

· 论 著 ·

自然杀伤细胞对小鼠异基因骨髓移植中移植物抗宿主病效应的影响

杨志刚^{1,2}, 曾耀英^{1*}, 王 通¹, 江 逊¹, 王 青¹

(1. 暨南大学组织移植与免疫学教育部重点实验室, 广州 510632; 2. 广东医学院附属医院, 湛江 524001)

[摘要] **目的:** 研究自然杀伤细胞(NK)在异基因骨髓移植中对移植物抗宿主病(GVHD)的影响。**方法:** 以近交系小鼠 C57BL/6 (H-2^b) 为供鼠、BALB/c (H-2^d) 为受鼠, 在移植物中增加供者的外周 T 细胞和(或)NK 细胞进行异基因骨髓移植, 根据临床表现和病理检查, 比较不同移植组的存活率和 GVHD 发生情况。**结果:** 增加 1×10^6 供鼠 NK 细胞的移植组中 40% 小鼠出现 GVHD, 增加 2×10^6 供鼠 NK 细胞的移植组中仅 30% 出现 GVHD; 与单纯异基因骨髓移植组(80% 急性 GVHD、20% 慢性 GVHD)和骨髓+T 细胞组(100% 急性 GVHD)比较, GVHD 发生率显著下降($P < 0.01$), 30、60 和 120 d 存活率显著增高($P < 0.01$)。**结论:** 在小鼠异基因骨髓移植中, 同种异基因反应性 NK 细胞可抑制 GVHD 效应, 延长存活期。

[关键词] 自然杀伤细胞; 骨髓移植; 移植物抗宿主病

[中图分类号] R 392.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0267-04

Effect of NK cell on graft-versus-host disease in mouse allogeneic bone marrow transplantation

YANG Zhi-gang^{1,2}, ZENG Yao-ying^{1*}, WANG Tong¹, JIANG Xun¹, WANG Qing¹ (1. State Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China; 2. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of natural killer(NK)-cells on graft-versus-host disease(GVHD) in mouse allogeneic bone marrow transplantation. **Methods:** Lethally irradiated BALB/c(H-2^d) mice were transplanted with C57BL/6(H-2^b) bone marrow containing donor peripheral T cells and/or NK cells. GVHD and survival rates were studied by observing clinical manifestations and pathological changes. **Results:** In the group transplanted with NK cells, GVHD were induced only in 30% mice of 2×10^6 NK cells group and 40% of 1×10^6 NK cells group. The incidence of GVHD was evidently reduced and survival rates were significantly higher compared with 2 groups without NK cells infusion($P < 0.01$) (80% vs 20% and 80% vs 0 in 2×10^6 NK cells group, 70% vs 20% and 70% vs 0 in 1×10^6 NK cells group, $P < 0.01$). **Conclusion:** In mouse allogeneic bone marrow transplantation, alloreactive NK cells can reduce the incidence of GVHD and increase survival rates of mice.

[KEY WORDS] natural killer-cell; bone marrow transplantation; graft-versus-host disease

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 267-270]

自然杀伤细胞(NK)是机体重要的免疫细胞, 在抵抗肿瘤和感染方面起十分重要的作用。近年来的研究还发现, 在异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)中, NK 细胞可能发挥促进造血干细胞植入、抑制移植排斥、减轻移植物抗宿主病(GVHD)并增强抗肿瘤效应等作用, NK 细胞在 allo-HSCT 中的应用前景已引起学者们的高度关注^[1~4]。本实验在进行小鼠异基因骨髓移植(allo-BMT)同时, 输注一定数量的供鼠 NK 细胞, 研究 NK 细胞对 GVHD 的影响, 对 NK 细胞在临床 allo-HSCT 中的应用有一定的实际意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 Anti-mouse CD3-FITC、NK_{1.1}-PE 抗体购自 Bioscience 公司, 重组人白介素 2 (rhIL-2) 购自北京四环生物制药有限公司。RPMI 1640 培养液和胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.2 实验动物 移植受鼠: SPF 级 BALB/c (H-2^d) 雌性小鼠 60 只, 8~10 周龄, 体质量 18~20 g; 移植供鼠: 清洁级 C57BL/6 (H-2^b) 雄性小鼠 22 只, 10~11 周龄, 体质量约 20 g。均购自第一军医大学实验动物中心。

1.3 受鼠准备 全部受鼠在移植前 5 d 开始饮用含庆大霉素(32 万 U/L)+红霉素(250 mg/L)的灭菌水, 移植前 4 h 予⁶⁰Co γ 射线全身照射(TBI)。总剂量 8.5 Gy, 剂量率 0.5 Gy/min。

1.4 供鼠骨髓与外周 T 细胞的准备 断髓处死 20

[基金项目] 国家重点基础研究规划("973"计划)课题(G2000057006); 国家自然科学基金重点项目(30230350); 广东省"十五"重大科技专项(A302020204)。

[作者简介] 杨志刚(1966-), 男(汉族), 博士, 副主任医师。

E-mail: yangzhigangcn@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: ozms@jnu.edu.cn

只 C57BL/6 供鼠, 无菌分离股骨、胫骨与脾脏。剪去股骨与胫骨的骨髓端, 用注射器冲出骨髓腔内细胞, 裂解红细胞后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 计数备用; 脾脏于 200 目筛网上研磨滤过收集脾细胞, 用淋巴细胞分离液经密度梯度离心分离淋巴细胞, 再用尼龙毛除去 B 细胞, 即可获得外周 T 细胞^[5]。

1.5 供鼠 NK 细胞的体外培养扩增和分离 移植前 15 d 预先分离 2 只供鼠脾淋巴细胞 (方法同上), 置塑料培养瓶中加入刀豆蛋白 A (ConA) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后弃去贴壁细胞, 悬浮细胞加入 1 000 U/ml 的 rhIL-2 继续培养 14 d, 刺激 NK 细胞增殖并具有一定黏附性, 利用两步黏附分离法分离 NK 细胞, 所获细胞用 Anti-mouse CD3-FITC 和 Anti-mouse NK_{1.1}-PE 荧光单抗标记, 经流式细胞仪检测 CD3⁻ NK_{1.1}⁺ 细胞占 60.03%^[5], 按 CD3⁻ NK_{1.1}⁺ 细胞百分率计算, 计数 NK 细胞备用。

1.6 移植分组 按移植物的不同分为 6 组, 每组 10 只。全部受鼠在 TBI 后 4 h 经尾静脉注入移植物:

(1) 空白对照组: RPMI 1640 液 0.5 ml/只; (2) 骨髓细胞组: 供鼠骨髓细胞 1×10^7 /只; (3) 骨髓+T 细胞组: 供鼠骨髓细胞 1×10^7 + 外周 T 细胞 1×10^7 /只; (4) 骨髓+NK 细胞组: 供鼠骨髓细胞 1×10^7 + NK 细胞 1×10^6 /只; (5) 骨髓+T+NK 低浓度细胞组: 供鼠骨髓细胞 1×10^7 + 外周 T 细胞 1×10^7 + NK 细胞 1×10^6 /只; (6) 骨髓+T+NK 高浓度细胞组: 供鼠骨髓细胞 1×10^7 + 外周 T 细胞 1×10^7 + NK 细胞 2×10^6 /只。

1.7 观察指标 (1) 临床表现: 体质量、毛发、体位、大小便等; (2) 病理检查: 取死亡小鼠 (存活超过 120 d 者人为处死) 的皮肤、小肠及肝组织制作组织切片 (H-E 染色), 进行形态学检查; (3) 存活期: 计算各组 7、15、30、60 和 120 d 的存活率。

1.8 统计学处理 采用小样本生存时序检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 临床及病理表现 空白对照组无脱毛、弓背体位、腹泻等 GVHD 的临床表现, 移植后精神萎靡, 体质量逐渐减轻, 全部在 2 周内死亡。肝、小肠和皮肤病理检查未见异常 (图 1A、1B)。骨髓细胞组和骨髓+T 细胞组出现不同程度的毛发混乱、脱落, 弓背体位和腹泻等 GVHD 表现, 但两组出现典型急性 GVHD 表现 (如弓背体位) 的时间不同。其中骨髓+T 细胞组全部在移植后 5~14 d 内出现弓背体位表现; 而骨髓细胞组 80% (8/10) 小鼠在移植后 9~30 d 内出现弓背体位, 20% (2/10) 小鼠在移植后 30 d 内无明显急性 GVHD 表现, 移植后 60 d 出现瘙痒、脱毛等慢性 GVHD 表现, 但 1~2 周后逐渐恢复并长期存活超过 120 d (因观察存活期需要, 未作病理活检)。两组死亡小鼠的肝和小肠病理改变符合急性 GVHD 表现: 肝小叶结构不清, 肝细胞肿胀, 排列紊乱, 肝索变窄, 可见大量肝细胞嗜酸性变, 少数嗜酸小体, 汇管区炎细胞浸润 (图 1C); 小肠绒毛变短、变平, 部分上皮坏死脱落, 可见淋巴细胞浸润 (图 1D)。皮肤病理未见异常。骨髓+NK 细胞组和骨髓+T+NK 细胞组 (低浓度) 分别有 40% (4/10) 小鼠在移植后 14~36 d 出现弓背体位、腹泻等急性 GVHD 表现; 骨髓+T+NK 细胞 (高浓度) 组仅 30% (3/10) 小鼠在移植后 19~34 d 出现弓背体位。而且输注供鼠 NK 细胞的 3 组中各有 1 只小鼠急性 GVHD 表现较轻, 10 d 后恢复并长期存活, 急性 GVHD 发生率与骨髓细胞组和骨髓+T 细胞组相比明显降低 ($P < 0.01$), 全部无瘙痒、脱毛等慢性 GVHD 表现。出现 GVHD 表现的小鼠肝、小肠和皮肤的病理表现与异基因骨髓组相似, 其余无 GVHD 表现的则与空白对照组大致相同。

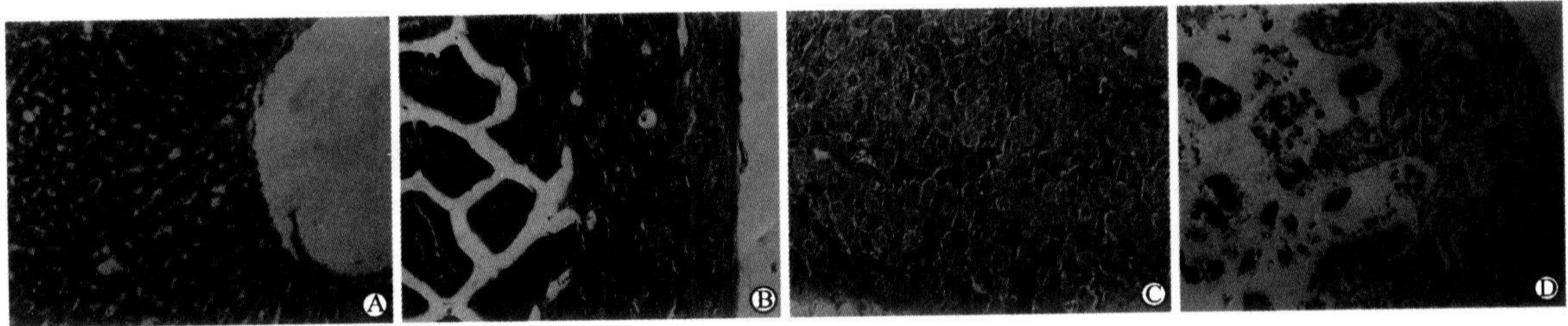


图 1 移植后小鼠肝脏和小肠的病理表现

Fig 1 Histological changes in liver and small intestine of mice after transplantation (H-E, $\times 200$)

A: Histological changes in liver of mice without GVHD in control group; B: Histological changes in small intestine of mice without GVHD in control group; C: Histological changes in liver of mice with GVHD in marrow cell group; D: Histological changes in small intestine of mice with GVHD in marrow cell group

2.2 存活率 各移植组不同时间点的存活率见表1, 移植后 15、30、60、120 d, 骨髓+ NK、骨髓+ T+

NK、骨髓+ T+ NK(高浓度)组的存活率明显高于对照组、骨髓组和骨髓+ T 细胞组($P < 0.01$)。

表1 各移植组 7、15、30、60 和 120 d 的存活率

Tab 1 Survival rates of mice 7, 15, 30, 60, and 120 d after transplantation

[N=10, n(%)]

Group	Time after transplantation(t/d)				
	7	15	30	60	120
Control	6 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Marrow	10 (100)	5 (50)	3 (30)	2 (20)	2 (20)
Marrow+ T	8 (80)	3 (30)	1 (10)	0 (0)	0 (0)
Marrow+ NK	10 (100)	10 (100)**	8 (80)**	7 (70)**	7 (70)**
Marrow+ T+ NK(1×10^6)	10 (100)	9 (90)**	8 (80)**	7 (70)**	7 (70)**
Marrow+ T+ NK(2×10^6)	10 (100)	10 (100)**	9 (90)**	8 (80)**	8 (80)**

** $P < 0.01$ vs marrow cells and marrow+ T cells group

3 讨论

NK 细胞属于天然免疫系统, 编码 NK 细胞受体(NKR)的基因没有重排多样性, 所以 NKR 不具有 T 细胞受体(TCR)识别抗原的多样性和特异性。但 NKR 也可以通过识别 MHC I 类分子配体, 调节 NK 细胞的细胞毒活性和分泌细胞因子等功能, 在抵抗病毒感染和防止机体正常细胞恶性变方面起着十分重要作用^[6~8]。近年来有学者注意到, 利用供者 NK 细胞介导的针对受者表达 MHC I 类分子细胞的杀伤作用, 可能大大提高临床异基因骨髓移植效果^[1~4]。

本实验以 NKR 表位不合的 H-2^b 和 H-2^d 小鼠进行 allo-BMT, 结果与骨髓细胞组及骨髓+ T 细胞组比较, 输注供鼠 NK 细胞的移植组小鼠出现 GVHD 临床表现的时间较晚、数量减少、程度减轻。比较 120 d 的存活率, 骨髓+ NK 细胞组和骨髓+ T+ NK 细胞组均为 70%, 骨髓+ T+ NK 细胞(高浓度)组为 80%, 而骨髓细胞组和骨髓+ T 细胞组则分别为 20% 和 0, 可见 NK 细胞可抑制小鼠 allo-BMT 中的 GVHD, 延长存活期。骨髓细胞组和骨髓+ T 细胞组的肝和小肠病理检查可见不同程度的急性 GVHD 表现, 各组小鼠皮肤病理未见明显 GVHD 改变, 原因可能是急性 GVHD 发生早, 皮肤并非其累及的主要器官。骨髓+ T 细胞组较骨髓细胞组的急性 GVHD 发生率高、存活率低, 而骨髓+ NK 细胞组和骨髓+ T+ NK 细胞组的 GVHD 发生率和长期存活率无显著差异, 且输注供鼠 NK 细胞的各移植组中均有 1 只 GVHD 表现较轻的小鼠能恢复并长期存活, 表明 NK 细胞可以克服增加 T 细胞植入导致的急性 GVHD; 骨髓细胞组 20% 长期存

活的小鼠在移植 60 d 仍出现慢性 GVHD 表现, 输注供鼠 NK 细胞的移植组全部小鼠均无慢性 GVHD 表现, 说明 NK 细胞也能抑制慢性 GVHD。骨髓+ T 细胞组较骨髓细胞组小鼠出现急性 GVHD 的时间早、数量多是因为移植物中增加了供鼠 T 细胞所致。在 allo-HSCT 中, 增加植物中 T 细胞的数量可以克服排斥、利于植入, 却往往导致严重的 GVHD, 这是临床 allo-HSCT 中一对难以避免的矛盾^[9]。本实验在增加 1×10^7 的供鼠外周 T 细胞同时输注 1×10^6 的供鼠 NK 细胞, 即能使 GVHD 的发生率远远低于骨髓细胞组和骨髓+ T 细胞组, 并获得 70% 长期存活率, 无疑为解决临床 allo-HSCT 中的这对矛盾提供了新思路。

人类 NKR 主要有杀伤细胞免疫球蛋白受体家族(KIRs)、C-型凝集素家族(CD94/NKG2 家族)和非 MHC I 类分子特异性的 NK 细胞活化受体(如 NKG2D)等^[1,2]。NK 细胞效应是这些受体与 MHC I 类或 I 类样分子配体相互作用所介导的活化和抑制信号之间竞争的结果, 目前研究表明, 供者和受者 NK 细胞的 KIR 表位不匹配是 NK 细胞发挥抑制 GVHD 和增强抗肿瘤作用等效应的关键。在 allo-BMT 中, 当供者 NK 细胞表达一个在受者 NK 细胞不表达的 KIR 表位时, 可产生移植物抗宿主方向的同种异基因反应性 NK 细胞克隆(GVH direction alloreactive NK cell clone)^[3,4,6]。该亚群 NK 细胞介导的针对受者异基因细胞的 NK 细胞同种异基因反应, 可能通过杀伤受者的抗原提呈细胞来抑制供者 T 细胞介导的同种异基因反应, 从而克服供者 T 细胞识别受者同种异基因抗原带来的 GVHD 效应。而 NK 细胞介导的同种异基因反应并不攻击正常的非造血细胞, 因为正常的非造血细

胞罕有表达促进NK细胞和靶细胞结合的黏附分子白细胞功能相关抗原1(LFA1)^[1,2,8],不表达NK细胞活化受体NKG2D的配体MHC I类分子链相关抗原蛋白A和B(MICA和MICB)^[1,3]。Ruggeri等^[3]分析了57例高危急性髓细胞白血病半相合骨髓移植,结果有GVH同种异基因反应性NK细胞的20例60%获得5年无病生存,全部无移植排斥和Ⅱ度以上急性GVHD,其余无GVH同种异基因反应性NK细胞的37例5年无病生存率只有5%,其中15.5%出现移植排斥、13.7%发生Ⅱ度以上急性GVHD。这些资料及本文的实验结果都提示了NK细胞可能在异基因造血干细胞移植中具有重大应用前景,值得深入研究。

[参考文献]

- [1] Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants[J]. *Nat Immunol*, 2003, 3(2): 108-122.
- [2] Fang SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect[J]. *Blood*, 2002, 100(9): 1935-1947.

- [3] Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants[J]. *Science*, 2002, 295(3): 2097-2100.
- [4] Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Blood*, 1999, 94(1): 333-339.
- [5] 杨志刚, 曾耀英, 何贤辉, 等. 一种分离、培养扩增小鼠NK细胞方法的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(2): (印刷中).
- [6] Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors[J]. *Immunity*, 1997, 7(3): 739-751.
- [7] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology of human natural killer cell subsets[J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(2): 633-640.
- [8] Trinchieri G. Biology of natural killer cells[J]. *Adv Immunol*, 1989, 47(1): 187-376.
- [9] Reddy P, Ferrara JL. Immunobiology of acute graft-versus-host disease[J]. *Blood Rev*, 2003, 17(4): 187-194.

[收稿日期] 2004-08-10

[修回日期] 2004-11-21

[本文编辑] 孙岩

Structure and dynamics of dinuclear zirconium(IV) complexes

Zhong W, Parkinson JA, Parsons S, Oswald ID, Coxall RA, Sadler PJ (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] We have determined by X-ray crystallography the structures of three dinuclear zirconium(IV) complexes containing the heptadentate ligand dhpta (where H(5)dhpta = 1,3-diamino-2-propanol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1) and different counteranions: K(2)[Zr(2)(dhpta)(2)]·5H(2)O (2·5H(2)O), Na(2)[Zr(2)(dhpta)(2)]·7H(2)O·C(2)H(5)OH (3·7H(2)O·C(2)H(5)OH), and Cs(2)[Zr(2)(dhpta)(2)]·H(5)O(2)·Cl·4H(2)O (4·H(5)O(2)·Cl·4H(2)O). In the K(I) complex 2, crystallized from water, the two Zr(IV) ions are 3.5973(4) Å apart and bridged *via* two alkoxo groups (average Zr-O 2.165 Å). Each Zr(IV) is eight-coordinate and also bound to two N atoms (average Zr-N 2.448 Å), and four carboxylate O atoms (average Zr-O 2.148 Å). The two dhpta ligands in the dinuclear unit have different conformations. One face of the complex contains an array of 14 oxygen atoms and interacts strongly with the two K(I) ions, one of which is 6-coordinate, the other 8-coordinate, which are 3.922(4) Å apart and bridged by a carboxylate O and by two water molecules. The structures of the dinuclear anion [Zr(2)(dhpta)(2)](2-) in the Na(I) complex 3 and in the Cs(I) complex 4 are essentially identical to that found in complex 2, although the alkali metal ions coordinate differently to the oxygen-rich face. All Zr(IV) ions have a distorted triangulated dodecahedral geometry. Although the crystal structure of complex 2 does not indicate the presence of acidic protons, in 4 an [H(5)O(2)](+) unit is strongly H-bonded to an oxygen atom of a coordinated carboxylate group. 1D and 2D (1)H and (13)C NMR spectroscopic and potentiometric studies reveal two deprotonations with pK(a) values of 9.0 and 10.0. At low pH, two carboxylate groups appear to undergo protonation accompanied by chelate ring-opening, and the complex exhibits dynamic fluxional behavior in which the two magnetically nonequivalent dhpta ligands exchange at a rate of 11 s⁻¹ at pH 3.30, 298 K, as determined from 2D EXSY NMR studies. Ligand interchange is not observed at high pH (>11). The same crystals of complex 2 were obtained from solutions at pH 3 or 12. The dynamic configurational change is therefore mediated by the aqueous solvent.

[*Inorg Chem*, 2004, 43(12): 3561-3572]