



张凤奎, 医学博士, 主任医师, 血液内科学教授, 博士生导师。现任中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)贫血诊疗中心主任、国家新药临床试验机构主任。主要从事造血系统红细胞疾病临床及实验研究, 对各种疑难贫血性疾病诊断与治疗经验非常丰富, 在骨髓衰竭、铁代谢异常疾病及溶血性贫血性疾病治疗方面多有建树, 对重型再生障碍性贫血的治疗效果达国际先进水平, 率先系统报道我国大颗粒淋巴细胞白血病、先天性红细胞生成异常性贫血。现兼任《中华血液学杂志》副主编和多个血液专业杂志编委。主持和参与多项课题研究, 发表论文百余篇。

再生障碍性贫血中残存造血细胞的生物学特征

杨文睿 张凤奎*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室,
国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 再生障碍性贫血是T细胞免疫介导的骨髓衰竭, 造血前体细胞在淋巴细胞及细胞因子作用下凋亡增加。再生障碍性贫血不仅造血干/祖细胞池萎缩, 其残存造血细胞还存在功能缺陷, 与老化造血干细胞特征相似。在免疫攻击和造血压力作用下, 残存造血细胞增殖能力减退、对细胞因子反应不良, 端粒缩短、遗传不稳定, 或虽逃逸免疫攻击, 发生克隆性造血和向MDS/AML转化的倾向明显增大。

关键词 再生障碍性贫血; 造血干细胞; 端粒; 克隆性造血

Biological Characteristics of Residual Hematopoietic Cells in Aplastic Anemia

YANG Wenrui, ZHANG Fengkui*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases,
Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract AA (aplastic anemia) is a rare bone marrow failure disorder mainly due to T cell immune-mediated destruction of hematopoietic precursor cells. The hematopoiesis of AA was characterized by both a severe decrease quantitative and qualitative defect of the HSCs (hematopoietic stem cells), with similar properties to aging HSCs. With the damage of immune attack and hematopoietic pressure, the remaining progenitor and stem cells showed lower clonogenic capacity, poorly responsive to cytokines, shortened telomeres and genetic instability; or some of them escaped from immune attack, while the propensity to undergo clonal hematopoiesis and transformation to MDS/AML was significantly increased.

Keywords aplastic anemia; hematopoietic stem cells; telomere; clonal hematopoiesis

收稿日期: 2021-11-04

接受日期: 2021-12-09

*通讯作者。Tel: 022-23909229, E-mail: Zhfk@hotmail.com

Received: November 4, 2021 Accepted: December 9, 2021

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909229, E-mail: Zhfk@hotmail.com

再生障碍性贫血(再障)是一少见的,以外周血全血细胞减少和骨髓造血红髓萎缩为特征,临床表现为贫血、出血和感染,并常危及生命的骨髓衰竭综合征。再障发病机制尚未完全阐明,目前认为本病主要是由T细胞免疫介导的,以骨髓造血组织为靶的的器官特异性自身免疫性疾病。造血干/祖细胞受到生物因素、化学因素影响,或自身DNA不稳定,表达新的抗原决定簇,被自身T淋巴细胞所识别;或者,可能是淋巴细胞中的小部分“禁止克隆”识别造血干细胞上的某些特殊靶位,淋巴细胞继而增殖并释放白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)等淋巴因子,致使造血干/祖细胞FAS配体表达增加,通过FAS途径使造血干祖细胞凋亡增加,最终导致造血干/祖细胞数量明显减少^[1],这些尚活存的造血干/祖细胞(残存造血细胞)不足以维持造血需要和外周血正常水平,引起造血衰竭。有关再障免疫发病机制已有较多研究和论述,迄今最主要的支持证据仍是大多数患者经免疫抑制治疗可获得自身造血恢复^[1]。免疫介导的造血干/祖细胞攻击最终导致严重的造血干细胞功能缺陷,表现为造血干细胞耗竭和干细胞质量异常。

1 细胞池萎缩

体外集落培养结果显示,再障患者骨髓基质细胞并不影响正常造血干/祖细胞的集落形成和产率,再障患者骨髓基质细胞仍可构建功能完善的造血干细胞龛^[2],以及转基因造血干细胞移植并未改变骨髓基质细胞而成功重建患者造血,均提示尽管骨髓基质细胞具有支持造血和生理性免疫调节作用,但其在导致再障骨髓衰竭的过程中并不起初始的和决定性作用;推测再障骨髓衰竭主要源自造血干细胞数量减少。在可以通过体内进行造血干细胞量化检测的试验动物模型中,已经充分证明再障的发生与干细胞的缺乏有关;再障患者骨髓涂片有核细胞明显减少,一片荒凉,骨髓小粒空虚;组织活检显示细胞面积萎缩,造血细胞构成减低;骨髓CD34⁺细胞明显减少,骨髓单个核细胞体外半固体集落培养产率极低或无生长,表明再障患者造血前体细胞数量明显减少;以流式细胞术检测,所有的再障患者均显示有骨髓CD34⁺细胞减少或缺如,不仅定向祖细胞减少,更加不成熟的CD34⁺/c-Kit-或CD34⁺CD38前

体细胞也同样减少。直接检测再障造血干细胞非常困难,或不可行。应用造血干细胞替代体外分析方法,结果显示再障外周血和骨髓长期培养启动细胞(long-term culture initiating cell, LTC-IC)也极度减低,初诊患者其LTC-IC数量较正常水平减少至少一个对数级,同时骨髓有核细胞数在再障患者中明显减少,推测LTC-IC数量甚至低至正常人数量的1%。这些均表明再障早期造血细胞明显减少,仅少数残存。

2 生长受抑或免疫逃逸

针对造血组织的T细胞异常免疫攻击及干扰素等淋巴细胞因子,对于造血干细胞可起到直接杀伤、功能抑制和诱使其失去不对称分裂特征的作用。细胞毒T淋巴细胞直接杀伤和 γ -干扰素抑制干细胞增殖均可导致造血祖细胞和成熟细胞的生成减少而失去非对称分裂特性,结果两个子细胞均向终末分化,也必将导致HSC池逐渐耗尽,最终使得外周血细胞减少。除了直接杀伤死亡和凋亡导致造血干/祖细胞减少外,再障残存造血干/祖细胞功能也受到抑制,这是免疫抑制治疗能够恢复患者自身造血的基本前提。临床上,采用免疫抑制治疗而不补充正常造血干细胞,大多数再障患者,包括极重型再障患者,即可获得造血改善或外周血恢复完全正常,表明至少在这些患者中其造血干细胞并未被完全杀伤,或其损伤可逆。

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)是一由X染色体上磷脂酰肌醇糖基A基因(phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A gene, *PIGA*)体细胞突变所致的获得性造血干细胞疾病,临床突出表现为血管内溶血和高风险发生血栓并发症,其标志性的改变是血细胞表面缺少锚蛋白和锚联蛋白,可通过流式细胞术检测FLAER或/和CD55、CD59表达。大多数健康正常人外周血粒细胞可以检测到大约0.003%的锚蛋白缺失PNH细胞,具有与PNH患者GPI(glycosylphosphatidylinositol)锚蛋白缺乏细胞相似的体细胞*PIGA*突变,并且这一突变可持续数月之久,提示该体细胞*PIGA*突变可能发生于健康个体的造血干细胞。然而,PNH在临床上极为少见,*PIGA*基因敲除小鼠造血干细胞在骨髓中也并未显示克隆扩增特征,表明这些*PIGA*突变干细胞在正常造血骨髓中并不能逐渐扩增形成PNH临床表现型。

约半数再障患者在疾病诊断时外周血细胞中可检测到微小PNH克隆;溶血PNH经常与骨髓衰竭相伴发,或其前期经常有明确的再障病史。这些PNH克隆经常与再障骨髓衰竭伴发,被认为是缺少锚蛋白和锚联蛋白,致使T淋巴细胞攻击靶的缺如,从而获得“免疫逃逸”的结果。淋巴瘤患者在使用抗GPI锚联蛋白CD52单克隆抗体药物阿伦单抗(alemtuzumab)治疗时出现PNH表型淋巴细胞也支持存在这种逃逸机制。根据这种免疫逃逸机制,若导致再障的T淋巴细胞免疫反应靶抗原为细胞膜锚蛋白或锚联蛋白,则正常的造血干细胞将被杀伤,而PNH造血干细胞得以逃逸攻击并存活^[3-4]。再障残存造血细胞中经常检测到PNH克隆存在,这正是PNH造血干细胞在异常免疫造血环境下具有相对生存优势的结果;反之,在造血衰竭患者中检测到PNH克隆细胞,通常可推测其发病与免疫机制有关。最近,RICHARDS等^[5]对1 081例伴有PNH克隆的再障和PNH患者进行的流式细胞术检测的结果显示,PNH克隆从小至0.1%到大于90%呈一连续群体,也支持PNH的发生与逃逸免疫攻击有关,以至于有学者认为应将PNH看作是一种特殊亚型的再障^[6]。

与PNH丢失锚蛋白/锚联蛋白抗原一样,丢失抗原递呈分子也可使造血细胞逃逸免疫攻击。部分再障患者缺失或杂合性丢失位于6号染色体短臂(6p)的HLA位点(6p CN-LOH),丧失抗原递呈功能^[7]。KATAGIRI等^[8]报道在13%的日本再障患者中可检测到6p CN-LOH。ZAIMOKU等^[8]报道造血干细胞发生HLA-B位点基因特殊突变,逃逸自身反应性T细胞MHC限制性杀伤,且HLA-B位点基因突变的生物学意义与PNH克隆逃逸免疫攻击相同。

3 再生能力下降

尽管再障造血干细胞数量明显减少,但多数患者经免疫抑制治疗能够完全或部分恢复自身造血,在这些患者中必然有残存的造血干细胞。再障CD34⁺细胞在异基因正常基质细胞层上生长不良,而正常CD34⁺细胞在再障基质细胞层上生长良好,表明再障造血存在质量缺陷,并且这一缺陷来自造血干细胞。骨髓单个核细胞体外集落培养和长期骨髓培养均显示再障患者定向祖细胞产率较正常人明显减低。以纯化分离的CD34⁺细胞进行体外培养,在多种不同细胞因子作用下,其集落产率也均较正常

对照明显为少。然而,采用骨髓单个核细胞或CD34⁺细胞体外集落培养的方法并未将导致这些细胞群体在再障患者有更高凋亡比例的因素排除,是否分离这些已经受损的造血前体细胞,而仅分析那些在体内耐受凋亡刺激的残存造血干/祖细胞会显示与正常造血前体细胞相当的功能特性呢?选取5-氟尿嘧啶抵抗的静止期造血细胞进行体外长期骨髓培养,结果再障细胞在培养的整个期间内,其CFU(colony-forming unit)产率明显较正常对照为低,并且CFU生成提前终止,证明再障更为原始的造血干细胞也存在功能异常。

再障残存造血干/祖细胞功能异常与细胞毒T淋巴细胞杀伤作用、干扰素及肿瘤坏死因子诱导的抑制等多种因素有关。最近研究表明, γ -干扰素可与内源性促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)结合形成二聚体,影响后者与TPO受体(cMPL/TPO-R)胞外区的结合。因而,尽管再障患者内源性TPO水平明显增高,但在 γ -干扰素作用下并不能完成正常的TPO-cMPL信号转导,不能维持损害的造血干细胞的活存^[9]。这些因素共同作用,最终导致造血干细胞凋亡。造血干细胞长时间暴露于异常免疫造血环境,其损伤也更明显。另外,免疫异常的杀伤和抑制作用不仅限于具有可识别靶抗原的造血细胞,还包括“无辜旁观者”造血细胞。

4 端粒明显缩短

再障残存造血干/祖细胞质量异常的另外一个突出表现就是端粒缩短。

端粒位于染色体末端,起保护染色体稳定的作用,随着细胞复制和暴露于增殖压力而逐渐缩短。因此,端粒长度可作为反映前体造血细胞经历的复制和造血压力累积影响的生物标记。正常人造血干细胞利用端粒酶逆转录酶、端粒酶RNA成分以及稳定蛋白dyskerin(DK1)装配端粒酶复合物以维持端粒长度而不出现明显端粒缩短。在端粒复合物相关蛋白基因胚系突变的体质性端粒维持异常疾病中,造血干细胞端粒明显缩短而过多过早凋亡,经常发生所谓的先天性骨髓衰竭。获得性再障患者并不伴有端粒复合物相关蛋白基因突变,其发生的造血细胞端粒缩短更主要与残存造血细胞造血压力明显增大有关,端粒长度随着细胞分裂次数增加而进行性缩短。在iPSC(induced pluripotent stem cell)建模的

重型再障显示造血前体细胞端粒缩短^[10]。依据成熟细胞的端粒长度可推测造血干/祖细胞端粒长度,反映造血干细胞的增殖分裂次数。大约35%的再障患者外周血粒细胞和单核细胞端粒缩短,提示其造血干/祖细胞也存在端粒缩短。再障造血细胞端粒较正常人缩短,伴有体细胞突变的患者其端粒缩短更为明显^[11]。

造血干/祖细胞池萎缩、造血压力增大,再障造血细胞端粒缩短;反之,再障造血细胞端粒缩短程度可反映造血干/祖细胞池萎缩的严重程度,用于预测免疫抑制治疗疗效反应^[12]。临床上,再障患者端粒越长免疫抑制治疗疗效越好,端粒明显缩短者不仅疗效不佳,其转化为MDS/AML(myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemia)的风险也明显加大^[13]。

再障端粒缩短的程度取决于特定时间内参与造血的干细胞数目。在严重外周血细胞减少的患者中,由于造血干细胞增殖被抑制,检测到的端粒缩短程度可能低于预期。同样,非重型再障端粒可以明显缩短,而急性重型再障由于干细胞增殖周期阻滞其端粒缩短可能并不明显。

5 更高的克隆性造血倾向

基因突变源自复制错误或DNA损伤修复异常,机体在各种内部和外部DNA损伤因素作用下,随着生命过程的延长,体细胞基因突变将不可避免并逐渐积累。与其他原发恶性血液肿瘤克隆性造血发生机制并不完全相同,再障骨髓造血干/祖细胞池极度萎缩和免疫发病机制的病理生理背景在其克隆造血的发生、发展中同样发挥重要作用,并赋予再障克隆性造血独特特性。约15%再障患者骨髓造血细胞染色体检查存在细胞遗传学异常克隆;流式细胞术检测显示,半数患者存在*PIGA*基因突变所致的PNH克隆细胞。最近,二代基因测序技术更是在47%~72%的再障患者中检出异常造血克隆,且其分子遗传学克隆性造血异常类型主要集中在*PIG-A*、*BCOR/BCORL1*、*ASXL1*和*DNMT3A*基因异常,而其他类型突变均较为少见^[14-16]。

再障患者克隆性造血是以年龄相关克隆性造血类型为基础,先期存在的年龄相关突变再经细胞毒T淋巴细胞免疫攻击造血微环境筛选,加之造血干/祖细胞功能减退、耗竭,或两者兼而有之,竞争

减少,获得某些突变者可能更易扩张,最终形成免疫原性丢失或减少和耐受细胞毒T淋巴细胞介导凋亡与细胞因子介导的造血抑制,具有逃逸免疫攻击和相对生长优势的造血克隆。与成年和老年患者比较,儿童和年轻成人较少发生骨髓增生异常综合征相关的体细胞突变也支持这种猜测。

再障残存造血细胞发生克隆性进展的倾向增加,其机制如下。①端粒缩短,染色体不稳定。端粒缩短导致染色体不稳定,进而发生染色体端融合、非平衡易位、非整倍体细胞,以及再障恶性转化倾向增加。在造血干/祖细胞池减少的基础上加速端粒缩短是髓系肿瘤发生,特别是7号染色体丢失和MDS/AML转化的早期特征^[17]。②特殊克隆逃逸免疫攻击。最近有研究显示,6p-CN-LOH可能赋予伴有年龄相关体细胞突变造血干细胞克隆生存优势,导致突变克隆扩增^[18]。③正常和突变造血干细胞对耗竭机制具有不同的敏感性。④由于正常造血干细胞减少,在正常条件下处于静止态的缺陷造血干细胞参与造血。⑤医源性使用某些外源造血细胞因子。

YOSHIZATO等^[16]报道,再障患者伴或不伴获得性体细胞MDS/AML样基因突变,对患者免疫抑制治疗血液学反应、总生存和无进展生存无影响。进一步分析不同类型基因突变与预后关系时则发现,获得*BCOR*和*BCORL1*突变者免疫抑制治疗血液学反应率、生存率和无进展生存率更高,为“良好突变”;获得*ASXL1*、*DNMT3A*、*TP53*、*RUNX1*、*JAK2*、*JAK3*和*CSMD1*突变者为“不良突变”,疗效较差。随着再障病程的延长,“良好突变”克隆负荷倾向于稳定或逐渐减小,“不良突变”克隆负荷倾向于逐渐增大。

最近FEUSIER等^[19]对来自三个非肿瘤队列的4 500多人,包括400多例儿童的全外显子组测序数据进行克隆造血分析,结果表明突变克隆造血可能早在儿童期即已起始;白血病转化风险与涉及恶性髓系驱动基因的克隆造血相关,并可依特定基因及克隆造血负荷进一步风险分层;更高的白血病转化风险常与更高的突变位点频率/克隆造血负荷和涉及多个突变基因的“复杂”克隆造血相关;其他非驱动基因克隆造血与恶性血液病没有特异性关联,其在克隆扩增和白血病进展中的作用并不清楚。SHANNON等^[20]也证明骨髓造血微环境与克隆造血

相互影响。至于再障患者克隆造血的演进和转归,特别是某些常见基因突变克隆造血的预后,除参考正常人群和其他恶性血液病相关结果外,更需在再障病理生理机制背景和残存造血细胞生物学特征基础上加以阐明。

再生障碍性贫血患者不仅造血干祖细胞池萎缩、前体造血细胞数量减少,这些残存的造血细胞还存在功能异常,与老化造血干细胞特征相似。在免疫攻击和造血压力作用下,残存造血细胞增殖能力减退、对细胞因子反应不良,端粒缩短、遗传不稳定,或虽逃逸免疫攻击,发生克隆性造血和向MDS/AML转化的倾向明显增大。上述对残存造血细胞生物学特性的认识,提示临床上再障一经诊断应尽早施以阻断异常免疫之治疗,不失时机地挽救残存造血细胞,以期恢复自身造血并最大程度地减小造血压力,并且,即使恢复自身造血,定期监测克隆性造血发生、发展也非常必要。

参考文献 (References)

- [1] LUZZATTO L, RISITANO A M. Advances in understanding the pathogenesis of acquired aplastic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2018, 182(6): 758-76.
- [2] MICHELOZZI I M, PIEVANI A, PAGNI F, et al. Human aplastic anaemia-derived mesenchymal stromal cells form functional haematopoietic stem cell niche *in vivo* [J]. *Br J Haematol*, 2017, 179(4): 669-73.
- [3] GARGIOULO L, ZAIMOKU Y, SCAPPINI B, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN-gamma-producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia [J]. *Blood*, 2017, 129(3): 388-92.
- [4] BAT T, ABDELHAMID O N, BALASUBRAMANIAN S K, et al. The evolution of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria depends on intensity of immunosuppressive therapy [J]. *Br J Haematol*, 2018, 182(5): 730-3.
- [5] RICHARDS S, DICKINSON A, CULLEN M, et al. Presentation clinical, haematological and immunophenotypic features of 1081 patients with GPI-deficient (PNH) cells detected by flow cytometry [J]. *Br J Haematol*, 2020, 189(5): 954-66.
- [6] LUZZATTO L. PNH phenotypes and their genesis [J]. *Br J Haematol*, 2020, 189(5): 802-5.
- [7] BETENSKY M, BABUSHOK D, ROTH J J, et al. Clonal evolution and clinical significance of copy number neutral loss of heterozygosity of chromosome arm 6p in acquired aplastic anemia [J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 209(1/2): 1-10.
- [8] KATAGIRI T, OTSUBO A, KASHIWASE K, et al. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia [J]. *Blood*, 2011, 118(25): 6601-9.
- [9] ZAIMOKU Y, TAKAMATSU H, HOSOMICHI K, et al. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia [J]. *Blood*, 2017, 129(21): 2908-16.
- [10] ALVARADO L J, HUNTSMAN H D, CHENG H, et al. Eltrombopag maintains human hematopoietic stem and progenitor cells under inflammatory conditions mediated by IFN- γ [J]. *Blood*, 2019, 133(19): 2043-55.
- [11] MELGUIZO-SANCHIS D, XU Y, TAHEEM D, et al. iPSC modeling of severe aplastic anemia reveals impaired differentiation and telomere shortening in blood progenitors [J]. *Cell Death Dis*, 2008, 9(2): 128.
- [12] KULASEKARARAJ A G, JIANG J, SMITH A E, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome [J]. *Blood*, 2014, 124(17): 2698-704.
- [13] SAKAGUCHI H, NISHIO N, HAMA A, et al. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia [J]. *Haematologica*, 2014, 99(8): 1312-6.
- [14] DUMITRIU B, FENG X, TOWNSLEY D M, et al. Telomere attrition and candidate gene mutations preceding monosomy 7 in aplastic anemia [J]. *Blood*, 2015, 125(4): 706-9.
- [15] LANE A A, ODEJIDE O, KOPP N, et al. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia [J]. *Leukemia*, 2013, 27(4): 968-71.
- [16] HEUSER M, SCHLARMANN C, DOBBERNACK V, et al. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing [J]. *Haematologica*, 2014, 99(9): e165-7.
- [17] YOSHIZATO T, DUMITRIU B, HOSOKAWA K, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia [J]. *NEJM*, 2015, 373(1): 35-47.
- [18] IMI T, KATAGIRI T, HOSOMICHI K, et al. Sustained clonal hematopoiesis by HLA-lacking hematopoietic stem cells without driver mutations in aplastic anemia [J]. *Blood Advances*, 2018, 2(9): 1000-12.
- [19] FEUSIER J E, ARUNACHALAM S, TASHI T, et al. Large-scale identification of clonal hematopoiesis and mutations recurrent in blood cancers [J]. *Blood Cancer Discov*, 2021, 2(3): 226-37.
- [20] SHANNON K, LINK D C. Soil and seed: coconspirators in therapy-induced myeloid neoplasms [J]. *Blood Cancer Discov*, 2020, 1(1): 10-2.