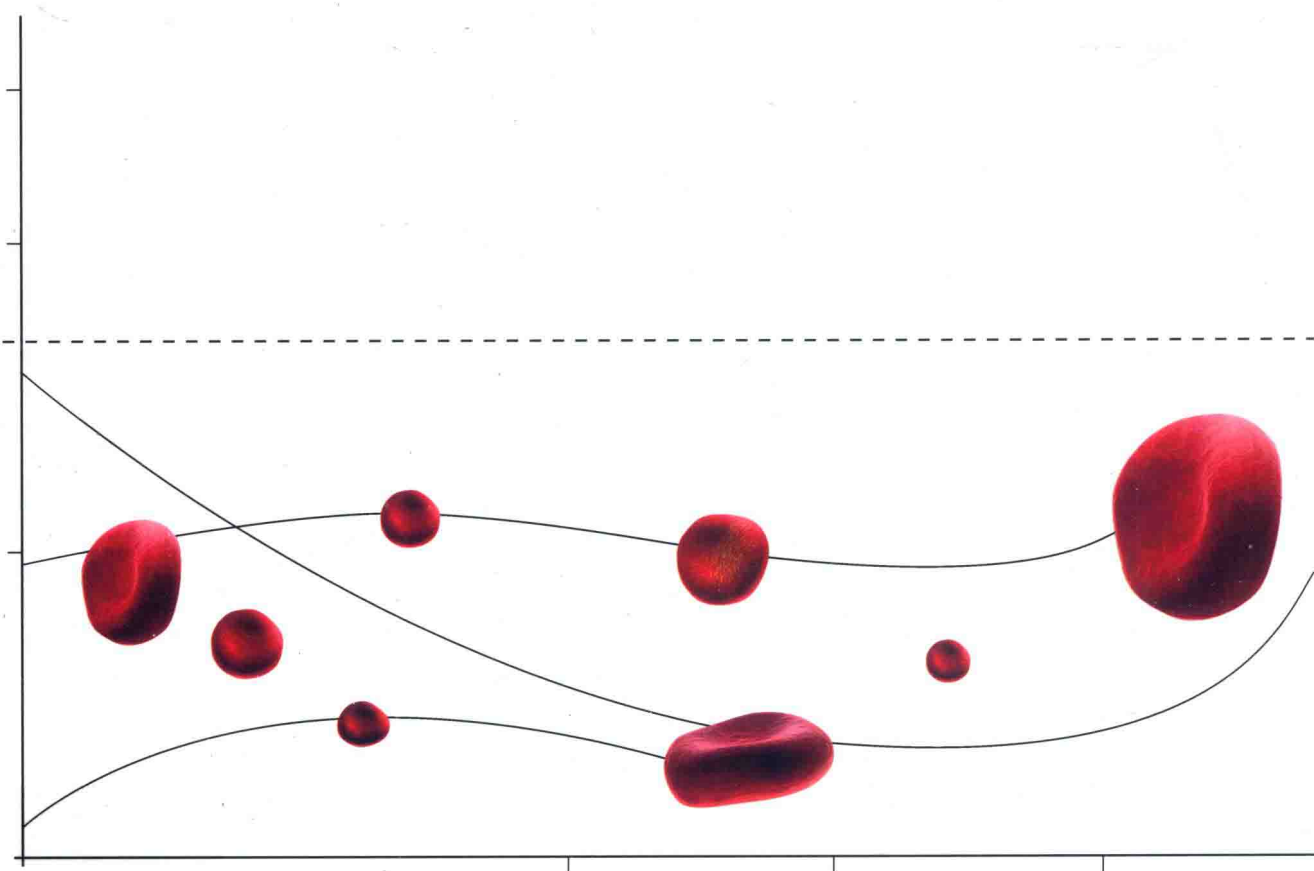


“十二五”国家重点出版物出版规划项目
2016年四川省重点资金资助项目
毒理学安全性评价系列丛书

药物血液 毒理学与检测方法

YAOWU XUEYE DULIXUE YU JIANCE FANGFA

主编 / 潘东升 范玉明 张 舒



电子科技大学出版社

“十二五”国家重点出版物出版规划项目
2016年四川省重点资金资助项目
毒理学安全性评价系列丛书

药物血液 毒理学与检测方法

YAOWU XUEYE DULIXUE YU JIANCE FANGFA

主编 / 潘东升 范玉明 张 舒



电子科技大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

药物血液毒理学与检测方法 / 潘东升, 范玉明,
张舒主编. —成都: 电子科技大学出版社, 2016. 7

(毒理学安全性评价系列丛书)

ISBN 978-7-5647-2716-1

I. ①药… II. ①潘… ②范… ③张… III. ①血液—
药理学—毒理学 IV. ①R322.2②R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 185643 号

内 容 提 要

本书共 9 章, 前 5 章较详细地描述了包括血液毒理学的研究方法、血液与造血系统概述、红细胞毒性评价、白细胞毒性评价和血小板及凝血系统的毒性评价。后 4 章主要包括血液毒性的实验室检查方法、实验数据的统计分析 with 结果解释, 以及为了保证数据质量而必需的质量保证与质量控制程序和分析仪器的验证。

本书被列为“十二五”国家重点出版物出版规划项目, 该书的突出特点是侧重于血液毒性数据的统计分析 with 结果解释, 以及为保证数据质量而必须采取的措施, 可作为新药血液毒性安全性评价的参考书。

毒理学安全性评价系列丛书

药物血液毒理学与检测方法

主编 潘东升 范玉明 张 舒

出 版: 电子科技大学出版社 (成都市一环路东一段 159 号电子信息产业大厦 邮编: 610051)

策划编辑: 汤云辉

责任编辑: 汤云辉

主 页: www.uestcp.com.cn

电子邮箱: uestcp@uestcp.com.cn

发 行: 新华书店经销

印 刷: 成都蜀通印务有限责任公司

成品尺寸: 205 mm×280mm 彩插 24 页 印张 11 字数 289 千字

版 次: 2016 年 7 月第一版

印 次: 2016 年 7 月第一次印刷

书 号: ISBN 978-7-5647-2716-1

定 价: 128.00 元

■ 版权所有 侵权必究 ■

◆ 本社发行部电话: 028-83202463; 本社邮购电话: 028-83201495。

◆ 本书如有缺页、破损、装订错误, 请寄回印刷厂调换。

前 言

药物毒理学安全性评价的目的是为了确保人用药物的安全。血液是药物作用最常见、最敏感、最大的靶器官,某些药物直接或间接作用于血液及造血系统,造成可逆和不可逆性的血液细胞和骨髓各种复杂的损伤。突出表现在有药源性红细胞病(包括药源性再生障碍性贫血、药源性纯红细胞性再生障碍性贫血、药源性巨幼细胞性贫血、药源性溶血性贫血、药源性铁粒幼细胞性贫血)、药源性白细胞病(包括药源性粒细胞减少症、药源性白血病)以及药源性出血性疾病(包括药源性血小板减少症、药物性血小板功能障碍、药源性紫癜、弥散性血管内凝血)等三大类;此外,药物的血液毒性往往要早于其他毒性指标的改变,血液毒性的研究可以发现药物的早期毒性。目前,在国内还没有一本专门介绍动物血液毒理学研究方法的参考书,常规毒理学安全性评价要求检测的血液学指标仅仅是基本项目,且在标准化方面没有特别强调,缺少用于分析质量控制的血液学标准品,该书的出版必将填补国内空白。

主编及作者主要来自中国食品药品检定研究院食品药品安全评价研究所临床检验实验室,该实验室通过了国际公认的美国病理学家学会(College of American Pathologists, CAP)的实验室认可,也是目前国内唯一通过CAP认可的专门从事临床前药物安全性评价研究的临床检验实验室,作者将这些国际的先进管理经验及知识汇集在我们的书中,必将为药物安全性评价临床检验实验室走向世界带来益处。

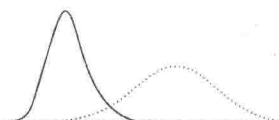
全书共分9章及9个附件,主要讨论了动物血液毒理学研究概况,血液与造血系统,红细胞毒性评价,白细胞毒性评价,药源性凝血系统毒性评价,血液毒性的常规实验室检查,数据分析与结果评价,质量保证与质量控制,血液分析仪器的3Q验证。附件汇集了血液毒理学的各种参数,标准操作规程,仪器设备管理,文件管理等。

本书适用于从事药物安全性评价的工作人员,也可作为从事药物研发领域的科研工作者,从事生命科学的研究者,医(药)学(院)校教师、研究生和药品检验人员的参考书。

在编写时，苗玉发和刘芳同志共同参与了背景数据的收集及血液涂片的制备，在此表示衷心的感谢。衷心感谢成都电子科技大学出版社的大力支持；衷心感谢“十二五”国家重点出版物出版规划项目和2016年四川省重点资金资助项目的支持！

由于编者专业知识与临床经验的限制，对于书中存在的错误和不足，恳请读者提出意见和批评。

编 者
2016 年 5



目 录

第一章 概述.....	1
第一节 毒性靶器官.....	1
第二节 血液毒性研究方法.....	1
第三节 数据分析及结果评价.....	3
第二章 血液与造血系统.....	5
第一节 造血系统与血细胞的生成.....	5
第二节 血液.....	12
第三节 血细胞.....	13
第三章 红细胞毒性评价.....	17
第一节 红细胞动力学.....	17
第二节 红细胞的种属特征.....	17
第三节 与红细胞相关的血液毒性.....	18
第四节 血液毒性评价方法.....	26
第四章 白细胞毒性评价.....	35
第一节 白细胞动力学.....	35
第二节 白细胞的种属特征.....	36
第三节 与白细胞相关的血液毒性.....	37
第四节 毒性评价方法.....	44
第五章 血小板及凝血系统的毒性评价.....	50
第一节 血小板动力学.....	50
第二节 凝血与止血过程.....	50
第三节 血小板与凝血指标的种属特征.....	50
第四节 与血小板及凝血系统相关的血液毒性.....	51
第五节 毒性评价.....	54
第六章 血液毒性的常规实验室检查.....	59
第一节 血液学检查.....	59
第二节 骨髓检查.....	64
第三节 体外骨髓抑制实验.....	68
第七章 数据分析与结果评价.....	73
第一节 临床病理数据的变异.....	73

第二节 临床病理数据的特点.....	79
第三节 临床病理数据的统计分析.....	80
第四节 生物参考区间.....	82
第五节 临床病理结果的解释.....	84
第六节 血液学检测结果的解释.....	88
第八章 质量保证与质量控制.....	92
第一节 分析前质量保证与质量控制.....	92
第二节 分析中的质量控制.....	95
第三节 分析后质量评估.....	97
第四节 实验室内部质量控制.....	98
第五节 质量保证检查.....	106
第六节 室间质量评价常见问题分析.....	107
第九章 分析仪器的 3Q 验证.....	110
第一节 设计验证.....	110
第二节 安装验证.....	110
第三节 操作验证.....	111
第四节 性能验证.....	111
第五节 血细胞分析仪的校准及校准确认.....	118
附录一 常用实验动物血液学指标参考范围.....	122
附录二 常用实验动物骨髓细胞数量.....	124
附录三 自动血液分析仪测定参数假性升高或降低的原因分析及解决方法.....	125
附录四 实验动物血液样本采集的操作规程.....	127
第一节 前言.....	127
第二节 材料.....	127
第三节 动物的准备.....	127
第四节 麻醉剂的使用.....	127
第五节 采血时间段.....	127
第六节 采集顺序.....	127
第七节 采集方法.....	128
第八节 样本收集.....	129
第九节 样本管的标记.....	129
第十节 实验记录.....	129
附录五 样本的运输、接收、处理、检测及保存的操作规程.....	130
第一节 前言.....	130
第二节 范围.....	130

第三节 流程.....	130
附录六 分析仪器的管理规定.....	133
第一节 建立档案.....	133
第二节 标识.....	133
第三节 使用手册.....	133
第四节 保养与维护.....	133
第五节 仪器验证.....	134
第六节 异常情况处理.....	134
第七节 辅助仪器设备.....	135
附录七 试剂的选择和评价程序.....	136
第一节 试剂的采购.....	136
第二节 实验室登记.....	136
第三节 试剂的标识.....	136
第四节 试剂的准备.....	136
第五节 试剂的使用.....	136
第六节 试剂的废弃.....	137
第七节 试剂的更换.....	137
第八节 试剂比对.....	137
第九节 试剂混用.....	137
附录八 文件的控制程序.....	138
第一节 程序文件的编制.....	138
第二节 文件编号.....	138
第三节 文件审批.....	138
第四节 文件使用.....	138
第五节 文件的修改.....	138
第六节 文件的审核.....	139
第七节 文件的废弃.....	139
附录九 CLIA'88 血液学允许误差	140
附录十 缩略词.....	141
附录十一 食蟹猴外周血图谱.....	145
附录十二 恒河猴外周血图谱.....	150
附录十三 Beagle 犬外周血图谱.....	155
附录十四 SD 大鼠外周血图谱.....	160
附录十五 Wistar 大鼠外周血图谱	164

第一章 概 述

血液毒理学又称造血系统毒理学,是研究外来物质对血细胞与造血器官所致的有害作用、作用机制及实验治疗的一个毒理学分支;是毒理学中关于靶器官毒理学的一种,主要介绍外来物质与肌体交互作用导致靶器官损伤的基本原理、规律和评价方法。损害造血系统或直接损害血细胞的有药物、化学毒物、生物毒素及电离辐射等。药物对血液和造血组织产生毒害效应,从而影响血液的形成和功能,主要包括:对红细胞的毒性作用、对白细胞的毒性作用、对血小板的毒性作用以及骨髓抑制。如血液中一种或多种成分直接受到药物的影响,这种效应称为原发性血液毒性效应,当毒性效应作为其他组织损伤或系统紊乱的一种反应结果时,这种效应则被称为继发性血液毒性效应。原发性毒性效应被认为是药物比较严重的反应,由于血细胞能反映出药物对其他组织局部和系统的影响,所以继发毒性效应更为常见。

第一节 毒性靶器官

血液与药物接触频率较高以及造血组织的高增值特点,使得血液与造血系统易受药物的攻击而产生毒性。进入肌体的各种药物在吸收后首先进入血液,并达到较高的浓度,在分布、代谢和排泄等过程中都依靠血液来运输,所以血液更容易受到损伤;同时,造血系统具有携带氧气、维持血管完整性及参与肌体免疫等重要的生理功能,并具有高速增值分化的特性,使其对药物毒性具有极高易感性,因此,血液系统比肌体的其他组织器官更容易受到药物的损伤。

第二节 血液毒性研究方法

药物毒性研究的目的有两个,识别化合物毒性作用的靶器官或靶组织,以及急性和慢性暴露剂量,在该剂量下组织可以耐受而不产生临床症状。第一个目标是定性的,主要涉及不同组织的毒性比较,最佳方法是体内实验,因为在体内几乎所有的器官均会暴露于外源物质。第二个目标是定量评估靶器官可以耐受的毒性暴露剂量,如直接使用靶器官或靶细胞进行评价,体外血液毒理学即可满足此目标^[1]。体内研究的血液毒性预测主要依据临床检验血液学参数(如外周血细胞计数)、骨髓的细胞学和组织学检查以及其他特殊的检查,然后根据这些结果预测人类的血液毒性作用。

在大多数的研究中,血细胞均要暴露于药物或其代谢产物,毒性反应可能是由母体药物引起的,也可能是由其中的一个或多个代谢产物引起的,具有相同结构的药物可能产生不同的副作用。体外模型可能不能够模拟受试物体内吸收、分布、代谢及排泄过程(Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, ADME)的特征,有时可能体内体外均观察不到毒性反应,如一个受试物在体外不能代谢为产生毒性的活性代谢物,相反,体外观察到的毒性可能是因为使用的剂量要远远高于体内研究的毒性反应剂量^[2]。

一、体外实验

大多数的抗癌药物和抗艾滋病病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)的药物能产生

严重的骨髓毒性进而限制其临床应用^[3-7],所以造血组织的潜在毒性应该在药物开发的早期进行评价,但是通常的动物肿瘤模型(如裸鼠移植人或鼠源性的肿瘤)的研究结果对人类临床药物效应动力学和药物代谢动力学只有很小的预测价值,很多药物因为严重的骨髓抑制在 I 期临床研究中被迫终止。利用集落形成单位作为骨髓抑制替代标记的体外血液毒性评价方法,在链接实验动物毒性研究与临床调查中起着关键性作用^[8]。

二、体内实验

目前,实验动物被广泛地用来预测血液毒性。外源物质的生物利用度和毒性是一个复杂的相互反应过程,这些相互反应在不同种属间有差异,所以在不同种属观察到的毒性不一样。监管机构要求在新药、化学品和食品添加剂被批准前,至少要进行两个种属动物的体内毒性研究,其中包括一个非啮齿类动物研究。

体内实验最常用的动物种属是大鼠、小鼠、犬和非人灵长类动物,啮齿类动物实验操作相对简单,且较容易获得大量关于造血细胞的信息。使用犬作为研究对象的优势主要有:其血液学特点与人类相似,犬的体积较大可以持续监测血细胞和骨髓细胞的变化^[9]。外源化合物暴露后产生的血液毒性结果可以通过 4 个主要的参数来描述:血细胞计数改变的严重程度(血球减少或血球增多)、从暴露开始到产生严重毒性的时间、最低点的时间和毒性恢复时间(可逆性的程度)^[10]。体内实验获得的数据也是决定 I 期临床研究的最高剂量的标准,通常是小于动物最大耐受剂量的 10 倍^[11]。

(一) 体内实验设计

通常一个受试物要选择两种动物进行研究,包括啮齿类和犬(或者是非人灵长类)。对于单克隆抗体毒性研究动物模型的选择,应该选择与人具有交叉反应或有相同靶抗原的动物种属。动物种系的选择,如大鼠的选择通常是实验室长期的经验和历史的累积数据进行选择。临床前实验研究通常遵循药物临床前研究质量管理规范(Good laboratory practice, GLP),如果条件允许,尽可能进行一个预实验^[12-15]。

体内动物实验包括单次给药(急性暴露)和多次给药后(重复暴露)毒性研究。多次给药的周期有多种,包括短期重复给药(给药周期小于动物正常寿命的 5%)、亚急性(给药周期为动物正常寿命的 5%~20%)和长期慢性给药(所占比例较高,或者是整个寿命期间均给药,如 2 年)^[16]。给药的途径包括经口、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、吸入、腹腔注射和黏膜给药等。

血液毒性的评价主要是进行血液学检查和骨髓检查,根据实验周期、给药频率、受试物的生物学活性及动物血细胞的寿命等特点设计采血的频率,进行持续的监测。

对于小鼠来说,受血容量的限制,一只动物无法同时进行血液及生化的测定,在实验设计时,选择一组动物进行血液学测定,另一组动物进行生化的测定。小鼠通常不进行凝血实验的检查,但是,如果受试物对凝血功能有影响,应进行测定。

(二) 实验室检查

体内实验主要依靠血液学检查和骨髓检查来评价药物对血液系统的毒性作用,全血细胞计数是评价血液系统毒性最为基本的方法。

血液学检查,包括凝血的检查,常规血细胞计数检测的项目有:红细胞(Red blood cell, RBC)、血红蛋白(Hemoglobin, HGB)、血细胞比容(Hematocrit, HCT)、红细胞平均容量(Mean corpuscular volume, MCV)、红细胞平均血红蛋白量(Mean corpuscular hemoglobin, MCH)、

平均血红蛋白浓度 (Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、红细胞分布宽度 (Red blood cell distribution width, RDW)、网织红细胞 (Reticulocyte, RETIC)、血小板 (Platelets, PLT)、平均血小板体积 (Mean platelet volume, MPV)、白细胞 (White blood cell, WBC)、白细胞分类计数 (中性粒细胞 (Neutrophilic granulocyte, NEUT)、淋巴细胞 (Lymphocyte, LYMPH)、单核细胞 (Monocyte, MONO)、嗜酸性粒细胞 (Eosinophilic granulocyte, EOS)、嗜碱性粒细胞 (Basophilic granulocyte, BASO), 这些指标在自动血液分析仪中全部可以得到。凝血实验常规进行凝血酶原时间 (Prothrombin time, PT)、部分凝血活酶时间 (Activated partial thromboplastin time, APTT)、纤维蛋白原 (Fibrinogen, FIB) 和凝血酶时间 (Thrombin time, TT) 的检测, 受试物引起凝血异常较为少见, 所以, 如果动物血容量有限, 此实验可不进行。

骨髓检查, 实验结束时每只动物需要制备骨髓涂片, 但毒理学研究中通常不进行骨髓涂片检查, 如出现连续的外周血异常改变 (此改变与骨髓功能相关), 应进行骨髓涂片镜下检查, 结合骨髓镜检的异常改变, 即可评价受试物对骨髓的影响。但是只在一个时间点进行骨髓采集, 并不能真正反应出受试物的毒性, 因为对于急性骨髓毒性, 在不同的时间点上其细胞变异会很大。因此, 对于此类相关毒性, 需要进行特殊的实验设计, 如利用流式细胞技术进行骨髓细胞的定量分析, 对于毒性评价很有帮助^[17]。

其他检查, 如高铁血红蛋白测定、海因小体 (Heinz body, Heinz 小体) 检测作为受试物引起氧化损伤的指标; 血小板功能实验用来检测直接作用于血小板的受试物等。

第三节 数据分析及结果评价

数据统计分析, 实验室检查的定量数据及其他数据应该用合适的统计方法进行处理, 比较给药组与对照组的差异, 以及是否存在剂量依赖关系, 对于犬和非人灵长类动物还需要比较给药前与给药后的数据。

结果解释, 经统计分析后, 不论统计结果如何, 最终都需要对受试物的毒性效应进行科学的解释。单独统计学差异不可以用来判断毒理学或生物相关的临床病理结果。此外, 没有统计学意义也不能排除受试物无毒性效应。对照组的数据比历史的参考范围更适合作为给药组的参考。在结果解释时, 须结合临床症状及组织病理的改变以及其他实验室检查进行综合评价。

参 考 文 献

- [1] Parchment RE. Alternative testing systems for evaluating noncarcinogenic, hematologic toxicity [J]. Environ Health Perspect, 1998, 106 (Suppl 2):541—557.
- [2] Evans GO. Animal hematotoxicology: A practical guide for toxicologists and biomedical researchers [M]. New York: CRC Press, 2008:2.
- [3] De Jager R, Cheverton P, Tamanoi K, et al. DX-8951f: summary of phase I clinical trials [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 922:260—273.
- [4] Pitot HC, Goldberg RM, Reid JM, et al. Phase I dose-finding and pharmacokinetic trial of irinotecan hydrochloride (CPT-11) using a once-every-three-week dosing schedule for patients with advanced solid tumor malignancy [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6 (6):2236—2244.
- [5] Grochow LB, Rowinsky EK, Johnson R, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of topotecan in patients with advanced cancer [J]. Drug Metab Dispos, 1992, 20 (5):706—713.
- [6] Dahut W, Harold N, Takimoto C, et al. Phase I and pharmacologic study of

9-aminocamptothecin given by 72-hour infusion in adult cancer patients [J]. J Clin Oncol, 1996, 14 (4) :1236—1244.

[7] Gribaldo L, Malerba I, Collotta A, et al. Inhibition of CFU-E/BFU-E by 3“-azido-3”-deoxythymidine, chlorpropamide, and protoporphirin IX zinc(II): a comparison between direct exposure of progenitor cells and long-term exposure of bone marrow cultures [J]. Toxicol Sci, 2000, 58 (1) :96—101.

[8] Masubuchi N, May RD, Atsumi R. A predictive model of human myelotoxicity using five camptothecin derivatives and the in vitro colony-forming unit granulocyte/macrophage assay [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (19) :6722—6731.

[9] Deldar A, Stevens CE, Rodocker KB. Canine BFU-E progenitors: adaptation of a reproducible assay and anatomical distribution [J]. Int J Cell Cloning, 1991, 9 (6) :579—593.

[10] Pessina A, Malerba I, Gribaldo L. Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and preclinical trials [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11 (8) :1055—1065.

[11] Parchment RE, Huang M, Erickson-Miller CL. Roles for in vitro myelotoxicity tests in preclinical drug development and clinical trial planning [J]. Toxicol Pathol, 1993, 21 (2) : 241—250.

[12] 药物临床前研究质量管理规范. 国家食品药品监督管理局令第2号, 2003.9.

[13] ICH S6: Pre-clinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceutical products. 1997.

[14] FDA/CBER: Point to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. 1997.

[15] OECD: Principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development. 1997.

[16] Evans GO. Animal hematotoxicology: A practical guide for toxicologists and biomedical researchers [M]. New York: CRC Press, 2008:1.

[17] Hall RL. Principles of clinical pathology [A]. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C, eds. Toxicologic Pathology: Nonclinical Safety Assessment [M]. New York: CRC Press, 2013: 135.

第二章 血液与造血系统

血液系统由血液和造血器官组成,血液由血浆及悬浮其中的血细胞组成;造血器官主要包括骨髓、脾脏、胸腺和淋巴结。各种血细胞与免疫细胞均起源于造血干细胞(Hemopoietic stem cell, HSC),HSC 可以增殖、分化为红细胞、粒细胞、淋巴细胞、浆细胞、血小板和单核细胞。HSC 主要存在于骨髓中,骨髓的造血微环境由基质细胞、细胞因子及细胞外基质组成。

第一节 造血系统与血细胞的生成

一、造血器官、造血组织的结构与功能

造血器官主要包括骨髓、脾脏、胸腺和淋巴结,脾脏及全身淋巴结可促使淋巴细胞的第二次增殖,即淋巴细胞在接触抗原后繁殖的免疫反应。人类的造血组织主要是骨髓,但是啮齿类动物骨髓和脾脏均是主要的造血器官,有时犬的骨髓和脾脏均为主要的造血器官^[1]。

(一) 骨髓

1. 骨髓的结构

骨髓是存在于长骨(如肱骨、股骨)的骨髓腔、扁平骨(如髌骨、肋骨)和不规则骨(胸骨、脊椎骨等)的松质骨间网眼中的一种海绵状的组织。骨髓由神经、血管、基质细胞等组成,其间充以各种造血细胞。造血细胞在造血组织中自我更新、增殖分化所依赖的环境称造血微环境,或称为造血诱导微环境。造血微环境应当包括所有影响造血的活性因素,而骨髓基质是其中重要的成分;与造血细胞增生和扩张形成的组织相比较,骨髓基质的最主要的功能是血细胞生成的营养和支持环境^[2]。

2. 骨髓的功能

骨髓的主要功能是产生血细胞,红细胞、粒细胞、血小板和部分淋巴细胞都由骨髓生成。骨髓是 B 淋巴细胞的产生地,并向胸腺提供造血干细胞,在胸腺发育成 T 淋巴细胞。骨髓中还有浆细胞,可分泌免疫球蛋白而具有免疫功能。

(二) 胸腺

1. 胸腺的结构

胸腺由淋巴组织构成,胸腺的表面有结缔组织被膜,结缔组织伸入胸腺实质把胸腺分成许多不完全分隔的小叶,小叶周边为皮质,深部为髓质。皮质主要由淋巴细胞和上皮性网状细胞构成,网状细胞胞浆中有颗粒及泡状结构且网状细胞间充满了密集的淋巴细胞。胸腺中的淋巴细胞又称为胸腺细胞,在皮质浅层的细胞较大,为较原始的淋巴细胞;中层为中等大小的淋巴细胞,深层为小淋巴细胞;从浅层到深层为造血干细胞增殖分化为小淋巴细胞的过程。皮质内还有巨噬细胞,无淋巴小结。髓质中淋巴细胞少而稀疏,上皮性网状细胞多而显著。

2. 胸腺的功能

胸腺的主要功能是产生 T 淋巴细胞、产生和分泌胸腺素和激素类物质。造血干细胞经血流迁入胸腺后,先在皮质增殖分化成淋巴细胞。其中大部分淋巴细胞死亡,小部分继续发育进入髓质,成为近于成熟的 T 淋巴细胞。这些细胞穿过毛细血管后微静脉的管壁,再迁移到周围淋

巴结的弥散淋巴组织中。整个淋巴器官的发育和肌体免疫力都必需有 T 淋巴细胞, 胸腺为周围淋巴器官正常发育和肌体免疫所必需。当 T 淋巴细胞充分发育, 迁移到周围淋巴器官后, 胸腺重要性逐渐减低。

(三) 脾脏

脾脏是一个血供丰富的实质性脏器, 是胚胎阶段重要的造血器官, 胚后成为淋巴器官。脾的组织中有许多称为“血窦”的结构, 是血细胞的重要的储存库, 平时一部分血液滞留在血窦中, 当某些紧急状态(如急性大失血), 脾会收缩将血细胞释放到循环血液中以补充血容量。脾脏还是血液有效的过滤器官, 脾脏的特殊结构可使红细胞流速变慢、浓缩, 同时血窦的壁上附着大量巨噬细胞, 血液中的细菌、异物、抗原抗体复合物及衰老的血细胞在流经脾脏时, 被大量的巨噬细胞吞噬和消化。

二、血细胞的生成

造血干细胞自我更新并分化为各血细胞系统的祖细胞(如淋巴系干细胞、粒系干细胞), 再大量分化增殖为各种原始和成熟血细胞, 这些成熟的血细胞通过骨髓进入血液中, 发挥各自的生理作用。

(一) 造血干细胞

造血干细胞是指尚未发育成熟的细胞, 是所有造血细胞和免疫细胞的起源。造血干细胞有两个重要特征: 其一, 高度的自我更新或自我复制能力; 其二, 可分化成所有类型的血细胞。造血干细胞采用不对称的分裂方式, 即由一个细胞分裂为两个细胞; 其中一个细胞仍然保持干细胞的一切生物特性, 从而保持身体内干细胞数量相对稳定, 这就是干细胞自我更新; 而另一个则进一步增殖分化为各类血细胞、前体细胞和成熟的血细胞, 释放到外周血中, 执行各自任务, 直至衰老死亡。

造血干细胞在骨髓内发育分化为淋巴样干细胞和髓样干细胞, 再进一步增殖分化为定向造血干细胞或前体细胞。其中 T 细胞转移到胸腺内发育成为 T 细胞各种亚群; 前 B 细胞在骨髓内增殖发育成为有功能的 B 细胞。

(二) 血细胞的生成与释放

血细胞的发生是一连续的发展过程(如图 2-1 所示), 造血细胞的生长发育过程包括增殖、分化、成熟和释放, 是多种因素调节控制的过程, 以维持血细胞数量和质量的稳定。

增殖是通过分裂而使其数量增加的过程, 有丝分裂是造血细胞的主要增殖方式, 在这种增殖中, 母细胞有丝分裂后形成的子细胞同时都趋向分化成熟。巨核细胞的增殖与其他系统的增殖不同, 其他系统细胞在 DNA 合成后, 随即分裂成两个子细胞; 而巨核细胞则是以连续双倍增殖 DNA 的方式, 即细胞核成倍增殖, 每增殖一次, 核即增大一倍, 而胞浆并不分裂, 故巨核细胞体积逐渐增大, 属多倍体细胞。

分化是细胞发育过程中失去某些潜能而获得新功能的过程, 即由多潜能转变为单潜能的过程; 分化后的细胞在形态和功能上产生新的特征, 分化过程是不可逆的。

成熟是指造血干细胞定向分化、从原始经历幼稚到成熟细胞的发育过程。血细胞越成熟其形态越易辨认, 功能也日趋完善。

成熟的血细胞在骨髓内通过“髓血屏障”释放入血循环中, 各种细胞因子类药物可直接或间接影响骨髓细胞的发育和成熟。

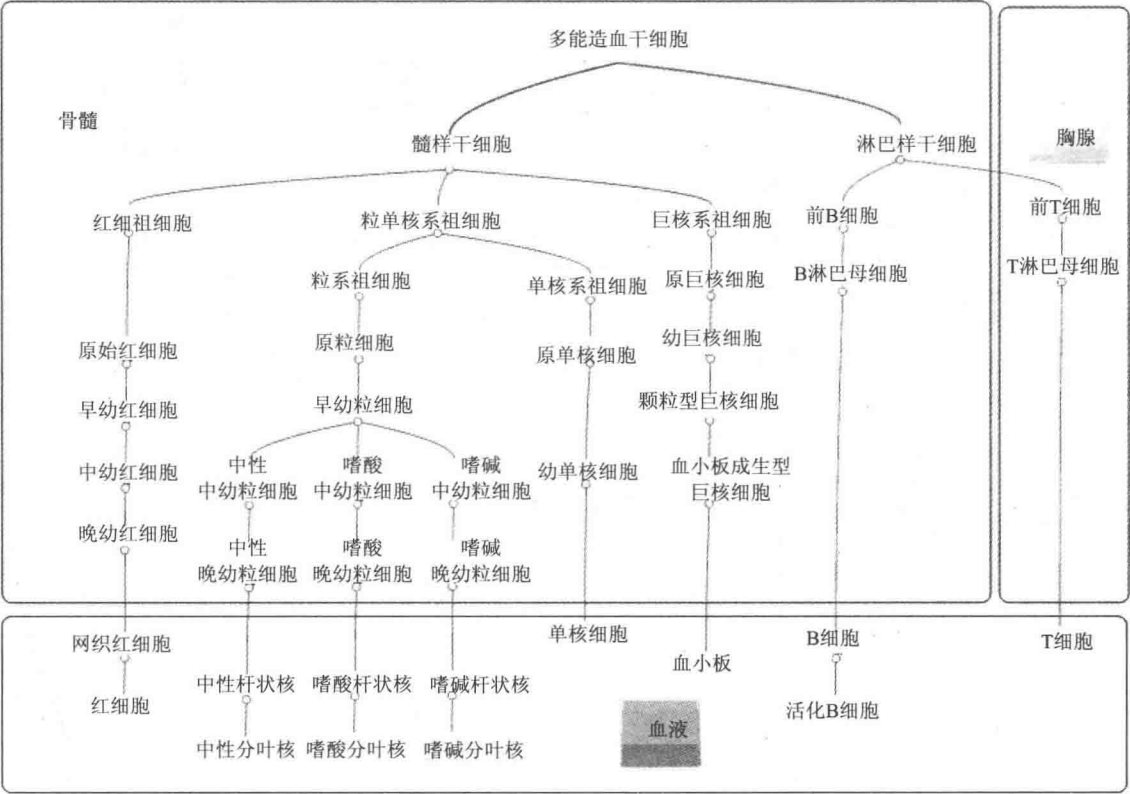


图 2-1 血细胞的发育演变过程

三、骨髓细胞形态学特征

(一) 造血干细胞形态学特征

造血干细胞是未分化的间质细胞，细胞核大而圆，染色质细腻染色偏红，核仁清晰；胞浆呈蓝色有空泡，整个细胞体积较大，边缘毛糙有突起。HSC 与小淋巴细胞经 Wright-Giemsa 染色在光镜下比较，造血干细胞细胞直径约 8 μ m，胞体外形呈不规则圆形，胞浆量很少；小淋巴细胞胞体一般小于 8 μ m，胞体外型呈圆形，胞浆量也很少。因此，两者在光镜条件下无法区分。透射电镜检查及免疫表型分析有助于鉴别二者（如表 2-1 所示）。

表 2-1 造血干细胞与小淋巴细胞的电镜下区别

特征	造血干细胞	小淋巴细胞
高尔基复合体	-	+
内质网	-	+
溶酶体	-	+
糖核蛋白体	许多	有
多泡小体	-	+
核染色质	常染色质为主，细致疏松	异染色质为主，致密浓集
核仁	1~2 个	无
细胞免疫表型分析：		
CD34/CD117/CD38	+/-/-	-/-/+

(二) 红系细胞的形态学特征

红系细胞胞体较规则, 原红及早幼红可有瘤状突起; 细胞核为圆形, 胞浆无颗粒, 胞浆染色有明显的变化规律, 颜色从深蓝色至灰色, 最后至淡红色。镜下观察红系细胞以中晚幼细胞为主, 原红细胞少见。

1. 原始阶段-原红细胞 (Pro-erythroblast, PEb)

胞体: 圆形或椭圆型, 边缘常有钝角状或瘤状突起。

胞核: 圆形、居中或偏于一旁, 核仁 2~3 个或无、大小不一、染浅蓝色, 核染色质呈颗粒状、细腻而疏松, 胞核与胞浆比例大于 3/4。

胞浆: 量少、强的嗜碱性着色、深蓝色、不透明, 在核周围常形成淡蓝区, 无血红蛋白。

2. 幼稚阶段-早幼红细胞 (Basophilic-erythroblast, BEb)

胞体: 圆形或椭圆型, 毛刺状。

胞核: 圆形或椭圆型、居中或稍偏位, 核仁模糊或消失, 核染色质可浓集成粗密小块, 较原红细胞粗糙, 胞核与胞浆比例大于 1/2。

胞浆: 量多、强的嗜碱性着色、染不透明蓝或深蓝色, 仍可见核周淡蓝区, 开始出现血红蛋白。

3. 幼稚阶段-中幼红细胞 (Polychromatic erythroblast, PoEb)

胞体: 圆形。

胞核: 圆形或椭圆型, 核仁完全消失, 核染色质凝聚成条索状或块状, 其中有明显空隙, 胞核与胞浆比例约等于 1/2。

胞浆: 血红蛋白逐渐增多, 嗜碱性物质逐渐减少, 因含不等量血红蛋白, 可呈不同程度的嗜多色性染色或红蓝间染。

4. 幼稚阶段-晚幼红细胞 (Normochromic rubricyte, NEb)

胞体: 圆形。

胞核: 圆形、居中或偏位, 无核仁, 核染色质聚集成数个大块或凝缩成紫黑色团块状, 胞核与胞浆比例小于 1/2。

胞浆: 量较多、弱的嗜碱性着色、浅红色, 含有大量血红蛋白。

5. 成熟阶段-网织红细胞 (Reticulocyte, Retic)

胞体: 圆盘状。

胞核: 无。

胞浆: 量较多、极微的嗜碱性着色、浅红色, 含有大量血红蛋白。

6. 成熟阶段-红细胞 (Erythrocyte, Ery)

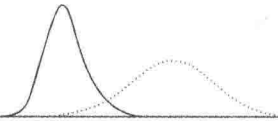
胞体: 圆盘状。

胞核: 无。

胞浆: 量较多、无嗜碱性着色、红色, 含有大量血红蛋白。

(三) 粒系细胞的形态学特征

粒系细胞特点为胞体规则、胞体由小变大然后再变小, 中幼粒细胞的体积最大; 胞核有明显的变化规律 (圆形→椭圆形→一侧扁平→肾形→杆状→分叶), 胞浆中的颗粒也有明显的变化规律。镜下观察骨髓细胞中原粒细胞较原红细胞多, 其中中性粒细胞较多, 嗜碱性粒细胞极少见, 但大鼠的嗜碱性粒细胞较多。



1. 原始阶段-原始粒细胞 (Myeloblast, MyBI)

胞体: 圆形或类椭圆形。

胞核: 较大、圆形、居中或略偏位, 核仁 2~5 个、较小、清楚, 核染色质呈细颗粒状、排列均匀、疏松无浓集, 胞核与胞浆比例大于 3/4。

胞浆: 量少、淡蓝色、绕于核周, 强的嗜碱性着色, 无嗜天青颗粒。

2. 幼稚阶段-早幼粒细胞 (Promyelocyte, PMy)

胞体: 圆形或椭圆形。

胞核: 体积较大、卵圆或稍凹陷、位于中央或偏位, 偶见核仁且较清晰, 核染色质开始聚集变得粗密, 胞核与胞浆比例大于 1/2。

胞浆: 量较多、淡蓝染色, 嗜碱性着色减弱, 胞浆内出现大小、形态和多少不一的紫红色, 非特异的嗜天青颗粒, 分布不均, 常近核一侧先出现, 有时可出现在核上。

3. 幼稚阶段-中幼粒细胞 (Myelocyte)

胞体: 圆形。

胞核: 出现凹陷或呈粗面包圈状, 核仁消失, 核染色质聚集呈索块状, 胞核与胞浆比例约等于 1/2。

胞浆: 量多、偏淡蓝色, 弱的嗜碱性着色, 中性中幼粒细胞 (Myelocyte Neutrophilic, My-N) 内含中等量、大小较一致的特有的中性颗粒, 嗜酸性中幼粒细胞 (Myelocyte Eosinophilic, My-E) 内含中等量、大小较一致的特有的嗜酸性颗粒, 嗜碱性中幼粒细胞 (Myelocyte Basophilic, My-B) 内含中等量、大小较一致的特有的嗜碱性颗粒。

4. 晚幼粒细胞 (Metamyelocyte)

胞体: 圆形。

胞核: 呈细的面包圈状, 核仁消失, 核染色质粗糙、致密成结块, 胞核与胞浆比例更小。

胞浆: 中性晚幼粒细胞 (Metamyelocyte Neutrophilic, Mt-N) 胞浆量多、浅红色, 充满中性颗粒, 颗粒较细腻; 嗜酸性晚幼粒细胞 (Metamyelocyte Eosinophilic, Mt-E) 胞浆量多、桔红色, 充满嗜酸性颗粒, 颗粒较粗大; 嗜碱性晚幼粒细胞 (Metamyelocyte Basophilic, Mt-B) 胞浆量多, 充满嗜碱性颗粒, 颗粒粗大。

5. 成熟阶段-杆状核粒细胞 (Stab band granulocyte)

胞体: 圆形。

胞核: 形态弯曲成带状或杆状、粗细均匀、也可见核呈“S”形、“U”形或“E”形, 核两端钝圆呈深紫红色, 无核仁, 核染色质更致密, 更粗糙呈块状。

胞浆: 嗜碱性着色消失, 中性杆状核粒细胞 (Neutrophilic Stab Granulocyte, Bd-N) 充满中性颗粒, 呈淡红色; 嗜酸性杆状核粒细胞 (Eosinophilic Stab Granulocyte, Bd-E) 充满嗜酸性颗粒, 呈红色或橘红色; 嗜碱性杆状核粒细胞 (Basophilic Stab Granulocyte, Bd-B) 充满嗜碱性颗粒, 呈蓝紫色。

6. 成熟阶段-分叶核粒细胞 (Segmented Granulocyte)

中性分叶核粒细胞 (Neutrophilic Segmented Granulocyte, Neut): 胞体呈圆形, 胞核呈分叶状, 叶与叶之间有细丝相连或完全断开, 常分 2~5 叶, 无核仁; 核染色质浓集, 呈深紫红色; 胞浆丰富, 呈淡红色, 胞浆内分布着细小的中性颗粒。

嗜酸性分叶核粒细胞 (Eosinophilic Segmented Granulocyte, Eos): 胞体通常比中性分叶核细胞大, 呈圆形; 胞核呈分叶状, 叶与叶之间有细丝相连或完全断开, 常分 2~5 叶, 无核仁, 染色质浓集呈深紫红色; 胞浆充满嗜酸性颗粒。