

## 小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养中的生长动力学

山根兴\* 杨家宽\* 吴祖泽

(军事医学科学院 放射医学研究所 北京)

自从 Berman 和 Kaplan<sup>(1)</sup> 在造血研究中引入扩散小室培养技术以来, Bφyum 等<sup>(2-5)</sup> 从技术和理论等方面展开了广泛的研究。现在, 扩散小室培养技术已经成为造血研究中一个重要的实验技术, 它对于了解造血细胞生长动力学、评论造血细胞的功能状况、研究药物、体液等因素对细胞生长的影响以及在白血病的病因探讨中都有重要的意义。

小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下的生长以及在培养瓶中<sup>(6,7)</sup> 的生长是两个较好的培养体系。在上述两个体系的培养过程中, 不仅有细胞数量的增长, 同时存在着造血干细胞的增殖和分化, 后者是维持造血细胞在较长培养时间内处于活跃增殖活动的基础。

但是, 在上述任何一个培养体系中, 维持造血细胞增殖活动的时间都是有限的。不少学者试图寻找最合适的体外培养条件。Nettesheim 等<sup>(8)</sup> 报告在体内培养过程中, 扩散小室上微孔薄膜通透性降低是阻碍小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下持续生长的一个原因。Marmor<sup>(9)</sup> 等指示小鼠骨髓细胞在扩散小室内生长所引起的细胞密度增高, 是影响培养中细胞持续生长的另一个原因。

我们研究了小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下造血细胞的增殖和分化, 探讨了影响细胞持续生长的各种因素。

### 材料和方法

#### 动物

本院繁殖的小白鼠, 8—10周龄。

#### 照射条件

<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线, 剂量率为115伦/分。

### 扩散小室制备

在一个内径为9毫米的有机玻璃环上打一个直径约1毫米的小孔作为加样口, 环的两侧用粘合剂粘上两张微孔薄膜(孔径约为0.4微米)。扩散小室的容积约为130微升。将扩散小室置于密闭玻璃瓶内, 80℃干热消毒24小时后, 备用。

### 骨髓细胞在体内扩散小室中的培养方法

用一定量的费歇氏(Fischer's)培养液从3只小鼠的3根股骨中冲出全部细胞, 通过带有6  $\frac{1}{2}$ 和4号针头的注射器, 制成单细胞悬液。根据有核细胞计数, 配制成含有15%马血清和一定细胞浓度的细胞悬液。每个扩散小室中加入100微升细胞悬液, 加样口用熔融石蜡封住后, 将扩散小室埋入经750拉德 $\gamma$ 线照射的小鼠腹腔中。

### 培养细胞的收集和计数

体内培养一定时间后, 杀死小鼠, 取出扩散小室, 擦去表面沾连的附着物, 然后将扩散小室投入盛有0.75%胰蛋白酶的溶液中, 室温下振荡60—70分钟, 使小室内内容物完全溶解。然后剔除扩散小室上的石蜡封口, 吸出其中的细胞悬液, 空小室再用培养液洗涤两次(每次0.1毫升), 合并后, 计数有核细胞浓度, 然后作CFU-S测定和细胞涂片。

### 0.75%胰蛋白酶溶液的配制

以溶解5个扩散小室所需的5毫升溶液为例, 其组成是: 胰蛋白酶37.5毫克, 40%聚蔗糖0.6毫升, 费歇氏培养液4.4毫升。

\* 现在地址: 上海工业卫生研究所

### 细胞分类

细胞涂片经瑞氏染液染色后，计数500个有核细胞中各类细胞的比例。增殖性粒细胞包括中幼粒细胞以前各阶段中的幼稚细胞。非增殖性粒细胞包括晚幼粒细胞、带状核和分叶核粒细胞。

### CFU-S 测定

按Till和 McCulloch<sup>(10)</sup>方法，对850拉德照射小鼠输注一定量的骨髓有核细胞或培养后的细胞，每组12—15只小鼠，9天后，计数受体小鼠脾脏表面生成的脾结节数。

## 实验结果

### 一、小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下的增殖和分化

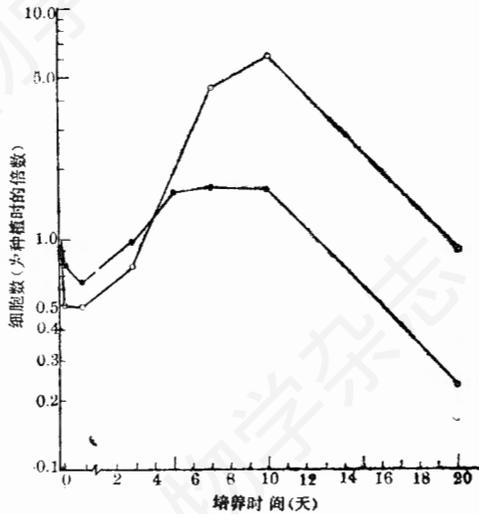


图1 小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养中有核细胞(—○—)和CFU-S(—●—)数量的动态变化

从图1可以见到，正常小鼠骨髓细胞在体内扩散小室中培养4小时后，有核细胞数量明显降低，约为植入量的50%。2—3天后，进入指数增长阶段。培养后第10天，每个扩散小室中的有核细胞数量约为植入量的6倍。以后逐渐降低，至培养后第20天，每个小室中有核细胞数量约为植入量的90%。

同时，CFU-S数量亦有类似的消长过程。

在最初24小时内，CFU-S数量降低到63%，以后转入指数增长。培养第7天的CFU-S数量约为植入量的1.67倍。在扩散小室的培养条件下，CFU-S和有核细胞数量的变化，在时相上是比较接近的。

小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下，主要生长的细胞类型是粒细胞和单核—巨噬细胞。从表1的细胞分类中可以见到，培养第5天时，增殖性粒细胞和单核—巨噬细胞

表1 正常小鼠骨髓细胞和体内扩散小室中培养不同时间后收集的有核细胞的形态分类

时间	增殖性粒细胞	非增殖性粒细胞	单核—巨噬细胞	其它
种植前	9.0	63.4	2.4	25.2
种后5天	24.6	54.6	16.4	4.4
7天	22.0	58.6	18.2	1.2
10天	16.0	60.2	20.4	3.4

胞的比例大幅度增加，尤以单核—巨噬细胞的增加更为显著，而红系细胞和淋巴细胞的比例急剧降低。当扩散小室中细胞进入指数增长的

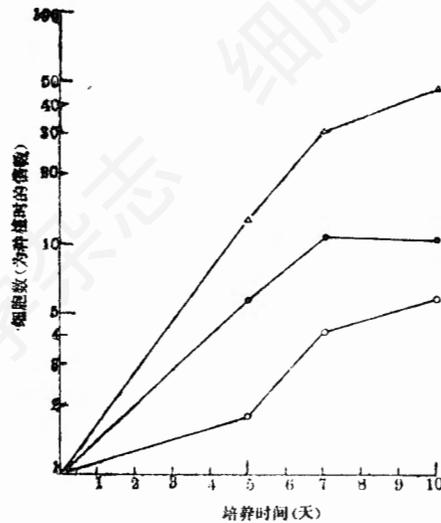


图2 小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养中各类有核细胞数量的动态变化。每个实验点由5只扩散小室组成。

- △— 单核—巨噬细胞
- 增殖性粒细胞
- 非增殖性粒细胞

阶段，可以在细胞涂片中见到较多的增殖性粒细胞、单核—巨噬细胞以及它们的分裂相。图2是增殖性粒细胞、非增殖性粒细胞以及单核—巨噬细胞在培养过程中细胞数量增长的动态变化。以培养第10天为例，单核—巨噬细胞数量约为培养前的46倍，增殖性粒细胞数量约为培养前的10倍，而非增殖性粒细胞增加近6倍。

### 二、二次移植对细胞生长的影响

正常小鼠骨髓细胞在体内扩散小室( $1.5 \times 10^5$ 个/小室)中经过7—10天生长后，造血干

细胞和有核细胞数量都逐渐降低，反映了扩散小室的培养条件或细胞增殖能力在上述培养过程中的变化，其中，膜通透性的降低和扩散小室中细胞密度的增加是影响细胞持续生长中两个值得重视的因素。为此，我们将正常小鼠骨髓细胞在体内扩散小室中培养5天后，取出其中的细胞，经过适当的稀释，再种入到另一个新的扩散小室( $1.5 \times 10^5$ 个/小室)中，然后植入经750拉德照射小鼠的腹腔，观察第二次移植后扩散小室中的细胞生长状况。

从图3和图4可见，第二次移植后扩散小

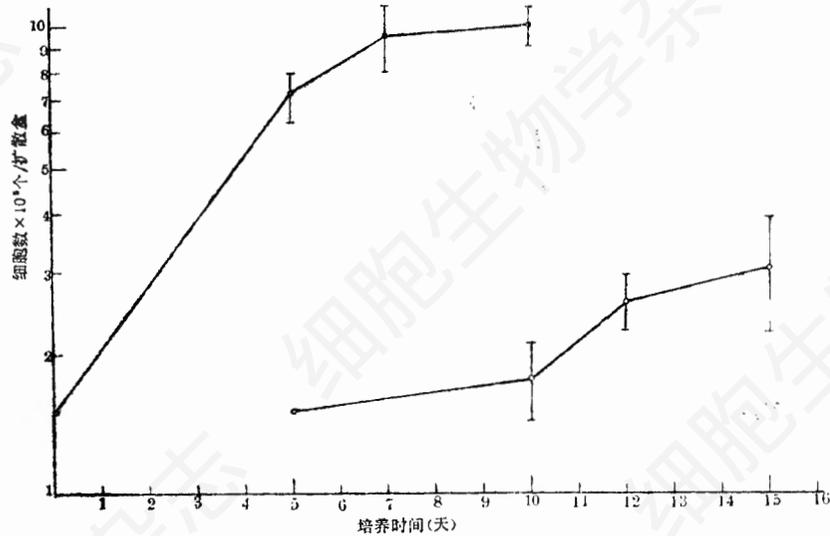


图3 小鼠骨髓细胞在一次(●)和二次(○)移植后细胞数量的动态变化，每个实验点由5只扩散小室组成，平均值±标准误。

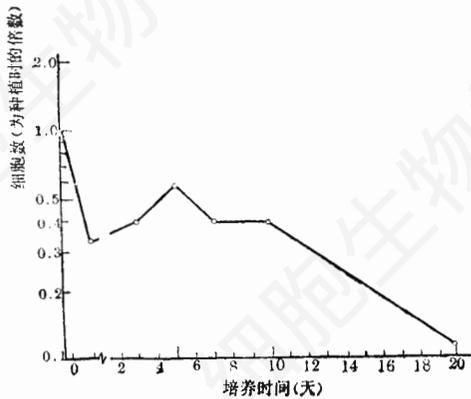


图4 小鼠骨髓细胞在二次移植后CFU-S数量的动态变化

室中的细胞生长是有改善的，但CFU-S和有核细胞数量的增长幅度远远地低于第一次移植后的生长特性。

### 三、细胞组成对二次移植细胞生长的影响

小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下的一个生长特点，是培养过程中各类细胞相对比例的急剧变化。因此，细胞与细胞之间相互影响的改变，或造血干细胞在扩散小室培养条件下微环境的改变，可能会影响上述培养体系中的细胞增殖和分化。为了纠正和培养过程中细胞组成改变可能造成的影响，我们将正常小鼠骨髓细胞在体内扩散小室中培养5天后，取

出其中的细胞，作适当的稀释。在上述细胞悬液 ( $3 \times 10^5$  个/100微升) 中混入等量 ( $3 \times 10^5$  个/100微升) 的、经过500或1000拉德 $\gamma$ 线照射的同种骨髓细胞悬液，将混合的细胞悬液再种入到另一个新的扩散小室中，然后埋入经750拉德照射小鼠的腹腔，观察第二次移植后扩散小室中的细胞生长状况。

我们注意了经500或1000拉德 $\gamma$ 线照射的正常小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下微弱的细胞增殖活动，在扣除了这种影响的基础上，从图5可以见到，改变第二次移植中的细胞组成可以明显地改善细胞的生长状况。第二次移植后5天的有核细胞数量比对照组明显增高，而且有统计显著性的差别 ( $P < 0.01$ )。

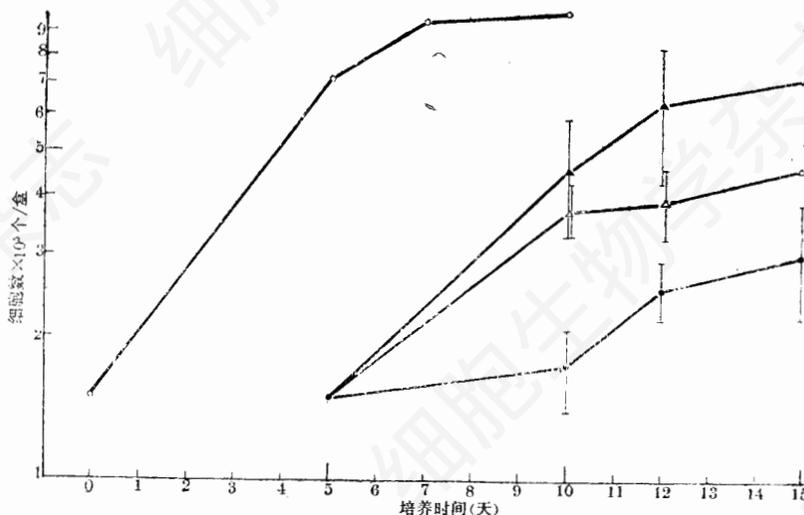


图5 照射骨髓细胞对二次移植中细胞生长的影响，每个实验点由5只扩散小室组成平均值±标准误

- 一次移植
- 二次移植
- △— 二次移植中加入经500拉德 $\gamma$ 线照射的骨髓细胞
- ▲— 二次移植中加入经1000拉德 $\gamma$ 线照射的骨髓细胞

### 讨 论

小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下的动力学研究，是深入认识正常造血活动以及细胞毒剂，电脑辐射等因子影响造血的一个体外实验模型，而且，有可能为体外造血研究提供某些理论依据。

迄今体内扩散小室培养方法是小鼠骨髓细胞在脑体条件下比较接近于自然生长的一个培养体系。在培养后的3—4日间，可以见到粒系和单核—巨噬细胞的指数增长。应用细胞分裂抑制剂可以测定增殖性粒系细胞的周期时间，它与体内测定结果是很接近的<sup>(11)</sup>。但是，小鼠骨髓细胞在扩散小室培养条件下的生长持续

时间是有限的，一般在培养10天以后，小室中造血干细胞和有核细胞数量都趋于减少。造成细胞生长停滞的原因是多方面的，例如微孔薄膜通透性的降低、小室中细胞密度的增高、培养过程中细胞成分或细胞与细胞之间相互作用的改变，以及造血干细胞的自我更新能力的降低等，这些可以在不同程度上影响造血细胞的正常增殖和分化活动。图3说明小鼠骨髓细胞在体内培养5天之后，小室中的细胞密度增高近5倍，降低细胞密度和更换扩散小室，即在稀释5倍后再作第二次移植，确实有利于细胞的生长，但是，它的增长幅度远远低于第一次移植中的细胞生长状况，反映了膜通透性和细胞密度对细胞增殖的影响是存在的，但不是

最重要的。骨髓细胞在扩散小室培养条件下, 各类细胞相对比的变化可能会影响细胞与细胞之间的正常相互作用, 进而影响细胞的增殖和分化活动。从图5可以见到, 在二次移植中加入适量照射的骨髓细胞, 有利于培养细胞的生长。但是, 随着二次移植中细胞数量的增长, 在我们的初步实验中并没有见到CFU-S数量成相应比例的增高, 反映了上述细胞数量的增长, 并不一定意味着CFU-S增殖活动的提高, 很可能与CFU-S的分化有着密切的关系。在体外培养条件下, 持续性的细胞增殖活动可能会影响造血干细胞的自我更新能力, 如将这些细胞输注给照射小鼠, 可能会影响它们在造血组织中的植入率, 这也是不可忽视的因素<sup>(12)</sup>。要澄清这个问题, 还有待进一步研究。

### 摘 要

将小鼠骨髓细胞注入两侧粘有微孔薄膜的扩散小室内( $1.5 \times 10^5$ 个有核细胞/小室), 然后埋入预先经750拉德 $\gamma$ 线照射的小鼠腹腔中。在体内培养不同时间(4、24小时、3、5、7、10和20天)分批取出扩散小室, 经胰蛋白酶溶解后, 吸出小室内的细胞悬液, 作CFU-S测定、有核细胞计数和分类。

扩散小室植入腹腔后4—24小时, CFU-S数量趋于降低, 以后进入指数生长阶段, 第7天达到峰值, 此时CFU-S数量为植入前的1.67倍。10天后, CFU-S数下降。有核细胞数也有类似的时相变化, 但峰值出现在10天, 此时有核细胞数为植入前的6.1倍。上述实验结果说明, 正常小鼠骨髓细胞可以在受体小鼠扩散小室内进行增殖和分化。

含有正常小鼠骨髓细胞的扩散小室在植入受体小鼠后的第5天, 当时骨髓细胞处于指数生长中, 取出其中的细胞转注到另一新的扩散小室中, 然后植入第二个受体小鼠腹腔。但是, 在以后的培养中, 有核细胞和CFU-S数量的增

长幅度是比较小的。在培养体系中加入经500或1000拉德 $\gamma$ 线照射的同种骨髓细胞, 有利于二次移植后的细胞数量的增长。

对于正常小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养条件下不能持续增殖的可能原因作了讨论。

### 参考文献

- (1) Berman. I. & Kaplan. H. S. The cultivation of mouse bone marrow in vivo *Blood* 14/9: 1040, 1959.
- (2) Bøyum. A. & Borgström. R. The concentration of granulocytic stem cells in mouse bone marrow, determined with diffusion chamber technique. *Scand. J. Haemat.* 7/5: 294, 1970.
- (3) Breivik. H. Benestad. H. B. Bøyum. A. Diffusion chamber and spleen colony assay of murine haematopoietic stem cells *J. Cell. physiol.* 78/1: 65, 1971.
- (4) Benestad. H. B. Cell kinetics in diffusion chamber: survival, resumption of proliferation and maturation rate of murine hemopoietic cells. *Cell. Tissue Kinet.* 5/5: 421, 1972.
- (5) Squires. D. J. P. The growth of human bone marrow in diffusion chambers *Brit. J. Haemat.* 29/1: 89, 1975.
- (6) Dexter. T. M. Allen. T. D. and Lajthe. L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro *J. Cell. physiol.* 91/3: 335, 1977.
- (7) Williams. N. Jackson. H. and Rabillion. E. M. proliferation and differentiation of normal granulopoietic cells in continuous bone marrow cultures *J. Cell. physiol.* 93/3: 435, 1977.
- (8) Nettesheim. P. Makinodon. T. and Chadwick. C. J. Improved diffusion chamber cultures for cytokinetic analysis of antibody response. *Immunology* 11/5: 427, 1966.
- (9) Marmor. J. B. Russell. J. L. Miller. A. M. and Robinson. S. H. Modulation of murine granulocyte proliferation in diffusion chamber culture. *Blood.* 46/1: 39, 1975.
- (10) Till. J. E. & McCulloch. E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells *Radiat. Res.* 14: 213, 1961.
- (11) Bøyum. A. & Benestad. H. B. Kinetics of murine hemopoietic cell proliferation in diffusion chamber *Cell. Tissue Kinet.* 6/2: 101, 1973
- (12) Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell *Blood Cells* 4: 7, 1978.