

人尿集落刺激因子对受照射小鼠存活的影响

汪 涛 王洪云 张军宁

(苏州医学院, 苏州 215007)

摘要 本实验证明人尿集落刺激因子(CSF)能明显地提高受照射小鼠存活率, 并延长存活时间。用微孔板有限稀释法培养粒细胞证明人尿 CSF 能维持外周血粒细胞存活, 且存活细胞数与 CSF 浓度有密切关系。在含有人尿 CSF 的条件下, 骨髓粒-巨噬细胞存活数(CFU-GM)在培养 12 d 时较培养 8 d 者增多。

关键词 集落刺激因子(CSF), 细胞存活, 粒-巨噬细胞集落(CFU-GM), 造血功能

集落刺激因子(CSF)能刺激造血祖细胞增殖分化^[1-4], 其临床应用日趋广泛。重组的和部分纯化的天然 CSF 对造血细胞有放大作用, 使单核、中性和嗜酸细胞增殖。以外周血成熟粒细胞存活率作为造血因子的试验指标, 比琼脂培养物中集落形成的标准方法敏感 100~1000 倍^[6], 并可在 24 h 完成培养, 从而有可能为临床找到新的有效的诊断和治疗方法。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验动物与照射条件

选用昆明种雄性小鼠, 体重 18~20 g, 用 ^{60}Co γ 射线照射 7 Gy, 水平距离 3 m, 剂量率为 1 Gy/min。实验分为 3 组: (1) 生理盐水(对照组)、(2) 胎肝裂解物(FL 组)、(3) CSF 组。每组 12 只小鼠, 在照射后 3 h、3 d、5 d 和 10 d, 各组动物分别经腹腔注射 0.2 ml 相应溶液, 并在各不同时间从尾静脉采血, 计数外周血白细胞数, 并作动物存活率统计。

1.2 CSF 制备^[5]

将正常人尿用 K-9 型高岭土吸附, 用硫酸铵沉淀, 沉淀物用磷酸缓冲液溶解, 经 Sephadex G-75 和 DE-32 层析柱分离, 分管收集, 抽滤除菌, 备用。

1.3 CFU-GM 培养

另取 3 只雄性小鼠, 乙醚麻醉下股动脉放血, 经用碘酒、酒精消毒后, 摘取股骨, 用 5 ml RPMI 1640 培养基, 冲出全部骨髓有核细胞, 计数。骨髓细胞在扩散盒中采用半固体培养法测定 CFU-GM^[7]。培养体系为 RPMI 1640 培养基加入 200 u/ml CSF, 0.3% 琼脂、骨髓细胞 1×10^5 个/0.2 ml 培养物, 在 CO_2 培养箱内 37℃ 下孵育, 在不同时间, 用 Olympus 倒置显微镜计数大于 50 个细胞的集落, 并制片, Wright-Gimsa 染色, 观察粒细胞分化情况。

1.4 外周血粒细胞分离

江苏省科委资助课题

收稿日期: 初稿 1994-03-28, 修改稿 1994-08-09

受照射小鼠外周血肝素抗凝,用18%右旋糖苷分离,获得白细胞,预先在离心管中加入3 ml 淋巴细胞分离液,将分离的白细胞加于其上,离心10 min, 3000 r/min,收集底层细胞,用不完全培养液洗涤2次,即粒单细胞,最后悬浮于完全培养液中,计数,备用。分离的外周血粒细胞进行涂片, May-Grüawald 染色,测定粒细胞的比例。

1.5 粒细胞微孔板有限稀释培养法

用96孔组织培养板,每孔加入0.2 ml RPMI 1640 培养基,其中含15%小牛血清, 2×10^{-3} mol/L 谷氨酰胺,青霉素100 u/ml,链霉素100 μ g/ml, 5×10^{-5} mol/L 二巯基乙醇及CSF的系列稀释液,然后加入200个分离的粒细胞。在5%CO₂培养箱内37℃下孵育24 h后,用倒置显微镜计数3~5个复孔中的细胞数。每孔中各加1滴台盼蓝,10 min后测定细胞拒染色能力。

2 结 果

2.1 人尿 CSF 对受照小鼠存活率的影响

受7 Gy γ 射线照射的小鼠,分为FL、CSF和对照三个实验组,每组12只小鼠,在照射后30 d观察期内,FL组动物存活1只,CSF组存活7只,对照组存活1只(见图1),CSF组动物存活数明显高于另两组。存活时间,对照组为15.5 d,FL组18.1 d,CSF组为25 d。CSF组比对照组存活时间明显延长,表明它对受照小鼠提高存活率、延长存活时间作用显著。

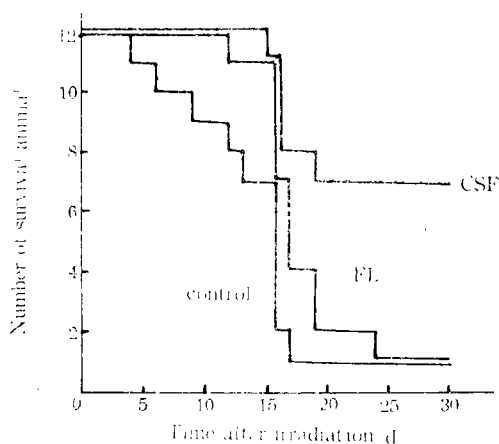


Fig 1. Effect of CSF on survival of irradiated mice

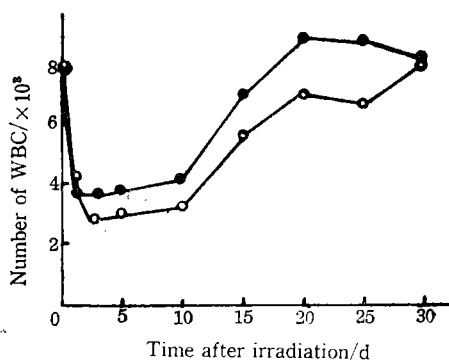


Fig 2. Effect of CSF on WBC in mice irradiated by 7 Gy (●) CSF (○) control

2.2 人尿 CSF 对受照动物外周血有核细胞数的作用

电离辐射作用后动物造血功能受到严重抑制,导致细胞数量急剧减少。从两批重复实验数据合并处理的结果分析,照射后第1 d和3 d时降到最低,10 d以后逐渐回升。给予CSF组的动物外周血WBC数与对照组相比,从第5~25 d都明显增高,在30 d时,两组WBC总数都恢复到照前水平(见图2)。

2.3 人尿 CSF 对体外培养的成熟粒细胞存活的影响

照后30 d仍存活的小鼠、将其外周血粒细胞分离,培养于96孔培养板中,CSF按等比稀释法依次加入各孔,每孔200个细胞/0.2 ml培养基,在5%CO₂培养箱中37℃下培养24 h后,进行细胞计数。结果表明,CSF能够使外周血成熟粒细胞维持存活,CSF稀释倍数增加时,存活

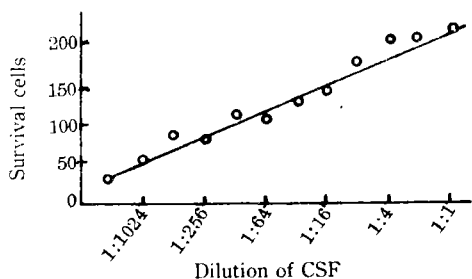


Fig 3. Dose-response relationship between CSF concentration and granulocytes survival

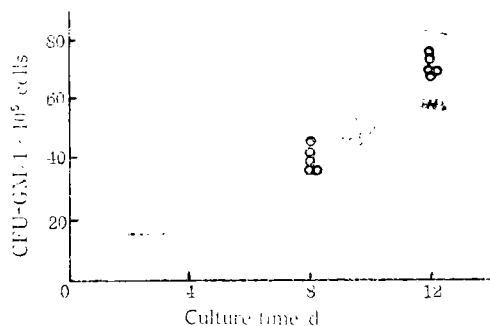


Fig 4. CFU-GM formation after CSF stimulation

细胞减少,给予的浓度增加时,细胞数增加(见图3)。经直线回归统计,具有良好的线性关系,相关系数 $r=0.97$, $p<0.001$,有显著性差异。拒台盼蓝染色,活细胞大于95%。

2.4 人尿 CSF 促进 CFU-GM 增殖

骨髓细胞在含有 200 u/ml CSF 的半固体琼脂培养体系中培养 8 d 和 12 d 后,应用 Olympus 倒置显微镜放大 100 倍,测定大于 50 个细胞的集落数。由图 4 结果表明,CSF 促进 CFU-GM 增殖,而且孵育 12 d 的样品比孵育 8 d 的样品中 CFU-GM 的数量增多,而且 CFU-GM 的形态变大。培养物用 2.5% 戊二醛固定,压片, Wright-Giemsa 染色,镜检证实为粒细胞集落。

3 讨 论

电离辐射作用致使受照射动物造血功能受抑制。粒-巨噬祖细胞的恢复有其特殊的时相性和规律^[7], CSF 可促使白细胞和血小板的恢复,对造血祖细胞的增殖发育有深远的意义^[1-4]。

利用 CFU-GM 培养,已经证明外周血中含有粒-巨噬祖细胞存在^[6]。本实验证明在人尿 CSF 存在的情况下,使培养的外周血存活粒细胞数依 CSF 浓度增加呈线性关系。并且人尿 CSF 可促进骨髓粒系祖细胞增殖分化,在培养 12 d 的培养体系中 CFU-GM 数量较 8 d 者增多。提示 CSF 具有促进粒-巨噬祖细胞增殖分化和维持祖细胞及成熟粒细胞存活的功能。

照射后给动物注入人尿 CSF,促进受照射小鼠造血功能恢复、存活动物数明显增加。从照射后 30 d 尚存活的小鼠,分离外周血成熟粒细胞,在人尿 CSF 的作用下仍能存活,而且与人尿 CSF 有剂量依赖关系。结果为人尿 CSF 能保护祖细胞池和促进粒-巨噬细胞迅速恢复的论断提供了重要依据。

根据有关对粒-巨噬祖细胞增殖分化的知识,已知 CSF 对恢复造血功能具有明显的刺激作用,日益广泛地应用于化疗或放疗引起的造血功能受损的病人,以促进造血功能恢复。结合粒细胞微孔板有限稀释培养技术,更可为 CSF 临床应用提供敏感、快速的测试方法。

参 考 文 献

- 1 Grant S, Pettit G R, McCrady C. *Exp. Hematol.*, 1992, 20: 34—42
- 2 Hovgaard D, Schifter S, Rabol A et al. *Eur. J. Hematol.*, 1992, 48: 202
- 3 Butturini A, Gale R P, Lopes D M et al. *Lancet*, 1988, 2(8609): 471
- 4 Moriaka E, Taniguchi S, Okmura S et al. *Res. Exp. Med.*, 1990, 190: 229
- 5 Begley C G, Lopez A F, Nicola N A et al. *Blood*, 1986, 68: 162
- 6 王洪云, 汪 涛, 杨宏德等. *苏州医学院学报*, 1994, 14(3): 249
- 7 汪 涛, 王洪云, 曹 霞. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1994, 12(1): 54

EFFECT OF COLONY STIMULATING FACTOR FROM HUMAN URINE ON SURVIVAL OF IRRADIATED MICE

Wang Tao Wang Hongyun Zhang Junning

(*Suzhou Medical College, Suzhou 215007*)

ABSTRACT It was shown that colony stimulating factor (CSF) extracted from human urine could increase survival rate obviously and prolonged survival time in irradiated mice. Using tissue culture mini-well plate by means of limiting dilution method, it was shown that with CSF the mature granulocytes in peripheral blood could be kept survival and the counts of them were closely correlated with the concentrations of CSF. With CSF (200 u/ml), in the bone marrow culture the numbers of granulocyte-macrophage colony forming unit (CFU-GM) at the 12th day were larger than that at the 8th day.

KEYWORDS Colony stimulating factor(CSF), Survival cells, Granulocyte-macrophage colony forming unit (CFU-GM), Haemopoietic function