

种处理后并不能明显加速其造血恢复。但是,当供体给小剂量,受体给大剂量的环磷酰胺的实验表明,“起动的”小剂量可能刺激造血细胞,使能对大剂量用药后骨髓枯竭的刺激发生较强的反应。为了确定将小剂量

环磷酰胺处理的骨髓移植到受体小鼠后是否能促进再生问题,现正进行这一实验。

(Gordon MY: Cell and Tissue Kinetics 10(5): 497, 1977(英文))

鲁新节译 刘及校)

## 小鼠粒细胞成熟率的调节

本研究的目的是探讨粒细胞的成熟是否能由一般的抑制粒细胞产生的各种措施来予以加速。

作者利用了密闭的体内培养体系进行了粒细胞成熟的研究。这种培养体系对粒细胞来说,培养条件是良好的,就象在骨髓的自然环境中一样能很快的增殖。

### 材 料 和 方 法

动物:将成年雌性WHT或NMRI/Bom小鼠股骨骨髓细胞培养在植入各种受体腹腔内的扩散盒中。使用了同系受体(雌性WHT),同种受体(雄、雌性CB-20, DBA-20和NMRI/Bom)及异种受体(雄、雌性Wistar大鼠,1~4月令,60~180克重)

再生骨髓细胞:将环磷酰胺处理过的小鼠股骨剪开,收取骨髓细胞(环磷酰胺200mg/kg体重,前三天腹腔注射)。

扩散盒技术见以前的报导。将不透过细胞、无菌的DC、植入受体腹腔内,每只小鼠植入2个,大鼠则植入3~4个。通常每组6个盒,培养1、2、3和4天后取出。

培养1和2天,因细胞数过少,用一般方法计数不够准确,故把经戊二醛固定的一定量的鸡红细胞加到细胞悬液内计数,然后在涂片上分出有核红细胞所占比例。并进行分类计数。

放射自显影:将已培养三天的DC孵育

在含有1.0或2.5微居里/毫升 $^3\text{H-TdR}$ 的组织培养基内1小时,37℃( $^3\text{H-TdR}$ 5居里/毫克分子)。如在体内标记,则给培养三天的受体腹腔内注射 $^3\text{H-TdR}$ ,以后23小时取出扩散盒(注入 $^3\text{H-TdR}$ 量:10微居里/小鼠(2毫升),20微居里/大鼠(4毫升))。

用Ilford L4乳剂,大部分试验均按标准程序操作。后期的试验,自显影前,在已染色的涂片上涂上薄层氯化聚乙烯(PVC)保护膜。

细胞核内有10个或10个以上的颗粒即算作标记细胞。随机任选100个标记细胞中平均颗粒数为55,而在100个非标记细胞中的颗粒数为1。在自显影中,将缺乏粒细胞特点的一些幼稚细胞归为“原始细胞”类。其中多数细胞在普通涂片或自显影片上(PVC)均可见有嗜苯胺兰颗粒。实际上这些都是增殖阶段的粒细胞。

粒细胞生成的抑制和DC受体的障碍:在某些实验组中使DC内细胞含量高于对照组15倍,或用大鼠代替小鼠做受体,从而使粒细胞产率降低。有些大鼠在2~4周令时,皮下注射 $2\sim 3 \times 10^6$  Shay绿色瘤细胞,接种后2~5周做DC受体,此时大鼠皮下绿色瘤已经很大。前已述及这种肿瘤可分泌生长抑制素(粒细胞抑素),能使腹腔DC粒细胞生成降低。

有些DC经粗制或半纯制的白细胞提取物(粒细胞抑素)处理后,在体内和体外培养

中观察到 $^3\text{H-TdR}$ 标记和细胞收取间有抑制粒细胞生成的作用。白细胞提取物有的经受体腹腔注射到DC内,有的则常加到培养液中(Hepes缓冲的fischer's液)。将DC在体外培养(体内培养最后24小时前5小时),有的于再移植前直接注入DC内(20微居里/DC)。后两种情况下,最后的受体小鼠均预先注射300毫克/公斤体重环磷酰胺,3天,以刺激粒细胞生成。

统计处理:除特殊情况外,一律用双侧-Fisher-Irwin法测验差异的显著性。

## 结 果

相对成熟率是单位时间内增殖的粒系祖细胞成熟到非增殖池的份数。我们用下述两种方法判定成熟率:①追踪一天中在DC培养中非增殖粒细胞与增殖粒细胞的比值②经与 $^3\text{H-TdR}$ 培养三天的标记增殖粒细胞数。标记后一天,在多数标记细胞尚未到达终末阶段(分叶核)之前便测定了标记细胞移入非增殖池的数量。

培养1~4天间,收取DC内高含量和低含量培养的再生骨髓细胞。第4天,高细胞含量组,非增殖细胞数和增殖细胞数的比值最高。而在第3天无此现象。这表明,在最后培养阶段的成熟率最高。在培养的三天,用脉冲标记指数( $^3\text{H-TdR}$ )测定,发现增殖粒细胞的增殖率在DC内细胞含量高者反而比含量低者降低(0.51比0.57,  $P=0.05$ ,单侧Fisher-Irwin检验)。

用放射自显影技术测定时,见细胞含量高者比含量低者相对成熟率明显增高。同样,把DC埋在正常大鼠和患绿色瘤大鼠内的粒细胞相对成熟率也比低含量细胞的对照组高。

把粗制白细胞提取物注入DC受体,相对成熟率明显高于其它处理组。培养细胞经 $^3\text{H-TdR}$ 体外标记后用粗制或半纯制白细胞提取物在体外培养三天,然后体内再培养

一天,将提取物加入DC周围培养基中5小时,或加入即将再植入新受体小鼠的DC内。前者相对成熟率增加,而后者则变化不明显。同样,半纯制白细胞提取物经短时体外培养,也对成熟率影响不大(未发表资料)。这表明粒细胞与其抑制剂的结合是不紧密的。

成熟率的促进最终必将导致形成终末细胞的减少。而粒细胞成熟率突然增加,在粒系祖细胞增殖池显著减少之前,将引起非增殖细胞的暂时增加。观察结果与推论是一致的。当增殖的粒细胞数近于正常时,经白细胞提取物处理培养在DC内,标记的非增殖粒细胞的绝对数高于对照组,但当粒系祖细胞群体被强烈抑制时,则提取物处理的DC中所含标记的非增殖粒细胞数低于对照组。

## 讨 论

实验证明,在扩散盒培养中种入细胞量多时,用正常大鼠,患绿色瘤大鼠做受体代替小鼠时,以及培养的细胞用含有粒细胞抑制素的白细胞提取处理时,都可促进粒细胞相对成熟率增加。

对这一问题的分析是建立在某些重要的速率常数,在一天的实验时间内不会产生变化的基础上的。相反如果它们发生了变化,那么在实验组和对照组中都必需是一致的。有关的速率常数,包括特异的粒细胞分裂率、死亡率和分化或成熟率(向非增殖粒细胞和巨噬细胞)发展。例如,若在培养细胞收取前短时间,增殖的粒系祖细胞大部分分化成巨噬细胞,则标记的非增殖细胞数可能稍低于对照组,而标记的增殖粒细胞数则可能明显减少,将出现相对成熟率增高的假象。

我们在多数实验中发现不仅相对成熟率增加,而且DC内被标记的非增殖粒细胞绝对数也增加。所以在理论上对加速成熟的另一个可能的解说是白细胞提取物可防止标记

的非增殖粒细胞死亡，但这似乎是不可能的。因为第一，在DC培养后3-4天内幼稚，细胞死亡比分叶粒细胞少，而且，其倍增时间也仅较细胞周期时间稍长。第二，一般情况下，在成熟粒细胞标计指数尚未达到晚幼粒细胞和杆状粒细胞之前，也就是在标记的成熟粒细胞尚未衰老、死亡之前，我们的实验便已结束。因此，实验中证实的促进粒细胞成熟率增高的结果是可信的。

理论上，相对成熟率的增加和粒细胞产率的减少在以下两种情况下可以出现：①细胞分裂率降低(在成熟时间不变或缩短时)。②某些未知的细胞成分(X)的合成速率的增加，终止了细胞分裂，并且是不可逆的。后一机理可能使成熟期缩短，但分裂率不变，如果增殖细胞不因死亡或分化成巨噬细胞，而是生成非增殖细胞时，也会见到相对成熟率的增加。然而这将造成粒细胞的产生增多而非减少。本资料并不支持后一种的可能性。也不能象以前在白细胞提取物和绿色瘤实验中的解释。因此，实验组的粒细胞必然在很少几次分裂后就停止分裂而进入非增殖阶段(参看上述D和②)虽本资料很难确定是哪一种情况，但我们倾向第一种解释，因为实验中，高细胞含量组经 $^3\text{H-TdR}$ 标记后测量证实增殖率稍低，另外，以前工作已表明，注入白细胞提取物后可降低增殖率。当然，本

实验的各种处理均可能引起在粒细胞发生过程中抑制物(X)的急剧增加(参看上文)。

而且，粒细胞成熟率的增加，非常可能是由于粒细胞抑素所引起。实验表明，抑素含量增加有4种情况(即注射白细胞提取物；在白细胞提取物存在时的体外培养；增加培养的细胞量和在患绿色瘤的受体中培养等)。正常大鼠做DC受体也可能是第五种情况，因为没有测定大、小鼠腹膜炎渗出液中的抑素含量，所以尚难确定。总之，因为一般的细胞毒性作用根本不能解释这个结果，再加上所用的提取物之一(ox-2)作为抑制剂的浓度已超过 $10^5$ 倍之多，所以，除了对所有上述5种情况产生粒细胞抑素外，很难再找到任何一个共同因素。

以前，粒细胞抑素的作用通常是利用靶细胞的增殖活动进行测定的，这种方法由于可能具有细胞毒性作用而经常遭到反对。本实验中，由于能将“丢失”的增殖粒细胞在非增殖池中进行追踪，从而便排除了细胞毒性的干扰。

能否将这次研究中对促进粒系成熟的观察做为对抑素实际测定的基础，尚待进一步研究。

(Benestad HB and Rytömaa T:  
Cell and Tissue Kinetics 10(5):461,  
1977 (英文) 范洪学节译 刘及校)

## cGMP对干细胞增殖的刺激作用

一般认为，粒细胞的增殖是依次由多能干细胞、定向干细胞而来的，最终成为形态上可辨认的粒细胞和巨噬细胞。定向干细胞是活跃增殖的，但大部分多能干细胞必需激活后才能参与细胞的产生。已有人认为环状核苷酸在细胞增殖周期的起中起着重要的作用。Byron的实验指出，cAMP及cGMP

二者都能激起多能干细胞的DNA合成。然而，环状核苷酸在体外粒细胞生长中的作用尚未弄清。本研究中，作者证实了cGMP能刺激体外培养中粒细胞的生长。cGMP反应干细胞对胸腺嘧啶核苷 $^3\text{H-TdR}$ 的自杀是有抵抗力的，它们能为cGMP激活，从静止期进入增殖期。