

基质成纤维样祖细胞(CFU-f)^{*} 在造血放射损伤修复中的作用

白求恩医科大学放射医学专业

于洪臣综述 刘 及 朱壬葆^{••} 审

目前,急性放射病尚无理想的治疗措施。已知造血组织的再生是本病恢复的关键。为了促进造血再生,许多学者从移植骨髓干细胞着手进行了一系列的研究,并取得了一定的进展。但人们已发现,放射损伤时,若无造血基质的迅速恢复,则骨髓移植的疗效亦难显现。因在大剂量照射后,由于基质成分的损伤,造血微环境遭受破坏,造血组织便不能再生^[1~6]。因此,造血的最终恢复,基质微环境起着重要作用。基质成纤维样祖细胞(CFU-f)是造血基质的再生源泉和重要成分,故研究CFU-f的性质、形态、功能及其对放射损伤造血修复的作用,已成为当前一个重要的研究课题^[7]。

CFU-f是造血组织(骨髓、脾、胸腺及淋巴结)中能长期自身维持并构成和发展为基质细胞(体外培养时主要是成纤维样细胞)的原始阶段细胞。由于研究方法和着眼点之不同,名称尚不统一,如成纤维样细胞、基质成灶单位、造血基质干细胞以及微环境支持细胞等。目前已初步了解,该细胞的后代有分泌激素^[8]和支持与调节造血细胞增殖与分化^[4,9,10]的功能,是主要的微环境成分。但对该细胞的功能细节、来源、与其他基质成分的关系,以及它在造血损伤和修复中的作用,均尚了解不多。本文仅就CFU-f的研究进展和与放射损伤修复有关的问题简要综述如下:

一、CFU-f的研究概况

从Чайлахян和Фриденштейн1970年在体外单层培养体系中成功地豚鼠骨髓和脾细

胞悬液培养出成纤维样细胞灶以来^[11],他们一直进行这方面的研究。其中包括各造血器官的成纤维样细胞灶的组成、成灶条件、放射敏感性等^[12~14]。他们还进行了CFU-f的转移、体外传代及再植等方面的实验观察^[13,15]。1971年Amsel等用股骨皮下移植观察造血基质法研究了骨髓的再生^[16];Chamberlin(1974)依此法测定并比较了放射损伤时造血基质和造血干细胞的再生速度和规律^[17]。1972年Chan等研究了骨髓中造血刺激素产生细胞的局部生成特点和作用^[18];Wilson等(1974)用体外培养法研究了成纤维样细胞与CFU-f的关系^[9];Knospe^[19](1976)和Greenberg等^[19](1978)也相继观察了正常和异常状态下骨髓基质细胞或贴壁细胞所生成刺激素的作用特点和变化规律。Fried等(1977)专门研究了辐射对造血基质和干细胞的效应^[20]。1977年Werts等深入探索了基质细胞活力与造血再生的关系^[21]。Dexter等也观察到骨髓贴壁细胞是维持长期培养造血细胞的必要条件^[22]。1976年Weiss对造血基质的亚微结构进行了系统的观察和描述^[23]。1980年Chertkov等^[24]用肾被膜下移植法进一步研究了骨髓基质细胞对造血干细胞的调节作用。以上情况表明,70年代以来,CFU-f已引起人们的重视和兴趣。尽管这一课题的研究开始较晚,但进展很快,仅短短十余年,就已发展为当前实验血液学的重要组成部分。

二、CFU-f的性质、形态与功能

构成骨髓的基质细胞有:成纤维样细胞、血管外膜细胞、网状细胞、巨噬细胞、内皮细

^{*} Colony-Forming Unit-fibroblastoid

^{••} 中国军事医学科学院

胞、脂肪细胞及成骨细胞等。这些基质细胞的来源虽尚未确知,但已证实这些细胞在造血机能上是有密切协同作用的。现就 CFU-f 的性质、功能及与此有关的形态结构概述如下:

1. 性质、功能及形态结构

CFU-f 不属于造血干细胞及造血细胞,在放射性嵌合体的骨髓和脾脏中,基质细胞是属于受体性的,而造血和淋巴细胞则被供体细胞所替代;在异位(异体)移植中,基质细胞保持供体特征,而实质细胞则为受体性的。基质成纤维样细胞是形成造血器官特殊微环境的细胞。实际上,早在1928年 Maximow 就已将血细胞在体外培养成纤维样细胞⁽²⁶⁾。

正常时,CFU-f 的活性不为体内注入³H-TdR所杀死,表明这些细胞在体内并不增殖。体外移植24小时后,可增殖形成成纤维样细胞灶。培养6~12天,可有 $39 \pm 4\%$ 的成纤维样细胞为³H-TdR杀死。CFU-f体外培养40~60小时便可进入S期⁽²⁶⁾。

Фриденштейн等在体外单层培养中见CFU-f可形成在显微镜下或肉眼可见的成纤维样细胞灶^(11~14)。豚鼠骨髓和脾细胞在培养的头几天,瓶壁上便出现逐渐变性的造血细胞,白细胞和有突起的组织细胞,3~10天出现较大的成纤维样细胞。该细胞核为卵圆形,胞浆淡染,内有张力原纤维(tonofibrils)。10天后便形成疏松的成纤维样细胞灶。此灶是由一定数量的CFU-f增殖后形成的。

小鼠脾细胞在单层培养3~5天后,主要见不整形的组织细胞及巨噬细胞,7天出现灶状的成纤维样细胞,10天时灶发展变大,每灶可含数十至数百个细胞。其中心部为少量小细胞,周围是多量中等大的成纤维样细胞,再外层为少量大型细胞。培养2周仍有较多组织细胞,这是小鼠骨髓和脾细胞培养的特点。胸腺培养时则只出现少量上皮细胞而不见组织细胞。

基质成纤维样祖细胞的具体形态,目前还未见描述。这里只简要介绍仅有的少数有关各基质细胞的形态资料。电镜下观察时,见大鼠

骨髓中有支持造血的成纤维样细胞性基质和血窦。基质细胞主要有网状细胞及其伸向附近造血间隙中的分支两部分。造血细胞即存在于网状细胞分支所形成的网眼中。脂肪细胞出现于血窦的外膜处,一般推测它可能是一种沉积脂肪的网状细胞⁽²⁸⁾。

Weiss认为,造血基质细胞有两种:一是血管外膜网状细胞,一是具有吞噬能力的巨噬细胞。后者有多量溶酶体。静止型网状细胞胞浆中有糙质内网和微丝结构,虽也有少量溶酶体,但吞噬功能较弱。一般认为,这可能就是成纤维样细胞。血管外膜网状细胞的核区对血窦有亲合性,其突起复盖血窦,必要时可开放以调节血流和释放新成熟的血细胞。该细胞胞浆突可伸入造血细胞群中。巨噬细胞分布于骨髓各部,最多见于幼红细胞岛中央和窦周围。无论幼红或幼粒细胞群均有巨噬细胞胞浆突伸入,有的尚可长入细胞质内。基质细胞的长胞浆突形成的网眼可为发育中的细胞创造暂时性稳定条件,但不影响以后这些细胞的迁移。Sl/Sl^d小鼠之所以贫血,就是因为造血细胞岛中央巨噬细胞发育不良,胞浆突分支少,从而不能形成网眼,难以保证干细胞造血所致。这与Tavassoli等用实验性溶血法所得实验结果是一致的⁽²⁷⁾。

巨噬细胞有分泌与吞噬功能,并可构成分子调节谱,以调节造血平衡。位于造血岛中央的巨噬细胞则有供铁、饮液与传递分子的作用⁽²⁸⁾。其大小胞浆粒可能与造血活性物质的产生、利用和分布有密切关系。亚微结构上既无上皮样细胞的特殊粘附物、基底膜和张力原纤维,又无成纤维细胞的胶原结构⁽²⁹⁾。La Pushin在电镜下见红灶的基质细胞呈梭形、星形和网状形。

上述资料表明,CFU-f的具体形态尚未确知。正常时CFU-f在体内并不增殖,体外培养时可形成成纤维样细胞灶。基质中网状细胞和巨噬细胞对造血细胞的成熟、释放和成长起重要作用,但各型网状细胞与各类基质细胞间的关系,尚待进一步研究。

2. 成灶率和传代培养

将造血组织细胞进行 CFU-f 培养时, 则可形成成纤维样细胞灶。如植入的细胞不少于每平方米 10^5 个时, 则成灶数与植入细胞数呈线性关系。成灶率反映着植入细胞中的 CFU-f 数^(12, 14)。成人骨髓细胞成灶率为 $0.5 \sim 4 \times 10^{-5}$ 细胞⁽¹³⁾。小鼠成灶率为: 骨髓 2.2×10^{-5} , 脾 0.2×10^{-5} , 胸腺 0.16×10^{-5} 。豚鼠则为: 骨髓 $0.5 \sim 5 \times 10^{-5}$, 胸腺 $1 \sim 2 \times 10^{-5}$, 脾 0.5×10^{-5} , 淋巴结 0.05×10^{-5} 。

人骨髓成纤维样细胞灶用胰蛋白酶短时间消化、解离、再接种于液体培养基后, 可很快生长形成单层。经 6 代后其生长活力也不改变。传代培养可形成长的成纤维样细胞, 核圆形, 胞浆淡染, 核型分析具有二倍体型染色体⁽¹³⁾。

由造血和淋巴组织培养 12~16 天的成纤维样细胞, 在体外传代移植后 5~8 天, 可形成成纤维样细胞层。豚鼠、家兔和人的骨髓培养物可有效地持续到 15 代。从第二代开始便具有典型的成纤维细胞形态⁽¹⁶⁾。

各种动物各造血组织中 CFU-f 含量不同, 因而其成灶率各异。

3. CFU-f 的迁徙和转移造血微环境的功能

迄今, 人们一直认为, CFU-f 是不能通过血循环转移至机体其他部位进行增殖的^(19, 21, 22, 31)。支持这一观点的主要实验有: 皮下移植股骨后对新生造血组织进行核型分析, 见造血干细胞来自受体, 而造血基质则来自供体; 单肢或局部大剂量照射后, 常造成受照部基质的永久性损伤而不能恢复造血等。但是, 最近提出^(32~34), CFU-f 和造血干细胞一样, 也可迁移至机体的各部。其主要依据是: 小鼠 1000 拉德局部照射后, 受照部可先获得基质再生而后恢复造血; 而全身 1000 拉德照射的对照组因缺乏基质祖细胞的来源, 故不能再生恢复。至于超大剂量局部照射后, 也见不到基质祖细胞迁徙的原因, 是由于骨髓微循环发生了炎症阻塞所致。此外, 外周血的血浆层中可

检出 CFU-f 也是确定该细胞可在血中循环的重要依据^(6, 36)。看来 CFU-f 通过血流迁移至身体各部的造血组织建立微环境问题, 似乎可以确定, 但其迁徙的机理和细节尚须进一步研究。

家兔骨髓和脾细胞经 4~8 代体外基层培养后, 将生成的成纤维样细胞移植到肾被膜下, 便可形成造血组织片断。其中植入由骨髓培养的成纤维样细胞者, 形成骨和骨髓组织; 植入由脾培养者则形成混有网状细胞的淋巴细胞集合体。这种由造血基质移植而能在异位生成新造血微环境的过程称为造血微环境的转移 (Transferring Haemopoietic Inductive Microenvironment—THIM)。应当注意, 这种功能并非由 CFU-f 所完成, 而是由 CFU-f 分化、增生的后代即基质细胞实现的⁽¹⁶⁾。其转移 HIM 的方式和细节尚不清楚, 但基质细胞的这种机能的发现和阐明, 将对实验血液学和造血系统疾病的防治有重要意义。

三、CFU-f 的放射损伤和修复

检查 150 拉德照射后小鼠每只股骨的 CFU-f 含量, 发现照后即降至正常的 58%, 以后数天继续下降, 6~8 天最低 (降至 9%), 然后回升, 25 天接近正常。有趣的是, 照后 3 分至 6 小时 CFU-f 先增高近 2 倍, 24 小时未降至照后即刻水平⁽¹⁴⁾。

小鼠和豚鼠 CFU-f 的 D_{50} 值分别为 178 和 216 拉德。局部照射 2000 拉德后 3 周未见 CFU-f 出现⁽⁴⁾。

150 拉德照射小鼠后 5~20 天进行脾细胞体外培养可见 CFU-f 成灶力较正常增高 3~6 倍, 而 300 拉德照后 12 天培养则与未照者一样; 600 拉德照射则成灶力明显降低; 825 拉德照后既不成灶也无组织细胞和巨噬细胞生长⁽¹²⁾。

CFU-f 放射敏感性是根据受照后细胞悬液成灶率抑制程度而测定的。然后成灶率改变是由于 CFU-f 损伤及死亡所致^(14, 15)。由此可见, 虽然 CFU-f 的放射敏感性较造血干细胞低, 但稍大剂量照射便可引起同样严重的放射损伤。

四、造血系统疾病及药物作用时 CFU-f的变化

Тарубарова^[86]给豚鼠腹腔内注射长春新碱引起急性再障,然后测定股骨髓有核细胞数、CFU-f数及其在每股骨中的含量。作者发现,形成再障后,在骨髓有核细胞数下降的同时,尚见有CFU-f浓度及每股骨CFU-f总量的下降。因而认为,再障时的骨髓反应可能是骨髓造血细胞和基质成分相互作用的结果。

急性粒细胞性白血病急性期,骨髓CFU-f增多,经治疗进入缓解期则减少。这表明,促进CFU-f成灶的因素可以活跃造血。^[7]。从而进一步说明,骨髓的增生性病变也可能是造血细胞与造血基质相互作用下发生的。

某些药物如环磷酰胺和马利兰均可引起造血基质的损伤^[20]。前者可明显损伤造血基质,虽经6周也未恢复;后者则损伤基质较轻。此外,消炎痛(indomethacin)可抑制体外培养条件下造血基质分泌前列腺素E,但可通过造血基质促进红细胞灶的形成^[88]。

从上可见,CFU-f不仅在造血系统疾病时可表现出明显的反应,而且对药物的反应也很敏锐。这均表明,造血基质在这些疾病的发病中或对药物的反应中,是起有重要作用的。

五、CFU-f的放射生物学意义

CFU-f的D₀值大于造血干细胞,在一定照射剂量范围内可以很快修复,CFU-f的后代可分泌造血刺激素及支持造血细胞增殖和分化等作用,对造血放射损伤的修复与放射病的防治具有重要意义。CFU-f的放射损伤修复及其对造血器官和机体恢复的影响,是器官机能恢复的物质基础。例如,在800拉德照射后6天并未出现造血机能的恢复,只在照后10天出现CFU-f之后,才逐渐恢复造血。最近研究发现^[37],造血基质成分中,基质细胞和微循环的重建与再生是造血恢复的关键与先决条件。因此,深入阐明CFU-f的增殖、损伤、修复及其对造血机能的影响,不仅对造血机能恢复

和放射病的治疗,而且对放射生物学的发展都具有重要的意义。

六、研究展望

正如上述,CFU-f的研究,尽管只有短短的十余年,但已取得了迅速的进展。在阐明血液、造血损伤和疾病的发病机理中起着重要作用的CFU-f的研究,预计将在今后获得更加长足的进展。其中尤以CFU-f本身的来源、演化、各阶段的形态与功能、与造血细胞及其他基质细胞的关系等课题,也将得到广泛的研究与逐渐阐明。这不仅可为研究造血损伤和放射病的发病机理提供资料,而且还可对防治造血、血液系统疾病提供理论依据。目前,对造血的旧概念已作了新的修正和发展^[7],随着这一领域及有关方面的深入研究,重度造血型放射病及造血系统疾病这些难关的攻破,也必将大大加快进程。

七、结 语

本文对CFU-f的研究进展情况,从放射生物学角度进行了综述。重点介绍了CFU-f的性质、形态结构及功能、放射损伤与修复,从中强调了造血基质对造血实质细胞的影响和调节作用。指出了造血基质的研究时间虽短,但发展很快,已成为实验血液学的重要组成部分,并将在防治造血放射损伤的研究中发挥日益重要的作用。

参 考 文 献

1. Knospe WH et al, Blood 31, 400, 1968.
2. Maloney MA and Patt HM, Rad Res 50, 284, 1976.
3. De Cowin RL et al, Arch Inter Med 134, 297, 1974.
4. Лациняк НВ и др, Радиобиол 848, 1979.
5. Турдыев АА и др, Радиовиол 907, 1979.
6. Стрелин ГС и др, Радиобиол 556, 1975.
7. 刘及、范洪学,《国外医学》放射医学分册(3), 17, 1978.
8. Chan SH et al, Blood 40, 646, 1972.
9. Wilson FD et al, Exp Hematol 2, 343, 1974.
10. Wolf NS, J Exp Med 127, 205, 1968.

11. Чайлахян РК и др, БЭБМ (2), 94, 1970.
12. Фриденштейн АЯ и др, БЭБМ (1):74, 1971.
13. Панасюк АФ и др: П Г П К (8):34, 1972.
14. Горекая ЮФ и др, БЭБМ (5):614, 1976.
15. Фриденштейн АЯ и др, П Г П К (10):14, 1973.
16. Amsel S and Dell E: Proc Soc Exp Biol Med 138:550, 1971.
17. Chamberlin W et al, Blood 44:385, 1974.
18. Knospe WH et al, Exp Hematol 4, 125, 1976.
19. Greenberg PL et al, Blood 52: 362, 1978.
20. Fried W et al, Cancer Res 37, 1205, 1977.
21. Werts ED et al, Rad Res 71, 214, 1977.
22. Dexter TM et al, Cell Physiol 91:335, 1976.
23. Weiss L, Anat Rec 186:161, 1976.
24. Chertkov JL et al, Exp Hematol 8(6), 770, 1980.
25. 转引 Мошкин СА и др: П Г П К (5), 39, 1976.
26. Епихина СЮ и др: БЭБМ (1), 55, 1976.
27. Tavassoli M et al, Brit J Hematol 23: 707, 1972.
28. Shaklai M and Tavassoli M: J Ultrast Res 69:343, 1979.
29. Daniels E, Exp Hematol 8(2), 157, 1980.
30. La Pushin RW and Trentin JJ, Exp Hematol 5:505, 1977.
31. Чертков ИЛ и др: П Г П К (2):32, 1979.
32. Werts ED et al: Rad Res 81, 20, 1980.
33. Werts ED et al: J Lab Clin Med 93: 995, 1979.
34. Werts ED et al, Exp Hematol 8(4), 226, 1980.
35. Панасюк АФ: БЭБМ (11), 96, 1970.
36. Тарубарова НА, БЭБМ (2):211, 1977.
37. 刘及等, 第一届中国辐射研究与辐射工艺学会学术论文摘要集, 九, 上海, 1981.
38. De Cowin RL et al, Exp Hematol 8(7, suppl), 80, 1980.

骨髓造血微环境及其放射敏感性

乌鲁木齐军区后勤部军事医学研究所 许廷贵 综述 白求恩医科大学 刘及 审

近年来,对造血干细胞据以增殖和分化的造血微环境研究已引起广泛重视,它不仅是临床血液学工作者而且也是放射生物学者所关注的新课题。目前的研究虽不能全面阐明骨髓造血微环境,但已取得了不少进展。本文仅就近年的文献简要综述如下。

一、各种造血微环境的特异性

广义而言,生物体内各个器官都有其特异微环境,就造血系统来说,就更典型而复杂。尽管目前的电镜技术尚未能全面揭示其超微结构,但其客观存在已为各国学者公认。骨髓、胸腺、腔上囊、脾和淋巴结等均各有其特异微环境,即或同一造血器官中,不同部位生成的

血细胞各异⁽¹⁾。小鼠胸腺中以T细胞为主(占97%)。成年鼠胸腺皮层中主含淋巴细胞,而髓质中则很少^(2~3)。人胸腺皮层中78%为“诱导”或“辅助”型T细胞⁽⁴⁾。鸟类的腔上囊上皮层诱导干细胞分化成免疫球蛋白分泌细胞。哺乳动物无腔上囊,有人提出其消化道的某些淋巴组织如阑尾、扁桃体及淋巴结等是腔上囊的等同组织^(3~4)。McCuskey等^(5~6)曾研究过脾的微环境,当给小鼠注红细胞生成素后,脾红髓中红细胞生成增加。在脾脏中,粒细胞生成集中于脾包膜下和沿脾小梁包膜下的末端处,而红细胞生成则遍布红髓⁽⁸⁾。Kotzin等把瘤细胞静脉注给小鼠,注入