

造血干细胞发生学研究*

I. 人胚肝造血干细胞

施斐曼 刘永

(军事医学科学院基础医学研究所)

人卵黄囊的血管内造血已被细致地观察过^[1]。卵黄囊的造血停止,肝成为主要的造血器官^[2]。肝造血持续到胎生7个月为止^[3]。Fukuda, T.^[4,5]在电镜观察中看到了肝造血中出现未分化的单个核细胞,提出预期的干细胞(presumptive stem cell)一词。近来有人对人胚造血提出卵黄囊、肝及骨等组织的造血三阶段^[6]。国内进行了胚肝扩散盒培养细胞的电镜观察^[7],开展了各种因素对造血干细胞的调控研究^[8]。

迄今为止对造血干细胞的发生学尚乏定论。干细胞的形态是怎样的?在生理及病理条件下,间叶细胞是如何转化为造血干细胞及所谓“预期性干细胞”是如何分化与调节的?这些问题的探索具有理论和实际意义。

材料与 方法

本文收集的计划生育(电吸人工流产、水囊引产、剖腹取胎)胚胎标本,来自铁道总医院,首钢医院及307医院。胎龄分布在8—40周间,较集中在肝造血阶段(表1)。

材料处理,电吸胚胎碎组织于手术室检出后立即定,水囊引产或剖腹取胎的胎儿用冰壶取回,一般在2小时内解剖取出肝,光镜观察部分用Bouin氏固液固定,石蜡包埋,切片厚4微米,苏木精伊红染色。制备电镜样品时,将切成1立方毫米大小的肝组织,以3%的戊二醛(1/15M磷酸缓冲液)作前固定,2小时后置入含有0.19M蔗糖磷酸缓冲液浸洗过夜,然后以1%四氧化锇作后固定,系列乙醇脱水,Epon 812包埋。先切1微米的厚片,苏木精伊红染色,光镜下观察定位后,再作超薄切片,经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,用JEM-6C电镜观察。

表1 人胚肝胎龄分布

| 妊娠日期 | 观察例数* |
|------|-------|
| 8周 | 4 (1) |
| 9 " | 1 (1) |
| 10 " | 2 |
| 11 " | 2 (1) |
| 12 " | 2 (1) |
| 13 " | 1 (1) |
| 14 " | 1 (1) |
| 15 " | 1 (1) |
| 17 " | 2 (2) |
| 19 " | 2 (1) |
| 23 " | 2 (2) |
| 24 " | 1 (1) |
| 26 " | 1 |
| 29 " | 1 (1) |
| 40 " | 1 (1) |

* 观察例数项括弧中数字为电镜观察例数。

结 果

一、胚肝造血的光镜观察

电吸人流术胚胎组织已碎,肉眼检取肝组织颇为不易,例如8周的胚肝组织是在几十例中才获得数例,有一例是偶然的在光镜下发现肝组织附于腹腔中其他脏器,边缘光滑游离,见有肝窦,肝小叶发育尚未臻完善,但可见明显而不十分密集的造血细胞。图1右上可见肝细胞索之间约含50个左右幼稚红细胞的造血灶。此类细胞的胞核呈圆形或椭圆形,染色质浓密,胞浆较窄,属定型幼红细胞类。左侧肝窦中的幼稚红细胞核/浆比率似更减少,胞体

* 仪器中心电镜组汪宝珍、杨怡同志制作电镜超薄切片,王星荷、丁颖同志制作光镜切片。

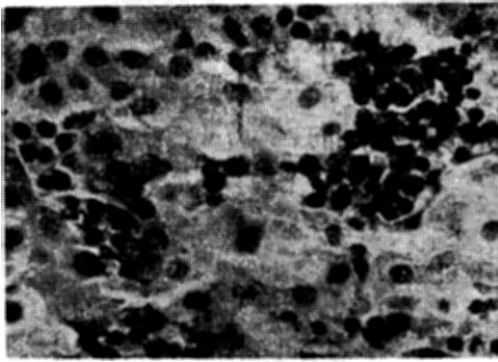


图 1 妊娠 8 周人胚肝

右上为定型幼稚红细胞, 左侧肝窦内有晚、中幼稚红细胞。×1,380

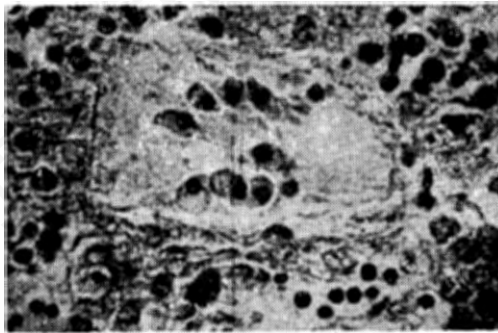


图 2 妊娠 9 周人胚肝

示肝窦中晚幼稚红细胞。×1,380

也稍大, 胞浆量参差不等, 为晚、中幼稚红细胞。8 周的胚肝已可见少量粒系细胞和巨核细胞。

妊娠 9 周的胚肝造血细胞的密度略有增高, 造血细胞出现的规律与妊娠 8 周相仿(图 2)。

妊娠 10 周的胚肝: 在一个被覆内皮细胞的管腔(静脉)周围有 3、4 层至 7、8 层肝细胞, 在肝细胞间为较密集之幼稚红细胞灶。巨核细胞位于其他造血细胞之间, 细胞呈圆形, 胞体大, 核 2—4 叶, 稍扭曲, 核质疏松。偶见单个的杆状核粒细胞。

妊娠 11 至 13 周的胚肝: 在肝窦和肝细胞索之间密布造血细胞和造血细胞灶, 仍以幼稚红细胞为主。11 周的 2 例胚肝, 巨核细胞仍少见, 至 12—13 周的则能见到较多巨核细胞, 于汇管区可见一些散在的粒系细胞,

妊娠 14 周的一例胚肝: 于被膜下有较密集的造血细胞, 部分是幼稚红系细胞, 余外是形状不规则核质致密浓染的不易分类的幼稚细胞。在肝小叶间隙有少量幼稚红细胞。

妊娠 15 至 19 周的胚肝: 造血细胞和造血细胞灶分布较密集, 19 周的胚肝更见有弥漫广泛之造血细胞。幼稚红系细胞仍占主要成分, 粒系造血比前增多, 尤其在汇管区粒系细胞可呈小灶存在(图 3), 也可见一些单核样的细胞, 巨核细胞较多, 但是核叶稍减少, 核质较为浓集。

妊娠 23 周和 24 周的胚肝: 此胎龄的胚肝造血细胞的密度除 24 周的一例略减低外仍较普遍和密集。以幼稚红系造血细胞为主, 且常可见散在的和在小范围内成灶的粒系细胞。巨核细胞较多, 以晚期成熟的巨核细胞为著(图 4)。妊娠 24 周的胚肝, 于被膜下偶可见淋巴样细胞。

妊娠 26 周和 29 周的胚肝: 镜下所见在肝小叶间隙和肝窦内以幼稚红系细胞比较丰富, 掺杂有粒系细胞, 29 周的一例在汇管区粒系细胞较明显。巨核细胞量不甚多, 淋巴细胞不易见到。

妊娠 40 周的胚肝: 肝内留存造血灶已很稀疏, 所见者仅为肝细胞索间微小集灶存在的幼稚红细胞, 其他系造血细胞已较少见。

二、胚肝造血的电镜观察

于电镜下观察造血细胞出现的部位是在肝

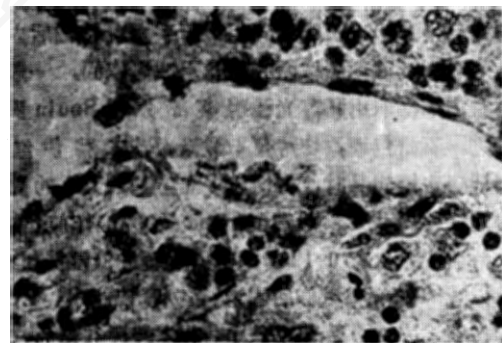


图 3 妊娠 17 周人胚肝

汇管区的粒系细胞造血灶。×1,380

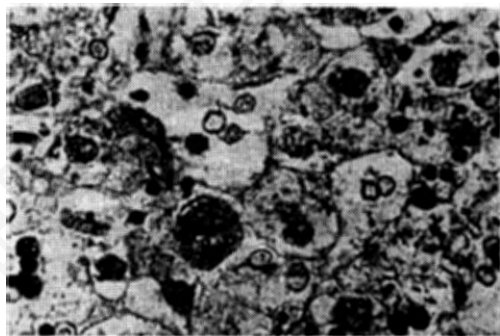


图4 妊娠23周人胚肝

造血细胞密度略稀疏，示巨核细胞及幼稚细胞。×1,380

细胞索之间或 Disse 腔之中，首先出现的是红系细胞且各胎龄均以红系造血为主，可见分化为早幼、中幼和晚幼阶段的红细胞，还有属更早期的幼稚红细胞。如在17周的胚肝见到的细胞，胞体与胞核略呈圆形，核染色质稍浓集。两团明显的核仁，约4—5个线粒体，少数粗面内质网，多聚核糖体丰富（原红至早幼红）。

随着红系细胞的逐渐成熟，核的染色质益趋浓集；核/浆比率则逐渐减小；且胞浆中的核糖体量减少而代之以电子密度较淡、细小的血红蛋白颗粒；细胞核偏向细胞的一侧。曾见到一例胚肝在两个肝细胞的间隙中出现幼稚红系细胞（图版图1）。在妊娠11和12周的胚肝，常见幼稚红细胞成灶聚集处有在分化中的间叶细胞与其紧密相邻（图版图2），上述分化中的间叶细胞形态特殊，细胞体形不规则，胞核一侧凹陷染色质稀疏，核仁显著，胞浆中除线粒体外有细小分布均匀之核糖体，其细胞突起常穿入两红系细胞之间。

粒系细胞：妊娠8周的胚肝偶见，妊娠11、12周的胚肝略易见到，妊娠15周以后胚肝的粒系造血逐渐增多。妊娠17周的胚肝见有不同阶段的粒系细胞，如嗜中性晚幼粒细胞，胞浆内特异颗粒量多，电子密度浓淡不一；线粒体丰富，呈杆状或椭圆形，有窄管状之粗面内质网；核糖体密集。染色质于核边缘部稍凝集，未见核仁。较早期约相当于原粒至早幼粒阶段

的细胞，胞体略呈圆形，胞核一端向胞浆稍突出，核染色质轻度聚集，胞浆内有稀疏而均匀分布的核糖体，3—4个线粒体，不发达的高尔基氏体；约含4—5个电子致密颗粒，部分颗粒的膜内侧有空隙。

妊娠12周后的胚肝电镜下见到单核细胞。典型者细胞核呈马蹄形，核的凹陷侧有高尔基氏体，线粒体较集中，少数粗内质网，核糖体密集，兼有圆形致密颗粒。不甚典型者细胞核形扭曲。胞浆内有电子致密的溶酶体样结构，有单膜围绕。

淋巴细胞：在胚肝造血中淋巴细胞所占比例低，数量少，仅偶可见，一般在肝窦中出现。我们在妊娠17周（2例）和23周胚肝见到淋巴细胞。核/浆比率大，胞浆窄，有的核形稍不规则，具较深的褶皱，细胞器少，有2—3个线粒体，少数粗内质网和一些小的空泡，亦可见少许致密颗粒，核糖体较丰富。于23周胚肝肝窦中发现淋巴细胞伸出较长的细胞突起与幼稚红系细胞相邻接。

巨核细胞：妊娠8周的胚肝即可见巨核细胞。所见一例其巨核细胞的胞体大，胞核也大有轻度扭曲，核膜向内呈轻度褶皱，核染色质呈分散凝集状态，具有不显著的核仁。胞浆宽广，线粒体颇丰富，有管状或泡状的小池与一些电子致密大小不等的颗粒相间，即分界膜系统（demarcation membrane system）已形成（图版图3）。

巨噬细胞：在人胚肝中，巨噬细胞颇为多见。文献记载，巨噬细胞在妊娠5周的胚肝丰富，6周后量渐减少^[6]。我们观察各胎龄的胚肝均易见到巨噬细胞。此类细胞大小形状差异颇著。以细胞核的形状而言，有的核形扭曲褶皱较多，有的呈不整团块状，也有为肾形、葫芦形等。核染色质分布或浓集或稀疏，核仁不显著。胞浆内细胞器及吞噬内含物亦有差别，如线粒体的量多少不等；部分线粒体的形状较特殊；或有些巨噬细胞胞浆内有成束之纤细微丝，吞噬内含物多见者如细胞碎片，也有次级溶酶

体,如形态多样的髓样结构,部分则见整个细胞被吞入。被噬细胞的核常固缩,可依稀辨认一些残存细胞器。

值得注意的是于妊娠17周的胚肝中发现有一个细胞的形态颇为幼稚,难以归属某个系统。出现在肝细胞之间,此细胞呈卵圆形,核卵圆略呈不规则,一侧核膜向内轻度凹陷,核染色质细,呈分散的小片状分布,于核周轻度凝集,有一个显著的核仁,核孔不明显;胞浆较为宽广,含有丰富的均匀分布的多聚核糖体,已见有高尔基氏体,线粒体集中于胞浆之一侧,约10个左右,粗面内质网呈条索状分布于胞浆中(图版图4),这类细胞为分化中早期干细胞。

此外,在妊娠11和12周的胚肝发现了一些分化很低的间叶细胞,形态特殊且有不同类型。一类细胞分化很低,细胞核略呈圆形,染色质细而疏松,核仁有痕迹而不显,胞浆内细胞器少,但丰富的多聚核糖体引人注目,偶见窄管状的粗面内质网。另一类细胞亦较幼稚,胞体大,胞核略呈椭圆,核质稀疏,核仁显著,且往往在一个以上,胞浆内密集的核糖体,2—3个单膜围绕的泡,有髓样结构小体。

讨 论

Kelemen, E. 等^[9]报告约在妊娠第5周时肝开始成为主要的造血器官,为第二代造血。Block, M. H. 和天野重安的看法雷同。我们的工作证明胚肝造血有个上升时期(15周以前),旺盛时期(15—23周)和减退时期(24周以后)。从电镜下观察29周的胚肝造血细胞的数量明显减少,且红系细胞的胞浆内有些空泡形成等变化。

胚肝造血细胞以红系为主。在所观察胎龄的较早期如8、9、10周肝窦中晚幼红细胞较多,而在肝细胞索之间为不同发育阶段的定型幼稚红系细胞,考虑前者肝窦中的晚幼红细胞可能是由早期卵黄囊造血的第一代细胞通过血流而到肝脏。目前普遍认为干细胞的迁移和种植于合宜的微环境为造血发育的基础^[12]。我

们认为,不能排除肝组织本身的间叶细胞在获得合宜的“生态龛”(Ecological Niche)的条件下,亦可分化为造血干细胞而向各个造血细胞系发育的可能性。在电镜下取得了以下有利的证据。其一,在紧密相邻的两个肝细胞的间隙中出现了幼稚红系细胞。其二,在胚肝的幼稚红细胞灶中含有正在分化中的幼稚间叶细胞。其三,在妊娠11、12周的胚肝中发现了分化很低的间叶细胞。这些分化中的或分化很低的间叶细胞可能对造血细胞起支持营养作用,但也不能排除它们向着造血干细胞发育和分化的可能。

胚肝造血为何以红系造血发育较著?这显然与胎儿在母体子宫内的生理特性有关。胎体本身与母体有脐动脉、脐静脉的循环连系,此时对外界的刺激反应,诸如吞噬免疫能力均由母体代之执行。为满足胎儿迅速生长的需要,需氧增加,故红系造血极为旺盛,其他粒系、巨核等造血细胞则相对较少。单核和淋巴细胞则更属偶见。在电镜下见到23周的胚肝肝窦中淋巴细胞和幼红细胞之间的密切联系,其机制不清。但上述各系造血细胞在胚肝中的出现也说明了胚肝本身必定有多能性干细胞的存在^[13]。

Van Bekkum, D. W.^[10]提出备选干细胞(candidate stem cell)的名词和特征。Rifkind, R. A.^[11]提出了妊娠10 $\frac{1}{2}$ 天小鼠的胚肝中有预期的血母细胞(presumptive hemocytoblast)。Fukuda, T.^[4,5]指出“在排卵后的33天,在肝细胞的细胞间隙首次可见少数未分化的单个核细胞和过渡型细胞至红系细胞。”

我们在17周的胚肝发现了一个幼稚的造血细胞,此细胞比Van Bekkum的备选干细胞幼稚得多,比Fukuda, T.的预期的造血干细胞稍成熟而比其提出的过渡型细胞略为幼稚,鉴于其性质十分幼稚,可以考虑属于过渡型干细胞。

通过此工作我们认为早期胚肝造血干细胞的来源之一可能由卵黄囊经血流中来,但不能

排除在一定的生理条件和因素(化学物质, 细胞和细胞间信息传递)的调控下, 胚肝本身的间叶细胞向多能性干细胞分化从而发育成系列的造血细胞, 但必须有适合于复制和分化的基质即“生态龕”的存在。病理情况下的髓外造血并不支持干细胞均来自血液。

参 考 文 献

- [1] Bloom, W. and Bartelmez, G. W., 1940, *Amer. J. of Anat.* 67: 21—53.
- [2] Block, M. H., 1976, *Text-Atlas of Hematology 2. Embryologic Basis of Postnatal Hematopoiesis*, by Lea and Febiger. Copyright under the International Copyright Union.
- [3] 天野重安: 关于人胎生造血, 日本血液学全书, (1) 形态 p. 3—7.
- [4] Fukuda, T. 1973, *Virchows Arch. Abt. B Cell Path.* 14: 31—34.
- [5] Fukuda, T. 1974, *Virchows Arch. Abt. B Cell Path.* 16: 249—270.
- [6] Kelemen, E. Calvo, W., Fliedner, T. M. 1979, *Atlas of Human Hemopoietic Development*, by Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [7] 吴祖泽等: 1981. 中国科学, 8: 1009—1013.
- [8] 唐佩弦等: 1981. 生理学报, 33: 51—56.
- [9] Grasso, J. A., 1962. *J. Cell Biology* 14: 235—254.
- [10] Van Bekkum, D. W., 1971, *Blood* 38: 547—558.
- [11] Rifkind, R. A. 1969, *J. Cell Biology* 40: 343—365.
- [12] Fliedner, T. M. and Calvo, W., 1978, *Hematopoietic Stem cell Seeding of a Cellular Matrix: A principle of Initiation and Regeneration of Hematopoiesis* In: “Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells” Clarkson, B. et al. p. 757—773, Cold Spring Harbor Lab.
- [13] Barnes, D. W. H., 1964, *Lancet* Vol. 1. P. 1395—1396.

* 本文多数的流产胚胎都由铁道总医院、首钢医院及 307 医院提供, 特此致谢。

图 版 说 明

图 1 妊娠 24 周人胚肝: 在两个肝细胞的间隙中出现幼稚红细胞。×10,300

图 2 妊娠 12 周人胚肝: 示分化中的间叶细胞与右上、右下的中幼红细胞之间的密切接触。×4,900

图 3 妊娠 17 周人胚肝: 幼巨核细胞胞浆中分界膜系统(DMS)已形成。×7,700

图 4 妊娠 17 周人胚肝: 一个幼稚的造血细胞, 核仁显著, 胞浆内有高尔基氏体、核糖体等——分化中的过渡型干细胞。×7,700

经验交流

聚乙烯醇缩甲醛用于游离细胞电镜样品的制作

Susmumu, S. 1978 年报道用火棉胶膜锥形管固定血细胞的方法。我们用 Formvar 膜代火棉胶膜, 增加了膜的牢固性, 具体方法如下:

将配制的 2% Formvar 氯仿溶液滴 5—6 滴在彻底洗净的锥形离心管中, 把离心管倾斜 45° 边转动边在酒精灯上微微加热, 使其在离心管下半部形成一个 Formvar 膜的内套, 然后加入游离细胞样品 1ml, 加 2.5% 戊二醛 1ml, 3000rpm 离心 20 分钟, 去上清液, 再以 2.5% 戊二醛固定 1.5 小时, 以 0.1M 磷酸缓冲液冲洗三次 每次 25 分钟, 1% 锇酸固定 1 小时。以镊子取出离心管内套, 此时沉淀样品随同内套一起被取出, 用双面刀片把样品切成小块, 然后按常规操作方法进行脱水、浸透、包埋、切片。

(庄元忠)