

# 影响人骨髓 CFU-C 产率某些因素的分析

马思普 毕建进

(军事医学科学院放射医学研究所 北京)

在 CFU-C (粒系或单核-巨噬细胞集落生成单位)体外琼脂培养中,只有在 CSF (细胞集落生成刺激因子)的作用下粒系祖细胞才能增殖、分化,生长成为细胞集落。CSF 来源广泛,其刺激活力文献报告不一<sup>[1-10]</sup>。此外,CFU-C 产率波动较大,影响因素甚多。本文在相同的实验条件下,比较了不同来源的 CSF 刺激活力,并对影响 CFU-C 产率的某些因素进行了分析。

## 材料与 方法

### 一、CSF 的制备

1. 胎儿肌肉、胎盘条件培养液:取水囊引产的胎儿横纹肌组织和胎盘组织,分别剪成小块,漂洗后取 1 克组织加入盛有 7 毫升 RPMI 1640 培养液、2 毫升马血清的三角烧瓶(容量为 30 毫升)内,在 37℃ 条件下培养 8—10 天,取上清,保存在 -20℃ 备用<sup>[5]</sup>。

2. 白细胞滋养层:取健康人静脉血,用不含防腐剂的肝素(10 单位/毫升血)抗凝。加入相当于十分之一血量的 6% 葡聚糖(分子量为 20 万)溶液,37℃ 水浴 30 分钟。待红细胞沉降后,吸出含白细胞丰富的血浆层。经离心、清洗,制成白细胞悬液。取  $1 \times 10^6$  个白细胞加入总量为 1 毫升的培养液内,置入直径为 30 毫米的玻璃培养皿中培养。培养液含 20% 马血清、15% 正常人血清和 0.5% 琼脂。培养条件为 37℃

3.5% CO<sub>2</sub> 空气、饱和水蒸汽,培养 6—8 天,即为白细胞滋养层。

3. 膀胱癌细胞(代号 5637)条件培养液:取人的膀胱癌细胞,加在含 1640 培养液的培养瓶(容量为 50 毫升、底面积为 22 平方厘米)中使每毫升培养液含  $1 \times 10^6$  个癌细胞。通入 5% CO<sub>2</sub> 空气,37℃ 条件下培养 3—4 天,收集上清液,保存在 -20℃ 备用。

### 二、人骨髓细胞悬液的制备

取未经化疗、放疗的肿瘤患者经胸外科手术切除的肋骨一段,挤出骨髓 1 滴,用 1640 培养液洗 1 次,制成含有骨髓有核细胞约为 5000/立方毫米的细胞悬液。

### 三、CFU-C 培养

用体外琼脂单层和双层培养法<sup>[5,11]</sup>。培养体系由 20% 马血清、15% 正常人血清、0.3% 琼脂和 1640 培养液组成。培养时每个培养皿加入 1 毫升培养体系和 0.2 毫升 CSF。用白细胞滋养层进行双层培养时,培养体系加在滋养层上面。每个培养皿接种骨髓有核细胞数为  $1-2 \times 10^5$ 。在 37℃、3.5% CO<sub>2</sub> 空气、饱和水蒸汽条件下培养 7 天。

## 结果与分析

### 一、不同来源 CSF 的刺激活力

在相同实验条件下,观察了不同来源的 CSF 对人骨髓 CFU-C 的刺激活力,结果列入

表 1 不同来源的 CSF 对 CFU-C 产率的影响\*

实验次数	培养皿数	胎儿肌肉 条件培养液	胎盘条件 培养液	5637条 件培养液	白细胞 滋养层
I	4	138±5	81±7	63±4	99±5
II	4	282±6	65±4	91±6	59±10
III	4	111±4	106±8	80±5	54±2
IV	4	76±7	41±1	38±3	—

\* 接种骨髓有核细胞数为  $1 \times 10^5$ , CFU-C 产率为  $M \pm SE$ , 以后同。

表1。可以看出:

(1) 四种不同 CSF 作用下, CFU-C 产率为 38—282/10<sup>5</sup>骨髓有核细胞。这表明四种 CSF 均有较好的刺激活力, 可在正式实验中应用。

(2) 每次实验中都以肌肉条件培养液作 CSF 时 CFU-C 产率最高。统计学处理, 除了第Ⅲ次实验中肌肉和胎盘条件培养液两个均数之间无显著性差别外, 其它平均数与同次实验中肌肉条件培养液平均数相比, 均有明显差异 ( $P < 0.01$ )。如将4次实验的 CFU-C 产率分别求平均值, 则肌肉、胎盘、5637 条件培养液和白细胞滋养层作 CSF 时, CFU-C 产率分

别为 151、73、68 和 70/10<sup>5</sup>有核细胞。结果表明, 肌肉条件培养液中 CSF 的活力比另外三种约高 1 倍。

(3) 每次实验 CFU-C 产率波动较大, 说明不同人的骨髓中 CFU-C 含量不同。

## 二、影响 CFU-C 产率的因素分析

用胎儿肌肉条件培养液作 CSF, 观察了不同因素对人骨髓 CFU-C 产率的影响。

1. 接种骨髓有核细胞数: 从表 2 可以看出, 接种细胞数从 0.5—2.0 × 10<sup>5</sup>有核细胞/培养皿时, CFU-C 产率随接种细胞数增加而增加。当接种细胞数增至 3 × 10<sup>5</sup>/皿时, 则 CFU-C

表 2 人骨髓细胞种入量与 CFU-C 产率之间比例关系

实验次数	培养皿数	种入细胞数 (×10 <sup>5</sup> )			
		0.5	1.0	2.0	3.0
I	4	56±5	88±7	179±12	201±5
II	4	25±2	59±5	126±11	181±7
III	4	73±5	106	195±3	241±7
IV	4	68±6	142±5	316±4	293±44

产率不成比例增加, 甚至不及 2 × 10<sup>5</sup>/皿。结果表明, 接种骨髓有核细胞过量时不能客观地反映 CFU-C 在骨髓中的含量。

2. 培养时间: 动态观察细胞集落的生长变化过程可以看到, 培养 12—24 小时, 有增殖能力的细胞已完成了 1—2 次分裂, 形成 2—4 个细胞聚在一起的细胞丛; 培养 4 天时, 有些细胞丛已增至 40 个细胞以上的细胞集落; 第 6 天时, CFU-C 产率达到最高值, 为 174/10<sup>5</sup>有核细胞。以后逐渐减少(表 3)。这表明, 细胞集落的产率随着观察计数时间不同而不同。考虑到细胞集落在第 6 天产率虽高, 但多数细胞集落由近 40 个细胞组成, 不易与较大的细胞丛相鉴别, 故以第 7 天观察计数为宜。

3. 正常人血清和马血清: 从表 4 看出, 在培养体系中加入正常人血清时 CFU-C 产率明显提高 ( $p < 0.01$ ) 与 Foa 和 Mabry 报告结果一致<sup>[12, 13]</sup>。

表 3 人骨髓细胞体外琼脂培养中 CFU-C 增殖的动力学变化

培养时间 (天)	CFU-C/10 <sup>5</sup> 有核细胞
12—24 小时	2—4 个细胞/丛
2	5.9 个细胞/丛
3	16.9 个细胞/丛
4	38±2
5	90±5
6	174±7
7	128±8
8	95±3
10	50±1
12	37±3
14	25±4

比较了 5 匹健马血清, 其中一匹马在不同时间采集了两次血清(38—1 和 38—2)对 CFU-C 产率的影响(表 5)。结果表明, 培养体系

表4 正常人血清对人骨髓细胞体外琼脂培养中 CFU-C 产率的影响

实验次数	培养皿数	CFU-C/10 <sup>5</sup> 有核细胞	
		加血清	不加血清
I	4	100±4	27±1
II	4	97±1	37±3
III	4	282±6	240±6

I、II 次实验中, 加血清与不加血清两均数相比,  $P < 0.01$ 。

中加入不同批号的马血清时 CFU-C 产率不同: 205 与 339、205 与 346、346 与 38—2、38—1 与其它马血清相比差别显著 ( $P < 0.01$ ); 甚至

表5 不同批号马血清对人骨髓细胞体外琼脂培养中 CFU-C 产率的影响

马血清批号	培养皿数	CFU-C/10 <sup>5</sup> 有核细胞
38-1	4	161±17
38-2	4	111±1
139	4	91±4
346	4	80±1
205	4	55±2
339	4	31±3

用同一匹马不同时间采集的血清时, CFU-C 产率也不相同 ( $P < 0.05$ )。因而进行造血干细胞培养时需要选择优质马血清才能取得满意结果。

4. 琼脂: 两次实验结果证明, 培养体系中加入广东省汕头市水产品综合加工厂加工的琼脂时 CFU-C 产率(分别为 285±5 和 100±

#### (上接封二)

源于古代的某种原细菌。现今真细菌的操纵子式的基因调控下可能是原始的, 看来倒象是 DNA 朝着高度精简的方向进化而得到的结果。真核细胞的基因调控方式很可能是朝着另外的方向进化而产生出来的。李懋学同志(北京大学)在发言中论述了植物核型进化的规律问题, 并提出我国的横断山系是植物细胞地理学研究的得天独厚的场所, 我们应加强利用并在这方面作出贡献。陈瑞阳同志(南开大学)在发言中介绍了他多年来为研究栽培植物的染色体进化, 在我国各个地区所进行的极其大量的工作。他发现多倍化虽属常见, 但是染色体组内的变化却未能见到。朱风绥同志(农科

4)不低于日本琼脂(CFU-C 产率分别为 268±7 和 95±5)。

#### 小 结

在相同的实验条件下, 比较了来源于人胎儿肌肉、胎盘、膀胱癌细胞和白细胞的 CSF 对人骨髓 CFU-C 的刺激活力。CFU-C 产率分别为 151、73、68 和 70/10<sup>5</sup> 骨髓有核细胞。结果表明, 肌肉条件培养液中的 CSF 活力最高。

实验结果还表明, 接种骨髓有核细胞数、培养 CFU-C 时间、马血清和人血清等因素对 CFU-C 产率均有不同程度的影响。

#### 参 考 文 献

- [1] Entringer M. A. et al. 1980, *Exp. Hematol.* 8: 1232.
- [2] Moore M. A. S. et al. 1977, *Br. J. Cancer* 35: 500.
- [3] Chervenick P. A. et al. 1970, *Science* 169: 691.
- [4] 朱王葆等, 1983, *生理学报*, 35: 149.
- [5] 葛忠良等, 1981, *中华血液学杂志*, 2: 138.
- [6] 余婉芬, 1982, *中华血液学杂志*, 3: 1.
- [7] Zinzard S. N. et al. 1981, *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.* 22: 340(c-29).
- [8] Stanley E. R. et al. 1972, *J. Lab. Clin. Med.* 79: 657.
- [9] Burgess A. W. et al. 1977, *Blood* 49: 573.
- [10] Grilli G. et al. 1980, *Exp. Hematol.* 8: 42.
- [11] Pike B. L. et al. 1970, *J. Cell Physiol.* 76: 77.
- [12] Foa R. et al. 1980, *Haematologica* 65: 1.
- [13] Mabry J. et al. 1975, *Exp. Hematol.* 3: 354.

院植物所)和姚珍同志(北京遗传所)在讨论中提出, 今后应以很大的力量争取在植物染色体分带的技术上有一个突破, 这样将来就可以在一个更高的水平上重新考查栽培植物的染色体进化问题。关于植物染色体的分带, 大家进行了热烈的讨论, 提出了不少宝贵的具体建议。会上初步决定, 在适当的时候召开一个有关植物染色体分带技术的经验交流会。

为了会议的成功, 第四军医大学, 特别是四军大生物学教研室的同志作出了很大努力, 与会者一再向他们表示了衷心的感谢。

学会秘书处