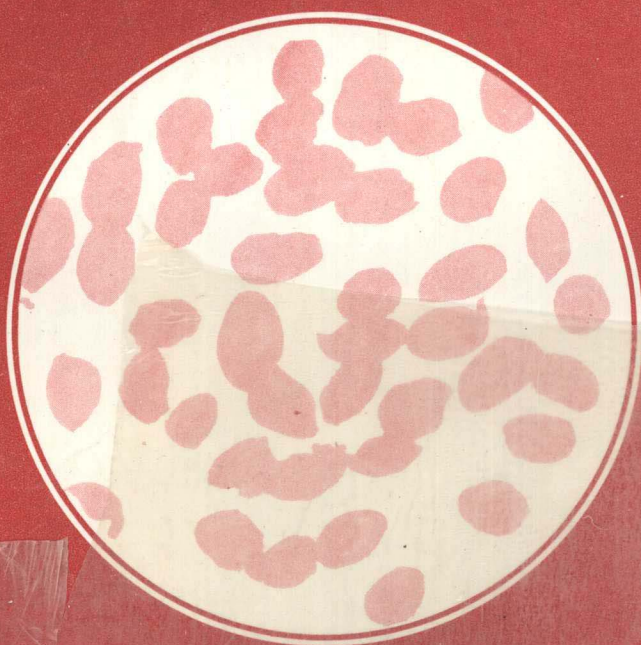


贫血 ANEMIA

张之南 殷德厚 主编



科学技术文献出版社重庆分社



ANEMIA

張之南 趙鐵厚 主編



科學出版社出版 北京 100717

贫 血

ANEMIA

张之南 殷德厚 主编

科学技术文献出版社重庆分社

第一篇 总 论

第一章 血细胞的生成

第一节 血细胞的发展史

一、血细胞的发现

在古代从受伤的部位流出红色液体，不能了解其作用，关于其机能的推测也种种不一。Harvey在17世纪已有关于血液循环系统的记载（1628），但是只记载了关于大血管部份。Malpighi（1660）发现了动脉和静脉之间还有毛细血管连接。

借助显微镜观察发现红色的血液中不只是液体还有血细胞存在。原始显微镜从13世纪即开始应用，但实际观察发现血细胞及其机能是在17世纪。上述的Malpighi和Swammerdam都没有确切的指出有红细胞的存在。Leeuwenhoek明确指出有红细胞的存在，并有红细胞大小的记载。Malpighi和Leeuwenhoek各自都对白细胞进行了观察，血小板的发现较晚，在19世纪初期Donne最早开始记载。

二、血细胞的染色和分类

关于各种血细胞的大小和机能等的研究从很早就有记载，经过很长一段时间没有进展，这主要是因为当时还没有关于血细胞的染色法，用显微镜还不能充分了解血细胞的形态。在19世纪中叶解决了关于红细胞的大小、数量和血红蛋白的浓度测定等。

对血细胞形态学贡献最大者是Ehrlich。1877年他在学生时代就用三元酸（tri-acid stain）染色进行了研究。从此开始用血液涂片干燥标本染色，可以将血细胞的核

和胞浆分开并可观察到其微细构造。以后的半个世纪渡过了血液学的形态学的基础阶段。他的主要贡献是对再生障碍性贫血的记载和巨幼红细胞的发现等。此外还有血细胞产生异常的疾病，如：真性红细胞增多症（Vaquez 1889, Schultze 1909），过氧化酶染色对粒细胞性白血病和淋巴细胞性白血病的鉴别（Schultze, 1909）等。

三、血细胞的起源

骨髓造血在很早就被注意，Neumann（1868）和Bizzozero（1868）最初开始记载。Neumann提出骨髓可以产生和胎儿红细胞相似的有核红细胞，并记载骨髓细胞数和脂肪的含量成反比。Bizzozero提出除红细胞外白细胞也从骨髓产生。

在此以前Kolliker发表了人的胎儿肝脏的有核幼红细胞可以分化为无核红细胞。Neumann和Bizzozero的学说当时受到Heym, Jolly等权威学者的激烈攻击，但约在20年后此一学说已成定论。与现在研究造血干细胞的历史相比很有意义。与此同时从卵黄囊造血逐渐向肝脏移行，转至肝脏造血的学说已被确定。

这样用Ehrlich染色可以清楚分出骨髓内的幼稚造血细胞，并记载有幼稚原始大型嗜碱性单核细胞，该氏称为Myelozyt，考虑是粒细胞的祖先。此外还有与此完全不同的系统，从淋巴组织产生的淋巴细胞，这大概是先人关于血细胞系统最早记载。继Ehrlich染色法之后，改进的Romanowsky

染色法，可以检查出嗜酸性细胞。不久又在各类细胞相互之间类似点中进行了探索。已经明瞭幼稚的单核细胞的祖先，将此种细胞命名为淋巴样细胞(Lymphoidzyt)或成血细胞。考虑这可能是多能性(totipotent)干细胞的存在一元论学说的开始，关于这一血细胞起源议论，各权威学者的态度多数表示暧昧。

关于血细胞的起源，从另外的立场对胚胎期造血的研究做出了很大的贡献。1892年Vanderstrich提出红细胞由血管内产生。在1907~1910年Maximow和Dantschakoff都承认了这一学说，大概是从胚胎间叶产生的没有未分化特征的细胞，此种未分化的细胞和淋巴细胞很难区别，认为此两种细胞为同一来源，因此提倡血细胞一元论学说。

另一方Naegeli于1900年以来发表了支持Ehrlich学说，其论点是原始粒细胞和原始淋巴细胞在形态学上有所不同。此后这两派的争论自1910年一直持续到1930年。

天野主张自胚胎期开始就在各自不同的场所产生造血巢。一元论者称为一元论的原始血细胞，此种细胞在任何地方都不易发现，但主张血细胞的每个祖先细胞可以向各种细胞分化。特别是在此时Yoffey发表了对淋巴细胞就是干细胞学说进行了激烈的反驳。这些结论都是根据详细的形态学观察提出的。除此之外因为没有其它方法进行检查所限，对上述论点妥否提不出任何意见。由于先人的努力，在以后开展的实验中已经完成了关于血细胞的起源及调节机制的研究，并建立和完成了新的体系。

关于血细胞产生的机理，以实验进行研究，在20世纪50年代为最活跃。特别是其先驱者Osgood首先提出了干细胞自我复制等理论。新的实验研究并无形态学的血液学者参加，是由放射线生物学者们进行的，研究是从50年代开始，他们将动物的脾脏和骨髓保护起来，用致死量的放射线照射，动物没

有死亡，但起到和同种骨髓移植的同样效果，由此确认是由于对脾脏和骨髓细胞保护的结果。此项研究由Till和McCulloch的脾克隆法所证实。

(一) 幼红细胞的分化和红细胞生成素(erythropoietin)

在干细胞研究之前是关于红细胞系细胞的产生调节研究的最盛时期，由于红细胞含有特殊蛋白质血红蛋白(Hemoglobin, Hb)，这对形态学检查或 ^{59}Fe ^{51}Cr 等对细胞标记的应用创造了有利的条件。有人提出在高地生活的低氧状态下红细胞的产生增高，由于低氧刺激骨髓使其造血功能亢进的结果。

在半世纪前Carnot和Deflendre发表了由于注射贫血患者的血清，引起造血功能亢进。

Alpen和Cranmore给狗投与 ^{59}Fe ，标记幼红细胞，然后将此狗进行放血，于是不久在骨髓内的幼红细胞标记率下降，此时新产生的幼红细胞，与幼红细胞的形态不同而是由未标记的其它细胞产生。

Reissman用联体鼠做实验，将其中一只大白鼠造成低氧状态，与其吻合的另一只鼠(常压呼吸)可见造血亢进。Stohlman在动脉导管未闭的患者中观察，膈肌以上的氧浓度正常，膈肌下的部份呈低氧状态，此时胸骨造血亢进，支持上述学说。

特别是Borsook等学者从1954年至1955年的报告，在贫血动物血清的提取物中有促进红细胞造血物质。Carnot和Deflendre观察，此体液因子有促进红细胞的造血作用，因此命名为红细胞生成素(Erythropoietin, Epo)。Epo从肾脏分泌产生，Gordon进一步研究，提出了肝脏可分泌产生Epo的前驱物质，此前驱物质在肾脏转换为Epo的学说。此后，对Epo的作用机理继续进一步研究。

Filmanowicz等从输血致红细胞增多症的小鼠实验中发现Epo在机体内有使幼红细

胞分化的作用。

进行输血时幼红细胞由造血器官消失,此时注射Epo出现一过性幼红细胞并向成熟阶段分化。但并不是确认了Epo对幼红细胞的作用,还有人提出前驱细胞的作用,这些以后均在体外试验中被证实。

(二) 造血干细胞

在上述将动物脾脏保护后照射的实验中,预先将造血组织细胞中的DNA标记,在恢复后的细胞用放射自显影进行检查,在形态学上发现新生的血液细胞的母细胞和粒系红系的细胞不同,出现一过性的种群变化。

根据Till和McCulloch的实验证明有多能干干细胞的存在。用致死量放射线照射小鼠后,再用同系小鼠的骨髓移植,肉眼可以看到在脾脏有克隆形成,并证明各个克隆均来自一个细胞。在一个克隆中含有红细胞系,粒细胞系、巨核细胞系三个系统的血细胞。因此认为可能存在一种形态不明的,能分化为多种细胞的造血干细胞。说明这种细胞在脾脏形成克隆单位,因此命名为(Colony Forming Unit in spleen(CFU-S。))

用实验的方法检查这种细胞是完全不明瞭的,这种细胞从形态学上很难辨认。此后又用测定细胞的比重、大小,特别是用荧光细胞分辨装置(FACS)等可以区别细胞的特点。在CFU-S中可以分离大量的形态类似小淋巴细胞样的细胞,但最近对此也有不同意见。

在此Yoffey的淋巴细胞干细胞学说又被重新认识。但是在此所说的细胞仅仅是和已经分化的淋巴细胞系的细胞其外观上看相似的另外一种细胞。因为一般未分化的细胞未形成特殊蛋白质,缺乏RNA等细胞内的小器官,因此细胞浆含量少、幅度狭小,类似淋巴细胞的形态并不奇怪。

随着干细胞研究的进展,至此还有一个固定概念被推翻,即未分化的细胞也可以进

入血流中。

在此提示在CFU-S以下的幼红细胞的前驱细胞BFU-E,粒细胞巨噬细胞的前驱细胞CFU-C(或CFU-GM)等在末稍血的有核细胞分类中可被检出。但比其更成熟的幼红细胞,幼稚粒细胞等除在患病的场合以外血液中是见不到的。因此非常幼稚的未分化的血细胞的母细胞按着需要可以移动流入血液中。但是,正在进行分化的幼稚细胞,固定于各个造血器官直至成熟,不再移动。在动物实验中证明造血干细胞的存在。

Pluznik和Sachs(1965)Bradley Me-calf(1966)各自分别将骨髓细胞放入软琼脂中培养,此时对Feeder层必须加入各种细胞,已证明从这些细胞中分泌体液性的克隆刺激因子(Colony stimulating factor CSF)。以后用这种细胞的培养上清代替这种方法,至此与全系统不同的是嗜中性粒细胞和单核细胞、巨噬细胞,见于相同的克隆中,两者从同样的前驱细胞(CFU-C)产生,因此考虑两者为同系的细胞。

此后以造血干细胞为基础,较多的应用于临床和基础的研究。一方面对CSF进行了纯化,对造血因子进行了详细的研究并有所发展。数年后幼红细胞的培养克隆形成成功,特别是将幼红细胞的前驱细胞分为BFU-E和CFU-E,两个阶段已经完全明瞭。除幼红细胞系细胞的调节因子为Fpo外,还有植物血凝素(lectin)刺激淋巴细胞在其培养上清中含有Burs Promoting Activity(BPA)。

此项研究进一步发展,在一个克隆中含有幼红细胞、嗜中性粒细胞、巨核细胞的形成,这些细胞都是由含有多能干细胞的克隆分化而来的。

第二节 胚胎造血期

血细胞的生成在胚胎初期由中胚叶卵黄囊开始造血,从制造红细胞开始,接着肝脾等脏器开始造血,最后至出生时为止,移行至骨髓。

一、胚胎造血期概况

关于人的胚胎期造血经过,因为很难得到人的早期妊娠的材料,所以研究人的血细胞正确的发生过程比较困难。根据Wintrobe经过多年研究确定的学说,将胚胎期造血分为三个不同时期,血细胞首先在卵黄囊出现,随之见于肝脾,最后在骨髓,已被很多人引用见图1。

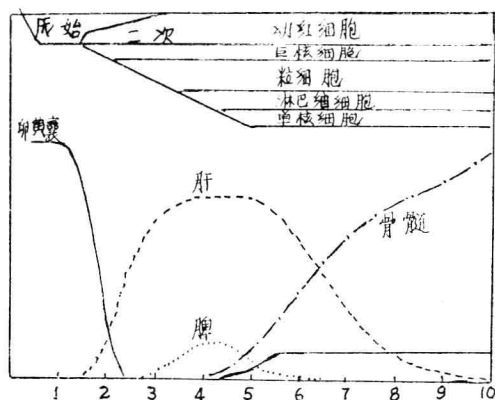


图1 胚胎期的主要造血器官

林氏根据组织学的观察,对上述记载给予修正。提出卵黄囊造血由胚胎25日开始,肝脏造血在妊娠的第40天开始,在妊娠第50天达到顶峰,第40周降至最低,骨髓造血在3.5个月时开始,出生时几乎全部移行至骨髓造血。在成人时骨髓以外造血都是异常的表现。

二、卵黄囊造血和细胞相互间的作用

(一) 卵黄囊造血和血液干细胞的发生

卵黄囊造血,只能见到红细胞,不能产生粒细胞和淋巴细胞。但是从小鼠和鸡的实验中发现在这一时期多能干细胞(CFU-S)或粒细胞巨噬细胞克隆形成细胞(CFU-C)已经存在。

在卵黄囊产生的红细胞和肝以后产生的血细胞形态不同,呈现哺乳类的巨幼样形态。

血细胞发生于卵黄囊的中胚叶层,开始是独立的幼红细胞群,其周围有内皮细胞围绕,这样构造的红细胞块称为血岛(blood island)见图2

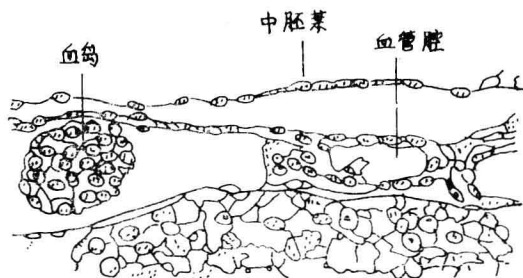


图2 卵黄囊和血岛

以后血岛依次延长融合,同时呈网状,此时心脏开始搏动和血管系统连络,开始了血液循环。对于胚胎全部发育速度如此调和,据我们现在的知识尚不能解释。

胚胎期造血的变化,过去主要是从形态学方面进行研究观察,近年来主要从血液干细胞和细胞生物学方面积累一些资料,进行分析和实验研究。

(二) 卵黄囊细胞的相互关系和造血的调节

对卵黄囊进行研究最好是采用鸟类,因为它发生的初期,其卵即可在体外进行自由的观察,可以收集大量的资料。

鸡的受精卵的胚在生出落于体外时即已经进行细胞分裂,形成了圆板状细胞集团,将此卵置于38℃孵育6~7小时后形成原条(primitive streak)。此时原条向头侧伸

出,约经18小时后达到原条完成期(defined primitive streak stage)。到此时期为止,卵黄囊已发育完成。

将胚的尾侧部分围起而形成内胚叶,中胚叶,外胚叶。

血岛是在此从尾侧的马蹄形部分的中胚叶孵育30小时后形成,红细胞的前驱细胞,已在早期被检出,将原条完成期以前的卵黄囊取出,放于琼脂培养基中培养,可以在体外详细观察血岛的形成过程。还可以进行血红蛋白染色,观察到每个幼红细胞的存在。

原条完成期将内胚叶除外,进行中胚叶、外胚叶培养,血岛形成受到显著障碍,若再将内胚叶附着进行培养,则血岛形成良好。因此在仅有内胚叶存在的场合,幼红细胞并不完全消失,经常可见有散在性红细胞(这可能是内胚叶残存一些内胚叶细胞的作用)。从卵黄囊的头侧将内胚叶切下,亦证明与其有相同的作用。将薄的内胚叶贴敷其反对侧培养,血岛形成良好,但是经过热处理的内胚叶,无此保护作用。

从上述实验中可以了解,内胚叶对血岛的形成有促进作用。在此时期不存在肾脏等EPO分泌器官,也没有与EPO相似促进血岛形成物质。但Samarut等发现卵黄囊培养上清含有红细胞克隆形成促进因子。

三、胚胎期红细胞造血的体液因素

EPO是成体哺乳类在胎儿肝脏的幼红细胞分化调节的重要体液因素,过去关于卵黄囊造血的体液因素已被否定。Samarut等报告用贫血鸟的血浆培养卵黄囊细胞形成了幼红细胞克隆。该氏等还从卵黄囊培养的上清中发现有EPO样作用的物质,考虑是另外一种造血因子(例如:Burst Promoting Activity,BPA)或其他的同样的物质,现在尚难判定。

另外关于肝造血以后时期幼红细胞的分化,受EPO的支配,现已很清楚。

在卵黄囊造血若加入二甲基亚风(Dimethylsulphoxid,DMSO)或其它混合白血病细胞的幼红细胞分化诱导物质,使造血明显亢进。关于其作用机理尚不十分清楚。

四、造血干细胞的发生

(一)多能干细胞的发生

在实验中证明小鼠的卵黄囊在胚胎的第8日后已含有多能干细胞CFU—S。但是,这一时期多能干细胞数非常少,仅在每 10^6 个细胞中含有1.44个,也就是占成鼠骨髓1%左右。以后CFU—S急剧增加,第11日在每 10^6 个有4个,第13日在卵黄囊已不能检出CFU—S。根据卵黄囊在形成的脾克隆中可以观察到幼红细胞、粒细胞、巨核细胞三个系统的细胞。发现每个克隆都比成体形成的克隆大,在移植12日的克隆中再移植,可能还含有SFU—S。将这种克隆进行染色体分析,证明细胞是由卵黄囊形成的。卵黄囊造血可以观察到幼红细胞,有人认为CEU—S在卵黄囊中不能分化成其它细胞,或许在卵黄囊中存在引起幼红细胞分化的前驱细胞,是否如此,尚未得出结论。

Feldman等报告,将卵黄囊的细胞在体外培养48小时,CFU—S数量增加80倍。

(二)粒细胞巨噬细胞的前驱细胞CFU—C的产生

将小鼠的卵黄囊细胞直接放于软琼脂中培养,在胚胎的第七天产生CFU—C,正好在血岛形成时被检出,此后CFU—C的数量急剧增加,在第10日达最高峰,每个卵黄囊平均有7300个,以后急剧减少,在第13日已不能见到(见图3)。在此时和CFU—S同样在卵黄囊粒细胞克隆细胞的形成和发育能力已减弱,或许此时在卵黄囊已显示出不适宜于CFU—C发育。

(三)幼红细胞克隆形成细胞的出现

用体外克隆形成法对幼红细胞形成的定量观察。发现形成有大型幼稚克隆群的

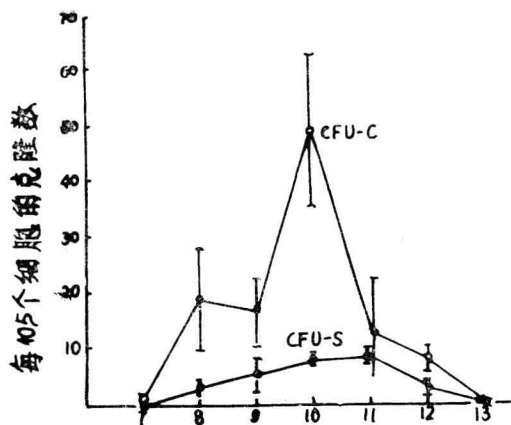


图3 小鼠的胎龄和CFU—S
CFU—C的发生过程

前驱细胞, BFU—E(burst forming unit erythroid) 和由此进行分化形成的小形克隆CFU—E (Colony forming unit erythroid)。此类前驱细胞从胚胎期的材料中也可检出。其方法是將胚胎期细胞疏散的埋入培养基中(加入足够的营养索和血清),使其处于完全与上述的细胞环境完全分离的状态,却能产生幼红细胞的前驱细胞,根据两者间的结果分析,是很有意义。

到目前为止,关于卵黄囊的幼红细胞克隆形成,在人和鼠还不能很好的形成,但是关于鸟类已有很多的研究。

Samarut等以鸟的初发生期到成体,在各个时期用幼红细胞克隆形成方法进行了观察,孵育后16~18小时原条期BFU—E在卵黄囊已被检出。随着胚的成长发育,急剧增加。CFU—E比BFU—E稍迟方被检出,在克隆中含有与幼红细胞相似的细长卵圆形二次红细胞。在鼠的肝中第11日CFU—E、BFU—E均可被检出,以后剧增,分别在第14日达到顶峰,以后逐渐减少,肝造血随着胎龄的增加,幼红细胞克隆形成EPO的最大需要量大致在0.3u/ml,在成体中大致需同样的数量。所以考虑肝脏造血的范围和幼红细

胞产生调节机制与成体相同。

(四)在体外培养混合克隆的证明

Johnson和Metcalf用小鼠的胎肝细胞培养出幼红细胞、粒细胞、巨噬细胞、巨核细胞的混合克隆。由此证明哺乳类的成体初期就含有多能干细胞的克隆,可以形成各种血细胞。

以上胎肝造血与成体有同样的调节机构,但其增殖能力有较强的倾向。

(五)胚胎期血红蛋白的形成与变化

高等动物的胚胎期红细胞系的细胞,由于在各个时期产生的部位不同,血红蛋白的种类也伴随着变化。从红细胞系统而言,如前述通过卵黄囊的原始红细胞和在它以后分化成的二次细胞被分开,原始红细胞经一过性增殖后即消失,血红蛋白在人、鼠、鸟类高等动物各自都带有自己特殊分子结构。人的原始红细胞的血红蛋白称为Gower I II,其肽链由 α 、 ζ 、 ϵ 组成。Hb Gower从卵黄囊开始造血时期就开始产生至妊娠第七周消失。

其次是肝脏造血二次产生的红细胞、开始形成胎儿血红蛋白,其肽链由 $\alpha\gamma$ 构成。骨髓造血开始以后,出现成人型HbA₁和HbA₂,出生后主要是HbA₁,仅有极少量的HbA₂ HbF(图4)。也就是Hb结构的

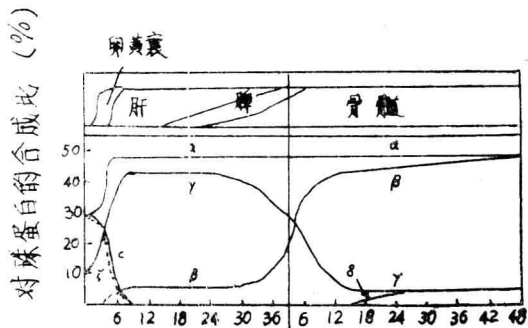


图4 人胎生期Hb的变化

变化,大致与红细胞造血器官的变化一致。所以到目前为止,各造血器官细胞的发生机理

和Hb结构的调节,尚未完全明瞭。

HbA和HbF的转换与从Gowers向HbF的转换不同,是从细胞中的HbF向HbA的转换机构所起的作用。由于疾病所致的HbF值增高,提示这种疾病可能是地中海贫血。此外,再生障碍性贫血或其它骨髓增生异常性疾患也有HbF值增高者,但其HbF值增高程度远比地中海贫血为低。

第三节 血细胞产生的调节机构

一、造血干细胞

(一) 关于造血机构观点的改变

1、形态学观察的时代:对血液细胞学的研究可以追溯到Hippocrates (460—377 BC) 时代,对血细胞形态学能进行科学的判断,还是伴随显微镜的发明, Leeuwenhoek (1632—1723) 开始较细致地对血细胞形态学进行观察。约从Leeuwenhoek 100年以后,被称为血液学之父的William Hewson观察到圆形平坦各种无色的血细胞,当时认为,这种细胞起源于淋巴组织,通过胸导管到达全身。到1846年Weher和Koeliker从胚胎期造血的观察,提出造血由肝脏开始的学说,此后这种说法又被修改,证明胚胎初期的血岛“Blood islands”是最早开始造血的场所。

1868年Neumann和Bizzozero各自对成人造血组织进行了观察,开始提出了骨髓造血学说,此一学说当时受到一些学者的强烈反对。但是Neumann的学说以后被病理学者所确认。自19世纪末到现在,骨髓造血学说已被广泛地承认。

随着血液学研究的迅速发展,又发现了一些新的研究方法,1878年Paul Ehrlich报告,把血液和骨髓细胞固定后,用Triacid混合液染色来区别血细胞,用这种方法可以观察到细胞的微细结构,如大型细胞,体大、有兰色的细胞浆、无颗粒、有核仁,考

虑为原始细胞,这种细胞见于粒细胞的起源细胞,故称为原始粒细胞。该氏等认为与淋巴细胞的起源完全不同,因此,主张将血细胞的起源分为二元论。

Ehrlich的研究工作由Pappenheim继续进行。在1898年他设计的Ehrlich的染色法优于Romanowsky的染色法(伊红和美兰染色组合的染色),可以精细地观察到血细胞的微细构造。Pappenheim对各种血细胞移行型的观察有很大的成就,但和Ehrlich血细胞的起源学说有所不同。他的意见即所有的血细胞均为一个共同的起源细胞,称为淋巴母细胞,推测为一种全能的未分化的造血干细胞。

Pappenheim以后有人主张Ehrlich二元论的流派和多元论的学说, Pappenheim的意见继续主张一元论学说,这样反复争论约有30年以上。

关于血细胞的起源,一元论和多元论的争论,由于研究材料和实验手段的不同,很难得到一致意见,用胚胎期材料研究者多主张一元论,用临床材料研究者多倾向于多元论。

2、造血干细胞与血液学的发展

上述用形态学方法关于血细胞起源的研究,如组织化学染色(氧化酶反应, Schulze 1909年;过氧化酶反应 Kveilch 1910)的发展等,但没有明显的进步,1930年后半叶基本陷于停止状态。

但在二十世纪40年代后半期,改变了研究方向,引入了新的研究方法,有了明显的进步,即放射生物学的引入。放射性同位素(RI)在血液学中的应用。组织移植、细胞遗传学、免疫学等等研究方法的引入。

特别有意义的是在1949年Jacobson的实验,他用X射线1025R对小鼠进行全身照射,小鼠100%死亡,若在照射时用铅板保护脾脏,有82.5%存活,而且造血障碍程度显著减轻,这种保护效果只能见于用铅板保

护骨髓和脾可以见到,保护其他脏器无效。此时再进一步将保护的脾一小时后摘出和24小时后摘出时有同样的致死率。但可以看到造血组织的有效恢复。在此理论的基础上Lorenz、Loutit、Barnes等用超致死量的放射线照射小鼠,然后再移植给健康小鼠的骨髓,可以延长小鼠的寿命。提供骨髓的动物(供体)的骨髓细胞,移植给接受动物(受体),在受体的造血组织内成活并增殖分化成熟。根据染色体的分析、组织化学和免疫学的方法已多次被证实(Ford、Nowell、Makinodan等)。

事实证明进行骨髓移植时被移植的造血组织中的造血的起源细胞,在宿主体内移动,最后终于在造血组织中定居,并在其中进行增殖分化,这种被移植的造血组织再次构成了造血起源细胞,除保持自己的增殖能力外,还有活跃的分化能力。将此种细胞命名为造血干细胞(Hemopoietic Stem-cell)。

但是这种造血干细胞,在形态学上很难与原始红细胞、原始粒细胞、原始巨核样幼稚细胞鉴别,但可将DNA前驱物质用放射性同位素(^{32}P 、 ^{14}C 、 ^3H)标记用放射自显影可以得到解决。

此项研究由Brookhaven国立研究所的Gronkite, Bond等做出了很大的贡献,到1960年用形态学识别所得的结论所谓幼稚细胞阶段的细胞具有活泼的DNA合成和分裂能力,由于经过数次的分裂和分化仅能保持达到成熟细胞的能力,但却不能有自身旺盛的增殖能力和对全身造血功能的再建。

干细胞的特殊机能是:第一、有向成熟细胞分化能力,第二、具有强大的自我复制能力,具备此两项条件的细胞,也就是以前用形态学不能识别的幼稚细胞阶段的细胞。

3、脾克隆形成细胞的发现

1961年Till和McCulloch用超致死量的 γ 射线照射小鼠,再用同系的小鼠骨髓移

植,7~10日后在受体的脾脏形成了造血细胞的克隆,并发现其克隆数与移植的细胞数成比例关系。对移植的细胞和克隆中的细胞进行染色体分析,结果发现一个克隆中所有的细胞全部来自一个起源细胞,所谓纯株的克隆已被证实。此后,再进一步对产生的克隆进行组织学的研究,有很多学者的报告,发现幼红细胞系的细胞克隆占全克隆数的50~60%;粒细胞系细胞克隆占15~20%;巨核细胞系的克隆占10%;各细胞系的混合克隆占10%,综合各家报告的总合:红细胞系和粒细胞系之比为3:1或4:1。

其次在一个克隆中取出的细胞,此种细胞只能看到一个血细胞系的细胞(例如红细胞系),将此细胞再移植给超致死量照射的小鼠,在第二个受体的脾脏产生的克隆经组织学检查,已见不到红细胞系,可见有粒细胞系,巨核细胞系的克隆形成。

此一事实的发现,说明根据脾克隆形成,脾脏产生一个克隆的起源细胞,自己有再生能力的同时,还有分化能力,具备一个血液干细胞的特点,而且此种干细胞具有向各细胞系分化和多向分化的能力。这种脾克隆的起源细胞,称为脾克隆形成细胞(Colony Forming Unit Spleen、SFU-S)。此种造血组织中的多能干细胞CFU-S移植在脾脏定居,并得到增殖,比实际移植造血细胞中的干细胞的量更多,在小鼠脾脏的定居率(Seeding efficiency)根据细胞系统、年龄而不同,可在0.05~0.24之间,所以由CFU-S推定在小鼠体内全部多能干细胞的数大约在 $10^6 \sim 10^7$ 个。

4、用培养法检查血液干细胞

过去对造血细胞用组织培养法已进行过多次反复的研究,关于其定量性和再现性都没达到十分满意的效果,根据1965年Pluznik和Sachs、1966年的Bradley和Metcalf各自分别用半固体培养基的方法发现了粒细胞系和巨噬细胞系的干细胞定量法。

这种方法的原理是用半固体培养基(琼脂或甲基纤维素)限制培养细胞的活动,使克隆易于形成。此外还有一个重要问题,为了使造血细胞很好的增殖,易于形成克隆,还必须在培养基中加入营养层(Feeder Layer)和液性克隆形成刺激因子(Colony Stimulating Factor, CSF)。

培养7~14日产生的造血细胞克隆,与前述的脾克隆不同,可以看到由粒细胞系和巨噬细胞系的细胞构成。根据染色体分析结果证明,一个克隆来源于一个细胞。搜集此种克隆的细胞,移植给小鼠,不能形成脾克隆。但是,再一次将此克隆细胞放于培养基中培养,可以形成克隆。所以用这种方法形成克隆的起源细胞,不是多能干细胞,也就是只能向粒细胞系、巨噬细胞系方向分化的定向干细胞,这种细胞称为Colony Forming Unit—Culture (CFU—C)。

已于前述,关于造血细胞培养法在鼠和大白鼠不能检出CFU—S,但CFU—C不仅在啮齿类而在猴或人也可以检出。

这样一个定向的血细胞系,即用这种单分化能(Unipotential)的干细胞培养法,在其它血细胞系也可检出。

1971年Stephenson等将血浆凝块(Plasma clot)和大量的红细胞生成素(EPO)加入培养基中培养两日,幼红细胞的克隆已形成。这种克隆的起源细胞,称为Colony Forming Unit Erythroid (CFU—E)。除在小鼠的骨髓细胞外,在人的骨髓细胞也可进行培养,Plasma clot也可用甲基纤维素(methyl-cellulose)代替。

Axelrad等又进一步研究,将CFU—E的培养系中,在培养途中加入EPO,观察7日,可以见到全部形成大的集落(burst)。此大的burst形成的起源细胞,从形态学上观察,不如CFU—E成熟,用速度沉降法(Velocity Sedimentation)进行细胞分离,可以和CFU—E清楚分开,由此Axelr

ad等将此种形成大burst的起源细胞命名为Erythropoietic Burst Forming Unit (BFU—E),在人的骨髓和周围血中均可培养出BFU—E。

其次是关于巨核细胞克隆的形成,1975年Nakeff等用胎儿的纤维母细胞,下层敷以软琼脂培养法,从小鼠的骨髓细胞中培养,巨核细胞克隆形成成功。还有Metcalf等报告用小鼠骨髓细胞培养系或从小鼠的脾细胞液体培养系中加CSF可以形成巨核细胞的克隆。

此外用Pokeweed mitogen (PWM)、刺激脾细胞加入CSF,用小鼠的骨髓细胞和脾细胞进行培养,形成大型的分散的克隆,克隆形成细胞为嗜酸性细胞,此嗜酸性细胞克隆的起源细胞称为Colony Forming Unit—Eosinophil (CFU—E)。用人的骨髓细胞培养也可形成嗜酸性细胞克隆。此时无分散的克隆(dispersed Colony)比嗜中性细胞克隆小,其形状显示非常密集。CFU—Eos的存在,是在原始粒细胞分化阶段以前的嗜酸性定向干细胞。

由于造血细胞培养技术的进步和惊人的发展,不仅在上述的一种血细胞系统形成克隆,也可在两个血细胞系统以上形成克隆,即在一个克隆中同时含有粒细胞系、红细胞系、巨核细胞系的混合细胞,被确定能培养出混合克隆的培养系,关于小鼠骨髓细胞Johnson等用甲基纤维素(methylcellulose)培养系加EPO,脾和胸腺细胞的培养上清对小鼠骨髓细胞的培养获得成功。在人的骨髓细胞加入PHA和人的白细胞培养上清进行培养,混合细胞克隆的形成也获得成功。

此种混合细胞的起源细胞称为Colony Forming Unit—mixed Colonies (CFU—Mix)或称之为Granulocyte—Erythrocyte—Macrophage—Megakaryocyte Colony Forming Unit (CFU—GEMM)。这

种克隆与多能干细胞CFU—S的分化阶段不同,但是Humphries等经过实验检查结果证明,采取从混合细胞的培养皿中的细胞,用Till等脾克隆形成法进行研究,发现在混合细胞克隆中只有极少数的CFU—S存在。最近 Nakahata 等用PWM刺激小鼠的脾细胞并加入CSF,培养小鼠的骨髓和脾细胞,在第16日可以见到40~1000个未分化细胞的克隆形成。这种克隆他们称为干细胞克隆(Stem Cell Colony)。将此克隆中的细胞再次移植培养反复四次,经过64天还是保持同样的克隆。再将此干细胞克隆的细胞移植给动物

可以形成很多的脾克隆,还可以形成很多的混合细胞克隆。这一事实可以证明干细胞水平的细胞,在体外条件下培养,可以增殖成功。由此开始可以用培养法对干细胞进行检查,和脾克隆检查法进行检查的结论,对今后的研究方向开辟了新的道路。

综上所述,主要是以造血干细胞为中心的细胞分化过程,从形态学方面得知,关于血细胞的前驱细胞的分化增殖状态,积累了很多新的资料,如图5。补充增加了左侧两行空白形态不明的细胞。

图6 根据新的概念由多能干细胞CFU

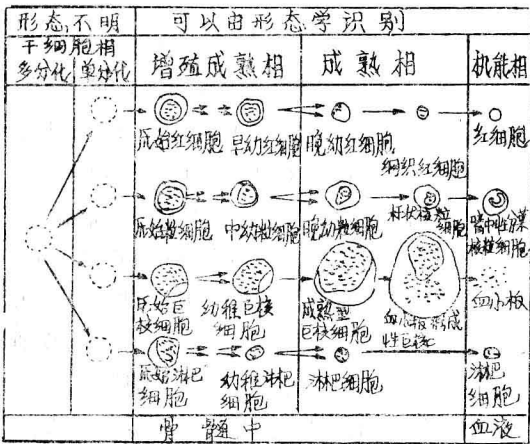


图5甲 造血细胞形态学的增殖分化过程

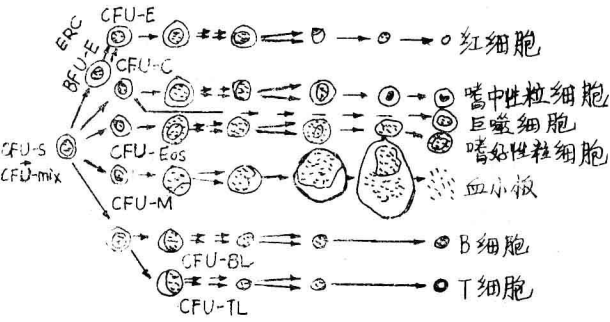


图5乙 造血干细胞的增殖分化过程

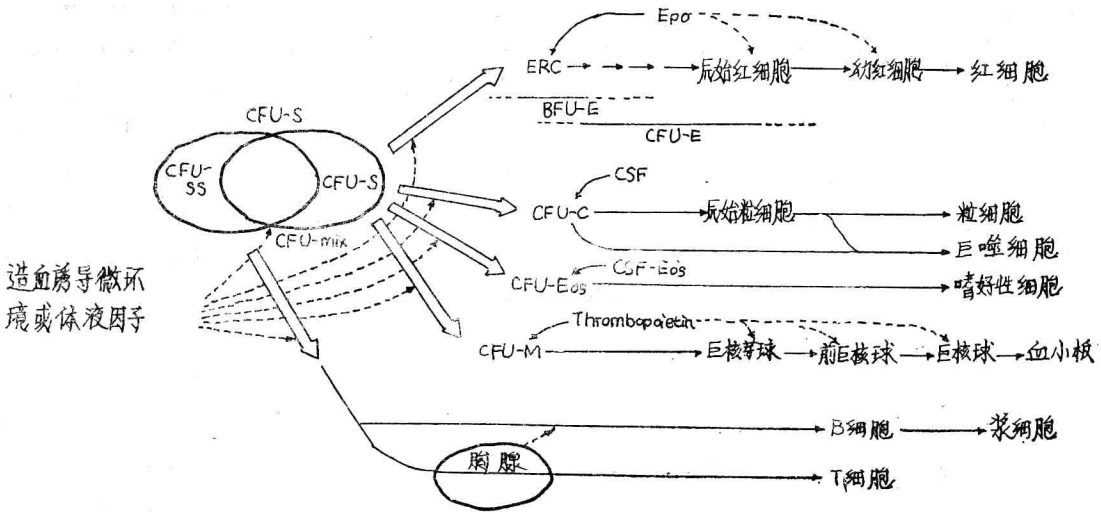


图6 血细胞分化模式图

—S分化至各系血细胞。根据小鼠脾克隆形成法的研究,可以定量测定干细胞数,在骨髓中占整个有核细胞的0.2~1.2%,Van, Bekkum测定在小鼠骨髓中每1000个有核细胞中有6~8个,脾脏在每10000个中有4个,在末梢血每100000中有4个干细胞。

二、红细胞系造血

(一) 红细胞系造血的研究历史

红细胞系的造血在各血细胞系中,特别是关于其详细的发生机制已经明确。关于其原理已在造血机构及其变迁中详述。最早是从形态学的观察研究阶段开始,以后又进行动态造血机构分析研究。如用放射性铁合成

血红蛋白最适的指标。1938年以后对RI的开发与应用,已逐渐增多。带有 $^{59}\text{Fe}\gamma$ 射线放射性最适当的半衰期在医学生物学中的应用等。

更进一步在1950年以后,随着Epo的研究,已明确红细胞的分化顺序,在1960年以后,干细胞的定量法已被确立,还有比较困难的是红细胞系干细胞培养法的确立,和自干细胞到红细胞的红细胞系造血,到目前已经大致明确。

(二) 红细胞系的造血机构

红细胞产生的过程模型,如图7所示,从分化机能方面将其产生过程可分为四个阶段。

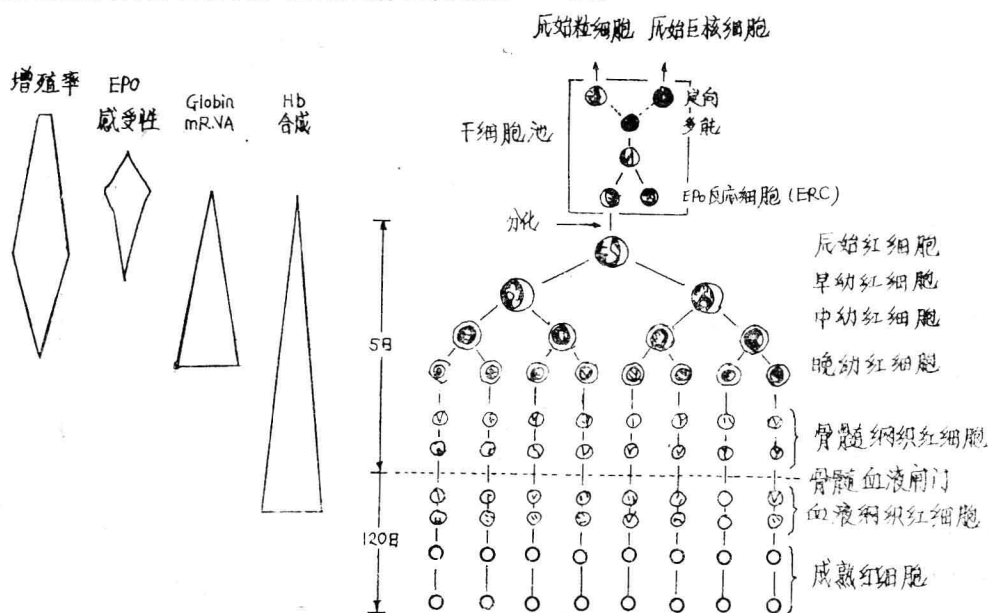


图7 红细胞产生的机构模型

1、多能干细胞(Pluripotential stem Cell; CFU—S CFU—Mix) Till 和 Mc Culloch在动物实验中对脾克隆形成法CFU—S的研究,用培养法CFU—Mix培养可以对其机能的检查,已于前述。

2、造血祖细胞或红系祖细胞(Unipotential stem Cell, Committed erythroid stem cell; ERC BFU—E, CFU—E)由多能干细胞分化而来,向红细胞系各个阶段分

化的定向干细胞。此阶段细胞为Epo反应细胞,幼红细胞克隆群形成细胞(Erythropoietic Burst—Forming Unit, BFU—E)和幼红细胞克隆形成细胞(Erythroid Colony Forming Unit, CFU—E)两个阶段。

1) ERC: 随着Epo作用机理的研究 Alpen和Cranore的实验和Filmanowicz等的实验认为Epo作用于可以用形态学识别的原始红细胞的前一个阶段细胞,已明确此阶

段细胞可起到向原始红细胞分化的作用。

Kranz等用骨髓细胞中的ERC的含量测定方法,将骨髓细胞的悬浮液中加入培养液,培养72小时,在培养终了的前6小时加入⁵⁹Fe,检查新生血红蛋白的合成量。证明在DNA合成期有70~76%ERC存在。还可根据造血状态G₁期的长短变动来观察,如输血多血症的小鼠,其造血处于停滞状态,G₁期可延长至30小时,在出血或贫血时G₁期则缩短。

2) CFU—E和BFU—E: 已如前述,随着培养法的进步,1970年以后对幼红细胞的克隆形成已经培养成功,从此对CFU—E、BFU—E产生了新的概念。

1971年,Stephenson和Axelrad对红系干细胞的培养已经成功。用小鼠骨髓加入Epo培养,在24~72小时后,可见8~64个幼红细胞集落,它的起源细胞称CFU—E。

Axelrad等报告,若加入更大量的Fpo继续培养,可以看到10000个以上呈火花迸发样集落(burst)形态,形成大的幼红细胞克隆。其起源细胞命名为BFU—E。

最近Grygory等报告,培养第3~4天,可以看到3~8个丛中形成幼红细胞集团,从这种克隆大小和对Epo反应性等,认为这种克隆的起源细胞位于CFU—E和BFU—E之间为分化成熟阶段的BFU—E(mature BFU—E)。因此我们发现红细胞系克隆形成细胞分三个阶段,其三者性状的比较,见图8。

在小鼠骨髓,能形成这样红细胞的克隆,在人的骨髓同样可以观察到。但是,在人的培养时,到第7天来自CFU—E克隆细胞数仅在64个以内,到第13天方可见到来自分化成熟的BFU—E(Mature BFU—E)红细胞克隆集合体,在20天以后,方能形成早期的BFU—E(Primitive BFU—E)20个以上的克隆集合体。

关于这三种红细胞克隆的关系是按着

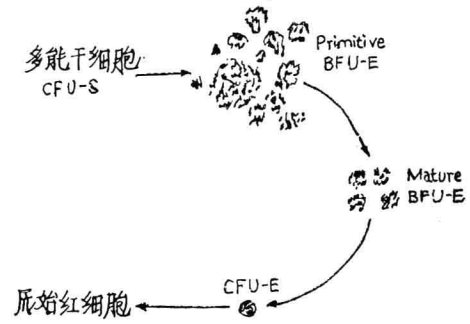


图8 骨髓培养法定向干细胞(造血祖细胞)BFU—E、CFU—E模式图

Primitive BFU—E→Mature BFU—E→CFU—E的顺序进行分化的(见图8),但其在分化过程中,增生能力低下时均对Epo感受性增强。

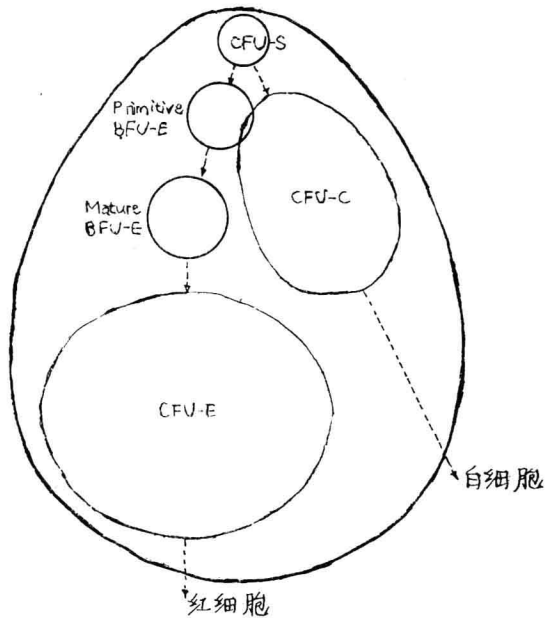


图9 多能干细胞和红细胞粒细胞系干细胞分化阶段模式图

Gregory和Henkelman的实验分析,CFU—S与Primitive BFU—E分化度接近,mature BFU—E与CFU—C分化度接近,但CFU—E和CFU—S或CFU—C分化度的阶段则有很大差别(图9)。对Epo反应的比较,用培养法观察Epo的反应曲线,Epo 0.2~0.4U/ml CFU—E就可以达到较高的水平.BFU—E用Epo 2u/ml才勉强

达到较高的水平。还有BFU—E可在周围血中存在，而CFU—E则在血中不存在。

3) 幼稚红细胞：从形态学上能识别最早期未成熟阶段的细胞是原始红细胞，在此阶段细胞浆内几乎不含有Hb，但含有很多的核糖核酸。原始红细胞分裂成早幼红细胞，早幼红细胞分裂成中幼红细胞，中幼红细胞分裂为晚幼红细胞。在此期间红细胞的分裂和分化是同步分开进行(图7)。

细胞浆按成熟的顺序，Hb的量含由浅红逐渐变深，细胞也由大变小；核染色质逐渐浓缩，核仁消失。

晚幼红细胞不能再进行分裂，脱核后就成为成熟红细胞。在刚脱核后的未成熟红细胞，细胞浆内还含有一部分核糖核酸。此类红细胞用Romanowsky染色称为多嗜性红细胞，用超生体染色，红细胞内染成有网状结构的物质，称此类细胞为网织红细胞(recticulocyte)。

在骨髓内，原始红细胞到网织红细胞的成熟时间，在人均需5天，骨髓内网织红细胞在骨髓内停留时间为2.8天。

红细胞由骨髓被释放到周围血中，需经过骨髓窦状隙的间隙，此间隙约有 $3\mu\text{m}$ ，为了通过此间隙，红细胞有明显的变形功能，有核红细胞缺乏变形功能，很难通过此类窦壁间隙，刚脱核的网织红细胞也不能直接进入血中。

由于窦状隙的间隙扩大和红细胞变形，红细胞才能被释放至血中。

在溶血发作或急性失血等代偿性造血功能亢进时，大型的网织红细胞或有核红细胞可在周围血中出现。这种现象除幼红细胞Skipped division机制外，还可引起骨髓窦状隙自身的变化，破坏了正常释放机制，同时还可以观察到在低氧状态下，可以引起骨髓窦壁扩大和血流量增加。

4) 红细胞：脱核的红细胞，在骨髓内停留后，到周围血液循环中。在周围血中网

织红细胞存在时间为7日，红细胞的寿命在人为109~127日，平均120日，小鼠为41~50日。主要在脾脏被网状内皮细胞处理，近年来，由于生化学、免疫学、酶学、红细胞血液流变学的研究进展，由于疾病状态而致的红细胞破坏机理也逐渐被了解。但是在生理条件下，红细胞的破坏机理尚未完全明了。

(三) 红细胞产生的调节机制

根据机体对造血的需要，红细胞的产生数量可增加，必要时仅制造红细胞，决不制造多余的血细胞。这种自动巧妙的控制机构的调节机制，有三种学说：①红细胞分裂亢进；②从干细胞开始促进红细胞的分化；③幼稚红细胞的成熟时间缩短。

第一种学说：根据幼稚红细胞的生殖时间(generation time)实际测定的结果证明，生殖时间与造血状态无一定关系而被否定(鼠约10小时，人比鼠时间略长)。

第二种学说：也是最重要的作用机制，现已被证明，与促进其分化的体液调节物质Epo有一定关系。Alpen等用放血犬的实验和Filmanowicz等的实验再一次证实，在输血所致红细胞增多症的小鼠，观察其脾脏，红细胞的产生已完全停止，但在注射Epo24小时后出现原红细胞，48小时出现幼稚红细胞，72小时周围血中网织红细胞增加(图10)。

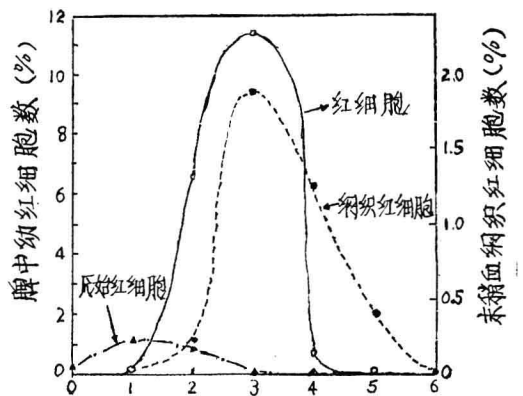


图10 输血致红细胞增多症的鼠注射Epo后在脏脾出现的幼红细胞像

第三种学说：是关于Stohlman 等的实验，用放射性铁检查造血亢进状态的动物，发现周围血细胞的高峰比正常状态时出现为早，随之幼稚网织红细胞明显增加，Epo的作用保证其分裂，越至成熟阶段，致使网织红细胞早期流至周围血中，因此引起红细胞成熟时间缩短，大型的红细胞很快的流至血流中，其机制主要是由于机体的紧急需要。

1、红细胞生成素(Erythropoietin)：在过去考虑红细胞的生成是否有体液因素控制，1906年Carnot和Deflandre提出很早就存在液体因素。但是一直到最近才注意到Epo体系的研究意义。1950年根据Erslev的动物实验和Stohlman的临床观察开始考虑这个问题。1950年以后主要用动物实验对Epo的研究，其作用机理由于造血干细胞的研究进展而逐步被证实。Epo是在贫血时极度缺氧状态下，紧急需要红细胞的产生时才起作用的因子。近来应用RI等对正常人血浆的Epo力价测定，正常人血浆中3~20mu/ml左右，尿中排泄量2—5u/24hr，正常动物血中存在的Epo有10~30mu/ml。若将抗Epo抗体投给正常动物，红细胞即停止产生。现已明确Epo是红细胞产生的生理调节因子。

关于其化学性质，观察在羊血浆中的Epo分子量为39000~46000的糖蛋白，蛋白74%、糖26%组成。

最近Miyake等根据从再障患者的尿中精制成930倍，得到70400u/mg纯度较高的蛋白。

在贫血的组织中氧供给减少，血流量减少，刺激肾脏而产生Epo，但必须有Epo的前驱物质，在肾脏变成活性物质(renal erythropoietic factor REF)，才能产生Epo。关于Epo产生的机理、尚未得出完整的结论。

Epo在肾脏产生的部位，现尚未完全清

楚，有的学者根据实验提出，靠近肾小球的细胞有此作用。但是最近观察肾切除的患者，或进行动物实验中发现，在肾脏以外也可产生Epo，此肾外性Epo在大白鼠可产生10~20%。由于动物的种类不同，产生的比率亦异，考虑此肾外性Epo可能在肝脏或网状内皮系统产生。Epo对红细胞产生的调节见图10。

2、BPA(burst—promoting/enhancing activity)

随着幼红细胞培养法的研究进展，上述的作用于早期BFU—E阶段的细胞除Epo以外，已证明还受其它体液因子的影响，Aye发现在白细胞培养上清还存在有产生幼红细胞的促进因子。

Iscoe等将PWM加入无血清脾脏培养上清的纯化物中对CFU—E无作用，但证明有对BFU—E作用的因子存在，将此种因子命名为burst—promoting activity(BPA)。

从从Sephadex G150部分纯化的结果推测，其分子量约为25000。另外，Wagemaker也发现从骨髓细胞中和小鼠血清中同样放出与Epo不同的体液因子(burst—enhancing activity)。

(四)关于老化红细胞的破坏：由于生存日期的增加生理变化过程的结果，最重要的是首先应了解正常红细胞随着年龄的增加而变化 and 到红细胞老化时而引起生理的破坏。

红细胞随着年龄的增加，其表面积和容积的比值低下，因而失去特有的形态，呈球形，还有构成红细胞膜的膜蛋白，总脂质，胆固醇、磷脂减少，这是膜表面产生一次性变化，或是糖酵解能力低下，产生二次性变化，但尚未明确。其他随着年龄的增加，红细胞膜表面荷电密度的减少，或膜结合唾液酸的减少，或种种膜结合酶的低下。

红细胞随着年龄的增加，在代谢方面的变化是：G6PD或GAPD等糖酵解的活性低