

培养条件下以及移植后的发育情况。采用聚合法使 Wistar-Imamichi 大鼠和 ICR 小鼠的早期胚胎聚合为一体,然后用于体外培养,并进行移植。实验结果表明,大小鼠异种间嵌合胚在含 20%FCS 的 Whitten 溶液中有 80.8%的胚可发育为囊胚期胚胎。这种胚胎在受体大鼠和小鼠,均能着床,着床率分别为 51.3%和 53.7%,没有显著差异。着床后的胚胎能够维持到妊娠第 10 天左右,但以后很快退化、死亡,其原因有待进一步探索。

参 考 文 献

[1] Lulie Ann Miller, 1984, *Bioscience*, Vol.

34, No 5, 290.

[2] Tarkowski, A. K., 1961, *Nature*, 190, 857—860.

[3] Mintz, B., 1964, *J. Exp. Zool.*, 157:85—100, 273—292.

[4] Stern M. S., 1973, *Nature*, Vol. 243, June, 22, 472—473.

[5] 高桥文明,藤代克彦等,1986,哺乳卵研志, Vol. 3 No 2 73—77.

[6] Tachi, S., Tachi, C., 1980, *Develop. Biol.* 80, 18—27.

[7] Tarkowski, A. K., 1962, *J. Embryol. Morphol.* 10, 476—495.

人胎肝细胞裂解液对照射小鼠多能造血干细胞的影响

史剑慧 程文英 王建平 徐萍 丁志圣 罗伟华 莫素珍

(上海医科大学放射医学研究所 200032)

在胎肝移植输注中,人们已经注意到除造血细胞对患者造血功能的支持和替代外,还有造血刺激因子的作用。本文采用内、外源脾结节测定法和流式细胞术,观察了人胎肝细胞经反复冻融裂解后的胎肝细胞裂解液(fetal liver lysate, FLL)及其洗脱峰组分对受照小鼠多能造血干细胞的影响,为胎肝移植有效作用机理提供实验依据。

材 料 和 方 法

1. 动物及照射条件 10—12 周龄的 BALB/C 及 ICR 雄性小鼠,体重 24 ± 2.5 g; ^{60}Co γ 射线,照射距离 80 cm,剂量率 1.0 Gy/min。

2. FLL 制备及分离 从妊娠 4—5 月的水囊引产胎儿中无菌取出肝脏,制成单细胞悬液,以生理盐水洗涤后调整细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml,反复冻融破碎细胞,4℃ 22500 × g 离心,20 min,取上清液,此即为 FLL。经 Sephacryl S-300 凝胶柱(瑞典 Pharmacia 生产)过滤洗脱 FLL,以 280 nm 紫外分光光度法及 Hartree 酚试剂检测 FLL 洗脱液组分的蛋白含量,并经聚丙烯酰胺凝胶电泳确定各洗脱峰的分子量范

围。

3. 外源性脾结节测定 经 6 Gy 照射的供体小鼠于照后 24 h 腹腔注射 FLL 1 ml/鼠,并将其照后 3、7、10 和 15 天之股骨骨髓,由尾静脉输注至经 8 Gy 照射的受体小鼠,按 Till 和 McCulloch 法进行脾结节(又称脾结节生成单位,CFU-S)测定。

4. 内源性脾结节测定及细胞周期分布分析 经 7.5 Gy 照射的小鼠于照后 24 h 腹腔注射 FLL 或各峰组分 1 ml/鼠,于照后 9 天杀鼠取脾,计数脾凸面的结节数;然后切取脾结节,以 PBS 制成单细胞悬液,洗涤后乙醇固定。取细胞 1×10^6 /管,洗涤后加入 RNase 40 u/管,37℃ 温育 30 min,然后加 PI 50 μg /ml,在流式细胞仪 FACS TAR PLUS 上进行细胞周期分析。本实验细胞变异系数(CV)值为 $5.66 \pm 0.9\%$ 。

结 果

1. 层析后的 FLL 各峰组分蛋白含量和分子量范围 层析 FLL 可以得到 5 个峰蛋白组分,以峰 4、峰 5 的蛋白含量为最低,分子量也最小(表 1)。

表1 FLL各峰组分蛋白含量和分子量范围

	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5
蛋白浓度(mg/ml)	0.032	0.074	1.696	0.024	0.020
分子量范围(KDa)	>450	450	70-80	<70	<70

表2 FLL对受照小鼠骨髓CFU-S的影响($\bar{X} \pm SE$)

时间(天)	例数	FLL处理组(%) ^A	对照组
3	5	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
7	5	0.47 \pm 0.12*	0.19 \pm 0.04
10	5	5.01 \pm 0.97*	0.34 \pm 0.08
15	5	16.20 \pm 2.13*	3.32 \pm 0.72

* 与对照组相比 $P < 0.01$.^A 以正常小鼠骨髓含有 4813 ± 372 个 CFU-S/femur 为100%。

2. FLL对受照小鼠外源性脾结节生成的影响 FLL处理组7、10和15天测得的小鼠骨髓CFU-S值都明显高于对照组(表2)。

3. FLL及其峰组分对小鼠内源性脾结节生成的影响 FLL处理组小鼠的内源性脾结节数明显高于对照组,其中以峰4、峰5组分的作用最为明显(表3)。

4. FLL及峰5组分对内源性脾结节细胞周期分布的影响 FLL处理组及峰5处理组的

表3 FLL及各峰组分对小鼠内源性脾结节生成的影响($\bar{X} \pm SE$)

	FLL	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5
例数	40	8	5	10	10	10
CFU-S(%) (处理组/对照组)	213 \pm 184*	100 \pm 34	100 \pm 41	75 \pm 45	325 \pm 216*	425 \pm 198**

* 与对照组相比 $P < 0.05$. ** 与对照组相比 $P < 0.01$.表4 FLL及峰5组分对细胞周期分布的影响($\bar{X} \pm SD\%$)

	例数	G ₁ /0	S	G ₂ M
FLL组	4	62.95 \pm 8.10	24.73 \pm 4.98	12.33 \pm 4.90
峰5组	4	63.05 \pm 9.00	29.05 \pm 8.42	7.90 \pm 2.55
对照组	4	83.30 \pm 6.15	12.80 \pm 7.31	3.88 \pm 1.48

细胞增殖状态(S+G₂M期),分别为37.05 \pm 8.11%,36.95 \pm 9.00%,明显高于对照组(表4)。

讨 论

我们在动物整体研究中已经证明,FLL能提高 γ 射线大剂量照射小鼠的存活率,增加受照小鼠外周血网织红细胞和白细胞水平^[1];同样,在离体培养中亦证实胎肝细胞含有粒系和红系造血的刺激物^[2,3]。这些结果促使我们试图从多能造血干细胞水平来探讨FLL中是否还存在着CFU-S增殖的刺激物?在FLL中又是何种组分在发挥作用?本项研究证实FLL含

有CFU-S的增殖刺激物;在FLL中,峰4和峰5是CFU-S增殖刺激作用的活性成分。

CFU-S是由脾结节生成细胞经过一定时间的细胞增殖与分化而生成,而脾结节生成细胞主要存在于成年小鼠的骨髓中,它可以在照射小鼠脾中不断地分化成熟^[4]。

正常机体的造血功能由于CFU-S含量的稳定,通常维持在动态平衡状态,而保持CFU-S数量的稳定可能取决于CFU-S增殖调控物质的浓度及活力的相对恒定。一旦造血干细胞大量损伤,稳定机制即遭破坏,造血细胞数量大幅度降低可使CFU-S增殖刺激因子的活力增加,体内残存的造血干细胞即从Go

期提前进入增殖周期进行适应性调节。我们在以胎肝细胞裂解液处理照射小鼠脾结节测定的实验中,发现无论是外源性还是内源性 CFU-S 形成的实验,均获得了相似的结果,即 FLL 能够明显增加照射小鼠骨髓中残留的造血干细胞在脾脏形成 CFU-S 的能力。细胞周期分布的实验也证明了这点。我们对 FLL 进行层析分离,分别得到了分子量大小不等的 5 个组分。实验结果表明,分子量 < 70 KDa 的峰 4、峰 5 具有明显促进小鼠内源性脾结节的形成能力,而分子量较大的峰 1、2、3 的促进作用则不明显;流式细胞术的分析也表明,峰 5 能明显增加脾结节生成细胞的增殖率,加速 G₁/0 期细胞进入周期,这与 Cork 报道以 5-FU 自杀率检测胎肝细胞培养上清液组分 II (分子量 30—50 KDa) 的促细胞增殖能力的实验结果相一致^[5]。值得注意的是,峰 4、峰 5 的蛋白含量甚微,但促进 CFU-S 增殖的活性却很强,提示 FLL 中这部分造血细胞生长刺激因子的效价之高,是很值得进一步探索研究的。

综上所述,我们认为人胎肝细胞裂解液及其组分 4—5 对辐照小鼠造血干细胞的功能恢

复有明显促进作用。这可以部分解释胎肝移植时造血干细胞虽无植入,但却明显改善了造血功能的机理。看来进一步分离提纯 FLL 的有效成分,将是势在必行的工作。

摘 要

本文采用内、外源脾结节形成测定法和流式细胞术观察了人胎肝细胞裂解液 FLL 及其峰组分在 γ 射线照射小鼠多能造血干细胞损伤修复中的作用。证明照后 24 h 给予 FLL 及峰组分 4—5 能明显增加受照小鼠残存造血干细胞形成 CFU-S 的能力,促进处于 G₁/0 期的造血干细胞提前进入增殖状态。

参 考 文 献

- [1] 程文英等, 1992, 中华器官移植杂志, 13, 11—13.
- [2] 丁志圣等, 1992, 医学生物物理学杂志, 3, 5—8.
- [3] 史剑慧等, 1992, 医学生物物理学杂志, 3, 1—4.
- [4] Wright, E G. et al., 1987, *Cell Tissue Kinet.*, 20: 191—203.
- [5] Cork, M J. et al., 1986, *Br J Haematology.*, 63: 775—783.

人胎胸腺上皮细胞的培养及其上清液中胸腺激素的测定

鲍培忠 沈时霖 洪 庆

(上海市第一人民医院儿科 200080)

体外培养人胎儿胸腺上皮细胞的移植,是已被用于临床的一种免疫疗法^[1]。为有助于了解这种疗法的机理,本文从细胞形态学及生物学功能方面,对体外培养胎儿胸腺上皮细胞进行了研究。结果表明,体外短期生长的胸腺上皮细胞仍保持了上皮细胞的特性。用生物学方法检测培养胸腺上皮细胞上清液(Thymic Epithelial Supernatants 以下简称 TES) 证明其具有类似胸腺激素样作用,从而说明上皮细胞在

体外培养的条件下,仍能保持其分泌胸腺激素的功能。

材 料 和 方 法

1. 人胎儿胸腺上皮细胞的培养 胸腺取自胎龄 18~22 周的胎儿。将离体组织尽可能去除表面包膜和其中的淋巴细胞,经洗涤后切成 1~2 mm³ 小块,接种入培养瓶。用 RPMI-1640 培养基。每 100 ml 中含 20% 小牛血清, 0.1 mmol/L 谷氨酰胺, 2 mmol/L Hepes