维普资讯 http://www.cqvip.com

脐血，造血干细胞，造血细胞移植

169~172 脐血造血活性的研究与临床应用

临床血液学教研室 张 伶 综述 刘国卿 审校

R714.56

中图分类号 R714·56

自从1964年Barness发现胎鼠、新生鼠的脐血中含有可重建同系LACA小鼠造血功能并使其存活期延长的集落形成单位以来[1]，随着造血细胞体外培养，流式细胞术和单克隆抗体检验技术的发展，人们研究发现人脐血富含造血干细胞和各系造血祖细胞，基质细胞以及多种造血调控因子，是一种极有潜力的造血细胞移植的来源，引起了国内外广大血液工作者的高度重视，脐血造血细胞移植大有替代骨髓造血细胞移植之势。

1. 脐血中造血活性物质

胚胎期卵黄囊的血岛中心间充质细胞分化为第一代造血干细胞，这些造血细胞随血循环向次级造血器官(肝、脾、骨髓)播散形成新的造血。因此妊娠末期脐带血中也含有丰富的造血细胞，造血调控因子和造血基质细胞。

(1)脐血富含造血干/祖细胞

①造血前体细胞(Hpp-CFC,Pre-CFU)

能够在体内长期重建造血组织的潜能在于造血干细胞的高度自我更新，自我维持能力。脐血是否具有造血活性也有赖于具有高度自我更新能力的造血细胞，这些造血细胞较祖细胞原始，目前还不能肯定就是造血干细胞，人们称之为造血前体细胞。这种细胞和祖细胞均能表达CD_{34}抗原。

LuLi等[2]用免疫荧光和流式细胞术来分离纯化脐血中CD_{34}^{+++}细胞群。在单个细胞水平上对CD_{34}^{+++}造血细胞的增殖和分化能力进行研究。而增殖能力又反映造血细胞的自我更新能力。结果表明:单个CD_{34}^{+++}细胞形成集落后取其中单个细胞进行增殖，每隔21天增殖一次，至少可持续5代，提示脐血CD_{34}^{+++}造血前体细胞具有一定的自我更新能力。观察单个CD_{34}^{+++}细胞的培养，其集落形成率为66%，其中39%为大集落，分析其集落组成细胞，发现具有与小鼠高增生性集落形成细胞(Hpp-CFC)极为相似的形态，作者认为脐血中CD_{34}^{+++}细胞似乎就是Hpp-CFC，与骨髓Hpp-CFC比较，脐血中Hpp-CFC集落形成比骨髓多8倍。最后作者认为脐血中含有高增生性和自我复制潜能的造血前体细胞(Hpp-CFC)，这些细胞存在有助于脐血造血细胞移植后的造血重建。但同时作者观察到脐血Hpp-CFC再植后只有CFU-GM集落形成，因此脐血Hpp-CFC是否具有鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com

Hpp-CFC相同的多向分化潜能还有待于进一步研究。

Miguel Abboud等[8]用4-羟过氧化环磷酰胺(4-HC)处理CD_{34}^{+}细胞群以去除定向祖细胞的干扰，单独研究脐血中的造血前体细胞，即CD_{34}^{+}/4-HC^{res}(4-hydroperoxycyclophosphamide resistant,4-HC^{res})。作者先把CD_{34}^{+}/4-HC^{res}细胞于液体培养，7天后再把培养液中细胞种植于半固体培养基中，观察到CFU-GM、BFU-E、CFU-MIX集落形成，提示脐血中存在着一种早期的造血前体细胞(Pre-CFU)，它能分化为各种定向祖细胞，而且对多系集落刺激因子rhIL-3(recombinate human IL-3,)敏感。

②多向造血祖细胞(CFU-MIX)

脐血中含有不同分化阶段的造血祖细胞。在不同培养体系中脐血可培养出CFU-G/E CFU-GEMM等多向造血祖细胞，它们可定向分化为粒系、红系或粒、红、巨核、巨噬细胞集落，但它们的自我更新能力却很弱。

③粒一单系造血祖细胞(CFU-GM)

临床上粒单系祖细胞检测(CFU-GM)常用来作为估计采集的脐血祖细胞数量是否能达到移植成功的细胞数的一个代表性的细胞系，因此它是目前研究最多的造血祖细胞。国外学者用体外培养体系研究表明人脐血CFU-GM产率平均数高于外周血12～16倍，相当或超过骨髓[4]。国内张洪泉用单层琼脂法培养脐血CFU-GM，其平均产率略低于骨髓，但远高于成人外周血[6]。许忠仁研究结果脐血CFU-GM产率为正常人骨髓的一倍[6]另外罗惠琪则认为胎血CFU-GM接近正常骨髓，为正常成人静脉血的10倍[7]。这些脐血CFU-GM平均产率的不同很可能与不同的培养体系有关。

④红系造血祖细胞(CFU-E,BFU-E)

Hassan等以加Epo的血浆凝块培养体系培养人脐血BFU-E产率125/10^5(14天)，CFU-E200/10^5，高于成人外周血或骨髓，集落生成依赖Epo[8]。但Tchernia等却认为正常足月新生儿脐血中仅含有BFU-E[9]。此外，有人在胎血红系祖细胞培养中发现有不依赖Epo即可生长的内源性红系形成细胞(EEC)。

⑤其他系造血祖细胞

除粒-单，红系造血祖细胞外，脐血中还发现有CFU-Eos[10]，CFU-Meg(比成人血多，且巨核细胞更成熟)[11]。CFU-TL(比成人外周血低，可能由于缺乏成熟T淋巴或存在特异性T亚群)[12]。

上述体外培养测定脐血中造血祖细胞，均不是直接测定，而只能从后期细胞的测试来推断前期的祖细胞。由于脐血造血干、祖细胞表达CD_{34}抗原，所以可通过识别CD_{34}的单抗来测定脐血中CD_{34}阳性的造血干、祖细胞。这种方法测定结果稳定，较培养法节约时间。

(2)脐血富含多种造血调控因子

测定造血调控因子方法分两大类：一类是据不同调控因子对各种相应靶细胞刺激其增殖、分化的特点而建立的生物学方法，它反映调控因子的生物学活性，另一类是建立在人类造血调控因子cDNA克隆成功基础上，制备其单克隆抗体的免疫学方法。

①Laver以人TALL101细胞株作靶细胞，用rhGM-CSF作标准曲线，测定脐血浆GM-CSF为19.9±5.2U/ml，而正常人血浆中未测出，加GM-CSF单抗于脐血浆中GM-CSF活性下降。G-CSF活性脐血也高于成人外周血[13]。Roth等用放免法测定正常足月胎儿脐血M-CSF水平为健康成人血清的3倍[14]。国内许忠仁用20～30%脐血清代替rhGM-CSF可获得满意的CFU-GM生长，提示脐血清中确实含有造血刺激因子[6]。

②脐血中含有促红系祖细胞生长的Epo和BPA，但活性不高。

③脐血中含有IL-1β、IL-2、IFN和NK细胞活性，但均低于成人血。

脐血富含的造血调控因子有助于脐血造血活性的维持，它们对造血干、祖细胞调控作用在脐血造血细胞移植中有待于更充分的利

维普资讯 http://www.cqvip.com

用。

(3)脐血含造血基质细胞

造血干细胞需在造血间质这一特定微环境中才能存活，进行增殖和分化。成纤维细胞是体外支持造血的间质细胞中的一种主要成份。1987年Prindull用加10^{-7}氢化可的松α培养基液体培养体系首次证实人脐血含有循环的成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)，含有两类增殖分化潜能不同的群体，比骨髓中的成纤维祖细胞更原始，同时还发现CFU-F具有产生CSF的能力[15]。

2．脐血造血活性的临床应用

(1)脐血输注

脐血富含造血干/祖细胞、各种造血细胞刺激因子、多种无机盐、激素、酶类和高于成人外周血的Hb、RBC，以及高于成人血20～30%的凝血效果。因此脐血输注可用于各种造血系统疾病和免疫缺陷性疾病的辅助治疗，在再障和急性白血病方面临床上已取得疗效。1992年许忠仁等用脐血输注加康力龙治疗20例再障，基本治愈6例。缓解4例，明显进步8例，无效2例，总有效率为90%[8]。随后又对17例急性白血病诱导强化治疗同时联合脐血输注，结果表明所有患者自觉症状好转，与对照组(常规应用抗生素加化疗)相比提高了机体抗感染能力，增强药物耐受性，提高化疗效果。因此急性白血病治疗时输注脐血能改善临床症状，控制出血，防治感染，可作为治疗白血病的一种重要辅助手段[16]。

(2)脐血造血细胞移植(CBSCT)

脐血输注只能是暂时性使造血细胞植入，为综合治疗创造条件。而只有脐血造血细胞移植(CBSCT)才可能使受体造血组织重建和免疫重建。脐血由于富含自造血干细胞至定向祖细胞等不同分化阶段的造血细胞，因此可用于多种血液疾病的治疗。1989年Gluckman和Broxmeyer首次为1例Fanconi′s贫血患儿进行HLA相合的CBSCT获得成功，随后又对4例Fanconi′s贫血患者进行了CBSCT3例获得成功[17]。Vilmer在1991年对1例晚期白血病患儿进行HLA不合的CBSCT获得成功[18]。国内沈柏均等人于1991年首次对1例晚期脂肪肉瘤患儿进行异基因无关供体的CBSCT获得成功[19]。最近沈柏均等人又相继对另外4例晚期实体瘤(神经母细胞瘤、恶性淋巴瘤、卵巢胚胎瘤、脂肪肉瘤)患儿进行CBSCT，4例均完全缓解，外周血象恢复正常，部分病例检出移植成功的重要标志物—供者的性染色体，移植及随访过程均未发现明显的GVHD[20]。尽管CBSCT临床资料还很少，但结果是令人鼓舞的，这将对恶性肿瘤的治疗开辟一条新的途径，呈现出辉煌的前景。此外，脐血造血细胞移植还可用于遗传性免疫缺陷病，急性放/化疗后的全血细胞减少以及骨髓抑制等多种造血和免疫功能缺陷或低下的病例。

3．脐血造血细胞移植目前存在的问题

脐血造血细胞移植可用于同基因或异基因的造血重建。尤其是HLA无关供体(异基因)的CBSCT临床研究成功，避免了骨髓移植中严格的HLA配型，为造血细胞移植治疗造血和免疫缺陷开辟了一条崭新的道路。但是国内外专家认为，CBSCT目前存在两个主要障碍:1，是GVH反应。在胚胎发育和分娩过程中母体的血细胞可能"漏入"胎儿循环，致使胎血中混有母体成熟的淋巴细胞，可能引起严重的GVH反应。从目前临床移植的情况来看，还很少发生或反应很轻。2，单个脐血中的造血细胞数量少，不足以使移植获得成功。另外，CBSCT还有待解决的问题，如:同骨髓移植一样，CBSCT也存在免疫重建迟于造血重建，使移植初期病人感染死亡率高，降低了移植成功率;脐血造血细胞在受体的植入是一种暂时性替代还是永久的植入进而完全取代患者的造血功能，以及这种替代对受体内环境的影响，仍需进行更多的研究。

4．CBSCT今后的方向

针对上述问题，众多学者对CBSCT进行

维普资讯 http://www.cqvip.com

更深入的研究。沈柏均等人用多个脐血(5个左右)混合移植来克服单个脐血造血细胞数量的不足，而多个脐血混合需深低温冻存和复杂程序[20]。最近Broxmeyer总结脐血基础研究和临床移植的经验认为，任何形式的脐血造血细胞分离、溶解RBC和洗脱二甲亚砜的措施都会增加脐血造血细胞的丢失。而沈柏均等用多个脐血混合移植后在受体中却只能找到一个供体脐血细胞的标志物，同时5个混合脐血造血细胞之间相互免疫反应和5个脐血对受体的相互免疫反应是很难避免的。因此多个脐血混合移植还有待于进一步的研究和改良。由于脐血造血细胞对造血调控因子的反应敏感性，我们可以假设，通过单个脐血的造血细胞在体外经造血刺激因子作用增殖、分化培养后再进行移植，使脐血造血细胞数量达到足以使移植成功的水平，或脐血造血细胞和造血刺激因子同时移植或输注来加速受体移植后的造血重建。另外，通过选择性地利用造血细胞刺激因子(CSF)刺激脐血中淋巴系细胞加速其增殖、分化，使脐血中淋巴系细胞数量和功能增加，从而克服CBSCT中的免疫重建迟于造血重建以减少这类病人移植前期的致死性感染；还可以通过单个脐血造血细胞的体外选择性增殖、分化培养，特异性地治疗某一细胞系单独缺乏的疾病，扩大脐血移植的临床应用。

脐血作为一种废弃的血源，若能有选择地采集回收，利用其富含造血干/祖细胞和多种造血活性物质，加之无需严格的HLA配型，适用于同基因或异基因的造血重建，大有取代骨髓移植之势，具有广阔的临床应用前景。

参 考 文 献

1 Barness DWH, et al.Lancet 1964; 1：1395
2 Lu Li, et al. Blood 1993 January; 81(1)：41
3 Abboud M, etal. Exp Hematol 1992, October; 20(9)：1043
4 杜宏微.国外医学输血与血液学分册 1991;14(5)：258
5 张洪泉，等.中华血液学杂志 1992;13(4)：180
6 许忠仁，等.江苏医药 1992;18(5)：260
7 罗惠琪，等.泸州医学院学报 1992;15(4)：268
8 Hassan MW, et al. Br J Haematol 1979;41(4)：477
9 Tchernia G, et al. J Lab Clin Med 1981;97(3)：322
10 Kirshner JJ, et al. Exp Hematol 1980;8(10)：1202
11 Vainchenker W, et al. Blood Cells 1979;5(1)：25
12 Foa R, et al. Exp Hematol 1980;8(9)：1139
13 Laver J, et al. J Pediatr 1990;4：627
14 Rath PJ, et al. Pediatr 1991;119(1)：113
15 Prindull G, et al. Blut 1987;54：351
16 许忠仁，等.南通医学院学报 1992;12(2)：121
17 Broxmeyer HB, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86(10)：3828
18 Vilmer E, et al. Bone Marrow Transplant 1991;7：125
19 沈柏均，等.中华器官移植杂志 1991;12(3)：138
20 沈柏均，等.中华肿瘤学杂志 1993;(2)：152

(收稿日期1994-01-20)