

· 论 著 ·

粒细胞集落刺激因子联用激素和(或)免疫抑制剂动员供体小鼠外周血造血干细胞对其免疫系统的影响

曹永彬,王健民*,解琳娜,江千里,高磊,邱慧颖,周虹

(第二军医大学长海医院血液科,上海 200433)

[摘要] 目的:探讨粒细胞集落刺激因子(G-CSF)联用激素和(或)免疫抑制剂动员供体小鼠外周血造血干细胞对其免疫系统的影响。方法:根据对供体 C57BL/6 小鼠动员方案不同分为 4 组,G-CSF 组(250 $\mu\text{g}/\text{kg}$,连用 4 d),G-CSF(250 $\mu\text{g}/\text{kg}$,共 4 d)+甲泼尼龙组(100 mg/kg,第 3 天),G-CSF(250 $\mu\text{g}/\text{kg}$,共 4 d)+甲泼尼龙(100 mg/kg,第 3 天)+环孢素 A 组(100 mg/kg,第 3 天)和 PBS 对照组。观测动员后供体小鼠 T 淋巴细胞对 BALB/c 小鼠脾细胞的单向混合淋巴细胞反应(MLR),ELISA 法测定供体鼠脾细胞培养上清中细胞因子 IFN- γ 、IL-4、TGF- β_1 的水平,RT-PCR 半定量测定 IFN- γ 、IL-4 的 mRNA 水平。结果:3 个实验组 MLR 刺激效率分别为 42%、21%和 39%,与 PBS 对照组的 68%相比有显著性差异($P < 0.01$);各实验组与 PBS 对照组相比,培养上清中 IFN- γ 表达明显减低,IL-4、TGF- β_1 明显增高($P < 0.01$),而各实验组之间无显著差异;RT-PCR 半定量测定发现 IFN- γ mRNA 表达明显减低,IL-4 明显增高($P < 0.01$)。结论:G-CSF 联用激素和(或)免疫抑制剂动员供体小鼠外周血造血干细胞可降低其 T 淋巴细胞异基因反应性,改变其细胞因子分泌类型,可能易于诱导受体免疫耐受。

[关键词] 粒细胞集落刺激因子;异基因反应性;造血干细胞移植

[中图分类号] R 392.4

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)11-1200-04

Influence of granulocyte-colony stimulating factor combined with adrenocortical steroid and/or immunosuppressants on immune system of donor mice during hematopoietic stem cell mobilization

CAO Yong-bin, WANG Jian-min*, XIE Lin-na, JIANG Qian-li, GAO Lei, QIU Hui-ying, ZHOU Hong (Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the influence of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) combined with adrenocortical steroid and/or immunosuppressants on immune system of donor mice during hematopoietic stem cell mobilization. **Methods:** The donor C57BL/6 mice were divided into 4 groups according to the mobilization strategies, namely, the G-CSF group (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 4 days), G-CSF (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 4 days) + methylprednisolone group (100 mg/kg on day 3), G-CSF (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 4 days) + methylprednisolone group (100 mg/kg on day 3) + cyclosporine A (100 mg/kg on day 3), and PBS control group. The post-mobilization T lymphocytes of C57BL/6 mice and the splenocytes of BALB/c mice were subjected to mixed lymphocyte reactions (MLR). The levels of IFN- γ , IL-4, and TGF- β_1 were determined in the supernatants of donor mice splenocytes by ELISA method and the mRNA levels of IFN- γ and IL-4 were determined by RT-PCR. **Results:** The results showed that the MLR-inhibitory activities in the 3 G-CSF mobilized groups were 42%, 21%, and 39%, respectively; all lower than that in PBS control group (68%). IFN- γ levels in the 3 G-CSF mobilized groups were lower than that in PBS control group, but the levels of IL-4 and TGF- β_1 were significantly higher than those in PBS group ($P < 0.01$), with no significant difference found between the 3 G-CSF mobilized groups. RT-PCR analysis found that the expression of IFN- γ mRNA was obviously decreased and the expression of IL-4 was obviously increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** G-CSF combined with adrenocortical steroid and/or immunosuppressants can decrease the allogeneic reaction of T lymphocytes and change the types of secreted cytokines in donor mice during hematopoietic stem cell mobilization, which may induce immune resistance in the recipients.

[KEY WORDS] granulocyte-colony stimulating factor; allogeneic reaction; hematopoietic stem cell transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1200-1203]

目前对移植物抗宿主病的预防和治疗多是从受体角度来考虑的,在移植后给予免疫抑制剂如环孢素 A、甲氨蝶呤,以抑制移植物对宿主组织的免疫攻击反应。移植物抗宿主病(GVHD)的发生不仅与供、受体组织相容性有关,而且与移植物中细胞的特性密切相关,这已经为临床实践所证明^[1]。已有研

[基金项目] 国家自然科学基金(30172347);上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划(98BR029)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30172347) and Fund for "One Hundred Leading Scientists for the 21st Century" of Health Department of Shanghai Municipal Government(98BR029)。

[作者简介] 曹永彬,硕士。现在解放军总医院第一附属医院血液科,北京 100853。

*Corresponding author. E-mail: jmwang@medmail.com.cn

究表明,重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员后的外周血干细胞移植中,虽然 T 淋巴细胞含量比骨髓多 10 倍以上,但急性 GVHD 发生率并未明显增加,可能与 G-CSF 的免疫调节作用使淋巴细胞的功能发生了变化相关^[2]。那么,在动员时加强对移植物的免疫调节,对移植中的细胞亚群和细胞因子分泌类型有何影响?加用免疫干预后,能否在不影响移植效率的基础上,进一步降低 GVHD 的发生率?我们应用小鼠异基因造血干细胞移植模型,观察了对供体小鼠应用 G-CSF 动员时联合免疫抑制剂,对移植中淋巴细胞的异基因反应性及 GVHD 相关的效应细胞因子表达和分泌水平的影响,以探讨加用免疫抑制剂对供体免疫系统的调节作用,以及这种免疫调节对受体的 GVHD 发生的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物 C57BL/6(H-2b)小鼠,6 周龄,雄性,体质量(19.6 ± 1.3) g, BALB/c(H-2d)小鼠,8 周龄,雌性,体质量(20.3 ± 0.7) g;均为 SPF 级,购自上海生命科学院实验动物中心。饲养于无菌层流室,垫料、饲料及饮水高压消毒处理。

1.2 试剂 重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF, 75 μg/0.3 ml 注射液,杭州九源);甲泼尼龙(MP,法玛西亚普强);环孢素 A(CsA,瑞士诺华制药有限公司)。

1.3 实验小鼠分组及处理 供体鼠随机分 4 组,每组 3 只。rhG-CSF 组于第 1~4 天每天固定时间给予一次性腹部皮下注射 rhG-CSF 250 μg/kg; rhG-CSF + MP 组 rhG-CSF 的用法同 rhG-CSF 组,另外在第 3 天给予 MP 腹腔注射,剂量 100 mg/kg; rhG-CSF + MP + CsA 组在 rhG-CSF + MP 组基础上,在第 3 天给予 CsA 腹腔注射,剂量 100 mg/kg; PBS 对照组小鼠腹部皮下注射与 rhG-CSF 组等量的 PBS 缓冲液。

1.4 单向混合淋巴细胞培养^[1-5] BALB/c 小鼠脾细胞悬液经丝裂霉素 C(MMC)处理后作为刺激细胞,终密度为 5×10^6 /ml,各处理组 C57BL/6 小鼠的脾细胞作为反应细胞,终密度为 5×10^6 /ml,进行单向混合淋巴细胞培养,每个样本设复孔 6 个。加样后置于 5% CO₂ 培养箱 37 °C 温育 72 h, MTT 法测定 492 nm 处 D 值。计算细胞增殖刺激效应:刺激效应(%) = (实验孔 D₄₉₂ 值 - 对照孔 D₄₉₂ 值) / 对照孔 D₄₉₂ 值 × 100%。

1.5 双抗体夹心 ELISA 法检测小鼠脾细胞培养上

清中细胞因子水平 分别取各实验处理组 C57BL/6 小鼠脾脏,制备脾细胞悬液以完全培养基调细胞密度为 5×10^6 /ml,按每孔 0.5 ml 加入到 24 孔板,同时加入 ConA 至终浓度为 5 μg/ml,置 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后收集上清测定 IL-4 水平,继续培养至 72 h 后收集上清液用 ELISA 试剂盒测定细胞因子 IFN- γ 、IL-4 和 TGF- β_1 水平。

1.6 半定量 RT-PCR 测定受体小鼠脾脏细胞因子 IFN- γ 、IL-4 mRNA 水平 引物序列如下^[4]: -actin (540 bp), sense 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3', antisense 5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'; IL-4 (378 bp), sense 5'-GTC ATC CTG CTC TTC TTT CTC G-3', antisense 5'-GAT GCT CTT TAG GCT TTC CAG G-3'; IFN- γ (427 bp), sense 5'-TGG CTG TTT CTG GCT GTT ACT G-3', antisense 5'-AAT CAG CAG CGA CTC CTT TTC C-3'。

处死小鼠时取约 50 mg 脾脏组织,液氮冻存后 -80 °C 保存,采用 TRIzol 试剂抽提总 RNA。cDNA 合成参照 TaKaRa RNA PCR Kit AMV Ver. 2.1 试剂盒说明书进行。30 °C 保温 10 min, 42 °C 逆转录 30 min, 99 °C × 5 min, 5 °C × 5 min。PCR 扩增: -actin 退火温度 58 °C, 25 个循环; IFN- γ 退火温度 58 °C, 30 个循环;而 IL-4 退火温度 60 °C, 35 个循环。反应完毕取 PCR 反应液 5~10 μl 以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 反应产物。PCR 产物应用生物电泳图像分析系统对条带进行分析,细胞因子的表达量通过内参照 -actin 的表达来进行校正,对条带 cDNA 的量进行密度扫描,以目的基因 cDNA/ -actin cDNA 量的比值表示 mRNA 表达的相对强度。

1.7 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数的比较采用 Student's *t* 检验; 2 个以上样本均数的比较采用方差分析(One-way ANOVA)。样本率的比较采用 χ^2 检验。所有统计学处理均采用 SPSS 11.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 单向混合淋巴细胞培养测定供体淋巴细胞对异基因抗原的反应性 PBS 对照组单向混合淋巴细胞反应(MLR)刺激效率为 68%,各实验组与 PBS 组相比,刺激效率明显减低($P < 0.01$),实验组中 G-CSF + MP 组刺激效率最低,为 21%,与 G-CSF 组的 42%和 G-CSF + MP + CsA 组的 39%相比差异显著($P < 0.01$),G-CSF 组和 G-CSF + MP + CsA 组相比无显著差异。

2.2 ELISA 测定细胞因子分泌水平 如表 1,各实验组与 PBS 对照组相比,3 种方案动员组 IFN- 表达与 PBS 组相比明显减低 ($P < 0.01$);IL-4、TGF- β_1

明显增高 ($P < 0.01$),3 种方案动员组之间比较无显著差异。

表 1 各实验组脾细胞分泌细胞因子情况的比较

Tab 1 Levels of cytokines in different groups

Group	IFN- γ	IL-4	TGF- β_1
G-CSF	154.4 \pm 5.8 **	406.9 \pm 171.4 **	46.1 \pm 27.3 **
G-CSF + MP	168.3 \pm 9.1 **	337.7 \pm 80.5 **	77.1 \pm 20.2 **
G-CSF + MP + CsA	189.1 \pm 5.1 **	338.5 \pm 52.3 **	70.0 \pm 6.7 **
PBS	714.2 \pm 108.2	39.2 \pm 7.8	16.9 \pm 6.5

($n = 3, \bar{x} \pm s, B/pg \cdot ml^{-1}$)

** $P < 0.01$ vs PBS group

2.3 半定量 RT-PCR 测定细胞因子表达 见图 1、图 2。脾细胞 IFN- 的 mRNA 表达与内参照相比, G-CSF 组为 0.21 \pm 0.11, G-CSF + MP 组为 0.14 \pm 0.05, G-CSF + MP + CsA 组为 0.32 \pm 0.22, PBS 组为 3.20 \pm 0.41; IL-4 的 mRNA 表达, G-CSF 组为 2.40 \pm 1.22, G-CSF + MP 组为 1.40 \pm 0.24, G-CSF + MP + CsA 组为 1.84 \pm 0.44, PBS 组为 0.52 \pm 0.41。统计分析显示:各实验组与 PBS 对照组相比,IFN- 表达明显减低 ($P < 0.01$),IL-4 明显增高 ($P < 0.01$),3 种方案动员实验组之间,差异无显著统计学意义。

的刺激发生增殖,其增殖效率受抗原差异的影响。3 个实验组脾脏淋巴细胞在体外培养条件下,与 PBS 对照组比较能有效地减弱其混合淋巴细胞培养中的异基因反应性。在 3 个实验组中,以 G-CSF + MP 组反应性最低, G-CSF + MP + CsA 组次之, G-CSF 组最高,这些结果说明细胞因子 G-CSF 联合免疫抑制剂预防 GVHD 的策略在体外实验中可以得到验证,联合应用免疫抑制剂可以有效地减低细胞对异基因抗原的反应性^[5,6]。

ELISA 分析理论上可以准确反映蛋白质分泌的水平,而半定量 RT-PCR 只能反映大致趋势。我们分别采取 ELISA 分析蛋白水平和半定量 RT-PCR 对供体脾细胞的细胞因子表达水平进行测定^[7,8]。结果表明, G-CSF 动员的 3 个实验组 IFN- 的分泌水平与 PBS 组相比明显减低,同时 IL-4、TGF- β_1 的水平增高,提示细胞因子动员造成脾脏细胞分泌细胞因子的类型发生改变。3 个实验组间细胞因子的表达水平没有显著统计学差异,提示在 G-CSF 的基础上加用免疫抑制剂可能没有进一步影响脾细胞分泌细胞因子的水平^[2]。

细胞因子分泌类型的改变对于诱导 T 细胞免疫耐受状态非常重要, G-CSF 动员可能改变淋巴细胞的功能或者细胞因子的表达谱,给小鼠注射 G-CSF 后发现调整 T 细胞产生 Th2 型细胞因子,增加 IL-4 产生,与 IL-2 和干扰素下降相协调,可能降低 GVHD 的发生率并减轻 GVHD 的程度^[9]。文献报道^[10,11], 类细胞因子 IL-4、IL-10 在体外培养中可以诱导免疫耐受,而 类细胞因子 IFN-、IL-2、IL-12 在急性 GVHD 发生过程中增加。因此,通过调控细胞因子的分泌水平,可能预防或控制急性

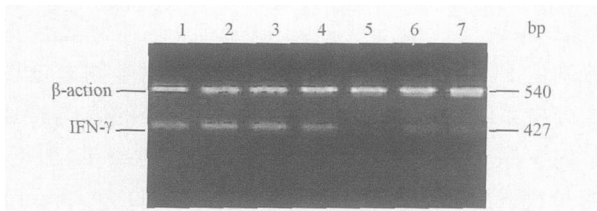


图 1 实验组脾脏细胞因子 IFN- 的表达

Fig 1 Expression of IFN- mRNA in spleen of different groups 1,2: G-CSF group; 3: G-CSF + MP group; 4: G-CSF + MP + CsA group; 5-7: PBS group

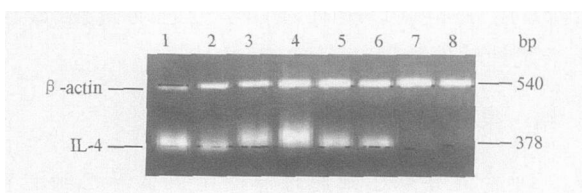


图 2 实验组脾脏细胞因子 IL-4 的表达

Fig 2 Expression of IL-4 mRNA in spleen of different groups 1,2: G-CSF group; 3,4: G-CSF + MP group; 5,6: G-CSF + MP + CsA group; 7,8: PBS group

3 讨论

脾脏淋巴细胞在体外培养条件下受异基因抗原

GVHD。

另外我们的研究提示,体外培养条件下细胞因子联合免疫抑制剂甲泼尼龙和环孢素 A 能有效地增加脾脏 TGF- β_1 的表达。TGF- β_1 被认为是一种重要的免疫抑制因子,它可以诱导 T 细胞免疫无反应性,在移植耐受中有着重要的地位,但具体作用机制尚不完全清楚^[12,13]。本研究提示,在 G-CSF 的基础上加用免疫抑制剂可能对供体免疫系统有调节作用,从而可能影响移植受体的 GVHD 发生率或程度,其有效性及进一步的作用机制我们将另文报道。

[参考文献]

- [1] Barbey C, Irion O, Helg C, et al. Characterization of the cytotoxic alloresponses of cord blood [J]. Bone Marrow Transplant, 1998, 22(Suppl 1) :S26-S30.
- [2] Johnson BD, Becker EE, Truitt RL. Graft-*vs*-host and graft-*vs*-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 1999, 5:123-132.
- [3] 赵桐茂. 混合淋巴细胞培养方法 HLA 分型原理和应用[M]. 上海:上海科技出版社, 1984:285-291.
- [4] Renda MC, Fecarotta E, Dieli F, et al. Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implication for fetal hematopoietic stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 25:135-141.
- [5] Zeng D, Lewis D, Dejbaksh-Jones S, et al. Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft-*vs*-host disease[J]. J Exp Med, 1999, 189:1073-1081.
- [6] Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1⁺ T cells: a new family of T cells[J]. Immunol Today, 1996, 17:71-76.
- [7] Blazar BR, Taylor PA, Vallera DA. CD4⁺ and CD8⁺ T cells each can utilize a perforin-dependent pathway to mediate lethal graft-*versus*-host disease in major histocompatibility complex-disparate recipients[J]. Transplantation, 1997, 64:571-576.
- [8] Donahue J, Gilpin E, Lee TH, et al. Microchimerism does not induce tolerance and sustains immunity after in utero transplantation[J]. Transplantation, 2001, 71:359-368.
- [9] Zeller JC, Panoskalis-Mortari A, Murphy WJ, et al. Induction of CD4⁺ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- β [J]. J Immunol, 1999, 163:3684-3691.
- [10] Sakata N, Yasui M, Okamura T, et al. Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-*versus*-host disease[J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 27:1153-1161.
- [11] Renda M, Fecarotta E, Maggio A. In utero fetal liver hematopoietic stem cell transplantation: is there a role for alloreactive T lymphocytes[J]. Blood, 2000, 96:1608-1609.
- [12] Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, et al. Granulocyte-colony stimulating factor enhances the expression of transforming growth factor- β mRNA in CD4⁺-positive peripheral blood lymphocytes in the donors for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation [J]. Am J Hematol, 2002, 69:138-140.
- [13] Billiau AD, Sefrioui H, Overbergh L, et al. Transforming growth factor- β inhibits lymphokine activated killer cytotoxicity of bone marrow cells: implications for the graft-*versus*-leukemia effect in irradiation allogeneic bone marrow chimeras [J]. Transplantation, 2001, 71:292-299.

[收稿日期] 2006-03-20

[修回日期] 2006-09-22

[本文编辑] 曹 静

《胆道疾病内镜诊断与治疗学》已出版

本书全面、系统地介绍了胆道疾病内镜诊断与治疗技术及临床应用价值;文字简明扼要,图片清晰、真实,均为编者在临床工作中所收集。既是一本临床工作中的实用参考书,又是一本内容详实的专业教科书,可供内、外科及内镜医生参考阅读。

由第二军医大学出版社出版、发行,ISBN 7-81060-554-2/R.411,定价:200.00 元。

订购电话:021-65493093,地址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科,邮编:200433