

国家“十一五”重点图书

临床 造血干细胞移植

LINCHUANG
ZAOXUE GANXIBAO YIZHI

主 编 吴德沛 孙爱宁
副主编 陈子兴 张 日 何广胜

ARCTIME
时代出版

时代出版传媒股份有限公司
安徽科学技术出版社

国家“十一五”重点图书

临床造血干细胞移植

主 编 吴德沛 孙爱宁

副主编 陈子兴 张 日 何广胜



时代出版传媒股份有限公司
安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床造血干细胞移植/吴德沛,孙爱宁主编. —合肥:
安徽科学技术出版社,2010.1
ISBN 978-7-5337-4539-4

I. 临… II. ①吴…②孙… III. 造血干细胞-移
植术(医学) IV. R550.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 227325 号

临床造血干细胞移植

吴德沛 孙爱宁 主编

出版人:黄和平
责任编辑:吴萍芝
封面设计:冯劲
出版发行:安徽科学技术出版社(合肥市政务文化新区圣泉路1118号
出版传媒广场,邮编:230071)
电 话:(0551)3533330
网 址:www.ahstp.net
E-mail:yougoubu@sina.com
经 销:新华书店
排 版:安徽事达科技贸易有限公司
印 刷:安徽新华印刷股份有限公司
开 本:787×1092 1/16
印 张:33
字 数:782千
版 次:2010年1月第1版 2010年1月第1次印刷
定 价:98.00元

(本书如有印装质量问题,影响阅读,请向本社市场营销部调换)

本书编委会

主 编 吴德沛 孙爱宁

副主编 陈子兴 张 日 何广胜

编 委 (以姓氏笔画为序)

马 骁	王 荧	王 俊	王秀丽	仇惠英	计成阜
卢 俊	卢晓旭	付铮铮	朱明清	朱霞明	刘跃均
孙爱宁	孙道萍	杨明珍	李建琴	吴小津	吴德沛
何 军	何广胜	何海龙	何雪峰	沈益民	张 日
张旭辉	张秋蓉	陈 峰	陈广华	陈子兴	陈苏宁
陈晓晨	苗 瞄	金正明	周 玲	周海霞	周菊英
赵 晔	胡晓慧	姚 利	袁燕慧	唐晓文	黄海雯
常伟荣	符粤文	韩 悦	曾 慧	颜灵芝	薛胜利

前 言

造血干细胞移植是白血病、淋巴瘤、实体肿瘤、自身免疫性疾病等恶性血液病和免疫缺陷及遗传性疾病等的主要治疗手段之一,对于某些疾病是唯一治愈方法。近年来,关于造血干细胞生物学研究进展迅速,造血干细胞来源的扩展,造血干细胞和间充质干细胞的扩增、保存,预处理方案的优化,免疫抑制剂的开发和方案组合,过继免疫发展等,使得造血干细胞移植范围拓宽,安全性及有效性提高,更多的患者受益于这一技术。

因此,越来越多的临床工作者需要一本能够及时反映这些进展,系统介绍现代造血干细胞移植理论与技术的参考书。江苏省血液研究所暨苏州大学附属第一医院血液科是国家教育部重点学科和江苏省临床医学重点学科,造血干细胞移植一直是我科的主要研究方向,我科也进行了大量的基础与临床研究。所以,在安徽科学技术出版社的支持下,我科组织有关专家根据多年的临床实践经验和实验室研究成果,编写了本书。

本书分为基础篇、技术篇和临床篇,从造血调控的基础研究、免疫调节写起,再转入临床使用,最后分述常见各类需要行造血干细胞移植疾病,力求方便参考,紧扣应用,体现技术进展。

本书几易文稿,反复校对,作者与编辑付出了很大辛苦与努力,在此,对所有帮助书稿出版的人致以深深的谢意。

虽然编者希望本书能尽量反映该领域进展,但是因人员时间精力有限,科技发展迅速,相关文献浩瀚,故难免有不足和错误之处,盼各位同道、读者不吝赐教,使我们有再学习的机会,便于提高下一版的学术水平。

吴德沛

2009. 9. 10

目 录

上篇 基础篇

第一章 造血干细胞的来源、发育和生物学特性	1
第一节 正常造血系统的发生发育	1
第二节 造血干细胞的生物学	3
第三节 造血系统发生发育过程中基因表达的调控	5
第四节 造血干细胞“可塑性”的争论	7
第二章 造血调控	9
第一节 造血的细胞因子调节	9
第二节 造血微环境	18
第三节 各系列造血细胞定向分化的相关基因	19
第四节 与造血细胞的形成、发育和命运相关的基因表达调控	20
第五节 造血干细胞定向分化中的基因诱导转录	22
第三章 造血干细胞移植免疫学	27
第一节 主要组织相容性抗原与 HLA 配型	27
第二节 次要组织相容性抗原	33
第三节 免疫耐受	36
第四节 移植物抗宿主病	40
第五节 移植物抗肿瘤/白血病作用	43
第六节 红细胞血型抗原	45
第四章 全身放射治疗	48
第一节 临床放射生物学	48
第二节 全身放射治疗的实施	56
第三节 全身放射治疗技术的质量保证(QA)/质量控制(QC)	64
第四节 正常组织的反应与损伤	66
第五章 造血及免疫重建	69
第一节 造血重建	69
第二节 免疫重建	75
第六章 造血干细胞移植免疫抑制剂	86
第一节 糖皮质激素	86
第二节 抗代谢药	87
第三节 T 细胞抑制剂	90
第四节 抗 T 细胞抗体	95

第五节 其他药物	99
第七章 造血干细胞与基因治疗	102
第一节 基因转移	102
第二节 目的基因的表达	106
第三节 造血干细胞基因转染的临床应用	108
第八章 异基因抗肿瘤疫苗策略	116
第一节 肿瘤的免疫逃逸和免疫耐受	116
第二节 肿瘤免疫诱导	117
第三节 异基因造血干细胞移植中的抗肿瘤疫苗策略	122

中篇 技术篇

第九章 造血干细胞移植分类及适应证	129
第一节 概述	129
第二节 单倍型造血干细胞移植	132
第三节 非亲缘供体造血干细胞移植	136
第四节 非清髓性造血干细胞移植	140
第十章 造血干细胞的来源	145
第一节 外周血造血干细胞动员	145
第二节 正常供体造血干细胞动员	149
第三节 脐带血造血干细胞	151
第四节 造血干细胞动员采集及保存	157
第十一章 异基因造血干细胞移植	160
第一节 HLA 组织配型和供体的选择	160
第二节 异基因造血干细胞移植前供、受体的选择和评估	165
第三节 异基因造血干细胞移植的预处理方案选择	168
第十二章 自体造血干细胞移植	178
第一节 概述	178
第二节 自体造血干细胞移植的预处理	179
第三节 自体造血干细胞移植治疗恶性血液病	181
第四节 自体造血干细胞移植治疗实体瘤	188
第五节 自体造血干细胞移植在自身免疫性疾病中的应用	190
第十三章 造血干细胞移植的护理	193
第一节 造血干细胞移植前的各项准备	193
第二节 预处理的护理	193
第三节 造血干细胞输注的护理	194
第四节 不良反应及并发症的护理	195
第五节 饮食护理	197
第六节 心理护理	198

第十四章 营养及支持治疗	200
第一节 营养支持治疗	200
第二节 造血生长因子支持治疗	201
第十五章 输血技术	203
第一节 成分输血	203
第二节 血小板无效输注	206
第三节 ABO 血型不合的造血干细胞移植输血	207
第四节 ABO 血型不合的 allo-HSCT 的并发症及预防	208
第十六章 造血干细胞移植合并感染	214
第一节 细菌感染	214
第二节 侵袭性真菌感染	220
第三节 巨细胞病毒感染	225
第十七章 肝静脉闭塞病	229
第十八章 移植物抗宿主病	238
第一节 急性移植物抗宿主病	238
第二节 慢性移植物抗宿主病	248
第三节 T 细胞去除在移植物抗宿主病中的应用	257
第十九章 异基因造血干细胞移植后嵌合体的检测	267
第二十章 出血性膀胱炎	283
第二十一章 移植相关肺部并发症	291
第一节 感染性肺部并发症	291
第二节 间质性肺炎	297
第三节 非感染性肺部并发症	306
第二十二章 神经系统、肌肉及骨骼并发症	317
第一节 神经系统并发症	317
第二节 肌肉组织并发症	319
第三节 骨骼并发症	322
第二十三章 移植相关出凝血异常	326
第一节 血栓性微血管病	326
第二节 导管与输注相关性血栓病变	330
第三节 深静脉血栓	331
第四节 肺栓塞	332
第五节 其他动脉并发症	333
第二十四章 移植晚期相关并发症	335
第二十五章 微小残留病的检测	341
第一节 概述	341
第二节 荧光原位杂交技术(FISH)检测微小残留病	347
第三节 应用 PCR 技术检测白血病的微小残留病	348
第四节 流式细胞技术检测微小残留病	354

第二十六章 造血干细胞移植后复发及治疗	362
第一节 造血干细胞移植后复发	362
第二节 造血干细胞移植后复发的治疗	363
第二十七章 造血生长因子在造血干细胞移植中的应用	375
第一节 G-CSF、GM-CSF 与造血干细胞移植	376
第二节 促红细胞生成素与造血干细胞移植	378
第三节 血小板生长因子与造血干细胞移植	380
第四节 其他细胞因子在造血干细胞移植中的作用	381

下篇 临床篇

第二十八章 成人急性白血病	382
第一节 急性髓系白血病	382
第二节 急性淋巴细胞白血病	397
第二十九章 儿童急性淋巴细胞白血病	406
第三十章 慢性白血病	415
第一节 慢性粒细胞性白血病	415
第二节 慢性淋巴细胞性白血病	427
第三十一章 重型再生障碍性贫血	434
第一节 重型再生障碍性贫血的综合治疗	434
第二节 重型再生障碍性贫血的免疫抑制治疗	435
第三节 异基因造血干细胞移植治疗重型再生障碍性贫血	439
第三十二章 骨髓增生异常综合征	446
第三十三章 多发性骨髓瘤	466
第三十四章 造血干细胞移植治疗淋巴瘤	477
第一节 造血干细胞移植治疗霍奇金淋巴瘤	477
第二节 造血干细胞移植治疗非霍奇金淋巴瘤	484
第三十五章 造血干细胞移植治疗实体瘤	493
第一节 自体造血干细胞移植	493
第二节 异基因造血干细胞移植	495
第三十六章 造血干细胞移植治疗自身免疫病	499
第一节 自身免疫病的发病机制	499
第二节 自身免疫病的治疗机制	500
第三节 不同类型的自身免疫病的造血干细胞移植	503
第三十七章 其他疾病的造血干细胞移植治疗	510
第一节 造血干细胞移植治疗重症联合免疫缺陷	510
第二节 造血干细胞移植治疗血红蛋白病	511
第三节 造血干细胞移植治疗遗传性骨髓衰竭综合征	513
第四节 自体造血干细胞移植治疗儿童实体肿瘤	513
第五节 造血干细胞移植治疗阵发性睡眠性血红蛋白尿症	515

上篇 基础篇

第一章 造血干细胞的来源、发育和生物学特性

第一节 正常造血系统的发生发育

一、哺乳动物造血系统的胚胎发生和发育过程

传统将干细胞分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体(组织特异性)干细胞(adult/tissue-specific stem cells, ASCs)。ESCs 来源于胚胎胚泡的内细胞团(inner cell mass, ICM),具有无限的自我更新能力,能分化成包括生殖细胞在内的各种类型的细胞。而 ASCs 存在于分化的组织中,自我更新能力有限,通常情况下仅能分化成其所在组织的特定类型的细胞。但近几年的研究表明,ASCs 的分化能力远超过传统观点局限的范围,来源于各组织的 ASCs 事实上并未定型,一旦处于一个特定的微环境中,将有可能分化为其他组织类型的细胞,即 ASCs 具有可塑性。目前根据干细胞的来源,最新的分类方法将其分为成体干细胞、胎儿干细胞、胚胎干细胞和核移植干细胞(cell nuclear transfer stem cells)四种类型。造血干细胞是一种 ASCs。

在成人体的造血是一个由全能造血干细胞支持的稳定系统,在胎儿体内胎肝是主要的造血器官。但在胎肝尚未形成的早期哺乳动物胚胎中,胚胎存活和生长所需的红细胞是从哪里来的呢?第一个血细胞是从卵黄囊中的血岛产生的。以小鼠为例,初始的卵黄囊在妊娠后 7~8 天形成。卵黄囊是双层的腔状器官,由脏内胚层和相对的胚外中胚层细胞组成。内胚层和中胚层细胞联合部位称为胚脏壁(splanchnopleure)。卵黄囊对正常的胚胎发育非常重要,因为内胚层输送和代谢许多生物大分子和合成血清蛋白,而中胚层的血岛产生初始的血细胞。脏内胚层参与促进血岛的发育并对血细胞的形成发送弥散于细胞间的诱导信号。血岛在 E7 到 E7.5 天时形成于面向卵黄囊腔的脏内胚层细胞与单层的中胚皮细胞(mesothelium)之间,E8 到 E9 天时,血岛外层细胞分化成内皮细胞,而其余大部分细胞逐渐相互分离而分化成初始的原始红细胞。所以,初始的造血细胞和初始的微血管几乎同时生成。由血岛中同时出现的内皮细胞和初始血细胞推测,原始血管血液干细胞(hemangioblast)是两者的共同前体细胞。这一概念由体外培养的小鼠 ESCs 二次种植能形成内皮细

胞和造血细胞所证实。不过,体内的证据尚不具备。(图 1-1,图 1-2)

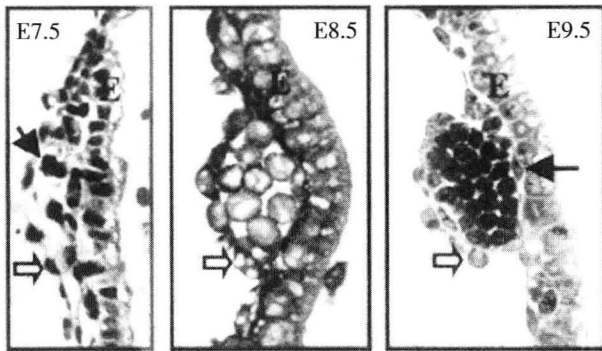


图 1-1 小鼠胚胎 E7.5 至 E9.5 天期间
卵黄囊血岛的发育

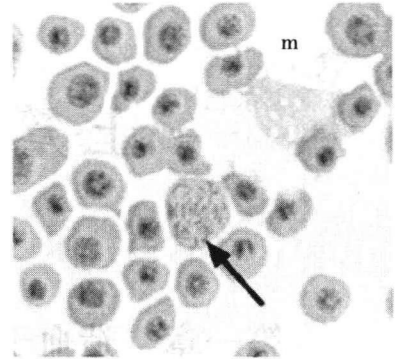


图 1-2 小鼠胚胎 10.5 天时循环
血细胞离心涂片示初始原始红细胞

二、初始造血和定型造血,造血细胞的定向分化

卵黄囊血岛形成不久,生成的初始原始红细胞(primitive erythroblast)就进入了胚胎中新生的微血管。从 E10.5 天的鼠胚采血的血涂片上即可见到绝大多数是初始原始红细胞,很少的巨噬细胞。血流中的初始原始红细胞不断分化,在珠蛋白基因稳定转录的指导下合成血红蛋白直到细胞分裂停止。在 E13 天血红蛋白达到稳定水平,约每个红细胞含 80 pg,几乎是成年鼠红细胞的 4 倍。电泳法证明初始原始红细胞合成的胚胎血红蛋白与胚肝来源的脱核红细胞中成年血红蛋白是不同的。在所有卵黄囊中初始原始红细胞里都发生由胚胎珠蛋白到成年珠蛋白的转换。小鼠初始原始红细胞体积巨大,即使在血流中分化脱核后,体积仍然保持巨大并有高含量的血红蛋白,被称为巨红细胞(megalocyte)。它有 E12 天开始出现于血流中的胚肝来源的红细胞体积的 3 倍大。E16 天起卵黄囊的初始原始红细胞不再进入血流,但巨红细胞(megalocyte)还在血流中循环直至 E18 天。红细胞生成素(erythropoietin, Epo)是成年骨髓造红细胞的关键因子,但对其在卵黄囊中初始红细胞造血过程中的作用还有争议。早先的研究认为卵黄囊中初始红细胞造血并不依赖 Epo,但若加入外源 Epo,可增加初始原始红细胞数及其血红蛋白含量。在最早的卵黄囊中初始红细胞中即存在 Epo 受体。后来的研究还证明了 Epo 及其信号传导通路对初始红细胞造血具有重要功能作用。如将 Epo、EpoR 和胞内信号分子 Jak2 激酶基因阻断,循环中的初始原红细胞数下降 5~20 倍,小鼠胚胎死于严重贫血。但与此时期胚肝定型造血(definitive hematopoiesis)生成的终末分化红细胞完全消失相比,有显著差别的是,还有少量初始原始红细胞在循环中持续存在。这表明卵黄囊中初始红细胞造血对 Epo 有一定的非依赖性。这些初始原红细胞在半固体基中的集落形成特性与成型造血红细胞的 BFU-E 和 CFU-E 也有所不同。在 E8.5 天卵黄囊中定型红细胞造血(definitive erythropoiesis)也开始了。卵黄囊中出现 BFU-E, 24 小时后出现 CFU-E。此时 BFU-E 进入新生的血流中,稍后,血流中也有了 CFU-E。E10.5 至 E11.5 天,卵黄囊中的 BFU-E 和 CFU-E 数不断下降,却在胚肝形成区聚集并大量扩增。实验证明初始和定型的红细胞造血均起源于卵黄囊。两种类型造血形成两个波形,先有一过性的初始红细胞造血,然后开始定型的红细胞造血。但卵黄囊的环境不能使定型造血的红

细胞分化成熟,第二波定型造血红细胞进入血流到达肝原基(liver primordium)后才开始大规模定型造血。E12 天后至胚鼠出生都由胚肝主导定型造血。

卵黄囊也是其他多种髓系祖细胞发源之地,例如 E9 至 E9.5 天出现巨噬细胞,E7 天可见小星型祖细胞(microglial progenitor cell),此细胞在体外可形成大的髓系集落。但这些细胞不进入血流,却直接移行到神经褶处发育成中枢神经系统。应用不同时间的卵黄囊细胞植入被化疗药物预处理的胚鼠胚肝内,分析分娩后新生鼠婴的血液细胞,发现 E7 天的卵黄囊细胞即可重建长期的多系列造血。E9 天的卵黄囊和正在发育中的主动脉—生殖脊—中肾区(aorta-gonadal-mesonephros, AGM region) 即可发现表达 CD34⁺ 和 c-kit 的胚胎造血干细胞(embryonic HSC),提示胚胎造血干细胞也起源于卵黄囊。此外,用上述受体鼠婴重建造血 3 个月后的骨髓细胞二次移植给受致死量照射的受体成鼠,仍可重建造血。这表明胚胎 HSC 在体内可变为成体 HSC。人类的胚胎造血程序与小鼠类似,妊娠 3~6 周卵黄囊为初始红细胞造血起始之处,第 6~22 周由胚肝进行造血,其后骨髓成为主导一生的造血器官。但与小鼠也有所不同。一是小鼠卵黄囊中胚层细胞来源于早期外胚层原细胞(epiblast),而人卵黄囊中胚层细胞来源于早期内胚层细胞(hypoblast)。人的卵黄囊形成两次,血岛在妊娠 18 天时二次形成的卵黄囊中出现。组成血岛的血细胞来源于卵黄囊的内胚层,移行到卵黄囊间充质(mesenchyme)中,逐渐被来源于内胚层细胞分化成的内皮细胞所包围,而聚集形成血岛。第二次卵黄囊是合成蛋白质和输送营养及维生素的场所。由卵黄(vitelline) 动静脉连接胚胎和胚外的血循环。第 10 周后,卵黄囊开始收缩,组织退化,血管网封闭。此时新发育的肠微血管取代其对胚胎供血,直到肝索发育形成门脉循环。第 3~4 周的胚胎内就形成了血管网,4~5 周开始,卵黄囊血管内出现初始红细胞。8 周时 88% 血管内循环的细胞是有核的初始红细胞。不过此时胚肝成型造血的红细胞和巨噬细胞也开始出现。在妊娠第 5~10 周,人卵黄囊中充满了 BFU-E、CFU-E 和 CFU-GM,而 6 周后胚肝中也能测出这些祖细胞,此后的 3 周内它们的数目快速增长,到第 8~9 周达到平台。从妊娠 35~40 天卵黄囊中获得的 CD34⁺ 细胞都是具有高增长潜能的集落生成细胞(HPP-CFC),它们不表达 CD33 和 CD38,对外加的重组粒细胞—巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)不敏感,但必须有重组干细胞因子(SCF)和 IL-3 的支持。

第二节 造血干细胞的生物学

HSC 有以下特征:①数量少,体积小,相对密度小,形态与小淋巴细胞不易区别;②基本位于 G₀期,对 4-氢过氧化环磷酰胺和 5-氟尿嘧啶抵抗;③若丹明-123 淡染或不染, Hoechst 染色荧光弱或无;④ Thy-1 (CD90)⁺/CD38⁻/HLA-DR⁻/Lin⁻ (系列特异性抗原), CD34⁺ 细胞是由一群不同发育时期和功能的细胞组成,CD34 是否为 HSC 的标志目前尚有分歧。目前测定 HSC 主要有以下方法:① LTC-IC、CAFC;② NOD-SCID、人/胎羊宫内竞争植入模型。

一般来说,被认为是造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的血细胞必须满足以下条件:首先它必须是全能的(pluripotent),即具有产生至少 8 种造血系列的子代细胞的潜能。包括 B 和 T 淋系,红系,巨核和血小板系,嗜碱和肥大细胞系,嗜酸细胞系,中性粒系和

单核巨噬细胞系。其次,它必须具有强大的增殖潜能。在正常人体内据估计存在 5 000 万个 HSCs,在一生中可产生约 10^{13} 个成熟的血细胞。其三,细胞的增殖与分化并不一定严格相连,对大多数早期 HSCs 来说增殖潜能表现为自我更新的能力。这一性质对 HSCs 是最重要的,它保证了造血干细胞群体在正常的一生中的各种刺激下保持一定的数量,不致枯竭。

各系造血祖细胞不断地分化为终末细胞以维持机体正常的造血状态,这就需要 HSCs 也持续地进入细胞增殖周期,以补充消耗的造血祖细胞。一只成年鼠每日有 8%~10% 的 HSCs 进入细胞增殖周期,经 1~3 个月所有的 HSCs 均经过细胞增殖周期,而成熟动物体内的 HSCs 的数目是相对恒定的。HSCs 通过以下途径保持数量稳定:①其他干细胞如机体全能干细胞或其他的组织干细胞的去分化(de-differentiation)或转分化(trans-differentiation);②自我更新,其被认为是 HSCs 保持数量稳定最重要的途径。

HSCs 自我更新从单个细胞和群体水平来完成:①单个细胞不对称分裂(individual asymmetric cell division),HSCs 生成一个子代 HSCs 和一个会迅速分化为造血祖细胞的子代 HSCs。这一现象已在单细胞生物和无脊椎动物中得到确认,但发生的机制尚不明确;②群体性不对称分裂(populational asymmetric cell division),HSCs 分裂产生的两个子代 HSC 均具有成为干细胞和定向祖细胞潜能,但子代 HSCs 随后分别发育为干细胞和定向祖细胞。大多数动物的组织干细胞的自我更新属于第二种方式。调节子代细胞发育的机制尚不明确。HSCs 的高端粒酶活性及 GATA-1、GATA-2、PU. 1、Bcl-2 等可能在 HSCs 的自我更新中起着重要的作用。

HSCs 位于具有不同自我更新能力的细胞克隆组成的层级系统(hierarchy)的最顶端,处于静寂状态(如小鼠骨髓干细胞在稳定状态下平均 30 天才分裂一次),但在造血应激时 HSCs 可迅速进入活跃造血状态。此时 HSCs 的自我更新增殖可与向各系列的局限成熟增殖同时存在,向各系列的局限成熟增殖使少数 HSCs 变成了造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs),最终分化成各系列的终末细胞。由于终末细胞的寿命均较短,因此要在常态下维持稳定数量的终末细胞,就需要在整个生命期内 HSCs 能被不断按序活化增殖。这一过程由存在于基质细胞组成的微环境中的复杂的细胞因子网络严格调控。在半固体培养基上的集落形成检测法可以展示 HSCs 和各系列 HPCs 的功能特性并提供独立定量检测这些功能的指标。最早的是 CFU-S,即注射后能在经致死辐照后的小鼠脾脏中形成结节的细胞,此细胞还能二次形成脾结节,表明此类细胞在培养 12 天左右时仍具有自我更新的能力。但后来的研究发现 CFU-S 并不能维持长期的造血,且这种细胞群体实际上区别于真正的 HSCs。现在广泛认可 HSCs 的标准是展示细胞在植入后能持续地重建完全的造血系统达 6 个月以上。以后又有学者应用预测的 HSCs 与另一已知细胞群体共同植入致死辐照后的小鼠或 MOD/SCID 小鼠体内竞争的方法,检测重建造血后被测 HSCs 相对于标准竞争细胞群体的功能活性,引入重群体化单位(repopulation unit, RU)和竞争性重群体化单位(competitive repopulation unit, CRU)的概念,来作为衡量 HSCs 重建造血功能的指标。例如,以此检测小鼠 1 CRU 可以在植入后产生和维持淋系和髓系造血至少 1 年,代表着每 15 000 个成人骨髓细胞或第 14 天的胎肝细胞群体中的 1 个 HSCs。在人的 CRU 或 SCID 小鼠体内重群体化细胞(SCID-repopulating cells, SRC)中的 HSCs 也差不多是这个频数。当然,所有这些重群体化的检测法都会低估被测细胞群体中的具有长期重生成群体潜能(long-term repopulating potential, LTR)的 HSCs 数,因为它只反映能在体内顺利归巢

(homing)到支持的微环境而重建造血的 HSCs。

由此推测,在人或小鼠造血组织内,具有 LTR 的 HSCs 的确切出现频数接近每 2000 个细胞中就有 1 个。根据细胞表面抗原的表达,细胞内酶标记,染料外流特性,对细胞周期特异细胞毒性物质的敏感性和细胞周期特性,从造血组织中可以不同程度地富集出 HSCs,其中每 3~5 个中有 1 个有长期造血潜能。对定量的所谓“纯化 HSCs”的植活动力学分析可见,HSCs 中的移植潜能有很大的异质性。移植后的早期(12 周之内),主要同时由系列局限性祖细胞(如各种集落形成细胞 CFCs 或高增殖潜能的 HPP-CFCs)和具有短期植活能力的干细胞发挥作用。这一多克隆时相最终被较少的几个 HSCs 支持的长期造血所取代,并维持下去。

第三节 造血系统发生发育过程中基因表达的调控

哺乳动物和人的造血系统从胚胎到发育形成的过程有赖于一系列基因的有序表达和严格精细的调控。这些机制非常复杂,是造血调控研究的热点。特别是进入后基因组学的时代,先进的高通量的技术,如基因芯片等,用来研究从全能和多能造血干细胞定向分化到各系祖细胞,直至各系列终末功能细胞的各阶段,其基因表达态势(gene expression profile)的变化,大大加深了对造血调控分子机制的认识。上述卵黄囊中初始原始红细胞中发生的由胚胎珠蛋白到成年珠蛋白的转换正适合作为基因表达编程和调控的典型实例,来说明从初始红细胞造血到定型的红细胞造血中血红蛋白转换过程的分子生物学基础。人类 β 类-珠蛋白基因簇(β -like globin gene cluster) 包括 ϵ , ζ , γ , δ 和 β 5 个基因,按此顺序同方向从 5' 端到 3' 端线性地排列在第 11 对染色体的约 70 kb 的范围内。其中 ϵ 是胚胎珠蛋白, ζ 和 γ 是胎儿珠蛋白,而 β 是成人珠蛋白。在红系定向祖细胞的成熟分化过程中,这些珠蛋白基因在红系特异性转录因子,如 GATA-1, FOG-1, NF-E2 和 EKLF 等的的作用影响下有序地逐个表达,使合成胚胎血红蛋白的初始红细胞转变成合成胎儿和成人血红蛋白的定型红细胞。有学者应用逆病毒载体介导的转 β -珠蛋白基因簇的转基因小鼠来研究红细胞发育过程中这些 β -珠蛋白基因表达转换的调控机制。在 β 类-珠蛋白基因簇的 ϵ 珠蛋白基因上游几个 kb 处有至少 5 个对 DNase I 的高敏感点(DNase I hypersensitive sites) HS1~HS5,它们构成位点控制区(locus control region, LCR)。这一区域含有上述许多转录因子的结合点和通用转录因子(general transcription factors, GTFs)的结合点。胚胎珠蛋白 ϵ 总是离 LCR 最近而成人珠蛋白 β 离得最远。先前实验表明与 LCR 相邻的基因总是转录较多的,如果将 γ 和 β -珠蛋白基因直接与 LCR 相连,它们仍然在原来正常的发育阶段表达,只是转录的相对水平与相距 LCR 有关。所以 LCR 的作用主要是开放核染质的构型,提高启动子的转录效率,而基因的阶段特异性表达取决于作为反式元件的各种转录因子。进一步实验发现,LCR 的方向(HS1~HS5 的排列顺序)和 β 类-珠蛋白基因簇的排列顺序对胚胎发育中的红细胞造血调控是密切相关的。 ϵ 珠蛋白基因必须与 LCR 相邻,才能在卵黄囊的初始红细胞中表达胚胎血红蛋白。其次 LCR 的活性作用是有方向性的。反向排列的 LCR 使各发育阶段的珠蛋白转录全部严重降低。根据 LCR 作用的方向性看,它对 β 类-珠蛋白基因的转录并非只起简单的增强子的作用。LCR 除了长期调控 5 个 β 类-珠蛋白基因的转录的转换,还在红细胞发育各阶段都进行基因间转录(intergenic transcription),实验表明 LCR 通过与核染质

及基因间启动子的相互作用,影响各 β 类-珠蛋白基因所在核染质的构型和特异性转录因子与相应基因启动子的竞争性结合,从而调控红细胞造血的发育。而 LCR 中的各区段在初始红细胞造血或定型红细胞造血中所起的作用和重要性也各不相同。目前在越来越多的基因位点前都发现了 LCR,使我们认识到细胞发育和组织特异性系列分化过程中,基因表达不仅依靠紧邻基因的顺式元件,如启动子、增强子和沉默子,还要依靠其他远距离的顺式元件与核染质之间的长期相互作用。

造血系统发育分化过程的分子机制显然不是仅由个别或少数几个基因的表达所能阐明的。实际上,它是数百上千种基因表达产物组成的网络动态变化的综合结果。对此,孤立地逐个研究每个基因的动态表达是远不能奏效的。高通量的基因杂交技术和生物信息学技术的发明和应用使我们能同时检测和分析大量的基因信息,对研究造血系统发育分化的基因表达调控提供了强有力的工具和高效的方法。例如近年来研究造血干/祖细胞的定向分化的分子机制,研究具有自我更新能力的多能干细胞怎样变成失去自我更新能力而定向的各系列祖细胞,又怎样再分化成各系列的成熟细胞,主要采取两种技术策略。一种是在模式动物(小鼠,猿猴等)体内应用各种方法分离纯化或富集各类造血细胞群体,如未定向的 HSC,定向的 MPP(multipotent progenitor)和成熟的髓细胞群体,分别提取 RNA 并逆转录成 cDNA,构成 cDNA 文库。将成熟细胞 cDNA 文库与 HSC 或 MPP 文库差减杂交(subtractive hybridization),可得数千条 cDNA 克隆或表达序列标签(EST),表明这些基因所比较的两个细胞群体之间表达有显著差异。再用 cDNA 微阵列(microarray)法获得这些基因在所研究的细胞群体中的表达态势(expression profile),并应用基因数据库分析这些基因的可能功能和所起的作用。由此找出 HSC 或 MPP 与成熟细胞间主要有哪些基因表达不同,非定向的 HSC 与已定向的 MPP 细胞之间主要有哪些基因表达不同。将目标缩小并集中到少数几个基因(可以是已知的或未知的),再深入研究其结构和表达调控规律。另一种策略,目前也有人应用胚胎干细胞体外培养和定向诱导造血分化的技术,来看此过程中的基因表达态势的演变,并与直接由动物体内骨髓分离富集所得的各阶段造血细胞的基因表达态势做比较。目前的结果显示,HSC 与 MPP 细胞之间差异表达的基因有数十种,主要包括转录因子,信号通路分子和一些未知基因。由胚胎干细胞(ES)体外诱导分化的各阶段造血细胞的基因表达态势与体内分离的造血细胞基本相符,不过有某些例外,如 ES 来源的 CD34⁺CD38⁻细胞不表达 flt3, integrin α L 和 IL-6,而动物骨髓中的该类细胞却高表达这些基因。此外,ES 来源的 CD34⁺CD38⁻细胞同时表达胚胎珠蛋白 ϵ 和 ζ 及成年珠蛋白 α 、 β 和 γ ,而骨髓来源的细胞不表达胚胎珠蛋白。

HSC 的增殖能力不是无限的。对小鼠移植 HSC 只能连续 5~7 次植活,说明 HSC 的复制的次数是有限的。但是 HSC 在一生中又必须随时能够分裂,提供各系列的造血细胞,补充所需,这就提出一个问题,即细胞分裂所致的端粒缩短是否是限制 HSC 复制能力的原因?实验表明,HSC 复制多次后端粒确实会缩短。成人骨髓细胞的端粒就比脐血细胞的端粒短。然而在一般的体细胞中,端粒随分裂次数增加而发生的缩短可以由端粒酶的作用代偿,不过一般的体细胞的端粒酶都低到不能测知,而 HSC 中可测知低至中度的端粒酶活性。在转基因小鼠中,被转导了 TERT(端粒酶逆转录酶)基因的 HSC 显著增加其连续多次移植植活的次数,表明端粒酶确实能增加 HSC 的增殖潜能。不过端粒酶的过表达会使细胞永生而致恶性肿瘤,因此,这一策略目前还应慎用,如将来能设计使所转导的 TERT 基因可被

开关调控,则有望应用来提高 HSC 移植的植活率。

第四节 造血干细胞“可塑性”的争论

在探讨造血细胞的起源和发育过程不断深入的同时,近年来不断有学者报告在实验中发现:造血细胞可以在体外特定条件下与其他系统的组织细胞之间发生相互转变,为此提出了造血细胞具有可塑性(plasticity)的概念,引起学术界极大的兴趣和争议,对血液学的发展也有重要影响。因为始作俑者为血液学学者。最早的报告是在接受造血干细胞移植的受者体内,发现骨髓细胞转变成了骨骼肌细胞,心肌细胞,肝细胞以及脑神经细胞。而其他组织来源的细胞也可变成造血细胞而参与重建造血。接着,有学者进一步报告,在体外特定的条件下,好几种组织体细胞都可以人为地向所需的方向相互转变,不同胚层来源的组织体细胞也可相互转变。神经细胞也可变回造血细胞,甚至脂肪细胞都可以转变成造血细胞,并提出了转分化(transdifferentiation)的理论。

临床学家更乐观地认为应用这种组织工程学的方法为组织器官创伤的治疗开辟了史无前例的光明大道,将来可以用各种体细胞来再造组织或再造器官,代替损伤的组织器官。这样比用胚胎干细胞在伦理方面引起的争议小得多。这些新发现、新概念和新理论不但使某些疾病的治疗策略发生极大改观,如在心肌局部植入造血干细胞,以期转变成新生的心肌细胞来治疗心肌病或心肌梗死引起的心力衰竭,特别在下列几方面对已往传统的基本概念和基础理论造成了巨大的冲击。首先,传统的理论认为体内有两种意义上的干细胞,一种是胚胎干细胞,具有分化成各种组织细胞的全能性;另一种是各种组织特异或局限性的干细胞,它只能再生或分化成新生的该组织的体细胞,而不具备全能,不能分化转变成其他组织的体细胞。而目前的新概念提出几乎所有组织的体细胞都具有分化成其他各种组织体细胞的“全能干细胞”的特征。第二,传统概念认为在一种组织内,干细胞可以分化成成熟的终末细胞,这种分化虽然有时可以减慢或被阻断,但基本是不可逆的。而目前提出的新说法是成熟的体细胞还可以逆向分化成该组织的干细胞,并进一步转变成另一种组织的干细胞,关键是给予需要的环境条件就行。这些干细胞生物学的新理论更是对深层次的基因表达调控的理论提出了严重挑战。即干细胞或成年体细胞在朝某种组织细胞定向分化过程中,其内在固有的特异性基因表达程序可以由外界条件的作用而重新编程并重新启动,使其基因表达态势完全改变。

这样的新理论引起了强烈的争议,主要的批评在于新理论根本模糊了“干细胞”的概念,对实验观察判定转变成的新组织细胞的标准不够严格和准确,并可能因为细胞融合、微细胞嵌合和细胞群体的污染而造成假象。干细胞的识别和鉴定往往最终依赖于其功能检测,如生成子代细胞以确保组织的稳态或参与组织再生。但是这些检测方法,无论是通过收集体外扩增或分化所得细胞的体外检测还是模拟一些应激环境,将干细胞输注给免疫缺陷或预处理小鼠的体内实验,都存在一个问题:这些体内外环境都不能提供完整的龛位,因而这些处理手段很可能改变了干细胞原有的一些特性。

细胞表型是常用于干细胞识别和鉴定的方法。虽然在某些情况下,人们将干细胞与某一表型联系起来,但是通常情况下它们都表达不同种类的表面标志,如表达 CD34 的人造血

细胞富含 HSCs, 然而 CD34⁺ CD38⁻ 细胞、CD34⁺ lin⁻ 细胞、CD34⁺ Hoechst^{low} 细胞甚至 CD34⁻ 细胞都被报道是真正的 HSCs, 它们在受者体内重建造血的效率要高于单纯的 CD34⁺ 细胞。人们发现在整个细胞周期中, HSCs 的表型和重建受者造血功能的能力都不是稳定的, 这进一步反映了干细胞表型的复杂性。骨髓间充质干细胞(MSCs)的表型也尚未统一, STRO-1 在 MSCs 上的表达近来也受到了挑战。而且, 培养条件、培养时间和接种的细胞密度都影响 MSCs 的表型和自我维持能力。

这些结果表明细胞的干细胞性(stemness)可能随着生理状态(如当前干细胞的基因表达模式)和(或)周围环境的变化而变化。因而将干细胞定义为一种状态而非一个实体似乎更具有现实性。这可能解释了为什么即使人们对出生后干细胞表型鉴定进行了深入研究后, 多数组织的干细胞表型仍然不确定的原因。有科学家提出了判定是否转变成另一组织体细胞的标准, 即不能仅看少数几个细胞的形态和某些表面抗原的微小改变, 而必须观察到有足够数量的细胞发生活跃持续的形态和功能的改变, 特别是有形成新的组织特异性细胞克隆的能力, 才能令人信服。

最近有科学家的研究又有新的进展。他们发现和证明从人和小鼠 MSCs 培养体系中分离出一种多能成人祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs), 此细胞在体外培养能分化成三种胚层的细胞, 将之植入囊胚(blastocyst)可分化成几乎所有组织类型的体细胞, 移植入小鼠体内可分化成造血细胞系列, 肝细胞, 肺和肠上皮细胞, 且具有长期增殖分化能力。经过全世界许多实验室的研究和学术争论, 所谓造血细胞具有可塑性的真相越来越明朗。目前逐步达成共识的概念是胚胎干细胞在发育分化成成体内各组织特异性细胞的同时, 不排除还存在着极少量的保持有全能干细胞特性的细胞, 在成体各组织器官内呈隐伏状态或在循环中, 就如少量造血干细胞存在于骨髓中随时准备应急一样, 这些成体全能干细胞也能在组织损伤时被快速动员起来并向受损组织趋化, 分化成所需修补的组织细胞。因此骨髓细胞中分离到的细胞可能仍具有全能分化的能力, 但这些细胞不能认为是造血干细胞。

总之, 关于造血细胞和其他更广义的体细胞的可塑性的发现和研究的, 当前还处于刚刚起步的阶段, 有许多疑点和争论是不足为奇的, 但它无疑将不但对血液学, 更对发育生物学、细胞和分子生物学的基础理论以及临床医学的实践产生极为深远的影响。

(陈子兴)

参 考 文 献

- [1] PALIS J & YODER M C. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man[J]. *Exp Hematol* 2001, 29:927 - 936.
- [2] ENVER T, HEYWORTH C M, DEXTER T M. Do stem cells play dice? [J]. *Blood*, 1998, 92:348 - 351.
- [3] HOLDEN C & VOGEL G. Plasticity: Time for a reappraisal? [J]. *Science* 2002, 296:2126 - 2129.
- [4] LEMISCHKA IHOR. A few thoughts about the plasticity of stem cells[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30:848 - 852.
- [5] THEISE N D & KRAUSE D S. Towards a new paradigm of cell plasticity[J]. *Leukemia*, 2002, 16:542 - 548.
- [6] THOMAS. Differentiation plasticity of hematopoietic cells[J]. *Blood*, 2002, 99:3 089 - 3 100.
- [7] OGAWA M. Changing phenotypes of hematopoietic cells. *Exp. Hematol*, 2002, 30:3 - 6.
- [8] COLTER D C, SEKIYA I, PROCKOP D J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cell colonies of human stromal cells[J]. *PNAS*, 2001, 98:7 841 - 7 845.