

·学科进展·

造血细胞工程的基础研究与临床应用

裴雪涛*

(北京放射医学研究所,北京 100850)

[摘要] 造血系统是体内高度活跃和高度新陈代谢的系统,造血干细胞具有自我更新能力和高度增殖以及多向分化的潜能,利用这些性能可以在体外大量扩增造血细胞,并可定向诱导其分化成熟,还可以对其功能进行激活或调控,以及靶向性转染目的基因等,最终满足基础研究和临床应用的需 要,本文将简要介绍造血细胞工程的主要研究内容及其相关的研究进展。

[关键词] 造血干/祖细胞,造血细胞工程,体外扩增,定向诱导,细胞治疗,基因治疗

造血系统是体内高度活跃和高度新陈代谢的系统,造血干细胞具有自我更新能力和高度增殖以及多向分化的潜能,血细胞的生成及其调控依赖于各种造血生长因子,造血基质细胞、细胞外基质等多种因素的相互作用与平衡,并涉及细胞的增殖、分化、发育、成熟、迁移、定居、衰老、凋亡、癌变等生命科学中的许多基本问题和研究热点。因此,造血细胞及其生成的调控研究具有十分重要的理论意义,以此为模型的基础研究可以在细胞、蛋白质分子和基因水平阐明生命活动中的许多调控机制;同时,造血干细胞移植和血细胞的治疗在恶性肿瘤、免疫缺陷性疾病、感染性疾病、AIDS、遗传性疾病、自身免疫性疾病等的支持治疗、免疫治疗和基因治疗中具有十分广泛和重要的应用价值。

细胞治疗是生物免疫治疗和基因治疗的重要组成部分。血细胞由于具有运输氧、修复损伤内皮、控制感染、参与机体免疫等多种复杂的功能,因此,又是细胞治疗的主要细胞来源。此外,造血干细胞具有高度的自我更新、多向分化及重建长期造血的潜能,早期造血祖细胞也具有高度的增殖能力和多向分化能力,从而又使造血细胞在干细胞移植、免疫治疗、基因治疗、造血支持治疗等领域具有广泛的用途。第一代的细胞输注疗法是成熟血细胞的全血输注,以后逐渐发展为成分输血,包括红细胞、血小板、成熟 T 淋巴细胞的输注,中性粒细胞由于半衰期短

暂而对中性粒细胞减低者无明显效果;第二代细胞疗法的典型代表是骨髓移植,但近年来动员的外周血干细胞移植和脐带血干细胞移植的数量明显增加,并有取代骨髓移植的趋势。干细胞移植的应用也使造血细胞治疗的领域拓展到恶性血液疾病、遗传性疾病、重症免疫缺陷、AIDS、自身免疫性疾病以及肿瘤放化疗后的造血支持治疗等领域。然而,干细胞移植需采集到足够量的干细胞,骨髓采集和外周血动员、采集、分离等步骤较为复杂,对于多次接受化疗的患者也难以进行有效的动员和采集;单份脐带血所含 CD34⁺ 细胞的数量为用于成人骨髓移植的数量的 1/10—1/15;此外,干细胞移植后成熟血细胞的再生也还需 1—3 周。因此,人们依然期盼更加有效、安全、经济的细胞疗法。近年来,细胞分选技术,造血生长因子的发现与克隆,各种 *ex vivo* 操作技术的建立与完善,使得造血细胞在数量、性能和功能方面的改造更易于操作与应用,从而产生了新一代(第三代)的细胞疗法。第三代细胞疗法是利用造血干/祖细胞的高度增殖能力和多向分化潜能,通过细胞工程的技术,在体外模拟或部分模拟体内的造血过程(包括基质细胞的支持和造血生长因子的调控等),对分离纯化的造血干/祖细胞进行体外扩增、定向诱导分化、功能激活与调控、目的基因转染等,从而在短时间内大量扩增早期造血祖细胞及各阶段的造血前体细胞。以及定向诱导扩增大量的

* 1998 年度国家杰出青年科学基金获得者。

· 本文于 1999 年 1 月 14 日收到。

红细胞、粒/巨噬细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞(Dendritic Cells, DC)、NK细胞、T/B淋巴细胞等功能血细胞和免疫活性细胞,并可对部分细胞的功能进行激活和调控,对缺陷性基因进行靶向性转染,最终将造血细胞治疗更广泛和有效地应用于干细胞移植、生物免疫治疗、造血支持治疗和基因治疗等领域。

1 造血干/祖细胞的主要生物学特性及其分离纯化

造血干细胞除具有自我更新和多向分化的性能特征外,还具有以下特点:(1)绝大多数干细胞处于静止期(G_0 期);(2)高度表达 CD34 和 CD_w90 抗原;(3)缺乏 CD33、CD71 等系相关抗原;(4)具有人类白细胞抗原 CD45RA 高分子量形式;(5)低表达或不表达 HLA-DR;(6)Rhodamine 低吸收率(Rho^{dim}),其中 CD34 抗原是造血干/祖细胞分离纯化的主要标志,其功能尚不完全清楚,主要存在于幼稚的造血干/祖细胞、部分骨髓基质细胞和少量的内皮细胞表面。

纯化造血干/祖细胞是造血细胞工程的限制性因素,但造血细胞是一不均一的细胞群体,在时间上具有不同分化发育阶段的细胞,在空间上则可向红细胞系、粒/巨噬细胞系、巨核细胞/血小板系、T/B淋巴细胞系、NK细胞、树突状细胞等方向分化。因此,造血细胞在细胞大小、比重、形状、行为特征、表面标志、细胞周期、调控机制等方面均存在较大的差异。因此,各种血细胞群体的复杂性、不均一性以及造血干/祖细胞的稀少使得造血干/祖细胞的分离纯化难以实现。进入 90 年代后,随着分子生物学、免疫学、细胞生物学、激光工业,纳米材料和电子计算机等学科和技术的高速发展,使纯化造血干/祖细胞成为现实,也为造血干/祖细胞的体外扩增、定向诱导分化、基因治疗、生物免疫治疗、建库、移植等奠定了基础。

造血干/祖细胞在增殖分化过程中表面抗原的变化是其分离纯化的标志,而高亲和力和单克隆抗体的制备和相关分离纯化技术的完善则是其基础。利用 CD34、CD38、HLA-DR、CD45RA、c-kit、CD_w90 等细胞表面标志,通过不断发展和完善的免疫磁珠、生物素-抗生物素亲和吸附、流式细胞术、单抗铺展贴壁等细胞分选技术,从而使 CD34⁺ 及其亚群细胞(如 CD34⁺ CD38⁻、CD34⁺ CD38⁻、CD34⁺ HLA-DR⁻、CD34⁺ HLA-DR⁺、CD34⁺ Thy-1⁺ Lin⁻、CD34⁺ HLA-DR⁻ CD33⁻ 等)的分离纯化得以广泛开展。且更深

入的研究还发展了新的造血干/祖细胞分选标志(如 AC133)以及发现了可能是更早期的、能够重建长期造血和免疫功能的 CD34⁻ 造血干细胞(CD34^{low} c-Kit + Sca-1⁺ Lin⁻)^[1]。

2 造血干细胞移植的新资源

自 80 年代起,造血干细胞移植已成为癌症、造血系统疾病、自身免疫性疾病和部分遗传性疾病的重要治疗手段。但在过去相当长的一段时期内,造血干细胞移植,尤其是异基因移植的干细胞来源只有骨髓。之后,外周血干细胞(PBSC)被首先应用于化疗单独动员后的自体移植,进一步的研究和临床试验则表明化疗+细胞因子(G-CSF、GM-CSF 等)可使更多的干细胞进入外周血,从而可以采集到足够的造血干/祖细胞用于移植,并使其移植后的粒细胞和血小板恢复速度明显快于骨髓移植。进入 90 年代以来,细胞因子动员的 PBSC 进一步被用于异基因移植。1990 年以来,自体造血干细胞移植的数量已超过异基因移植;1993 年以后,自体外周血干细胞移植的数量又超过了自体骨髓移植;1990—1994 年,用于淋巴瘤和乳腺癌患者的自体造血干细胞移植增加了 5 倍,同期,外周血干细胞移植的百分比也由 15%增至 75%,成为造血干细胞移植的主要干细胞来源^[2]。同时,PBSC 和脐带血(CB)干细胞开始被用于异基因移植。目前的研究则更多地关注于 VLA-4、LFA-1、LFA-3、VLA-5、c-kit、CD44、CD18 等细胞粘附分子(CAM)所参与的干细胞动员机制,以及 G-CSF、GM-CSF、SCF、FL、TPO、IL-8、EPO、IL-3、PIXY321、IL-6、IL-1、MIP-1 α 等细胞因子及其组合的动员效率和动员细胞表型、性能、长期造血重建能力等,此方面的研究将会使外周血干细胞移植的应用更加广泛、高效和快捷。

脐带血含有丰富的造血干/祖细胞,其免疫细胞的抗原性较弱,CTL 祖细胞较少,移植相关 GvHD 的发生相对骨髓的外周血少而轻,采集保存容易,对供者无任何伤害,因此被认为是极具潜力的新的造血干细胞来源。1989 年首例脐带血移植治疗 Fanconi 贫血获得成功,更是引起全球的关注,对脐带血造血干/祖细胞的生物学性能、免疫学特征、移植潜能等方面的研究已成为热点,且在许多国家均建立了规模不等的脐带血库。纽约血液中心自 1992 年开始启动其胎盘/脐带血计划,至今所保存的胎盘/脐带血已超过 8 000 份,并为 700 余例患者提供了脐带血干细胞用于移植。对其移植后随访超过 100 天的

562例患者进行分析,表明脐带血移植可以顺利重建患者的长期造血,其植入时间与细胞剂量、患者年龄、疾病种类和HLA相合程度等均明显相关,移植患者中54%有2—3个位点不相合,但其发生的急性GvHD较易控制,仅少数患者出现慢性GvHD^[3]。因此,大规模的脐带血库将成为新的、有效的干细胞来源。

造血干细胞移植的另一个新资源来自于CD34⁺细胞的分离纯化,依据上述CD34⁺细胞分选的原理,获得FDA批准的CellPro亲和吸附分选系统和欧共体(EC)批准的CliniMACS磁性分选系统均已进入临床应用,纯化CD34⁺细胞可净化移植中污染的肿瘤细胞和异基因移植时的T淋巴细胞,从而降低移植后的复发率,控制移植相关的严重GvHD和移植对肿瘤细胞的免疫反应,因此被广泛应用于恶性肿瘤和自身免疫性疾病治疗时的异基因和自体干细胞移植,同时,纯化的CD34⁺细胞还使应用相关供者的超剂量干细胞进行半相合移植成为可能。此外,纯化的CD34⁺细胞也是造血细胞扩增和基因转染的前提条件。

3 造血干/祖细胞体外扩增与定向诱导分化

近年来,造血细胞工程,尤其是造血祖细胞的体外扩增研究有了长足的进步。利用造血干/祖细胞的高度增殖能力和多向分化潜能,以及各种造血生长因子和造血基质细胞的调控作用,可使来自于骨髓、动员外周血和脐带血的CD34⁺细胞在SCF、IL-1、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、EPO和PIXY321等细胞因子的不同组合刺激下得以大量扩增,经8—14天即可扩增细胞总数30—1000余倍,造血祖细胞(包括CFU-GM、BFU-E、CFU-GEMM)也可被扩增41—190倍。但上述细胞因子在扩增造血细胞的同时,对CD34⁺CD38⁻早期造血祖细胞的扩增作用不明显,且明显地加速了早期造血祖细胞的分化,从而导致重建长期造血能力的耗竭。因此,如何在扩增造血细胞、加快短期造血恢复的同时,又保留造血干细胞及扩增早期造血祖细胞,保证长期造血重建,这种“鱼”和“熊掌”兼得的理想境地将成为造血细胞工程研究的重点和难点。近年来,Flt3/Flk2配基(FL)、TPO等新的细胞因子被克隆,并证明其可以协同刺激早期造血祖细胞,且对细胞分化的压力相对较小。我们的研究结果则表明,FL、TPO加上部分传统的细胞因子组合,可以大大提高造血细胞的扩增效率,短时间内可使造血细胞总数增加数千倍,且可使早期

造血祖细胞扩增近50倍,这远远高于传统细胞因子组合的扩增效果;利用CD34⁺CD38⁻细胞亚群进行扩增也可以明显增加早期造血祖细胞的扩增而减缓其分化成熟,且其扩增细胞的再植能力也明显高于CD34⁺CD38⁻亚群扩增的细胞;基质细胞的支持也是扩增早期造血祖细胞的重要手段,有基质存在的情况下,CD34⁺CD38⁻细胞经FL、SCF、IL-3等细胞因子的刺激,10—14天LTC-IC即可被扩增3—30倍,3周后可达50倍,而没有基质的扩增体系则难以维持LTC-IC的自我更新能力;更新一代的“生物反应器”则可持续灌注低浓度的细胞因子和不断更新培养基,从而减轻细胞分化压力,清除细胞代谢产物,减少污染机会,增加扩增效率;此外,TGF- β 、MIP-1 α 、TNF- α 、LIF等负调控因子可阻止细胞分化,在适当的时机加入扩增体系,使扩增细胞的分化速率减慢,从而保留更多的早期造血细胞数量和功能^[4]。

扩增造血祖细胞的同时,也明显地加速了其分化,这是造血祖细胞扩增面临的一个难题,但同时又为我们展开了一个新的研究领域,即利用造血干/祖细胞具有多向分化的潜能,通过SCF、IL-3、GM-CSF、G-CSF、EPO、TPO、IL-2、IL-4、IL-7等细胞因子的不同组合,以及骨髓、胸腺、淋巴结等造血微环境的作用,定向地诱导其分化,产生大量所需的功能细胞(如红细胞、粒细胞、血小板、树突状细胞、NK细胞、淋巴细胞等),满足基础研究及临床应用的需要,这在新一代的细胞免疫治疗中将具有十分重要的意义^[5]。

4 造血细胞相关的细胞治疗与基因治疗

血细胞输注和造血干细胞移植已广泛应用于许多疾病的临床治疗,以造血干/祖细胞体外扩增及定向诱导分化为代表的新一代细胞治疗也已从实验室走向临床应用,并进一步拓宽了其应用领域:外周血干细胞移植时减少动员次数和分离时间、自体造血干细胞移植时的肿瘤净化、脐带血干细胞移植、造血干细胞作为靶细胞的基因治疗、异基因骨髓和外周血干细胞移植、造血干细胞移植相关及肿瘤化疗后的粒细胞和血小板减少,以及NK、DC和淋巴细胞介导的生物免疫治疗等。

除造血细胞相关的造血支持治疗外,LAK、CIK、CTL、TIL以及DC等细胞介导的免疫治疗也逐渐成为恶性肿瘤等疾病的重要治疗策略。其中DC是体内最有效的抗原递呈细胞(APC),通过其表面的B7、MHC-II、CD1、ICAM-1等信号分子和共刺激分子,并分泌大量IL-12等细胞因子,激活T辅助细胞,并传

递特异性抗原信号,最终激活细胞毒 T 细胞(CTL)。因此,在肿瘤免疫及其治疗中具有重要意义。利用 GM-CSF、IL-4、TNF- α 、FL、SCF、Rank、Trance 等细胞因子的不同组合,可以从 CD34⁺ 造血细胞和外周血单核细胞诱导扩增出大量的 DC,进一步则通过肿瘤特异性多肽、酸提抗原或肿瘤差异 mRNA 刺激、肿瘤抗原编码基因导入、细胞因子修饰、DC 与肿瘤细胞融合、DC 吞噬细胞凋亡小体等策略使 DC 装载特异性抗原^[6],诱导抗原特异性 CTL 杀伤肿瘤细胞,因此已成为当今肿瘤生物治疗领域倍受关注的焦点。目前,DC 回输疗法已成功地试用于非何杰金氏淋巴瘤、黑色素瘤、前列腺癌和多发性骨髓瘤等恶性肿瘤晚期患者的治疗^[7]。此外,DC 的来源与大量扩增、免疫学特性、作用机制等研究也成为热点。DC 在感染、移植排斥和自身免疫性疾病中的作用也有人涉足,在 HIV 的研究中,有人发现 DC 可能是病毒感染早期逃避机体免疫而进行复制的部位;而在移植前去除移植物中的 DC 或降低其抗原递呈能力均可使移植存活期延长。进一步的深入研究,将会使 DC 介导的特异免疫治疗在肿瘤、感染、移植免疫、自身免疫等疾病中得到更安全、有效的应用。

由于造血干细胞具有自我更新、多向分化、重建长期造血、采集和体外处理容易等特点,因此是基因治疗最理想的靶细胞之一,以此为基础的基因治疗在重症免疫缺陷、遗传性疾病、恶性肿瘤、造血干细胞保护、AIDS 等领域具有广阔的应用前景。在美国 NIH 公布的基因治疗方案中,以造血细胞作为靶细胞的基因治疗方案已达 30 余个,这些治疗方案正从实验室阶段逐渐向临床过渡。其中 ADA 转染 CD34⁺ 细胞治疗重症联合免疫缺陷综合征(SCID)、FACC 导入治疗 Fanconi 贫血、 β -珠蛋白及其相关调控区基因的转染治疗 β -地中海贫血和镰状细胞贫血、IX 因子基因转入治疗血友病 B 等均获得了令人鼓舞的疗效;外源基因标记在自体造血干细胞移植后复发原因和净化效果的分析中也已成为主要的证据,这在干细胞移植后的造血重建、细胞归巢(Homing)、肿瘤复发的克隆起源、各种净化肿瘤细胞方法的评价等方面具有重要价值;mdr-1、dhfr、mgmt 等耐药基因的转染则可使造血干/祖细胞能够耐受更高的化疗药物剂量,从而可以进一步提高化疗剂量和增加不同作用机制的药物组合,使肿瘤化疗效果更加满意,同时又保护造血细胞免遭伤害;抑制 HIV 复制的基因转入 T 淋巴细胞后表现出对 HIV 复制的明显抑制作用,若将其转染造血干/祖细胞,在体

内分化为对 HIV 有抗性的巨噬细胞、T 细胞等,从而获得治疗 AIDS 的长期效果^[8];此外,通过 HSV-TK 自杀基因的转染和 GCV 的选择性杀伤作用,调控 T 淋巴细胞的数量,也将为异基因造血干细胞移植时控制 GvHD 保留 Gvl 的治疗方案奠定基础。目前人们普遍关注的造血干/祖细胞及其亚群的分离纯化、造血细胞基因转染效率的提高、基因转移载体(脂质体、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等)的不断改进、转基因细胞的扩增和定向诱导分化、新的目的基因的发现、目的基因转染后的稳定表达和调控等领域的深入研究将会使造血细胞相关的基因治疗更加有效和广泛地应用于临床。

5 造血调控的相关基础研究

造血系统是体内高度活跃和高度新陈代谢的系统,造血干细胞具有自我更新能力和高度增殖以及多向分化的潜能,血细胞的生成及其调控依赖于各种造血生长因子、造血基质细胞、细胞外基质等多种因素的相互作用与平衡,并涉及细胞的增殖、分化、发育、成熟、迁移、定居、衰老、凋亡、癌变等生命科学中的许多基本问题和研究热点。因此,造血细胞及其生成的调控研究具有十分重要的理论意义,以此为模型的基础研究可以在细胞、蛋白质分子和基因水平阐明生命活动中的许多调控机制。造血细胞工程在大量扩增造血祖细胞、定向诱导各系功能血细胞分化、改造或激活造血细胞功能、靶向性转染目的基因的同时,也为造血调控的相关基础研究提供了一个十分理想的模型,这已成为细胞生物学、细胞社会学、分子生物学、遗传学、基因组学和生物信息学、血液学、肿瘤学、免疫学、放射医学、细胞和组织工程学等领域的研究重点和热点。同时,造血细胞工程所涉及的是一个不均一的细胞群体,在“空间”上存在粒/巨噬细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、T/B 淋巴细胞、NK/NKT 细胞、树突状细胞等各系血细胞,在“时间”上存在原始的造血干细胞、幼稚的造血祖细胞、增生活跃的各系前体细胞、成熟的功能细胞和走向衰老、凋亡的终末细胞,以及处在不同细胞周期的各类细胞。因此,这种“时空”间的差异及其多样性也为人类基因组计划提供了发现新基因和已知基因新功能的理想模型。

参 考 文 献

- [1] Osawa M, Hanada K, Hamada H et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.

- Science, 1996, **273**:242—245.
- [2] To L B, Haylock D N, Simmons P J et al. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*, 1997, **89**:2233—2258.
- [3] Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med*, 1998, **339**:1565—1577.
- [4] Herman P, Ferrant A, de Bruyere M et al. Stromal factors support the expansion of the whole hemopoietic spectrum from bone marrow CD34⁺ DR⁻ cell and of some hemopoietic subsets from CD34⁺ and CD34⁺ DR⁺ cells. *Leukemia*, 1998, **12**:735—745.
- [5] 裴雪涛,王立生,徐黎等. CD34⁺造血祖细胞的定向诱导分化研究. *中华血液学杂志*, 1998, **19**:289—293.
- [6] Albert M L, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 1998, **392**:86—89.
- [7] Salgaller M L, Tjoa B A, Lodge P A et al. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer. *Crit Rev Immunol*, 1998, **18**:109—119.
- [8] Davis B, Saitta F P, Bauer G et al. Targeted transduction of CD34⁺ cells by transdominant negative Rev-expressing retrovirus yields partial anti-HIV protection of progeny macrophages. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**:1197—1207.

ENGINEERING OF HEMATOPOIETIC CELLS: THE BASIC RESEARCH AND ITS CLINICAL APPLICATION

Pei Xuetao

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract Over the last few years, techniques have become available that allow the extensive proliferation and orderly differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells in ex vivo culture systems. The article will discuss the purification, expansion, orderly differentiation, functional activation and gene transfer of hematopoietic stem/progenitor cells. These techniques have now developed to the point at which clinical trials are now underway in a variety of settings for the applications of hematopoietic regulation research, stem cell transplantation, hematopoietic support after high-dose chemotherapy, immunotherapy of cancers, and gene therapy.

Key words hematopoietic stem/progenitor cells, engineering of hematopoietic cells, ex vivo expansion, orderly differentiation, cell therapy, gene therapy

·资料·信息·

中韩基础科学联委会第四次次会议在上海召开

根据国家自然科学基金委员会与韩国科学与工程基金会(KOSEF)签订的协议,中韩基础科学联委会第4次会议于1999年5月17日在上海召开。国家自然科学基金委员会副主任周炳琨院士和随团来访的KOSEF朴唇好主席出席了会议。

中韩基础科学联委会是由中国国家自然科学基金委员会和KOSEF共同组建的,共有12名成员,双方各6名,每方各有一位主席。中方的6名成员分别是数理科学部主任白以龙院士,化学科学部主任张礼和院士,生命科学部主任强伯勤院士,地球科学部主任周秀骥院士,工程与材料科学部主任蔡睿贤院士和信息科学部主任侯朝焕院士。白以龙院士任本次联委会中方主席,朴龙安教授任韩方主席。

在本次会议上,双方共同回顾和评价了1998年度中韩协议的执行情况,对共同资助召开的双边学术研讨会及科学考察团互访等情况进行了总结。经联委会遴选确定了1999年共同资助的12个项目,还讨论了1999年共同资助的双边研讨会的有关事宜。对1998年在韩国召开的,由双方共同重点资助的“第一届东北亚地区环境变化及生物多样性国际研讨会”给予肯定,并就1999年11月将在上海举行“第二届东北亚地区环境变化及生物多样性国际研讨会”达成共识。双方商定,中韩将各出席30名科学家(地球科学和生命科学领域各15名),另邀请日本、俄罗斯、朝鲜等国科学家参加本届国际研讨会。

(国际合作局 张永涛 供稿)