

^3H -TdR 测定人胚造血组织的功能

汪 涛 马祥瑞 褚作仁 王洪云

(苏州医学院)

关于人胚胎时期的造血组织已有许多研究^[1-3], 其造血功能随胎龄不同有着特殊的时相变化。我们从动物实验^[4]得知, 胚肝是旺盛的造血器官, 利用标记化合物的参入证明胚肝细胞的造血功能是非常活跃的。但是对人类造血细胞的生理特性和代谢功能特性了解得仍不多。胚肝和脾脏都是造血器官, 而且与骨髓有类似的增殖能力。不同来源的造血组织的细胞具有各自的功能性质和生理特性。为了认识造血细胞的生化代谢和生理功能, 用放射性核素进行标记探索是一种比较理想的手段。

本文利用 ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)参入胚肝、脾脏、骨髓、胸腺以研究它们的代谢功能, 并通过形态学和放射自显影方法对其中造血细胞进行了观察和比较。

材 料 和 方 法

人体胚胎的选择: 选用自然流产(1例)、剖腹产(1例)、前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ (ONO-802 Vaginal Suppository, Osaka, Japan)引产的人胚(8例), 经妇产科确定其胎龄为4—5月。

胚肝、胸腺、脾脏、骨髓细胞的制备: 在无菌条件下, 取出胚肝、脾脏、胸腺, 用虹膜剪剪碎, 加10毫升Eagle培养液, 以6号、4号注射针头冲打, 制成单细胞悬液。骨髓细胞从股骨取出, 用注射器吸10—20毫升培养液, 冲出全部骨髓细胞。上述几种细胞悬液静置5分钟后, 去掉凝块, 用血细胞计数器进行计数。

人胚胸腺细胞条件培养液的制备: 取胸腺细胞悬液, 用Eagle培养液稀释成 5×10^6 个细胞/毫升。培养液含有植物血凝素(PHA)200微克/毫升、青、链霉素各100单位/毫升、AB血清15%、谷胺酰胺0.03%。细胞分装于平底培养瓶中, 5毫升/瓶, 37℃

温育7天, 上清液转入离心管中离心3000转/分, 15分钟, 取上清液保存于冰箱待用。

^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)参入及液体闪烁计数器测量条件^[4,6]: ^3H -TdR(比活性14居里/毫克分子, 放射性强度60微居里/毫升, 中国科学院理化所生产)用生理盐水配制。每瓶培养物注入 ^3H -TdR1.2微居里(20微升), 37℃孵育4小时, 终止培养后制备成纸片样品^[4,6]。运用FJ-353型液体闪烁计数器测量, 其条件为: 电压1400V、上道5V、中道0.5V、下道0.5V、分析选择“1”、A道 $1/2 \times 1/16$ 、B道 $1/2 \times 1/4$ 、A道和B道的计数/分比较接近, 分析样品按B道减本底之后进行计算。

体内血浆凝块扩散盒培养方法: 收集胎儿心脏血及腹腔血液用肝素抗凝, 2000转/分离心10分钟, 取上层血浆。胚肝细胞悬液按 1×10^5 个细胞/盒/0.15毫升, 用Eagle培养液稀释, 10毫升细胞液中加入0.5毫升胸腺细胞条件培养基, 制备成工作溶液。用0.25毫升注射器, 取细胞工作液0.15毫升及血浆0.05毫升, 经扩散盒侧壁小孔在盒中冲打均匀, 用熔化的石蜡封口。在埋扩散盒前24小时, 小白鼠腹腔内注入环磷酰胺(300毫克/公斤), 埋扩散盒时, 小鼠在乙醚麻醉下, 腹部用酒精消毒, 于腹中线剪开腹壁1.2—1.5厘米, 埋入扩散盒, 用小钉书机缝合腹部伤口。

根据胚肝细胞培养的不同时间, 分批用颈部脱臼方法杀死小鼠, 从腹腔取出扩散盒, 用单面刀片切去微孔滤膜, 将血浆培养物从盒中转移到玻片上, 用10%甲醛固定10分钟, H.E染色, 以前法进行集落计数^[4,5]。

放射自显影技术: 用前述同样量的 ^3H -TdR进行细胞标记后, 以前法^[6]在培养终止时将细胞转移到离心管中, 1500转/分离心15分钟, 弃培养液, 用生理盐水反复洗涤两次, 于沉淀中加入少许血清, 打匀, 用注射器转移到玻片上制片, 甲醇固定10分钟, 涂布核4乳胶, 曝光3天, 显影、定影后, 用姬姆萨染色观察。

结 果

一、 ^3H -TdR 参入胚胎骨髓、肝脏、脾脏、胸腺细胞的差别

取胚胎肝脏、脾脏、胸腺、骨髓细胞悬液配制成 1×10^6 个细胞/毫升, 2 毫升/瓶, 加入 ^3H -TdR 20 微升 (1.2 微居里), 37°C 培养 4 小时后, 制备纸片样品, 用液体闪烁计数器测量。结果 (表 1) 表明 4—5 个月的人胚中, 骨髓、胸腺组织的造血功能旺盛, ^3H -TdR 参入很高, 肝脏的参入低于前两者, 脾脏的计数与前几种细胞计数相比几乎低 7—17 倍。经统计

表 1 人胚五个月时骨髓、胸腺、肝脏、脾脏中 ^3H -TdR 参入的放射性计数 (CPM/ 1×10^6 个细胞/毫升)

样品	骨 髓	胸 腺	肝 脏	脾 脏
1	38947	20305	14306	2149
2	34228	28473	15783	1790
3	40994	28302	15327	2179
4	34575	34606	15525	2291
5	36721	23995	14014	2471
均数 \pm S.D	37093 \pm 2887	27136 \pm 5373	14991 \pm 782	2179 \pm 250

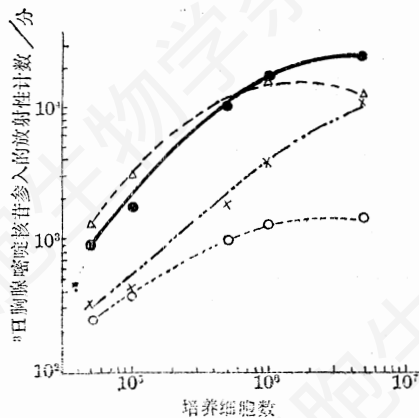


图 1 人体胚胎骨髓、胸腺、肝、脾各种组织的不同细胞数量组加入 ^3H -TdR 1.2 微居里, 培养 4 小时后放射性计数的变化

(每个点为 5 个样品的均数, 重复三批, 规律一致)

学分析各组之间差异非常显著。

二、胚胎肝脏、脾脏、骨髓和胸腺的不同细胞数量与 ^3H -TdR 参入的关系

4—5 个月人体胚胎的上述几种器官, 以 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 个细胞/毫升进行培养, 标记 4 小时, 制成纸片样品, 用液体闪烁计数器测量, 发现骨髓、胸腺、肝脏、脾脏细胞在 5×10^4 — 1×10^6 个/毫升之间 ^3H -TdR 的计数/分, 随细胞量的增加而明显增高, 5×10^6 个细胞/毫升时 ^3H -TdR 参入量的增长速度已经相应减缓 (图 1)。4—5 个月胚胎的骨髓、胸腺 ^3H -TdR 参入较高, 胚肝细胞的参入计数/分低于骨髓和胸腺细胞。脾脏细胞的参入最低。

三、人体胚肝细胞培养的动态观察

人体胚肝细胞加入上述人胚胸腺细胞条件培养液, 以相同的细胞数量在血浆凝块扩散盒中进行培养, 以 1×10^5 个细胞/盒, 分期分批进行观察细胞集落的动态变化 (图 2)。实验发现

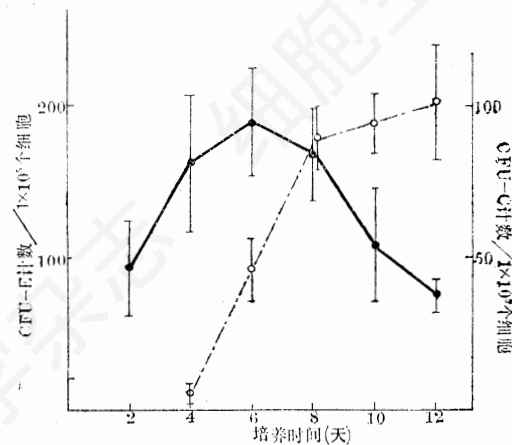


图 2 五个月人胚的胚肝细胞在血浆凝块扩散盒中形成红细胞集落 (CFU-E) 和粒细胞集落 (CFU-C) 的动态观察 (每个点为 5 个样品均数 \pm S. D.)

●—● CFU-E ○—○ CFU-C

红细胞集落 (CFU-E), 在 2—6 天时明显增加, 从 90 上升到 190 个左右随后下降, 至 12 天时为 70 多个。粒细胞集落 (CFU-C) 在 4—8 天内不断增加, 8—12 天增长速度变缓, 12 天时

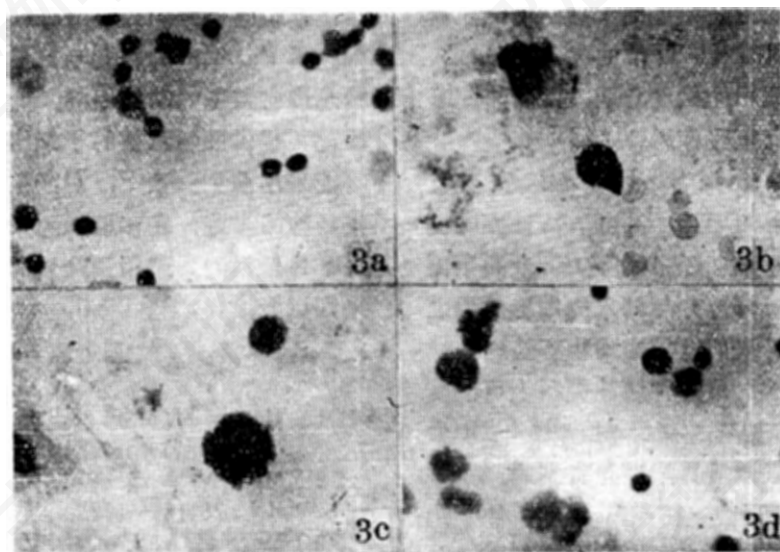


图3 4—5个月人胚骨髓、胸腺、肝、脾细胞用 ^3H -TdR标记的放射自显影特征

a. 胸腺中标记的小淋巴细胞。b. 骨髓中标记的粒细胞；c. 肝脏中标记的早幼红细胞；
d. 脾脏中标记的有核红细胞。

(^3H -TdR 1.2 微居里/瓶标记4小时，曝光3天)

CFU-C 达到100个左右。在6天后CFU-E周围有许多成熟红细胞堆积，逐渐变成血红蛋白团块，最后消失，而CFU-C的数量迅速增加，故8—12天时，样品中粒细胞占优势。

四、人胚肝脏、骨髓、胸腺、脾脏造血细胞的分化及放射自显影观察

^3H -TdR 1.2 微居里参入人胚肝脏、骨髓、胸腺、脾脏4小时后的放射自显影图像(图3)证明胸腺淋巴细胞(多为小淋巴细胞)被浓密的黑色银粒覆盖，标记较强，标记指数达40%。骨髓有核细胞标记指数达45%；胚肝为38%；脾脏30%。在几种标记图像中亦可见到有被标记的分裂相。

细胞形态观察表明，骨髓以粒细胞为主，原粒到分叶核均可见到，细胞形态较大，颗粒粗糙；肝脏和脾脏以红系为主，细胞形态较大，粒细胞亦大，颗粒粗；胸腺以小淋巴细胞为主，原淋巴及幼稚淋巴细胞可见。

讨 论

成人骨髓是制造各种造血细胞的主要部

位，在扩散盒中人类骨髓原始造血细胞可以增殖分化^[7,8]，它是造血干细胞移植的重要来源。采用胚胎造血组织——如胚肝、骨髓、胸腺、脾脏等，为提供更多的造血干细胞来源开辟了广阔的前景。

为了解人胚造血细胞的代谢功能及生理特性，我们利用DNA的前体物质—— ^3H -TdR参入胚胎造血器官的细胞悬液培养体系，结合闪烁计数器测量，对造血细胞的代谢功能进行研究，了解造血细胞的增殖分化和代谢功能，利用 ^3H -TdR参入是一种快速测定方法^[4]。胎龄4—5个月的人胚，骨髓和胸腺细胞的放射性 ^3H -TdR的参入率很高，表明这些组织的造血功能已经很旺盛。众所周知，胚肝是胚胎期主要造血器官之一，从 ^3H -TdR参入的实验证明，4—5个月时胚肝造血功能已降低，而骨髓则成为造血功能活跃的器官。但此时肝脏体积大，细胞多，在胚胎造血中可能仍占有优势。

根据造血细胞来源于原始多能干细胞的理论^[3,10]，可知胚胎肝、脾、骨髓、胸腺的造血细胞也同样由原始造血干细胞发育而来的。利

用集落形成技术反应胚肝定向干细胞形成集落的生理特性,而利用 ^3H -TdR的参入实验则表明胚胎时期造血细胞的代谢功能,两者彼此呼应,相互衬托具有重要作用。

从不同细胞数量对 ^3H -TdR参入实验发现,随着细胞数量的增加,其参入活性亦明显增加。在 5×10^4 — 1×10^6 个细胞/毫升的范围内,放射性核素的计数/分与植入的细胞数量之间呈线性关系。与我们以前的动物实验的规律是相似的^[4]。其次,从这种线性关系上可以发现细胞浓度为 1×10^6 个/毫升时, ^3H -TdR参入良好,对选择最适培养浓度是有利的。

一些资料表明^[1,9],在正常生理条件下,胚肝在红细胞生成过程中发挥较大的作用,在5个月以后,代谢率出现迅速下降。其标记指数分别为:骨髓45%、胸腺40%、肝脏38%、脾脏30%。虽然各种细胞均匀地处于周期的不同时期,而从形态学和自显影证明 ^3H -TdR参入计数的变化反映了各种造血组织的代谢功能和生理特性。 ^3H -TdR参入计数高的样品,表明细胞处于幼稚阶段,也提示干细胞的数量较多,能够合成较多的DNA,故增殖代谢旺盛, ^3H -TdR参入计数低者,表明细胞处于成熟阶段,增殖能力差。

在胚胎发育时期,肝、脾、胸腺、骨髓都是造血器官,而且大部分淋巴细胞仍处于未成熟阶段,故对胚胎细胞移植所引起的GVH反

应比移植同种骨髓为轻^[10-12]。我们所选的以前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ 引产的胎儿与自然流产及剖腹产的胎儿造血组织的功能相同。 $\text{F}_{2\alpha}$ 无毒性,安全,因此可提供胚胎移植的干细胞,如果各个医院都能采用前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ 引产,结合干细胞的收集与冷冻措施,在移植物的来源和细胞数量方面都是乐观的。采用引产后的新鲜组织培养效果则更好。

参 考 文 献

- [1] Hassan M. M. et al., 1979, *Brit. J. Hematol.*, 41:477—487.
- [2] Moor M. A. S. et al., 1970, *J. Cell Physiol.*, 75:181—192.
- [3] Moor M. A. S. et al., 1967, *J. Exp. Med.*, 126:715—726.
- [4] 汪涛等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(1): 32—34.
- [5] 汪涛等, 1979, 生理学报, 31(4):328—335.
- [6] 苏州医学院卫生系第三教研组, 1978, 生物化学与生物物理学报, 10(1):51—58.
- [7] Squires D. J. P., 1975, *Brit. J. Hematol.*, 29:89—97.
- [8] Boyum A. et al., 1972, *Blood*, 40:163—171.
- [9] Rowley P. T., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:984—988.
- [10] 吴祖泽, 1980, 中华血液学杂志, 1(1): 56—58.
- [11] Thomas E. D. et al., 1975, *New Eng. J. Med.*, 292:832—841.
- [12] Gale R. P. et al., 1976, *Lancet*, 2:921.

体外辐射对淋巴细胞微核出现率的稳定性研究

王天宇 杨丽君

(南京医学院七〇九研究组)

在辐射损伤、药物筛选、肿瘤防治等有关课题研究领域内,应用微核率观察其效应,已经受到了研究工作者的广泛重视^[1-8]。我们在人外周血细胞体外经受 $^{60}\text{Co}\gamma$ -线不同剂量照射、不同培养时相观察的微核出现率效应的研

究中^[9],从受检对象的实验资料的统计分析看到,无论是作为总体或是作为分开的个体,在所选定的评价指标(Y_{I} 、 $Y_{\text{总}}$ 、 $Y_{\text{淋}}$)上,其淋巴细胞微核率与一定的辐照剂量之间,均呈正比线性关系。为了更确切地了解细胞微核指标稳定