

白介素-11 对小鼠异基因骨髓移植后 aGVHD 的预防作用

庄 强 江松福 梁 彬 俞 康 陈必成

摘 要 **目的** 评估白介素-11 (Interleukin-11, IL-11) 对小鼠异基因骨髓移植 (allo-BMT) 后急性移植物抗宿主病 (aGVHD) 的预防作用。**方法** 用主要组织相容性抗原 (MHC) 完全不合的纯种近交系 SPF 级小鼠, 雄 C57BL/6 (H-2b) 为供鼠, 雌性 BALB/C (H-2d) 为受鼠, 建立 allo-BMT/aGVHD 动物模型, 随机分 3 组: 模型对照组、IL-11 组 (剂量为 $500\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)、环孢素 A (CsA) 组 (剂量为 $10\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$), 观察其对 aGVHD 的预防作用。**结果** IL-11 组、CsA 组受鼠生存时间均长于模型对照组 ($P < 0.01$); IL-11 组、CsA 组受鼠 aGVHD 临床表现和病理改变均较模型对照组明显轻。IL-11 组、CsA 组之间平均生存时间比较无统计学差异 ($P = 0.901$)。**结论** IL-11 可有效预防小鼠 allo-BMT 后 aGVHD, 减轻其症状和病理损害程度, 显著延长平均生存时间。

关键词 白介素-11 移植物抗宿主病 急性 异基因骨髓移植 小鼠

Prevention of Acute Graft-versus-host Disease by Interleukin-11 in a Murine Allogeneic Bone Marrow Transplantation Model. Zhuang Qiang, Jiang Songfu, Liang Bin, Yu Kang, Chen Bicheng. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325003, China

Abstract Objective To evaluate the prophylactic effect of interleukin-11 (IL-11) on acute graft-versus-host disease (aGVHD) in a murine allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT) model. **Methods** Acute GVHD was induced in male BALB/C (H-2d) mice by total body irradiation (TBI) followed by female allogeneic C57BL/6 (H-2b) bone marrow and spleen cells transplantation. The experiment groups were designed as follows: control group, IL-11 ($500\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$) group, cyclosporine A ([CsA, $10\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]) group. The occurrence of aGVHD was assessed by signs of weight loss, diarrhea, ruffled fur, hunched posture and histologic changes of skin, liver and small intestines. **Results** The survival time of IL-11 group and CsA group were prolonged as compared with that of the control group ($P < 0.01$). aGVHD signs and histologic changes of IL-11 group and CsA group were milder than those of the control group. **Conclusion** IL-11 can be effective in prevention for aGVHD after allo-BMT in a murine model. It can decrease the aGVHD signs and histologic changes, and markedly prolong mean survival time.

Key words Interleukin-11; Acute graft versus host disease; Allogeneic bone marrow transplantation; Mouse

异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 是目前血液系统肿瘤的有效治疗手段。对于许多没有相关全相合或无关全相合造血干细胞供者的恶性血液病患者来说, 用半相合的亲属或部分相合无关供者的造血干细胞作为干细胞来源, 成为治疗恶性血液病的必然选择。急性移植物抗宿主病 (aGVHD) 是异基因骨髓移植的常见并发症, 发生率在 30%~90%, 与 aGVHD 直接或间接有关的移植相关病死率高达 50%^[1]。探索降低或减轻 aGVHD 的发生率及程度的方法, 对临

床 HSCT 有重要意义。我们用 IL-11 对 aGVHD 的预防作用进行了小鼠实验观察, 现报道如下。

对象与方法

1. 对象: 实验动物用 SPF 级雄性 C57BL/6 (H-2^b) 为供鼠, 雌性 BALB/C (H-2^d) 为受鼠, 均为 6~8 周龄, 体重为 18~22g 之间。实验动物均购于温州医学院, 许可证号: SYXK (浙) 2005-0061。受鼠饲养于温州医学院外科学实验室 SPF 级动物房内, 饲养温度 25℃, 相对湿度 70%, 昼夜照明 12h/12h。饲料及饮水经灭菌处理, 移植受鼠前 5 天开始饮用含红霉素 (250mg/L) 和庆大霉素 (320mg/L) 的无菌水, 并持续至移植后 3 周, 进行肠道净化。

2. 方法: (1) 主要试剂: 白介素-11 (IL-11) 原药由杭州九源基因工程有限公司提供, 溶于 PBS 中, 配制浓度为 $5\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ ^[2]; 环孢素 A (CsA) 为瑞士 Sandoz 公司产品, 溶于无菌生理盐水, 配制浓度为 $200\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ 。(2) 小鼠 aGVHD 模

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y207422); 浙江省医药卫生科学研究基金 (Y200710439); 温州市科技局科技合作项目 (H20090010)

作者单位: 325003 温州医学院附属第一医院血液科 (庄强、江松福、梁彬、俞康); 325003 温州市外科学重点实验室 (陈必成)

通讯作者: 江松福, 电子邮箱: jiangsongfu@189.cn

型复制:参照文献方法^[3]无菌条件下制备骨髓细胞和脾细胞悬液,均调整细胞浓度为 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 。受鼠移植前接受直线加速器全身照射(TBI),剂量:8.0Gy,照射距离:50cm,照射时间:8min,剂量率:1.0Gy/min。TBI后4~6h内经尾静脉注入含 2×10^7 个骨髓细胞和 2×10^7 个脾淋巴细胞的混合细胞悬液,观察aGVHD发生情况。(3)实验动物分组:受鼠随机分3组,每组10只,分别给予不同的aGVHD预防方案:①IL-11组:IL-11 500 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[2],皮下注射,从移植前2天(-2天)开始用药;②CsA组:CsA10mg/(kg·d),灌胃,从移植前2天(-2天)开始用药;③模型对照组,等量无菌生理盐水灌胃。(4)观察指标:定期球后静脉取血计数各组外周血白细胞;观察小鼠的生存期;观察各组受鼠体重、体型、体位、毛发、腹泻等临床表现;病理检查:取濒死小鼠的皮肤、肝及小肠组织,用4%中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,苏木精-伊红染色(HE染色)后检查,观察aGVHD病理表现,并按Thomas GVHD病理组织学分级标准判定。(5)统计学处理:计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过SPSS15.0专业统计软件进行分析,采用ANOVA方差分析,两两比较采用SNK法。

结 果

1. 移植后各组小鼠的外周血白细胞变化:本实验测得正常BALB/c小鼠白细胞计数为 $9.56 \times 10^9/\text{L}$,移植后各组小鼠的外周血白细胞计数明显低于移植前。移植后6天时各组白细胞总数降至最低点,对照组、CsA组、IL-11组分别为 $1.36 \times 10^9/\text{L}$ 、 $1.24 \times 10^9/\text{L}$ 、 $1.35 \times 10^9/\text{L}$,各组之间差异无显著性($P > 0.05$)。白细胞数量移植后9天渐有升高趋势,移植后15~21天白细胞总数基本恢复正常(图1)。

2. allo-BMT后小鼠平均生存时间(MST):CsA

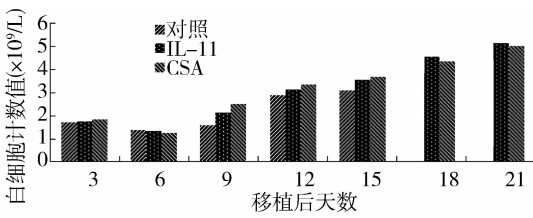


图1 移植后各组小鼠外周血白细胞计数

组和IL-11组MST较模型对照组明显延长($P < 0.01$)。CsA组和IL-11组之间MST比较无统计学差异($P = 0.901$)(表1)。

表1 allo-BMT后小鼠平均生存时间(MST)

组别	鼠数(只)	aGVHD 预防方案	MST(天)	P
模型对照组	10	等量无菌生理盐水	11.30 ± 2.11	
IL-11组	10	IL-11 500 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$	25.60 ± 9.98	0.000
CsA组	10	CsA 10mg/(kg·d)	26.10 ± 7.63	0.000

P为各组与模型对照组比较结果

3. 不同预防方案对小鼠aGVHD的预防效果:

(1) aGVHD临床表现(图2):模型对照组的移植小鼠于+3~+5天即出现体重减轻、翘毛、活动减少、腹泻、弓背体位、皮肤脱毛等aGVHD临床表现,小鼠的死亡高峰期在+12~+15天,病死率达100%。CsA组于+8~+12天左右出现体重减轻、轻度弓背体位、翘毛、腹泻等aGVHD临床表现,但明显轻于模型对照组。IL-11组于+8~+10天出现aGVHD症状,临床表现较模型对照组明显减轻,而稍重于CsA组,GVHD出现高峰后移明显。(2) aGVHD病理表

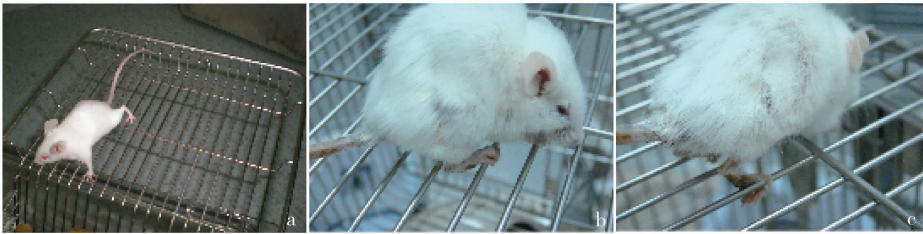


图2 正常小鼠与aGVHD小鼠的临床表现

a. 为正常小鼠表现,b、c. 小鼠为aGVHD表现(b. 弓背、倦怠、翘毛;c. 脱毛)

现:对照组表现为皮肤组织中有较多淋巴细胞浸润,局灶性上皮与真皮分离。肝脏汇管区及毛细胆管周围较多淋巴细胞浸润,肝细胞浊肿、点状坏死。肠管黏膜上皮坏死脱落,小肠绒毛有较多淋巴细胞浸润,绒毛结构破坏,隐窝消失。病理检查符合Thomas GVHD病理分级Ⅲ~Ⅳ级改变;IL-11组、CsA组aGVHD病理改变明显轻于模型对照组,受鼠仅皮肤、

肝脏汇管区或小肠有少量淋巴细胞浸润,符合Ⅰ~Ⅱ级GVHD病理改变(第127页彩图4~彩图6)。

讨 论

近年来对aGVHD发病机制的研究提示胃肠道受损在aGVHD的发生和发展过程中起着主要的病理生理作用^[4-6];简而言之,高剂量的预处理导致受者组织器官损伤,尤其是胃肠道首当其冲。肠道内细

菌的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 通过受损的肠黏膜渗入邻近的组织 and 血液。LPS 和坏死的细胞成分活化了不同细胞表面的 toll 样受体。toll 样受体的激活一方面使多种细胞分泌炎症性细胞因子,启动了原发免疫 (innate immunity) 引起受损肠黏膜进一步的损伤;另一方面,激活了已捕获受损肠黏膜细胞抗原的树突状细胞,使之迁徙到 Peyer's 结等淋巴器官内发育成熟,并将抗原递呈给供者 T 细胞。供者 T 细胞增殖活化并出现异种抗原反应,释放 IL-2 和 γ 干扰素 (IFN γ) 启动获得性免疫反应 (acquired immunity) 引起局部组织的进一步损伤。炎症和损伤的恶性循环导致局部损伤不断扩大。另外, Toll 样受体的活化阻断了调节 T 细胞抑制作用,进而使得活化的供者 T 细胞进入血液循环、迁移并损伤其他器官,如皮肤和肝脏。此细胞因子紊乱的网络效应表现为严重的炎症反应,即急性 GVHD。理论上,通过保护胃肠道黏膜屏障,减少预处理方案对胃肠道的破坏,可预防和治疗 aGVHD。IL-11 由纤维细胞、上皮细胞和软骨细胞等基质细胞受刺激产生^[7]。近来发现 IL-11 作用比较广泛,具有强大的抗炎特性^[8],其机制为抑制核因子 κ B (NF- κ B) 的迁移。IL-11 还是重要的造血调节因子,其作用主要是单独或与其他细胞因子协同刺激骨髓造血干细胞的增生和分化成熟,促进巨核系、红系和粒系造血生成^[9]。IL-11 受体为 I 类细胞因子受体超家族成员,与 IL-6 受体同属一家族^[10]。能在免疫系统发挥作用,另外尚能抑制肥胖、调节神经元分化、刺激金属蛋白的酶-1 组织抑制因子产生和激活破骨细胞。IL-11 对于胃肠道放化疗或缺血的损伤有直接的保护作用^[11], IL-11 已被广泛应用于放、化疗后的临床治疗^[12]。

研究表明, IL-11 对 aGVHD 引起的肠道黏膜损害的保护作用可能与以下机制有关^[2]: IL-11 在 aGVHD 的发病机制中起细胞因子级联作用。急性 GVHD 的发展是一个分 3 阶段的过程。单核-吞噬细胞和其他辅助细胞触发抗宿主反应,经与细胞因子之间复杂的相互作用后损伤宿主组织。第 1 阶段, IL-11 能阻止 LPS 从肠道内腔易位至血循环,来减轻预处理对肠道黏膜的损伤。第 2 阶段, IL-11 能削弱宿主巨噬细胞对全身照射后分泌的 TNF α 的敏感性,同时也能减少宿主抗原递呈细胞分泌 IL-12。从而, IL-11 抑制供者 T 细胞分泌 IFN γ ,降低体内 TNF α ,而细胞毒性 T 淋巴细胞功能未受影响。最后达到减轻靶器官损害,改善生存。本实验选择 C57BL

/6 $\rightarrow$ BALB / c 小鼠异基因移植模型,受鼠在移植后 1 周左右白细胞开始上升, 2~3 周白细胞基本恢复至接近正常, 2~3 周受鼠骨髓细胞中, XY 染色体出现率为 16/20~20/20, 表明异基因骨髓细胞已种植。模型对照组小鼠临床及病理均符合典型 GVHD 表现, 20 天内全部死亡, 证明小鼠 GVHD 模型复制成功。本实验在已建立的小鼠 aGVHD 模型上, 灌胃给予 IL-11 500 μ g/(kg $\cdot$ d), 受鼠 aGVHD 临床和病理表现均较模型对照组明显减轻, 生存时间显著延长、和 CSA 组比较, IL-11 组 aGVHD 的临床表现稍重于 CSA 组, 病理表现相似, 两组之间生存时间无统计学差异。本研究表明 IL-11 具有预防小鼠 allo-BMT 后 aGVHD 的作用, 为 IL-11 应用于 allo-HSCT 后 GVHD 的预防提供了有力的实验依据。

参考文献

- Cutler C, Antin JH. Novel drugs for the prevention and treatment of acute GVHD[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(20):1962-1973
- Geoffrey RH, Kenneth RC. Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation[J]. J Clin Invest, 1998, 102(1):115-1123
- 蔡芳芳, 俞康, 江松福. 小鼠同种异基因骨髓移植 aGVHD 动物模型的建立[J]. 温州医学院学报, 2009, 39(4):320-324
- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell Transplantation. N Engl J Med, 2006, 354(17):1813-1826
- Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. Semin Hematol, 2006, 43(1):3-10
- 余建, 黄河. 肠道急性移植抗宿主病. 国外医学输血及血液学分册, 2004, 27(2):110-113
- Leng SX, Ellias JA. Interleukin-11. Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29(8-9):1059-1062
- Opal SM, Keith JC, Palardy JE, et al. Recombinant human interleukin-11 has anti-inflammatory actions yet does not exacerbate systemic Listeria infection[J]. J Infect Dis, 2000, 181(2):754-756
- Oeberg F, Wu S. Cytokine-induced restoration of differentiation and cell cycle arrest in v-myc transformed u-937 monoblasts correlates with reduced Myc activity[J]. Leukemia, 2001, 15(2):217-229
- Kurth I, Horsten U, Pflanz S, et al. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. J Immunol, 1999, 162(3):1480-1487
- Van der Meeren A, Mouthon MA, Gaugler MH, et al. Administration of recombinant human IL-11 after supralethal radiation exposure promotes survival in mice: interactive effect with thrombopoietin[J]. Radiat Res, 2002, 157(6):642-649
- Isaacs C, Robert NJ, Bailey FA, et al. Randomized placebo-controlled study of recombinant human interleukin-11 to prevent chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with breast cancer receiving dose-intensive cyclophosphamide and doxorubicin. J Clin Oncol, 1997, 15(11):3368-3377 (收稿:2009-12-28)