



(日) 青木延雄 编
柴田 昭

血液学研究检查法

科学出版社

血液学研究检查法

〔日〕青木延雄 编
柴田 昭

孙素莲 申文江 凌启柏 译

孙素莲 凌启柏 校

王淑娟 于秀涛 校订

科学出版社

1989



E-100

内 容 简 介

血液学研究的检测方法多种多样。由日本95位具有丰富的科研与教学经验的专家编写的这部著作,介绍了一些最新的重要检查法,内容涉及:造血干细胞、造血因子、各系血细胞、出凝血、血液遗传学,以及电镜在血液学研究中的应用等新技术、新方法。本书对所介绍的每一种方法,都颇为详尽地叙述了其检测意义、基本原理、试剂配制、材料设备、操作步骤、可信性及注意事项、正常值范围等,并附有大量插图(其中彩图8面)及可供进一步查阅的大量参考文献。

本书具有较高的实用价值,是从事血液学研究、教学的较好参考书。可供血液学领域的研究人员、临床医师、检验人员以及有关大专院校师生参考。

青木延雄 柴田 昭

血液学研究检查法

中外医学社, 1980

血液学研究检查法

[日] 青木延雄 柴田 昭 编

孙素莲 申文江 凌启柏 译

孙素莲 凌启柏 校

王淑娟 于秀涛 校订

责任编辑 张国金

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1989年8月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1989年8月第一次印刷 印张: 33 3/4

平 1—590 插页: 平 4 精 6

印数: 精 1—1250 字数: 784 000

ISBN 7-03-000949-5/R·35 (平)

ISBN 7-03-000950-9/R·36 (精)

定价: 平 装 32.60 元
布 装 34.80 元

译 者 的 话

1961年, Till 和 McCulloch 以成功的实验,巧妙地证明了多向干细胞的存在,从而丰富和更新了血液学的基础理论及研究手段,有力地促进了血液学的发展。近年来,我国血液学领域的进展也十分迅速,无论是基础研究还是临床医学方面都取得了令人瞩目的成果。尽管如此,《血液学研究检查法》这本专著,由于它集中反映了近十年来有关血液学研究方法的进展及其实际应用成果,在很多方面仍不失其先进性,故翻译出版以供广大读者参考。

本书共十章。第一章除讲述了造血干细胞的理论、发展沿革及多种技术方法外,还详细介绍了各种方法的操作注意事项以及巨核细胞集落培养法。第二章介绍了造血因子测定方法;明确证实了粒细胞生成素(CSA)不仅是体外集落培养时必不可少的因子,且在体内也具有调控粒细胞生成的作用,并举例说明测定 CSA 的重要意义;证实了体内血小板生成素(TPO)的存在并建立了测定方法,指出了解 TPO 的动态对阐明血小板产生过程中生理、病理机理以及各种血小板疾病的本质均有重要意义。此外,本章亦阐述了造血抑制因子的意义及其测定方法。第三章着重探讨了血细胞遗传学和传代培养法,除介绍末梢血、骨髓细胞常用的染色体分带法(Q、G、R、SCE)外,还阐述了C带、T带、NORs 染色、Cd 染色及 DNA 复制带等方法。第四至六章以大量的篇幅,较详细地介绍了对红细胞、粒细胞、淋巴细胞与单核细胞、巨噬细胞的多种测定方法。这些测定方法对实验室研究及临床实验均具有较高的参考价值。在第七章里,对血小板各组成成分的生物学作用及其在血小板疾病中的异常变化的临床意义,以及对其检测方法均进行了详尽的介绍,并指出在先天性血小板异常疾病、弥漫性血管内凝血的病例及血栓形成过程中,血小板膜糖蛋白、血小板内核苷酸均呈现出异常变化;血小板膜的磷脂酶 A₂ 活性缺乏或亢进与某些出血倾向或血栓形成侧向密切相关;测定血小板的腺苷环化酶活性与环核苷酸磷酸二酯酶活性可以了解 cAMP 的合成与分解的情况;对 ATP 酶活性的测定可以了解肌凝蛋白活性及其与血小板形态变化、血小板聚集及释放反应之间的关系,而 ATP 酶活性调节与钙调蛋白又密切相关;通过前列腺素系统生成物测定,可进一步了解前列腺素与血小板各种酶代谢之间的相互关系;测定 ADP、ATP、5-羟色胺的释放、钙的释放及冯维勒布兰德因子(VIII:WF)活性等,可观察血小板功能情况;尤其是 VIII:WF 活性的测定,不仅对冯维勒布兰德氏病的诊断是必要的,而且对于阐明第 VIII 因子复合物参与止血机理等方面也是不可缺少的。以上诸问题均为目前研究和讨论的焦点。在血液凝固一章里具体地介绍了纤维蛋白 A 肽测定法,这一方法对于及早诊断弥漫性血管内凝血及各种血栓栓塞性疾病有重要意义。

本书系由日本具有丰富理论知识和实践经验的 95 名专家集体编写而成,所介绍的内容并非一般的常规检查方法,而是重点介绍血液学研究及检查方法学的进展,尤其是近十年来的研究成果。书中介绍的每一方法,均包括检测意义、基本原理、试剂配制、材料设备、操作流程、注意事项及正常值范围,叙述得颇为详尽并附有大量参考文献。

应当指出的是,本书所介绍的不少研究检查方法,目前我国尤其是在临床工作中大多尚未开展,鉴于这一点,我们十分希望这本书能为广大血液学研究者及临床医师提供有益的借鉴。

在本书翻译过程中,承蒙王淑娟教授和于秀涛老师详细审阅,在此谨致以衷心的感谢。

本书内容涉及的范围较广,而我们的水平有限,译文中有错误和不妥之处,敬请读者批评指正。

为了便于查阅,书后附有本书所用缩写及中、外文索引。各检查方法材料项中所涉及的国外厂商的名称,统一未作翻译。

译 者
于1986 夏

前 言

近几年间,血液学研究有了长足的进步,所涉及的领域日益广阔,面貌为之一新。本书一位从事基础医学研究而并非血液学家的执笔者,在编写本书时,接触了血液学发展的新动态,不禁感叹血液学领域变化之大。不仅他如此,就是我们这些从事血液学研究的人也有此同感。人们公认,血液学研究进展如此迅速的巨大推动力,正是其研究方法学本身的进步。

现今,新创建的研究检查方法层出不穷,可谓令人应接不暇。欲掌握如此繁多的新方法是有困难的。特别是刚开始步入这一领域的青年工作者,一定会面临许多问题。如果手边能有一本这样系统的关于最新血液学研究法、检查法的参考书,必将大有裨益。

本书不介绍实验室中一般的常规方法,仅介绍最新的重要研究方法,以及目前在研究室主要采用的,和今后将要在化验室普及的,或已经部分移交化验室的检查法,就其具体方法、操作步骤及可信性等进行论述。本书由我国在第一线工作的专家们执笔编著,相信此书不仅对年轻的研究者和准备晋升的技师们有益,就是对广大的血液学爱好者也必会有所帮助。

阅读本书后即可发现,作为现代血液学重要分支的免疫学——特别是关于体液免疫部分——所占比重很少。因为这一领域在生物科学中已成为独立的学科,其方法学已成册出版,故在此删略,免疫学问题请参考其他有关专著。

本书如能成为探讨血液学新研究领域的工作者的良友,如能成为实验室和化验室的一本有益参考书,从而能促进学术进展,我们将会感到十分的高兴。

编 者

1980 年夏

目 录

译者的话

前言

第一章 造血干细胞	1
第一节 多向干细胞测定法	1
一、脾集落形成单位 (CFU-S)	平岛邦猛 1
二、混合集落	原 宏 5
第二节 造血祖细胞测定法	9
一、粒细胞集落	三浦恭定 9
二、红细胞系集落	森山美昭, 真田雅好 14
三、淋巴细胞集落	古泽新平, 广濑康二 19
四、巨核细胞集落	沟口秀昭 25
第三节 扩散盒 (diffusion chamber) 法	高桥 宏、大北 威 28
第四节 干细胞的长期保存	服部绚一、石野千津子 34
第二章 造血因子	40
第一节 促红细胞生成素测定法	千叶省三 40
第二节 粒细胞生成素测定法	仁保喜之 43
第三节 血小板生成素测定法	芦泽 健 50
一、体内生物学测定法	50
二、免疫学测定法	53
三、体外生物学测定法	54
第四节 造血抑制因子 (chalone) 测定法	森山美昭 55
第三章 血细胞遗传学、传代培养	61
第一节 末梢血培养法	镰田七男 61
第二节 骨髓直接法	石原隆昭 65
第三节 染色体显带法	70
一、Q-显带法	阿部达生、三泽信一 74
二、G-显带法	77
三、姐妹染色单体显带法	79
四、R-显带法	阿部达生 81
五、C-显带法	84
六、T-显带法	86
七、NORs 染色法	87
八、Cd 染色法	89
九、DNA 复制带	91
第四节 血细胞传代培养法	三好勇夫 92
第五节 G-6-PD 同功酶测定法 (A 与 B)	山中直树 98
第四章 红细胞	109

第一节	血细胞核苷酸测定法	小峰光博	109
第二节	维生素 B ₁₂ 测定法——特别是 B ₁₂ 同族体测定法(包括内因子及内因子抗体测定法)	田中信夫	116
一、	B ₁₂ 同族体测定法		116
二、	内因子活性测定法		119
三、	内因子抗体测定法		121
第三节	叶酸测定法	内山幸信	124
第四节	膜蛋白测定法	八幡义人	128
第五节	膜脂质测定法		134
第六节	糖代谢测定法		140
第七节	血红蛋白测定法	宫地隆兴、藤泽桂子	154
第八节	血红素合成酶测定法	竹下正纯、指吸俊次	161
第九节	铁代谢(包括铁蛋白)测定法	齐藤 宏	168
一、	铁代谢测定法		168
二、	铁蛋白测定法		173
第十节	红细胞动力学测定法	齐藤 宏	175
	有效造血量与有效造血率		175
第十一节	铁吸收与铁排出测定法	齐藤 宏	178
一、	铁吸收测定法		178
二、	铁排出测定法		180
第五章	粒细胞		187
第一节	粒细胞动力学测定法	御供奉治	187
一、	同位素法		187
二、	非同位素法,流式微量荧光光度计法		192
第二节	粒细胞功能		194
一、	吞噬功能测定法	大桥辰哉、镰仓正英	194
二、	溶菌酶测定法		196
三、	NBT 还原能测定法	伊藤和彦	199
四、	趋化性测定法		202
五、	杀菌功能测定法		205
第三节	粒细胞的构造与功能		207
一、	细胞化学	柴田 昭、小池 正	207
二、	表面抗原(膜抗原)	下山正德、湊 启辅	213
三、	酶(代谢)	中村 彻、山本孝吉、笹目昌孝、内野治人	229
第六章	淋巴细胞与单核细胞、巨噬细胞		240
第一节	淋巴细胞动力学测定法	内田立身、松田 信	240
第二节	表面特性检查法		246
一、	E 玫瑰花结形成、补体受体	渡边信雄、橘 武彦	246
二、	Fc 受体	服部俊夫、泽田博义、高月 清	253
三、	表面免疫球蛋白	熊谷胜男、日沼州司	257
第三节	淋巴细胞功能测定法		263
一、	产生免疫球蛋白的能力	谷内 昭、今井浩三	263
二、	MIF 检查法		268

三、使用致有丝分裂原的检查法	272
第四节 酶测定法	坂本 忍 274
一、末端脱氧核苷酰转移酶 (TdT)	274
二、氨基己糖酶同功酶	282
三、N-碱性磷酸酯酶	285
第五节 抗淋巴细胞血清制备法	三浦 亮、秋滨、哲雄 288
第六节 单核细胞、巨噬细胞的电镜细胞化学	大西义久、根本启一 292
一、过氧化物酶	293
二、酸性磷酸酯酶	295
第七节 巨噬细胞与淋巴细胞 (T 细胞与 B 细胞) 的相关测定法	野本龟久雄 298
第八节 免疫应答调节机理检查法	平野俊夫 304
第七章 血小板	318
第一节 血小板动力学测定法	塚田理康 318
一、放射性同位素测定法	318
二、血小板寿命的非放射性同位素测定法	323
第二节 血小板膜蛋白分析法	渡边清明、安藤泰彦 326
第三节 血小板内核苷酸测定法	塚田理康 332
一、萤火虫荧光素酶法	333
二、酶法	335
三、高效液相色谱层析法	337
四、环 3', 5'-AMP (cAMP) 和环 3', 5'-GMP (cGMP) 的测定	339
第四节 血小板酶测定法	341
一、花生四烯酸的游离(磷脂酶 A ₂ 活性)	青木延雄 341
二、环氧化酶系酶(环氧化酶及血栓素内环合成酶)活性测定法	大熊 稔 344
三、脂氧化酶活性测定法	349
四、腺苷、鸟苷环化酶活性测定法	吉田信彦 351
五、环核苷酸磷酸二酯酶活性测定法	358
六、血小板蛋白激酶活性测定法	久米章司、刈家利承 361
七、ATP 酶活性测定法	日高弘义、田中利用 366
第五节 前列腺素系生成物测定法	大熊 稔 369
第六节 血小板功能测定法	372
一、释放反应测定法	田上宪次郎;吉田信彦 372
二、冯维勒布兰德因子活性测定法	吉冈 章、福井 弘 381
第七节 血小板释放蛋白测定法(释放血小板第 4 因子和 β -血小板球蛋白)	387
..... 本官武司、山崎博男	387
第八节 血小板抗体测定法	安永幸二郎 390
一、5-HT 释放试验	391
二、绵羊红细胞溶血抑制试验	394
三、免疫荧光微量光度测定法 (IFMP)	396
第八章 血液凝固	407
第一节 凝血因子测定法	407
一、电泳分析	吉冈 章、福井 弘;松田道生 407
二、使用合成基质的测定法	浅井纪一;大石幸子;浦山 功 417

三、蛇毒检查法的应用	樱川信男	431
第二节 凝血抑制因子测定法		436
一、使用合成基质的测定法	浅井纪一;长谷川淳、小熊丰	436
二、抗凝血酶 III 的分离测定法	吉田信彦	442
三、抗凝血酶 III 的免疫学测定法	松田 保	446
第三节 纤维蛋白 A 肽测定法	池松正次郎 松原泰久	449
第九章 纤溶		458
第一节 纤溶酶原测定法		458
一、血浆纤溶酶原测定法	青木延雄	458
二、纤溶酶原的分离测定法	坂田洋一	461
第二节 纤溶抑制因子 (α_2 PI) 测定法——使用合成基质的测定法	青木延雄	465
第三节 纤溶系统因子的免疫学测定法	青木延雄	468
第四节 A 片段测定法	高木皇辉	470
第十章 血细胞的电子显微镜观察法		475
第一节 透射式电子显微镜		475
一、电镜细胞化学	小川哲平	475
二、免疫电镜法	铃木郁男	480
三、放射自显影术	小林 繁	485
四、冷冻断裂法与复型技术	有森 茂	489
第二节 扫描式电子显微镜		496
一、样品制备与观察法	服部 晃	496
二、树脂灌注法	入野昭三	501
三、免疫扫描电镜法	服部晃、伊藤粹子	506
本书所用缩写		515
中文索引		521
外文索引		527

第一章 造血干细胞

第一节 多向干细胞*测定法

一、脾集落形成单位(CFU-S)

(一) 意义

造血细胞分红细胞系、白细胞系、血小板系等三个系统。在染色标本上,根据细胞质、核的变化、细胞大小等形态学特征划分其分化成熟的程度。

从形态学角度观察,可以识别的最幼稚阶段的细胞,对红细胞系而言是原红细胞,对白细胞系而言是原粒细胞,对血小板系而言是原巨核细胞。

末梢血中红细胞寿命为120天,白细胞为6—20小时,血小板为5—10天。破坏了的各系血细胞,分别由骨髓中各系的原始细胞分化成熟予以补充。以红细胞系为例,在一天内要破坏 2×10^{11} 个红细胞,为此每天必须新生原红细胞 2×10^6 个。新的细胞不断地大量产生,如果机体内没有具有很强的自我复制(self-renewal)能力的细胞存在,则机体的造血功能将会很快枯竭。

能够成为这种细胞之来源的,必须兼有下述两种能力:第一,具有很强的分裂能力和自我复制能力;第二,具有多向性分化及成熟的能力。在功能方面能满足上述条件者,称为造血干细胞(hematopoietic stem-cell)。能向三个系统血细胞分化的多向干细胞(pluripotential stem-cell)在体内是否存在,很久以来就有争议。

最初, Jacobson 等依据造血组织放射损伤研究及骨髓移植实验研究的成果,逐渐明确了在造血组织中可能存在多向干细胞^[1]。及至1961年, Till 和 McCulloch^[2]利用成功的实验技术,建立了小鼠造血组织中干细胞的定量检测法,并证实了干细胞具有多向分化的能力^[3-6]。此方法被称为脾集落形成法。

目前,定量检测满足上述定义的多向干细胞的脾集落形成法,只能用于实验动物(小鼠、大鼠)。

检测多向干细胞的实验技术的建立,不仅有益于探讨血细胞分化、增殖的理论基础,

* 名词统一说明:

多向干细胞(pluripotential stem cell): 在80年代初,国内有关造血干细胞的研究论文及吴祖泽著的《造血干细胞动力学》一书中的名词采用“多能干细胞”,也有人采用“多潜能干细胞”。唐佩弦教授认为“多能干细胞”一词不够贴切,建议统一改用“多向干细胞”或“多向造血干细胞”(pluripotential hemopoietic stem cell),即具有多向分化能力的造血干细胞。

造血祖细胞(hemopoietic progenitor cell): 包括BFU-E, CFU-E, CFU-C或GM-CFC, CFU-M等,以前多采用“定向干细胞”(committed stem cell),现统称为“(造血)祖细胞”。

为与国内名词统一,将本书原版的“多潜能干细胞”译为“多向干细胞”;将本书的“定向干细胞”译为“祖细胞”。下同。

唐佩弦教授在统一名词方面给予指导,特此致谢。——译者注

而且在临床上十分有助于阐明病理生理尚不明确,但有干细胞水平异常的再生障碍性贫血、白血病等的病因^[6-9]。下述干细胞体外培养法应是人的干细胞定量法的基础。

(二) 原 理

将同系的小鼠骨髓细胞,移植给接受超致死剂量放射线照射过的小鼠,从受体小鼠的生存率可正确地反映移植的骨髓细胞数。从这一事实出发,McCulloch 与 Till 推测:是否可从生存率得知移植骨髓细胞中的干细胞数^[10]。他们进一步将移植骨髓后 7—10 天的动物解剖观察,发现脾脏表面有造血细胞形成的集落(图 1-1)而且该集落数与移植的细胞数成相应的比例关系^[2],进一步用染色体分析法进行研究,发现同一个集落中的细胞都是由一个始祖细胞分裂增殖而来^[11]。

因此,根据受体动物脾脏产生的集落数就能测知移植的骨髓细胞中的干细胞数。

对脾集落进行组织学检查,发现有单纯由红细胞系细胞组成的集落,有单纯由白细胞

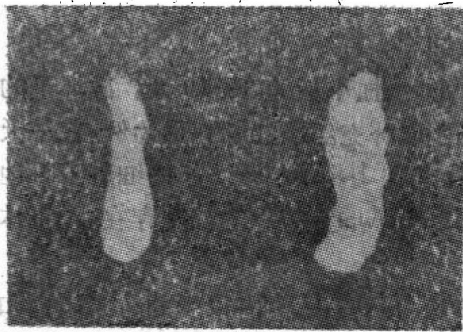


图 1-1 照射 600 拉德 X 射线后第 7 天的脾(左)和照射 900 拉德后移植骨髓细胞第 7 天的脾及其产生的造血细胞集落(右)

系细胞或单纯由巨核细胞系细胞组成的集落,及由各系细胞混合组成的集落,其出现的比率依次是 2:1:1。若将只由红细胞系细胞组成的集落中的细胞,再移植给受致死剂量照射过的小鼠,则在第二宿主脾脏上也依上述同样的比率出现红细胞系、白细胞系、巨核细胞系集落^[3-5]。

上述实验证明,一个脾集落是由骨髓中一个始祖细胞生成,该细胞具有向各系细胞多向性分化的能力,目前通称其为 CFU-S (脾集落形成单位, spleen colony-forming units)。可以认为只有 CFU-S 方符合于上述多向干细胞的定义。

(三) 材料及实验器械

1. 小鼠

宜用纯系小鼠。常用者为 C₃H/He、C₅₇BL/6J 及其 F₁(BC₃F₁) 等系小鼠。8—12 周龄。

2. 放射线照射装置

治疗用 X 线机 (250kV, 20mA, 岛津 SHT-250M 型), 或动物实验用照射装置 (¹³⁷Cs, γ 线源), 治疗用 γ 线源 (⁶⁰Co)。为使小鼠全身均匀受到照射,又不窒息而死,需将小鼠置于有机玻璃盒内加以固定。

3. 制备细胞悬液的培养液

除 α -Medium、Hanks 液、TC199、Tyrode 液等培养液外,尚需大量普通灭菌生理盐水。

4. 解剖、注射用器械

剥离股关节用的弯剪刀,切断骨端用的直剪刀及镊子等,给小鼠静脉注射骨髓细胞用的 1ml 蓝蕊注射器及 23G (0.60 × 25mm) 针头。以上器械均须高压消毒、备用。

5. 小鼠注射时用的固定器及红外线灯

在给小鼠进行尾静脉注射时,需有固定小鼠用的塑料支架(有各种样式的市售品),及注射前加温尾静脉用的红外线灯。

(四) 方 法

实验操作方法概略如图 1-2 所示。

1. 造血细胞悬液制备方法

用颈椎脱臼或乙醚麻醉处死小鼠,用 75% 酒精棉球涂擦小鼠皮肤进行消毒。将小鼠固定于软木板上,用剪刀在股关节及膝关节处切断两侧的大腿骨,只把所需要的股骨收集到湿纱布或滤纸上,然后用灭菌的高级滤纸或纱布剥去肌肉。再用直剪刀切除股骨两端,用 22G 或 23G 针头由一端插入骨髓腔内注入 1ml 培养液(生理盐水)将骨髓细胞冲洗出来。我们采用的方法是每端各用 0.5ml 培养液(或生理盐水)冲洗和收集细胞。

制备的骨髓细胞悬液置于常温或冷冻保存。

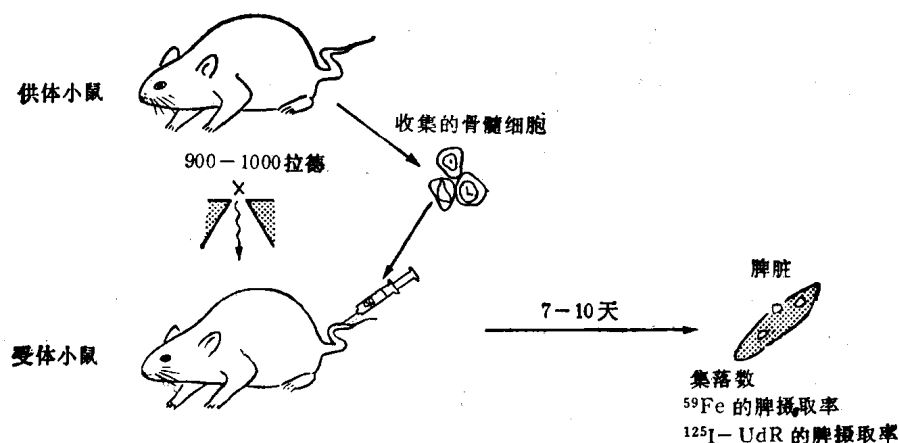


图 1-2 脾集落形成法示意图

若用脾细胞悬液代替骨髓时,则用匀浆器将脾脏磨碎,加入适量培养液(约 20ml 左右)充分混匀,再用不锈钢网过滤,制成脾细胞悬液。

2. 受体小鼠放射线照射法

将小鼠放入照射用的固定盒内(该盒是由有机玻璃制成圆盘状,并用板隔成放射状),用 X 线或 γ 线进行全身照射。管球与动物间的距离保持在 35—50cm。照射条件是:全

身均匀照射,剂量率为50—100拉德/分(Till原法^[3]为 γ 线,采用330拉德/分高剂量率),总剂量为900—1000拉德(原法为950拉德)。照射剂量应根据小鼠的品系、性别、周龄不同而进行增减。

最好是用自己饲养的一定周龄的小鼠,先作预备实验,即以800,900,1000拉德剂量行全身照射,使小鼠一周内不致死亡,并解剖观察脾脏无内源性造血集落^[12]产生。由此得到上述最适照射条件后,再行细胞移植实验。

8—12周龄的C₃H/He系小鼠适宜的X线照射剂量是900拉德。

3. 造血细胞悬液静脉注射法

这是脾集落形成法中最关键的技术方法。受体小鼠在放射线照射后24小时内,从尾静脉注入造血细胞悬液(骨髓或脾细胞)0.5ml,其内含有适量细胞数(后述)。将小鼠置于注射用固定支架内(有各种市售品),鼠尾留在外面,用手指固定之。尽量从尾末端开始注射,其关键是将小鼠尾部及全身加温,可将尾部置于40℃左右的温水中。我们采用的方法是将小鼠放入鼠笼内,用红外灯照射鼠笼之后注射效果良好。采用1.0或0.5ml的蓝蕊注射器和23G针头注射,虽然23G针头稍粗,但液体完全进入静脉可毫无抵抗感,从而确保注射成功,此点较之采用细针头更为有利。

4. 脾集落计数

移植后的第7—10天(原法是第10—11天),处死小鼠取出脾脏,立即置Bouin固定液中,2小时后即能观察脾集落,并在1—2天内计数完毕。用实体-显微镜或放大镜即容易观察到。除计数脾集落数外,亦可求出脾重量、放射性铁(⁵⁹Fe)的脾掺入率^[13]、¹²⁵I-脱氧尿苷^[14](¹²⁵I-UdR或¹³¹I-UdR)的脾掺入率。即用⁵⁹Fe1 μ c、¹²⁵I-UdR 2 μ c(¹³¹I-UdR 0.5 μ c)注射后第5—6小时处死小鼠取脾置入试管内,用井型闪烁计数器进行测定。

(五) 可信性及注意事项

脾集落形成法操作简单,如实验条件恒定则重复性非常高。问题是实验动物的品系、周龄、饲养环境影响较大,即使是自己饲养的动物,也有必要作预备实验,求得移植细胞数和脾集落数的关系图之后再作实验。例如,我们用8周龄的C₃H/He系小鼠,移植后第10天处死进行观察,结果如图1-3所示,为求出移植骨髓细胞数和脾集落数之间的关系,求取每个数值时所用小鼠数宜在5只以上。

其他注意事项如下:

1) 如上所述,因小鼠品系不同,对放射线敏感性也不同。有时不给被照射动物移植细胞也能产生内源性集落,因此对要进行照射的动物须预先检查清楚,如产生内源性集落时,或者增加照射剂量,或者由测定的结果中将内源性集落数减去。

2) 幼小动物(8周龄以下)对放射线敏感性高,往往在实验过程中死亡而结果不准确。

3) 如实验过程中饲养环境差,则动物不是由于感染致死就是很衰弱,以致脾集落形成不良,造成很大误差。故应尽可能地在专用无菌环境(specific pathogen free, SPF)中

饲养为好。

4) 移植骨髓细胞时,其有核细胞数以在 10^4 — 10^5 范围内较好,如细胞数过多则形成的脾集落变小且数量多,计数时易产生误差。产生的集落数在 50 个以内为宜。

5) 从收集造血细胞到进行移植的时间越短越好,在室温下 2—3 小时以内对集落形成无显著影响。根据一般经验,常温下比冰浴所得结果要好。

6) 细胞悬液在每次注射时应注意摇匀。

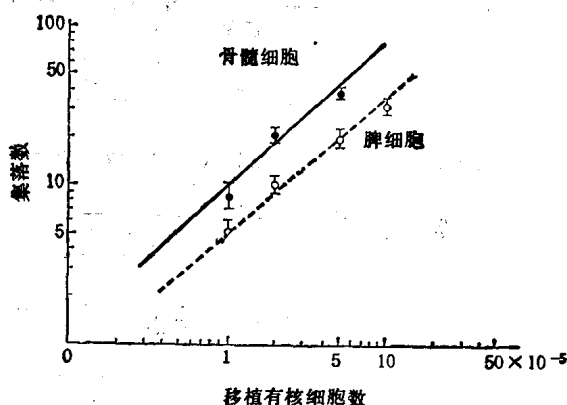


图 1-3 移植骨髓(脾)细胞数和脾集落数的关系
(C₃H/He 小鼠 移植后第 10 天)

如上所述,脾集落数可由于动物的品系、周龄而有差异,但以每注射大约 10^4 骨髓有核细胞能产生一个脾集落, 10^5 有核细胞能产生 10 个脾集落为好。

(七) 其 他

CFU-S 只表示停留于脾脏的造血细胞中的多向干细胞数。将此作为植入率 (seeding efficiency), 以 f 来表示。 f 值依据动物品系不同而异,一般为 0.05^[16]—0.17^[17]。

根据上述,可认为在骨髓有核细胞数中,多向干细胞数尚不到 1%。

二、混 合 集 落

(一) 意 义

如前所述,多向干细胞的 CFU-S 测定法是一种非常卓越的方法,然而其最大缺点是只能应用于小鼠。第二个缺点是经 X 线照射的小鼠如同使用的试管一样,不能直接观察到各种物质的影响。

对此,在应用组织培养法测定时,若改进培养方法,则有可能应用于任何动物。另外,对各种物质的影响亦便于直接观察。

目前,改良培养方法,利用混合集落形成法成功地测定多向干细胞,不仅已应用于小鼠^[18,19],而且也已应用于人^[20]。对小鼠有 CFU-S 测定法,而人的多向干细胞测定法在临床上也被广泛地应用。如图 1-4 所示,多向干细胞,能向红细胞、粒细胞、单核细胞及巨噬细胞、血小板、B 淋巴细胞分化。因此,这种方法可作为一种手段,用以研究全血细胞减少的再生障碍性贫血的病因,或探讨白血病患者正常细胞成熟受抑制的机理。在不久的将来,在这一领域,可望获得重要的研究资料。

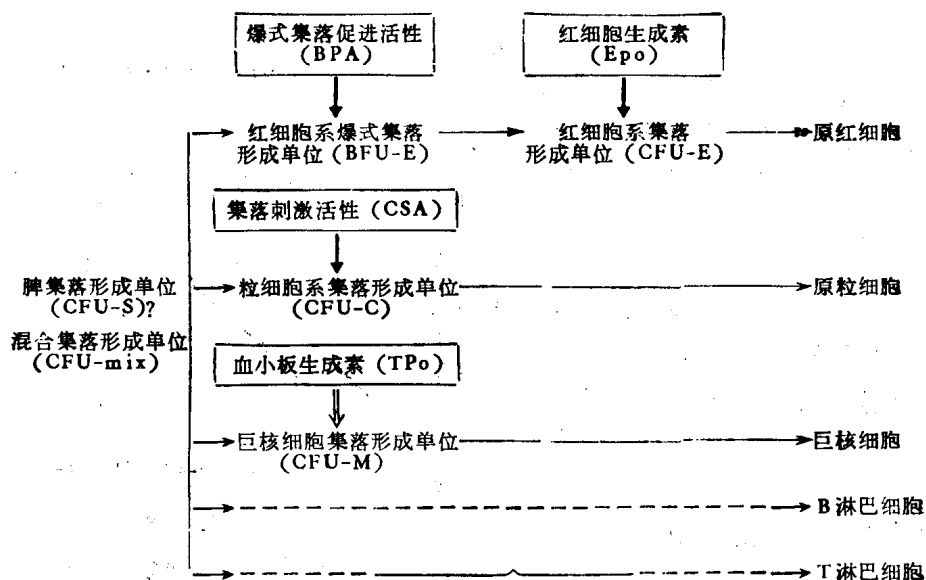


图 1-4 干细胞的分化和成熟

(二) 原 理

以往关于多向干细胞的知识是通过 CFU-S 法所获得, 这种细胞有下述两个特征:

- 1) 能自身增殖。
- 2) 具有向 2 个以上系统的血细胞如红细胞和粒细胞分化成熟的能力。

混合集落形成法能证明: 由 2 个系统以上血细胞形成的集落, 系来源于一个造血干细胞, 这是证明干细胞多向性的一种方法。因此, 亦可认为, 混合集落是由粒细胞和巨核细胞, 或粒细胞和淋巴细胞组成的细胞集落。但这些细胞缺乏标志, 而红细胞系细胞含有血色素, 在培养中, 随血色素量的增加呈现出红色, 容易与其他系统血细胞加以区别, 所以往往以红细胞系为标志, 与组成集落的其他系统血细胞鉴别。

(三) 材料与 方法

1. 小鼠的混合集落

促红细胞生成素	1—2 单位/ml	二巯基乙醇	10^{-4} mol/L
胎牛血清	30%	甲基纤维素	0.8%
牛血清白蛋白	1%	小鼠脾或胸腺细胞培养上清	10%

将造血细胞的单个细胞悬液加入含有上述成分的 α -MEM 培养基(大日本製藥)中, 培养 14 天。甲基纤维素是为了保持培养液的粘度, 以使细胞之间不发生互相聚集的现象。

此外, 牛血清白蛋白应予去离子处理。

小鼠脾或胸腺细胞培养上清制备方法是在含有 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液

中,加入细胞。其浓度为 $10^7/\text{ml}$, 于 37°C 含 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养 5 天,再行离心,沉淀,取其上清。脾细胞和胸腺细胞上清之间未见有差别。

2. 人的混合集落

胎牛血清	30%	甲基纤维素	0.9%
添加 PHA 的人白细胞			
培养上清	5%		

在含有上述成分的 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基中,加入造血组织的单个核细胞悬液,每个小培养皿中加入上述培养液 0.9ml, 于 37°C , 含 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养 4—5 天。然后,在培养皿中加入 0.1ml 浓度为 25 单位/ml 的促红细胞生成素继续培养 10 天。

添加 PHA 的人白细胞培养上清的制备方法是在含有胎牛血清 10%、PHA1% 的 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基中,加末梢血白细胞,其浓度为 $10^6/\text{ml}$ 。按上述条件培养 7 天后,离心沉淀,取上清^[21]。

(四) 混合集落的证明

为了证明一个集落是来源于多向干细胞,必须证明:该集落是由两个系统以上血细胞所组成并起源于一个细胞。

1. 两个系统以上血细胞的证明

(1) 形态学特征

如上所述,需确认存在着含有色素的红细胞系的细胞和已经趋向于另一细胞系分化的细胞。

在倒置光显微镜下观察未染色的标本,可见有小型细胞紧密聚集,形成显示出各种特异形态的爆式集落,同时还有大型细胞(与小型细胞相比而言)存在(参阅图 1-5—7)*。小鼠和人的混合集落,均可见其中心部因有色素合成而呈红色(图 1-5—7)。

(2) 细胞组成

1) 红细胞系细胞: 首先应确认红细胞由于血红蛋白合成而呈现的红色。此外,尚有利用二甲氧基联苯胺 (3, 3'-dimethoxy-benzidine)^[22] 或二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine)^[23] 进行的假过氧化物酶 (pseudo-peroxidase) 染色的方法,但根据染色的条件,过氧化物酶也会被染色,这是值得注意的。

2) 粒细胞系细胞: 证明有过氧化物酶阳性细胞的存在,即证明了粒细胞系细胞的存在。

3) 巨核细胞: 可用各种方法确认巨核细胞。对于小鼠和大鼠,胆碱酯酶染色^[24]是骨髓细胞**的特异性染色法。如图 1-8 所示的茶褐色细胞即是乙酰胆碱酯酶阳性细胞。对于人的巨核细胞,则利用抗甲醇性的酸性磷酸(酯)酶随其成熟而呈现强阳性的特点,进行酸性磷酸(酯)酶染色^[25],并可借电镜证明巨核细胞中的据认为是具有特导性的核周过氧

* 图 1-5-7 及图 1-8 为彩色图,见书末。以下各章的彩图均附在书末。——译者注

** 指巨核细胞系细胞。——译者注