

实验结果表明, TNT 染毒小鼠的肝脏病理变化以肝细胞肿胀、嗜酸性变及肝瘀血为其突出特征。在 TNT 染毒的同时, 给予小鼠口服 Que, 可见肝损伤程度明显减轻, 同时 Que 还可促使病损组织的肝细胞再生。提示 Que 对 TNT 染毒小鼠肝损伤具有一定的保护作用。

自由基及其引发的脂质过氧化是各种肝病肝细胞损伤的重要原因^[7]。TNT 与肝脏线粒体、微粒体孵育后均可形成活性氧^[1], 活性氧可引起生物膜脂质过氧化损伤, 因而导致膜的通透性发生改变。表现为超微结构上线粒体扩张、嵴结构紊乱, 严重时线粒体高度肿胀^[8], 光镜下肝细胞水肿。研究表明^[9], 在铁负荷的肝细胞培养体系中, Que 能够防止细胞的脂质过氧化及肝细胞内的酶释放。因此, Que 可能通过清除活性氧自由基, 抑制脂质过氧化及络合铁离子而发挥其保肝作用。TNT 是否造成肝组织铁蓄积, 有待进一步探讨。

Que 口服剂量增加似不能明显提高血药浓度^[10], 本实验仅给予小鼠口服 50mg/kg Que, 未作剂量-效应关系探讨。

4 参考文献

- 1 孔令媛, 江泉观, 曲青山. 三硝基甲苯在大鼠肝线粒体及微粒体内的还原活化. 卫生毒理学杂志, 1988, 2 (2): 87

- 2 孔令媛, 江泉观, 李来玉. 三硝基甲苯在恒河猴体内的还原活化. 职业医学, 1988, 15 (5): 56
- 3 Tsutomu Nakayama. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. Biochemical Pharmacology, 1993, 45 (1): 265
- 4 李中, 杨建会, 史霖, 等. 没食子酸丙酯对三硝基甲苯染毒小鼠肝脏病理形态学的影响. 卫生研究, 1998, 27 (3): 151
- 5 孙瑞元. 定量药理学. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 84
- 6 黄明芳. 三硝基甲苯 (TNT) 对大鼠毒作用的实验研究. 卫生研究, 1990, 19 (3): 4
- 7 Arthu M J P. Reactive oxygen intermediates and liver injury. Journal of Hepatology, 1988, 25
- 8 胡文媛, 吴沈春, 等. 三硝基甲苯对大鼠兔亚急性染毒肝脏透射电镜观察. 中华劳动卫生职业病杂志, 1989, 7 (4): 247
- 9 Isabelle Morel, Gerard Iescoat, Pascale cogrel, et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. Biochemical Pharmacology, 1993, 45 (1): 13
- 10 赵维中, 戴俐明, 方明. 槲皮素在兔体内的药代动力学. 中国药理学通报, 1992, 6: 452

(收稿: 1997-07-17 修回: 1998-08-31)

脐血 CD₃₄⁺造血干/祖细胞含量的研究

刘长安 贾廷珍

脐血作为造血干/祖细胞 (HSC/HPC) 的一个重要来源已是医学工作者的共识, 对脐血 CD₃₄⁺HSC/HPC 含量测定已有较多报道, 但较大样本的研究报道尚不多见。本文采用单克隆抗体 (MoAb) 技术和流式细胞术 (FCM) 检测了足月正常分娩新生儿脐血 (CB) 中 CD₃₄⁺ 细胞含量, 并与成人外周血 (PB) 及骨髓 (BM) CD₃₄⁺ 细胞含量进行了比较, 同时分析了新生儿性别、体重、胎龄、产母年龄和脐血血象诸指标与其 CD₃₄⁺ 细胞含量的关系, 以期对脐血的临床应用提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 CD₃₄ 单克隆抗体 (MoAb-CD₃₄, phamingen 公司)。淋巴细胞分离液 (1.077g/ml, 中国医学科学院血液学研究所)。叠氮钠 (NaN₃, Sigma)。牛血清白蛋白 (BSA, Sigma)。FACSscan 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。MEK-5108K 型血液分析仪 (日本 NIHON KOHDEN 公司)。

1.2 试剂配制

1.2.1 PBS 洗涤液 取 0.15mol/L pH 为 7.4 的 PBS 1 000ml 加入 2.0g BSA 及 1g NaN₃ 溶解备用。

1.2.2 红细胞溶解液 于 0.15mol/L pH 为 7.4 的 PBS 1 000ml 中加入氯化铵 8.29g、碳酸氢钾 1.0g、Na₂EDTA 0.037g, 溶解后置 4℃ 保存备用。

1.2.3 细胞保存液 pH7.4 的 0.15mol/L PBS 中含 2% (W/V) 葡萄糖, 1% (V/V) 甲醛、0.1% (W/V) NaN₃, 置 4℃ 保存。

1.3 标本采集和单个核细胞 (MNC) 分离

采集健康产妇足月分娩 48 名正常新生儿 CB, 男、女各 24 名, 胎龄为 37~42 周, 体重为 2 600~4 950g, 48 名健康成人 PB 和 7 名健康成人 BM, 均肝素抗凝。采集后以 1.077 比重的淋巴细胞分离液分离 MNC 层, 加入红细胞溶解液 1ml 反应 1min, 再以 PBS 洗液洗涤 2 次备用。

1.4 血常规和白细胞分类

取抗凝 CB 用 MEK-5108K 型血液分析仪测定白细胞 (WBC)、血红蛋白 (Hb)、红细胞 (RBC) 和血小板 (Plt), 并涂片以瑞氏姬姆萨染液染色, 在油镜下进行白细胞分类。

1.5 CD₃₄⁺ 细胞含量测定

1.5.1 CD₃₄⁺ 细胞荧光标记单抗染色 调整 MNC 悬液浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 每份样品取细胞悬液 100 μl , 加 FITC 标记的 MoAb-CD₃₄ 20 μl 混匀, 4℃ 孵育 30min, PBS 洗涤液洗涤 2 次, 吸干上清液, 加入细胞保存液制备 MNC 悬液 ($1 \times 10^6/\text{ml}$), 置 4℃ 于 24 小时内送检。每一样品均设非特异对照, 以 PBS 代替

FITC 标记的 MoAb-CD₃₄ 其余步骤同上。

1.5.2 流式细胞仪检测 激发光源为 15mW 氩离子激光, 波长 488nm, FITC 受激发后发出绿色荧光。检测荧光前以标准微球调整仪器, 使变异系数在 2% 以内, 每一样品用 FACS can 软件收集 1×10^4 个细胞, 荧光强度以对数放大, 光散射数据存软盘, 测试后用 lysysII 软件分析处理数据。

$$\text{CD}_{34}^{+} \text{细胞}(\%) = \frac{\text{CD}_{34}^{+} \text{细胞数}}{\text{CD}_{34}^{+} \text{细胞数} + \text{CD}_{34}^{-} \text{细胞数}} \times 100\% - \text{非特异结合细胞}\%$$

1.6 实验数据用 t 和相关检验作统计学处理。

2 结果

2.1 脐血、成人外周血和骨髓 CD₃₄⁺ 细胞含量比较

骨髓 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率显著高于脐血 ($P < 0.05$); 而脐血 CD₃₄⁺ 细胞百分率比成人外周血高 10 倍, 两者之间有极显著性差异 ($P < 0.001$); 骨髓 CD₃₄⁺ 细胞百分率为成人外周血的 16 倍, 二者之间有极显著性差异 ($P < 0.001$)。见表 1。

表 1 脐血、成人外周血和骨髓 MNC 中 CD₃₄⁺ 细胞百分率 ($\bar{x} \pm s$)

标本	标本数	CD ₃₄ ⁺ 细胞 (%)
骨髓	7	$3.19 \pm 1.05^{*}$
脐血	48	2.14 ± 1.23
成人外周血	48	$0.19 \pm 0.14^{**\Delta}$

与脐血相比 * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$; 与骨髓比较 $\Delta P < 0.001$ 。

2.2 新生儿性别、体重、胎龄及产妇年龄与脐血 CD₃₄⁺ 细胞含量关系

新生儿男性 CD₃₄⁺ 细胞百分率为 1.87 ± 0.79 , 女性为 2.51 ± 1.49 , 经 t 检验两者有极显著性差异 ($P < 0.001$), 女性高于男性。新生儿体重、胎龄、产妇年龄 (24 ~ 39 岁) 与 CD₃₄⁺ 细胞百分率间经相关检验均无相关性 ($P > 0.05$)。

2.3 脐血血象诸指标与脐血 CD₃₄⁺ 细胞含量关系

脐血 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率分别与脐血 Hb、RBC、Plt、WBC 总数、中性粒细胞绝对值及淋巴细胞绝对值作相关检验, 均无相关性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

HSC/HPC 绝大部分存在于 CD₃₄⁺ 细胞组分中, 而不表达 CD₃₄ 抗原的细胞几乎没有集落形成能力, CD₃₄⁺ 可作为早期 HSC/HPC 的标志^[1]。本文比较了脐带血、成人外周血和骨髓

CD₃₄⁺ 细胞含量。结果表明, MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率以骨髓最高, 其次是脐血, 成人外周血最低, 脐血 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率为成人外周血的 11 倍, 这与 Bender 等的研究结果非常一致。有关脐血中 CD₃₄⁺ HSC/HPC 数量各家报道不尽相同, 可能与各实验室检测方法、条件、样本量等差异有关, 但可以肯定脐血中含有丰富的 HSC/HPC, 其数量远远超过成人外周血。

虽然脐血的 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率低于骨髓, 但其 CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ 亚群比例明显高于骨髓, 脐血 HSC/HPC 较骨髓和外周血增殖能力强, 其 CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ 细胞在体外可形成大量的各系集落, CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ 细胞可在液体培养体系中维持长期的活跃造血, 并且对细胞因子的反应敏感, 说明脐血为干/祖细胞的良好来源^[1,4]。我们发现, 不同性别新生儿脐血中 CD₃₄⁺ 细胞数量存在极显著性差异, 女性明显高于男性。这种性别差异目前尚难以解释。脐血中 CD₃₄⁺ 细胞数量与足月新生儿体重、胎龄、产妇年龄及脐血血象诸指标之间均无相关性, 可能与胎儿发育至 34 周时大部分造血细胞已完成从肝脏到骨髓的主动转移有关。Clapp 等发现脐血 HPC 随胎龄不同而有不同的动态变化, HPC 随胎龄增加而递减, 直至 34 周, 才与足月儿相当^[5]。本文也显示 37 ~ 42 周间胎儿脐血 CD₃₄⁺ 细胞数量与胎龄增加无明显关系。

4 参考文献

- 1 裴雪涛, 王立生, 徐黎, 等. 脐带血造血干细胞的“质”和“量”研究. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17: 146 ~ 150
- 2 Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, et al. Phenotypic analysis and characterization of CD₃₄⁺ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. Clin Immunopathol, 1994, 70: 10 ~ 18
- 3 Rao SG, Desai SS, Goud AP, et al. Umbilical cord blood as a source of CD₃₄ positive hematopoietic stem cells. Indian J Med Res, 1995, 101: 28 ~ 30
- 4 Hao QL, Shah AJ, Thiernann FT, et al. A functional comparison of CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ cells in cord blood and bone marrow. Blood, 1995, 86: 3745 ~ 3753
- 5 Clapp DW, Baley JE, Gerson SL, et al. Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants. J Lab Clin Med, 1989, 113: 422 ~ 427

(收稿: 1998-10-05)

(上接 83 页) APMIS, 1994, 102 (8): 581

5 司徒锐. 实验性矽肺的亚细胞研究. 暨南大学学报, 1981, 1: 152

6 Lou H, Zhao Y, Delafontaine P, et al. Estrogen effects on insulin-like growth factor-I-induced cell proliferation and IGF-1 expression in native and allograft vessels. 1997, Aug 5, 96 (3): 927

7 Chung A, Nissely SP, Adams SD, et al. Asbestos fibers and pleural plaques in a general autopsy population. AM J Path, 1982, 109 (1): 88

8 Heppelston AG, Styles JA. Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. Nature, 1967, 214: 5219

9 陈佰义, 姜莉, 赵洪文, 等. 肺纤维化大鼠肺泡巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α 和血小板源生长因子的研究. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19 (4): 209

10 陈非, 邓鸿业, 丁桂凤, 等. 染矽尘大鼠肺泡巨噬细胞胰岛素样生长因子的研究. 中华劳动卫生职业病杂志, 1993, 11 (5): 257

11 Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, et al. Transforming growth factor-beta in silicosis. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154 (4pt1): 1076

(收稿: 1998-11-30)