

雷公藤多甙对急性移植抗宿主病时小鼠 T 细胞及其亚群的影响*

于艳秋 张海鹏 杜烨玮 段忠辉

内容提要 目的:观察雷公藤多甙对急性移植抗宿主病时小鼠脾、皮肤、肺、肠组织中 T 细胞及其亚群(CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞)的影响,探讨雷公藤多甙对急性移植抗宿主病的作用及机理。方法:用直线加速器排空受鼠骨髓后注入供鼠骨髓与脾淋巴细胞的混合液,复制出急性移植抗宿主病(aGVHD)模型。观察雷公藤多甙、雷公藤多甙加环孢素 A(CsA)、CsA 加甲氨蝶呤对各组小鼠脾 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞(流式细胞仪检测),皮肤、肺、肠组织 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞浸润情况(应用免疫组化技术检测)的影响。结果:雷公藤多甙组小鼠脾、皮肤、肺组织 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞明显低于异基因移植组($P < 0.05$),而小肠组织 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞变化不明显($P > 0.05$)。结论:雷公藤多甙可降低脾 T 细胞及亚群数量,减少皮肤、肺的 T 细胞浸润,具有明显的抗 aGVHD 作用。

关键词 移植抗宿主病 雷公藤多甙 T 淋巴细胞

Effect of Glucosidorum Tripterygii Tororum on T-Lymphocyte and Its Subsets in Mice with Acute Graft-Versus-Host Disease YU Yan-qiu, ZHANG Hai-peng, DU Ye-wei, et al *Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang (110001)*

Objective: To observe the effect of Glucosidorum tripterygii tororum (GTT) on T-lymphocyte and its subsets in mice with acute graft-versus-host disease (aGVHD). **Methods:** The recipient mice, after their bone marrow had been evacuated by radiation with linear accelerator, were given the mixture of bone marrow and splenic T-lymphocyte obtained from donor mice to duplicate aGVHD model. The effect of GTT, GTT + Cyclosporin A and CsA + Methotrexate on T-lymphocyte subsets (CD_3^+ , CD_4^+ and CD_8^+) in spleen was determined by flow cytometer, and those on lymphocyte infiltration in skin, lung and intestine was detected with immunohistological technique. **Results:** CD_3^+ , CD_4^+ and CD_8^+ cells in spleen, skin and lung in mice of the GTT treated groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$), while in intestinal tissue, the difference was insignificant ($P > 0.05$). **Conclusion:** GTT could reduce the T-lymphocyte and its subsets in spleen and the T-lymphocyte infiltration in skin and lung, showing evident anti-aGVHD effect.

Key words graft-versus-host disease, Glucosidorum tripterygii tororum, T-lymphocyte

异基因骨髓移植是许多疾病的重要治疗手段,它为患者提供了长期缓解及根治的机会。但由于多种因素所致异基因骨髓移植时,急性移植抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)是异基因骨髓移植后的主要并发症。aGVHD 的发生,主要是由于骨髓移植中供者来源的成熟 T 细胞被宿主的异型组织相容性抗原所激活,增殖分化为效应 T 细胞^[1,2]。这些细胞在受者体内移动,对宿主的组织器官发动免疫攻击,从而导致 aGVHD。目前认为防治 aGVHD 是

决定异基因骨髓移植成败的关键。

aGVHD 防治尚无理想的方法,临床上移植后采用免疫抑制剂等,如环孢素 A(Cyclosporine A, CsA)。但 CsA 等具有很大的毒副反应,如严重的感染和肝、肾损伤以及诱发恶性肿瘤等。因此,寻找一种较温和的药物,使 aGVHD 既能够减轻,又不致使机体受到过多损伤,一直是国内外学者关注的课题。

雷公藤多甙(Glucosidorum Tripterygii Tororum, GTT)作为免疫调节剂在临床已应用于自身免疫病的治疗,目前认为雷公藤多甙主要通过抑制 T 细胞的功能而发挥免疫抑制效应^[3,4]。本研究观察了 aGVHD 时小鼠经雷公藤多甙、CsA、甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)作用后,小鼠脾、皮肤、肺、肠组织 T 淋巴细胞及

* 国家中医药管理局青年基金资助项目(No. 2000-J-Q-06)
中国医科大学病理生理教研室(沈阳 110001)

其亚群(CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+),以探讨雷公藤多甙防治 aGVHD 的作用及其机理,为其进一步临床应用提供实验依据。

材料与方法

1 动物模型复制与处理

1.1 aGVHD 模型建立 同基因骨髓移植:供鼠 BALB/C 雌性,受鼠 BALB/C 雄性;异基因骨髓移植:供鼠 BALB/C(H-2^d)雄性,受鼠 C₅₇BL/6(H-2^b)雌性,均为 8~12 周龄,体重 20g 左右,由中国科学院动物研究所提供。无菌取供鼠脾脏及双侧股骨骨髓,分离脾淋巴细胞,用 RPMI 1640 液调脾淋巴细胞浓度为 2×10^7 /ml,调骨髓细胞浓度为 4×10^6 /ml。将脾细胞与骨髓细胞按体积 1:1 混合,制成混合细胞悬液。受鼠在骨髓移植前 24h 内应用直线加速器(西门子公司)全身照射,总剂量为 1800cGy,剂量率为 200Gy/min,将制成的混合细胞悬液经尾静脉输给受鼠。每只输入 0.5ml,含骨髓细胞 1×10^7 个,脾淋巴细胞 5×10^6 个,制成 aGVHD 模型。受鼠于无菌室内饲养,食料及水均高压灭菌,饮水中加入庆大霉素(320mg/L)、红霉素(250mg/L)。

1.2 实验动物分组 将动物随机分成 5 组,同基因移植组,异基因移植组,CsA + MTX 组,GTT 组,GTT + CsA 组。从移植当日起,同基因移植组与异基因移植组受鼠,每日腹腔注射生理盐水 0.2ml,CsA + MTX 组受鼠,每日腹腔注射 CsA(Sigma 公司)2.5mg/kg,第 1、3、5、9 天腹腔注射 MTX(江苏恒瑞医药股份公司,批号:0040192,注射用针剂)7mg/m²。GTT 组受鼠每日腹腔注射 GTT(湖南株江第三制药厂,批号:20000501,片剂,用吐温 80 溶解制成 1mg/ml 的 GTT 注射液)5mg/kg。GTT + CsA 组受鼠每日腹腔注射 GTT 2.5mg/kg、CsA 2.5mg/kg,骨髓移植第 11 天处死各组受鼠,检测各项指标。

2 脾脏 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 CD_8^+ 检测 取受鼠脾,0℃下将脾研磨制成细胞悬液,分离淋巴细胞,用含 NaN₃-Hank's 液调细胞浓度为 1×10^7 /ml。取上述细胞悬液 100μl,分别加入 8μl 用 FITC 标记的 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 单克隆抗体(Sigma 公司),4℃避光孵育 30min,用 NaN₃-Hank's 液洗细胞 2 次后,用流式细胞仪(美国 BD 公司 FACScan 型)测定,分别计数 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞的百分率。

3 皮肤、肺、小肠组织 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 CD_8^+ 检测 采用免疫组织化学法取受鼠皮肤、肺、小肠组织,10%

福尔马林固定,石蜡包埋,切片分别加 FITC 标记的抗小鼠 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 单克隆抗体各 8μl,荧光显微镜下观察并照相,采用图像分析仪(LUZEX F 型日本)进行图像处理,计算每视野下荧光面积。

4 数据处理 所有数据采用配对 *t* 检验进行统计学分析。

结果

1 一般状态 骨髓移植后观察受鼠一般状态,同基因移植组小鼠一般状态较好,较活泼,食欲较好,脱毛、弓背等 aGVHD 症状不明显。异基因移植组小鼠一般状态差,倦怠、食欲不振、脱毛、弓背等 aGVHD 症状明显。GTT 组、GTT + CsA 组、CsA + MTX 组小鼠一般状态较好,aGVHD 症状不明显,GTT 组、GTT + CsA 组小鼠食欲差。

2 各组受鼠生存率的比较 同基因移植组生存率(9/10)明显高于异基因移植组(8/19),GTT 组生存率(12/19)高于 CsA + MTX 组(9/18)和 GTT + CsA 组(10/18)。

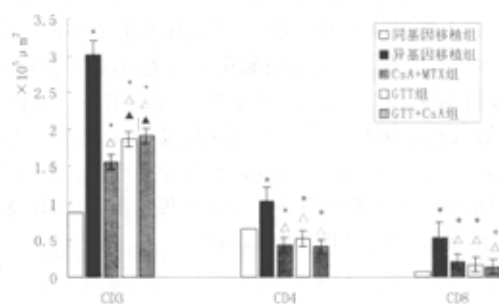
3 各组小鼠脾脏 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 CD_8^+ 比较 见表 1。

表 1 各组小鼠脾 T 淋巴细胞及其亚群比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+
同基因移植	8	65.31 ± 4.27	57.84 ± 5.41	5.65 ± 0.16
异基因移植	8	80.53 ± 3.86 [*]	74.18 ± 4.84 [*]	9.10 ± 1.39 [*]
CsA + MTX	8	71.39 ± 7.73 ^{*△}	57.88 ± 4.32 [△]	6.61 ± 0.47 ^{*△}
GTT	8	70.39 ± 2.08 ^{*△}	67.25 ± 7.28 ^{*△▲}	8.23 ± 1.62 ^{*△▲}
GTT + CsA	8	75.23 ± 3.91 [▲]	70.64 ± 3.37 ^{*▲}	7.87 ± 1.86 ^{*△▲}

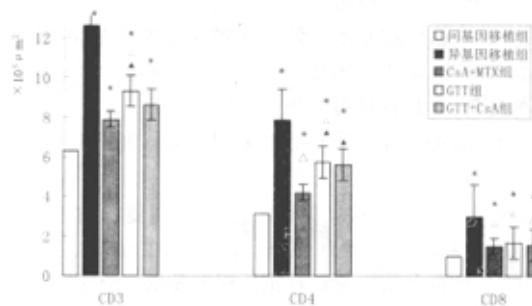
注:与同基因移植组比较,**P* < 0.05;与异基因移植组比较,[△]*P* < 0.05;与 CsA + MTX 组比较,[▲]*P* < 0.05

4 各组皮肤、肺、小肠组织 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 CD_8^+ 浸润荧光面积变化 见图 1~3。



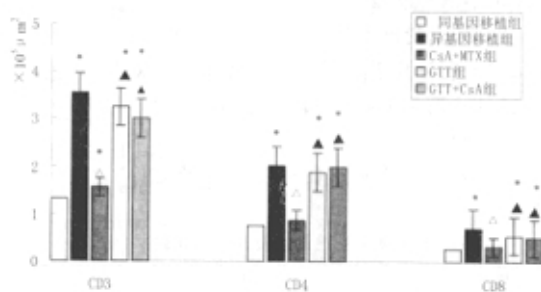
注:与同基因移植组比较,**P* < 0.05;与异基因移植组比较,[△]*P* < 0.05;与 CsA + MTX 组比较,[▲]*P* < 0.05

图 1 各组皮肤 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞荧光面积变化



注:与同基因移植组比较, * $P < 0.05$; 与异基因移植组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 CsA + MTX 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 2 各组肺浸润的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞荧光面积变化



注:与同基因移植组比较, * $P < 0.05$; 与异基因移植组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 CsA + MTX 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 3 各组小肠浸润 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞荧光面积变化

讨 论

aGVHD 的发病机制极为复杂,至今未明。一般认为骨髓移植时,供受者主要和次要组织相容性抗原复合物的差异是引起 aGVHD 的根本原因。而与骨髓同时进入宿主体内的少量 T 细胞具有重要作用。因此,本研究检查了与全身细胞免疫有关的脾 T 细胞及其亚群数量;和 aGVHD 时主要受损器官——皮肤、肺、肠道的 T 细胞及其亚群的浸润情况,以观察 GTT 及 GTT + CsA 抑制 aGVHD 的作用及其机制。并同时与目前国内外主要骨髓移植中心常用的抗 aGVHD 较理想方案(CsA + MTX)进行比较。

本实验观察到:同基因移植组小鼠未出现典型的 aGVHD 症状,而异基因骨髓移植组小鼠出现明显的 aGVHD 症状,且其皮肤、肺、小肠、脾组织的 T 细胞及其亚群数量比同基因骨髓移植组明显升高($P < 0.05$)。

GTT 可提高 aGVHD 小鼠生存率;GTT 及 GTT + CsA 较异基因骨髓移植组明显降低了 aGVHD 时小鼠脾、皮肤、肺靶器官中浸润的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 阳性细胞数($P < 0.05$);肠组织中浸润的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 阳性细胞数虽降低,但无统计学意义,这可能与 GTT 的胃肠道毒性反应较大有关。

在与 CsA + MTX 联合应用组比较中看到:对脾、肠中 T 细胞及亚群影响方面, CsA + MTX 明显优于 GTT 及 GTT + CsA;而在皮肤、肺组织中无明显差别。本文也同时观察了 GTT 与 GTT + CsA, 两组之间的变化无统计学上的意义。这也可能与联合应用后的毒副反应较大等有关,有待今后进一步探讨。

综上,雷公藤多甙具有明显的抗小鼠 aGVHD 作用,这与其降低脾及 aGVHD 靶器官中 T 细胞及其亚群数量有关。提示雷公藤多甙在防治 aGVHD 方面有明显的应用前景,但其对胃肠道的毒性反应有待今后研究予以克服。

参 考 文 献

1. Krenger W, Rossi S, Piali L, et al. Thymic atrophy in murine acute graft-versus-host disease is effected by impaired cell cycle progression of host pro-T and pre-T cells. *Blood* 2000;96(1): 347—354.
2. Vandijk Astrid MC, Kessler Floorije, Stadhouders-Keet. Simone AE, et al. Selective depletion of major and minor histocompatibility antigen reactive T cell towards prevention of acute graft-versus-host-disease. *British Journal of Haematology* 1999; 107:169—175.
3. 于艳秋,王常慧,张海鹏.雷公藤多甙对皮肤移植小鼠 T 淋巴细胞及其粘附分子表达的影响. *中国中西医结合杂志* 1999; 19(基础理论研究特集):99—100.
4. 林科雄,王长征,钱桂生.雷公藤多甙对哮喘患者 Th1、Th2 细胞因子产生的影响. *中国中西医结合杂志* 2001;21(1): 22—27.

(收稿:2001-12-26 修回:2002-07-03)