

作用。这些报道的不同可能与实验条件不同有关。本实验的条件与上述报道也不尽相同。这是在使用 neo 作为选择基因时需要考虑的问题。

HPV-11 和 neo 共染诱导的转化灶数是 neo 单独诱导的 3.7 倍,并在转化的细胞中含有该两种 DNA(图版图 2)。由此虽可证明 HPV-11 的转化作用,但该两种 DNA 对细胞的转化作用是彼此单独的,抑是协同的?尚需进一步研究。

摘 要

本实验将 neo 及 HPV-11 两种 DNA 共同转染 NIH 3 T 3 细胞,以 G 418 抗生素作为选择剂,对诱导的转化灶进行筛选。同时还就 G 418 对 NIH 3 T 3 细胞的毒性进行了观察。neo 单独使用诱导的转化灶数为 $44.00/1 \times 10^5$; neo 与 HPV-11 合用诱导的转化灶数为 $162.66/1 \times 10^5$ 。由 neo 转化的细胞含有 neo 基因,由 neo 和 HPV-11 转化的细胞内含有该两种基因。

图 版 说 明

1. 示转化灶的形成。A 由 pSV-2 neo + pHPV-11

转染,可见大量转化灶。B 由 pSV-2 neo 转染,可见较少转化灶。C 对照,无转化灶出现。DNA 转染后 4 周,福尔马林固定,结晶紫染色,缩小 0.55 倍。

2. 克隆转化灶细胞 DNA 与有关探针点杂交显影。A: 与 pSV-2 neo 杂交结果,上排为标准 neo,从左至右以 0.125 μg 作倍比稀释。下排从左至右分别为 pSV-2 neo + pHPV-11 转化细胞之克隆 a, b, c, d 及 pSV-2 neo 转化细胞之克隆 a, b。所有克隆细胞均含有 neo DNA。B: 与 pHPV-11 杂交之结果,上排为标准 HPV-11 DNA,从左至右的 0.125 μg DNA 作倍比稀释。下排材料从左至右与 A 的下排同,但 pSV-2 neo + pHPV-11 转化细胞克隆含 HPV-11 DNA, neo 转化细胞克隆 a 及 b 不含 HPV-11 DNA。

参 考 文 献

- [1] Southern, P. J. and Berg, P., 1982, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 327-341.
- [2] Yasumoto, S. et al., 1986, *J. Virol.*, 57: 572-577.
- [3] Chesters, P. M. and McCance, D. J., 1985, 66: 615-620.
- [4] Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. PP. 280-281, CSH.
- [5] Graham, F. L. and Van der Eb, A. J., 1975, *Virology*, 52: 456-467.
- [6] Gissman, L. et al., 1984, *J. Invest. Dermatol.*, 83: 26-28.

人体骨髓长期培养中粘壁层的基质细胞

陈志哲 李觉民 洪华山 林艳娟

(福州,福建省血液病研究所 350001)

人体骨髓长期培养 (HLTBMC) 能维持粒-单核细胞的造血达数月之久。这种粒-单核细胞的长期造血依赖于造血细胞和粘壁层的基质细胞之间的密切互相作用。所谓基质细胞包括成纤维细胞、脂肪细胞、巨噬细胞和内皮细胞等^[1]。有证据表明 HLTBMC 基质细胞中的成纤维细胞有别于通常骨髓中的成纤维细胞。后者在不同的培养条件下可以传代生长。利用表面标记可以将骨髓基质细胞中各种不同的细胞群体辨别开来,从而进一步研究它们各自的功

能特性。本研究报告 HLTBMC 粘壁层中基质细胞的抗原表型,并与两次传代的存在于骨髓的成纤维细胞、皮肤成纤维细胞和脾脏的成纤维细胞作一比较。此外,本研究还报告 HLTBMC 中各种不同的基质细胞的分布。

材 料 与 方 法

一、骨髓细胞长期培养

1. 自髂后上棘穿刺采取骨髓液。抽吸髓液的 10 ml 针筒内预先装有 1 ml RPMI-1640, 5% 小牛血

清和 166 U 不含防腐剂的肝素。

2. 髓液以等量 RPMI-1640 稀释, 加入甲基纤维素, 充分混匀, 终浓度 0.1%。30 分钟后吸取上层骨髓有核细胞, 以 RPMI-1640 洗涤两次, 加入小牛血清制成细胞悬液, 计数。

3. 培养体系 IMDM 80%, 小牛血清 10%, 马血清 10%, 氢化考的松 5×10^{-7} mol/L, 青霉素 100 IU/ml, 链霉素 100 μ g/ml。

4. 培养方法 制备骨髓细胞悬液, 使每 ml 培养液含 3×10^6 有核细胞。在 6 孔培养板中以盖玻片法作 HLTBMC, 每孔加 2 ml 培养液。置于 5% CO₂ 温箱中, 饱和湿度, 33°C 恒温, 每周半量更换培养液^[2]。

二、成纤维细胞

10 ml IMDM (含 15% 小牛血清) 中加 20×10^6 骨髓有核细胞于 T-25 cm² 培养瓶, 置于 37°C 温箱中培

养, 每周更换半量培养液。待培养瓶底部细胞汇合时, 粘壁层细胞以 0.25% 胰蛋白酶 (溶解于 PBS, pH 7.4) 处理后, 传代培养。经过两次传代培养后, 经胰蛋白酶处理的成纤维细胞接种于培养瓶和 6 孔培养板中, 以便作免疫荧光检查。皮肤成纤维细胞培养方法同此。脾脏成纤维细胞取自新鲜尸体脾脏。方法为: 切一小块脾组织, 剥去脾被膜, 将脾髓切成小碎块, 置于生理盐水中, 再用吸管反复吹打, 然后将细胞悬液以淋巴细胞分离液处理, 收集单个核细胞, 以 RPMI-1640 洗涤两次, 培养方法同上。

三、免疫荧光检查

对培养 4 周的 HLTBMC 基质细胞, 传代两次的骨髓成纤维细胞、皮肤成纤维细胞以及脾脏成纤维细胞, 用下述单克隆抗体按常规方法作间接免疫荧光检查:

单克隆抗体	抗原分布(特异性)	来源
CD 10(J ₉)	幼稚 B 细胞, 粒细胞	Coulter Clone
FIB 86.3	人乳腺成纤维细胞	Dr Z Berneman
CD 13(My 7)	单核细胞、粒细胞	Coulter Clone
CD 71(OKT ₉)	运铁蛋白受体	Ortho Diagnostics
CD 14(My 4)	单核巨噬细胞	Coulter Clone
CD 33(My 9)	幼稚粒、单核细胞	Coulter Clone
CD 25(Tac)	活化 T 和 B 细胞	Coulter Clone
HLA-DR (OKIa1)	HLA-DR	Ortho Diagnostics
CD 19(B 4)	B 细胞	Coulter Clone
CD 45	"全"白细胞	Behring
EN-4	内皮细胞	Sanbio
PAL-E	内皮细胞	Sanbio

结 果

一、HLT BMC 中基质细胞的细胞标记

采用间接免疫荧光反应技术, 测定不同的基质细胞对不同的单克隆抗体的反应情况, 列于表 1。我们如将粘壁层细胞预先与人血清孵育, 发现免疫荧光并没有减弱或消失, 说明此种免疫荧光不可能是抗体的所谓的非特异性结合。但是我们注意到当采用直接免疫荧光技术时, 确有非特异性结合现象存在。在这种情况下荧光在细胞外间质中也出现, 表现为弥漫性或散在性荧光, 其强度比细胞表面的荧光更明显。此时如果用血清处理粘壁层, 则细胞外间质的免疫荧光明显减弱或消失, 而细胞表面

的荧光则不减弱。

粘壁层基质细胞中的成纤维细胞对 CD 10 呈阳性反应, 巨噬细胞表现阴性或弱阳性。FIB 86.3 对成纤维细胞、巨噬细胞及小圆形造血细胞均表现强阳性, 但脂肪细胞呈阴性反应。有趣的是 CD 13 (一种粒-单核细胞抗原) 不仅在小圆形造血细胞上可测出, 而且在巨噬细胞、成纤维细胞和脂肪细胞上也能测出。CD 71 (转铁蛋白受体) 对所有成纤维细胞、部分巨噬细胞起阳性反应。脂肪细胞如若脂滴少, 则呈弱阳性反应。如若脂肪细胞充分发育, 脂滴密集, 则 CD 71 呈阴性反应。

本研究发现巨噬细胞对 CD 19 呈阳性反应, 而 CD 19 一直被认为仅限于 B 细胞系列,

表1 HLTBMC中的基质细胞的膜标记

单克隆抗体	HLTBM C		
	成纤维细胞	脂肪细胞	巨噬细胞
CD 10	+	+	-/±
FIB 86.3	+	-	±
CD 13	+	+	+
CD 71	+	-/±	-/±/+
CD 14	-	-	+
CD 33	-	-	±
CD 25	-	-	+
HLA-DR	-	-	+
CD 19	-	-	+
CD 45	-	-	+
EN 4	-	-	±
PAL-E	-	-	-

+ 阳性 - 阴性 ± 弱阳性

但最近有报告急性非淋巴细胞白血病,特别是急性单核细胞白血病,CD 19亦呈阳性反应。在所有粘壁层基质细胞中未见任何胞浆对DAKO-desmin起阳性反应。

二、HLTBM C的成纤维细胞和其他成纤维细胞膜标记的比较

以两次传代的骨髓成纤维细胞、皮肤成纤维细胞以及脾脏成纤维细胞作膜免疫标记分析,并与HLTBM C的成纤维细胞进行比较,结果发现这些成纤维细胞对CD 10、FIB 86.3 CD 13和CD 71均呈阳性反应。但骨髓成纤维细胞和脾成纤维细胞对CD 71的阳性反应有时非常微弱,而且脾成纤维细胞对CD 10和CD 13的阳性反应表现出不均一性,部分细胞呈阴性。

应用免疫荧光检查发现脾脏和骨髓成纤维细胞对EN-4和PAL-E呈阴性反应(EN-4和PAL-E是内皮细胞的膜标记的抗体),同时对Von-Willebrand因子抗体亦呈阴性反应。我们还取胎盘脐静脉内皮细胞作免疫荧光检查,发现脐静脉内皮细胞不仅对vWF、EN-4和PAL-E起阳性反应,而且对CD 13、FIB 86.3和CD 71也起阳性反应。但脐静脉内皮细胞对CD 10呈阴性反应。

三、HLTBM C中各种基质细胞数的动态变化

在培养的第2、4、8周,计数粘壁层基质细胞的绝对值,结果列于表2。统计学分析结果:

(1) 粘壁层细胞总数在2周时大于8周时(P=0.05)

(2) 小圆形造血细胞数在4周时大于8周时(p=0.025)

(3) 巨噬细胞数在8周时大于成纤维细胞数+脂肪细胞数(p=0.025)

(4) 巨噬细胞数在8周时大于小圆形造血细胞数(p=0.025)

讨 论

本研究结果表明HLTBM C基质细胞中的成纤维细胞,其抗原表型与两次传代的骨髓成纤维细胞、皮肤及脾脏的成纤维细胞大致相似。基质细胞中的脂肪细胞的表型也与之类似,但有一定差异,即CD 71(转铁蛋白受体)阴性或弱阳性,而且FIB 86.3阴性。对上述结果可用实验研究来解释,即骨髓中的成纤维细胞在氢化考的松的作用下可以转变为脂肪细胞^[3,4],而且骨髓脂肪细胞的碱性磷酸酶阳性^[5]。当然有时不同细胞表现出共同的抗原型,不应当武断地认为这些细胞是互相转化而来。例如,脐静脉内皮细胞和骨髓成纤维细胞均表现出CD 13⁺,FIB 86.3⁺和CD 71⁺,但尚无证据认为它们在细胞发生和分化中有何联系。况且,即使像HLTBM C的基质成纤维细胞和骨髓成纤维细胞有着相同的抗原型,它们至少在功能上是有着差别的^[1]。

目前还没有一种单克隆抗体仅对成纤维细胞或仅对基质细胞中的成纤维细胞起特异性反应,有些单克隆抗体仍然对多种不同的成纤维细胞起反应,例如6-19对皮肤和骨髓成纤维细胞以及胚胎肺脏的成纤维细胞起反应,同时又与HLTBM C的基质细胞和脐静脉的内皮细胞起反应。^[6]有的作者力图寻找一种单克隆抗体,

表2 HLTBMC中粘壁细胞的数量比*

细胞类型及细胞数	培养的周数		
	2周	4周	8周
总粘壁细胞数($\times 10^3/\text{cm}^2$)	107 \pm 53	101 \pm 63	56 \pm 35
成纤维细胞及脂肪细胞	22 \pm 11	32 \pm 28	14 \pm 14
巨噬细胞	19 \pm 15	30 \pm 39	28 \pm 15
小圆形造血细胞	66 \pm 46	39 \pm 32	14 \pm 9
基质细胞/粘壁细胞数			
成纤维细胞及脂肪细胞(%)	26.3 \pm 19.6	31.0 \pm 12.0	22.3 \pm 7.6
巨噬细胞(%)	20.1 \pm 10.4	26.6 \pm 16.0	54.0 \pm 9.6
小圆形造血细胞(%)	53.7 \pm 25.1	42.4 \pm 24.4	23.8 \pm 9.8

* 数字取自6个不同的正常 HLTBMC

旨在能特异性地与 HLTBMC 中的多角形基质细胞起反应, 结果生产出的单克隆抗体却对多种马血清蛋白起反应。因此, 欲区分众多的 HLTBMC 中的基质细胞, 有时应采用排除法: 例如已知巨噬细胞对 CD 14 呈强阳性反应, 而内皮细胞对 EN-4 呈强阳性反应, 而成纤维细胞对 CD 14 和 EN-4 均呈阴性反应。

此外我们应用银染色法观察 HLTBMC 中的网状纤维(资料待发表), 发现培养4周后的 HLTBMC 网质中网状纤维增多, 而且此时基质成纤维细胞+脂肪细胞的数量与非巨噬细胞性造血细胞的数量相当(表2)。这比起体内骨髓中造血细胞占绝对优势而网状细胞比例极少的现象, 似乎说明在 HLTBMC 中存在着基质成纤维细胞和网状纤维增生过度的情况, 这可能是 HLTBMC 后期造血功能急剧减退的原因之一。

摘 要

应用免疫荧光技术对人体骨髓长期培养(HLTBMC)粘壁层细胞作了研究, 发现在不同的基质细胞中有着下列表面标记: 基质成纤维

细胞 CD 10⁺, FIB 86.3⁺, CD 13⁺, CD 71⁺; 脂肪细胞 CD 10⁺, FIB 86.3⁺, CD 13⁺, CD 71⁺/-, CD 14⁺, CD 33⁺, CD 25⁺, HLA-DR⁺, CD 19⁺, CD 5⁺, 基质成纤维细胞的标记与两次传代的骨髓成纤维细胞以及皮肤和脾脏的成纤维细胞相似。HLTBM C 中的成纤维细胞较之非巨噬细胞的小圆形造血细胞, 数量上占很大的优势, 加之镀银染色发现网状纤维增多, 提示 HLTBMC 后期造血活性的消失可能与临床上的骨髓纤维化有着相似的机理。

参 考 文 献

- [1] Liesveld J L. et al., 1989, *Blood*, 73: 1794—1803.
- [2] Chen Z Z.(陈志哲) et al., 1989, *Leukemia*, 3: 162—164.
- [3] Greenberger J S. et al., 1979, *In Vitro*, 15, 823—827.
- [4] Mc Intyre A P. et al., 1986, *Exp Hematol.*, 14: 833—838.
- [5] Bianco P. et al., 1988, *Brit. J. Haematol.*, 68: 401—406.
- [6] Abboub C N. et al., 1986, *Blood*, 68: 1196—1201.

《实验生物学报》(季刊)国内邮发代号4—152, 欢迎订阅。