

接受干细胞移植重型β地中海贫血患者部分细胞因子水平与移植物抗宿主病的关系

陈丽白, 温建芸, 阮永胜, 裴夫瑜, 刘华颖, 何岳林, 李春富, 吴学东(南方医科大学南方医院儿科, 广东省广州市 510515)

文章亮点:

1 许多研究都试图找到移植物抗宿主病生物标记, 这些生物标记可分为3大类: ①广义炎症的标志(如白细胞介素2, 肿瘤坏死因子α)。②淋巴细胞表面分子(如CD30)。③器官受损后分泌的产物(如reg3α和细胞角蛋白18碎片)。这些研究有利于进一步了解移植物抗宿主病的病理生理过程。

2 文章的创新点在于采用了前瞻队列研究方式观察了移植物抗宿主病发生发展过程中部分细胞因子的动态变化。结果表明白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子α、巨噬细胞游走抑制因子等细胞因子水平检测对辅助诊断治疗移植物抗宿主病具有一定的意义。

关键词:

干细胞; 移植; 重型β地中海贫血; 移造血干细胞移植; 植物抗宿主疾病; 白细胞介素6; 白细胞介素8; 白细胞介素12; 肿瘤坏死因子α; 巨噬细胞游走抑制因子

主题词:

造血干细胞移植; β地中海贫血; 移植物抗宿主病; 细胞因子类

基金资助:

广东省科技计划项目(2011B031800280)

摘要

背景: 细胞因子在移植物抗宿主病的发生发展过程中起至关重要的作用, 但目前缺乏其在重型β地中海贫血中的研究报道。

目的: 探讨细胞因子与重型β地中海贫血患者造血干细胞移植后发生移植物抗宿主病之间的关系。

方法: 采用液相芯片技术检测11例重型β地中海贫血移植物抗宿主病出现前, 出现时, 出现第4天, 第7天, 完全消失时白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子α、巨噬细胞游走抑制因子的动态变化。

结果与结论: 各时相白细胞介素6、白细胞介素12、肿瘤坏死因子α、巨噬细胞游走抑制因子水平差异有显著性意义, 移植物抗宿主病出现时各细胞因子水平最高, 移植物抗宿主病出现第7天次之。各时相白细胞介素8水平差异有显著性意义, 移植物抗宿主病出现第4天最高。以上结果提示移植物抗宿主病发生前后白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子α、巨噬细胞游走抑制因子动态水平变化在一定程度上反映移植后患者的免疫状态, 可作为辅助诊断移植物抗宿主病的监测指标。

陈丽白, 温建芸, 阮永胜, 裴夫瑜, 刘华颖, 何岳林, 李春富, 吴学东. 接受干细胞移植重型β地中海贫血患者部分细胞因子水平与移植物抗宿主病的关系[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7273-7278.

Association between some cytokines and graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for beta-thalassemia major

Chen Li-bai, Wen Jian-yun, Ruan Yong-sheng, Pei Fu-yu, Liu Hua-ying, He Yue-lin, Li Chun-fu, Wu Xue-dong (Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Cytokines play an important role in the occurrence and development of graft-versus-host disease, but there is a current lack of reports on the association between cytokines and graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for treatment of β-thalassemia major.

OBJECTIVE: To investigate the association between cytokines and graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for β-thalassemia major.

METHODS: We observed the dynamic variation of interleukin 6, interleukin 8, interleukin 12, tumor necrosis factor-α and macrophage migration inhibitory factor in 11 children with β-thalassemia major before onset of graft-versus-host disease, when graft-versus-host disease occurred, at days 4 and 7 after onset of graft-versus-host disease, and when graft-versus-host disease disappeared.

RESULTS AND CONCLUSION: There was a significant difference in serum levels of interleukin-6, interleukin-12, tumor necrosis factor-α, macrophage migration inhibitory factor in different time points, and the highest levels of different cytokines appeared when graft-versus-host disease occurred, followed by those at 7 days after

陈丽白, 1988年生, 湖南省株洲市人, 汉族, 2012年吉首大学医学院毕业, 医师, 主要从事小儿血液病及造血干细胞移植研究。

通讯作者: 吴学东, 主任医师, 南方医科大学南方医院儿科, 广东省广州市 510515

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.011
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)45-07273-06

稿件接受: 2014-10-19

Chen Li-bai, Physician, Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wu Xue-dong, Chief physician, Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-10-19

graft-versus-host disease. There was a significant difference in serum levels of interleukin-8 in different time points, and the highest level appeared at 4 days after graft-versus-host disease. The dynamic expression of interleukin-6, interleukin-8, interleukin-12, tumor necrosis factor- α , macrophage migration inhibitory factor can estimate the immune function of β -thalassemia major patients who develops graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, and can be used as the immunobiology indicators for the early diagnosis of graft-versus-host disease.

Subject headings: hematopoietic stem cell transplantation; beta-thalassemia; graft vs host disease; cytokines

Funding: the Scientific and Technological Plan of Guangdong Province, No. 2011B031800280

Chen LB, Wen JY, Ruan YS, Pei FY, Liu HY, He YL, Li CF, Wu XD. Association between some cytokines and graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for beta-thalassemia major. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(45):7273-7278.

0 引言 Introduction

重型 β 地中海贫血(β -thalassemia major)是以慢性进行性溶血性贫血、特殊面容、肝脾大及血红蛋白F明显升高为特征的一种血液系统疾病。对于重型 β 地中海贫血患者必需定期输血及应用去铁药物,即使给予正规的输血加去铁治疗也常于30岁之前夭折^[1]。异基因造血干细胞移植是目前惟一的根治地中海贫血的方法^[2]。但是重型 β 地中海贫血患者因本身的骨髓富细胞特性及反复输血的致敏效应,使得骨髓移植相对于其他疾病而言具有更大的难度,移植物抗宿主病是目前造成移植失败和移植相关死亡的重要因素^[3]。预处理、感染等引起胃肠道黏膜上皮细胞损伤,使细菌的降解产物如脂多糖进入血液,引发“细胞因子风暴”,是移植物抗宿主病致靶器官各种病理损害的重要原因之一。相关研究显示细胞因子在移植物抗宿主病的发生发展中起着至关重要的作用^[4-7]。白细胞介素2和肿瘤坏死因子 α 是研究最多的细胞因子。Miyamoto等^[8]率先报道了移植后第3天sIL-2R水平可预测急性移植物抗宿主病,Mathias等^[9]报道sIL-2R水平与急性移植物抗宿主病的发病及严重程度有关。Choi等^[10]测量438名采用清髓预处理患者移植后第7天可溶性的TNFR1水平增加超过原来的2.5倍,与II-IV度急性移植物抗宿主病发生存在相关性,增加了移植相关死亡率。Berger等^[11]报道含有较高的肿瘤坏死因子时则预示发生移植物抗宿主病的风险率增高。众多研究提示白细胞介素10升高可能降低移植物抗宿主病的发生^[12-14]。尽管相关研究表明细胞因子与移植物抗宿主病关系密切,但还有很多细胞因子与移植物抗宿主病的关系尚不清楚,同时地中海贫血为非肿瘤性疾病,重型 β 地中海贫血患者发生移植物抗宿主病可能存在其特殊性。因此,了解重型 β 地中海贫血患者造血干细胞移植后发生移植物抗宿主病时细胞因子的变化,为临床防治重型 β 地中海贫血造血干细胞移植后移植物抗宿主病,提高重型 β 地中海贫血患者的生存质量,具有重要意义。

本研究采用液相芯片技术检测重型 β 地中海贫血患者造血干细胞移植后发生移植物抗宿主病前后血清白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子 α 、巨噬细胞游走抑制因子水平的变化,评估其是否可以作

为移植物抗宿主病发生及疗效的监测指标。

1 对象和方法 Subjects and methods

设计: 前瞻队列研究。

时间及地点: 病例来自2012年7月至2013年1月南方医科大学南方医院儿科病房,细胞因子测定实验在广州医科大学实验室完成。

对象:

重型地中海贫血分度标准: I度:铁蛋白小于3 000 $\mu\text{g/L}$,肝脏小于肋下2.5 cm,年龄小于4岁; II度介于I度和III度之间; III度:铁蛋白大于5 000 $\mu\text{g/L}$,肝脏大于肋下4 cm,年龄大于8岁。

急性移植物抗宿主病诊断标准: I度:皮肤1, 2级,无肠道和肝脏受累; II度:皮肤1-3级,伴或不伴肠道1级,伴或不伴肝脏1级; III度:肠道2-4级,伴或不伴肝脏2-4级,伴或不伴皮疹; IV度:和III度相似,伴有终末症状或死亡。

慢性移植物抗宿主病诊断标准: 局限性慢性移植物抗宿主病(以下1项或2项): ①局限性皮肤侵犯。②慢性移植物抗宿主病引起的肝功能异常。广泛性慢性移植物抗宿主病(以下任意1项): ①全身性皮肤损害。②局部性皮肤侵犯和(或)慢性移植物抗宿主病导致的肝功能异常并包括: a、肝脏组织学示慢性活动性肝炎,桥状坏死或硬化; b、眼睛受累(Schirmer试验 $< 5 \text{ mm}$); c、口唇组织活检证实微小唾液腺或口腔黏膜受累; d、侵犯其他任何器官。

纳入标准: ①诊断为重型地中海贫血患者。②按美国Fred Hutchinson癌症研究所诊断标准(西雅图标准)移植后发生移植物抗宿主病。③至少保证造血干细胞移植后1个月内配合样本采集和6个月以上的随访。

排除标准: ①移植物抗宿主病发生时1周内发生其他部位严重感染(细菌、病毒、衣原体、真菌)。②发生肝静脉闭塞症病例。③造血干细胞移植后未采集完整检验标本。④不愿参与或因经济原因不能坚持用药者。

34例接受造血干细胞移植治疗重型 β 地中海贫血患儿,其中11例发生移植物抗宿主病。患儿均进行地中海贫血基因检查,基因型为 β 地中海贫血基因纯合子或双重杂合

子, 其中男19例, 女15例, 中位年龄7.2岁(年龄范围在2-16岁)。移植前34例重型 β 地中海贫血患儿按国内地中海贫血临床分度(根据年龄、肝大情况和铁蛋白水平分为3度), 类似于Pesaro分度, 其中4例为I度, 29例为II度, 1例为III度。

亲缘异基因造血干细胞移植17例, 其中7例为外周血干细胞移植, 2例骨髓干细胞移植, 3例骨髓干细胞+脐血干细胞移植, 3例外周血干细胞+脐血干细胞移植, 1例骨髓干细胞+外周血干细胞+脐血干细胞移植, 1例脐血干细胞移植。

非亲缘异基因造血干细胞移植17例, 均为外周血干细胞移植。

21例为HLA配型全相合(6/6, 8/8或10/10), 10例患者符合HLA 7/8相合, 3例半相合。移植物抗宿主病诊断按照美国Fred Hutchinson癌症研究所诊断标准(西雅图标准)^[15], 排除感染因素及肝静脉闭塞症。11例移植物抗宿主病中, 急性移植物抗宿主病9例(I度1例, II度3例, III度3例, IV度2例), 慢性移植物抗宿主病2例, 均为广泛型。所有受试对象均对实验项目知情同意, 实验经过医院伦理委员会批准。

方法:

预处理方案: 大部分患者采用环磷酰胺/白消安为基础的清髓性方案: 环磷酰胺[50-60 mg/(kg·d), -10 d至-9 d]; 白消安[2.8-4.4 mg/(kg·d), -8 d至-6 d]; 氟达拉滨[40 mg/(m²·d), -6 d至-2 d]; 噻替哌[10 mg/(kg·d), -5 d]; 加或不加抗人T淋巴细胞免疫球蛋白[5-10 mg/(kg·d), -3 d至-1 d]或兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白[2.5 mg/(kg·d), -3 d至-1 d]; 采用环孢素A、霉酚酸酯联合甲氨蝶呤常规预防移植物抗宿主病。

干细胞动员、采集、鉴定、保存、回输:

动员: 骨髓干细胞及外周血干细胞供者于采集前5 d开始给予粒细胞集落刺激因子5-10 μ g/(kg·d)进行动员。

采集: ①骨髓采集: 移植当日于供者髂后上棘抽取, 骨髓采集前用以下自行设计的公式[(25-30) mL/kg \times 受者体重]粗略估算骨髓量。②外周血干细胞采集: CS3000血细胞分离机采集, 采集量50-200 mL/(人·次), 采集次数不超过2次, 每次循环处理血量不多于15 000 mL, 有核细胞数达 10×10^8 /kg时, 不再采集。③脐血采集: 在新生儿出生后尽早在靠近胎儿端断脐, 穿刺脐静脉采集, 收集的脐血不做任何分离、纯化或扩增处理, 新鲜全血保存, 加入冷冻保护剂, 经程序降温仪处理后, 放入液氮中低温保存备用。

鉴定: 计算有核细胞数、流式细胞仪行CD34⁺细胞含量测定。

回输: 在预处理完成后, 次日行造血干细胞移植输注, 骨髓干细胞+脐血干细胞移植则在移植当天先将供者体内采集的骨髓造血干细胞直接从中心静脉尽快输入, 次日上午输注脐血干细胞。输注单个核细胞数平均为

7.41×10^8 /kg, 输注CD34⁺细胞数平均为 6.33×10^6 /kg。

移植物抗宿主病的治疗: 仅有局部皮疹的急性移植物抗宿主病, 可不治疗或局部涂用可的松软膏控制。但如果有如皮疹面积迅速扩大, 皮肤损害程度加重, 出现发热、流感样症状, 或怀疑有肠道或肝脏移植物抗宿主病等情况时给予全身性治疗。急性移植物抗宿主病的一线治疗: 甲基泼尼松龙2 mg/(kg·d)分次给予或地塞米松; 二线治疗: 霉酚酸酯, 普乐可复、人T-淋巴细胞免疫球蛋白, CD25单抗, 抗淋巴细胞球蛋白等。慢性移植物抗宿主病一线治疗: 甲基强的松龙和环孢素交替使用; 二线治疗: 硫唑嘌呤、他克莫司、霉酚酸酯、环磷酰胺、甲氨蝶呤治疗等。

感染的判定: 体温 >38.5 $^{\circ}$ C, 血、尿、痰等培养以及通过其他检查发现有阳性的微生物学结果, 影像学表现或临床证实或怀疑的感染。

植活标准: 连续3 d中性粒细胞数 $>0.5\times 10^9$ L⁻¹; 在没有输注血小板情况下连续7 d血小板 $>20\times 10^9$ L⁻¹; 红细胞抗原(ABO和Rh血型改变成供者型)、细胞遗传学标记(外周血或骨髓性染色体转变成供者型)、HLA抗原(在HLA配型不全相合的病例中, HLA抗原改变为供者型), 原位免疫荧光杂交法(FISH)检测性染色体的转变(供受者性别相同)、短串重复序列聚合酶链反应(STR-PCR)(供受者性别不同)。

实验室指标检测: 入组病例清晨空腹时抽取外周静脉血3 mL(EDTA抗凝), 室温静置1 h后, 放入4 $^{\circ}$ C冰箱1 h, 普通离心机3 000 r/min离心10 min, 取离心后上清液0.5 mL冻存-80 $^{\circ}$ C冰箱待测。液相芯片技术检测细胞因子: 严格按照美国Bio.Pad公司的实验要求进行操作, 使用其公司购买的检测仪器及Bio. Plex human cytokinemulti-plex试剂盒、Bio-Plex cytokine reagent试剂盒, 同时检测200 μ L血清标本中的白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子 α 、巨噬细胞游走抑制因子水平, 样品数据分析应用了Bio-Plex的管理软件(version 4.0), 可检测的细胞因子水平范围为1-32 000 ng/L, 敏感性 <10 ng/L。

主要观察指标: 患儿移植物抗宿主病出现前(移植前5 d)细胞因子水平基础值(T0)、移植物抗宿主病出现时(T1)、移植物抗宿主病出现第4天(T2)、移植物抗宿主病出现第7天(T3)、移植物抗宿主病症状完全消失(T4)检测5次细胞因子水平, 包括白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子 α 、巨噬细胞游走抑制因子。

统计学分析: 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组间比较采用Friedman M检验, 两指标间比较采用Spearman相关分析。 $P < 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 纳入34例接受造血干细胞移植治疗重型 β 地中海贫血患儿, 其中11例发生移植物抗宿主病, 均进入结果分析。

发生移植物抗宿主病 11 例患儿基本资料:

| 病例 | 年龄(岁) | 性别 | 地中海贫血分度 | 基因型 | HLA 配型 | 移植类型 |
|----|-------|----|---------|----------------|-----------|--|
| 1 | 5 | 男 | II | β-29/β71-72 | 8/8 | 非亲缘外周血干细胞移植 |
| 2 | 8 | 女 | II | β41-42/βII-654 | 7/8 | 非亲缘外周血干细胞移植 |
| 3 | 5 | 女 | II | β41-42/βII-654 | 8/8 | 同胞外周血干细胞移植 |
| 4 | 16 | 女 | III | β41-42/β28 | 6/6 | 同胞外周血干细胞移植 |
| 5 | 7 | 男 | II | β17/β17 | 8/8 | 非亲缘外周血干细胞移植 |
| 6 | 10 | 女 | II | β41-42/β41-42 | 8/8 | 同胞外周血干细胞移植 |
| 7 | 10 | 男 | II | βII-654/β27-28 | 7/8 | 非亲缘外周血干细胞移植 |
| 8 | 14 | 男 | II | β41-42/β28 | 7/8 | 非亲缘外周血干细胞移植 |
| 9 | 14 | 女 | II | βII-654/β17 | 半相合+7/8 | 同胞骨髓干细胞(半相合)+同胞外周血干细胞(半相合)+非亲缘脐血干细胞(7/8) |
| 10 | 6 | 男 | II | β71-72/β17 | 8/10 +6/8 | 父亲外周血干细胞(8/10)+非亲缘脐血干细胞(6/8) |
| 11 | 6 | 男 | II | β41-42/β41-42 | 半相合+8/8 | 同胞骨髓干细胞(半相合) +非亲缘脐血干细胞(8/8) |

表 1 移植物抗宿主病出现前后各时相细胞因子变化水平

Table 1 Variation tendency of different cytokines at different time points before and after graft-versus-host disease ($\bar{x}\pm s$, $n=11$, ng/L)

| 指标 | 移植物抗宿主病出现前(T ₀) | 移植物抗宿主病出现时(T ₁) | 移植物抗宿主病出现第 4 天(T ₂) | 移植物抗宿主病出现第 7 天(T ₃) | 移植物抗宿主病症状完全消失(T ₄) |
|------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 白细胞介素 6 | 10.12±12.79 | 90.84±126.37 ^b | 17.25±21.73 | 47.71±61.03 | 43.08±97.21 |
| 白细胞介素 8 | 25.96±18.07 | 78.84±63.03 | 107.03±177.57 ^a | 93.82±193.79 | 32.75±20.98 |
| 白细胞介素 12 | 10.52±19.33 | 306.24±657.61 ^b | 11.07±18.96 | 80.52±212.63 | 3.31±4.44 |
| 肿瘤坏死因子 α | 5.85±3.69 | 298.32±955.91 ^b | 6.93±6.36 | 125.68±398.68 | 7.17±8.17 |
| 巨噬细胞游走抑制因子 | 311.72±299.29 | 2 354.89±2 887.89 ^a | 1 001.21±751.27 | 1 559.71±2 008.36 | 451.22±404.93 |

表注: 白细胞介素 6、白细胞介素 12、肿瘤坏死因子 α、巨噬细胞游走抑制因子在移植物抗宿主病出现时处于高表达状态, 白细胞介素 8 在移植物抗宿主病出现第 4 天处于高表达状态。与移植物抗宿主病出现前比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 移植物抗宿主病出现前后各时间点细胞因子水平见表 1。各时相白细胞介素 6 水平相比较差异有显著性意义 ($P=0.002$), 移植物抗宿主病出现时最高。各时相白细胞介素 8 水平相比较差异有显著性意义 ($P=0.022$), 移植物抗宿主病出现第 4 天最高。各时相白细胞介素 12 水平相比较差异有显著性意义 ($P=0.003$), 移植物抗宿主病出现时最高, 移植物抗宿主病出现第 7 天次之。各时相肿瘤坏死因子 α 相比较差异有显著性意义 ($P=0.005$), 移植物抗宿主病出现时最高, 移植物抗宿主病出现第 7 天次之。各时相巨噬细胞游走抑制因子水平相比较差异有显著性意义 ($P=0.026$), 移植物抗宿主病出现时最高, 移植物抗宿主病出现时最高, 移植物抗宿主病出现第 7 天次之。

2.3 相关性分析 移植物抗宿主病出现前(T₀时相)各细胞因子均无明显相关性 ($P > 0.05$), 移植物抗宿主病出现时(T₁时相)白细胞介素 12 与肿瘤坏死因子 α 有显著正相关性 ($r=0.87$, $P=0.001$), 白细胞介素 12 与巨噬细胞游走抑制因子有显著正相关性 ($r=0.73$, $P=0.011$)。移植物抗宿主病出现第 7 天(T₃时相)白细胞介素 6 与巨噬细胞游走抑制因子有显著正相关性 ($r=0.73$, $P=0.01$), 白细胞介素 12 与巨噬细胞游走抑制因子有显著正相关性 ($r=0.71$, $P=0.013$), 移植物抗宿主病症状完全消失时(T₄时相)白细胞介素 6 与白细

胞介素 8 有显著正相关性 ($r=0.91$, $P=0.001$)。

3 讨论 Discussion

移植物抗宿主病的发展可以分为 3 个阶段: ①抗原提呈细胞的激活。②供体 T 细胞活化、增殖、分化和迁移。③靶组织破坏^[16]。急性移植物抗宿主病一般认为与 Th1 免疫反应相关, 慢性移植物抗宿主病主要与 Th2 免疫反应相关^[17-18]。Th1 细胞产生 γ-干扰素等细胞因子, 介导细胞免疫, 而 Th2 细胞产生白细胞介素 4、白细胞介素 5 和白细胞介素 13 等调节体液免疫^[19]。细胞因子在移植物抗宿主病中的作用机制尚未完全明确, 一般认为在实验模型中可以概括为: ①移植前大剂量放、化疗的预处理、感染、输血等影响引起宿主细胞释放炎性细胞因子如白细胞介素 1、白细胞介素 6 等, 增强供者 T 细胞对宿主 MHC 抗原的识别, 刺激宿主体内的巨噬细胞产生白细胞介素 12^[20-21]。②白细胞介素 12 刺激供者骨髓中 T 细胞增殖。T 细胞分泌白细胞介素 12、γ-干扰素, 控制和放大对异体抗原的免疫应答^[22-23]。③为多效应因子的复合连锁阶段, I 类细胞因子过度产生, 引发“细胞因子风暴”, 直接导致靶器官的各种病理损害, 非 T 效应细胞分泌的肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 或与 CTL 和 NK 细胞介导的细胞毒作用引起移植物抗宿主病靶

器官的各种病理损害^[24-25]。对于重型地中海贫血患者, 多次输血的本身可因铁超负荷存在广泛的免疫异常, 其中包括T细胞亚群的变化, 如T抑制细胞(CD8)活性和数量增加, T辅助细胞(CD4)增殖能力、活性水平及数量下降^[26], 现尚未有细胞因子与重型地中海贫血移植物抗宿主病之间关系的研究报道。本次研究中, 结果显示白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子 α 、巨噬细胞游走抑制因子在移植物抗宿主病发生后均较移植物抗宿主病发生前高。

白细胞介素6可通过增强Th1和Th17亚群活化, 减少调节T细胞或直接细胞毒性导致移植物抗宿主病。Malone等^[27]测定了147例异基因造血干细胞移植患者细胞因子水平, 其中96例患者出现不同程度的急性移植物抗宿主病, 临床移植物抗宿主病之前白细胞介素6水平突然升高, 且与移植物抗宿主病严重程度成正比, 本研究中, 可能因为移植物抗宿主病前仅采集了一次标本作为水平基础值, 其后白细胞介素6水平升高, 故峰值提示发生于移植物抗宿主病发生时。

白细胞介素8是由某些类型细胞如巨噬细胞和上皮细胞受炎症刺激后释放的因子, 对中性粒细胞有趋化作用而实现对移植物抗宿主病的调节。白细胞介素12可促进T细胞和NK细胞的分化增殖, 提高特异性CTL细胞的应答能力, 诱导 γ -干扰素产生, 可能为移植物抗宿主病发病的中心环节, 居小萍等^[28]研究提示白细胞介素12在移植物抗宿主病发病中起重要的正向调节作用。众多研究支持肿瘤坏死因子 α 可作为标志移植物抗宿主病活动性的效应因子。如华佳叶等^[29]的研究也发现白血病患者预处理后及移植后血清中白细胞介素2、肿瘤坏死因子 α 水平及供体动员后白细胞介素2水平可能与急性移植物抗宿主病发生及严重程度有关, 可作为预测发生II-IV度急性移植物抗宿主病指标。巨噬细胞游走抑制因子为炎症性趋化因子, 可调控肿瘤坏死因子 α 的产生。Toubai等^[30]发现, 血清巨噬细胞游走抑制因子峰值在急性移植物抗宿主病时显著增高, 且在6个月内发生慢性移植物抗宿主病者的平均巨噬细胞游走抑制因子水平比移植前显著增加。Lo等^[31]发现, 巨噬细胞和T淋巴细胞的浸润局限于巨噬细胞游走抑制因子强表达的区域, 73%的患者血清巨噬细胞游走抑制因子水平先于移植物抗宿主病的发生而升高, 在急性移植物抗宿主病出现前就达到峰值, 且随移植物抗宿主病的加重而升高, 提示巨噬细胞游走抑制因子表达的上调与急性移植物抗宿主病的发生相关。

本次结果印证了实验前假设, 移植物抗宿主病发生过程中存在细胞因子的明显变化如: 白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素12、肿瘤坏死因子 α 、巨噬细胞游走抑制因子, 特别是在移植物抗宿主病发生前后变化显著。因为在移植前5d至移植物抗宿主病发生后中间未收集标本, 加上样本量的限制, 故不能判断细胞因子的峰值出现于移植

物抗宿主病前还是移植物抗宿主病时, 具体的关系需更系统、更大样本量的实验设计明确证实。另外本次研究结果提示移植物抗宿主病出现时白细胞介素12与肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素12与巨噬细胞游走抑制因子有显著正相关性, 移植物抗宿主病出现第7天白细胞介素6与巨噬细胞游走抑制因子、白细胞介素12与巨噬细胞游走抑制因子有显著正相关性, 移植物抗宿主病症状完全消失时白细胞介素6与白细胞介素8有显著正相关性。提示移植物抗宿主病发生时白细胞介素12、肿瘤坏死因子 α 可能相互促进分泌, 移植物抗宿主病出现第7天, 白细胞介素6与巨噬细胞游走抑制因子、白细胞介素12与巨噬细胞游走抑制因子可能相互促进产生, 移植物抗宿主病消失后白细胞介素6与白细胞介素8下降具有相关性。

细胞因子的产生和分泌具有相互调控的作用, 如果进一步了解具有相关性细胞因子在移植物抗宿主病变化过程中的变化规律, 可能有助于临床医生根据细胞因子的变化预测移植物抗宿主病发病风险, 同时为受者制订个体化的用药方案, 从而更好地防治移植后急、慢移植物抗宿主病的发生, 减少移植物抗宿主病的发生率和降低死亡率。

作者贡献: 试验设计为通讯作者, 实施为第一、二作者, 评估为第七作者, 资料收集为第一、二、三、四、五、六作者。第一作者成文, 通讯作者审核。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 患者及家属签署造血干细胞移植治疗地中海贫血科学研究知情同意书, 研究方案经南方医科大学南方医院医学伦理委员会批准([2012]伦审字(034)号)。南方医科大学南方医院造血干细胞移植资质。

学术术语: 巨噬细胞移动抑制因子-是巨噬细胞的自身分泌因子, 为一种重要的前炎性反应因子, 其主要作用为抑制巨噬细胞游走移动, 促进巨噬细胞在炎性反应局部浸润、聚集、增生、活化, 增强其黏附、吞噬作用, 还能促进多种细胞因子的生成, 从而间接增强巨噬细胞的功能。巨噬细胞移动抑制因子广泛参与了机体多种生理及病理生理学反应, 包括炎性反应、脂肪发生、肾脏病变、肿瘤生成和皮肤创伤修复等。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Martin A, Thompson AA. Thalassemias. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(6):1383-1391.
- [2] Karimi M, Cohan N, De Sanctis V, et al. Guidelines for diagnosis and management of Beta-thalassemia intermedia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014;31(7):583-596.
- [3] Li C, Wu X, Feng X, et al. A novel conditioning regimen improves outcomes in β -thalassemia major patients using unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2012;120(19):3875-3881.

- [4] Zhang Y, Sandy AR, Wang J, et al. Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4⁺ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;117(1):299-308.
- [5] Liu D, Yan C, Xu L, et al. Diarrhea during the conditioning regimen is correlated with the occurrence of severe acute graft-versus-host disease through systemic release of inflammatory cytokines. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(11):1567-1575.
- [6] Fall-Dickson JM, Mitchell SA, Marden S, et al. Oral symptom intensity, health-related quality of life, and correlative salivary cytokines in adult survivors of hematopoietic stem cell transplantation with oral chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(7):948-956.
- [7] Resende RG, Correia-Silva Jde F, Araújo TC, et al. Investigation of functional IL-10 gene polymorphism and IL-10 levels in acute graft-versus-host disease. *J Clin Immunol*. 2010;30(3):465-473.
- [8] Miyamoto T, Akashi K, Hayashi S, et al. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17(2):185-190.
- [9] Mathias C, Mick R, Grupp S, et al. Soluble interleukin-2 receptor concentration as a biochemical indicator for acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9(3):393-400.
- [10] Choi SW, Kitko CL, Braun T, et al. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. *Blood*. 2008;112(4):1539-1542.
- [11] Berger M, Signorino E, Muraro M, et al. Monitoring of TNFR1, IL-2R α , HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in paediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(9):1230-1236.
- [12] Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia*. 2003;17(6):1150-1156.
- [13] Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1044-1050.
- [14] Weber M, Stein P, Prüfer S, et al. Donor and host B cell-derived IL-10 contributes to suppression of graft-versus-host disease. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1857-1865.
- [15] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007:268-271.
- [16] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
- [17] Chu YW, Gress RE. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(4):365-378.
- [18] Lim JY, Cho BS, Min CK, et al. Fluctuations in pathogenic CD4⁺ T-cell subsets in a murine sclerodermatous model of chronic graft-versus-host disease. *Immunol Invest*. 2014;43(1):41-53.
- [19] Yi T, Chen Y, Wang L, et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114(14):3101-3112.
- [20] Sung AD, Chao NJ. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(1):25-32.
- [21] Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol*. 2013;160(3):288-302.
- [22] Mosaad YM. Immunology of hematopoietic stem cell transplant. *Immunol Invest*. 2014;43(8):858-887.
- [23] Zhang Y, Joe G, Hexner E, et al. Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2005;11(12):1299-1305.
- [24] Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000;95(9):2754-2759.
- [25] Manjili MH, Toor AA. Etiology of GVHD: Alloreactivity or Impaired Cellular Adaptation. *Immunol Invest*. 2014;43(8):851-857.
- [26] Fuchs J, Harris Z. The pathologic role of iron in infection and immunity. *Contemp Critic Care*. 2005;3(1):1-9.
- [27] Malone FR, Leisenring WM, Storer BE, et al. Prolonged anorexia and elevated plasma cytokine levels following myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(8):765-772.
- [28] 居小萍, 王健民, 韩凤来, 等. IL-12在急性移植物抗宿主病发病机制中的作用研究[J]. 解放军医学杂志, 2001, 26(11):813-815.
- [29] 华佳叶, 周旭红, 庞纛, 等. 供受体血清白介素-2、肿瘤坏死因子- α 水平与急性移植物抗宿主病的关系[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(4):831-833.
- [30] Toubai T, Shono Y, Nishihira J, et al. Serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol*. 2009;31(2):161-168.
- [31] Lo JW, Leung AY, Huang XR, et al. Macrophage migratory inhibitory factor (MIF) expression in acute graft-versus-host disease (GVHD) in allogeneic hemopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(6):375-380.