

造血干细胞 (CFU) 增生状态的研究

用Till和McCulloch (1961) 的方法, 能定量地测定小鼠的多能造血干细胞 (CFUs)。一种方法是移植少量骨髓或脾细胞进入超致死剂量照射的受体鼠, 8~10天以后计数脾脏内的集落数(外源性-CFUs)。另一种方法追查亚致死剂量照射动物活存的干细胞在脾脏内形成的集落(内源性-CFUs)。Becker, McCulloch和Till, Lajtha等(1969)的早期研究证明, CFUs代表一种增生缓慢的细胞群, 大约只有10%的细胞处于细胞周期的S期。

近来Boggs等(1973)和Boggs及Boggs (1973)提出, 内源性-CFUs的增生速率比外源性-CFUs高。羟基脲是核糖核酸还原酶的抑制剂(Skoog和Nordenskjöld (1971), 被发现适于在体内测定S期细胞的比例(Morse, Rencricca和Stohlman, 1970; Kuqonek等1973)。我们用羟基脲的方法再一次研究了外源性和内源性-CFUs的增生状态。

增生缓慢的干细胞因照射引起部分损伤后, 提高了它的增生速率(Beches et al 1965)。亚致死剂量照射后CFUs开始增生的速度被发现与移植给照射受体的CFUs有差别。照射后内源性-CFUs的生长几乎是立刻开始的(Boggs, Chervenick和Boggs, 1972; Chervenich和Boggs, 1971), 而外源性-CFUs开始增生要晚1~2天(McCulloch和Till, 1964)。

再一次利用羟基脲, 比较了外源性和内源性-CFU, 增生的开始。

某些药物被发现能增加CFU_s和腮腺细胞的增生速率(Byron, 1971, 1972 a, b; Baserga, 1971)。本文采用异丙肾上腺素和环腺苷-磷酸(cAMP)研究了它们对受照射的和正常动物CFU_s增生的影响。

材 料 和 方 法

骨髓细胞的供体和受体都采用22~25克的NMRI小鼠。用⁶⁰Co源照射, 剂量率大约16伦/分。

依照Till和McCulloch (1961)描述的方法测定外源性-CFUs。造血细胞的悬液用股骨的骨髓来制备。每次实验把取自7根股骨的骨髓混合在一起。细胞悬浮在成分十分类似M199 (Morgan等1950)的组织培养液(pH7.45)内, 把相应于一定实验组的骨髓细胞悬液合并, 用注射器仔细地混匀, 并计算有核细胞数。把最终体积为0.2或0.3毫升内含10⁵个细胞的培养液, 给照射受体注射。受体小鼠在注射骨髓细胞前2小时接受850伦照射。移植后第8天取出脾脏, 固定在Bouin氏液内。脾集落数由两人分别计数。对照组每个脾脏平均20~22个集落。计算每根股骨的CFUs数时, 以平均每根股骨的细胞数和注射已知量的造血细胞后形成的集落数为基础。

内源性CFUs方法是根据亚致死剂量

照射后受照射小鼠活存下来的造血组织能够再生的事实。在这种动物的脾脏上形成的肉眼可见的结节起源于内源性-CFUs细胞 (Bruce 和 McCulloch, 1964; Marsh 等1967)。在用作内源性-CFUs测定的实验中, 照射剂量用 650 伦。按这种处理, 对照动物在照射后第 8 天大约形成 10~15 个脾集落。其它实验条件与在外源性-CFUs方法中所描述的相同。

利用羟基脲研究了 CFUs 增生状态, 当体内给药时羟基脲选择性的杀死 DNA 合成的细胞 (Morse 等 1970)。除了对 S 期细胞的毒性作用外, 羟基脲还使细胞从 G₁ 期进入 S 期发生暂时性拖延 (Bhuyan 等 1973)。此外, 羟基脲在小鼠体内迅速地代谢, T_{1/2} 为 13 分钟 Bajewsky 等 (1971)。这意味着羟基脲只是杀死给药时处于 S 期的那些细胞。

临用前将羟基脲 (Sguibb, Heyden) 溶解在生理盐水内, 每公斤体重腹腔注射 900 毫克。以注射羟基脲引起的 CFUs 减少的百分数来估计 S 期细胞的比例。

双丁酰环腺苷 3', 5'-磷酸 (db-cAMP) 从美国 Calbiochem 获得。

骨髓受体或在内源性-CFUs 实验中的亚致死剂量照射小鼠每组实验一般由 9 只小鼠组成。从得到集落数计算均数和均数标准误。在图内均数标准误用垂直线表示。

结 果

一、外源性和内源性-CFUs 的增生速率

表 1 为几批实验结果的总结, 在这些实验中, 比较了外源性-CFUs 对一次注射羟基脲的敏感性。在取骨髓细胞 (外源性-CFUs) 前 2 小时或用 650 伦 (内源性-CFUs) 亚致死剂量照射前 2 小时给羟基脲。注射一次羟基脲使小鼠股骨中外源性-CFUs 的量减少约 10%。给羟基脲似乎不改变内源性-CFUs 的量。(表 1)

二、CFUs 在受照射或移植到致死剂量照射小鼠后, 增生状态的变化。

表 1 羟基脲对外源性-CFUs 和内源性-CFUs 的影响

外源性-CFUs			内源性-CFUs		
对照	羟基脲	%	对照	羟基脲	%
1074±93*	964±121	90	11.5±1.7†	11.6±2.1	101
(n=48)	(n=47)		(n=81)	(n=36)	

n: 脾脏数 *; CFUs/股骨(均数±SEM) †: 650 伦照射后脾脏集落数。

在亚致死剂量照射后, 或者在给照射受体小鼠移植骨髓细胞后不同时间, 给小鼠注射一次羟基脲。此法能够估计处于细胞周期 S 期的内源性-CFU_s 或外源性-CFU_s 的比例。这些实验的目的是测定 CFU_s 从 G₁ 和 G₀ 进入 S 期流量增高的发生时间。

图 1 表明, 移植的外源性-CFU_s 对

羟基脲不敏感的时间长达 30 小时, 但此后干细胞进入细胞周期 S 期的比例增加。在另一方面, 照射后内源性-CFU_s 的增生率立即升高, 这一点由这些细胞为羟基脲逐渐增多的杀死所证明。照射后大约 15 小时, 注射一次羟基脲足够杀死大约 80% 的内源性-CFU_s。

Byron (1971, 1972) 证明, 外源性

-CFU_s能够在试管内被cAMP的双丁酰衍生物或异丙肾上腺素激发而进入DNA合成期,后者能刺激腺苷酸环化酶而使细胞内cAMP水平升高。下列的实验用来研

究上述药物是否能影响移植到照射受体的外源性-CFU_s DNA合成的开始时间(图1)。

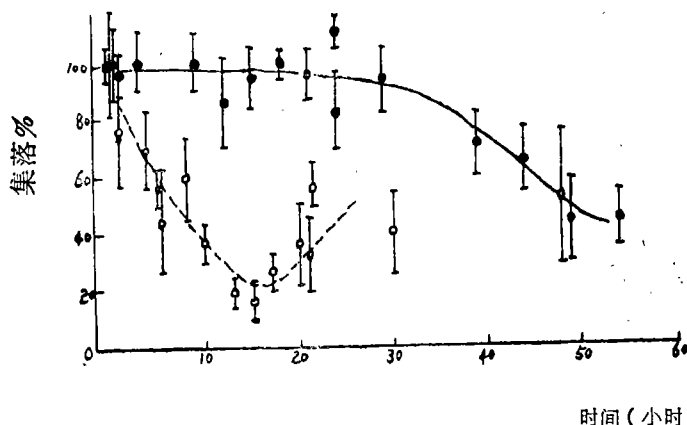


图1 一次注射羟基豚对集落数的影响。在外源性-CFU_s试验中(●—●),羟基豚于骨髓移植后0~4小时给药,在内源性-CFU_s试验(○……○)中,于亚致死剂量照射后0~48小时给药

850伦照射小鼠移植骨髓后1小时给异丙肾上腺素(100毫克/公斤),加速了对羟基豚敏感性增高的开始时间。同样,在移植骨髓细胞后1小时,给照射受体小鼠注射db-cAMP也能使移植的外源性-CFU_s立即增高对羟基豚的敏感性。

最后实验的目的是用未经照射的正常小鼠测定异丙肾上腺素是否能够激发多能干细胞进入S期。在给羟基豚前不同时间给未经照射的供体小鼠一次注射异丙肾上

腺素(100毫克/公斤)。采集骨髓细胞前2小时给羟基豚。比较了注射异丙肾上腺素和羟基豚小鼠股骨内外源性-CFU_s的含量和只接受异丙肾上腺素小鼠股骨内外源性-CFU_s的含量。把羟基豚处理下活存的外源性-CFU_s百分率与异丙肾上腺素给药时间作图。图2显示,在异丙肾上腺素引起正常小鼠外源性-CFU_s群体开始DNA合成之前需要15~20小时的间隔。

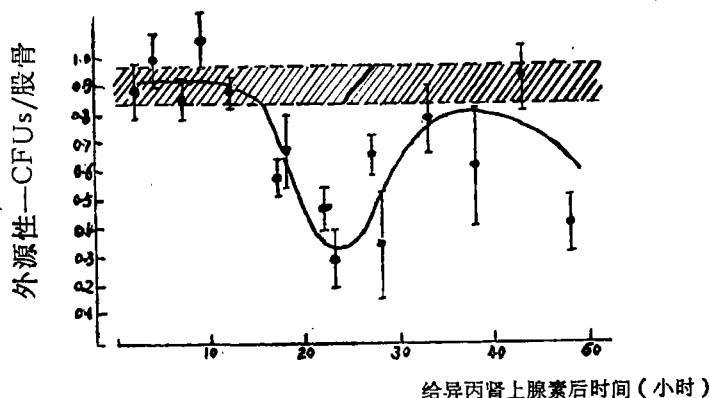


图2 异丙肾上腺素对正常供体小鼠股骨中外源性-CFU_s羟基豚敏感性的影响

讨 论

我们未能用羟基脲证明Boggs等(1973)及Boggs和Boggs(1973)的发现,他们认为内源性-CFU_s的增生速率比外源性-CFU_s高。Boggs等(1973)研究了照射前1或2小时注射阿糖胞苷时内源性-CFU_s的增生率。他们发现30~60%死亡,和照射前2小时注射羟基脲的影响大大地不同(表1)。Boggs等的结果和我们自己的结果之间的差别可能是由于这样一种事实,即我们采用不同的杀死S期的药物来测定处于S期的CFU_s组份。虽然羟基脲和阿糖胞苷都杀死S期细胞并且代谢迅速,但即使把阿糖胞苷从细胞周围完全去除后,它仍然引起一种长期的G₁期阻滞(Bhugan等,1973),而阻滞在G₁期末的细胞可以显著地增高对辐射损伤的敏感性(Fvindel和Tubiana,1971)。氮甲嘌呤比用自杀剂量的³H-胸腺嘧啶核苷处理杀死更多的可移植的干细胞(Blackett, 1968),后者是单纯杀死S期细胞的药物。

在亚致死剂量照射后,处于S期的内源性-CFU_s迅速而大量地增加,这一事实有力地支持了在正常情况下大多数内源性-CFU_s并不处于S期的这种论断。亚致死剂量照射后15小时注射一次羟基脲杀死将近80%的CFU_s,可以归因于细胞周期的高度同步(指细胞以整齐步伐同时进入S期)。如果照射前这些细胞的大部分已进入S期,就不能期望它们能作出如此同步进入S期的运动。图1所示的结果也证明,在受照射机体,一种刺激活存下来的CFU_s强烈增生的条件很快就发展起

来。

但是,给致死剂量照射受体移植的CFU_s(外源性-CFU_s)为什么要在大约30小时后才开始进入S期(图1, McCulloch和Till, 1964)还不十分清楚。我们要问,移植的CFU_s究竟是在移植后短期内就能被诱导开始增生呢,还是必须在受体的组织中耗费若干时间。Byron(1971, 1972a b)发现用睾丸酮, 5 β -二氢睾丸酮, 异丙肾上腺素和db-cAMP等类药物能在试管内诱导CFU_s增生。

移植骨髓后短期内给照射受体注射异丙肾上腺素或db-cAMP,使得移植的CFU_s迅速地对羟基脲敏感。这说明移植给受照射机体后,这些细胞能够像照射后的内源性-CFU_s那样立即地被激发进入细胞周期。照射后出现的使CFU_s增生的生理性刺激物,可能只有当它们在造血组织内通过某种细胞与细胞的相互作用时,才能被转移到移植细胞。移植的CFU_s被激发进入细胞周期的这种迟发性可能反映了建立这种细胞与细胞相互作用的必需时间。

异丙肾上腺素对移植的CFU_s的作用是即时的,但它激发腮腺细胞进入S期则延迟20~30小时(Baserga, 1971; Furuno, Asami和Matsudaiva, 1974)。因此,我们试验了在正常机体内注射异丙肾上腺素对外源性-CFU_s的影响。已经证明(图2),在正常机体,只有经15~20小时后异丙肾上腺素才增高CFU_s处于S期的比例,这与它对移植进致死剂量照射受体的CFU_s的即刻作用成为鲜明的对照。

(NečASE等: Cell Tissue Kinet 9(3): 223~230, 1976(英文)皮国华译 徐承熊校)