



# 目 录

289-83/6/6  
3.88元

- 造血干细胞的性能及其在造血障碍疾病治疗中的应用.....吴祖泽 ( 1 )
- 造血干细胞的实验研究.....吴祖泽 ( 15 )
- 小鼠骨髓细胞体外琼脂培养的几种方法的比较.....吴祖泽等 ( 22 )
- 人胎肝造血干细胞的性能、保存及其临床应用.....费瑞高等 ( 29 )
- 国内造血干细胞研究概况.....吴祖泽 ( 44 )
- 红细胞膜与溶血.....潘华珍等 ( 48 )
- 染色体与染色体病.....刘权章 ( 59 )
- 先天性代谢病.....张贵寅 ( 82 )
- 血红蛋白分子病.....张贵寅 ( 91 )
- 人类白血病病毒病因研究的重大突破.....范江等 ( 100 )
- 恶性组织细胞病的临床诊断.....郁知非 ( 104 )
- 白血病研究进展.....杨天楹 ( 108 )
- 慢性粒细胞型白血病的进展概况.....洪宝源 ( 115 )
- 中西医结合治疗研究白血病的概况与展望.....周鸞祥 ( 133 )
- 血小板功能缺陷性疾病.....王振义 ( 138 )
- 原发性血小板减少性紫癜的研究进展.....沈志祥等 ( 146 )
- 弥散性血管内凝血.....王振义 ( 155 )
- 血友病甲及血管性假血友病的研究进展.....王振义 ( 162 )
- 血栓形成及抗血栓疗法.....王振义 ( 170 )
- 西德急性白血病及淋巴瘤诊治及分类有关问题简要介绍.....王辨明 ( 181 )
- 美国血液学研究的一些动向.....张之南 ( 190 )
- 再生障碍性贫血的研究进展.....殷德厚 ( 196 )

# 造血干细胞的性能及其在造血障碍疾病治疗中的应用

军事医学科学院 放射医学研究所

吴祖泽

五十年代后期,在骨髓移植的实验研究基础上,开始了人的骨髓移植,并用于治疗放射事故病人、免疫缺损、再生障碍性贫血以及白血病等患者,特别是在孪生子之间的骨髓移植中取得了良好的疗效。但是,在同种骨髓移植中遇到了严重的、甚至是致死性的威胁,即移植物抗宿主(GVH)反应的发生可以导致骨髓移植的失败。这是六十年代临床骨髓移植治疗进入停滞状态的主要原因。Bortin<sup>(1)</sup>总结了1967年以前的骨髓移植工作,能够确实证明移植成功的比例不到10%。近十多年来,由于造血干细胞研究的逐步深入,骨髓移植中组织配型、免疫抑制剂在防止继发病研究中的进展,以及临床经验的累积,骨髓移植在临床治疗中的意义和可能性又引起了人们的重新估价,并在实验研究和临床研究中进入了一个新的活跃时期。

## 一、造血干细胞的测试技术

在成年动物的造血组织中,造血干细胞的数量极少,因此,从形态上识别它们,或者用形态分类方法计数它们在造血组织中的数量,都是有困难的。目前测定造血干细胞的各种方法都是根据它们的功能特征,即细

胞增殖和分化的特性,应用生物学方法作相对测定的。

### (一) 脾结节的形成

1961年Till和McCulloch<sup>(2)</sup>发现对受致死剂量射线照射小鼠输注同种正常骨髓细胞后的8—10天,可以在受体小鼠脾脏上生成肉眼可见的,由红系、粒系或巨核系细胞或三者混合组成的脾结节。脾结节的生成量与输注的骨髓有核细胞数成正比。应用标记染色体的实验技术可以进一步证明这些脾结节都是起源于单一细胞的增殖和分化的结果,符合了多向性造血干细胞的基本特性。因此,称脾结节的生成细胞为多向性造血干细胞(CFCs),或者,把每生成的一个脾结节称为CFU—S。这样,CFU—S就成了造血干细胞在实际操作中的一个定义。

CFU—S测定法是实验血液学研究中一个重要的、基本的反映多向性造血干细胞的实验技术,它的不足之处是仅仅适用于啮齿类动物。如果将狗或人的骨髓细胞输注给受照射的小鼠,则在一般情况下都不能生成由狗或人造血细胞所组成的脾结节<sup>(3)</sup>。

### (二) 造血细胞的体外测试技术

1965年以后发展了一系列造血细胞的体外培养技术,为评价各种动物或人的造血细

细胞的功能状况,提供了许多有意义的定量研究技术。

### 1、CFU—C测定法

动物和人的造血细胞在适当的刺激因子(CSF)作用下,可以在体外琼脂(或甲基纤维素)培养体系中生成主要由粒系细胞或单核—巨噬细胞或二者混合组成的细胞团(CFU—C)。在上述培养条件下生成的细胞团是起源于单一细胞的,称生成这类细胞团的原始细胞为CFCc。因此,应用体外琼脂培养方法可以测定CFCc的相对数量,同时,可以研究体液中存在的细胞团生成的刺激因子(CSF)对细胞团生成的作用特点,从而加深了对体内粒系和单核—巨噬细胞的生成及其控制的认识(4' 5)。

### 2、CFU—E测定法

多向性造血干细胞在向红系细胞方向分化的过程中经历了一个受红细胞生成素(EP)作用的阶段,即这类细胞在EP作用下可以诱导血红蛋白的合成,并推进这类细胞向骨髓红系细胞方向的分化,把这类细胞统称为ERC。

若将上述体外琼脂培养中的支持物质改为血浆凝块,CSF改为EP,则造血细胞在类似的条件下经过2—3天培养后,可以生成由数个至数十个红系细胞组成的细胞团,称这类细胞团为CFU—E。它们可能是ERC细胞群中一类在分化程度上比较接近于原红细胞的细胞亚群。在提高培养体系中EP浓度的条件下,经过数天培养后,则可以生成由较多红系细胞组成的大型细胞团,称BFU—E(6' 7)。

### 3、CFU—M测定法

小鼠骨髓细胞在淋巴细胞条件培养液的刺激下可以生成由巨核细胞组成的细胞团。由于上述淋巴细胞条件培养液中同时含有促进粒细胞和单核—巨噬细胞组成的细胞团(CFU—C),及嗜酸性粒细胞组成的细胞团(CFU—Eo)生成的刺激因子,因此,

在上述培养体系中生成的是一个由多种类型细胞团组成的混合体(8' 9)。

### 4、B—淋巴细胞团的生成

小鼠脾脏细胞或淋巴结细胞等在含有适量巯基乙醇的体外琼脂培养体系中可以生成由B—淋巴细胞组成的细胞团。如果在上述培养体系中加入适量胎牛血清(FCS)和羊红细胞或内毒素,则细胞团的生成数量与种入的细胞量之间呈良好的线性关系(10' 11)。

### 5、T—淋巴细胞团的生成

外周血经密度梯度分层液(Ficoll—Pague,  $d = 1.077g/cm^3$ )的离心分离后,收集的单个核细胞在含有植物凝集素(PHA)和羊红细胞的琼脂(0.45%)培养体系中,在37°C条件下经过5—7天培养后,可以生成由淋巴细胞组成的细胞团。为了计数方便起见,计数前可以先在培皿中加入0.5毫升3%醋酸溶液溶解红细胞(12)。

### 6、CFU—MiX的测定

动物和人的造血细胞能不能在体外培养条件下生成由骨髓各系细胞混合组成的细胞团?

Hara和Ogawa(13)应用体外甲基纤维素培养体系,当其中含有适当组成的条件下( $\alpha$ -培养液、0.8%甲基纤维素、1%牛血清蛋白、30%胎牛血清、 $1 \times 10^{-4}M$ 巯基乙醇、 $2.0u/ml$ 红细胞生成素以及适当浓度的脾脏细胞条件培养液等),小鼠骨髓细胞经过体外培养14天后,可以生成由红系细胞和巨噬细胞或红系细胞、巨噬细胞和巨核细胞混合组成的细胞团,称这类混合组成的细胞团为CFU—MiX。它的产率比较低,为 $5.0 \pm 1.7CFU-MiX/10^5$ ,然而,CFU—MiX生成量与培皿中种植的小鼠骨髓有核细胞数之间呈线性关系,支持了这类细胞团是起源于一个原始细胞的增殖和分化的结果。从细胞的生理特性(例如,受高比活性 $^3H-TdR$ 掺入后的自杀率接近于0)和物理性质(例如,细胞沉降速度为 $3.4mm/小时$ )

的初步资料分析中可以见到。CFU—MiX 是一类在性质上类似于CFU—S的造血干细胞亚群。因而，为在体外培养条件下测定造血干细胞提供了一个方法，也为在类似条件下测定除啮齿类动物以外的各种动物和人的造血干细胞提供了一个线索。

### 7、造血细胞的体内扩散盒琼脂或血浆凝块培养

Gordon (14) 将体内扩散盒培养技术与体外琼脂培养技术结合起来，形成了体内扩散盒琼脂培养方法，它利用受体动物的内源性CSF，生成由粒系细胞和单核—巨噬细胞组成的细胞团(CFU—C)。利用这个培养体系测定了小鼠、狗、人骨髓细胞中CFU—C的相对含量。

骨髓细胞在血浆凝块培养体系中，必须在有Ep的参与下，经过2—3天的体外培养后，才能生成由数个至数十个红系细胞组成的细胞团(CFU—E)。Sternberg(15) 汪涛(16) 等将体内扩散盒培养技术与体外血浆凝块培养法结合起来，利用受体动物内源性Ep和CSF，可以生成类似的红系细胞团(CFU—E)和粒系细胞团(CFU—C)为研究造血干细胞的分化提供了一个实验技术。

## 二、造血干细胞增殖和分化的模型

许多实验资料指出，应用上述不同的测试技术所表示的造血干细胞或祖细胞，在性质和功能上都不是完全一样的。下面列举几点，比较CFU—S与CFU—C、ERC、CFU—E等在细胞性质和功能上的差异：

1、在正常生理条件下，成年小鼠骨髓中CFU—S大多处于细胞静止期( $G_0$ )，自杀率小于10%；而CFU—C或ERC的自杀率却高达40%。(17)

2、在细胞沉降速度上，成年小鼠骨髓

CFU—S和CFU—C的沉降速度分别为 $S$  (CFU—S) = 4.67mm/小时， $S$  (CFU—C) = 6.13mm/小时；成年小鼠脾脏CFU—S和CFU—C的沉降速度分别为 $S$  (CFU—S) = 4.50mm/小时， $S$  (CFU—C) = 6.69mm/小时；胎鼠肝脏CFU—S和ERC的沉降速度分别为 $S$  (CFU—S) = 5.9mm/小时， $S$  (ERC) = 7.7mm/小时。细胞沉降速度上的差异反映了造血干细胞在向定向干细胞或祖细胞分化中有一个在细胞体积上过渡性增大的过程(18, 19)。

3、各类造血干细胞有不同的辐射敏感性。在整体 $\gamma$ 线照射条件下，小鼠骨髓CFU—S的 $D_0$ 值为104.7拉德，CFU—C的 $D_0$ 值为157.8拉德，豚鼠骨髓CFU—C的 $D_0$ 值为84.2拉德，CFU—E的 $D_0$ 值为67.6拉德(16, 20)。

4、Dexter (21) 在小鼠骨髓细胞的体外液体培养中，将含有CFU—S的细胞悬液输注给经 $\gamma$ 线照射的小鼠，有明显的促进照射动物造血恢复的效果；将含有CFU—C(不含CFU—S)的细胞悬液输注给照射小鼠，不具有类似的功能。对于照射小鼠的治疗效果，随输注CFU—S数量的增加而加强，而且，与输注CFU—S的生理状态有关(22)。

5、Golub (23) 发现小鼠脑组织与造血干细胞(CFU—S)有一个共同的抗原。因此，用小鼠脑组织免疫大鼠、家兔或山羊后所制备的抗血清(RAMB)可以在体外与造血细胞接触中，对其中的造血干细胞(CFU—S)起到细胞毒的作用，导致CFU—S生物功能的丧失。上述抗血清经过胸腺、脾、肝、骨髓、红细胞、肺等多种组织吸收后，唯有脑组织具有明显降低抗血清中抗CFU—S的毒性作用，而且，成年小鼠脑组织比较新生(出生1—3天)小鼠脑组织具有更强的吸收能力。RAMB血清作用骨髓细胞后，在CFU—S明显损伤的同时，并

不影响其中CFU-C和CFU-E在体外培养条件下生成细胞团的能力或产率，反映了这种抗原随着多向性造血干细胞向祖细胞（CFU-C、CFU-E）方向的分化而消失。

Testa (24) 的最近工作指出，小鼠骨髓细胞经与RAMB血清作用后，将细胞悬液注射给受致死剂量射线照射的受体小鼠，脾结节生成减少近95%。但是，在注射的细胞悬液中加入 $25-50 \times 10^6$ 个胸腺细胞，或者，受体小鼠注射上述细胞悬液的30—60分钟，再注射 $25-50 \times 10^6$ 个胸腺细胞，则脾结节的生成量可以恢复到近于正常的水平。如果胸腺细胞事先经过1600拉德 $\gamma$ 线照射，就失去了以上的效果。从这些初步的实验结果中可以推测，RAMB血清并非直接作用于CFU-S，可能是作用于一类在脾结节生成中协助造血干细胞生成脾结节的细胞。

上述实验资料说明，造血干细胞群是一个不均一的细胞群，其中，造血干细胞（CFU-S）具有自我更新和多向分化的能力，因此，它是维持正常造血，或者在骨髓移植中促进造血和免疫重建中起决定作用的细胞类型，而祖细胞（CFU-C、CFU-E、BFU-E、CFU-M等）是一类在分化方向和增殖能力上都受到了限制的细胞群，后者在进一步的分化中成为形态上可以识别的各类幼稚的骨髓细胞。

应用标记染色体技术进一步证明了存在于外周血中的各类血细胞（红细胞、粒细胞、血小板、淋巴细胞等）都是起源于造血组织中的多能造血干细胞的(25)。

### 三、不同来源造血干细胞的性能比较

小鼠胚胎发育中的造血活动大致可以分为卵黄囊造血、肝、脾造血和骨髓造血等三个阶段。胚胎第10天，卵黄囊造血逐渐衰

退，开始了肝脏造血。受孕10天后，可以在肝脏中见到造血干细胞的出现和数量的逐渐增多。随着胚胎的进一步发育，可以见到造血干细胞性质和功能的相应变化(26-28)。

#### 1、造血干细胞分布

造血干细胞主要分布在造血组织，也有少量循环于外周血中。若以造血干细胞的浓度（每 $10^5$ 个有核细胞中CFU-S含量）作为比较基础，则骨髓CFU-S的浓度最高（ $28\text{CFU-S}/10^5$ ），受孕15—18天胎肝中造血干细胞浓度仅为成年骨髓中的1/3—1/4（ $7.9\text{CFU-S}/10^5$ ），脾脏中CFU-S浓度较低（ $1.9\text{CFU-S}/10^5$ ）应用泛影葡胺和右旋糖酐分层液（ $d=1.090\text{g}/\text{cm}^3$ ）分离的外周血有核细胞（其中，淋巴细胞和单核细胞占90%以上）中，CFU-S浓度最低（ $0.7\text{CFU-S}/10^5$ ）。若以整个组织作为比较基础，则成年小鼠中绝大部分的造血干细胞集中于骨髓。

#### 2、造血干细胞的物理性质的比较

在胚胎的发育过程中，造血干细胞的密度逐渐增大，细胞体积渐渐减小，而趋于与成年骨髓造血干细胞的性质相接近(29)。

应用直径为14.2厘米的沉降池测定了不同来源造血干细胞在4℃条件下的沉降速度。受孕15—18天的胎肝CFU-S的沉降速度（ $S=5.79\text{mm}/\text{小时}$ ）比较同样沉降条件下的骨髓CFU-S（ $S=4.38\text{mm}/\text{小时}$ ），脾脏CFU-S（ $S=4.50\text{mm}/\text{小时}$ ）和外周血CFU-S（ $S=4.96\text{mm}/\text{小时}$ ）为高，反映了胚胎期间与成年动物中的造血干细胞在细胞体积或沉降速度上存在着的明显差异，然而，在成年动物各组织中的造血干细胞，它们在细胞体积或沉降速度上却是基本近似的。

#### 3、造血干细胞生长特性的比较

对于800拉德 $\gamma$ 线照射小鼠输入含有相近数量CFU-S的胎肝细胞、或骨髓细胞、或外



## 四、造血干细胞移植在造血障碍疾病治疗中的应用

### (一) 骨髓移植

在比较多的情况下,骨髓移植被用来治疗严重的免疫缺陷病(SCID)、再生障碍性贫血和急性白血病。在严重的再生障碍性贫血中,曾经使用了广谱抗菌素、激素以及输血等治疗措施。但是死亡率仍高达80—90%。Thomas及其同事(34)用孪生子骨髓治疗10例再障病人,其中8例取得良好治疗效果;对73例严重的再障患者施行HL—A相同的同胞骨髓移植中,31例存活1—5.5年(占42%)。其中25例达到痊愈并恢复了正常生活,另6例发生慢性GVHD;对110例急性白血病患者施行骨髓移植后,其中17例存活1—6年(35)。这些事实说明,再障发生的发病机理中与体内造血干细胞数量与功能的变化有着密切的联系,移植的骨髓细胞可以在患者的骨髓基质或造血微环境中生存和繁殖,因而有利于体内正常造血功能的重建。

类似的,对超致死剂量X或γ射线照射狗及时地移植适量的同种骨髓后,都有明显的促进造血恢复的作用,表现为骨髓再生、外周血白细胞、血小板的迅速回升、临床症状的减轻或消失等(36)。在对存活动物的骨髓和淋巴细胞的染色体分析中,可以见到供体骨髓在受体中长期嵌入。例如,一条雄性狗经全身1490伦X线照射后,输入 $11 \times 10^9$ 个同种雌性狗骨髓有核细胞,4年后,临床表现和造血功能都已恢复正常,而且,骨髓、外周血和淋巴结细胞中存在的都是典型的供体狗的染色体组型(37)。

人服用大剂量肿瘤化疗药物或放射性事故中受到大剂量射线照射后,正常造血遭到了严重的破坏。在这种情况下,为了实现造血恢复所需要输入的正常造血干细胞的数量

可以作如下的粗略估计:从16例白血病人移植孪生的骨髓细胞中,对于促进造血恢复有效的细胞量为 $1.7-4.0 \times 10^8$ 个/公斤体重;对于放射事故病人输入 $9.1 \times 10^8$ 个孪生骨髓细胞后,造血恢复提前,临床症状减轻。假定骨髓穿刺中造血干细胞的相对浓度为 $300 \text{CFU}-\text{C}/10^6$ ,则上述骨髓治疗中输入的造血干细胞总量约为 $2.7 \times 10^6 \text{CFU}-\text{C}$ (38)。

造血干细胞对电离辐射或细胞毒剂是很敏感的,然而,动物经射线的局部照射或全身照射后及时地移植适量的骨髓细胞,都可以见到照射局部或全身造血组织中造血功能的恢复。这些结果说明,造血干细胞在体内是可以由一个部位向另一个部位迁移的,同时,骨髓的基质对射线又是相对地不敏感的,因此,对于极重度造血型放射病或轻度肠型放射病,在照后迁入造血组织的造血干细胞可以在原有的基质中“着陆”,并进行增殖和分化(39,40)。

### (二) 外周血白细胞移植

对照射动物输注全血,不仅有抗感染、抗出血等功用,而且有促进造血恢复的作用,这在动物实验和临床应用中都得到了证实(41-45)。产生这种作用的原因是由于血液存在着少量的造血干细胞,它们通过输血植入照射机体造血组织后的增殖和分化,可以从根本上改善机体的造血功能。

在血细胞分离器(Blood cell separator)问世之后,促进了从外周血分离造血干细胞,并用于对造血障碍疾病进行实验治疗和临床研究的研究。由于从外周血分离造血干细胞比从髂骨、肋骨等多次穿刺采集骨髓简便,因此,容易被人们所接受。

应用IBM或Aminco血细胞分离器可以自动地、连续地从人外周血中分离有核细胞。在对全身作连续5小时的分离中,可以收集到 $8 \times 10^6 \text{CFU}-\text{C}$ 。所以,从外周血中收集到相当于或超过穿刺骨髓所能得到的



CFU-C数量是有可能的。假定骨髓和外周血白细胞在体外培养中CFU-C产率是可以互相比拟的,则上述5小时内收集的造血干细胞量已足够用于一个病人,对由化疗药物或射线所致的造血损伤可以起到明显的治疗效果<sup>(46)</sup>。分离前,如给供体注射某些药物(内毒素、强的松龙等)可以提高外周血中CFU-C含量。这些都预示着应用血细胞分离器从外周血分离造血干细胞,并有效地用于对造血障碍疾病治疗中所蕴藏的潜力。

但是,与骨髓相比,血液中造血干细胞的数量毕竟是比较少的。无论在骨髓或血液中,免疫活性细胞的数量比较造血干细胞多得多。因此,免疫反应,即移植细胞的抗宿主反应,已经成为骨髓或血液造血干细胞实际临床应用中的主要障碍。

Flidner等<sup>(47)</sup>选择狗白细胞抗原(DL-A)相同、混合淋巴细胞培养反应(MLR)为阴性的两条狗分别作为供体与受体。应用血细胞分离器先从供体中分离白细胞、然后输注给经全身1200伦X射线照射的受体。或者,在照射前先用血细胞分离器分出自身白细胞作冰冻保存,动物经全身1200伦X射线照射后,再将贮存的自身白细胞输回原动物。实验结果表明,对照射动物移植相同数量的自身白细胞或同种白细胞,在近期内,两者对促进骨髓再生的程度上并无明显差别,它们都有促进照射动物造血组织和淋巴组织恢复的功能,但是,在远期的治疗效果上却显示出很大的差别。4条狗经全身1200伦X射线照射后输注 $1.2-1.6 \times 10^6$ 个自身白细胞,动物存活时间在483—791天以上。12条狗经同样剂量X射线照射后输注同种白细胞,其中只有一条狗存活二年以上,其余11条狗大都于照后一个月内死亡。另外14条狗经相同剂量射线照射和移植同种白细胞后,给予氨甲喋呤作免疫抑制治疗,则14条狗中6条存活时间在84—310天以上,而且,从染色体分析中可以证明供体的细胞已植入

受体,并在受体的造血组织和淋巴组织中长期生存和繁殖。

当前,临床治疗用的造血干细胞主要取自患者自身。例如,对于造血功能正常的肿瘤病人,在化疗前先从外周血收集足够量的造血干细胞、冷冻保存;在化疗导致造血严重破坏之后,再将贮存的造血干细胞输回自身<sup>(38)</sup>。在不断提高对免疫活性细胞的分离技术,尽量减少移植的造血干细胞样品中免疫活性细胞数量的基础上,有可能使同种造血干细胞的移植有效地应用于临床实际中。

### (三) 胎肝移植

应用组织抗原一致的骨髓移植治疗婴儿免疫缺陷病是一项有效的治疗措施。但是,对于组织抗原不一致的供者与受者之间施行骨髓移植,往往由于GVHD的发生,导致移植的失败。在胚胎的发育期间,肝、脾都是造血器官,其中淋巴细胞的含量比较少,而且大多尚未完全分化为成熟的T—淋巴细胞。动物试验表明,移植同种胎肝细胞所引起的GVHD比较移植同种骨髓为轻。然而,胎肝细胞与骨髓细胞有相似的再生能力。例如,对照射的C3H小鼠移植同系或异系(Af)胎肝细胞或新生小鼠的脾脏细胞后,应用Simonsen的GVH鉴别试验,可以证明受体小鼠中同时存在着供体与受体小鼠的免疫活性细胞,但是,从动物的存活和GVH反应中说明,受体对供体的免疫活性细胞具有耐受性<sup>(48)</sup>。

近年来的临床经验表明,应用胎肝细胞治疗婴儿免疫缺陷病(CID)的效果还不够理想,主要的原因是移植的细胞不容易在受体中植入。这可能有几方面的原因:

1、移植的细胞量。荷兰放射生物学研究所的学者们在对照射小鼠移植胎肝细胞的研究中进一步观察到移植同种异系小鼠胎肝细胞(C57BL→CBA)需要的细胞数量为同系移植中的2倍,加上胎肝CFU-S浓度



约为骨髓的 $1/3$ ，因此，为了达到与骨髓移植中有相似的治疗效果，需要输入胎肝细胞数量应为骨髓有效细胞数量的6倍<sup>(49)</sup>。这一事实是否适用于人？

假定对CID患者移植HL-A相同、MLR为阴性的骨髓细胞，移植有效的细胞数量为 $50 \times 10^6$ 个/公斤。按照上述推论，则胎肝细胞移植中的有效细胞数量为 $300 \times 10^6$ 个/公斤。实际上，过去临床中采用的移植细胞量都低于这个数字，这可能是造成移植不成功的一个原因。Lowenberg等<sup>(49)</sup>对两例CID患者移植新鲜的胎肝细胞( $> 3 \times 10^8$ 个/公斤)，都可以证明移植的造血细胞在受体中的植入，并且免疫功能亦趋于恢复。

2、胎肝月龄的选择。随着胚胎的不断发育，胎肝中造血干细胞的数量和它们的增殖能力都在发生变化。因此，选择适当妊娠月令的胎儿肝脏是一个重要的问题。

3、同种移植抗性(Allogeneic resistance)。受体对植入的造血细胞除了经典的免疫反应外，还存在着一种同种抗性因子(Allogeneic resistance factor)，它在不同的供体与受体组合中起着不同程度的作用。实质上，这种同种移植的抗性是受体造血组织破坏植入的非同系造血细胞的一种宿主抗移植物反应<sup>(50)</sup>。如果选择具有相近的HL-A的供体与受体，或者在移植骨髓前对受体先施行免疫抑制措施(如免疫抑制剂等)，都有可能提高植入的造血细胞在受体中生存和增殖，有利于造血干细胞移植的成功。

此外，胎肝细胞悬液的制备和冷冻贮存；胎肝细胞的输注途径(静脉或腹腔注射)的选择等，都会在不同程度上影响胎肝细胞的治疗效果。如果使用恰当，则有利于充分表现胎肝细胞对于免疫缺陷病的治疗效果。

## 五、造血干细胞移植的发展动向

胎肝移植在一定程度上受到来源的限制。骨髓移植或外周血白细胞移植的主要障碍是免疫反应，即继发病的发生可以导致移植的失败，在严重的情况下，可以造成受体的死亡。因此，骨髓移植或外周血白细胞移植研究中的发展趋向是与移植免疫学的研究联系在一起。

人类组织或细胞都带有特定的抗原，称为人类组织相容性抗原(Human Histocompatibility Antigen)或人类白细胞抗原(Human Leucocyte Antigen)，简称HL-A。HL-A是由遗传决定的。在同卵孪生子之间或自身骨髓移植中，供者与受者带有相同的组织抗原，因此，移植中不存在免疫障碍。在同种异体的组织或骨髓移植中，当受体与供体的HL-A不相配时，会引起免疫反应。由于HL-A系统的多形态性，这样，在无亲缘关系的人群中，要找到两个人具有相同白细胞抗原的机率是很小的。但是，HL-A是符合遗传规律的，所以，在骨髓移植中，从同胞儿中寻找适当供体的机率是比较高的。例如，据统计从533个患者的同胞中可以找到255个HL-A相配的供体，约占48%<sup>(34)</sup>。

在实际骨髓移植中，即使供体与受体在组织抗原配型上完全相同，仍然不能避免有一部分受体发生严重的继发病。例如，选择同窝狗中两只DL-A相同的作为供体与受体。受体动物经超致死剂量(1200—1580伦)X射线照射后植入正常供体动物的骨髓细胞( $1.7 \pm 0.2 \times 10^6$ 个/公斤)。17只受体中有9只在移植骨髓后30—230天内死于继发病，其余8只狗的存活时间超过230天，未见继发病的发生。在HL-A相同的同胞骨髓移植中，不发生GVHD的仅占27%，

而发生严重GVHD的却占50%。所以，GVHD是当前开展临床骨髓移植治疗研究中的一个重要问题。

目前应用的组织抗原配型试验只是反映了一些主要的组织抗原。然而，那些“非主要”的或“弱”的，尚未被检查的组织抗原，当它们不适合时，同样在骨髓移植后可能导致严重的继发病。上面的例子说明，即使在狗上用8种抗血清鉴定了供体与受体的组织抗原相配的，而且，混合淋巴细胞培养结果为阴性的情况下，在骨髓移植后仍有50%死于继发病。

如果在骨髓移植中正确地使用免疫抑制措施，可以显著提高组织抗原配型相同的动物存活率。例如，对受超致死剂量X射线照射狗移植同窝、组织抗原配型相合的正常狗骨髓细胞后，及时地给予氨甲喋呤，动物存活率达到90%<sup>(51)</sup>。即使供体与受体的组织抗原配型不全相合，但是在骨髓移植后正确地使用免疫抑制剂，也可以使受超致死剂量X线照射狗的存活率由0提高到30%<sup>(52)</sup>。

对于一个经过大剂量X线照射或大剂量环磷酰胺处理的狗或人输入同种骨髓细胞后，输入的供体骨髓细胞可以在受体中长期存在，形成一个稳定的嵌合体，它们对抗原刺激有接近正常的细胞和体液免疫反应性。为什么嵌合体能够长期存在，而且不发生GVHR或GVHD？

Thomas<sup>(53)</sup>对两条混合淋巴细胞反应为阳性的同窝狗作骨髓移植，一条作为供体，另一条作为受体。在移植骨髓前，先从受体收集一部分正常淋巴细胞作冷冻保存（-169℃）。受体在移植供体骨髓并存活后，作进一步的混合淋巴细胞培养试验。结果表明嵌合体淋巴细胞与贮存的正常受体淋巴细胞之间的反应性为阴性，但是与其它无关狗的淋巴细胞或植物凝集素（PHA）均显示强阳性反应。这个实验结果说明，维持稳定嵌合体的原因至少有以下三种可能性：

1、提高了移植细胞的免疫耐受性，因此对受体抗原表现出免疫无反应性。2、抑制细胞（Suppressor Cell population）阻碍了输入的供体淋巴细胞对受体抗原的识别。如果输入的供体细胞事先经过受体抗原的致敏，则抑制细胞也就失去了原有的作用。3、体内生成了血清封闭因子（Serum blocking factors），它阻断了淋巴细胞对靶细胞的作用。

随着造血细胞移植中一些重要免疫问题的深入认识，无论从理论或实际应用上，它对于促进同种组织或细胞移植都有着重要的意义。

为了在造血干细胞移植中避免或减轻GVHR或GVHD，从造血细胞中分离除去免疫活性细胞已经成为造血干细胞移植研究中另一个重要课题。一些实验室对这种分离的可能性开展了广泛的研究，也取得了一定的进展：

#### （一）物理分离法

利用细胞在物理或物理化学性质上的差异，例如在一些物质上的吸附能力、细胞密度、沉降速度、细胞电泳速度等，可以将骨髓细胞中的造血干细胞与免疫活性细胞相对地分开，然后将相对浓集的造血干细胞用于移植的目的。由于移植细胞中免疫活性细胞含量的相对减少，在临床治疗和动物实验中确实可以减轻GVHR，提高骨髓移植的治疗效果。Miller和Phillips<sup>(54)</sup>根据细胞体积的差异，应用沉降分离装置研究了各类造血细胞的不同沉降速度和沉降分布图谱，提出了分离造血干细胞和免疫活性细胞的可能性。

应用动物存活率或PHA反应细胞等测试技术证明了免疫活性细胞是一类在沉降速度上比较缓慢（ $S = 3.0 - 3.5 \text{ mm/小时}$ ）的细胞群。因此，有可能利用细胞的沉降特性，将免疫活性细胞与造血干细胞相对分开，而且，还在动物试验的基础上，进一步

作了临床应用的初步尝试。

我们应用 Simonsen 的脾指数测定方法以及体内生成脾结节 (CFU-S) 和体外琼脂培养方法 (CFU-C) 研究了小鼠脾脏细胞和外周血白细胞中造血干细胞和免疫活性细胞在自然沉降条件下的沉降特性。在小鼠脾脏细胞的沉降试验中, CFU-S 的沉降速度为 4.50mm/小时, CFU-C 的沉降速度为 6.69mm/小时, 脾指数阳性细胞的沉降速度为 3.57mm/小时。上述沉降试验表明, 造血干细胞与免疫活性细胞有不同的沉降速度和分布特性, 因此, 在一定程度上可以相对地分开这些细胞, 由于这些细胞在沉降分布上存在着不同程度的重叠现象, 因此, 在分离效率上又是不够理想的。CFU-C 是一类粒系祖细胞, 它的沉降速度高于 CFU-S, 因而, 在沉降分离过程中, 有可能使 CFU-C 与免疫活性细胞得到较高分离, 这一现象不仅存在于小鼠中, 也存在于人的骨髓细胞分离中。在目前还未建立起啮齿动物以外的造血干细胞测试技术的情况下, 以 CFU-C 和免疫活性细胞的分离程度作为分离效果的判断尚须作进一步的检验<sup>(27)</sup>。

小鼠脾脏细胞是一个淋巴组织, 其中含有免疫活性细胞的数量远比骨髓中多。Blazi 等<sup>(56)</sup> 将 C57BL 小鼠脾脏细胞悬液在不同浓度的葡聚糖溶液中作非连续密度梯度离心。离心平衡后, 造血干细胞分布在上层 (组分 1—2)。将组分 1 的细胞输注给受 900 伦 X 射线照射的 CBA 小鼠, 可以明显提高动物的存活率和延长死亡动物的存活时间。然而, 免疫活性细胞主要分布在组分 3—4 中, 将这些组分中的细胞输注给上述受体小鼠, 动物均于照后 7—8 天内死于 GVHD。以上结果说明, 应用密度梯度离心法可以将造血干细胞与免疫活性细胞相对地分开, 这与 Dicke 等<sup>(58)</sup> 的报告是一致的。

近来 Ross 等<sup>(57)</sup> 在狗上进行的造血干

细胞移植试验是当前骨髓移植或外周血白细胞移植中一个值得重视的例子。作者用 IBM 血细胞分离器从狗外周血中收集足够量的白细胞, 除去其中的少量红细胞后, 在不同浓度的白蛋白溶液中作非连续密度梯度离心, 大部分造血干细胞集中于组分 2 中, 大部分淋巴细胞分布于组分 3 和 4 中, 粒细胞分布于组分 5 和 6 中。然后, 将各组分细胞分别输注给经 1200 拉德 X 射线照射的、DL-A 相同、混合淋巴细胞培养反应为阴性的受体狗。结果表明, 只有输注组分 2 的两条狗存活时间在 3 和 7 个月以上, 注射其它组分细胞的受体狗, 均于 1 个月内死亡。由于采用性别相反的供体与受体, 因此, 从受体狗骨髓分裂细胞的性染色体分析中可以判断, 供体的细胞确已嵌入受体, 组分 2 中淋巴细胞的含量极少, 因此, 受体输注组分 2 的细胞后不发生 GVHR。然而, 在输注组分 3 和 4 的受体中, 都可以从生化指标、临床表现和尸检中见到明显的 GVHR 或 GVHD。

应用物理方法分离免疫活性细胞是一个对细胞损伤比较轻的也是比较理想的分离方法。但是, 目前应用的沉降分离方法或密度梯度离心法等还不能满足实际应用的要求。利用造血干细胞与淋巴细胞的细胞表面受体的特性, 例如 T-淋巴细胞与红细胞生成的玫瑰花结反应<sup>(59)</sup> 以及造血干细胞与凝集素 (Lactin) 的结合<sup>(60)</sup> 等, 都有可能进一步增大淋巴细胞与造血干细胞在细胞体积、密度、吸附能力等方面的差异性, 为更好地利用物理学方法或物理化学方法从造血细胞中分离除去免疫活性细胞提供有利条件。

## (二) 血清学分离方法

抗淋巴细胞血清是一个很强烈的免疫抑制剂, 它可以在小鼠<sup>(60)</sup>、大鼠<sup>(61)</sup>、狗<sup>(62)</sup> 的皮肤和肾脏移植中延长移植物的存活时间, 而且, 对于已经发生排异反应的, 也有很好的抑制作用<sup>(63)</sup>。

过去研究中比较注重抗淋巴细胞血清对淋巴系统的作用,实际上,用淋巴细胞或胸腺细胞免疫家兔或马所制备的抗淋巴细胞血清或抗胸腺细胞血清是一种粗制品,这种含有多种成分的抗淋巴细胞血清不仅有破坏淋巴细胞的作用,而且,在整体或离体培养条件下都有破坏造血细胞,特别是破坏造血干细胞的作用。例如, C3H/He 小鼠骨髓细胞在体外与家兔抗A/JQX小鼠淋巴细胞血清于30℃保温30分钟后,大约有50%的有核细胞被解体破坏, CFU-S 的产率和数量都出现大幅度减少。类似的,对受致死剂量射线照射的小鼠注射  $3.5 \times 10^4$  个骨髓有核细胞后,立即再注射 0.1 毫升上述抗淋巴细胞血清, 9 天后,脾脏生成脾结节的数量比较对照组也明显减少。因此,只有对所制备的抗淋巴细胞血清作必要的吸收,除去交叉反应中所掺进的其它抗体之后,才能有效地用于抑制异体移植中的GVH反应。

假定抗淋巴细胞血清主要作用于 T-淋巴细胞,而不作用于造血细胞,特别是造血干细胞,这样,就有可能应用抗淋巴细胞血清在体外分离除去免疫活性细胞,从而减轻同种骨髓或外周血白细胞移植中的 GVH 反应。

小鼠的  $\Theta$  抗原同时存在于胸腺细胞和脑组织。Rodt 等<sup>(64)</sup> 用小鼠脑组织免疫家兔后所制备的抗血清有同时杀伤 T-淋巴细胞和造血干细胞的作用。上述抗血清经小鼠红细胞、肝匀浆等吸收后,对骨髓造血干细胞和 B-淋巴细胞的毒性可以明显降低,但保留了原来的对 T-淋巴细胞的毒性。对 900 拉德 X 射线照射的 (C57BL/6 × CBA) F<sub>1</sub> 小鼠输注  $5 \times 10^7$  个 C57BL/6 小鼠脾脏细胞后,动物于 20 天内全部死于继发病。然而,脾脏细胞预先经与吸收的抗淋巴细胞血清保温后,则动物死亡率明显降低,照后 300 天,动物存活率仍达 90%。

Muller-Ruchholtz 等<sup>(65)</sup> 用大鼠胸

腺细胞免疫家兔后所制备的抗胸腺细胞血清,经红细胞、腹腔渗出细胞和胎肝细胞吸收后,抗淋巴细胞的特异性明显增高。CAP 大鼠骨髓细胞经与吸收的抗胸腺细胞血清培养后,输注给受 1250 拉德  $\gamma$  射线照射的 LEW 大鼠。输注细胞后可以见到照射动物的造血获得重建,而且,大部分动物存活。然而,对照射的 LEW 大鼠直接输注未经处理的 CAP 大鼠骨髓细胞,则大部分动物死于急性 GVH 反应。

为了将抗淋巴细胞血清应用于临床,同样有必要对抗淋巴细胞血清的毒性进行全面的。例如,家兔经人胸腺细胞免疫后所制备的抗淋巴细胞血清粗制品,不仅有抑制 T-淋巴细胞的作用,同时有抑制骨髓红系和粒系祖细胞 (CFU-E、CFU-C) 的作用。上述抗淋巴细胞血清经肝、肾匀浆以及用 IBM 血细胞分离器从慢性淋巴细胞型白血病患者外周血中分离收集的细胞吸收后,可以除去在交叉反应中产生的影响红系和粒系祖细胞活性的抗体,然而,保留了血清中原有的抗淋巴细胞的活力<sup>(66)</sup>。

### (三) 造血细胞的体外培养

造血细胞是一个在体外培养过程中很容易发生分化的细胞类型。因此,至今还不能在体外模拟体内造血的全过程。在体外的培养体系中曾经采用过组织块的悬浮培养法、单层或双层液体培养法、造血细胞与胸腺细胞的共体培养以及扩散盒培养法等。

造血细胞在体外培养条件下维持增殖活动的时间都是比较短的,同时, T-淋巴细胞在培养过程中很快消失。因此,造血细胞体外培养的意义不仅在于研究体外造血,即体外培养条件下维持造血细胞持续增殖和分化的条件,而且,通过体外培养也是分离除去其中免疫活性细胞的一个可能途径。

Dexter 等<sup>(67)</sup> 的工作是向这方面努力中的一个较好的起端。作者设想在培养瓶的壁上先生长一层贴壁细胞,为以后植入的

骨髓细胞建立一个有利于细胞生长的良好环境。最初,他们采用胸腺细胞和骨髓细胞的共体培养(Co—Culture)方法,即在一个100毫升扁形培养瓶中先加入10毫升含有 $10^7$ 个胸腺细胞和20%马血清的费歇氏(Fischer)培养液,让种入的胸腺细胞在瓶壁上形成一层贴壁细胞,以后发现,胸腺细胞的作用可以为同种骨髓细胞所替代<sup>(8)</sup>。

在一个100毫升扁形培养瓶中先种入10毫升含有 $10^7$ 个小鼠骨髓细胞和20%马血清的费歇氏培养液,通入含有5%CO<sub>2</sub>的空气,37℃培养中,每隔3—7天从培养瓶中吸出5毫升悬液,再补入5毫升含有20%马血清的培养液,经过连续培养3周后,悬液中的细胞成分(包括CFU—S、CFU—C)已经减少到很低的水平,但是,在瓶壁上生成了一层由纤维细胞(Fibroblastoid)、上皮细胞(Epithaloid)、单核—巨噬细胞(Phagocytic mononuclear cells)巨大脂肪细胞(Giant fat cell)以及由巨大脂肪细胞聚集而成的、肉眼可见的细胞凝集体。这些贴壁层细胞的形成对于以后植入的造血细胞增殖和分化起着重要的作用。三周后,从培养瓶中吸出5毫升悬液,补入5毫升含有 $10^7$ 个小鼠骨髓细胞。以后,每周从培养瓶中吸出5毫升细胞悬液,补入5毫升含有20%马血清的培养液。从吸出的细胞悬液中可以测定培养过程中CFU—S、CFU—C和有核细胞数量的动态变化。

在上述培养条件下,CFU—S主要存在于悬液中或贴壁细胞层的表面,因此,轻轻振荡培养瓶,可以使大部份细胞进入悬液中。在培养过程中,CFU—S可以存在3个月之久,而且,培养后的CFU—S具有与培养前相似的生物功能。

对800拉德照射的雌性BDF<sub>1</sub>(C57BL×DBA)小鼠注射 $5 \times 10^6$ — $10^7$ 个正常雄性C57BL小鼠骨髓细胞后,很快发生GVH反应,大部份动物于照后13—50天内死亡。

如果将输注的骨髓细胞先在上述体系中培养2周,然后将收集的细胞输注给照射的BDF<sub>1</sub>小鼠,则照后120天的动物存活率达75%,而且,全部存活小鼠的骨髓细胞都是起源于输入的供体小鼠骨髓细胞的增殖结果。上述实验说明,骨髓细胞经过短时间的体外培养后可以用于同种骨髓移植形成永久性嵌合体,而又不发生GVH反应<sup>(9,10)</sup>。

为了使移植的造血干细胞可以长期嵌入受体并在受体中增殖和分化,生成各类成熟的血细胞,当前,在尽可能选择组织抗原配型相近的供体与受体的基础上,对供体造血干细胞与免疫活性细胞作适当的分离,减轻或消除在同种造血细胞移植后的继发病,是一个值得重视的研究方向。

- (1) Bortin, M. M. Transplantation 9, 571, 1970
- (2) Till, J. E. and McCulloch, E. A. Rad. Res. 14, 213, 1961.
- (3) Louwagie, A. C. and Verwilghen, R. L. Nature 225, 383, 1970.
- (4) Pluznick, D. H. and Sachs, L. J. Cell. Comp. Physiol. 66, 319, 1965.
- (5) Bradley, T. R. and Metcalf, D. Aust. J. Biol. Med. Sci. 44, 287, 1966.
- (6) Stephensen, J. R., Axelrad, A. A., McLeod, D. L. and Shreeve, M. M. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 68, 1542, 1971.
- (7) Wagemaker, G., Ober-Kiefteburg, V. E., Brouwer, A. and Peters-Stough, M. F. Experimental hematology Today P. 103, 1976.
- (8) Metcalf, D., MacDonald, H. R., Odartchenko, N. and Sordat, B. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1744, 1975.
- (9) Metcalf, D., Parker, J., Chester, H. M. and Kincaid, P. W. J. Cell.

- Physiol. 84, 275, 1974.
- (10) Metcalf, D., Nossal, J. T. V., Warner, N. W., Miller, J. F. A. P., Mandle, T. E., Layton, J. E. and Gutman, G. A. *J. Exp. Med.* 142, 1538, 1975.
- (11) Metcalf, D. *J. Immunol.* 116, 635, 1976.
- (12) Metcalf, D. Hemopoietic colonies in vitro cloning of normal and leukemic cells P. 21, 1977.
- (13) Hara, H. and Ogawa, M. *Am. J. Hemat.* 4, 23, 1978.
- (14) Gordon, M. Y. *Brit. J. Cancer* 30, 421, 1974.
- (15) Stoinberg, H. N., Handler, E. S. and Handler, E. E. *Blood* 47, 1041, 1976.
- (16) 涛汪、赵晓宁、吴祖泽 *生理学报* 31, 328, 1979.
- (17) Lajtha, L. G., Pozzi, L. V., Schofield, R. and Fox, M. *Cell Tissue Kinet.* 2, 39, 1969.
- (18) Stephenson, J. R. and Axelrad, A. A. *Blood* 37, 417, 1971.
- (19) 吴祖泽、蒋铁男、杨凤桐、赵士富、薛惠华、朱壬葆、*生理学报* 31, 263, 1979
- (20) 吴祖泽、薛惠华、朱壬葆 *生理学报* 30, 121, 1979.
- (21) Dexter, T. M., Allen, T. D., Lajtha, L. G., Schofield, R. and Lord B. I. *J. Cell. Physiol.* 82, 461, 1973
- (22) 吴祖泽、程伊洪、薛惠华 *生理学报* 31, 219, 1979.
- (23) Golub, E. S. *J. Immunology* 109, 168, 1972.
- (24) Testa, N. G. and Schofield, R. Annual Report of Paterson Laboratories P. 170, 1977-1978.
- (25) Gold, D. W. and Cline, M. J. *N. Engl. J. Med.* 291, 1388, 1974.
- (26) 蒋铁男、杨凤桐、吴祖泽、赵士富、薛惠华、*中华血液学杂志* 1, 347, 1980.
- (27) 吴祖泽、费瑞高、周淑珍、施斐曼、李春海、汪宝珍 *中国科学* 9, 1160, 1981.
- (28) 费瑞高、周淑珍 吴祖泽 *中华血液学杂志* 3, 5, 1982.
- (29) Metcalf, D. and Moore, M. A. S. *Haemopoietic Cells* 1971
- (30) Symann, M., Fontebuoni, A., Quesenberry, P., Howard, D. and Stohlman, F. Jr. *Cell Tissue Kinet.* 9, 41, 1976.
- (31) Micklem, H. S. and Ogden, D. A. *Stem Cells of Renewing Cell Population* P. 331, 1976.
- (32) Goodman, J. W. and Hodgson, G. S. *Blood* 19, 702, 1962.
- (33) Simonsen, M. and Jensen, E. *Biological Problems Of Grafting* P. 214, 1959.
- (34) Thomas, E. D., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. and Buckner, C. D. *N. Engl. J. Med.* 292, 832, 1975.
- (35) Thomas, E. D. and Weiden, P. L. *World J. Surg.* 1, 197, 1977.
- (36) Storb, R., Rudolph, R. H. and Thomas, E. D. *J. Clin. Invest.* 50, 1272, 1971.
- (37) Epstein, R. B., Bryant, J. and Thomas, E. D. *Transplantation* 5, 267, 1967.
- (38) Nelson, B. M. and Andrews, G. A. *Advances in Radiation Biology* 6, 325, 1976.
- (39) Maniatis, A., Tavassoli, M. and

- Crosby, W.H. *Blood* 38,569,1971
- (40) Werts, E.D., Johnson, M.J. and DeGowm, R.L. *Rad. Res.* 71,214, 1977.
- (41) Pozzi, L.V., Andreozzie, U. and Silini, G. *Acta Haemat.* 48,337, 1972.
- (42) Netzel, B., Brehm, G, Grosse-Wilde Mempel, W., Ruppelt, W. and Thierfelder, S. *Exp. Hemat.* 2, 275, 1974.
- (43) Debelak-Fehir, K.M., Catchatourine, R. and Epstein, R. *Exp. Hemat.* 3,109, 1975.
- (44) McCredie, K.B., Hersh, E.M. and Freireich, E.J. *Science* 171,293, 1971.
- (45) McCredie, K.B., Freireich, E.J., Haster, J.P. and Vallejos, G. *Transplantation Proc* 5,1285, 1973.
- (46) McCredie, K.B., Freireich, E.J., Hersh, E.M., Curtis, J.S. and Kazer, H. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 11,54, 1970.
- (47) Fliedner, T.M., Flad, H.D., Bruch, C., Calvo, W., Goldmann, S.F., Hebrst, E., Hugh, E., Huguet, R., Korbli ng, M., Krumbacher, K., Noehdurft, W., Ross, W.M., Schnappaut, H.P. and Steinbach, I. *Haematologica* 61,141, 1976.
- (48) Yunis, E.J., Fernandes, G., Smith, J. and Good, R.A. *Transplantati- on Proc.* 8,521, 1976.
- (49) Lowenberg, B., Dicke, K.A., van Bekkum, D.W. and Dooren, L.G. *Transplantation Proc.* 8,527, 1976.
- (50) Evalotozova *Exp. Hemat.* 5,215, 1971.
- (51) Storb, R., Epstein, R.B., Graham, T.C. and Thomas, E.D. *Transpla- ntation* 15,92, 1973
- (52) Storb, R., Epstein, R.B., Graham, T.C. and Thomas, E.D. *Transpl- antation* 9,240, 1970.
- (53) Storb, R., Tsoi, M.S., Weiden, P., L, Graham, T.C. and Thomas, E.D. *Transplantation Proc.* 8,561, 1976.
- (54) Miller, R.G. and Phillips, R.A. *J. Cell. Physiol.* 73,191, 1969.
- (55) Blazi, M. and Boramic, M. *Exp. Hemat.* 3,85, 1975.
- (56) Dicke, K.A., van Hobft, J.I.M. and van Bekkum, D.W. *Transplantation* 6,562, 1968.
- (57) Ross, W.M., Korbling, M., Noth- durff, W., Calvo, W. and Fliedner, T.M. *Experimental Hematology Today* P.29, 1976.
- (58) Zeylemaker, W.P., Ross, M.Th, L., Meyer, C.Jl.M., Schellekens, P.Th. A. and Eijsvoogel, V.P. *Cellular Immunology* 14,346, 1974.
- (59) Reisner, Y., Hzirovitch, L., Mesh- orer, A. and Sharon, N. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75,2933, 1978.
- (60) Monaco, A.P., Wood, M.L., Gray, TGJG and Russell, P.S.J. *Immu- nol.* 96,229, 1966.
- (61) Woodruff, M.F.A. and Andreson, N. *Nature* 200,702, 1963.
- (62) Monaco, A.P., Abbott, W.M., Ot- hersen, H.B., Simmons, R.L., Wood , M.L., Flax, M.H. and Russell, P. S. *Sciencel* 53,1264, 1966
- (63) DeMeester, T.R., Anderson, N. D. and Shaffer, C.F.J. *Exp. Med.* 127, 731, 1968.



- (64) Rodt, H., Thierfelder, S. and Eulitz, M. Eur. J. Immunol. 4, 25, 1974.
- (65) Muller-Ruehholz, W., Wottgo, H. U. and Muller-Hermelink, H. K. Transplantation Proc. 8, 537, 1976.
- (66) Netzel, B., Rodt, H., Hoffmann Fezer, G., Thiel, E. and Thierfelder, S. Exp. Hemat. 6, 410, 1978.
- (67) Dexter, T. M., Allen, T. D., Lajtha, L. G., Schofield, R. and Lord, B. I. J. Cell. Physiol. 82, 461, 1973.
- (68) Dexter, T. M., Allen, T. D. and Lajtha, L. G. J. Cell. Physiol. 91, 335, 1977.
- (69) Dexter, T. M., Moore, M. A. S. and Sheridan, A. P. C. J. Exp. Med. 145, 1612, 1977.
- (70) Spooner, E. and Dexter, T. M. Annual Report of Paterson Laboratories p. 150, 1977-1978.

## 造血干细胞的实验研究

军事医学科学院 放射医学研究所

吴祖泽

近年来, 由于造血干细胞测试技术的发展, 推动了实验血液学研究的不断深入, 其中, 造血干细胞的移植研究是实验血液学和临床血液学研究中的一个很活跃的领域。

下面, 就我们实验室在造血干细胞研究方法和造血干细胞移植的实验研究中的部分工作, 向大家作一个简单的介绍。

大家知道, 血细胞的生成是经历了一个比较长的细胞增殖、分化、成熟和释放的动力过程。现在比较一致地认为, 在造血组织中存在一类多能造血干细胞, 或称为淋巴—造血干细胞 (HSC), 它可以分化为淋巴干细胞, 进一步分化、成熟为功能性的淋巴细胞; 它也可以分化为髓系造血干细胞, 或称为多向性造血干细胞 (CFU—S) 由于造血

微环境的影响, CFU—S 可以分化为粒系定向干细胞 (CFU—D、CFU—C), 然后进一步分化为原始粒细胞或单核细胞, 再继续成熟成为功能性的粒细胞或单核细胞; CFU—S 也可以向红系细胞方向分化, 它经过红系定向干细胞, 即BFU—E、CFU—E, 然后进入原始红细胞, 再进一步成熟为红细胞。当然, CFU—S 也可能向巨核细胞方向分化等。这就构成了一个目前流行的关于血细胞生成的模式图。

其中, HSC、CFU—S 和淋巴干细胞具有干细胞的基本特性, 即自我更新的能力; 然而, BFU—E、CFU—E、CFU—C、CFU—M 等, 它们的分化方向和增殖能力都是有限的, 因此, 不能笼统地称为造血干

细胞。过去，把这类细胞称为定向干细胞，现在，比较普遍地称为祖细胞或前驱细胞等，实验研究表明，CFU—S与CFU—C、BFU—E有着密切的相关性，因而，可以通过CFU—C或BFU—E的测定结果来间接地反应造血细胞中造血干细胞的相对数量和功能特性。实际上，目前临床研究中也是这样做的。

### 一、多向性造血干细胞的测定技术：

小鼠经过致死剂量射线照射后，由尾静脉输入适当数量的正常同系小鼠的造血细胞，例如骨髓细胞，9—10天后，可以在小鼠的脾脏上生成造血细胞组成的脾结节。每一个脾结节就称为一个脾结节的生成单位，或称为CFU—S。

正常小鼠颈部脱臼处死后，剪开皮肤，取出股骨，用酒精纱布剥离肌肉，用培养液从股骨中冲出细胞，让细胞通过带有6号和4号针头的注射器，使成为单细胞悬液。经过计数、稀释，然后对每只经过850拉德 $\gamma$ 线照射小鼠，由尾静脉输入0.2ml含有 $3 \times 10^4$ 个有核细胞的骨髓细胞悬液。

9天后，杀死受体小鼠，取出脾脏，经过Bouin'S液固定后，可以在脾脏表面见到粗大的脾结节。经过组织切片，可以看到这些脾结节大多是由红系细胞、粒系细胞或巨核细胞或它们混合组成的。经过解剖显微镜下的计数，可以推算出每根股骨中所含有的CFU—S的总量。

脾结节实验技术仅仅适用于啮齿类动物，如果将狗、猴或人的骨髓细胞输注给致死剂量射线照射的小鼠，一般情况下，是不会在体内生成脾结节的。

### 二、CFU—C的测试技术

1965年以来，发展了一系列的造血细胞的体内、外琼脂培养技术，它不仅可以在小鼠造血细胞，而且适用于其它动物和人的造血细胞的培养，成为目前反映造血细胞功能特征的一个重要的测试技术。

造血细胞的琼脂培养技术，主要分为二类

#### 1、体外培皿琼脂培养技术

用Fischer's培养液从小鼠股骨中冲出细胞。在培养体系中含有培养液、马血清和刺激因子（或条件培养液），然后加入5%的琼脂，经过充分均匀和分散后，琼脂的最终浓度为0.3%。取1ml上述混悬液，其中大约含有 $1 \times 10^5$ 个骨髓有核细胞，加到一个直径为30—35mm的培皿中。造血细胞在适当的刺激因子作用下，以琼脂作为支持物质，经过体外培养后，可以生成主要由粒系细胞组成的细胞团或集落。

肺条件培养液的制备。从正常小鼠中取出肺组织，经过培养液漂洗和剪碎后，取大约0.5克肺组织，投入到一只灭菌的50ml培养瓶中，加入10ml含20%马血清的Fischer's培养液，经过37℃培养5天后，收集上清液，这就是肺条件培养液，其中含有很强的刺激小鼠骨髓细胞在体外琼脂培养条件下生成粒系细胞团的刺激活力。它在-20℃冰箱中可以保存半年，不失去其原有的刺激活力。

体外琼脂培皿培养的操作过程。先准备培养体系，其中加入：

Fischer's培养液	10.0ml
马血清	4.5ml
肺条件培养液	2.5ml
骨髓细胞悬液	1.0ml

上述培养体系置于37℃温箱中温热后，加入1.2ml5%琼脂。经过充分吹打，然后取1ml混匀的细胞悬液，加入一个无菌的培皿中，为了节省条件培养液的用量，也可以在培养体系中不加入条件培养液，而是在每个培皿中事先加入0.1ml条件培养液，这样所得到的结果是相同的。

准备一个干燥器，盛入少量蒸馏水，然后装入培皿。在干燥器接口处，涂上一层薄