文章编号:1000-5404(2006)18-1837-03

论著

GITR 抗体对 L615 白血病抑制作用的实验研究

杨晓鲲,郑峻松,张 新,蒲晓允 (第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨糖皮质激素诱发型 TNF 受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR)的抗体对抗小鼠 L615 白血病(T 淋巴细胞来源白血病)的效果和作用机制。**方法** 以 L615 小鼠建立白血病模型,分 3 组实验组以及阴性对照组,观察实验小鼠生存状态及时间、外周血白细胞计数及分类、外周血和骨髓中白血病细胞形态变化、肝脾指数、肝脾组织病理改变。**结果** GITR 抗体可以延长 L615 白血病小鼠的生存时间,可引起骨髓中白血病细胞发生凋亡、坏死、肝脾指数降低、肝脾组织被白血病细胞浸润,提示 GITR 抗体能够降低和缓解白血病细胞所致的小鼠外周血白细胞的升高和浸润,以及肝脾的肿大。**结论** 通过免疫调节机制 GITR 抗体能够有效地抑制 L615 白血病细胞的增殖,进而抑制白血病的发展。

关键词: GITR 抗体;L615 白血病;调节性 T 细胞;免疫调节
中图法分类号: R392.11;R392.12;R733.7 **文献标识码**: A

Anti-GITR antibody inhibits L615 leukemia in mouse

YANG Xiao-kun, ZHENG Jun-song, ZHANG Xin, PU Xiao-yun (Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and the mechanism of the GITR-antibody (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand antibody) on the mouse leukemia model induced by L615. **Methods** The mouse leukemia models induced by L615 cells were divided into 4 groups: negative controls (peritoneal injection of normal saline, 0.2 ml/d), GITR group (GITR, 100, infused through caudal vein 2 d before leukemic lymphocytes inoculation, again at dose of 50 μg/each mouse after inoculation), Cyclophosphamide group (200 mg · kg^{-1} · d^{-1}, intraperitoneal injection from the 3rd day after inoculation for 3 d), GITR + Cyclophosphamide group (100 mg · kg^{-1} · d^{-1} Cyclophosphamide instead). The survival time, leukocyte counting in the peripheal blood, liver and spleen index were calculated and the pathological examination of liver, spleen were performed. **Results** GITR-ligand could prolong the survival time of mouse leukemia model, lead the necrosis and apoptosis of leukemic cells in bone marrow, decrease the liver and spleen index, decrease and relieve the leukocyte increase of peripheal blood and the irregular swelling of liver and spleen. **Conclusion** Through immunoregulation, GITR-antibody can inhibit the L615 leukemic cells effectively, therefore inhibit the progress of leukemia to some extent.

Key words: GITR antibody; L615 leukemia; regulatory T cells; immunoregulation

调节性 T 细胞的功能研究最近已经成为免疫领域的一个热点,它参与了机体的很多生理病理过程,最初人们的注意力主要集中在其维持机体自身免疫耐受的作用上,而日本学者 Sakaguchi 等发现调节性 T 细胞通过免疫调节作用能够间接影响机体对抗肿瘤的作用。本研究将调节性 T 细胞表面上的高表达分子产物糖皮质激素诱发型 TNF 受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR, 亦称作 TNFRSF18)的抗体与 Treg 细胞结合,通过抑制 Treg 细胞功能而产生抑制白血病细胞的作用,并在 L615 急性淋巴细胞白血病动物模型上成功观察到了 GITR 抗体抑制白血病的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GITR 抗体(美国 R&D 公司);环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司生产,批号:041006);RPMI1640 培养基,胎牛血清(Gibco 公司),红细胞裂解液,瑞氏染液,过氧化物酶染液(自配),碘化吡啶(PI)(本校流式细胞实验室提供)。

作者简介:杨晓鲲(1978-),男,四川省成都市人,硕士,医师,主要从事临床检验诊断学方面的研究。电话:(028) 81576987, E-mail: yangxk191@sina.com
通讯作者:蒲晓允,电话:(023)68755637, E-mail: puxiaoyun@yahoo.com
收稿日期:2005-09-19;修回日期:2006-06-01

L615 近交系小鼠共48 只,体质量 18 ~ 22 g,8 ~ 10 周龄,雄性,由中国医学科学院天津血液病研究所动物室提供,购回后全部喂养于本校实验动物中心 SPF 清洁动物房内。L615 白血病细胞株:由中国医学科学院天津血液病研究所病理细胞库提供。实验仪器及器械:NIKON 光学显微镜(日本产),眼科手术器械,自制 100 目金属网和 200 目尼龙网,血球计数板,20 μl 毛细微量采血管。

1.2 实验方法

1.2.1 L615 小鼠白血病模型的建立 参照张惠铭等[1]的实验方法,将 L615 白血病细胞进行体外传代后,确定活细胞数占总细胞数的 96% 以上,按 1×10^6 个细胞经腹腔注射入正常 L615 小鼠,共计 2 只。接种后第 3 天起,每日断取种鼠尾静脉取血进行外周血白细胞计数及血涂片后行瑞氏染色和过氧化物酶染色后找白血病细胞,证实种鼠发病后,模型建立成功。于第 7 天小鼠濒死前用颈椎脱位法处死后,将小鼠浸于 75% 乙醇中 10 min,在无菌条件下取脾脏,分离干净脾脏包膜后,预冷 PBS 液清洗 2 次,在 100 目金属网中边研磨边滴加 RPMI1640 液,直至研磨完全后收集细胞悬液,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液后,用自配预冷红细胞裂解液处理 10 min 后,再次用 200 目尼龙网过滤,RPMI1640 培养液重悬并计数,按 1×10^5 个细胞的接种量接种于实验分组的小鼠腹腔内。

1.2.2 实验分组及给药方法 实验共分为 4 组,每组 12 只小鼠,分组如下:第 1 组为阴性对照组,记为Ⅰ组,腹腔内注射生理盐水组(0.2 ml/d);第 2 组为 GITR 组,记为Ⅱ组,加 GITR 组(100 μg/只,接种前 2 d 一次性经由尾静脉注入,接种后 3 d 加强 1 次给药 50 μg/只)[2];第 3 组为环磷酰胺组,记为Ⅲ组(接种后第 3 天开始,腹腔内注射,200 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,连用 3 d);第 4 组为环磷酰胺加 GITR 组,记为Ⅳ组,GITR 加法同上,环磷酰胺用法改为 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,连用 3 d。用药期间正常进食,进水。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 小鼠生存状态及生存时间观察 小鼠发病后,观察小鼠体质量改变、毛色变化及脾脏肿大情况,7 d 后每组留取一半数量的小鼠用作生存期观察,生命延长率用公式(治疗组平均生存天数/给生理盐水组平均生存天数 - 1) × 100% 得出。

1.2.3.2 外周血象观察及细胞涂片 从接种后第 3 天起,参照以上方法,每日断取小鼠尾静脉取外周血进行白细胞计数并行瑞氏染色和过氧化物酶染色观察小鼠发病情况及病情进展程度。

1.2.3.3 骨髓有核细胞涂片分类 实验分组中皆取发病7 d 后的小鼠股骨,和组织分离干净后,剪去一端,用 1 ml 注射器(内装新鲜小牛血清)直接将骨髓腔内骨髓细胞冲出,后进行瑞氏染色涂片观察,镜下进行分类及观察药物对白血病细胞的作用。

1.2.3.4 肝脾脏器指数计算及病理学检查 于小鼠发病后的第 7 天,颈椎脱位法处死小鼠,称重后,取小鼠的肝脏、脾脏,吸干水分后立即称重,计算肝脾脏器指数,用 10% 中性甲醛液固定标本,石蜡切片,HE 染色,于光镜下进行观察。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计学软件进行方差分析。

2 结果

2.1 生存状态及生存时间

小鼠发病后,体重减轻,毛皮光泽度降低,部分小鼠出现倒毛,伴有腹泻,脾脏肿大比较明显,每只发病小鼠皆有不同程度的脾脏肿大。生存时间上Ⅰ组与另外 3 组间存在着显著差异,Ⅳ组较之Ⅱ、Ⅲ组又有显著差异,其中Ⅳ组小鼠存活状态最好,而且存活时间也最长。见表 1。

表 1 各组别小鼠存活时间的比较

组别	n	生存时间(d)	生命延长率(%)
Ⅰ	6	9.42 ± 0.14	—
Ⅱ	6	12.33 ± 0.29[a]	32
Ⅲ	6	15.59 ± 0.14[a]	64
Ⅳ	6	17.67 ± 0.29[ab]	88

a: $P < 0.01$,与Ⅰ组比较; b: $P < 0.01$, 与Ⅲ组比较

2.2 外周血白细胞计数及分类

接种小鼠都于 3 ~ 4 d 后发病,小鼠外周血内白细胞总数增加,且皆有不同数量的白血病细胞被检出,其发病时间无统计学差异。但在进行外周血白细胞计数和分类后发现各组间的病情进展程度存在着较大的差异。以下是发病后第 4 天和第 7 天采外周血所进行的统计分析,由表 2 中可以看出,Ⅰ组与另外 3 组间在白细胞总数上存在显著差异,而Ⅳ组的白细胞数较之另 2 给药组又有显著差异,至晚期小鼠濒死前,外周血中已是大量白血病细胞,各组之间也无统计学意义。在高倍镜下可以清楚地观察到各用药组的白血病细胞出现核固缩、碎裂、溶解等细胞坏死的征象,其中单纯用 CTX 组细胞坏死的尤为明显,甚至部分正常血细胞也发生坏死,GITR 组相对细胞毒性较轻,但也可看到较多的白血病细胞坏死。

表 2 第 4、7 天外周血白细胞计数及分类

组别	动物个数(只)	白细胞数(10^9个/L)	减少率(%)
Ⅰ	12	16.28 ± 0.90(45.61 ± 1.84)	-
Ⅱ	12	12.90 ± 0.36(35.45 ± 1.72[a])	23[a](22[a])
Ⅲ	12	11.93 ± 0.27(24.65 ± 1.92[a])	29[a](44[a])
Ⅳ	12	11.86 ± 0.24(16.40 ± 1.24[a,b])	30[a](63[a,b])

a: $P < 0.01$,与Ⅰ组比较; b: $P < 0.01$,与Ⅲ组比较

2.3 骨髓有核细胞涂片分类

实验分组中皆取发病后 7 d 的小鼠股骨,和组织分离干净后,剪去一端,用 1 ml 注射器(内装新鲜小牛血清)直接将骨髓腔内骨髓细胞冲出,后进行瑞氏染色涂片观察。镜下分类后,低倍镜下可明显看见Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组小鼠骨髓内白血病细胞要少于Ⅰ组小鼠,其中Ⅲ、Ⅳ组尤为明显。高倍镜下可观察到同外周血较为一致的白血病细胞坏死的迹象,较为明显的白血病细胞变形坏死,细胞核表现为固缩,碎裂,部分细胞核出现溶解的现象。

2.4 肝脾脏指数计算及其组织的病理学检查

小鼠发病后,肝脏脾脏肿大明显,但Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组小鼠肝脾肿大不如Ⅰ组小鼠,指数也明显低于Ⅰ组小鼠,其中尤以Ⅳ组小鼠的肝脾指数最低,各组之间有统计学差异(表 3)。肝脏、脾脏病理切片可看出Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组中白血病的浸润程度明显轻于Ⅰ组小鼠,Ⅳ组的肝脾切片中可见部分正常结构,Ⅱ、Ⅲ组

中的正常结构较少，但也能见到肝脏中有未被破坏的肝脏动静脉、门静脉、肝管以及脾脏中的小梁，较为清晰明显的脾脏白髓质分界。而Ⅰ组小鼠的肝脾正常结构完全被破坏，整个肝脏脾脏中绝大部分可见白血病细胞浸润。见图 1、2。

表 3　L615 小鼠的肝脏、脾脏指数对比

组别	n	体质量(g)		肝脏指数(%)	脾脏指数(%)
		病前	病后		
Ⅰ	6	20.6	18.9	8.2	2.5
Ⅱ	6	20.0	18.6	7.1[a]	1.6[a]
Ⅲ	6	21.2	20.0	5.8[a]	0.8[a]
Ⅳ	6	20.5	19.6	5.5[ab]	0.77[ab]

a：$P<0.01$，与Ⅰ组比较；b：$P<0.01$，与Ⅲ组比较

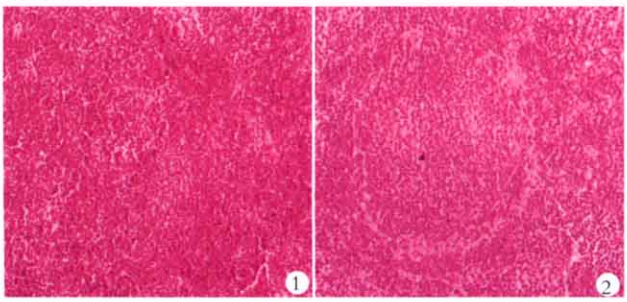


图 1　未加药Ⅰ组第 4 天小鼠脾脏的病理学变化　(HE×100)

图 2　加入 GITR 抗体和 CTXⅣ组，第 4 天小鼠脾脏的病理学变化　Ⅳ组中可见肝脏脾脏中白血病细胞的浸润明显要轻于Ⅰ组 (HE×100)

3　讨论

近来随着对 Treg 细胞的研究逐渐深入，已有国外学者发现 Treg 细胞参与了机体对肿瘤的免疫反应并在其中发挥着比较重要的作用[3]。正常小鼠中 Treg 细胞显著地高量表达糖皮质激素诱发型 TNF 受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor，GITR，也有人称作 TNFRSF18)，它的具体存在价值和意义尚在进一步研究中[4]。在正常小鼠中使用 GITR 抗体能够引发自身免疫性疾病，Forslind 等[5]在小鼠乳腺癌模型上也观察到 GITR 抗体具有一定的抗肿瘤作用，表明小鼠体内的 Treg 细胞的功能在 GITR 被封闭后是受到了抑制的。因为作为功能正常的 Treg 细胞在体内正是充当着“监察兵”的作用，有效的发挥功能后抑制机体的各种效应细胞，这其中包括着 $CD4^+CD25^+$T 细胞，细胞毒性 T 细胞 CTL($CD8^+$T 细胞)以及 NK 细胞等，一旦其功能被抑制，这些效应细胞的效应就能够得到释放，攻击机体自身细胞和器官，从而引发比较严重的自身免疫性疾病，提示 GITR 信号通路可以通过调节 Treg 细胞的功能而参与到对效应细胞的影响机制中。但封闭 GITR 信号通路后机体到底是通过何种机制达到对 Treg 细胞抑制的，目前尚没有明显的实验证据进行说明。

本实验以 Treg 细胞表面上高表达的 GITR 分子的抗体为线索，在引进了天津血液病研究所建立的 L615 白血病小鼠模型后，通过动物实验，发现 GITR 抗体的确能够抑制 Treg 细胞，从而增强机体的抗肿瘤免疫反应能力，且能够增加实验动物的存活期，减轻病变程度，减少细胞毒性药物用药。另外可以看出，在单独使用细胞毒性药物环磷酰胺时的效果不如环磷酰胺联合 GITR 抗体用药的效果，这可能是环磷酰胺在抑制肿瘤细胞的同时也抑制了机体内正常具有活性的杀伤细胞，而给予 GITR 抗体后则不同，它加强了效应细胞的强大细胞毒功能，即加强了机体本身的抗肿瘤能力，另外运用 GITR 抗体后，可以明显减少细胞毒性药物的用量，这对长期以来困扰临床的细胞毒性药物的副作用问题又提供了一个合理的解决方案。

但是 Treg 细胞影响效应细胞的机制比较复杂，至于 Treg 具体是如何作用于效应细胞并改变其活性的原因目前还没有得到完全清楚的阐述，但可以肯定的是这其中至少有细胞因子分泌方式和细胞接触机制两种形式起作用。例如 Treg 细胞主要分泌两种抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF-β1 来减弱效应细胞的活性；在细胞接触抑制方面，Treg 细胞膜表面则可以表达传递抑制信号的 CTLA-4 分子[6]来直接发挥对效应细胞的抑制，而当运用 GITR 抗体抑制 Treg 细胞后，效应细胞如细胞毒性 T 淋巴细胞($CD8^+$T 细胞，CTL)，自然杀伤细胞(NK 细胞)以及 $CD4^+CD25^+$T 细胞等就可以通过多种方式进行对肿瘤细胞的杀伤，这涉及的方式主要包括穿孔素、颗粒酶、Fas/FasL、TNF-α、INF-γ 和 LT(淋巴毒素)途径[7]。

参考文献：

[1] 张惠铭. L615 小鼠脑膜白血病模型的建立和发病机制的初步探讨[J]. 中华血液学杂志，1983，4(6)：335－339.

[2] USHIGOME H，HORI S，NISHIMURA E，*et al*. GITR activation in donor specific transfusion accelerates allograft rejection[J]. Transplantation，2004，78(2 Suppl 1)：561－562.

[3] ANTONY P A，RESTIFO N P. $CD4^+CD25^+$ T regulatory cells，immunotherapy of cancer，and interleukin-2[J]. J Immunother，2005，28(2)：120－128.

[4] YANG Y，HUANG C T，HUANG X，*et al*. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance[J]. Nat Immunol，2004，5(5)：508－515.

[5] FORSLIND B，WERNER－LINDE Y，LINDBERG M，*et al*. Elemental analysis mirrors epidermal differentiation[J]. Acta Dermato Venereologica，1999，79(1)：12－17.

[6] 郑峻松，吴　军，易绍萱，等. $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞调节 T 细胞的作用机制分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1881－1884.

[7] 潘景轩，马涧泉，李树浓. 细胞毒 T 细胞对靶细胞的杀伤机制研究进展[J]. 免疫学杂志，1997，13(1)：58－62.

(编辑　张大春)