

# 前列腺素 E<sub>2</sub> 对小鼠骨髓细胞增殖及 DNA 合成的影响\*

谭子兴 李春海 卢秀桂

(军事医学科学院基础医学研究所)

前列腺素(PG)是一组具有高度生物活性的不饱和脂肪酸衍生物,广泛存在于哺乳动物的各种组织中,参与机体许多生理和生化代谢过程。近来发现其参与免疫反应<sup>[1]</sup>和造血调控<sup>[2]</sup>。虽然 PGE 类对人和小鼠的 CFU-GM 增殖影响已有人研究<sup>[3,4]</sup>,但其作用机理还不十分清楚,本文通过微量悬液培养 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法来测 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 增殖过程中 DNA 合成的影响,探讨对造血干细胞增殖负调控的作用机理。

## 材料和方法

1. 实验动物 系本院饲养健康的 LACA 纯系雄性小鼠,日龄 47—55 天,体重 18—24 克。

2. 试剂 前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)系 Sigma 公司产品,溶于无水乙醇中,浓度为 1 mg/ml,贮存于 -70℃,临用时稀释为不同工作浓度。

3. <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR) 上海原子核研究所产品,1 毫居里/毫升,放射性比度 41 居里/毫克分子。用生理盐水或 1640 培养液稀释成 10 微居里/毫升。

4. 细胞悬液的制备 每次实验活杀 3 只小鼠,各取一根股骨,用 1640 培养液将骨髓细胞全部冲出,作成适当浓度的细胞悬液,进行体外半固体单层琼脂培养 CFU-GM 及微量悬液细胞培养 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入法测定 CFU-GM 的增殖。

5. 用 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入测定 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 细胞的增殖<sup>[5]</sup> 在 1 毫升培养体系中,1640 培养液 0.5 毫升、马血清 0.45 毫升,细胞悬液 0.05 毫升(内含 2 × 10<sup>5</sup> 有核细胞),实验组加不同浓度的 PGE<sub>2</sub>(用无水乙醇稀释)10 微升/每毫升培养体系,对照组只加 10 微升无水乙醇,混合后分别加入预先加有 20 微升/孔的小鼠肺条件液的培养板中,每孔 0.2 毫升,每孔最终体积为 0.22 毫升。培养板放在 37℃,含

5 % CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,96 小时后加 <sup>3</sup>H-TdR 0.2 微居里/孔,继续 37℃ CO<sub>2</sub> 箱培养 6 小时,把样品分别收集在红光 49 型玻璃纤维滤膜上,经 3 % 三氯醋酸固定,生理盐水洗后放 80℃ 烤箱内干燥 30 分钟,取出分别放入装有闪烁液瓶内,暗化 10 小时后,在 LKB-1215 型液闪仪上测定每分放射性计数(cpm)。

6. 单层琼脂培养法观察 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 增殖的影响 应用培养体系组成: 2 毫升 1640 培养液,1.9 毫升马血清,0.1 毫升细胞悬液(内含 8 × 10<sup>5</sup> 有核细胞)混合后经 37℃ 水浴预温 10 分钟,分别加入不同浓度的 PGE<sub>2</sub>,对照组只加 10 微升无水乙醇,混匀,最后加 3 % 琼脂热化液 0.6 毫升,充分轻快打匀后加入装有 0.1 毫升小鼠肺条件液的培皿中,每皿 1 毫升,待凝后把培养皿放入经灭菌的干燥器中,内含 5% CO<sub>2</sub>(用碳酸氢钠和磷酸反应产生的)饱和湿度,37℃ 培养 7 天,在低倍镜下计数,含 50 个以上细胞团为一集落,每个集落定为一个 CFU-GM。

7. 实验结果采用我院统计室根据 BASIC 语言所编的 D 5. BAS 程序,在 IBM-PC/XT 电子计算机运算。

## 结 果

通过 <sup>3</sup>H-TdR 掺入测定小鼠骨髓 CFU-GM 计数率的结果表明,随 PGE<sub>2</sub> 剂量增加其 <sup>3</sup>H-TdR 掺入率降低(表 1),说明 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 细胞 DNA 合成有明显的抑制作用,抑制 50% 时, PGE<sub>2</sub> 剂量为 3.5 × 10<sup>-8</sup> mol/L, PGE<sub>2</sub> 对数剂量(X)与小鼠骨髓 CFU-GM <sup>3</sup>H-TdR 掺入率所对应的概率单位值(Y)呈负相关, R = -0.9545(图 1)。

\* 国家自然科学基金资助课题。

我院统计室张学中主任协助处理文中的实验数据,特此致谢。

表 1 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM<sup>3</sup>H-TdR 掺入率测定结果(cpm)

PGE <sub>2</sub> (mol/L)	cpm						$\bar{x} \pm SD$	(%)	
0	9136	8986	9852	9934	10208	9610	9321 ± 194	100	
1.1 × 10 <sup>-8</sup>	4798	5674	6384	6100	6842	5424	8870 ± 297	61.0	
4.4 × 10 <sup>-8</sup>	3502	4174	4608	4644	4382	3248	4426 ± 236	46.0	
1.7 × 10 <sup>-7</sup>	4208	3828	3728	2944	3564	3226	2014 2282	3348 ± 236	35.0
7.1 × 10 <sup>-7</sup>	1560	2648	1630	1890	2230	2254	2762 3743 2892 2866	2413 ± 204	25.0
2.8 × 10 <sup>-6</sup>	500	220	524	174	564	894		479 ± 106	5.0

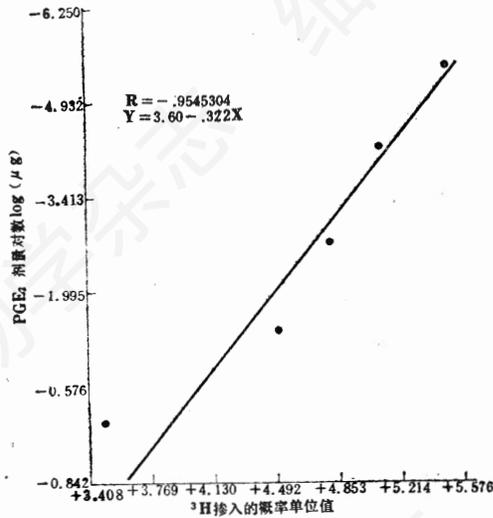


图 1 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM <sup>3</sup>H-TdR 掺入的影响

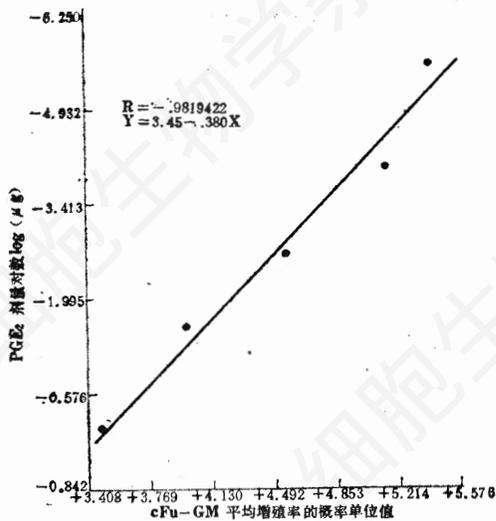


图 2 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 增殖的影响

用单层琼脂培养法观察小鼠骨髓 CFU-GM 的增殖结果表明 PGE<sub>2</sub> 对其 CFU-GM 增殖有明显的抑制作用。PGE<sub>2</sub> 的对数剂量(X)与其对 CFU-GM 增殖率的概率单位值(Y)呈负相关, 相关系数  $R = -0.98194$ ,  $Y = 3.45 - 0.380 X$ (图 2)。

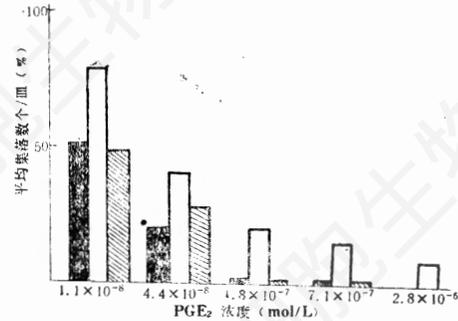


图 3 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 集落分类的影响

(以对照组集落形成数为 100%)

■ CFU-GM □ CFU-G ▨ CFU-M

PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 的各系集落形成的影响。

把琼脂法培养的 CFU-GM 进行压片染色分类计数, 结果表明, PGE<sub>2</sub> 对各系集落形成均有明显的抑制作用(图 3), 抑制率与 PGE<sub>2</sub> 浓度成正比, 其中以 CFU-M 和 CFU-GM 的抑制最为明显, 次之为 CFU-G。PGE<sub>2</sub> 对前两者抑制 50% 的相应浓度为  $1.2 \times 10^{-8} \text{mol/L}$  和  $1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ , 后者为  $3.5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ , 当 PGE<sub>2</sub> 浓度增加  $7.3 \times 10^{-8} \text{mol/L}$  时 CFU-GM 和 CFU-M 的增殖被抑制至对照组的 10% 以下, 而 CFU-G 降至 10% 以下时所需 PGE<sub>2</sub> 浓度却为  $1.1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。

## 讨 论

据报道<sup>[6]</sup>,人和小鼠的单核-巨噬细胞可产生前列腺素,但当体内前列腺素达到一定水平时,又反馈地抑制 CFU-M 的增殖。一般采用琼脂或甲基纤维素半固体培养法,以计集落形成率来反映 CFU-GM 的增殖状态,但每个集落的细胞数差异很大,不能正确反映增殖程度的变化,也不能说明造血调控物质的作用机理。而 <sup>3</sup>H-TdR 掺入率的变化则反应细胞在增殖过程中 DNA 合成的程度,所以 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法测定 PGE<sub>2</sub> 对 CFU-GM 增殖的抑制作用是通过抑制其 DNA 合成来实现的。此外与半固体琼脂培养法相比,两者测定的结果虽然相似,但微量培养 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法操作简便,细胞培养周期短,而且可避免集落计数时人为的误差。目前用这方法测定 PGE<sub>2</sub> 对 CFU-GM 增殖状态的影响尚未见报道。

Goodwin 等<sup>[7]</sup>认为 PGE<sub>2</sub> 对免疫反应调控是十分复杂的,由此推想 PGE<sub>2</sub> 对造血干细胞增殖分化反应也是相当复杂的,影响因素较多,如 PGE<sub>2</sub> 的浓度,所用靶细胞类型及分化程度,细胞周期和作用时间都是今后值得研究的问题。

## 摘 要

本文采用半固体单层琼脂培养和液体培养 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法观察 PGE<sub>2</sub> 对小鼠骨髓 CFU-GM 增殖分化的影响,实验结果表明 PGE<sub>2</sub> 可明显抑制 CFU-GM 增殖和分化,抑制率与 PGE<sub>2</sub> 剂量呈负相关。其 50% 抑制率所对应的 PGE<sub>2</sub> 剂量,琼脂培养法为  $4.8 \times 10^{-8}$  mol/L,

<sup>3</sup>H-TdR 掺入法为  $3.5 \times 10^{-8}$  mol/L,两种方法观察的结果相近。压片染色集落分类的结果还表明 PGE<sub>2</sub> 对 CFU-GM 各类型集落形成均有明显的抑制作用。其中以 CFU-M 和 CFU-GM 抑制最为明显。 $1 \times 10^{-8}$ — $1.2 \times 10^{-8}$  mol/L 的 PGE<sub>2</sub> 浓度就可抑制 CFU-M 和 CFU-GM 增殖 50%,当 PGE<sub>2</sub> 浓度增至  $7.3 \times 10^{-8}$  mol/L 时 CFU-M 增殖即被抑制 90%,说明单核-巨噬系祖细胞对 PGE<sub>2</sub> 是十分敏感的。PGE<sub>2</sub> 对粒系集落的抑制作用机理尚不清楚。

## 参 考 文 献

- [1] Ninnemann JL: 1984, Prostaglandins and immunity. *Immuno. Today*. 5: 170.
- [2] Lewis GP: 1983, Immunoregulatory activity of metabolites of arachidonic acid and their role in inflammation. *British Medical Bulletin* 39: 243.
- [3] Pelus LM, Broxymeyer HE, and Moore MAS, 1981 Regulation of human myelopoiesis by prostaglandin E and lactoferrin. *Cell Tissue Kinet*. 14: 515.
- [4] Pelus LM, 1982, Association between colony forming units granulocyte macrophage expression of Ia-like(HLA-Dr) antigen and control of granulocyte and macrophage production. *J. Clin. Invest* 70: 568.
- [5] 张明伟,黎燕: 1987, 测定 CFU-GM 增殖状态微量液体培养 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法. 第一届全国实验血液学学术会议论文汇编(-), p-1. 哈尔滨.
- [6] 唐佩弦,杨天楹编: 1985, 造血细胞培养技术 第一版 陕西科学出版社 pp 30-31.
- [7] Goodwin JS, 1985, Prostaglandins, cellular immunity and cancer. in: *Prostaglandins and Immunity*. Goodwin JS, ED. Boston: Martinus Nijhoff Publishing, pp 1-20.