

TLR4 与小鼠半相合造血干细胞移植后急性 GVHD 关系的实验研究

吴迪¹, 张伟², 刘亚林¹, 习杰英¹

(¹西安交通大学医学院第一附属医院血液科, 陕西 西安 710061; ²西安市第四医院外科, 陕西 西安 710004)

[摘要] 目的: 探讨 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)对半相合造血干细胞移植(HSCT)小鼠急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, a-GVHD)的影响及其可能机制。方法: 建立小鼠半相合 HSCT 模型, 随机分为实验 1 组($n=12$): 每只小鼠按 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 输注 TLR4 激动剂-脂多糖(LPS); 实验 2 组($n=12$): 每只小鼠按 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 输注 TLR4 单克隆抗体; 对照组($n=12$): 其中 6 只小鼠按 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 输注灭菌生理盐水, 另 6 只半相合 HSCT 移植后不作任何处理。观察各组小鼠的 a-GVHD 临床表现及生存时间, 检测小鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)变化情况, 并于移植后 14 d 对小鼠肝脏进行病理分析。结果: 与对照组相比较, 实验 2 组的 GVHD 严重程度、生存率以及病理改变均明显轻于对照组($P < 0.05$), 而实验 1 组的上述改变则明显较对照组为重。结论: 针对 TLR4 的抑制剂对半相合 HSCT 小鼠的 a-GVHD 具有一定的预防作用。

[关键词] Toll 样受体; 造血干细胞移植; 急性移植物抗宿主病

[中图分类号] R457.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-462-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130408

The relationship between TLR4 and acute graft-versus-host disease in murine haploidentical hematopoietic stem cell transplantation model

Wu Di¹, Zhang Wei², Liu Yalin¹, Xi Jieying¹

(¹Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061;

²Department of Surgery, Forth Hospital of Xi'an, Xi'an 710004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Toll-Like receptor 4 (TLR4) on the severity of acute graft-versus-host disease (GVHD) after haploidentical stem cell transplantation (HSCT) in mouse and explore its potential mechanism. **Methods:** Establish a mouse model of MHC haploidentical bone marrow transplantation. The mice were randomly divided into the experimental group 1 ($n=12$): each mouse was received 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ infusion of TLR4 agonist LPS; the experimental group 2 ($n=12$): each mouse was received 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ infusion of TLR4 monoclonal antibody; the control group ($n=12$): six mice were received 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ infusion of sterile saline; other six mice without any treatment after transplantation. We observed the clinical manifestation of GVHD and the survival rate by using Kaplan-Meier analysis. On the 14th day after transplantation, the histopathology of GVHD was evaluated in the liver, and the change of serum IL-1 β , TNF- α was detected. **Results:** Compared with the control group, the mice in the experimental group 2 had reduced severity of acute GVHD symptoms, improved survival rate ($P < 0.05$) and less histopathological evidence of GVHD. Correspondingly, the above changes of the mice in the experimental group 1 were severe. **Conclusion:** The TLR4 inhibitors can prevent acute GVHD in murine haplo-HSCT model.

[Key words] TLR4; transplantation of hematopoietic stem cell; acute GVHD

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 462-466]

造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)业已成为根治多种恶性血液病的重要手段。由于同胞全相合的几率较低(约 25%), 而非血缘移植受供者限制, 因此用半相合的亲缘供者作为干细胞来源, 成为近年来治疗恶性血液病的

有效方法^[1]。相比同胞全相合移植, 半相合造血干细胞移植(haploidentical hematopoietic stem cell transplantation, haplo-HSCT)的最大障碍是移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)^[2]。目前临床上常用的控制 GVHD 的方法包括移植前去除移植物

中的淋巴细胞,或在移植后给予大量的免疫抑制剂。但这些方法均存在较为严重的并发症:去除移植中的T淋巴细胞在一定程度上减轻了GVHD,但肿瘤的复发率增大,移植物成活的几率降低,延迟了免疫重建^[3];如果长期应用免疫抑制剂可引起肿瘤、感染和各种代谢性疾病。因此,通过揭示GVHD的发生机制并藉此寻找新的防治GVHD的方法就显得颇为重要。现有的资料表明人体固有免疫反应在急性GVHD(a-GVHD)的发生发展中起主要作用^[4-5],脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)能够激活固有免疫反应受体——Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs),并引起细胞因子释放的级联瀑布效应,而这与a-GVHD的发展关系密切^[6-7]。本研究通过建立小鼠半相合HSCT模型,探讨TLR4激活和抑制两种状态下小鼠a-GVHD发生发展变化情况及其可能机制,为寻找新的防治a-GVHD靶点奠定实验基础,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

BALB/c小鼠(H-2^d):为实验组受鼠,雌性,体重18~20g;BALB/c×C57BL/6杂交鼠CB6F1(H-2^{d/b}):为半相合异基因供鼠,雄性,体重18~20g。供、受鼠为清洁级动物,购于第四军医大学实验动物中心,饲养在该中心层流房千级仓中。

1.1.2 主要试剂与仪器

TLR4单克隆抗体(Biolegend公司,美国);LPS(Sigma公司,美国);RPMI 1640培养基、胰蛋白酶(Gibco公司,美国);小牛血清(民海生物工程有限公司,兰州);5430型离心机(Eppendorf公司,德国);CX21普通显微镜、CKX31-A12PHP倒置相差显微镜(Olympus公司,日本);FACSCalibur流式细胞仪(Becton-Dickson公司,美国);ML00159-00型CO₂培养箱(三洋公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠半相合移植模型建立^[8]

1.2.1.1 移植前预处理

BALB/c小鼠于照射前5d开始饲喂含有庆大霉素(32×10⁴U/L)和红霉素(250mg/L)的灭菌蒸馏水,直至移植后2周。移植前6h,以⁶⁰Co全身照射8.5Gy,剂量率为228cGy/min,照射35min,照射源与动物之间距离约为50cm。

1.2.1.2 制备移植细胞

取CB6F1(H-2^{d/b})雄性小鼠作为供鼠,无菌条件下将脾脏剪碎后,滴加RPMI1640液研磨,经200目金属网过滤,制成脾细胞悬液备用;取小鼠股骨、胫骨,去干骺端,用注射器冲洗出骨髓腔内的骨髓细胞,轻轻吹散细胞,250g离心5min,弃上清,用RPMI1640制成细胞悬液,备用。

1.2.1.3 骨髓移植方法

受鼠BALB/c接受照射后4h,将等体积混合的2.0×10⁷个/ml的供鼠脾细胞和3.0×10⁶个/ml的供鼠骨髓细胞悬液,从受鼠尾静脉注射,0.3ml/只。

1.2.2 实验分组

随机分为实验1组(n=12):每只小鼠按20μg/kg输注TLR4激动剂——脂多糖(LPS);实验2组(n=12):每只小鼠按200μg/kg输注TLR4单克隆抗体;对照组(n=6):其中6只小鼠按20μg/kg输注灭菌生理盐水,另6只半相合HSCT移植后不作任何处理。

1.2.3 半相合HSCT小鼠a-GVHD的监测指标及判定标准

1.2.3.1 监测指标

①大体及实验室检测指标:外周血白细胞计数(处理后第7、14、21、28天每组随机取3只小鼠,尾静脉采血20μl,并立即在显微镜下用血细胞计数板测白细胞数值)、生存时间、体重、食欲、外观、腹泻、出血或黏膜炎症等;②病理学检查:取濒死或移植后14d各组小鼠(随机取3只)肝脏组织,用10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜观察。

1.2.3.2 判定标准

小鼠出现食欲下降、体重下降、皮毛粗乱、弓背、嗜睡或活动减少、腹泻、出血或黏膜炎症等表现;病理检查可见不同程度肝组织淋巴细胞浸润,正常组织结构破坏,伴有局灶性出血等改变判为急性GVHD。

1.2.4 小鼠血清中白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)变化情况

采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测转染前后细胞培养上清中IL-1β和TNF-α含量。分别将抗小鼠IL-1β/TNF-α单抗包被于酶标板上,标准品与样品中的小鼠IL-1β/TNF-α与单抗结合,加入生物素化的抗小鼠IL-1β/TNF-α,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的Streptavidin与生物素结合,加入酶底物OPD,出现黄色,加终止液硫酸,颜色变深,在492nm处测吸光度值,人IL-1β/TNF-α

浓度与吸光度值成正比,通过绘制标准曲线求出标本中小鼠 IL-1 β /TNF- α 浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,生存时间比较采用 Log-rank 检验,外周血白细胞计数及血清 IL-1 β /TNF- α 的比较采用单因素方差分析,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 半相合 HSCT 后各组小鼠 a-GVHD 发生情况

2.1.1 临床症状

半相合 HSCT 后小鼠出现食欲下降、皮毛粗乱、弓背和活动减少等 a-GVHD 临床表现。实验 1 组小鼠于移植后 6 d 出现上述 GVHD 症状;实验 2 组小鼠于移植后 10 d 出现上述症状;对照组小鼠于移植后 8 d 出现上述症状,移植后输注生理盐水与不做处理两种方法无显著差别。

2.1.2 外周血白细胞计数变化

与对照组比较,实验 1 组白细胞下降速度较快,全部在 2 周内死亡,实验 1 组外周血白细胞在移植并 LPS 处理后第 7、14 天显著低于对照组和实验 2 组($P < 0.05$);而实验 2 组白细胞下降速度平缓,实验 2 组外周血白细胞在移植并 TLR4 单抗处理后第 7、14 天显著高于实验 1 组($P < 0.05$),而与对照组相比,第 7 天差异无显著性($P > 0.05$),第 14、21 天显著升高($P < 0.05$,表 1)。

表 1 小鼠半相合 HSCT 处理后外周血白细胞变化

Table 1 The changes of mice peripheral blood leukocytes after haplo-HSCT and dealt with TLR4

组别	移植并做相应处理后时间(d)			
	7	14	21	28
对照组	5.97 \pm 0.13	4.30 \pm 0.15	2.28 \pm 0.20	-
实验 1 组	4.43 \pm 0.21*	2.46 \pm 0.25*	-	-
实验 2 组	6.03 \pm 0.16 Δ	5.45 \pm 0.25* Δ	3.60 \pm 0.20*	3.26 \pm 0.16

与对照组相比,* $P < 0.05$;与实验 1 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

2.1.3 生存状况

实验 1 组于移植后 6 d 出现死亡,实验 2 组于移植后 14 d 出现死亡,而对照组则于移植后 10 d 出现死亡(图 1)。实验 1 组、实验 2 组及对照组中位生存时间(median survival time)分别为 10.80、21.80 及 13.80 d;实验 1 组与实验 2 组相比, $P < 0.01$;实验 1 组与对照组相比, $P < 0.05$;实验 2 组与对照组相

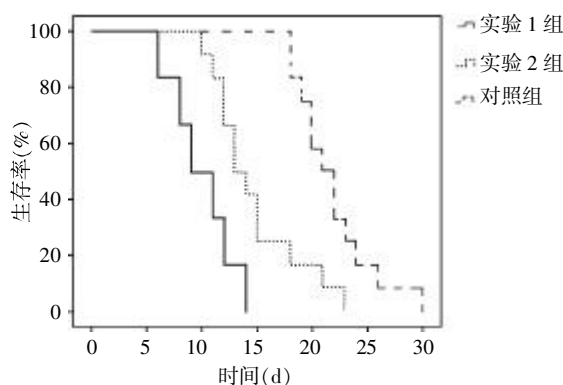


图 1 各组小鼠生存曲线

Figure 1 Survival curves of mice in each group

比, $P < 0.01$ 。

2.2 半相合 HSCT 并相应处理后小鼠肝脏病理改变

实验 1 组:肝细胞浊肿,点灶状坏死,肝血窦及中央汇管区内有淋巴细胞浸润,病理改变为 GVHD II~III 级;实验 2 组:肝细胞肿胀,排列紊乱,肝索变窄,汇管区、中央静脉和肝血窦扩张、淤血,肝血窦及中央汇管区内有淋巴细胞浸润,散在少数嗜酸小体,病理改变为 GVHD I 级,明显轻于实验 1 组,仅为轻度炎症反应;对照组:肝细胞斑点状肿胀,排列紊乱,汇管区、中央静脉和肝血窦扩张、淤血,有淋巴细胞浸润,病理改变为 GVHD II 级,移植后输注生理盐水与不做处理两种方法无显著差别(图 2)。

2.3 半相合 HSCT 并相应处理后小鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 测定

小鼠移植并相应处理后第 7 天血清中 IL-1 β 、TNF- α 的变化情况,结果显示实验 1 组 IL-1 β 、TNF- α 水平明显高于对照组 [(45.58 \pm 0.83)pg/ml vs (32.32 \pm 0.67)pg/ml, $P < 0.01$; (112.55 \pm 2.17)pg/ml vs (77.04 \pm 3.84)pg/ml, $P < 0.01$];实验 2 组这两种因子水平则较对照组明显下降 [(24.22 \pm 0.67)pg/ml vs (32.32 \pm 0.67)pg/ml, $P < 0.01$; (49.41 \pm 2.43)pg/ml vs (77.04 \pm 3.84), $P < 0.01$,图 3]。

3 讨论

异基因 HSCT 是目前治愈多种血液系统恶性肿瘤的有效手段之一,近年来随着异基因 HSCT 技术的发展,移植成功率与长期生存率都有了很大的提高,但 GVHD 和移植排斥一直是影响半相合 HSCT 成功的关键因素。目前认为 GVHD 的发生发展分为 4 个阶段并形成正反馈回路而无限发展下去^[2,9];由于疾病的本身损害以及放化疗的存在所导致的组织

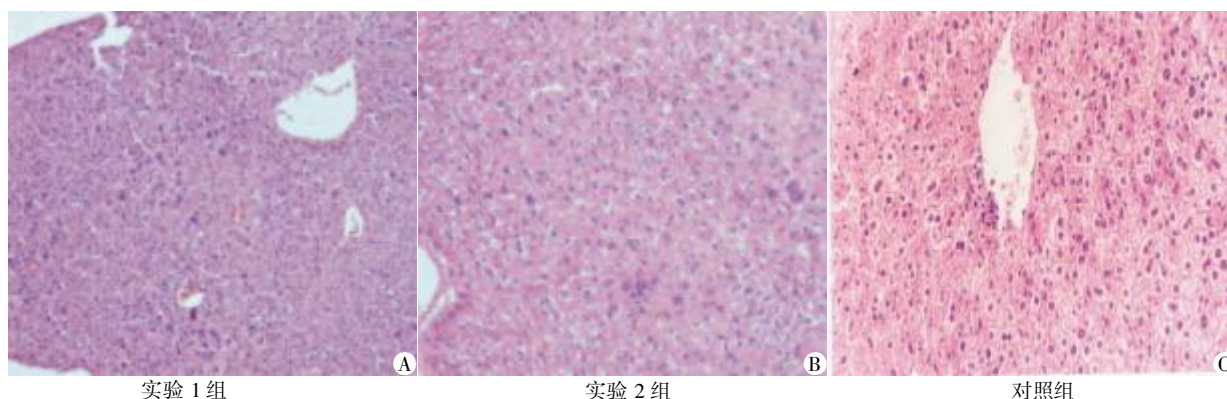


图 2 各组小鼠肝脏病理改变(HE 染色,×200)
Figure 2 Liver pathology of mice in each group(HE,×200)

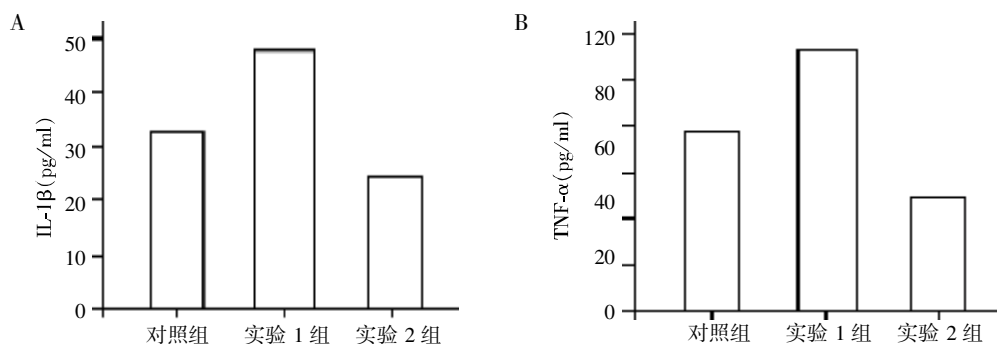


图 3 各组小鼠半相合 HSCT 并相应处理后第 7 天血清 IL-1 β 、TNF- α 测定
Figure 3 IL-1 β ,TNF- α determination of mice serum in the 7th day after haplo-HSCT and dealt accordingly

损伤能够激活并增强抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APCs) 功能;肠道菌群释放病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 和细胞因子能够激活固有免疫系统导致细胞因子释放级联瀑布效应并参与组织损害;宿主造血系统来源 APCs 对于 GVHD 的始动环节非常重要,当然供者 APCs 和宿主非造血系统来源 APCs 在 GVHD 发生中的作用同样不能忽视;随着 APCs 将抗原提呈给 T 细胞,会引起强烈的细胞因子反应,这些细胞因子反过来又能促进抗原提呈和效应 T 细胞的重新募集;最终,效应 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞以及前炎症因子(如 TNF)导致了效应器官的损害,如果这种组织损害没有得到及时有效的控制,最终将导致 GVHD 严重阶段的发生,而此时的 GVHD 将很难被控制。

TLRs 是一类主要表达在 DC、巨噬细胞等 APC 上的跨膜蛋白,能够特异性识别 PAMPs,如 TLR4 识别革兰阴性菌的 LPS;TLR3 识别病毒感染时产生的双链 RNA,而 TLR9 识别原核染色体和 DNA 病毒中的未甲基化 CpG DNA 基序等^[10-12]。TLRs 在宿主

免疫系统对病原体的抵御过程中起着关键性的作用,可以说 TLRs 控制着 APC 对适应性免疫应答的激活^[13-14]。有研究显示 LPS 能够引起免疫系统细胞因子释放的级联瀑布效应,而这与 a-GVHD 的发展关系密切^[5];另外,在小鼠和临床患者的观察中均发现 TLR4(LPS 受体)编码基因突变能够降低 GVHD 的发生风险^[6]。因此,本研究选择探索体内 TLR 受体抑制剂来改善 GVHD 的效果及可行性。

通过构建 MHC 单体型半相合 HSCT 小鼠 a-GVHD 模型,本研究发现,移植后 TLR4 通路的激活与否对小鼠的 a-GVHD 临床表现有明显影响:与对照组相比较,实验 2 组注射了 TLR4 单克隆抗体的小鼠 a-GVHD 临床症状的出现更晚、白细胞下降的速度更慢($P < 0.05$)移植后小鼠生存时间更长,而实验 1 组(即给予 TLR4 激动剂的小鼠)的上述数据较对照组为重。为了对半相合 HSCT 后小鼠 a-GVHD 确诊以及严重程度进行判定,本研究作了小鼠的大体病理和组织切片检查,肝脏组织病理切片 HE 染色显示:对照组小鼠肝脏正常组织结构破坏,大量出血,淋巴细胞浸润增多,实验 2 组的这类症状明显减

轻,而实验1组的病理改变较对照组为重。可见TLR4对于a-GVHD发生、预处理损伤的发生以及小鼠的生存时间具有一定的影响。为进一步探讨TLR4对a-GVHD发生、发展影响的可能机制。本文检测了小鼠移植并相应处理后第7天血清中IL-1 β 、TNF- α 水平,结果显示实验2组IL-1 β 、TNF- α 水平明显低于对照组,而实验1组这两种因子水平则显著高于对照组。以上结果提示TLR4对a-GVHD发生、发展影响可能是通过调节体内炎症因子的释放来实现的,当然这需要进一步的机制研究来证实。因此在后续的实验中,本文将通过基因芯片等方法来进一步揭示TLR4对a-GVHD发生、发展影响的可能机制,并探索调节TLR4通路最佳方法、剂量及干预时机等,为临床防治GVHD提供更好方法和手段。

综上所述,在一定条件下(如组织损害、LPS释放),TLR4通路激活并通过调节体内炎症因子(如IL-1 β 、TNF- α)的释放,能够显著增加a-GVHD发生、发展的严重程度,而针对TLR4通路的负性调节能够在一定程度上起到预防GVHD发生并减轻其严重程度的作用,进一步研究其作用机制和(或)同其他预防GVHD方法联合可能为预防和治疗GVHD提供新的策略。

[参考文献]

- [1] Pasquini MC, Wang Z, Horowitz MM, et al. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders[J]. *Clin Transpl*, 2010; 87-105
- [2] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, et al. Graftversushost disease[J]. *Lancet*, 2009, 373(9674): 1550-1561
- [3] Broady R, Yu J, Chow V, et al. Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells[J]. *Blood*, 2010, 116(25): 5748-5751
- [4] Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graftversushost disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Blood*, 2000, 95(9): 2754-2759
- [5] Penack O, Holler E, van den Brink MR. Graftversushost disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors[J]. *Blood*, 2010, 115(10): 1865-1872
- [6] Imado T, Iwasaki T, Kitano S, et al. The protective role of host Toll-like receptor4 in acute graftversushost disease[J]. *Transplantation*, 2010, 90(10): 1063-1070
- [7] Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, et al. MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graftversushost disease[J]. *Gut*, 2010, 59(8): 1079-1087
- [8] 王三斌, 郭坤元, 胡灯明, 等. 小鼠同种异体骨髓移植GVHD模型的建立[J]. *实验动物科学与管理*, 2006, 23(2): 10-14
- [9] Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 139-170
- [10] Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors[J]. *Science*, 1999, 285(5428): 732-736
- [11] Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines[J]. *J Immunol*, 2002, 168(2): 554-561
- [12] Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(5): 495-502
- [13] Schmidt KN, Leung B, Kwong M, et al. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 138-143
- [14] Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, et al. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity[J]. *Cell Immunol*, 2006, 241(2): 102-112

[收稿日期] 2012-11-14