

的1.54倍。因此,就细胞表面的单位面积来说,经激素处理的细胞与ConA的结合量不仅没有增高,而且稍有降低。毛祖成等(待发表资料)用荧光素标记的ConA以及凝集试验检测了BEL-7402细胞经糖皮质激素处理后其ConA受体的变化。经激素处理的细胞,其阳性荧光百分率略有下降。同时,经激素处理的细胞对ConA的凝集反应也有所下降。本实验结果与上述观察相吻合,而且进一步提出,细胞对凝集素的反应强度与ConA的结合位点的数量似乎有一定关系。至于结合位点数量的变化是否系决定细胞凝集强弱的唯一因素,尚待更多的工作来证实。

参 考 文 献

- [1] 施渭康等, 1977. 动物学报, 23: 337—436.
 [2] 陈瑞铭等, 1975. 科学通报, 20: 434—436.
 [3] 张仕明等, 1980. 实验生物学报, 13: 119—126.
 [4] Marchalonis, J. J. 1969. *Biochemistry J.* 113: 299—305.
 [5] Matsuoka y. 1976. *In cancer Related Antigens* pp 3—14.
 [6] Kaeffer, H. P. Billing, K. Levine, A. M. and Golde, D. W. 1980. *In Blood* 56: 11—14.
 [7] Wainberg, M. A. Silber, L. P. Kanfman, M. and Cohen, S. D. 1982. *J. Cell Science* 55. p 287—299.
 [8] 张仕明等, 1980. 细胞生物学杂志, 第一期.
 [9] Ozanne, B. and Sambroek, J. 1971. *Nature New Biology* 232; : 156—160.

造血干细胞发生学研究II. 人胚骨髓各型细胞超微结构的分析及探讨*

施斐曼 刘 永

(军事医学科学院基础医学研究所)

继卵黄囊、胚肝之后,骨髓就是人胚胎主要的造血器官^[1]。曾在人胚肝造血的研究中^[2],从电镜下找到一些证据,不能排除肝本身的间叶细胞在适宜的条件下有可能发展成造血干细胞并向不同系造血细胞发育的可能性。它在人胚骨髓的造血中会是怎样的?骨髓发育中实质细胞和间质细胞又是如何联系的?这些问题在文献中虽有所报道但缺乏系统的电镜观察资料。我们对人胚骨髓造血发育中各型细胞的超微结构作了系统的观察和分析,现报告如下。

材 料 与 方 法

本文收集的胚胎标本(电吸人工流产、水囊引产、剖腹取胎)胎龄分布在10~40周间(表1)。

胎龄计算方法 鉴于部分标本为电吸胚胎碎组织难以用测量胎儿顶臀长度的方法来估算受精日期,故

表 1 人胚标本胎龄分布

妊娠日期	电镜观察例数	妊娠日期	电镜观察例数
10周	1	16周	2
11 "	3	19 "	1
12 "	4	23 "	3
13 "	5	29 "	1
14 "	1	40 "	1
15 "	1		

一律根据临床医师提供的妊娠妇女末次月经日期来核算胎龄,对于月经周期不规律或胚胎大小与胎龄不符的例子剔除不用。

电吸胚胎碎组织于手术室检出后立即固定,水囊引产和剖腹取胎的胎儿置入冰瓶内取回,一般在2小时内解剖取出骨,因身体各部分的骨骼其发育的先后次序不一,在设计实验时规定取肢体的骨髓,大部取

* 仪器中心电镜组汪宝珍主管技师制作超薄切片。本文多数流产胚胎由铁道总医院、首钢医院及307医院提供,特此致谢。

下肢的骨髓。

电镜样品制备 切开肢体骨髓腔,选取组织切成1立方毫米大小的组织块(每例7~10块),以3%戊二醛(1/15M磷酸缓冲液)固定2小时后移至含有0.19M蔗糖磷酸缓冲液中浸洗过夜,再以1%四氧化锇作后固定,系列乙醇脱水,Epon 812包埋,先切0.5~1微米的厚片,苏木精伊红染色,光镜下观察定位后作超薄切片,经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,JEM-6C和EM 400-T透射电镜观察。

观 察 结 果

光镜下观察不同胚龄的骨的造血发育处于不同的阶段,发育的顺序为软骨、软骨细胞崩解后骨髓基质形成、骨髓形成及造血。但在一个胚龄尤其是在骨髓发育的早期阶段时同一骨中亦可见到不同的造血发育时期。

电镜观察

软骨细胞 所取妊娠13周前的材料均可以见到软骨细胞,有的软骨细胞处于退变阶段。所见一例细胞核呈宝塔形,核染色质很细,核膜外侧有糖元颗粒粘附,胞浆内细胞器不多,可见有管状平行排列或缠绕的粗面内质网,散在的核糖体颗粒,线粒体数量较少。

在软骨后阶段所见细胞可归纳为以下三类:一类为骨髓基质形成和骨髓形成时构成支架的细胞,第二类为血窦及其窦壁成分,第三类为骨髓的实质细胞。

一、骨髓基质形成和骨髓形成时构成支架的细胞 此类细胞的形态可请千姿百态有的像网状细胞,胞核略呈三角形或如钟罩形,核仁明显,胞浆疏密不等,有突起,胞浆宽广者富于多种细胞器,如大小不等的线粒体,粗内质网等,核糖体弥散分布有少量溶酶体样颗粒。

有的象纤维母细胞和纤维细胞,可以衬垫于窦的外壁上,胞体长形,胞核亦呈窄长,一端稍膨大,有褶皱,核染色质稍浓集,核仁较显著;胞核所在部分的胞体稍膨大,核外胞浆窄,有少数线粒体及粗内质网;核糖体较密集。(图版图1)

有些细胞,核形呈不规则之花朵状,一侧

向内有褶皱,核染色质粗碎而密集,有一个核仁。胞浆内见数组高尔基氏体及大量密集之聚核糖体,线粒体及粗内质网数量不等。

有的细胞,形体细长,胞核呈长椭圆,胞浆之一端伸出很长之粗突起与其他细胞相连,突起部胞浆含有纵切和斜切之中心粒,粗内质网与一些颗粒相缠绕,线粒体与核糖体均可见。另有一种梭形带细突起之细胞,胞核棱角形,核染色质呈细碎片状凝集,胞浆窄,有少许小泡和核糖体。也有的细胞胞核呈梭形,核染色质细而密,核仁硕大,且胞浆中内质网丰富扩张呈池状,线粒体呈较大空腔状。

二、血窦及被覆窦壁的成分 在血窦形成后,大部分血窦内充盈成熟的红细胞及网织红细胞,亦可见其中有血小板形成。

被覆窦壁的内皮细胞类型很多,最常见者其胞核呈圆形或椭圆形,有或无核仁,胞浆疏密及内含物很不一致,线粒体大小不等,有的呈球形,嵴位于线粒体边缘,呈放线状,并有些小泡和致密颗粒。有的细胞则像网状细胞,另有一个窦壁被覆细胞与邻接细胞有紧密连接相连。

三、骨髓的实质造血细胞 妊娠79天的人胚其长骨髓已开始造血,随着胚龄的增长,骨髓造血细胞日趋发育,妊娠13周的胚胎长骨髓造血细胞的数量已较多,妊娠14周的骨髓作为形成骨髓支架的细胞相对减少,造血细胞的数量又有增加,15、16、19周各例骨髓组织发育较好,23周胚龄的骨髓组织确已比较发育,包括血窦、窦壁成分及骨髓的造血细胞。29周仅一例人胎标本,极难取得,此例骨髓造血尚未臻旺盛,可能取样时采到骨组织而骨髓少有关。40周为穿颅之胎婴,骨髓造血已是高度发育,在髓腔中见到密集的造血细胞灶。各系造血细胞基本均可见到。

红系细胞 相当于早幼、中幼、晚幼红各阶段的细胞均可见到。有的细胞,胞体与核均呈椭圆形,核一端有小的凹陷,核染色质稍有凝集,胞浆内密布核糖体,有5~6个线粒体,管状内质网2~3条,于胞浆一端似有2~3个

颗粒,考虑是介于原红和早幼红间的细胞。红系细胞越趋成熟,其核的染色质越浓集,核/浆比率逐渐减小,胞浆中的核糖体量减少代之以血红蛋白颗粒。

粒系细胞 在长骨髓开始造血时所见的粒系细胞较少,且不典型,约在妊娠12、13周时,可见相当于原粒、早幼、中幼和晚幼粒各个阶段的细胞,原粒细胞较不易察见。我们在妊娠88天所见的原粒细胞与内皮细胞紧邻,细胞略呈椭圆,核染色质甚稀疏,胞核一端稍向内陷,该处胞浆中有电子致密的小颗粒一堆,有10余个线粒体,大部亦集中于细胞一端并有纤细呈小梅花瓣状核糖体(图版图2)。14⁺周人胚骨髓可见自早幼至成熟的不同发育阶段的粒细胞,所见晚幼粒系细胞灶,其中一个细胞与骨髓中间叶性细胞紧密相连。在15~16周时,粒系细胞明显的趋向成熟的分化,嗜酸性粒系细胞较多见,如嗜酸性中、晚幼粒细胞,其胞核略呈圆形,胞浆内满布电子致密大小不等的圆形或核形颗粒,部分颗粒的中心出现电子致密的杆状物,粗内质网及核糖体丰富。妊娠114天的一例,见到嗜碱性粒系细胞,两叶核,核周边染色质浓集,特异颗粒大而量多,个别颗粒解聚,周边不整齐,而且膜内侧有空隙。常可见粒系细胞以网状细胞为中心共同组成小灶。

巨核细胞 长骨髓开始造血以后即可见巨核细胞存在,电镜下形态多样,细胞器成分亦有差异,有单核和多个核者。单个核的巨核细胞体积硕大,核甚圆位于细胞一侧,核染色质很细,中央有一核仁,胞浆内细胞器繁复,有3~4组高尔基氏体,无数电子致密颗粒,有的颗粒像牛眼(颗粒膜内侧有环状空隙),线粒体和管状粗内质网丰富,细胞浆内一个区域颗粒集中限局化,似将与细胞之其余部分分离,故考虑是一型在发育过程中的巨核细胞。还看到双核细胞,一大一小两个核,大核内有核仁,核质电子密度淡,胞浆中有高尔基氏体,有扩张的小泡与颗粒相间存在,部分颗粒膜内有腔隙。

单核细胞 妊娠12~13周起见幼单核

细胞。细胞核呈哑铃形,中腰部较窄,凹陷处胞浆中有高尔基氏体和中心粒,线粒体6~7个,内质网呈窄管状,还有核糖体。另有一个已向单核分化的幼稚细胞,于胞核一端向内形成凹陷,核膜边缘略不平滑,核染色质呈小片不整形凝集,较粗糙,胞浆中有细小而密集的核糖体,10余个线粒体和一些内质网,数个致密的颗粒。有的单核细胞,核形高度褶陷,扭曲明显。随着单核细胞幼稚至成熟程度的不同,其细胞器如线粒体和致密颗粒的量也由少增多。

淋巴细胞 妊娠12~13周的胚胎骨髓即可见有淋巴细胞,细胞膜表面波纹状呈钝圆小突起,胞核近似圆形,上、下两极向内有褶陷,核染色质极为浓集,呈条索状分布。胞浆中有5~6个线粒体,核糖体尚密集。淋巴细胞核染色质的浓集程度随细胞的成熟程度而增加,但在胞浆内细胞器方面则无明显差异。

巨噬细胞 形态复杂多样。有的巨噬细胞,胞核略似三角形并含一个大核仁,胞浆内见有内质网缠绕线粒体之现象,有吞噬体,核糖体不规则分布,尚有大小不等之嗜钺团块、空泡、液泡及脂滴,有的巨噬细胞部分胞膜解离缺失。

在电镜观察中,特别注意到一些间叶性细胞的形态比较幼稚、分化低。如在妊娠72天骨髓基质中有一细胞,核呈两端不均等之肾形。核染色质浓密,不均匀,胞浆中所含细胞器少,不规则分布之粗内质网,2—3个结构不甚清晰之线粒体,还有少量嗜钺碎片,此细胞确很幼稚,分化也低(图版图3)。妊娠114天,在髓窦中见到一个细胞胞体甚大,有突起,胞核圆形,核染色质在核周边轻度凝集,有两个明显的核仁,胞浆中有10余个线粒体,聚核糖体密集,少数粗面内质网,不清晰的高尔基氏体,未见任何颗粒,此细胞为较幼稚的间叶细胞。

此外,观察到细胞之间有紧密接触。如在窦中的一个圆形细胞,亦较幼稚,胞浆中细胞器少,有两个线粒体,聚核糖体,不发达之粗内质网,与邻接之网状内皮细胞部分以紧密连接相连(图版图4);粒系灶中晚幼粒细胞与间

叶性细胞之间有紧密连接巨噬细胞与幼稚淋巴细胞之间也有接触。

讨 论

Kelemen, E. 等报告^[1], 长骨的骨髓基质形成在妊娠 9~10 周, 而造血则在 10 至 11 周以上开始。本研究观察到在 10 周时, 除软骨外, 已有骨髓基质形成, 妊娠 79 天(11 周)以上有骨髓形成并已见造血。在卵黄囊造血停止以后, 第 5 周即开始肝的造血, 骨髓为第三代造血。本实验室曾证实 8 周的人胚肝有幼稚红细胞的造血灶^[2]。因此, 骨髓的造血确实是在肝造血之后。

在妊娠 10~13 周人胚长骨骨髓造血发育的各个阶段中, 骨髓基质形成和骨髓形成中作为支架的细胞数量丰富, 形态多样, 可归为纤维母细胞, 网状细胞及一些在分化中的间叶细胞。而血窦和窦壁被覆的细胞随着胚龄增长也在不断的发育之中。这些细胞各具其不同的超微结构特点。在实验中还观察到以下现象, 往往长骨的此一节段为软骨, 其邻近节段已有骨髓基质形成, 此时形成的血窦中偶或可见幼稚红系细胞等, 但尚未能发现窦外的造血灶。有作者亦曾提出, 在人胚骨髓造血的建立中, 于软骨发生崩解后, 常发现有一个持续 1~2 星期的时相, 此时骨髓仅由基质成分组成而无造血的实质。综上所述, 证明在胚胎骨髓造血发育中间叶组织最先处于旺盛的发育和活跃的分化过程之中, 更重要的是间质的发育为造血实质的发育准备了充分的条件和场所, 有些学者提出了造血诱导微环境的概念^[3], 而造血间质就组成一个能支持造血干细胞增殖的微环境。近来, 所谓生态龛(Ecological Niche)^[4]的假设也得到了普遍承认。

关于骨髓基质的来源, 在光镜下见有软骨膜的细胞向骨膜内腔生长形成骨髓基质。所以, 骨髓基质系由软骨周围区域来的局部间充质细胞所建立^[5]似无疑问。

有关骨髓的实质细胞发育说法不一, 大部

分作者接受干细胞的迁移学说^[4,9,11]。而 Fukuda, T. 指出造血干细胞可能不仅起源于卵黄囊而且也能起自肝和其他来源, 例如由骨髓间叶细胞构成, 这些造血器官的早期支架可分化和变成造血干细胞^[6]。

在电镜下所见在骨髓形成过程中的一些幼稚的分化较低的间叶性细胞, 具有重要的意义, 它们可能继续发育为较成熟的间质细胞, 也可能向造血干细胞和祖细胞发育和分化。在先前胚肝造血的研究中^[2]于电镜下已获得一些证据。因此, 有理由认为在骨髓实质的发育中除干细胞的迁移外, 髓腔中分化低的间叶性细胞很可能向造血干细胞和祖细胞发育和分化。

关于细胞间接触。我们见到间叶性细胞和粒系造血细胞之间的紧密连接, 窦的被覆细胞与其邻接细胞以及巨噬细胞和幼稚淋巴细胞之间的接触。在人胚肝造血中亦见幼稚红系细胞与正在分化中的间叶细胞的密切接触^[2]。曾有作者提到网状细胞及其间充质对造血细胞增殖分化具有重要作用^[7]。关于细胞间的接触调控近来讨论较频繁。例如正常皮肤损伤后细胞修复到相互接触时, 即有接触信息抑制细胞的增殖^[8]。这方面的实验研究正日益开展但尚无定论。

在胚胎骨髓造血发育中, 细胞的多样化和不典型性, 幼稚细胞多, 逐渐的趋向于成熟, 这些特点估计是与造血干细胞的复制和进一步向各个造血细胞系的分化有关。因此, 运用已有的对骨髓造血中各类细胞超微结构特点的认识进行动态的分析以及形态和功能相结合的研究, 从而对造血干细胞发生作进一步的探索乃是十分重要和极为迫切的。

参 考 文 献

- [1] Kelemen E, Calvo W, Fliedner TM, 1979, Atlas Of Human Hemopoietic Development by Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [2] 施斐曼, 刘永。1982。细胞生物学杂志, 4: 15-19。