维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0029-03

几种组织培养上清液对造血祖细胞体外增殖分化的比较

姜 蓉[1]，郑 敏[1]，王亚平[1]，吴 宏[1]，王莎莉[1]，戴 勤[2]

（1. 重庆医科大学基础医学院组胚教研室；2. 重庆医科大学基础医学院生理教研室；
3. 重庆医科大学临床学院血液内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：寻求既经济又有效的造血生长因子样活性物质。方法：采用造血祖细胞体外培养与造血生长因子生物活性检测等实验血液学技术，检测胎肌培养上清液、骨髓基质细胞培养上清液、胸腺细胞培养上清液与脾细胞培养上清液对造血祖细胞CFU-GM、BFU-E和CFU-Mix增殖分化的影响。结果：胎肌培养上清液和对CFU-GM和CFU-Mix的体外增殖与分化有明显刺激作用，而胸腺与脾细胞条件培养上清液对BFU-E的生长有显著促进作用。结论：胎肌培养上清液中可能含GM-CSF样活性物质，而胸腺与脾细胞培养上清液具有较高IL-3样活性，可以利用组织与细胞培养上清液替代重组造血生长因子进行造血细胞的实验研究和临床诊断。

【关键词】条件培养上清液；造血祖细胞；造血生长因子

【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-03-27

Comparison of the activity among several culture conditional media to stimulate the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells

JIANG Rong, et al

（Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine Sciences, Chongqing Medical University, 400016）

【Abstract】 *Objective*: To find some active materials that can be easily and cheaply attained and have similar function of hematopoietic growth factor(HGF). *Methods*: The technique of cell culture ex vivo and the assay of the biological activity of HGF were used. The supernatants of culture conditional media in fetal muscle tissue, thymocyte, spleen cell and human bone marrow stromal cell were collected. The effects of the different conditional media on the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cell including CFU-GM, CFU-Mix and BFU-E were observed. *Results*: The culture conditional media of fetal muscle can markedly improve the proliferation and differentiation of CFU-GM and CFU-Mix; and the culture conditional media of thymocyte and spleen cell can enhance the growth of BFU-E. *Conclusion*: There may be some active materials similar GM-CSF in the supernatants of the bone marrow stromal cell and fetal muscle conditional media. The supernatants of thymocyte and spleen cell conditional media may function as the alike activity of IL-3. Such culture conditional media may act as the substitute for HGF in hematopoietic progenitor cell culture and in the clinic diagnostic assays.

【Key words】 Conditional media; Hematopoietic progenitor cell; Hemato-poietic growth factor

造血祖细胞的体外培养技术已广泛的应用于实验研究及临床血液疾病的诊断。造血祖细胞在体外增殖分化形成集落有赖于培养体系中相应造血生长因子（hematopoietic growth factor, HGF）的刺激，所形成的集落类型及数量与HGF的种类和活性有关[1]。目前，市场上所售的重组造血生长因子昂贵，这严重影响该实验技术的普及。本文总结了我室多年来利用组织细胞条件培养液进行造血祖细胞体外培养的经验，为造血祖细胞体外培养技术的开展与普及提供经济、简便的方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640培养基、IMDM培养基：美国GIBCO公司产品；重组IL-3、GM-CSF、EPO：美国Amgen公司产品；甲基纤维素：Sigma公司产品；谷氨酰胺：上海化学试剂厂生产；马血清：军事医学科学院购买；琼脂：日本进口分装。

作者介绍：姜 蓉（1962- ），女，实验师

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 人脐静脉内皮细胞株Ecv-304

购于上海细胞所。

1.3 骨髓细胞的制备

取手术切除人肋骨（骨髓涂片检查无损伤及血液学疾病），用咬骨钳挤出骨髓，淋巴细胞分离液分离单个核细胞，1640培养液清洗两次后，调细胞浓度为2×10^6/ml备用。

1.4 胎儿骨骼肌条件培养液(FMCM)制备

水囊引产的胎儿（6个月以上），严格消毒，取大腿骨骼肌剪成约0.5mm×0.5mm×0.5mm大小，按我室方法培养[2]，7天后取上清液备用。

1.5 脾细胞条件培养液（HSCM）、胸腺细胞条件培养液（HTCM）制备

分别取水囊引产之胎儿的脾脏、胸腺，淋巴细胞分离液分离单个核细胞，按我室方法培养[3]，3天后取上清液备用。

1.6 骨髓基质细胞条件培养液（HBMSCM）制备

取人骨髓细胞，按Dexter方法[4]培养基质细胞，14天左右待基质细胞贴满瓶底后换液，4天时取上清液备用。

1.7 内皮细胞条件培养液（ECCM）制备

在含有10%小牛血清的培养液中传代培养人脐静脉内皮细胞株Ecv304，7天左右待细胞完全贴满后，取上清液备用。

1.8 骨髓粒单系造血祖细胞（CFU-GM）的培养

取制备的骨髓单个核细胞悬液，分别设立对照组(加重组GM-CSF，使其终浓度达到20μg/ml)；实验组：①骨骼肌条件培养液组：培养体系中加10%（V/V）骨骼肌条件培养液，取代重组的GM-CSF；②脾细胞条件培养液组：在对照组基础上加10%（V/V）脾细胞条件培养液；③胸腺细胞条件培养液组：在对照组基础上加10%（V/V）胸腺细胞条件培养液；④骨髓基质细胞条件培养液组：在对照组基础上加10%（V/V）骨髓基质细胞条件培养液。按刘氏法培养、鉴定、计数[3]。

1.9 骨髓红系造血祖细胞（BFU-E）的培养

取制备的骨髓单个核细胞悬液，分别设立对照组(加重组EPO 2u/ml，IL-3 20μg/L)；实验组均不加重组IL-3，分组为：①在对照组基础上加脾细胞条件培养液10%（v/v）；②在对照组基础上加胸腺细胞条件培养液10%（v/v），培养、鉴定、计数同前。

1.10 骨髓混合性造血祖细胞（CFU-Mix）的培养

取制备的骨髓单个核细胞悬液，分别设立对照组(重组EPO 2u/ml，IL-3 20μg/L，GM-CSF 20μg/L)；实验组均不加重组IL-3和GM-CSF，而在对照组的基础上分别加已制备的上述五种条件培养液10%（v/v），培养、鉴定、计数同前。

2 结　果

2.1 几种条件培养液对CFU-GM增殖的影响

内皮细胞，脾细胞、胸腺细胞、骨髓基质细胞条件培养液单独使用均不能有效刺激CFU-GM的集落形成，骨骼肌条件培养液对CFU-GM有显著的促进作用。在有外源性GM-CSF的条件下，脾细胞、胸腺细胞、骨髓基质细胞条件培养液对CFU-GM有明显的促进集落形成作用（见表1）。

表1 几种条件培养液对CFU-GM增殖的影响

（集落数/1×10^5BMC）

组别		n	$\bar{x}\pm s$	P
对照组(GM-CSF)	I	12	40.5±3.8	
FMCM	II	12	89.3±6.0	<0.05(I：II)
对照+HSCM	III	14	70.4±4.9	<0.05(I：III)
对照+HTCM	IV	14	67.1±8.79	<0.05(I：IV)
对照+HBMSCM	V	12	63.5±4.3	<0.05(I：V)

2.2 脾细胞、胸腺细胞条件培养液对BFU-E增殖的影响

在有外源性EPO的条件下，脾细胞、胸腺细胞条件培养液对BFU-E的增殖有明显的促进作用（见表2）。

表2 脾细胞、胸腺细胞条件培养液对BFU-E增殖的影响

（集落数/1×10^5BMC）

组别		n	$\bar{x}\pm s$	P
对照组	I	12	20.7±6	
HSCM+EPO	II	22	31±8	<0.05(I：III)
HTCM+EPO	III	18	39±7	<0.05(I：IV)

2.3 几种条件培养液对CFU-Mix增殖的影响

在有外源性的EPO的条件下，几种条件培养液对CFU-Mix增殖都有明显的促进作用（见表3）。

表3 几种条件培养液对（CFU-Mix）增殖的影响

（集落数/1×10^5BMC）

组别		n	$\bar{x}\pm s$	P
对照组	I	32	33.5±3.4	
对照+FMCM	II	32	62.7±4.4	<0.05(I：II)
对照+HSCM	III	32	45.6±4.5	<0.05(I：III)
对照+HTCM	IV	32	43.1±4.6	<0.05(I：IV)
对照+ECCM	V	32	47.1.5±4.3	<0.05(I：V)
对照+HBMSCM	VI	32	65.8±4.4	<0.05(I：VI)

3 讨　论

造血祖细胞体外培养技术的发展导致了造血生

维普资讯 http://www.cqvip.com

长因子（hematopoietic growth factor，HGF）的发现，为造血生长因子的生物学效应观察及其临床应用奠定了基础。造血祖细胞培养不仅能对造血干/祖细胞进行定量分析，而且可以在体外观察各种因素对造血干/祖细胞的影响。在临床上造血祖细胞培养对白血病、骨髓增生异常综合症、再生障碍性贫血等多种血液疾病的诊断、鉴别诊断以及预后提供重要的参考[6]。

现代研究认为，造血祖细胞膜上存在HGF的受体，接受相应造血生长因子的刺激。祖细胞所形成集落类型及数量与培养体系中的因子种类和含量密切相关。因此造血祖细胞体外培养既可以检测未知的造血生长因子，也可以观察已知细胞因子对造血祖细胞的生物学活性。迄今发现至少有17种重组细胞因子对血细胞的生成具有正向调控作用。其中人红细胞生成素(rhEPO)，重组人GM-CSF已获FDA批准应用于临床治疗白血病，肿瘤放、化疗后的白细胞减少以及自体骨髓移植等[7]。但目前商品化的重组细胞因子非常昂贵，这大大限制了其在临床上的应用和实验室检测的开展。本研究采用造血祖细胞体外培养的方法，检测了几种组织、细胞培养上清液对祖细胞集落形成的影响，为该项实验技术的开展与普及提供经济、简便的方法。研究结果表明：胎儿肌条件培养液能显著刺激人粒单系造血祖细胞（CFU-GM）的集落形成，其集落产率甚至高于rhGM-CSF组，提示胎儿肌条件培养液中富含GM-CSF样活性物质，完全可以替代rhGM-CSF进行CFU-GM培养。而脾细胞，胸腺细胞和骨髓基质细胞培养上清液单独使用，很难刺激CFU-GM的集落形成。但若同时加入基础量的GM-CSF则可明显提高CFU-GM的集落产率，提示其上清液中含GM-CSF量较少，或者含有加强GM-CSF作用的物质。早期红系祖细胞（BFU-E）增殖分化主要依靠GM-CSF、IL-3和EPO的刺激，我们在BFU-E的体外培养体系中加入10%脾细胞，胸腺细胞上清液其BFU-E的集落产率显著提高，说明其培养上清液中含有较高活性的IL-3、EPO样物质。而骨髓基质细胞和内皮细胞条件培养液对BFU-E的体外增殖刺激使用很弱。多系造血祖细胞（CFU-Mix）是更为早期祖细胞，在体外培养体系中存在GM-CSF、IL-3、EPO和TPO等造血生长因子诱导下可形成粒、红、巨核系细胞的混合集落，本文研究表明，肌条件培养液、胸腺细胞、脾细胞、骨髓基质细胞和内皮细胞条件培养液都可与EPO协同刺激CFU-Mix的生长，说明其培养上清液中富含GM-CSF、IL-3、TPO样物质。

综上所述，利用活体组织、细胞制备的培养上清液中富含多种造血生长因子，可用于造血祖细胞的体外集落培养。根据所需培养的祖细胞集落性质选不同的培养上清液。这些条件培养液可替代重组造血生长因子的作用，且制备简便，易于推广。

参 考 文 献

[1] 王亚平，祝彼得．当归多糖对小鼠多能造血干细胞增殖分化影响的研究[J]．中国中西医结合杂志（实验专辑），1993;13:119-121.

[2] 王亚平、当归多糖对小鼠粒单系血细胞发生的影响[J]．中国实验血液学杂志，1993;1(1):79-82.

[3] Fabian I. Human spleen cell generation of factors stimulating humanpluripotent stem cell, erythroid and myeloid progenitor cell growth[J]. Blood 1985;65(4):990-992.

[4] Dexter TM. Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro[J]. J Cell Physiol 1971;91:335-337.

[5] 刘秀珍．造血细胞培养技术实验手册[M]．北京出版社，1993;94-95.

[6] 王 勇，祝彼得．造血祖细胞体外培养的实验研究和临床意义[J]．国外医学输血与血液学分册，1994;17:89-90.

[7] Young DC,Griffin JD. Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic Leukemia[J].Blood 1986;68:1178-1181.