



淋巴细胞对造血干细胞增殖分化的调控

唐佩弦 韩福刚 江飞子 谭子兴 黎燕 李秀森 张明伟 刘永

(军事医学科学院基础医学研究所)

大剂量照射后,造血干细胞遭到杀伤,除部分幸存外,其余都在短期内死亡。当前不少学者致力于造血细胞的移植,以期重建造血组织。我们的工作则探索把受照射机体内幸存的干细胞调动起来,使及早从静止状态转入细胞周期,并且在体内进行“自我重建”或“内源性再生”过去我们见到大剂量电离辐射后,在荒芜的造血组织中,仅有一定数量的淋巴细胞、浆细胞和其他间质细胞。体内残存的干细胞在微环境重建后如何增殖分化的?造血组织中的淋巴细胞是否参与了对干细胞增殖的调控?这是本题研究的目的。

材料与 方法

外源性 CFU-S 法

以联合国 LACA 系 50 天龄(雄)小鼠为细胞移植实验的供体动物。宿主动物为同品系小鼠 60—70 天龄。供体动物的骨髓细胞及同体的胸腺细胞先后经尾静脉输注给宿主动物,24 小时前宿主动物受 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 线 850 rads 的照射。细胞输注 8 天后,杀宿主取脾, Bouin 氏液固定后作脾表面结节计数,折成 CFU-S 数。脾组织切片 5 微米, H-E 染色后作造血灶分类计数。

CFU-C 体外琼脂培养

小鼠骨髓细胞 2×10^4 或脾细胞 4×10^6 加入 1 毫升含 30% 马血清 0.3% 琼脂的 199 培养液。在培养皿底部层铺 5—10 毫克小鼠肺组织碎块。在含 5% CO_2 的潮湿空气 37℃ 下孵育 5 天。终止培养后,用低倍镜计数每个培养皿(直径 30 毫米)中含 20 个细胞以上的集落数(CFU-C)。

ConA 作为激活 T 细胞的有丝分裂刺激原。以生理盐水配成 500 微克/毫升溶液,200 微克/只腹腔注射,72 小时后进行实验。或以 20 微克/毫升加入体外培养体系中。

胸腺去除术在小鼠新生后 3—5 天内进行,手术活存 90% 左右,50 天后约 40% 活存,供本实验用。

兔抗小鼠胸腺细胞血清(ATS)

小鼠胸腺细胞悬液洗三次后,与福氏完全佐剂混合乳化。在兔背多点皮内注射,细胞数共 1.2×10^8 , 30 天后经兔耳静脉输注 1×10^8 小鼠胸腺细胞,一天一次,连续 3 天加强免疫。第一次免疫 40 天后,取兔血分离血清,再经小鼠肝、红细胞等吸收后,体外抗小鼠胸腺细胞凝集反应滴度为 1:1280—2560, -20℃ 储存备用。

实验 结果

1. 胸腺细胞对骨髓多向性造血干细胞增殖的影响

给宿主小鼠单独输入正常供体小鼠的骨髓细胞 4×10^4 , 8 天后测得 CFU-S 为 4.5 ± 0.2 ; 单独输入胸腺细胞 20×10^6 , 测得 CFU-S 为 1.0 ± 0.3 ; 但在输注骨髓细胞之后,再输胸腺细胞悬液(用量同上),所观察到的 CFU-S 为 10.3 ± 0.5 , 大大超过骨髓 CFU-S 与胸腺 CFU-S 之和。结果表明胸腺细胞对 CFU-S 的增殖有“放大”作用。当胸腺细胞数与输入的骨髓细胞数的比例为 500 左右时,其放大的效果最为明显。

小鼠腹腔注射 ConA 72 小时后,其骨髓 CFU-S 增加至 9.6 ± 0.5 , 为对照组 4.5 ± 0.2 的 2.1 倍;若加输胸腺细胞,则 CFU-S 增加至 13.2 ± 0.8 。此结果表明经 ConA 活化的淋巴细胞对 CFU-S 的增殖具有更强的放大作用。

宿主小鼠输胸腺细胞加骨髓细胞后第 15 天,其骨髓粒系细胞 $^3\text{HTdR}$ 的掺入明显增多,表明胸腺细胞有加强造血细胞合成 DNA 从而促进其增殖的作用,在胸腺细胞的作用

下,骨髓-CFU-S 先增加红细胞系分化,后又增强了粒细胞系分化^[1]。

2. 胸腺与脾细胞对骨髓粒系定向干细胞增殖的放大作用

实验结果已表明正常小鼠的胸腺细胞在体外琼脂培养中对骨髓 CFU-C 的增殖无明显的作用。然而用 ConA 体内或体外激活的 T 淋巴细胞(胸腺细胞)加入体外培养体系中,与同体动物的骨髓细胞混合培养的 CFU-C 分别为 105.0 ± 16.9 (ConA 体内激活) 及 50.3 ± 1.8 (ConA 体外激活),为不加胸腺的对照组的 1.7—3.5 倍(表 1)。实验中见到激活的胸腺细胞与骨髓细胞的比例 50—200 时,其放大作用最强。

表 1 体内激活的胸腺细胞对骨髓-CFU-C 增殖的放大作用

培 养 内 容	CFU-C
骨髓细胞	30.3 ± 3.9
ConA 激活的胸腺细胞	0
骨髓细胞 + 胸腺细胞 + ConA	50.3 ± 1.8
骨髓细胞 + ConA 激活的胸腺细胞	105.0 ± 16.9

用 ATS 处理的小鼠,其脾 CFU-C 显然增多,达 171.8 ± 5.3 ,若用正常兔血清腹注 5 次的小鼠,其脾 CFU-C 为 151.3 ± 7.8 ,都比对照组(25.5 ± 3.7)明显增高。表明非特异性抗原可促进脾 CFU-C 的增殖,新生去胸腺的成年小鼠和先天性无胸腺小鼠的脾 CFU-C 各为 114.5 ± 38.1 和 143.8 ± 5.3 ,也明显高于对照组(25.5 ± 3.7)。这些是缺乏 T 细胞并富有 B 细胞的动物。上述实验正说明经非特异性抗原激活的 B 细胞,或体内长期缺乏 T 细胞的动物的 B 细胞,都具有很强的放大 CFU-C 增殖的活性^[2]。

3. 淋巴细胞调控干细胞增殖的作用方式

胸腺细胞腹腔注射而骨髓细胞则静脉注射给照射的宿主小鼠,或用超声波粉碎了的胸腺细胞与骨髓细胞先后经静脉输注,8 天测定 CFU-S 与胸腺细胞静注的结果相比较均无放

大骨髓 CFU-S 增殖的效应(表 2)。这些实验结果似乎表明,必须活的、完整的胸腺细胞,并通过和造血干细胞的相互接近或接触下才能发生对 CFU-S 增殖的放大效能^[1]。

表 2 胸腺细胞经超声波破坏后静注,或完整细胞腹注,对骨髓 CFU-S 的作用

胸腺细胞 20×10^6	骨髓细胞 4×10^4 静注	CFU-S (8 天)
—	+	4.5 ± 0.3
静 注	+	10.3 ± 0.6
腹 注	+	5.4 ± 0.7
破碎后静注	+	3.7 ± 0.7

在 CFU-C 体外培养体系中,用 ConA 激活的胸腺细胞放在下层琼脂,与肺组织碎块一起,培养层的上层仍铺以骨髓细胞,使胸腺细胞与骨髓细胞之间有半固态的琼脂相隔,保持较远的距离。这样培养的结果其 CFU-C 反而比对照组更低。若把激活的胸腺细胞放在培养体系上层与骨髓细胞混合一起,相互之间能保持近距离,或接触,其结果 CFU-C 竟高达 105.0 ± 16.9 ,比单纯骨髓对照组(30.3 ± 3.9)及单纯胸腺细胞组(0)大大增加了(表 3),进一步表明淋巴细胞对骨髓 CFU-C 和 CFU-S 的调控,都是近距调控,均与细胞间相互作用有密切关系^[2]。

表 3 激活的胸腺细胞与 CFU-C 的作用方式

培 养 方 式	CFU-C
ConA 激活的胸腺细胞	0
肺块	
骨髓细胞	30.9 ± 3.9
肺块	
骨髓细胞	12.7 ± 1.8
肺块 + ConA 激活的胸腺细胞	
骨髓细胞 + ConA 激活的胸腺细胞	105.0 ± 16.9
肺块	

4. 淋巴细胞上清液对 CFU-C 增殖的放大作用

正常小鼠胸腺或脾细胞在培养液中放置 4 天 37℃, 离心取上清液。将上清液加入 CFU-C 培养中, 结果与不加上清液的对照组无明显差别。若用异系("615"系)小鼠的胸腺细胞输注给 LACA 系供体小鼠, 然后取供体小鼠的胸腺细胞作上清液, 加入骨髓-CFU-C 的体外培养中, 显然提高了 CFU-C 的数目。若用 ATS 给供体小鼠腹腔注射, 然后取其脾细胞作成上清液, 加入骨髓-CFU-C 的培养中, 结果 CFU-C 数更显著增加, 尤其注射了五次 ATS 的供体小鼠, 其脾细胞上清液中含有更强的活性(表 4)。这种脾细胞上清液如果加入到小鼠脾-CFU-C 的培养中, 结果脾-CFU-C 数更加明显增加。5 次注射 ATS 的供体小鼠其脾细胞上清液使脾-CFU-C 的增殖放大 10.1 倍(表 5)。

表 4 激活的胸腺和脾细胞上清液对小鼠骨髓-CFU-C 增殖的放大作用

CFU-C 培养系统加入物	骨髓-CFU-C
ConA 注射小鼠的胸腺细胞上清液	18.3±5.0
异系细胞注射小鼠的胸腺细胞上清液	22.7±2.9
ATS 一次注射小鼠的脾细胞上清液	26.1±2.7
ATS 五次注射小鼠的脾细胞上清液	91.7±4.7
不加上清液对照	12.0±1.8

表 5 腹注 ATS 小鼠的脾细胞上清液对脾-CFU-C 增殖的放大作用

CFU-C 培养系统加入物	脾-CFU-C
ATS 一次注射小鼠的脾细胞上清液	78.0±9.8
ATS 五次注射小鼠的脾细胞上清液	267.2±29.2
不加上清液对照	25.5±3.7

5. 淋巴细胞对受照射的干细胞增殖的放大作用

静脉输注受 γ 线体外照射 100—300rads 的小鼠骨髓细胞时, 又加输正常的胸腺细胞, 其 CFU-S 分别为 4.9±0.4、3.2±0.5 以及

1.0±0.1, 是单纯输骨髓细胞对照组的 2.6、4.0、1.7 倍(表 6)。表明胸腺细胞对受照 100—300rads 的 CFU-S 的增殖有明显放大作用。

表 6 小鼠胸腺细胞对体外受照射骨髓-CFU-S 增殖的影响

骨髓细胞照射剂量 (rads)	骨髓-CFU-S	加输胸腺细胞后, 骨髓-CFU-S
100	1.9±0.4	4.9±0.4
200	0.8±0.2	3.2±0.5
300	0.6±0.1	1.0±0.1
400	0.2±0.0	0.2±0.0
500	0.1±0.0	0.1±0.0

输注受 γ 线体外照射 25—200rads 的胸腺细胞给全身照射 750rads 的小鼠, 内源 CFU-S 明显提高, 表明受这个剂量范围照射的淋巴细胞仍具有调控 CFU-S 增殖的能力。虽然输入照射 400、800rads 的胸腺细胞, 其放大效能已明显减弱, 但仍比不输入胸腺细胞组高。当照射剂量增高到 1600rads 时, 胸腺细胞完全失去了对受照射的 CFU-S 增殖的调控能力(表 7)。

表 7 小鼠胸腺细胞体外照射不同剂量对受照射 750rads 小鼠内源性 CFU-S 的作用

胸腺细胞照射剂量 (rads)	CFU-S
0	5.1±0.4
25	5.3±0.9
50	4.1±0.8
100	5.1±0.8
200	5.1±0.5
400	2.4±0.4
800	1.8±0.5
1600	0.5±0.6
不输胸腺细胞	0.9±1.6

6. 抑制淋巴细胞活性对 CFU-S 辐射效应的降低作用

给正常小鼠腹腔注射 ATS 0.5 毫升一次,

24小时后外周血淋巴细胞数明显低于注前,相当于注射前35.5%,给药后第5天开始回复。在给药后24小时,骨髓及脾CFU-S均明显降低,分别为对照的62%及24%(表8)。

表8 正常小鼠腹注一次ATS 24小时后骨髓及脾的CFU-S

	骨髓-CFU-S	脾-CFU-S
ATS	5.3±0.5	1.4±0.4
对照	8.6±0.8	5.7±0.5

小鼠照射不同剂量(650—950 rads)前24小时腹腔注射ATS 0.5毫升一次,照后第9天测定CFU-S的结果表明比各对照组高,以650及750 rads组尤为明显($P<0.001$)(表9)。照射850 rads以上的ATS组与对照组CFU-S的差别随着照射剂量的增大而缩小,但统计学处理仍有显著意义。在照射900 rads后第13天,给ATS组CFU-S平均为9.0,而对照组仅1.5。说明即使在大剂量900 rads组,照射前注射ATS而使动物的CFU-S辐射效应下降的效果仍是十分明显的(表9)。

从照射后第9天的胫骨骨髓细胞计数的结果,也说明ATS明显降低了造血细胞的辐射效应(表10)。

表9 小鼠不同剂量照射前24小时注ATS一次,照射后第9天的骨髓-CFU-S

照射剂量 rad	ATS	对 照
650	15.3±0.9	2.0±0.4
750	6.1±0.8	0.6±0.2
850	2.4±0.7	0.3±0.2
900	0.8±0.4	0.1±0.1
950	0.4±0.2	0

小鼠在照射900 rads前一天腹注ATS 0.5毫升一次,观察照后20天的活存率,结果用ATS的小鼠活存91.2%(31/34),对照组活存6.1%(2/33),给ATS的小鼠活存率比对照提高80%以上(表11)。

表10 小鼠不同剂量照射前24小时注ATS一次,照射后第9天骨髓细胞数($\times 10^6$ /胫骨)

照射剂量 rads	ATS	对 照
650	6.2	2.2
750	4.0	1.0
850	1.1	0.6
900	0.5	0.4
950	0.3	0.2

表11 小鼠900 rads照射前24小时腹注ATS一次,照射后第20天活存率(%)

	ATS	对 照
第1批	78.6(11/14)	0(0/14)
2	100.0(6/6)	20.0(1/5)
3	100.0(14/14)	7.0(1/14)
总 计	91.2(31/34)	6.1(2/33)

讨 论

近10年来国外一些学者围绕造血组织局部的近距离调控作了不少探索并取得了较大进展,突破了30年来体内远距调控造血的学说。人们开始重视造血组织中由局部非造血细胞及某些细胞产物所构成的“造血诱发性微环境”(HIM)对造血细胞增殖分化的调控作用^[3]。

造血干细胞从静止状态Go与细胞周期之间的往返变动,是正负两种调控作用的结果,使机体维持正常的造血平衡。G₁期对造血抑制因子高度敏感而造成G₁-S阻断,或转入Go静止状态。Go状态又很可能介于G₁与S期之间,一旦细胞受到刺激性调控因子的激发,象扣动的板机一样,瞬间即可从Go进入S期。不少学者企图找出在造血组织局部存在的近距离调控因子,这些局部的调控因子的来源也是人们所不清楚的。

几年前有的学者发现了T淋巴细胞对造血

干细胞的增殖有放大作用^[4,5]。我们的工作证实,不但T淋巴细胞而且B淋巴细胞也有很强的放大作用。经特异或非特异性抗原激活的淋巴细胞具有更强的活性。我们的实验结果又表明了淋巴细胞对造血干细胞的调控是通过完整细胞之间相互接近时发生的,是细胞间相互作用的结果。造血组织在大剂量电离辐射后的恢复,正如胚胎中造血组织发生过程的重演,即先是间质的重建,形成完好的“龕”(niche)准备接纳干细胞的嵌入,然后才出现造血干细胞的再增殖与分化。实际上,所谓“龕”是干细胞与周围微环境交换信息,维持增殖分化的温床。以上实验启示了微环境中细胞成分的重要性,而淋巴细胞可能是“干细胞龕”的正常组成部分。在淋巴—造血系统中,各类功能不同的细胞都生活在一个“细胞社会”之中。在一定条件下它们相互排斥,在另一条件之下又相互依存。其中造血干细胞与免疫活性细胞之间正是这样的关系。我们的工作证实了淋巴细胞上清液有放大CFU-C增殖的活性。可以初步估计上清液含有调控活性物质。这种物质有待于我们继续验证,并了解其理化及生理特性和它发生的机理。我们的实验似乎表明这种调控因子是淋巴细胞与干细胞相遇时,经过细胞间相互识别后产生的,因而它具有专一性,例如正常小鼠胸腺细胞只能对CFU-S发生调控,而CFU-C却仅能接受激活的胸腺细胞的调控。

结 论

1. 小鼠胸腺细胞对多向性造血干细胞的

增殖有明显的放大作用,同时它先促进CFU-S向红系分化,以后又增强粒系的分化。被抗原激活的胸腺细胞对多向性干细胞及粒系定向性干细胞具有更强的放大增殖的作用。

2. 各种T细胞缺乏的动物以及非特异性抗原刺激的动物的脾脏淋巴细胞,即激活的B细胞对CFU-C具有比T细胞更强的放大增殖的活性。

3. 淋巴细胞上清液对CFU-C的增殖也同具有刺激活性。

4. 淋巴细胞对受一定剂量照射的CFU-S仍能恢复并加强它的增殖。如果淋巴细胞自身也受到一定剂量照射,仍能保持或保持部分这种活性。

5. 抑制淋巴细胞增殖活性可以降低CFU-S辐射效应。

参 考 文 献

- [1] 唐佩弦、江飞子、黎燕, 1981, 生理学报, 33:127—133.
- [2] Tang Pei-hsien, Han, F. K., Liu Y., 1981, *Experimental Hematology*, 9 (9 suppl.): 199.
- [3] Trentin, J. J., Rauchwerger, J. W. & Gallagher, M. T., Regulation of hemopoietic stem cell differentiation and proliferation by hemopoietic inductive microenvironments, in *Control of proliferation on Animal Cells*, Clarkson, B. and Baserga, R. pp. 927-931, Cold Spring Harbor, N. Y. 1974.
- [4] Goodman, J. W., 1978, *Experimental Hematology*, 6: 151-160.
- [5] Lord, B. I., Schofield, R., 1973, *Blood*, 42(3):395-404.