

·综述·

胎肝造血前体细胞特征及其临床应用的研究进展

罗长缨 综述, 顾龙君 审校

(上海第二医科大学附属新华医院/上海儿童医学中心, 上海 200127)

[中图分类号] R318.11 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2003)05-0494-04

肝脏是胎儿时期的主要造血器官, 鼠胚胎 12~15 d^[1,2] 和人胚胎 6 周至 4 月是肝脏造血活跃期。在个体发育阶段上, 胎肝造血干细胞(HSCs)较骨髓造血干细胞原始; 从生理需求角度讲, 骨髓 HSCs 的功能是维持终生造血稳定, 其分裂采取群体不对称方式, 因此骨髓 HSCs 数目在人体内保持恒定。而胎肝造血是处于由胚胎造血系统分化形成转向为胎儿日益扩张的循环容量和氧需提供足够红细胞的过渡时期, 因此, 胎肝 HSCs 有一个对称分裂以增加自身数目的性能和过程, 以便为终生造血稳定提供足够的干细胞贮备^[1,3,4]。因此可以推测, 胎肝造血前体细胞在增殖潜力、多系分化和自我更新能力方面应该比骨髓相应细胞更具优势。本文就近年有关胎肝造血前体细胞生物学特征及其临床应用方面的进展作一综述。

1 胎肝造血前体细胞的生物学特征

迄今为止, 还没有一种能特异性鉴定 HSCs 的抗原或核酸标记; 各种体外培养只能检测细胞的短期增殖能力, 而且一般限于髓系集落的培养, 而 HSCs 的关键特征在于长期自我更新(一般>6 月)和多系分化的性能。目前能可靠鉴定 HSCs 的方法是受体内长期多系造血重建活性(LTRA)的测定^[5]。

1.1 小鼠胎肝造血前体细胞的生物学特征

1.1.1 免疫表型 胎肝 HSCs 和骨髓 HSCs 除拥有共同标记 Sca-1⁺ c-kit⁺ WGA⁺ Lin⁻外, 骨髓 HSCs 表现为 AA4.1⁻ Mac-1⁻ CD45RB⁻ Rh123^{dull}, 低度侧向散射光强度(SSC); 而胎肝 HSCs 为 AA4.1⁺ Mac-1⁺ CD45RB⁺ Rh123^{bright}, 中等 SSC^[1,5,6]。

1.1.2 增殖动力学 胚胎 12~15 d 的胎肝中, 25%具长期造血重建活性的 HSCs(LTR-HSCs)为 >2nDNA 细胞。而骨髓的 LTR-HSCs 中仅 4%为

>2nDNA 细胞^[1]。高增殖潜能集落生成细胞(HPP-CFC)含量在胚胎 15 d 胎肝、新生鼠肝和骨髓分别为(103±8)、(50±2)、(87±7)/10⁵ 单个核细胞, 其中 S 期细胞比例分别为(53±3)%、(28±0.4)%、(10±1)%^[7]。

1.1.3 长期造血重建功能 HPP-CFC 和长期培养起始细胞(LTC-IC)等早期祖细胞因其可能直接从 HSCs 分裂而来, 其数量可相对反映该造血组织所含的 HSCs 量。体内竞争重建能力检测是近年更常用的检测 HSCs 定量和功能的方法。将待检供体细胞和 10⁵ 新鲜骨髓细胞一同植入受致死量辐射的受体内。供体细胞、骨髓细胞和受体三者遗传背景相同, 但供体带有一特殊供检测的标记。骨髓细胞的作用是提供辐射保护和作为竞争参照标准, 即 10⁵ 的新鲜骨髓细胞在受体内所产生的 LTRA 定为一个重建单位(RU)。测定带有供体细胞特异标记并包括髓淋两系的子代细胞百分比, 再除以参照物的子代细胞百分比, 就能获得供体细胞的 RU 含量。细胞数相同的胎肝 LTRA 相当于骨髓的 3.7~4.9 倍^[5]。Rebel^[8] 用不同稀释剂量的待测供体细胞(Ly 5.1) - 分别来自胚胎 14.5 d 胎肝和成年骨髓 - 与 10⁵ 受体表型(Ly 5.2)相同的骨髓细胞一起输入受体的 Ly 5.2 鼠内。在移植后不同时间点通过 Ly 抗原系统检测受体外周血白细胞中的 Ly 5.1 型细胞, 可以分析供体竞争重建单位(CRU)的重建动力学。阳性受体的标准为外周血有核细胞中 Ly 5.1 等细胞比例超过 1%, 且利用散射光性质证明其中含有髓/淋两系的细胞。然后用 Poisson 统计法由阴性受体的百分比算出待测细胞群体中的 CRU 含量。结果显示: ① 移植后第 4 周胎肝和骨髓供体重建水平无明显差异; 第 8 和第 16 周, 胎肝移植小鼠外周血的供体型白细胞比例显著高于骨髓移植受体。供体

[收稿日期] 2002-12-04; [修回日期] 2003-04-08

[作者简介] 罗长缨(1970-), 女, 硕士, 主治医师。主攻方向: 造血干细胞移植。

细胞比例随时间呈上升趋势的受体比例在胎肝移植为80%,在骨髓移植者为35%。②将初级受体骨髓再输入次级受体,13组对照实验中,胎肝移植的次级受体中11组为阳性重建,而骨髓仅4组为阳性重建。表明胎肝CRU在体内不仅有高增殖能力,还能产生更多的后代CRU,即表现更强的自我更新能力。

1.2 人胎肝造血前体细胞的生物学特征

1.2.1 人胎肝造血细胞定量 人胚胎12~17周,每份胎肝约含 $3.0 \sim 34.6 \times 10^6$ CD34⁺细胞^[9]。16~24周胎肝内造血前体数量已基本稳定,每份胎肝平均含 1.3×10^8 CD34⁺细胞,各种集落形成细胞(CFC)总数为 $4.1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^7$ ^[10]。根据此结果,16周以后的单份胎肝才能提供足够移植的前体细胞数。但胎肝前体细胞上的HLA-A、B、C和DR相关抗原表达随胎龄的增加而加强^[11];13周后胎肝开始出现TCR α β ⁺ CD8⁺ T细胞,此T细胞能与同种异体HLA I类分子强烈反应^[12],提示13周以后胎肝细胞对受体的排斥可能增加。

Lansdorp等^[13]将10~16周胎肝、脐血和骨髓CD34⁺细胞在SF、IL-3、IL-6、Epo组合的无血清液体培养基中培养5周,骨髓CD34⁺细胞数无扩增,脐血和胎肝CD34⁺细胞则分别扩增了31~250倍和490~3200倍。以此扩增能力,可获得 10^9 胎肝CD34⁺细胞。因此通过体外扩增,可能获取足够供移植所需的低免疫反应性人早期胎肝造血细胞。

1.2.2 人胎肝HSC的表型和功能特点 Roy等^[14]对7~14周胎肝HSCs和成人骨髓HSCs免疫表型和集落形成情况比较分析后发现骨髓的LTC-IC主要集中于CD34⁺ CD38⁻ HLA-DR⁻细胞,而胎肝的LTC-IC主要集中于CD34⁺ CD38⁻ HLA-DR⁺细胞。另一项研究表明脐血的LTC-IC平均分布在HLA-DR⁺和HLA-DR⁻群体中,提示HLA-DR表达随发育而下调。其原因可能为:①HLA-DR抗原能激活T细胞,再反馈抑制过度造血而维持成年的造血稳定。胚胎20周前的胎肝中T细胞少且不成熟,无法抑制HLA-DR⁺细胞的增殖;②慢粒病人的LTC-IC也表达HLA-DR,推测HLA-DR的表达可能代表了一种细胞的高增殖状态^[14,15]。

Nicolini等^[16]用体外集落培养分析比较人胎肝、脐血和骨髓造血细胞量及其在体内的重建功能显示:①三种标本中,胎肝各型CFCs生成都较另两者高,胎肝的髓系混合集落形成单位(CFU-GEMM)分别是脐血和骨髓的60和250倍,爆式红系集落形成单位/红系集落形成单位(BFU-E/

CFU-E)和粒单核系集落形成单位(CFU-GM)分别是后者的50和100倍,巨粒系集落形成单位(CFU-MK)是后者3倍。②胎肝中LTC-IC含量约为 $(7.6 \pm 1.7)/10^5$ 单个粒细胞,是骨髓中的两倍。胎肝重建受体骨髓内的LTC-IC数量也显著高于脐血和骨髓。③胎肝造血前体对Epo有很高的敏感性。人胎肝细胞在小鼠体内能形成高水平的红系终末造血,而骨髓细胞必须在给予外源性人Epo才能形成相当的红系终末造血。

Holyoake等^[17]用与上述小鼠CRU类似方法定量比较人胎肝、脐血和骨髓HSCs在NOD/SCID小鼠体内的重建功能。他用CD34⁻ CD19/20⁺和CD45/71⁺ CD15/66b⁺分别检测受体骨髓的B系和髓系细胞,两系均有细胞超过5个/ 2×10^4 受体骨髓细胞为阳性重建受体。结果显示:①单位CRU生成的平均细胞总数以脐血最多,骨髓次之,胎肝最少。②成熟淋系和髓系后代细胞生成量由多到少依次为脐血、骨髓和胎肝;成熟红系后代产量依次为胎肝、脐血和骨髓。巨核系数三者相当。③3种标本所产生的后代CD34⁺细胞和CFC总数无显著差异,但胎肝产生的原始前体最多,其CD34⁺ CD38⁻细胞分别为脐血和骨髓的6倍和30倍,LTC-IC分别是后二者的7倍和300倍。④连续移植实验显示:给脐血移植的初级受体注射SF、IL-3、GM-CSF和Epo,可增加其骨髓中的CRU数,提高次级受体的重建率;骨髓移植的初次受体无论接受生长因子与否,其次级受体中都无法再测出人CRU重建的细胞;而胎肝移植受体无论是否给生长因子,都能在次级受体形成很高的重建水平,并且其中部分(15个初级受体中的3个)进一步重建第三受体淋/髓两系的造血。

2 胎肝造血干细胞移植的临床应用

2.1 造血重建

移植物的植入水平不仅取决于移植植物中干/祖细胞的含量,还取决于细胞的归巢能力。而成功重建受体的造血功能除要求供体细胞具有强大增殖能力外必须具备相当的自我更新能力,才可能达到长期稳定造血。虽然大多实验都显示小鼠和人的胎肝HSC的移植性能较骨髓和脐血更优。但是临床利用胎肝细胞移植代替骨髓移植或脐带血移植进行造血重建的效果却不如意。胎肝移植植入慢^[18],病原体污染率较高^[19],缓解率低而复发率高^[20]。刘海川等^[20]对112例白血病和恶性肿瘤患者进行自体

(ABMT)、净化 ABMT、自体外周血干细胞移植(PB-SCT)、异体骨髓移植和胎肝细胞移植(FLT),统计其3年的无病生存率和复发率分别为68.3%, 67.6%, 69.5%, 57.1%, 33.3%和30.8%, 26.8%, 20.1%, 13.0%, 62.5%。Kochupillai 等^[18]在对41例再障FLT中,仅40%患者获得缓慢而不完全的造血改善,生存率1年占52%,5年37%。治疗有效者在缓解的3~20月中,HbF上升0%~15.7%(平均3.5%)。1例生存>1年患者继发急性未分化白血病。

2.2 免疫重建和宫内移植

Touraine 等^[21]对63例免疫缺陷(IDD)和先天代谢疾病(IEM)进行生后FLT,67%的患儿获得治愈或明显改善,嵌合状态维持长达20年。之后他们又进行了6例宫内FLT,其中3例已4岁,2例为IDD,免疫重建良好,1例为 β 地中海贫血,不能完全脱离输血。1例Nieman-Pick病,有植入证据,但仍出现神经系统的症状。其余2例分别是地中海贫血和慢性肉芽肿病,均因FLT后心动过缓而死于胎内。宫内移植的供受双方均处于免疫不成熟状态,既避免了生后移植所需的预处理,又利于长期嵌合状态的形成;母体子宫提供了天然的隔离环境;还降低了生后疾病症状出现的和由此所需的花费。Flake 等^[22]对既往报道的26例宫内移植总结后认为尽管宫内移植有上述优点,但临床的结果并不很理想。供体细胞的植入水平首先取决于供体细胞相对于受体细胞的竞争优势,即受体某一系前体细胞功能缺陷。目前宫内移植效果最肯定的是重症联合免疫缺陷(SCID),受体淋系造血完全来自供体,供体髓系虽然也能测到,但明显不如淋系。其次才是供体移植中的HSC含量。因此,最适合宫内移植的疾病包括两大类:①供体细胞在竞争重建功能上具有相对优势,如SCID, Wiskot-Aldrich综合征, Fanconi贫血和Bloom综合征等。②只需低水平的植入就能改善症状的,如高IgM综合征,慢性肉芽肿病。最不适合做宫内移植的是那些有神经系统表现的先天性代谢疾病。一方面这些疾病需要大量的供体细胞植入产生足量的酶才能纠正其症状,而胎儿不能耐受过度的细胞输注。另一方面,尽管已有报道能诱导骨髓干细胞转分化成神经胶质细胞,但这些细胞在体内何时分化并迁入中枢尚不得而知。时间过晚,血脑屏障成熟,即使有很高的植入,也无法使神经系统获得足量有效的酶以改善症状。

2.3 基因治疗

要求被导入外源基因的细胞具有长期的自我更新维持能力,还要求这些细胞多处于增殖期以便于

病毒的转入。骨髓HSC多为静止期细胞,胎肝HSC则具有较大比例的增殖期细胞。目前,利用HSCs进行基因治疗尚处于初步实验阶段。有报道将携有绿色荧光蛋白(GFP)和 β 珠蛋白基因的逆转录病毒感染人胎肝HSCs和脐血HSCs。体外集落形成分析显示35%~55%的CFCs呈GFP⁺。将此HSC植入SCID鼠后6周,子代细胞中15%显示GFP⁺,并且GFP⁺的淋/髓/红系细胞数量之间显著相关,说明具有多系重建功能的HSC被成功感染^[23]。

[参 考 文 献]

- [1] Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(22): 10302-10306.
- [2] Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 35-71.
- [3] Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo [J]. *Blood*, 2000, 95(7): 2284-2291.
- [4] Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture [J]. *Blood*, 1999, 94(7): 2161-2168.
- [5] Jordan CT, Aistle CM, Zawadzki J, Mackarehstschian K, Lemischka IR, Harrison DE. Long-term repopulating abilities of enriched fetal liver stem cells measured by competitive repopulation [J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(9): 1011-1015.
- [6] Rebel VI, Miller CL, Thornbury GR, Dragowska WH, Eaves CJ, Lansdorp PM. A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse [J]. *Exp Hematol*, 1996, 24(5): 638-648.
- [7] Blair A, Thomas DB. The proliferative status of haematopoietic progenitor cells in the developing murine liver and adult bone marrow [J]. *J Anat*, 1998, 193(Pt 3): 443-449.
- [8] Rebel VI, Miller CL, Eaves CJ, Lansdorp PM. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts [J]. *Blood*, 1996, 87(8): 3500-3507.
- [9] Zwicky C, Gerber S, Gasparini D, Forestier F, Hohlfield P, Tisot JD, et al. Preparation and analysis of fetal liver extracts [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 26(6): 667-671.
- [10] Golfier F, Barcena A, Cruz J, Harrison M, Muench M. Mid-trimester fetal livers are a rich source of CD34⁺/++ cells for transplantation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 24(5): 451-461.
- [11] Phan DT, Benczur M, Paloczi K, Mihalik R, Kotlan B, Gidali J, et al. Early expression of histocompatibility class I, class II and myeloid antigens on human fetal liver cells [J]. *Thymus*, 1990, 16(2): 123-129.
- [12] Renda MC, Fecarotta E, Dieli F, Markling L, Westgren M, Damiani G, et al. Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal

- liver; implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 25(2): 135-141.
- [13] Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny - related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells [J]. J Exp Med, 1993, 178(3): 787-791.
- [14] Roy V, Miller JS, Verfaillie CM. Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver [J]. Exp Hematol, 1997, 25(5): 387-394.
- [15] Traycoff CM, Abboud MR. Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells [J]. Exp Hematol, 1994, 22(2): 215-222.
- [16] Nicolini FE, Holyoake TL, Cashman JD, Chu PP, Lambie K, Eaves CJ. Unique differentiation programs of human fetal liver stem cells shown both in vitro and in vivo in NOD/SCID mice [J]. Blood, 1999, 94(8): 2686-2695.
- [17] Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow [J]. Exp Hematol, 1999, 27(9): 1418-1427.
- [18] Kochupillai V, Sharma S, Sundaram KR, Ahuja RK. Hemopoietic improvement following fetal liver infusion in aplastic anemia [J]. Eur J Haematol, 1991, 47(5): 319-325.
- [19] Rice HE, Hedrick MH, Flake AW, Donegan E, Harrison MR. Bacterial and fungal contamination of human fetal liver collected transvaginally for hematopoietic stem cell transplantation [J]. Fetal Diagn Ther, 1993, 8(2): 74-78.
- [20] 刘海川,姚善谦,楼方定,彭云,王连元,周绮,等.造血干细胞移植治疗白血病及其他恶性肿瘤 112 例临床研究 [J]. 白血病, 1996, 5(2): 70-73.
- [21] Touraine JL, Raudrant D, Laplace S. Transplantation of hemopoietic cells from the fetal liver to treat patients with congenital diseases postnatally or prenatally [J]. Transplant Proc, 1997, 29(1-2): 712-714.
- [22] Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers [J]. Blood, 1999, 94(7): 2179-2191.
- [23] Nicolini FE, Imren S, Oh IH, Humphries RK, Leboulch P, Fabry ME, et al. Expression of a human beta-globin transgene in erythroid cells derived from retrovirally transduced transplantable human fetal liver and cord blood cells [J]. Blood, 2002, 100(4): 1257-1264.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 493 页)

- [4] Berseth CL, Nordyke C. Enteral nutrients promote postnatal maturation of intestinal motor activity in preterm infants [J]. Am J Physiol, 1993, 264(6 Pt 1): G1046-1051.
- [5] 李振彪,吴圣楣,蔡威.新生儿胃肠道生长发育研究进展 [J]. 国外医学儿科学分册, 2000, 27(1): 9-13.
- [6] Moore FA, Feliciano DV, Andrassy RJ, McArdle AH, Booth FV, Morgenstein-Wagner TB, et al. Early enteral feeding, compared with parenteral, reduces postoperative septic complications. The results of a meta-analysis [J]. Ann Surg, 1992, 216(2): 172-183.
- [7] Liang J, Co E, Zhang M, Pineda J, Chen JD. Development of gastric slow waves in preterm infants measured by electrogastrography [J]. Am J Physiol, 1998, 274(3 Pt 1): G503-508.
- [8] Baker JH, Berseth CL. Duodenal motor responses in preterm infants fed formula with varying concentrations and rates of infusion [J]. Pediatr Res, 1997, 42(5): 618-622.
- [9] Jadcherla SR, Berseth CL. Acute and chronic intestinal motor activity responses to two infant formulas [J]. Pediatrics, 1995, 96(2 Pt 1): 331-335.
- [10] de Ville K, Knapp E, Al-Tawil Y, Berseth CL. Slow infusion feedings enhance duodenal motor responses and gastric emptying in preterm infants [J]. Am J Clin Nutr, 1998, 68(1): 103-108.
- [11] 芦惠,薛辛东,张家骥,李蓬,江红.早产儿间断鼻十二指肠喂养和鼻胃管喂养的对照研究 [J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(4): 206-209.
- [12] Riezzo G, Indrio F, Montagna O, Tripaldi C, Laforgia N, Chiloio M, et al. Gastric electrical activity and gastric emptying in term and preterm newborns [J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12(3): 223-229.
- [13] Bernardini S, Semama D, Huot F. Effects of cisapride on QTc interval in neonates [J]. Arch Dis Child, 1997, 77(3): F241-F243.
- [14] Costalos C, Gounaris A, Varhalama E, Kokori F, Alexiou N, Katsarakis I. Effect of low-dose cisapride on gastric emptying and QTc interval in preterm infants [J]. Acta Paediatr, 2000, 89(12): 1446-1448.
- [15] 陈燕萍,邵肖梅,曾纪骅,季志英.新生儿期胃食管反流的检测与治疗 [J]. 中华儿科杂志, 1994, 32(6): 355-356.
- [16] Ng E, Shah V. Erythromycin for feeding intolerance in preterm infants [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2001(2): CD001815.
- [17] Oei J, Lui K. A Placebo-controlled trial of low-dose erythromycin to promote feed tolerance in preterm infants [J]. Acta Paediatr, 2001, 90(8): 904-908.
- [18] Ng PC, So KW, Fung KS, Lee CH, Fok TF, Wong E, et al. Randomised controlled study of oral erythromycin for treatment of gastrointestinal dysmotility in preterm infants [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2001, 84(3): F177-182.
- [19] Shulman RJ. Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: a pilot study [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2002, 86(2): F131-133.
- [20] 朱翠平,谢宗德,马祖祥.新生儿胃肠道疾病临床分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(1): 43-45.
- [21] 张跃娟.不同卧位对早产儿胃肠蠕动功能的影响 [J]. 中华护理杂志, 2001, 36(2): 91.
- [22] 高玉先,张葆荣,李春艳.早产儿、低出生体重儿喂养方式与体重增长关系的探讨 [J]. 护士进修杂志, 2002, 17(9): 652-653.

(本文编辑:吉耕中)