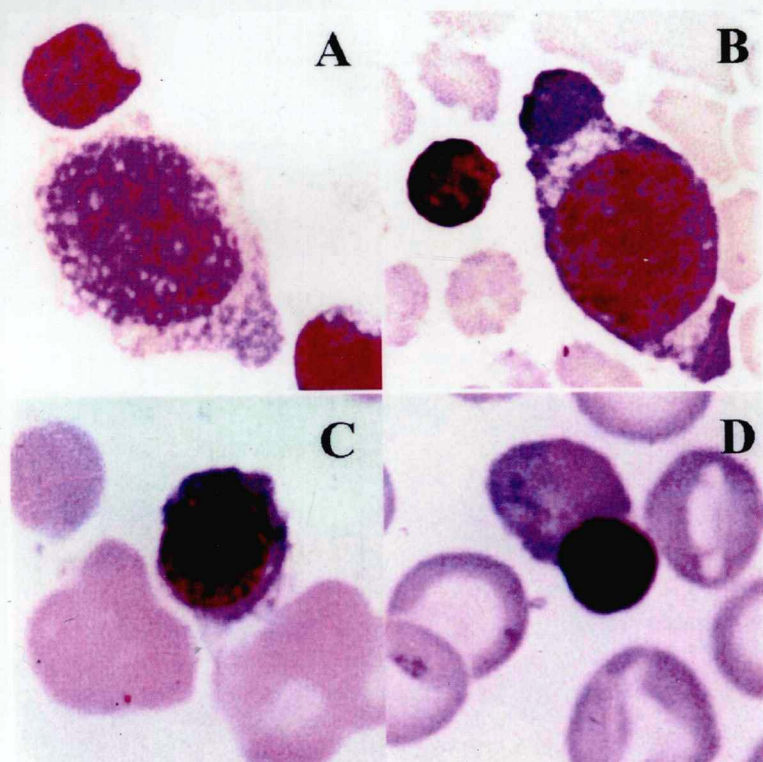




Transplantation of Umbilical Cord Blood Stem Cell

脐带血干细胞移植

主编 周芳 孙黎飞

天津科学技术出版社

脐带血干细胞移植

主 编 周 芳 孙黎飞

天津科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

脐带血干细胞移植/周芳,孙黎飞主编. —天津:天津科学技术出版社,2009.9
ISBN 978 - 7 - 5308 - 5382 - 5

I. ①脐… II. ①周…②孙… III. ①干细胞—移植术(医学) IV. ①R550.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 178368 号

责任编辑:郑东红

责任印制:王 莹

天津科学技术出版社出版

出版人:胡振泰

天津市西康路 35 号 邮编 300051

电话(022) 23332693(编辑室) 23332393(发行部)

网址:www.tjkjcs.com.cn

新华书店经销

济南红日印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 10.25 字数 240 000

2009 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

定价:88.00 元

前 言

尽管全球无关供者登记处已有数百万已登记的无关供者,但由于人类组织相容性的复杂性以及供者来源的问题,无关供者登记处向许多患者提供造血干细胞的能力受到限制,并且大部分少数民族患者无法找到合适的供者。尽管对人类组织相容性抗原(HLA)不相合的临床研究进行了几十年,HLA 不相合仍然会导致移植相关死亡率(transplant-related mortality, TRM)增加。即使供者全相合,移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)始终是临床医生的巨大挑战。目前无血缘关系的脐血移植(umbilical blood transplantation, UCBT)可以解决上述许多问题。脐带血干细胞可在清髓性或减低剂量预处理后恢复造血。目前,脐带血公共库项目已经在全世界许多国家启动,大约有 250,000 份库存脐血可以使用,且大约有 8,000 次无血缘关系 UBT 已经进行。造血系统恶性疾病的许多研究表明,对于大多数儿童白血病患者来说,来自于 HLA-A、B、DRB1 抗原共 6 个位点中有 4~6 个相合的冷冻保存的 UCB 中有足够的造血干细胞以供植入。虽然早期关于 UBT 在高体重的儿童和成年人白血病患者中的治疗经验表明,UCBT 有很高的 TRM;但是近来更多的研究表明,UCBT 在体重较大的儿童和成人血液系统恶性肿瘤患者中取得了令人鼓舞的成绩。UCB 有潜在的优势,首先,UCB 是可以冷冻保存的 HSC 来源,这使得 HSC 的来源及时,没有找不到供者的危险;其次,UCB 几乎可以完全根据患者的需要而不是供者的问题来制定移植计划;更重要的是,UCBT 后的 GVHD 发生率低于其他无关供者且其移植物抗肿瘤(grafts-versus-malignancy, GVM)可以持续存在。最近的单中心研究数据表明,由于 UBT 对 HLA 配型要求不严,非西北欧种族患者可以有机会进行移植。近 10 年来,我国先后已有 50 多家医院开展了脐血干细胞的移植临床医疗工作。自成立至今,血库已成功储存脐带血造血干细胞 6 万余份,为国内外 2000 多名需要移植的患者进行了造血干细胞的配型查询,先后为 184 例患者的临床治疗提供了 200 多份脐血造血干细胞。截至 2008 年 1 月,中国脐带血库公民自愿捐赠总共存储的脐血造血干细胞 2.5 万份,公民自愿出资储存的脐血造血干细胞超过 8 万份,实现非血缘脐血干细胞移植 500 多例。因此脐血移植具有广阔的应用前景且正在走向成熟。

(周 芳)

目 录

上篇 基础研究

第一章 脐血移植概述	(1)
第一节 脐血移植发展简史	(1)
第二节 脐血库的建立与发展	(6)
第三节 脐血干细胞移植的适应症与禁忌症	(11)
第四节 脐血优缺点	(12)
第五节 脐血造血干细胞的临床应用	(14)
第二章 脐血造血干细胞的基础研究	(26)
第一节 脐血的生物学特性	(26)
第二节 脐血造血干细胞的生物学特性	(31)
第三节 脐血的免疫学特性	(37)
第四节 脐血干细胞的体外扩增	(43)
第三章 脐血干细胞的采集及处理	(48)
第一节 脐血干细胞的采集	(48)
第二节 脐血分离技术	(55)
第三节 当事人的认可制度	(56)
第四节 脐血的冷冻保存	(58)
第四章 脐带血干细胞移植的类型	(64)
第一节 儿童脐血干细胞移植	(64)
第二节 成人脐血干细胞移植	(68)
第五章 多次造血干/祖细胞移植	(75)
第六章 脐血干细胞移植的并发症及其防治	(81)
第一节 感染	(81)
第二节 移植物抗宿主病	(86)
第三节 巨细胞病毒及相关性间质性肺炎	(93)
第四节 造血干细胞移植后肝静脉阻塞病	(97)
第五节 出血性膀胱炎	(101)

第六节 植入综合征	(105)
第七节 移植相关性血栓性微血管病	(107)
第八节 造血干细胞移植后白血病复发的治疗	(108)
第七章 脐血干细胞移植的护理	(111)

下篇 临床应用

第八章 脐血造血干细胞移植的临床应用概述	(117)
第一节 脐血移植的临床应用类型	(117)
第二节 脐血移植的效果	(120)
第三节 脐血移植存在的问题与对策	(121)
第九章 脐血干细胞移植治疗白血病	(126)
第十章 脐血干细胞移植治疗再生障碍性贫血	(140)
第十一章 脐血干细胞移植治疗地中海贫血	(152)
第十二章 脐血造血干细胞的前景展望	(159)

上篇 基础研究

第一章 脐血移植概述

脐血(cord blood)又称胎盘血或胎盘/脐带血(placental blood, Umbilical cordblood),是胎儿出生时脐带内及胎盘近胎儿一侧血管内的血液。1974年Kundtson等首先发现脐血中含有造血祖细胞。随后1982年Nakahata等发现脐血中的造血祖细胞的产率高于骨髓。1983年Toles等在动物实验中证实脐血造血祖细胞移植是可行的。1988年Gluckman等首先进行了人类脐血移植,她们采用HLA相合同胞的脐血移植治疗一例5岁范可尼(Fanconi's)贫血的患儿。开创人类脐血移植的先河。此后,世界各地相继开展了同胞间的脐血移植。脐血移植与异基因骨髓移植相比,具有GVHD发生率较低、严重程度较弱等优点,使得HLA配型不完全相合同胞间移植亦可移植进行。

随着同胞间脐血移植的发展,人们又把目光转移到非血缘间脐血移植上来,其前提是建立脐血造血干细胞库。

脐血与骨髓不同,其来源丰富,可以说是取之不尽,用之不竭,并可以实物形式保存,

采集时不存在任何痛苦,查寻过程迅速。有HLA配型不完全相合亦可利用的优点。1992年在美国国立心、肺、血液研究所(National Heart Lung Blood Institute, NHLBI)的资助下,美国纽约血液中心的Rubinstein在美国建成了第一个脐血库。目前,世界上已有大小不同规模的脐血库上万个,开展脐血移植上千例。

脐血移植是最近应用于临床的一种新的造血干细胞移植方法。由于脐血富含造血干细胞,来源广泛,同时其免疫细胞不成熟,因此采集脐血比较容易,而且对HLA匹配要求较低,为临床应用提供可用造血干细胞来源。

第一节 脐血移植发展简史

1988年10月6日法国巴黎圣路易医院Gluckman领导的骨髓移植科对1例范可尼贫血(Fanconi贫血)的5岁患儿进行脐血移植(umbilical cord blood transplantation, UCBT),并获成功,使UCBT、成为了造血干细胞移植的一个新的研究热点。造血干细胞来源于骨髓、外周血和脐带血。目前临床上所进行的造血干细胞移植主要取源于自体或异体的骨髓和外周血。来源于骨髓及外周血的异体造血干细胞移植存在供者来源困难的问题。从无血缘关系人群中寻找HLA配型相合的供者,其配型相合率约为万分之一左右。许多患者找不到HLA配型相合供者,一部分患者即使找到了供者,也会因疾病进展等原因失去移植的机会。因此,人们一直在寻找除了骨髓及外周血来源以外的造血干细胞。脐带血作为骨髓、外周血后的第三种造血干细胞来源,在异基因造血干细胞移植方面具有巨大的发展潜力。

随着科学的飞速发展,二十一世纪进入了生命科学的时代,干细胞因其特有的生物学特性及潜在的应用价值成为其中最引人瞩目的领域之一。干细胞的研究的不断深入,推动着基础医学和临

床医学进入全新的发展时期。

造血干细胞移植根据移植物不同可分为骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT), 外周血干细胞移植(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT), 脐血干细胞移植(cord blood stem cell transplantation, CBSCT)及 CD34 细胞移植等。骨髓是干细胞含量最为丰富的成体组织, 骨髓来源的造血干细胞的临床应用已有近 50 年的历史。目前已成为治疗多种良、恶性血液病实体肿瘤、遗传性疾病和重症自身免疫性疾病等的有效手段。骨髓移植又包括异基因骨髓移植(allogeneic BMT)、同基因骨髓移植(isogeneic BMT)和自体骨髓移植.autologous BMT); 外周血干细胞移植包括异基因外周血干细胞移植(allogeneic PBSCT), 同基因外周血干细胞移植(isogeneic PBSCT)和自体外周血干细胞移植.autologous PBSCT)。异基因移植根据移植物来源不同可分为亲缘供者和无关供者移植, 根据预处理强度不同可分为清髓性和非清髓性移植, 根据 HLA 表型分为 HLA 表型相合和 HLA 表型不完全相合移植。尽管全球无关供者登记处已有数百万已登记的无关供者, 尽管对人类组织相容性抗原(HLA)不相合的临床研究进行了几十年, 但是骨髓来源的造血干细胞尚面临几个主要问题: 一是供体来源不足, 约有 30% 需要骨髓移植的病人无法找到与之相配的供者; 二是移植相关死亡率较高; 三是急、慢性移植物抗宿主病, 尤其是慢性移植物抗宿主病, 严重影响了移植患者的远期生存及生存质量。虽然异基因骨髓和外周血造血干细胞移植已广泛应用临床, 治疗多种恶性和非恶性疾病, 但因造血干细胞供者来源日益缺乏, 使临床应用相对受到限制。目前无血缘关系的脐血移植(umbilical blood transplantation, UCBT)可以解决上述许多问题。脐带血干细胞可在清髓性或减低剂量预处理后恢复造血。

自 1974 年 Knudtzon 等发现脐带血中富含定向造血干细胞以来, 许多学者对其进行了广泛而深入的研究, 脐带血由于其来源可靠且丰富、价格低廉、配型要求不如骨髓移植严格等特点, 成为造血干细胞的重要来源。

脐带血是指脐带内连同胎盘近胎儿一侧血管内的血液。1974 年 Kundtson 等首先发现脐血中含有造血祖细胞。随后 1982 年, Nakahata 发现脐血中的造血祖细胞的产率高于骨髓。1983 年 Toles 首次进行脐血移植的动物试验成功。1992 年美国国立心、肺、血液中心研究所(National Heart Lung Blood Institute, NHLBI)资助美国纽约血液中心的 Rubistein 建第一间脐血库(public cord blood bank)。1993 年该脐血库与 Duke 大学医学中心合作, 首次成功地用冻存的脐血对 2 名急性淋巴细胞白血病(ALL)患者分别进行无关供者以及同胞间的脐血移植。至 20 世纪末, 全世界已保存脐血近 4 万份, 约 2000 份用于移植治疗恶性血液病、遗传性疾病、重症联合免疫缺陷病、实体瘤、重度放射病, 其中包括 HLA 相合及 1~3 个位点不合的同胞与无关供者的移植。移植病人大部分为儿童, 成人的数量近年来开始增加。

目前脐血常采用密闭式采集法, 每份采集的量 60~120mL, 其中单个核细胞约为 1.6×10^6 / mL。孕妇分娩时在胎儿脐部最近处双结扎脐带, 从两次结扎中间断脐。暂不娩出胎盘, 下垂结扎的脐带, 经消毒后在脐带断端穿刺脐静脉, 靠重力作用使脐血流入抗凝采血袋中。胎盘娩出后, 可将消毒后的胎盘放置在一定高度的采集架上, 用同样方法穿刺脐静脉, 获取胎盘和脐带中存留的血液。采集后对脐血进行生物学检测、细菌检查、血型及人类白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen, HLA)分型检测、血清学病毒检查以及遗传疾病的检测。各项检测合格的脐血将被分型冰冻保存。

脐带血中含有丰富的造血干细胞, 这也是目前脐带血临床应用的细胞基础。在数量上, 脐带血中 CD34⁺ 细胞所占比例与骨髓相似, 高于外周血, 约占有核细胞的 1%—3%。在质量上, CD34⁺ 细

胞体外长期培养中的 $CD34^+$ 、 $CD45^+$ 脐血高于骨髓,脐带血 $CD34^+$ 、 $CD38^-$ 细胞的增殖分化能力高于骨髓, $CD34^+$ 、 $CD38^-$ 、和 $CD34^+$ 、 $CD33^-$ 细胞在脐带血中 $CD34^+$ 细胞中的比例均显著高于骨髓。此外,脐带血中 HSC/HPC 的含量及增殖能力(CFU-GM, BFU-E/CFU-GEMM)也均高于骨髓。这些可能是为什么少量脐带血(50—200ml)有可能替代大量的骨髓来满足临床移植需要的原因。有学者认为脐带血干细胞是目前干细胞最可靠和最稳定的来源之一。

脐带血来源的造血干细胞与骨髓来源的造血干细胞相比,具有其独特的优点,脐带血干细胞不仅具有骨髓干细胞的分化潜能,更具有胚胎干细胞的特点:一是脐带血来源广泛,采集方便,不会给供者造成任何损伤。而无论是直接骨髓采集还是利用细胞因子动员外周血获取干细胞都会给捐献者带来一定风险及痛苦,如骨髓或静脉穿刺、麻醉、感染以及造血因子刺激等,收集脐带血对产妇和新生儿没有任何危害及痛苦;二是脐带血干细胞收集于胎儿出生时期,这种细胞很少有机会被各种病毒污染,因此病毒携带及传播几率低。而在外周血及骨髓造血干细胞移植中的供者,由于携带有疱疹病毒、EB 病毒和巨细胞病毒常常引起造血干细胞移植后的相关并发症,导致骨髓移植和外周血干细胞移植患者的死亡,而绝大部分的脐带血供者没有感染过这些病毒,这使脐带血传播病毒的机率大大减少,移植相关死亡明显减少;三是脐带血中淋巴细胞的免疫功能不够成熟,移植后移植物抗宿主病的发生率低。脐带血中的免疫细胞较为幼稚,功能活性低,引起移植物抗宿主病的几率及严重程度也就相应降低,而 GVHD 正是导致骨髓及外周血干细胞移植患者死亡的严重并发症之一。因此,脐带血移植并不要求 HLA 配型的完全相合,这也正是弥补骨髓移植和外周血干细胞移植受到 HLA 配型限制的最大优点之一。脐带血为无法找到骨髓 HLA 合适配型的患者提供可供移植的造血干细胞,特别是稀有 HLA 类型和来自于少数种族群体的患者也有机会进行造血干细胞移植。最近的单中心研究数据表明,由于 UBCT 对 HLA 配型要求不严,非西北欧种族患者可以有机会进行移植。有人报道这可能与脐带血中 $CD8^+$ NKT 细胞的缺乏密切相关。据资料统计,脐带血造血干细胞移植患者,急性移植物抗宿主病的发生率较低,Ⅲ度和Ⅳ度的急性 GVHD 约占 20%,Ⅳ度急性 GVHD 的发生率 <5%;四是脐带血中的干细胞较为原始,细胞代谢非常旺盛,细胞充满活力,体外增殖分化能力明显好于骨髓和外周血来源的干细胞,能更好地重建人体干细胞池。脐带血含有丰富的细胞因子,且 IL-3、GM-CSF、G-CSF 等细胞因子含量明显高于成人外周血。

脐血造血干细胞在体外扩增反应明显强于骨髓,有自分泌造血生长因子功能,自分泌产生的造血生长因子可赋予脐血造血干高增殖和扩增能力。脐带血 $CD34^+$ 细胞体外长期培养中的 $CD34^+$ 细胞明显高于骨髓, $CD34^+$ 、 $CD38^-$ 细胞在脐带血 $CD34^+$ 细胞中的比例显著高于骨髓,而且脐带血 $CD34^+$ 、 $CD38^-$ 细胞的增殖分化能力高于骨髓。脐血中造血干细胞 $CD34^+$ 细胞端粒末端转移酶长度比骨髓长 4kb,按细胞每分裂一次端粒缩短 100~200bp 推算,脐血比成人骨髓细胞增加了 20~40 次分裂的机会,提示脐血造血干细胞有更大的重建造血的潜能。五是脐带血快捷、便利、稳定,脐带血在低温下储存,便于运输,供体稳定,这使得 HSC 的来源及时,没有找不到供者的危险,避免了骨髓和外周血造血干细胞捐献者临时退缩、疾病和死亡等诸多不确定因素。UCB 几乎可以完全根据患者的需要而不是供者的问题来制定移植计划。有报道称脐带血干细胞在冻存了 15 年后仍然有 90% 能保持其性状。Barker 等估计 UCBT 从寻找合适配型到接受移植的时间要比骨髓移植少 25 到 36 天,这为急需造血干细胞移植的患者赢得了宝贵的时间。1988 年, Broxmeyer 首先以实验证明脐带血(umbilical cord blood, UCB)中富含造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)。

法国 Gluckman 等在巴黎圣路易斯医院为一位患有先天性再生不良性贫血的儿童实施了世界

上首例脐带血移植术,并取得成功。从此,人们对于一直被当成废弃物丢掉胎盘和脐带血有了全新的评价和认识。1990年HLA不全相合同胞UCBT治疗急性淋巴细胞白血病又获成功。至今,脐血移植已成功应用于临床治疗多种恶性和非恶性疾病。国际骨髓移植登记处的最新统计资料显示,1998年以来20岁以下患者进行的干细胞移植,其中20%是脐带血移植。Rubinstein等最近估计全世界自1993年以来至少进行了8000例非相关脐带血干细胞移植,因此脐带血干细胞移植的重大作用还是得到了大家的普遍肯定。而且非亲缘供者、不全相合、甚至半相合的脐血移植数量逐年增多,临床疗效满意。

而且目前,脐带血干细胞移植不仅仅被用于血液系统、免疫缺陷和代谢性疾病,研究人员已经开始了脐带血治疗神经系统疾病、心脏疾病、缺血性下肢血管病、实体瘤以及组织再生方面的应用研究,并取得了可喜的成果。2001年Sanz研究用UCBSCT治疗一组9名成人CML患者,其中慢性期6例,加速期1例,急变期2例。有核细胞输入数 $1.7 \times 10^7/\text{kg}$,预处理方案为TT/BU/环磷酰胺(CY)/ATG,7例植入成功;绝对中性粒细胞数 $\geq 0.5 \times 10^9/\text{L}$ 时间为22d;Plt $\geq 20 \times 10^9/\text{L}$ 时间为50~128d,3例发生II°以上的aGVHD,移植前慢性期6例中,4例42个月无病生存。国际骨髓移植登记处及欧洲脐血登记处的两个大的系列报道,随访2年和1年,同胞供者的0~1个位点不相合脐血移植实际生存率分别为61%和63%,但脐血移植还存在许多问题有待解决。比如:第一,单份脐带血中的造血干细胞数量较少,所以一般只能用于儿童和体重小于20kg的成年人。干细胞数量的不足意味着移植失败风险的增大和造血重建的延缓,甚至导致患者在成功植入前就已经死亡。有人报道最佳有核细胞输注量为 $2 \times 10^7/\text{kg}$,当输注量少于 $1 \times 10^7/\text{kg}$ 时,死亡概率约为75%。

为了解决干细胞数量相对少的问题,研究人员采用了很多对策以提高移植的成功率:(1)体外扩增CD34⁺细胞;(2)多份脐带血共移植;(3)间充质干细胞与造血干细胞共移植;(4)小剂量放化疗与脐带血造血干细胞移植相结合;(5)骨髓腔内注射。这些方法大多已经进入临床试验阶段。有人采用外周血CD34⁺细胞与脐带血共移植也取得很好的效果,如Fernandez等报道28例接受这种方法治疗的高危血液病患者,四年生存率高达65%—82%。除了改进脐血收集、分离、冻存和复温等处理技术,减少体外丢失、增加每份脐血可利用的干细胞量以外,混合脐血移植是解决单份脐带血因细胞数量少而难以植入的有效途径之一。近年来已有很多的基础和临床研究为多份脐血移植的推广应用提供了较为坚实的理论和实验依据。Barker等报道了23例高危组恶性血液病患者接受2份UCBT的临床研究结果。患者中位年龄24岁(13~53岁),采用清髓性预处理方案,两份脐血总有核细胞中位数为 $3.5 \times 10^7/\text{kg}$ 。可评价患者21例,脐血植入时间23天,II~IV、III~IV度aGVHD发生率分别为65%和13%;1年无病生存期(DFS)为57%,其中缓解期移植者1年DFS为72%Shibuyad等报道了一名9岁肝炎相关性再生障碍性贫血病人,接受其弟骨髓和脐血移植,2周获得植入,4周时发生轻微的GVHD,移植后20个月维持血液学缓解。国内也有双份HLA不全相合非血缘CBT成功治疗成人急性髓细胞白血病的报道。张丽萍等将2份人HLA半相合或不相合混合脐血输入经亚致死量照射后的严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency disease, SCID)小鼠,结果表明HLA半相合及不相合混合人脐血移植可重建SCID小鼠造血和免疫功能,HLA相合程度较高者,似乎更易于2份脐血同时植入。

目前,多份脐血移植还存在一些争议,如多个体造血干细胞能否在体内同时植入、持久性如何、多份脐血组合的规律性、HLA相合率与植入的关系以及脐血间竞争性植入的机制等,这些问题还有待于进一步研究和探讨。Ibatici等应用脐血骨髓腔内直接植入的方法进行了29例成人脐血移

植,中位年龄 38 岁,HLA 基因配型 18 例 4/6、10 例 5/6、1 例 3/6 位点相合,中位有核细胞数量为 $2.3(1.4\sim4.2)\times 10^7/\text{kg}$ 。多数患者采用经典 CY/TBI 预处理方案。所有生存超过 14d 的患者达到 100% 脐血植入,中性粒细胞和血小板植入的中位时间分别为 +23d 和 +38d,较常规脐血移植植入时间明显缩短。只有 8% 发生 I~II 度急性 GVHD。通过体外扩增脐血干细胞,也是提高输注的干细胞数量的方法之一,目前为止较有前景扩增体系是 Hox 基因产物,其中 HoxB4 最为引人注目。通过逆转录病毒感染使 HSC 过表达 HoxB4mRNA,脐血 HSC 能扩增 100 倍以上,如果用 TAT-HoxB4(一种可溶性 HoxB4 蛋白)处理纯化的 HSC,也能使 HSC 扩增 100 倍。第二,重建造血慢。由于单份脐带血中的干细胞比骨髓和外周血中的数量少,所以植入所需要的时间长,这导致严重感染和输血的机会增加,住院时间也相应增加。植入缓慢引发的并发症是脐带血造血干细胞移植患者死亡的主要原因。因此如何提高输注的脐带血细胞数量,进一步改善成人脐带血移植的治疗效果,减少移植相关死亡,已成为目前研究的重点。脐带血 HSC/HPC 体外扩增,可以增加脐带血的有效细胞数量,降低移植物植入的时间,减少移植风险,有可能改善脐带血移植的治疗效果。

目前,体外扩增的策略包括以下三种:①液体培养扩增:筛选出 $\text{CD}34^+$ 或 $\text{CD}133^+$ 培养于含有能使原始前体细胞增殖和自我更新的细胞因子的培养基中。②共培养扩增:未经处理的脐带血与造血微环境的基质成分,特别是间充质干细胞在含有生长因子的培养基中共培养。③持续灌注扩增:脐带血 HPC 不是在静态的培养基中而是在含有生长因子的生物反应器中培养、扩增。Shpall 等曾对 37 例病人进行了临床试验,结果是扩增后的细胞与未处理的脐带血共移植的病人与移植未处理脐带血 10d 后再移植扩增细胞的病人,在中性粒细胞和血小板的植入时间上没有明显差异。但是目前,还没有掌握维持 HSC 自我更新和扩增的关键细胞因子和细胞内信号途径,这方面的研究还在进行中。第三,无法为移植失败的患者提供额外的供者造血干细胞以及后续的过继免疫治疗。目前许多学者针对提高脐带血干细胞的利用率进行了大量研究和临床实验。

长期以来,关于脐带血与骨髓移植、外周血干细胞移植孰优孰劣的争论一直伴随着脐带血造血干细胞移植的发展壮大。虽然受到国家政策、民族和患者情况的影响,目前脐带血造血干细胞移植数量和比例还是在持续增加。据统计,美国儿童移植的一半是脐带血造血干细胞移植,而 2003 年日本脐带血造血干细胞移植的数量已经超过了造血干细胞移植总数的 50%。因此,脐带血干细胞的广阔应用前景促使干细胞技术相关产业应运而生,成为生物技术领域最热点产业之一。

临床疗效证明脐血移植可以作为造血干细胞移植的一个重要手段。作为一种新的造血干细胞来源,脐血干细胞与骨髓、外周血造血干细胞相比有着无可比拟的优势。由于脐血采集容易,来源广,对产妇及胎儿不会产生伤害,无肿瘤细胞污染的危险,脐血的早期造血干细胞含量丰富,移植后 GVHD 发生率低而轻,寻找 HLA 配型相合供者所需时间较骨髓库短,不需担心供者的减少,作为实物方式储存的脐血在应用时不会受到供者的拒绝,所以脐血移植有着广阔的临床应用前景。但脐血量少,脐血移植后造血功能恢复较慢,感染出血机会大,具有潜在的遗传性疾病感染的可能性,脐血库的构建有一定要求,用冻存的非血缘脐血移植费用昂贵等,也限制了脐血移植的进一步普及开展。

(周 芳 孙黎飞 许晓巍)

第二节 脐血库的建立与发展

异基因造血干细胞(HSC)移植已成功应用于治疗高危或复发性恶性血液病、骨髓衰竭综合征、遗传性或获得性免疫缺陷以及代谢失调。但是以骨髓或外周血为HSC来源,显然不能满足造血干细胞移植(HSCT)的需求,1993年Rubinstein等开始组建了第一个脐血库(CBB)。以后几年,Kurtzberg、Wagner、Fouillard、Gluekman、Rubinstein等人先后报告了非亲缘供者脐血移植(unrelated cord blood transplantation,UCBT)的初步临床观测结果。综合来看,库存无关供者脐血(CB)含有移植所需的足够数量的HSC,且发生急性移植物抗宿主病(GVHD)的危险性比预计低;至少在儿童和年轻成人,1年存活率大于50%,儿童2年存活率35%(在预后较好组接近50%)。患者每千克体重输入的有核细胞数量高;供、受者白细胞抗原(HLA)配型一致预示中性粒细胞更快植入;而受者的巨细胞病毒(CMV)血清学状态预示了发生GVHD的风险,这两个因素预示了总的存活状态。基于对uCBT的临床观测,许多国家已经建立了大量的CBB。我国自1996年也开始了对脐血HSC的研究并建立CBB,现在有数家规模较大的CBB。建立CBB的关键问题是如何更好地利用UCBT的经验和已经建立的CBB的操作经验。

自20世纪70年代以来,异基因骨髓移植在血液系统疾病、实体瘤、遗传性疾病方面取得了较为满意的疗效。由于异基因骨髓移植要求供受者之间HLA必须相合,而这种相合率即使在同胞间也仅有25%,非血缘性供受者之间HLA相合的几率极低,因此国外许多国家相继建立骨髓库以解决这一难题。但是,从无血缘关系的人群中寻找HLA配型相合的供者,其成功率仅为万分之一左右,而且从开始寻找供者到采集骨髓,整个过程平均耗时半年左右,使许多患者因此失去移植的最佳时机。以上种种原因限制了异基因骨髓移植的应用,因此,人们开始寻找一种可以替代骨髓和外周血的其他来源的造血干细胞。10余年来大量基础研究和临床移植的结果显示,脐血中含有比骨髓造血干细胞更丰富、更原始、更具有扩增能力的造血干细胞,脐血移植的疗效不仅能与骨髓移植相媲美,而且其适应证更广、GVHD等并发症更少、更轻。采用脐血移植替代骨髓及外周血造血干细胞移植已成为近10年来造血干细胞移植领域的最重大进展之一。因此,充分利用脐血的巨大资源优势,深入开展脐血移植基础和临床研究、积极有序地建立脐血造血干细胞库不仅具有重大的基础医学意义,而且具有深远社会意义。

一、脐血库建立的必要性

造血干细胞移植是当前治疗恶性血液病、遗传性疾病、再生障碍性贫血、重症免疫缺陷病等疾病的最有效治疗方法之一,但受HLA匹配的骨髓或外周血造血干细胞来源限制,只有少数患者受益。脐带血来源丰富,采集与保存简便,短时间内可收集大量不同HLA型的脐带血,能为患者提供造血干细胞移植的机会,故此建立脐血库很有必要。

1992年Rubinstein在美国纽约血液中心开始建立脐血库。他们从市内产科医院收集脐血,经过去除红细胞后在-196℃液氮中冷冻保存。1993~1998年间该脐血库为世界上290个移植中心的6497多位需要移植的患者寻找合适供者,已为患者提供了700余份脐带血。仅1998年即为250例无关移植患者提供帮助。日本也在1995年开始建立脐血库,至1998年1月已正式建立脐血库9个,共保存脐血1500余份。西班牙、德国及意大利参照ISO 9000系列国际质量管理体系建立了一套从脐血采集、分离、冻存、检测、功能鉴定、HLA分型方法及脐血库的管理与质量控制标

准,此后成立了欧洲脐血库协调机构。1997年3月又成立了国际性脐血协调网络(Nel-cord)。我国山东、天津、北京、广东等地亦已开展此项工作。至目前为止,世界上已建立起规模化的脐血库超过100个,未形成规模化的脐血库有上万个。广州脐血库从1998年5月至2000年底已先后提供30多份库存脐血用于移植治疗重症B-地中海贫血、成人再生障碍性贫血、急性淋巴细胞白血病等。

脐血库是20世纪末医学领域的最新科技成果,与骨髓库及一般血库相比,它所涉及到的高新技术含量甚高甚广,有些技术还有待成熟和完善。近年来,国外脐血库的工作重点已从技术方法的摸索、改进,转向脐血库的质量管理。也就是说,一个脐血库应有标准技术操作守则,能对传染病进行充分的检测,以及采用cGMP管理(current good manufacturing practice)。标准技术操作守则内容包括脐血供者的筛选、采集、加工、冻存、运输、造血干细胞数量、质量检测、组织分型等。cGMP管理包括人员培训、实验场所的要求、仪器设备管理、试剂消耗品管理、资料管理、质控、审计等。

二、脐血库建立的发展简史

一直以来,是否有必要建设脐带血库的争论从来都没有停止过。比如有人认为扩充后的骨髓库足够为需要造血干细胞移植的患者提供合适配型。其实,脐带血造血干细胞移植和骨髓移植的特点决定了脐带血库和骨髓库都各有长处和不足,两者是互补而并不存在人为的对立关系。据Brunstein等的统计,尽管目前骨髓库中有700万志愿者,但是仍然有1/3的患者无法找到合适配型,这在客观上要求和促进了脐带血库的快速建设及国际间的合作。

从1993年美国Rubinstein建立的第一个公共脐带血库(cord blood bank)开始,脐带血库在全世界快速兴起,建设速度十分惊人。截止到2003年,全世界已经建立了至少100个脐带血库,70%的脐带血库建立在欧洲和北美等医疗水平比较发达的地区,其中在美国大概就有超过20个公共脐带血库和24个自体脐带血库。目前全世界的脐带血储存量大概为25万份,仅欧洲脐带血库协调机构Eurocord的17个子库截至2006年6月就储存了约12万份脐带血。据国际脐带血库组织(NETCORD)最新资料显示,至2003年11月11日,该组织的13个脐带血库已储存脐带血73760份,已提供移植用脐带血2465份,其中儿童1630份、成人833份,包括美国已进行脐带血干细胞移植1505例,意大利281例,日本215例,德国200例,西班牙140例,法国111例。

美国Duke大学医学中心儿科干细胞移植中心主任Joannt Kertzberg博士已进行了500多例脐带血干细胞移植。近年来日本脐血移植例数呈逐年急速递增趋势,至2003年6月达1000例,至2005年6月已超过2100例。最近1年间每月脐血移植例数已接近骨髓移植例数。1999年8月日本12个地区的公立脐血库成立了日本脐血库联盟(JCBBN)。现在,登录合格脐血已超过20,000份,提前达到JCBBN成立时制定的目标。东京脐血库与东京市内和郊县9所医院建立无偿采集脐血协作关系。捐献脐血的宣传和采集脐血的运送是由“市民志愿团”完成,这是东京脐血库特色之一。目前为止东京脐血库已采集了脐血10000余份,冷冻保存的约6000份,其中合格登录脐血超过4000份。

东京脐血库资料显示近年来接受脐血移植高龄患者例数显著增加,1998至2003年224例接受脐血移植的患者年龄分布:≤5岁58例(26%),6~15岁30例(13%),16~30岁34例(15%),31~40岁23例(10%),41~50岁33例(15%),≥51岁46例(21%),成人脐血移植数已超过儿童脐血移植数。东京脐血库提供101例脐血移植患者的资料接受脐血移植99%成人患恶性疾病,而25%儿童患非恶性疾病。尽管成人平均每千克体重输注的有核细胞数、集落数和CD34细胞数只

有儿童的二分之一,但成人与儿童脐血移植中性粒细胞 $>0.5 \times 10^9/L$ 的中位时间分别为 25 天和 33 天,差异无统计学意义。另据纽约血液中心(N York Blood Center)、全国脐带血协会(National Cord Blood Program)理事长 Pablo Rubenstein 介绍,全世界各国脐带血库已提供了超过 3500 份移植用脐带血干细胞。

2005 年末,美国通过《2005 年干细胞治疗与研究法案》,为脐带血干细胞研究和应用提供约 8 千万美元资金,以便在 5 年内建立一个储存数目达到 15 万份的国家脐带血库网络,这在一定意义上也说明脐带血的重大意义及建设脐带血库的必要性正被人们逐渐认识和肯定。一方面,脐带血储存数量的增加,要求我们建立高标准的脐带血库,这不仅包括高质量的脐带血、先进的相关设施、完善的产品标准质量体系,还包括标准的操作程序,从而实现脐带血库的自动化和工业化。美国血库联合会(AABB)和细胞治疗授权基金会(FACT. NETCORD)最近分别公布了自体脐带血库和公共脐带血库标准,用以指导脐带血的收集、检测、处理和储存。此外,Adami 等在 2005 年报道了一种新的分离装置在保证有核细胞和 $CD34^+$ 细胞高回收的前提下,能够在 60 分钟内快速去除红细胞,这为脐带血库的自动化提供了方向。另一方面,脐带血储存数量相对于人口总数来说仍然很少,这需要国家在财政方面的大力扶持。

美国 CRYO—CELL 公司是世界最大的自体脐带血干细胞库,已在美国纳斯达克上市。至 2003 年 4 月,该库已储存自体脐带血干细胞 5 万份。许多大学和科研机构成立了干细胞研究所或实验室。以研制和生产供临床治疗和科研用干细胞产品为目的的公司纷纷成立。许多跨国制药和生物技术公司也涉足干细胞研究,各国政府都在干细胞的研究领域投入了大量的人力物力,意图抢占 21 世纪生命科学的制高点。最近国际权威杂志《新英格兰医学杂志》和《血液》杂志对脐带血等成体干细胞的临床应用做了全面综述,提出有望在不久的将来用脐带血干细胞治疗糖尿病、肝病、肾病、老年病等 40 余种疾病,修复并再生组织器官。鉴于脐带血干细胞技术的发展和脐带血干细胞巨大的医学价值,2003 年 7 月,美国国会议员 Chris Smith 正式向国会提出立法,要求政府加大对脐带血库的投入,在未来的两年投入 4500 万美元建设 15 万份规模脐带血库;9 月,美国国家卫生研究院(NIH)宣布在 3 年内为三家研究机构拨款 630 万美元,资助人类胚胎干细胞的研究。

近年来,我国的脐带血库建设也取得了飞速发展,早在 1996 年,中国就在北京建立了脐带血库,也是北京地区唯一一家脐带血库。近 10 年来,我国先后已有 50 多家医院开展了脐血干细胞的移植临床医疗工作。自成立至今,血库已成功储存脐带血造血干细胞 6 万余份,为国内外 2000 多名需要移植的患者进行了造血干细胞的配型查询,先后为 184 例患者的临床治疗提供了 200 多份脐血造血干细胞。中国到 2010 年之前将设置 4 至 10 个脐带血库。专家测算,在我国公民自愿捐赠的脐带血库存量达到 7 至 10 万份时,就能基本满足目前我国儿童相关疾病临床治疗需求。截至 2008 年 1 月,中国脐带血库公民自愿捐赠总共存储的脐血造血干细胞 2.5 万份,公民自愿出资储存的脐血造血干细胞超过 8 万份,实现非血缘脐血干细胞移植 500 多例。

脐血长期以来都被认为是废物而被丢弃。随着 1988 年首例脐血造血干细胞移植获得成功,促进了脐血造血干细胞的临床应用。

三、世界脐血库建立情况

1992 年 Rubinstein 在美国纽约血液中心开始建立脐血库。他们从市内产科医院收集脐血,运送到血液中心,经过去除红细胞后在 -196°C 液氮中冷冻保存。1993 年与美国 Duke 大学合作,首次为 2 例急性淋巴细胞白血病患者实施了 HLA 配型相合的移植。其中 1 例脐血来自无关供体脐血,另一例来自同胞间的脐血。截止到 1998 年来,纽约血液中心共采集脐血约 8000 余份,已为世

界 290 个移植中心的 6497 个患者寻到了脐血。已提供临床脐血移植 600 余份,是目前世界上储存脐血和提供脐血移植份数最多的脐血库。

欧洲的法国、英国、德国、西班牙、意大利等国也相继建立了脐血库。日本也在 1995 年开始建立脐血库,至 1998 年 1 月,已正式建立脐带血库 9 个,共保存脐血 1500 余份。我国北京大学人民医院于 1997 年开始着手建立脐带血库的工作,到 1998 年 6 月,已冻存检测 HLA 的脐血近 2000 份。天津、广州等地亦已开展此项工作。脐血库与骨髓库的比较见表 1—1。

表 1—1 骨髓库与脐血库的比较

比较指标	骨髓库	脐血库
造血干细胞采集量	基本可满足需要	受采集、冻存量的限制
患者申请至移植需时	数月	数周
因各种原因提供造血于细胞取消率	25%~30%	基本没有
采集造血干细胞并发症	6%	无
细胞保存	不需要	需要
CMV 阳性率	42%	<2%
必要的供者数	10 万~30 万人	1 万~2 万份

随着世界各地脐带血库数量和脐带血库库容(冻存脐血份数)的不断增加,需要一套完整的脐血库标准系统,以达到标准化、系统化、规范化、规模化的科学管理。1997 年西班牙、德国及意大利参照 ISO9000 系列国际质量控制系统建立了一套从脐血采集、分离、冻存、检测、功能鉴定、HLA 分型方法及脐血库的管理与质量控制标准,此后成立了欧洲脐血库协调机构(Eurocord)。1997 年 3 月又成立国际性脐血协调网络(Netcord)。世界上目前已建立起的规模化的脐血库已超过 100 个,未形成规模化的脐血库有上万个。

目前,脐血库可以分为两种:①非血缘关系脐血库(又称为公共脐血库):脐血来源

为无关供者,通过各种检测和组织配型后,可用于组织配型相匹配的患者;②自体或同胞间脐血库(又称为自体脐血库):用于保存胎儿本人的脐血,为将来胎儿本人或其亲属需要时做储备。合格的可登记的脐血标准见表 1—2。

表 1—2 脐血登记合格标准

1. 传染病检查(母体资料):HbsAg(—),HIV1/HIV2(—),HTLV. 1(—),Hcv(—),梅毒血清反应(—)
2. 妊娠并发症(—),分娩诱导剂之外的用药(—)
3. 胎龄 38~40 周
4. 采集脐血量:50ml 以上
5. 采集有核细胞数: 3×10^8 以上
6. 脐血的细菌检查:需氧菌、厌氧菌、真菌(—)
7. 家族中无遗传病记载

四、存脐血的相关检查

检查的主要目的是最大限度地保证脐血移植受者的安全性,同时还需要考虑到供者费用和方便因素,所以检查一般分两步进行,包括冻存前的检查和移植前的检查。

冻存前常规进行以下检查:询问产妇关于其种族、既往健康情况、家族史以及围产期感染的详细情况。对母血及脐血样本均进行 HBsAg、HCV、HIV 和 CMV、EBV、弓形虫和梅毒螺旋体的检查以及细菌培养等;采集的脐血量、全血细胞数、单个核细胞数、分离后细胞回收率、造血干/祖细胞培养、CD34⁺ 细胞数量及台盼蓝拒染测定细胞活率;HLA 分型。

脐血中 HLA—I 类分子表达水平外周血差别不大,而 HLA—II 类分子表达低于成人外周血。

HLA—I 类分型的方法包括血清学方法和 DNA 分型法:血清学方法即传统的微量淋巴细胞毒试验,是目前 HLA—I 类分型的常用方法;DNA 分型法包括 PCR—SSp、PCR—SSOF、PCR—DNA 测序等方法,其结果较血清学方法更可靠。HLA—II 类分型常规采用 DNA 分型法,常用 PCR—SSp、PCR—SSO 等方法。

采用何种方法进行 HLA 配型除应考虑其准确性及可靠性外,还应考虑到费用问题,可选择的方案包括:①仅对 HLA—I 型抗原进行配型,只有在 HLA. A、B 均匹配时再对冻存的标本进行 HLA—II 型抗原进行配型;②先用血清学方法证实 HLA—I、II 型抗原相合后,再用分子生物学方法对 HLA—DR 进行配型;③先用分子生物学方法鉴定 HLA—II 型抗原,如相合再进行 HLA—I-A、B 配型。

五、建立脐血库的基本要求

1. 脐血库的含义

CBB 可以说是一个系统工程,特别强调组织化、系统化和程序化,一般认为它是一个完整的团队,他们负责脐血的采集、处理、测试、储存、选择合适的脐血并发放到临床移植中心。

2. 脐血库设施方面的要求

CBB 是生物领域内现代化生产项目,因而对空间、设备、相关实验室都有严格的要求。首先要求足够和洁净的空间,用于各种实验操作和 CB 的储存。所谓洁净并不是普通意义上的干净,而是对实验区域内细菌数量和空气中的尘粒都有明确的要求,这样才能保证实验操作中 CB 不受污染。目前卫生部规定 CB 操作间必须达到“药品生产质量管理规范(CMP),这就要求必须要有专门的洁净设备,并经常检测和维护,工作人员也要遵守相应的工作规程。

试剂和消耗器材的存放要安全、卫生和有序,无菌和有菌的试剂、消耗器材必须分开存放。同时要有 CB 采集、处理、测试和储存等必备的设备。CBB 必须和以下实验室联合工作:HLA 检测实验室,用于检测供者和 CB 的遗传病、传染病的实验室。

3. 脐血库的安全措施

安全性是建立脐血库的一个重要内容,每个 CBB 必须有相应的措施以最大程度保证工作人员、供者和移植受者的安全,这在后面的章节中有介绍。同时还要求注意处理污染物和 CB 操作过程中产生的废弃物,以免造成生物污染。某些实验室废弃物不具有传染性,如产品包装材料和废纸,可与传染性废弃物区分开来而作为普通废弃物处理。这样做可降低特殊处理的废弃物的量。而可能有传染性的废弃物如脐血采集袋(目前认为凡血制品或与血制品接触的废弃物都要作为传染源处理),应采取高压消毒和焚烧等方法灭活传染性微生物。通常这样的处理是交给专门的处理医疗废弃物的公司处理的。

4. 人员

人员是 CBB 的重要组成部分。首先是带头人,他对 CBB 的科学研究和临床应用总负责。因而国际上一般要求带头人是医学或科学博士,并经血液学、免疫学或冷冻学方面的培训。同时国际上 CBB 往往邀请多名 HSCT 专家做顾问,可以让临床对 UCBT 的观测结果及时反馈到 CBB,进而改进工作。目前国际上和国内,CBB 往往有一个实验室主管,他对 CB 的处理和储存负责。特别强调的是,各个 CBB 都配备有专门的质量控制人员。这些人员由带头人指定,对各项操作的质量要求非常熟悉。CBB 的其他人员也要求经过严格的培训,能胜任各项工作。

5. 质量控制

质量控制是 CBB 的生命,它涉及到供者的筛选,CB 的采集、处理、冷冻和保存,传染病的检测,

HLA 配型和其他检测等方面。可以说每一个环节,质量控制都有重要的意义。

6. 证书

目前全世界大大小小的脐血库数以百计,而库存的总脐血量达到几万份。北美和欧洲已制定了相应的法规,并有专门的机构认证新的 CBB,只有获得证书的 CBB 才能正式运作。我国卫生部已经出台了管理 CBB 运作的草案,已具规模的 CBB 都在积极地准备,迎接卫生部的审查。

六、脐血库建立的方法

建立一个脐血库必须解决的问题,包括:①确立脐血的采集方法;②确立分离、保存脐血造血干细胞的方法;③确定造血干细胞的检测方法,包括确定造血干细胞或祖细胞的培养(CFU—GEMM、BFU—E、CFU—GM 等)和流式细胞技术测定 CD34⁺ 细胞等的方法;④具有一定规模的脐血保存场所,并具备高清洁度空间;⑤具有符合 GMP、GLP 标准的实验室;⑥具有微量血流(2~3ml)检测 HLA I、II 抗原的能力;⑦确定检测病原菌的方法,包括细菌(需氧菌、厌氧菌)、真菌、病毒(HIV、HBV、HCV、CMV)、寄生虫、梅毒、弓形虫等;⑧具备对脐血供体检查各种遗传性疾病的能力;⑨具有安全可靠的脐血来源;⑩具有脐血各项检查结果、母亲、供体等的资料储存管理系统。另外,尚有确定的脐血安全输送的方法,具有从事上述工作的专门人材和具备脐血库建立及日常运输所需的经费等。脐血库的建立必须符合血库的管理要求,从而保证脐血应用的安全性和有效性。

为了了解脐血标本质量,并了解所实施分离、冷冻技术的稳定性,常规应进行以下检测:①冷冻前:血量、全血细胞数、造血祖细胞数量、去红细胞后细胞数、细胞回收率、台盼蓝拒染率。②冷冻后:每份标本冷冻同时冻存一份备存管(内含 10⁷ 左右的细胞),配型相合时先取出冷冻管解冻,检测细胞数、台盼蓝拒染率及造血组细胞数目,以了解是否符合病人体重的要求,同时可以复核 HLA 配型。

脐血的临床应用所取得的成果,足以证明它是 HSC 的可靠来源,随着基础与临床研究的进一步深入,相信 UCBT 的适应症将逐渐扩大,有望为某些造血调控异常的疾病提供更广泛、安全、有效的治疗手段。目前通过脐血干细胞移植能够解决的疾病越来越多,等待干细胞移植的患者也越来越多,脐血干细胞移植在临床上的需求将日益增多。在今后的脐血移植中,应着重改进治疗策略,使移植能早期且持久植入,同时尽可能减少 GVHD 和移植相关死亡率为越来越多需要移植治疗的病人带来福音。

(周 芳 许晓巍 孙黎飞)

第三节 脐血干细胞移植的适应症与禁忌症

一、脐血干细胞移植的适应症

脐血干细胞移植的适应症包括:①对化/放疗敏感的恶性肿瘤如急性白血病、慢性白血病、神经母细胞瘤等。②需要造血重建的非恶性血液系统疾病。如范可尼贫血、再生障碍性贫血、 β 地中海贫血等。③需要免疫重建的难治性疾病。如原发性免疫缺陷病等。

以上患者需与供体脐血 HLA 配型相合,或 <3 个 HLA 抗原不匹配。最好选择 16 岁以下的儿童患者,体重 <40kg;无影响移植的心、肝、肺、肾疾病;移植前输血少,或输血较多,但时间已超过 3 个月;血清病毒学检查阴性,无过敏体质。

由于脐血量及其有核细胞数有限,迄今为止的 UCBT,多用于体重 <40kg 的患儿。但一些研