

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

缓冲剂。细胞置 37℃ 培养。最初 6 天不换培养液, 以后每周传代一次, 换液一次。生长迅速时每周传代一次。用上述方法共培养了 5 个胎儿胸腺。

2. **细胞电镜检查** 用 2% 戊二醛作培养细胞的前固定, 锇酸作后固定。然后经脱水、包埋、染色、超薄切片等处理。制片在透射电镜下观察。

3. **核型分析** 取培养 10~30 天的上皮细胞, 分别作染色体核型分析。每个标本至少分析 20 个核型。

4. **TES 收集:** 收集自培养第 10 天起至第 35 天的 TES, 每隔 3—4 天收集一次。每个培养物每次收集三瓶, 然后用 0.3 μ 滤膜过滤, 放 -20℃ 保存待检测。

5. **TES 中胸腺激素活性测定:** 根据刘士廉等^[2]的方法略改动。具体步骤: 1. 取健康新生儿脐血, 用 Ficoll 分离淋巴细胞。细胞经 Hanks' 液洗涤后最终浓度稀释为 $2.5-3 \times 10^6/\text{ml}$ 。用 2% 台盼蓝检查细胞活力, 要求 95% 以上为活细胞。2. 新鲜羊血经洗涤后稀释到 0.5% 备用。3. 将每份待测 TES 按 1:10, 1:100... 稀释成若干管, 液量为 0.2 ml, 同时设空白管加入等量的 Hanks' 液。4. 于上述所有管中加入稀释的淋巴细胞悬液 0.1 ml, 置 37℃ 孵育 90'。离心去上清液, 加入 0.5% 的 SRBC 0.1 ml。低速离心 5', 置 4℃ 过夜。次日去上清液, 加 0.1% 戊二醛 0.1 ml, 固定 15'。用美蓝染色, 制成压片。计数花环百分率。以每个单个核细胞附着 4 个以上 SRBC 为一个花环, 每个稀释管计数 400 个单个核细胞。5. 结果评判: 以花环率(RFC)超出空白 30% 以上的测定管为有活性, 稀释倍数最大的有活性管即为所测标本的最终滴度。

结 果

一、培养的胸腺上皮细胞形态及细胞核型分析

1. 光镜观察 细胞体外培养 4—6 天, 可见大量游离的淋巴细胞和已贴壁生长的上皮样细胞。第 10—15 天, 上皮样细胞形成多个集落。部分培养物中还可见具胸腺组织特征的 Hassall 小体。第 10—28 天为上皮样细胞生长旺盛期, 汇合为单层细胞, 其间夹杂少量成纤维样细胞。此时游离淋巴细胞消失。一般这段时间细胞可传 7—8 代。培养 30 天以后由于成纤

维细胞大量生长, 上皮细胞生长受抑。(细胞光镜形态见图 1, 2)

2. 透射电镜所见: 胞浆中可见卵圆形线粒体。部分细胞可见粗面内质网, 核糖体及溶酶体颗粒。绝大部分细胞浆内有张力纤维。细胞之间有桥粒连接(电镜结构见图版图 3, 4)。

3. **核型分析** 对生长 35 天以内的细胞分阶段染色体核型分析结果, 所有受检标本都保持了正常人的染色体组型, 未发现有数目和结构的异常。

二、TES 中胸腺激素活性的检测

对取自 5 个胎儿胸腺组织, 培养 10—12 天的 TES 分别检测结果表明, 在 1:10—1:100 的稀释范围内, 均显示胸腺激素的活性(见表 1)。

表 1 TES 作用脐血淋巴细胞后的花环形成率

检测标本 ¹	空白 RFC%	TES 各个稀释度的 RFC% ²		
		1:10	1:100	1:200
TES-1	16	27	28	17
-2	4	20	33	6
-3	8	14	16	5
-4	17	19	25	20
-5	19	31	33	23
$\bar{x}$	12.8 ± 6.4	22.2 ± 6.7	27 ± 7	14.2 ± 8.2

1. 标本取自不同胸腺培养 10—12 天时的 TES, 每份标本的培养细胞数为 10^6 左右。

2. 检测管超过空白 30% 以上时为有胸腺激素活性。

个别标本的 TES 在低浓度时 RFC 反而上升, (如表 1 中 TES-4 的结果)呈逆向比例关系。每个胸腺标本不同天数收集的 TES 其检测结果见图。胸腺激素滴度基本在 1:10—1:200 之间波动。滴度高低可能与细胞的生长密度有关。图中第 16~28 天时的 TES, 滴度较高, 而此时正是细胞生长的旺盛期。

* 根据上海医科大学卫生统计学教研组《医学统计方法》上海科学技术出版社, 1978, P 277。

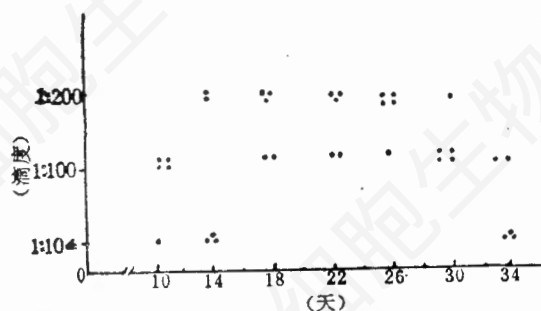


图 不同培养天数 TES 滴度的变化

标本取自 5 个胸腺, 分别收集每个胸腺不同培养天数的 TES 逐一进行检测

讨 论

一、细胞培养: 观察发现胸腺组织在开始培养的 30 天内主要以上皮样细胞生长为主, 而 30 天后由于成纤维样细胞的大量增殖使上皮细胞生长受抑制。用一般培养方法要使胸腺上皮细胞长期生长较困难, 已有报道通过改变培养基成份等方法^[3,4]可使胸腺上皮细胞在体外获得长期生长。

二、细胞超微结构: 电镜观察所见, 胞浆内的张力纤维和细胞间的桥粒连接, 均为上皮细胞的特征结构。而部分胞浆内的大小颗粒状结构可能和胸腺激素分泌有关^[5,6]

三、TES 中的胸腺激素活性检测: TES 中胸腺激素活性, 是证明体外培养的胸腺上皮细胞仍具生理功能的最有效依据。本文所用的 TES 检测方法依据是: 胸腺激素能使未成熟的 T 淋巴细胞产生成熟 T 细胞样的特性^[7]; 人脐血中大量未成熟的淋巴细胞经胸腺提取物

作用后与 SRBC 的花环率上升^[8]。我们用脐血花环法检测 TES 也得到了类似结果。说明所收集的 TES 中有胸腺激素活性的存在, 并且其活性的高低与上皮细胞生长情况有密切关系。有人认为^[8]胸腺激素活性表达要有一个合适的浓度, 因此浓度过高或过低都将影响其活性的表达, 但确切原因尚不清楚, 在本文结果中也存在浓度过高花环形成率反而下降的情况。

摘 要

人胎儿胸腺组织在体外培养, 30 天内基本为上皮细胞生长。其主要依据是电镜下可见细胞浆内普遍存在张力纤维, 细胞之间有桥粒连接。用脐血花环法测定胸腺激素活性, 结果表明, 在所收集的胸腺细胞培养上清液中确有胸腺激素活性存在。

参 考 文 献

- [1] Hong, R. et al., 1978, *Transplant Rev.* 10: 201—210.
- [2] 刘士廉等, 1978, 生物化学与生物物理学报, 10: 431—432.
- [3] 李伯青等, 1987, 中国免疫学杂志, 3: 266—269.
- [4] Janine, M J, et al., 1984, *Clin Immunol & Immunopathol.* 30: 214—220.
- [5] Niebugo, J. et al., 1985, *Cellar Immunology.* 10: 439—445.
- [6] Rinina, W. et al., 1984, *Clin Immunol & Immunopathol* 31: 56—63.
- [7] Incefy, C. S. et al., 1975, *Clin Exp Immunol.* 19: 475—480.
- [8] Oosterom, R. et al., 1979, *Clin Immunol & Immunopathol.* 12: 460—469.

欢迎订阅《细胞生物学杂志》

季刊(48 页)单价 1.00 元 国内邮发代号: 4-296

《细胞生物学杂志》是中国细胞生物学学会主办的中级学术性刊物。交流推广有关细胞生物学的新进展, 促进国内细胞生物学的发展。主要刊登本学科的专论、综述、研究报告、实验技术方法与新技术介绍、译著、讲座、动态等。读者对象为从事细胞生物学及有关领域工作的科研人员、大学中学教师、大学院校学生及科研组织管理人员。