

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,在成熟粒细胞标记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。

## 材 料 和 方 法

全部实验使用成熟的DBA/2雄性小鼠。从注射25单位沙门氏杆菌内毒素后3小时的小鼠制取血清,其中富含细胞灶刺激素(CSA),将此注射内毒素后的多鼠血清(PES)混合,于-80℃的条件下保存备用。浓缩的环状核苷酸溶液和其它培养附加剂均在使用前用蒸馏水配制。对照培养液中加入与实验组所加试剂体积相等的蒸馏水。骨髓细胞用Hanks'平衡盐溶液(HBSS)从小鼠的后肢骨中冲出,并用电子计算机作三次细胞计数。按Bradley等的方法做骨髓细胞的琼脂培养。将细胞混匀在含有0.3%琼脂和15%胎牛血清的McCoy's 5A的培养液中,然后将 $5 \times 10^4$ 骨髓细胞培养在35毫米的塑料培养皿中。培皿放在含有7%CO<sub>2</sub>, 37℃,且有较高湿度的孵育器中培养7天后,用立体显微镜计数50个细胞以上的细胞灶。胸腺嘧啶核苷的自杀实验是按Byron的方法进行。将 $5 \times 10^6$ 骨髓细胞培养在含有100微居里<sup>3</sup>H-TdR的2毫升的HBSS中,使其最终浓度为50微居里<sup>3</sup>H-TdR/毫升(37℃20分钟)。相应的对照组培养在未标记的TdR中。20分钟后加入含有15%胎牛血清和100微克/毫升<sup>1</sup>H-TdR冰冷的HBSS液30毫升来终止<sup>3</sup>H-TdR的摄入。将上述细胞用200g、离心12分钟,然后用冷的HBSS胸腺嘧啶核苷血清溶液将细胞冲洗两次。上述细胞再培养在含有3%PES之中,最终将对照细胞与先在<sup>3</sup>H-TdR培养过的细胞所成灶数进行比较。

## 结 果

cGMP对细胞灶形成的影响:

在最初的实验中,将cGMP加至不含CSA的培养体系中,6次实验,在分别含有 $10^{-10} \sim 10^{-6}$  M的cGMP总共36个培皿中,

仅有极少数的细胞灶形成。因此可以说,在不含CSA的培养中,仅cGMP不能刺激细胞灶生长。在其它的全部实验中都含有PES型的CSA,从三次实验所得的数据来看,在含有 $10^{-10} \sim 10^{-6}$  M的cGMP,有PES刺激素的18个培皿中所形成的细胞灶都比不加cGMP的对照培养者多。

在培养中加入氯化氨甲酰胆硷(Carbachol,可在细胞内刺激产生cGMP),做了增加cGMP的刺激作用的确证实验。对每一种剂量都是累积3或4次实验的数据。在含有 $10^{-14} \sim 10^{-8}$  M氯化氨甲酰胆硷的每组12-16个培皿中所形成的细胞灶均高于不加氯化氨甲酰胆硷组。由于氯化氨甲酰胆硷已确定作用于胆碱能感受器,从而有促进cGMP合成的作用。因此,我们用了抗胆碱能药物,即d-氯化防己碱(d-tubocurine Chloride)以阻断碳酰胆硷的作用。将骨髓细胞先在含 $10^{-6}$  M d-氯化防己硷中培养5分钟,然后在含 $10^{-6}$  M的d-氯化防己硷和氯化氨甲酰胆硷中再培养。结果可见,先经氯化防己硷处理过的细胞,再用氯化氨甲酰胆硷刺激培养的各组12~16个培皿中所形成的细胞数,均低于未先处理组。由此可见,氯化氨甲酰胆硷的作用能被胆硷阻滞剂所抑制。

在另外的实验中,将其它一些药物对成灶的影响也进行了观察。当把 $10^{-10} \sim 10^{-6}$  M的5'-GMP加入培养体系中时,均未见刺激成灶的作用。加入 $10^{-10} \sim 10^{-6}$  M的cAMP或db-cAMP时,也未见有明显的刺激作用。但在加入 $10^{-12}$  M DL-盐酸异丙肾上腺素(一种腺苷酸环化酶激活剂)时,则能抑制细胞灶的形成,但当其浓度在 $10^{-10}$ 和 $10^{-8}$  M时,对细胞灶生长便无影响。

cGMP-敏感细胞:

为了比较cGMP-敏感细胞与CSA单独作用下能成灶的细胞特性,进一步又做了以下的实验。首先观察了在不同浓度的CSA存在下,cGMP的作用。将细胞培养在含0.5%

~10%浓度的PES中为对照, 实验组中加入 $10^{-8}$ M cGMP。三次实验中 每组 为12培皿。在各种PES浓度中, cGMP都有刺激成灶的作用。其中PES浓度在2%和5%时, cGMP的刺激作用最强。这表明, cGMP是能够诱发通常对 CSA 不发生反应的细胞群形成细胞灶的。

#### 胸腺嘧啶核苷自杀试验:

胸腺嘧啶核苷自杀试验能表现出cGMP-敏感细胞的周期特性与那些PES反应细胞是不同的。将细胞先在 $^3\text{H}$ -TdR中培养, 使处于DNA合成期细胞摄取致死剂量的放射性胸腺嘧啶核苷, 然后把残留在细胞外的 $^3\text{H}$ -TdR冲掉, 再将细胞培养在只含有PES或PES+cGMP同时存在的条件下, 然后将用 $^3\text{H}$ -TdR处理的细胞与用 $^1\text{H}$ -TdR作用的对照细胞进行培养比较。在11次实验中, 实验组与对照组均作了33~35个培皿。结果见表1。

表1、以 $^3\text{H}$ -TdR处理后CFU-c的减少

TdR处理	两种附加物培养时所得灶数(均值±标准误)		cGMP敏感细胞数
	$^3\text{H}$ -PES	$^3\text{H}$ -PES+cGMP	
$^3\text{H}$ -TdR	132±18	146±18 ( $P<0.005$ )	14
$^3\text{H}$ -TdR	95±14	113±15 ( $P<0.001$ )	18

均值±标准误依11次实验各组33~35个培皿的灶产量算出。单纯CSA下减少的CFU-c数为 $132-95=37$ , 对cGMP敏感细胞数为 $146-113=33$ 。两组间无明显差异。可见cGMP虽可促进成灶, 但对 $^3\text{H}$ -TdR有抵抗力, 因而, 该组cGMP敏感细胞并未减少。

从结果中可见,  $^3\text{H}$ -TdR在只含有CSA的体外培养中所得成灶细胞的减少数(37个/培皿与CSA和cGMP两者均存在时的培养结果(33个/培皿), 并无差别。即使cGMP是可以引起细胞灶的增加, 由cGMP诱导的细胞灶的增加, 也并不由于 $^3\text{H}$ -TdR的处理而减低, 这说明cGMP-敏感细胞对 $^3\text{H}$ -TdR的杀伤是有抵抗力的。因此, 它们不是处于增殖活跃的细胞。在另外的一些实验中, 为了杀死可能对50微居/毫升的 $^3\text{H}$ -TdR效应较差的成灶细胞, 将作用在成灶细胞的胸腺

嘧啶核苷的放射性增加到200微居/毫升, 在两次各组为12个培皿的实验中发现, 经 $^1\text{H}$ -TdR处理的cGMP反应细胞计数为17个/培皿, 经 $^3\text{H}$ -TdR处理的计数为15个/培皿。这说明了cGMP敏感细胞对大剂量的 $^3\text{H}$ -TdR自杀也是有抵抗力的。

#### 讨 论

本实验证实了cGMP在有CSA存在时能够促进成灶。不仅把cGMP加入培养体系中能够成灶, 而且, 如果把氯化氨甲酰胆碱加入培养基中, 也见有同样的作用。(后者是cGMP合成过程中鸟苷环化酶的一种刺激剂)。这表现在细胞内cGMP含量的增加能够促进细胞灶的形成。氯化防己碱是一种胆碱能抑制剂, 它能阻滞氯化氨甲酰胆碱的作用, 本实验也进一步证实了这一结果。这些资料都说明了细胞内cGMP的含量对造血干细胞的增殖可能有重要的影响。诚然, 本实验与Seifert所观察的也是一致的, 他曾观察到同步的小鼠成纤维细胞, 当开始进入增殖期时, 细胞内cGMP的含量增加。Whitfield和Macmanus也指出在增殖的胸腺细胞中cGMP含量是增高的。

Byron的研究指出, cAMP和cGMP均能提高胸腺嘧啶核苷对多能干细胞的自杀率, 这说明DNA的合成已经开始。但是, 予先用环状核苷酸培养时, 并不能增加在体内增殖的干细胞数目。因而, 用Byron的实验去与本实验相比较是困难的。因为在Byron的实验中, 细胞先培养在环状核苷酸中3小时, 然后经过7天在体内形成脾结节。而在本实验中, 细胞灶在体外形成的过程中, 一直是受到环状核苷酸作用的。

异丙肾上腺素能抑制细胞灶的形成, 它是一种cAMP合成的刺激剂。这与Morley和Tisman等人研究结果是一致的。他们曾证实在培养中加入前列腺素 $\text{E}_1$ , 便可升高cAMP含量而抑制粒细胞灶的形成。

对cGMP敏感的细胞似乎与那些只对

CSA发生反应的细胞群不同。因为cGMP加入到培养中,能够引起成灶数增加,即使是在最大浓度CSA刺激时也是如此。这说明cGMP能诱使一种对CSA单独存在时不起反应的细胞成灶。在胸腺嘧啶核苷自杀试验中,进一步发现cGMP敏感细胞是一种特殊的细胞群,它与那些只对CSA发生反应的细胞相比,有着不同的细胞周期特点(表1)。cGMP敏感细胞对胸腺嘧啶核苷的杀伤有抵抗力,说明了这些细胞是处于慢增殖或G<sub>0</sub>期中。而CSA反应细胞中的29%能被胸腺嘧啶核苷杀死,这与它们是增殖活跃细胞群的概念是相符的。

本实验证实了静止期或慢增殖期的干细胞群的存在,它们能在cGMP存在的条件下,变为对CSA反应的细胞,并在体外成

灶。这种cGMP敏感细胞也和具有慢增殖期或静止期特点的多能干细胞相类似的性质。然而也不能排除cGMP敏感细胞是不活跃的一种定向干细胞的可能性。但无论如何,细胞内cGMP含量的增高,对动员静止期干细胞进入增殖周期仍是重要的因素。

最近Brown和Adamson的研究表明,cAMP能够促进体外培养中狗红系灶的生长,但cGMP则无此作用。因此,可以假定,cAMP是红系生长的激动剂,cGMP则是粒系生长的激动剂。然而,不同种类动物所获得的结果是难以比较的。同时,这样的概念也还需要在单一种属实验动物中作进一步的观察。

(Oshita AK等: Blood 49(4): 58 ~591, 1977(英文)鞠桂芝译 刘及校)

## 体外放射诊断法

1988年发展了体外诊断法,1970年开始形成核医学的独立部份,并出现了成套试剂的工业品。1970年国际原子能委员会在维也纳举行了首次体外放射诊断方法专门的讨论会,到1973年已研制出检查激素、维生素、药物、代谢的活性物质、酶和免疫球蛋白、各种特异性变态反应元等100多种方法(1973年伊斯坦布尔(Станбул)国际原子能委员会资料)。国外许多实验室放射性同位素体外诊断法检查约为总工作量的60%。

除了测定方法专一灵敏度等于 $10^{-9}$ ~ $10^{-12}$ 克/毫升而外,应用体外放射诊断法的优点还在于它能使检查广泛的自动化。

体外放射诊断法是包括各种放射生化方法和放射免疫的方法的总称,依其使用反应原理分为两类:放射性竞争分析(PKA)和放射性试剂分析(PPA)。PKA是利用体内被测物质与其标记类似物之间在形成复合物时与结合成份的竞争作用。根据结合成份

的性质又可分为两种分析:蛋白性竞争分析(BKA),其结合成份为生理性蛋白(如皮质素传递蛋白或甲状腺素结合球蛋白)和放射免疫分析(PIA),其结合成份为被测物的抗体。BKA在1960年首先由Ekins用于测定血浆内甲状腺素,而PIA在1960年由Jolow和Bersor建议用来测定胰岛素。

1957年Hamolsky等应用PPA测定甲状腺素结合球蛋白能力,是根据标记物饱和和测定物质的原理。在某些情况下标记剂是被检物的抗体,与放射免疫样品不同,这种测定也属于放射免疫分析的范畴。

对临床有意义的生物活性物质测定,若用生化检查或者根本不能测定或者测定起来方法非常繁杂和费时,以致实际上不能应用于临床诊断。如以前曾用的常规检查方法,不可能客观地判定妊娠过程中胎儿胎盘系统的状态,而用放射免疫方法测定胎盘催乳激素则可评价胎盘的功能和测出妊娠过程