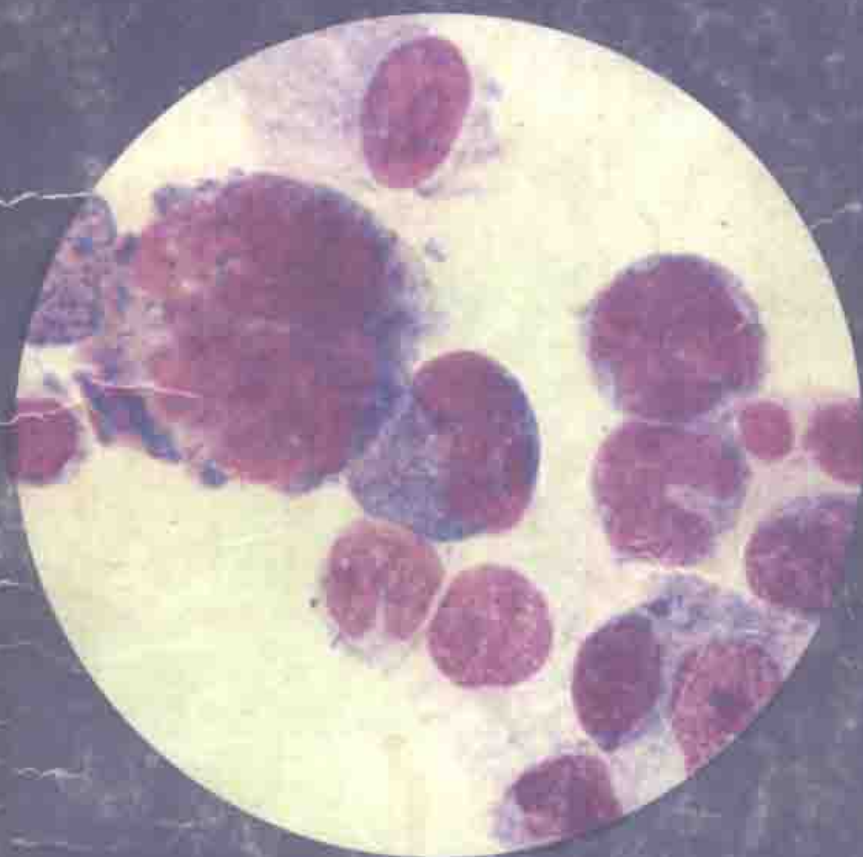


造血细胞培养技术

唐佩弦 杨天楹 主编



陕西科学技术出版社

造血细胞培养技术

唐佩弦
杨天楹 主编

陕西科学技术出版社

造血细胞培养技术

唐佩弦 杨天骢 主编

陕西科学技术出版社出版

(西安北大街 131 号)

陕西省新华书店发行 西安新华印刷厂印刷

787×1092 毫米 32 开本 7.5 印张 156 千字

1985 年 10 月第 1 版 1985 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1—10,000

统一书号: 14202·149 定价: 1.60 元

序

中国病理生理学会全国造血协作组于1984年10月在江西南昌市举行了全国造血细胞培养技术经验交流会议，各地的同行和专家们交流了造血研究的新技术、新方法，并积累了大量技术资料。为了满足广大从事血液学专业的医务、科研、教学人员、研究生和医学学生学习的需要，在协作组成员的共同努力下，本书终于由陕西科学技术出版社出版了。

近年来，造血生理及病理学的研究，在国内正从形态学转入细胞功能的研究。而国外近十余年造血生理及某些血液病发病原理的探索已经达到分子生物学的新水平。为了促进我国临床及实验血液学的发展，必须大力推广普及造血细胞研究的新技术，并且促使技术、方法的标准化和规范化。这正是本书出版的目的。

本书能及时与广大读者见面，是由于作者们及陕西省人民医院等有关方面的努力和热情支持。我谨代表中国病理生理学会总会对本书出版作出贡献的所有同志们深志谢忱。

刘 永

1985年5月20日

编写人员

军事医学科学院基础医学研究所

唐佩弦 江飞子 徐元基 谭子兴

(第一章、第十章、附一章、附二章)

沈阳中国医科大学第一附属医院

单书春

(第二章、第三章)

武汉医学院第一附属医院

李崇渔 陈 燕

(第四章)

哈尔滨医科大学第二附属医院

王 晨 齐笑庸 马 军 吴占河 王均衡

(第四章附、第五章)

中国医学科学院血液学研究所

姜学英

(第五章附、第六章)

江西省医学科学研究所

戴育成

(第七章)

陕西省人民医院

李梅生

(第八章、第九章)

前 言

血液病与一般内科疾病不同，它的诊断几乎全靠实验室检查，而病史、主诉、体征等只能作参考。即使病人没有明显的症状和体征，仅凭实验室检查的异常发现也可确诊血液病。因此，一个医院的血液病诊治水平取决于它的血液学实验室的工作水平。各种造血异常疾病如果诊断技术仅仅是血相和骨髓相分析，是很不够的，还要靠各种新的实验技术。一个现代化血液病实验室应该具备精湛的细胞培养、细胞生化、细胞免疫和细胞遗传学等新技术。开展这些新技术固然需要增添一些必要的设备，然而，也有不少单位因陋就简地建立了新的技术方法。一个实验室的工作质量决定于操作技术与实验材料的标准化、规范化。这是本书的出版目的。

为此，我们总结了自己在实验血液学方面的一些经验，汇编成册，希望能促进造血细胞研究新技术在国内推广、普及并促进临床血液学的发展。

编 著 者

1985年2月10日

目 录

序

前言

第一章 造血细胞	(1)
第一节 造血干细胞.....	(1)
第二节 粒系祖细胞.....	(22)
第三节 红系祖细胞.....	(35)
第四节 巨核系祖细胞.....	(43)
第二章 造血细胞培养设备与器材	(50)
第一节 造血细胞培养室.....	(50)
第二节 培养造血细胞常用器材.....	(58)
第三章 粒单系集落刺激因子 (GM-CSF)	(70)
第一节 概说.....	(70)
第二节 集落形成条件.....	(71)
第三节 造血细胞分化诱导因子.....	(74)
第四节 粒系祖细胞与集落刺激因子.....	(75)
第五节 粒单系集落刺激因子的制作及分离.....	(79)
第六节 GM-CSF活性测定法.....	(88)
第四章 粒单系祖细胞	(93)
第一节 CFU-GM和CSF的性质.....	(94)
第二节 实验材料的制备.....	(97)
第三节 培养方法.....	(103)

第四节	计数和正常值·····	(105)
第五节	染色方法·····	(106)
第六节	实验室和临床应用·····	(107)
〔附〕	粒单系祖细胞体内扩散盒培养法·····	(115)
第五章	红系祖细胞·····	(119)
第一节	红系造血与红系祖细胞·····	(119)
第二节	红系造血因子与抑制因素·····	(123)
第三节	红系祖细胞体外培养技术·····	(127)
第四节	红系祖细胞培养的临床应用·····	(136)
〔附〕	红系祖细胞体内扩散盒培养技术·····	(140)
第六章	骨髓成纤维祖细胞·····	(147)
第一节	骨髓成纤维祖细胞的研究概况·····	(147)
第二节	培养技术·····	(151)
第三节	集落性质鉴定·····	(156)
第四节	注意事项·····	(157)
第五节	临床应用·····	(158)
第七章	淋巴系祖细胞·····	(161)
第一节	概述·····	(161)
第二节	T淋巴祖细胞及其测定技术·····	(162)
第三节	B淋巴祖细胞及其测定技术·····	(170)
第八章	巨核系祖细胞·····	(177)
第一节	概述·····	(177)
第二节	试剂与方法·····	(178)
第三节	计数与观察·····	(181)
第四节	临床应用·····	(184)
第九章	多向祖细胞·····	(186)

第一节	概述	(186)
第二节	试剂的制备	(187)
第三节	培养体系	(188)
第四节	培养方法	(189)
第五节	观察与计数	(189)
第六节	克隆性生长的鉴定	(191)
第七节	集落产率及混合集落的细胞成份	(193)
第八节	临床应用	(194)
第十章	多向干细胞	(196)
第一节	外源性 CFU-S 测定方法	(196)
第二节	造血干细胞自我更新的测定	(200)
第三节	内源性 CFU-S 测定法	(202)
第四节	CFU-S 分化的观察方法	(203)
〔附一章〕	小鼠 CFU-GM 测定法	(206)
〔附二章〕	小鼠 BEU-E 测定法	(214)
附 录	缩写词注释	(226)

第一章 造血细胞

第一节 造血干细胞

1978年在法国Villejuif召开了一次专题讨论会，美、加、澳、英、法、荷等国11位当代著名的实验血液学家讨论了造血干细胞研究中的一些概念、定义和命名。后由Lajtha, Cronkite等按讨论结果写了几个报告，发表于Blood Cell (1979) 第5卷中。从那时以来已多年，这方面的工作（尤其是造血祖细胞的工作）进展十分快，对造血干、祖细胞有了崭新的认识，所以七十年代的旧概念和定义应作必要的、较大的修正及补充。

图1—1突出了干细胞池及祖细胞池。这与六十至七十年代教科书中描述的干、增殖、成熟储存、边、循环等五个池相比，主要是增加了祖细胞池。图中干细胞池用方形图，表示干细胞靠自我更新来维持池的大小（即细胞数量不变），而祖细胞池及形态学可辨认的前体细胞池在分化成熟的过程中又同时进行增殖而使细胞数量大大增加（放大）。一个造血干细胞经过10次分裂后细胞量为 2^{10} ，即1024个。如在分化成熟过程中发生12次分裂，则一个干细胞可变为4096个终末细胞。所以下图把祖细胞到终末细胞画成一个逐渐放大的三角形。

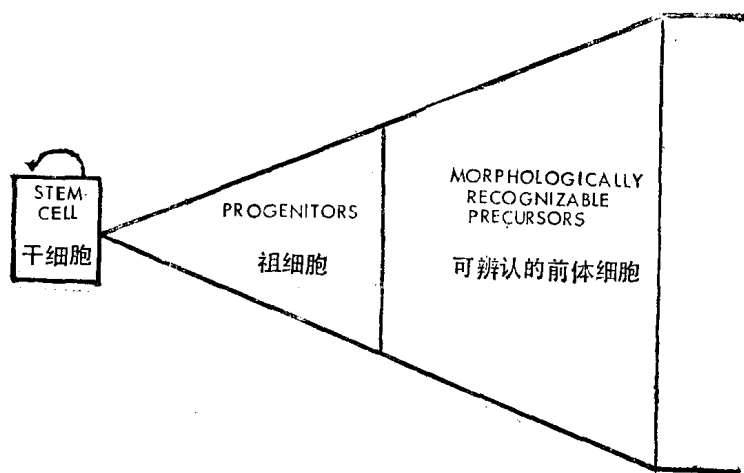


图 1—1 造血细胞各阶段序列

造血干细胞的增殖有两种不同的结果：一种，经过有丝分裂后，正常稳定状态下大约半数的子细胞仍保持干细胞的全部特征，这称为自我更新，自我更新使干细胞池的大小维持不变，故又称自我维持。另一种，干细胞在有丝分裂过程中，可能由于基因发生重排或易位（genetic reprogramming）使细胞特征发生改变走上了逐步分化的途径，也是一个细胞数量逐步放大的途径。

经过自我更新使干细胞本身能保持生存并维持原有的数量；走上了逐步分化的道路则使细胞数量逐步增大，这些细胞逐步分化成熟，经由祖细胞到形态可辨认的前体细胞，成熟后为功能细胞，又称为终末细胞。终末细胞的寿命短暂，不久死亡。故自我更新标志着细胞的生存能维持下去，而分化却意味着细胞逐渐走向死亡。

一、造血干细胞的概念

造血干细胞定义：

造血干细胞具有高度自我更新能力，并有进一步分化为各系祖细胞的潜能。所谓“高度自我更新能力”是指这种能力可一直保持到正常健康机体生命的终了，也是一切干细胞必有的特征。“进一步分化为各系祖细胞”则是造血干细胞区别于其他干细胞的特征。过去有不少作者误称造血干细胞为“未分化细胞”。造血干细胞是从卵黄囊全能间叶细胞分化而成，实际上它已有了一定程度的分化。它将进一步向各系造血祖细胞分化。所以造血干细胞应是一种低分化的细胞，而不是未分化细胞。

上述造血干细胞的定义基于细胞的功能，而没有任何形态学的条件和特征。六十至七十年代国内外曾有一些实验室致力于寻找或搜索造血干细胞，企图发现干细胞的形态特征，均未成功。McCulloch说这种探索是“白费时间”。因为：①当一个细胞被证实为造血干细胞时，它已经变为一团成熟中的细胞；②在形态上无法判断细胞有无自我更新与进一步分化的潜力。犹如用生化、电镜等方法不可能判断分子的生物活性一样。造血祖细胞 (Progenitor Cells) 介于造血干细胞与形态学可辨认的前体细胞 (Precursor cells)之间的由多向分化到单向分化过渡阶段，它也没有任何形态学的条件和特征。因此，在目前的条件下去进行造血干、祖细胞的形态探索是徒劳的。

1978年法国 Villejuif会议上还认为祖细胞是已经定向而且没有自我维持能力的细胞，因为那时人们只发现CFC-

GM及CFU-E不能再植。近五年来祖细胞研究的发展使人们了解早期的造血祖细胞也是多向的，称为多向祖细胞（multipotential progenitor），并且也还具有一定的自我更新能力，只不过自我更新力较弱而已。所以早期的多向的祖细胞（如CFU-GEMm）与CFU-S的界限有时不易弄清，但干细胞与少向、单向祖细胞之间有明确的界限，主要是前者有高度自我更新、自我维持力，因而在体内有长期重建造血组织的潜能；后者自我更新力很弱或没有。在六十至七十年代教科书中的“定向干细胞”一词已被当今学者所摒弃。唯少数学者如Ogawa (1983) 仍称多向性祖细胞为“多能定向干细胞”，这个提法欠妥，只能造成概念上的混乱，曾引起学术界的异议。

二、造血干细胞的自我更新

如前所述，干细胞经过无数次有丝分裂后，基本上仍然保持亲代细胞原有特性，即自我复制。这种自我更新能力维持于正常机体的全部生命时间。正常幼年与老年鼠骨髓中测得的CFU-S数是一样的。干细胞数量能维持不变（自我维持）即由于干细胞有自我更新能力。

在许多次不断的有丝分裂后，干细胞自我更新能力会有所减弱。在正常稳定的情况下，自我更新力的这种减弱是有一定限度的，并且仅仅在应激情况下才表现出来，并不影响在正常稳定情况下继续维持干细胞池的大小。

造血干细胞的自我更新机率（P）在正常稳定情况下必须为0.5才能维持干细胞池的大小。即干细胞分裂增殖后的子细胞只有一半保持干细胞的特性（自我更新），而另一半

进行分化而离开了干细胞池。干细胞自我更新与分化二者若失去平衡就会导致病理性造血。

用二次移植法所测得的自我更新率往往大于0.5。如Lajtha测P为0.63, Schofield报告P为0.68。这是因为在用移植方法作脾结节的实验中,被输注的CFC-S处于应激状态中,比正常稳定情况下体内的干细胞的自我更新率高,它反映了造血干细胞自我更新的潜力。

但值得注意的是,近年来的研究证明:在适当的条件刺激因子作用下,如WEHI-3粒-单系白血病细胞的条件培养液(CM),或在长期培养体系中,正常粒系祖细胞(CFC-G)也可能在体外较长期地维持,产生非白血病的正常的二倍体细胞。Dexter(1980)称之为“不灭亡的细胞”(immortalized cells)。但一旦条件刺激因子缺乏活力,祖细胞在2~3天即消亡,因而它们又称为“因子依赖性细胞”。

此外,NK细胞、T细胞及嗜硷细胞等在体外适当的条件刺激作用下,都可以建立持续生长的细胞克隆。这些表明祖细胞在特定条件下也有自我更新力。甚至有人报告,小鼠粒系或淋巴系祖细胞可以在照射致死量的小鼠体内一时重建该细胞系的造血。尽管这种重建不能长期维持,却表明祖细胞也有一定程度自我更新的能力。

观测自我更新的方法有:①小鼠脾结节再植法;②在体内能否重建造血组织(造血干细胞可重建永久性造血,而祖细胞只能重建非永久性造血);③在体外培养中的长期维持。

三、造血干细胞的多向分化

为了证明造血干细胞多向分化的特性，必须证实用移植法在小鼠脾内所形成的每个细胞集落是否源自一个细胞。在体外培养祖细胞所产生的细胞集落，有时也要证明集落的细胞群体是否由一个细胞增殖分化而形成，即细胞群体的克隆性 (clonality)。这些方法又称为克隆源性试验 (Clonogenicity test)，有以下几种：①染色体标志法 (T_0T_0 ，性染色体，辐射畸变， Ph_1 等)；②显微操纵单细胞培养 (micromanipulation)；③ G_0PD 同功酶法。

骨髓红、粒及巨核系细胞源自造血干细胞，在小鼠脾结节生成的实验中已经证实。但脾结节法不能形成淋巴细胞集落。淋巴系与上述骨髓系细胞是否共源，尚未完全澄清，但近年来已有大量支持共源观点的资料。例如 Martin (1980) 在慢性粒细胞性白血病人中发现 B 淋巴细胞与其他骨髓系细胞有共同的 Ph_1 染色体。Moore (1979) 在 19 例 $Ph_1(+)$ 慢性粒细胞性白血病急性发作的病人中发现带有淋巴系表型的细胞，形态象急性淋巴白血病。他又在其他 3 例慢粒白血病急性发作的病人中发现前 B 细胞 (Pre-B) 表型的白血病细胞；Prohal (1978) 从铁粒幼细胞性贫血病人中发现 T、B 细胞与骨髓系造血细胞及巨噬细胞都含有共同的 G_0PD 同功酶；又有人在 CML 急性发作中发现一向被认为清一色的“原粒细胞”中却有一部分是 B 淋巴细胞；在另 3 例 CML 病人中证实骨髓系细胞与 B 淋巴细胞及非 T 非 B 细胞都含共同的 G_0PD 同功酶。这方面的动物实验材料更多，经移植骨髓或胎肝的受照射小鼠，其重建的骨髓系及淋巴系细胞有相同的染色体标

志。加拿大Messner (1981) 和日本Hara (1983) 在人、小鼠中分别发现CFU-GEMm多向祖细胞也含有T或B淋巴细胞, 更有力地支持髓系与淋巴系同源学说。上述一些作者设想淋巴系与骨髓系造血细胞来自一种比CFU-S更早的“全能”干细胞。或称“淋巴骨髓-造血干细胞”(Lymphomyeloid hemopoietic stem cell)。但淋巴细胞各亚群是否有共同的祖细胞(如Pre-TB细胞), 尚未充分弄清。

造血干细胞(CFU-S)还能产生某些非造血细胞。Ash (1980), Marks (1981) 分别证明破骨细胞源自CFU-S。Testa (1981) 又见到CFC-GM可变成破骨细胞。Katz (1979) 证明表皮生发层星状细胞(Langerhans cell)也源自CFU-S。他在移植骨髓重建造血的宿主中证明80%表皮的Langerhans细胞带有供体的标志。再例如日本大阪市Kitamura (1977~1981) 发表一系列文章报告用bgj/bgj(血液中性细胞中含粗大颗粒的小鼠)的骨髓CFU-S给w/w⁺贫血小鼠移植, 证明肥大细胞与粒系细胞同源, 都来自供体的CFU-S。

以上说明造血干细胞的多向性。

四、造血干细胞的测定

自从1961年Till与McColluch发现脾结节法测定CFU-S以来已二十多年, 至今还没有第二个测定造血干细胞的方法。这种脾结节测定法只适用于鼠类(主要是小鼠), 对人及其他动物都无法测定其多向性造血干细胞。不可把体外培养祖细胞、体内扩散盒培养祖细胞或体外短期液体培养骨髓细胞误称为“干细胞培养”。

在正常生理状态下以及某些物理或化学损伤下，骨髓中CFC-GM与CFU-S的数量变化有显著的相关性。因此人们常用GM-CFU的测定结果去推测人（或狗等其他动物）造血干细胞的变化。

正常体内干细胞90%以上都是静止不增殖的（ G_0 ），所以在脾结节法植入的干细胞头几天并不增殖，大约4~5天后呈指数式增加，第7天倍增时间约20~25小时。输注的干细胞大量在肺中停留，一部分到骨髓，另一部分到脾脏后如果遇到合适的微环境，干细胞才能被激活，增殖分化而形成各系细胞团，即为肉眼所见的脾结节。在这同时，干细胞又进行自我复制，所以在各个脾结节中尚含有一定数量的多向性干细胞。也有人发现在输注前已经处于增殖周期的CFC-S反而植入率低。此外，宿主小鼠脾的大小也影响形成脾结节的数量。总之，输注的干细胞（CFC-S）中仅有一小部分称为CFU-S，可形成脾结节。所以，

$$\text{植入率}(f) = \frac{\text{CFU-S}}{\text{CFC-S}}$$

正常小鼠骨髓CFC的 f 为0.10，脾CFC的 f 为0.05，血液CFC的 f 为0.21。实际上在实验中 f 值很难准确地测定。

通常CFU-S的测定数值用“产率”（incidence）来表示。如正常小鼠CFU-S为 $10 \sim 60/10^5$ ，也是CFU-S在骨髓细胞中的相对比值。有的实验为了反映CFU-S绝对数量的变化，则用每根股骨中CFU-S含量来表示，如正常小鼠CFU-S为 $10^4/\text{股骨}$ 。

祖细胞是否也可能形成8天的脾结节？过去都认为不能。但近年来混合集落培养成功，证明多向祖细胞的存在，