

# 脐血技术基础和临床应用研究现状

钱忠明 郭天欢 王玮 郭试瑜 袁其朋

干细胞技术是近年发展最为迅速的生物医学技术。由于干细胞移植对许多疾病治疗的特殊意义,干细胞研究和应用已成为目前医学界最为热门的课题。在干细胞技术的研究应用中,造血干细胞移植的临床应用较早,始于 20 世纪 50 年代后期,80 年代初有较大突破。由于脐血富含造血干细胞,来源广泛,为研究人员所关注。1988 年法国科学家为一个患 Fanconi 症的儿童进行了世界上第一例脐血移植获得成功。至今,全球已有数千例患者接受了脐血移植,成功率高达 80%。现就脐血技术的基础及临床应用研究现状作一综述。

## 一、脐血生物学特点的基础研究

1. 脐血细胞的特点: 胎儿造血器官历经卵黄囊、肝、脾到骨髓,第 4 月末开始骨髓造血期。到出生时,肝、脾产生全血细胞的功能基本丧失,骨髓代之成为主要的造血器官,故脐血是骨髓造血早期的血液。脐血含有丰富的造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPC),其数量相当甚至超过骨髓所含的造血祖细胞,因此脐血是一个引人注目,很有潜力可代替骨髓的造血祖细胞的来源。Almici 等<sup>[1]</sup>分析了脐血中祖细胞不成熟(immaturity)的程度,他们发现脐血含有高比例的未成熟祖细胞。三色分析(three-color analysis)的结果证实,大多数分化簇(cluster differentiation, CD<sub>34</sub><sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>)细胞亚群可检测到干细胞因子(SCF)受体。甲基纤维素混合物中加入 SCF 可增加单核细胞(MNC)和 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>细胞的集落生长,粒巨噬细胞系集落形成单位(CFU-GM)和粒红巨噬巨核细胞系集落形成单位(CFU-GEMM)的增加最为显著。与骨髓相比,脐血祖细胞对巯磷酰胺(mafosfamida)处理有较强的抵抗力。单一集落转化测定显示,在培养液中加入 SCF 可促进脐血细胞的再植入潜能,不管这些细胞是否经巯磷酰胺事先处理。这些表面抗原的表达,SCF 的分布,对巯磷酰胺的抵抗力和再植入潜能的研究结果显示,脐血是具有未成熟特点的祖细胞的一个资源。Cardoso 等<sup>[2]</sup>比较了骨髓和脐血 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD<sub>38</sub><sup>-</sup>细胞群的分化增殖能力和在长时间培养中产生早期祖细胞的能力。在脐血中 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD<sub>38</sub><sup>-</sup>组分占 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>群的 4%,而在骨髓中

只占 1%,显示脐血可能相对富含干细胞。与一份用于成人移植的常规骨髓标本相比较,一份典型的脐血标本中的 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD<sub>38</sub><sup>-</sup>细胞可产生等量的 CFU-GEMM,产生的 CFU-GM 是骨髓的 2 倍,产生的红系爆式集落形成单位(burst-forming units erythroid, BFU-E)是骨髓的 3 倍。另外,脐血标本形成的集落也比骨髓形成的大,显示脐血有较强的生长潜能。端粒是在所有真核生物染色体末端的富含 G/C 的重复 DNA 序列,在细胞分裂期间端粒重复序列的丢失被认为可能是细胞衰老的机制。应用 DNA 印迹法(Southern blot)、荧光原位杂交方法(FISH)研究发现脐血干细胞的端粒平均长度明显较骨髓干细胞的端粒长,表明脐血的造血增殖潜能要高于骨髓。

2. 脐血的免疫学特征: 利用脐血重建重度骨髓抑制治疗之后的造血功能的一个最重要的益处是同种异体移植后受者急性移植物抗宿主病(GVHD)的发生率较低<sup>[3,4]</sup>。由于成熟 T 淋巴细胞在 GVHD 的发病机制中起重要作用,D'Arena 等<sup>[5]</sup>使用双倍标记单克隆抗体大板的流式血细胞计数法比较了人脐血和外周血的 T 淋巴细胞的免疫表型。他们发现脐血中淋巴细胞的绝对数大于外周血,但脐血和外周血 T 细胞百分率有明显不同,而 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>比率无差别。除了 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>CD<sub>16</sub><sup>+</sup>和(或)CD<sub>35</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群,CD<sub>3</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>和 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>活化 T 细胞外,脐血中其他所有淋巴细胞亚群的绝对值均较外周血液高。CD<sub>38</sub>是一个活化和未成熟的标志,几乎所有的脐血 T 细胞都含 CD<sub>38</sub>,成人外周血的 T 细胞仅一半含 CD<sub>38</sub>。大部分的脐血 T 细胞也表达 CD<sub>45</sub>RA 幼稚抗原,而成人外周血 T 细胞中以 CD<sub>45</sub>RO<sup>+</sup>记忆细胞为主。这些结果证实脐血和成人外周血中淋巴细胞的免疫表型有明显的差别。脐血 T 淋巴细胞免疫表型不成熟,大多数脐血细胞是幼稚的(CD<sub>45</sub>组分中以 RA 型为主)。Baibey 等<sup>[6]</sup>的研究也取得了类似的结果。这些结果部分解释了为什么脐血同种异体移植时受体 GVHD 发生率较低。此外,除了 IgM 型免疫球蛋白外,脐血 B 淋巴细胞几乎不产生任何抗体。最近, Gudmundsson 等<sup>[7]</sup>使用 ELISPOT 法比较了脐血和成人外周血循环中 IgA, IgM, IgG, IgE 细胞的数量。他们的结果支持这一结论,同时他们也发现脐血中也含有一些产生 IgA, IgG 的细胞,但数量很小。

3. 脐血造血因子: 脐血中除有形的细胞成分外,另一部分即为液态的血清成分,含有丰富的造血细胞生长因子。脐血移植的成功,与脐血含有丰富的细胞生长因子有相当关系。目前研究表明脐血血清中细胞生长因子浓度及脐血细胞

基金项目: 香港政府 RGC(A/C; PolyU5270/O1M/B-Q445 和香港理工大学研究基金资助项目(A/C; A-PC 23)

作者单位: 香港理工大学应用生物及化学科技学系(钱忠明、郭天欢、袁其朋); 美国奥马哈内布拉斯加州州立大学医学中心生理和生物物理系(王玮); 日本东京昭和大学医学院第一生理室(郭试瑜)

通信作者: 钱忠明, Email: bcznqian@polyu.edu.hk

表达造血因子能力与成人外周血不同。脐血细胞生长因子主要包括集落刺激因子,如:促红细胞生成素(EPO)、中性粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、SCF 和白细胞介素(IL),如:IL-6、IL-3、IL-1 $\beta$  等两类。正常新生儿脐血清中 G-CSF 和 GM-CSF 水平明显高于正常人血清。GM-CSF 是造血干细胞增殖和分化所必需的刺激因子。因此认为脐血中祖细胞较多和增殖率较高的原因可能与脐血清中较高水平的 G-CSF 和 GM-CSF 有关。IL-6 是一种与骨髓造血相关的细胞因子,单独应用 IL-6 并不能刺激或诱导骨髓 CFU-GM,当其 与 GM-CSF 并存时,能增加骨髓粒、单核细胞系祖细胞对 GM-CSF 的敏感性,促进骨髓造血。以上结果表明,脐血清中造血细胞生长因子不仅含量颇高而且种类也多,可能对各阶段造血干、祖细胞均具有重要的刺激作用。

## 二、脐血细胞库技术的研究

1. 脐血造血干、祖细胞的分离浓缩及冻存复苏:许多脐血造血细胞的分离、浓缩技术已经建立,如单纯离心法、不连续密度梯度离心法、三联袋分步离心法以及 Ficoll、Percoll、甲基纤维素、明胶、羟乙基淀粉等方法。目前广为应用的是利用抗 CD<sub>34</sub> 抗原的单克隆抗体进行分离纯化的免疫学方法,如免疫珠吸附法、生物素-抗生物素亲和柱法、流式细胞仪分选法。有研究发现明胶法造血细胞损失率最低,其集落形成细胞(colony forming cell, CFC)、CD<sub>34</sub><sup>+</sup> 细胞回收率分别可达 92% 和 86%<sup>[8]</sup>。最近国内袁立新等<sup>[9]</sup>采用优化的羟乙基淀粉法分离技术,使脐血中的有核细胞总数、单个核细胞数及 CD<sub>34</sub><sup>+</sup> 细胞数分别达到 88.9%、89.7%、88.5%,优于国外常用的方法。脐血细胞低温冻存保护是脐血技术研究中的一个重要课题。Games 等<sup>[10]</sup>研究表明二甲基亚砷浓度在 5%~10% 时,冻存的造血祖细胞有最好的恢复和成活率。采用程序降温和预孵复温的方法可提高脐血造血细胞的集落产率。

2 脐血造血干、祖细胞的体外扩增:人脐血是可移植干细胞的一个来源,但单份脐血所含的造血干、祖细胞量有限,只能满足一个体重 30~40 kg 患者移植之用,因此主要用于儿童。进行体外扩增可扩大脐血应用范围。大部分研究表明,不含造血因子的普通培养液几乎无扩增造血细胞的作用。在培养液中加入细胞因子进行扩增,细胞总数可增加数百倍,祖细胞数可扩增 10~100 倍。细胞因子 IL-1、IL-3、SCF、EPO 等主要作用于较早期的多能造血祖细胞,IL-6、GM-CSF、G-CSF、M-CSF 等主要作用于较晚期的定向造血祖细胞。不同细胞因子组合可产生不同的扩增效应。脐血 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>、CD<sub>45</sub>RAlo、CD<sub>71</sub>lo 细胞研究的结果显示细胞因子 SCF、IL-3、M-CSF、G-CSF、EPO 的某些特殊组合可致祖细胞数明显扩增,细胞数增加 103 倍以上,BFU-E 扩增 55 倍,培养基集落形成单位(CFU-C)扩增 70 倍,并影响其增生及分化形式。单用脐血清扩增的多向造血祖细胞数目少,若将脐血清和细胞因子联合应用,可有效扩增造血祖细胞,而且脐血清对脐血造血祖细胞的扩增强于对骨髓细胞的扩增。Hao 等<sup>[11]</sup>用来

源于脐血的 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD<sub>38</sub><sup>-</sup> 细胞作为长期培养的起始细胞(long-term culture-initiating cells, LTC-IC),在基质培养中能持续产生 CFU-GM 达 100 d 以上。脐血干、祖细胞也可通过自分泌转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor, TGF- $\beta$ )等负调控因子使绝大多数干、祖细胞处于静止期。而生长因子 SCF、IL-6、IL-3、G-CSF 与 EPO 等均不能阻断 TGF- $\beta$  的抑制作用。在上述组合加入 TGF- $\beta$  反义寡聚脱氧核苷酸或抗 TGF- $\beta$  抗体能有效拮抗 TGF- $\beta$ ,可改善脐血 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD<sub>38</sub><sup>-</sup> 细胞的长期扩增能力,产生的 CFU-GEMM、CFU-GM 和 BFU-E 分别是骨髓的 1、2、3 倍<sup>[2]</sup>。除了体外扩增外,新的研究<sup>[12]</sup>已经证实,将多份脐血合并使用是可行的,这将克服单份脐血所含干、祖细胞不足的困难,使得脐血的应用范围可以扩大到成年人。

## 三、脐血细胞的临床应用研究

由于脐血的淋巴细胞功能不成熟,抗原表达弱,GVHD 发生率低,因此在同胞兄妹中人类 HLA 配型不完全相合者也能成功移植。纽约血液中心已进行无关供体脐血移植 500 多例,说明脐血移植的供受者之间无亲缘关系及 HLA 不完全匹配均可成功。然而,应当指出,有亲缘关系、HLA 完全匹配者移植效果最佳。Rubinstein 等<sup>[13]</sup>分析了自 1992 年 8 月至 1998 年 1 月多个中心进行的 562 例无关体脐血移植,94% 受体 1 年内存活良好,81% 受体中性粒细胞恢复的平均时间为 28 d,85% 受体血小板的平均恢复时间为 90 d 急性 GVHD (III、IV)发生率为 23%,慢性 GVHD 发生率为 25%,显示脐血移植有较高的存活率及较低的 GVHD 发生率。虽然脐血中淋巴细胞抗原表达弱,淋巴细胞功能不成熟,但很快可诱导分化出非特异性 NK 细胞样效应,并可显示出比成人外周血更强的细胞毒作用。研究发现经细胞内因子刺激的脐血细胞胞质内有大量细胞毒效应颗粒,对 K562 和 Raji 肿瘤细胞的细胞毒作用明显强于骨髓和外周血,而经 IL-2 活化的脐血可明显抑制 K562 白血病细胞在严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)鼠体内的生长。体内外实验均说明脐血含有较骨髓、外周血更多的抗肿瘤前体细胞,是肿瘤过继性免疫治疗的良好资源<sup>[14]</sup>。目前可用脐血移植治疗的疾病有:恶性肿瘤中的急、慢性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、睾丸癌、黑色素瘤、原发性脑瘤、小细胞性肺癌等;非恶性肿瘤中的再生障碍性贫血、地中海贫血、范科尼贫血、SCID、骨质疏松症、放射病、Wiskott-Aldrich 综合征等。

脐血移植用于基因治疗也日益受重视。Kohn 等<sup>[15]</sup>将人腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)基因转入脐血 CD<sub>34</sub><sup>+</sup> 细胞,输给 3 例 ADA 缺陷患儿,治疗成功。另外有用多药耐药基因(MDR1)转染造血细胞的研究,用 MDR1 基因转染造血细胞对骨髓进行保护性基因治疗,可加大化疗药物剂量,将对肿瘤的治疗产生重要推动作用。目前,脐血造血细胞基因治疗的研究尚处于初级阶段。此外,脐血干细胞具有较强的横向分化能力,能发育成多种不同的细胞。Chen 等<sup>[16]</sup>最近的研究显示将维生素 A 衍生物处理过的脐血细胞注射到卒

中小鼠静脉内, 脐血细胞可自行转移入脑组织内受损部位, 并发展成为正常的神经细胞, 活动能力恢复到卒中前的 50%~80%。最近研究也已证明将脐血干细胞人工培养液中加神经生长因子, 最终可使其分化成神经元和胶质细胞。因此, 脐血细胞可作为干细胞替代治疗神经退行性疾病的一个细胞来源<sup>[17]</sup>。转基因动物的研究已显示人脐血细胞移植可明显改善老年痴呆<sup>[18]</sup>和亨顿病<sup>[19]</sup>的症状。相信不久脐血将可作为一个重要的干细胞库被加以广泛利用。

参 考 文 献

- 1 Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE, et al. Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Leukemia* 1997, 11: 2143-2149.
- 2 Cardoso AA, Li ML, Batard P, et al. Release from quiescence of CD34+CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 8707-8711.
- 3 Brahmī Z, Hommel-Berrey G, Smith F, et al. NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum Immunol* 2001, 62: 782-790.
- 4 Lin AJ, Wang LY, Huang YJ, et al. Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on apoptosis and proliferation of umbilical cord blood mononuclear cells. *Bone Marrow Transplant* 2001, 28: 439-445.
- 5 D' Arena G, Musto P, Cascavila N, et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* 1998, 83: 197-203.
- 6 Barbey C, Irion O, Helg C, et al. Characterisation of the cytotoxic alloresponse of cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1998, 22 Suppl 1: S26-30.
- 7 Gudmundsson KO, Thorsteinsson L, Gudmundsson S, et al. Immunoglobulin-secreting cells in cord blood: effects of Epstein-Barr virus and interleukin-4. *Scand J Immunol* 1999, 50: 21-24.
- 8 Denning-Kendall P, Donaldson C, Nicol A, et al. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking. *Exp Hematol* 1996,

- 24: 1394-1401.
- 9 袁立新, 曾丘林. 脐血造血细胞分离、低温冻存保护新技术. *中国医学论坛报*, 2000, 744: 8.
- 10 Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80 degrees C without rate controlled freezing. *Transfusion*, 1996, 36: 794-797.
- 11 Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, et al. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood*, 1996, 88: 3306-3313.
- 12 Ende N, Lu S, Alcid MG, et al. Pooled umbilical cord blood as a possible universal donor for marrow re-constitution and use in nuclear accidents. *Life Sci* 2001, 69: 1531-1539.
- 13 Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placenta-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998, 339: 1565-1577.
- 14 Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. *Transfus Clin Biol* 2001, 8: 146-154.
- 15 Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nature Med* 1995, 1: 1017-1023.
- 16 Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 2001, 32: 2682-2688.
- 17 Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001, 171: 109-115.
- 18 Ende N, Chen R, Ende-Harris D. Human umbilical cord blood cells ameliorate Alzheimer's disease in transgenic mice. A brief report. *J Med* 2001, 32: 241-247.
- 19 Ende N, Chen R. Human umbilical cord blood cells ameliorate Huntington's disease in transgenic mice. A brief report. *J Med* 2001, 32: 231-240.

(收稿日期: 2001-09-25)

(本文编辑: 李敬东)

光疗科研课题招标启事

上海海斯泰投资有限公司是医药行业上市公司之全资子公司, 正在试生产一种无创光疗设备。相关的基础研究(光照射对人纤维母细胞增生及基因表达图谱的影响等课题)已于今年 2 月开始, 现征求临床科研合作医院。

该光疗机的治疗方向是: (1)提高红细胞携氧能力及增加细胞供能; (2)改善机体免疫功能; (3)降低体内有害自由基水平; (4)改善微循环及血液黏稠度; (5)消除慢性疲劳; (6)减轻放疗、化疗后的呕吐反应; (7)治疗抑郁症; (8)减缓皮肤衰老及美容; (9)促进皮肤创面愈合。

为作好这一科学研究, 我公司提供: (1)全身光疗机 1 台(市场价 200 万元人民币左右, 科研结束后退回公司或另外签订合同); (2)课题方案(著名临床流行病学专家按循证医学原则设计); (3)相关学术论文 700 余篇及已经完成的基础医学研究成果; (4)必要的技术支持。

医院(课题组长)需具备的条件是: (1)三级甲等医院; (2)牵头人有较强的科研能力, 曾经在中华医学系列杂志上发表过论文; (3)提供 50 平方米带冷暖空调的治疗用房, 需是里外套间(公司将提供 1 份治疗用房标准平面图); (4)医院的全力支持; (5)确保充足的科研时间。

欢迎有兴趣参加该科研项目的医院科室来电来函联系相关事宜。联系人: 李剑飞。Email: lr@healthtech.com.cn。联系电话: 021-63372888-8016。联系地址: 上海市宁波路 1 号申华金融大厦 8 层, 上海海斯泰投资有限公司医学部, 邮政编码: 200002。