# 人胚胎发育中肝脏粒系造血祖细胞（CFU-C）与 T-淋巴细胞的动态研究

吴祖泽　费瑞高　周淑珍　施斐曼　李春海　汪宝珍
（中国人民解放军军事医学科学院）

**摘　　要**

在人的胚胎发育中，肝脏是一个重要的造血器官．本文测定了 24 个不同妊娠时间胎儿中肝脏的重量和有核细胞总数，以及 22 个胎儿肝脏中粒系造血祖细胞(CFU-C)、T-淋巴细胞的含量．从胎肝发育的动态分析中可以看到，对于妊娠 4—5 个月的肝脏，其中 CFU-C 的产率与总量达到最高值；在妊娠 5 个月内，T-淋巴细胞的含量基本保持在 1—2% 左右．

在人和动物的胚胎发育中，肝脏是一个重要的造血器官，而且以红系为主．随着胚胎月龄的增长，肝脏的造血活动逐渐被骨髓所取代．出生后，骨髓成为主要的造血器官．

我们已在文献[1]报告，胎肝中不仅存在着旺盛的生成红细胞活动，而且应用体内琼脂扩散盒培养技术，证明了还存在着丰富的粒系祖细胞（CFU-C），反映了胎肝组织同时具有生成粒细胞的潜力[1]．此外，在胎肝中还存在着少量的巨核细胞和淋巴细胞[2]．这些事实说明，类似小鼠的胚胎发育过程[3]，在人的胎肝组织中也存在着多向性造血干细胞，这是胎肝移植治疗婴儿免疫缺陷症及某些造血障碍等疾病，具有重建造血功能的主要的物质基础[4]．

可惜，至今反映人多向性造血干细胞的测试技术仍然是一个没有解决的问题．但是，实验血液学研究中的许多事实说明，多向性造血干细胞与粒系造血祖细胞（CFU-C），在一些动力学特性上具有较高的相关性[5]，因此，应用 CFU-C 的测定结果来反映造血组织中多向性造血干细胞的状况，在一定程度上是有意义的．

为了造血干细胞移植在临床上的应用，人们不仅关心胚胎发育中造血干细胞的浓度与数量的变化，同时也注意到其中淋巴细胞，尤其是 T-淋巴细胞数量的动态变化．本文对胎肝细胞在体内琼脂扩散盒培养条件下所生成的细胞团作了形态学分析，并对不同月龄的胎儿肝脏中 CFU-C 以及 T-淋巴细胞含量作了比较研究．

## 一、材料与方法

胎肝的采集：在水囊引产后 4 小时内，从胎儿中取出肝脏．胎龄按胎儿身长的平方根值

本文 1980 年 7 月 31 日收到．

并结合临床检查估算[6]。

胎肝细胞悬液的制备：从胎儿中取出肝脏，称重，取 1 克肝脏组织置于直径为 60 毫米的培皿中，用眼科剪刀剪碎成泥状，加入 10 毫升含 20% 马血清的 199 培养液，然后用不带针头的 10 毫升注射器反复抽打，直至看不见明显的组织块为止。将细胞悬液通过滤血网，再经过带 6 号和 4 号针头的注射器，制成单细胞悬液。

胎肝细胞体内琼脂扩散盒培养技术：培养体系为 4 毫升含 20% 马血清、0.33% 琼脂和 $2\times10^6$ 个胎肝有核细胞的 199 培养液。在每个内径为 11 毫米、厚为 2 毫米的单面扩散盒中加入 0.2 毫升上述细胞悬液。扩散盒经石腊封口后，植入经 750 拉德 $\gamma$ 线照射的小鼠腹腔中。体内培养 9 天后，取出扩散盒，揭去微孔滤膜，在显微镜下（60 ×）计数由多于 50 个细胞组成的细胞团的数目。

酸性酯酶染色法：胎肝印片或细胞涂片经甲醛蒸气固定 3—5 分钟，自来水冲洗，约经 4 小时自然凉干。经含有 α-醋酸萘酯与副品红的染液作用与染色后，油镜计数 3000—5000 个有核细胞中酯酶阳性细胞的百分率[7]。

E-玫瑰花结形成率的测定：胎肝细胞悬液（$<1\times10^7$）中加入 0.83% Tris-$NH_4Cl$ 溶液（1:20）溶解红细胞，离心，分离出的有核细胞用 Hank 液制成单细胞悬液，然后应用聚蔗糖-泛影葡胺（d = 1.077 克/厘米$^3$）分层液离心分离出单核样细胞。在 0.1 毫升单核样细胞悬液（$10^6$/毫升）中加入 0.1 毫升 2% 绵羊红细胞（SRBC）和 0.1 毫升小牛血清。37℃ 保温 5—10 分钟后取出，用 200 克离心 5 分钟，然后置于 4℃ 冰箱中 2—12 小时，用滴管吸去多余上清液，对沉积在试管底部的细胞摇匀加入 1—2 滴 0.8% 戊二醛，固定 15 分钟，最后加入 1—2 滴姬姆萨染液，染色 10 分钟。取出细胞悬液，在高倍显微镜下计数 400 个有核细胞，观察其中结合 3 个以上 SRBC 的淋巴细胞数，求出 E-玫瑰花结的形成率。

细胞超微结构的电子显微镜观察：胎肝细胞经体内琼脂扩散盒中培养 9 天后，取出单个细胞团（连同琼脂在一起），以 1% 戊二醛磷酸缓冲液作前固定，经蔗糖磷酸缓冲液洗后，再以锇酸作后固定。经系列脱水后，以 Epon 812 包埋，切成 0.5—1 微米的厚片。先用光学显微镜定位，作超薄切片，醋酸铀、柠檬酸铅染色，应用 JEM-6C 电子显微镜观察细胞的超微结构。

## 二、实验结果

### 1. 人胎肝细胞的体内琼脂扩散盒培养

人胎肝细胞经体内琼脂扩散盒培养 9 天后，可以生成由许多细胞组成的细胞团，我们把多于 50 个细胞组成的细胞集落计为 1 个细胞团（CFU-C）（图版 I-1）。体内培养 9 天后，可以见到这些细胞团中的细胞大多由粒系细胞或单核-巨噬细胞组成。对培养后生成的细胞团，作进一步细胞超微结构的电子显微镜观察显示出：这些细胞一般只有一个细胞核，有的也可以见到两个核。细胞核的形状有的近似圆形、稍带折陷或呈杆状，核染色质在核周边较深。胞浆中普遍可以见到溶酶体样的特异性颗粒，但有的颗粒不明显。胞浆中一般含有 5—7 个线粒体，还有由单膜围绕的空泡样结构。核糖核蛋白体比较丰富。此外，在有的细胞胞浆中可以见到数量不等的嗜锇的深电子致密团块。根据以上分析，人胎肝细胞在小鼠体内琼脂扩散盒培养条件下生长的是粒系和单核-巨噬细胞系统（图版 I-2）。

体内琼脂扩散盒培养条件下，细胞团的生成量与最初种入扩散盒的胎肝有核细胞量成正

比，相关系数（$r$）为 0.995（图 1）.

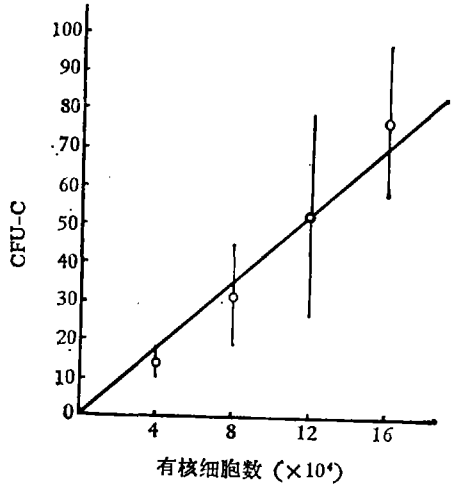



图1 胎肝细胞经体内琼脂扩散盒中培养 9 天后，种入的胎肝细胞量，与细胞团生成量之间的比例关系
（胎肝月龄为5.5个月，每个实验点由 6 只扩散盒组成，平均值±标准差，相关系数 $r = 0.995$）

**2. 胚胎发育中肝脏 CFU-C 产率与总量的动态变化**

随着胚胎的不断发育，胎儿肝脏的重量或每个肝脏中的有核细胞总数，都不断增长（图 2，3）. 但是，在妊娠 1.5 个月时，CFU-C 产率（CFU-C/$10^5$）极低，以后随着胎龄的增长，CFU-C 的产率或每个肝脏中 CFU-C 的总量（CFU-C/肝脏）都急剧增加，峰值出现在妊娠 4—5 个月. 以后，随着胎龄的增长，肝脏重量不断增加，但 CFU-C 的产率或每个肝脏中 CFU-C的

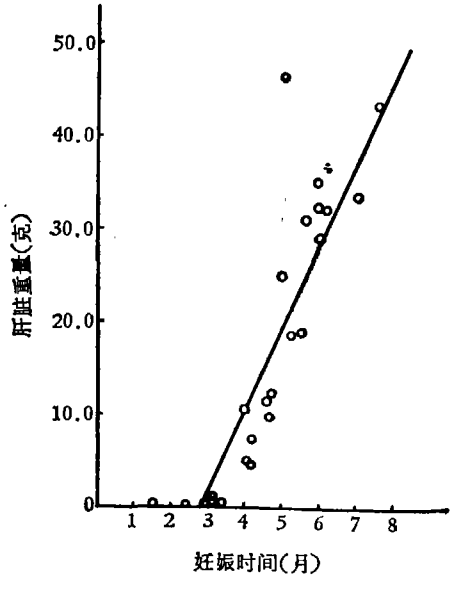



图 2 胎肝重量（克）与妊娠月数的相互关系（$r = 0.920$）

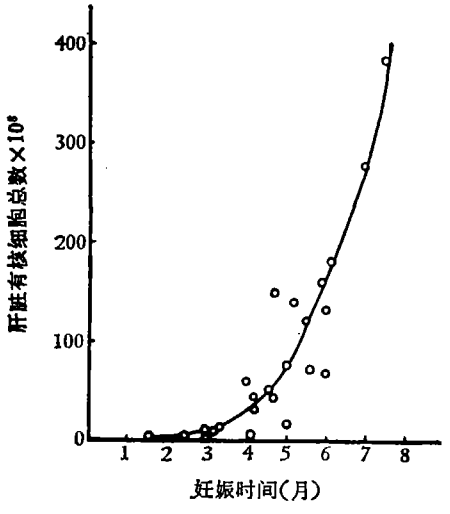



图 3 胎肝中有核细胞总数与妊娠月数的相互关系

总量都急剧下降．妊娠 7 个月以后，CFU-C 产率或每个肝脏中的 CFU-C 总量都降低到了很低的水平．上述胎肝 CFU-C 数量与胎龄之间构成了一个明显的钟形分布的特征(图 4，5)．

**3. 胚胎发育中肝脏 T-淋巴细胞含量的动态变化**

随着胚胎的不断发育，肝脏中淋巴细胞总量逐渐增加．我们采用酸性酯酶染色法或 E-玫瑰花反应，重点观察了胎肝发育中 T-淋巴细胞数量的动态变化．在妊娠 5 个月内，随着肝脏

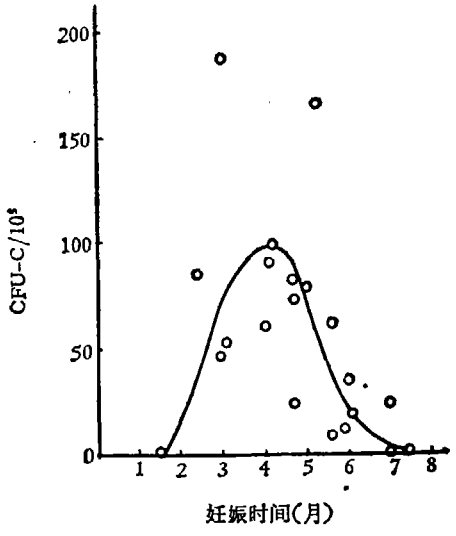



图 4　胎肝 CFU-C 产率与妊娠月数的相互关系

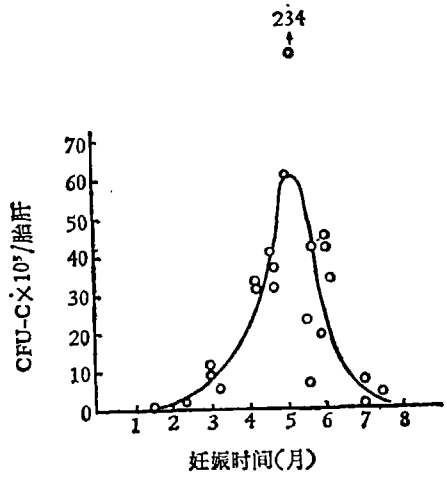



图 5　胎肝中 CFU-C 总量与妊娠月数的相互关系

重量或有核细胞总数的增长，T-淋巴细胞百分率大约维持在 1—2％（表 1），反映了在上述妊娠期间，肝脏中 T-淋巴细胞的含量是比较低的．

表 1　胎肝中 T-淋巴细胞含量与妊娠月数的关系(％)

| 妊娠月数 | ％ | |
|---|---|---|
| | 酸性酯酶染色法 | E-玫瑰花结 |
| 2.5 | 0.42 | |
| 3 | 0.23, 0.56, 0.30 | |
| 4 | 1.06, 0.29 | 0.5 |
| 4.5 | 0.34, 0.20 | |
| 5 | 1.12, 0.96, 0.53 | 1.5, 0.8 |
| 5.5 | 0.92 | 2.8 |
| 6 | 0.50, 0.63 | |
| 7 | | 4.0 |

## 三、讨　论

胚胎造血最早起源在卵黄囊的血岛上．妊娠 40 天后，卵黄囊造血衰退，然后肝脏进入了活跃的造血活动．在肝脏造血的最盛期，90％ 的血细胞为有核红细胞．妊娠 4 个月以后，肝脏造血逐渐减弱[8]．从胎肝造血活动变化的总的趋势来看，与我们所观察到的肝脏 CFU-C 动

态变化的特征是一致的，反映了肝脏的造血活动是造血干细胞增殖和分化的表现.

最近，Dresch 等[9]应用体外琼脂培养技术，观察了人胎肝细胞生成 CFU-C 的产率受妊娠时间长短的影响，妊娠 4 个月的胎肝细胞生成 CFU-C 的产率最高，为620 CFU-C/2 × $10^5$. 但是，从他们的实验数据还不能得到整个胎肝中 CFU-C 总量以及动态变化的规律性认识.与 Dretsch 等人制备肝脏细胞悬液相似，我们在前文中也曾对肝脏细胞悬液先作非连续密度梯度离心，分离收集单核样细胞，然后作体内琼脂扩散盒培养，这样可以得到比较高的 CFU-C 的生成率，但是会影响全胎肝中 CFU-C 总量估计的正确性. 从图 1 可见，胎肝细胞悬液不经非连续密度梯度离心，直接作体内琼脂扩散盒培养，接种的细胞量与培养 9 天后生成的细胞团数之间，同样呈现良好的线性关系. 因此，根据培养后 CFU-C 的产率与胎肝中的有核细胞总数，可以计算不同胎龄的整个肝脏中 CFU-C 的总量.

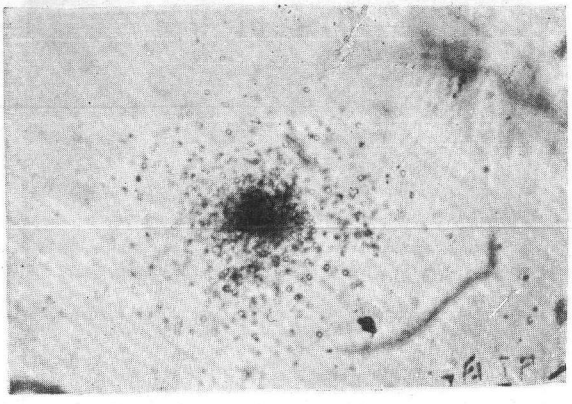
应用造血细胞或造血干细胞移植治疗某些造血障碍疾病的研究，已有相当长的历史.其中造血干细胞的来源和异体移植后可能发生的免疫反应是造血干细胞移植研究中的二个重要问题.

人服用大剂量肿瘤化疗药物或放射性事故中受到大剂量射线照射后，造血机能受到严重的破坏. 在这种情况下，为了实现造血机能的重建，需要输入的正常孪生骨髓细胞中造血祖细胞的含量，大约为 2.7 × $10^6$ CFU-C[10].我们从胚胎发育中肝脏 CFU-C 含量的动态变化可以看到，妊娠 4—5 个月的肝脏约含有 3—6 × $10^6$ CFU-C. 因此胎肝是造血干细胞移植研究中一个值得重视的干细胞来源. 然而，胎肝造血细胞移植属于同种造血细胞移植，其中同种抗力的程度以及如何提高受体对移植细胞的免疫耐受性等问题，都是有待进一步研究的问题.

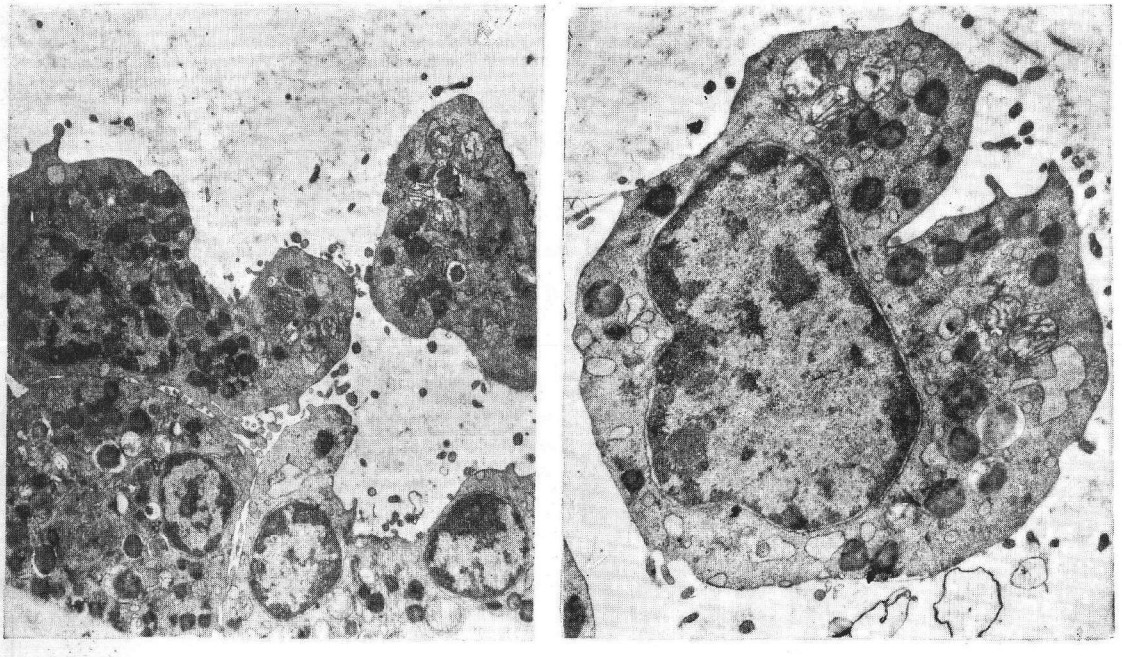
随着胚胎的发育，肝脏中淋巴细胞的数量逐渐增多. Oguro[2]报告妊娠31周后，肝脏中淋巴细胞含量明显地增加到 21—51%.在胎龄为 2.5—5 个月的肝脏中应用酸性酯酶染色法测定的 T-淋巴细胞浓度在 0.2—1.1% 之间. 这与 E-玫瑰花结形成率的测定结果大致相似. 与外周血或骨髓相比，胎肝组织中 T-淋巴细胞的含量是比较低的[11—13]，这是异体胎肝移植中发生免疫反应比较轻的一个重要原因[14]. 但是，不同月龄胎肝组织中存在 T-淋巴细胞的事实，可能是导致胎肝移植后出现继发病的一个原因. 因此，分离除去胎肝细胞中的免疫活性细胞以及与造血无关的肝细胞等，也是进一步提高胎肝造血干细胞移植效果的一个值得重视的课题.

## 参 考 文 献


[1] 费瑞高等，中华血液学杂志，1981 年.
[2] Oguro, M., Koizumi, F. & Sasagawa, S., *Acta Haematologica Japonica*, **41**(1978). 1231—1341.
[3] 蒋铁男等，中华血液学杂志，**1**(1980)，347—351.
[4] Good, R. A., *Clin. Bul.*, **71**(1977). 33—39.
[5] Gregory, C. J. & Henkelman, R. M., *Experimental Hematology Today*, 1977, 93—101.
[6] 柯应夔主编，生理产科学，1959，94.
[7] 孙国贤等(待发表).
[8] Fang-Hayshe, C. H., *Acta Haematologica Japonica*, **41**(1978), 1196—1203.
[9] Dresch, C. & Faille, A., in *Cell Lineage, Stem Cell And Cell Determination. INSERM symposium*, 1979, No. 10. 191—198.
[10] Nelson, B. M. & Andrews, G. A., in *Advance In Radiation Biology*, **6**(1976), 325—338.
[11] Wybran, J., Carr, M. C. & Fudenberg, H., *J. Clin. Invest.*, **51**(1972), 2537—2543.
[12] 吴祖泽等，生理学报，**31**(1979)，263—272.
[13] 吴祖泽等，中国科学，1980，12:1228—1236.
[14] Löwenberg, B., Vossen, J. M. J. J. & Dooren, L. J., *Blut*, **34**(1977), 181—195.



1.胎肝细胞经体内琼脂扩散盒培养9天后，所生成的细胞团的形态(200×)



a　　b

2.人胎肝细胞经体内琼脂扩散盒培养9天后细胞形态的电子显微镜观察

a.粒系和巨噬细胞的形态(9000×)

b.粒系细胞形态

[图示细胞为单个核，胞浆内有几个线粒体，有多数溶酶体样特异颗粒，核糖核蛋白体及一些空泡样结构(17500×)]