

# 用于粒-巨噬祖细胞培养的横纹肌条件培养液

葛忠良 刘秀珍

(军事医学科学院放射医学研究所)

造血粒-巨噬祖细胞 (Granulocyte-macrophage progenitor, 以在半固体培养基中细胞集落形成单位 Colony forming unit, GM-CFU-C 来表示) 增殖分化时, 需要细胞集落刺激因子 (Colony stimulating factor, CSF) 参与<sup>[1,2]</sup>。虽有许多方法可以获得 CSF<sup>[1-14]</sup>, 但有的方法较复杂<sup>[2,10]</sup>, 有的材料来源不易<sup>[3]</sup>, 有的活性不高<sup>[4-6]</sup>。我们在研究药物作用原理过程中, 观察到横纹肌组织可以产生 CSF, 经过进一步研究制备出含有 CSF 的肌条件培养液(简称肌浸液), 现就其制备的方法与活性报告如下。

## 材料与方 法

### 一、肌组织的来源与骨髓细胞悬液的制备<sup>[15]</sup>

小鼠肌组织取自性成熟 LACA 小鼠腿部与背部横纹肌。骨髓细胞直接由股骨冲出作成悬液计数后应用。人肌组织取自早期引产胎儿大腿部横纹肌。人的骨髓由胸部肿瘤切除术切下的肋骨挤出, 病人骨髓由髌骨抽出。所有人骨髓均与培养液混合后经过离心, 弃去黄色脂肪层与上清液后作成细胞悬液, 经计数后使用。

### 二、肌条件培养液的制备<sup>[15]</sup>

在无菌条件下取得的肌组织, 先用生理盐水漂洗掉血液(小鼠肌组织可免此步), 然后剪成直径约 0.3 cm 的小块, 浸泡在培养液内 2 个多小时。漂洗后的肌组织块即可直接用于培养 GM-CFU-C, 每个培养皿放 3 小块。制备肌浸液时, 在 7 ml 培养液与 2 ml 马血清中加入 1 gm 湿重肌组织, 然后放入 37℃ 温箱中培养, 不需要通入 CO<sub>2</sub>。制备小鼠肌浸液时, 肌组织块需培养 7 天, 对人肌组织块需培养 10 天后收集其上清液。此上清液应是透明淡黄色液体, 如发生混浊, 则表示已有污染, 应弃去。将培养后各小瓶上清液收集在大瓶内混匀, 再分装小瓶, 保存在 0℃ 冰箱内备用。

### 三、GM-CFU-C 体外琼脂培养方法<sup>[15]</sup>

培养方法的简要过程是 RPMI 1640 培养液

6 ml、马血清 2.5 ml、肌浸液 1.3 ml。小鼠骨髓细胞为  $1 \times 10^5$  个有核细胞/ml, 人的是  $2 \times 10^5$  个有核细胞/ml, 最后加入 5% 琼脂 0.5 ml, 混匀后在每个小培养皿内加入 1 ml。置小培养皿于干燥器内, 点燃蜡烛加盖密封, 待蜡烛自然熄灭后, 在 37℃ 温箱中培养 6 天(小鼠骨髓)或 9—10 天(人骨髓)后在低倍镜下计数集落数/皿。

## 实 验 结 果

### 一、肌浸液的活性

应用人胎儿肌浸液可使  $2 \times 10^5$ /ml 人骨髓有核细胞产生 100 个细胞集落; 应用小鼠肌浸液可使  $10^5$ /ml 小鼠骨髓有核细胞形成 160 个细胞集落, 见表 1。在培养体系中马血清增加到 32.4% 时, 并用试管法计数骨髓有核细胞, 用人胎儿肌浸液培养人骨髓 GM-CFU-C 的效果明显增加, 见表 2。

表 1 肌浸液培养骨髓 GM-CFU-C 的活性

| 肌浸液的种类 | 实验次数 | 培养皿数 | 细胞集落数 (个/ml·)   |
|--------|------|------|-----------------|
| 人胎儿肌浸液 | 47   | 226  | $100.1 \pm 5.2$ |
| 小鼠肌浸液  | 65   | 320  | $160.3 \pm 5.7$ |

表 2 马血清的用量对人骨髓 GM-CFU-C 的作用

| 马血清用量 (%) | 实验次数 | 培养皿数 | 细胞集落数 (个/ml)          |
|-----------|------|------|-----------------------|
| 32.4      | 20   | 85   | $334.6 \pm 15.0^{**}$ |
| 23.1      | 6    | 28   | $161.5 \pm 18.0$      |

\*\* P < 0.01

肌浸液与其它条件培养液在相同条件下进行比较, 结果如表 3 所示, 应用肌浸液培养人

**表 3 肌浸液与不同条件培养液对人骨髓 GM-CFU-C 作用的比较**

| 条件培养液<br>的种类 | 细胞集落数(个/ml) |             |
|--------------|-------------|-------------|
|              | 实验组         | 对照组(肌浸液)    |
| 5637 细胞      | 21.3±5.8    | 66.6±9.3**  |
| 成人肺组织        | 77.2±5.6    | 128.8±8.4** |
| 胎盘组织         | 46.3±1.6    | 102.4±5.4** |
| 脐带           | 1.4±0.5     | 80.0±3.1**  |
| 肋骨           | 16.8±1.0    | 51.4±2.2**  |
| 胎儿皮肤         | 97.2±5.6    | 118.6±5.5*  |

\* P<0.05, \*\* P<0.01

骨髓 GM-CFU-C 的活性都比其它条件培养液

高,其中包括具有较好活性的人膀胱癌 5637 细胞株条件培养液<sup>[12]</sup>与胎盘条件培养液<sup>[10]</sup>。从表 3 还可以看到,应用人胎儿皮肤制备的条件培养液,其培养人骨髓 GM-CFU-C 的活性,虽然比应用肌浸液的略低,但较其它条件培养液高。

应用人胎儿肌浸液培养不同疾病病人骨髓或未稍血 GM-CFU-C,如表 4 所示,慢性粒细胞白血病与急性淋巴细胞白血病复发期末稍血内存在较多的形成细胞集落的细胞,而再生障碍性贫血、白细胞减少症等疾病骨髓内存在较少的 GM-CFU-C。

**表 4 肌浸液对几种病人 GM-CFU-C 的作用**

| 材料来源与疾病种类    | 接种细胞数(×10 <sup>5</sup> /ml) | 培养皿数 | 细胞集落数(个/ml) |
|--------------|-----------------------------|------|-------------|
| <b>骨髓:</b>   |                             |      |             |
| 急性淋巴细胞白血病    | 4                           | 5    | 41.8±3.4    |
| "            | 2                           | 5    | 9.4±1.5     |
| " 恢复期        | 2                           | 5    | 13.5±1.5    |
| " 缓解期        | 1.4                         | 5    | 1.4±0.5     |
| " 复发期        | 2                           | 5    | 269.2±28.2  |
| 急性粒细胞白血病 缓解期 | 2                           | 5    | 147.8±5.1   |
| " 复发期        | 2                           | 5    | 18.0±3.5    |
| 嗜碱性粒细胞白血病    | 4                           | 5    | 0           |
| 再生障碍性贫血      | 4                           | 5    | 2.0±0.8     |
| "            | 3                           | 5    | 2.2±0.3     |
| 白细胞减少症       | 2                           | 5    | 3.5±1.2     |
| 血小板减少症紫癜     | 1                           | 5    | 0           |
| <b>末稍血:</b>  |                             |      |             |
| 慢性粒细胞白血病     | 1                           | 20   | 163.2±20.8  |
| 急淋复发期        | 2                           | 4    | 163.8±1.9   |

**表 5 人或不同动物的肌浸液对骨髓 GM-CFU-C 的影响**

| 肌浸液<br>种类 | 细胞集落数(个/ml) |            |          |           |            |
|-----------|-------------|------------|----------|-----------|------------|
|           | 人           | 猴          | 狗        | 兔         | 小鼠         |
| 人         | 127.4±5.8   | 128.5±15.2 | 1.7±0.9* | 81.0±4.5  | 117.8±7.1  |
| 猴         | 22.2±2.6    | 13.4±2.4   | ---      | 33.2±2.1  | 30.3±4.1   |
| 狗         | 40.4±2.3    | 2.5±0.9    | 2.7±0.5* | 59.5±6.6  | 27.8±3.4   |
| 兔         | 0           | ---        | ---      | 119.3±5.6 | ---        |
| 小鼠        | 0           | 0          | ---      | 42.0±4.8  | 152.2±10.9 |

\* 为末稍血

人与实验动物肌浸液的作用存在一定的种属特异性。应用不同种的肌浸液培养人、猴、狗、兔和小鼠的造血 GM-CFU-C 的结果列入

表 5。由表 5 可见,除培养猴骨髓组外,一般使用同种肌浸液培养 GM-CFU-C 的效果最好。同时还观察到使用人肌浸液培养动物 GM-

表 6 肌浸液保存不同时间后培养 GM-CFU-C 的活性

| 肌浸液<br>的种类 | 保存不同时间后的活性(细胞集落数/皿) |           |           |            |           |           |
|------------|---------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
|            | 0                   | 2月        | 7月        | 1年         | 1.5年      | 2年        |
| 人胎儿        | ---                 | 142.4±7.7 | 146.8±9.4 | ---        | 11005±5.5 | ---       |
| 小鼠(800211) | 152.3±5.9           | 160.2±3.2 | 187.4±2.2 | 154.3±18.5 | ---       | ---       |
| 小鼠(790906) | 95.8±3.3            | ---       | 88.8±5.1  | 102.0±7.1  | 88.9±9.0  | 96.5±16.2 |

CFU-C 都显示出较好的作用,但使用较低等动物,如小鼠的肌浸液培养高等动物的 GM-CFU-C 时,则没有形成细胞集落的作用。

肌浸液的稳定性较好。如表 6 所示,肌浸液平时保存在 4℃ 冰箱冰匣内,小鼠肌浸液已保存 2 年多,人肌浸液已有 1 年半多,它们的活性未见明显变化。

## 二、影响制备肌浸液活性的一些因素

为了获得 CSF 活性较高的肌浸液,除须按前述的具体方法外,并注意以下一些影响肌浸液活性的因素。

**1. 制备方法的影响** 制备肌浸液必须应用新鲜的肌组织块。如表 7 所示,把肌组织打碎用其上清液或下沉物,用同样的方法加入培养液和马血清后进行培养,所得到的条件培养液并没有 CSF 活性。

表 7 不同方法制备的肌浸液对 GM-CFU-C 的作用

| 肌浸液制备的方法      | 培养皿数 | 细胞集落数<br>(个/ml) |
|---------------|------|-----------------|
| 用肌组织块制备的肌浸液   | 5    | 204.2±12.4      |
| 用肌匀浆上清液制备的肌浸液 | 5    | 0               |
| 用肌匀浆下沉物制备的肌浸液 | 5    | 0               |

**2. 肌组织块用量的影响** 制备肌浸液时所加入的组织块必须适量。在 7 ml 培养液和 2 ml 马血清中分别加入 0.5、1.0、2 和 8 gm 肌组织块,经 37℃ 温箱培养 40 小时后所得肌浸液的效果,以加入 1—2 gm 肌组织块最好。所用组织块的大小对肌浸液活性影响也很明显。如表 8 所示,肌组织块太大的肌浸液活性有很大的下降。

表 8 肌组织块大小对制备肌浸液活性的影响

| 肌组织块大小<br>(cm/直径) | 培养皿数 | 细胞集落数<br>(个/ml) |
|-------------------|------|-----------------|
| 0.2               | 13   | 100.0±6.3       |
| 0.5               | 13   | 34.7±3.2**      |

\*\* P<0.01

**3. 浸泡时间的影响** 新鲜肌组织剪成小块后必须用培养液浸泡一定时间后,制备出的肌浸液活性才高。如表 9 所示,浸泡 2 个半小时后,所制备的肌浸液活性就明显地增加。

表 9 肌组织块浸泡时间对肌浸液活性的影响

| 浸泡时间<br>(小时) | 培养皿数 | 细胞集落数<br>(个/ml) |
|--------------|------|-----------------|
| 0            | 4    | 33.5±1.5        |
| 1.0          | 4    | 66.7±3.1        |
| 2.5          | 5    | 154.7±11.5      |
| 5.0          | 5    | 178.7±4.9       |

由表 10 所示,制备肌浸液加入马血清后,其活性显著地增加。马血清用量在 5—30% 之间,肌浸液活性呈线型增高( $r=0.998$ ,  $y=143.1+43.3x$ )。

表 10 马血清对制备肌浸液活性的影响

| 组别       | 培养皿数 | 细胞集落数<br>(个/ml) |
|----------|------|-----------------|
| 有马血清的肌浸液 | 5    | 95.3±3.5        |
| 无马血清的肌浸液 | 5    | 6.0±1.1         |

血清种类对制备肌浸液活性影响也很大,用人血清制备肌浸液的活性明显大于马血清组(见表 11)。

表 11 血清种类对制备人肌浸液活性的影响

| 血清的种类 | 实验次数 | 培养皿数 | 细胞集落数 (%)    |
|-------|------|------|--------------|
| 人血清   | 4    | 17   | 297.3±17.6** |
| 马血清   | 4    | 18   | 100.0±8.5    |

\*\* P&lt;0.01

5. 培养液的影响 培养液的种类对肌浸液活性影响很大。如表 12 所示,用 199 制备的人胎儿肌浸液活性只有 RPMI 1640 培养液的 23%。收集肌浸液的最适时间,小鼠肌浸液为培养 7 天,人肌浸液为 9—11 天。

表 12 不同培养液对制备人肌浸液活性的影响

| 培养液的种类         | 培养皿数 | 细胞集落数 (%)  |
|----------------|------|------------|
| RPMI 1640(德国)  | 10   | 100.0±10.0 |
| RPMI 1640(日本)  | 9    | 114.0±6.0  |
| RPMI 1640(中科院) | 9    | 27.0±9.7   |
| Fischer's(自配)  | 9    | 70.0±11.1  |
| 199(美国)        | 9    | 23.0±6.6   |

### 讨 论

体外琼脂培养人与小鼠骨髓 GM-CFU-C 所使用的细胞 CSF 有多种来源。培养小鼠骨髓 GM-CFU-C 可用小鼠肺组织及其条件培养液<sup>[3]</sup>、小鼠胚胎条件培养液<sup>[4]</sup>、注射内毒素后的血清<sup>[5]</sup>及人尿提取物等<sup>[6]</sup>。培养人骨髓细胞应用的 CSF 来自人或猴的白细胞作为底层滋养细胞<sup>[7]</sup>、人白细胞条件培养液<sup>[8]</sup>、人胚胎肾<sup>[9]</sup>、胎盘<sup>[10]</sup>、人肺<sup>[13]</sup>、猪肺<sup>[14]</sup>以及膀胱癌 5637 细胞株等条件培养液<sup>[12]</sup>,其中尤其以胎盘条件培养液更受重视<sup>[2,10]</sup>。由于这些条件培养液内存在着某种抑制因子,CSF 活性往往不高,因此要经过一定处理后才能实际应用<sup>[2]</sup>。我们观察到肌组织可产生 CSF,Bradley 等<sup>[11]</sup>也报道过类

似的结果,但他们认为肌组织块培养 GM-CFU-C 的效果不如肺组织<sup>[2,12]</sup>,与本文结果不同(表 3)。我们在制备肌组织条件培养液过程中,为使能产生较高的 CSF 活性而比较了多种条件。应用胎儿肌浸液可使  $2 \times 10^5$  个人骨髓有核细胞平均产生 100 个细胞集落。肌浸液制备简单,可以大量获得,保存容易,活性稳定。对临床和科研开展粒系造血研究有一定价值。

### 参 考 文 献

- [1] Metcalf D., 1977, "Hemopoietic Colonies in vitro Cloning of Normal and Leukemic Cells", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- [2] Moore M. A. S. et al., 1977, *Br. J. Cancer*, 35:500.
- [3] Sheridan J. W. et al., 1973, *J. Cell. Physiol.*, 81:11.
- [4] Stanley E. R., 1971, *J. Cell. Physiol.*, 78:301.
- [5] Metcalf D., 1971, *Immunology*, 21:427.
- [6] Stanley E. R., 1972, *J. Lab. Clin. Med.*, 79:657.
- [7] Pike B. I. et al., 1970, *J. Cell. Physiol.*, 76:77.
- [8] Iscove N. N. et al., 1971, *Blood*, 37:1.
- [9] Brown C. H. et al., 1971, *J. Natn. Cancer Inst.*, 46:989.
- [10] Burgess A. W. et al., 1977, *Blood*, 49:573.
- [11] Bradley T. R. et al., 1971, *Aust. J. Exp. Biol. Med. and Sci.*, 49:595.
- [12] Moore M. A. S., 1982, "Recent Advances in Hematology", Churchill Livingstone Edinburgh London Melbourne and New York.
- [13] Fojo S. S. et al., 1977, *Biophys. Biochim. Acta*, 494:92.
- [14] Neumeier R. et al., 1980, *Exp. Hematol.*, 8:728.
- [15] 葛忠良等, 1981, "中华放射医学与防护杂志", (1):40.