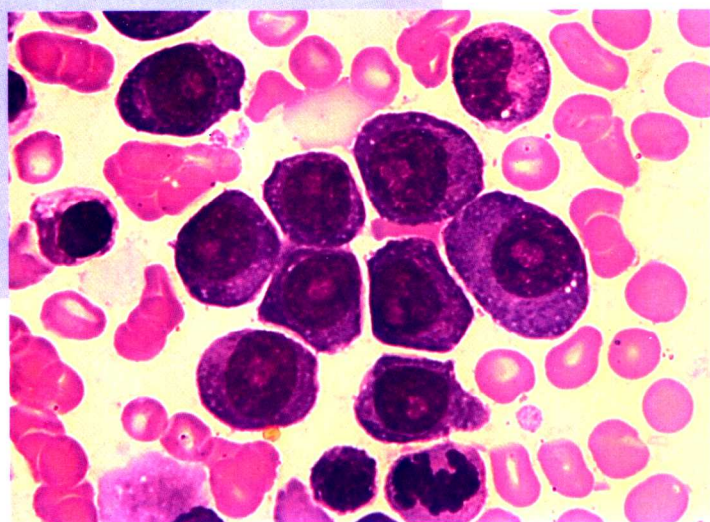


武淑兰 孙士斌 主编

浆细胞病

——基础与临床



北京大学医学出版社

浆 细 胞 病

——基础与临床

主 编 武淑兰 孙士斌
编 委 (以姓氏笔画为序)

刘淑俊 孙士斌 朱立华 许佐良
张 波 李 挺 武淑兰

编者名单 (以姓氏笔画为序)

刘淑俊	北京大学肿瘤学院	肿瘤内科
孙士斌	河北医科大学第一医院	血液科
朱立华	北京大学第一医院	检验科
许佐良	北京大学肿瘤学院	免疫室
岑溪南	北京大学第一医院	血液内科
张 波	北京大学基础医学院	病理系
李 挺	北京大学第一医院	病理科
李明明	河北医科大学第一医院	血液科
邱志祥	北京大学第一医院	血液内科
邹万忠	北京大学基础医学院	病理系
欧晋平	北京大学第一医院	血液内科
武淑兰	北京大学第一医院	血液内科

北京大学医学出版社

JIANGXIBAOBING

图书在版编目 (CIP) 数据

浆细胞病：基础与临床/武淑兰，孙士斌主编. —北京：
北京大学医学出版社，2003.10
ISBN 7-81071-496-1

I. 浆… II. ①武… ②孙… III. 浆细胞-血液病-诊
疗 IV. R559

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 080852 号

北京大学医学出版社出版发行

(100083 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内 电话：010-82802230)

责任编辑：许 立

责任校对：潘 慧

责任印制：张京生

莱芜市圣龙印务书刊有限责任公司印刷 新华书店经销

开本：787mm×1092mm 1/16 印张：22.75 插页：4 字数：572 千字

2003 年 12 月第 1 版 2003 年 12 月第 1 次印刷 印数：1-2000 册

定价：73.00 元

版权所有 不得翻印

本书由

北京大学医学部

科学出版基金

资助出版

序

武淑兰教授多年来不懈地从事血液病学的临床与实验研究工作，不但有丰富的临床经验而且富有创新性的研究成果。这次看到她与孙士斌教授等倾注心血所编撰的《浆细胞病》一书，内容丰富、翔实，涉及浆细胞的基础与临床，反映了相关领域中国内外研究的新进展，亦包括了该书作者多年的实践心得。本书的出版是我国血液学进展的又一标志。

本书的重要内容之一是恶性浆细胞病。随着人类寿命的延长，在老年人发病率较高的恶性浆细胞病的重要性亦日益增加。随着相关学科的发展，对本病的诊断亦由几十年前几乎是仅仅依赖形态学、X光平片与临床的诊断发展为兼有免疫学、生物化学、病理生理学与放射影像诊断等新进展的综合诊断。本书不但包括了这些进展的内容，亦提出了更新的诊断仪器与途径，这是具有导向性的。

血液系恶性肿瘤的诊断与治疗在人类各种恶性肿瘤中是具有先进性与示范性的。血液系肿瘤的治疗亦从非特异性细胞毒药物发展成为根据特异性的细胞遗传学与分子生物学改变来指导细胞分化诱导剂、肿瘤细胞凋亡诱导剂与对 Ph 染色体阳性细胞较特异的酪氨酸激酶抑制剂。在浆细胞恶性肿瘤的治疗方面亦证明了若干早有的和新开发的非细胞毒药物，说明了恶性浆细胞病的治疗面临若干新的途径，包括药物治疗与造血干细胞移植。一个医师们面对此病而束手无策的年代已经结束，我们将以无比激动的心情去迎接一个新时代的来临。

中国工程院院士

中华医学会血液病学会主任委员

北京大学血液病研究所所长、教授



2003 年 10 月

前 言

浆细胞病是血液系统疾病的一个重要组成部分。随着免疫学、细胞生物学、遗传学和分子生物学的飞速发展，浆细胞病的基础研究及临床诊疗手段日益提高，新观点、新技术以及新的诊断方法和治疗措施不断问世。

近年来不少有关血液病学的著作陆续出版，内容全面、详尽，充分反映了国内外血液学的研究成果。遗憾的是至今国内尚缺乏一部关于浆细胞病的专著，而近年来浆细胞病的发病增加，一些少见的浆细胞病也陆续在国人中发现，且浆细胞病所涉及的基础理论和临床实践又与许多学科有着相互交叉的密切联系。有鉴于此，为了填补这项空白，为我国的浆细胞病研究尽一点添砖加瓦的微薄之力，我们邀请了长期从事浆细胞病临床、病理、检验和基础研究工作的同道，共同编写了这部《浆细胞病——基础与临床》，以期抛砖引玉。

本书编写遵循下列原则：① 实用为本：基础密切联系临床，理论为实践所用，以临床实用性强的内容为主体，兼顾有关的理论知识，为临床医师正确诊断和治疗提供依据；② 便于普及：系统阐述浆细胞病的基础理论及临床诊断和治疗相关的基本知识，国内外资料并重，反映国人发病和诊治的特点，使血液和肿瘤专科医师或非专科医师均能看得懂，用得上；③ 有利提高：在总结临床实践经验的同时，大量参阅近期文献，充分反映近年来国内外的新理论、新知识、新技术和新的发展动态；④ 严谨规范：在文字上，力求简练，定义准确，概念清楚，结构严谨，书写规范，全文体例和文风保持一致。

虽然我们力求编写一部精品专著，也曾为之付出努力，反复讨论、修改和审阅，但限于水平和能力，本书仍会有不少缺点和不足之处，恳请读者不吝赐教，予以指正，以便有机会再版时改进。

武淑兰 孙士斌

2003年5月

目 录

第一篇 基础理论

第一章 造血干细胞	(2)
第一节 造血干细胞的来源和特征	(2)
第二节 造血微环境	(21)
第三节 造血调控因子及其受体	(29)
第二章 淋巴细胞和浆细胞	(42)
第一节 淋巴细胞的发育程序及其调控	(42)
第二节 淋巴细胞的形态学	(50)
第三节 淋巴细胞的生化特点	(52)
第四节 淋巴细胞的分化抗原及其他细胞表面分子	(58)
第五节 淋巴细胞对抗原的识别功能	(64)
第六节 淋巴细胞在调节机体免疫反应功能中的作用	(80)
第三章 免疫球蛋白	(88)
第一节 免疫球蛋白的结构	(88)
第二节 免疫球蛋白的基因结构及重组	(96)
第三节 免疫球蛋白的多样性机制	(104)
第四节 免疫球蛋白的合成与分泌	(107)
第五节 抗体的生物学功能	(112)
第六节 免疫球蛋白的受体	(118)

第二篇 浆细胞病

第一章 总论	(126)
第二章 浆细胞瘤	(130)
第一节 多发性骨髓瘤	(130)
第二节 孤立性浆细胞瘤	(164)

第三节 骨硬化性浆细胞瘤 (附 POEMS 综合征)	(171)
第三章 Waldenström 巨球蛋白血症	(182)
第四章 重链病	(193)
第五章 淀粉样变性	(203)
第六章 冷球蛋白血症	(218)
第七章 意义未明单克隆 γ 球蛋白病	(232)
第八章 反应性浆细胞增多症	(240)
第九章 多中心型 Castleman 病	(246)

第三篇 浆细胞病的诊疗技术

第一章 骨髓细胞形态学检查	(254)
第一节 检查步骤	(254)
第二节 浆细胞系统的形态学特点	(256)
第三节 浆细胞系统异常及其临床意义	(257)
第二章 病理学检查	(259)
第一节 正常浆细胞形态学	(259)
第二节 浆细胞特殊病理技术方法学	(260)
第三节 浆细胞病病理学改变	(262)
第三章 M 蛋白的检测方法	(266)
第一节 血清蛋白电泳	(266)
第二节 本周蛋白定性检查	(268)
第三节 免疫球蛋白定量	(270)
第四节 单向 (环状) 免疫扩散法测定 IgD 含量	(271)
第五节 荧光酶联免疫分析法 (FEIA) 测定 IgE 含量	(272)
第六节 轻链定量	(273)
第七节 免疫电泳	(274)
第八节 免疫固定电泳	(275)
第四章 生物学技术检测及应用	(278)
第一节 基本方法及其应用	(278)
第二节 浆细胞疾病的分子标志	(280)
第三节 浆细胞病相关分子标志的建立	(282)
第五章 抗肿瘤药的临床应用	(285)

第一节 药理学基础	(285)
第二节 抗肿瘤药的毒性及其处理	(297)
第三节 联合化疗实施细则	(299)
第六章 感染的预防和治疗	(301)
第一节 感染性疾病的治疗	(301)
第二节 感染性疾病的预防	(309)
第七章 疼痛的药物治疗	(311)
第一节 镇痛药	(311)
第二节 解热镇痛抗炎药	(317)
第三节 中药和辅助药物	(321)
第四节 疼痛治疗的基本原则与疗效评价	(321)
第八章 造血干细胞移植的应用	(323)
第一节 概述	(323)
第二节 造血干细胞移植的应用	(331)
第九章 生物免疫治疗的应用	(335)
第一节 细胞因子的应用	(335)
第二节 单克隆抗体	(337)
第三节 肿瘤独特型免疫球蛋白疫苗	(338)
第四节 独特型 DNA 疫苗	(339)
第五节 过继性细胞免疫治疗	(339)
第十章 血浆置换术的应用	(343)
常用缩略语	(349)

第一篇

基础理论

造血干细胞

第一节 造血干细胞的来源和特征

一、造血干细胞的来源

1981年 Evans 等人报道了小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 系的建立过程。1998年 Thomson 和 Gearhart 两个研究小组分别报道了所建立的人类胚胎多能干细胞系。这些干细胞的特点是：具有多向分化潜能，可在体外培养条件下建立稳定的细胞系，并可长期保持高度未分化状态和发育潜能；其表型或标志性抗原的表达量和出现时间还不清楚。将 ESC 与 8~16 个细胞阶段的胚胎共培养后，植入假孕母体子宫，可孕育产生嵌合体子代，其遗传性状可以进入胚系细胞，并遗传给子代。判断干细胞的标准见表 1-1-1。

表 1-1-1 判断干细胞的标准

标 准	干细胞	过渡型细胞	成熟细胞
(1) 分化标志	无	开始出现	有
(2) 增殖能力	有	有	无
(3) 自我维持能力	有 ($P_{sm} \geq 0.5$ possible)	无 ($P_{sm} \geq 0.5$ possible)	无 ($P_{sm} = 0$)
(4) 产生许多子细胞的能力	有	有限	无
(5) 损伤后组织再生能力	有 (长期)	有 (短暂)	无
(6) 选择的可变性	(2) ~ (6)	(2)、(4)	无

P_{sm} : self-maintenance probability

从干细胞来源的胚胎干细胞和特定组织干细胞，按其功能区分又能分成为全能干细胞 (totipotent stem cell, TSC) 和多能干细胞 (multipotent stem cell, MSC)。多能干细胞则继续向前分化为定向祖细胞，持续停留在某种组织中，被称为特定组织干细胞，例如造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC)、骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC)、神经干细胞 (neural stem cell, NSC) 等等。对小鼠胚胎干细胞研究表明，在不同的细胞阶段和饲养层条件下，胚胎干细胞会分化成不同的组织细胞，例如神经细胞、心肌细胞、内皮细胞和造血细胞。一些研究证实在不同组织中所保留的胚胎干细胞，例如肌肉间叶细胞、肌肉卫星细胞、脑室管膜神经干细胞可以转化为造血细胞。与此同时，造血干细胞在一些特定的条件下也可以培养发育为脑组织中的大胶质细胞、血管内皮细胞和骨骼肌细胞。所以，这种胚胎性的干细胞是一种多能性的成人干细胞 (multipotential adult progenitor cell, MAPC)。随着对胚胎干细胞的深入研究，将会对干细胞多潜能原因有一个更确切的了解。

不同的研究小组将 ESC 培养在含有特定细胞因子或 OP9 饲养细胞层上，ESC 可分化为各

系造血细胞,其分化发育过程与胚胎内造血动力学过程非常相似。OP9 小鼠胚胎肝基质细胞株是由 Nakano 等人建立的,它所产生的各种细胞因子在种类和数量上可以与造血微环境相比拟,因而可以使 ESC 有效地向造血干细胞的方向分化。ESC 分化发育来的造血干细胞可能具有更强的增殖能力,而且,由此而来的这些原始造血细胞和定向造血细胞最后都能发育为终末血细胞。但是,实验研究结果表明,ESC 分化发育来的造血干细胞并不能重建所有各系的血细胞。这可能有两种原因,首先,被移植的受体鼠体内微环境与胚胎期的微环境可能有明显的不同;其次,从胚胎造血动力学考虑,卵黄囊造血在先,大约在 7 天时出现造血,但该部位的早期造血细胞总是发育为红系和淋巴系。而主动脉-生殖腺-中肾区的造血发生在第 10~12 天,此时将该区的造血细胞与卵黄囊的造血细胞都进行重建,就可以重建所有各系的造血细胞。因此,ESC 分化发育来的造血干细胞可能更接近于卵黄囊早期造血阶段,细胞更原始。对 ESC 分化发育来的造血干细胞的研究,将有助于深入了解造血系统的生物学行为。

大部分造血干细胞的资料来源于对哺乳动物的研究,目前尚缺乏测试人类造血干细胞的技术。最初由小鼠脾结节技术来测定胚胎肝中多能干细胞在脾脏中集落形成的数量(CFU-S)和增殖活性。胚胎造血研究证实,小鼠胚胎最早的造血位点在卵黄囊区域。在受精后 7 天,在该区域内可以检测到造血干细胞,然后在副主动脉层/主动脉-生殖腺-中肾区(PAM/AGM)可检测到造血活性。而且 PAM/AGM 区域来的细胞可以产生更多的脾集落形成单位(colony forming unit-spleen, CFU-S)。这表明 PAM/AGM 区域的造血功能比卵黄囊更活跃,也更具有重要的意义。

在小鼠胚胎干细胞的研究中发现,大约在妊娠第 11 天出现 CFU-S,在妊娠第 17 天达到高峰,能产生大约 4000 个 CFU-S。在出生后 1 周,肝中实际上就没有 CFU-S。脾脏的集落形成细胞(colony forming cell-spleen, CFC-S)数量大约是成人股骨中的两倍,但最后所有的骨骼都成为造血的主要位置。脾脏仅保留了少数 CFU-S,这在造血中的作用还不及一根股骨的造血功能。小鼠的一根股骨大约含有 $(0.5 \sim 1) \times 10^4$ CFU-S。每根股骨中含有大约 2×10^7 个细胞,也就是说每 10^5 个骨髓细胞中就有 1 个骨髓再生细胞。如果 CFU-S 在小鼠中的分布可以与全身造血组织的分布相比较的话,小鼠中总的 CFC-S 数量大约为 2×10^6 。按脾集落细胞生长状态来计算,造血干细胞的细胞周期大约为 6~7 个小时。如按 CFU-S 更新的速度来测定,细胞倍增时间大约为 8.6 小时。表 1-1-2 列出了利用集落形成单位测定造血祖细胞的名称。

表 1-1-2 造血祖细胞的名称

缩写形式	全 称
CFU-GEMM	粒细胞、红细胞、单核-巨噬细胞、巨核细胞-集落形成单位
CFU-GM	粒细胞、单核-巨噬细胞-集落形成单位
CFU-Eo	嗜酸粒细胞-集落形成单位
CFU-Bas	嗜碱粒细胞-集落形成单位
CFU-Meg	巨核细胞-集落形成单位
BFU-E	红细胞-爆式形成单位
CFU-E	红细胞-集落形成单位

在外周血中只含有少量骨髓再生细胞群(MR)和 CFU-S,因此,这些细胞在造血中的意义不大。而且,这些细胞的自我更新状态也很差,似乎是一些衰老和无用的干细胞。这些

细胞具有高的循环率和脾脏接种效率，但是它们很少再回到骨髓中进行造血活动。细胞毒性药物或者一些造血生长因子可以动员骨髓干细胞进入到外周血中，骨髓再生能力可以增加 120 倍。事实上由于这种动员能力是如此强，在人类中外周血造血干细胞的移植正在替代骨髓移植。

大部分 CFU-S 都越过 G_0 期进入细胞 DNA 合成期和分裂周期。有人计算每天大约有 20% 的 CFU-S 会进入到细胞周期中。小鼠大约能存活 1000 天，每个 CFU-S 在一生中能复制分裂 200 次。尽管如此，每一个 CFU-S 在一生中仍然没有什么改变。从一个老龄小鼠中将 CFU-S 转移到一个照射的受体中，CFU-S 的生长率与从一个幼龄鼠来的 CFU-S 没什么差别。但是在一些情况中，例如进行一系列的移植，这种再生能力还是有限的，即所谓的“衰退现象”。这些细胞的自我更新能力实际上与干细胞的质量有关。大部分 CFU-S 都能很容易地进入到细胞周期中，只有一部分不成熟的 MR 细胞可以选择性地被排除在 DNA 合成外。所以，CFU-S 是一种过渡性的细胞，它们可以不断地从更早期、更原始以及具有更大的自我更新能力的细胞成分中得到补充（图 1-1-1）。真正的原始造血干细胞应该是前脾集落形成单位（Pre-CFU-S）。

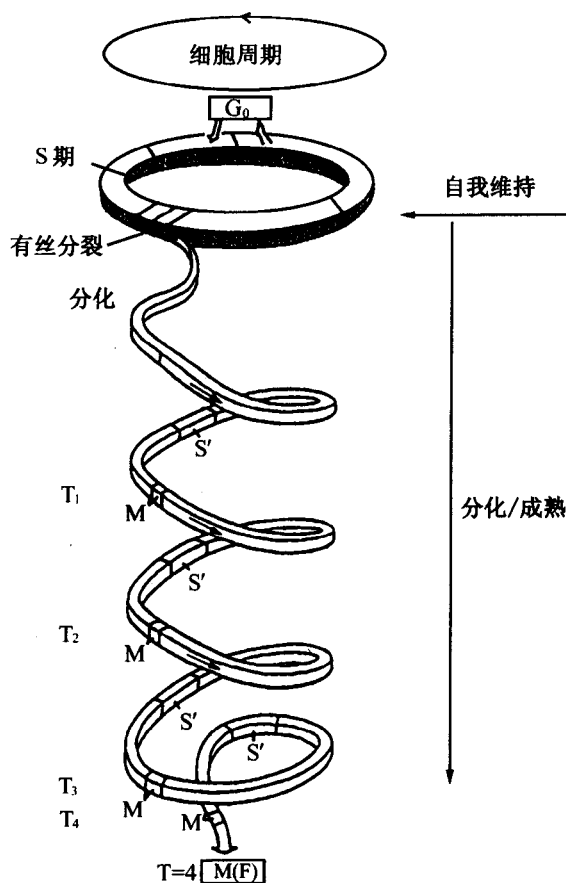


图 1-1-1 干细胞的自我更新和分化成熟

不同的 CFU-S 群体具有不同的自我更新能力。外周血中的 CFU-S 的自我更新能力最低。早期的或年轻的 CFU-S 有较大的自我更新能力，而较老的或在一系列移植后期的 CFU-S 自我

更新能力很低。而且发现这种更新能力与 CFU-S 在骨髓中的位置有关。在骨髓间隙结构中的骨髓细胞群体中,在骨髓空腔中央静脉窦附近的干细胞都是较早期的造血干细胞,越成熟的细胞越接近骨的表面,在那里它们可以与各种分化信号接触,进入系列定向发展的阶段,也就是说位于骨表面的造血细胞增殖活性最强,在中轴位置的细胞自我更新能力最高,Pre-CFU-S 主要位于骨的中轴位置。实验证实只有 Pre-CFU-S 才有长期的再生能力。

有一些因素对造血干细胞生长发育有重大的影响。在对果蝇和一些低等生物的基础研究中了解到,当受精卵开始分裂进入桑葚胚期时,细胞表面所表达的黏附分子的改变会影响不同分裂细胞的发展归宿。在哺乳动物的造血活动中与造血生长有关的因子和黏附分子,如整链蛋白与胞外基质的相互作用,在细胞生长和个体的发育中同样起着重要的作用。造血干细胞中高活性的端粒酶、转录因子 GATA-1、GATA-2、GATA-3、Pu-1 蛋白产物以及 Bcl-2 等抗凋亡产物等因素在造血干细胞的增殖中都发挥了不可替代的作用。

造血转录因子 GATA 家族中已发现有 6 个成员,其中有三个与造血细胞的生长发育有关。GATA 家族属于锌指结构家族中的转录因子,它能与特定的 DNA 调节序列结合,从而使转录过程受到控制。大量的研究表明,这一家族的成员在脊椎动物胚胎的各种系统组织中分布具有组织特异性,但是 GATA-3 的分布却相当广泛。现已知道 GATA-1 在调节红系的增殖和分化中起重要作用。在造血干细胞和祖细胞的增殖和分化中,GATA-2 转录调节是必不可少的。GATA-3 主要调节 T 细胞的增殖和分化,对机体免疫反应的发展方向有着重要的作用。但是,由于 GATA-3 早期表达并广泛分布在胚胎的各种原始组织胚基中,所以也与胚胎的发育有密切的关系。GATA-3 基因定位于 10 号染色体上,cDNA 全长为 1.3kb,编码含有 444 个氨基酸的多肽。GATA-3 的过表达可增强 IL-5 启动子的活性,从而诱导 IL-5 基因的高表达。GATA-3 选择性地在 Th2 细胞中高表达,这种高表达会竞争性地抑制 Th1 细胞的发育。这种结果会诱导机体 B 淋巴细胞产生更多的抗体。转化生长因子- β (TGF- β) 可抑制 GATA-3 的表达,从而抑制 Th0 细胞向 Th2 细胞的分化。转录因子基因是一类原癌基因,突变是原癌基因激活的重要途径之一。GATA-3 的基因突变体在抑制 GATA-3 功能的同时,也抑制 GATA-1、GATA-2 的功能,这提示这三种转录因子在功能上有重叠。GATA-3 在胚胎滋养层巨细胞中也有表达,它可以调节促进胎盘催乳素 I 基因的转录。而催乳素 (Prolactin, PRL) 在免疫系统和造血系统中的调控作用也是近年来受人注意的一个研究热点。

催乳素受体 (PRL-R) 广泛分布在骨髓、胸腺和外周血等免疫造血组织中。PRL-R 为造血生长受体家族成员之一,这一家族中包括了许多与造血有关的生长因子受体成员,如 G-CSF、GM-CSF、EPO 等受体。这一受体家族成员在结构上具有共同的特点,都是单链跨膜蛋白。胞外区有 WSXSW (色氨酸-丝氨酸-X-丝氨酸-色氨酸) 五肽保守序列,X 代表任何一种氨基酸。胞内近膜区共有 Box1 和 Box2 两个功能区。所有这些受体都有相同或相关的下游信号通路。当 PRL 与 GM-CSF 和 EPO 或与 IL-3 和 EPO 协同作用于 CD34⁺ 细胞时,会增加细胞的核酸和血红蛋白的合成,并促使 BFU-E、CFU-G 集落形成率的提高。这是由于 PRL 在与受体结合后可上调 GM-CSF 或 EPO 等受体的表达。单独使用 PRL 并不增加和刺激造血功能。由于这些受体具有相同或相关的下游信号通路,因此在一些特定条件下,与某一种配体的结合或与其他配体的结合,都可能会传递相同的信号,产生相同的生物学效应。PRL 不仅能刺激上调 GM-CSF 或 EPO 等受体的表达,也能刺激 IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-6 等受体的表达。

Discorde 等人研究了 *c-kit* 基因及其配体干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 的表达和相互关系。*c-kit* 基因编码一种针对 SCF 的受体酪氨酸激酶 (RTK)。当配体与受体结合时,可

引起受体二聚化,胞内受体酪氨酸激酶产生磷酸化,从而产生胞内的一系列级联反应。检测了人类胚胎早期不同区域和时间中 *c-kit* 基因转录表达产物和 SCF 表达水平,可以注意到在早期 SCF 表达很低,在第 4~5 周时表达达到高峰, *c-kit* 基因转录表达水平也是不同的。*c-kit* 基因的表达产物在造血细胞的早期发育阶段中有重要的意义。不同的造血因子受体及其配体在造血细胞的生长中有非常重要的作用,在干细胞发育的各个阶段中受体会动态的表达,从而调控了细胞的生长模式。

在造血干细胞中凋亡基因功能的调控,对造血干细胞的分化发育有重要的作用。细胞凋亡涉及 Bcl-2 家族、*p53* 等抑癌基因及原癌基因表达产物。Bcl-2 家族按其功能可分为凋亡抑制基因和凋亡诱导基因两类。凋亡抑制基因所编码的蛋白质包括 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1 等。凋亡诱导基因所编码的蛋白质有 Bax、Bad、Bak、Bid、Hrk、Bcl-xs 等。此外还有 EBV 病毒编码的 BHRF1、LMP1,非洲猪热病毒的 LMW5-HL 和 Soal。与凋亡相关的基因有 *p53*、*p21*、*p16* 和 *c-myc*。相关的蛋白有 E1A、A-20、Callreticulin、clusterin 和 ICE 家族、fas/fasL 和 TNFR 等。

bcl-2 最早是从小鼠 B 细胞淋巴瘤中分离出来的原癌基因,所编码的多肽 Bcl-2 由 239 个氨基酸组成。在正常免疫系统中, *bcl-2* 基因的表达具有细胞特异性,在外周淋巴细胞,扁桃体和脾脏的 T 细胞、淋巴滤泡的生发区、脾脏的红髓区有较多的表达。Bcl-x 由 241 个氨基酸组成,在表达中由于 mRNA 剪切方式不同,可以产生两种大小不同的分子,大分子为 Bcl-xl,小分子为 Bcl-xs。这两种分子的功能决然不同。Bax 的分子量为 2.1kD,由 192 个氨基酸组成。Bcl-2 分子的主要功能是一个细胞死亡阻遏的核心分子。Bcl-2 分子在早期造血细胞,如 CD34⁺CD38⁻细胞中研究较少。Bcl-2 和 Bcl-xl 是一组抑制造血细胞凋亡的膜相关蛋白,它与造血干细胞自我更新、自我维持以保持自身数量密切相关。过表达 Bcl-2 的转基因小鼠模型 H2K-BCL-2 骨髓中,可以获得较多数量的造血干细胞,而且这些细胞对凋亡诱导剂有较大的抗性。CD34⁺/Lin⁻/CD38⁻细胞中,仅有 1%~4% 的细胞表达 Bcl-2,94% 的细胞表达 Bcl-xl,所以 Bcl-xl 可能在造血干细胞的自我维持中有更重要的意义。Bcl-2 高表达的造血细胞,同时也高表达 Bcl-xl (>95%);相反,诱导凋亡的蛋白质,如 Bax (4%~12%),Bad (0~0.8%),Bak (0~3%) 都很低。Bcl-2 过表达的小鼠对辐射的抗性也较强。随着细胞的分化和发育, Bcl-2 的表达也趋于下调。Bcl-2 反义核酸则会抑制 CD34⁺细胞集落的形成,而且完全抑制 GM-CSF 依赖性髓系细胞的生长。当用细胞因子刺激和促进 CD34⁺细胞在体外的分化时,如用 EPO 和 SCF 刺激 CD34⁺细胞向红系分化时, Bcl-xl 和 Mcl-1 表达会升高。但是,凋亡抑制因子并不直接参与造血细胞的分化调控。

在保持机体内环境稳定以及正常的生理功能过程中,机体必须终身产生大量各系血细胞,新的细胞不断产生,衰老的细胞则不断地死亡,但是机体循环中的血细胞总量总是保持在一个稳定的范围内。这说明机体的造血干细胞在自我更新和自我维持的过程中,有相当的一部分细胞进入到细胞分化发育阶段。造血系统中极少量的造血干细胞何以能保持这种特殊的生物学活性,显然与造血调控密不可分,也与凋亡基因的参与密切相关。

随着基因组计划的实施和完成,对功能性基因及其表达产物的深入研究,我们可以从生物信息学的角度了解到,在胚胎细胞中各种与分化发育有关的基因是如何按照一种由长期进化所约定的程序被先后启动、调控和关闭。对一些新的与造血生长有关的正负调控因子及其受体的功能将会有更多的发现和了解。通过对干细胞,尤其是对造血干细胞的研究,我们不仅可以对干细胞维持自我更新的机理有所了解,也可以对因为遗传、外环境和免疫等因素引

起的细胞癌变机理有所了解。肿瘤是一种能不断地增殖,但又随机停止在分化某一阶段上的干细胞性疾病。它的分化调控程序因为某些基因的突变而失去了功能,因而只能停留在分化的某一个阶段上,而维持细胞增殖的能力却保持不变。细胞的增殖、分化和凋亡三个功能阶段在造血细胞系统中表现得非常充分。

二、造血干细胞的特点

造血系统能够持续地维持各种血细胞成分是依赖于组织、器官、干细胞和各种调节因子组成的一个复杂的网络。这一网络负责未分化细胞的分裂和成熟。这些细胞在形态学上不容易被鉴别,也不会发展成各种系列的细胞。造血干细胞是生成血细胞的原始细胞,是一种组织特异性干细胞。它具有自我更新能力,通过不对称分裂维持数量的相对稳定,又能够分化发育为各系造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)。由骨髓、肝脏、脾脏、淋巴结和胸腺组成的造血系统与血细胞的产生、成熟以及血细胞的破坏有关。造血干细胞数量少,大约仅占骨髓有核细胞总数的0.5%。这种干细胞分布在骨髓和胚胎脐带血中,在出生后外周血循环中也有少量干细胞。造血干细胞既具有多向定向分化能力,又具有自我更新维持造血干细胞基本数量的能力。这两个最基本的特性使得机体具有正常的造血功能。早在上个世纪60年代就有一些研究人员提出造血干细胞群中有三个亚群,即多能造血干细胞、髓系干细胞和淋巴系干细胞。随着分子生物学技术的发展,用DNA印迹法分析经逆转录病毒感染并随后发育分化的骨髓干细胞。结果表明在分离出高纯度的T细胞、B细胞和巨噬细胞后,它们的DNA电泳图谱很不均一。这提示造血干细胞不是单克隆的,而是具有明显异质性和可塑性的多克隆群体。

人类造血干细胞具有一些不同于一般血细胞的特点。区别造血干细胞和造血祖细胞的方法主要有两种,即(1)用流式细胞仪测定细胞膜上显示不同颜色的荧光素标记抗体,根据细胞所表达的表型,尤其在发育阶段所表达的分化抗原来加以鉴别。(2)用体外集落培养技术。一般来说原始细胞在体外形成集落所需的时间较长,形成的集落越小,集落数量也少。造血干细胞的数量极少,体积小,比重轻,形态与小淋巴细胞相似,大多数干细胞(99.5%)都处于的 G_0 期,也就是说造血干细胞是处于一种非细胞周期的静止状态。通常只有4%的细胞处于DNA合成和分裂期($S/G_2/M$)。因此它们对化疗药物,如5-氟尿嘧啶(5-FU)、4-氢过氧环磷酰胺(4-HC)的敏感性较低;对一些荧光物质,如罗丹明-123这一类的荧光染料吸收率非常低或完全拒染。造血干细胞还表达一些特殊的分化抗原,其中主要表达CD34抗原,CD45R抗原。但造血干细胞不表达或低表达CD38和HLA-DR,而且还缺乏系列相关表型标志和CD71。目前认为人类造血干细胞的表型为 $CD34^+ / Thy-1^+ (CD90) / CD38^- / Lin^- / CD45RO^+ / Rh_{123}^{dull}$ 。小鼠的表型为 $Sac-1^+ / Sac-2^+ / Thy-1^+ / Lin^-$ 。近来的研究表明血管内皮生长因子受体(KDR)可以作为一种判断造血干细胞和造血祖细胞的标志。在 $CD34^+$ 细胞中表达 KDR^+ 的细胞仅为0.1%~0.5%。 $CD34^+ KDR^+$ 的表型仅局限在造血干细胞中,而 $CD34^+ KDR^-$ 的表型为造血祖细胞的标志。有的作者认为,造血干细胞之所以能维持自我更新和自我维持力,是因为正常干细胞只进行不对称性的有丝分裂。造血干细胞的不对称分裂可以是单个细胞的不对称分裂,也可以是造血干细胞分裂发展成两个具有不同能力的群体,一个群体只有分裂的特性,而不会继续分化,另一个群体不仅分裂了,而且继续发育进入到分化阶段,这称为群体性不对称分裂。一旦分化成为祖细胞即开始出现对称性分裂,当这种对称性分裂继续发展时,它们的自我更新和自我维持力就会进一步下降,直至消失。

当分化为祖细胞时,则具有高度增殖的能力。在早期的部分祖细胞中会丧失自我更新和自我维持力,而在晚期时则全部丧失这种能力。造血干细胞与造血祖细胞在表型上会有所不同。造血干细胞在早期主要表达 CD45、KDR、SIRP,低表达 CD82、CD90、AC133;进一步发展时可以表达 CD34、CD82、CD90、AC133、KDR、SIRP,低表达 CD117、IL-6R、Flt3R;到分化发育为造血祖细胞时,抗原的表达就变得比较清楚,它表达 CD34、CD38、CD71、CD117、HLA-DR、IL-6R 和 Flt3R,上述其他的抗原就不表达。虽然在表型上有这样的差别,但这种差别也并不是绝对的,总有一些是过渡类型。这种情况与造血细胞所处的微环境有关,而这给鉴定带来许多困难。

CD34 抗原选择性地表达在造血干细胞/祖细胞以及一些血管内皮细胞和间质祖细胞上。CD34 抗原是一个膜表面酸性糖蛋白,分子量约为 105 ~ 120kD。编码 CD34 抗原的基因定位在 C1q^{l2}-q^{ter}基因位点上,与编码 CD45 及其他一些膜蛋白基因相比邻。CD34 抗原具有 I 型跨膜蛋白的典型特征。CD34 多肽链共有 9 个 Asn-X-Ser/Thr (天冬酰胺-X-丝氨酸/苏氨酸)位点,其中七个位于胞外区,是 N 糖苷链与多肽链结合的基础。胞内区有 3 个潜在的蛋白激酶 C (PKC) 作用位点,即 Ser、Thr 位点。在 PKC 被其激活物 TPA 激活后,可直接导致 CD34 抗原的磷酸化。CD34 抗原在造血细胞上的表达随着分化程度的增高而减少。推测 CD34 转录的调控元件位于远隔启动子的地方,在其上游区存在 *myb* 结合位点,该位点在造血分化中可能发挥一定的作用,*c-myb* 在造血细胞中的表达与分化呈负相关性,分化程度越高,*c-myb* 表达越低。在外周血中的粒细胞、单核细胞和淋巴细胞等成熟的细胞都不表达 *c-myb*。CD34⁺细胞中含有大量造血干/祖细胞,95% 以上的干/祖细胞为 CD34⁺细胞。CD34⁺细胞中末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxyribonucleotidyl transferase, TdT) 阳性率明显高于 CD34⁻细胞。

CD34⁺细胞并不是一群均一的细胞,根据集落培养及表面抗原的分析,可以将 CD34⁺造血干细胞与其他分化抗原的表达情况再细分为不同的亚群。而且同一亚群内不同来源的细胞,因不同的个体,不同的发育阶段和年龄以及不同的造血部位,使得 CD34⁺造血干细胞具有不同的增殖和分化特性。这可能与不同状态下特定细胞所处的微环境影响有关。首先可以将 CD34⁺造血干细胞分为是否表达 CD38 抗原,即 CD34⁺CD38⁺, CD34⁺CD38⁻两个亚群。CD34⁺CD38⁻亚群是更原始的细胞,是机体长期维持造血功能的原始造血细胞。一旦 CD34⁺造血干细胞也表达 CD38,即表示造血干细胞进入了分化发育的阶段,也即分化成为祖细胞,并会进一步发展为定向造血干细胞。事实上,在大部分集落生成细胞中都表达 CD34⁺CD38⁺分化抗原。其他的一些分化抗原,如 CD33、CD45RA、CD71、HLA-DR、Thy-1、LFA-1、C-kit 等抗原以及与系列细胞相关的抗原也有表达。在 CD34⁺细胞上还可以检出 CD10、CD11a、CD18 和 CD19。可以将 CD34⁺造血干细胞分为不同的亚群,例如有人根据 CD34 抗原,CD38 抗原以及 HLA-DR 在造血干细胞上的表达情况将造血干细胞分成几个亚类:CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁺细胞约占 89%; CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁻细胞约占 3%; CD34⁺CD38⁻HLA-DR⁻细胞约占 4%; CD34⁺CD38⁻HLA-DR⁺细胞约占 4%。其中 CD38⁺细胞群体具有形态学上的不均一性,是由不同的系列细胞组成。而 CD38⁻细胞群体,形态较均一,集落生成率高,这些细胞具有自我更新能力。在体外培养中,CD34⁻细胞主要可分化形成成为 CFU-E 以及非常少量的 CFU-GM 和 BFU-E。CD34⁺/CD33⁺细胞明显缺乏自我更新能力,这提示这种细胞可能是更早期的造血干细胞。CD34⁺/HLA-DR⁻细胞可以在体外长期培养达 5 周以上,95% 以上的这种细胞处于 G₀ 和 G₁ 期,这表明它们也是比较幼稚的造血细胞。CD34⁺/CD10⁺细胞可能