维普资讯 http://www.cqvip.com

14-17
R457 R331.2
5

文章编号：0253-3626（2000）01-0014-04

小鼠颌下腺组织培养上清液对造血干细胞和骨髓细胞增殖影响的实验研究

吴 宏[1]，王亚平[1]，祝彼得[2]
（1. 重庆医科大学基础医学院组胚教研室 400016；2. 成都中医药大学 610075）

摘 要 本实验采用脾集落形成法和流式细胞术等技术，研究了小鼠颌下腺组织培养上清液(SGCM)对造血干细胞和骨髓细胞增殖的影响。结果表明：正常雄性和雌性SGCM对小鼠造血干细胞增殖和分化有明显促进作用；SGCM能有效促进小鼠骨髓细胞(BMC)由相对静止期(G_0/G_1)进入增殖活跃期($S+G_2/M$)，并能提高骨髓有核细胞数。研究提示，正常小鼠颌下腺可能通过分泌造血生长因子样物质促进小鼠造血干细胞增殖和分化并加快BMC从静止期进入增殖周期，从而发挥造血调控功能。

关键词 小鼠；颌下腺组织培养上清液；造血干细胞；骨髓细胞；血细胞发生
中国图书分类法分类号：R331.2 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-05-04

Experimental study of the effect of murine submandibular gland conditioned media on hematopoietic stem cell and bone marrow cell proliferation

WU Hong, et al
Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences

Abstract: By using such techniques as spleen colony formation and flow-cytometry, the effects of murine submandibular gland conditioned media (SGCM) on the proliferation of hematopoietic stem cells (CFU-S) and bone marrow cells (BMC) in mice was studied. The results indicated that the proliferation and polarization of murine hematopoietic stem cell(CFU-S) is significantly stimulated by normal male or female SGCM(♂SGCM, ♀SGCM). SGCM can markedly promote the entrance of BMC into the active proliferative phase and increase the numbers of BMC. The relationship between the submandibular glands and hematopoiesis may be that SGCM secretes hematopoietic growth factors.

Key Words: Mouse; Submandibular gland conditioned media(SGCM); Hematopoietic stem cell (CFU-S); Bone marrow cell (BMC); Hematopoiesis

70年代初，国外学者发现小鼠和大鼠颌下腺含有骨髓集落刺激因子(CSF)和红细胞生成素(EPO)[1~4]，提示颌下腺与造血调控有关系。但迄今为止，有关颌下腺参与造血的研究甚少，文献报道尚存较大差异[5~10]。且国内无这方面的研究。本实验采用脾集落法和流式细胞术等技术，观察了小鼠颌下腺组织培养上清液对血细胞发生尤其是对造血干细胞和骨髓有核细胞增殖分化的影响，旨在探讨与阐述颌下腺与血细胞发生的关系，为认识颌下腺的造血功能提供实验依据。

1 材料与方法

作者介绍：吴 宏(1963-06出生)，女，讲师，硕士

1.1 实验动物 8~12周龄BALB/c纯系雄性和雌性小鼠，体重18~25g。本校实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 RPMI-1640培养基，美国GIBCO公司产品；马血清(HS)：中国军事医学科学院购买(批号970406)；胎牛血清(FBS)：美国Sigma公司产品。

1.3 正常雄性和雌性小鼠颌下腺组织培养上清液(♂SGCM和♀SGCM)的制备 取颌下腺，分别按1：2：7比例将颌下腺组织块(g)，马血清(ml)和1640培养液(ml)加入培养瓶内，培养5天，收集上清液。同时将含有20%HS的1640培养液(无颌下腺组织块)加入培养瓶内，孵育5天，收集，作为阴性对照备用。

1.4 小鼠脾集落(CFU-S)的测定

1.4.1 供体小鼠骨髓细胞的制备：颈椎脱臼处死正常小鼠，取股骨，常规制备骨髓单细胞悬液，调整细胞浓度待用。

1.4.2 骨髓移植：受体小鼠经8.5Gy ^{60}Co γ射线全身致死剂量照射(照射面积15cm×15cm，距离75cm，照射时间6'51"，剂量率124.21CGy/min)，照射后30min内从尾静脉输入供体小鼠骨髓细胞(5×10^4个/只)。将受体小鼠随机分为四组：照

维普资讯 http://www.cqvip.com

射后当日分别腹腔注射生理盐水(NS)；孵育五天含20%HS的1640培养液(20%HS1640)；正常♂SGCM和正常♀SGCM各0.5ml，q.d×6d，第九天断颈杀鼠取脾脏，称脾湿重。脾脏经Bouin氏液固定24h，氨酒精脱色，肉眼计数脾结节数。同时，取股骨，冲出骨髓细胞，计数每根股骨的骨髓有核细胞数(BMC/股骨)。

1.4.3 脾脏连续切片及集落分类计数：脾脏经Bouin氏液固定，石蜡包埋，沿脾长轴作连续切片，常规H.E染色，光镜下计数脾集落总数和分类计数。

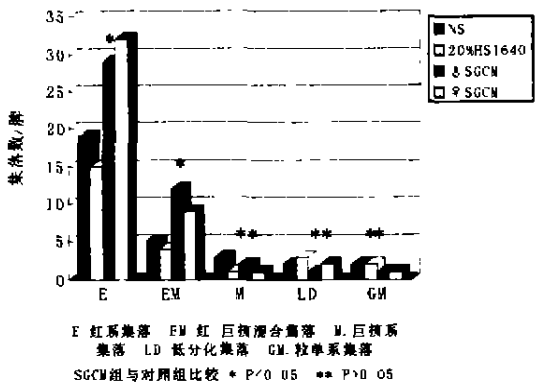
1.5 SGCM对BMC增殖周期影响的测定 正常小鼠骨髓有核细胞按5×10^5/ml种植于含20%FBS的1640培养液中，实验I组加入10%(v/v%)的♂SGCM，实验II组加入10%(v/v%)的♀SGCM，对照组加入等量含20%FBS的1640培养液。分别培养12小时，经处理上流式细胞仪，每个标本测定3×10^4个细胞，经计算机分析得细胞周期各时相比例。

2 结 果

2.1 SGCM对小鼠脾集落(CFU-S)增殖分化的影响

腹腔注射♂SGCM或♀SGCM的受体小鼠与注射生理盐水、20%HS1640的受体小鼠相比，第九天的脾湿重无显著性差异，肉眼下计数所形成的脾结节数之间也无统计学差异(表1，图2)。

♂SGCM和♀SGCM组虽在肉眼下计数所形成的脾结节数与注射生理盐水、20%HS1640的受体小鼠相比无统计学差异，但通过脾脏连续切片光镜下计数脾集落总数发现♂SGCM和♀SGCM组的脾集落生成数均高于NS组和20%HS1640组，且红系、红-巨核混合集落数均高于两个对照组(图1、图3~6)。



E 红系集落 EM 红-巨核混合集落 M 巨核系集落 LD 低分化集落 GM 粒单系集落
SGCM组与对照组比较 * P<0.05 ** P>0.05

图1 SGCM对小鼠CFU-S增殖分化的影响

2.2 SGCM对小鼠骨髓细胞的影响

2.2.1 SGCM对正常小鼠骨髓细胞增殖周期的影响 在BMC液体培养体系中，加入10%的♂SGCM，培养12小时后经流式细胞仪分析，处于S+G_2/M期的细胞百分比显著高于对照组(加入等量20%FBS1640)。但培养体系中加相同浓度的♀SGCM，其S+G_2/M期细胞百分比与对照组相比无统计学差异(表2)。

2.2.2 SGCM对造血抑制小鼠骨髓有核细胞数的影响 小鼠经^{60}Co γ射线致死剂量(8.5GY)照射后，经尾静脉输入正常小鼠的BMC，腹腔注射♂SGCM和♀SGCM组，第九天的骨髓有核细胞数(BMC/股骨)均明显高于注射生理盐水组和20%HS1640组(表3)。

3 讨 论

颌下腺属于三对大唾液腺之一，其主要功能是分泌唾液，参与消化。近20年来，陆续从鼠等动物及人的颌下腺发现或分离提取出近30种生物活性多肽，这些多肽物质对多种组织和细胞的生理活动起重要调节作用。Sheridan等(1971)[1]发现在小鼠各种组织中以颌下腺所含的CSF浓度最高。雄鼠含CSF浓度比雌鼠高3倍。Zangheri等(1973)[3]提出大鼠颌下腺能产生EPO。从此揭开了颌下腺是否能产生造血生长因子(HGF)及其形成机制的研究工作，但迄今为止，有关颌下腺参与造血的研究甚少，结论各异，且国内尚无报道。血细胞生成的调控是十分复杂的细胞及生化过程。从造血干细胞到造血祖细胞的增殖分化，直至成熟血细胞的形成过程中，每一环节都受着多种具有刺激活性或抑制活性的造血调控因子的调节。HGF是造血细胞增殖分化必不可少

表1 SGCM对受体小鼠脾湿重和脾结节数的影响

组别	n	脾湿重 $\bar{x}\pm s$	P	脾结节数（/脾） $\bar{x}\pm s$	P
NS	10	0.054±0.030	>0.05	17.20±6.221	>0.05
20%HS1640	10	0.029±0.008		13.50±3.619	
♂SGCM	10	0.062±0.022		16.60±3.362	
♀SGCM	10	0.061±0.023		16.20±2.950	

维普资讯 http://www.cqvip.com



图2 小鼠脾脏的CFU-S(Bouin's液固定)

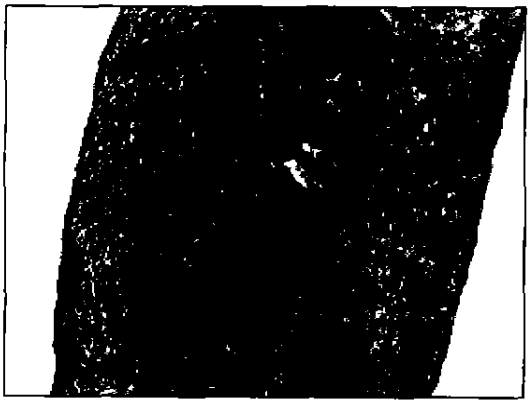


图3 小鼠脾脏的红系集落(H.E染色，10×10)



图4 小鼠脾脏的红-巨核混合集落(H.E染色，10×20)



图5 小鼠脾脏的巨核系集落(H.E染色，10×40)

的调控蛋白，它包括集落刺激因子类(CSF)、白细胞介素类(IL)及某些激素(EPO、TPO)等正调控因子和一些负调控因子，如干扰素(IFN)和肿瘤坏死因子



图6 小鼠脾脏的粒单系集落(H.E染色，10×40)

表2 SGCM对小鼠骨髓细胞增殖周期的影响

组别	G_0/G_1(%)	$S+G_2/M$(%)	P
对照组(Ⅰ)	84.48	15.52	
♂SGCM组(Ⅱ)	69.96	30.04	<0.05(Ⅰ:Ⅱ)
♀SGCM组(Ⅲ)	76.39	23.60	>0.05(Ⅰ:Ⅲ)

(TNF)等。机体很多组织细胞尤其是造血基质细胞和淋巴细胞能分泌上述调控因子，正是这些正负调控因子的协调才构成了血细胞发生的微妙调节网络。

血细胞发生始于多能造血干细胞。造血干细胞是一种具有高度自我更新能力和多向分化潜能的原始造血细胞。自1961年Till等创建脾结节法测定多能造血干细胞以来，迄今为止此方法仍是测定小鼠多能造血干细胞的主要方法之一。将小鼠全身致死剂量照射，受照射小鼠失去造血功能，此时，由尾静脉输入正常同种供体小鼠的骨髓有核细胞，其中到达脾脏的多能造血干细胞在适宜的造血微环境诱导下，即可增殖形成肉眼可见的脾结节，每一脾结节由一个多能造血干细胞增殖形成[11]。因而计数脾结节可检测小鼠造血干细胞的增殖能力。造血干细胞的增殖需要有HGF的作用，其中干细胞因子(SCF)对造血干细胞和早期祖细胞有刺激活性，IL-3也可刺激小鼠CFU-S的增殖[12]。我们给受致死剂量

表3 SGCM对照射小鼠骨髓有核细胞数的影响

组别	BMC数（/股骨） $\bar{x}\pm s$ （$\times10^6$）	P
NS（Ⅰ）	0.338±0.109	>0.05(Ⅰ:Ⅱ)
20%HS1640（Ⅱ）	0.495±0.299	<0.01(Ⅱ:Ⅲ)
♂SGCM（Ⅲ）	1.180±0.213	<0.01(Ⅱ:Ⅳ)
♀SGCM（Ⅳ）	1.260±0.476	>0.05(Ⅲ:Ⅳ)

维普资讯 http://www.cqvip.com

照射的小鼠输入正常小鼠BMC后，经腹腔分别注射♂SGCM、♀SGCM、生理盐水(NS)和20% HS1640，第九天杀鼠肉眼计数脾结节与称脾湿重，结果显示各组之间的脾结节数和脾湿重均无显著差异。但通过脾脏连续切片光镜下计数脾集落总数发现♂SGCM和♀SGCM组的脾集落生成数显著增加，说明♂SGCM和♀SGCM在体内对造血干细胞的增殖有明显的促进作用。可能通过SGCM中的HGF样物质发挥作用，但其机理还不清楚。

CFU-S是一个不均一的细胞群体，由不同年龄等级的亚群组成。有实验证明，不同亚群的CFU-S在生成脾集落数、形成脾集落类型、自我更新能力和对放射的敏感性等方面都有很大差异。有文献报道[13]，7～9天的CFU-S中可能存在一种趋向红系分化而对射线更敏感的亚群。我们对脾脏连续切片进行脾集落分类计数结果表明，体内注射♂SGCM或♀SGCM对CFU-S均表现为红系和红-巨核混合系分化促进作用，这两类脾集落数明显增高。这似乎说明在SGCM中促进红系和红-巨核混合系分化的HGF样物质占优势。

骨髓细胞(BMC)是由造血干细胞、祖细胞、形态可识别的各系原始和幼稚血细胞、少量成熟血细胞和基质细胞构成。其中90%以上的多能造血干细胞处于G_0期，必需经适当刺激因子作用才能进入增殖周期。我们用流式细胞技术观察了SGCM对正常BMC增殖周期的影响，结果表明：10%的♂SGCM能促进骨髓细胞由相对静止的时相(G_0/G_1期)进入增殖活跃时相($S+G_2/M$期)，但相同浓度的♀SGCM对正常骨髓细胞的促增殖作用不明显。此外，我们还发现，无论♂SGCM或♀SGCM均能使受辐射后引起骨髓抑制并接受正常小鼠BMC输注的小鼠股骨骨髓有核细胞数增加，这进一步表明SGCM中有能促进骨髓细胞有丝分裂的因子存在。我们以往的工作也发现，在SGCM中可能存在有促进造血祖细胞增殖的HGF样物质。

综上所述，SGCM对小鼠造血干细胞(CFU-S)的增殖有明显促进作用，尤其是对红系和红-巨核混合系的分化有刺激作用：SGCM还能增加受体小鼠的骨髓有核细胞数，♂SGCM还能促进正常小鼠静止期的BMC进入增殖活跃期。因此，小鼠颌下腺可能通过分泌造血生长因子样物质促进CFU-S的增殖和分化并加快骨髓细胞从静止期进入增殖周期，从而发挥造血调控功能。但颌下腺组织培养上清液中所含的造血调控物质的本质是什么仍不清楚。作为传统消化腺的颌下腺，其中含有数十种生物活性多肽，尤其是颌下腺可能作为肾外EPO的来源之一，通过内、外分泌两种方式影响机体功能，这使得我们必须重新认识颌下腺，除了传统的参与消化功能外，还有那些人们至今未知的生理功能，尤其是颌下腺与造血的关系，均是具有强烈挑战性的研究课题，正等待我们深入研讨。

参 考 文 献

[1] Sheridan JW, Stanley ER. Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor [J]. J Cell Physiol, 1971; 78(3): 451~460

[2] Shimizu M, Sato J,Ishii T, et al. Androgen induced production of colony-stimulating factor (CSF) and colony inhibitory factor (CIF) in the submandibular gland in female mice [J].JPharmacobiodyn, 1989; 12(6): 352~356

[3] Zangheri EO. Fava de Moraes F, Lopez OI, et al. The role of submandibular glands on extrarenal erythropoietin production [J]. Experientia, 1973; 29: 706~707

[4] Zangheri EO. Lopez OI, Honorato LE, et al. The role of submandibular glands on extrarenal erythropoietin production in mice [J]. Exp Hematol, 1977; 5(4): 237~240

[5] Clemons GK, De Manicor D, Fitzsimmons SL, et al. Immunoreactive erythropoietin studies in hypoxic rats and the role of the salivary glands [J]. Exp Hematol, 1987;15(1): 18~23

[6] Tam RC, Beawell J,Cotes PM, et al. Sexual dimorphism of erythropoietin-degrading activity in mouse submaxillary gland extracts [J]. Exp Hematol, 1989; 17(2):160~163

[7] Vidal A, Carcagno M, Criscuolo M, et al. Damage of tracer erythropoietin results in erroneous estimation of concentration in mouse submaxillary gland [J]. Exp Hematol, 1993; 21(2):299~302

[8] Beru N, McDonald J, Lacombe C,et al. Expression of the erythropoietin gene [J]. Mol Cell Biol, 1986; 6: 2571~2575

[9] Tatemoto Y, Mor M. Erythropoietin expressed in granular convoluted tubule cells of mice submandibular glands under hypoxia, anemia and nephrectomy [J]. Cell Mol Biol, 1991; 37(3): 261~277

[10]Hamilton DL, Cotes PM. The effect of the submandibular salivary gland on the erythropoietin response to hypoxia in mice with chronic renal failure [J]. Exp Hematol, 1994; 22(3): 256~260

[11] 唐佩弦，主编．造血细胞培养技术[M]．第1版.西安：陕西科学技术出版社，1985：147~148

[12] 陈文杰，主编．血液分子细胞生物学[M]．第1版．北京：中国医药科技出版社，1993；100~101

[13] 胡晓棠，周衍掀，李叔庚．多能造血干细胞(CFU-S)的不均一性[J]．湖南医科大学学报，1986；11(3)：205~210