615近交系小鼠造血干细胞的定量测定*

尤育初　万景华　糜静娴　冯敏　廖菁

（中国医学科学院　血液学研究所）

615近交系小鼠是本所动物室于1961年用昆明种小白鼠(♀)和由苏联引进的$C_{57}BL$近交系小鼠(♂)杂交第一代按同胞兄妹交配纯化而得的一系棕色小鼠，至今已培养20余年，共繁殖了57代。通过皮肤移植，混合淋巴细胞反应免疫学分析，血红蛋白分子遗传学分析，血清蛋白电泳分析，毛色基因检测等试验，均证明615小鼠是纯合子，符合近交系要求。该小鼠生殖能力也比$C_{57}BL$等近交系小鼠强。其自发瘤的发生情况也有一定的规律和特点，是一株低白血病，低乳腺瘤小鼠，但肺腺瘤发生率较高（36.7%），是研究肺癌病因和发病学的良好工具。目前国内很多单位已使用615近交系小鼠。本文用脾集落形成技术和体内琼脂扩散盒技术测定了健康615小鼠股骨骨髓，脾脏和循环血中多向性造血干细胞（CFU-S）和粒系前体细胞（CFU-D），并动态观察了骨髓细胞在体内扩散盒培养中的生长和分化。为开展实验血液学的研究提供了一些参数。

一、材料和方法

（一）动物　受检动物为本所动物室饲养的第56代2—3月龄健康615小鼠，体重18—23克，脾集落试验的受体动物为健康615小鼠，雄性，体重18—21克。体内扩散盒受体动物为健康昆明种小白鼠，雄性，体重22—26克。

（二）CFU-S 检测　采用外源法[2]。受体小鼠先接受^{60}Co γ线850拉德照射(剂量率160拉德/分)。照射后4小时内每只受体小鼠尾脉注入0.2—0.4毫升细胞悬液，内含1×10^5个骨髓有核细胞或3×10^6个脾脏有核细胞或5×10^6个循环血白细胞，9天后处死，取出脾脏，固定于Bouin's液中，24小时后计数脾脏表面集落数。

（三）CFU-D 检测　采用体内琼脂扩散盒培养法[2]。循环血细胞和脾脏细胞经淋巴细胞分离液(比重1.077)分离后，用199培养液洗涤所收集的有核细胞两次。琼脂培养体系由20%马血清，0.3%琼脂，2×10^5骨髓有核细胞/毫升，或4×10^5脾脏有核细胞/毫升，或5×10^6循环血白细胞/毫升所组成。每个扩散盒注入0.12毫升上述培养体系。在受鼠腹腔中培养6天后于解剖镜下计数琼脂培养基上生长的集落。以多于50个细胞组成的细胞团计为一个集落。

（四）健康615小鼠骨髓细胞体内扩散盒培养的观察方法同文献[1,2]。

二、结　果

（一）健康615小鼠骨髓、脾脏和循环血中有核细胞总数、CFU-S和CFU-D的测定结

图1　生长在脾脏表面的脾集落外形

* 本所药物室余艳华同志参加部分工作。

表 1 615 小鼠骨髓、脾脏和循环血中干细胞的测定结果 ($\bar{x}$±SE)

材　料	性　别	有核细胞数 ×10⁶	CFU-S/10⁵	CFU-D/10⁵
骨　髓	♀	9.79±0.87/股骨(36)	12.6±4.4(9)	102.1±32.5(9)
	♂	11.28±0.72/股骨(45)	15.0±3.8(9)	95.2±22.9(9)
脾　脏	♀	125.0±7.7/脾(21)	0.82±0.16(18)	17.9±6.5(12)
	♂	135.4±11.8/脾(20)	0.92±0.14(15)	17.6±9.2(11)
循环血	♀	8.47±0.36/毫升(20)	0.29±0.05(163)	0.26±0.05(75)
	♂	7.90±0.44/毫升(23)	0.30±0.04(193)	0.26±0.05(92)

注：( )内为各实验组受检动物数。

果(见表 1)。脾脏表面的集落数(见图 1)。

（二）615 小鼠骨髓细胞在体内扩散盒培养中的生长曲线(见图 2)。

从图 2 可见，当每个扩散盒植入 5×10^5 个骨髓有核细胞时，在培养早期 (1—2 天内)，细胞总数有一个下降过程，接着出现指数生长 (2—9 天)，以后逐渐下降。培养 1 天时细胞数最低，为植入时的 37.8%，第 9 天时最高，为植入时的 2.5 倍。

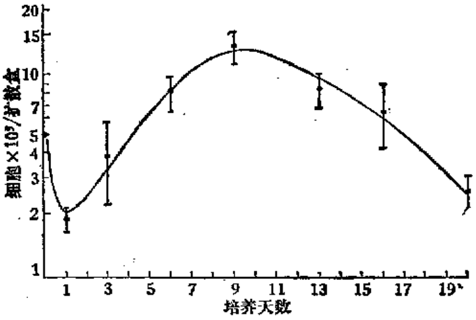

图 2 615 小鼠骨髓细胞在体内扩散盒培养不同时间后细胞数的动态变化 (12 只 615 小鼠，四次实验的 $\bar{x}$±SE)

（三）615 小鼠骨髓细胞在体内扩散盒培养中的分化 对扩散盒内细胞分类进行动态观察的结果表明，615 小鼠骨髓细胞在扩散盒培养中生长的主要是单核-巨噬细胞，其次为增殖性粒细胞 (见图 3)。在培养 1—3 天内，单核-巨噬细胞和增殖性粒细胞的比例即开始明显增加，尤其单核-巨噬细胞增加更快，第 9 天时可达种入时的 54.9 倍。9 天后各类细胞均下降，而以增殖性粒细胞开始得最早 (第 6 天)，减少得明显。非增殖性粒细胞的比例在初期略有增加 (开始时占 29.8%，第 3 天占 37.5%)。

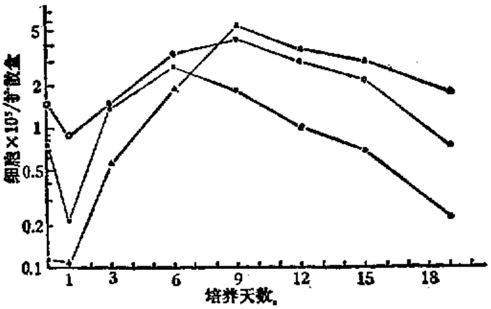

图 3 615 小鼠骨髓细胞在扩散盒培养中各类有核细胞的改变 ($\bar{x}$±SE)

●——● 增殖性粒细胞　○——○ 非增殖性粒细胞

▲——▲ 单核-巨噬细胞

以后基本保持平衡 (第 9 天 35.5%，第 13 天 38.0%)。

三、讨　论

本实验采用体内琼脂扩散盒培养法 CFU-D，与常用的体外琼脂培养 CFU-C 相比，培养条件更接近于天然环境，结果比较稳定，重复性也较好；而且省略了制备外源性集落刺激因子的手续。

本实验结果表明，健康 615 小鼠骨髓、脾脏和循环血中有核细胞数、CFU-S 和 CFU-D 均无明显的性别差异 (表 1)。造血干细胞在骨髓、脾脏和循环血中的相对浓度以骨髓为最高，循环血最低。如以血中浓度为 1，则脾脏中 CFU-S 为2.8，CFU-D 为 68.6；骨髓中 CFU-S 为 46.3，CFU-D 为379.4。

615 小鼠骨髓、脾脏和循环血中干细胞的测定结果与文献[3]报告的其它 3 株小鼠的比较，各参数都显示有种间差异 (见表 2—4)。

表 2　615 小鼠骨髓干细胞与其它小鼠的比较（$\bar{x}\pm SE$）

	615	C_3H	RFM	SAS/4
有核细胞总数$\times10^8$/股骨	0.11±0.01	5.32±0.26*	4.90±0.10*	8.76±0.68*
CFU-S/10^5	13.9±0.8	10.45±0.39	7.40±0.20	14.23±1.14
CFU-D/10^5	98.6±3.9	—	100[4]	74.3±20.3**
CFU-S$\times10^3$/股骨	1.52±0.10	55.59±0.21*	36.26±0.11*	124.66±0.54*
CFU-D$\times10^3$/股骨	10.85±0.43	—	—	—

* 以全身骨髓细胞计。　** 为 $CBA\times C_{57}BL\rightarrow F_1$。

表 3　615 小鼠脾脏干细胞与其它小鼠的比较（$\bar{x}\pm SE$）

	615	C_3H	RFM	SAS/4
有核细胞数$\times10^8$/脾	1.30±0.07	1.47±0.40	3.03±0.31	3.35±0.31
CFU-S/10^5	0.85±0.06	1.52±0.10	2.30±0.40	0.70±0.04
CFU-D/10^5	17.76±1.24	—	—	—
CFU-S$\times10^3$/脾	1.1±0.1	2.23±0.37	6.27±0.20	2.35±0.57
CFU-D$\times10^3$/脾	23.0±1.6	—	—	—

表 4　615 小鼠循环血干细胞与其它小鼠的比较（$\bar{x}\pm SE$）

	615	C_3H	RFM	SAS/4
血容量，毫升/100 克体重	6.4±0.1	5.68±0.20	6.19±0.17	5.96±0.35
有核细胞数，$\times10^3$/毫米^3	8.17±0.29	7.78±0.32	8.01±0.45	6.90±0.75
CFU-S/10^5	0.30±0.04	0.30±0.22	0.07±0.01	0.09±0.01
CFU-D/10^5	0.26±0.04	—	—	—
CFU-S/100 克体重	156.8	132.6	34.7	37.0
CFU-D/100 克体重	135.7	—	—	—

615 小鼠骨髓细胞在体内扩散盒环境中能生长 20 天左右，其生长高峰在 9—11 天，此时细胞数为植入时的 2—3 倍。比小白鼠骨髓细胞的培养结果[1]低，反映了 615 小鼠造血细胞增殖能力比小白鼠低及对培养环境的适应能力比小白鼠也差。体内扩散盒培养中各类有核细胞的动态变化观察结果表明，在扩散盒培养中生长的细胞类型主要是单核-巨噬细胞，其次为增殖性粒细胞。进一步证明了该培养体系适合于粒系和单核巨噬细胞系统的分化、增殖和成熟，而不利于其它系统，特别是红系统的生长，与体内琼脂扩散盒培养（CFU-D）和体外琼脂培养（CFU-C）时，只有粒-单核巨噬细胞生长的情况相类似。因此，体内扩散盒培养中粒细胞和巨噬细胞的生长情况，在一定程度上也反映了培养细胞中该两类细胞的前体细胞的多少。

参 考 文 献

[1] 山根兴等 1979 小鼠骨髓细胞在体内扩散小室培养中的生长动力学。细胞生物学杂志 1(1): 29。

[2] 吴祖泽 1978 «造血细胞动力学概论»，科学出版社，北京，116,182、237。

[3] Coggle, J. E. and M. Y. Gordon, 1975 Quantitative Measurements on the Haemopoietic Systems of Three Strains of Mice. *Exp. Hemat.* **3**:181.

[4] Gordon, M. Y. 1974 Quantitation of Haemopoietic Cells from Normal and Leukemic Mice Using an in vivo Colony Assay. *British J. of Cancer.* **30**: 421.

[5] Горбунова И. А. 1979 Клонирование кроветворных клеток мышей собак in vivo в диффузионных камерах. *Пробл.Гематол.* **3**:55.