

豚鼠骨髓细胞在小鼠体内的增殖特性*

汪涛 马祥瑞 王洪云

(苏州医学院)

哺乳动物和人的造血干细胞能促进受致死剂量照射的或造血障碍的机体恢复造血功能。关于造血干细胞增殖与分化的问题,许多学者^[1-4]进行了大量实验,积累了丰富的资料。骨髓细胞离体培养的目的,在于了解1)造血细胞的发育过程;2)多能干细胞与定向干细胞(或造血祖细胞)之间的关系;3)细胞增殖、分化与影响造血的体液因子的依赖关系;4)培养后细胞功能及性质的变化等等。我们以前的工作^[5,6],对豚鼠骨髓细胞的辐射敏感性及代谢功能已有初步了解。为了解造血干细胞在扩散盒培养中的动态变化,我们将豚鼠骨髓细胞种植在扩散盒中并埋入经环磷酰胺处理的小鼠腹腔内,以观察造血干细胞的增殖和功能状况。

材 料 和 方 法

一、骨髓细胞悬液的制备 用Eagle培养基,按以前叙述的方法^[6]制备细胞悬液。

二、扩散盒技术 内径9毫米×厚2毫米的有机玻璃环,两面贴有微孔滤膜(孔径0.2—0.4微米,上海医工院生产),侧面有一加样小孔,经80℃消毒12小时。每个盒的容积为0.15毫升,种入 2×10^5 个细胞。液体扩散盒法,用0.25毫升注射器取细胞悬液0.15毫升,注入双面扩散盒;血浆凝块扩散盒法,则取重新配制的细胞悬液0.1毫升,加血浆0.05毫升,在扩散盒中来回冲吸两次,使细胞均匀分布。石蜡封口后,置于盛冷培养基的培皿中浸泡,随后埋入小鼠腹腔中培养。

三、受体小鼠的处理 选用体重18—22克的昆明种小鼠,在植入扩散盒的前一天,小鼠腹腔注射环磷酰胺(300毫克/公斤体重)。埋扩散盒时,受体小鼠在乙醚麻醉下,经消毒处理,沿腹白线剖腹,植入

扩散盒,随后用小钉书机迅速缝合。

四、扩散盒的消化与细胞的收集 将实验小鼠颈部脱白活杀,腹部用酒精消毒,取出扩散盒,用无菌纱布擦去周围的纤维蛋白膜,放进盛消化液(5毫升Eagle培养基+50毫克胰蛋白酶)的试管中,振荡90分钟,从扩散盒的边缘见内容物清澈透明或有气泡移动时,剥去封口石蜡,用0.25毫升注射器抽出细胞悬液,再用0.25毫升培养液分两次洗涤,将其容液合并(总体积0.4毫升),计数。

五、放射自显影技术 将上述收集的细胞悬液置于离心管中,加Eagle培养基3毫升,离心(1000转/分)5分钟,以洗去胰蛋白酶。于沉淀细胞中加2毫升培养基,混匀,并注入³H-TdR(比放射性14居里/毫克分子,放射性强度60微居里/毫升)4微居里,在37℃温箱中孵育4小时,取出后用Hanks液5毫升洗涤2次,弃上清液。于沉淀中加一滴血清打匀,用注射针头吸出,转移到玻片上。制片在纯甲醇中固定10分钟,按以前叙述的方法^[7],作细胞放射自显影。

结 果

一、豚鼠骨髓细胞在小鼠腹腔中增殖的动态观察

豚鼠骨髓细胞在扩散盒中能够增殖。在四次液体扩散盒培养中,细胞增殖动力学表现的特征如(图1a)所示,在植入的最初1—2天,细胞数量下降,收集的细胞数为种植细胞数的57%,8—10天时,细胞数量达到最高峰,收集的细胞数达到或略高于种入数。随后,增殖受到限制,细胞数量又下降。

* 本文承军事医学科学院吴祖泽教授指导,特此致谢。

虽然豚鼠骨髓细胞能够在小鼠腹腔液体扩散盒中增殖,但最高峰值时收集的细胞数仍近似于种入数。为了使在小鼠腹腔中培养的豚鼠骨髓有核细胞提高收集量,我们两次采用了血浆凝块方法进行培养,从细胞数量的动态变化(图1b)可见,第1天收集的细胞数为种入的29%,第2天开始增殖,10天左右达到最高峰,收集细胞数为种入数的142%。与液体扩散盒法相比,细胞数量明显增加,说明血浆凝块培养体系较液体扩散盒优越。然而,细胞在扩散盒中增殖的规律,两种体系大致相似。

另外,在血浆凝块扩散盒中种入 5×10^4 — 2.5×10^5 个细胞,培养5天后,收集的细胞数量与种入的细胞数量之间呈线性关系(图2)。经统计学分析,相关系数 $\gamma = 0.96$,斜率 $b =$

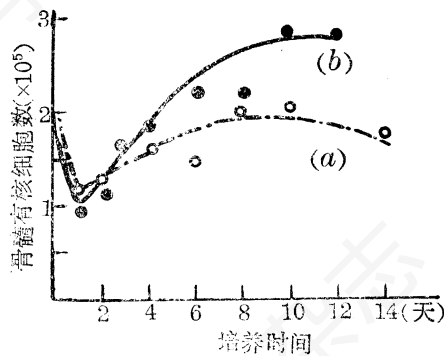


图1 液体扩散盒(a)和血浆凝块扩散盒(b)培养对骨髓有核细胞数的影响

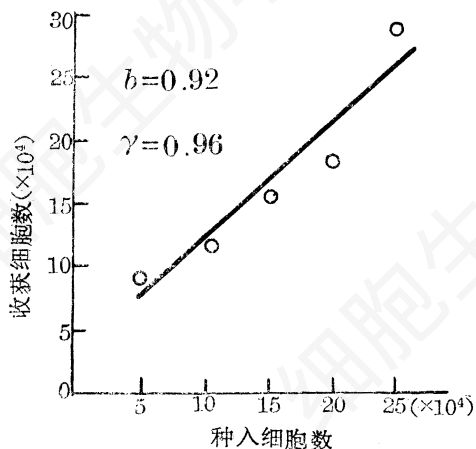


图2 血浆凝块扩散盒培养5天后,种入和收获的骨髓有核细胞数之间的关系

0.92。本实验中选用 2×10^5 个细胞/盒,正处于线形增长范围内。

二、血浆凝块扩散盒培养后豚鼠骨髓细胞的功能状况

1. 豚鼠骨髓细胞在血浆凝块扩散盒培养条件下,第6天时已形成许多细胞集落,第12天时每个集落增大(图3a),也有些细胞集落发生融合。其中有红细胞集落形成单位(CFu-E)(图4),粒细胞集落形成单位(CFu-C),其产

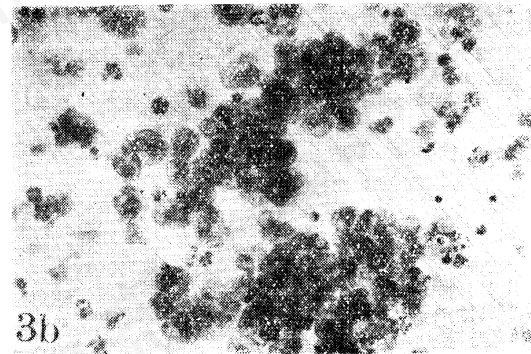
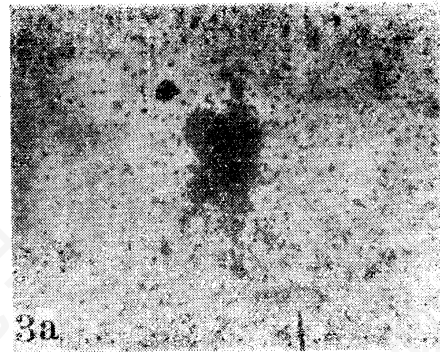


图3 豚鼠骨髓细胞在血浆凝块扩散盒中培养12天时的CFu-C

a. 巨大的CFu-C $\times 80$

b. 放大的CFu-C $\times 320$

率分别为500CFu-E/ 10^5 个细胞和270 CFu-C/ 10^5 个细胞。

2. 血浆凝块扩散盒中培养的豚鼠骨髓细胞经胰蛋白酶消化后,用2%台盼蓝染色,细胞存活率可达80%左右。培养6天的细胞用放射自显影技术观察到细胞核上有 ^3H -TdR显影的黑色银粒(图5),标记率为52%,证明培养后骨髓有核细胞有DNA合成能力和细胞增殖能力。

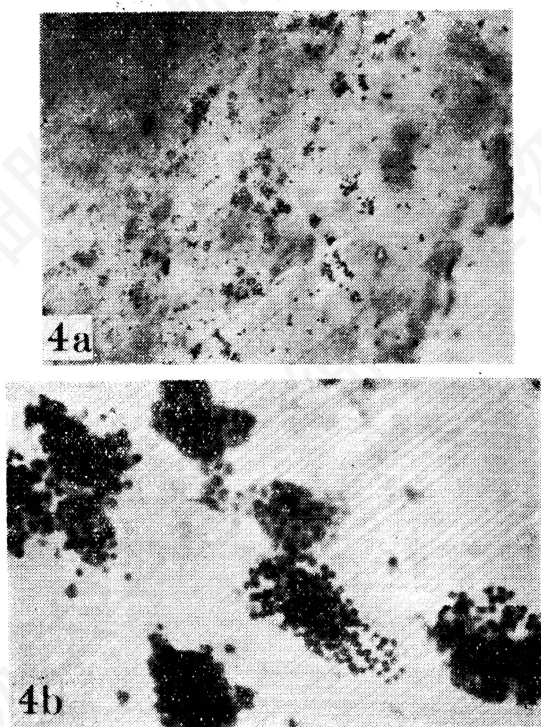


图4 豚鼠骨髓细胞在血浆凝块扩散盒中培养12天时的CFu-E

- a. 散在分布的40个CFu-E $\times 80$
b. 6个BFu-E $\times 320$

3. 正常豚鼠骨髓细胞与培养1、3、6、9、12天的细胞分类表明,在正常和培养早期的涂片上大多数细胞是杆状核、分叶核、中幼红及晚幼红,在培养晚期(12天)以粒系一巨噬系细胞占优势,同时在涂片中还发现一些巨核细胞。

讨 论

我们的实验证明豚鼠骨髓细胞能够在用环磷酰胺处理的受体小鼠腹腔中增殖。从增殖曲线的变化见到在扩散盒植入后的第1天细胞数量迅速下降,第2、3天开始迅速上升,8—10天时收获细胞数量达到最高峰值,随后又逐渐下降。初期细胞数量下降,可能由于实验操作过程中机械性刺激、条件的改变、造血环境不适应等原因。待造血微环境建立之后,细胞数量迅速上升。第4天收获的具有增殖能力

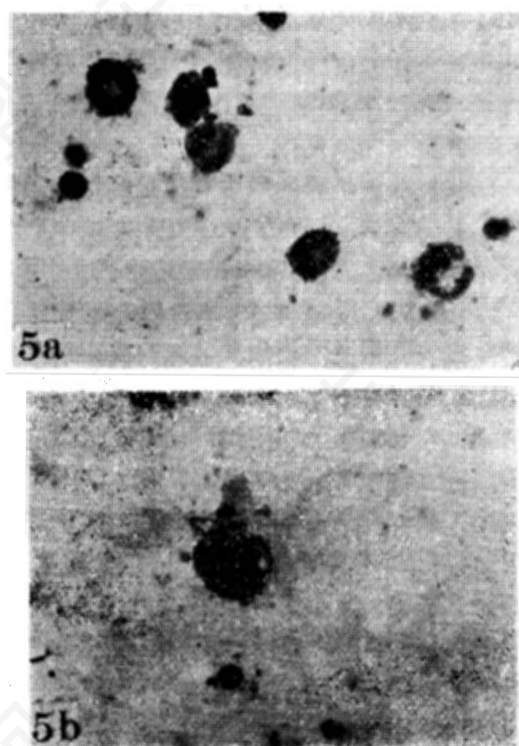


图5 豚鼠骨髓细胞在血浆凝块扩散盒中培养6天后, ^3H -TdR参入细胞的形态

- a. 标记的增殖性粒细胞 $\times 800$
b. 标记的巨核细胞 $\times 800$

的幼稚细胞,一般都是新产生的,是初期存在的干细胞的后代^[8,9,10]。细胞数量在增殖高峰(8—10天)之后又出现下降,这一现象可能受多种因子的影响,例如:(1)受体小鼠体内粒细胞刺激因子的减少或其造血抑制因子的发展。(2)扩散盒特性的改变,扩散盒外面有纤维蛋白膜包裹,造成刺激因子的缺乏及扩散盒中营养成分的枯竭。Marmor^[11]将培养7天的扩散盒取出,剥去表面的纤维蛋白膜,种入新照射的第二代受体,获得与原来第一代受体相同的结果。(3)细胞种类的改变,造血干细胞与增殖性粒细胞减少,吞噬细胞增多^[12]。(4)细胞密度效应,我们运用 ^3H -TdR、 ^{14}C -uR双标记技术测定DNA、RNA合成能力的研究中^[6]表明,本实验选用 2×10^5 个细胞/盒(约等于 1.5×10^6 个细胞/毫升),其密度处于DNA合成线性增长范围内。(5)免疫反应,照

射的或细胞毒剂处理的动物,可使对异源性细胞的免疫排斥反应受到抑制,因而细胞数量下降出现较迟。Laissue^[8]用山羊自体骨髓作实验,没有发生免疫反应。

血浆凝块法培养的细胞其数量的增殖较液体培养者高,其原因可能由于血浆凝块中造成细胞定居的环境,便于造血微环境形成;CFu-E、BFu-E和CFu-C同时增殖^[5]从而使细胞数量得到较大幅度的增加,故血浆凝块培养体系比液体培养体系优越。

豚鼠骨髓细胞能够在用环磷酰胺处理的小鼠腹腔扩散盒中形成许多CFu-E、BFu-E、CFu-C,表明骨髓原始造血干细胞具有旺盛的增殖能力。³H-TdR的放射自显影也证明培养6天的细胞,4小时标记率为52%。说明这些细胞有DNA合成能力及细胞增殖能力。细胞分类表明,在培养早期幼稚细胞较多,在培养晚期幼稚细胞减少。

摘 要

豚鼠骨髓细胞种植于用环磷酰胺处理的小鼠腹腔中,在液体和血浆凝块两种扩散盒中进行培养,对细胞增殖的动力学作了观察。在血浆凝块培养体系中细胞繁殖能力较旺盛。

骨髓有核细胞在血浆体系中培养后,能够形成CFu-C、CFu-E。培养6天的骨髓有核

细胞用³H-TdR参入4小时,作放射自显影,标记指数达52%。增殖性粒细胞的数量随培养时间的延长而逐渐减少。

参 考 文 献

- [1] Boyum, A., W. Boecker, A. L. Carsten and E. P. Cronkite, 1972. *Blood* 40: 163—171.
- [2] Boyum, A., A. L. Carsten, O. D. Learum and E. P. Cronkite, 1972. *Blood*, 40:174—186.
- [3] Luissue, J. A., A. D. Chanana, E. P. Cronkite, D. D. Joel and W. Pavel, 1975. *Blood*, 45:417—424.
- [4] Squiers, D. J. P., 1975. *Brit. J. Haematol.* 29:89—96.
- [5] 汪涛、赵晓宁、吴祖泽, 1979. *生理学报* 31:328—335.
- [6] 苏燎原、汪涛、马祥瑞、刘克良、林兴成、王洪云、冯纪辛, (待发表资料).
- [7] 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*, 10:51—58.
- [8] 吴祖泽, 1978. *造血细胞动力学概论*, 科学出版社, 228—267.
- [9] Shulman, L. N. and S. H. Robinson, 1977. *J. Lab. Clin. Med.*, 90:581—588.
- [10] Petterson, E. D., A. Boyum and B. F. Loane, 1974. *Rad. Res.*, 58:409—416.
- [11] Marmor, J. B., J. L. Russell, A. M. Miller and S. H. Robinson, 1975. *Blood*, 46:39—49.
- [12] Metcalf, D. 1971. *J. Cell Physiol.*, 77: 277—280.

磁场对水稻花粉愈伤组织诱导和分化的影响*

赵 成 章

(浙江省农业科学院水稻所生理组)

近年来生物磁学的应用范围日益扩大。特别是在农业方面的应用已获得良好的效果。许多农作物在生长发育过程中,外加一定的磁场强度可以促进种子的发芽、生长,有的还可以增加产量^[4,5,7]。在500—4500奥斯特(以下

简称为奥)的非均匀磁场中,一些植物(如葱属、水仙属和紫苏属)的细胞、组织和器官发

* 本试验得到浙江省计量局陈锦田、陈干钦两同志的热情帮助,特此感谢。

参加本项试验工作的还有郎莉娟、潘裕才同志。