

文章编号: 1001-098X(2000)05-0223-04

## 放射损伤病人的造血干 祖细胞移植研究进展

张占英

(苏州大学流行病学教研室,江苏苏州 215007)

摘要: 随着核能与核技术的发展,以及放射性核素的应用日益广泛,为核战争条件下急性放射病病人以及和平利用原子能中意外核事故受害者的治疗提供及时、有效的造血干 祖细胞移植,是极其重要的研究课题。

关键词: 干 祖细胞; 移植; 放射损伤; 治疗

中图分类号: R811.5

文献标识码: A

凡接受 10Gy 以上内外照射的胃肠型、血管型和脑型急性放射病病人,由于出现多系统的不可逆性损伤而不能存活。低于此剂量时,即处于骨髓型急性放射病的病例,后果主要是感染和出血,用支持疗法和及时给予造血因子以及造血干 祖细胞的移植,可加快病人造血功能恢复,使之存活。

### 1 骨髓移植

多年来,临床上用骨髓移植治疗辐射损伤性疾病、骨髓衰竭、白血病、恶性肿瘤和某些遗传性疾病等,其效果已为世公认。但是,这种移植要求供、受体间人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)必需相合,而人群 HLA 相合概率只有数万分之一,同胞间也只有 1/4 相合,尤其是我国目前多为独生子女,这种相合的 HLA 是很难找到的。1987 年,美国建立了国家骨髓供体规划(National Marrow Donor Program, NMDP)<sup>[1]</sup>,发展了一种可行的骨髓供者登记注册,由于国际间骨髓供体库的彼此合作,相继开展了临床和基础方面对相关和无关供体的骨髓移植研究。到 1997 年 5 月,美国在 NMDP 登记注册的供体已超过 270 万。同时,欧洲也成立了血液和骨髓移植小组(European Blood and Marrow Transplantation group, EBMP),并有 500 多万骨髓供者登记注册<sup>[2]</sup>。尽管如此,使用骨髓移植治疗仍然继续受到限制和障碍,主要是日益增加的 HLA 多态性限制了骨髓库的利用效率。目前所采用的新的高灵敏度的分子生物学技术及序列分型技术,降低

了找到 HLA 完全匹配供体的概率,所获得的混合淋巴细胞培养、细胞毒 T 淋巴细胞前身细胞和辅助 T 淋巴细胞前身细胞的矛盾结果,导致常规使用骨髓库的复杂性<sup>[3-6]</sup>,而使许多患者失去了移植治疗的机会,骨髓移植进行维艰。在切尔诺贝利核电站事故发生后,13 例进行骨髓移植的病人中,9 例移植成功,但是只有 2 例存活,其他 7 人死于烧伤等综合症或骨髓移植并发症,主要是移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)。骨髓移植潜在的负效应减弱了对放射性事故进行骨髓移植探讨的积极性,但由于细胞生物分子学的发展,人们进一步提出用造血生长因子指导完成干细胞的移植。

### 2 外周血和脐血干 祖细胞移植

近来,研究使用动员外周血和脐血代替骨髓作为造血干细胞来源的报道日益增多,它们较骨髓来源的干细胞移植有几种优点,并有希望代替骨髓移植治疗辐射损伤性疾病和恶性肿瘤。结果提示,动员的外周血干细胞(PBSC)中含有比骨髓多 10 倍的 T 淋巴细胞,故有与骨髓移植相类似的急性 GVHD 反应。而脐带血中不仅含有与骨髓和细胞因子动员的外周血中类似浓度的祖细胞,且多能祖细胞的比例较骨髓和外周血中高。脐血中还含有一定比率的正常辅助 T 淋巴细胞和细胞毒 T 淋巴细胞前身细胞,这些前身淋巴细胞由于免疫功能的不成熟,对同种异体抗原反应较弱,特别是脐血的整个 T 淋巴细胞群体的表型是不成熟的,在体外对丝裂原和抗原的反应非常弱,因此脐血造血干细胞移植诱发的 GVHD 要比骨髓和外周血少。脐血作为造血干细胞的来源在实践中有许多优点:(1)脐血造血干细胞和祖细胞可分离、纯化、培养、增殖、液氮低温冻存,至少 15 年不失其特性和临床应用潜能;(2)在正常分娩时无菌采集脐血,不仅方便易取,而且对产妇和新

收稿日期: 1999-08-11

作者简介: 张占英(1957-),女,河北唐县人,苏州大学流行病学教研室副教授,博士。现为复旦大学医学院(原上海医科大学)博士后,主要从事辐射流行病学和毒理流行病学研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970244);国家核工业基金资助项目(Y7197Q6206)

审校者: 苏州大学核医学学院 朱寿彭

生儿均无危险,可以作为干细胞的丰富来源;(3)由于脐血中T淋巴细胞发育不成熟,发生GVHD和移植排斥的可能性小,反应亦较弱;(4)许多病原体在新生儿体内普遍较成人少,传播疾病的危险性小;(5)可以克服人种的差异,为非血缘关系受者骨髓重建的重要来源;(6)能补充恶性肿瘤患者放疗和化疗所造成的血细胞减少及提高抗感染力。

随着外周血和脐血作为代替骨髓造血干细胞来源的进展,必须考虑到是否这些新技术进一步改变对辐射事故处理的策略。学者们提出问题的焦点,在于不同来源的干细胞的质量差异,应该筛选优质的不同类型的移植物。为此,美国和欧洲的一些国家相继建立了脐血库,并进行国际性的脐血注册、登记,希望为无关供体移植物的保存进行国际联网,发展成为一个庞大而种族平衡良好的脐血干细胞库。更有人甚至考虑到储存自己的脐血干祖细胞,为将来需要时用。到目前为止,世界各地的脐血库共计有10 000多个脐血可供利用。为评价脐血移植效果,EBMP组织了欧洲脐血小组(European group),其任务为:①标准化脐血收集、检验和冻存的方法;②研究脐血造血祖细胞和基因移植特性;③研究脐血淋巴细胞的免疫功能;④协调和促进脐血移植时供体和受体的血清和细胞的交流;⑤建立欧洲登记处,登记用脐血治疗的病人和设计原始记录,以比较脐血移植代替传统的血液和骨髓造血干细胞移植。

### 3 脐血干祖细胞体外扩增

1979年有人发现,人类脐血中多能造血祖细胞含量丰富,如粒单系造血祖细胞在脐血中的含量为成人的12~16倍,红系造血祖细胞和其它系的祖细胞含量均高于成人。1981年和1982年Salahuddin和Nakahata等分别用体外技术发现,脐血中的一组单个核细胞具有高度自我更新能力和分化潜能,当时认为是干细胞和祖细胞,但成人骨髓和外周血中未发现这种原始细胞。Broxmeyer等发现,脐血含有纯系产生的(clonogenic)祖细胞,其比率高于成人外周血。随后观察到脐血中含有数目较多的早期和定向祖细胞,集落形成单位-粒单细胞(CFU-GM)数目大大地增加;集落形成单位-粒细胞、红样细胞、单核细胞、巨核细胞(CFU-GEMM)也明显增加,此增殖率与成人外周血相比也显著升高。Ven等人研究证明,脐血中分离的CD<sub>34</sub>干祖细胞经白介素-11(IL-11)加粒细胞集落刺激因子(G-CSF)刺激,培养

14d时比相应的骨髓多扩展80倍,CFU-GM巨核细胞祖细胞(CFU-Meg)亦明显增加。在脐血培养物中对细胞集落形成的观察表明,脐血干细胞的再生群体优势超过成人干细胞,这提示脐血干细胞和祖细胞可能有较高的增殖能力,并且有较高的自我更新能力。目前用造血因子或细胞因子(IL- $\beta$ 、IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF、干细胞因子等)联合培养使造血细胞扩增,已获得一定程度的成功。Piacibello W等<sup>[7]</sup>联合应用两种造血因子络胺酸酶配体和血小板生成素培养脐血中CD<sub>34</sub>细胞,持续6个月以上,可使培养物明显扩增,不断增加所有造血细胞各谱系的祖细胞和其它细胞,CFU-GM的数目可增加200万倍。非常原始的造血祖细胞包括长期传代培养开始的细胞(LTC-1CS)和母细胞集落形成单位(CFU-blast)都大大扩增。

自1989年Gluckman等在上世界上首例以HLA匹配的同胞的脐血造血干细胞代替骨髓移植治疗Fanconi's anemia获得成功以来,目前全世界已进行了600多例相关和无关供体的脐血移植<sup>[8]</sup>,国内亦有病例报道。使用来自相关和无关供体的脐血,在2到3个HLA位点不匹配的情况下移植,大部分病人没有严重的GVHD发生,移植后已随访1~2年,供体的移植物在受体内以多细胞系列而持久地存在,用脐血细胞治疗儿童疾病目前已被公认。脐血细胞移植提供一种日益令人感兴趣的离体培养方法,使干细胞扩增,扩增的干祖细胞数目足够用于成人,已进入临床应用。

Frickhofen等报道,用造血干细胞治疗放射事故的受害者与治疗白血病患者不同:白血病患者移植干细胞是以移植物永久地代替宿主造血细胞和免疫系统为目的,根除白血病干细胞,建立对任何残留肿瘤细胞的免疫控制机制;而对放射事故的受害者来说,没有必要取代病人的造血干细胞和免疫系统,相信某些造血干细胞能耐受任何剂量的辐射而存活,然而重要的是所有的病人都有希望最终能从骨髓障碍中恢复。自身恢复事实已经在切尔诺贝利核事故后进行同种异体移植的存活者中观察到,在骨髓衰竭和进行同种异体骨髓或肝移植之后混合型嵌合体并非罕见<sup>[9]</sup>,故认为放射事故后,在确定辐射损伤和核事故受害者的造血干细胞和祖细胞严重缺乏时,给病人移植造血干细胞是最好的策略,因为病人恢复自身骨髓和免疫功能需要一定的时间,在此期间内必需使病人免于遭受各类血细胞减少所造成的

恶果,暂时性移植脐血来源的同种异体的造血细胞是合适的。输入脐血可增加病人的免疫力,抗感染并提高造血功能。目前通过体外培养库存的或新鲜的同种异体的脐血干细胞,可以制备暂时性移植,移植给病人就达到了治疗目的。对于核事故受害者,出现多种血细胞减少预料要死亡的病人,细胞因子动员的外周血细胞可能也是可选择的干细胞来源。然而,因其含有大量成熟T细胞,GVHD反应较重,应小心控制。在有脐血库的情况下,及时移植脐血干细胞最为理想,因为最初由T细胞介入的GVHD是同种异体骨髓移植后引起发病和死亡的原因之一。接受HLA相配骨髓移植的病人,不管移植后是否应用免疫抑制剂,大约有一半人发生急性GVHD。与此相反,应用HLA相配脐血儿童的同胞间移植是以低到测不到GVHD为特征的。此外,在第一例报告中,使用一部分HLA位点不匹配的脐血,也限制GVHD的发生。

#### 4 脐血干细胞低温保存

脐血造血干细胞的诱人之处还在于可长期低温储存,并完全保持产品的特征,应用时可立即获取。Kobylka P等<sup>[10]</sup>研究了低温保存15年的脐血细胞其免疫学特性和克隆形成潜能的变化:他们分别用18份冻存2~8周的脐血和8份冻存15年的脐血检测其存活率、回收率、CFU-GM克隆形成能力和T细胞对HLA异体抗原的反应活性,发现长期冻存的脐血中低密度部分单个核细胞的回收率平均为80%(范围从64%~92%),而且没有观察到对长期冻存的脐血T淋巴细胞增殖能力和细胞毒能力的损伤效应,说明长期冻存的脐血细胞保持了其克隆形成潜能,随时可供骨髓重建病人使用。Lu等<sup>[11]</sup>用动物存活率研究了冷藏后的脐血多潜能祖细胞的功能性能力:他们将新鲜脐血放置4℃,分别于第1天和第21天加各种生长因子作克隆形成试验,再将所形成的克隆注射给受致死剂量照射的不同种类的小鼠,其中SJL/J小鼠50d的存活率为54%,ACB/C小鼠为100%。说明储存后的脐血多潜能祖细胞具有临床应用潜能。

总之,随着脐血造血干细胞冻存方法的不断改进,使建立大规模的脐血库成为可能。这将为辐射损

伤性病人的治疗提供广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Cairo MS and Wangner JE, et al. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation [J]. *Blood*, 1997, 90(12): 4665-4678.
- [2] Gluckman E, Rocha V, Chastang C, et al. European results of unrelated cord blood transplants [J]. *Bone Marrow Transplantat*, 1998, 21: S87-91.
- [3] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al. Definition of HLA-DQ as a transplantation antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15358-15363.
- [4] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al. Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors [J]. *Blood*, 1997, 89: 1818-1823.
- [5] Hansen JA, Petersdorf EW, Martin PJ, et al. Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors [J]. *Immunol Rev*, 1997, 157: 141-152.
- [6] Madrigal JA, Scott I, Arguello R, et al. Factors influencing the outcome of bone marrow transplants using unrelated donors [J]. *Immunol Rev*, 1997, 157: 153-166.
- [7] Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from Cord Blood [J]. *Blood*, 1997, 89(8): 2644-2653.
- [8] Rocha V, Chastang CI, Souillet G, et al. Related cord blood transplants: the Emocord experience from 78 transplants [J]. *Bone Marrow Transplantat*, 1998, 21(30): 59-62.
- [9] Frickhofen N, Korbiling M, Flieder TM. Is blood a better source of allogeneic stem cells hematopoietic stem cells after radioation accidents? [J]. *Blood Marrow Transplantat*, 1996, 17: 131-135.
- [10] Kobylka P, Ivanyi P, Vriesendorp BS. Preservation of immunological and colonyforming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells [J]. *Transplantation*, 1998, 65(9): 1275-1278.
- [11] Lu S, Ende N. Potential for clinical use of viable pluripotent progenitor cells in blood bank stored human umbilical cord blood [J]. *Life Sci*, 1997, 61(12): 1113-1123.

# Research development of hematopoietic stem/progenitor cells transplantation for the patients injured by radiation

Zhang Zhan-ying

(Department of epidemiology in Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215007, China)

**Abstract** With the development of nuclear energy and nuclear technology and with using radio nuclide widely, it is an much more important project to provide hematopoietic stem/progenitor cells transplantation timely and efficiently for the patients with acute radiation sickness and for treatment of victims of radiation accidents.

**Key words** stem/progenitor cells; transplantation; radiation injury; treatment

文章编号: 1001-098X(2000)05-0226-05

## 电离辐射诱发的基因组不稳定性与辐射致癌

王仲文

(中国辐射防护研究院,山西太原 030006)

**摘要:** 电离辐射诱发的基因组不稳定性在哺乳动物细胞和体内广泛的存在,使受照的细胞子代增加了遗传变化的频率。在辐射诱发小鼠白血病中,受预照射的 CBA/H 小鼠本身的白血病发生率与对照组相比并不显著,但子代小鼠中受  $\gamma$  射线照射后与单独受到  $\gamma$  射线照射的小鼠相比,白血病的潜伏期缩短,发病率增高。辐射诱发的基因组不稳定性可能使整基因组处于临界突变状态。随着基因组不稳定性过程使细胞内一些关键的基因(如癌基因活化,抑癌基因失活)突变,癌症发生。因此,基因组不稳定性在癌症的起始过程中作为一个关键的早期事件,可能起着特殊的,也许是独特的作用。

**关键词:** 辐射; 基因组不稳定性; 微卫星序列; p53

**中图分类号:** Q345 **文献标识码:** A

### 1 引言

长期以来一直认为,在哺乳动物细胞中,辐射的重要生物学效应如染色体畸变、突变和细胞死亡是 DNA 损伤的直接结果<sup>[1]</sup>。许多研究已显示,这个概念正在发生着变化,辐射可能诱发一个基因组不稳定性过程,它们可传递到细胞复制的子代中,并在细胞复制许多代后继续影响受照射细胞的遗传效应。这样,最终的遗传变化在受照细胞本身并未发生,但照射已使细胞处于一个临界状态,使子代细胞中突变频率增加,并表现出遗传学变化。

这种可传递的基因组不稳定性类型在受照的细胞子代中是多种形式的,如增加突变频率,滞后性

繁殖的细胞死亡及增加染色体重排的频率。一些形式的表达如滞后性繁殖的细胞死亡在 30 多年前已有描述,但只是在近年来才引起人们的注意<sup>[2]</sup>。这主要是基因组的不稳定性可能与辐射致癌相联。如果基因的不稳定性过程发生在体内,对辐射致癌的机制可能有非常重要的意义。长期以来一直假设,辐射致癌的起因是包含了一个关键癌基因或肿瘤抑制基因的突变。在细胞群体中,这个突变的发生是非常低的,大多数癌症的起始是克隆型的。然而,最近的证据表明,这个细胞的子代要完全形成恶性肿瘤必须累积 6 至 8 个分别不同基因的突变。这样就产生了一个问题:如果这些突变的发生是各自的,并且频率很低,那么单个细胞是如何在它的寿命期累积到这些所有的突变?如果照射诱发了一个基因组不稳定性的传递过程,这将引起一个持久的、基因组范围内的突变频率的增加。最近越来越多的资料支持这个观点<sup>[1]</sup>。现就电离辐射诱导基因组不稳定性与辐射致癌的最新研究进展简述如下。

收稿日期: 2000-03-07

作者简介: 王仲文(1962-),男,中国辐射防护研究院副研究员,主要从事辐射生物效应的研究。

基金项目: 核工业科学基金资助项目( J96Q61008)

审校者: 中国辐射防护研究院 张连珍