

加入葡萄糖激动因子对细胞有激动作用。采用生长快的 Hep 细胞与胰岛细胞杂交, 获得杂种细胞传多代仍含有一定量的胰岛素, 用这种方法探索研究胰岛细胞延续传代可能是有效的。胰岛细胞经过两个月冷冻保存, 复苏后仍有部分细胞生长较好。

参 考 文 献

[1] 胡远峰等, 1988, 中华器官移植杂志,

9(3):102。

- [2] Mandel TE. 1984, World J. Surg, 8:158.
 [3] Burghen G. A. 1989, Diabetes, 38(Suppl. I):129.
 [4] Warnock G. L. et al., 1989, Diabetes, 38 (Suppl. I):136.
 [5] Takaki R. 1987, Advances in cell culture. 5:1.
 [6] Lafferty KJ. 1983, Ann. Rev. Immunol. 1:143.
 [7] Shimizu T. et al., 1988, Diabetes. 37: 1524.

人 体 骨 髓 细 胞 长 期 培 养 的 建 立

陈志哲 李觉民 洪华山 卓光生

(福建省血液病研究所)

Z Berneman M. Peetermans

(比利时安特卫普大学血液学中心)

骨髓细胞长期培养(Long-term culture of bone marrow, LTCBM)是指骨髓细胞在体外培养体系中造血活性能维持2—3个月以上。1679年More等报告在人体骨髓细胞培养中, 集落形成细胞的活性可维持一个月^[1], 此后对人体骨髓细胞的长期培养进行了许多深入的研究^[2-4]。国内迄今报告的多为小鼠LTCBM。本文介绍我们建立的人体LTCBM的培养体系及方法, 并就人体LTCBM方法学的有关问题作了探讨。

材 料 与 方 法

一、骨髓细胞的采集与制备

10例骨髓细胞均以髂后上嵴骨髓穿刺吸取。抽取骨髓的10ml针筒含1ml的RPMI-1640和5%小牛血清以及不含防腐剂的肝素166u/ml。

5例正常供者的骨髓在采集后, 加入等量RPMI-1640作1:1稀释, 然后再加入预先37℃温浴的2.25%甲基纤维素。每10ml RPMI稀释的髓液加0.45ml甲基纤维素混和后, 在室温中静置30min。吸取上层髓液以RPMI-1640洗涤两次后加入小牛血清制备骨髓细胞悬液, 计数。

5例新鲜尸体(因颅脑外伤和颅内出血死亡半小时内)的髓液加入等量RPMI-1640作1:1稀释, 在5ml淋巴细胞分离液中(比重1.077)轻轻加入8ml RPMI-1640稀释的髓液, 400g离心30min。采集交界面的单个核细胞层, 以RPMI-1640洗涤三次后, 加入小牛血清配制成骨髓细胞悬液, 计数。

二、培养液

Iscove's modified Dulbecco's medium	80%
小牛血清	10%
马血清	10%
氢化考的松	$5 \times 10^{-7} M$

三、培养方法

5例正常供者的骨髓细胞培养于25cm²T培养瓶中, 将 20×10^6 骨髓有核细胞植入8ml上述培养液, 置于二氧化碳孵箱中, 5%CO₂, 饱和湿度, 33℃恒温。5例新鲜尸体骨髓细胞置于6孔培养板中, 细胞浓度为 $2 \times 10^6/ml$, 每孔植入2ml。

四、培养的维持

培养开始后每周更换培养液。先将培养瓶轻轻摇动, 使非粘壁层的细胞均匀分布, 吸取4ml含有非粘壁细胞的上层培养液, 而后注入4ml新鲜培养液。吸出含有非粘壁细胞的培养液, 作细胞计数并测定CFU-GM。细胞离心涂片可作细胞分类、细胞化学、细胞

标志及细胞遗传学检查。每周观察并拍摄粘壁细胞的生长情况。

五、CFU-GM 检测

培养前先作 CFU-GM 测定, 然后每周取非粘壁细胞部分以同样方法测定 CFU-GM, 直至非粘壁细胞部分测不出 CFU-GM 为止。其方法为: 将含有非粘壁细胞成分的培养液以 400 g 离心 15 min, 弃上清液。底部细胞以 RPMI-1640 洗涤 1 次, 以小牛血清制备细胞悬液, 计数。

CFU-GM 采用琼脂培养法, 每 ml IMDM 培养液含 2×10^5 骨髓细胞、0.3% 琼脂、20% 小牛血清、10% 人膀胱癌细胞 5637 条件培养液或人胎盘条件培养液, 置于 35 mm Petri 培养皿中, 5% CO₂, 37°C 恒温。于培养第 10 天计算 CFU-GM, 含有 40 以上的细胞团算为集落。

测定粘壁细胞层的 CFU-GM 方法为: 吸弃全部非粘壁细胞部分, 用 RPMI-1640 轻轻清洗粘壁细胞层表面 2 次, 加入少许 0.1% 胰蛋白酶, 加入适量含小牛血清的 RPMI-1640, 以中止胰蛋白酶的作用。将胰蛋白酶处理后的细胞悬液, 洗涤 3 次, 以小牛血清制备细胞悬液, 计数。然后按上述同样方法测试粘壁细胞的 CFU-GM。

六、细胞离心涂片的细胞学检查

将非粘壁细胞作离心涂片, 以 Giemsa 染色, 观察非粘壁细胞形态, 亦可作细胞化学及细胞标志研究。

粘壁细胞按上述方法以 1% 胰蛋白酶处理后, 制成分散的细胞悬液, 然后离心涂片作细胞学研究。

结 果

一、粘壁细胞层

LTCBM 最具特征性的变化是在培养瓶的底层出现一个融合的粘壁细胞层。起初, 在培养开始后第一周, 一些细胞出现纺锤形改变。数日后, 这些细胞逐渐形成纤维母细胞, 彼此交融连结(图版图 1)。粘壁层细胞数量逐渐增多, 除纤维母细胞外, 可以见到一些多角扁平细胞、上皮样细胞、脂肪细胞及小圆形细胞。这些细胞到培养的第 4 周左右盖满培养瓶的底部, 即融合(confluence)。

在整个融合层中, 纤维母细胞和多角扁平细胞相互交错连结。纤维母细胞向其长轴伸出

纤维丝; 多角扁平细胞体积大, 有较长的伪足样突起。这些细胞可称为基质细胞, 其间分布着众多的大小不等的圆形细胞。大圆形细胞系巨噬细胞, 胞体大而核小, 胞浆中可见到吞噬的颗粒、色素和细胞碎片。小圆形细胞被认为是造血干细胞, 往往群集成堆, 故有鹅卵石(cobblestone)之称(图版图 2)。此外可见到单核样细胞和各阶段粒细胞。脂肪细胞呈散在分布或有小堆集(图版图 3)。

粘壁细胞的组成随着培养时间的延长出现相应的变化。在培养的前 2 周, 纤维母细胞和多角扁平细胞生长占优势, 似乎在为造血干细胞“铺床”。3—4 周, 各种细胞相继出现, 脂肪细胞数量也增多。5—6 周后, 粘壁层的造血细胞中单核-巨噬细胞增多, 而各阶段粒细胞比例减少。这些细胞与基质细胞混杂群居, 交错层叠(图版图 4)。

二、非粘壁层

LTCBM 中的非粘壁细胞随着培养时间的延长而减少, 到培养的 3—4 周, 非粘壁层的细胞数仅及原先的 10%。非粘壁部分的细胞组成也有动态变化。在培养的前 4 周, 以各阶段粒细胞为主, 约占 50—70%, 淋巴细胞约占 10—15%。培养的第 4 周后, 单核细胞和巨噬细胞增多, 淋巴细胞逐渐减少, 仅占 5% 左右, 各阶段的粒细胞亦减少。非粘壁层中的单核细胞非特异性脂酶呈强阳性, 并为氟化钠所抑制。有核红细胞仅见于培养的前 2 周。

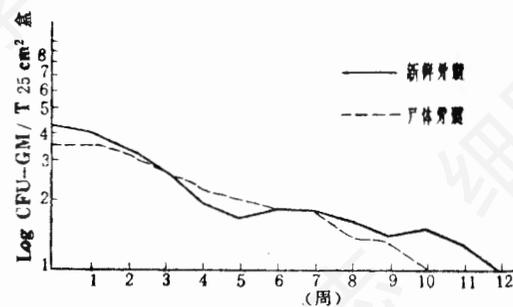


表 1 人体骨髓细胞长期培养非粘壁层的 CFU-GM

三、CFU-GM产量

10例人体骨髓细胞长期培养的非粘壁细胞的CFU-GM产量见表1。

讨 论

一、培养体系的配制和培养条件

我们曾对照不同浓度的氢化考的松对培养液中细胞生长的影响,发现氢化考的松浓度为 10^{-6} M时,脂肪细胞和巨噬细胞生长旺盛,在第3—4周,成片成片的脂肪细胞几乎遮盖了整个培养盒底部,“鹅卵石”造血细胞受到排挤而明显减少。当氢化考的松的浓度为 10^{-7} M时,发现各种细胞生长较差,“鹅卵石”较稀疏、范围较小,唯纤维母细胞和多角扁平细胞占优势。因此在粘壁细胞层,背景较为单调,见不到多种细胞竞相生长的景象。比较了在培养液中添加不添加复方维生素B液和 α -巯基乙醇,未发现非粘壁和粘壁细胞生长方式有何不同。

我们还试用80%IMDM+20%马血清作为培养体系,发现培养瓶中细胞生长不如本文采用的培养体系好,表现为粘壁细胞迟迟不能融合。巨噬细胞比例较高,“鹅卵石”稀少,其它细胞成分也相对稀少。

将培养瓶置于37℃恒温,则细胞生长过于旺盛,一般在第2—3周就完全融合,巨噬细胞和脂肪细胞生长旺盛,而且每周更换培养液时,发现培养瓶中液体明显变金黄色,提示细胞新陈代谢旺盛而培养液pH值下降。

二、骨髓有核细胞的采集与分离

本文应用甲基纤维素和淋巴细胞分离液采集骨髓有核细胞,两种方法均去除了红细胞。但后者清除红细胞比较彻底。有的作者认为可以不去除红细胞,有的则应用右旋糖酐分离有核细胞^[4]。我们的经验发现应用淋巴细胞分离液处理的骨髓有核细胞,在培养瓶中观察粘壁细胞时,由于红细胞清除干净,视野清晰,便于动态观察细胞生长的变化。

吸取骨髓液,可采用骨髓穿刺获得,但有的利用外科手术切除的肋骨,冲洗出骨髓细

胞。用这种方法常能获得比骨髓穿刺更大量满意的骨髓有核细胞^[5]。

三、培养的维持

有一种所谓“二期培养法”,即在培养2—4周后,待粘壁层细胞融合,再加入一次新鲜的骨髓有核细胞。新加入的骨髓细胞可以是自体的骨髓,也可以是异体骨髓。如若异体骨髓,应先对粘壁细胞层8 Gy照射,否则植入后生长不佳^[6]。二期法由于为新加入的骨髓造血细胞提供了基质细胞融合层,即在体外的骨髓微环境已经建立,因此特别对淋巴细胞系列造血的维持较好^[7]。

有的作者每周移除全部非粘壁细胞部分,再加入新鲜培养液^[6],我们采用移除半量非粘壁细胞部分,再加入半量新鲜培养液的方法。比较结果发现全部移除非粘壁细胞部分的方法,在开始头4周CFU-GM产量甚高,但旋即急剧下降。半量移除法则CFU-GM的下降坡度较小(表1)。

四、比较了载玻片6孔培养板和25 cm² T培养瓶方法

后者的CFU-GM产量维持时间长,即LTCBM寿命长。但载玻片法适于对粘壁细胞层的动态观察,每次取出载玻片研究粘壁细胞层,不致于破坏和终止培养^[4]。

五、几个观察指标的意义

1. 融合。融合是指培养中的骨髓基质细胞和造血细胞复盖整个培养瓶底面积,一般应在培养开始后的3~4周达到融合。融合推迟是培养及生长不佳的征象。

2. “鹅卵石”。“鹅卵石”区是许多小圆形细胞的群集堆积,这些小圆形细胞很可能就是造血干细胞^[5-8]。正常情况下这些造血干细胞安家在粘壁层的基质细胞中^[4]。“鹅卵石”的出现是培养成功的一个标志。

3. 脂肪细胞。脂肪细胞一般开始出现于第3周,以后随着培养的老化,脂肪细胞逐渐增多,脂肪颗粒增粗胞体增大。到培养后期,脂肪细胞比例明显增高。脂肪细胞占优势表明

培养“老龄化”。

4. 巨噬细胞。非粘壁层的巨噬细胞的比值随培养时间而增高, 培养后期非粘壁层中绝大多数为巨噬细胞, 因此也可以看作是培养“老龄化”的一个表现。如若正常人的 LTCBM, 培养早期即发现巨噬细胞比例高, 应注意检查是否培养液质量不好或培养条件不佳。

5. CFU-GM 的产量。非粘壁层和粘壁层的 CFU-GM 是判断 LTCBM 寿命的标志, 也是培养成功的标志。培养良好的 LTCBM 一般应能维持产生 CFU-GM 达 8 周以上。关于粘壁层的 CFU-GM 产量, 有的作者报告它比非粘壁层高, 但文献中亦有相反的结果^[9,10]。但普遍认为非粘壁层的 CFU-GM 形成细胞来源于附着在粘壁层的基质细胞中的造血祖细胞^[4]。

6. 粘壁层剥脱。LTCBM 老化时, 非粘壁细胞数量减少, 且绝大多为巨噬细胞, 此时粘壁层的细胞不断重叠, 使粘壁层增厚, 基质细胞互为层叠卷曲, 继则出现小斑脱区, 最终见成片增厚的粘壁层剥脱, LTCBM 至此告终。

摘 要

人体骨髓细胞长期培养可维持造血活性达 2—3 个月。10 例人体骨髓有核细胞植入一种复合液体培养体系, 观察到一层融合的粘壁细胞层, 包含骨髓造血细胞和各种骨髓基质细胞。在粘壁细胞层上方为非粘壁细胞层, 其细胞来自粘壁层。动态观察粘壁层和非粘壁层

的生长情况, 可发现细胞的生长和组成有一定规律性变化。定期测定非粘壁细胞层的 CFU-GM 产量, 可推断培养体系中粒系祖细胞的生长情况。

图 版 说 明

1. LTCBM 粘壁层的纤维母细胞开始交融连接。第 2 周。× 250
2. LTCBM 粘壁层, 第 4 周。许多小圆形细胞群集成堆, 酷似“鹅卵石”。× 250
3. LTCBM 粘壁层, 第 4 周的脂肪细胞小堆集。× 250
4. LTCBM 第 6 周, 骨髓基质细胞和造血细胞交错层叠。× 250

参 考 文 献

- [1] More, M A S. et al., 1979, *Blood Cells*, 5:297—311.
- [2] Gartner, S. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)*., 77:4756—4759.
- [3] Porter, C G. et al., 1981, *Clin. Lab. Haematol.*, 3:245—255.
- [4] Charbord, P. et al., 1986, *Nour. Rev. Fr. Hematol.*, 28:75—79.
- [5] Greenberg, H M. et al., 1981, *Blood*, 58:724—732.
- [6] Takahashi, M. et al., 1985, *Exp. Hematol.*, 13:926—931.
- [7] Touw, I. et al., 1984, *Blood*, 64:656—661.
- [8] Hocking, W G. et al., 1980, *Blood*, 58:118—124.
- [9] Coulombel, L. et al., 1983, *Blood*, 62:291—297.
- [10] Touw, I. et al., 1983; *Blood*, 61:770—774.

新 书 介 绍

国家科委编辑、中国法制出版社出版的《中华人民共和国科学技术法规选编》汇集了自 1985 年科技体制改革以来至 1990 年为止的、由中共中央、全国人大、国务院、国家科委、国防科工委、国务院有关综合职能部门发布的现行有效的科技法规和法规性文件; 精选了建国后至 1985 年以前发布实施的、至今对科技工作仍有重要意义的科技法规文件; 以及一些尚未形成正式法规, 但又必须执行的重要科技政策性文件。本书还囊括了一些与科学管理有关的重要法规文件。此外, 本书收录了一些法规文件的标题, 虽未引正文, 但均注明发布单位、时间、出处等, 列入附录中。

需要本书的单位和个人请与国家科委科技体制与管理研究所(北京西城区兵马寺胡同19号邮编100034)肖威、苏格联系。

沪区单位可向本编辑部索要订单, 来函即寄。