

参考文献

- [1] Kroto, W. et al., 1985, *Nature*, 318: 162—163.
- [2] Arbogast, J. W. et al., 1991, *J. Phys. Chem.*, 95: 11—12.
- [3] Tokuyama, H. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 7918—1919.
- [4] Sijbesma, R. et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 6510—6512.
- [5] Kratschmer, K. et al., 1990, *Nature*, 347: 354—358.
- [6] Mosmann, T., 1983, *J. Immuno. Methods*, 65: 55—63.
- [7] Harman, D. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7124—7130.
- [8] Wenzhu, L. et al., 1994, *Chin. Phys. Lett.*, 11: 207—210.
- [9] Tsuchiya, T. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Research Communications*, 206: 885—894.
- [10] Kuochu, H. & David, M., 1993, *Nature*, 361: 138—140.

THE PHOTODAMAGE EFFECT OF BUCKYBALL C_{60} ON THE HELA CELLS CULTURED IN VITRO

Huang Wendong Qian Kaixian Li Wenzhu*

(Department of Biological science & Technology, *Department of Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

ABSTRACT

The method of MTT colorimetric assay was used to detect the photodamage effect of C_{60} on the HeLa cells cultured in vitro under different concentrations and photo-intensity. The result showed that when the concentration of C_{60} was $30 \mu\text{g/ml}$ and the photo-intensity reached 4000 Lux, C_{60} could damage most of the cells. The damaged cells detached from the wall of bottles and their shape became round and contractive. The dark particles were increased in the cells and the microvilli were decreased. The surface of the cells was even damaged when the photo-intensity was increased.

Key words: C_{60} Rrradiation HeLa cells Photodamage effect

骨髓高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC) 分化产生巨核细胞的研究

张学军 蒋丽珍 王新明 韩忠朝

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

巨核细胞形成是一个分多阶段的细胞分化成熟过程。通过这些过程,原始干细胞分化并产生巨核细胞祖细胞,继而形成巨核细胞和血小板。近年来对于已定向的巨核细胞祖细胞的增殖和成熟有广泛的研究。许多检测祖细胞的新

方法的应用和多种基因重组造血生长因子的使用,刺激和推动了该研究的进展^[1-3,18]。但是,对于原始干细胞如何分化成巨核细胞祖细胞的过程仍不很清楚。小鼠造血干细胞的分化阶段是不同的,各个阶段的亚群可根据 5-FU 处理

后的再生动力学和对细胞因子的特殊需要来加以区别^[2,6,8]。HPP-CFC-1的特征是在体内抗5-FU处理并能进一步产生HPP-CFC-2的HPP-CFC细胞和晚期祖细胞^[5,6]。有报道HPP-CFC-1和HPP-CFC-2都不直接生成巨核细胞。本研究中,我们观察到以前未曾阐述的小鼠HPP-CFC,这些细胞的生长可以因单用再生障碍性贫血血清(AAS)或联合用IL₃、GM-CSF、IL₆、EPO和SCF而刺激生长。

材料与方 法

造血生长因子

纯化的基因重组小鼠SCF, IL₃, GM-CSF, IL₆和PF4从上海贝特生物技术有限公司购买,基因重组EPO由KIRIN公司提供。纯化的TGF-β1从英国Bio-Technology公司购买。再生障碍性贫血猪血清(AAS)由法国血管血液研究所(IVS)赠送。5-FU从上海旭东海普药业有限公司购买。

小鼠骨髓细胞的制备

本研究使用8周龄Balb/c小鼠,颈椎脱臼法处死小鼠。取出股骨,用2 ml RPMI 1640培养液(GIBCO)冲洗出骨髓细胞。然后,在RPMI 1640中,22℃,250 g离心洗涤2次。5-FU实验组小鼠,按McNiece等^[6]的改良方法,向小鼠腹腔内注射5-FU (150 mg/kg), 8天后收集骨髓细胞。

培养系统

本文使用血浆凝块法^[8]培养骨髓细胞。将骨髓细胞(正常小鼠 $2 \times 10^5/\text{ml}$,或5-FU处理小鼠 $1 \times 10^5/\text{ml}$)培养于35 mm塑料培养皿中。每个培养皿中,总量为1 ml RPMI 1640培养液,其中包含1%牛血清白蛋白(BSA)(Sigma Chemical Co.),10%枸橼酸钠处理的小牛血浆(Flow Laboratory, Paris) 1×10^{-4} M巯基乙醇(Sigma), 0.34 mg CaCl₂和15 U青霉素,15 μg链霉素。此外,实验组添加生长因子或AAS(详见表1)。培养12天后,用滤纸吸干凝块中的水分,加1%多聚甲醛固定,再作乙酰胆碱酯酶染色反应,最后用苏木精染色。

集落再生培养实验

5-FU处理的小鼠骨髓经过12天原代血浆凝块培养后,在倒置显微镜高倍视野下,将单个大克隆用巴

士德吸管吸出,放入RPMI 1640培养液中。用带有小针头的注射器抽取培养液,使细胞分散,计细胞数,按上述培养方法继续培养12天。

克隆的鉴定

按McNiece等^[5]和我们以前^[8,10]的分类方法,将直径为0.5 mm以上的集落,但无乙酰胆碱酯酶阳性反应细胞的致密大克隆定义为HPP-CFC-1;如果其中含5个以上巨核细胞则是HPP-mCFU-MK集落。

结 果

巨大集落形成

由正常和经5-FU处理的小鼠骨髓细胞产生的巨大集落最早出现在含AAS培养基中的第6—8天,高峰在12天。这些集落的直径在0.5 mm—5 mm之间。乙酰胆碱酯酶-苏木精染色显示HPP-mCFU-MK集落中含有大量的颗粒-巨噬细胞和少数未成熟的幼红细胞及大量的巨核细胞(图版图1,图2)。每个HPP-mCFU-MK集落中的巨核细胞数约5—200个。根据巨核细胞的增殖能力,HPP-mCFU-MK集落又可分为A和B两个亚型:A型(图版图1),很像Long等^[4]描述的小鼠BFU-MK那样,每个集落含有42个以上的巨核细胞;B型(图版图2),有11—41个巨核细胞,并混合有大量的粒细胞和红细胞系。使用联苯胺和苏木精染色发现在AAS刺激培养生长的大集落中,有73%的大集落含有母幼红细胞,其数量每个集落中约有10—200个不等。在同样的培养条件下,也有部分巨大集落中没有巨核细胞(HPP-CFU-1,见图版图3)。HPP-mCFU-MK和HPP-CFC-1的出现率,依据添加的因子而异。在加有AAS的正常骨髓细胞和5-FU处理的小鼠骨髓细胞培养中其比例分别是3/4.6和16/42(见表1和表2)。

AAS、生长因子和细胞浓度对HPP-mCFU-MK集落生长的作用

经辐射处理后获得的再生障碍性贫血猪血清(AAS)能刺激巨大集落的生长,而正常猪血清则没有这种作用。表1中显示了正常小鼠骨

表1 正常小鼠骨髓单个核细胞经过培养后所形成的 HPP-CFC 和 HPP-mCFU-MK

添加的因子	HPP-CFC-1	HPP-mCFU-MK	
		A 型	B 型
未添加因子	0	0	0
AAS	3.0±0.5	2.6±0.4	2.0±0.5
IL 3 + IL 6	2.2±0.2	0	0
IL 3 + IL 6 + GM-CSF	4.0±0.7	0	0.8±0.3
IL 3 + GM-CSF + SCF	4.2±0.8	0	0
Epo + GM-CSF + SCF	3.5±0.3	0	0
IL 3 + IL 6 + GM-CSF + Epo	5.2±0.9	1.0±0.2	1.5±0.2
IL 3 + IL 6 + GM-CSF + Epo + SCF	7.2±0.7	2.1±0.4	2.5±0.7

表中数值是3次重复实验,每碟内3种不同集落,各种集落数目的平均值±均数标准误(SEM)。每碟的单个有核细胞的接种密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。添加的生长因子浓度为:IL 3(100 U/ml), IL 6(20 ng/ml), GM-CSF(5 ng/ml), Epo(1 U/ml), SCF(20 ng/ml), AAS均是10%。

表2 5-FU 处理的小鼠骨髓单个核细胞经过培养后所形成的 HPP-CFC 和 HPP-mCFU-MK

添加的因子	HPP-CFC-1	HPP-mCFU-MK	
		A 型	B 型
未添加因子	0	0	0
AAS	16.0±2.0	20.0±2.0	22.0±1.0
IL 3 + IL 6	8.0±0.8	0	0
IL 3 + IL 6 + GM-CSF	14.0±1.0	0	1.6±0.2
IL 3 + GM-CSF + SCF	12.0±2.0	0	2.4±0.3
Epo + GM-CSF + SCF	10.0±0.3	0	0
IL 3 + IL 6 + GM-CSF + Epo	14.0±2.0	2.0±0.2	6.0±0.7
IL 3 + IL 6 + GM-CSF + Epo + SCF	20.0±2.0	6.0±1.0	8.0±1.0

表中数值是4次重复实验,每碟内3种不同集落,各种集落数目的平均值±均数标准误(SEM)。每碟的单个有核细胞的接种密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。添加的生长因子浓度为:IL 3(100 U/ml), IL 6(20 ng/ml), GM-CSF(5 ng/ml), Epo(1 U/ml), SCF(20 ng/ml), AAS均是10%。

髓细胞经不同条件培养的结果。在未用 AAS 和生长因子的对照组中,没有观察到 HPP-CFC 集落。而加有 AAS 的实验组中,有 HPP-mCFU-MK 和 HPP-CFC-1 集落生长。联合使用多种细胞因子,以适合于诱导巨核细胞生长的浓度^[8,19,20],如 IL₃(100 U/ml), GM-CSF(5 ng/ml), IL₆(20 ng/ml), SCF(10 ng/ml)和 Epo(1 U/ml),加入到培养液中,经过一段时间后,可观察到 HPP-mCFU-MK 和 HPP-CFC-1 集落生长。

5-FU 处理的小鼠骨髓细胞的实验组,计算有核细胞,以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的浓度接种于培养皿。在单一使用了 AAS 时, HPP-mCFU-MK

集落的出现频度,比来源于正常小鼠骨髓细胞对照组高出5—9倍之多。联合使用 IL₃, IL₆, GM-CSF 等3种因子,也可以促使 HPP-CFC-1 和 HPP-CFU-MK B 型的形成。但是, HPP-CFU-MK A 型(表2)的生长,却需要4或5种细胞因子。在 AAS 和其他细胞因子使用组中, HPP-CFU-MK 的数量之差异有显著性($P < 0.05$, Student's *t* 检验)。TGF- β 1 和 PF 4 是两种强有力的巨核细胞生长抑制因子^[7,8,10]。将 TGF- β 1 和 PF 4 以有效抑制 CFU-MK 生长的浓度,加入到 5-FU 处理的小鼠骨髓细胞培养液中,没有发现两者有抑制 HPP-mCFU-MK 生长的作用(表3)。

表3 TGF β 1和PF4对HPP-mCFU-MK生长的作用

因子	HPP-mCFU-MK	HPP-CFC-1	mCFU-MK	CFU-MK	CFU-GM
AAS	20 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3	248 $\pm$ 9	158 $\pm$ 4
AAS+TGF β 1	26 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1☆	42 $\pm$ 4☆	78 $\pm$ 5☆
AAS+PF4	24 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1☆	90 $\pm$ 3☆	134 $\pm$ 4

表中的实验细胞来源于5只5-FU处理的小鼠骨髓,接种密度为 $1\times 10^5/\text{ml}$,在AAS及有无TGF β 1,PF4存在的条件下,形成的5种不同集落数目。根据4次重复实验结果,取其平均值 $\pm$ 均数标准误(SEM)。☆号是与AAS比较, $P<0.05$ (Student's test)。

表4 源于HPP-CFC集落细胞经第2次培养再形成的集落

添加的因子		HPP-mCFU-MK		
原代培养	第2次培养	HPP-CFC-2	A型	B型
AAS	AAS	6 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0.3	3 $\pm$ 0.3
AAS	IL3+IL6+GM-CSF+SCF	4 $\pm$ 1	0	0
IL3+GM-CSF+SCF	AAS	0	0	0

用血浆凝块方法作了3次重复实验,每次每项一式三份。各种集落数目的平均值 $\pm$ 均数标准误(SEM)。原代培养的细胞来源于5-FU处理的小鼠骨髓,接种密度为 $1\times 10^5/\text{ml}$,经过12天培养后,吸出已形成的巨大集落的细胞,放入RPMI-1640培养液中,以 2×10^5 的密度,用前次同样的方法,再培养12天。添加的生长因子和AAS浓度见表1。

HPP-mCFU-MK集落细胞的增殖潜能

挑选出单用AAS或几种因子联合应用刺激生长了12天后的原代培养的巨核细胞集落,再次分别用AAS或联合应用几种因子,血浆凝块培养12天,结果见表4。三组中,只有原代培养和第2代培养单用AAS实验组能再次形成HPP-CFU-MK集落。

讨 论

本研究显示正常和5-FU处理的小鼠骨髓中一种新的多能干细胞群,我们称之为HPP-mCFU-MK。这些细胞除能形成HPP-CFU型集落^[2,5,6]外,还有大量的巨核细胞。这些细胞与AAS或3种以上造血因子联合刺激作用有关,但是,对于可抑制晚期巨核细胞祖细胞生长浓度的TGF- β 1和PF4不敏感。我们曾在培养的小鼠和人骨髓细胞中鉴定出一种巨核细胞祖细胞,该祖细胞可以形成小型的混合了其他细胞的巨核细胞集落。这些祖细胞被命名为mCFU-MK。因为强调巨核细胞,故也称作CFU-GEMM或CFU-Mix^[8,10]。我们认为HPP-mCFU-MK较之mCFU-MK为早,因

为mCFU-MK增殖能力相对有限,常常形成仅有少数巨核细胞的小集落。而且mCFU-MK对单一因子的刺激,如IL₃或GM-CSF^[8,10]有所反应。

很明显HPP-mCFU-MK是早期干细胞,因为它可以在第二次培养中再生出HPP-mCFU-MK和HPP-CFC-2集落。HPP-mCFU-MK到底是不是以前发现的HPP-CFC-1呢?这种可能性是应该考虑的。因为当培养条件中缺乏适当的因子,或细胞因子的浓度低于巨核细胞生长所需要的浓度时,HPP-CFC-1可能不表达出其潜能。然而,本实验所得到的结果显示HPP-CFC是异源性的。因为HPP-mCFU-MK和HPP-CFC-1集落在同一培养皿中被观察到。此外,HPP-mCFU-MK集落的生长基本上与AAS刺激或3种以上细胞因子联合应用相一致。HPP-CFC-1则可用单一的^[5,6]GM-CSF、M-CSF和IL₃、或两种合用刺激生长(表1和表2)。然而,仅用AAS而不合用多种因子的原代培养,12天后得到的HPP-mCFU-MK,经过第二次培养,又能产生HPP-mCFU-MK。来自正常小鼠和5-FU处理

的小鼠的实验结果显示了某些有趣的差异(见表1和表2)。用于正常的小鼠骨髓细胞实验时,5种细胞因子的效果与AAS相似。但是,用于5-FU处理的小鼠骨髓细胞实验时,5种细胞因子合用的效果显著地低于AAS。该结果暗示同步化细胞是必要的。因为5-FU处理的小鼠骨髓内晚期成熟的细胞已被排空。AAS含有某种因子,该因子可能由同步化细胞释放。长期以来,人们认为AAS含有一种称作MK-CSF^[1,11-13]的巨核细胞克隆生长因子和包括Epo,GM-CSF,G-CSF和IL₆在内的其他几种生长因子^[14-17]。有可能从受放射处理猪得到的AAS含有MK-CSF,从而对HPP-mCFU-MK的生长有作用。如果有纯化的MK-CSF,就可以得到肯定的结果。

总之,我们观察到一种小鼠多能祖细胞,其特点是在多种因子刺激下能形成大量的巨核细胞,并且在第二次血浆凝块培养时,具有再次形成集落的能力。本研究提供了一个研究正常和病理状态下巨核细胞发生的新方法。

摘 要

本研究用正常和5-FU处理的小鼠骨髓细胞,作血浆凝块培养,对一种称作HPP-mCFU-MK的HPP-CFC亚型细胞集落进行体外追踪。发现HPP-mCFU-MK不但能形成符合HPP-CFC标准的巨大集落,而且能产生大量的巨核细胞。该巨大集落的生长,依赖添加再生障碍性贫血猪血清(AAS)或合用三种以上的基因重组造血生长因子而增强,在体外不被TGF- β 1和PF4抑制。原代培养12天所得到的HPP-mCFU-MK集落,用AAS刺激可再次形成集落。该结果提示HPP-mCFU-MK是小鼠骨髓中多能祖细胞的一个亚型。

关键词: 高增殖潜能集落形成细胞 巨核细胞 细胞因子

参 考 文 献

- [1] Han Z. C. & Caen J. P., 1991, *Intern. J. Hematol.*, 54: 3-14.
- [2] Moore M. A. S., 1991, *Blood*, 78: 1-19.
- [3] McDonald T. P., 1989, *Int. J. Cell Cloning*, 7: 139-55.
- [4] Long M. W. et al., 1985, *J. Clin. Invest.*, 76: 431-8.
- [5] McNiece I. K. et al., 1987, *Exp. Hematol.*, 15: 972-7.
- [6] McNiece I. K. et al., 1988, *Blood*, 72: 191-5.
- [7] Han Z. C. et al., 1991, *C. R. Acad. Sci.*, 313: 553-8.
- [8] Han Z. C. et al., 1992, *Br. J. Haematol.*, 81: 1-5.
- [9] Han Z. C. et al., 1992, *Int. J. Hematol.*, 55: 281-6.
- [10] Han Z. C. et al., 1990, *Blood*, 75: 1234-9.
- [11] Hoffman R., 1989, *Blood*, 74: 1196-212.
- [12] Mazur E. M. et al., 1990, *Blood*, 76: 290-7.
- [13] Tsukada J. et al., 1992, *Blood*, 80: 37-45.
- [14] Erslev A. J. et al., 1987, *J. Lab. Clin. Med.*, 109: 429-34.
- [15] Straneva J. E. et al., 1992, *Exp Hematol.*, 20: 47-50.
- [16] Watari K. et al., 1989, *Blood*, 73: 117-22.
- [17] Yamasaki K. et al., 1988, *J. Clin. Invest.*, 82: 255-63.
- [18] 韩忠朝、阮长耿, 1993, 中华血液学杂志, 14: 159-61
- [19] 万海英等, 1994, 中华血液学杂志, 15(5): 259-60.
- [20] 万海英等, 1994, 实验血液学杂志, 2(3): 263-67.

A STUDY OF MEGAKARYOCYTES DIFFERENTIATED FROM MURINE HIGH PROLIFERATIVE- POTENTIAL COLONY-FORMING CELLS (HPP-CFC) IN VITRO

ZHANG Xue Jun JIANG Li Zhen WANG Xin Ming, HAN Zhong Chao
(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

ABSTRACT

In the present study, a new subset of HPP-CFC denominated high-proliferative-potential mixed colony-forming unit-megakaryocyte, (HPP-mCFU-MK), was detected in normal and 5-fluorouracil (5-FU) treated murine bone marrow cells in plasma clot cultures. The HPP-mCFU-MK was not only able to form macroscopic colonies that fit the criteria of the HPP-CFC colony, but also to grow a number of megakaryocytes. Their growth was dependent on complementing either aplastic anemia serum (AAS) or a combination of three or more recombinant hematopoietic growth factors, but it was ineffective for adding inhibitory factors, transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and platelet factor 4 (PF 4), in vitro. The recolonizing of the 12-day-old HPP-mCFU-MK colonies picked up from AAS-stimulated primary cultures caused a secondary formation of HPP-CFC colonies. These results strongly suggest that HPP-mCFU-MK is a new subset of stem cells in murine bone marrow.

Key words: High proliferative potential colony-forming cells(HPP-CFC) Megakaryocyte,
Platelet factor 4 (PF 4) Cytokine

脑啡肽对小鼠神经母细胞瘤细胞脂褐素影响的实验研究*

孙晓江 蔡琰 苏敏 王瑀 张毅 邓锦波

(上海第二医科大学附属仁济医院神经生物学实验室 上海 200001)

孙九伶 高彦军

(承德医学院附属医院神经生物学实验室)

神经肽的研究是神经科学研究的前沿课题。随着科学研究的不断深入和社会逐步老龄化,衰老与抗衰老研究已成为国际社会所共同关注的课题之一。神经细胞老化是老年学的核心问题。我们先前的研究已表明,精氨酸加压素、神经降压素和强啡肽这三种神经肽可显著降低神经母细胞瘤细胞 $A_2(NBA_2)$ 内脂褐素的

积累^[1];分别使 cAMP 和 cGMP 水平及 cAMP/cGMP 比值发生改变,将生物信息传入细胞内部^[2];通过 DNA 和细胞总蛋白的变化^[3,4],促进细胞突起数目增加^[5],以使细胞更好地发挥其生物学功能,延长细胞培养寿命^[6],进而

* 上海高等院校科学发展基金及河北省自然科学基金资助