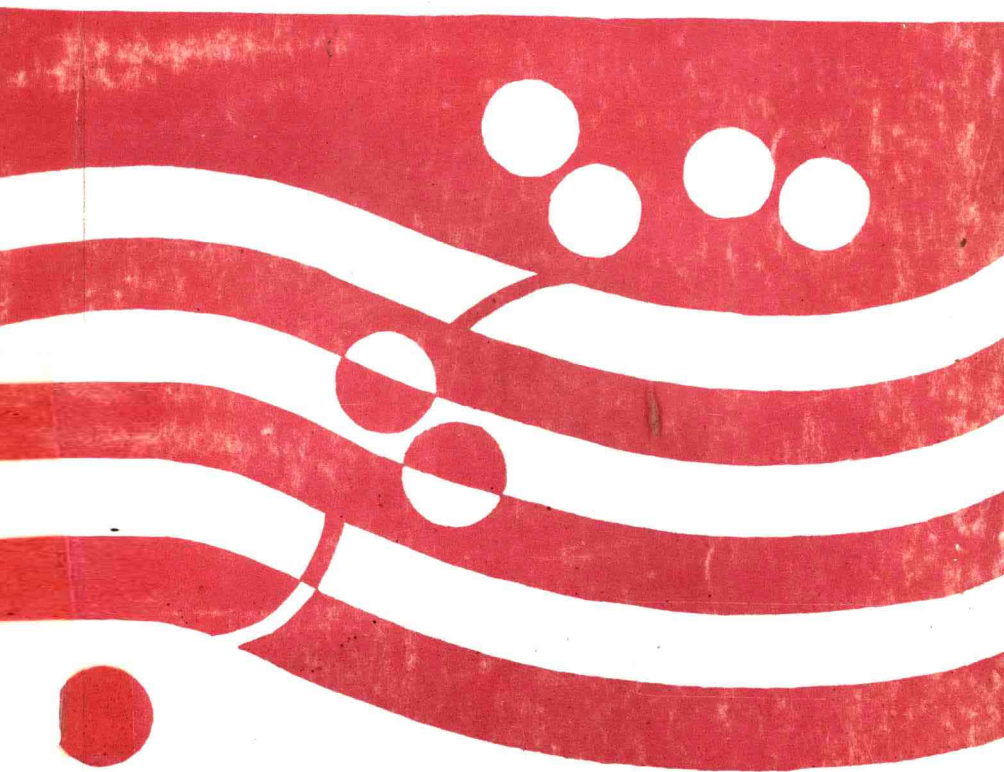


造血干细胞基础与临床

张永法

宋永平

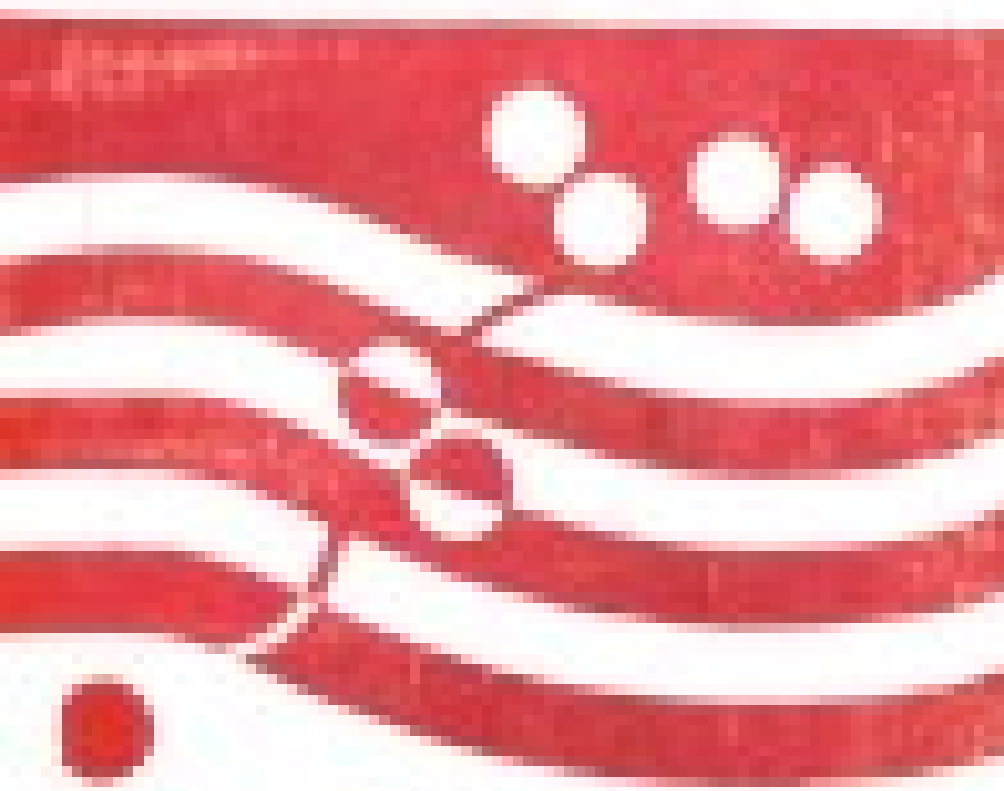
主编



河南医科大学出版社

造血干细胞基础与临床

陈永强 董永平 主编



河南医科大学出版社

造血干细胞基础与临床

主编 张永法 宋永平

河南医科大学出版社

(豫)登字第 11 号

造血干细胞基础与临床

张永法 宋永平 主编

责任编辑:李喜婷

河南医科大学出版社出版

(郑州大学路 40 号)

郑州二七嵩山印刷厂印刷

32 开本 850×1168 毫米 印张 8.5

字数 213 千字 印数 1—2000 册

1995 年 10 月第 1 版 1995 年 10 月第 1 次印刷

ISBN 7-81048-039-1/R. 39

定价:10.50 元

内容提要

本书在查阅近千篇文献的基础上,全面地反映了有关造血干细胞基础与临床方面的最新观点和进展。在造血干细胞基础方面,系统地介绍了造血干细胞的分化发育、调节、造血干细胞的分离纯化方法及其测定和造血微环境;在临床方面,重点介绍了造血干细胞与血液病发生发展的关系以及与造血干细胞有关的最新治疗手段。本书资料全面、内容丰富,并致力于基础研究成果与临床应用的结合,从而使读者能全面地了解国内外研究和应用的最新动向。

《造血干细胞基础与临床》

主 编:张永法 宋永平

副主编:阮林海 王功臣 孙 玲

杨茹玉 蒋洪河

编委(以姓氏笔画为序)

王功臣	孙 玲	阮林海	刘长凤
张永法	宋永平	芦景华	杨茹玉
郭树霞	蒋洪河		

序

1961 年加拿大学者 Till JE 与 McGulloch EA 在小鼠中经静脉注射同系小鼠的骨髓细胞,结果发现在脾脏表面可形成由单个造血细胞所产生的 CFU—S。此后,有关造血干细胞的研究便进入了极盛时期。由于免疫学特别是单克隆技术的飞速发展以及分子生物学技术的确立及广泛应用,使得造血细胞的分离纯化成为可能,从而使得人们较以往更能清楚地了解造血干细胞的分化发育、血细胞的成熟、造血与免疫的关系、造血微环境以及细胞因子在造血调节中的重要意义。有关造血细胞基础理论的进步,使得人们对血液病及免疫病能够从病因学上提出更确切的论据。造血干细胞的分离纯化以及造血因子重组的实现使得人们在临床上治疗血液病、免疫病、恶性肿瘤甚至某些遗传病成为可能。

我国造血干细胞的研究开始于七十年代初期,与国外相比有较大的差距。虽说近年来在全国范围内有关造血干细胞基础与临床研究的单位正在迅速增加,但较深入的研究迄今还较少见,所幸的是有关各种培养技术已基本普及。鉴于目前的研究状况与水平,新乡医学院青年学者张永法和河南医科大学青年学者宋永平等主编的《造血干细胞基础与临床》一书的问世将对造血干细胞的基础研究与临床应用起到促进作用。本书除了对必要的新技术——诸如造血干细胞的分离纯化作作了详细的介绍外,主要以科研思路为线索对造血干细胞的基础研究与临床应用进行了详细的阐述。

本书的取材虽然没有包括造血细胞的全部内容,但主要含义均已列入,其各章节虽然是总结了前人的研究成果,但其中取材与结论性的见解也有一定的权威性。希望这本书的出版对血液学的研究与应用能起到推动作用。

郑宗秀

一九九五年八月

前 言

造血干细胞的研究是实验血液学和临床血液学研究中的一个重要部分,近年来更是渗透到了免疫学的许多分支,目前已成为血液学、免疫学及基因治疗学研究中的一个十分活跃的领域。弄清楚造血干细胞的来源、分化、增殖、发育及其最后的转归毫无疑问地将对难治性血液病、免疫疾患甚至某些代谢性疾病,诸如白血病、再生障碍性贫血、骨髓恶性增殖性疾病、免疫缺陷病、自身免疫病、重度放射病、糖尿病等的发生、发展及治疗发挥极其重要的作用。即使在其它恶性肿瘤的治疗中也毫无疑问地牵涉到血液学特别是造血干细胞的问题,例如,在人类实体瘤的治疗中,一个新的疗法正在崛起,那就是超大剂量化疗加自体造血干细胞移植。

目前,由于免疫学、分子生物学、生物医学工程等的飞速发展,特别是细胞表面标记技术、单克隆抗体技术、细胞培养技术、细胞分离技术、基因克隆技术以及生物医学仪器的进展及其在血液学中的应用,使得造血干细胞及其相关领域的研究近年来取得了长足的进展。而在我国,由于受国民经济发展水平的限制,加之整体科技水平特别是相关学科诸如免疫学、分子生物学的研究与国外差距较大,因而严重制约了造血干细胞及相关领域的基础及临床研究。虽然近年来国内在这方面的研究也正在逐步兴起和发展,但目前国内在有关造血干细胞基础与临床方面尚缺乏与国际最新进展相衔接的专著。为了减少国内在造血干细胞研究方面的盲目性,我们特综合国内外造血干细胞的最新研究成果编成此书,以使读者能全面了解国内外研究的最新动向,从理论上站在国际血液学研究的最前沿。

本书的编写特点:

1. 从大量的研究资料入手,系统介绍国内外有关造血干细胞

研究的最新进展;同时力求理清研究思路,反映研究热点,提出今后的发展方向。填补我国在这方面专著出版的空白。

2. 努力将基础研究成果与临床结合起来,以期弄清血液病的发生机制,介绍最新的血液学治疗手段,诸如造血干细胞移植、基因导入疗法等。

3. 本书可供实验血液学、临床血液学、免疫学及放射医学工作者,医学院校教师、临床内科医生以及血液学、免疫学和内科相应专业的研究生等参考。

由于编著者水平有限,书中错误之处尚祈国内同行批评指正。

在本书的编写中,得到了我的导师、国际知名学者、日本关西医科大学池原进教授和美国南佛罗里达大学儿童总医院 RA Good 教授的悉心指导,本书插图均由张永法同志绘制,在此深表感谢。

张永法
一九九五年八月

目 录

第一章 胚胎干细胞向造血细胞的分化.....	(1)
一、引言	(1)
二、未分化 ES 细胞(阶段 I)的特征	(2)
三、ES 细胞在体外向 ES 胚胎的分化(阶段 II)	(3)
四、从 ES 胚胎建立淋巴细胞系及髓系细胞株(阶段 III)	(4)
第二章 多能造血干细胞的功能评价.....	(6)
一、引言	(6)
二、材料与方法	(8)
三、结果与讨论	(9)
第三章 多能造血干细胞的纯化	(16)
一、引言.....	(16)
二、造血干细胞测定法.....	(17)
三、造血干细胞的不均一性.....	(24)
四、小鼠造血干细胞的分离纯化.....	(27)
五、人造血干细胞测定法.....	(31)
六、人造血干细胞的分离纯化.....	(35)
第四章 造血干细胞向各系前体细胞的定向分化	(38)
一、脾脏集落形成单位——髓系干细胞.....	(38)
二、在造血干细胞群中的高增殖能力集落形成细胞的状态.....	(43)
三、几种小鼠造血祖细胞的特征.....	(52)
四、从造血干细胞向淋巴细胞的分化发育.....	(58)
第五章 造血微环境	(71)
一、造血干细胞与间质细胞的相互作用.....	(71)
二、造血干细胞亚群:测定与负调节	(80)

三、间质细胞依赖的造血干细胞·····	(88)
第六章 造血干细胞调节 ·····	(104)
一、造血结构·····	(104)
二、造血生长因子概述·····	(106)
三、IL—3·····	(109)
四、GM—CSF·····	(111)
五、G—CSF·····	(113)
六、M—CSF·····	(114)
七、Epo·····	(115)
八、Meg—CSF·····	(117)
九、IL—5·····	(118)
十、IL—1·····	(118)
十一、IL—4·····	(119)
十二、IL—6·····	(119)
十三、人 CSF 受体·····	(121)
十四、c—kit 和 SCF 的构造与作用·····	(125)
十五、造血系统的负调节因子·····	(126)
十六、造血干细胞的分化和增殖·····	(128)
十七、造血干细胞的分化与细胞周期·····	(133)
十八、造血干细胞和祖细胞的体外扩增·····	(137)
第七章 造血干细胞与疾病 ·····	(149)
一、造血干细胞与再生障碍性贫血·····	(149)
二、造血干细胞与白血病——白血病性干细胞及其增殖动态·····	(157)
三、造血干细胞与骨髓增殖性疾病·····	(164)
四、SCID—hu 白血病模型·····	(172)
第八章 骨髓及造血干细胞移植 ·····	(181)
一、引言·····	(181)

二、同种骨髓移植的特征及方法	(181)
三、自体骨髓移植	(183)
四、骨髓移植的主要适应症	(185)
五、目前的问题和将来的研究方向	(189)
六、人脐带血移植	(197)
七、外周血干细胞的生物学特性及临床应用	(202)
八、胎肝造血干细胞移植入宫腔内胚胎	(210)
第九章 造血细胞的冷冻保存	(218)
一、引言	(218)
二、冷冻保护剂	(220)
三、冷冻技术	(223)
四、冷冻速度	(226)
五、贮存温度和时间	(232)
六、造血细胞冷冻保存技术在血液病学上的应用	(235)
七、造血细胞低温保存中的几个问题	(238)
第十章 造血干细胞基因导入疗法	(245)
一、引言	(245)
二、反转录病毒介导的基因导入	(246)
三、反转录病毒基因导入原始造血干细胞	(248)
四、由腺苷脱氨酶缺陷引起的重症联合免疫缺陷的基因 导入疗法	(253)
五、血红蛋白异常症的基因治疗	(256)

第一章 胚胎干细胞向造血细胞的分化

一、引言

来源于成年骨髓的多能造血干细胞可以向髓系、红系及淋巴细胞系等所有血细胞分化。目前,关于造血干细胞的起源及其在胚胎时期向淋巴细胞系细胞的定向分化的资料十分混乱。业已证明,来自卵黄囊的造血干细胞可以分化成红细胞、巨核细胞以及髓系细胞,当卵黄囊造血干细胞输给动物时,可在体内产生 B 淋巴细胞,但在体外分化条件下却不能产生 B 淋巴细胞。然而,与卵黄囊造血干细胞不同,来自胎儿肝脏的造血干细胞在体外却可以分化成髓系细胞、红系细胞及 B 淋巴细胞。一般说来,T 细胞的分化需要胸腺微环境,但近几年的研究成果表明,机体内尚存在着 T 细胞的胸腺外分化场所和途径,且其分化是胸腺非依赖性的,其细胞特征也与胸腺 T 细胞有较大区别。

由于骨髓和胎儿肝脏中多能造血干细胞(PHSC)含量极低,因而关于它们的研究也受到了极大的限制。近年来,造血干细胞分离纯化技术的进展已开始使得 PHSC 的研究有了很大的进展,但有关造血干细胞的起源、自我更新及其定向分化的机制仍然所知甚少。为此,我们有必要首先了解胚胎干细胞(ES 细胞)的生长条件,特别是其体外生长条件及其在体外向造血干细胞的分化。

小鼠 ES 细胞株是由内胚层(ICM)克隆而产生的细胞株。在体外,ES 细胞可产生简单的囊泡状胚体,在囊泡状胚体中有包含红系细胞的血岛产生。最近已在体外建立了几种 ES 细胞培养体系,其中,在含甲基纤维素的培养条件中,ES 细胞可向髓系细胞分化,但却不能向淋巴细胞系分化,这可能是由于:(1)ES 细胞在该培养体系中只能分化到相当于在体内的卵黄囊阶段;(2)该培养体

系不支持 ES 细胞向淋巴细胞系分化;或(3)二者均有。在 Chen 等的液体培养体系中,PHSC 及所有各系造血细胞均能发育。

在显微镜下,ES 细胞的分化可以通过观察其在三维空间的生长而测定之。ES 细胞分化时首先在细胞簇中出现一个简单的胚体,然后出现具有复杂内胚层结构的囊泡状胚体,然后形成含有规律收缩心肌、卵黄囊血岛和杯状结构内的小淋巴样细胞之 ES 胚胎。

二、未分化 ES 细胞(阶段 I)的特征

要想维持 ES 细胞的未分化状态,首先要会检测其未分化状态。其检测标准包括四个方面:(1)形态学特点;(2)免疫标记;(3)核型;(4)体内外分化能力。核型检查的方法不在本书范围之内,可参阅有关文献。其体内分化能力主要以其形成嵌合动物的能力为标准;体外分化能力则主要观察其在体外形成淋巴——造血细胞的能力。

形态学上,未分化 ES 细胞在饲养细胞(小鼠成纤维 STO 细胞或原始胚胎成纤维母细胞)上呈二维生长;其细胞集落呈“薄煎饼”样或“岛”状;单个细胞的边缘在光镜下不能明确辨认。一旦细胞开始在三维空间生长或/和细胞集落形态改变以及单个细胞边缘开始变得清晰,则表明该 ES 细胞已开始“杂乱”分化。未分化 ES 细胞也可通过其细胞表面的免疫标记来鉴别。如表 1—1 所示,未分化 ES 细胞表达一个阶段特异性胚胎抗原(SSEA—1),其能被单克隆抗体 MC—480 所识别,如果 ES 细胞开始分化,则 SSEA—1 的表达消失,这一方法是鉴别未分化 ES 细胞的简便快速的方法。

ES 细胞属快速增长细胞,其倍增时间为 8~10 小时,因此,维持培养体系的中性 PH 和充足的营养对维持 ES 细胞株是极为关键的。此外,ES 细胞、饲养细胞及各种试剂一定要避免被污染,因

为其被污染后将严重影响 ES 细胞在体内及体外的分化能力。

表 1—1. ES 细胞及由其分化而来的造血细胞的免疫标记

细胞型	抗体染色				
	SSEA-1	Ig	CD ₃	Mac-1	AA ₄
未分化 ES 细胞	+	—	—	—	—
ES 细胞由来的 造血细胞	—	+	+	+	+

三、ES 细胞在体外向 ES 胚胎的分化(阶段 II)

在液体悬浮培养中,ES 细胞可向包含所有已知造血细胞的 ES 胚胎分化发育。在理想的营养条件下(高糖、高血清、低 CO₂)使小的 ES 细胞集落缓慢而自由地运动是 ES 细胞向 ES 胚胎分化的条件之一,但更重要的是必须维持培养液的中性 PH 状态,且要提供丰富的营养。一般说来,ES 细胞在这种培养条件下经过 11~30 天即可形成 ES 胚胎。ES 胚胎的鉴别主要依据其中存在的规律收缩心肌、卵黄囊血岛,更重要的是存在有包含小淋巴样细胞的杯状结构。

四、从 ES 胚胎建立淋巴细胞系

及髓系细胞株(阶段 III)

这些造血细胞株的建立通常通过用反转录病毒(如 Abelson 小鼠白血病病毒——A-MuLV)在 polybrene 存在下以 10⁵~10⁶PFU/ml 的量感染 ES 胚胎,感染后细胞自动从胚胎上脱离,大多数细胞脱落后轻轻地贴于 Petri's 培养盘的表面。收集这些造血细胞并建立细胞株。细胞株建立后,以 Giemsa 染色评价这些细胞

株的形态学特征:通常情况下,单个核细胞和巨噬细胞围绕于红细胞周围,而淋巴样细胞则位于由单个核细胞、巨噬细胞和红细胞组成的细胞簇中或散布于髓系细胞之间。

本章中我们描述了 ES 细胞的生长行为、未分化阶段的标准判定、分化条件及其分化的造血细胞的特征。ES 细胞在体外的分化成熟阶段相当于小鼠妊娠第 11~14 天的胎肝,即在培养中有髓系、红系及淋巴细胞系的混合细胞群,这一分化现象仅见于成人骨髓和胎儿肝脏。这一系统对研究淋巴——造血系统极有用处,由于胚胎样胚体可在体外通过控制营养环境等而形成,因而控制造血细胞的生长需求对研究造血细胞的起源、定向,特别是淋巴细胞的定向分化极为有用。如果适当的生长因子或间质细胞被加入这一培养体系,则定向细胞发生的频率将明显增加。

下面我们列出一些研究造血细胞起源和定向分化常用的工具:

Thy—1、Sca—1	造血干细胞
AA ₄	Pre—B 细胞
G—5—2	Pre—B 细胞、浆细胞
Joros	Pro—T 细胞、未定向淋巴前体细胞
PCR—Ig/TcR 基因重排	T 和 B 细胞系
GATA—1 基因	红细胞系细胞

参考文献

1. Brsce J et al. J. Immunol. 1981,127:2496
2. Chen U. et al. Proc. Natl Acad Sci USA 1992
3. CHen U. et al Tth International Congress of immunol. 1989, abstr. 29—2

4. Clynes R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988,85:6067
5. Doetschman T. et al. J. Embryol. Exp. Morphol. 1985,87:27
6. Iscove N. et al. J. Immunol. 1989,142:2332
7. Koller BH. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989,86:8932
8. Labastie M—C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984,81:
1453
9. Lindenbaum MH. et al. Gene Dev. 1990,4:2075
10. McKeearn JP. et al. J. Immunol. 1984,132:332
11. Melchers F. et al. Eur. J. Immunol. 1980,10:763
12. Ogawa M et al. EMBO J. 1988,7:1337
13. Palacios R et al. J. Exp. Med. 1990,172:219
14. Pevny L. et al. Nature 1991,349:257
15. Roberston EJ. Teratocarcinomas & emlrionic stem cells. a
practical approach. IRL press, Oxtont, 1987
16. Schmitt RM. et al. Hematopoietic development of embryonic
stem cells in vitro; Cytokine and receptor gene expression
17. solter D et al. Proc Natl. Acad. Sic. USA 1987,75:5565
18. Springer T. et al. Eur J Immunol 1979,9:301
19. Strasser A. Eur. J. Immunol. 1988,18:1803
20. Thompson S. et al. cell 1989,56:313
21. Wiles MV, Keller G. Development 1991,111:259
22. Zijlstra M. et al. Nature 1989,342:435

(张永法 孙 玲)