

国家“九五”重点图书出版规划项目

主编 吴祖泽 贺福初 裴雪涛

造血调控

HEMATOPOIESIS REGULATION



上海医科大学出版社

国家“九五”重点图书出版规划项目

造血调控

HEMATOPOIESIS REGULATION

主 编 吴祖泽 贺福初
编著者 (以姓氏笔画为序)

马恩普 王立生 冯 凯 刘永学
李 梁 李元敏 吴祖泽 邱兆华
施斐曼 宫 锋 贺福初 郭树华
韩 颖 裴雪涛 戴一凡



上海医科大学出版社

·上海·

责任编辑 宫建平 杨家宽

责任校对 袁 庆 赵 霞

图书在版编目(CIP)数据

造血调控 / 吴祖泽 贺福初 裴雪涛主编. — 上海:
上海医科大学出版社, 2000.9

ISBN 7-5627-0551-8

I. 造… II. ①吴… ②贺… ③裴… III. 造血 调
节(生理) 研究 IV. Q462

上海医科大学出版社出版发行

上海市医学院路138号

邮政编码: 200032

昆山亭林印刷总厂印刷

新华书店上海发行所经销

开本 787 × 1092 1/16 印张 19.25 字数 453 000 千字

2000年9月第1版 2000年9月第1次印刷

印数: 1-3 200册

定价: 75.00元

如遇印、装质量问题, 请直接与印刷厂联系调换

(地址: 江苏省昆山市中山路293号 邮政编码: 215300)



主 编 简 介

吴祖泽 1935年10月生，浙江镇海人。1957年毕业于山东大学。1973年赴英国 Paterson 肿瘤研究所进修实验血液学。1993年当选为中科院院士。曾任中国军事医学科学院放射医学研究所所长、中国军事医学科学院院长等职。现任中科院生物学部常委，国务院学位委员会学科评议组成员，《中国科学》、《科学通报》副主编，中国病理生理学会实验血液学专业委员会主任，中国医药生物技术协会血液生物专业技术委员会名誉主任委员，中华医学会常务理事，中华医学细胞生物学会常务理事，全军医学科技委员会副主任，中国人民解放军总后勤部卫生部药品审评委员会主任，全军实验血液学重点实验室主任等职。在放射生物学、造血细胞动力学、造血干细胞移植等领域获国家自然科学二等奖，国家科技进步二、三等奖，军队科技进步一等奖等21项科技成果。著有《造血细胞动力学概论》、主编《造血干细胞移植基础》等书，发表学术论文210余篇。

吴祖泽致力于放射生物学与造血细胞动力学研究。自1975年起在我国引入和传播造血干细胞的基础理论与实验技术。1978年结合自己的实践经验,撰写了我国第一本介绍血细胞生成动力学与造血干细胞研究的专著《造血细胞动力学概论》,1988年主编了《造血干细胞移植基础》一书,对于普及和推进我国造血干细胞移植作出了有益的贡献。

吴祖泽在研究中采用天然的性染色体和性别决定基因作为遗传学标志,结合单个脾集落转移技术,证实了骨髓细胞在受射线照射小鼠脾脏上生成的脾集落是起源于单一细胞增殖与分化的结果。发现这类细胞不仅具有重建髓系细胞的功能,而且具有重建淋巴细胞的功能,澄清了多年来文献中有关脾集落生成细胞性质的争论。在此基础上分析了造血细胞生长因子的分子进化与造血细胞发育的相关性,提出了造血干细胞群的不均一性的科学依据。他领导的“造血干细胞的不均一性与动力学研究”课题,于1987年获国家自然科学二等奖。

吴祖泽在动物和人胎肝细胞性能与移植的实验研究中,比较完整地提出了胚胎发育中肝脏造血和造血干细胞的动态变化规律,并以此为理论依据,合作完成了世界上首例胎肝移植对急性重症骨髓型放射病病人的成功治疗。他领导的“造血干细胞的实验研究与临床应用”成果,于1985年获国家科技进步三等奖。吴祖泽等深入研究了胎肝中刺激造血、刺激肝细胞生长以及低分子抑瘤物等3类因子的纯化与生物学特性。首先发现相对分子质量为15 000的人源性肝细胞生成素,1995年获美国专利,其基因工程研究已列入国家“863”项目。“人肝细胞生成素的发现及其分子生物学系列研究”1999年获国家科技进步二等奖。他发现邻苯二甲酸正丁酯等一类小分子化合物可选择性诱导肿瘤细胞凋亡,由此推进了自体骨髓移植体外净化技术的临床应用。其成果“低分子抑瘤物净化白血病细胞的实验研究及临床应用”1996年获军队科技进步一等奖,“人粒细胞集落刺激因子”1998年获国家二类新药证书。

吴祖泽对造血干细胞的辐射损伤与恢复规律作了深入的研究,系统地阐明了“低剂量率X线或γ线连续照射,引起动物辐射死亡所需要的累积剂量比大剂量一次急性照射要高许多倍”这一现象的机制,从造血干细胞与造血微环境的辐射损伤研究中推测了对造血系统的远期效应。这些动物观察结果已为以后的几起急性或慢性照射引起的事发性放射病病人的病程所证实。



贺福初 1961年5月生，湖南安乡人。博士。中国军事医学科学院放射医学研究所所长、研究员、博士生导师，国家有突出贡献中青年专家，国家杰出青年科学基金获得者。现任中国遗传学会常务理事、中华医学会理事、中国细胞生物学会理事。主要从事细胞调控的分子机制、细胞因子的分子生物学与基因工程研究。承担国家自然科学基金重大、重点项目，国家“863”、“973”项目以及国家“九五”攻关项目等研究课题。发表学术论文200余篇。曾获国家科技进步二等奖和部级科技进步一等奖各1项(均署名1)，部级科技进步二等奖6项(分别署名1、1、1、2、3、5)。1998年获中国青年科学家奖提名奖，1999年获求是青年学者奖。申请中国发明专利7项，获得美国发明专利1项。



裴雪涛 1962年5月生，云南昆明人。博士。中国军事医学科学院野战输血研究所所长、研究员、博士生导师，国家杰出青年科学基金获得者。现任中国病理生理学会实验血液学专业委员会副主任委员兼秘书长，全军血液学专业委员会副主任委员，中国医药生物技术协会血液生物专业技术委员会副秘书长，《中国实验血液学杂志》副主编，《International Journal of Hematology》、《中华放射医学与防护杂志》编委，第一军医大学、第三军医大学客座教授，国际辐射病理学会理事。主要从事干细胞工程、造血调控、细胞治疗与基因治疗等研究。承担国家自然科学基金重点项目，国家“863”、“973”项目以及军队重点项目等研究课题。发表学术论文100余篇。曾获部级科技进步一、二、三等奖各1项(分别署名2、1、2)。

前言

20 世纪中期以来,随着造血细胞动力学与造血干/祖细胞研究的兴起,以及现代免疫学、细胞生物学、分子生物学等学科领域之间的相互渗透,拓展了实验血液学的基础研究,并在与临床血液病治疗的结合中取得了丰硕的成果。

1978 年,笔者编著了《造血细胞动力学概论》一书(科学出版社出版),介绍了造血干细胞基本概念、测试技术以及血细胞生成的动力过程。鉴于对造血干细胞性能研究的进一步深入以及造血干细胞移植临床应用取得的成就,笔者于 1988 年主编了《造血干细胞移植基础》一书(人民卫生出版社出版),介绍了造血干细胞移植中的基础研究与临床应用的进展。近 10 多年来,在造血细胞的发生与发育,造血干/祖细胞的测试与分离纯化技术,造血细胞的增殖、分化与凋亡,造血细胞的迁移与归巢,造血因子与信号转导,造血干细胞移植以及基因治疗等方面又有了新的发展。这样,对一些过去熟悉的内容有必要进一步归纳、整理,对一些新的内容有待学习、消化。适逢上海医科大学出版社约稿,遂构思了本书的编写大纲。我们在繁忙的科研之余,挤出时间潜心写作、切磋研讨,经过大家的共同努力,终于基本完成了本书的预期目标。

本书力求内容新颖,结构合理,理论联系实际。上海医科大学出版社的编辑对全书的法定计量单位、专业术语等进行了规范和统一,使本书在内容与表达上更趋完善。尽管撰写本书各章节的作者都是在这一领域中有丰富实践经验的科学工作者,但由于当今科学发展的惊人速度,难免在取材上有遗漏,在观点上有不妥之处。

实验血液学是一门年轻又富有朝气的新兴学科。谨以此书为关心这一领域发展的同行们提供一份参考和进一步研讨的材料。学习是为了发展与创新,希望这本书的出版对推进我国血液学的进步有所裨益。

吴祖泽

2000 年 4 月 5 日

目 录

第一章 绪 论	吴祖泽	1
第一节 造血细胞的增殖、分化及其调控研究		2
第二节 造血干细胞移植研究		4
第三节 基因治疗研究		6
第二章 造血组织的发生与发育	施斐曼	12
第一节 脊椎动物的早期发育		12
第二节 人胚胎造血组织的发育		14
第三节 胚胎干细胞		26
第四节 影响胚胎造血的若干因素		29
第五节 造血干细胞来源和迁移的生物学特性		33
第三章 血细胞生成	吴祖泽 裴雪涛	37
第一节 血细胞生成		37
第二节 个体发育中的造血变迁		42
第三节 血细胞生成的调控		44
第四章 造血干细胞、造血祖细胞的性能与 测试	冯 凯 裴雪涛	50
第一节 造血干细胞与造血祖细胞的性能		50
第二节 造血干细胞的性能测试		52
第三节 造血祖细胞的性能测试		54
第五章 造血干/祖细胞的分离纯化与体外 扩增	裴雪涛	66
第一节 CD34 的分子生物学		67
第二节 CD34 ⁺ 细胞及其亚群的分离纯化与性能		69
第三节 造血祖细胞的体外扩增与定向诱导分化		73
第六章 造血细胞的迁移与定居	李 梁 裴雪涛	79
第一节 造血细胞迁移与定居的分子基础		79
第二节 造血细胞迁移与定居的可能机制		93
第三节 造血细胞迁移与定居在造血增殖分化中的作用		96

■ 第七章 造血细胞凋亡与造血负调控	王立生 裴雪涛	100
第一节 细胞凋亡的分子机制及基因调节		100
第二节 造血细胞凋亡的特点及其影响因素		105
第三节 趋化因子与造血负调控		108
■ 第八章 造血生长因子及其受体的进化与起源	贺福初	113
第一节 造血生长因子的发育相关进化		113
第二节 造血调控因子与对应受体在进化中的协同性		116
第三节 造血生长因子 cDNA 编码区与非翻译区间的协调进化		118
第四节 造血生长因子的减速进化		121
第五节 根据造血生长因子及其受体进化与起源规律所作预测的验证		123
■ 第九章 造血生长因子受体家族	宫 锋	128
第一节 受体酪氨酸激酶家族		129
第二节 造血生长因子受体超家族		131
第三节 可溶性受体研究概况		134
■ 第十章 造血生长因子与受体的信号转导	刘永学 贺福初	141
第一节 概述		141
第二节 受体蛋白在信号传递中的作用		142
第三节 Ras 通路		147
第四节 JAK-STAT 信号转导通路		150
第五节 展望		152
■ 第十一章 造血生长因子基因剔除和转基因		
动物的生物学表型	郭树华	156
第一节 红细胞生成素基因剔除和转基因小鼠的生物学表型		156
第二节 粒细胞集落刺激因子基因剔除和转基因小鼠的生物学表型		157
第三节 巨噬细胞集落刺激因子缺陷小鼠的生物学表型		158
第四节 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子基因剔除和转基因小鼠的生物学表型		159
第五节 血小板生成素和 c-mpl 基因剔除小鼠的造血缺陷		160
第六节 白血病抑制因子基因剔除和转基因小鼠的生物学表型		161
第七节 干细胞因子和 c-kit 缺陷小鼠的生物学表型		162
第八节 FL 缺陷和 flt-3 基因剔除小鼠的生物学表型		163
第九节 巨噬细胞炎症蛋白-1 α 基因剔除及 CC 趋化因子受体-1 基因剔除小鼠的生物学表型		164

第十节 白细胞介素基因剔除和转基因动物的生物学表型	166
---------------------------------	-----

第十二章 造血生长因子的生物治疗应用

..... 李元敏	182
第一节 红细胞生成素的治疗应用	182
第二节 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和粒细胞集落刺激因子的治疗应用	185
第三节 白细胞介素-2 的治疗应用	205
第四节 白细胞介素-3 的治疗应用	206
第五节 白细胞介素-6 的治疗应用	209
第六节 白细胞介素-11 的治疗应用	211
第七节 巨噬细胞集落刺激因子的治疗应用	212
第八节 干细胞因子的治疗应用	214
第九节 血小板生成素的治疗应用	216

第十三章 造血干细胞移植

..... 冯 凯 马恩普 韩 颖	231
第一节 骨髓造血干细胞移植	231
第二节 外周血造血干细胞移植	235
第三节 脐带血造血干细胞及其临床应用	245

第十四章 造血系统与基因治疗

..... 邱兆华 戴一凡	256
第一节 基因治疗的发展历史及国内外研究现状	256
第二节 基因治疗中的基因转移系统	258
第三节 基因治疗涉及的造血系统靶细胞	262
第四节 血液病的基因治疗	264

英文缩略语	274
-------------	-----

索引	279
汉字	279
外文	289
数字	290

造血是生命活动的重要部分。为了保证人体有恒定的血细胞数量,造血系统必须持续不断地生成新的血细胞,以替换那些已衰老退变的细胞。

第二次世界大战后,为了有效地防治由核武器爆炸产生的电离辐射对人体造血系统的损伤,加强了血液学的实验研究,并迅速扩展到对血细胞生成以及血液病发病机制的研究,逐渐形成了一门新兴的实验血液学(experimental hematology)学科。

细胞形态学分析是实验血液学研究中最基本的技术。20世纪50年代末期,在造血细胞研究中,开展了放射性核素标记和放射自显影技术,揭示了骨髓幼稚细胞增殖、成熟和释放的动力学过程,评价了一些药物对血细胞生成过程的影响。例如,根据造血细胞动力学的估算,一个健康成年人每天大约生成 11.5×10^{10} 个中性粒细胞、 20×10^{10} 个红细胞和 12×10^{10} 个血小板,这些血细胞的总和约重 200 g,即每个健康成年人每年新生的血细胞相当于人体的重量。但是,在一个很长的时期内,用于反映造血功能的方法,如红细胞、粒细胞或血小板的再生能力等,都不是起源于单一细胞的测试技术。

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的概念在20世纪初已经提出,当时对这种细胞的含义不甚明确。20世纪50年代前后,Lorentz等^[1]的骨髓移植实验成功,表明在造血细胞中存在一类原始的造血细胞即造血干细胞,它们具有自我更新(self-renewal)或自我复制(self-replication)并向骨髓各系细胞分化的能力,从而维持了机体的正常造血功能,保证了在生命活动中机体对各类血细胞的需要。1961年,Till和McCulloch^[2]发现对受致死剂量X线或 γ 线照射小鼠移植正常同系小鼠骨髓细胞后,可以在脾脏表面生成肉眼可见的脾集落(又称脾结节)。每一个脾集落称为一个脾集落生成单位(colony forming unit in spleen, CFU-S)。生成脾集落的原始造血细胞符合多能造血干细胞的基本特征,已被公认为一类造血干细胞。这一发现加速了造血干细胞由概念性阶段进入广泛、深入的实验研究阶段,在实验血液学研究史上写下了光辉的一页。

20世纪60年代以后,由于造血干细胞、造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)测试技术的发展和实际应用,使血液学研究有了进一步深入探讨造血和血液病发病机制的可能性。同时,在认识不同来源造血干细胞性能的基础上,为应用造血干细胞移植治疗白血病、再生障碍性贫血(简称再障)、重症联合免疫缺陷病(severe combined immunodeficiency disease, SCID)以及极重度骨髓型放射病或轻度肠型放射病等打开了新的局面。随着科学技术的发展,在血液学研究中引入了细胞生物学、生物化学、免疫学等学科的新理论与新技术,特别是近年来分子生物学研究方法的渗透,血液学已在细胞性能、细胞动力学,尤其在分子与基因水平的造血调控(hematopoiesis regulation)等方面取得了很大的进步。

我国造血干细胞研究始于20世纪70年代^[3~10]。与国外相比,基础薄弱,起步较晚。但是,通过20多年来的不懈努力,在普及与提高、基础与应用等方面都取得了令人鼓舞的进步。

第一节 造血细胞的增殖、分化及其调控研究

血液中的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血小板、红细胞、T细胞、B细胞、单核细胞以及存在于组织中的巨噬细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)、破骨细胞等均起源于多能造血干细胞。机体根据需要,有条不紊地调控造血干细胞的增殖与分化,保持各类细胞数量的相对恒定。

造血干细胞的发生学及其来源问题尚无定论,现已从显微和超微结构水平上研究了人胎肝、骨髓、脾和胸腺的造血发育及其规律。鉴于人早期胚胎取材极难,研究人员设计了鼠胚组织的罗斯小室(Rose chamber)环流培养,使发生学的研究趋于完善,提出在胚胎造血组织发育中间质细胞的发育先于实质细胞,以及在造血干细胞的可能来源中,除迁移外,不能排除造血组织自身分化低的间叶细胞在获得适宜造血微环境的“龕(niche)”中可分化为造血干细胞或造血祖细胞^[11~15]。

在造血组织中,造血干细胞的数量是很少的。目前对造血干细胞的形态有了进一步认识^[16],但还不能直观地研究造血干细胞的分化。通常采用的方法是,在造血干细胞上选择一个天然的或人为的具有遗传学特征的标志,通过对分化细胞中这种特殊标志细胞的识别,从而推论造血干细胞的分化。

在过去的文献中,比较多的是选择辐射诱发的染色体畸变作为识别细胞的标志。近年来,采用反转录病毒(retrovirus,又称逆转录病毒)载体中的外源基因作为细胞遗传标志追踪观察造血干细胞的增殖与分化特性。这类标志的一个弱点是很难估计染色体畸变和外源基因本身对细胞增殖与分化可能带来的影响。人们对由此推导的关于造血干细胞分化的结论,在一定程度上持有疑虑。采用天然的性染色体以及性别决定基因作为细胞遗传标志,结合造血干细胞研究中的单个脾集落转移技术,证实了脾集落的生成是起源于单一细胞增殖与分化的结果。这类细胞不仅具有重建髓系细胞的功能,而且具有重建淋巴细胞的功能。研究结果表明脾集落生成细胞是一类多能造血干细胞,不能笼统地称之为髓系干细胞,从而澄清了文献中多年来争论的脾集落生成细胞究竟是多能造血干细胞还是髓系干细胞的问题。对骨髓、胎肝、外周血等不同来源的脾集落生成细胞功能的比较研究结果表明,有些脾集落生成细胞具有造血干细胞的基本特性,即具有自我更新或重建造血的能力;另一些脾集落生成细胞虽能在照射脾脏中生成脾集落,却失去了造血干细胞的基本特性,从而进入了造血祖细胞的行列。由此澄清了文献中多年来争论的脾集落生成细胞是造血干细胞还是造血祖细胞的问题,支持了在造血组织中还存在一类脾集落生成细胞的前体细胞,提出了造血干细胞群不均一性的科学依据,充实了对造血细胞动力学的认识^[17~20]。

利用单克隆抗体与细胞分化群(cluster of differentiation, CD)抗原相结合的原理,是当前分离和富集造血干细胞的重要技术。1988年,美国斯坦福大学的学者采用上述原理,对致死剂量射线照射的小鼠注射50个经富集的造血干细胞后,动物存活^[21]。这一技术为发展单一造血干细胞的实验研究与实际应用开辟了新的途径^[22~24]。

至今对人类造血干细胞尚无统一、公认的检测方法。根据造血干细胞的表面标志,通常认为人类造血干/祖细胞表达 CD34 抗原,CD34⁺CD38⁻ 是其中一类比较幼稚的细胞亚群。

血细胞是在造血组织这一特定环境中由少数造血干细胞通过不断的细胞增殖和分化生成的。在造血微环境中同时存在着造血细胞和间质细胞,它们之间的相互作用构成了造血调控的重要内容。

体外模拟造血干细胞在体内的增殖与分化活动,从而控制造血干细胞的扩增与定向分化,一直是实验血液学中关注的重大基础与应用课题。1973 年, Dexter 等^[25]建立了造血细胞体外长期液体培养体系,为体外模拟造血迈出了一大步。

对 LACA 小鼠胎肝细胞在骨髓构建的贴壁细胞上作体外长期液体培养,发现培养前后的细胞具有同等重建受致死剂量射线照射小鼠造血的功能。对 9 Gy γ 线照射的 F1(C57BL/6 $\times$ LACA)小鼠输注 5×10^6 个由 LACA 小鼠胎肝细胞经体外培养后生成的造血细胞,动物长期存活率达 70%~80%,对照动物则在照射后 1 个月内全部死亡^[26~28]。

由骨髓细胞构建的贴壁细胞层对造血干细胞增殖与分化的调控是通过构成造血微环境细胞分泌的细胞因子(cytokine)实现的^[29~31]。因此,构建基质细胞系或者选择重组细胞因子的合理组合,是实现造血干细胞体外扩增的另一途径。

1. 构建基质细胞系 在小鼠胎肝细胞体外长期贴壁培养中发现一类基质细胞可以长期传代培养,且持续不断地合成和释放 CFU-S 增殖刺激物,驱使静止期造血干细胞进入活跃的细胞增殖状态,而且证实 CFU-S 增殖刺激物是胎肝基质细胞的基因表达产物^[32]。建立的骨髓基质细胞系,在体外液体培养条件下可以贴壁生长,与骨髓细胞共培养时,可以明显促进造血细胞的增殖^[33,34]。

2. 细胞因子的合理组合 用于体外扩增的造血细胞,主要有骨髓或经动员的外周血或脐带血,它们都含有丰富的 CD34⁺ 细胞。

采用重组人干细胞因子(stem cell factor, SCF)加白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)、白细胞介素-6(IL-6)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、红细胞生成素(erythropoietin, Epo)的组合用于扩增脐带血 CD34⁺ 细胞。经体外培养 7~21 天后,细胞总数可扩增 500 倍,集落生成细胞(colony-forming cell, CFC)可扩增 4 倍,CD34⁺ 细胞则可扩增 24 倍^[35]。

从外周血分离 CD34⁺ 细胞,经 G-CSF、IL-3 和 SCF 组合的造血生长因子(hematopoietic growth factor, HGF)的无基质培养体系培养 6~7 周后,单个核细胞(mononuclear cell, MNC)可扩增 618 倍,产生的大量成熟细胞可用于临床输注^[36]。

根据造血干/祖细胞多向分化的潜能,通过不同细胞因子的组合,还可诱导 CD34⁺ 细胞向红系、巨核系、粒系、淋巴系或树突状细胞等定向分化^[37~44]。

小鼠、大鼠、兔、猴等动物胚胎干细胞系已经相继建立,按当前的实验技术水平建立人胚胎干细胞系,经过体外分阶段的诱导培养和扩增,即胚胎干细胞经过造血干/祖细胞,最终生成血细胞,已是一个可望达到的目标。

血细胞生成是造血干细胞经历连续增殖与分化的结果。在这个复杂的细胞活动中,造血细胞与基质细胞之间通过受体与配体的相互接触,以及细胞因子与造血细胞受体之间相互作用,并通过不同的信号转导通路启动或关闭一系列的基因而实现对造血细胞增殖、分化与凋亡的调控。因此,在搞清造血干/祖细胞基因表达谱的同时,不断发现新的造血调控因

子和加深对细胞增殖与分化调控的分子机制认识的基础上,人类才有可能在血细胞生成障碍疾病的治疗中取得更大的进步。

体外模拟体内的造血活动,一是为了深刻了解造血调控的规律,二是实现血细胞的规模化生产。尽管这是遥远的目标,但是模拟造血微环境或合理的细胞因子组合,实现造血细胞的体外扩增和定向诱导分化,并逐步过渡应用于临床,这已经是一个可以实现的近期目标。

研究造血干细胞的增殖与分化,特别是造血干细胞自我复制的调控、造血干/祖细胞的定向分化与扩增,为进一步发展造血干细胞移植、基因治疗(gene therapy)、临床输血等奠定了基础。

本书第二章至第七章论述了造血细胞的发生、发育、迁移与死亡过程,造血干细胞的增殖与分化性能,造血干/祖细胞测试与体外扩增技术,这些都是研究造血细胞调控的细胞生物学基础。

发育与进化是生物界两个基本的生命活动,但从分子水平上认识发育与进化的相互关系甚少。近30年来,对血细胞的生成过程有了深入的研究,即对血细胞发育中的形态学变化与相应的HGF的分子进化、造血细胞发育的相互关系提供了一个理想的模型。我们根据不同物种各种因子核苷酸编码序列和氨基酸序列的同源性程度,再应用Dayhoff换算表,将种间差异百分率换算为进化的距离,系统分析了HGF的分子进化与造血细胞发育的相关性。研究结果表明,HGF在分子进化上的起源先后与其调控的髓系细胞发育阶段的先后次序恰为一致。在此基础上,又揭示了细胞因子与受体的进化速率之间的一致性,反映了两者的协同进化的特性。这些研究结果加深了人们对生物体内存在的数量庞大又似乎是杂乱无章的多肽因子之间内在联系的了解,丰富了人们对生物学自然规律的认识^[45]。

尽管目前对造血调控的机制还远远没有弄清,但是已经明确可以影响造血的生长因子与抑制因子至少有30多种。本书第八章至第十二章论述了在造血调控中存在着繁多的细胞因子,它们之间有着内在规律性的协同作用,构成了相互关联的网络系统。这些因子与细胞受体的相互作用引发了细胞内部发生的一系列生物化学反应,最终决定了造血干细胞及其子细胞的增殖、分化、成熟、释放以及衰老、凋亡等生理活动。

造血细胞是体内更新速率极快的一类细胞,每时每刻有大量的血细胞生成与凋亡。血细胞的正常凋亡过程发生障碍,是导致造血系统恶性肿瘤发生的一个重要原因。在当前化疗的基础上,深入探索正常细胞与肿瘤细胞的凋亡机制,并以此为理论依据,发展一类新型的选择性诱导肿瘤细胞凋亡的肿瘤治疗药物,将是肿瘤治疗中一个重要的研究任务。

造血调控研究是造血的基础研究,它对于阐明造血机制以及造血系统疾病的诊断、治疗和病因分析等都具有重要的作用。

第二节 造血干细胞移植研究

近30年来的实践表明,造血干细胞移植是难治性血液病(如白血病、再障、免疫缺陷病)治疗中一个有效的措施,也是大剂量细胞毒性制剂和放射线导致严重造血损伤救治中的一个不可缺少的重要措施。

造血干细胞主要存在于骨髓、外周血(含脐带血)以及胎儿肝脏中^[46~49]。正常动物外周血中造血干细胞数量极少。多种物质,如抗肿瘤药物、细胞因子、紫色杆菌内毒素以及我

国自行合成的低相对分子质量(relative molecular mass, M_r)硫酸葡聚糖(M_r 为 10 000)等,都可以大幅度提高循环血液中造血干细胞浓度^[50]。

提高造血干细胞在造血组织中的植入率是造血干细胞移植成败或者移植后造血重建快慢的一个关键,曾经从改变造血微环境或改变造血干细胞性能方面作了探索性研究^[51,52]。例如,对受射线照射小鼠同时输注胸腺细胞与骨髓细胞,有利于改善造血干细胞植入的微环境,提高造血干细胞的植入率^[53]。动物实验表明,胎肝造血干细胞在成年骨髓中的植入率低;而胎肝造血干细胞经体内或体外培养后可以模拟体内造血干细胞而发育成熟,提高在成年造血微环境中的适应性,从而提高植入率^[54]。从脐带血分离的 CD34⁺细胞经与 GM-CSF、IL-3 或两者联合培养后,在成年骨髓基质中的植入率可由 36% 增加到 68% ~ 69%^[55]。这些事实支持了造血细胞在移植前作短期体外培养,有利于移植后的造血重建。如能大幅度提高造血干细胞的植入率,则用于移植所需采集的造血干细胞数量可大幅度减少。

骨髓中的造血干细胞是通过一些黏附分子,如血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)、CD44、细胞间黏附分子-3(ICAM-3)、极晚抗原-4(VLA-4)等,紧密黏附于基质上的。造血干细胞与骨髓基质细胞之间通过黏附分子起到组织定位,同时,通过信号转导启动造血干细胞的增殖、分化、凋亡、休眠等生理活动。一些动员剂可以降低造血干细胞表面黏附分子的数量,促进造血干细胞脱离骨髓而进入血液。然而,在骨髓移植中回输的造血干细胞表面的黏附分子又在造血干细胞归巢(homing)中起着重要的作用。例如,最近发现造血细胞上普遍存在一类 CXCR4 受体,而造血基质细胞则分泌基质细胞来源因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)细胞因子。后者是 CXCR4 受体的配体,尤为重要。SDF-1 α 对造血细胞是一个很强的化学趋化物(chemoattractant),因而对造血细胞的迁移与黏附起着十分重要的调节作用。研究指出,正常造血干细胞表面很少表达 CXCR4 受体,但是经过与一些细胞因子(如 IL-6、SCF)共同孵育后,可以诱导 CXCR4 表达,从而提高移植造血干细胞的植入率。因此,上调造血干细胞的 CXCR4 表达,有利于移植后的造血重建^[56~59]。如果这一基础研究成果进一步发展完善,并获得临床验证,则无论在移植的细胞数量或移植细胞来源的选择上,都将对现行的造血干细胞移植产生深远的影响。

1990 年以来,国外自体造血干细胞移植的病例数大幅度增长。在自体造血干细胞移植中,外周血造血干细胞(peripheral blood stem cell, PBSC)已经成为造血干细胞的主要来源。

根据我国控制人口的国策,独生子女的家庭比例将不断增加。因此,在开展同种异基因骨髓移植(allogenic bone marrow transplantation, Allo-BMT)的同时,应当充分重视自体造血干细胞移植(包括骨髓与外周血造血干细胞移植)在肿瘤与血液病治疗中的积极作用;结合大剂量放疗、化疗,还需重视和发展净化的自体造血干细胞移植,以提高临床疗效^[60,61]。

自 1989 年 Gluckman 等^[62]采用脐带血造血干细胞移植成功治疗 1 例儿童范科尼贫血(Fanconi anemia)后,对脐带血造血干细胞能否成为一个普遍适用的、新的造血干细胞来源,现已成了一个研究热点。

1996 年, Kurtzberg^[63]证明,采用 3 个不匹配的人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)无关供者的脐带血造血干细胞植入儿童患者体内,可以实现各系血细胞的重建,且不产生严重的移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)。这说明儿童对移植 HLA 不匹配的脐带血造血干细胞有惊人的耐受能力。

同年, Laporte 等^[64]报道了将脐带血造血干细胞移植给 1 例无关的 26 岁慢性粒细胞白

血病(chronic myelocytic leukemia, CML)女性患者(体重为 55 kg,每千克体重接受的脐带血有核细胞数量仅为 10^7 个)获得成功。这证明了脐带血造血干细胞可以在成人体内植活。移植的脐带血细胞数量不是移植成功的惟一因素,而移植的脐带血造血干细胞比成人骨髓造血干细胞具有更强的自我更新能力,可能起到更为重要的作用,这进一步显示了脐带血造血干细胞更具有实际应用的前景。

造血干细胞具有自我更新的能力,因而,通过移植后的增殖与分化,可以重建各系血细胞;同时,利用造血干细胞作为靶细胞,转入各种目的基因,可以用于基因治疗。这样,脐带血作为一个新的造血干细胞来源,扩大了造血干细胞移植的临床应用范围。

根据脐带血细胞的临床移植进展,各国已着手建立脐带血细胞库。组建脐带血细胞库,发展脐带血细胞生物(基因)治疗,是一个集细胞工程、基因工程、安全性检验、细胞运输与临床应用等多环节协调、多学科密切合作的系统工程。这一工程的完成,将为推进人类对疑难疾病的治疗作出新的贡献。

本书第十三章专题介绍了造血干细胞移植的研究进展。

第三节 基因治疗研究

随着人类对自身认识的不断深化,从人体解剖学开始,已经进入了细胞和分子病理生理学研究,特别是从基因水平上阐明人类遗传与疾病这一核心本质的研究。

目前人类基因组计划已经从结构基因组进入功能基因组研究,它对疾病的诊断、预防与治疗将产生深远的影响。

1980 年, Cline 等^[65]证明对骨髓细胞转导耐药基因后可以提高转导细胞的药物耐受性。这些初步的动物实验结果展示了造血干细胞基因治疗在肿瘤以及已知基因缺损的遗传病治疗中的发展前景。

凡是同种异基因造血干细胞移植可以治疗的非恶性造血-免疫系统疾病,例如 SCID、珠蛋白生成障碍贫血(地中海贫血)、范科尼贫血等,原则上都可以通过自体造血干细胞经转导基因后再行移植而取得类似的治疗效果。造血干细胞具有自我更新能力,对造血干细胞转导目的基因后实施基因治疗,具有巨大的治疗潜力。

与骨髓及外周血造血干细胞相比,脐带血造血干细胞对反转录病毒介导的基因转导具有更高的转导率和稳定表达的优点。因而,脐带血有可能成为基因治疗的一个最佳细胞来源。

1995 年, Kohn 等^[66]对 3 例 SCID 的婴儿,采用各自的脐带血 $CD34^+$ 细胞,通过反转录病毒转导正常人腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)的 cDNA,然后作自体移植。在移植后 18 个月的观察期间,均可见骨髓和血液白细胞中的 ADA 基因表达。

脐带血细胞的基因治疗除了适用于 SCID 外,还可望通过转导葡糖脑苷脂酶(glucocerebrosidase)基因治疗比较常见的戈谢病(Gaucher disease,旧名高雪病),以及转导耐药基因来提高对肿瘤的治疗效果等。

基因标志技术的发展对造血细胞的分化与分布规律,以及对肿瘤(含白血病)在放疗与化疗后的原发病复发机制提供了更科学的解释。例如,自体骨髓移植中对移植细胞的“净化”,是降低移植后原发病复发的有效措施。

转导基因的转导率及其在体内的持续表达是造血干细胞基因治疗成功的先决条件。在可供基因转导的载体中,目前仍以反转录病毒为主体。然而,与小鼠造血干细胞的基因治疗不同,反转录病毒对人类造血干细胞的转导率较低,这对于从临床上改善大多数造血系统疾患是不利的。因此,提高转导基因的转导率及其在体内的持续表达,已经成为造血干细胞基因治疗进一步发展所面临的一个关键问题^[67]。

肿瘤是当今危害人类健康的严重疾病之一。尽管肿瘤基因治疗还处于实际应用的早期阶段,但是它已成为基因治疗中的一个主要研究领域。

肿瘤基因治疗是对肿瘤细胞或造血干细胞转移一个或几个有功能的基因,它的表达产物有利于杀伤肿瘤细胞,或保护正常细胞免受化疗与放疗的严重伤害。

在肿瘤化疗中,肿瘤细胞的多药耐药性(multiple drug resistance, MDR)是一个主要障碍。多数死于肿瘤的病人都与肿瘤复发或获得性耐药性有关。自从发现多药耐药基因(multiple drug resistance gene, MDRG)及其分子机制后,如何提高造血干/祖细胞内与耐药有关的蛋白或酶水平,已经成为肿瘤基因治疗研究中的一个热点^[68]。

当肿瘤细胞产生耐药性时,并不妨碍肿瘤的免疫治疗。肿瘤免疫基因治疗主要是将一个或若干个免疫相关基因转入肿瘤细胞,以增强其免疫原性,提高肿瘤免疫治疗的效果。其中,抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)的肿瘤抗原呈递以及肿瘤细胞表达细胞因子、共刺激分子(B7)、黏附分子等是影响肿瘤免疫治疗效果的关键。

自杀基因(suicide gene)是指一些酶的基因。通过它们在肿瘤细胞内的表达,可以将无毒的药物前体(pro-drug)转化为有细胞毒性的药物,达到杀死肿瘤细胞的目的,同时增强肿瘤免疫反应。在肿瘤自杀基因治疗中,要防止自杀基因进入正常细胞,以及在药物作用下产生对正常细胞的毒性作用。

肿瘤是基因病,肿瘤发生的遗传背景是肿瘤基因或肿瘤抑制基因的异常。因此,肿瘤的基因治疗包括对肿瘤基因与肿瘤抑制基因治疗两个方面。针对肿瘤基因异常,可以采用反义寡核苷酸、反义核酸或核酶(ribozyme)等治疗策略;对于肿瘤抑制基因的异常,则可采用基因置换治疗,即将一个野生型肿瘤抑制基因转入肿瘤内,促使肿瘤细胞发生凋亡或恢复其正常细胞功能。

随着肿瘤分子生物学的发展,一些新的细胞因子不断被用于基因治疗,例如抑瘤素 M (oncostatin M, OSM)、血管生成抑制因子(angiostatin)和内皮抑制因子(endostatin)等。

在载体选择方面,要从对基因表达的时间长短、靶细胞转导效率以及可能产生的毒性作用等方面综合权衡。目前常用的载体以改构的反转录病毒与腺病毒(adenovirus, Ad)为主。腺病毒相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一个有发展前景的病毒载体。

肿瘤是一个多基因疾病。根据发病机制采用多基因治疗方案,应当更有利于从自身和环境两个方面促进肿瘤细胞的凋亡与解体。基因治疗研究的一个重要方面是发展基因治疗的运载系统,使携带的基因具有更高的靶向性、杀伤性与稳定性。当前肿瘤基因治疗主要集中在对实体瘤的研究与临床试验。在造血系统恶性肿瘤(如白血病)中,癌细胞的弥散分布不利于基因治疗中的基因转移。然而,易于从恶性肿瘤病人的外周血中采集癌细胞,又为研究肿瘤基因治疗以及制备瘤苗等创造了方便条件。因而,造血系统恶性肿瘤是肿瘤基因治疗中一个值得开拓的重要领域^[69~85]。

基因治疗研究将是今后 50 年内可望取得重大成就的研究领域。由于基因治疗与造血