

网络出版时间:2025-08-28 11:16:55 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251028.1127.002

◇基础医学研究◇

miHA-TM 在低强度预处理下改善供体骨髓移植的效果研究

蒲雅静,周 猛

(安徽医科大学生命科学院,合肥 230032)

摘要 目的 异基因造血干细胞移植(alloSCT)广泛应用于恶性、非恶性血液疾病的治疗。然而,因其易引发移植物抗宿主病(GVHD)以及供者匹配困难,且受体采用的清髓预处理易引发移植相关死亡等原因,亟需在降低预处理强度的同时,提升供者骨髓植入效果的新策略。方法 在 alloSCT 模型中,过继次要组织相容性抗原(miHA)特异性供体中枢记忆性 T 细胞(miHA-TM),并联合使用 CD40 激动剂,探讨不同辐照剂量条件下供体骨髓植入的效果。结果 miHA 特异性供者源中枢记忆性 T 细胞(TM)可促进受体免疫重建,且不会引发 GVHD。但供者源 TM 细胞在受体免疫重建过程中发生耗竭,影响低预处理强度下的受体获得完全供体植入。在低辐照剂量下(4 Gy),miHA-TM 联合 CD40 激动剂可促进供体骨髓植入。结论 miHA-TM 可促进受体免疫重建,且不会诱发移植物抗宿主病。

关键词 异基因造血干细胞移植;移植前预处理;次要组织相容性抗原;血液疾病;移植物抗宿主病;中枢记忆性 T 细胞

中图分类号 R 392.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)10-1775-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.10.001

异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, alloSCT)可用于治愈遗传性和获得性非恶性疾病^[1-2]。移植前的预处理是 alloSCT 的首要步骤,关系到移植的成功与否^[3]。然而,传统清髓性预处理方案由于副作用显著,仅适用于年轻且体能良好的患者^[4-7]。因此,亟需开发新的低剂量预处理方案,以在减少不良反应的同时,确保供者骨髓的完全植入和疾病的彻底治疗^[7]。

次要组织相容性抗原(minor histocompatibility antigen, miHA)是相对于主要组织相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC)命名的,具有较高的免疫原性^[8]。前期研究^[9-12]表明,在 MHC 相合的 alloSCT 小鼠模型中,利用造血系统特异性表达的 miHA(H60)免疫的中枢记忆性 CD8⁺ T 细胞(T_{MH60})作为供体 T 细胞,可有效促进供体免疫重建,介导移植物抗白血病效应(graft-versus-leukemia effect, GVL),且不会引发移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)。基于这一发现,本研究进一步以 T_{MH60} 细胞为研究主体,结合 CD40 激动剂以增强其活化,并在低剂量辐照预处理条件下,探

索联合治疗方案对供体骨髓植入的影响,为 alloSCT 治疗策略的优化和广泛应用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 健康雄性 B6.H60(H-2b, Ly9.1⁻, H60⁺)小鼠, C3H.SW(H-2b, Ly9.1⁺, H60⁻)小鼠,8 周龄,体质量 20~25 g,购自安徽医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK(皖)2017-06。小鼠在光/暗(12 h/12 h)交替循环、恒温 24℃、相对湿度 50% 的环境条件下饲养。所有小鼠都可以自由获得食物和水。所有实验方案和动物处理程序经安徽医科大学实验动物伦理委员会审查和批准(编号:LLSC20210370)。

1.1.2 细胞 取自原代小鼠脾脏细胞,小鼠骨髓细胞。

1.1.3 试剂与仪器 高糖 1640 培养基、胎牛血清(fetalbovineserum, FBS)购自美国 Gibco 公司; Anti-mouse CD8、Anti-mouse PD-1、Anti-mouse TIM3 等抗体购自美国 Biolegend 公司。4 激光 13 色 Cytoflex 流式细胞分析仪购自美国 Beckman 公司,流式细胞分选器 ARIA III 购自美国 BD 公司,台式低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 供者骨髓细胞的制备 取 C3H.SW 小鼠作

2025-05-11 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82100197)

作者简介:蒲雅静,女,硕士研究生;

周 猛,男,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: meng.zhoumj@outlook.com

为骨髓供鼠,处死后获取小鼠股骨与胫骨中的骨髓细胞,并采用抗 Thy1.2 磁珠去除骨髓中的 T 细胞。按此方法即获取 T 细胞去除的供鼠骨髓。C3H. SW → B6. H60 为 MHC 相合,miHA 不相合移植模型。

1.2.2 供者 T 细胞的制备 为获取 miHA 特异性 TM 细胞,采用偶联 H60 协同 CD40 激动剂免疫 C3H. SW 来源供鼠。于免疫成功后第 90 天处死供鼠,通过磁珠法分选脾脏 $CD8^+$ T 细胞,随后进一步通过流式细胞术分选 $CD44^+ CD62L^+$ 中枢记忆性 T 细胞,即为实验所需 T_{MH60} 。

1.2.3 移植受鼠的预处理 采用 B6. H60 (H2b) 造血系统特异性表达 H60 的小鼠为受鼠,接受不同剂量 X 射线进行全身照射进行预处理。

1.2.4 CD40 激动剂处理 采用 IP 注射,注射剂量为 50 μ g 每只鼠。

1.3 统计学处理 数据分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件分析。所有数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示。首先,通过 Shapiro-Wilk 测试评估数

据的正态分布。随后,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T_{MH60} 细胞促进非清髓剂量受体免疫重建 实验以 T_{MH60} 作为供体 T 细胞,在不同预处理强度下分析供者骨髓的植入情况 (图 1A)。结果显示,在非清髓辐照剂量 (6 Gy) 条件下,移植第 14 天受体即已实现供体髓系细胞、T 细胞和 B 细胞的完全植入 (图 1B),且在移植后第 60 天,供体细胞植入仍未形成嵌合体 (图 1C)。相比之下,当过继未免疫的中枢记忆性 T 细胞 (TM) 作为供体 T 细胞时,在相同的 6 Gy 预处理条件下,受体未能实现完全供体植入。此外,H60 四聚体染色结果显示,绝大部分供体来源的 T 细胞为 H60 特异性 (Tet^{H60+}),表明 T_{MH60} 在受体体内成功活化并大量扩增 (图 1D),但在整个实验过程中未观察到 GVHD 的发生。

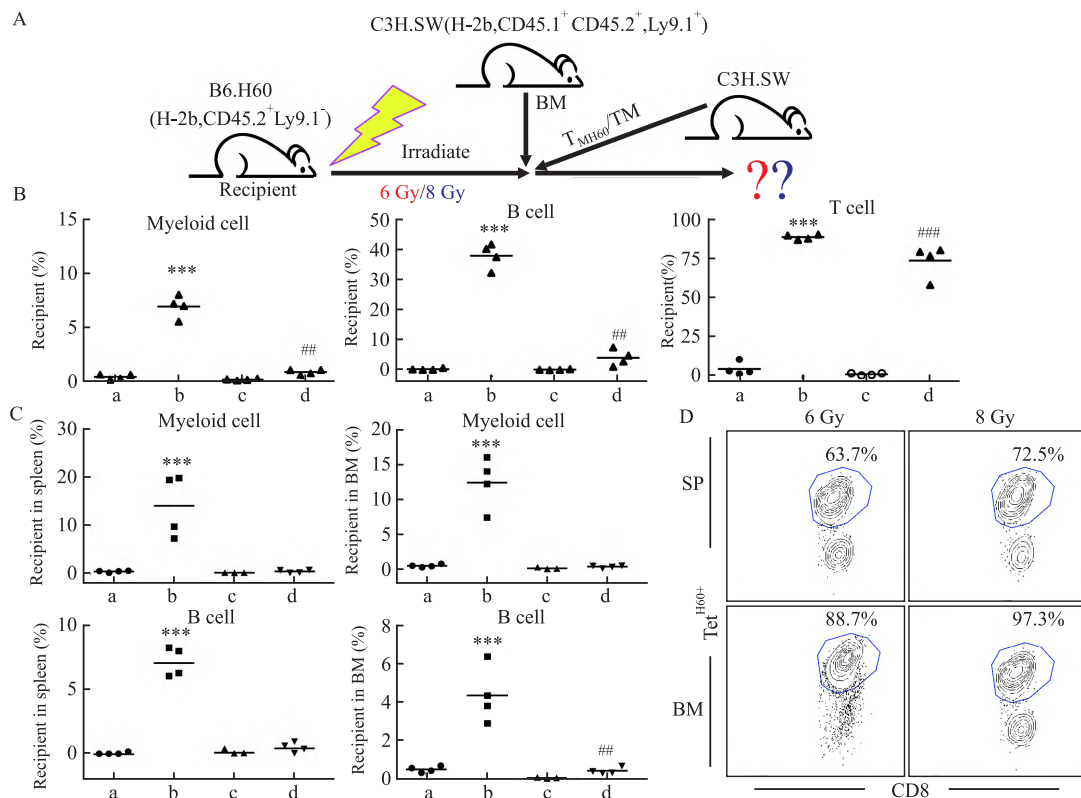


图 1 T_{MH60} 细胞促进非清髓剂量受体免疫重建

Fig. 1 T_{MH60} cells promoted immune reconstitution in recipients under non-myeloablative conditions

A: Schematic diagram of the bone marrow transplantation model showing T_{MH60} versus TM cells in immune reconstitution under non-myeloablative conditions; B: Donor-derived myeloid cells ($CD45.1^- Ly9.1^+ CD11b^+$), B cells ($CD45.1^- Ly9.1^+ CD19^+$), and T cells ($CD45.1^- Ly9.1^+ Thy1.2^+$) in recipient peripheral blood at day 14 post-transplantation; C: Donor-derived myeloid cells, T cells, and B cells in recipient spleen and bone marrow at day 60 post-transplantation; D: Proportion of H60-specific T cells (Tet^{H60+}) in recipient spleens detected by tetramer staining under different irradiation doses; a: 6 Gy/ T_{MH60} ; b: 6 Gy/TM; c: 8 Gy/ T_{MH60} ; d: 8 Gy/TM; *** $P < 0.001$ vs 6 Gy/ T_{MH60} ; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 8 Gy/ T_{MH60} .

2.2 CD40 共刺激增强 T_{MH60} 介导的免疫重建与供者嵌合 为探讨 T_{MH60} 能否促进低预处理强度下的受鼠免疫重建,该实验采用 C3H.SWB6.H60 的移植模型,并过继 T_{MH60} 或未免疫供鼠来源的 TM 细胞(图 2A)。结果显示,在 5 Gy 的辐照剂量照射下, TM 细胞处理组受鼠在移植后第 14 天就已经恢复了受鼠源免疫系统(图 2B)。而移植后 28 d, T_{MH60} 处理组的受体小鼠外周血中供者源髓系细胞、B 细胞、

T 细胞的比例接近 50%,说明受鼠并未达到完全供者植入(图 2C)。基于此,该实验采用 T_{MH60} 联合 CD40 激动剂(FGK45)处理 5 Gy 辐照后的受鼠。结果显示,移植后 60 d, T_{MH60} + FGK45 处理的受鼠脾脏、骨髓中供者源髓系细胞、B 细胞、T 细胞的比例接近 100%,说明 T_{MH60} + FGK45 处理组受鼠达到完全供者植入(图 2D)。由此说明, T_{MH60} 联合 CD40 激动剂可在低剂量预处理情况下受体免疫重建。

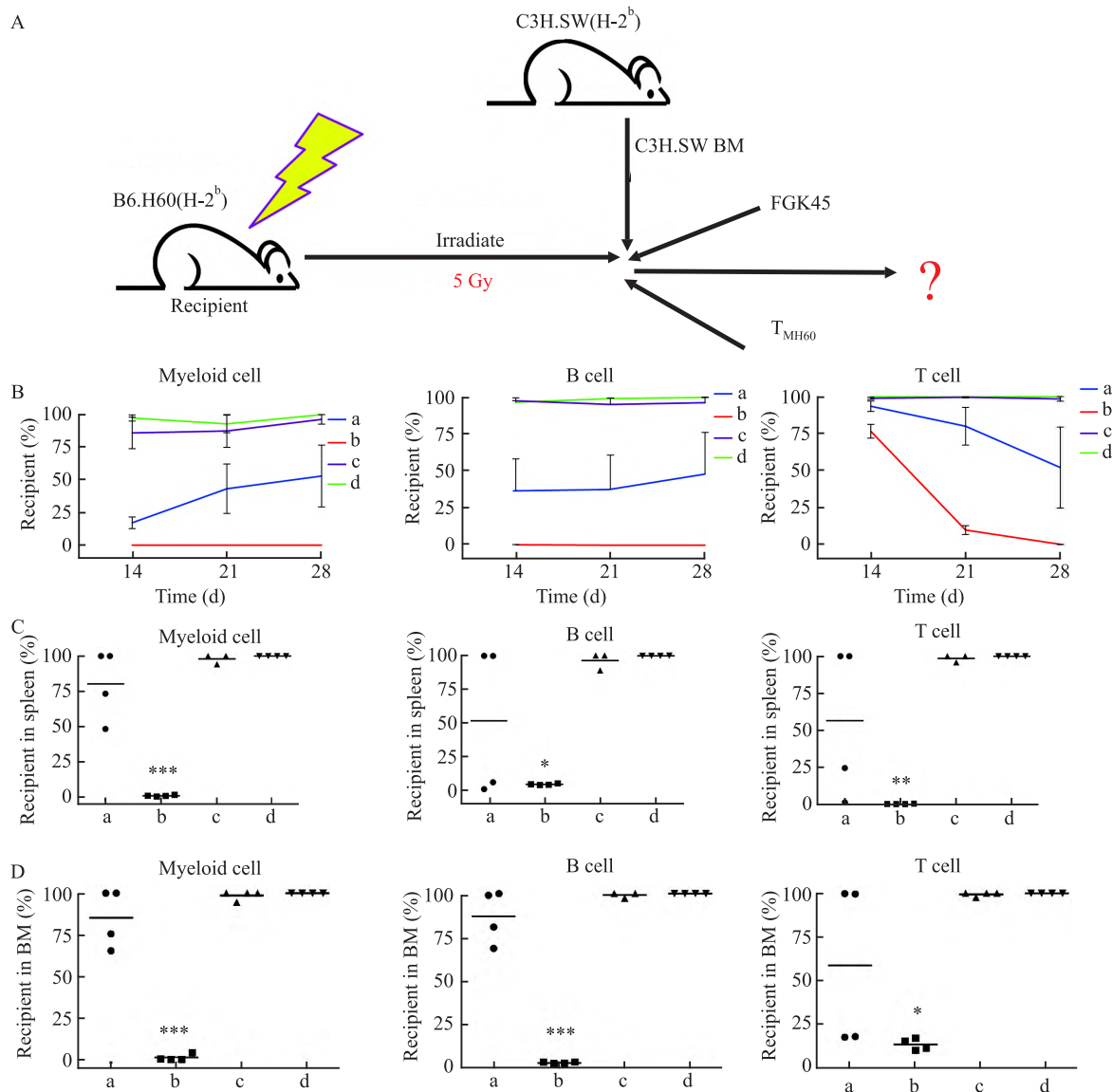


图 2 CD40 共刺激增强 T_{MH60} 介导的免疫重建与供者嵌合

Fig. 2 CD40 co-stimulation enhanced T_{MH60} -mediated immune reconstitution and donor chimerism

A: Schematic diagram of the mouse bone marrow transplantation model using T_{MH60} in combination with a CD40 agonist; B: The proportion of donor-derived myeloid cells, B cells, and T cells in recipient peripheral blood was measured at 14, 21, and 28 days post-transplantation; C, D: At 28, 60 days post-transplantation, the proportion of donor-derived myeloid cells, T cells, and B cells in the recipient spleen and bone marrow was analyzed; a: 5 Gy/ T_{MH60} ; b: 5 Gy/ T_{MH60} + FGK45; c: 5 Gy/TM; d: 5 Gy/TM + FGK45; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 5 Gy/ T_{MH60} .

2.3 T_{MH60} 在低辐照剂量处理受体内发生耗竭 与此同时,在移植后第 28 天分析受体外周血中 H60 特异性 T 细胞的状态。结果显示, T_{MH60} 单独处理组中 Tet^{H60+} 细胞比例较 $T_{MH60} + FGK45$ 处理组受体少(图 3A)。 T_{MH60} 处理组中的 Tet^{H60+} 细胞高表达 PD-1、TIM-3 等免疫负性调控分子。 $T_{MH60} + FGK45$ 处理组中的 Tet^{H60+} 同样表达 PD-1、TIM-3,但 Tet^{H60+} 细胞中 PD-1⁺ TIM-3⁺ 的比例较 T_{MH60} 单独处理组少(34.7% vs 16.9%)(图 3B)。基于此,该实验在后续的实验中分析 T_{MH60} 联合 CD40 激动剂以及免疫卡控点阻断剂能否促进接受低剂量预处理的受体免疫重建。

2.4 T_{MH60} 联合 CD40 激动剂可促进低剂量预处理情况下的受体免疫重建 该实验采用 C3H. SWB6. H60 的移植模型,给予受鼠 3 Gy、4 Gy 或 5 Gy 的不同强度的辐照进行预处理,并过继 T_{MH60} 或 $T_{MH60} + FGK45$ 。结果显示,在 4 Gy 预处理强度下, $T_{MH60} + FGK45$ 处理组受鼠的髓系细胞、B 细胞在移植后第 14 天就已经达到完全供者嵌合状态(图 4A)。而在 3 Gy 处理下,即使采用 3 倍的 T_{MH60} 数目,受鼠并未达到完全供者植入。基于此,该实验采用 T_{MH60} 联合 CD40 激动剂(FGK45)处理 5 Gy 辐照后的受鼠。结果显示,移植后 60 d, $T_{MH60} + FGK45$ 处理的受鼠脾脏、骨髓中供者源髓系细胞、B 细胞、T 细胞的比例接近 100%,说明 $T_{MH60} + FGK45$ 处理组受鼠达到完全供者植入(图 4B、4C)。 T_{MH60} 联合 CD40 激动剂可

在低剂量预处理情况下受体免疫重建。

3 讨论

同种异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)是目前治疗多种恶性血液系统疾病以及部分非恶性血液病的有效手段,被认为是最具潜力的治愈性治疗方式之一^[6-7]。然而,该方法在临床应用中仍面临诸多挑战,其中最主要的障碍包括移植物抗宿主病 GVHD 的发生以及在移植前进行的预处理方案(如放疗或化疗)对患者心、肝、肺、肾等多个重要脏器造成的毒性损伤。这些严重并发症不仅显著增加了治疗相关的病死率,也在一定程度上限制了 allo-HSCT 的广泛推广和临床应用价值^[8]。在 MHC 全相合的 allo-SCT 中,异体 T 细胞(allogeneic T cell, allo-T)可以识别受体多态性基因编码产物 - miHA 而介导 GVL 以及 GVHD 的发生。造血细胞局限性表达的 miHA,可以诱导 allo-T 介导的 GVL,但不会引起 GVHD,是实现 GVL 与 GVHD 效应分离的理想靶抗原^[13]。

前期已发表文章^[11]表明,通过采用 miHA (H60)免疫供体,获取 H60 特异性 CD8 中枢记忆性 T 细胞(T_{MH60})作为供体 T 细胞,并过继至造血系统局限性表达 H60 抗原的受体(B6. H60),显示 T_{MH60} 靶向并杀伤 H60⁺ leukemia,且不会引发 GVHD。与此同时,过继输入的 T_{MH60} ,可靶向受体 H60⁺ 造血系

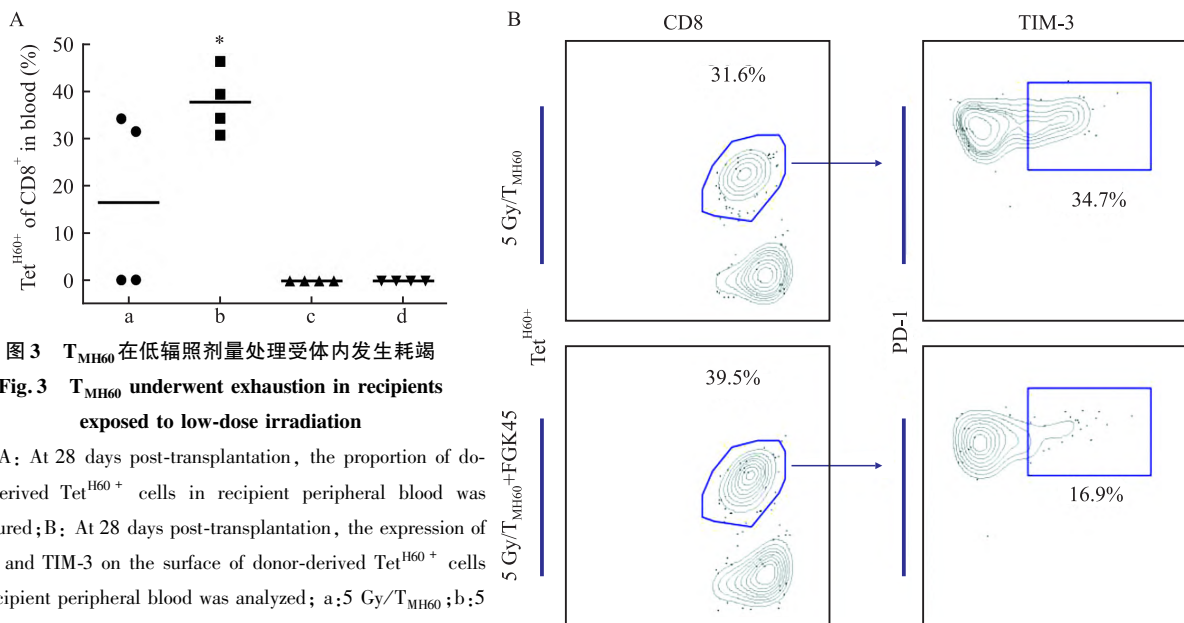


图 3 T_{MH60} 在低辐照剂量处理受体内发生耗竭
Fig. 3 T_{MH60} underwent exhaustion in recipients exposed to low-dose irradiation

A: At 28 days post-transplantation, the proportion of donor-derived Tet^{H60+} cells in recipient peripheral blood was measured; B: At 28 days post-transplantation, the expression of PD-1 and TIM-3 on the surface of donor-derived Tet^{H60+} cells in recipient peripheral blood was analyzed; a: 5 Gy/ T_{MH60} ; b: 5 Gy/ $T_{MH60} + FGK45$; c: 5 Gy/TM; d: 5 Gy/TM + FGK45; * $P < 0.05$ vs 5 Gy/ T_{MH60} .

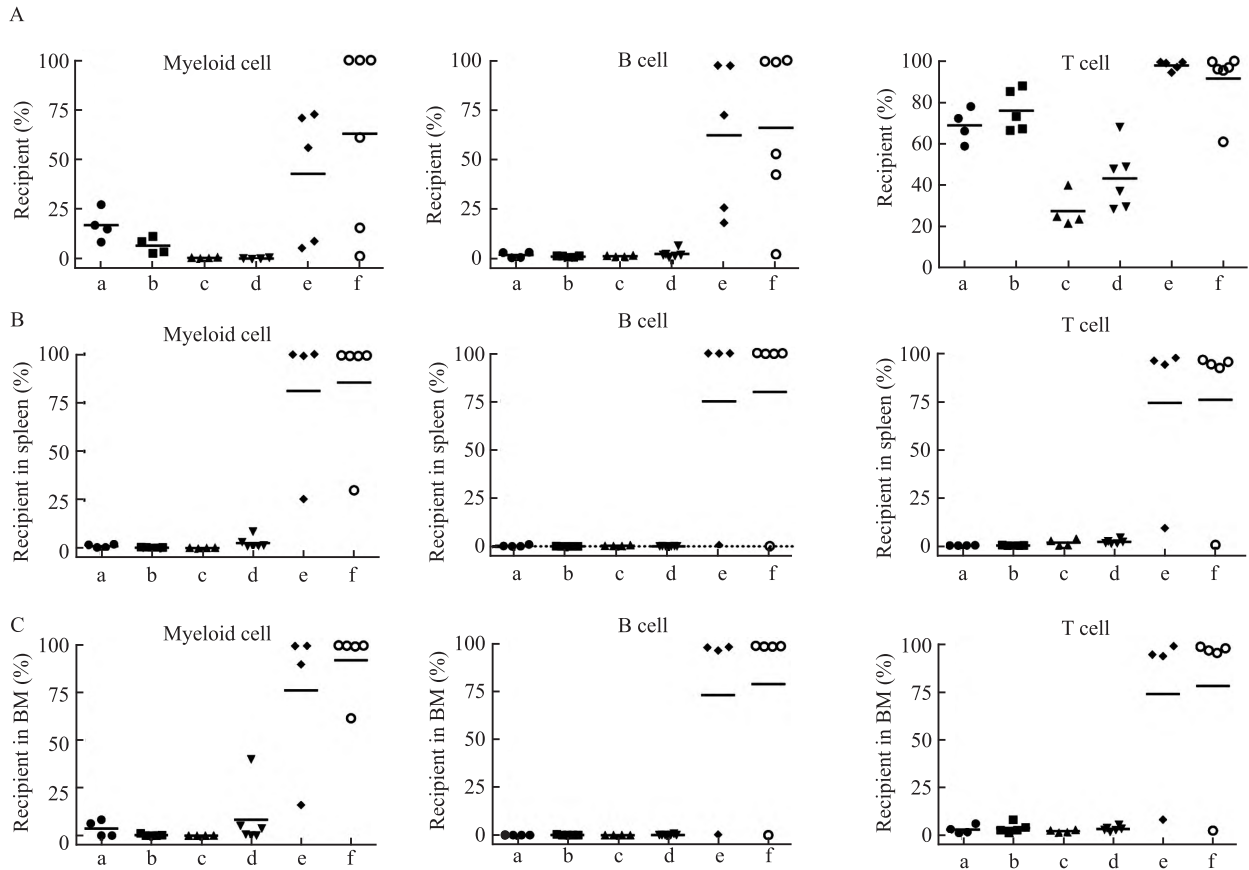


图4 T_{MH60} 联合CD40激动剂可促进低剂量预处理情况下的受体免疫重建

Fig.4 T_{MH60} combined with CD40 agonist promoted immune reconstitution in recipients under low-dose conditioning

A: At 14 days post-transplantation, the proportion of donor-derived myeloid cells, B cells, and T cells in recipient peripheral blood was measured; B, C: At 60 days post-transplantation, the proportion of donor-derived myeloid cells, B cells, and T cells in the recipient spleen (B) and bone marrow (C) was analyzed; a: 5 Gy/ T_{MH60} ; b: 5 Gy/5 $\times T_{MH60}$; c: 5 Gy/ T_{MH60} + FGK45; d: 4 Gy/ T_{MH60} + FGK45; e: 3 Gy/ T_{MH60} + FGK45; f: 3 Gy/3 $\times T_{MH60}$ + FGK45.

统,并促进免疫重建。该研究测试了针对 H60 的记忆 CD8 细胞(T_{MH60})在促进移植植入中的作用。在 B6. H60(H-2b, Ly9.1⁻, H60⁺)小鼠的骨髓移植到 C3H. SW(H-2b, Ly9.1⁺, H60⁻)小鼠模型中,无论在 8 Gy 还是 6 Gy 的全身照射(total body irradiation, TBI)剂量下,加入来自 H60 疫苗接种小鼠(T_{MH60})的记忆 T 细胞,相较于未接种疫苗的小鼠 TM,均能适度改善供体骨髓植入。在 5 Gy 条件下,接受 T_{MH60} 的小鼠在移植后 63 d,骨髓和脾脏中出现了多系来源的供体造血细胞。重要的是,这些小鼠并未出现临床 GVHD。在 4 Gy 的 TBI 剂量下,接受 T_{MH60} 的小鼠表现出较差的供体植入,而接受抗 CD40 激动抗体(FGK45)治疗的 T_{MH60} 小鼠,在 0 d 使用该抗体后,在脾脏、淋巴结和 BM 中达到了完全植入。此外,在一些接受 3 Gy 预处理的 T_{MH60} 和抗 CD40 治疗小鼠中虽然未能成功植入,但是在移植后 60 d,小鼠仍保持嵌合状态。

程序性死亡受体 1(programmed death 1, PD-1)是一种重要的免疫抑制分子,已经在肿瘤治疗中显示出前景广阔的治疗效果。T 细胞免疫球蛋白黏蛋白结构域 3(T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM-3)是一类 T 细胞表面抑制性分子,能够引起癌症与慢性病毒感染过程中 T 细胞的衰竭^[14]。这两种 T 细胞抑制受体 PD-1 和 TIM-3 在耗竭 T 细胞分化过程中共表达^[14]。研究表明,通过应用针对 PD-1 和 TIM-3 的阻断性单克隆抗体,可以显著减轻 T 细胞耗竭状态,从而恢复其增殖和效应功能,进一步增强 GVL 效应。这一策略为改善移植后肿瘤复发问题提供了新的免疫治疗思路。

参考文献

- [1] 李 芮,唐旭东. 骨髓衰竭疾病的体细胞突变在基因时代的临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(10): 1645-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.034.

- [1] Li R, Tang X D. Clinical significance of somatic mutation in bone marrow failure disease in gene age[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(10): 1645 - 7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.10.034.
- [2] Jefferis M, Andersen S, Brown T, et al. Malnutrition and clinical outcomes post alloSCT[J]. *J Hum Nutr Diet*, 2023, 36(4): 1253 - 60. doi:10.1111/jhn.13124.
- [3] Baranwal A, Chhetri R, Yeung D, et al. Factors predicting survival following alloSCT in patients with therapy-related AML and MDS; a multicenter study[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2023, 58(7): 769 - 76. doi:10.1038/s41409 - 023 - 01970 - 0.
- [4] Hill G R, Koyama M. Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease[J]. *Blood*, 2020, 136(4): 418 - 28. doi:10.1182/blood.2019000952.
- [5] 栾 皓, 邢 爽, 余祖胤. 血小板生成素调控机体造血免疫的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(3): 519 - 22. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.03.030.
- [5] Luan H, Xing S, Yu Z Y. Research progress of thrombopoietin regulating hematopoietic immunity[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(3): 519 - 22. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.03.030.
- [6] Du J, Yu D, Han X, et al. Comparison of allogeneic stem cell transplant and autologous stem cell transplant in refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma; a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(5): e219807. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.9807.
- [7] Jamy O, Zeiser R, Chen Y B. Novel developments in the prophylaxis and treatment of acute GVHD[J]. *Blood*, 2023, 142(12): 1037 - 46. doi:10.1182/blood.2023020073.
- [8] Ishina I A, Zakharova M Y, Kurbatskaia I N, et al. MHC class II presentation in autoimmunity[J]. *Cells*, 2023, 12(2): 314. doi:10.3390/cells12020314.
- [9] Teshima T, Hashimoto D. Separation of GVL from GVHD-location, location, location[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1296663. doi:10.3389/fimmu.2023.1296663.
- [10] Murphy W J. Drilling down interferon in GVHD/GVL[J]. *Blood*, 2023, 141(8): 821 - 3. doi:10.1182/blood.2022019232.
- [11] Zhou M, Sacirbegovic F, Zhao K, et al. T cell exhaustion and a failure in antigen presentation drive resistance to the graft-versus-leukemia effect[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4227. doi:10.1038/s41467 - 020 - 17991 - y.
- [12] Köhler N, Zeiser R. Epigenetic regulation to enhance graft-versus-leukemia activity[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(6): 1410 - 2. doi:10.1158/2159 - 8290.CD - 22 - 0329.
- [13] O'Neill A T, Chakraverty R. Graft versus leukemia: current status and future perspectives[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(5): 361 - 72. doi:10.1200/JCO.20.01801.
- [14] Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 92. doi:10.1186/s13045 - 019 - 0779 - 5.

Research on the effect of miHA-TM in enhancing donor bone marrow transplantation outcomes under low-intensity conditioning

Pu Yajing, Zhou Meng

(College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To treat malignant and non-malignant hematological diseases, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) is widely used. However, its application is limited by the risk of graft-versus-host disease (GVHD), difficulties in donor matching, and the high incidence of transplantation-related mortality due to myeloablative conditioning regimens. Therefore, there is an urgent need to develop new strategies that reduce the intensity of conditioning while enhancing donor engraftment efficiency. **Methods** In an alloSCT model, minor histocompatibility antigen-specific donor central memory T cells (miHA-TM) combined with a CD40 agonist were adoptively transferred to evaluate donor bone marrow engraftment under different irradiation doses. **Results** Minor histocompatibility antigen (miHA)-specific donor-derived central memory T cells (TM) facilitated recipient immune reconstitution without inducing GVHD. Donor-derived TM cells, however, underwent exhaustion during the process of recipient immune reconstitution, which compromised complete donor engraftment under reduced-intensity conditioning. At a low irradiation dose (4 Gy), the combination of miHA-TM and a CD40 agonist significantly promoted donor bone marrow engraftment. **Conclusion** miHA-TM facilitates immune reconstitution in recipients without inducing graft-versus-host disease.

Key words allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; pre-transplantation conditioning; minor histocompatibility antigen; hematological diseases; graft-versus-host disease; central memory T cells

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82100197)

Corresponding author Zhou Meng, E-mail: meng.zhounj@outlook.com