

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.06.0595

· 论 著 ·

## 异基因造血干细胞移植后小鼠共刺激分子表达与急性移植物抗宿主病的关系

王柔嘉, 王紫薇, 赵潇溟, 唐古生, 胡晓霞, 王健民\*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院血液内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探究异基因造血干细胞移植后小鼠共刺激分子表达及其与急性移植物抗宿主病(aGVHD)发病的关系。**方法** 供体为5只C57BL/6J( $H2KD^-H2KB^+$ )雄性小鼠,受体为30只CB6F1( $H2KD^+H2KB^+$ )雌性小鼠。将受体小鼠随机分为单纯照射组、骨髓移植组和aGVHD组,每组10只。单纯照射组:受体小鼠接受 $\gamma$ 射线照射后不注射任何细胞;骨髓移植组:受体小鼠接受 $\gamma$ 射线照射后注射 $5 \times 10^6$ 个供体来源去T淋巴细胞的骨髓有核细胞;aGVHD组:受体小鼠接受 $\gamma$ 射线照射后,同时注射 $5 \times 10^6$ 个供体来源去T淋巴细胞的骨髓有核细胞和 $3 \times 10^7$ 个供体来源脾细胞。采用log-rank生存曲线分析各组小鼠移植后生存情况。分别在移植后7、14、21、28d采用流式细胞术检测骨髓移植组和aGVHD组小鼠外周血 $CD4^+$ T淋巴细胞和 $CD8^+$ T淋巴细胞表面共刺激分子细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、程序性死亡蛋白1(PD-1)、可诱导共刺激分子(ICOS)和CD28的表达情况,以及移植后21d两组小鼠脾组织 $CD4^+$ T淋巴细胞内白细胞介素(IL)-17、 $\gamma$ 干扰素、IL-4的表达情况,并在移植后21d采用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色检测两组小鼠结肠组织共刺激分子配体的表达情况。**结果** 单纯照射组受体小鼠均在 $\gamma$ 射线照射后19d内死亡;骨髓移植组小鼠在 $\gamma$ 射线照射后均未出现aGVHD症状,30d内均存活;aGVHD组小鼠在 $\gamma$ 射线照射后出现aGVHD症状的时间为14(11~18)d,生存时间为22(13~30)d。随着时间的推移,aGVHD组小鼠外周血 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T淋巴细胞表面CTLA-4、PD-1表达在移植后均呈下降趋势,ICOS、CD28表达均呈上升趋势。在移植后28d时aGVHD组小鼠外周血 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T淋巴细胞表面CTLA-4、PD-1表达均低于骨髓移植组,ICOS、CD28表达均高于骨髓移植组,差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。DAB染色结果示,骨髓移植组结肠组织CD80、ICOS配体(ICOSL)、PD-1配体(PD-L1)表达均为阴性,aGVHD组结肠组织CD80、ICOSL、PD-L1阳性表达率分别为40%、80%、80%。与骨髓移植组比较,aGVHD组小鼠脾组织 $CD4^+$ T淋巴细胞内IL-17、 $\gamma$ 干扰素表达均增加,IL-4表达减少,差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。**结论** 异基因造血干细胞移植小鼠发生aGVHD后,共刺激分子CTLA-4表达随时间推移逐渐降低。CTLA-4、ICOS、PD-1均可能通过调节辅助性T细胞(Th)1、Th2、Th17等T淋巴细胞亚群分布参与aGVHD的发生、发展。

**[关键词]** 移植物抗宿主病;造血干细胞移植;共刺激分子;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4;细胞因子

**[中图分类号]** R 457.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)06-0595-07

### Expression of costimulators in mice after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its relationship with acute graft versus host disease

WANG Rou-jia, WANG Zi-wei, ZHAO Xiao-ming, TANG Gu-sheng, HU Xiao-xia, WANG Jian-min\*

Department of Hematology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression of costimulators in mice after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its relationship with acute graft versus host disease (aGVHD). **Methods** Five C57BL/6J ( $H2KD^-H2KB^+$ ) male mice were selected as donors. Thirty CB6F1 ( $H2KD^+H2KB^+$ ) female mice were selected as recipients and randomized into three groups: total body irradiation (TBI), bone marrow transplantation (BM) and aGVHD groups, with 10 mice in each group. The mice in the TBI group received radiation only without injecting any cells. The mice in the BM group were injected with  $5 \times 10^6$  bone marrow cells without T lymphocytes from donors after radiation. The mice in the aGVHD group were simultaneously injected with  $5 \times 10^6$  bone marrow cells without T lymphocytes and  $3 \times 10^7$  spleen cells from donors after

**[收稿日期]** 2019-04-30 **[接受日期]** 2019-05-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270638, 81530047, 81871043). Supported by National Natural Science Foundation of China (81270638, 81530047, 81871043).

**[作者简介]** 王柔嘉, 硕士生. E-mail: vera-529@163.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161293, E-mail: jmwangch@139.com

radiation. The survival rates of mice in the three groups were evaluated using log-rank survival curve. The expression levels of costimulators, including cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), programmed death 1 (PD-1), inducible costimulator (ICOS) and CD28, on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, were detected using flow cytometry at 7, 14, 21 and 28 d after transplantation. At 21 d after transplantation, the expression levels of interleukin (IL)-17, interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and IL-4 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and the costimulator ligands in the colon tissues, were detected with flow cytometry and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining, respectively. **Results** The mice in the TBI group all died within 19 d after irradiation. The mice in the BM group survived 30 d after irradiation without aGVHD. The median onset time of aGVHD symptoms and survival of mice in the aGVHD group were 14 (11-18) d and 22 (13-30) d, respectively. The expression levels of CTLA-4 and PD-1 on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were decreased after transplantation, while the expression levels of ICOS and CD28 were on the rise. At 28 d after transplantation, the expression levels of CTLA-4 and PD-1 on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were significantly lower in the aGVHD group than those in the BM group (all  $P < 0.05$ ), and the expression levels of ICOS and CD28 were significantly higher (all  $P < 0.05$ ). DAB staining showed that CD80, ICOS ligand (ICOSL), and PD-1 ligand (PD-L1) were negative in the colon tissues of mice in the BM group, and the positive expression rates of CD80, ICOSL, and PD-L1 in the aGVHD group were 40%, 80% and 80%, respectively. Compared with the BM group, the expression levels of IL-17 and IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the aGVHD group were significantly increased, while the expression level of IL-4 was significantly decreased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** In aGVHD mice after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, the expression of costimulator CTLA-4 is gradually decreased over time. CTLA-4, ICOS and PD-1 may participate in the development and progression of aGVHD by regulating the distribution of T lymphocyte subgroups such as T-helper cell (Th)1, Th2 and Th17.

**[Key words]** graft versus host disease; hematopoietic stem cell transplantation; costimulators; cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; cytokines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(6): 595-601]

近年来, 异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 已成为治疗血液病的重要方法, 甚至是治愈某些血液病的唯一方法, 急性移植物抗宿主病 (acute graft versus host disease, aGVHD) 是其治疗后主要并发症之一, 严重时可导致患者死亡<sup>[1]</sup>。共刺激分子 CD28 超家族成员, 包括 CD28、可诱导共刺激分子 (inducible costimulator, ICOS)、程序性死亡蛋白 1 (programmed death 1, PD-1) 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4), 可与共刺激分子配体 CD80/86、可诱导共刺激分子配体 (inducible costimulator ligand, ICOSL)、程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 结合产生第二信号, 诱导 T 淋巴细胞活化。虽然目前已知部分共刺激分子对 aGVHD 具有调节效应<sup>[2-3]</sup>, 但其在 allo-HSCT 治疗后的动态变化规律及各分子间的相互作用尚不完全明确。本研究以 aGVHD 小鼠模型为研究对象, 探讨共刺激分子表达的动态变化及其与 aGVHD 的关系。

## 1 材料和方法

1.1 实验分组 供体为 5 只约 8 周龄的 C57BL/6J

( $H2K^d/H2KB^d$ ) 雄性小鼠, 受体为 30 只约 8 周龄的 CB6F1 ( $H2K^d/H2KB^d$ ) 雌性小鼠。所有小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2016-0006、SCXK (京) 2016-0011, 实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2017-0033]。受体小鼠置于透气纸盒中一次性接受 <sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射, 总剂量为 9 Gy。将受体小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只: (1) 单纯照射组, 受体小鼠接受  $\gamma$  射线照射后不注射任何细胞; (2) 骨髓移植组, 受体小鼠接受  $\gamma$  射线照射后 4~6 h 经尾静脉注射  $5 \times 10^6$  个供体来源去 T 淋巴细胞的骨髓有核细胞; (3) aGVHD 组, 受体小鼠接受  $\gamma$  射线照射后 4~6 h 经尾静脉同时注射  $5 \times 10^6$  个供体来源去 T 淋巴细胞的骨髓有核细胞和  $3 \times 10^7$  个供体来源脾细胞。

1.2 H-E 染色 移植后 21 d 骨髓移植组和 aGVHD 组各取 2 只小鼠获得脾、小肠、肝、肺组织标本。采用 4% 多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片, 然后行 H-E 染色观察炎症反应。H-E 染色方法: 石蜡切片经脱蜡、水化处理, 于 37 °C 烤箱中烘烤 1 h 取出, 自来水润洗 1 次; 苏木精染液浸染 3~5 min, 自来水冲洗 1~2 min; 1% 盐酸乙醇分化数秒; 1% 氨水溶液返蓝数秒, 然后水洗 1~2 min;

伊红染液浸染 1~3 min; 无水乙醇脱水 5 min, 二甲苯透明 5 min。中性树胶封片, 于光学显微镜下观察形态病理学变化。

1.3 外周血流式细胞术 骨髓移植组和 aGVHD 组各取 4 只小鼠, 分别在移植后 7、14、21、28 d 采集面静脉血, 采用美国 BD 公司 Arai II 流式细胞仪及其配套软件行免疫荧光分析。采用分装后的 CD3-APC-H7、CD4-V510、CD8-PE、ICOS-APC、CTLA-4-PE-CY7、PD-1-FITC、CD28-V421 抗体 (均购自美国 BD 公司) 检测 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞及 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面 ICOS、PD-1、CD28 及 CTLA-4 抗原表达。采用分装后的 CD3-APC-H7、CD4-V510、CD8-PE、 $\gamma$  干扰素 (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-4、IL-4、IL-17 抗体 (均购自美国 BD 公司) 检测 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 的表达水平, 分别研究 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中辅助性 T 细胞 (T-helper cell, Th) 1、Th2、Th17 亚群的分布。

1.4 3,3'-二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 染色 取小鼠结肠组织标本制作石蜡切片, 进行免疫组织化学染色, 染色方法为 DAB 染色, 所用抗体均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。观察共刺激分子配体 CD80、ICOSL、PD-L1 表达情况。

DAB 染色方法: 石蜡切片经 60 °C 恒温箱中烘烤及二甲苯浸泡脱蜡, 于乙醇中浸泡水化, 并用蒸馏水浸泡清洗 3 次。柠檬酸三钠修复抗原, 在高压锅中保压后自然冷却至室温。蒸馏水浸泡清洗 2 次, 免疫染色洗涤液洗 3 次。使用免疫组织化学油性笔圈出组织样本位置, 滴加 0.3% 过氧化氢甲醇溶液, 洗涤并封闭。加入一抗稀释液后置于 4 °C 冰箱孵育过夜。第 2 天室温下复温并洗涤 4 次, 加入酶标二抗。洗涤后 DAB 染液显色 5~15 min, 充分水洗, 苏木精复染, 脱色、封片, 于光学显微镜下观察免疫病理学变化情况。

小鼠结肠组织上皮细胞膜呈棕黄色为 DAB 染色阳性, 分别计算 CD80、ICOSL、PD-L1 阳性表达率: 阳性表达率 (%) = 阳性切片数/切片总数  $\times$  100%, 每张切片随机选择 3 个高倍镜视野, 每个视野下阳性细胞数占比均  $\geq$  50% 则判定该切片为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件及

GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 各组不同时间点同一因变量重复测量数据的比较采用方差分析; 呈偏态分布的计量资料以中位数 (范围) 表示。采用 log-rank 检验进行生存分析。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 各组受体小鼠 log-rank 生存分析 单纯照射组受体小鼠均在  $\gamma$  射线照射后 19 d 内死亡。aGVHD 组小鼠在  $\gamma$  射线照射后出现 aGVHD 症状的时间为 14 (11~18) d, 生存时间为 22 (13~30) d; 骨髓移植组小鼠在  $\gamma$  射线照射后均未出现 aGVHD 症状, 30 d 内均存活。见图 1。

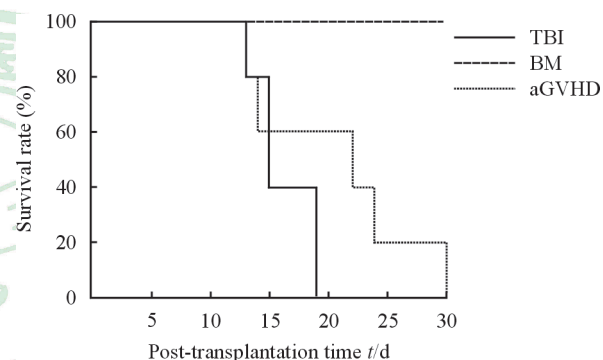


图1 各组小鼠接受  $\gamma$  射线照射后 log-rank 生存曲线  
Fig 1 Log-rank survival curve of mice in each group after  $\gamma$ -ray irradiation

TBI: Total body irradiation; BM: Bone marrow transplantation; aGVHD: Acute graft versus host disease.  $n=10$

2.2 移植后受体小鼠一般情况与形态病理学变化 骨髓移植组受体小鼠在照射后 1 周内出现短暂性轻度腹泻。aGVHD 组小鼠接受移植后 10 d 左右出现弓背、脱毛、腹泻等典型 aGVHD 表现; 移植后 21 d 脾、小肠、肝、肺组织均可见明显的炎症细胞浸润, 组织结构部分破坏, 出现典型 aGVHD 病理表现。与骨髓移植组小鼠相比, aGVHD 组小鼠移植后 21 d 脾脏组织结构紊乱, 皮质、髓质交界模糊, 出现大片细胞坏死, 并可见大量炎症细胞浸润 (图 2A); 小肠组织腺体明显减少, 绒毛缩短或断裂, 腺体下方大量炎症细胞浸润 (图 2B); 肝组织汇管区大量炎症细胞浸润 (图 2C); 肺组织部分肺泡腔及间质炎症细胞浸润 (图 2D)。

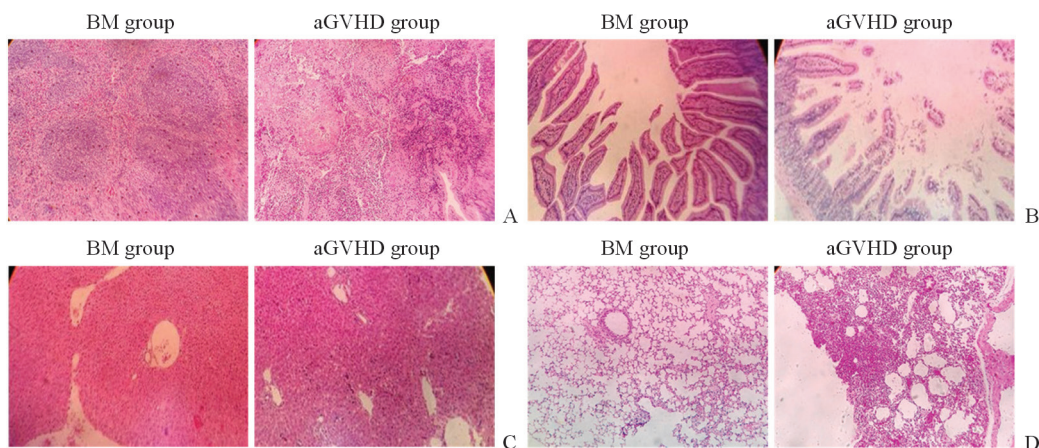


图2 移植后21 d小鼠的各脏器组织病理学表现

Fig 2 Pathological features of mouse organs at 21 d after transplantation

A: Spleen; B: Intestine; C: Liver; D: Lung. BM: Bone marrow transplantation; aGVHD: Acute graft versus host disease. H-E staining. Original magnification:  $\times 40$

2.3 移植后共刺激分子表达情况 如表1、表2所示, aGVHD组小鼠外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞表面CTLA-4表达在移植后7 d开始即呈下降趋势, CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面CTLA-4表达在移植后14 d开始也呈下降趋势, 在移植后28 d时均低于骨髓移植组( $t=202.23$ 、 $339.41$ ,  $P$ 均=0.01)。aGVHD组小鼠外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞表面ICOS表达在移植后21 d开始上升, CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面ICOS表达在移植后7 d开始即呈上升趋势( $F=845.02$ ,  $P=0.01$ ), 在28 d时均高于骨髓移植组( $t=$

108.89、152.74,  $P$ 均=0.01)。aGVHD组小鼠外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面PD-1表达在移植后7 d开始均呈下降趋势, CD28表达均呈上升趋势, 但PD-1仅在CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面表达差异有统计学意义( $F=53.73$ ,  $P=0.02$ ), CD28仅在CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞表面表达差异有统计学意义( $F=210.46$ ,  $P=0.01$ ), 在移植后28 d时二者表达水平与骨髓移植组比较差异均有统计学意义(PD-1:  $t=130.11$ 、 $149.90$ ,  $P$ 均=0.01; CD28:  $t=13.62$ 、 $465.28$ ,  $P=0.03$ 、0.01)。

表1 移植后各时间点小鼠CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞表面共刺激分子表达

Tab 1 Expression of costimulators on CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in mice at different time points after transplantation

						$n=4, \bar{x} \pm s$	
Index	Group	7 d	14 d	21 d	28 d	F value	P value
CTLA-4	BM	1.675 $\pm$ 0.115	1.040 $\pm$ 0.160	0.765 $\pm$ 0.355	1.690 $\pm$ 0.016	3.37	0.17
	aGVHD	2.605 $\pm$ 0.105	0.780 $\pm$ 0.017	0.300 $\pm$ 0.027	0.260 $\pm$ 0.015	181.15	0.01
	t value	5.97	1.66	1.32	202.23		
	P value	0.03	0.24	0.32	0.01		
ICOS	BM	3.850 $\pm$ 0.290	3.555 $\pm$ 0.325	1.995 $\pm$ 0.365	1.520 $\pm$ 0.023	9.61	0.04
	aGVHD	2.675 $\pm$ 0.425	2.260 $\pm$ 0.570	3.830 $\pm$ 0.420	5.290 $\pm$ 0.010	5.47	0.09
	t value	2.28	1.98	3.30	108.89		
	P value	0.15	0.19	0.08	0.01		
PD-1	BM	1.860 $\pm$ 0.015	1.900 $\pm$ 0.320	1.715 $\pm$ 0.135	1.330 $\pm$ 0.013	0.65	0.65
	aGVHD	4.080 $\pm$ 0.019	3.825 $\pm$ 0.705	0.895 $\pm$ 0.225	0.410 $\pm$ 0.014	9.34	0.09
	t value	313.96	2.49	3.13	130.11		
	P value	0.01	0.13	0.09	0.01		
CD28	BM	8.885 $\pm$ 2.215	8.180 $\pm$ 1.040	4.600 $\pm$ 0.190	4.090 $\pm$ 0.080	3.96	0.11
	aGVHD	1.705 $\pm$ 0.015	2.720 $\pm$ 0.090	5.375 $\pm$ 0.255	7.215 $\pm$ 0.215	210.46	0.01
	t value	3.24	5.23	2.44	13.62		
	P value	0.08	0.04	0.14	0.03		

CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; ICOS: Inducible costimulator; PD-1: Programmed death 1; BM: Bone marrow transplantation; aGVHD: Acute graft versus host disease

表 2 移植后各时间点小鼠 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面共刺激分子表达

Tab 2 Expression of costimulators on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in mice at different time points after transplantation

						<i>n</i> =4, $\bar{x}\pm s$	
Index	Group	7 d	14 d	21 d	28 d	<i>F</i> value	<i>P</i> value
CTLA-4	BM	0.675±0.115	1.540±0.340	2.000±0.017	2.700±0.028	7.90	0.11
	aGVHD	2.105±0.395	0.750±0.150	0.600±0.039	0.300±0.012	5.89	0.14
	<i>t</i> value	3.48	2.22	197.99	339.41		
	<i>P</i> value	0.07	0.17	0.01	0.01		
ICOS	BM	3.350±0.210	3.055±0.175	1.800±0.012	1.520±0.020	14.72	0.06
	aGVHD	2.175±0.075	1.760±0.070	7.700±0.012	2.600±0.025	845.02	0.01
	<i>t</i> value	5.269	6.871	834.39	152.74		
	<i>P</i> value	0.03	0.02	0.01	0.01		
PD-1	BM	0.880±0.020	1.100±0.026	1.220±0.031	1.660±0.022	326.30	0.01
	aGVHD	4.190±0.110	3.325±0.205	3.100±0.022	0.600±0.030	53.73	0.02
	<i>t</i> value	29.61	10.19	265.87	149.90		
	<i>P</i> value	0.02	0.03	0.01	0.01		
CD28	BM	2.705±0.015	2.220±0.410	1.300±0.034	2.010±0.043	2.69	0.28
	aGVHD	1.535±0.135	1.665±0.555	2.100±0.005	5.300±0.003	11.26	0.08
	<i>t</i> value	8.61	0.804	113.14	465.28		
	<i>P</i> value	0.07	0.51	0.01	0.01		

CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; ICOS: Inducible costimulator; PD-1: Programmed death 1; BM: Bone marrow transplantation; aGVHD: Acute graft versus host disease

2.4 移植后 aGVHD 发生靶组织中共刺激分子配体 ICOSL、PD-L1 表达均为阴性，aGVHD 组结肠组织的表达 取移植后 21 d 小鼠结肠组织行 DAB 染色，结果显示，骨髓移植组小鼠结肠组织 CD80、ICOSL、PD-L1 阳性表达率分别为 40%、80%、80%。见图 3。

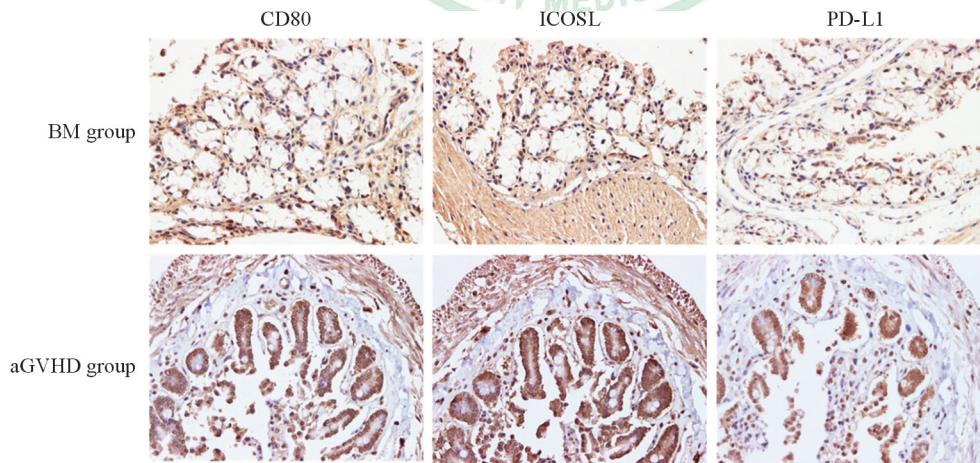


图 3 移植后 21 d 小鼠结肠组织中 CD80、ICOSL、PD-L1 表达

Fig 3 Expression of CD80, ICOSL and PD-L1 in colon tissues of mice 21 d after transplantation

BM: Bone marrow transplantation; aGVHD: Acute graft versus host disease; ICOSL: Inducible costimulator ligand; PD-L1: Programmed death-ligand 1. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. Original magnification: ×400

2.5 移植后 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 表达 移植后 21 d, aGVHD 组小鼠 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-17 表达均较骨髓移植组增加 [(18.000±1.803)% vs (11.900±2.476)%、

( $2.500 \pm 0.360$ )% vs ( $0.667 \pm 0.322$ )%], 而 IL-4 表达减少 [( $5.600 \pm 1.308$ )% vs ( $11.200 \pm 3.161$ )%], 差异均有统计学意义 ( $t=2.836, 3.450, 6.574, P=0.026, 0.003, 0.047$ )。

### 3 讨论

aGVHD 的病理生理过程包括 3 个阶段: (1) 预处理 (包括化学治疗和放射治疗) 导致患者组织、上皮细胞损伤, 释放相关炎症因子 IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等形成炎症; (2) 受体抗原提呈细胞黏附分子、共刺激分子和抗原表达增加, 使供体来源的 T 淋巴细胞活化继续分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等炎症因子, 从而导致 Th 向 Th1 极化; (3) 细胞毒性 T 淋巴细胞、细胞因子和天然免疫细胞共同攻击 aGVHD 靶器官, 引起相关靶细胞死亡, 靶器官出现 aGVHD 反应。在整个过程中, 共刺激分子发挥了重要作用。发生 aGVHD 时, 供体 T 淋巴细胞抗原受体与受体靶组织抗原提呈细胞表面抗原肽主要组织相容性复合物结合后产生第一信号。同时, T 淋巴细胞与抗原提呈细胞上多个共刺激分子结合产生第二信号, 活化供体 T 淋巴细胞。本研究探讨了 allo-HSCT 后小鼠 T 淋巴细胞表面 4 种共刺激分子的表达和 3 种 T 淋巴细胞亚群在 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的分布情况, 结果显示它们均与移植后 aGVHD 有关, 并且移植后共刺激分子的表达水平随着时间的推移而改变。受体在接受致死性  $\gamma$  射线照射后, 抗原提呈细胞可通过抗原提呈激活自身反应性 T 淋巴细胞, 进而引发 aGVHD<sup>[4-6]</sup>。CTLA-4 和 CD28 可竞争性结合 B7 分子活化淋巴细胞功能抗原 1 等分子, 从而阻止 T 淋巴细胞活化炎症因子风暴<sup>[7]</sup>。T 淋巴细胞与 aGVHD 的发生有关, 而 CTLA-4 可能通过调节 T 淋巴细胞活动调控 aGVHD 的严重程度<sup>[2-3]</sup>。本实验中, aGVHD 组小鼠 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面 CTLA-4 表达水平在 aGVHD 启动后 14~28 d 呈逐渐下降趋势, 且在 28 d 时低于骨髓移植组, 提示 CTLA-4 对 aGVHD 有抑制作用, 其表达水平可能和 aGVHD 严重程度有关。

本研究中, aGVHD 组小鼠在移植后 21 d 开始 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面正性共刺激分子 ICOS 的表达均逐渐增加, 说明随着时

间的推移 aGVHD 病情逐渐加重; 而骨髓移植组小鼠仅在  $\gamma$  射线照射后出现短暂辐照所致的靶组织损伤及炎症因子释放, 在移植后缓慢恢复正常, 故 ICOS 表达逐渐降低。研究表明, ICOS-免疫球蛋白融合蛋白能阻断 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞增殖并促进其凋亡, 转入 ICOS-免疫球蛋白融合蛋白的骨髓间充质干细胞干预可显著减轻 aGVHD 小鼠的症状, 验证了 ICOS 对 aGVHD 的正性推动作用<sup>[8]</sup>。

PD-1 与 CTLA-4 同为共抑制分子, 在移植后 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞及 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面表达均呈下降趋势。而由于 CD28 与 CTLA-4 竞争性结合 CD80/CD86, 移植后 aGVHD 组小鼠 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞及 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面的 CTLA-4 表达下降有助于 CD28 与其配体结合, 因此移植后 aGVHD 组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞及 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面 CD28 的表达水平逐渐升高。

由 H-E 染色结果可知, 移植后 aGVHD 小鼠小肠组织中可见明显的 aGVHD 表现, 如炎症细胞浸润、组织结构破坏等。DAB 染色结果显示, 相比骨髓移植组, 移植后 aGVHD 组小鼠 CD80、ICOSL、PD-L1 表达均增加, 提示共刺激分子与其配体结合产生第二信号增多, T 淋巴细胞活化增强, 促进了 aGVHD 的发生、发展, 这进一步验证了 ICOS 对 aGVHD 的促进作用。

既往研究报道, CTLA-4 表达上调时 IFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-22 等细胞因子表达下调, IL-4 表达明显上调<sup>[9-12]</sup>。ICOS 与其配体结合后 IFN- $\gamma$ 、IL-5、IL-13、IL-10 表达均增加, 而 IL-2 表达未见明显变化<sup>[13]</sup>。PD-1 和 PD-L1 结合可抑制 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞向 Th1 和 Th17 分化及炎症因子的释放<sup>[14]</sup>。在本研究中, 移植后 aGVHD 组小鼠 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面 CTLA-4、PD-1 表达较骨髓移植组减少, ICOS、CD28 表达增加, 第二信号增加, 从而促使效应 T 细胞及 Th 活化, IFN- $\gamma$ 、IL-17 表达增加, IL-4 表达减少, 最终导致 Th 向 Th1 极化, 使 aGVHD 进行性加重。

综上所述, 发生 aGVHD 时正性共刺激分子 CD28 和 ICOS 表达均逐渐增加, 负性共刺激分子 CTLA-4 和 PD-1 表达均逐渐减少, Th 向 Th1 极化。此外, CTLA-4、ICOS、PD-1 均可能通过调节 Th1、Th2、Th17 等 T 淋巴细胞亚群分布调控 aGVHD 的发生、发展。

## [参考文献]

- [1] WINGARD J R, MAJHAIL N S, BRAZAUSKAS R, WANG Z, SOBOCINSKI K A, JACOBSON D, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 2230-2239.
- [2] ZHENG J, LIU Y, LIU Y, LIU M, XIANG Z, LAM K T, et al. Human CD8<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 168ra9. doi: 10.1126/scitranslmed.3004943.
- [3] YOO J S, LEE Y J, YOON J W, HYUNG K E, HWANG K W. CTLA-4-Tg/CD-28-KO mice exhibit reduced T cell proliferation *in vivo* compared to CD-28-KO mice in a graft-versus-host disease model[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2012, 16: 349-353.
- [4] ZHANG Y, SHLOMCHIK W D, JOE G, LOUBOUTIN J P, ZHU J, RIVERA A, et al. APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8<sup>+</sup> T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease[J]. *J Immunol*, 2002, 169: 7111-7118.
- [5] SHLOMCHIK W D, COUZENS M S, TANG C B, MCNIFF J, ROBERT M E, LIU J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells[J]. *Science*, 1999, 285: 412-415.
- [6] DUFFNER U A, MAEDA Y, COOKE K R, REDDY P, ORDEMANN R, LIU C, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease[J]. *J Immunol*, 2004, 172: 7393-7398.
- [7] DILLON T J, CAREY K D, WETZEL S A, PARKER D C, STORK P J. Regulation of the small GTPase Rap1 and extracellular signal-regulated kinases by the costimulatory molecule CTLA-4[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 4117-4128.
- [8] XU H, LI X, LIU D, LI J, ZHANG X, CHEN X, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility[J]. *Nature*, 2013, 496: 523-527.
- [9] ZHU F, ZHONG X M, QIAO J, LIU Q, SUN H Y, CHEN W, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 down-regulates T helper 1 cells by increasing expression of signal transducer and activator of transcription 3 in acute graft-versus-host disease[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22: 212-219.
- [10] TSUCHIYAMA J, YOSHINO T, SAITO T, FURUKAWA T, ITO K, FUSE I, et al. Cutaneous lymphocyte antigen-positive T cells may predict the development of acute GVHD: alterations and differences of CLA<sup>+</sup> T- and NK-cell fractions[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2009, 43: 863-873.
- [11] BETTS B C, SAGATYS E M, VEERAPATHRAN A, LLOYD M C, BEATO F, LAWRENCE H R, et al. CD4<sup>+</sup> T cell STAT3 phosphorylation precedes acute GVHD, and subsequent Th17 tissue invasion correlates with GVHD severity and therapeutic response[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97: 807-819.
- [12] ZHAO K, ZHAO D, HUANG D, YIN L, CHEN C, PAN B, et al. Interleukin-22 aggravates murine acute graft-versus-host disease by expanding effector T cell and reducing regulatory T cell[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97: 807-819.
- [13] 王斌, 杨建民. 可诱导共刺激分子在造血干细胞移植中的作用[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2007, 16: 76-78.
- [14] KARIM R, JORDANOVA E S, PIERSMA S J, KENTER G G, CHEN L, BOER J M, et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1<sup>+</sup> T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 6341-6347.

[本文编辑] 杨亚红