文章编号:1000-5404(2005)13-1415-03

综述

联合免疫缺陷小鼠的发展及其人免疫重建的研究

Development of SCID mice and the human immune reconstitution in SCID mice

谭玉波 综述,林 晨,李扬秋 审校 (暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室,广州 510632)

多年来研究者致力于在联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficiency mice, SCID mice)体内重建有功能的人免疫系统,期以解决动物模型难以确切反映人体免疫系统的特点和研究人体免疫应答受限于体外实验的难题。1988 年 Mosier 等[1]将人外周血淋巴细胞移植入 C.B-17 SCID 小鼠首次建立了人源化的 SCID 鼠模型。人类造血干/祖细胞移植给联合免疫缺陷鼠后可在其体内多系分化、增殖。这类细胞可通称为联合免疫缺陷鼠再植细胞(SCID-repopulating cell, SRC),上述模型亦被称为 Hu-SRC-SCID 模型。针对早期使用的联合免疫缺陷小鼠存在免疫渗漏、有 NK 细胞活性等缺陷,近年来成功地在 C.B-17 SCID 鼠基础上又培育出多种品系的多突变型的免疫缺陷小鼠。新品系免疫缺陷模型鼠的应用、对 SRC 本质进一步认识均极大提高了 SRC 的植入能力,所重建的免疫系统功能也更加完整。以下就 SCID 鼠的发展和目前对 Hu-SRC-SCID 模型的研究应用作一综述。

1 免疫缺陷模型鼠的发展

1.1 单突变免疫缺陷鼠

C.B-17 SCID 鼠,其免疫缺陷源于小鼠第 16 号染色体的 DNA-PKCS 基因发生了无义突变(终止密码插入突变)不能正常表达 DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)。DNA-PKCS 是 DNA-PK 的催化亚基,与 Ku 蛋白一起组成 DNA-PK。DNA-PK 为 DNA 重组酶的活化所必需,它们在双链 DNA 损伤修复和 T、B 细胞的 TCR、BCR 基因 V、D、J 基因重排时发挥重要功能[2]。Ku 蛋白是 Ku70、Ku80 亚基的异二聚体,含有能与 DNA 结合的末端。Ku70、Ku80、DNA-PKCS 基因受损均可致小鼠的联合免疫缺陷,但迄今在人尚未发现由这些基因突变所致的免疫缺陷。活化态 DNA 重组酶的缺如使 TCR、BCR 基因重排不能正常进行,原始 T、B 细胞不能进一步分化为功能性的 T、B 细胞,产生细胞和体液双重免疫缺陷。但 C.B-17 SCID 鼠非淋巴性造血细胞能分化成为正常的巨噬、粒、巨核、红系细胞和 NK 细胞,且鼠具有正常的骨髓微环境和胸腺基质,适宜人源细胞的移植。应用该鼠有一定局限性,首先,相应于 T、B 细胞免疫功能缺陷,其固有免疫特别是 NK 细胞活性相对增强,使得 SRC 植入水平较低,植入后人源细胞在骨髓中所占比例仅为 0.5%~5%;其次,存在免疫渗漏现象,即随着鼠龄增长,约有 90% C.B-17 SCID 鼠产生少量的淋巴细胞 ,并表达少量的免疫球蛋白,原因在于随着鼠龄增长,TCR、BCR 基因有可能发生随机重排,能表达有功能的抗原受体,使部分淋巴细胞恢复功能[3]。

1.2 双突变免疫缺陷鼠

NOD/SCID 鼠。非肥胖性糖尿病(nonobese diabetes, NOD)鼠有自身免疫性 T 细胞介导非胰岛素依赖性糖尿病及多种固有免疫缺陷,是研究糖尿病的良好动物模型而为全世界广泛使用并繁衍出不同品系。NOD/SCID 鼠是 C.B-17 SCID 鼠与 NOD 鼠反交产生的,是目前最为普遍使用的免疫缺陷模型鼠。该系鼠既拥有 C.B-17 SCID 鼠的特征,缺乏适应性免疫系统,不再发生自身免疫性非胰岛素依赖性糖尿病,同时拥有 NOD 鼠具备的多种固有免疫缺陷,包括 NK 细胞活性低、骨髓功能发育不正常(巨噬细胞对 LPS 反应性分泌 IL-1 的能力下降)、约 30%纯合子无补体成分 C5 而缺乏补体系统的溶血活性。人外周血单个核细胞(PBMC)对 NOD/SCID 鼠的植入效率比 C.B-17 SCID 鼠要高 5~10 倍[4]。相对于 90% C.B-17 SCID 鼠发生免疫渗漏的可能性,仅有不到 10% NOD/SCID 鼠会发生渗漏[5]。此鼠亦有不利于外源性细胞移植的品系特征:与 NOD 鼠相比其骨髓细胞数较少,这意味着 HSC 生长所依赖的龛位(niches)减少;对放射更敏感,400 rads 的伽玛照射可致死;早期即易患胸腺淋巴瘤,其平均寿命不到 8 个月,NK 细胞活性低是主要原因,另一可能的原因是其 11 号染色体携带有亲 NOD 鼠的白血病前病毒基因"Emv30"。将 11 号染色体上 Emv30 置换后产生的 Emv30^{null} NOD-scid 鼠的早期胸腺淋巴瘤发病率大大降低[6]。

NOD/LtSz-*rag*1^{null} 鼠。该鼠由缺乏重组激活基因 1(recombination activating gene-1, *rag*1)的 C57BL/6,129 *rag*1^{null} 鼠和 NOD 鼠反交产生。成熟的免疫球蛋白和 T 细胞抗原受体基因是由彼此分离的编码基因片段组装而成的,它们在淋巴细胞发育过程中经历 V(D)J 重组。由 *rag*1, *rag*2 分别编码的重组激活蛋白(recombination activating protein, RAP)RAP1 和 RAP2 作为淋巴细胞特异性因子,是淋巴细胞发育和 V(D)J 重组所必需的。RAP 蛋白识别并结合重组信号序列(recombination signal sequences, RSS)是正确启动 V(D)J 重组的关键一步。RAP1 和 RAP2 在识

基金项目:广东省科技计划项目(2002C1040501),中德生物技术合作项目(CHN02/319),广州科委科技攻关项目(2003J1-I0011)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Guangdong (2002C1040501), Germany-China Cooperation Program on biotechnology (CHN02/319), and the Key Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Guangzhou (2003J1-I0011)

作者简介:谭玉波(1976-),男,湖南省益阳市人,硕士,医师,主要从事感染免疫方面的研究。电话:(020)85225733
通讯作者:林 晨,电话:(020)85220257

收稿日期:2004-12-13;修回日期:2005-04-12

别结合反应中的地位不同，体内单链杂交 DNA 结合分析显示，RAP1 在没有 RAP2 存在的情况下，即可经 RSS 上的 A + T 九聚体介导单独完成对 RSS 的识别和结合作用，而 RAP2，只有在 RAP1 存在时，方可与 DNA 结合。NOD/LtSz- RAP1^{null} 鼠由于无 *rag*1，不能启动 V(D)J 重组，无功能性的 T、B 细胞，且不发生随鼠龄增加而出现免疫渗漏的现象。其平均寿命长，为(319.5 ± 7.5) d，比 NOD/SCID 鼠高出 8 周以上，对辐射的耐受较好[7]。

1.3 多突变免疫缺陷鼠

NOD/SCID/β2m^{null} 鼠。无论是 C.B-17 SCID 鼠，还是 NOD/SCID 鼠都仍然存在 NK 活性，将缺乏 β-2 微球蛋白的 β2m^{null} 鼠与 NOD/SCID 鼠反交发展而来的 NOD/SCID/β2m^{null} 鼠因不能产生 MHC Ⅰ类分子，其 NK 活性比 NOD/SCID 鼠更低，即使用聚肌胞刺激后也难测到，人 PBMC 的植入效率也较 NOD/SCID 鼠高 5 ~ 10 倍。但由于 NOD/SCID/β2m^{null} 鼠的 IgG 血浆清除率较高使得再植后产生的人源 IgG 表达水平较 NOD/SCID 鼠并无明显升高，可能的原因是 β-2 微球蛋白缺失导致 Fc 受体表达下降，而 Fc 受体能保护 IgG 免于被代谢。NOD/SCID/β2m^{null} 鼠的寿命短，对离子辐射很敏感，几乎所有的 NOD/SCID/β2m^{null} 鼠均发生胸腺淋巴瘤，多因其早期症状而死亡，平均寿命仅为(191 ± 11) d[8,9]。

NOD/SCID/γ_c^{null} 鼠。白细胞介素-2 受体的 γ 链又称共同细胞因子受体 γ 链(common cytokine receptor γ chain，γ_c)。γ_c 是 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 等受体的共同组分，这些细胞因子与各种免疫细胞的分化、生长休戚相关，更是淋巴细胞信号传导的关键环节。γc 缺陷可致 SCID，人类约一半的 SCID 源于 γ_c 基因缺陷。新近开发的 NOD/SCID/γ_c^{null} 鼠是由 NOD/Shi-SCID 鼠与 C57B/6J-γ_c^{null} 鼠交配选育而成，该鼠没有淋巴细胞；无 NK 活性，聚细胞刺激后测不到 NK 活性；NOD/SCID 引入 γc 突变后引起 CD11$^+$ 树突状细胞(DC)的功能低下，导致 INFγ 分泌显著下降。该鼠植入能力极高，移植约 100 个 CD34$^+$ 细胞即可成功再植并多系分化。人脐血 CD 细胞移植 NOD/SCID/γ_c^{null} 鼠后易检出较成熟的 CDT 细胞[10]。

2 Hu-SRC-SCID 模型及免疫重建

在免疫缺陷鼠体内建立人的免疫系统，可提供研究人免疫系统的体内实验平台，而广泛应用于发展疫苗、药物试验、肿瘤防治和 HIV 感染机制等方面的研究。最早对鼠人源化的报道是在 1988 年，Moiser 等[1]将人外周血淋巴细胞(PBL)经皮下及肾包膜下植入未经照射 C.B-17 SCID 鼠。其后，研究者通过直接将 PBL 注射到免疫缺陷鼠的腹膜腔，可持续检测到活化的人 T 细胞。此类模型(Hu-PBL-SCID 模型)的缺陷在于无多系细胞分化，功能性 T 细胞表达时间短，B 细胞低表达，且 PBL 植入 3 周后逐渐产生移植物抗宿主反应。另两种在免疫缺陷鼠体内建立人免疫系统的模型分别是 Hu-SCID 和 Hu-SRC-SCID 模型[11]。采用胎骨髓、胎肝联合或不联合胎胸腺组织联合经肾包膜下移植，能在 SCID 鼠体内较好地重建人的免疫、造血系统，称 Hu-SCID 模型。两类缺陷限制了这种模型的应用，其一是植入胚胎组织后要经过好几个月的时间才能检测到嵌和体的形成；其二是人的胚胎组织获取较困难，应用中有道德伦理上的阻碍。反之，Hu-SRC-SCID 模型可以采用简单的直接静脉注射的方式将 SRC 植入免疫缺陷鼠体内，在较短时间内即可在受体鼠检测到嵌和体的形成，成为当前普遍采用的模型。

2.1 SRC 的本质

SRC 最初被表述为经过静脉植入照射过的 SCID 鼠可多系分化重建人造血和免疫功能的一类细胞。对 SRC 的研究促进了造血干细胞的认识。目前认为 SRC 主要由较原始造血干/祖细胞组成的一个非均质细胞群，其细胞表面标记包括 CD34$^+$、CD38$^-$、CD133$^+$、CD59$^+$、Thy1$^+$、c-kit$^-$、Lin$^-$ 等。尽管最近的研究发现存在 CD34$^-$ 的造血干细胞，如侧群细胞(Side population cell)等，但从发育生物学的角度来看，植入后能维持长期和多系分化的 CD34$^+$/CD38$^-$ 细胞起源于这类 CD34$^-$ 细胞，因此 CD34$^+$/CD38$^-$ 目前被作为 SRC 的主要表面标记广泛应用[12]。

2.2 移植细胞来源和植入方式

造血干细胞主要存在于骨髓中，在早期的实践中，骨髓细胞是最主要的移植物。后来发现一些药物可将骨髓池中的造血干/祖细胞驱赶到外周血，这样动员的外周血也成为重要的移植细胞来源。近年来，脐血被认为是更好的移植细胞来源，主要的原因是脐血 SRC 含量高，据估计，每 9.3×10^5、$1/(3 \times 10^6)$、$1/(6 \times 10^6)$个脐血、骨髓或动员外周血细胞中含一个 SRC。另外脐血还有其它优势：其一，脐血的 SRC 相较骨髓对造血抑制因子反应不同，它对 TNF-α 及 INF-α 的敏感性要差一些；其二，静止期脐血 SRC 能快速脱离 G_0 期而进入细胞周期；其三，脐血的 SRC 染色体的端粒长度相对骨髓的更长；此外，脐血细胞植入后还可以分泌相关的细胞因子促进 SRC 的分化增殖[13]。建立 Hu-SRC-SCID 模型早期采用的方法是通过 SCID 鼠的尾静脉直接输入由骨髓或动员外周血分离的单个核细胞，脐血因 SRC 含量相对较高，不经分离单个核细胞而直接输入脐血也能有效植入。为了能充分利用移植源和提高植入效率，目前多应用流式细胞术或免疫磁性分选法分离出纯度较高的 SRC 予以植入。

2.3 植入前后的处理

C.B-17 SCID 鼠具有 NK 细胞活性和吞噬细胞功能，在细胞植入前可采取不同措施以提高植入效率。使用一些单抗，如 anti-asialo GM1 和 anti-IL-2Rβ 能下调鼠的固有免疫，提高植入水平，但最常用的方法是对受体鼠预先进行剂量为 2.5 ~ 4.0 cGy 的照射。照射能降低鼠 NK 细胞活性和 Mφ 吞噬能力，减少对植入细胞的排斥，同时照射能破坏受体鼠原有的造血而供给 SRC 植入或归巢所需的龛位。研究表明照射后分次移植较照射后 4 h 内单次移植的植入效率更高。经照射预处理使原位造血干细胞在损伤后数天内逐渐发生凋亡和/或死亡，进而使龛位逐步腾出。腾出存在的龛位有时间性，如果无干细胞的及时植入，龛位则会因基质细胞的损伤、造血生长因子的重分布以及淋巴细胞的浸润而消失。归巢是一个主动性过程，指造血干细胞高度选择性地定居在骨髓等造血组织，并与造血微环境特异结合，进行增殖分化，重建造血功能。SRC 移植后在髓外要经过多次迁移，最后在 24 h 内完成归巢，如无及时可供植入的龛位，移植的 SRC 则进入肝、脾、肺等的网状组织中，不能发挥正常功能。分次移植是充分利用了每次腾出的龛位，促进移植

的细胞归巢[14]。由于移植的鼠体内无 SRC 所需人源细胞因子，接受移植后给予人的细胞因子如 SCF、GM-CSF、IL-3 等能明显提高植入水平。近几年对趋化因子 SDF-1 的研究提示 SDF-1/CXCR-4 对 $CD34^+$ 细胞的归巢起关键性作用，应用 SDF-1 使通过静脉注入 $CD34^+$ 细胞快速移位到骨髓微环境，可提高植入水平[15,16]。

2.4　Hu-SRC-SCID 模型的不足

以 C.B-17 SCID 鼠为宿主的 Hu-SRC-SCID 模型能较好的重建人免疫系统，一般植入后 4～5 周可在外周血检测到人源 T 细胞，B 细胞出现稍晚（约 6 周左右）。对 Ig 的测定表明，植入早期鼠血清中人 Ig 以 IgM、IgA 为主，10 周后血清中出现较高浓度的 IgG 提示 B 细胞成熟。双、多突变免疫缺陷鼠植入水平较 C.B-17 SCID 鼠大为提高，一只 NOD/SCID 鼠成功植入只需要 9.3×10^5 个脐血单个核细胞，而 NOD/SCID/$\beta2m^{null}$ 鼠仅需 3.6×10^4，但以 NOD/SCID、NOD/LtSz-$Rag1^{null}$ 为宿主的 Hu-SRC-SCID 模型重建的人免疫功能并不完整，植入后检测到的 T 细胞多为较原始，成熟 T 细胞的标记 $CD3^+$ 较少检测到，原因在于这些鼠的胸腺上皮细胞不易诱导人 T 细胞的成熟[17]。NOD/SCID/γ_c^{null} 能很好地重建人免疫功能，在 SRC 植入的 12 周后可在外周血和脾都能检测到 $CD3^+$ T 细胞，其 TCRVβ 区为多谱性，能受植物血凝素的刺激增殖并分泌细胞因子[18,19]。该鼠造血微环境的那些因素特别适于人的 T 细胞发育仍在研究中。

3　展望

免疫缺陷鼠发展的新方向是应用转基因技术使鼠产生人的细胞因子支持植入人源细胞的分化、增殖。最近用携带人 *gm-csf* 基因的慢病毒载体（HIV-1）转染 NOD/SCID 鼠单个胚胎细胞开发出了产生人 *gm-csf* 的转基因鼠[20]，可预见应用转基因技术将开发出更适宜于人免疫重建的免疫缺陷模型鼠。

关键词：免疫缺陷鼠；再植；免疫重建

中图法分类号：R593.3　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] Mosier D E, Gulizia R J, Baird S M, *et al*. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency [J]. Nature, 1988, 335(6187): 256－259.

[2] Watanabe F, Shinohara K, Teraoka H, *et al*. Involvement of DNA-dependent protein kinase in down-regulation of cell cycle progression [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(4): 432－440.

[3] Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, *et al*. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice [J]. Science, 1992, 255(5048): 1137－1141.

[4] Hesselton R M, Greiner D L, Mordes J P, *et al*. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice [J]. J Infect Dis, 1995, 172(4): 974－982.

[5] Shultz L D, Schweitzer P A, Christianson S W, *et al*. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice [J]. J Immunol, 1995, 154(1): 180－191.

[6] Serreze D V, Leiter E H, Hanson M S, *et al*. Emv30^{null} NOD-scid mice. An improved host for adoptive transfer of autoimmune diabetes and growth of human lymphohematopoietic cells [J]. Diabetes, 1995, 44(12): 1392－1398.

[7] Shultz L D, Lang P A, Christianson S W, *et al*. NOD/LtSz-Rag1^{null} Mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells[J]. J Immunol, 2000, 164(5): 2496－2507.

[8] Christianson S W, Greiner D L, Hesselton R A, *et al*. Enhanced human $CD4^+$ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice [J]. J Immunol, 1997, 158(8): 3578－3586.

[9] Ishikawa F, Livingston A G, Wingard J R, *et al*. An assay for long-term engrafting human hematopoietic cells based on newborn NOD/SCID/β2-microglobulin(null) mice [J]. Exp Hematol, 2002, 30(5): 488－494.

[10] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, *et al*. NOD/SCID/γ_c^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. Blood, 2002, 100(9): 3175－3182.

[11] Yoshikawa H, Lennon V A. ACh receptor protein drives primary and memory autoantibody responses in chimeric human-SCID mice [J]. Clin Immunol, 2002, 104(2): 128－137.

[12] Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M. CD34-hematopoietic stem cells: current concepts and controversies [J]. Stem Cells, 2003, 21(1): 15－20.

[13] Noort W A, Willemze R, Fibbe W E, *et al*. High doses of $CD34^+$ cells from umbilical cord blood, bone marrow and mobilized peripheral blood result in comparable myeloid engraftment in the nod/scid mice[J]. Exp Hematol, 2000, 28(7 Suppl 1): 111.

[14] Jetmore A, Plett P A, Tong X, *et al*. Homing efficiency and early cell cycle kinetics of human $CD34^+$ cells transplanted into conditioned nod/scid recipients[J]. Exp Hematol, 2000, 28(7 Suppl 1): 96－97.

[15] Kahn J, Byk T, Jansson Sjostrand L, *et al*. Overexpression of CXCR4 on human $CD34^+$ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation[J]. Blood, 2004, 103(8): 2942－2949.

[16] Perez L E, Alpdogan O, Shieh J H, *et al*. Increased plasma levels of stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) enhance human thrombopoiesis and mobilize human colony-forming cells (CFC) in NOD/SCID mice [J]. Exp Hematol, 2004, 32(3): 300－307.

[17] Res P, Blom B, Hori T, *et al*. Downregulation of CD1 marks acquisition of functional maturation of human thymocytes and defines a control point in late stages of human T cell development [J]. J Exp Med, 1997, 185(1): 141－151.

[18] Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, *et al*. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood $CD34^+$ cells using the NOD/SCID/γ_c^{null} mice model[J]. Blood, 2003, 102(3): 873－880.

[19] Matsumura T, Kametani Y, Ando K, *et al*. Functional CD5+ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/γ_c^{null} (NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood $CD34^+$ cells [J]. Exp Hematol, 2003, 31(9): 789－797.

[20] Punzon I, Criado L M, Serrano A, *et al*. Highly efficient lentiviral-mediated human cytokine transgenesis on the NOD/scid background [J]. Blood, 2004, 103(2): 580－582.

（编辑　栾　嘉）