维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1990年第15卷第4期

腹腔巨噬细胞培养上清液对小鼠红系造血调控的研究

组织胚胎学教研室 祝彼得 郭瑞清

提 要 本文研究了未刺激和经大肠杆菌内毒素(LPS)刺激的腹腔巨噬细胞培养上清液对小鼠红系造血的调控作用。结果提示：未刺激和经LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液对早期红系祖细胞 (BFU-E)均呈刺激作用，对晚期红系祖细胞 (CFU-E) 呈双向调控，即低浓度刺激，高浓度抑制。二者比较，LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液具有更高调控活性。实验还提示，腹腔巨噬细胞培养上清液具有促红细胞生成素 (EPO) 、BPA (Burst Promoting Activity)样活性

关键词 巨噬细胞；BFU-E；CFU-E；红系血发生；促红细胞生成素；BPA

单核巨噬细胞是血发生中重要的调控活性细胞，本文应用造血祖细胞体外培养技术，观察腹腔巨噬细胞培养上清液对小鼠红系血发生的调控，借以对血发生调控及某些血液病发病机理研究提供理论依据。

材料和方法

1. **动物** 8—12周龄$C_{57}BL/6J$雌性小鼠，体重18—24克，本校实验动物中心提供。

2. **腹腔巨噬细胞上清液的制备** 详见我们既往报告[1]。

3. **大肠杆菌内毒素(Lipopolysaccharides, LPS)** 卫生部北京生物制品研究所产品。用McCoy's培养液配成所需浓度。

4. **骨髓有核细胞(BMC)制备** 颈椎脱臼处死小鼠，取股骨，以RPMI-1640培养液冲出股骨的全部骨髓，反复吹打，过4号针头制成单细胞悬液，计数，调整细胞数至所需浓度。

5. **常规制备红系祖细胞(BFU-E和CFU-E)培养体系**[2]。

6. **实验方法**

(1) 将雌性小鼠随机分成四组，①对照组。②未刺激腹腔巨噬细胞上清液组。③LPS刺激上清液组。④LPS对照组。常规培养红系祖细胞(BFU-E和CFU-E)，分别于培养第七天和第三天，光镜下计算集落。

(2) 除无外源性EPO(Erythropoietin)或外源性BPA (Burst Promoting Activity)外，余同(1)。

(3) 除改变巨噬细胞上清液浓度外，余同(1)。探讨不同浓度腹腔巨噬细胞上清液对BFU-E和CFU-E的调控。

(4) 除使用不同培养时间未刺激腹腔巨噬细胞上清液外，余同(1)。探讨不同培养时间腹腔巨噬细胞上清液调控BFU-E和CFU-E的活性。

结 果

1. 腹腔巨噬细胞培养上清液对CFU-E的调控

(1) 腹腔巨噬细胞培养上清液在10% V/V浓度下对CFU-E呈刺激作用，LPS刺激上清液比未刺激上清液具有更高的调控活性，而LPS(0.02μg/ml)本身对CFU-E无明显作用。[表1]

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 巨噬细胞上清液(10%)对CFU-E的调控

组别	n	CFU-E(集落/5×10⁴BMC) $\bar{X}\pm s_{\bar{x}}$	P
对照组(1)	11	129.27±15.05	
未刺激上清液(2)	11	167.09±23.70	<0.01 (2):(1)
LPS刺激上清液(3)	11	186.55±23.44*	<0.01 (3):(1)
LPS对照组(4)	9	113.88±9.98	<0.01 (4):(1)

* LPS刺激上清液与未刺激上清液比(3:2) P<0.05

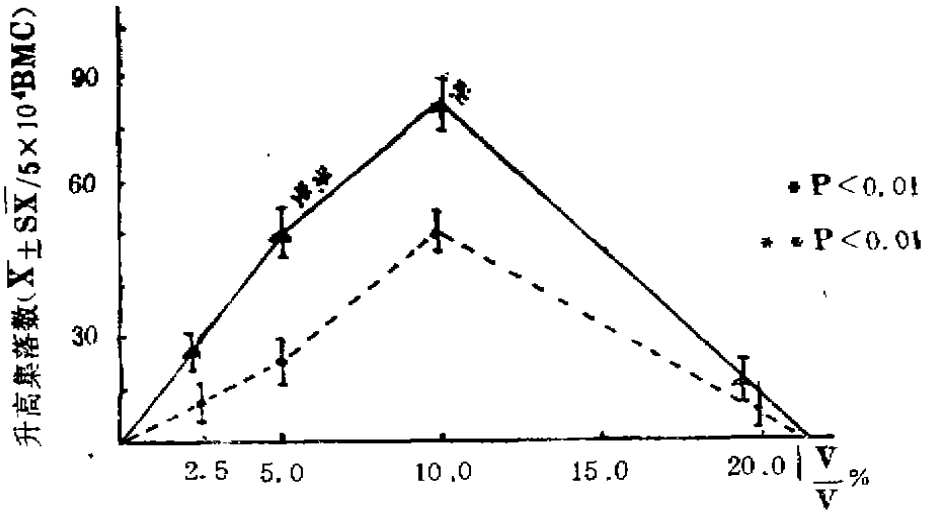
表2 巨噬细胞上清液(10%)对CFU-E的调控（无外源性EPO）

组别	n	CFU-E(集落/5×10⁴BMC) $\bar{X}\pm s_{\bar{x}}$	P
对照组(1)	13	32.08±8.00	
未刺激上清液(2)	14	52.07±5.90	<0.01 (2:1)
LPS刺激上清液(3)	14	89.54±17.67*	<0.01 (3:1)

* LPS刺激上清液与未刺激上清液比(3:2) P<0.01

（2） 无外源性EPO时，腹腔巨噬细胞培养上清液（10%V/V）对CFU-E呈明显促进作用，LPS刺激上清液比未刺激上清液具有更高的调控活性。提示腹腔巨噬细胞上清液中有EPO样活性。[表2]

（3） 不同浓度腹腔巨噬细胞培养上清液对CFU-E的增殖呈双向调控作用，低浓度促进CFU-E增殖，当浓度达20%时，对CFU-E的增殖呈抑制作用。LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液对CFU-E的调控活性明显高于未刺激上清液(P<0.01)。(图1)



实线示LPS刺激巨噬细胞上清液　　虚线示未刺激巨噬细胞上清液

图1 不同浓度腹腔巨噬细胞培养上清液对CFU-E的调控

（4） 不同培养时间未刺激腹腔巨噬细胞培养上清液对CFU-E表现出不同的调控活性，在一定时间内，随培养时间的延长，活性渐增强。[表3]

2. 腹腔巨噬细胞培养上清液对BFU-E的调控

（1） 腹腔巨噬细胞培养上清液在10%(V/V)浓度下，对BFU-E呈刺激作用，LPS刺激上清液比未刺激上清液具更高调控活性，而LPS(0.02μg/ml)本身对BFU-E无明显作用。[表4]

（2） 无外源性EPO时，BFU-E数目明显下降，但腹腔巨噬细胞培养上清液对BFU-E表现促进作用，LPS刺激上清液比未刺激上清液具更高调控活性。[表5]提示BFU-E的增殖在一定程度上依赖EPO的存

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 不同培养时间未刺激腹腔巨噬细胞培养上清液(10%)对CFU-E的调控

培养时间（天）	CFU-E(集落/5×10⁴MC) n	$\bar{X}\pm sx$	P
0 (1)	16	79.13±8.17	
1 (2)	16	82.13±12.36	>0.05(2:1)
2 (3)	16	118.75±11.98	<0.01(3:1)
4 (4)	16	136.31±12.65*	<0.01(4:1)
7 (5)	11	167.09±23.70**	<0.01(5:1)

* 第4天上清液与第2天上清液比(4:3)P<0.01

** 第7天上清液与第4天上清液比(5:4)P<0.01

表4 腹腔巨噬细胞培养上清液(10%)对BFU-E的调控

组别	BFU-E(集落/5×10⁴BMC) n	$\bar{X}\pm sx$	P
对照组(1)	19	33.53±6.32	
未刺激上清液(2)	18	51.78±14.65	<0.01(2:1)
LPS刺激上清液(3)	19	66.16±18.00*	<0.01(3:1)
LPS刺激对照组(4)	11	35.73±8.91	>0.05(4:1)

* LPS刺激上清液与未刺激上清液比(3:2)P<0.01

在；腹腔巨噬细胞培养上清液中含有EPO样活性。

表5 腹腔巨噬细胞培养上清液(10%)对BFU-E的调控（无外源EPO）

组别	BFU-E(集落/5×10⁴BMC) n	$\bar{X}\pm sx$	P
对照组(1)	9	1.56±1.13	
未刺激上清液(2)	11	5.64±2.20	<0.01 (2:1)
LPS刺激上清液(3)	11	17.36±2.80	<0.01 (3:1)

* LPS刺激上清液与未刺激上清液比(3:2)P<0.01

（3） 无外源性BPA时，BFU-E数目明显下降，但腹腔巨噬细胞培养上清液对BFU-E增殖呈明显刺激作用，与未刺激巨噬细胞上清液相比，LPS刺激上清液具有更高刺激活性。[表6]提示BPA为BFU-E增殖所必需；巨噬细胞培养上清液中含有BPA样活性。

（4） 不同浓度腹腔巨噬细胞培养上清液对BFU-E的增殖呈刺激作用，随巨噬细胞培养上清液浓度的升高，BFU-E产率随之增高；与未刺激巨噬细胞上清液相比，LPS刺激上清液对BFU-E具更高刺激活性。

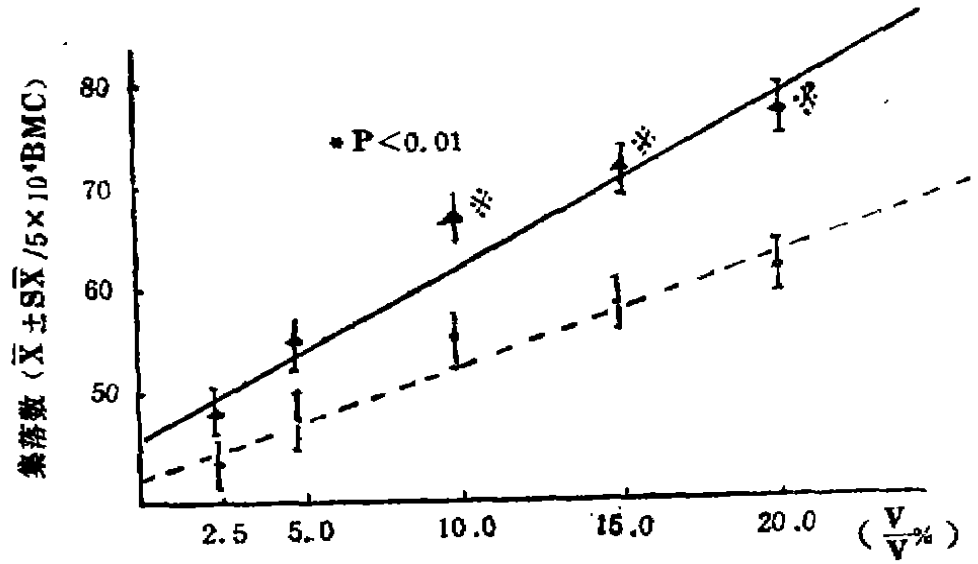


图2 不同浓度腹腔巨噬细胞培养上清液对红系BFU-E的调控

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 6　腹腔巨噬细胞培养上清液(10%)对BFU-E的调控（无外源BPA）

组　别	BFU-E(集落/5×10⁴BMC) n	$\bar{X}\pm sx$	P
对照组(1)	15	6.37±2.43	
未刺激上清液(2)	15	13.80±2.27	<0.01(2:1)
LPS刺激上清液(3)	14	21.98±4.33	<0.01(3:1)

* LPS刺激上清液与未刺激上清液之比(3:2)P<0.01

[图2]

（5）不同培养时间未刺激腹腔巨噬细胞培养上清液对BFU-E表现出不同的调控活性，一定时间内，随培养时间的延长，活性渐增强。[表7]

表 7　不同时间培养未刺激腹腔巨噬细胞培养上清液(10%)对BFU-E的调控

培养时间(天)	BFU-E(集落/5×10⁴BMC) n	$\bar{X}\pm sx$	P
0(1)	13	1.77±0.93	
1(2)	13	1.54±0.88	>0.05(2:1)
2(3)	13	7.69±1.80	<0.01(3:1)
4(4)	13	14.62±2.69*	<0.01(4:1)
7(5)	18	61.78±14.55**	<0.01(5:1)

* 第4天上清液与第2天上清液比(4:3) P<0.01

** 第7天上清液与第4天上清液比(5:4) P<0.01

讨　论

单核巨噬细胞是构成造血微环境的重要细胞成分，是血发生的重要调控活性细胞之一[3]。巨噬细胞来源于骨髓造血干细胞，又反过来影响造血细胞的发生与分化。

形态学研究发现，无论是在体或体外培养时，骨髓中幼稚红细胞总是围绕着巨噬细胞，形成红血细胞岛[4,5]。近期，Lambertsen通过电镜观察提供了巨噬细胞和拟造血干细胞之间存在相嵌连接的证据[6]，笔者近年的工作亦曾证明，巨噬细胞与红系、粒系和淋巴系细胞之间存在相嵌连接等细胞连接结构[5]。以上实验证据提示，在红系血发生过程中，巨噬细胞可能有着重要作用。但不同学者对单核巨噬细胞与红血细胞发生的研究结论各异，有报告呈刺激作用[7-9]；有报告显抑制作用[10,11]；有学者认为是双向调节，即低浓度促进，高浓度抑制[12,13]；还有学者认为无调节作用[14]。本研究观察小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液对红系早、晚期祖细胞增殖的调控，实验结果表明：无论是未刺激腹腔巨噬细胞还是LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液，对BFU-E均呈刺激作用，对CFU-E呈双向调控作用，即低浓度表现刺激作用，高浓度则呈抑制作用。二者相比，以LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液作用更强。从而，为血发生过程中细胞调控机制及临床某些血液病发病机理的研究，提供了有价值的理论依据。

局部微环境的近距离调控，在造血干细胞增殖、分化调控中有着十分重要的作用；而体液因子的远距离调控，则多发生于造血祖细胞阶段以及更进一步分化的骨髓前体细胞。实验证明，在祖细胞阶段已相继出现对调节因子起反应的多种受体，如BPA受体、EPO受体等，众所周知，EPO和晚期红系祖细胞CFU-E的增殖密切相关，BPA则与早期红系祖细胞BFU-E增殖关系密切。我们的实验提示，腹腔巨噬细胞培养上清液含有EPO样活性物质（表2.5）和BPA样活性物质(表6)，刺激CFU-E和BFU-E的增殖。我们的实验还证明，在一定时间内，随着培养时间的延长，腹腔巨噬细胞培养上清液中刺激红系早、晚期祖细胞增殖活性也随之增加(表3.7)。此外，有学者提出，巨噬细胞可以分泌EPF(Erythroid Promoting Factor)、BFA(Burst Feeder Activity)、造血细胞生长因子(Hemopoietic Cells Growth Factor, HCGF)、红系促进活性(Er-

维普资讯 http://www.cqvip.com

ythroid Promoting Activity, EPA) 和前列腺素E (PGE) 等促进红血细胞发生。单核巨噬细胞还可产生单核细胞因子(monokines)刺激内皮细胞及其它细胞分泌红系促进因子[8,15-21]。这些因子在本实验中的作用尚有待进一步探讨。

我们的实验表明：腹腔巨噬细胞培养上清液中具有某些抑制活性，在高浓度时(20% V/V) 对CFU-E呈抑制作用，其具体机理不明。日本学者认为，单核巨噬细胞在代谢过程中所产生的活性氧基团(O_2^-, H_2O_2)可抑制红系祖细胞的增殖[22]，亦有学者认为某些调控因子在不同浓度时可以刺激不同的细胞产生性质不同，甚至调控作用完全相反的活性因子，同一种因子对不同细胞可以表现为不同的调控活性，如对一类细胞表现为正调控，而对另一类细胞表现为负调控。

在实验中，我们选用LPS作为巨噬细胞激活剂。LPS是革兰氏阴性细菌内毒素的主要成分，它有许多生物学效应。有实验证明，LPS可以促进单核巨噬细胞分泌白细胞介素(Interleukin-1)、集落刺激因子(CSF)、r-干扰素 (Interferon)以及前列腺素等多种生物活性介质，通过这些介质对造血祖细胞的增殖分化表现出复杂的调控活性[23,24]。我们的实验提示LPS可以刺激巨噬细胞产生EPO和BPA样因子，而LPS本身对造血祖细胞似无明显刺激作用，这对于认识单核巨噬细胞在刺激状态下对血发生的影响及临床急、慢性感染与造血功能的关系有一定意义。

至于不同学者报告的单核巨噬细胞对红系血发生调控所表现出的结果不一致，我们推测，这可能与各实验室所选用的实验动物，血清种类、来源及用量不同，实验条件以及单核巨噬细胞功能异质性等因素有关。单核巨噬细胞是结构不一、功能复杂、具有异质性的细胞群体，不同来源的巨噬细胞及同一来源不同功能状态巨噬细胞其溶酶体含量、吞噬能力、F_c受体活性及分泌功能均不完全相同。因此，不同来源的巨噬细胞在造血调控中作用是否相同，正在进一步研究之中。

综上所述，我们的资料提示：未刺激和LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液对BFU-E均呈刺激作用，对CFU-E的增殖呈双向调控作用，低浓度表现刺激作用，高浓度则呈抑制作用。与未刺激上清液相比较，LPS刺激腹腔巨噬细胞培养上清液对红系血发生的调控活性更高。据此，结合我们和其它学者既往的工作，我们推测，巨噬细胞对造血的调控除细胞间相互作用外，尚可通过分泌生物活性因子发挥其作用。

参 考 文 献

[1] 郭瑞清，等．重庆医科大学学报 待发表
[2] 黄干，等．中华血液学志 1990; 11(2):66
[3] 祝彼得．国内外医学科学进展 1986; 139-14
[4] 祝彼得．等．中华血液学杂志 1986; 7(4):211
[5] 祝彼得．等．解剖学杂志，1988; 11:320
[6] Lambertsen RH, et al. Blood, 1984; 63(5):1225
[7] Jeutrey M, et al. Br. J. Haematol 1983; 53:361
[8] 唐佩弦，等．陕西科学技术出版社 1985; 35
[9] 祝彼得．等．国外医学《输血与血液分册》1988; 11:31
[10] John J, et al. J. Clin. Invest 1978; 62:979
[11] 奚永志，等．国外医学《输血与血液分册》1987; 10:159
[12] Nelson DS. Immunobiology of macrophage Academic Press 1976; 91
[13] Herbert B,et al. Anual Allergy 1985; 55:634
[14] 朱壬森，等．实验生物学报 1982; 15(2):169
[15] Joao I, et al. Blood 1981; 51(7):170
[16] Schrear, et al. Nature 1980; 287:228

维普资讯 http://www.cqvip.com

[17] Kenneths, et al. J. Clin. Invest 1985; 75:722

[18] Broudy K, et al. Clin. Res. 1984; 32:305

[19] Kurland, et al. J. Exp. Med. 1987; 147:952

[20] Peter PD, et al. J. Lab. & Clin. Med. 1973; 82(6):704

[21] Managan K, et al. Exp. Hematol 1980; 8:717

[22] Masarito, et al. Acta Hematol Japan 1986; 9:1140

[23] Morrison, et al. Ann. Rev. Med. 1987; 38:417

[24] Ortega J, et al. Exp. Hematol. 1979; 7:145

STUDY FOR REGULATION OF MOUSE ERYTHROPOIESIS BY SUPERNATANTS OF CULTURED PERITONEAL MACROPHAGE

Zhu Bide, et al

(DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY)

The effect of cultured supernatants of non-stimulated and LPS-induced peritoneal macrophages on erythropoiesis in $C_{57}BL/6J$ mice was studied by using the techniques of culture of hemopoietic progenitor cells in vitro. Our results indicate that(1)BFU-E growth is enhanced significantly after addition of either non-stimulated or LPS-induced supernatants of peritoneal macrophages; (2) the supernatants present positive and negative feedback control on CFU-E, growth-low concentration supernatants stimulate CFU-E and high concentration supernatants present inhibition; (3) the LPS-induced supernatants of peritoneal macrophage show stronger activities than non-stimulated supernatants to the proliteration of both BFU-E and CFU-E and(4)the supernatants of the cultured peritoneal macrophage may contain EPO-like, BPA-like stimulating activities, which regulate the proliferation of both BFU-E and CFU-E.

KEY WORDS Macrophage; BFU-E; CFU-E; Erythropoiesis; Erythropoietin; BPA

简　讯

《医药信息论坛》简介

原《中国医学论坛报》、《医药信息报》经上级批准，于1991年1月合并，改名为《医药信息论坛》报，该报英文名《China Medical Tribune》由卫生部主办、主管。

《医药信息论坛》为周报，每逢周四出版，地址在北京，后海北沿15号，邮政编码100009，读者对象为临床第一线医师、药师、医疗卫生机构管理人员、药厂、药品经营部门、医药院校师生和科研人员。

该报由人民日报印刷厂印刷，四开八版，彩色胶印，每份0.24元，国内外公开发行，全国各地邮局均可订阅。报纸代号81-2刊号CN11-0017。

（科研处　周永华）