

异基因造血干细胞移植中 GVL 和 GVHD 的研究进展

陈贇

作者单位:300162 天津市,武警医学院附属医院

造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 是近半个世纪临床医学中具有巨大创新性的技术,目前已经广泛应用于恶性血液病、非恶性难治性血液病、先天性免疫缺陷性疾病、遗传性疾病及某些实体肿瘤的治疗。异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT) 由于供、受者间免疫遗传学上的差异,引起同种异体免疫反应发生,其中移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 是患者移植后存活的主要障碍^[1]。与之相伴随的是早在 1956 年由 Barnes 等^[2]提出的移植物抗白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 效应,报道说移植骨髓的小鼠能消灭照射后残存的宿主白血病细胞。对急性白血病患者进行 Allo-HSCT 的最初设想之一就是移植物可能具有一种抗白血病作用,这个设想被以后的研究所证实。GVHD 与 GVL 既相互依存又相互独立,如何能在抑制 GVHD 的同时,更好的发挥 GVL 效应仍然是移植免疫工作人员为之不懈努力的“holy grail”^[3]。本文就其目前的研究进展做一综述。

1 光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT)

PDT 是近年来引起人们广泛关注的新型抗肿瘤方法。光敏剂进入体内后,可大量蓄留于肿瘤细胞内,这时用特定波长激光照射,可产生细胞毒性物质从而杀伤肿瘤细胞,通过结合线粒体靶目标、抑制 P-糖蛋白、产生活性氧来清除异基因活化的 T 淋巴细胞,是一种全方位的生物学治疗方法^[4]。研究^[5]已证实:将 5-氨基乙酰丙酸-光动力疗法 (5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy, ALA-PDT) 处理的混合淋巴细胞及供鼠的骨髓细胞移植给受鼠后,与传统的骨髓移植方法相比,受鼠在生存时间、GVHD 的发生程度以及造血恢复情况都有明显的改善,这就预示着 ALA-PDT 将有可能成为一种新型的血液系统恶性疾病治疗方法。但 ALA-PDT 应用于人体血液系统疾病的安全性及对其他组织的影响未完全清楚,尚需作进一步的研究。

2 供者淋巴细胞输注 (donor lymphocytic infusion, DLI)

DLI 指在进行 Allo-HSCT 后利用供者淋巴细胞发挥作用的一种过继免疫治疗。其作用是新输入的供者 T 细胞某些亚

群具有抗慢性髓细胞白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 细胞的作用。DLI 在诱导 GVL 效应、Allo-HSCT 治疗后复发等方面取得了可喜效果。Lundqvist^[6] 研究发现在负荷 RNECA 肿瘤的 Balb/c 小鼠体内有证据显示,组织相容性抗原匹配 HCT 后,行单独输注同种异体反应性供者 NK 细胞,能减少 GVHD 和介导抗肿瘤效应。

目前,半相合 DLI 已成为 Allo-HSCT 治疗后 CML 复发的最有效方法,并逐渐用于其他恶性血液病 Allo-HSCT 后复发的治疗,取得了令人瞩目的效果,应用范围逐渐扩展到 Allo-HSCT 的非复发并发症和未经骨髓移植预处理患者的过继免疫治疗。而半相合 DLI 治疗急性白血病成为本领域研究的热点^[6]。

国内外研究人员^[7-9]采用粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 动员外周血干细胞采集物代替静态外周血淋巴细胞单采物进行 DLI 治疗移植后复发,降低了 DLI 后 GVHD 的发生率,且 DLI 后 GVL 效应并没有减弱,甚至获得增强,提高了 DLI 的安全性和疗效,部分实现了 GVHD 和 GVL 的分离。

3 非清髓性造血干细胞移植 (nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation, NST)

传统的 HSCT 常用大剂量联合放、化疗作为移植前清髓性预处理,然后移植造血干细胞,重建造血和免疫功能。为了最大限度地杀灭肿瘤细胞,传统的 HSCT 通常将移植前的预处理增加到一个极限的量,从而导致许多并发症,造成较高的发生率和死亡率。故 HSCT 严格限于一般状况良好的、年龄小于 50 岁的患者,部分患者因年龄偏大或并发其他脏器疾病,丧失了进行 HSCT 的机会。

近年来,一种新的治疗方法逐渐开展并被证实有效,即采用相对低毒性、小剂量、非清髓性预处理策略,其目的不是清除肿瘤细胞,而是充分抑制免疫系统保证 Allo-HSCT,形成混合嵌合 (mixed chimerism, MC) 体,即 NST。NST 通过 GVL 效应,清除恶性病变,达到治愈疾病的目的。总之, NST 是安全、有效的。但较高的 GVHD 发生率可能会影响患者的生活质量

¹⁰⁰。故 GVHD 的预防仍不可少, 预防措施与传统 HSCT 基本相似。用 NST 替代传统的 HSCT 是可行的, 但能否完全取代尚有待于长期观察。

非清髓性预处理是一种安全而有效的预处理方案, 具有并发症少, 患者耐受性好等优点, 在 HSCT 中具有良好的应用前景, 进一步的研究将扩展 HSCT 的适应证, 使其可在先天性酶缺陷、自身免疫性疾病、诱导器官移植免疫耐受等领域发挥作用。但应指出的是, 并非所有的恶性血液病患者都适合非清髓性预处理。通过非清髓性预处理所达到的植入一般来说呈 MC 状态, 即患者骨髓中同时存在供者及自身来源的细胞, 自身残留细胞的清除依赖 GVL 效应, 这一过程往往需要数月才能完成。进展较快的恶性血液病常常在此之前复发, 故非清髓性预处理最佳适应证为慢性、非进行性血液疾病, 尤其是 CML 和淋巴瘤等¹⁰¹。

4 抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC)

在 Allo-HSCT 后, 受者体内同时存在受者源性和供者源性 APC 以及不同类型 APC (如树突细胞、单核巨噬细胞和 B 细胞等)。近几年的研究表明受者体内这些不同来源和不同类型 APC 在 GVHD 和 GVL 抗原提呈中所起的作用是不同的。受者 APC 的抗原提呈在诱导 GVL 产生的过程中起着发动并最大化 GVL 的作用, 而供者 APC 的作用很小¹⁰²。由于 MC 体中存在强大的 GVL 效应, Mapara 等¹⁰³假设, MC 体中受者源性 APC 在 GVL 的诱导中可能起着非常重要的作用。

虽然对 GVHD 和 GVL 中 APC 作用的研究是最近几年才开始的, 但是这些研究结果对我们减少 GVHD 发生率以及严重程度和保留 GVL 有非常重要的指导作用。已有的研究¹⁰⁴结果显示, 受者源性 APC 尤其是树突细胞在启动 GVHD 中起着非常重要的作用, 单独受者源性 APC 启动的 GVHD 比较轻微, 而供者源性 APC 中则起着放大至最大化的作用; 受者源性 APC 在 GVL 的产生中起着关键性的作用, 而供者源性 APC 的作用有限。这就为我们减少 GVHD 而保留 GVL 提供了新思路, 即去掉供者源性 APC (比如仅仅移植 T 淋巴细胞) 可能会减小 GVHD 而保留 GVL。

5 G-CSF 动员

G-CSF 不仅是造血干细胞的动员剂, 还同时具有免疫调节作用。Morris⁹研究表明, G-CSF 动员的骨髓移植后的急性 GVHD 发生率显著低于 G-CSF 动员的外周造血干细胞移植患者。Huang 等¹⁰⁵研究指出, G-CSF 动员的骨髓和外周血混合移植用于临床降低了 GVHD, 解决了造血干细胞供者来源缺乏问题, 但复发仍是移植后的主要并发症和死亡原因之一。黄晓军等考虑将细胞因子联合应用, 利用小鼠的 GVHD 和 GVL 模型证明 IL-11 和 G-CSF 联合在减轻 GVHD 和发挥 GVL 效应方面有协同作用, 两者联合在调节供鼠 T 淋巴细胞的数量和功能、延长移植后受鼠的生存期、降低死亡率、减轻

GVHD 的发生和严重程度等方面均优于 G-CSF 及 IL-11 单独应用, 二者联合应用能有效保留或未减弱 GVL 的作用。

6 其他

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的发现源于小鼠的自身免疫性疾病, 1995 年由 Sakaguchi 等首次报道, 随后许多的研究证明此类细胞属于免疫调节细胞亚群, 在免疫抑制方面发挥重要作用, 随后在人类也发现此类细胞。T-reg 细胞 (即 CD25⁺ 调节性 T 细胞) 在维持自身免疫耐受、维持机体内环境稳定等方面发挥着重要的作用。虽然近几年关于 T-reg 细胞在小鼠的 Allo-HSCT 免疫耐受的研究^{106, 107}获得较大进展, 证实 T 细胞抑制 GVHD 的同时对 GVL 效应无明显影响, 但是在人体, 由于受研究条件限制, 有关 T 细胞与 GVHD 和 GVL 效应的关系尚不明确。同时 T 细胞是通过何种作用机制发挥免疫调节作用, 如何能有效地抑制 GVHD, 同时保护 GVL 效应, 如何在体内或体外扩增这些细胞用于临床等问题均有待进一步探讨。

Allo-HSCT 使恶性血液病患者获得了重生的希望, 但随之带来的 GVHD 严重影响患者移植后的生活质量。为了尽量减少 GVHD 的影响, 研究人员在过去的几十年中不断努力, 证明了 PDT, DLJ, NST, APC, G-CSF 动员和调节性 T 细胞等能减少 GVHD 的发生, 更好的发挥 GVL 的作用, 但目前仍存在很多问题。相信随着 GVHD 及 GVL 效应发生机制研究的不断深入, 不久的将来会在 Allo-HSCT 治疗中诱导 GVL 效应和分离 GVL 与 GVHD 方面取得重大突破, 更好的造福血液病患者。

7 参考文献

- 1 李幼平, 主编. 移植免疫生物学. 第 1 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 202-216.
- 2 Barnes DW, Loutif JF. Treatment of murine leukemia with x-rays and homologous bone marrow: II. 1957. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10: 325-334.
- 3 Morris ES, MacDonald KP, Hill GR. Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? *Blood*, 2006, 107: 3430-3435.
- 4 Boumedine RS, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy*, 2005, 7: 134-143.
- 5 Lundqvist A, McCoy JP, Samsel L, et al. Reduction of GVHD and enhance dantitumor effects after adoptiveinfusion of alloreactive 49-mismatched NK cells from MHC-matched donors. *Blood*, 2007, 109: 3603-3606.
- 6 Costello RT, Rey J, Fauriat C, et al. New approaches in the immunotherapy of haematological malignancies. *Eur J Haematol*, 2003, 70: 333-345.
- 7 Huang XJ, Liu DH, Xu LP, et al. Prophylactic infusion of donor granu-

- lyocyte colony stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells after allogeneic hematological stem cell transplantation in patients with high-risk leukemia. *Leukemia*, 2006, 20: 365-368.
- 8 Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA-mismatched/haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2007, 92: 414-417.
- 9 Kang Y, Chao NJ, Aversa F. Unmanipulated or CD34 selected haplo-type mismatched transplants. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15: 561-567.
- 10 周世勇, 冯四洲, 王玫, 等. 非清髓性造血干细胞移植治疗白血病的初步临床疗效观察. *临床血液学杂志*, 2005, 5: 147-150.
- 11 Sloan E, Childs RW, Solomon S, et al. The graft-versus-leukemia effect of nonmyeloablative stem cell allografts may not be sufficient to cure chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 2003, 32: 897-901.
- 12 Chakraverty R, Sykes M. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood*, 2007, 110: 9-17.
- 13 Mapara MY, Kim YM, Wang SP, et al. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood*, 2002, 100: 1903-1909.
- 14 赵金河, 谢彦晖. 移植抗宿主反应中抗原提呈细胞作用的研究进展. *临床血液学杂志*, 2008, 3: 170-173.
- 15 Huang XJ, Zhao J, Zhao XY, et al. Treating donor mice with rhIL-11 and rhG-CSF promotes transplant-tolerance and preserves the effects of GVL after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res*, 2009, 33: 123-128.
- 16 Tuovinen H, Salminen JT, Arstila TP. Most human thymic and peripheral-blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells express 2 T-cell receptors. *Blood*, 2006, 108: 4063-4070.
- 17 Nadal E, Garin M, Kaeda J, et al. Increased frequencies of CD4⁺CD25⁺ (high) T (regs) correlate with disease relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2007, 21: 472-479.

(收稿日期: 2010-04-26)

(本文编辑: 陈淑莲)

(上接第 103 页)

液相色谱法、免疫组织化学法、荧光分析法^[6]、放射免疫分析法、放射受体分析法、质谱法、流动注射分析法^[7]等,但以上各种方法有的需要大型设备,价格昂贵;有的方法虽然结果准确,但操作繁琐,耗时较长;有的方法有放射性污染,均不适于在临床实验室常规开展,而本文研究所采用的 ELISA 法具有灵敏度高、特异性强、结果准确、操作简单等特点,适于在临床实验室常规操作。然而,ELISA 法检测 AGEs 没有统一的标准,这是由多方面的原因造成的:AGEs 的化学结构复杂多样、没有制备抗体的标准方法、没有统一的计量单位等。为使不同实验室或不同批次所测得的 AGEs 具有可比性, Misuhashi 等^[8]首先提出用正常人血清(normal human serum, NHS)来标准化 AGEs 检测。因 NHS 中可检测到 AGEs,而且其水平处在狭窄范围,所以可用 NHS 平均 AGEs 值作为测定 AGEs 的通用标准。NHS 法所定义的 AGEs 单位为:在竞争性 ELISA 中 1 U AGEs 等于 1:5 稀释的 NHS 所抑制的 AGEs 的量,即 NHS 中 AGEs 量定为 5 U/ml,本文也采用了 Misuhashi 的标准进行检测。

综上所述,血清 AGEs 水平的升高是早期诊断 DM 合并各种慢性并发症的重要指标,而 ELISA 具有快速、灵敏、准确且无放射性污染的特点,适于在临床实验室中作为常规检测 AGEs 的方法。

4 参考文献

- 1 Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis. *Curr Diab Rep*, 2004, 4: 31-36.
- 2 Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation end products: a review. *Diabetologia*, 2001; 129-146.
- 3 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 2005, 54: 1615-1625.
- 4 Huali ZH, Kathryn CB T, Sammy WM S, et al. Increased serum advanced glycation end products are associated with impairment in HDL antioxidative capacity in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23: 927-933.
- 5 Jurgen MB, Sybille F, Gunter S, et al. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289: F645-F659.
- 6 王培昌, 赵琪彦, 张建. 北京健康人群 AGEs 水平测定及其增龄性变化的研究. *中国老年学杂志*, 2006, 26: 725-726.
- 7 张林, 孙子林. 糖基化终产物与 2 型糖尿病慢性并发症的关系调查. *实用预防医学*, 2006, 13: 1140-1141.
- 8 Misuhashi T, Vlassara H, Found HM, et al. Standardizing the immunological measurement of advanced glycation end products using normal human serum. *Immunol Methods*, 1997, 207: 79-88.

(收稿日期: 2010-04-17)

(本文编辑: 陈淑莲)