

骨髓造血微环境与基质细胞的基因治疗

Hematopoietic Microenvironment of the Bone Marrow and Gene Therapy of Stromal Cells

秦凤华

(北京医科大学免疫学系, 博士研究生 北京 100083)

谢蜀生

(北京医科大学免疫学系, 教授 北京 100083)

造血干细胞是所有免疫细胞和血细胞的来源, 而造血微环境是造血干细胞增殖、发育和分化的场所, 对造血干细胞发育为成熟血细胞起重要的调节作用。造血微环境(Hematopoietic Microenvironment, HME)的概念 1970 年首先由坦廷(Tentin)提出, 当时认为它由骨髓中微血管系统、神经、网状细胞、细胞外基质及纤维组织等构成, 对造血干细胞的分化成熟起调节作用。以后的研究证明, 微环境中的基质细胞(Stromal Cell, SC)及一些造血刺激因子是造血微环境的主要成份。1977 年德克斯特(Dexter)建立了体外长期骨髓细胞培养系统(Long-Term Bone Marrow Cultures, LTBM), 使造血干细胞在体外骨髓基质细胞(Bone Marrow Stromal Cell, BMSC)层中可长期存活并增殖、分化为各系血细胞, 直接证明了由基质细胞组成的造血微环境对造血干细胞(Hematopoietic Stem Cell, HSC)自我更新和分化的重要作用。Dexter 培养法的建立是现代血液学研究技术的重大进展, 极大地促进了血液学的发展。近年来, 对骨髓造血微环境, 尤其是基质细胞的研究取得了许多重要的进展。本文综述这方面的概况, 并对其可能的应用前景进行介绍。

一、基质细胞的来源及其增殖分化

基质细胞是一个异质细胞群, 由纤维母细胞、内皮细胞、前脂肪细胞、脂肪细胞和巨噬细胞等组成。其中除巨噬细胞(Macrophage, $M\Phi$)来源于造血干细胞外, 其余几种基质细胞的来源长期以来一直不明确。

以往认为骨髓基质细胞都是胚胎发育过程中形成的固有结缔组织细胞。1970 年, 费里登施泰因(Friedenstein)等将骨髓细胞悬液在体外培养, 发现可形成纤维母细胞集落, 每个集落都来自单个纤维母细胞集落形成细胞, 或称纤维母细胞集落形成单位(Fibroblastic Colony-Forming Unit, CFU-F)。随后他们

进行 CFU-F 琼脂集落培养, 16~30 天后切下每个集落, 检查表明集落中有脂肪细胞、纤维母细胞、内皮样细胞, 证明基质细胞前体具有多向分化能力。移植到同系小鼠肾被膜下, 发现其中 15% 的 CFU-F 集落既能形成骨组织, 又能形成各种基质细胞。15% 的集落只能形成骨组织, 其余集落形成疏松结缔组织或不形成组织。因此推测存在多能基质细胞(Multi-Potential Stromal Cell, MPSC), 又称基质干细胞(Stromal Stem Cell, SSC), 它们既可以向各系基质细胞分化, 又可以向成骨细胞方向分化, 形成骨组织。为分离这种干细胞, 90 年代起, 对基质干/祖细胞的表面标志开始进行了许多研究。1991 年西蒙斯(Simmons)等用抗 CD34 分子和大豆凝集素 SBA 的 McAb 分析 CFU-F 时发现, 其中 95% 以上的细胞是 $CD34^+/SBA^+$, 而造血细胞则是 $CD34^+/SBA^-$ 。但具有 $CD34^+/SBA^+$ 表面标记的细胞本身仍是异质的。因此, 虽然在体内外从功能上都已证明了基质干细胞的存在, 但目前分离基质干细胞还很困难。主要问题是, 这些细胞缺乏独特的形态学特征和足够的表面标志; 培养时倾向于快速分化, 产生异质细胞。基质干细胞研究的最终突破仍需找到并分离这种既具有自身更新(renew)能力又具有多向分化能力的细胞。

大量研究表明, 基质细胞的增殖分化主要受细胞因子的调节。体外研究证明, 当用 IL-3、纤维母细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)刺激原代基质细胞时, CFU-F 克隆数增加。福岛(Fukushima)等发现, 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)可刺激造血基质细胞增殖, 向这些增殖的基质细胞(命名为 CF-1)中转入 β -半乳糖苷酶基因作为标记, 然后与骨髓细胞一起移植到辐射小鼠体内。结果在 CFU-S 脾结节中, 标记的 CF-1 细胞周围有许多粒细胞生成。生理情况下, 小鼠脾脏经常有红细胞生成, 但并不生成粒细胞。上述结果说明, 此时生成的粒细胞是由于 CF-1 细胞的作用, G-CSF 刺激增殖的基质细胞可特

异性刺激造血细胞的增殖。临床研究表明,肿瘤化疗后的病人用 IL-3 和 GM-CSF 治疗,不但可刺激造血细胞增殖,而且也刺激基质细胞增殖。

某些细胞因子可调节基质细胞的功能,使其产生不同的细胞因子,发挥不同的作用。IL-1 和 TNF 可刺激基质细胞产生 GM-CSF、G-CSF、IL-6、干细胞因子(SCF)和白血病抑制因子(LIF)。转化生长因子 β (TGF- β)可刺激基质细胞产生 LIF。 α 干扰素(IFN- α)可增强骨髓基质细胞结合慢性髓性白血病(CML)祖细胞的能力。某些细胞因子还可调节基质细胞表达粘附分子。IL-1 β 、TNF- α 和 IL-4 能上调基质细胞上粘附分子 VCAM-1 的表达,IL-1 β 能上调 ICAM-1 的表达,因此这些细胞因子可促进基质细胞与造血细胞之间的相互作用。某些因子对基质细胞的功能起负调节作用,如 IL-1 β 和 TGF- β 能抑制 H1/A 基质细胞系或原代骨髓培养中的前脂肪细胞向脂肪细胞转化。TGF- β 抑制 VCAM-1 的表达。IL-1 抑制基质细胞之间通过直接接触进行的信息传递。细胞因子对基质细胞的正负调节作用使基质细胞维持正常的造血功能。目前,决定基质干细胞向造血基质细胞还是向成骨细胞分化的细胞因子还没有确定,基质干细胞是随机分化还是受某些确定因子的作用定向分化的问题尚需进一步研究。

二、参与造血干/祖细胞与基质细胞相互作用的粘附分子

基质细胞与造血细胞的紧密接触是促进造血细胞分化的重要条件。研究表明粘附分子是造血细胞粘附到基质细胞上的主要细胞表面分子。下面介绍参与这个过程的 4 种主要的膜分子。

1. 归巢受体(homing receptor)。造血细胞之所以能够定居到骨髓(归巢)是由于细胞间相互作用的结果。归巢受体存在于造血干细胞上,是 110-KDa 的蛋白质。它是介导造血干细胞定居骨髓的重要表面分子。通过这个分子的识别作用,循环中的造血细胞或祖细胞(包括骨髓移植中供者的骨髓细胞)能选择性地定居在造血微环境中。这种识别是靠造血细胞上该受体与基质细胞上的糖结合配基中的半乳糖和甘露糖残基结合而达到的。这个识别系统是骨髓所特有的。塔瓦索利(Tavassoli)等证明半乳糖苷和甘露糖苷能抑制干细胞回到骨髓微环境中。

2. c-kit 配体。c-kit 配体又称干细胞因子(Stem Cell Factor, SCF)。由骨髓基质细胞产生,有可溶型和细胞膜结合型两种形式。其受体是癌基因 c-kit 编码的一种受体酪氨酸激酶,表达在造血干细胞上。抗 c-kit 单克隆抗体可明显抑制 CFU-S 数。说明 c-kit 和其配体(SCF)的结合在造血调节中起重要作用。但在体外去掉基质细胞,只加入 SCF 或将 SCF 和其它

细胞因子联合使用时,却不能长期支持造血细胞生长。说明干细胞上的 c-kit 受体和基质细胞上膜结合型 SCF 的直接接触在造血调节中起重要作用。

3. 其它细胞表面粘附分子。VCAM-1 分子是免疫球蛋白超家族的成员,表达在骨髓基质细胞上。通过该分子与造血细胞上的 VLA-4 分子结合,可使造血祖细胞、前 B 细胞粘附到骨髓基质细胞上。西蒙斯等证明,抗整合素 $\alpha_3\beta_1$ 和抗 VCAM-1 的 McAb 明显抑制富含 CD34 分子的造血干细胞粘附到培养的异基因骨髓基质细胞上。其他研究小组也发现抗 VLA-4 或抗 VCAM-1 的 McAb 抑制淋巴细胞的生成。髓系造血干细胞由 VLA-4 和 VCAM-1 粘附基质细胞、淋巴系干细胞通过 VLA-4 和 VLA-5-CD9、VLA-4 和 ICAM-1、VLA-5 和 Fn、 β_2 结合素和 ICAM-1 连接基质细胞。

三、造血微环境重建在血液系统疾病治疗中的意义

完整的造血微环境是维持造血过程所必须的。现已证明血液病(如再生障碍性贫血)和某些白血病的患者都有造血微环境的缺损,骨髓移植后造血与免疫功能重建缓慢也与微环境损伤密切相关。因此,修饰缺损的造血微环境对血液病的治疗和促进 BMT 后的造血与免疫功能重建有重要的潜在应用价值。目前修饰造血微环境的主要方法是直接输入可刺激造血的细胞因子。

骨髓移植(BMT)是临床治疗血液系统疾病和恶性肿瘤的有效手段。许多研究都已证明在 BMT 治疗中,基质细胞是可移植的。基廷(Keating)等 1982 年在《自然》杂志上报道,在 14 例兄弟姊妹间进行骨髓移植,取受体骨髓进行体外长期骨髓细胞培养,通过检查骨髓粘附细胞中 Y 染色体,发现在移植后第 80 天,70% 的基质细胞是供体来源的。说明基质细胞可定向回巢于骨髓。1983 年,皮尔斯马(Piersma)等在小鼠 BMT 后第 1 天取骨髓细胞做 CFU-F 培养,发现 72% 的 CFU-F 是供体起源的。移植后 3 个月,仍有 50% 的 CFU-F 是供者源的。1994 年石田(Ishida)等给患自身免疫病的 MRL/lpr 小鼠进行异基因骨髓移植和肾被膜下去除骨髓细胞股骨和肱骨移植(提供基质细胞),结果在移植后第 14 天,同时接受骨髓细胞移植和骨移植组小鼠形成的 CFU-S 数明显比单纯接受骨髓细胞移植组增多,而且小鼠产生抗体的能力及 T 细胞功能均已恢复正常。这说明异基因骨髓移植时需要供者的基质细胞。上述实验结果都表明基质细胞是可移植的。因为造血细胞粘附到基质细胞上对 BMT 治疗的成功与否至关重要,因此可通过上调基质细胞上粘附分子的表达促进造血干细胞粘附到基质细胞上,促进

造血细胞的分化、成熟。一些细胞因子,如 IL-1、IL-4 和 TNF- α 可上调基质细胞上粘附分子(VCAM 等)的表达,使用这些细胞因子可促进 BMT 的造血与免疫功能的重建。

再生障碍性贫血是血液系统的常见病。现已证明造血微环境障碍也是该病的重要原因。旺德纳(Wondnar)等报道“再障”病人血清中 SCF 的浓度低于正常人。取“再障”病人的骨髓细胞进行纤维母细胞培养,结果发现这些细胞的生长能力明显减弱。在基质细胞产生细胞因子缺陷的“再障”患者,用某些细胞因子(G-CSF、SCF)治疗已经取得了一些疗效。

直接使用造血生长因子修饰造血微环境,细胞因子的用量大,且有较明显的毒副作用,不符合造血的生理状况。由于基质细胞是造血微环境最重要的成份,输入体内又可以回巢定居于骨髓,据此 1994 年福岛提出了基质细胞基因治疗(gene therapy of stromal cells)的概念,认为将造血生长因子的基因转入基质细胞,使其能分泌微环境缺损的细胞因子,将它与造血干细胞一起进行骨髓移植,可能加速 BMT 的造血与免疫功能的重建。这种转基因基质细胞单独输入造血微环境缺损的患者,可以重建其造血微环境,在再生障碍性贫血等血液病及某些由微环境障碍的白血病的治疗上,可能有广阔的应用前景。用基因转染的基质细胞修饰造血微环境更接近造血的生理状态,避免了全身应用造血因子的副作用,具有明显的优越性。这是一个令人兴奋的设想。我们过去的研究证明,IL-6 能明显促进 BMT 后造血与免疫功能的重建(谢蜀生,科技导报,1994.2,P14~16)。在此基础上,我们建立了小鼠骨髓基

质细胞株 QXMSC1,构建了 IL-6 的真核细胞基因表达载体,用体外基因转染技术获得了稳定表达 IL-6 的小鼠骨髓基质细胞株 QXMSC1-IL-6。将它与造血干细胞同时输入被致死照射的 BALB/c 小鼠体内,明显促进了 BMT 小鼠的造血功能重建,首次为基质细胞基因治疗的可行性提供了实验证据。最近李(Li)等报告,通过连续 4 次用带外源基因的逆转录病毒培养上清转染原代培养的基质细胞,可使转染率达 91% 以上。这就为基质细胞基因治疗的临床应用奠定了基础。由于骨髓移植就是向供体输入骨髓细胞,所以 ex vivo 的基因治疗方法特别适用于基质细胞的基因治疗,因此,是一种具有实际应用前景的新的基因治疗方法,值得进一步深入研究。

四、结 语

组成机体的细胞都在一定的环境中生存并发挥功能。细胞生存的微环境稳定对细胞正常功能的维持有重要意义。造血微环境是血细胞分化、发育的场所,造血微环境最重要的成份是骨髓基质细胞。近年来对基质细胞的研究取得了许多进展,其中最重要的是证明了基质干细胞的存在,并对基质干细胞增殖、分化的调节及其与造血干细胞相互作用的分子基础进行了研究,在此基础上提出了基质细胞基因治疗的设想,从而通过促进造血微环境的重建,为血液病的治疗以及 BMT 后造血与免疫功能的重建开辟了新方向,使血液学的发展进入了一个新的阶段,具有重要的理论和实践意义。

(责任编辑 肖庆山)

(上接第 44 页)

际惯例进行风险性勘探,或引进外资共同开发;增加 BOT 方式试点项目。

4. 加强东部与中西部的经济联合与协作

结合产业结构调整,加强政策引导,通过联合,把东部地区高耗能、高耗料的传统产业向中西部资源丰富、发展条件较好的地区转移,努力发挥这些地区的突出优势。与此同时,东部地区可以组织优势行业、优势产品的骨干企业和优秀人才到中西部地区办企业,东部地区还可以出资金、出技术、出管理与中西部地区合办企业,东部地区也可以在中西部地区建立能源、原材料基地。

东部地区向中西部地区推广先进的农业技术和生产经验,并使一些地区成为东部大城市的农副产品供应基地;东部地区可以在中西部地区承包“五荒”,连片进行农业综合开发,发展种养业和林业,实行产供销、贸工农一体化经营模式;积极实

施《乡镇企业东西合作示范工程》,东部地区利用中西部地区的动植物资源和农副产品资源,合作兴办乡镇加工企业,提高产品的附加值和商品率。

努力推进以内联为基础、以外向型经济为导向的“中中外”式的联合,包括在境外联合招商,联合引资,联合与外商在中西部地区兴办三资企业,提高对外竞争能力,并开拓国际市场;同时,发挥东部沿海的优势,以港口、海关、口岸等为依托,传递信息,联合开展对外经贸活动。

东西部地区之间可以进行商工商联营、工商联营、农工商联营,积极组织各自产品进行异地展销,特别应重视组建以大中城市为依托、能够体现集散和辐射功能的商商联合体;以联合发展金融市场、发行投资债券、设立投资等方式,促进资金的横向融通;共同培育劳务市场、科技市场、信息市场和人才市场。

(责任编辑 王宏章)