

## 氟碳代血液对骨髓造血功能和吞噬活性的影响

丁训诚 张胜年 刘春芳 王根发 周兰凤 庄国诚 王炳森 (上海劳动卫生职业病研究所毒理研究室, 上海 200003) 戴志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 给小鼠单次 iv 氟碳乳剂(FCE) 50 ml/kg 后不同时期,  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  参入骨髓细胞 DNA 明显增加, 幼红细胞  $^{59}\text{Fe}$  利用率亦增高, 但骨髓细胞吞噬  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -绵羊红细胞( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SRBC)的能力无明显变化。大鼠骨髓电镜观察发现, 红系细胞特别是晚幼细胞轻度增生; 巨噬细胞胞浆内充满吞噬的 FCE 微粒, 表面呈较多的球状突起和伸展的条索状物, 成红细胞岛明显扩大。表明 FCE 对骨髓幼红细胞生成有促进作用, 对骨髓近期造血和吞噬功能无不良影响。

**关键词** 氟碳乳剂; 骨髓红细胞生成; 红细胞  $^{59}\text{Fe}$  利用率; 氟标胸腺嘧啶核苷参入;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -绵羊红细胞摄取; 电镜术

氟碳乳剂(fluorocarbon emulsions, FCE) 亦称氟碳代血液, 是一种具有优良载氧能力的超细状液, 它能代替血液在组织中进行  $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$  的交换, 起到人造红细胞的作用。但 FCE 对机体造血功能究竟有何影响, 报道不多。为此, 我们用同位素示踪、透射和扫描电镜观察等方法, 研究 FCE 对骨髓造血功能和吞噬活性的影响。

### 材料和方法

**药品和试剂** 氟碳代血液系中国科学院上海有机化学研究所提供 II 号乳剂, 外观为乳白色, 略带荧光。氟碳含量 35 mg/ml, pH 7.4,  $-10^\circ\text{C}$  保存, 规格符合临床使用要求。柠檬酸  $^{59}\text{Fe}$ , 为英国 Amersham 公司产品, 浓度为

1.0 mCi/ml。氟标胸腺嘧啶核苷 ( $[^3\text{H}]\text{TdR}$ , 25 Ci/mmol), 为中国科学院上海原子核研究所产品。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  发生器购自中国科学院原子能研究所。

**外周血红细胞  $^{59}\text{Fe}$  利用率的测定<sup>(1)</sup>** 昆明种小鼠 72 只,  $22.8 \pm (\text{SD}) 0.6 \text{ g}$ , 分 3 批, 每批 4 组。各组分别单次尾 iv FCE 10 和 50 ml/kg, 生理盐水 50 ml/kg 以及 ip 环磷酰胺(CY) 50 ml/kg, 后两组分别为空白和阳性对照。在给药后 24、48 及 72 h 再 iv  $^{59}\text{Fe}$  稀释液(用无菌生理盐水稀释  $^{59}\text{Fe}$  到  $2.5 \mu\text{Ci/ml}$ 。另取  $0.2 \text{ ml } ^{59}\text{Fe}$  稀释液按小鼠平均血容量稀释成标准源。 $^{59}\text{Fe}$  注后 24 h, 摘眼收集全血。取  $0.2 \text{ ml}$  全血在滤纸上, 烘干后在井型闪烁计数器中测定红细胞放射性, 计算 RBC 的  $^{59}\text{Fe}$  利用率:  $\text{UTIL}^{59}\text{Fe}\% = \text{每 ml 的红细胞放射性 (cpm)} \times \text{RBC 容量 (ml)} / \text{注入 } ^{59}\text{Fe 总放射性 (cpm)}$ 。

**$[^3\text{H}]\text{TdR}$  参入骨髓细胞的测定** A 系小鼠 48 只,  $26.4 \pm (\text{SD}) 0.8 \text{ g}$ , 分 4 批, 每批 2 组。各组分别 iv FCE 50 ml/kg 或生理盐水 50 ml/kg。于给药后 d 1, 2, 3, 6 分别 ip  $[^3\text{H}]\text{TdR}$   $0.6 \mu\text{Ci/kg}$  后 24 h 处死。取两侧股骨用 2.0 ml 生理盐水反复将骨髓冲出, 随后研磨制成悬液。加冰冷 0.6 M 高氯酸 4 ml 沉淀提取 DNA<sup>(2)</sup>。取 1.0 ml 提取液加 10 ml 闪烁液 (PPO 8.25 g, POPOP 0.15 g, Triton X-100 500 ml, 甲苯 1000 ml), YSJ-78 型自动液体

闪烁计数仪测定。以小牛胸腺 DNA 作标准, UV 分光光度法<sup>(3)</sup>测定 DNA 含量。

**骨髓摄取<sup>99m</sup>Tc-SRBC 的测定<sup>(4)</sup>** 绵羊红细胞(SRBC)压积 5 ml 加入 3 ml <sup>99m</sup>Tc-SRBC (比活性 1.5 mCi/ml), 37°C 保温 20 min, 再加新鲜配制 SnCl<sub>2</sub> 至 1.0 mg/ml, 22±1°C 经 15 min, 生理盐水洗 SRBC 2-3 次, 使上清液的放射性低于总活性 5%。调整 SRBC 浓度至 3×10<sup>9</sup>/ml。昆明种小鼠 56 只, 19.5±0.3 g, 分 6 个实验组和 1 个对照组尾 iv FCE 10 和 50 ml/kg 后 1, 5, 和 12 d 分别尾 iv 0.2 ml <sup>99m</sup>Tc-SRBC 3 h 后, 脱颈椎处死, 取后肢双侧股骨, 在井型闪烁计数仪中测放射性。

**电镜观察骨髓细胞** Wistar ♂ 性大鼠 8 只, 252±5 g, 分 4 组。尾 iv FCE 50 ml/kg 后分别于 d 1, 2, 3, 6 处死, 取出股骨红髓。各鼠挑取 1×1×2 mm 红髓数粒, 迅速置于冰冷的 4% 戊二醛溶液内固定 12 h。以 pH 7.4 磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min, 再用 1% 锇酸固定 2 h, 经缓冲液清洗 3 次后, 用逐级乙醇脱水。随后依次移入乙醇-醋酸异戊酯(各 50%)和 100% 醋酸异戊酯置换, 最后用 CO<sub>2</sub> 临界干燥器进行干燥, 并于旋转喷碳, 喷金后在岛津 ASM-SX 型扫描电镜观察和摄片。作透射电镜观察的样品, 于乙醇逐级脱水, 经环氧树脂包埋后作超薄切片, 再用醋酸铀-柠檬酸铅双重染色后, 置于日立 H-300 型电镜观察。

Tab 1. Effect of FCE on erythrocyte <sup>59</sup>Fe utilization in mice measured at 24, 48, 72 h after iv FCE 10 and 50 ml/kg. Control groups received saline 50ml/kg and cyclophosphamide 50mg/kg respectively. n=6,  $\bar{x}\pm SD$ , \* p>0.05, \*\* p<0.05, \*\*\*p<0.01

Group	<sup>59</sup> Fe utilization (%)		
	24 h	48 h	72 h
Control	18±7*	16±6*	18±6*
FCE 10 ml/kg	15±5*	16±4*	13±9*
ECE 50 ml/kg	29±5***	12±4*	15±5*
CY 50 ml/kg	10±4***	0.5±0.1***	1.0±0.6***

## 结 果

**对骨髓红系细胞再生能力的影响** 由表 1 可见, 小鼠注射骨髓抑制剂环磷酰胺(CY)后, <sup>59</sup>Fe 在外周血 RBC 利用率急剧下降(p<0.001), 说明 CY 能明显抑制红系细胞的再生, 亦证明本法可以测定红系细胞的再生能力。iv FCE 50 ml/kg 24 h 后的小鼠, <sup>59</sup>Fe 在其外周血 RBC 利用率明显增高, 提示 FCE 促进增殖阶段的幼红细胞的生成, 而在 48 h 后即无显著差异, 10 ml/kg 组, <sup>59</sup>Fe 利用率也未见明显变化。

### 对 [<sup>3</sup>H]TdR 参入骨髓细胞 DNA 的影响

从表 2 可见, 给药后不同时间, [<sup>3</sup>H]TdR 参入骨髓细胞 DNA 的放射性均高于对照小鼠, 提示 FCE 能促进 [<sup>3</sup>H]TdR 参入 DNA, 加速骨髓细胞 DNA 合成, 其中尤以给药后 d 1 和 6 的 DNA 合成更为显著(p<0.05)。

**对骨髓吞噬<sup>99m</sup>Tc-SRBC 的影响** 表 3 系用 <sup>99m</sup>Tc-SRBC 为指示细胞, 研究 iv FCE 10 及 50 ml/kg 对骨髓吞噬功能影响的实验结果。给药后 1-12 d, 小鼠骨髓吞噬 <sup>99m</sup>Tc-SRBC 的功能变化均无显著差异(p>0.05), 但 d 1 高剂量组有增高(143%)的趋势。

**骨髓细胞的形态观察** 在扫描电镜下, 骨髓巨噬细胞常以成红细胞岛出现或以单个(偶见两个)座落在造血细胞群中。单个巨噬细胞有近似球体的外形, 细胞表面有浓密的微绒毛和个别球状微突起。另外, 还可见到少数成红细胞连络的条索状物(图 1 A)。给药后可见成红细胞岛明显扩大, 包络细胞多达 10 余个(图

Tab 2. Effect of FCE on incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR into DNA of bone marrow in mice. n=6,  $\bar{x}\pm SD$ , \*\*p<0.05

Time after iv FCE	[ <sup>3</sup> H]TdR (cpm/100 μg DNA)	
	Saline 50 ml/kg	FCE 50 ml/kg
1 d	4333±879	6226±824**
2 d	2970±981	4133±1061**
3 d	3481±904	4826±1049**
6 d	3016±1208	4511±1299**

Tab 3. Effect of FCE on phagocytic activity of bone marrow in mice measured on d 1, 5, and 12 after iv FCE 10 and 50 ml/kg. n = 8,  $\bar{x} \pm SD$ , \* p > 0.05

Time after iv	Dose (ml/kg)	% of injected dose in femurs	$^{99m}Tc$ -SRBC uptake (cpm/femurs)	Phagocytic activity (%)
Control	---	$0.63 \pm 0.20$	$19775 \pm 6230^*$	---
1 d	10	$0.61 \pm 0.13^*$	$16190 \pm 3422^*$	82 <sup>*</sup>
	50	$1.06 \pm 0.13^*$	$28208 \pm 1656^*$	143 <sup>*</sup>
5 d	10	$0.64 \pm 0.33^*$	$18479 \pm 9590^*$	93 <sup>*</sup>
	50	$0.51 \pm 0.25^*$	$14703 \pm 7220^*$	74 <sup>*</sup>
12 d	10	$0.45 \pm 0.20^*$	$14623 \pm 3090^*$	74 <sup>*</sup>
	50	$0.63 \pm 0.20^*$	$13446 \pm 6060^*$	68 <sup>*</sup>

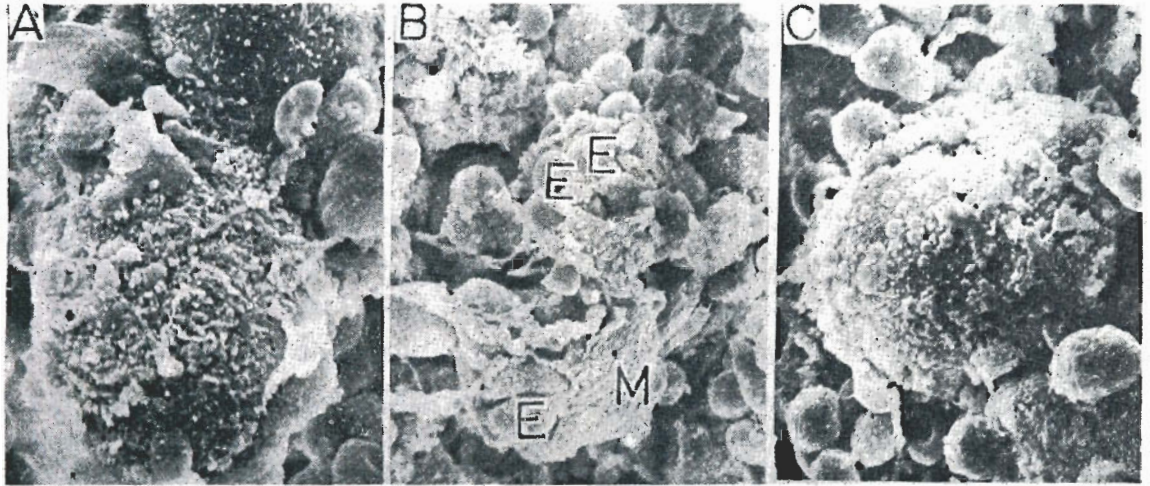


Fig 1. Scanning electron micrographs of bone marrow of rat femur. A) Macrophages of bone marrow of a normal rat were round and covered with dense microvilli and a few bubble-like microprojections.  $\times 4200$ . B) Activated macrophage obtained at 24 h after fluorocarbon emulsions (FCE) injection. Erythroblasts (E).  $\times 2200$ . C) Activated macrophage obtained 6 d after iv FCE. The cells were covered with bubble-like processes.  $\times 3800$ .

1 B)。单个出现的巨噬细胞其条索状物增生并伸入周围造血细胞中，其表面球状突起则明显增多增大(图 1 C)。其余造血细胞在给药后形态未见明显变化。

在透射电镜下，给药大鼠骨髓红系细胞特别是晚幼红有轻度增生，胞浆内有较多的线粒体(图 2 A)。粒系各阶段细胞成熟良好，无吞噬现象。在众多骨髓细胞中散在分布的巨噬细胞，胞体长 24-95  $\mu m$ 。胞膜外有条索状物包裹，浆内充满 FCE 微粒(图 2 B)。这些微粒境界清楚，大小不等呈圆形或椭圆形，无任何结构，直径 0.1-1.0  $\mu m$ 。某些 FCE 微粒外周出现有膜结构的吞噬体，溶酶体仍可散见，其它细胞器少见。

## 讨 论

Zucali 等曾以外周血细胞计数及骨髓细胞分类的手段，发现输注 FCE 的大鼠，在渡过危险期后，红细胞逐渐再生，贫血迅速消失，说明造血功能并没有受到损害<sup>(5)</sup>。我们采用  $^{59}Fe$  研究 FCE 对小鼠骨髓红系细胞再生能力的影响，显示 FCE 促进增殖阶段的幼红细胞的生成。表 2 也显示，给药后  $[^3H]TdR$  参入骨髓细胞 DNA 的放射性均增加，FCE 能促进骨髓 DNA 的合成。这些结果表明，FCE 促进幼红细胞的增殖，可能与其 DNA 的合成增强有关。这与文献报告输注 FCE 的大鼠骨髓胸腺嘧啶核苷激酶活性和 DNA 含量增加的结果<sup>(6)</sup>

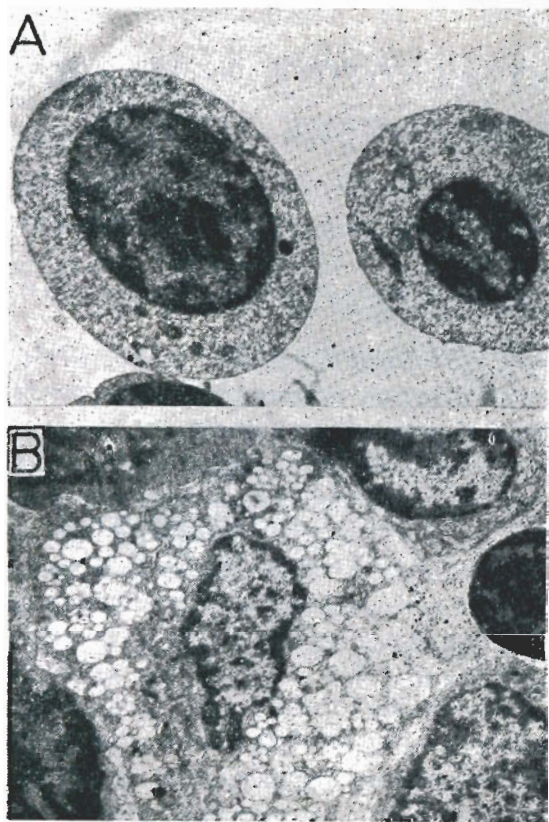


Fig 2. Transmission electron micrographs of bone marrow of a rat 24 h after iv fluorocarbon emulsion 50 ml/kg. A) Proliferative erythroid cells contained a number of mitochondria.  $\times 9500$ . B) Macrophage contained a low density of FCE granules; the remaining granules were large phagolysosomes after phagocytosis.  $\times 9400$ .

是相一致的。

用  $^{99m}\text{Tc}$ -SRBC 为指示细胞, 测定骨髓吞噬能力。虽在给药后 d 1 略微升高, 但与对照组相比无显著差异, 扫描电镜发现, iv FCE 后

大鼠骨髓巨噬细胞表面出现的球状突起增多, 条索状物丛生, 其包络的成红细胞岛范围扩大。这正象一些学者认为<sup>(7,8)</sup> 巨噬细胞表面形态变化是随着细胞的吞噬活性而改变的。具有吞噬活性的巨噬细胞较骨髓其它细胞代谢活跃和旺盛<sup>(9)</sup>。结合我们透射电镜下看到的大量 FCE 微粒, 可以认为给药后大鼠骨髓巨噬细胞的吞噬功能是具备而又比较活跃的。由此看来, FCE 促进骨髓细胞 DNA 的合成, 主要是红系细胞中的幼红细胞和巨噬细胞增生所致。作为人造血的 FCE 对骨髓近期造血和吞噬功能并无不良的影响。

### 参 考 文 献

- 1 Lee EM. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 48:485
- 2 Irons DR, Heck AH, Moore JB, Muirhead AK. *Ibid* 1979; 51:399
- 3 Wannemacher WR, Banks WL, Wunner WH. *Anal Biochem* 1965; 11:320
- 4 Scheidkraut MJ, Saba TM, Diluzio NR. *J Reticuloendothel Soc* 1981; 30:73
- 5 Zucali JR, Mirand EA, Gordon AS. *J Lab Clin Med* 1979; 94:742
- 6 Ohamoto M, Mirand EA, Sekita M, Mitsuno T. *Proceeding of the IVth International Symposium on perfluorochemical blood substitutes*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1978:247
- 7 Nabarra B, Cavelier JF, Dy M, Dimitriu A. *J Reticuloendothel Soc* 1978; 24:489
- 8 Parakkal P, Pinto J, Hanifin JM. *J Ultrastruct Res* 1974; 48:216
- 9 Rossi F, Zabucchi G, Rome D. Metabolism of phagocytosing mononuclear phagocytes. In: Furth RV, ed. *Mononuclear phagocytes in immunity infection and pathology*. 1st ed. Oxford: Blackwell, 1975:441

## EFFECTS OF FLUOROCARBON BLOOD SUBSTITUTE ON MARROW ERYTHROPOIETIC FUNCTION AND PHAGOCYTTIC ACTIVITY

DING Xun-cheng, ZHANG Sheng-nian, LIU Chun-fang, WANG Gen-fa, ZHOU Lan-feng, ZHUANG Guo-cheng, WANG Bin-sen (Dept of Toxicology, Shanghai Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Shanghai 200003)

DAI Zhi-qiang (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** Effect of fluorocarbon emulsions (FCE) on marrow erythropoiesis and phagocytosis in mice and rats were studied. The 24-h incorporations of  $^{59}\text{Fe}$  into circulating red blood cells were measured at 24, 48, and 72 h after iv FCE 10 and 50 ml/kg, saline 50 ml/kg or ip cyclophosphamide (CY) 50 mg/kg. CY reduced the  $^{59}\text{Fe}$  uptake. FCE increased the incorporation of  $^{59}\text{Fe}$  into circulating RBC at 24 h, but not 48 nor 72 h after iv FCE 50 ml/kg. FCE 10 ml/kg did not alter the  $^{59}\text{Fe}$  uptake, but significantly increased the incorporation of [ $^3\text{H}$ ] TdR into DNA in bone marrow cells of mice after iv FCE 50 ml/kg. No significant difference in  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SRBC uptake in bone marrow of mice was seen between FCE and control groups. It supports that FCE has no direct effect on phagocytic activity. Transmission electron microscopy showed slight proliferations of erythroblast cells and low density FCE granules

in the macrophage cytoplasm. In control rats, scanning electron microscopy revealed macrophages of bone marrow covered with dense microvilli and a few bubble-like microprojections. Erythroblastic island dilations were seen in the bone marrow of rats 1-6 d after iv FCE 50 ml/kg, whereas the surface of activated macrophages were covered with a number of bubble-like processes and slightly enlarged microvilli, suggesting that FCE accelerate the bone marrow metabolism. These studies indicate that FCE exert no adverse effects on marrow erythropoietic function and phagocytic activity and that it can be used as an artificial blood.

**KEY WORDS** fluorocarbon emulsions; marrow erythropoiesis; erythrocyte  $^{59}\text{Fe}$  utilization; [ $^3\text{H}$ ]TdR incorporation;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SRBC uptake; electron microscopy