DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.01.018

技术与方法

大白鼠骨髓粒系祖细胞(GM-CFU-C)的体外琼脂培养

郭朝华 罗成基 施 炎 陈世旭 伍 军（卫防系 防原医学教研室）

目前对多种动物的粒系祖细胞（GM-CFU-C）测试技术研究和应用日趋广泛。但是，迄今对大鼠骨髓GM-CFU-C体外琼脂培养的研究方法国内未见公开报道，国外有关文献也为数不多。我们在小白鼠骨髓GM-CFU-C体外琼脂培养方法的基础上[1][2]，进行了较系统的探索，初步建立起一种较稳定而简便的大鼠骨髓GM-CFU-C体外琼脂培养方法，为利用大鼠作为模型，研究粒系造血的有关问题提供一个重要的途径。

材料与方法

实验动物：大白鼠、雄性，体重180～200g，由本校动物所繁殖。

培养液：日本RPMI-1640组织培养粉按常规方法配制，调节pH至8.0～8.6经察氏漏斗过滤除菌后置4℃保存。

马血清：取健马全血，分离出血清置－20℃保存。

细胞团刺激因子：取正常小鼠的肌组织，经过培养液漂洗后剪碎，将约1 g肌组织，置于30ml无菌的培养瓶中，加入7 ml1640培养液、2 ml马血清，经过37℃培养7天后，收集上清液，－20℃冰箱保存。

骨髓细胞悬液的制备：将大鼠脱颈处死，放入75%的酒精内浸泡2分钟，剥离一侧股骨，用10ml 1640培养液冲出全部骨髓，打匀后计数有核细胞数。

培养体系的建立：取30ml试剂瓶1只，加入1640液4.2ml、马血清2 ml和一定量的骨髓细胞悬液，使每ml培养体系内含10^5个有核细胞，摇匀后置37℃水浴箱预热10～15分钟，然后加入0.4ml 60℃的琼脂，用1ml注射器抽打混匀，每培养皿滴入1.0ml培养体系。每实验组4～5皿，轻轻摇匀。随后加4滴小鼠肌浸液轻匀。最后将培养皿移入盛有少许蒸馏水的培养器（以干燥器代替）内，用凡士林将培养器严格密封通入5%CO_2气体1分钟，置37℃恒温箱内孵育5天。以≥30个细胞组成的细胞团定为一个GM-CFU-C。

结果与讨论

一、正常值

30只正常大鼠骨髓的GM-CFU-C测定结果，分别为49.2±1.5/0.5×10^5BMC，103.8±4.9/1×10^5BMC，163.5±3.3/1.5×10^5BMC，199.8±5.4/2×10^5BMC，平均每1×10^5个骨髓细胞形成细胞团102.8±3.2/10^5BMC（表1），将接种细胞数为横座标，GM-CFU-C数目为纵座标作图，可见所接种的细胞数与GM-CFU-C数呈良好的线性关系（图1），说明本方法是可靠的。

二、方法学特点

国内外许多研究工作者，分别对人，狗，小鼠，豚鼠的GM-CFU-C培养作了大量的研究工作[2][4][5][6][7]，我们应用类似的培养技术，研究了大鼠骨髓GM-CFU-C的体外培养条件。实验结果表明，大鼠GM-CFU-C培养方法具有如下特点：

一、培养基的pH值：用同样的培养基（1640），在相同培养时间和温度下，培养

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

表1　30只正常大鼠骨髓GM-GFU-C体外琼脂培养结果

接种细胞数/皿	样品数	GM-CFU-C/皿 ($\bar{X}\pm SD$)	GM-CFU-C/10^5BMC ($\bar{X}\pm SD$)
0.5×10^5	20	49.2±1.5	98.4±3.0
1.0×10^5	86	103.8±4.9	103.8±4.9
1.5×10^5	19	163.5±3.3	109.0±2.2
2.0×10^5	57	199.8±5.4	99.9±2.7

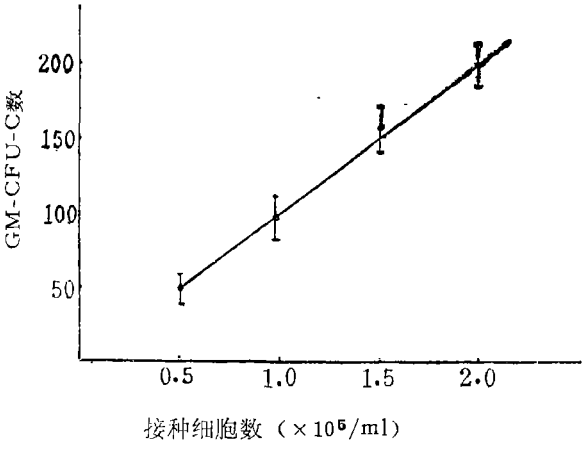


图1　接种细胞数与GM-CFU-C数的关系

大鼠及小鼠骨髓GM-CFU-C，当pH为7.2～7.4时，小鼠细胞团生长良好，致密GM-CFU-C为141.8±2.8/10^5 BMC，而大鼠GM-CFU-C仅为29.1±2.8/10^5 BMC，且细胞团不典型，疏散。但当pH为8.0～9.5时，大鼠细胞团生长密集，典型。GM-CFU-C达103.4±5.0/10^5 BMC；而小鼠GM-CFU-C则为2.6±1.7/10^5 BMC（表2）。

体外培养大鼠骨髓GM-CFU-C，其培养基pH值不仅影响细胞生长，而且直接影响细胞团生成的数目。从我们实验结果可见

表2　不同pH值对GM-CFU-C生长的影响

动物品种	培养基	样品数	pH值 7.2～7.4	pH值 8.0～9.5
大　鼠	1640	25.0	9.5±1.5	70.0±2.5
		24.0	36.8±2.4	126.0±4.1
		25.0	40.8±4.6	114.2±8.4
		24.7	29.1±2.8	103.4±5.0
小　鼠	1640	23.0	133.6±1.5	2.2±1.4
		21.0	150.0±4.1	3.0±1.9
		22.0	141.8±2.8	2.6±1.7

注：表内数字为$\bar{X}\pm SD$

pH=7.2～7.4时，对大鼠骨髓GM-CFU-C生长是不利的，当pH值8.0～9.5时大鼠细胞团生长密集丰盛。据有关文献报导[8]，在大鼠淋巴细胞转化试验和染色体标本制作时，其培养基的pH值同样需要提高，才能获得满意的结果。这一现象说明进行大鼠细胞培养时，其培养基的pH值以碱性环境为适宜，其中包括大鼠骨髓GM-CFU-C培养，至于大鼠骨髓GM-CFU-C体外培养，为何适宜碱性环境（pH8.0～9.5）生长，其机理有待进一步探索。

2．细胞团刺激因子（CSF）：有关大鼠GM-CFU-C培养的CSF制备，文献报导较少，Bradley曾介绍在培养体系内附加

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

胎牛血清、成牛血清及大鼠新鲜血清等[3]。同时骨髓需用沉降法处理，其培养体系复杂，方法繁琐。我们使用小鼠肌浸液作大鼠骨髓GM-CFU-C体外培养的CSF，能够得到满意的效果，其活性超过大鼠肌浸液，细胞团数目明显增加（表3）。

表3 不同肌浸液对大鼠骨髓GM-CFU-C形成能力的影响

批次	CFU-C/1×10⁵BMC($\bar{X}$±SD)	
	小鼠肌浸液	大鼠肌浸液
1	126.0±4.1	69.3±5.1
2	115.5±2.2	81.0±10.7
3	87.3±12.0	74.0±20.0
4	107.0±2.1	77.8±2.3
5	133.0±3.4	102.6±2.5

同时我们制备的肌浸液，在冰冻条件下可长期保存，多次使用。骨髓不作任何处理直接培养，简化了操作步骤，培养体系组成也较简单。

骨髓GM-CFU-C培养时，必须有细胞团刺激因子（CSF）的参与，经过5～6天的体外培养，才能生成粒系细胞组成的细胞团（GM-CFU-C）。然而CSF是GM-CFU-C体外培养中必不可少的条件，同时对培养结果的成败也起着决定性的作用，因此选择好CSF是培养中关键的问题之一。文献报导[9][10]除猴骨髓外，一般使用同种肌浸液的CSF培养GM-CFU-C的效果最好，CSF有着一定的种属特异性。这一论点与本实验是相符的。我们将大鼠肌浸液的CSF作小鼠骨髓GM-CFU-C时，其刺激作用不如小鼠肌浸液CSF的活力，但大鼠肌浸液的CSF作大鼠骨髓GM-CFU-C时，活力又不如小鼠肌浸液的CSF。这一现象与文献报导[10]猴血清能作人骨髓GM-CFU-C培养时的CSF，但猴血清的CSF来作猴骨髓GM-CFU-C时，其活力不如作人骨髓GM-CFU-C的活力，这一现象与本实验结果相一致。所以我们认为，在哺乳动物中，还应除大鼠骨髓外，一般使用同种肌浸液的CSF来培养GM-CFU-C。

二、两个重要环节

大鼠GM-CFU-C体外培养除了具有上述的方法学特点外，在培养过程其中二个环节也是非常重要的。

1．培养器的密封：在没有CO_2培养箱的条件下，密封状况的好坏将直接影响着CFU-C的数目（表4），因此，在密封培养器时，应将凡士林均匀涂抹在培养器的磨面上；尽力旋转磨动培养器盖子，直至磨面中的汽泡完全消除，否则应重新再密封。

表4 培养器密封状况对大鼠骨髓体外琼脂培养CFU-C生长的影响

培养皿数	CFU-C/10⁵BMC(X±SD)	
	培养器密封不严	培养器密封严
9	15.8±2.1	127.2±1.8
10	35.2±1.5	107.3±1.4
10	22.7±2.3	118.7±4.8

2．马血清：不同批号的血清对大鼠骨髓GM-CF-UC生长均有着不同程度的影响，本实验比较了4匹健马及一匹骡血清（表5）。结果表明健马与骡之间或不同健马之间其血清对大鼠骨髓GM-CFU-C体外琼脂培养GM-CFU-C的差异是很悬殊的。因而GM-CFU-C培养时需要选择活性优质

表5 不同批号血清对大鼠骨髓体外琼脂培养CFU-C生长的比较

血清种类	样品数	CFU-C/10⁵BMC($\bar{X}$±SD)
马—1	5	147.4±3.0
马—2	5	91.2±3.5
马—3	5	125.0±1.7
马—4	5	19.0±1.6
骡	5	14.6±1.8

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

马血清方能取得满意结果。

（本文承蒙陈宗荣教授、郑景熙副教授审修，特此致谢！）

参 考 文 献

1. 程伊洪，等。小鼠骨髓造血干细胞(CFU-S，CFU-C)的性质和功能研究。军事医学科学院院刊 1979；4:407～411
2. 吴祖泽。造血细胞动力学。科学出版社，1978
3. Bradley TR and Siminowicz R. Colony growth of rat bone marrow cell in vitro. Aust J Exp Biol, Med Sci 1968; 46:595
4. Metcalf D. Techniques for the clonal culture of hemopoietic cells in semisold medium in "Hemopoietic colonies" (in vitro cloning of normal and leukemic cells) chapter 1977:3
5. Moore MAS, et al. Report of a workshop on standardization of selective culture for normal and leukemic cells.Br J Cancu 1977; 35:500
6. Debelar-Fehir KM, et al. Exp Hemat 1975; 3:109
7. Moore MAS and Williams N. Analysis of proliferation and differentiation of foetal granulocyte macrophage progenitor cells in haemopoietic tissue cell. Tissue Kinet 1973; 6:461～476
8. 罗丽华，等。大鼠 (Rattus norvegicus) 微量血培养和染色体标本制作的方法。动物学研究1980；3:303～311
9. 葛忠良，等。肌培养液对人骨髓细胞培养的成团作用。军事医学科学院院刊 1981；1:57～61
10. Pike and Robinson. Human Bone Marrow colony Growth in Agar culture. J Cell Physiol 1970; 76:77

新型配液针头的研制及临床应用

王翠凤（第三附属医院 普外科）

静脉输液前的液体配制工作一般是用市售18号针头来完成的。在工作中，我们发现，原用作配液的市售18号针头在穿透橡皮瓶塞时常切割橡皮瓶塞，易造成：（1）配液时针头堵塞，且易污染；（2）被切割下来的橡皮碎块进入液体中，随液体输入血管内，作为异物可能形成栓塞；（3）未进入血管内的橡皮碎块亦可能堵塞静脉输液针头；（4）交换液体时，由于输液器上的针头堵塞，须更换输液器，给工作增添了麻烦。

为了克服以上弊端，我们研制了一种新型配液针头。经过200次反复的实验和临床应用，效果满意，现介绍如下：

一、新型配液针头的简介

新型配液针头的设计特点：1.在外径同市售18号针头粗细的钢管距针尖10mm处，钻成 ϕ 0.5～0.7mm、透过双壁的2个孔；针尖呈圆锥封闭型。

2. 钻孔后均应除毛刺和抛光。

3. 材料为不锈钢（1铬18镍9钛）。

二、实验结果和分析

在同类橡皮瓶塞上用市售18号针头和新型配液针头分别作穿透对比，结果如下：

原配液用市售18号针头在穿透橡皮瓶塞200次后产生的橡皮碎块数分别是：注射器内35块；输液瓶内14块；堵塞针头12次。而采用新型配液针头在穿透橡皮瓶塞200次后无论是注射器内还是输液瓶内均无一例有橡皮碎块，亦无一例堵塞针头。

因此，可以认为：新型配液针头基本解决了以往用市售18号针头配液时造成的橡皮碎块带入液体中或针头堵塞的现象，同时也不影响进针锐度和配液速度，临床试用效果满意，值得推广。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

六氮缩品红作偶联剂显示酸性磷酸酶的效果 （正文见第84页）

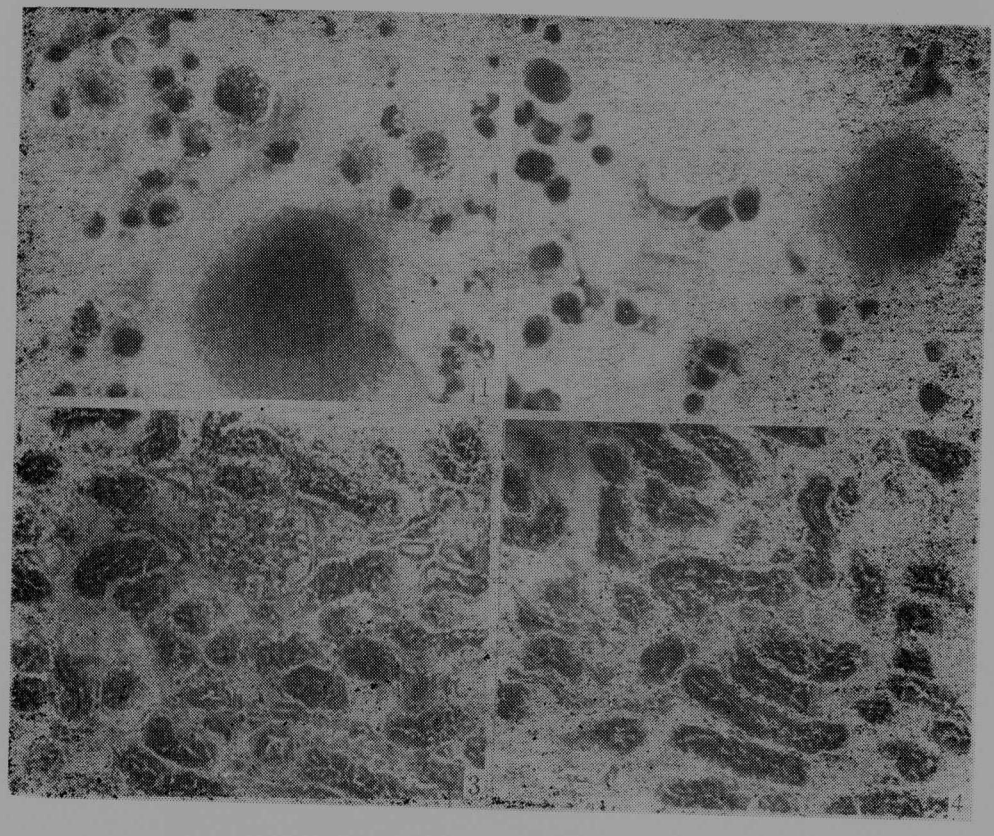


图1　骨髓涂片，六氮缩品红作偶联剂显示的ACP　×960
图2　骨髓涂片，六氮缩副品红作偶联剂显示的ACP　×960
图3　肾脏恒冷切片，六氮缩品红作偶联剂显示的ACP　×143
图4　肾脏恒冷切片，六氮缩副品红作偶联剂显示的ACP　×143

大白鼠骨髓粒系祖细胞（GM-CFU-C）的体外琼脂培养 （正文见第62页）

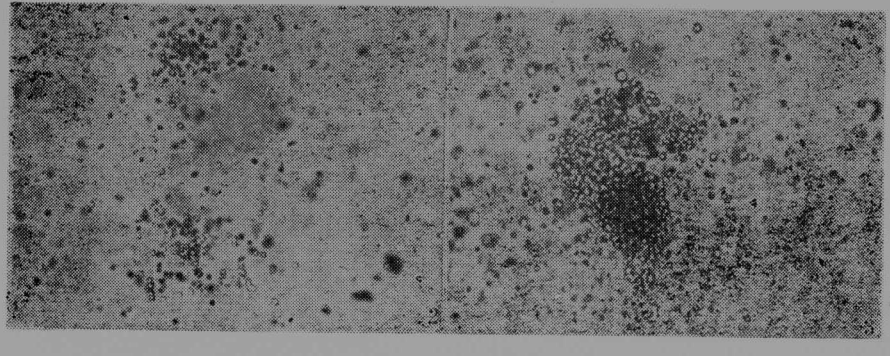


图2　培养基的pH值在7.2～7.4时，大白鼠骨髓GM-CFU-C形态，×400
图3　培养基的pH值在8.0～9.5时，大白鼠骨髓GM-CFU-C形态，×400

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n