

- [9] Telling, R. C., and Elsworth, R., 1965. *Biotechnol. Bioeng.* 7: 417—434.
- [10] Сергеев, В. А., 1976. Репродукция и Выращивание Вирусов Животных. С 249. Москва «Колос».
- [11] Telling, R. C., and Radlett, P. J., 1970. *Adv. Appl. Microbiol.* 13: 91—119.
- [12] Stoker, M., and Macpherson, I., 1964. *Nature* 203: 1155—1157.
- [13] Capstick, P. B., et al. 1966. *Exp. Cell. Res.* 44: 119—128.
- [14] Davis, J. L., et al. 1971. *Appl. Microbiol.* 21: 338—341.
- [15] Capstick, P. B., 1963. *Proc. Roy. Soc. Med.* 56: 1062—1064.
- [16] Fischer, A. B., et al. 1971. *Archiv. ges. Virusforsch.* 33: 375—384.
- [17] Кудрявцева, Г. А., и др., 1976. *инт. логия.* 18: 336—341.

## 离体条件下胎肝细胞代谢功能的研究

汪涛、马祥瑞、王洪云、苏燎原

(苏州医学院放射医学系)

胎肝细胞具有旺盛的造血功能,已被体内和体外集落形成细胞的许多实验所证实<sup>[1,2]</sup>。Moore 等人<sup>[3]</sup>的观察表明,早期造血器官的发生来源于胎肝的循环干细胞,这说明胎肝在造血过程中具有重要的意义。我们拟用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)和<sup>14</sup>C-尿嘧啶核苷(<sup>14</sup>C-UR)两者的参入实验来探讨胎肝细胞代谢功能的某些特性及其辐射敏感性。

### 材 料 和 方 法

#### 一、胎肝细胞悬液的制备

实验中选用昆明种怀孕小鼠,孕鼠颈部脱臼活杀,经酒精消毒后剖腹取出胎鼠,再将胎鼠剖腹取胎肝放进盛预冷的 Eagle 培养基的培皿中,通过 6 号、4 号针头冲打,使细胞均匀扩散,制成 10 毫升细胞悬液,用血细胞计数器进行计数。

#### 二、小鼠胚胎条件培养基的制备

将胎鼠断头并去四肢及内脏,所剩躯干部分用弯形小剪刀剪碎,用 1 毫升注射器冲打成匀浆,用 0.5% 胰蛋白酶消化,制备成单细胞悬液,细胞计数。用 Eagle 培养基按  $2 \times 10^6$  个细胞/毫升稀释,5 毫升/瓶,共 6 瓶,37℃ 培养 7 天,离心收集上清液。下面的细胞层加入 Eagle 培养基继续培养,准备连续收获。

#### 三、胎肝细胞的培养及标记

所制备的胎肝细胞混悬液的各实验组,分装成 4—8 个平行样品,每瓶样品 2 毫升,用微量注射器每瓶样品加入<sup>3</sup>H-TdR (比放射性 14 居里/毫克分子,

放射性强度 30 微居里/毫升) 0.6 微居里和<sup>14</sup>C-UR (比放射性 50 毫居里/毫克分子,放射性强度 7.5 微居里/毫升) 0.15 微居里混合液 20 微升,在 37℃ 温箱培养 4 小时后,制备成纸片样品<sup>[4]</sup>。

#### 四、测量条件与计算

应用国产 FJ—353 型双道液体闪烁计数器进行测量,其条件:高压 1400V,甄别阈上道 10.0V,中道 5.6V,下道 0.5V,分析选择用“2”,放大倍数  $A1/2 \times 1/4$ ,  $B1/2 \times 1/16$ 。测量样品减去本底后,根据<sup>3</sup>H 和<sup>14</sup>C 在 A、B 道的效率乘以校正值计算其参入量<sup>[4]</sup>。

### 结 果

#### 一、胎肝细胞植入数与放射性参入量之间的关系

胎肝细胞在 Eagle 培养基中短期培养后(4 小时),细胞浓度以  $2 \times 10^4$ — $2 \times 10^6$  个细胞/毫升之间培养时生长良好,<sup>3</sup>H-TdR 的参入量与<sup>14</sup>C-UR 的参入量均呈线性增长,而在  $2 \times 10^7$  个细胞/毫升时<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C 的参入降低,细胞生长受到抑制,同时发现<sup>3</sup>H-TdR 参入和<sup>14</sup>C-UR 参入相平行[图 1]。在<sup>3</sup>H-TdR 参入 DNA 受抑制的细胞浓度( $2 \times 10^7$  个细胞/毫升),<sup>14</sup>C-UR 参入 RNA 也受抑制,表明 DNA 与 RNA 的合成与种植的细胞数有一定依赖关系。

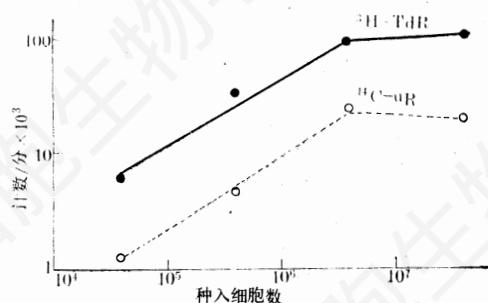


图1 种入细胞数与 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^{14}\text{C-UR}$ 参入量之间的关系  
(每一点代表5个样品均数)

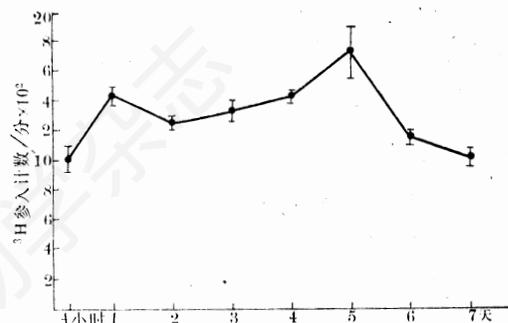


图2 相同浓度的胎肝细胞, 培养不同时间后, $^3\text{H-TdR}$ 参入的动态变化  
(图中每一点为10个样品的均数 $\pm$ S.D)

## 二、胎肝细胞 $^3\text{H-TdR}$ 参入的动态观察

小鼠胎肝细胞在含20%小鼠胚胎条件培养基的悬液中培养, 所有样品种入的细胞浓度一致, 在不同时间测定 $^3\text{H-TdR}$ 的参入动态, 以观察细胞合成DNA的能力。根据不同时间测得参入量的动态分布表明(图2), 在培养的第二天 $^3\text{H}$ 参入已经增高, 第五天 $^3\text{H-TdR}$ 参

入达到高峰, 随后逐渐下降, 第七天时 $^3\text{H}$ 的参入量降到细胞种后4小时的计数水平。另外不同胎龄的胎肝细胞, 对 $^3\text{H-TdR}$ 和 $^{14}\text{C-UR}$ 两者的参入均有明显的差异, 在13、14天时参入计数较高, $^3\text{H}$ 计数为34709cpm(每分钟数),  $^{14}\text{C}$ 计数为4149cpm, 随着胎龄的增长, 在19、20天时计数显著降低,  $^3\text{H}$ 计数为24728cpm,  $^{14}\text{C}$ 计数为1809cpm(图3)。

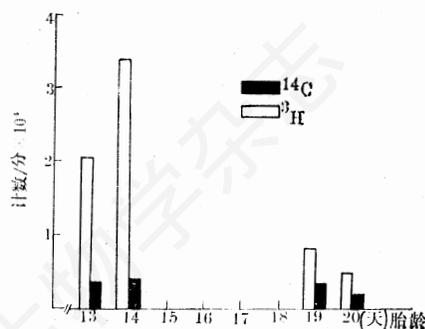


图3 不同胎龄的小鼠胎肝细胞, $^3\text{H-TdR}$ 、 $^{14}\text{C-UR}$ 参入的变化

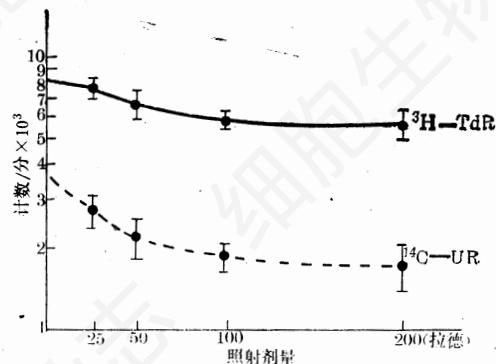


图4 电离辐射作用后, 胎肝细胞对 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^{14}\text{C-UR}$ 参入的影响

表1  $^{60}\text{Co-}\gamma$ 线照射对 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^{14}\text{C-UR}$ 参入胎肝细胞的影响\*

	对照组	25 $\gamma$	50 $\gamma$	100 $\gamma$	200 $\gamma$
$^3\text{H-TdR}$ 参入均数 $\pm$ 标准差	8089 $\pm$ 1313	7660 $\pm$ 719	6618 $\pm$ 820	5829 $\pm$ 429	5603 $\pm$ 700
相当于对照组的百分数	100%	94.69%	81.81%	72.06%	69.26%
$^{14}\text{C-UR}$ 参入均数 $\pm$ 标准差	3536 $\pm$ 915	2677 $\pm$ 385	2162 $\pm$ 338	1838 $\pm$ 238	1696 $\pm$ 320
相当于对照组的百分数	100%	75.70%	61.14%	51.98%	47.96%

\* 表内每一数据为5个样品。

### 三、电离辐射对胎肝细胞 DNA、RNA 合成的影响

<sup>60</sup>Co 治疗机照射胎肝液体培养体系, 致使胎肝细胞的代谢功能受损, <sup>3</sup>H-TdR 参入明显下降(图 4), 经统计学处理  $P < 0.01$ , 对照组与 100 $\gamma$ 、200 $\gamma$  照射组相比, 以及 25 $\gamma$  组与 100 $\gamma$ 、200 $\gamma$  组相比差异都非常显著。以 <sup>3</sup>H-TdR 参入的放射性计数而言, 200 $\gamma$  照射组为对照组的 69% (表 1)。照后 <sup>14</sup>C-UR 的参入亦明显受抑制, 采用 Keuls 法分析检验对照组与 50 $\gamma$ 、100 $\gamma$ 、200 $\gamma$  组相比差异非常显著, 25 $\gamma$  组与 100 $\gamma$ 、200 $\gamma$  组相比差异亦非常明显。而且 <sup>14</sup>C-UR 的参入受抑制似乎较 <sup>3</sup>H-TdR 明显, 200 $\gamma$  组掺入为对照组的 47%。

### 讨 论

利用胎鼠肝脏细胞悬浮培养体系, 结合 DNA、RNA 前体物质的参入实验, 并运用液体闪烁计数器测量是研究胎肝细胞代谢功能有效方法。胎龄为 10—11 天的胎鼠肝脏细胞即能造血, 但此时难以分离大量的细胞样品。胎龄 13—15 天时肝细胞造血较旺盛, <sup>3</sup>H-TdR 的参入较多, 从此期以后随着胎龄的增加, 胎肝细胞的造血功能逐渐下降。接近临产的胎鼠或出生后 1—2 天的婴鼠, 肝细胞的造血功能接近脾脏和骨髓的水平<sup>[1,6]</sup>。我们的实验也得到类似的结果(图 3), 说明标记化合物的参入很大程度上反应了胎肝细胞的造血功能。胎肝细胞的造血功能主要以造红细胞为主, 在血红蛋白的研究中, 有红细胞生成素存在的条件下, <sup>59</sup>Fe 参入的计数率大大增高<sup>[5,6]</sup>。根据骨髓造血干细胞发生于胎肝早期起源的循环干细胞的理论<sup>[3,7]</sup>, 研究胎肝早期的代谢功能对了解胎肝造血具有特殊的意义。

胎肝细胞不同浓度 ( $4 \times 10^4$ — $4 \times 10^8$  个细胞/瓶) 与参入的放射性呈良好的线性关系, 经对数变换处理, 相关系数  $\gamma = 0.98$ , 说明参入活性与细胞数量之间具有定量关系。与以前的实验相比, 当细胞浓度  $4 \times 10^7$  个细胞/瓶时参

入活性明显下降, 细胞生长受到限制。故选用  $4 \times 10^8$  个细胞/瓶的浓度, 对细胞的增殖与抑制的研究都是有利的。

胎肝细胞在小鼠胚胎条件培养基的存在下, 可在液体培养基中生长繁殖, <sup>3</sup>H-TdR 的参入明显增高, 高峰出现在培养的第五天, 达到培养 4 小时样品的 160%。胎肝细胞受照后, <sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>14</sup>C-UR 的参入随剂量的增大而急剧的下降。100 $\gamma$ 、200 $\gamma$  照射组与对照组相比, DNA 与 RNA 的合成都受到显著性抑制, 200 $\gamma$  照射组与对照组相比, <sup>3</sup>H-TdR 的参入为 69%, <sup>14</sup>C-UR 为 47%, 表明 RNA 合成受抑制比 DNA 更明显。这可能与胎肝细胞以造红细胞为主的造血特性密切相关, 胎肝细胞除了有核红细胞合成 DNA 外, 尚有大量的 RNA 和蛋白质合成, 以维持其细胞的功能特性, 当电离辐射作用后, 便诱发 RNA 合成的明显抑制。

### 摘 要

<sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>14</sup>C-UR 参入胎肝细胞 DNA 和 RNA 的实验, 反映了胎肝细胞的代谢功能。细胞数在  $2 \times 10^4$ — $2 \times 10^8$  /毫升之间, 参入活性呈线性增长, 液体培养 1—6 天的胎肝细胞 <sup>3</sup>H-TdR 参入较培养 4 小时的样品为高, 高峰出现在第五天。胎龄在 13、14 天的胎鼠胎肝参入较高, 似与造血功能旺盛有关, 19、20 天时降低。<sup>60</sup>Co $\gamma$  线照射导致胎肝细胞 <sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>14</sup>C-UR 参入减少, 而且照射剂量愈大, 参入的活性愈小, RNA 受抑制更明显, 反映电离辐射影响了造血机能。

### 参 考 文 献

- [1] Moore M. A. S., McNeill T. A. and Haskill J. S.: 1970 *J. Cell Physiol.* 75: 181-192.
- [2] Stephenson J. R., Axelred A. A., Mcleod D. L. and Shreeve M. M. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:1542-1546.
- [3] Moore M. A. S. and Owen J. J. T.: