



生命科学前沿及应用生物技术

干细胞移植 ——机理与临床

(德) A. D. 霍 (美) R. 霍夫曼 (美) E. D. 赞贾尼 编著
吴 际 主译



科学出版社

生命科学前沿及应用生物技术大系·典藏版

干细胞移植——机理与临床

〔德〕A.D.霍

〔美〕R.霍夫曼

〔美〕E.D.赞贾尼

编著

吴 际

主译

科 学 出 版 社

北 京

图字：01-2007-5845 号

内 容 简 介

应用生物技术大系和现代生命科学前沿系列图书分别被列为“十一五”和“十二五”国家重点图书出版规划项目。本丛书针对生命科学领域前沿重点发展方向以及应用生物技术领域的新成果、新思路、新方法和新技术，全面展示了其最新的发展动态，涵盖了基础理论和主要技术方法，呈现了新的概念与理论、技术，在更深层次上阐明了生命的本质规律，给人们提供了新的认识生命本质的手段，也为生物技术服务于人类开辟了新的途径。涉及领域包括生物医药、干细胞技术、工业微生物学、蛋白质及蛋白质组、系统生物学、合成生物学、生物材料、农业生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、生物资源与安全等。

Originally published in the English language by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany, under the title “stem cell transplantation”.

Copyright © 2006 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

图书在版编目(CIP)数据

生命科学前沿及应用生物技术大系：典藏版/舒红兵等编著. —北京：科学出版社, 2016

ISBN 978-7-03-047487-2

I. ①现… II. ①舒… III. ①生命科学—研究②生物工程—研究 IV. ①Q1-0②Q819

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043876 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：2108

字数：49 985 000

定价：8900.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

《干细胞移植——机理与临床》译者名单

主 译：吴 际

副 主 译：郭光明

参译人员：吴 际 郭光明 闫晓梅 杨金娥
施凌峻 侯若愚 孙旻尧 杨兆娟
张 永 邹 康 俞庆生 原 喆
熊 集

前言

1998 年，人类胚胎干细胞系的建立激起了人们对干细胞研究持续不断的热情，与此同时也出现了不少争议。在器官移植中，干细胞技术为组织工程打开了一条新的途径。在生物医学的研究历史上从没有某一科学发现能像干细胞这样在世界范围产生如此巨大的反响。干细胞可以和人类很久以来一直追求的“青春泉”相媲美。甚至可以想象，通过干细胞研究或许可以为再生医学提供各种损伤器官的替代部分。

尽管全世界范围内对干细胞研究的热情和努力不减，但是许多关于干细胞的基础问题还有待阐明。对于胚胎干细胞，除了长久以来的伦理学争论外，它的致肿瘤问题、宿主免疫排斥问题和培养过程中病原物传染问题都是不小的挑战。对于成体干细胞，早期实验显示其具有可塑性潜能的结论受到严重挑战，其中一些实验不具有可重复性，还有一些实验显示细胞核融合或者细胞融合是其发生转分化的主要原因。另外，成体干细胞即使能够被鉴定出来，如此少量的细胞也不具有临床上的意义。

然而来源于成体骨髓的干细胞（如造血干细胞）在治疗白血病和遗传性免疫缺陷疾病的临床实践中已应用了近 40 年。同时血液干细胞移植已经从实验性治疗逐渐提高到对抗特定类型的疾病（如髓系和淋巴系细胞扩增紊乱）的标准化治疗。这方面的进展是递增的，包括了许许多多研究团队的贡献，这说明干细胞研究需要相当的资源、投入和团队合作。

为把干细胞应用到再生医学的临床实践中，我们需要深入了解干细胞再生的基本原理和决定其自我更新或分化的调节机制。未来几年的研究应该集中到干细胞的“干性”（stemness）和分化决定过程中的细胞和分子机制上。只有对这些基本机制有了深入的了解，我们才可能获得操控干细胞命运的能力。本书是对干细胞移植前沿的总括，将会涉及以上提到的这些挑战。

第一部分，主要介绍干细胞的基础知识及其在临床应用上的潜能，然后介绍造血干细胞命运的表现遗传控制机制以及 microRNA 对干细胞生物学和临床医学的影响。

第二部分，主要介绍干细胞制备的标准化和质量保证，包括准确了解基于 SDF-1 α /CXCR4 途径的从骨髓和脐带血中分离的干细胞新动员机制以及造血干细胞遗传操作相关的问题和挑战。

第三部分，主要介绍了干细胞初步临床应用的策略，包括用于测试人类骨髓来源干细胞可塑性的大动物模型、研究转分化的鼠类囊胚模型、测试 MAPC 潜

能的动物模型和作为基因靶向运输载体的间充质干细胞。

最后 4 章介绍了成体干细胞在临床试验中的新策略。第 15 章详细阐述了间充质干细胞特殊的免疫调节作用。第 14 章和 16 章总结了血液系统肿瘤的过继免疫治疗的临床实践应用。

A . D . Ho

R . Hoffman

E . D . Zanjani

Heidelberg , Chicago , Reno , April 2006

目 录

前言

第一部分 干细胞生物学

1 干细胞的临床应用潜能：希望与否？	3
1.1 绪论	3
1.2 什么是干细胞	3
1.3 干细胞和再生	4
1.4 成体和胚胎干细胞	5
1.5 造血干细胞	6
1.6 成体干细胞的转分化	7
1.7 成体干细胞的可塑性：纯属夸大，毫无希望？	8
1.8 两种文化的对抗：胚胎干细胞 vs 成体干细胞	9
1.9 干细胞技术面临的挑战	10
1.10 自我更新 vs 分化的调控，不对称分裂	11
1.11 原始 HSC 的基因型和表达谱	13
1.12 干细胞特性的维持：HSC 和细胞微环境之间的相互作用	14
1.13 间充质干细胞	14
1.14 初步的临床研究	16
1.15 结论和未来展望	16
2 染色质修饰剂改变造血干细胞的分化命运	24
2.1 绪论	24
2.2 5-杂氮胞苷及其类似物的细胞毒性/抗肿瘤的活性与低甲基化效应	26
2.3 5-azaD/TSA 处理改变 HSC 的命运	26
2.4 5-azaD/TSA 的作用是由其细胞毒性产生的吗？	28
2.5 丙戊酸处理 HSC	29
2.6 用染色质修饰试剂进行 HSC 体外扩增	29
2.7 染色质修饰试剂处理细胞后基因表达的再激活	30
2.8 染色质修饰试剂改变非造血命运	31
2.9 染色质修饰试剂处理细胞的安全性和毒性	31
2.10 结论	32

3	microRNA 对干细胞生物学和医学的持续增长的影响	39
3.1	绪论	39
3.2	miRNA 生物合成	40
3.3	miRNA 的作用模式	42
3.4	miRNA 的潜在功能模式	44
3.5	结论	46

第二部分 干细胞制备的标准化和质量保证

4	造血干细胞动员的新策略	55
4.1	血液干细胞动员的生理学	55
4.2	PBPC 动员的新试剂	60
5	脐带血来源的多能干细胞	70
5.1	脐带血作为干细胞来源的生物学优点	70
5.2	脐带血来源多能干细胞 (USSC) 的制备和扩增	71
5.3	其他多能非造血干细胞: 脐带血和脐带血组织中的间充质细胞	79
5.4	结论: 展望脐带血非造血细胞的再生能力	80
6	生产质量管理规范: 间充质干细胞的临床规模化生产	85
6.1	绪论	85
6.2	临床规模化 MSC 生产的先决条件	86
6.3	临床规模的生产: 法国实验	90
6.4	QA 和 QC	91
6.5	前景	93
7	标记造血干细胞的克隆活性	99
7.1	绪论	99
7.2	基因标记 HSC 体内克隆活性的特点	99
7.3	逆转录病毒整合位点分析	100
7.4	动物模型与人类基因治疗试验中的克隆性分析	100
7.5	逆转录病毒整合位点及其转基因表达与独立转导 HSC 克隆活性间的相互作用	104
7.6	临床干预影响标记 HSC 克隆活性	105
7.7	展望	106

第三部分 临床应用的开端

8	用于研究人干细胞可塑性的非损伤性大型动物模型	113
8.1	绪论	113
8.2	胎羊模型的独特性	115
8.3	胎羊模型中人细胞的分化潜能	117

9 鼠囊胚注射后成体干细胞的分化潜能	125
9.1 绪论	125
9.2 神经球细胞在注射入早期胚胎后产生红细胞样细胞	126
9.3 人脐带血衍生造血干细胞的造血嵌合性	129
9.4 向囊胚中注射白血病细胞	130
9.5 讨论	132
10 动物模型中多能成体祖细胞的潜能测试	138
10.1 绪论	138
10.2 MAPC 的特性	138
10.3 MAPC 的体外分化潜能	140
10.4 MAPC 的体内分化潜能	141
10.5 MAPC 现象的机制	142
10.6 结论	143
11 间充质干细胞作为肿瘤治疗的基因靶向运送载体	147
11.1 绪论	147
11.2 肿瘤基质及其组分	148
11.3 肿瘤进程中肿瘤与基质之间相互作用的意义	150
11.4 MSC 在肿瘤与伤口愈合情况中的导向性的相似性	151
11.5 MSC 用作细胞运载工具的基本原理	152
11.6 发展基于 MSC 的运载工具的困难之处	155
11.7 结论	156
第四部分 临床试验	
12 用于心脏再生的内皮祖细胞	169
12.1 内皮祖细胞的特征	169
12.2 EPC 改善心脏功能的作用	171
12.3 归巢机理	173
12.4 临床研究结果	175
13 干细胞与促进心肌和血管再生的旁路移植	185
13.1 绪论	185
13.2 冠状动脉病	185
13.3 CABG 手术的适应证	187
13.4 进行 CABG 细胞治疗的理论依据	189
13.5 骨髓细胞的作用	189
13.6 (干)细胞治疗和 CABG 手术的结合	193
13.7 展望	201

14 过继免疫疗法：指导方案与临床实践	206
14.1 绪论.....	206
14.2 动物实验.....	206
14.3 对 CML 患者进行 DLT 的最早的临床试验结果	207
14.4 EBMT 研究	207
14.5 移植物抗白血病效应.....	209
14.6 细胞因子.....	209
14.7 双特异性抗体.....	211
14.8 NK 细胞、NK-T 细胞和 HLA-单倍体相合移植	212
14.9 对嵌合体过继免疫疗法的展望.....	213
15 人 MSC 介导的免疫逃逸和免疫抑制	216
15.1 绪论.....	216
15.2 MSC 逃过免疫系统监视	217
15.3 MSC 引发的免疫抑制	218
15.4 临床 MSC 应用	222
16 干细胞移植：成功细胞免疫疗法的基础	230
16.1 绪论.....	230
16.2 异基因干细胞移植在 CLL 治疗中的应用	230
16.3 CLL 治疗中的移植物抗白血病效应	231
16.4 CLL 治疗中的低强度预处理后进行 allo-SCT	232
16.5 来自无关联供体的 RICT	234
16.6 T 细胞清除.....	234
16.7 allo-SCT 在滤泡性淋巴瘤治疗中的应用	235
16.8 allo-SCT 在 Waldenström 巨球蛋白血症治疗中的应用	237
16.9 结论与展望.....	239

第一部分

干细胞生物学

1

干细胞的临床应用潜能：希望与否？

Anthony D. Ho and Wolfgang Wagner

1.1 绪论

当前，人们对干细胞研究的热情和争议起始于 2 个关键的突破：①1997 年 Ian Wilmut, Keith Campbell 及其合作者成功培育出克隆羊 “Dolly”^[1]；②1998 年 James Thomson 成功建立了人的胚胎干细胞（ESC）系^[2]。这些新技术的出现无疑为组织工程和器官移植开辟了新的途径^[3]。在生物医学的研究历史上从未出现某一科学的发现能在世界范围产生如此巨大的冲击。使人体再生甚至更换缺陷的器官或组织是人类百年的梦想。干细胞具有能分化出机体所有特定类型的细胞和组织的潜能，因此可以和人类很久以来一直追求的“青春泉”相媲美。最近使用成体和胚胎干细胞作为起始细胞群的研究，让我们推测使用这样的“原材料”或许可以为再生医学生产各种替代的部分。许多年龄相关的退行性紊乱疾病例如心脏病、帕金森病、糖尿病和中风等很有希望在未来某一天通过干细胞治疗治愈。

1.2 什么是干细胞

所有的生命形式都起始于一个干细胞，可以定义为具有自我更新和产生祖细胞以及生物体中不同类型细胞的双重能力的一种细胞。例如，在人生命的起始阶段，一个受精卵（合子）变成 2 个细胞，2 个再变成 4 个细胞^[4]。在这些早期阶段，每个细胞或许仍然具有全能性，也就是说这些细胞每一个都可以单独发育成一个生物个体。在 5~7 天内，约 40 个细胞形成内细胞团，外层的细胞将来发育成胎盘。这个时期的内细胞团的每一个细胞都具有产生包括生殖细胞在内的所有组织类型和器官的能力，即这些细胞都具有多能性（图 1.1）。内细胞团的细胞最终将产生组成人体的 10^{13} 个细胞，其中有 200 多种分化的不同类型细胞^[5]。在胎儿发育过程中可以产生许多非生殖的、组织特异性的或成体干细胞。相比多能胚胎干细胞这些细胞只具有有限的分化能力，也就是说它们具有多向分化性，能

产生多种不同类型的细胞系。这些成体干细胞持续在个体的一生中以不同的程度存在相应的器官中。

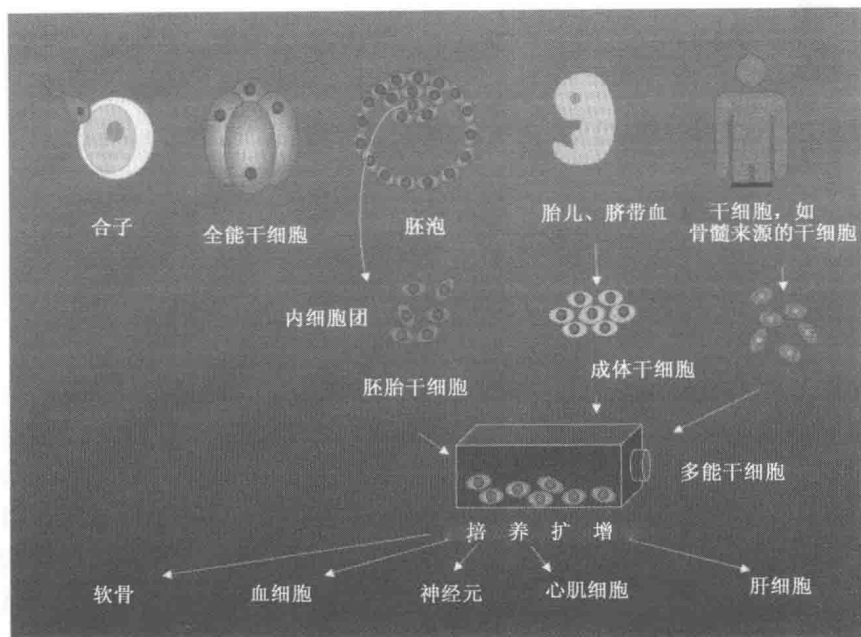


图 1.1 胚胎干细胞和成体干细胞的来源

1.3 干细胞和再生

低等生物具有惊人的再生能力，而哺乳动物特别是人类缺乏这种再生能力^[6]。涡虫在切去头的 5 天内可以再生一个新的头。水螅是一种终生吸附在岩石上的小管状淡水动物，当身体被切成 2 部分后可以在 7~10 天内产生 2 个新的个体。蝾螈在被猎食者伤害损失一条腿或者尾巴后可以在几天内重新长出新的肢体和尾巴。

哺乳动物在进化的过程中付出了巨大代价，丧失了相当的再生能力。这些具有再生能力的动物或者体内拥有大量的干细胞，或者可以根据需要把特定类型的细胞转变为干细胞。例如，估计涡虫体内至少有超过 20% 的细胞是干细胞，而水螅是一个“永恒的胚胎”^[6]。蝾螈则利用另一种完全不同的机制，当需要一个新的肢体和尾巴时，它们可以把已经分化成熟的细胞重新转变回一个胚胎样的未分化的细胞。这些细胞然后聚集在受伤的器官处组成一个芽基，进一步再生出受损的部分。理解干细胞自我更新、分裂、增殖然后分化并再生出损坏组织过程

的分子机制对再生医学的发展是十分关键的。

在一定程度上，人类可以更新一些类型的组织，如皮肤和骨髓，但是再生能力都很低。这些器官的再生能力与器官里存在充足数量的干细胞有关，即皮肤里的表皮干细胞和骨髓里的造血干细胞（HSC）（图 1.2）。并且皮肤和骨髓的再生能力随年龄增加而下降^[7,8]。理解 ESC 如何分化出各种类型的组织和成体干细胞如何被诱导并替换受损组织的机制对于许多年龄相关的退行性紊乱组织损伤的细胞替代治疗研究具有重要的意义。

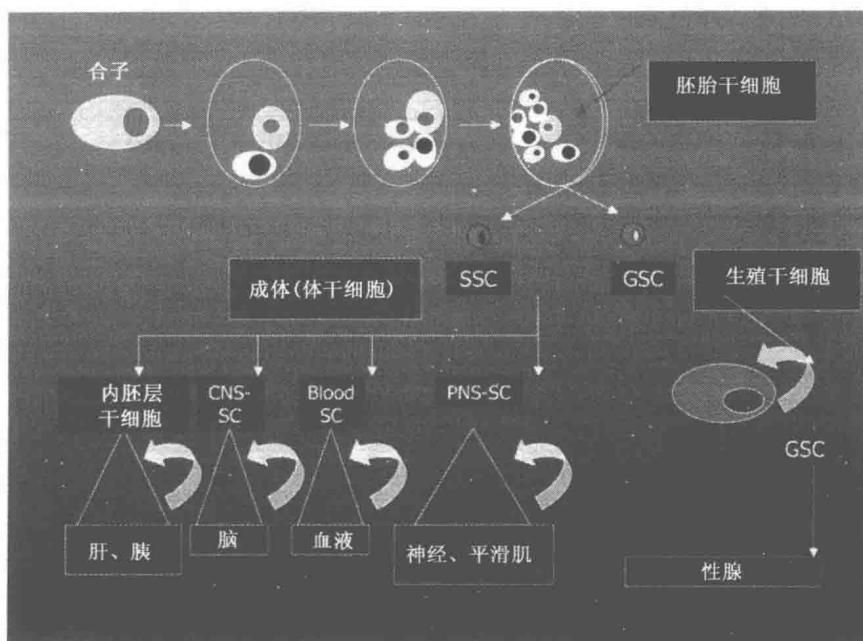


图 1.2 胚胎干细胞具有多能性，来自于 5~7 天的胚胎。多能干细胞也可以来自生殖干细胞（GSC）和一些体（成体）干细胞（SSC）。胚胎发育过程中组织特异干细胞可以产生组成特定功能器官的分化成熟的细胞。（注：CNS-SC 为中枢神经系统干细胞；Blood SC 为血液干细胞；PNS-SC 为外周神经系统干细胞）

1.4 成体和胚胎干细胞

1998 年，James Thomes 研究组报道了人胚胎干细胞系的建立。用于研究的人 ES 细胞主要是从体外受精培养的胚胎里提取的。受精后 5~7 天，组成内细胞团的 40 多个细胞被转移到一个铺有饲养层细胞的培养器皿中，经过几个月的培养和重新铺板，这些细胞还维持着自我更新的能力而不分化成特定的分化细

胞。这样就建立了理论上可以永久复制的 ESC 系^[9~11]。因此 ESC 几乎可以无限期地保持分化形成机体几乎所有类型细胞的能力。

如前所述,成熟的机体内的一些组织和器官里存在少量的成体或体干细胞^[12~14]。这样的成体干细胞(ASC)具有再生它们相应源组织的能力。例如造血干细胞(HSC)在机体的整个生命过程中持续不断地更新循环血液细胞和免疫系统细胞。最近许多研究者利用动物模型发现 ASC 可能具有 ESC 所具有的发育潜能^[14]。更近的报道则对以前实验结果的解释提出了质疑,认为 ASC 具有“可塑性”或者“转分化”潜能并不可信^[15~18]。因此 ASC 在机体一生中可以再生它们的源组织,而 ESC 则可以在相当长的体外培养下持续具有再生成年机体中几乎所有类型细胞的能力。ESC 似乎显示出无限制的生长和分化潜能。然而使用 ESC 来源的细胞进行移植治疗具有危险性,在伦理上也存在争议。在动物实验研究中未分化的 ESC 在移植后可以产生畸胎瘤,并且表现出表观遗传的不稳定性。用诱导未成熟 ESC 沿一定途径分化的培养条件对其进行预培养后再进行移植或许可以减少肿瘤发生的危险。动物实验中也发现只有经历特定分化阶段后的供体 ESC 才能被完全成熟的动物个体接受。在移植前 ESC 必须先被引导向一预先设定的分化途径。这样的诱导培养可以产生各种不同分化阶段的细胞包括未分化的 ESC,因此在临床应用前细胞的纯化制备是必需的。

1.5 造血干细胞

干细胞的概念是由 Alexander Maximow 在 1909 年最先引入的,当时他把干细胞看作为血液中不同细胞成分的共同祖先^[19]。而过了近 60 年,直到 1963 年才由 McCullough 及其同事以确凿的证据证明了骨髓中干细胞的存在^[20,21]。他们在鼠类模型中通过一系列的实验证明,①从骨髓中分离的细胞能重建造血系统,从而挽救受到致命剂量辐射的动物生命。②连续移植实验证明了这些细胞具有自我更新的能力。把移植入受体动物脾脏后得到的细胞进行收集,并再次移植入另一受到致命剂量辐射的动物体内,从这个二级受体动物中也发现了新生的白细胞和红细胞。基于这些实验所得到的结果,造血干细胞被定义为:能自我更新,并具有向多个细胞谱系分化潜能的细胞。这一发现标志着现代干细胞研究的开始。除了以上提到的两种来源的干细胞外,其他的体干细胞直到最近几年才在一些组织(如肝脏和脑)中被发现,它们的再生能力是更为有限的^[22,23]。

第一次成功地运用骨髓移植治疗罹患遗传性免疫缺陷或急性白血病的患者的尝试进行于 20 世纪 60 年代后期^[24~27]。最初的想法是在清髓后用健康的骨髓来替换病变的骨髓。但由于缺少当今免疫学和支持治疗的知识,当时的治疗过程中其他病变的发生率和死亡率都很高^[27]。不过相较于传统的治疗手段,骨髓移植

后所得到的治疗结果仍然是振奋人心的。骨髓移植同时也被证明是某些罹患白血病和一些遗传性疾病的患者的唯一的治愈可能^[28]。骨髓移植的成功是由于在被移入的骨髓中存在着造血干细胞，它能够在清髓后重建血液和免疫系统。造血干细胞最初在骨髓中被发现，但也能通过某种刺激从外周血中得到，例如：在骨髓抑制治疗的恢复期^[29]或是在施用细胞因子后^[30,31]。通过这种方法从外周血中得到的造血干细胞或是从中分离的 $CD34^+$ 细胞群都能成功地代替骨髓在受体中重新恢复造血和免疫功能^[32,33]。根据国际骨髓移植登记处的数据，血液干细胞移植现在每年至少为 27 000 名患者提供了持久的治疗方法来治疗各种癌症、骨髓衰竭或是遗传性疾病（图 1.3）^[34]。

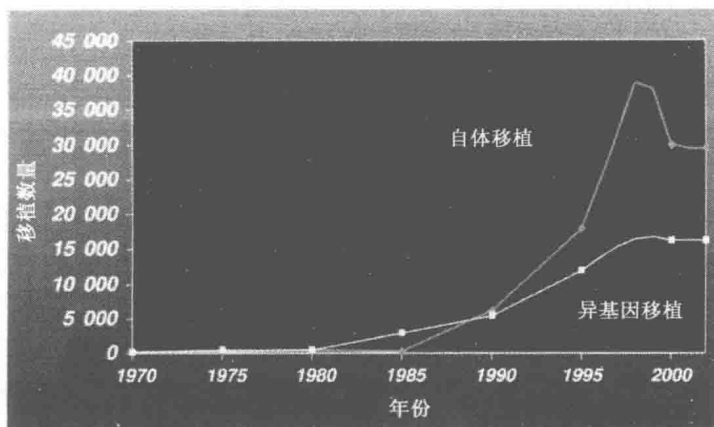


图 1.3 国际骨髓移植登记处登记的每年进行血液和骨髓移植病例的数量（1970~2002）

1.6 成体干细胞的转分化

在胚胎干细胞研究蓬勃发展的同时，众多的研究也指出成体干细胞可能表现出与胚胎干细胞同样的发育潜能。在最早进行的一项在鼠类模型中的实验里，Ferraris 等用化学方法诱导骨骼肌再生，当把未经任何处理的骨髓细胞注入骨骼肌后，他们发现骨髓细胞参与了肌肉的再生过程^[35]。而且，如果在再生完成后，用实验手段再次引起肌肉损伤，移入肌肉的骨髓细胞也会参与肌肉的修复过程。从这一研究发表以后，许多研究者都报道了小鼠骨髓中的干细胞能够转变为已分化的骨骼肌纤维，甚至心肌细胞也能通过移入循环的骨髓来源的干细胞来进行再生。Eglitis 和 Mezey^[36]的研究成果表明骨髓细胞能分化成中枢神经系统的小神经胶质细胞、星形神经胶质和神经元。从大鼠骨髓中得到的干细胞能够在人