

# 异基因造血干细胞移植患者抗内皮细胞抗体阳性血清对人脐带内皮细胞的作用

姚剑峰 宋阿霞 阮峥 周卢琨 刘鹏 朱海燕 公海艳  
董树旭 许元富 姜尔烈 庞爱明 冯四洲 韩明哲

**【摘要】** 目的 探讨抗内皮细胞抗体(AECA)介导的血管内皮(EC)损伤在异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)中的病理生理机制。方法 收集allo-HSCT后患者的血清并纯化IgG型免疫球蛋白,将后者与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)共培养,观察HUVEC的功能变化及凋亡情况。结果 HUVEC与AECA阳性的IgG共培养后,黏附分子表达显著增高:IgG浓度为160、320、640 μg/ml时,上清可溶性细胞间黏附分子-1浓度分别为(117.10±12.82)对(78.17±4.90)pg/ml, (151.30±15.35)对(89.46±6.02)pg/ml, (239.00±32.53)对(127.8±13.86)pg/ml( $P$ 值均<0.01);IgG浓度为40、80、160、320、640 μg/ml时,上清可溶性血管细胞黏附分子-1浓度分别为(38.51±3.762)对(24.78±2.50)pg/ml, (61.34±6.99)对(38.20±3.17)pg/ml, (135.60±24.46)对(63.73±5.08)pg/ml, (221.3±29.40)对(112.80±8.91)pg/ml, (420.90±31.70)对(224.40±20.79)pg/ml( $P$ 值均<0.01)。HUVEC与AECA阳性的IgG共培养后,凝血活性因子表达显著增高:IgG浓度为80、160、320、640 μg/ml时,上清血管性血友病因子浓度分别为(19.51±0.72)对(17.17±0.60)ng/ml, (22.97±1.18)对(18.27±0.614)ng/ml, (26.40±1.54)对(19.53±0.701)ng/ml, (34.35±1.60)对(23.81±0.92)ng/ml( $P$ 值均<0.05);IgG浓度为320、640 μg/ml时,上清血栓调节素浓度分别为(57.50±4.50)对(40.31±4.39)pg/ml, (59.18±4.11)对(38.84±5.16)pg/ml( $P$ 值均<0.05)。AECA阳性IgG对HUVEC分泌炎性因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8及ANG2)无明显作用( $P>0.05$ )。此外,AECA并不诱导HUVEC凋亡,对细胞增殖亦无影响( $P>0.05$ )。结论 AECA能引起EC功能发生显著变化,并不引起细胞凋亡,对于阐明AECA介导的EC损伤在移植抗宿主病等移植并发症中的作用机制有重要意义。

**【关键词】** 造血干细胞移植; 移植抗宿主病; 抗内皮细胞抗体; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡

**Vascular endothelial injury induced by anti-endothelial cell antibody in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation** Yao Jianfeng, Song Axia, Ruan Zheng, Zhou Lukun, Liu Peng, Zhu Haiyan, Gong Haiyan, Dong Shuxu, Xu Yuanfu, Jiang Erlie, Pang Aiming, Feng Sizhou, Han Mingzhe. Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 30020, China  
Corresponding author: Pang Aiming, Email: pam0020757@sina.com.cn

**【Abstract】 Objective** To clarify the role of endothelial cells (ECs) injury induced by anti-endothelial cell antibody (AECA) in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). **Methods** Serum immunoglobulin (IgG) from allo-HSCT recipients were purified and incubated with human umbilical vein vascular endothelium (HUVEC) *in vitro*, then the functional changes and cell apoptosis were tested. **Results** After incubation with AECA positive IgG, soluble adhesion molecules significantly elevated in culture supernatant. When concentration of IgG was 160, 320, and 640 μg/ml, concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 in supernatant were statistically higher in AECA positive groups [(117.10±12.82) vs (78.17±4.90) pg/ml, (151.30±15.35) vs (89.46±6.02) pg/ml, (239.00±32.53) vs (127.8±13.86) pg/ml,  $P<0.01$ ]. When concentration of IgG was 40, 80, 160, 320, and 640 μg/ml, concentrations of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in supernatant were also

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.005

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81200116);国家863计划(2013AA020103);心肌梗死省部共建教育部重点实验室(哈尔滨医科大学)开放基金(KF201213、KF201303)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院

通信作者:庞爱明,Email:pam0020757@sina.com.cn

statistically higher in AECA positive groups [(38.51±3.76) vs (24.78±2.59) pg/ml, (61.34±6.99) vs (38.20±3.17) pg/ml, (135.60±24.46) vs (63.73±5.08) pg/ml, (221.30±29.40) vs (112.80±8.91) pg/ml, (420.90±31.70) vs (224.40±20.79) pg/ml,  $P<0.01$ ]. Clotting activity factors also elevated in culture supernatant after incubation with AECA positive IgG. When concentration of IgG was 80, 160, 320, and 640  $\mu\text{g/ml}$ , concentrations of von Willebrand factor were statistically higher in AECA positive groups [(19.51±0.72) vs (17.17±0.60) ng/ml,  $P=0.0193$ ; (22.97±1.18) vs (18.27±0.61) ng/ml, (26.40±1.54) vs (19.53±0.70) ng/ml, (34.35±1.60) vs (23.81±0.92) ng/ml,  $P<0.01$ ]. When concentration of IgG was 320 and 640  $\mu\text{g/ml}$ , concentrations of thrombomodulin were statistically higher in AECA positive groups [(57.50±4.50) vs (40.31±4.39) pg/ml,  $P=0.0132$ ; (59.18±4.11) vs (38.84±5.16) pg/ml,  $P<0.01$ ]. However, inflammatory factors (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and ANG2) were not statistically different in AECA positive and negative groups ( $P>0.05$ ). Moreover, IgG from AECA positive samples did not change the proliferation or cell apoptosis. **Conclusions** AECA from allo-HSCT recipients dysregulates ECs' function *in vitro*, but do not induce apoptosis, which is valuable in the pathophysiology of graft-versus-host disease (GVHD) and other complications after allo-HSCT.

**【Key words】** Hematopoietic stem cell transplantation; Graft-versus-host disease; Anti-endothelial cell antibody; Human umbilical vein vascular endothelium; Apoptosis

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)过程中,诸多因素如大剂量放化疗、免疫抑制剂及异体免疫排斥反应等均可损伤血管内皮细胞(EC)<sup>[1]</sup>,引起细胞表面黏附分子高表达、炎性因子以及凝血活性因子大量释放,介导淋巴细胞黏附并浸润至靶组织,是移植抗宿主病(GVHD)发生过程中的重要环节<sup>[2-3]</sup>。血清抗内皮细胞抗体(AECA)是一种能特异性结合EC的自身抗体。对自身免疫性疾病的研究显示,AECA可导致EC功能紊乱或凋亡,从而参与这些疾病的发生<sup>[4]</sup>。近期有学者研究发现AECA会加剧器官移植患者的急性排斥反应并且与AECA诱导的EC凋亡相关<sup>[5]</sup>。我们的前期研究发现,急性GVHD(aGVHD)患者血清AECA显著升高,并且可以预测慢性GVHD(cGVHD)的发生<sup>[6]</sup>。我们推测AECA通过介导EC功能紊乱从而参与GVHD的病理机制。为了验证这一推想,我们收集了allo-HSCT后患者的血清并纯化IgG型免疫球蛋白,将后者与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)共培养,观察HUVEC的功能变化及细胞增殖、凋亡情况。

## 对象和方法

1. 研究对象:共收集26例allo-HSCT后患者血样,促凝管收集,分离后储存于-20℃冰箱中。所有患者均签署知情同意书。同时收集12名正常健康志愿者血清标本作为对照。

2. 主要试剂:HUVEC细胞系EA.hy926为首都医科大学何秀娟老师惠赠。高糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)及BCA定量试剂盒购自美国Thermo Scientific公司;辣根过氧化酶标记的羊抗人IgG购自美国KPL公司;四甲基联苯胺(TMB)购自美国

Tiagen公司;HUVEC及EC完全培养基购自美国Allcells公司;IgG型抗体纯化试剂盒及30KD蛋白浓缩柱购自美国Millipore公司;可溶性E-选择素、可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)、血管性血友病因子(VWF)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 ELISA检测试剂盒购自联科生物技术有限公司;血栓调节素(TM)、组织因子(TF)及血管生成素2(ANG2)ELISA检测试剂盒购自博士德生物公司;FITC-Annexin V凋亡试剂盒购自美国BD公司;MTT及放线菌素D购自美国Sigma-Aldrich公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )购自美国Peprotech公司。

3. 细胞培养:EA.hy926培养基为高糖DMEM+10% FBS+100 IU/ml青霉素+100  $\mu\text{g/ml}$ 链霉素;HUVEC接种于EC完全培养基中,培养瓶预先用0.25%明胶铺板37℃过夜。常规置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,2~3 d全量换液,待细胞进入对数生长期后用于实验。

4. 细胞铺板及固定:EA.hy926消化后按每孔 $2.0\times 10^4/200\ \mu\text{l}$ 接种于96孔板中培养36~48 h,待细胞完全融合后使用无血清培养基培养4 h,弃上清,0.1%戊二醛-PBS 4℃避光固定细胞10 min。1% BSA-PBS洗涤3次后,每孔加2% BSA-PBS 200  $\mu\text{l}$ 室温封闭非特异性抗体2 h。PBS洗涤3次,晾干后于-20℃储存备用。

5. 细胞酶联免疫吸附(cyto-ELISA)法检测AECA:每孔加100  $\mu\text{l}$ 血清(以PBS按1:100稀释),37℃孵育2 h后用0.1% Tween-PBS(PBST)200  $\mu\text{l}$ 洗涤3次;每孔加入辣根过氧化酶标记的羊抗人IgG(1:5 000)100  $\mu\text{l}$ ,37℃孵育1.5 h。PBST洗涤4次

并拍干后每孔加入显色底物 TMB 100  $\mu$ l, 室温避光反应 20 min。每孔加入 1.2 mol/L 硫酸 100  $\mu$ l, 立即使用酶标仪在波长 450 nm 处检测吸光度(A)值。所有样品均复孔检测。以健康志愿者血清为对照, 对照组 A 值均值+2 倍标准差为正常上限, 待测样品 A 值均值高于正常上限者定义为阳性, 否则定义为阴性。

6. 血清 IgG 型抗体纯化及浓缩: 抗体纯化、浓缩按照 IgG 型抗体纯化试剂盒(美国 Millipore 公司产品)说明书进行; 纯化后使用 Western blot 法及考马斯亮蓝染色检测抗体纯度, BCA 定量试剂盒测定浓度,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

7. 纯化的 IgG 与 HUVEC 共培养: 以培养到 4~6 代的 HUVEC 为靶细胞, 每孔  $2.0 \times 10^5/2.5$  ml 接种于 6 孔板中, 分别加入纯化后的 IgG, 浓度梯度分别为 20、40、80、160、320、640  $\mu\text{g/ml}$ , 并设阴性对照孔。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后收集上清分装于 1.5 ml EP 管中,  $-20^{\circ}\text{C}$  储存待测。

8. 双抗体夹心 ELISA 法检测上清可溶性黏附分子、凝血因子及炎症因子浓度: 上清 sE-Selectin、sICAM-1、sVCAM-1、VWF、TM、TF、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、ANG2 浓度按照相关 ELISA 试剂盒说明书进行。

9. 电镜观察细胞超微结构变化: HUVEC 培养到第 4~6 代时收集细胞, 按照  $1.0 \times 10^5/\text{ml} \times 5$  ml 接种于 T25 细胞培养瓶中, 分别加入 AECA 阳性及阴性 IgG, 终浓度为 320  $\mu\text{g/ml}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后收集细胞, PBS 重悬后送检电镜观察超微结构。

10. 流式细胞术检测细胞凋亡: 取培养到 4~6 代的 HUVEC, 按  $1.0 \times 10^5/\text{ml} \times 5$  ml 接种于 T25 细胞培养瓶中, 加入纯化后的 IgG, 浓度梯度为 20、40、80、160、320、640  $\mu\text{g/ml}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24 h

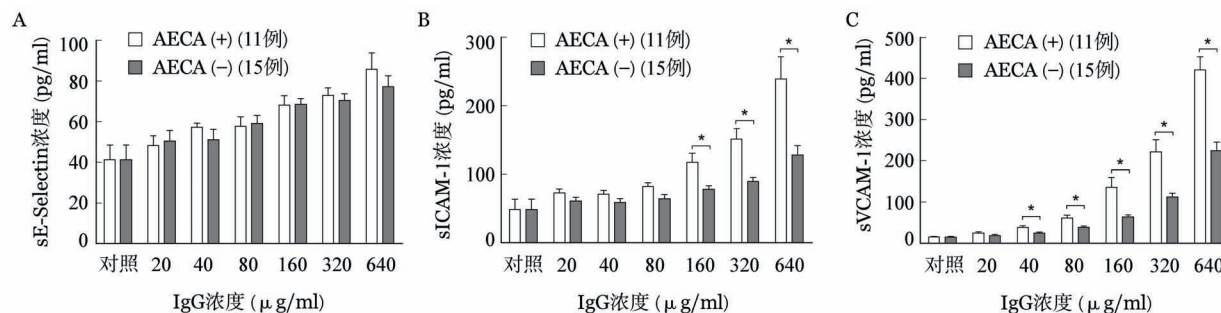
后收集细胞, PBS 洗涤后重悬于染色缓冲液中, 调整浓度为  $1 \times 10^6/100$   $\mu$ l, 加入 Annexin V 及碘化丙锭(PI)各 5  $\mu$ l, 避光孵育 15 min, 加入 400  $\mu$ l 染色缓冲液后上机检测, 每份标本分析  $2 \times 10^4$  个细胞。以 TNF- $\alpha$  及放线菌素 D 与 HUVEC 共培养作为阳性对照, TNF- $\alpha$  10 ng/ml, 放线菌素 D 1  $\mu\text{g/ml}$ , 相同培养条件下培养 10 h 后收集细胞。

11. MTT 法检测细胞增殖活性: 以培养到 4~6 代的 HUVEC 为靶细胞, 按每孔  $1.5 \times 10^5/100$   $\mu$ l 接种于 96 孔板, 以培养基为稀释液, 分别稀释 AECA 阳性及阴性的纯化 IgG, 按每孔 100  $\mu$ l 加入 96 孔板, 最终浓度分别为 320、640  $\mu\text{g/ml}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24 h。每孔加 MTT(5 mg/ml) 20  $\mu$ l, 培养 4 h。2 000 r/min(离心半径 18.0 cm)离心 20 min, 弃上清。每孔加 DMSO 150  $\mu$ l, 室温避光振荡 10 min, 在波长 490 nm 处检测 A 值。

12. 统计学处理: 采用 SPSS 17.0 软件及 GraphPad Prism 5.0 进行数据分析。细胞因子浓度用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均值比较采用 *t* 检验。*P* 值采用双侧检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 上清可溶性黏附分子浓度: 共收集 11 例 AECA 阳性、15 例 AECA 阴性患者 IgG 与 HUVEC 共培养的上清, 结果显示, 可溶性 E 选择素(sE-Selectin)浓度随着 IgG 浓度的升高呈上升趋势, 但 AECA 阳性组与阴性组 sE-Selectin 浓度差异并无统计学意义( $P > 0.05$ , 图 1A); sICAM-1 浓度随着 IgG 浓度的升高呈上升趋势, 当 IgG 浓度  $\geq 160$   $\mu\text{g/ml}$  时, AECA 阳性组 sICAM-1 浓度显著高于阴性组( $P < 0.05$ , 图 1B); sVCAM-1 浓度随着 IgG 浓度的升高亦呈上升趋势, 当 IgG 浓度  $\geq 40$   $\mu\text{g/ml}$  时 AECA 阳性组 sVCAM-1 浓度显著高于阴性组( $P < 0.05$ , 图 1C)。



A: 可溶性 E 选择素(sE-Selectin); B: 可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1); C: 可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)  
图 1 ELISA 法检测抗内皮细胞抗体(AECA)阳性或阴性患者 IgG 与人脐带内皮细胞共培养后上清可溶性黏附分子浓度( $P < 0.05$ )

2. 上清凝血活性因子浓度:共收集 11 例 AECA 阳性及 15 例 AECA 阴性患者 IgG 与 HUVEC 共培养上清,结果显示,VWF 浓度随着 IgG 浓度的升高呈上升趋势,当 IgG 浓度  $\geq 80 \mu\text{g/ml}$  时,AECA 阳性组 VWF 浓度显著高于阴性组 ( $P < 0.05$ ,图 2A);而 TF 浓度与 IgG 浓度无明显相关性,且 AECA 阳性组与阴性组 TF 浓度在 IgG 各浓度梯度作用下差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 2B);与 VWF 相似, TM 浓度随着 IgG 浓度的升高呈上升趋势,当 IgG 浓度  $\geq 320 \mu\text{g/ml}$  时,AECA 阳性组 TM 浓度显著高于阴性组 ( $P < 0.05$ ,图 2C)。

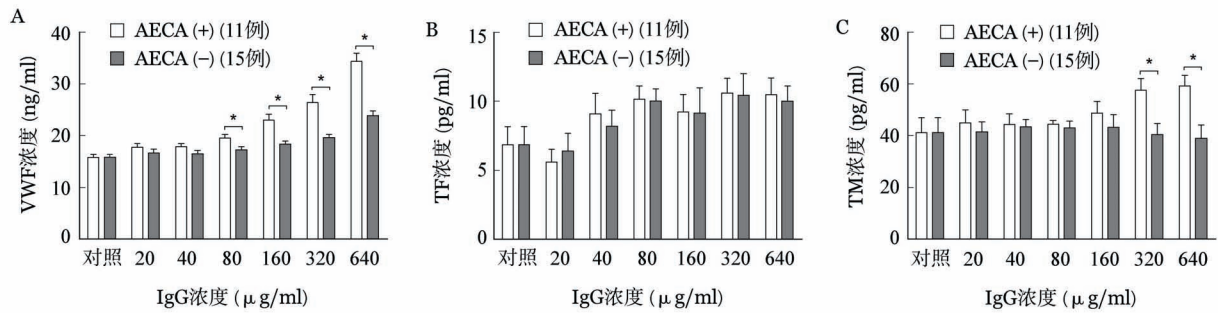
3. 上清炎症因子浓度:共收集 11 例 AECA 阳性及 15 例 AECA 阴性患者 IgG 与 HUVEC 共培养上清,结果显示,IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、ANG2 均与 IgG 浓度无明显相关,在各浓度梯度下,阳性组与阴性组 4 种

炎症因子分泌量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 3)。

4. 细胞超微结构变化:与 AECA 阳性 IgG 共培养后观察细胞超微结构发现,HUVEC 无明显凋亡,但细胞表面突起减少,内质网高度扩张,分泌物明显增加。

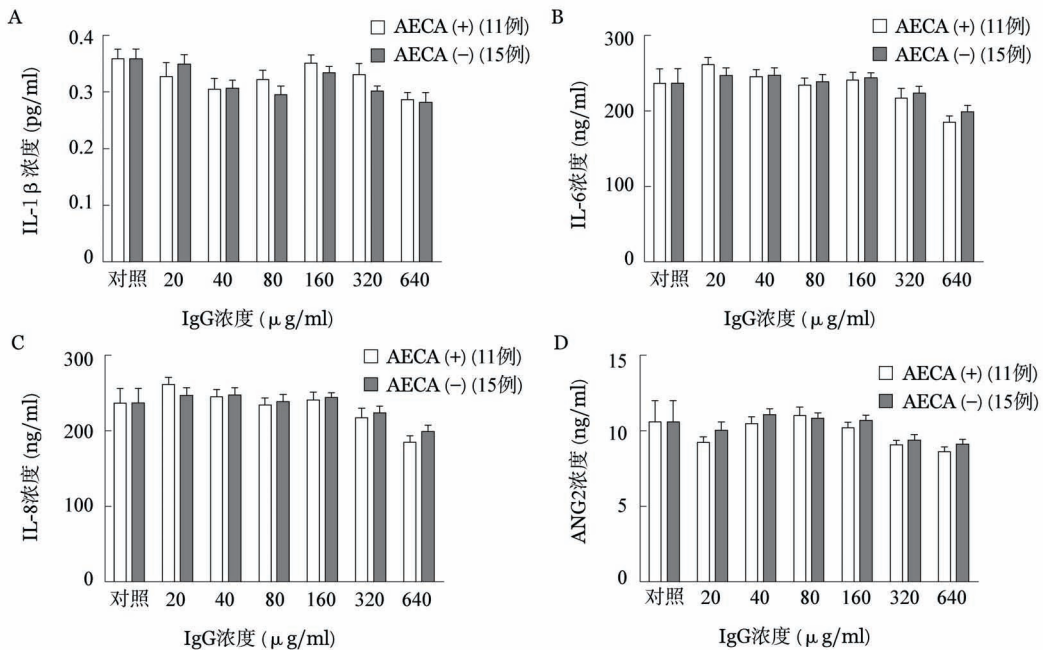
5. 与 AECA 阳性 IgG 共培养后 HUVEC 凋亡比例及增殖能力:共采用 AECA 阳性及阴性患者 IgG 各 8 份与 HUVEC 共培养,结果显示,与 AECA 阳性 IgG 共培养后,细胞凋亡比例并不随 IgG 浓度上升而增加,且在各浓度 IgG 作用下,AECA 阳性组与阴性组细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 4A),提示 AECA 并不诱导 HUVEC 凋亡。而阳性对照组细胞凋亡率明显升高 (19.1%,图 4C)。

采用 11 例 AECA 阳性、12 例 AECA 阴性患者 IgG 与 HUVEC 共培养,MTT 法检测细胞增殖活性,



A: 血管性血友病因子(VWF);B:组织因子(TF);C:血栓调节素(TM)

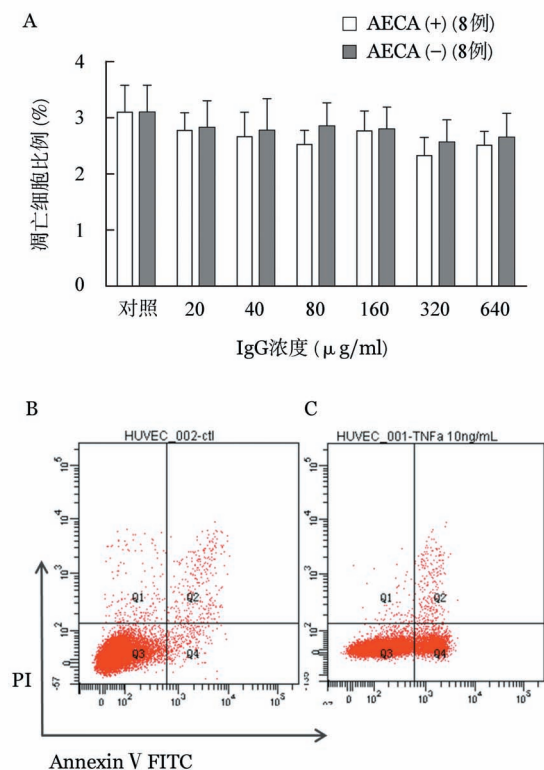
图2 ELISA法检测抗内皮细胞抗体(AECA)阳性或阴性患者IgG与人脐带内皮细胞共培养后上清凝血活性因子浓度(\* $P < 0.05$ )



A: IL-1 $\beta$ ;B: IL-6;C: IL-8;D: 血管生成素2(ANG2)

图3 ELISA法检测抗内皮细胞抗体(AECA)阳性或阴性患者IgG与人脐带内皮细胞共培养后上清炎症因子浓度

结果显示, AECA 阳性组与阴性组细胞活性差异无统计学意义 ( $P>0.05$ , 图 5), 提示细胞增殖不受 AECA 影响。



A: IgG 浓度升高时, 凋亡细胞比例无明显变化, 抗内皮细胞抗体 (AECA) 阳性组与阴性组差异无统计学意义; B 和 C: 阴性和阳性对照组细胞凋亡流式图

图 4 流式细胞术检测人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 凋亡细胞比例

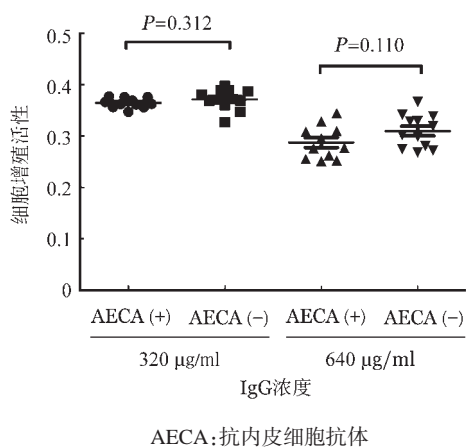


图 5 MTT 法检测人脐静脉内皮细胞增殖活性

### 讨 论

反映 EC 损伤的指标如黏附分子、凝血活性因子等在 GVHD 患者血清中显著升高, 且与 GVHD 严重程度相关<sup>[7-8]</sup>。EC 损伤后可以募集 T 细胞浸润至靶组织从而介导了 GVHD 的发生<sup>[9-10]</sup>。allo-HSCT

过程中引起 EC 损伤的因素主要有大剂量放化疗、钙调蛋白抑制剂、CMV 感染以及免疫因素<sup>[1,11-12]</sup>。allo-HSCT 后血清 AECA 能否引起 EC 损伤从而参与 GVHD 的发生尚未见文献报道。我们利用 cyto-ELISA 法筛选 AECA 阳性血清, 纯化 IgG 型免疫球蛋白并与 HUVEC 共培养, 检测上清中黏附分子、凝血活性因子、炎症因子的表达以及细胞增殖与凋亡, 从而探讨 AECA 对 EC 功能的影响。

我们的结果显示, 与 AECA 阳性的 IgG 共培养后, HUVEC 表达的 sICAM-1、sVCAM-1 显著升高, 并呈浓度依赖性。黏附分子是 EC 募集并介导免疫细胞尤其是 T 细胞浸润至靶组织的最重要分子。自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮 (SLE)、系统性硬化症 (SS) 等患者血清纯化后的 IgG 可以显著增强 EC 高表达黏附分子并促使淋巴细胞与之黏附<sup>[13]</sup>。Eyrich 等<sup>[14]</sup>发现小鼠 aGVHD 模型中淋巴细胞表面  $\alpha$  整合素、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 亦有显著升高; 作为 VCAM-1、ICAM-1 的配体,  $\alpha$  整合素、LFA-1 表达量上升意味着淋巴细胞与活化 EC 的黏附作用。因此, 我们推测 AECA 可能通过上调 EC 表达黏附分子参与了 GVHD 的发生。

allo-HSCT 后患者常常伴有出血倾向及凝血功能异常, 临床表现为移植相关性微血管病 (TAM)、肝静脉闭塞病 (VOD) 等, 这与 EC 受损后释放的凝血活性因子启动凝血途径有关<sup>[15-16]</sup>。有学者研究发现, II ~ IV 度 aGVHD 患者体内 TF 浓度显著高于基础水平, 并且经免疫抑制治疗后可回降<sup>[17]</sup>, 提示 TF 可能参与了 GVHD 的发生。我们的实验结果显示, 与 AECA 阳性的 IgG 共培养后, HUVEC 分泌的 VWF、TM 有显著升高, 而此前我们也发现部分 TAM 患者 AECA 阳性<sup>[6]</sup>, 提示 AECA 可能通过激活 EC 分泌的凝血活性因子从而参与了 TAM 及 VOD 的发生过程, 但我们并未发现 TF 浓度变化, 还需进一步的临床及实验研究加以验证。

众所周知, 炎症因子大量释放所致的炎症风暴是 aGVHD 发生过程中的重要环节。有研究显示, 在 SLE、SS 等疾病模型中, EC 在 AECA 刺激下可以释放 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、ANG2 等<sup>[13]</sup>; 而 GVHD 患者血清中炎症因子亦显著升高<sup>[18-19]</sup>, 这些炎症因子是否由 EC 受到 AECA 刺激后释放? 我们的研究并未发现 AECA 可以刺激 EC 高表达此类炎症因子, 可能是 GVHD 患者体内炎症因子主要由淋巴细胞释放所致, 亦可能与我们的培养体系未引入补体有关。

AECA 能否引起 EC 凋亡尚存在争议。在自身

免疫性疾病及器官移植免疫学中研究发现, AECA可以诱导EC凋亡,并可能与微血管损伤、排斥反应相关<sup>[20-21]</sup>。但也有研究发现AECA并不能引起EC凋亡<sup>[22]</sup>。已经证实GVHD患者血浆中游离EC显著升高,并可能与EC凋亡相关<sup>[8]</sup>,那么EC凋亡是否为AECA引起? 我们的研究未发现AECA阳性IgG能诱导EC凋亡;此外,细胞分泌的ANG2无显著升高,也从侧面证实EC未在AECA的作用下启动凋亡程序,提示allo-HSCT后的EC凋亡可能另有原因。

诚然,本实验尚存在一些不足。首先,我们仅研究了AECA与EC的关系。事实上,抗体与细胞间的作用机制还涉及到补体、T淋巴细胞等因素(如ADCC等),因此,本实验不能替代体内错综复杂的病理生理过程。其次,AECA识别EC的靶抗原迄今未有定论,因此无法纯化单克隆性IgG来研究,而总IgG中存在一些非特异性抗体可能干扰实验结果。最后,我们研究的样本量偏少,需扩大样本量、设计更为科学的研究方能深入探讨AECA在GVHD中的具体机制。

#### 参考文献

- [1] 姚剑峰, 韩明哲, 庞爱明. 造血干细胞移植中血管内皮损伤的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2011, 34(6): 531-535.
- [2] Dietrich S, Falk CS, Benner A, et al. Endothelial vulnerability and endothelial damage are associated with risk of graft-versus-host disease and response to steroid treatment [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2013, 19(1): 22-27.
- [3] Luft T, Dietrich S, Falk C, et al. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system [J]. Blood, 2011, 118(6): 1685-1692.
- [4] Szodoray P, Hajas A, Kardos L, et al. Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: subgroups and survival [J]. Lupus, 2012, 21(13): 1412-1422.
- [5] Xavier P, Aires P, Sampaio S, et al. XM-ONE detection of endothelial cell antibodies identifies a subgroup of HLA-antibody negative patients undergoing acute rejection [J]. Transplant Proc, 2011, 43(1): 91-94.
- [6] Yao J, Song A, Cao W, et al. Clinical significance of anti-endothelial cell antibody in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients with graft-versus-host disease [J]. Int J Hematol, 2014, 99(3): 329-337.
- [7] Jevtic D, Zecevic Z, Veljkovic D, et al. Venous occlusive disease in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation: relevance of activated coagulation and fibrinolysis markers and natural anticoagulants [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2011, 33(3): 227-234.
- [8] Wu Q, Chen H, Fang J, et al. Elevated Fas/FasL system and endothelial cell microparticles are involved in endothelial damage in acute graft-versus-host disease: a clinical analysis [J]. Leuk Res, 2012, 36(3): 275-280.
- [9] Deschaumes C, Verneuil L, Ertault-Daneshpouy M, et al. CD95 ligand-dependent endothelial cell death initiates oral mucosa damage in a murine model of acute graft versus host disease [J]. Lab Invest, 2007, 87(5): 417-429.
- [10] Sackstein R, Messina JL, Effenbein GJ. In vitro adherence of lymphocytes to dermal endothelium under shear stress: implications in pathobiology and steroid therapy of acute cutaneous GVHD [J]. Blood, 2003, 101(2): 771-778.
- [11] Tardieu M, Rybojad M, Peffault de Latour R, et al. Localized edema with sclerodermatous evolution: a possible form of skin chronic graft-versus-host disease associated with endothelial activation [J]. Blood, 2013, 122(3): 463-465.
- [12] Knight JM, Lyness JM, Sahler OJ, et al. Psychosocial factors and hematopoietic stem cell transplantation: potential biobehavioral pathways [J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(11): 2383-2393.
- [13] Mihai C, Tervaert JW. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(2): 319-324.
- [14] Eyrich M, Burger G, Marquardt K, et al. Sequential expression of adhesion and costimulatory molecules in graft-versus-host disease target organs after murine bone marrow transplantation across minor histocompatibility antigen barriers [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(5): 371-382.
- [15] Jodele S, Licht C, Goebel J, et al. Abnormalities in the alternative pathway of complement in children with hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy [J]. Blood, 2013, 122(12): 2003-2007.
- [16] Dignan FL, Wynn RF, Hadzic N, et al. BCSH/BSBMT guideline: diagnosis and management of veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) following haematopoietic stem cell transplantation [J]. Br J Haematol, 2013, 163(4): 444-457.
- [17] 郝珊珊, 李泉, 邹萍, 等. 异基因造血干细胞移植后移植物抗宿主病患者血清组织因子、组织因子途径抑制因子的变化及其临床意义 [J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(2): 125-126.
- [18] Dietrich S, Falk CS, Benner A, et al. Endothelial vulnerability and endothelial damage are associated with risk of graft-versus-host disease and response to steroid treatment. [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2013, 19(1): 22-27.
- [19] 赵晓甦, 黄晓军. 定量PCR检测细胞因子mRNA表达用于急性移植物抗宿主病诊断的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(8): 545-550.
- [20] van Paassen P, Duijvestijn A, Debrus-Palmans L, et al. Induction of endothelial cell apoptosis by IgG antibodies from SLE patients with nephropathy: a potential role for anti-endothelial cell antibodies [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1108: 147-156.
- [21] Mannam VK, Lewis RE, Cruse JM. The fate of renal allografts hinges on responses of the microvascular endothelium [J]. Exp Mol Pathol, 2013, 94(2): 398-411.
- [22] Williams JM, Colman R, Brookes CJ, et al. Anti-endothelial cell antibodies from lupus patients bind to apoptotic endothelial cells promoting macrophage phagocytosis but do not induce apoptosis [J]. Rheumatology (Oxford), 2005, 44(7): 879-884.

(收稿日期: 2014-11-23)

(本文编辑: 董文革)