

非清髓性干细胞移植治疗狼疮鼠

李娟¹, 尹培达¹, 罗绍凯², 郭长占³, 熊文杰²

(中山大学 1. 附属第一医院肾内科, 2. 血液科, 广东 广州 510080; 3. 北京大学免疫学系, 北京 100083)

摘要:【目的】探索用非清髓性干细胞移植治疗 BXSB 狼疮鼠的有效性及安全性。【方法】实验组用氟啶拉宾、环磷酰胺作预处理, 对照组用马利兰+环磷酰胺作预处理, 动态观察两组外周血细胞变化, 流式细胞仪检测移植后受者 CD₃⁻CD₅⁺、CD₃⁺CD₅⁺ 的改变, 聚合酶链反应-短串联重复序列分析移植后 BXSB 鼠嵌合状态, 免疫荧光法检测移植前后受者的肾病理变化。【结果】实验组白细胞、血小板、血红蛋白下降最低值分别为 $(0.6 \pm 0.2) \times 10^9/L$ 、 $(27.0 \pm 7.6) \times 10^9/L$ 、 $(48.0 \pm 1.2) g/L$, 均分别高于对照组 (P 均 < 0.05), 白细胞上升至 $1.0 \times 10^9/L$ 的时间在实验组为 $(17.5 \pm 6.3) d$ 比对照组明显缩短 ($P < 0.05$), 尿蛋白减少, 抗 ds-DNA 抗体转阴, 肾免疫荧光减少在两组间差别无显著性 (P 均 > 0.05), 移植后 8 周实验组 CD₃⁻CD₅⁺、CD₃⁺CD₅⁺ 开始上升, 出血、体质量下降、肺部感染发生率、死亡率实验组明显低于对照组 (P 均 < 0.05), 移植 30 d 后实验组 DNA 指纹图提示为混合嵌合体。【结论】非清髓性干细胞移植可有效改善 BXSB 鼠狼疮表现, 该方法抑制骨髓的功能较弱, 造血恢复较快, 与移植相关的并发症、死亡率发生率低, 是一种较安全、有效的治疗狼疮鼠的方法。

关键词: 红斑狼疮, 系统性; 干细胞移植, 非清髓性; 造血重建; 免疫重建

中图分类号: R730

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)03-0173-03

Treatment of BXSB with Nonablative Stem Cell Transplantation LI Juan¹, YIN Pei-da¹, LUO Shao-kai², GUO Chang-zhan³, XIONG Wen-jie². (1. Institute of Kidney, 2. Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 3. Department of immunity, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effectiveness and safety of nonablative stem cell transplantation (NST) on the treatment of BXSB lupus mice. 【Methods】The experimental group (group of NST) was pretreated with fludarabine and cyclophosphamide, while the control group (Allo-SCT) was pretreated with myleran and cyclophosphamide. Peripheral blood cells were observed, CD₃⁻CD₅⁺ and CD₃⁺CD₅⁺ of recipients were measured by flow cytometry. Recipients' mixed chimerism were analyzed with polymerase chain reaction-short tandem repeat and recipients' kidney pathological changes were examined with direct immunofluorescence after transplantation. 【Results】The lowest values of WBC, PLT and Hb fall in the NST group were $(0.6 \pm 0.2) \times 10^9/L$, $(27.0 \pm 7.6) \times 10^9/L$ and $(48.0 \pm 1.2) g/L$, respectively. They were all higher than those of the control group (P all < 0.05). The time for WBC rising from the lowest value to $1.0 \times 10^9/L$ were 17.5 ± 6.3 days in the NST group, which was shorter than that in the control group ($P < 0.05$). There were no statistically significant difference in the reduction of urinary excretion of proteins, change of anti-dsDNA and reduction of kidney immunofluorescence between the two groups (P all > 0.05). Early immune reconstitution began to recover 8 weeks after transplantation in the NST group. The incidences of bleeding, loss of body weight, pneumonia and mortality related to transplantation were lower in the NST group than those in the control group (P all < 0.05). Recipients' mixed chimerism in the NST group appeared 30 days after transplantation. 【Conclusion】NST can improve all manifestations of lupus mice effectively. NST show less suppression to bone marrow function. Hematopoietic function recovers faster with NST than with Allo-SCT. Incidences of complications and mortality related to transplantation in the NST group are lower than that in the Allo-SCT group. NST is a safe and effective method for the treatment of lupus mice.

Key words: lupus erythematosus, systemic; stem cell transplantation, nonablative; hematopoietic reconstitution; immune reconstitution

目前,人们对系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus SLE)的发病机制有了新的认识,认为SLE可能是造血干细胞异常所致的疾病^[1,2]。对重症SLE患者应用造血干细胞移植(简称干

胞移植)(stem cell transplantation, SCT)治疗已在 国外受到广泛关注,用异基因 SCT (allogeneic-SCT, Allo-SCT)治疗 SLE 是用供体正常造血干细胞来重建患者的免疫系统,从而达到根治 SLE 的

收稿日期: 2001-12-11

基金项目: 广东省科委重点攻关基金资助项目(9827820)

作者简介: 李娟(1963-),女,广东五华人,博士生,副教授

目的; 自体干细胞移植 (autologous- SCT, Auto-SCT) 也可达到重建免疫系统的目的, 相对 SLE 的常规治疗具有较彻底、远期副作用少^[3]。但 Allo-SCT 相关的并发症的发生率、死亡率高, 而使该方法在临床上应用受限。Auto-SCT 治疗 SLE 最终不可避免会复发^[4], 因此, 临床上有必要寻找安全、有效的移植方法治疗重型 SLE。我们用一种新的移植方法—非清髓性干细胞移植 (nonablative stem cell transplantation, NST) 治疗狼疮鼠, 旨在探讨该方法的安全性、有效性。

1 材料和方法

1.1 BXSB 狼疮小鼠、C57BL/6 小鼠

北京大学免疫学教研组提供 5 月龄雄性 BXSB 狼疮小鼠 44 只, 随机分为实验组和对照组, 实验组用 NST 方法治疗, 对照组用 Allo-SCT 方法治疗。实验组鼠体质量 (23.2 ± 3.6) g, 对照组鼠体质量 (24.4 ± 5.6) g, 两组差异无显著性 ($P > 0.05$)。取相同遗传背景的正常小鼠 C57BL/6 作供体 (北京大学免疫学教研组提供)。

1.2 供者外周血干细胞动员、采集、处理

供者用小鼠粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) (深圳晶美生物工程有限公司提供) 按 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 尾静脉注入, 连续 3 d, 第 4 天从眶静脉取血 $0.5 \sim 0.9$ mL, 平均 (0.7 ± 0.2) mL, 用混合液 ($\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Tris HCl}$) 破坏红细胞, 计算外周血单个核细胞数。

1.3 BXSB 鼠预处理

实验组预处理方案参照美国 M. D. Anderson^[5] 的非清髓性方案: Fludarabine 每天 1 次, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注入 ($-7 \text{ d}, -6 \text{ d}, -5 \text{ d}$), 环磷酰胺 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注入, 每天 1 次 ($-4 \text{ d}, -3 \text{ d}, -2 \text{ d}$)。对照组采用传统的清髓性方案^[6]: 马利兰 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 口饲 ($-8 \text{ d}, -7 \text{ d}, -6 \text{ d}, -5 \text{ d}$), 环磷酰胺 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注入, 每天 1 次 ($-4 \text{ d}, -3 \text{ d}, -2 \text{ d}$)。

1.4 BXSB 鼠输入供者异基因外周血干细胞

供者 C57BL/6 异基因外周血造血干细胞采集后即从尾静脉持续注入受者体内。

1.5 移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 的预防

两组均进行 GVHD 预防, 环孢菌素 A $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注入, 20 d 后改为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 口饲。

甲氨蝶呤于 $+1 \text{ d}$ $0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $+3, +6, +11 \text{ d}$ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注入。

1.6 GVHD 的观察

定期观察移植后小鼠的皮肤、肝功能、腹泻、全身一般状况, 急性 GVHD 的程度按美国西雅图 Fred Hutchinson 肿瘤所的分级法。

1.7 细胞因子的应用

用小鼠 G-CSF $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 尾静脉注入, 自白细胞低于 $1.0 \times 10^9/\text{L}$ 起开始, 直至白细胞上升至 $1.0 \times 10^9/\text{L}$ 止。

1.8 免疫表型分析

用流式细胞仪分析细胞表面标记, 用鼠的单克隆抗体 CD_{34} 、 CD_3 、 CD_5 检测供者 CD_{34}^+ 含量、移植后受者 T 细胞亚群的变化。

1.9 粒-巨噬细胞集落形成单位 (colony forming unit- granulocyte macrophage, GM-CFU) 培养

用甲基纤维素半固体培养法培养供者的 GM-CFU。GM-CFU 培养按常规方法进行。

1.10 DNA 指纹图检测

用聚合酶链反应-短串联重复序列对移植后 BXSB 小鼠嵌合状态进行分析。

1.11 肾脏直接法免疫荧光 (IgG) 检查

冰冻切片制成后滴加羊抗小鼠 IgG-FITC (Santa Cruz 公司产品) 单抗于玻片上, 玻片稍干后甘油封片, 在荧光显微镜下观察肾脏免疫荧光强度。

2 结果

2.1 供者外周血干细胞动员效果

供者 C57BL/6 经 G-CSF 动员 3 d 后, 外周血单个核细胞 (2.2 ± 0.4) $\times 10^8 \text{ kg}^{-1}$ 、 CD_{34}^+ (2.4 ± 0.3) $\times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ 、CFU-GM (2.6 ± 1.3) $\times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ 。

2.2 骨髓抑制及造血功能恢复

NST 组白细胞 (0.6 ± 0.2) $\times 10^9/\text{L}$ 、血小板 (27.0 ± 7.6) $\times 10^9/\text{L}$ 、血红蛋白下降至最低值 (48.0 ± 1.2) g/L、白细胞上升至 $1.0 \times 10^9/\text{L}$ 所需时间 (17.5 ± 6.3) d; 与对照组的 (0.2 ± 0.1) $\times 10^9/\text{L}$ 、(8.0 ± 4.2) $\times 10^9/\text{L}$ 、(23.0 ± 0.4) g/L、(33.5 ± 12.8) d 比较, P 均 < 0.05 。

2.3 植入的证据

NST 移植后第 30 天用 DNA 指纹图检查, 提示为混合嵌合体 DNA 指纹图, 见图 1。

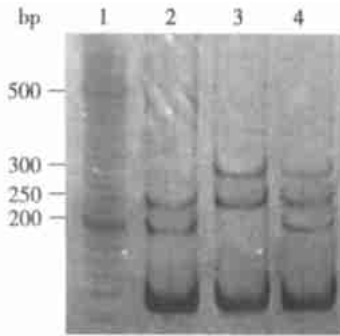


图1 NST 30 d 后受者 DNA 指纹图改变

Fig 1 DNA genetic map of the mouse after NST 30 days

1: Marker, 2: Doner's DNA lines gram, 3: Recipient' DNA lines gram pre-transplantation, 4: Recipient' DNA lines gram post-transplantation(mixed chimerism)

2.4 与 SLE 疗效相关的指标

检查与 SLE 疗效相关的指标, NST 组有 20 例尿蛋白从 +++ → + 或 ±, 占 91% (20/22), 抗 dsDNA 抗体转阴有 16 例, 占 73% (16/22), 对照组尿蛋白从 +++ → + 或 ±, 占 95% (21/22), 抗 dsDNA 抗体转阴有 12 例, 占 55% (12/22), 两组比较, 差别均无显著性 (P 均 > 0.05), 两组肾的直接免疫荧光强度均有减少。

2.5 GVHD 发生率

实验组发生 I 度急性 GVHD 2 例, 占 9%, 对照组 I 度急性 GVHD 3 例, 占 14%, 两者差异无显著性 ($P > 0.05$)。两组均未发生 II 度以上的 GVHD。

2.6 移植后早期免疫功能重建情况

移植前 NST 组 $CD_3^- CD_5^+$ 、 $CD_3^+ CD_5^+$ T 细胞亚群为 $5.6\% \pm 3.8\%$ 、 $31.8\% \pm 11.5\%$, 移植后第 4 周 $CD_3^- CD_5^+$ 、 $CD_3^+ CD_5^+$ 为 $3.5\% \pm 2.4\%$ 、 $21.3\% \pm 13.7\%$, 移植后第 8 周 $CD_3^- CD_5^+$ 、 $CD_3^+ CD_5^+$ 为 $6.6\% \pm 5.3\%$ 、 $34.8\% \pm 21.9\%$ 。移植前对照组 $CD_3^- CD_5^+$ 、 $CD_3^+ CD_5^+$ T 细胞亚群为 $5.7\% \pm 4.2\%$ 、 $34.2\% \pm 17.2\%$, 移植后第 4 周 $CD_3^- CD_5^+$ 、 $CD_3^+ CD_5^+$ 为 $2.8\% \pm 1.3\%$ 、 $24.1\% \pm 18.2\%$, 移植后第 8 周 $CD_3^- CD_5^+$ 、 $CD_3^+ CD_5^+$ 为 $3.5\% \pm 2.4\%$ 、 $21.2\% \pm 10.9\%$ 。

2.7 其它并发症观察

出血、体质量下降 (10% 以上)、肺部感染、死亡率的发生率在 NST 组分别为 5% (1/22)、14% (3/22)、9% (2/22)、23% (5/22), 均低于对照组的 37% (8/22)、41% (9/22)、36% (8/22)、50% (11/22) (P 均 < 0.05)。

3 讨论

NST 是在总结了以往传统移植方案机理和疗效的基础上采取免疫诱导受者对供体组织的耐受, 使后者在前者体内相容并发挥植入免疫细胞的功能, 从而达到纠正和攻击受体病变细胞的新尝试^[7]。其作用特点: ①用非骨髓清除性预处理, 产生免疫耐受, 使移植植物植入, 导致移植植物和宿主之间的双向耐受, 形成混合嵌合体, 这种混合嵌合体不增加 GVHD 发生但有明显的抗病理效应细胞的效应, 可以减少疾病复发; ②预处理通过相对较低放、化疗剂量, 使移植相关的并发症少, 病死率低; ③宿主尚存一部分造血干细胞, 外周血功能细胞不会太低, 感染、出血机会较少; ④通过 NST 后的患者即使复发, 反复供者淋巴细胞输注 (donor lymphocyte infusion, DLI) 可再次得到缓解。因此, NST 是一种既保留移植植物抗病变细胞效应, 预防疾病复发, 又无严重并发症和高的移植相关死亡率的安全可靠的移植方法。

本实验结果表明, 本课题所用的预处理方案和方法在移植 30 d 时可形成混合嵌合体, 达到 NST 的要求。用 NST 治疗狼疮鼠, 可纠正大量蛋白尿, 抗 ds-DNA 抗体转阴, 改善肾的狼疮病变, 取得与 Allo-SCT 相当的疗效, 但 NST 抑制骨髓的功能明显低于 Allo-SCT, 造血恢复时间明显比 Allo-SCT 缩短, 与移植相关的并发症如出血、体质量下降、肺部感染等发生率明显低于 Allo-SCT, 死亡率大大降低, 而急性 GVHD 反应并不比 Allo-SCT 的严重。由于骨髓抑制期缩短, 相应治疗费用减少, 因此 NST 是一种较安全、有效的治疗狼疮鼠的方法。有关 NST 治疗 SLE 长期疗效和慢性 GVHD 发生率有待于本课题继续观察。

造血干细胞移植后免疫功能重建是一个相当漫长的过程, $CD_3^- CD_5^+$ 细胞是早期胸腺细胞的标志^[8], $CD_3^+ CD_5^+$ 属于成熟 T 细胞, 这些细胞可以在异基因造血干细胞移植后早期恢复, 而 B、T 细胞的其它标志细胞及其功能恢复大多需 1 年或更长时间, 我们检测 $CD_3^- CD_5^+$ 和 $CD_3^+ CD_5^+$, 初步了解 NST 后 BXSB 小鼠的免疫功能重建情况, 发现 NST 后 $CD_3^- CD_5^+$ 和 $CD_3^+ CD_5^+$ 在移植后第 8 周开始恢复, 而 Allo-SCT 后第 8 周 $CD_3^- CD_5^+$ 和 $CD_3^+ CD_5^+$ 仍低于移植前, 表明 NST 有可能较 Allo-SCT 较快重建免疫系统。

(下转第 196 页 to page 196)

管重塑和病理性血管重塑^[4,5]。病理性血管重塑定义为随着粥样硬化病变的进展,动脉失去扩张能力,甚至呈现收缩状态^[1]。Mintz等^[2]观察到病理性血管重塑发生于PTCA术后1个月至6个月之间,与再狭窄的发病高峰期相同,并认为75%的血管腔径丧失源于病理性血管重塑,血管内超声亦发现PTCA术后出现血管外膜收缩,血管横截面积降低。

血管重塑成为关注焦点,但其机制尚不明确。PCNA是一种核内蛋白质,在静止期细胞中含量极少,G1晚期开始增加,相关研究证实支架植入后血管壁PCNA表达上调,可作为评价细胞增殖状态的指标^[6]。本研究采用免疫组化技术标记PCNA,观察到动脉损伤后早期即出现血管外膜细胞增殖活性的升高和细胞数量的增加,血管外膜厚度亦显著增加,提示血管外膜改变在血管修复过程可能起到始动环节的作用。Libby等^[7]发现动脉损伤后24h开始血管外膜细胞摄取BrdU(5-溴-2-脱氧尿嘧啶)增多,提示DNA合成增加,细胞增殖活跃,免疫组化染色显示增殖细胞为非平滑肌细胞。因此,可以设想,如果PTCA术中损伤动脉壁,撕裂中膜,甚至暴露外膜,通过内皮细胞或其它细胞释放各种细胞因子、趋化因子和生长因子,促使外膜细胞增殖,并通过一定机制使细胞外基质和收缩蛋白合成增加,致血管外膜增厚并收缩,构成病理性血管重塑

的可能机制。

本研究显示:血管外膜在血管修复过程中起着一定作用,外膜细胞的增殖、分化和迁徙可能参与血管再狭窄的形成,但主要细胞是否来源和动态变化尚有待于进一步研究。

(本文图1见封4 Fig.1 Shown in back cover)

参考文献:

- [1] Glagov S, Weisenberg E, Zarins C K, *et al.* Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316(22): 1371.
- [2] Mintz G S, Popma J J, Pichard A D, *et al.* Arterial remodeling after coronary angioplasty: A serial intravascular ultrasound study [J]. *Circulation*, 1996, 94(1): 35.
- [3] Lansky A J, Mintz G S, Popma J J, *et al.* Remodeling after directional coronary atherectomy: A serial angiographic and intravascular ultrasound analysis from the optimal atherectomy restenosis study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32(2): 329.
- [4] Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, *et al.* Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy [J]. *Circulation*, 1997, 96(2): 475.
- [5] Tardif J C, Cote G, Lesperance J, *et al.* Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(6): 365.
- [6] 刘英梅, 张旭明, 伍卫, 等. 支架植入对兔血管平滑肌细胞PCNA和Cyclin E表达及细胞凋亡的影响[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(3): 180.
- [7] Libby P, Tanaka H. The molecular bases of restenosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1997, 40(2): 97.

(编辑 刘清海)

(上接第175页 from page 175)

参考文献:

- [1] Ikehara S, Good R A, Nakamura T, *et al.* Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(12): 2483.
- [2] Jacobs P, Vincent M D, Martell R W. Prolonged remission of severe refractory rheumatoid arthritis following allogeneic bone marrow transplant [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1986, 1(1): 237.
- [3] Marmont A M. Stem cell transplantation for severe autoimmune disease: progress and problems [J]. *Haematologica*, 1998, 83(8): 733.
- [4] Ikehara S. Bone marrow transplantation for autoimmune disease [J]. *Acta Haematol*, 1998, 99(3): 116.

- [5] Khoufi I, Lee M S, Palmer L, *et al.* Transplant-lite using fludarabine-cyclophosphamide and allogeneic stem cell transplantation for low grade lymphoma [J]. *Blood*, 1999, 94(3): 1553.
- [6] Thomas E D. Bone marrow transplantation for malignant disease [J]. *J Clin Oncol*, 1983, 1(1): 517.
- [7] Storb R, Yu C, Sandmaier B, *et al.* Mixed hematopoietic chimerism after hematopoietic stem cell allografts [J]. *Transplantation Proceedings*, 1999, 31(2): 677.
- [8] Keever C A, Small T N, Flomenberg N, *et al.* Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts [J]. *Blood*, 1989, 73(6): 1340.

(编辑 黄小延)