

## 应用白消安联合氟达拉滨预处理方案建立小鼠半相合骨髓移植移植物抗宿主病模型

李乃农 胡晚育 李晓帆 杨雯 陈萍 陈元仲

**Establishment of a graft-versus-host disease mouse model for haplo- identical bone marrow transplantation with busulfan and fludarabine conditioning regimen** Li Nainong, Hu Wanyu, Li Xiaofan, Yang Wen, Chen Ping, Chen Yuanzhong

Corresponding author: Li Nainong, Department of Hematology, Fujian Institute of Hematology, Fujian Provincial Key Laboratory of Hematology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350000, China. Email: nainli@aliyun.com

HLA半相合异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)已成为治愈恶性血液病的重要手段<sup>[1]</sup>。但是其移植物抗宿主病(GVHD)的发生率高,是引起移植相关死亡的主要原因之一。目前GVHD的小鼠模型绝大部分是以全身照射(TBI)为预处理方案,而且多数是MHC完全不相合的移植模型,不能很好地模拟临床半相合骨髓移植(BMT)实际状况。同时,目前造血干细胞移植(HSCT)的预处理方案有一半以上是联合化疗方案,多采用白消安(Bu)和氟达拉滨(Flu)联合方案<sup>[2]</sup>。为此,我们采用Bu联合Flu预处理方案、选择C57BL/6(H-2K<sup>b</sup>)及CB6F1(H-2K<sup>db</sup>)分别作为半相合BMT供、受鼠,探索应用化疗预处理方案,建立稳定的半相合BMT GVHD动物模型,为研究预处理方案引起的GVHD机制提供稳定、可靠的实验平台。

### 材料和方法

1. 主要试剂: Bu购自日本协和发酵麒麟制药公司; Flu购自广东岭南制药公司; RPMI 1640培养基、胎牛血清、1×PBS购自美国Hyclone公司; 红细胞裂解液购自北京莱宝科技公司; 锥虫蓝购自美国Sigma公司; CD3磁珠抗体购自德国美天旎公司; PE CY7-CD4(GK1.5)、PERCP-CD8a(53-67)、PERCP CY5.5-TCRb(H57-597)、PE-H-2K<sup>d</sup>(H57-597)(SF1-1.1)、FITC-H-2K<sup>b</sup>(AF8-88:5)、PERCP CY5.5-Gr-1(HL3)、APC-B220(RA3-682)购自美国BD公司。

2. 实验动物: C57BL/6雄性小鼠(H-2K<sup>b</sup>)为供鼠, CB6F1

雄鼠(H-2K<sup>bd</sup>)(BALB/c雌性小鼠及C57BL/6雄性小鼠杂交得子一代小鼠)为受鼠,小鼠饲养在福建医科大学实验动物中心。小鼠均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验小鼠为8~10周龄。动物使用协议已由审查委员会批准,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

3. 小鼠骨髓和脾细胞的获取: 取C57BL/6小鼠肱骨、股骨并冲洗其中的骨髓制成骨髓单个核细胞(MNC)悬液,同时取BALB/c小鼠脾脏,充分研磨制备脾细胞悬液,并计数,锥虫蓝染色检测细胞活力均在95%以上,并按CD3磁珠筛选抗体的说明书步骤去除骨髓中T淋巴细胞,流式细胞术验证去除率(去除率>99%)。

4. 半相合BMT模型的建立: 将小鼠分两组,于-5~-2 d对两组小鼠腹腔注射Flu(10 mg/kg)和Bu(15 mg/kg),每日2次,连续化疗4 d(即预处理化疗总剂量为Bu 120 mg/kg+Flu 80 mg/kg)。骨髓组(BM组)输注供鼠去除T细胞骨髓细胞(TCD-BM)5×10<sup>6</sup>;脾细胞组(SPL组)输注供鼠TCD BM 5×10<sup>6</sup>及脾细胞100×10<sup>6</sup>。

5. 移植后观察指标: 根据文献[3]评分标准对GVHD的严重程度进行评估。

6. 组织病理学检查: 移植后10 d(+10 d)取GVHD靶器官(肝、肠道、肺、皮肤等组织)病理检查,并根据文献[3-4]对GVHD病理学等级进行评分。

7. 供者细胞的植入状况: 取小鼠+10 d外周血并分离MNC,通过流式细胞术检测供者细胞的植入情况。使用FlowJo 7.6.1软件进行分析。

8. 统计学处理: 组间体重和生存率比较采用Log-rank检验。定量资料用均数±标准误表示,两个均数的比较采用非配对双尾Student *t*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 化疗剂量: 选取8~10周龄CB6F1小鼠,分为6组,每组5只,给予不同剂量、不同给药频率的Bu和Flu处理不同时间(表1),化疗预处理48 h后均回输C57BL/6脾细胞100×10<sup>6</sup>及骨髓细胞5×10<sup>6</sup>。根据化疗后存活率及输注供者T细胞(C57BL/6)后是否有GVHD症状确定预处理化疗剂量,综合分析确定第5组(Bu 120 mg/kg, Flu 80 mg/kg的化疗剂量)为本实验的化疗预处理最佳剂量(表1)。

2. 半相合BMT GVHD模型建立: CB6F1受鼠,按上述药物剂量预处理化疗后,脾细胞组(SPL组)移植C57BL/6脾细胞100×10<sup>6</sup>及TCD BM 5×10<sup>6</sup>;骨髓组(BM)移植C57BL/6

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.014

基金项目: 国家自然科学基金(81270641); 国家自然科学基金青年基金(81200400)

作者单位: 350000 福州,福建医科大学附属协和医院血液科、福建省血液病研究所;福建省血液病学重点实验室

通信作者: 李乃农, Email: nainli@aliyun.com

TCD BM  $5 \times 10^6$ ; 仅化疗组不移植。化疗组+6 d开始小鼠死亡, 2周内全部死亡, 提示该化疗剂量预处理方案为清髓化疗剂量。BM组受鼠体重无下降, 未见弓背、脱毛、腹泻、脱皮等GVHD症状, GVHD评分都在0分, 生存时间超过120 d。SPL组小鼠移植后精神萎靡、体重连续减轻、出现不同程度的脱毛、弓背体位、腹泻等GVHD表现, GVHD评分高, 1个月内小鼠全部死亡( $P < 0.01$ )。

表1 不同剂量的化疗药物预处理后小鼠存活率和骨髓移植后移植物抗宿主病(GVHD)症状

组别	鼠数	白消安 (mg/kg)	氟达拉滨 (mg/kg)	化疗频率	化疗 (d)	化疗后存活率 (%)	GVHD 症状
1	5	50	20	每日1次	3	0	
2	5	30	15	每日1次	3	100	未见
3	5	25	10	每日1次	4	100	未见
4	5	30	15	每日1次	5	40	有
5	5	15	10	每日2次	4	100	有
6	5	20	13	每日2次	3	80	有

3. GVHD靶器官病理结果: +10 d取GVHD靶器官(肝脏、肺、肠道)病理组织, HE染色可见, SPL组小鼠病理切片显示肝细胞肿大、变性、坏死, 细胞结构不清, 肝血窦及汇管区有扩张及淋巴细胞浸润; 肺组织中气道和气管内淋巴细胞浸润; 肠黏膜及黏膜下层明显充血水肿, 淋巴细胞浸润, 部分可见肠组织溃疡、坏死等符合典型GVHD的病理表现。BM组小鼠肝脏、肺组织和肠道常规病理切片结构基本正常, 无GVHD病理表现。

4. 供者细胞植入情况: 将CB6F1小鼠按上述化疗剂量预处理后, BM组移植C57BL/6 TCD BM  $5 \times 10^6$ ; SPL组移植C57BL/6 TCD BM  $5 \times 10^6$  及SPL  $100 \times 10^6$ ; +10 d取外周血检测嵌合状态。提示SPL组供鼠粒细胞、B细胞和T细胞约占80%。BM组供鼠粒细胞和B细胞亦约占80%, 但CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>T细胞仅约占10%。这是因为BM组移植的是去除T细胞的骨髓, +10 d的T细胞是从干细胞发育来的, 数量尚少。+30 d检测BM组嵌合状态, 提示粒细胞、B细胞和T细胞已经完全为供鼠细胞。

## 讨 论

近年我国在半相合allo-HSCT方面取得重要进展, 克服了缺少供者来源难题, 并取得了与亲缘全相合移植相当的疗效。但是, GVHD发生率仍较高, 阻碍了疗效进一步的提高。如何克服GVHD是移植中亟待解决的关键问题, 而建立稳定可靠的半相合BMT动物模型是研究GVHD的基础。目前aGVHD小鼠动物模型绝大部分是用TBI预处理方案, 而临床上allo-HSCT患者的预处理方案有一半以上是联合化疗, 其诱导的GVHD严重程度和机制与TBI似有差别。本

研究我们应用Bu联合Flu经典预处理方案, 以C57BL/6及CB6F1分别作为供受鼠建造亲子半相合BMT模型, 通过反复实验验证了该模型的可靠性和稳定性。

Bu联合Flu是常用预处理方案, 但小鼠实验中, 该两种药物的剂量不一。本实验我们通过多组不同剂量和用法的比较发现, Bu 15 mg/kg及Flu 10 mg/kg, 每日2次共化疗4 d可以有效预处理受鼠, 以该剂量化疗后小鼠存活率100%。移植供鼠去除T细胞的骨髓细胞(TCD-BM)  $5 \times 10^6$ 及脾细胞  $100 \times 10^6$ 或TCD-BM  $5 \times 10^6$ , +10 d经流式细胞术检测供鼠细胞结果显示, 供鼠CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞、B淋巴细胞及粒细胞均成功植入。BM组小鼠全部存活, 证明该移植骨髓细胞数量足以保证受鼠恢复骨髓重建。脾细胞组小鼠可见弓背、腹泻、脱毛、脱皮和体重下降等典型GVHD症状, 上述症状与其他文献GVHD症状一致<sup>[5]</sup>, 提示该剂量预处理可以较好地满足本实验模型的需求, 该移植脾细胞数量可有效建立半相合BMT GVHD模型。Sadeghi等<sup>[6]</sup>应用Bu和环磷酰胺联合化疗预处理方案建立了C57BL/6小鼠到BALB/c小鼠典型的aGVHD模型。该模型是MHC完全不相合, 虽然也能够研究GVHD机制, 但不是模拟临床移植HLA半相合的aGVHD模型。我们建立的aGVHD模型是模拟临床的半相合HSCT产生的aGVHD, 通过临床常用Bu联合Flu预处理方案, 建立C57BL/6到CB6F1的亲子半相合BMT模型。

本研究我们根据GVHD临床表现及相应靶器官的病理来评价GVHD的发生及其严重程度。实验结果显示, 脾细胞组小鼠移植后立即出现体重明显下降、弓背、腹泻等临床症状, 1周开始出现脱毛, 以下腹部及颈部背侧脱毛较为严重, 3周后见脱毛处皮肤出现明显脱皮、皮肤角质硬化等表现, GVHD症状典型; 小鼠于+9 d开始死亡, 在1个月内全部死亡。肝、肺、肠道和皮肤等GVHD靶器官的病理切片显示: SPL组小鼠病理切片显示肝细胞肿大、变性、坏死, 细胞结构不清, 肝血窦及汇管区有扩张及淋巴细胞浸润; 肺组织中气道和气管内淋巴细胞浸润; 肠黏膜及黏膜下层明显充血水肿, 淋巴细胞浸润, 部分可见肠组织溃疡、坏死等符合典型GVHD的病理表现, 与其他文献报道一致<sup>[7]</sup>。有趣的是, 本模型肺组织GVHD表现亦明显, 若将输注供者脾细胞量减少或预处理方案降为非清髓方案, 使小鼠度过aGVHD, 或可以建立一个良好的肺组织cGVHD模型<sup>[8]</sup>。

综上所述, CB6F1小鼠以Bu和Flu为预处理方案, 移植供鼠C57BL/6细胞可建立理想的亲子半相合BMT模型。受鼠出现较为典型的GVHD临床表现及较为一致的病理表现, 小鼠死亡时间集中于+9~+26 d内, 便于进一步研究干预方案。该模型使用的两种品系小鼠均是目前国内最常见的品系, 可作为亲子半相合BMT后GVHD的理想模型。反复实验证明上述方法建立GVHD模型稳定、可重复性好。因此, 我们认为, 采用Bu联合Flu预处理方案, C57BL/6及CB6F1分别作为MHC半相合移植动物模型供、受鼠, 具有化疗方案与临床接近、实验重复性好、GVHD表现典型等优点, 是研究防治GVHD的一种可靠实验动物模型。

参考文献

[1] 黄晓军. 构建有中国特色的造血干细胞移植体系[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(8): 601-602.

[2] Liu H, Zhai X, Song Z, et al. Busulfan plus fludarabine as a myeloablative conditioning regimen compared with busulfan plus cyclophosphamide for acute myeloid leukemia in first complete remission undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective and multicenter study [J]. J Hematol Oncol, 2013, 6: 15.

[3] Li N, Chen Y, He W, et al. Anti-CD3 preconditioning separates GVL from GVHD via modulating host dendritic cell and donor T-cell migration in recipients conditioned with TBI [J]. Blood, 2009, 113(4):953-962.

[4] Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, et al. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype [J]. J Immunol,

2004,173(9): 5467-5475.

[5] Yi T, Li X, Yao S, et al. Host APCs augment in vivo expansion of donor natural regulatory T cells via B7H1/B7.1 in allogeneic recipients [J]. J Immunol, 2011,186(5): 2739-2749.

[6] Sadeghi B, Aghdami N, Hassan Z, et al. GVHD after chemotherapy conditioning in allogeneic transplanted mice [J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 42(12):807-818.

[7] Zhang C, Lou J, Li N, et al. Donor CD8+ T cells mediate graft-versus-leukemia activity without clinical signs of graft-versus-host disease in recipients conditioned with anti-CD3 monoclonal antibody [J]. J Immunol, 2007, 178(2): 838-850.

[8] Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease [J]. Blood, 2014, 124(3):374-384.

(收稿日期:2014-07-28)

(本文编辑:董文革)

·病例报告·

成人尼曼-匹克病一例

李亮亮 王晓帅 刘瑛 张连生 柴晔

**A case report of Niemann-Pick disease complicated with gastric cancer** Li Liangliang, Wang Xiaoshuai, Liu Ying, Zhang Liansheng, Chai Ye

Corresponding author: Chai Ye, Department of Hematology, The Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China. Email: papillon2009@163.com

患者,男,57岁。因“乏力伴间断恶心半个月”于2014年6月3日入院。既往有心肌梗死、脑梗死病史。否认家族遗传病史。查体:中度贫血貌,发育正常,言语不清。全身皮肤黏膜无黄染,睑结膜苍白。眼底黄斑部无樱桃红色斑。浅表淋巴结未扪及肿大,肝、脾肋缘下未及,右侧上下肢肌力为0级。实验室检查:血常规:WBC  $3.11 \times 10^9/L$ , HGB 61 g/L, 红细胞平均体积 100.5 fl, 红细胞平均血红蛋白 31.6 pg, 红细胞平均血红蛋白浓度 314 g/L, PLT  $141 \times 10^9/L$ ; 大便潜血阳性; 生化检查:碱性磷酸酶 544 U/L, 总胆红素 30.2  $\mu\text{mol/L}$ , 直接胆红素 6.9  $\mu\text{mol/L}$ , 间接胆红素 23.3  $\mu\text{mol/L}$ , LDH 170 U/L; 肿瘤标志物检查:CEA 26.31 mg/L, CA199  $1 \times 10^6$  U/L; 贫血三项:叶酸 2.43 mg/L, VitB<sub>12</sub> 338.4 ng/L, 铁蛋白 354.6 mg/L; 腹部CT检查示脾肿大;骨髓象:增生尚活跃,可见大量蜂窝状细胞,胞体巨大,呈圆形或不规则形,核较小,偏位,染色质

呈网状,可见核仁,胞质丰富,淡蓝色,有较多大小均匀空泡,考虑为尼曼-匹克病;骨髓活检:增生极度活跃(100%),骨小梁增多,骨髓腔缩小,纤维组织弥漫性增生,未见异型细胞团;胃镜检查:胃窦体交界处大弯侧可见一浅凹陷性病变,中央可见溃疡形成,常规取活检,病理诊断“胃窦体交界中分化腺癌”,免疫组化染色示C-erbB-2(2+)。根据患者临床表现及各项相关检查,诊断为尼曼-匹克病合并胃癌。

讨论:尼曼-匹克病又称神经鞘磷脂病,本病是由于神经鞘磷脂酶先天性缺陷所致神经鞘磷脂代谢障碍,神经鞘磷脂不能被降解而沉积在肝、脾、骨髓、脑组织等器官中,导致肝、脾肿大和神经系统的退行性病变。尼曼-匹克病临床分为五型:A型(急性神经型)、B型(慢性非神经型)、C型(慢性神经型)、D型(Nova Scotia型)和E型(成人非神经型)。根据本病临床分型,结合本例患者为中年男性,有贫血,脾肿大,既往有冠状动脉疾病史,骨髓找到尼曼-皮克细胞,无神经症状,故尼曼-匹克病E型(成人非神经型)诊断成立。同时因该患者CA199显著升高,且大便潜血阳性,行胃镜检查发现胃癌,故考虑尼曼-匹克病合并胃癌。尼曼-匹克病目前无特殊疗法,主要是对症治疗,脾功能亢进者则行脾切除术。目前尚有关于尼曼-匹克病与恶性肿瘤之间关系的研究,二者之间是否有因果关系尚不能明确。通过综合分析,本例患者的贫血原因,一方面是由于尼曼-匹克病所致,另一方面可能是由于消化道恶性肿瘤慢性失血所致。

(收稿日期:2014-10-09)

(本文编辑:刘志红)