

外周血干细胞的分离及对急性放射损伤的治疗

369 研究室 丁振海 麦智广

引言

早在1909年 Maximow⁽⁴⁾就提出干细胞这个概念,他认为在胎儿后期血细胞分化中的淋巴细胞称为“普通干细胞”(Common stem cells)。1961年 Till 和 McCulloch⁽⁵⁾用脾结节实验技术,研究骨髓功能状态,使造血干细胞由概念性阶段进入实验阶段。当时并不知道每个脾结节来源于一个造血干细胞。因此,统称脾结节生成单位(Colony forming unit)。想利用造血干细胞作为治疗,首先考虑从造血器官中取得干细胞。但是,取得有效的有核细胞数目($10\sim 20\times 10^9$),需要80~120次骨髓穿刺,显然,在临床应用是困难的⁽⁶⁾。

1953年 Brecher 指出,小鼠外周血存在多能干细胞⁽⁷⁾,后经 Goodman 用脾结节鉴定技术予以肯定⁽⁸⁾,1975年 Debelak 证实外周血干细胞具有恢复骨髓再生的能力^(26, 27)。血液比骨髓是更为有利的干细胞源, Gidali 等对外周血干细胞某些性质作了研究,认为输注外周血干细胞比输注骨髓干细胞更为有用。因外周血干细胞的种植效率比骨髓干细胞高⁽⁹⁾。对此,目前已较清楚,外周血存在少量造血干细胞,它在数量上大约为全身造血干细胞总量的1%。因此,要想利用外周血干细胞务必设法把它分离并予以浓集⁽⁴⁷⁾。造血干细胞的形态,目前还不能辨认,它是以单个核的细胞形式存在于外周血中,故必须从外周血中把单个核细胞分离,再从中分离造血干细胞,并已发展成为治

疗造血功能障碍的一项新技术。

外周血干细胞分离及浓缩

外周血液细胞正常的补充是由骨髓干细胞库多能干细胞增殖分化而来。骨髓中造血多能干细胞,它既能通过分裂维持本身的细胞繁殖,同时又可以向骨髓各系细胞分化增殖。多能干细胞可出现在外周血液循环。由于骨髓获取不易,从外周血中采集足够数量造血干细胞,有实际应用价值。实践说明,啮齿类动物经自体骨髓或同种骨髓移植于受致死量照射的受体如小鼠⁽⁹⁾豚鼠⁽¹⁰⁾犬⁽⁴²⁾狒狒⁽¹²⁾及人^(13, 14)等其外周血作体外培养,均证明有造血干细胞的存在。

十余年来,国外进行探索周围血干细胞分离及浓缩的研究,虽造血干细胞形态未作最后定论,基于造血干细胞酷似淋巴细胞,一般从外周血分离造血干细胞,大部系从单个核细胞,特别是在淋巴细胞相近的比重组分中获得。

外周血干细胞分离及浓缩方法大概分下列数种:

(一) 梯度离心法

应用梯度离心法分离单个核细胞,常用 Böyum 法⁽¹⁸⁾用 Ficoll (聚蔗糖) Hypaque (3,5-二乙酰胺-2,4,6-三碘苯甲酸钠),混合液作梯度分离,每毫升肝素抗凝血,平均可得 1.4×10^6 单个核细胞。

(二) 尼龙棉或玻璃毛粘附法

粒细胞能被不同表面所粘附,如尼龙棉⁽²³⁾或玻璃毛^(24, 25),但其粘附机理,迄今未清。

其方法是以静脉抗凝血液，通过盛有尼龙棉的管子内，血液流速以蠕动泵调整。本法粘连单个核细胞，可达流滤血70~80%，缺点是粘附的细胞不易洗下，若加入局部麻醉剂——潘托卡因或利多卡因较易洗脱。且可保持95%以上的细胞活性⁽²³⁾。

(三) 圆柱过滤法

圆柱分离细胞分四个部分：圆柱内放小的玻璃珠，起吸附细胞作用，将抗凝血液，直接通过圆柱，不附着于玻璃珠的细胞部分 I，用少量血清培养液，从圆柱洗下细胞属部分 II，以 EDTA 冲洗所得的细胞属部分 III，把玻璃珠倒出再用 EDTA 冲洗脱的属部分 IV。经过体外培养 (CFU-C) 除第 I 部分外其余各部分均有造血干细胞。

(四) 明胶沉降法

据认造血干细胞比重略小于淋巴细胞，利用3%明胶作沉降分离，所得单个核细胞注射全身照射过的受体，九天后观察脾造血灶，可见克隆 (Colony) 数增加。此法简便易行，但组分细胞不能分的很细，其内混杂多量淋巴细胞，输后易生免疫反应，使应用备受限制⁽²⁹⁾。

(五) 血球分离器分离法

常用美国国立肿瘤研究所研制成功的 (NCI-IBM) 血球分离器。肝素抗凝血经血球分离器中速水平离心，液面分别为血浆、粒细胞、单个核细胞 (包括淋巴细胞)、及红细胞各部分，通过透明面板的不同距离管道收集。分离率由蠕动泵调节，能使粒细胞连续不断地收集入血袋中。剩下血浆及红细胞，经离心碗后，成为没有粒细胞血液，回输给供体，如是连续地进行成份采血及回输，经4~5小时，流经血球分离器的血液可达4,000~5,000毫升，能采集 1×10^{11} 粒细胞。现已普遍用于临床。曾有供体，先后用此机器流滤采集粒细胞达12次，无明显反应，优点是密闭式成份采血，滤集的血细胞，经活体染色、³H-TdR 掺

入及吞噬细菌试验等检验，证明能保持一定的活性。除多次采血能引起轻度贫血外，无论供体或受体均可适应此采血及接受回输的血液。

滤集白细胞时加入羟乙基淀粉^(20, 21)，可增加白细胞浓度。加入羟乙基淀粉后，可以加速红细胞沉降，有利于粒细胞的分离。且对细胞的杀菌力，供血者的肝功，无不良反应。

外周血干细胞动员

正常生理状态下，外周血干细胞甚少，仅占全身造血干细胞1%，Fliedner 资料指出，几种动物和人干细胞水平如下⁽⁴⁾：

- 小鼠：30 CFU-S 或 75 CFU-C/ 10^5 骨髓细胞*
- 15 CFU-C/ 10^6 单个核细胞
- 20 CFU-S 或 30 CFU-C/毫升血
- 狗：100~200 CFU-C/ 10^5 骨髓细胞
- 30~100 CFU-C/ 10^6 单个核细胞
- 90~330 CFU-C/毫升血
- 人：30~300 CFU-C/毫升血

若增加外周血干细胞数，就要把造血组织中的干细胞动员出来，使它进入外周血，然后从外周血中可收集更多的造血干细胞。已经使用的有玻璃酸酯、骨胶酶原、组织胺、肝素及细菌内毒素等都有动员作用⁽²⁸⁾，作者 (1979) 做了伤寒杆菌、大肠杆菌内毒素，五联疫苗、Ficoll、雌激素等动员效果观察，看来内毒素效果最好⁽²⁹⁾。方法是给小鼠静脉注射动员剂，不同时间活杀，取其骨髓、脾、外周血作成细胞悬液，按所需细胞数 (一般为 $\times 10^4$) 给经致死量照射小鼠静脉输注，照后9天活杀，取脾脏固定后观察灶数，或作体外培养数其成灶数。结果发现注射伤寒杆菌脂多糖后，血 CFU-S 呈双相增加，第一个高峰为正常值的20倍，第二个高峰更高于第一高峰，脾 CFU-S 至少增加50倍，而且这种升高可达50天⁽³³⁾，

[注] CFU-S (Colony forming unit-spleen) 代表多向干细胞
CFU-C (Colony forming unit-culture) 代表定向干细胞

(见图 1)。

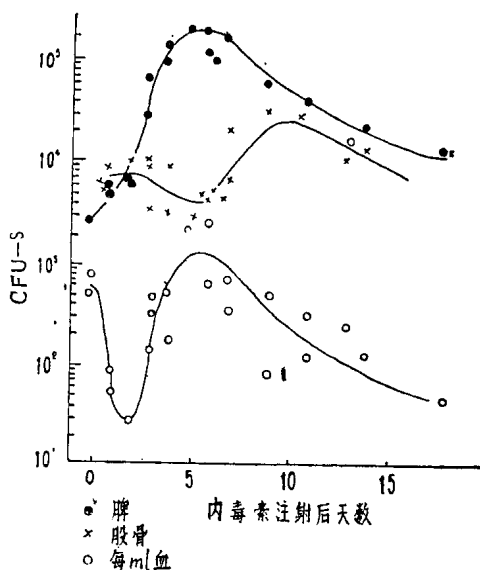


图 1 静脉注射伤寒杆菌内毒素后外周血、脾及股骨髓多能造血干细胞发生率

另外，注射酵母渣⁽³³⁾ (Zymosan) 也有较好的动员作用，被称为高效动员剂。在 0.1~2.0 毫克/只小鼠剂量范围，随着剂量增加，CFU-S 的动员作用也增强。(图 2)。

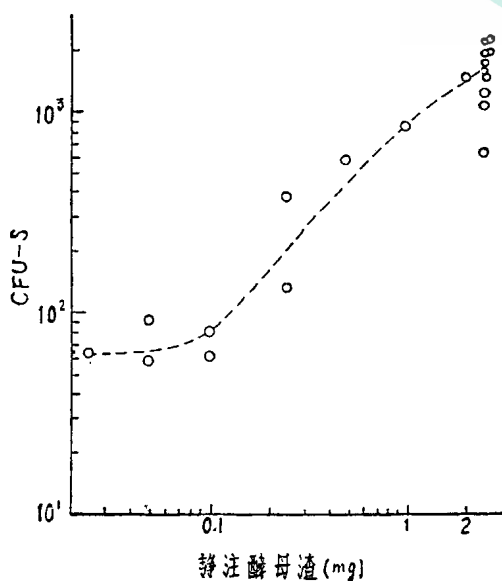


图 2 注射不同剂量酵母渣后每毫升血内动员多能造血干细胞作用。(每点代表注射酵母渣后 1 小时 10 只小鼠 CFU-S 平均数)

酵母渣对 CFU-S 动员作用与细菌脂多糖类似，也有双相反应，但它发挥作用更早，注射后数分钟即发生作用，维持外周血 CFU-S 高水平时间较长^(33,34)。

此外，胰蛋白酶、刀豆球蛋白，PHA 等都有动员作用，但作用不如脂多糖与酵母渣，有的发挥作用较慢，有的作用消失较快。

血细胞分离及收集通常用连续流动分离 (Continuous-flow-centrifugation) 经 4~5 小时，一般可得 $20\sim30 \times 10^9$ 白细胞，其中有 8.0×10^9 单个核细胞，在这些单个细胞中有 $4\sim10 \times 10^5$ 定向干细胞。而且可每天进行分离。连续 4~5 天。CFU-C 的数量不但不减少，却逐次增高。第三、四次比第一次高 2~4 倍^(37,38)。

若加入动员剂——硫酸葡聚糖 (dextran sulfate) 可增加单个核细胞产值和 CFU-C 的产值⁽³⁹⁾。以 15 毫克/公斤注射狗 3 小时后，血中 CFU-C 可以增高到原水平的 10 倍。(据 Nothdurft 资料，狗每毫升血 CFU-C 为 27 ± 21 和 314 ± 117 之间，每条狗有其特定的干细胞水平)。甚至经过较长期的每天流滤 5 小时，连续数天，能从干细胞池中动员 CFU-C 至少为血液中 CFU-C 的 60~100 倍^(4,38,39)。

一些资料指出，加入淋巴细胞动员剂：类肝素硫酸聚乙烯 (heparinoids polyvinyl sulphuric acid) 15 毫克/公斤，这些多阴离子的硫酸盐都能引起循环血中单个核细胞增加^(37,38)。

胶浆 (plasmagel) 是红细胞沉降剂，若加入 500 毫升，亦获致高产值的单个核细胞和 CFU-C^(37,38)。

实验证明，在单个核细胞中有大量的 CFU-C，正常情况下，外周血中 20,000 个单个核细胞有 1 个 CFU-C，加入硫酸葡聚糖动员剂的流滤期间所收集的细胞悬液中发现 1,000~2,000 单个核细胞中就有 1 个 CFU-C。见表 1。

表 1 狗单个核细胞和 CFU-C 在血中和收集袋中的分布关系:

供体狗	处理前的单个核细胞数/mm ³	处理前每毫升血中, CFU-C	CFU-C:单个核细胞	收集的单个核细胞数×10 ⁹	收集的CFU-C数×10 ⁶	在细胞悬液中CFU-C:单个核细胞	f
D ₁	1,045	292.64	1:3,571	8.13	27.43	1:296	12
D ₂	2,050	106.60	1:19,231	10.64	7.01	1:1,518	13
D ₃	4,452	83.37	1:29,412	12.60	7.30	1:1,726	17
D ₄	2,596	140.18	1:18,519	10.23	10.72	1:954	19

这些资料充分证明, 单个核细胞中有大量的定向干细胞(CFU-C), 而单个核细胞可以通过血细胞分离器获得, 方法简便易行。这就为放射损伤所致的造血障碍以及放疗、化疗和血液系统某些造血功能障碍治疗提供了一条新的途径。

外周血干细胞的冰冻保存

随着干细胞应用的发展, 以及细胞分离技术的逐步完善, 要求储备一定量干细胞, 以备紧急应用。特别是在战争条件下, 遂要求人们去研究干细胞库的建立, 外周血细胞库更有实际意义。Fliedner报告, 他们对“狗的干细胞库”已基本建成, 并可供应从正常狗收集的外周血干细胞, 且可冰冻保存, 积累到足够量的干细胞^(4 41-45)。象血库供给血源一样, 可随时供给干细胞作治疗之用。

冰冻的单个核细胞的 CFU-C 经体外培养

测定仍保持颇强的再生能力(见表2)。

表 2 冰冻保存效果: 单个核细胞和 CFU-C长期保存后的恢复率

种、类	保存 1~6 月	保存 7~27 月
白细胞流滤后单个核细胞恢复	58.6% ± 4.8 n = 23	84.1% ± 4.4 n = 11
每1×10 ⁶ 单个核细胞中CFU-C恢复	101.5% ± 4.7 n = 23	104.8% ± 3.0 n = 11
白细胞流滤后CFU-C恢复	85.9% ± 4.8 n = 23	89.4 ± 6.1 n = 11

从表中可以看出超低温保存长达27个月, CFU-C 只损失 10%左右, 与未冰冻单个核细胞比较, 并无明显差别。

为了测定冰冻保存造血干细胞在体内的再生能力, 给经 1200 rad 照射狗输注, 10 天后杀死, 观察其骨髓和外周血中粒细胞的含量见表 3。

表 3 X线全身照射 1200 rad 输注单个核细胞10天后骨髓、血粒细胞含量

种类	狗数	输注单个核细胞×10 ⁹	骨髓切片有核细胞/mm ²	骨髓切片粒系祖细胞数/mm ²	骨髓切片红系祖细胞数/mm ²	外周血单个核细胞数/mm ³
新鲜	5	6.7 ± 0.9	24,200 ± 363.9	100.3 ± 21.5	582.2 ± 21.5	174.5 ± 11.6
冰冻	5	8.1 ± 0.6	28,892 ± 563.5	81.8 ± 16.7	81.8 ± 16.7	162.6 ± 11.3
对照	5	0	693 ± 57.9	0	0	0

当输注 6 ~ 8 × 10⁹ 冰冻或新鲜的单个核细胞后, 在受体的骨髓有核细胞或外周血的粒细胞都无差别, 另外也有报告认为输注冰冻的单个核细胞对巨核系统和淋巴组织的再生也取得同样的效果。

造血干细胞对急性放射损伤的 实验治疗及临床应用

应用血球分离器分离浓缩而得较纯的粒细胞, 近年已普遍用作成分输血, 临床用于白细

胞高度增殖的白血病病例,用分离法抽除体内部分白细胞,可免患者因白细胞过多而致栓塞。对肿瘤病人,使用化疗或放疗后白细胞减少情况下,输入提纯的粒细胞,可提高白细胞,使治疗得以继续进行。更有意义的是,白血病病例,使用大剂量全身辐射抑制白细胞增生,而引起的极重度放射病,然后移植从骨髓或外周血经浓缩及梯度处理后,采取某个组分的造血干细胞,使患者免于死亡。对今后核武器所致的重度以上放射损伤,虽方法稍嫌繁琐,但不失为一种较有希望的治疗方法。

Buckner等⁽³⁰⁾应用NCI-血球分离器,成分采血以 $\times 10^9$ 粒细胞输给受环磷酸胺致死量注射(75毫克/公斤)的狗。对照九条犬均告死亡,治疗组(不用其他辅助药物)活存%。

Ross等⁽⁴⁰⁾应用血球分离器成分输血,对¹²⁵I-¹³¹I X线照射的狗,进行治疗,其方法是先用硫酸右旋糖酐驱赶剂,把干细胞动员到外周血,经5小时的滤集,去除红细胞,以Ficoll-Isopaque分离出单个核细胞(内含造血干细胞),再作牛血清白蛋白梯度分离,取第2组分,保存于-196℃液氮内。动物全身照射1200R后,立即输入冰冻保存后解冻的自体单个核细胞,4条犬活存2条。

Fliedner等⁽⁴¹⁾,用小猎犬全身照射1,200R,照后立即输入每公斤体重 $0.5\sim 2.8 \times 10^9$ 单个核细胞。结果:对照组11条在照后7~10死于肠型放射病。26条输同种单个核细胞加甲氨喋呤治疗的活存 $8/14$;未加免疫治疗的12条仅活存2条。16条输自体单个核细胞,其中12条观察10天细胞恢复情况;4条则追踪观察骨髓及白细胞的修复状态。认为自体或同种单个核细胞都能使造血组织恢复。

临床治疗大多应用骨髓有核细胞或白细胞移植,而用造血干细胞者仅见Gfaze⁽⁴⁶⁾报告1例男性因患肺门癌接受一次全身照射800rad的病例,照前以自体骨髓用Ficoll-Hypaque沉降分离单个核细胞,超低温保存。照射后两小时随即输注,辅以抗菌等治疗,病人得以完全血液学缓解。

临床病例用外周血造血干细胞治疗放射损伤,尚未见诸报告。

小 结

造血干细胞的研究,20年来已为国内⁽¹⁻³⁾外普遍重视。干细胞形态虽仍在争议,但由于骨髓造血干细胞生物鉴定技术建立,造血干细胞分离、浓缩方法渐趋成熟,这就对取得较纯的造血干细胞提供了可能性。

重度或极重度急性放射损伤以造血器官严重损伤为主,输注自体骨髓细胞是行之有效方法。但骨髓细胞来源困难,外周血造血干细胞输注被认为是简便可行的。更兼深低温冰冻保存细胞技术的进展,干细胞库建立,特别是在战争条件下,对放射病的治疗具有一定的意义。

参 考 文 献

1. 朱壬葆: 国外医学(放射医学分册), (3): 159-162, 1979.
2. 舒其勇: 国外造血干细胞的辐射损伤与恢复的研究概况, 军事医学科学院, 军事医学资料编辑组编印, 1979.
3. 吴祖泽: 造血细胞动力学概论, 科学出版社, 北京, 1978.
4. Fliedner TM, et al: Blood Cells, 5(2):313-329, 1979.
5. Till TE, McCulloch ED: Rad Res, 14:313, 1961.
6. Fliedner TM, et al: Leucocytes: Separation Collection and Transfusion, Academic Press Inc. Ltd (Foldman JM, Lowenthal RM,) London, P. 271-275, 1975.
7. Brecher G, et al: Proc Soc exp Biol Med, 84: 54-56, 1953.
8. Goodman TW, et al: Blood, 19:702, 1962.
9. Gidate J, et al: Blood, 43: 573, 1974.
10. Malinin TI, et al: Blood, 25:593-702, 1965.
11. Storb R, et al: Blood, 25:693-702, 1968.
12. Storb R, et al: Blood 50(3):537-542, 1977.
13. Golde EW, et al: J Clin Invest, 51:2981-2985, 1972.
14. Chervenick PA, et al: Blood, 37:131-135, 1971.
15. McCredie KB, et al: Science, 171:293-294, 1971.
16. Kurnik GE, et al: Blood, 37:136, 1973.
17. Richman CM, et al: Blood, 47:1031-1039, 1976.
18. Böyum AC: Scand J Clin Lab Invest, 21:

- (Suppl 97) 77, 1968.
19. Heizig GP, et al: Blood, 39:554, 1972.
 20. Mishler JM, et al: Blood, 44(4):571-581, 1974.
 21. Lani K, et al: Blut, 22:35, 1970.
 22. Lani K, et al: Klin Wočhenschr, 49:327, 1971.
 23. Schiffer CA, et al: Blood, 50(2):213-225, 1977.
 24. Johnson TM, et al: Proc Soc Exp Bio Med, 102: 333-335, 1959.
 25. Rabinowitz Y: Blood, 23 (6): 811-828, 1964.
 26. Debelak-Fehir M, et al: Transplantation, 20(1): 63-67, 1975.
 27. Debelak-Fehir M, et al: Exp Hemat, 3: 109, 1975.
 28. Vos, O et al: Cell Tissue Kinet, 5:467-479, 1972.
 29. 丁振海, 麦智广等; 未发表资料, 1980.
 30. Buckner S, et al: Blood, 31(5):653-671, 1968.
 31. Judson G, et al: Nature (London), 217:816-818, 1968.
 32. Sorb R, et al: Transplantation, 9:240-252, 1970.
 33. Vos O: Cell Tissue Kinet, 12: 257-267, 1979.
 34. Cline MJ, et al: Exp Hemat, 5: 186-190, 1977.
 35. Quesenberrg PDM, et al: New Engl J Med, 286: 227-322, 1972.
 36. Buckner D, et al: Blood, 31(5):653-672, 1968.
 37. Ross WM, et al: Leucocytes: Separation collection and Transfusion. Acad Press IncL (Foldman JM, Lowenthal RM), London, P. 261-270, 1975.
 38. Kovács P, et al: Acta Heamat, 60: 172-181, 1978.
 39. Ross WM, et al: Proc Soc Biol Med, 157:301-305, 1978.
 40. Ross WM, et al: Experimental Hematology today, Springer Verlag, New York, P.29-38, 1976.
 41. Fliedner TM, et al: Hematologica 61(2), 141: 156, 1976.
 42. Cavins JA, et al: Blood, 23: 38-43, 1964.
 43. Cavins JA: Blood 20: 730-737, 1964.
 44. Debelak-Fehir KM: Transplantation, 20(1): 63-67, 1975.
 45. Nothdurft W et al: Scand J Haemat, 470-481, 1977.
 46. Graze PR, et al: Transplantation, 27(2): 142-145 1979.
 47. Nelson B, et al: Am J Path 84: 259-266, 19

用游离肌皮瓣移植进行舌再造术初获成功

我校第二附属医院口腔科, 以模范军医吕士才为榜样, 对一例舌癌病人, 施行了舌体全切除, 并用游离肌皮瓣移植进行舌再造获得成功。

患者何凤珍, 女性, 39岁, 因舌多发乳头状鳞癌术后复发, 于1979年12月14日再次入院。

入院后, 经详细检查和周密的术前准备, 于今年1月4日, 施行了舌体全切除(界沟以后), 加左侧口底大部切除。经组织冰冻切片证实, 肿瘤确已全部切除后, 用前臂游离肌皮瓣修复左侧口底及舌腹面, 其血管神经束经左侧口底隧道引出, 分别将桡动脉与颌外动脉, 头静脉和颌外静脉, 桡侧皮神经和耳大神经相吻合, 又于左侧切除游离背阔肌皮瓣修复舌背, 其血管神经束经右侧口底隧道引出。将胸背动脉与颌外动脉, 胸背静脉与颌外静脉, 胸背神经与舌下神经降支相吻合。以上两个皮瓣呈瓦

合形式进行了舌重建。

术后, 在医护人员的密切观察和精心护理下, 经过58天的治疗, 用游离肌皮瓣植的新建之舌终于成功, 病人咀嚼、吞咽及语言功能良好, 痊愈出院。

舌肿瘤的治疗, 一般都需要手术。而术后由于病人进食不便和语言动能障碍, 造成生活上极大的困难。所以舌肿瘤术后的舌再造对功能恢复有重要意义。国外于1978年曾有胸锁乳突肌加额瓣再造舌的报道, 国内于1979年上海肿瘤医院曾报道用岛状带状肌皮瓣再造舌的方法。采用我们这种方法, 不仅可使舌瘤局部切除更为彻底, 而且疗程短, 舌功能恢复较好。目前第二附属医院口腔科正进一步总结经验, 争取对游离肌皮瓣的舌再造手术, 获得更圆满的效果。

(学报编辑室)