

其核膜的一部分有向外突出形成核袋的现象, 胚脾中嗜酸性粒细胞亦有此现象。关于核袋形成的机制不清, 但是因蛋白质的合成比较旺盛, 胞核内含物通过核膜孔而突出到胞浆或与粗面内质网相连的解释尚可考虑^[4]。

一般认为脾脏中主要是B淋巴细胞, 而胸腺则是T淋巴细胞。以免疫学方法可以将T、B淋巴细胞分开, 且根据细胞膜上不同的受体而将T细胞分成很多亚型。在形态学研究方面, 在扫描电镜下可以鉴别B淋巴细胞表面有微绒毛突起, 而T淋巴细胞表面比较光滑。在透射电镜下的观察利于分析多种形态淋巴细胞超微结构的特点。通过实验发现了胚胎胸腺比脾脏的幼稚淋巴细胞多, 有不同超微结构特点的胸

腺细胞(淋巴细胞)类型也多, 且发现了在胚胎胸腺中有较大量的变性淋巴细胞。但是在脾脏和胸腺中的成熟淋巴细胞形态和超微结构有相似之处, 不易区分。

参 考 文 献

- [1] 施斐曼, 刘 永, 1982, 细胞生物学杂志, 4(4): 15—19。
- [2] 施斐曼, 刘 永, 1984, 细胞生物学杂志, 6(3): 121—125。
- [3] Block MH, 1976, Text-Atlas of Hematology 2. Embryologic Basis of Postnatal Hematopoiesis, by Lea and Febiger, Copyright Under the International Copyright Union.
- [4] Shiro M et al., 1983, Cell Structure and Function. 8: 1—9。

造血干细胞发生学研究

Ⅳ. 小鼠胚胎早期造血的探索*

施斐曼 丁 颖 付生法 [刘 永]

(军事医学科学院基础医学研究所)

我们对人胚胎的造血发育包括胚肝、胚胎、骨髓、脾脏和胸腺的造血已有较详尽的研究与报道^[1,2]。但鉴于人胚取材的限制, 早期胚胎造血的材料极难取得, 故设计动物实验和应用罗斯小室作环流培养以期明确胚胎早期造血部位和造血干细胞的可能来源, 以使发生学的研究更为完善。

材 料 和 方 法

用日龄60—70天LACA雌性和雄性小鼠进行交配。每只鼠笼中放雌鼠2只, 雄鼠1只。每日晨8时和下午4时各检查一次雌鼠的阴道, 以发现阴栓的当天为妊娠第1天。按不同妊娠期(5, 6, 7, 8, 9, 10, 11及18天)取出子宫, 摘下鼠胚, 以10%福尔马林或Zcnker氏液固定制作光镜组织切片, 以戊二醛-锇酸双固定制作超薄切片。

Rose Chamber(罗斯小室)环流培养仪培养鼠胚组织块。在消毒灭菌条件下于超净台上取7天和9天鼠胚组织块, 尽量切取接近于被膜之组织, 放置于先已涂抹Teflon的盖玻片上, 为对照用取妊娠18天的鼠胚肝组织以同法培养, 培养系统配制参照文献^[3], 培养后每天观察组织培养生长情况。于培养第4天和第7天时取鼠胚组织培养标本, 培养后5、9天取胚肝培养标本, 制作透射和扫描电镜样品(常规方法), 然后在EM 400-T透射电镜和S-505扫描电镜下观察。

结 果

解剖妊娠第五和第六天之雌性小鼠可见子宫粘膜上约有米粒大结节样隆起, 组织柔嫩,

*张贺秋与王国华同志分别制作扫描和透射电镜样品, 殷铭岩同志放大照片, 致以谢意。

切开后常有水样液流出。妊娠第七天小鼠子宫粘膜上有绿豆样隆起之结节,低倍下观察鼠胚与子宫粘膜之间有较紧密之粘连,部分则显示裂隙的存在(图1)。倍数略高显示鼠胚表面向外伸出细胞索互相交叉成网成窦,该处被覆有内皮细胞,但罕见造血细胞。8~10天的鼠胚在被膜下或表面可见由扁平上皮和立方上皮被覆的腔,其中充盈有核红细胞。妊娠11天的鼠胚表面的囊腔有数个断面,相互连通(图2),腔中充满了原始的幼稚红细胞,组成了幼红细胞岛(图3),其中还有核丝分裂像,偶见单个核的细胞。

在妊娠10天前的鼠胚切片上已可见形似肝细胞索和窦的结构形成,但窦中基本上均是成熟红细胞(图4)。在10天的一例尚见到成熟粒细胞掺杂在红细胞之中,这些细胞可以考虑是由母血来的。仅在妊娠11天的鼠胚见到相当于肝细胞之间出现少数幼稚红细胞等,即开始有了胚肝的造血。

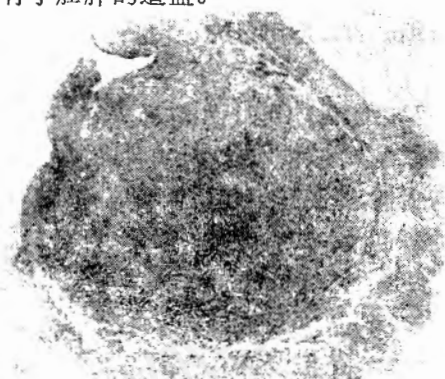


图1 示子宫粘膜小胚胎着床(妊娠7天鼠胚)
 $\times 138 \times 0.8$

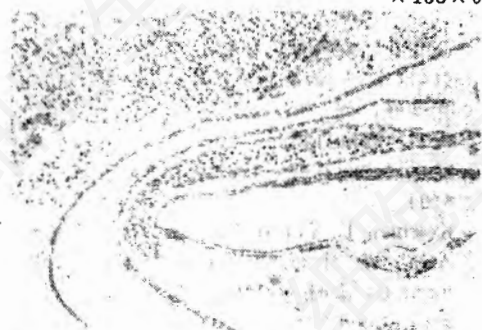


图2 妊娠11天鼠胚表面的囊腔有数个断面相互通连,腔中充满了幼稚红细胞 $\times 345 \times 0.8$

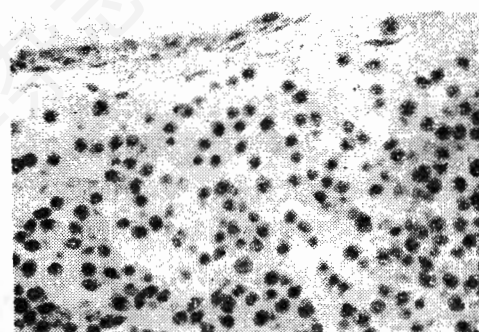


图3 图2部分放大,示造血细胞岛内原始幼红细胞
 $\times 1,380 \times 0.8$

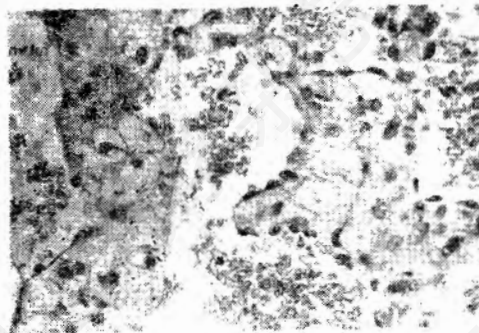


图4 妊娠10天鼠胚肝索和血窦内成熟红细胞
 $\times 1,380 \times 0.8$

鉴于在胚肝未开始执行造血功能以前在鼠胚的被膜下或表面的囊腔内已有造血细胞岛,又根据其被覆上皮分析象卵黄囊造血。因此设计将9天和7天的鼠胚置入罗斯小室中进行环流培养,逐日观察组织块培养生长的情况。培养2—3天后在母组织块之周围有圆形结构较致密以及梭形伸出突起的细胞,也有一些像巨噬细胞样的细胞,于培养4天和7天时分别取出培养玻片制作透射和扫描电镜样品。

透射电镜观察:培养4天的标本,有多种形态的细胞,细胞间相互有连接。有一种细胞,胞体巨大,含有3个核各有1—2个核仁,胞浆中有线粒体和一些管状结构及电子致密颗粒,少数核糖体,象是巨核细胞。

另有一个细胞,胞核形似僧帽状,核染色质稀疏,胞浆中有线粒体、粗内质网,灶状聚集的核糖体及数量较多的脂滴象巨噬细胞(图版图1)。还有的细胞,胞核形状更不规则,核膜向内形成三处较深之褶皱,两个核仁;胞浆中有丰富的粗内质网,聚核糖体及一些嵴清晰

之线粒体。

培养7天的标本, 所见细胞的胞体较大, 核形状不规则有2个核仁, 染色质较稀疏, 胞浆内有多数空泡, 亦类似巨噬细胞。另有一些细胞, 正常超微结构已消失, 核染色质凝聚, 电子密度异常致密, 胞浆内富于次级溶酶体, 尤以髓样结构小体为著。此外, 有较多崩解碎裂的细胞, 散在于细胞外的髓样结构小体和毛发样小体不乏少见。

扫描电镜观察: 7天胎鼠培养7天的标本, 在无规则形基底层的基质上粘附一些圆球形表面呈小陷窝的细胞, 并见一对表面网孔状处于有丝分裂末期的细胞。此外见一个三角形细胞, 向周缘伸出粗大之突起, 胞体表面呈花瓣状隆起。尚有圆球形细胞, 表面具有较宽大的褶皱(属单核巨噬细胞)(图版图2)。另一种呈蟹形的细胞, 表面似融熔的较细碎的火山堆积土状, 细胞向两端对称形的伸出突起。还可见一型细胞向四周伸出粗而再分枝为细的人参须状的细胞, 表面呈绒丝状隆起相互缠绕交叉, 此类细胞的性质很难断定。

观察鼠胚肝环流培养标本以作对比。在培养5天的标本看到巨噬细胞系和巨核细胞的生长。前者细胞表面有花瓣状隆起, 形状不规则, 伸出细而长的突起。后者细胞硕大, 圆球状, 表面有较多细小的褶皱。培养9天的标本, 细胞长势更旺盛, 种类也增多, 有红系、粒系、巨噬细胞系。红系细胞的表面较平滑, 圆球状; 可见红系细胞与很多巨噬细胞一起呈灶状分布(图版图3)。粒系细胞圆球形, 表面有稀疏的小嵴, 也见到梭形两头尖表面稍平坦的纤维细胞。

讨 论

Keleman等^[4]认为卵黄囊是胚胎时期的第一代造血, 其他的胚胎造血组织(胚肝、胸腺、脾、骨髓)的造血干细胞最初均由卵黄囊而来。本研究以小鼠为实验对象, 发现妊娠8—10天的鼠胚在被膜下或表面可见由扁平上皮和立方上皮被覆的腔, 其中充盈幼稚有核红细胞。

11天鼠胚表面的囊腔有数个断面相互通连, 腔中有幼稚红细胞岛。文献曾讨论^[5], 鼠胚上有三层膜, Reichart氏膜, 卵黄囊和羊膜。他们提出的卵黄囊亦是在鼠胚表面, 与我们所见相似, 究竟在这些鼠胚组织有无多能性造血干细胞呢? 我们应用了罗斯小室的培养。

罗斯小室有不断充以CO₂的培养液循环流经组织培养块, 因而赋予培养组织以较好的微环境。诚然, 保持培养体系中各种成分的优质是极为重要的, 尤其是必需保证含有优质的马血清。曾经发现一批培养标本, 在培养一周时部分细胞就出现退变现象, 如出现多量次级溶酶体, 而细胞器的正常超微结构亦有改变甚至消失, 经分析所用血清质量欠佳系原因之一。

透射电镜下观察妊娠9天和7天的鼠胚组织块经环流培养后4天的标本查见有象巨核细胞和巨噬细胞系的细胞。扫描电镜下所见鼠胚组织块培养细胞有多种表面形态, 除各型单核巨噬细胞外, 有处在有丝分裂末期的细胞, 还有一些细胞表面形态特殊, 但细胞性质则不易断定。

为对比起见, 我们也观察了鼠胚肝经环流培养的标本。培养5天, 见有巨噬细胞和巨核细胞的生长, 鼠胚肝组织培养9天后长势更旺, 细胞类型也增多, 有红系、粒系、巨噬细胞系, 尚见有纤维细胞等。

通过以上实验研究证明了小鼠胚胎中早期造血部位(卵黄囊)确实存在, 且该部位与鼠胚肝均存在着多能性造血干细胞。

参 考 文 献

- [1] 施斐曼, 刘永, 1982, 细胞生物学杂志, 4(4): 15—19.
- [2] 施斐曼, 刘永, 1984, 细胞生物学杂志, 6(3): 121—125.
- [3] 付生法, 赵林普, 1985, 中华血液学杂志, 6(9).
- [4] Keleman E, Calvo W, Flidner TM, 1979, Atlas of Human Hemopoietic Development by Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [5] Chen LT and Hsu YC, 1979 Exp. Hemat., 7(5): 231—244.