

## 骨髓间质干细胞对大鼠移植物抗宿主效应和脾脏结构的影响

雷俊霞<sup>1,3</sup>, 郭振宇<sup>2</sup>, 赵东长<sup>4</sup>, 温冠媚<sup>5</sup>, 张秀明<sup>3</sup>, 郑芹<sup>1</sup>, 李树浓<sup>3</sup>, 项鹏<sup>3</sup>  
(中山大学 1. 中山医学院病理生理教研室, 2. 附属第五医院器官移植科, 3. 干细胞中心, 广东 广州 510080;  
4. 广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 510010; 5. 广州医学院病生教研室, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨骨髓间质干细胞(MSC)对同种大鼠骨髓移植后移植物抗宿主反应(GVHD)的影响,尤其是 MSC 对脾脏结构重建的作用。【方法】建立 Fischer344 (RT-1A1) 大鼠至 Wistar(RT-1Au)大鼠的同种异体骨髓移植模型,观察移植后大鼠的基本生活情况,病理学分析靶器官皮肤、肝脏、肠道和脾脏的组织学改变,尤其注意 MSC 对同种骨髓移植后脾脏结构重建的影响。【结果】①在移植后 30 d 的观察期内,共移植组显示较高的生存率。②组织学分析显示:在共移植组,靶器官皮肤、肝脏、肠道的损伤相对较轻。③脾脏组织学分析显示:在骨髓与 MSC 共移植组,受体脾脏结构接近正常;在单纯骨髓移植组,受体脾脏白髓萎缩,动脉周围淋巴鞘只有少量 T 细胞,无典型脾小结形成。【结论】MSC 与骨髓共移植对 GVHD 有抑制作用,并显著促进脾脏结构重建。

**关键词:** 间质干细胞; 骨髓移植; 移植物抗宿主; 脾脏

中图分类号: R338.8 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)06-0680-04

## Influence of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cotransplanted with Bone Marrow to Severity of Graft vs Host Disease and Splenic Architecture

LEI Jun-xia<sup>1,3</sup>, GUO Zhen-yu<sup>2</sup>, ZHAO Dong-chang<sup>4</sup>, WEN Guan-mei<sup>5</sup>, ZHANG Xiu-ming<sup>3</sup>,  
ZHENG Qin<sup>1</sup>, LI Shu-nong<sup>3</sup>, XIANG Peng<sup>3</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. The Fifth Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Zhuhai 519000, China; 3. Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 4. Department of Pediatrics, Guangdong Province Maternal and Children's Hospital, Guangzhou 510010, China; 5. Department of Pathophysiology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of mesenchymal stem cells (MSC) on severity of graft vs host disease (GVHD) after allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT), especially on structural remodeling of spleen which was known as important peripheral immune organ and the GVHD target organ. 【Method】 BMT model from Fischer344 rats (RT-1A1) to Wistar rats (RT-1Au) was established. The rats' basic living conditions and the pathological changes of target organs such as the skin, the liver and the intestinal tract, as well as the reconstitution of splenic architecture especially were analyzed. 【Results】 It was demonstrated that the cotransplantation group had a higher survival rate at 30 days posttransplant. The histology analysis showed that the skin, the liver, and intestinal tract in cotransplantation group were damaged relatively slightly. By histologic analysis, the spleens from cotransplantation group appeared nearly structural normal, with well-developed red and white pulp; while the spleens from BM transplantation group were atrophic, containing less T cells forming periarteriolar lymphoid sheaths (PALS),

收稿日期: 2008-05-06

基金项目: 广东省自然科学基金(05300604)

作者简介: 雷俊霞(1970-),女,河南洛阳人,医学博士,讲师,E-mail:leijx@mail.sysu.edu.cn;项鹏,通讯作者,医学博士,教授,E-mail:xiangp@mail.sysu.edu.cn

without distinct follicles. 【Conclusions】 Cotransplantation of MSC and the bone marrow could suppress GVHD, and remarkably promote reconstitution of splenic architecture.

**Key words:** bone marrow transplantation; mesenchymal stem cell; GVHD; spleen

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(6): 680-683, 715]

骨髓间质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 具有明显的造血支持作用以及多向分化潜能<sup>[1-5]</sup>。近来 MSC 还被发现具有突出的免疫调节作用。MSC 低表达 MHC-I 类分子, 通常不表达 MHC-II 类分子, 不表达共刺激分子以及不能激发同种淋巴细胞的增殖反应, 因此 MSC 被认为具有低免疫原性, 这一特点使 MSC 的应用可能跨越“同种障碍”变得更为广泛。此外 MSC 还具有特殊的免疫调节效应, 体外实验表明 MSC 可抑制丝裂原和同种抗原诱导的 T 细胞增殖, 而且这种抑制不受 MSC、刺激细胞和反应细胞之间的 MHC 限制; 抑制专职抗原递呈细胞的成熟以及功能发挥; 抑制 B 细胞的增殖和趋化作用; 抑制静止状态 NK 细胞的活化增殖, 而对激活的 NK 细胞的抑制相对较弱<sup>[6,7]</sup>。但是同大量详尽的 MSC 体外研究相比, MSC 的体内免疫调节机制并未阐明, 部分 I 期临床虽然提示 MSC 可促进造血重建并抑制 GVHD, 但毕竟仅限于个别病例报道和有限的资料分析<sup>[6-11]</sup>, 而且有的报道也未明确 MSC 的治疗意义<sup>[12]</sup>, 可见 MSC 治疗效果不稳定且临床没有足够的指标可以对此作出解释, MSC 能否在临床推广应用, 如何制定安全有效的治疗方案, 促使我们必须对其体内免疫调节机制进一步探讨。在前期研究中, 通过流式细胞术和免疫功能检测, 分析发现 MSC 促进同种骨髓移植后免疫功能恢复。由于脾脏作为重要的外周免疫器官和 GVHD 攻击的靶器官, 本研究则进一步分析 MSC 对骨髓移植后脾脏结构重建的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

Fischer344 (RT-1A1)、Wistar (RT-1Au) 大鼠, 6~8 周龄, 中山大学药学院实验动物中心提供。

### 1.2 试 剂

DMEM-LG (GibcoBRL, Grand Island, NY), GLUTAMAX I (Gibco BRL, Paisley, United Kingdom), 100 ml/L 胎牛血清 (FCS), 100 U/mL 青霉

素和 100 μg/mL 链霉素 (Gibco BRL)。

### 1.3 MSC 的分离、扩增及鉴定

按本室常规方法操作<sup>[13]</sup>。收获大鼠股骨骨髓, 贴壁培养, 经反复换液、弃悬浮细胞, 待细胞传至第 5 代时, 可获得纯的骨髓 MSCs。选择 P5~P10 代的细胞, 用流式细胞技术分析细胞表面标记并进行成脂、成骨样细胞诱导鉴定。

### 1.4 大鼠 MSC 对同种异体骨髓移植后 GVHD 的影响

1.4.1 供者大鼠的骨髓细胞制备 取 6~8 周龄 Fischer344 (F344, RT-1A1) 雄性大鼠, 颈椎脱臼处死, 无菌条件下取出双侧股骨和腓骨, 用注射器吸取 RPMI-1640 培养基冲出骨髓腔中细胞, Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶解红细胞, 台盼蓝染色计算细胞活力和数目, 细胞活力应为 95% 以上, 调节细胞浓度为  $1 \times 10^8$  /mL。

1.4.2 受者大鼠预处理、分组 受者大鼠为体质量 180~200 g 的雌性 Wistar (RT-1Au) 大鼠, 移植前 3 d 开始饮用含庆大霉素 (320 mg/L) 和红霉素 (250 mg/L) 的饮用水。移植当天采用 <sup>60</sup>Coγ 射线全身照射法进行预处理。照射剂量为 8.5 Gy, 剂量率为 0.7 Gy/min。照射后 6 h 内, 经腹股沟静脉移植供体 MSC ( $5 \times 10^6$ ) 和/或骨髓细胞 ( $0.8 \times 10^8$ )。分组如下: A 组 (单纯骨髓移植组), 每只大鼠移植  $0.8 \times 10^8$  个骨髓细胞; B 组 (BM 与 MSC 共移植组), 每只大鼠移植 ( $0.8 \times 10^8$  个骨髓细胞 +  $5 \times 10^6$  个 MSC); C 组 (单纯照射组), 预处理后不移植细胞, 在股静脉注射等量的生理盐水。每组 10 只大鼠, 移植后 30 d 取材。

1.4.3 MSC 与骨髓共移植对 GVHD 的影响 每日观察大鼠的活动、饮食、大小便、皮毛等情况。移植后 30 d 取大鼠的皮肤、肝脏、脾脏、肠, 40 g/L 多聚甲醛固定后, 常规切片, HE 染色, 观察其组织学病理改变。GVHD 的病理表现及评分标准: ①肠道, 单个腺泡细胞坏死, 固有层炎症细胞浸润, 甚至整个腺泡缺失, 最严重的为表皮剥脱; ②肝脏, 汇管区淋巴细胞浸润, 胆管上皮细胞凋亡, 脉管内皮炎, 实质细胞凋亡; ③皮肤, 基底细胞

空泡变性或坏死;角化异常,表皮与真皮间出现裂隙,更严重的可有表皮层的缺失。

由于肝脏是 GVHD 时常见被累及的器官,参照相关标准<sup>[14]</sup>,进一步对肝脏进行 GVHD 组织学评分,由病理师在未知分组的前提下进行评分:0分,正常;0.5分,局灶轻微损伤;1分,轻度局灶病变;2分,轻度广泛病变;3分,中度广泛病变;4分,严重的弥漫性病变。

1.4.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件, Mann-Whitney test 分析组织学评分,以  $P < 0.05$  作为显著性差异的检验水准。

## 2 结 果

### 2.1 移植大鼠的一般情况

单纯照射组大鼠在预处理后的 2 周内全部死亡,骨髓病理表明死于造血衰竭。骨髓移植组在 30 d 的观察期内有 3 只死亡,该组大鼠虽未见严

重腹泻,但移植后 1 月受体头背部、腹部可见明显脱毛现象。骨髓与 MSC 共移植组在第 26 天不明原因死亡 1 只,在观察期内未见明显脱毛现象。

### 2.2 MSC 与 BM 共移植可减轻 GVHD 的严重程度

移植后 30 d,骨髓移植组皮肤有 2 只出现中度 GVHD 损伤,表皮角化异常,基底细胞空泡变性,表皮与真皮间有裂隙,其余呈现轻度 GVHD(图 1A);骨髓与 MSC 共移植组仅有一只显示轻度 GVHD。骨髓移植组肝脏可见肝细胞水肿变性,汇管区淋巴细胞浸润,胆管细胞变性(图 1B);骨髓与 MSC 共移植组仅见肝细胞浊肿,汇管区少许淋巴细胞浸润。进一步对肝脏进行 GVHD 组织学评分,结果显示骨髓移植组与共移植组分别为  $1.43 \pm 0.29$ 、 $0.56 \pm 0.18$  ( $P < 0.01$ )。肠道 GVHD 的出现通常是严重 GVHD 的表现,在 BM 组有一只肠道可见腺泡细胞坏死,固有层炎症细胞明显浸润(图 1C);而 MSC 与 BM 共移植组肠道未见明显异常。

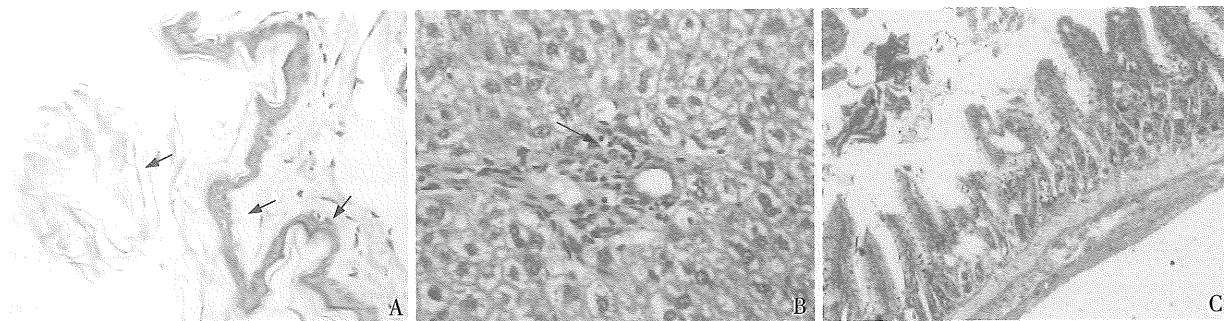


图 1 骨髓移植组大鼠肝脏、皮肤和肠道组织切片

Fig.1 Histology of rat liver, skin, and intestine from recipients of bone marrow transplantation group

30 days posttransplant; A: abnormal epidermal keratinization, interspersed edema of basement cells and fussure between epidermis and dermis (arrow),  $\times 400$ ; B: prominent portal lymphocytic infiltrates and injury to the bile duct in livers from BM transplantation rats (arrow),  $\times 400$ ; C: necrosis of intestinal crypt, HE staining,  $\times 100$

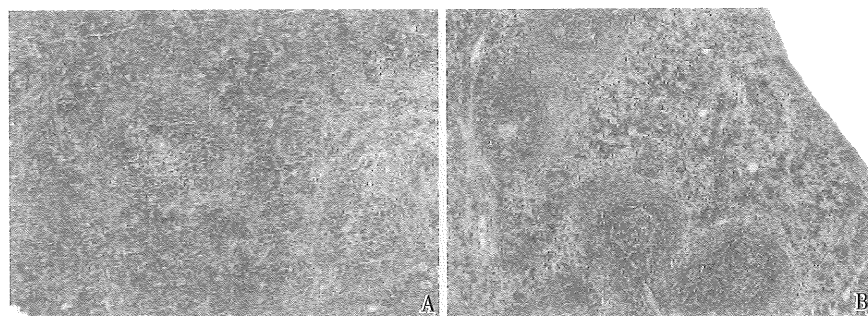


图 2 大鼠脾脏组织切片

Fig.2 Histology of rat spleen

Spleen harvested at day 30 from rats of cotransplantation groups revealed near normal splenic architecture, with well-developed red and white pulp (B), while spleens from BM transplantation rats showed atrophic white pulp with lymphocytes forming periarteriolar lymphatic sheaths (A), HE staining,  $\times 100$

### 2.3 MSC与骨髓共移植对脾脏结构重建的影响

在骨髓与MSC共移植组,受体脾脏结构接近正常,红髓和白髓发育良好;在单纯骨髓移植组,受体脾脏白髓萎缩,动脉周围淋巴鞘只有少量T细胞,无典型脾小结形成(图2)。

## 3 讨论

间质干细胞具有显著的免疫调节作用。体外实验表明MSC可明显抑制同种抗原诱导的T细胞增殖反应,并被试用于同种造血干细胞移植后移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的治疗。有认为MSC可减轻同种造血干细胞移植后严重GVHD症状,尤其是改善对常规免疫抑制剂抗性的严重GVHD<sup>[6-11]</sup>,但是也有报道并未肯定MSC的治疗意义<sup>[12]</sup>,可见MSC治疗效果不稳定且临床没有足够的指标可以对此作出解释, MSC能否在临床推广应用,如何制定安全有效的治疗方案,促使我们必须对其体内免疫调节机制进一步探讨。在前期工作中,我们着重分析了MSC对同种骨髓移植后造血重建和免疫功能恢复的促进作用<sup>[15]</sup>,本研究进一步分析MSC对同种骨髓移植后GVHD攻击的靶器官的结构影响,尤其是对骨髓移植后脾脏结构重建的影响。结果发现, MSC可明显抑制GVHD发生时对靶器官的损伤并促进脾脏结构重建。脾脏作为重要的外周免疫器官,其结构的恢复进一步支持MSC对免疫功能重建的促进作用,这一结果提示MSC对同种骨髓移植后免疫重建困难而引起的严重感染也有一定作用。

最近有报道还发现<sup>[16]</sup>,虽然第3体来源MSC可显著抑制同种T细胞增殖,但是对EBV和CMV诱导的外周血特异T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 产生并无明显影响,也不抑制EBV和CMV病毒特异性CTL对靶细胞的杀伤力。进一步通过体内研究也发现由于严重GVHD而接受MSC治疗的患者,其体内依然保留一定数量和功能的CMV特异性T细胞。可见MSC对同种抗原和病毒特异性T细胞反应的影响明显不同。上述结果均提示, MSC在用于GVHD的治疗时,似乎并不影响机体的特异抗感染力,并可能由于免疫器官和细胞的尽快恢复而提高其抵抗力。

尽管如此,从MSC的免疫抑制作用被发现,并被试用于GVHD的治疗,始终围绕人们的问题

就是:MSC在抑制GVHD的同时,是否容易招致肿瘤复发?显然上述研究结果或相关研究还不能对此疑问作出解释。体外实验发现MSC可通过与T、B、NK以及抗原递呈细胞间的作用发挥免疫抑制效应。一些可溶性因子,如HGF、PGE2、TGF- $\beta$ 1、IDO、NO、IL-10等可能参与MSC的免疫抑制作用,此外,一些细胞接触依赖因素也可能涉及<sup>[17,18]</sup>。但是在荷瘤背景下, MSC对瘤细胞增殖的量效和时效关系仍需进一步探讨。

由于MSC易于获得和体外扩增,体外显著的免疫抑制效应和部分体内实验的结果支持,因此最近已见MSC用于临床的报道。初步病例分析显示MSC无明显毒副作用,并可改善对常规免疫抑制剂抗性的严重GVHD症状<sup>[10]</sup>。而MSC能否在临床推广应用,如何制订安全有效的治疗方案,促使我们必须在理想的动物模型对MSC的体内免疫调节机制进一步阐明。

### 参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [2] Wu GD, Tuan TL, Bowditch ME, et al. Evidence for recipient derived fibroblast recruitment and activation during the development of chronic cardiac allograft rejection [J]. *Transplantation*, 2003, 76(3):609-614.
- [3] Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(3):1142-1147.
- [4] 王亚柱,邓宇斌,甘丹卉,等.大鼠骨髓间质干细胞定向分化为神经元的实验研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29(4):383-387, 392.
- [5] 陈欣欣,张镜芳,曹勇,等.体外定向诱导人骨髓间质干细胞分化为内皮样细胞[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(3s):124-127.
- [6] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4):1815-1822.
- [7] Frassoni FLM, Bacigalupo A, Gluckman E, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease: a