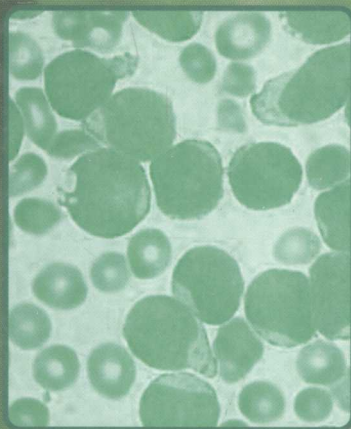


儿童白血病的 诊断和治疗

主编 方建培 陈 纯 金润铭



人民卫生出版社

R733.7/FJP

儿童白血病的诊断和治疗

主 编 方建培 陈 纯 金润铭

副主编 罗学群 陈 静

编 委 (按姓氏笔画排序)

方建培 (中山大学附属第二医院儿科)

白 燕 (华中科技大学附属协和医院儿科)

江 华 (上海儿童医学中心血液/肿瘤科)

沈树红 (上海儿童医学中心血液/肿瘤科)

陈 纯 (中山大学附属第二医院儿科)

陈 静 (上海儿童医学中心血液/肿瘤科)

林愈灯 (广东省人民医院儿科)

罗向阳 (中山大学附属第二医院儿科)

罗学群 (中山大学附属第一医院儿科)

金润铭 (华中科技大学附属协和医院儿科)

徐宏贵 (中山大学附属第二医院儿科)

薛红漫 (中山大学附属第二医院儿科)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

儿童白血病的诊断和治疗/方建培等主编. —北京:
人民卫生出版社, 2008. 7

ISBN 978-7-117-10228-5

I. 儿… II. 方… III. 小儿疾病: 白血病-诊疗
IV. R733.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 068049 号

儿童白血病的诊断和治疗

主 编: 方建培 陈 纯 金润铭

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 三河市富华印刷包装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 24.25

字 数: 575 千字

版 次: 2008 年 7 月第 1 版 2008 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-10228-5/R·10229

定 价: 49.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

序



儿童白血病的年发病率约为 3~4/10 万人口,随着感染性疾病已得到有效控制,儿科的疾病谱也发生了重大的变化,儿童白血病已成为威胁儿童健康和生命的重大疾病之一。在小儿血液系统疾病中,儿童白血病的诊断与治疗也有了许多新进展,已成为儿童血液病研究中的重要部分。

近年来,分子生物学、细胞生物学、遗传学、免疫学等基础医学学科的飞速发展,为儿童白血病的研究奠定了坚实的基础。将基础学科的理论研究成果与儿童白血病的临床实践紧密联系起来,将有利于推动儿童白血病的综合防治,提高儿童白血病的治愈率,改善他们的生存质量。这也是编著本书的目的。

儿童白血病的流行病、类型、生物学特征以及预后、疗效与成人白血病有很大不同,而国内有关儿童白血病的专业书籍尚缺少。本书系统地阐述了儿童白血病的病因、发病机制、临床表现、实验室检查、诊断与治疗等。既注重儿童白血病的新进展、又从临床实际出发,总结儿童白血病的诊疗经验,并融合了作者的工作经验,是一本具有较高质量的基础理论和临床相结合的参考书,可供儿科、内科血液、医学院校师生阅读、参考。

本书的作者均是对儿童白血病有着丰富临床经验,思维活跃、具有开拓精神的中青年学者,他们为本书的编写倾注了大量的心血。希望本书的出版能起到抛砖引玉的作用,为从事儿童血液专业及其相关领域的一线工作者提供了学习和研究的平台。因此向大家推荐这本书。

首都医科大学附属北京儿童医院
血液病中心主任医师、教授
中华医学会儿科学分会血液学组长
中国抗癌协会儿科分会副组长

吴敏媛

2008 年 2 月 6 日

前言



白血病是危害人类健康、致命的恶性肿瘤,是我国重点研究的九大肿瘤之一。根据流行病学的统计,我国白血病的自然发病率为 3/10 万,每年新增约 4 万名白血病患者,其中 2 万名是儿童,而且以 2~7 岁儿童居多。从 20 世纪 70 年代特别是 80 年代以后,儿童急性白血病,尤其是急性淋巴细胞白血病已成为可以治愈的恶性肿瘤,也是当今疗效最好、治愈率最高的恶性肿瘤之一。尽管我国对儿童白血病的研究起步较晚,但近 10 年来已取得了非常显著的进步。我国少数大学或儿童血液研究中心对儿童急性白血病的治疗已经达到国际水平。异基因造血干细胞移植治疗儿童白血病,大大改善了高危型白血病的预后和无病生存率。在儿童白血病的治疗中,国内外的资料显示,以前的“不治之症”儿童白血病经过治疗可以长期缓解、无病生存甚至治愈。

目前有关白血病的发病机制和治疗的书籍不少,但是针对儿童白血病则非常少,而儿童白血病在发病特点、发病机制、治疗以及预后都具有不同于成人的特点。编者根据血液学的最新进展,结合儿童白血病的特殊性,参阅大量国内外的最新文献而编写《儿童白血病的诊断和治疗》一书,希望更好地推广这些新成果,提高我们在儿童白血病领域的治疗水平。

本书编写遵循以下原则:①新颖性:为适应新世纪,本书着力反映国内外有关儿童白血病的新进展;②先进性:介绍当今最新的儿童白血病的基础理论和技术,包括现代免疫学、细胞凋亡理论、干细胞、人类基因组以及相关技术应用等知识;③实用性:采用医学基础理论与临床相结合,但更偏重从临床实际出发,介绍儿童白血病的临床表现、诊断和治疗方法,适当加入相关基础理论的叙述,便于更易掌握疾病的发生、发展、诊治和转归,提高临床逻辑思维能力,做到开卷有益,提高儿科医师的实际工作能力和专业水平。

本书主要由目前工作在临床一线的中青年医师编写,他们均为活跃在儿童白血病研究领域的学术骨干,具有较丰富的儿童白血病诊治经验,思维活跃,具有开拓精神及扎实的基础。相信本书的出版能对从事儿童血液病临床工作的儿科医师、医学院校的教师和学生有所帮助。

方建培 陈纯 金润铭

2007 年 12 月 3 日

目录



第一章 人类造血及其调控	1
第二章 血细胞形态学	14
第三章 血液病遗传学	19
第四章 人类白细胞抗原系统	30
第五章 白血病病因学	43
第六章 白血病细胞动力学	54
第七章 白血病的耐药机制及其逆转	67
第八章 儿童白血病的常用化疗药物	81
第一节 烷化剂	81
第二节 抗代谢类药物	87
第三节 蒽环类抗生素	92
第四节 植物抗肿瘤药	97
第五节 酶类	102
第六节 维生素 A 衍生物	102
第七节 其他化疗药物	103
第九章 儿童白血病的诊断	113
第十章 儿童急性淋巴细胞白血病的治疗	120
第一节 儿童急性淋巴细胞白血病的分型	120
第二节 儿童急性淋巴细胞白血病的治疗	138
第三节 儿童急性淋巴细胞白血病的治疗效果与预后	154
第十一章 儿童急性非淋巴细胞白血病的治疗	159
第十二章 特殊类型的急性白血病	193
第一节 先天性白血病	193
第二节 婴儿急性白血病	195

第三节	高白细胞性急性白血病	196
第四节	急性混合细胞型白血病	197
第五节	治疗相关性白血病	200
第十三章	儿童慢性粒细胞白血病的诊断和治疗	203
第十四章	中枢神经系统白血病	213
第一节	中枢神经系统白血病的发病率	213
第二节	中枢神经系统白血病的发病机制	214
第三节	中枢神经系统白血病的发病危险因素	214
第四节	中枢神经系统白血病的临床表现	215
第五节	中枢神经系统白血病的辅助检查	216
第六节	中枢神经系统白血病的诊断	217
第七节	中枢神经系统白血病的治疗	218
第八节	中枢神经系统白血病的预防	219
第九节	中枢神经系统白血病常用的防治方案	221
第十五章	微小残留白血病	224
第一节	白血病细胞的分子标记	224
第二节	MRD 的检测方法	227
第三节	MRD 检测在儿童 ALL 中的应用	231
第四节	MRD 检测在儿童 ANLL 中的应用	235
第五节	MRD 检测在干细胞移植中的应用	240
第六节	MRD 的治疗	240
第七节	MRD 检测的意义	241
第十六章	儿童骨髓增生异常综合征	244
第十七章	类白血病反应	263
第十八章	造血干细胞移植治疗儿童白血病	268
第一节	异基因骨髓移植治疗儿童白血病	268
第二节	异基因外周血干细胞移植治疗儿童白血病	283
第三节	脐血移植治疗儿童白血病	292
第四节	自体干细胞移植治疗白血病	308
第五节	造血干细胞移植常见并发症	319
第十九章	儿童白血病的输血治疗	342
第二十章	白血病儿童的心理问题及其干预对策	352
第二十一章	儿童白血病的护理	357

第二十二章 儿童白血病的管理.....	366
第二十三章 白血病常用临床操作规范.....	369
第一节 骨髓穿刺术.....	369
第二节 骨髓活检术.....	370
第三节 腰椎穿刺术.....	371
第四节 外周静脉插管术.....	372

第一章 人类造血及其调控

一、人类造血的不同阶段

随着个体发育的进展,造血中心由胚胎腹侧中胚层-副主动脉层/主动脉性腺-中肾区(PAS/AGM区)或卵黄囊迁至肝脾,并逐渐过渡到骨髓,出生后骨髓成为主要的造血组织。造血细胞胚胎发育及增殖分化过程中发生一系列基因差异表达,不同发育阶段的造血种系受不同基因调控。

(一) 出生前造血

此期为胚胎胎儿造血,先后分为中胚造血期,肝、脾造血期和骨髓造血期。

1. 中胚叶造血期 目前研究认为造血干细胞来自腹侧中胚层。它为血液、肾、肌肉和脊索等组织提供干细胞。腹侧中胚层在一定条件下,诱导增殖和分化为造血干细胞,PAS/AGM区是肝前造血最早的重要位点,可以为全部的各系造血。约于胚胎第19天,卵黄囊出现血岛(blood island),尤其含中胚层间质细胞演化的最早的原始血细胞(hemocytoblast),主要分化为巨幼红样初级原始红细胞,合成血红蛋白(hemoglobin, Hb) Gower-1 或 Hb Gower-1 及 portland,直到胚内循环形成后,才有各系造血能力。在胚胎第6周后,中胚叶造血开始减退,因而卵黄囊造血是一过性的,其后再种植到胚肝。

2. 肝(脾)造血期 胚胎第5周出现肝窦,与卵黄囊静脉丛相连接,肝窦中首次出现的血细胞及其前体细胞以幼稚红系细胞为主,为初级原始红细胞,后者又分化为次级原始红细胞及成熟红细胞,主要合成 HbF,少量 HbA1、A2。妊娠4~5个月的胎肝中含丰富的造血干细胞。此时粒系及淋巴细胞含量极少。胎儿第3个月左右脾脏参与短暂造血,主要产生粒细胞、红细胞和少量淋巴细胞,至第5个月脾造血渐减退,仅生成淋巴细胞。胎肝造血具有上升期、旺盛期和减退期,至出生时停止。肝造血为第二代造血。

胸腺是中枢淋巴器官,6~7周人胚胎已出现胸腺,并开始生成淋巴细胞。来源于卵黄囊、肝脏或骨髓的淋巴干细胞在胸腺中经包括胸腺素在内的微环境中诱导分化为具有细胞免疫功能的前T细胞和成熟的T淋巴细胞,并迁移至周围淋巴组织,在相应的微环境中分化为不同的亚群,这种功能维持终生。此外,胚胎期胸腺还有短暂的生成红细胞和粒细胞的功能。

自胚胎第11周淋巴结开始生成淋巴细胞,从此,淋巴结成为终生造淋巴细胞和浆细胞的器官。胎儿期淋巴结亦有短暂的红系造血功能。

3. 骨髓造血期 胎儿各种骨骼的骨髓发育时间不一,参与造血时间也不同,大多数自妊娠第9~12周开始,至7个月时,红髓充满骨髓腔,骨髓成为主要造血器官并保持终

生。人类骨髓中造血干细胞来自肝脏,栖居骨髓微环境中增殖分化。胚胎期各种血细胞出现次序为红系、巨核细胞、粒细胞系及淋巴细胞、单核细胞系。胚胎第6周开始出现骨髓,但至胎儿4个月时才开始造血活动,并迅速成为主要的造血器官,直至出生2~5周后成为唯一的造血场所。

(二) 出生后造血

出生后从幼儿至成人骨髓造血组织经历不同的变化,婴幼儿全部骨髓均含红髓,5~7岁后管状骨中段开始脂肪细胞浸润,变为黄骨髓并不再造血,但仍有造血潜能。成年时红髓仅限于扁骨及长骨近端,占骨髓总量1/2,婴幼儿骨髓代偿能力比成人低。当骨髓造血功能紊乱或溶血严重时,易发生髓外造血或骨髓造血衰竭。

1. 骨髓造血 出生后主要是骨髓造血。婴幼儿期所有骨髓均为红骨髓,全部参与造血,以满足生长发育的需要。5~7岁开始,脂肪组织(黄髓)逐渐代替长骨中的造血组织,因此到了年长儿和成人期红骨髓仅限于肋骨、胸骨、脊椎、骨盆、颅骨、锁骨和肩胛骨,但黄髓仍有潜在的造血功能,当需要增加造血时,它可转变为红髓而恢复造血功能。小儿在出生后头几年缺少黄髓,故造血代偿潜力小,如果需要增加造血,就会出现髓外造血。

2. 骨髓外造血 在正常情况下,骨髓外造血极少。出生后,尤其在婴儿期,当发生感染性贫血或溶血性贫血等需要增加造血时,肝、脾和淋巴结可随时适应需要,恢复到胎儿时的造血状态,出现肝、脾、淋巴结肿大。同时外周血中可出现有核红细胞或(和)幼稚中性粒细胞。这是小儿造血器官的一种特殊反应,称为“骨髓外造血”,感染及贫血纠正后即恢复正常。

二、胚胎期血细胞发育

胚胎及胎儿期血细胞发育分化经历不同的造血阶段,不同的造血场所受不同的造血微环境及造血因子调控影响,呈现不同系的增殖分化模式,逐渐演化发育为适应出生后生命活动的造血组织及血细胞。

(一) 红细胞系

胚胎期红系造血特点:①首先发生红系造血,卵黄囊血岛产生具有自我增殖能力的原始成红细胞(primitive erythroblasts),然后发育为原始红细胞(primitive erythrocytes),可合成原始血红蛋白(hemoglobin, Hb),胚胎第6周后原始成红细胞发育为正成红细胞(definitive erythroblasts),最后发育为正红细胞;②整个胚胎发育过程,红系造血处于活跃状态,尤其是肝脏造血期,随胎龄增加,胎血中红细胞数、Hb含量和血细胞比容逐渐升高;③有核红细胞比例高,12周时高达 $50 \times 10^9/L$,妊娠中期至出生降至 $10 \times 10^9/L$;④红细胞含Hb经历从胚胎型Hb到成人型Hb的转换,它受Hb珠蛋白链编码基因调控,也受胚胎发育内环境影响。

(二) 白细胞系

妊娠第2个月胎肝中原始造血细胞首先分化为前髓细胞,然后是中粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞。以后各期胎儿造血中粒细胞含量处于低水平且多形核比例少。直至妊娠26周时才接近成人1/2,此后呈持续升高至出生。从妊娠4~6周卵黄囊和间充质即可培养出粒-巨噬细胞系集落形成单位(CFU-GM),但胎血中单核细胞含量一直至出生都处于低水平。

(三) 淋巴细胞

胚胎期 T 淋巴细胞发育特点:①胎儿骨髓中 TdT 阳性细胞比率高于成人;②T 淋巴细胞表面标记分布异于成人;③淋巴细胞³H-TdR 掺入率高于成人,随胎龄增加呈下降趋势;④新生儿脐血 T 细胞功能不成熟性。B 淋巴细胞发育经历前 B 细胞、不成熟 B 细胞、成熟 B 细胞及浆细胞等阶段。自然杀伤细胞(natural killer, NK)细胞主要由骨髓产生,28 周时胎儿血中出现 NK 细胞,直至出生前维持较低水平。

(四) 巨核细胞和血小板

巨核细胞主要产生场所为骨髓,胎血中血小板随胎龄增加而逐渐升高。

(五) 胚胎微环境及发育调控

造血细胞发育既有其自身因素的作用,也依赖于骨髓诱导微环境的作用。在胚胎造血发育过程中涉及不同的发育位点,这些位点的微环境对造血发挥重要作用。研究发现只有将胚胎造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)植入胚胎胸腺中,才可生成 γ_3^+ -T 细胞。而骨髓 HSC 则不能,且成熟的胸腺也不能使胚胎的骨髓 HSC 分化为 γ_3^+ -T 细胞。在一定条件下,造血细胞分化能力可以转化,如将骨髓 HSC 暴露于胚胎环境中,可产生卵黄囊和胚肝造血。造血细胞的发生、增殖和分化均是基因差异表达调控的结果。造血细胞在不同的发育位点、不同发育阶段和功能状态以及造血细胞本身和造血微环境成分,均受不同的基因调控,形成复杂的网络。

三、造血干细胞的生物学特性

造血干细胞(HSC)是具有高度自我更新能力和多能分化潜能的造血前体细胞。其生物特征:

(1)自我更新能力:自我更新指由亲代细胞分裂而成的两个子代细胞,其中一个保留有 HSC 的全部生物学特征,从而维持干细胞池大小、干细胞数量/质量不变。原始 HSC 具有自我复制和自我更新能力,可不断产生新的 HSC 以自我补充,从而生生不息。

(2)多能分化潜能:HSC 分裂后的另一个子代细胞进入分化程序,能分化为多种早期祖细胞,并进一步发育为各种血细胞(图 1-1)。

(3)静止性:HSC 具有巨大的功能储备,多数 HSC 处于静止状态,在机体需要时进入细胞周期。

(4)“可塑性”:最近有研究表明 HSC 可向非造血组织分化,如肝脏细胞、神经细胞、肌肉细胞、血管内皮细胞等,但此特性目前仍存争议。

HSC 具有自我更新和多向分化潜能,并具有长期免疫及造血重建功能。骨髓造血细胞还包括造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPC),由 HSC 分化而来,是各种成熟血细胞的前体,并具有增殖和分化的能力,而移植后只可短期重建造血。一般认为只有 HPC 才可在体外大量培养扩增,但最近有证据表明部分 HSC 亦能在体外扩增且保持干细胞的特性。此外,有学者认为 HSC 主要分布于骨的干骺端,而 HPC 主要分布于骨的中段;也有研究表明 HSC 与 HPC 在 SLAM 家族分子受体的表达有明显的差异。而最近 Colvin 等提出一个新的干细胞模型——连续性调控模型,认为 HSC 与 HPC 可互相转化,其表型的波动与细胞周期中染色体的重塑有关。

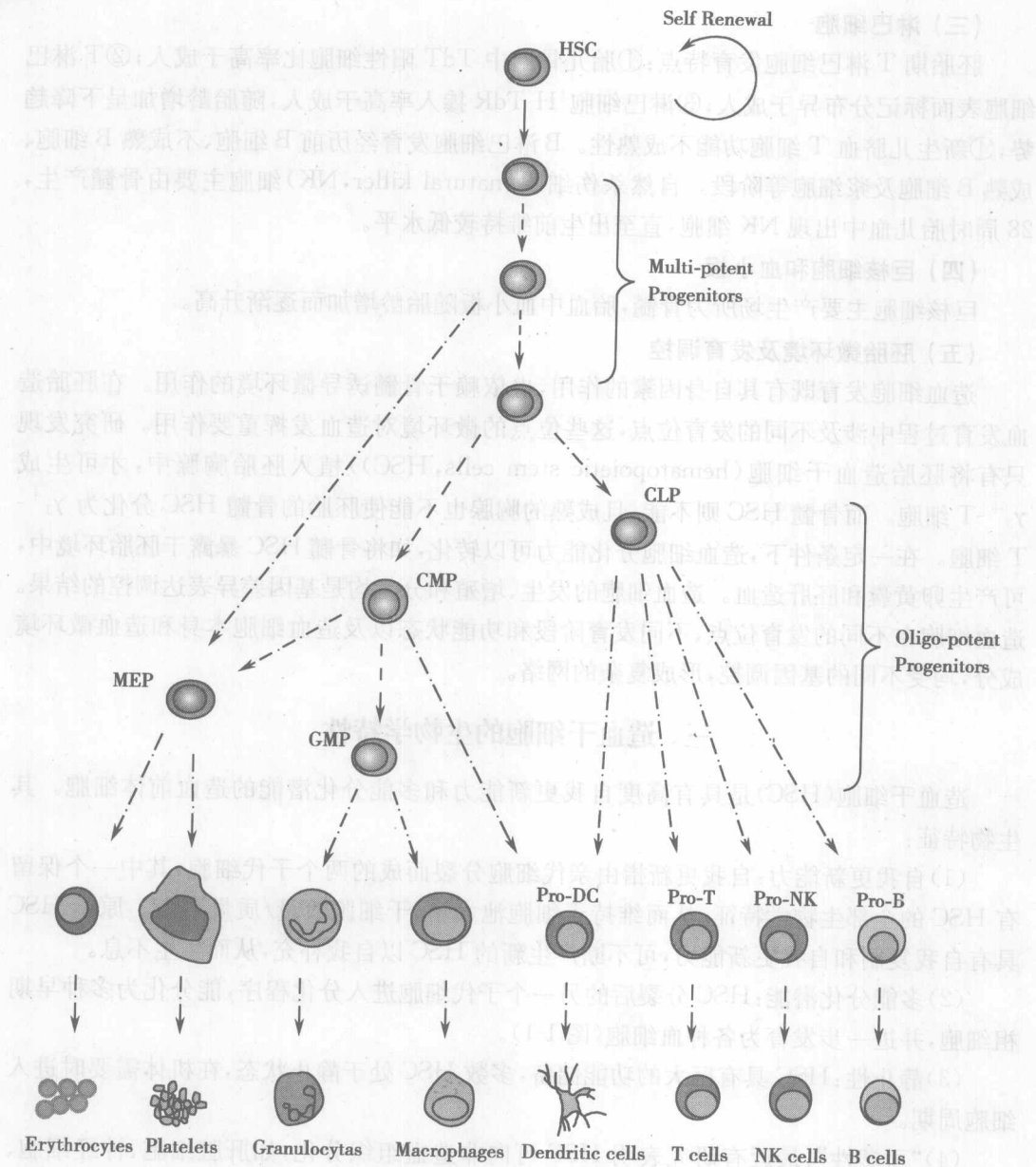


图 1-1 造血干细胞多能分化潜能

(一) HSC 自我更新

目前认为 HSC 经细胞不对称分裂的方式进行自我更新,即每次 HSC 分裂后,一个子细胞立即分化为 HPC,而另一个子细胞保持不分化。HSC 在不断产生 HPC 的同时,还使干细胞的数量和质量保持终生不变。HSC 自我更新的具体机制尚不清楚,但与骨髓微环境密切相关。

1. 成骨细胞 HSC 存在于骨髓微环境中,HSC 的数量与其定居的空间大小有关,而成骨细胞是骨髓微环境的重要组成部分,研究表明成骨细胞能调控 HSC 造血生成。最

近国外有研究发现,梭形的成骨细胞与 HSC 之间通过 N-钙粘蛋白和 β -连环蛋白连接在一起,当增加此种梭形成骨细胞数量时,HSC 数量也相应地明显增加,并证实其间主要通过骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)调控 HSC 生成。国外另一研究小组在转基因动物体内和体外实验中亦表明,当应用甲状旁腺激素刺激成骨细胞生成时,同样发现能增加 HSC 的数量,并认为通过活化 Notch 信号而调控 HSC 生成。还有研究表明成骨细胞调控 HSC 造血生成的机制与分泌骨桥蛋白有关,骨桥蛋白能诱导 HSC 凋亡,是调节 HSC 数量的负性因素。

黏附在成骨细胞的 HSC 处于静止未分化状态而保持 HSC 数量恒定,但如何维持 HSC 稳定状态是目前研究的热点。国外 Arai 等研究表明成骨细胞与 HSC 间 Ang-1/Tie2 信号通路是关键因素,他们研究发现静止状态的 HSC 表达酪氨酸激酶受体 Tie2,而成骨细胞能产生相应配体 Ang-1,Tie2/Ang-1 相互作用能抑制 HSC 的细胞分裂,维持 HSC 处于细胞周期 G_0 期。现认为 Tie2/Ang-1 阻断细胞分裂的机制可能是:①HSC 内在因素,HSC 表面分子 Tie2 分子能活化细胞内磷脂酰肌醇激酶 PI3-K/Akt,使 P21 蛋白磷酸化,维持核内蛋白质稳定而使细胞周期停滞。②Tie2/Ang-1 相互作用能促进细胞表面整合素等黏附分子表达,促使 HSC 与成骨细胞紧密结合,从而间接地影响细胞周期。同时,国外 Wilson 等研究还表明在 Tie2/Ang-1 信号传导中,HSC 表面分子 c-Myc 蛋白是一负性调节因素。他们研究发现增强 c-Myc 蛋白表达则抑制 N-钙粘蛋白等许多黏附分子受体的表达,促使 HSC 脱离成骨细胞,丧失自我更新能力,促进 HSC 分化。

2. 信号传导通路 经典 Wnt 信号通路由细胞内 β -连环蛋白介导,当 Wnt 信号分子与相应受体结合后,能活化 Disheveled 酶,抑制糖原合成酶 Gsk-3 β 作用, β -连环蛋白能顺利进入细胞核内,并与 LEF-1/TCF 转录因子相互作用,启动 Wnt 目的基因表达。有研究发现 Wnt 信号通路在维持 HSC 自我更新发挥重要作用,阻断 Wnt 信号通路能抑制 HSC 生长及降低 HSC 免疫造血重建能力;进一步研究发现活化 Wnt 信号还能提高 HoxB4、Notch1 及 Hes-1 等表达,协同发挥维持 HSC 自我更新的功能。Wnt 蛋白是一类分泌型脂质糖蛋白,目前已能被纯化分离,并在实验中被证实是 HSC 生长因子,能使 HSC 保持自我更新的能力。

Notch 信号途径:研究表明 Notch 配体和受体在造血系统中广泛表达,并在 HSC 自我更新的调控中发挥重要作用。有学者应用 MSCV 逆转录病毒载体将持续激活型的 Notch1 导入 RAG-1/-小鼠骨髓 HSC 中,分选转基因细胞进行骨髓移植观察 Notch1 表达及对 HSC 自我更新能力的影响,结果表明 Notch1 表达在体内可增强 HSC 自我更新能力;同时在体外培养结果中证明 Notch1 表达可抑制造血干/祖细胞的分化,逆转录病毒载体介导的 Notch1 在 HSC 表达可促使干细胞在 SCF、Flt-3、IL-6、IL-11 的培养基中持续存活并形成多能干细胞系。另外还有研究表明完整的 Notch 信号在 Wnt 信号传导通路中是必不可少的。

除 Wnt、Notch 信号通路外,还有 P21、Bmi-1 等信号传导通路共同协调维持 HSC 自我更新和未分化状态。Trowbridge 等学者在动物骨髓移植实验中表明,应用 Gsk-3 抑制剂能明显增加宿主 HSC 数量,促进宿主免疫及造血重建,并证实 Gsk-3 抑制剂通过修饰 Wnt、Hedgehog 及 Notch 等信号传导途径而协同调控 HSC 造血生成。此外,还有研究表明在骨髓低氧的微环境中,ATM 基因扮演重要角色。Ito 等研究研究表明 ATM-/-基

因敲除的动物表现为骨髓衰竭和 HSC 功能缺陷,进一步研究发现 ATM^{-/-}基因敲除能引起活性氧簇基因表达,损伤 HSC 自我更新的功能;当应用抗氧化因子时能修正 HSC 的功能,说明 HSC 适应于骨髓低氧的微环境,ATM 基因在维持 HSC 自我更新发挥重要作用。

(二) HSC 的主要表面标记

1. CD34⁺ CD34 被认为是 HSC 的一种重要标记。借助流式细胞仪从人骨髓细胞中分离 CD34⁺ 细胞群,在体外与造血因子共同培养,可获得各类血细胞的混合集落,由此证明 CD34⁺ 细胞为原始 HSC。CD34⁺ 细胞占骨髓细胞的 1%~4%,另外从胎肝或脐血中也可分离得到 CD34⁺ 细胞。随 HSC 分化成熟,其表面 CD34 表达水平逐渐下降,成熟血细胞不表达 CD34。在外周血单个核细胞中,CD34⁺ 细胞占 0.01%~0.09%。

长期以来,CD34 一直被认为是 HSC 的特征性表面标记,而 CD34⁻ 细胞则被视为骨髓基质细胞。近年的研究发现,多种动物骨髓来源的 HSC 中,存在 CD34⁻ 细胞。另外,从鼠外周血中也能分离和克隆出少量 CD34⁻ HSC。已证明,这些 CD34⁻ 细胞的形态学特征类似于成纤维细胞,并具有 HSC 的特征性表型(如 Sca-1⁺、c-kit⁺、Thy-1^{low}等),属黏附生长的 HSC。CD34⁺ 细胞和 CD34⁻ 细胞可相互转换,形成“干细胞循环”。此两类细胞均可存于骨髓或外周血中,目前认为最早期的 HSC 可能是 CD34⁻ 细胞,其分化为 CD34⁺ 细胞,然后分化为造血祖细胞。

2. CD117⁺ (Kit) CD117 即干细胞生长因子受体(SCFR),属于含酪氨酸激酶结构的生长因子受体,其胞膜外区结构属于 IgSF。CD117⁺ 细胞占骨髓细胞的 1%~4%。50%~70%的 CD117⁺ 骨髓细胞表达 CD34,约 60%~75%的 CD34⁺ HSC 同时表达 CD117。CD117 也表达于人肥大细胞和急性髓样白血病细胞表面。SCF 通过与 CD117 结合发挥促进 HSC 增殖分化的作用。在早期的造血细胞表面,CD117 密度较低,随着分化发育而密度逐渐增加,至祖细胞阶段 CD117 密度达最高,而随着向终末成熟细胞分化,CD117 表达又逐渐下降。

3. AC133 抗原 AC133 是一种新的造血干/祖细胞标志物,AC133 分子为 120kD 的糖蛋白,选择性表达于人胎肝、骨髓和外周血 CD34⁺ 造血干/祖细胞表面,认为 AC133⁺ 细胞群含有比 CD34⁺ 细胞群更多的早期造血细胞,再植效率更高,而且与白血病和上皮细胞关系密切。

4. 胸腺抗原-1 (Thy-1,CD90) Thy-1 抗原作为 HSC 比 CD34 分子出现得早,Thy-1 是细胞表面 I 型糖蛋白连接分子,表达在早期造血细胞表面,与细胞间黏附有关,介导负增殖信号,抑制细胞的增殖分化。CD34⁺ Thy-1⁺ 细胞约占 CD34⁺ 细胞群的 0.1%~0.5%,具有高度自我更新和多向分化潜能,可利用它进行 HSC 的筛选。

5. 其他表型特征 实验研究证明,在 HSC 分化发育的不同阶段,其表型特征会发生改变。①HLA-DR:人 HSC 通常被定义为 CD34⁺ DR⁻ lin⁻,其继续分化为 CD34⁺ DR⁺ lin⁻,故 HLA-DR 可能是 HSC 分化的重要标记。DR⁺ HSC 能分化为所有血细胞系,仍属干细胞。②CD38:也是干细胞的分化标记之一。CD34⁺ 细胞可分化为 CD34⁺ CD38⁻ 和 CD34⁺ CD38⁺ 两个亚群,前者更为原始。CD38 的表达可拥有判断 HSC 的分化程度,也可用于分离 HSC。③CD45:CD34⁺ 细胞通常表达白细胞共同抗原,早期 HSC 以表达 CD45RO 为主。④其他谱系特征性标记:HSC 不表达 CD3、CD4、CD14、CD16、CD19、

CD41、CD56 等表面标记属于谱系阴性(Lin⁻)细胞,据此可鉴别和分离 HSC。

(三) HSC 的检测方法

由于具有自我更新和多向分化这两个基本特点,所以在判定时必须同时满足这两个条件,需要所用的方法能够同时反映这两个指标。体内长期多系重建造血研究是判断 HSC 最直接、最可靠的方法,对动物较为方便,而对人 HSC 的研究则在很大程度上需要通过体外测试间接反映。目前主要通过功能实验来检测 HSC。

1. 脾结节形成单位(CFU-S)测定法 只适用于啮齿类动物,是检测小鼠 HSC 的经典方法。其测定小鼠 HSC 在脾脏定居和形成集落的能力。给受致死剂量照射的小鼠输入同种骨髓细胞,在第 8 天和第 14 天计数小鼠脾脏表面的集落。每一个集落均是由一个 HSC 增殖分化来的,而且输入的骨髓细胞数与生成的脾结节具有良好的线性关系。通常第 14 天的 CFU-S 比第 8 天更原始。

2. 长期重建实验和骨髓再植测试 长期重建实验(long-term reconstituting assay, LTRA)和骨髓再植测试(marrow repopulating assay, MRA),是将 HSC 输注给受致死剂量照射的小鼠或 SCID 小鼠,观察各系的长期造血重建或骨髓再植重建髓系造血的情况。具有长期多系造血重建能力的细胞成为长期重建细胞(long-term reconstituting cell, LTRC),而具有定居于受照小鼠骨髓并重建髓系造血能力的细胞称为骨髓再植能力细胞,其比 LTRC 成熟但早于 12 天的 CFU-S。有实验证实,LTRC 是一种比 CFU-S 更早的 HSC。由于人的 HSC 可植入 SCID 小鼠,所以用 SCID 小鼠移植通常用来检测人的 HSC。但其对检测人的 HSC 活性存在一些限制,因这些小鼠在 12 个月内死亡而且长期观察及次级移植实验有一定难度。另外,其淋巴器官缺陷,在 SCID 小鼠体内人造血细胞向淋巴系分化受到影响。由于这些限制,确切地将这种细胞称为 SCID 小鼠再植细胞(SCID repopulating cell, SRC)。如果在 SCID 小鼠体内植入人的胚胎期胸腺组织制成 SCID-hu 模型后再进行 HSC 的移植,便可以弥补 SCID 小鼠不能观察淋巴系造血重建的缺陷。

(1) 胎羊宫内移植模型:在人 HSC 检测的动物模型中,最为可靠的是绵羊子宫内胎羊移植系统。该系统是在胎羊免疫系统发育前于子宫内将人的造血细胞植入绵羊的胚胎,在绵羊出生后,通过追踪其体内人的造血细胞及其各系的分布来判断移植的细胞是否具有长期重建多系造血的能力。这一系统不仅能进行长期观察,而且可进行次级受者移植研究。

(2) 竞争性再植实验(competitive repopulating assay):是一种相对定量检测 LTRC 的方法,它是将带有不同遗传学标志的两种 HSC 同时输注给经致死剂量照射的小鼠,在这种情况下,成熟细胞含量高或 HSC 存在某种缺陷的群体将会受到抑制,从而观察不同来源 HSC 的长期造血重建能力的差别以及某些因素对 HSC 造血重建能力的影响。这种具有长期重建造血能力的细胞称为竞争性再植单位(competitive repopulating unit, CRU)。

3. 体外克隆实验 通过模拟体内的造血环境和造血过程可在体外观察 HSC 的增殖和分化,从而判断细胞是否具有产生造血祖细胞并分化为多个造血细胞系的能力,进而间接反映 HSC 的存在。目前用来检测 HSC 和早期造血祖细胞的体外克隆实验包括:

(1) 长期培养启动细胞 LIC-IC 实验(long-term culture initiating cells, LTC-IC):指

在骨髓基质细胞的支持下生长 35~60 天所产生的集落。

(2)延长的长期培养启动细胞 LIC-IC 实验(extended long-term culture initiating cells,ELTC-IC):指生长 60~100 天所产生的集落。

(3)高增殖潜能集落形成细胞实验 HPP-CFC(high proliferative potential colony forming cell,HPP-CFC):指在体外半固体培养 10~12 天后形成的大集落,其在体内对细胞毒药物 5-FU 不敏感,具有向髓系和淋巴系分化的潜能,对多种细胞因子有反应性。

(4)卵石样区域形成细胞实验 CAFC(cobblestone area-forming cell,CAFC):是一种基于 Dexter 体系的微型基质依赖骨髓培养法,它是将骨髓细胞接种于受致死剂量照射的基质细胞层上培养 10~28 天,观察卵石样造血区域形成情况。

(5)原始细胞集落形成细胞测试 CFC-BI(blast colony forming cell,CFC-BI):是一种早期造血细胞,其在体外适当的条件下半固体培养 18~32 天后,形成由形态上未分化细胞组成的小集落(大于 25 个细胞)。这种细胞具有高度再克隆能力和自我更新潜能,并有生多系定向祖细胞的能力,其在分化程度上相当于 HPP-CFC 或更早。

(6)混合集落培养法 CFU-Mix(colony forming unit-mix)和(CFU-GEMM,colony forming unit-granulocyte,erythrocyte,macrophage,megakaryocyte):是半固体培养 12~16 天后形成的含有粒、红、巨噬和巨核多个造血细胞系列的集落。这些细胞大致相当于较晚期的 CFU-S,比 LTRC 成熟。

虽然各种体外实验可部分反映 HSC 的情况,但当前的各种体外检测方法均无法观察 HSC 向淋巴系的分化,即无法判断这些细胞是否具有全系造血能力,因此至今仍没有一个体外培养方法可用于检测 HSC。

四、造血干细胞与白血病干细胞

在正常造血生成调控下 HSC 可分化为各种造血细胞,然而当 HSC 或 HPC 发生变异时则会引起病态造血。1997 年 Bonnet 等首次从白血病患者骨髓中分离得白血病干细胞(Leukemia stem cell,LSC),开创了肿瘤干细胞的研究。研究表明 LSC 与 HSC 有许多相似之处,LSC 也具有自我更新的能力,能分化为肿瘤细胞,将 LSC 移植到 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠可产生白血病样细胞。白血病性干细胞与正常 HSC 的表型特征非常相似,因而很难以此区分正常与白血病性干细胞。最近已有小宗病例研究发现 Thy-1(CD90)抗原表达与正常干细胞高度相关,而白血病性干细胞主要富集于 CD34⁺Thy-1⁻细胞层。此外,Jordan 等的初步研究发现 IL-3 受体 α 链(IL-3R α 或 CD123)是 AML 白血病性干细胞的一个独特的表型标志,是否可据此来鉴别正常和白血病干细胞尚有待大系列病例研究进一步证实。

目前认为 LSC 起源于 HSC 或 HPC(图 1-2)。LSC 产生机制涉及 HSC 自我更新的信号转导通路,研究表明 Notch 信号或 HOX 基因表达的改变均可促使 HSC 向 LSC 转化。动物实验和临床研究均发现 T-ALL 的细胞信号通路 Notch1 发生突变,影响细胞内 Notch1 分子释放和降解,从而增强 Notch 信号的活化,使骨髓内造血细胞持续增殖和高度自我更新而导致 T-ALL。此外,HOX 家族基因改变如 HOX11 基因高表达或 HOX 基因易位融合等都可引起白血病发生。正确区分 HSC 与 LSC 对临床治疗有重要指导意义,Guzman 等研究发现 LSC 表达抗凋亡因子 NK- κ B,而正常 HSC 无此表达,在体外应

用 NK- κ B 抑制剂可引起 LSC 凋亡。最近 Zhang 和 Yilmaz 等研究发现 HSC 的稳定性依赖于磷酸酯酶 PTEN 作用,而 PTEN 突变与白血病发生有密切联系,应用药物雷帕霉素(Rapamycin)可选择性清除 LSC 而不影响 HSC。

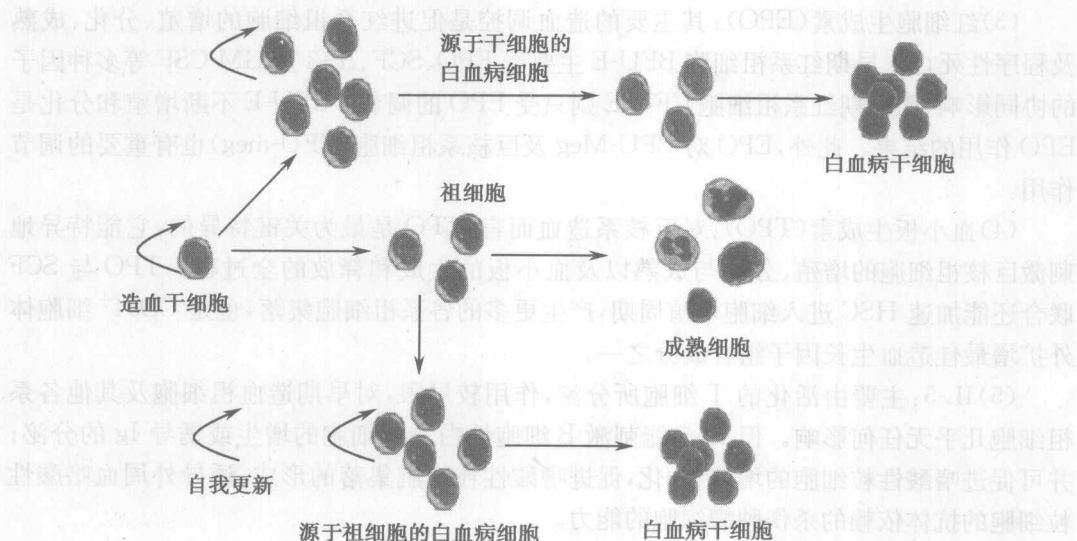


图 1-2 白血病干细胞起源于造血干细胞或造血祖细胞

五、造血干细胞调控因子

HSC 的存活、增殖、分化、成熟及程序性死亡的调控是依赖于多种正、负造血因子的相互作用与制约来维持。调控造血干/祖细胞增殖分化的环境称为造血微环境,包括巨噬、网状、内皮、含脂、成纤维及肥大细胞等间质细胞或称为基质细胞,还有数量更多的成熟细胞,如粒、单核、淋巴细胞及血小板,都与造血干/祖细胞之间有生物信号联络,并分泌各种细胞因子,对 HSC 起调控作用。HSC 调控因子分为生长因子和负调控因子。

(一) 造血干细胞生长因子

1. 系列特异的造血生长因子 主要有 G-CSF、M-CSF、EPO、TPO 和 IL-5。

(1) 粒细胞集落刺激因子(G-CSF):是系列特异性较强的集落刺激因子,其最主要的造血调控作用是能特异性促使 CFU-GM 向 CFU-G 分化,对粒系祖细胞的增殖、分化成熟及功能活化全过程均有重要的调控作用。由于 G-CSF 还具有促使 HSC/HPC 处于 G_0 期的进入细胞周期以及缩短 HSC/HPC 在 G_0 期的期限,因此 G-CSF 是 $CD34^+$ 细胞体外扩增所需造血生长因子重要组合成员之一。G-CSF 已在临床广泛应用,能有效促进放、化疗后的造血恢复,以及造血细胞体内动员。

(2) 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF):又称集落刺激因子-1(CSF-1),在骨髓细胞体外琼脂培养中可以诱导生成单核-巨噬细胞集落。促进和维持单核-巨噬细胞的增殖和分化。M-CSF 是有双硫键连接的双链糖蛋白,相对分子量为 47 000~76 000。在 M-CSF 的基因中含有 6 个外显子,由于这些外显子和 3' 非编码区的不同剪接,在基因转录中可以生成几个 RNA,导致生成由 256 氨基酸(AA)和 544AA 以及含有 32AA 信号肽构成的两