

在人胎盘条件培养液中白细胞介素2 对粒-巨噬系祖细胞生长的影响

吴祥元 梁锦华

(附属第三医院血液病研究室)

提 要 在正常骨髓粒-巨噬系祖细胞(CFU-GM)常规培养体系中加入白细胞介素2(IL-2),所有18例CFU-GM的集落产率明显上升,平均上升46.37%, $t=11.152$, $P<0.001$ 。结果提示IL-2和人胎盘条件培养液(HPCM)之间具有协同作用,但IL-2单独并无刺激CFU-GM生长的作用。

关键词 白细胞介素2;粒-巨噬系祖细胞;人胎盘条件培养液

中图分类号 R3.12; R392

大量研究表明白细胞介素2(IL-2)不仅是一种T淋巴细胞生长因子,且具有广泛的生物活性^[1],如促进T淋巴细胞生长并释放淋巴因子,提高杀伤性T淋巴细胞的活性,使天然杀伤(NK)细胞的活性增强,支持前B淋巴细胞系的生长,并能活化巨噬细胞等,因此IL-2在免疫调节中发挥着重要作用。近年的研究表明多种白细胞介素对造血调控有重要作用,如IL-3本身就是一种多克隆刺激因子(multi-CSF)^[2],然而IL-2对造血调控的作用尚未完全阐明。IL-2在粒-巨噬系祖细胞(CFU-GM)的生长调控作用据文献报道有些地方相互矛盾^[3,4],它对CFU-GM的生长是起正调控抑或负调控的作用尚无定论。为此作者选用了18例正常骨髓作CFU-GM培养,直接加入IL-2以了解其对CFU-GM生长的影响。

材 料 和 方 法

试 剂 ①白细胞介素2,本实验使用的是人类重组白细胞介素2(rhIL-2),是Sigma公司产品。②Iscove's modified dulbecco's medium(IMDM)培养液,也是Sigma公司产品。③新生小牛血清(NBS),广州龙洞牧场出品。④甲基纤维素,Dow化学公司产品。⑤淋巴细胞分离液,上海试剂二厂出品。⑥人胎盘条件培养液(HPCM),根据唐佩弦^[5]介绍的方法制备,用经过检验无菌、活性高的同一

批产品作CFU-GM培养。

CFU-GM 培养与观察方法 根据黄仁魏等^[6]采用的方法培养。取骨髓液2ml,注入肝素抗凝瓶中,小心地将其置于淋巴细胞分离液上,1800转/分离心20分钟,吸出界面层细胞后再以IMDM液洗涤2次,每次离心1200转/分10分钟,细胞通过5号针头用IMDM制成细胞悬液,计数悬液中细胞数,以确定在培养体系中加入细胞悬液量。培养方法采用甲基纤维素半固体单层培养法。依次在培养体系中加入:新生小牛血清(30%)、HPCM(10%)、细胞悬液(2×10^5 个/ml)、甲基纤维素(0.83%)、IMDM(适量)。每一体系分别接种在两个35mm直径的玻璃平皿中,每皿接种1ml,37℃,5%CO₂,全湿度条件下的CO₂培养箱培养7天。培养7天后取出平皿,在倒置显微镜下观察,细胞数 ≥ 40 个为1个集落单位, $\times 100$ 镜下计数两个平皿的集落单位,取其平均数为集落产率。为了解CFU-GM集落单位的细胞特性,用自制的巴氏吸管,在倒置显微镜下准确、迅速地吸出1个集落单位,放在洁净玻片上,干燥后作瑞氏染色,油镜下观察。

病例选择和实验分组 ①选择标准:取18例骨髓象正常者作CFU-GM培养,标本均来源于髂骨骨髓。②分组:按同一标本配对设计的方法进行实验。实验分3组。见表1。

表1 实验分组及培养体系组成

	对照组	实验组 I	实验组 II
NBS	30%	30%	30%
HPCM	10%	10%	—
单个核细胞	2×10^5 个/ml	2×10^5 个/ml	2×10^5 个/ml
甲基纤维素	0.83%	0.83%	0.83%
rhIL-2	—	100u/ml	100u/ml
IMDM	适量	适量	适量

统计学处理 配对计量资料集落产率以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 t 检验方法检验其显著性。

结 果

CFU-GM细胞形态观察

正常骨髓CFU-GM 主要由中晚幼粒细胞组成, 这些细胞核多呈半月形, 染色质凝聚, 胞浆中有较多嗜中性颗粒, 过氧化酶染色阳性。

IL-2 对 CFU-GM 的作用 实验结果见表 2。

表2 IL-2 影响各实验分组CFU-GM 的集落产率情况

	CFU-GM集落产率
1. 对照组	58.83 ± 20.12
2. 实验组 I	86.11 ± 28.74
3. 实验组 II	0~4

单位: 集落单位/ 2×10^5 骨髓单个核细胞, 1:2
 $t = 11.152, P < 0.001$

从表 2 的结果可知, 实验组 II 的集落产率为 0~4 个, 这在正常 CFU-GM 培养时应看作是集落不生长型说明当培养体系中缺乏 HPCM 时 IL-2 无刺激 CFU-GM 生长的作用。实验组 I 的集落产率为 86.11 ± 28.74 , 对照组的集落产率为 58.83 ± 20.12 , 统计学分析两者相差有高度显著性意义 ($P < 0.001$), 实验组 I 的 CFU-GM 产率明显升高(平均上升 46.37%) 说明在 CFU-GM 培养体系中(内含有 HPCM)

加入 IL-2 后, 集落产率明显提高。

讨 论

本研究以 HPCM 为刺激因子(CSF)来源, 作正常骨髓 CFU-GM 培养, 在培养体系中加入 IL-2, 集落产率明显升高(均数为 46.37%)。当作者在培养体系中不加 HPCM, 但加入 IL-2, 这时 IL-2 无刺激 CFU-GM 生长的作用。由于 IL-2 单独并无刺激 CFU-GM 生长的作用, 因此作者认为 IL-2 本身并无 CSF 的特性。然而当培养体系中同时存在 HPCM 和 IL-2 时, CFU-GM 的产率明显增加, 说明 IL-2 能提高 HPCM 的刺激活性, 两者间有协同作用。人们已观察到^[7] IL-1 和多种造血因子(G-CSF, M-CSF, GM-CSF)对血细胞生长有协同作用。因此推测 IL-2 很可能是同 HPCM 中具有 CSF 活性的一种因子起协同作用。由于 HPCM 含多种具有 CSF 活性的物质^[8], 因此这种因子是什么有待进一步研究阐明。

本实验结果表明 IL-2 在一定条件下对 CFU-GM 的生长有刺激作用。据此作者推测 IL-2 对粒-巨噬细胞系造血过程是起一种正调控因子的作用。IL-2 不仅对 CFU-GM 的生长有调控作用, 有人^[9] 在体外还观察到高浓度的 IL-2 能刺激 T 淋巴细胞分泌红细胞系爆式集落刺激因子 (BPA-brustpromoting activity)。因此 IL-2 在造血调控中的作用是多方面的, 有待进一步研究阐明。

多种白细胞介素和造血细胞刺激因子(CSF)现已能用基因工程的方法大量生产, 深入研究这些细胞因子的造血调控作用及它们相互间的影响, 将有助于人们进一步了解造血机制, 并为临床合理应用这些细胞因子提供理论依据。

参 考 文 献

1. Smith KA, et al. Interleukin 2. Ann Rev Immunol 1984; 2:319
2. Barber KE, et al. Human interleukin 3: effect on normal and leukemic cells. Growth Factors 1989; 1(2):101

3. Nissen C, et al. The release of interleukin-2 and Colong stimulating activity (CSA) in aplastic anemia patients: opposite behavior with improvement of bone marrow function. *Blut* 1986; 52(4):221
4. Krumwiet D, et al. Effect of recombinant human interferon gamma and interleukin 2 on CFU-GM. *Behring Inst Mitt* 1986;6(80):59
5. 唐佩弦, 等. 造血细胞培养技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985:81~84
6. 黄仁魏, 等. 白血病细胞相关抑制物对正常 CFU-GM 的影响的研究. *广东医学* 1988; (5):34
7. Dexter TM. Hemopoietic growth factors. *Br Med Bull* 1989; 45(2):337
8. Nicala NA, et al. Separation of functionally distinct human granulocyte-macrophage colong-stimulating factors. *Blood* 1979; 54:614
9. Skettina S, et al. Selective generation of erythroid burst-promoting activity by recombinant interleukin 2-stimulated human T lymphocytes and naturat killer cells. *Blood* 1988; 71(4):907
(1991-02-20收稿 1992-02-28修回)

THE MODULATION OF GRANULO-MACROPHAGE COLONY FORMING UNIT GROWTH BY INTERLEUKIN-2 IN VITRO

Wu Xiangyuan Liang Jinhua

(Hematology Research Unit, Third Affiliated Hospital)

When interleukin-2 (IL-2) was added to normal bone marrow cells to perform granulo-macrophage colony forming unit (CFU-GM) growth, all 18 specimens showed significant increase in CFU-GM plating efficiency, the incremental mean was 46.37% ($t=11.152, P<0.001$). This suggests that IL-2 and human placental condition media (HPCM) acts synergically to form CFU-GM. Contrarily in the absence of HPCM, IL-2 has no stimulating effect on CFU-GM growth.

Key words interleukin-2; granulo-macrophage colony forming unit; human placental conditioned medium