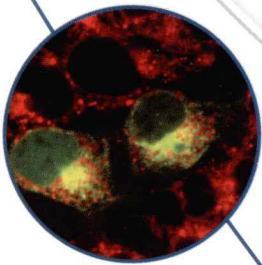



第2版

Practical Cell Culture Techniques

实用细胞培养技术

主 编 张卓然 副主编 张凤民 袁小林



 人民卫生出版社



Practical Cell Culture Techniques

实用细胞培养技术

第 2 版

主 编 张卓然

副主编 张凤民 袁小林

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

实用细胞培养技术/张卓然主编. —2 版.—北京:
人民卫生出版社, 2012. 12

ISBN 978-7-117-16565-5

I. ①实… II. ①张… III. ①细胞培养
IV. ①Q813. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 264203 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数 据库服务, 医学教育资 源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

实用细胞培养技术 第 2 版

主 编: 张卓然

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 36

字 数: 876 千字

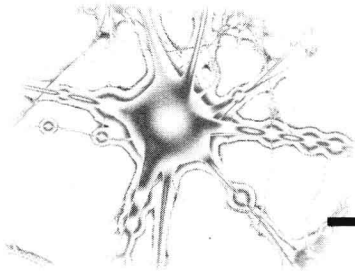
版 次: 1999 年 10 月第 1 版 2012 年 12 月第 2 版第 3 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-16565-5/R · 16566

定 价: 99.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

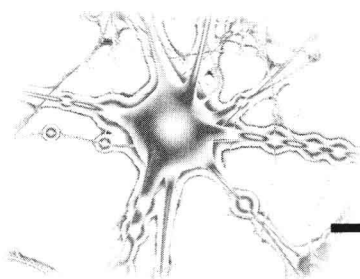


编委 (以姓氏笔画为序)

于宏伟 (哈尔滨医科大学基础医学院)
刘克辛 (大连医科大学药学院)
孙文长 (大连医科大学基础医学院)
孙鲜策 (大连医科大学基础医学院)
朴丰源 (大连医科大学基础医学院)
张凤民 (哈尔滨医科大学基础医学院)
张卓然 (大连医科大学基础医学院)
张俊磊 (第三军医大学)
杨淑凤 (大连医科大学基础医学院)
汪正清 (第三军医大学)
谷鸿喜 (哈尔滨医科大学基础医学院)
周慧敏 (大连医科大学基础医学院)
赵越 (中国医科大学基础医学院)
钱钧 (哈尔滨医科大学基础医学院)
袁小林 (大连大学附属中山医院)
翟爱霞 (哈尔滨医科大学基础医学院)

编者 (执笔人, 以姓氏笔画为序)

于宏伟	马骁驰	王长远	石铭	朴丰源	吕莉
刘克辛	安磊	孙文长	孙鲜策	孙慧君	李华
李卫平	杨淑凤	汪正清	谷鸿喜	张凤民	张卓然
张宝憬	张俊磊	张爱杰	林原	郑丛龙	范晓磊
周慧敏	赵越	姚继红	袁小林	钱钧	高东雁
唐立	唐泽耀	彭金咏	翟爱霞	霍晓奎	



序

细胞 (cell) 是组成除病毒、类病毒和朊粒 (prion) 以外的所有生命体的基本单位, 于 1665 年由英国科学家 Robert Hooke 首先发现。而细胞培养 (cell culture) 则是从生命体内取出组织或细胞, 模拟体内的生理环境, 在体外使细胞生存和生长, 并维持其结构与功能的方法。细胞培养在 19 世纪末就出现了研究的萌芽, 1907 年 R. G. Harrison 用成体蛙新鲜淋巴液培养蛙胚神经组织, 又创建了覆盖凹玻片悬滴培养法, 标志着现代组织细胞培养技术的建立。至今细胞培养的历史只有 100 多年, 但其发展却是一日千里、突飞猛进。从细胞培养技术的发展史中可清晰看出, 该技术在细胞生物学的诞生与发展中起到重要的作用, 它可以从细胞水平上帮助人类揭开生、老、病、死的规律, 探索优生、优育、抗衰老和防治疾病的手段与途径, 人为地诱导细胞遗传性状的改变, 使其向更有利于人类和自然界的方向发展。随着细胞遗传学、细胞生理学、细胞社会学和分子细胞学等分支学科的飞速发展和深入研究, 细胞体外培养技术将为探索体内细胞的物质流、能量流和信息流等生命现象提供有力与可行的方法。干细胞培养技术的成功与逐渐成熟, 加之临床组织移植和细胞治疗的迫切需求, 促进了组织工程学这一新兴学科的诞生与发展。利用组织工程学原理和手段, 以生物材料为载体, 整合被分离的细胞, 促进组织再生与修复, 突破了以往的治疗模式, 提供了新的思路和方法。

张卓然教授主编的《实用细胞培养技术》一书得以再版, 无疑对细胞培养技术的教学、科研起到了巨大的作用。该书全面系统地阐述了细胞培养技术的最新理论和应用, 主要内容包括细胞培养技术的基本理论、细胞培养的条件和基本技术、人与动物各种组织细胞的培养方法, 以及该技术在病毒学、免疫学、肿瘤学、药理学、遗传学、毒理学和细胞治疗学等方面的应用。张教授的编写团队, 大都是相关领域的专家和学科带头人, 长期从事教学、科研工作, 长期工作在基础与临床实验室的第一线, 具有丰富的实践经验和精湛的实验技术, 所编写的技术方法也大多为自己使用过并证明是可行的优选方法。全书内容紧密结合实际应用, 具有较高的学术意义和应用价值。

《实用细胞培养技术》(第二版) 是从事细胞学、病毒学、免疫学、药理学、毒理学、遗传学、临床医学等工作的人员, 以及从事组织和细胞工程技术研究、生产和管理人员的重要工具书, 也可作为基础医学与临床医学、生物技术等专业研究生和本科生开办细胞培养技术课的教材, 可作为从事生物学, 医用生物材料学及临床医学的科研人员和研究生的参考书。

《实用细胞培养技术》(第二版) 是应迅速发展起来的“细胞培养技术”研究生教学, 生

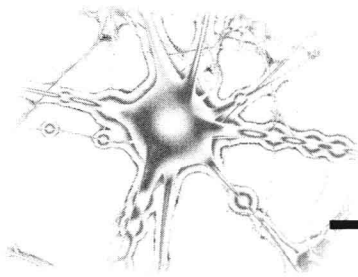
序

物科学研究工作的深入,以及临床上对“细胞治疗和组织细胞工程”的迫切要求而再版的。该书是细胞培养技术的基础理论与应用实践完美结合的范本,既新颖又实用,使读者能获得新的启迪和灵感,特别是在应用这些技术去完成自己的教学与科研工作中,将具有重要的参考价值 and 指导意义,将促进国内细胞培养技术的推广与发展,加快细胞培养实验室建设的步伐。

中国工程院院士 哈尔滨医科大学校长

 教授

2012年7月31日



前 言

细胞培养是从活体内取出组织或细胞,模拟体内生理环境,在体外建立无菌、适温和营养的条件,使细胞生存和繁殖,并维持其结构与功能的方法。细胞培养技术可以帮助人类从细胞水平上揭示生、老、病、死的规律,探索优生、优育,实施抗衰老和防治疾病的措施。现代细胞培养技术的建立和发展已走过百年的历程,现已成为一种在医学和生物学研究中普遍应用的手段,尤其在临床免疫学、药理学和毒理学的研究中,干细胞等在难治性慢性病、肿瘤和遗传性疾病等的治疗中,均得到迅速的发展,具有深刻的学术意义和应用价值。这就提出了一个严肃的问题,即细胞培养的质量将直接影响到研究工作的进展和临床应用的效果。细胞的质量不仅会影响实验结果的真实性和可靠性,而且还涉及“人命关天”的大事。因此,细胞培养并非仅仅是一种操作性技术,要达到一定的水平和标准,而且还需要了解和掌握其基本原理,具备丰富的相关知识和练就熟练的技术,甚至包括伦理学和社会管理学的相关的理论知识,这样才能研制出高质量的细胞,才能有所发现,有所创新。

《实用细胞培养技术》原为医学专业本科和研究生开办细胞培养技术课程的教材,已在数所大学里应用了10余年。此次再版既是应广大读者的要求,更是因为细胞培养技术在这10余年间的飞速发展。从细胞培养技术的发展史中能清晰看出该技术在细胞学的科研与应用中所起到的重要作用。随着细胞遗传学、细胞生理学和分子细胞学等分支学科的飞速发展,再用目前培养细胞的水平去探索体内细胞的物质流、能量流和信息流等生命现象,感到体外细胞孤立、培养技术滞后,将完不成这种关于生命奥秘的探索任务。这就要求我们必须进行培养技术的革新,实现一个从方法学向一专门学科的飞跃。故本书提出了培养细胞学(cultural cytology)的新概念。培养细胞学是应用细胞培养技术研究离体细胞的生命现象与规律,比较体内、外细胞的特点与差异,通过模拟生理条件的革新减少这两种细胞的差异,最终从细胞和分子水平揭示生命的奥秘,成为一门为生物学和医学科研与应用服务的分支学科。

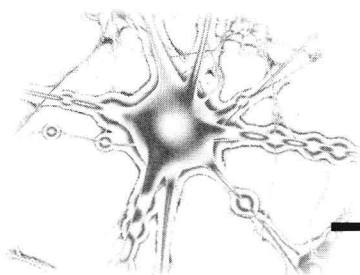
本书共分三篇13章。第一篇有3章,分别讲述细胞培养的基本条件、基本技术和相关的研究方法;第二篇有4章,分别讲述动物细胞、人细胞、干细胞和肿瘤细胞的培养方法;第三篇是应用篇,共6章,分别讲述了细胞培养技术在病毒学、免疫学、肿瘤学、药理学、干细胞、毒理学等方面的应用。本书始终保持实用性、可操作性和先进性的优点,其特点为:①所述培养技术是作者多年来的经验总结,技术成熟,方法可靠,可重复性好;②本书较详尽地介绍了各种细胞的制备与培养,可满足基础研究及临床应用的需求;③培养方法与实验设计密

切配合,与临床应用相适应,能解决诊断、预防和治疗上的各种实际问题;④实验方法先进,反映了研究与应用的最新进展等。该书既是学习细胞培养技术的理论教材,又是一本实验技术手册。是从事细胞学、病毒学、免疫学、药理学、毒理学、遗传学、临床医学等工作的人员,以及从事组织和细胞工程技术研究、生产和管理人员的重要工具书。既可作为医学和生物技术等专业本科生和研究生的教材,又可作为从事生物学、生物材料学及临床医学科研人员的参考书。

由于本书的编写时间比较仓促,作者的学术水平和编写能力又有限,难免出现内容和文字上的错误和疏漏,恳请广大读者和同仁批评、斧正。

大连医科大学 张卓然

2012年8月



目 录

绪论	1
----	---

第一篇 细胞培养的基础

第一章 细胞培养的基本条件	17
第一节 细胞培养实验室的建立	17
第二节 细胞培养用液	27
第二章 细胞培养的基本技术	43
第一节 无菌技术	43
第二节 标本材料的选择和处理	44
第三节 细胞培养类型及培养技术	46
第四节 细胞形态学检查法	55
第五节 细胞培养污染的检测、排除	67
第六节 细胞的冻存、复苏与运输	74
第三章 培养细胞研究及检测技术	78
第一节 细胞周期分析方法	78
第二节 细胞同步化方法	80
第三节 细胞融合	84
第四节 细胞克隆技术	88
第五节 培养细胞的转化	92
第六节 细胞凋亡	95
第七节 培养细胞基因导入技术	100
第八节 细胞酶活性测定	118
第九节 流式细胞分选术	122

第二篇 细胞培养技术

第四章 动物细胞培养	129
第一节 雉科动物细胞培养	129
第二节 鼠科动物细胞培养	137

目 录

第三节	兔科动物细胞培养	150
第四节	犬科与猪科动物细胞培养	159
第五章	人细胞培养	166
第一节	人胚细胞的制备与培养	166
第二节	人内皮细胞的制备与培养	168
第三节	人结缔组织细胞培养	177
第四节	人骨细胞培养	187
第五节	人肌细胞的培养	191
第六节	人肺泡细胞培养	199
第七节	人乳腺上皮细胞培养	200
第八节	人胰岛细胞的制备与鉴定	202
第九节	人甲状腺细胞的制备与应用	204
第十节	人神经元的培养	206
第六章	干细胞的培养	209
第一节	饲养层细胞与条件培养基的制备	209
第二节	干细胞的建系	211
第三节	胚胎干细胞的培养	213
第四节	人皮肤干细胞的培养	219
第五节	大鼠心肌干细胞的培养	221
第六节	人造血干细胞的分离与培养	223
第七节	人骨髓间充质干细胞的培养与诱导分化	226
第八节	大鼠神经干细胞的培养	233
第九节	胰岛干细胞的培养	235
第十节	诱导性多潜能干细胞	238
第七章	肿瘤细胞培养	244
第一节	肿瘤细胞的取材及培养	244
第二节	培养肿瘤细胞的生物学鉴定	251
第三节	影响肿瘤细胞生长实验	254
第四节	常见肿瘤的原代细胞培养	258
第五节	常用肿瘤细胞株的培养	270

第三篇 细胞培养技术的应用

第八章	细胞培养在病毒学研究中的应用	283
第一节	增殖和分离鉴定病毒	283
第二节	病毒性感染的血清学诊断	290
第三节	体外抗病毒药效试验	291

第四节	研究病毒受体及致病机制方面的应用	294
第五节	肿瘤相关病毒致癌机制的研究	296
第六节	制备病毒性疫苗	297
第九章	细胞培养在肿瘤学研究和临床实践中的应用	300
第一节	恶性转化细胞的诱发和培养	300
第二节	肿瘤细胞侵袭性检测	304
第三节	肿瘤细胞端粒酶活性的检测	307
第四节	肿瘤分化诱导模型的建立	310
第五节	肿瘤细胞药物敏感性实验	315
第六节	肿瘤细胞基因及其表达产物检测	319
第七节	肿瘤转移模型的建立	328
第八节	肿瘤细胞修饰和瘤苗制备	329
第十章	细胞培养在免疫学领域的应用	334
第一节	免疫细胞的制备、分离与纯化	334
第二节	免疫活性细胞数量的检测	342
第三节	淋巴细胞增殖活性的检测	346
第四节	免疫细胞的细胞毒活性检测	352
第五节	免疫细胞的体外制备及功能检测	357
第六节	杂交瘤技术制备单克隆抗体	371
第七节	细胞培养用于细胞因子及其受体的检测	375
第八节	细胞培养用于 HLA 的检测	389
第十一章	细胞培养在药理学和药物开发中的应用	399
第一节	药物对培养细胞增殖的影响	399
第二节	细胞对药物摄取的实验	402
第三节	细胞对药物转运的实验	407
第四节	作用于肝脏的药物对体外培养肝细胞的影响	421
第五节	作用于心血管系统药物对培养细胞的影响	429
第六节	抗骨质疏松药物对培养细胞的影响	452
第七节	抗糖尿病药物对培养细胞的影响	457
第八节	抗血栓药物对培养细胞的影响	462
第九节	神经系统药物对培养细胞的影响	473
第十节	影响生殖功能药物对培养细胞的影响	478
第十二章	干细胞培养在临床上的应用	484
第一节	临床治疗用干细胞培养的条件要求	484
第二节	造血干细胞在白血病、恶性肿瘤治疗中的应用	487
第三节	造血干细胞在再生障碍性贫血治疗中的应用	491

第四节	造血干细胞在自身免疫性疾病治疗中的应用	492
第五节	临床研究用间充质干细胞的采集、分离与扩增培养方法	494
第六节	间充质干细胞在缺血性心肌病治疗中的应用	498
第七节	间充质干细胞在终末期肝病治疗中的应用	500
第八节	间充质干细胞在糖尿病治疗中的应用	502
第九节	间充质干细胞移植在帕金森病及中枢神经损伤治疗中的应用	504
第十节	间充质干细胞在骨关节病治疗中的应用	508
第十三章	细胞培养在毒理学中的应用	511
第一节	细胞毒性检测方法	511
第二节	遗传毒性的检测方法	529
附录一	实验室常用的细胞系(株)	549
附录二	常用人工合成细胞培养基	551
附录三	细胞培养及相关试验常用缓冲液	552
附录四	等密度沉降分离时某些哺乳动物细胞在 Percoll 中的漂浮密度	555
中英文对照索引	557

阐明了生物体的繁殖主要是通过细胞分裂的观点,支持并丰富了细胞学说,成为该学说的重要发展。现代细胞学是随着细胞体外培养的实施及包括分子生物学技术在内的物理、化学等方面的技术进步,使细胞水平上的生物学研究日益成为生物学研究的主要方向,因而诞生了细胞生物学。

细胞培养(cell culture)泛指所有的体外培养,其本意是从活体内取出的组织或细胞,模拟体内生理环境,在体外建立无菌、适温和一定营养的特定条件下,使细胞生存和生长,并维持其结构与功能的方法。若以培养物而言,可分为组织、细胞和器官培养等。组织培养指将活体的一小片组织置于底物上孵育,细胞自其周围移出并增殖,实际上培养和增殖的主要成分是细胞。细胞培养是将取材的组织用机械或消化的方法分散成单个细胞悬液,然后进行培养和增殖。无论是组织还是细胞培养,细胞在体外增殖时仍然是相互依存,相互影响的。因此,细胞培养与组织培养是同义词。此外,体外培养中尚有一种培养物,是将活体中的器官或器官的一部分取出置于体外培养,使其生存、生长并同时保持其一定的结构和功能特征,特称为器官培养,以与一般的细胞培养相区别。

细胞培养技术可以从细胞水平上帮助人类揭开生、老、病、死的规律,探索优生、优育、实施抗衰老和防治疾病的手段与措施。人为地诱导细胞遗传性状的改变,使其向更有利于人类和自然界的方向发展。细胞培养的优点是:①研究的对象是活细胞,在实验过程中根据要求可始终保持细胞的活力,并可长时间地监控、检测,甚至定量评估;②可在体外条件下依其需要设计实验方案,不受体内复杂环境的影响去研究细胞的生命活动及规律,可在体外控制pH、温度、O₂张力、CO₂张力等物理、化学条件,可做到精确以及保持相对恒定;③细胞培养所制备的细胞具均一性,由于物种、个体的遗传背景,器官种类和所处发育阶段的不同,想要获取大量生物学性状相同的细胞,必须进行细胞克隆;④研究内容便于观察、检测和记录;⑤研究范围广泛,多学科均可采用细胞培养技术进行研究,如细胞学、免疫学、肿瘤学、生物化学、遗传学和毒理学等;可供实验的组织来源众多,各种动物,可以是胚胎也可以是成体;可为正常组织,也可为肿瘤细胞等;⑥研究费用相对经济,由于细胞培养有可能大量提供相同时期、条件、性状的实验样本,比体内实验经济得多。但是,细胞离体培养,由于所处环境与条件的局限性,在研究中应避免将体外培养细胞的实验结果看作是体内同种细胞性状的反映;反之,离体的细胞系统均会受到人为设计的体外营养系统及环境系统的影响,设计的环境越接近体内状况一步,培养细胞的性状就向回归体内跨越一步,这都是细胞培养技术所涉及的具体问题。培养技术的进步就在于如何去探索和洞悉细胞的特性,如何在体外造就一个极其接近体内细胞的生理环境,满足细胞对物质、能量和信息三者统一的要求,只有这样才能用培养的离体细胞去完成细胞生物学所研究的内容及学科任务。

二、细胞培养的发展史

19世纪初,生物学家为回答神经系统的发生和神经轴突是如何形成的,便开始尝试了神经组织的体外培养,但多不成功。1885年德国学者 Wilhelm Roux 用温生理盐水培养鸡胚神经板组织达数日,而且首次采用“组织培养”这一概念,这是组织培养的萌芽。1898年 Liunggren 将人体皮肤保存在腹水中几日至几周后,再用来作移植手术并获得成功。Jolly 于 1903 年将蝾螈的白细胞输入生理盐水或血清中培养,并观察到活细胞的游走及分裂。Beebe 等于 1906 年用动物血清培养犬传染性淋巴瘤细胞达 3 天。这些尝试为以后细胞培养

的建立奠定了基础。

Russ Granville Harrison 为细胞培养作出重要贡献,他于 1906 年用成体蛙新鲜淋巴液培养蛙胚神经组织近 4 周,从此标志着组织细胞体外培养的基本模式的建立,他首次成功地在体外培养基(凝结的淋巴)中培养了神经元,有力地证实了原始的胚胎神经元或成神经细胞的胞质向外突起而形成轴突,并不断延伸的假说,结束了从 20 世纪以来关于神经轴突形成理论的那场争论。而且他在实验中设计出哈里森悬滴培养法,并总结了一整套合理的无菌操作技术。故一般公认哈里森为“组织培养之父”。

美国医生 M. T. Burrows 和 Alexis Carrel 合作在哈里森实验的基础上,于 1910 年用血浆或用组织匀浆液与血浆混合液代替淋巴成功地培养了狗、猫、小鼠、豚鼠,以至恶性细胞的外植物。外科医生 Carrel 具有良好的无菌技术,用他发明的卡氏瓶(Carrel flask)将一鸡胚的心肌组织经过换液和不断传代的方法,持续培养长达 34 年之久。这些创造性的工作揭示离体动物组织在合适条件下,具有近于无限生长繁殖的能力。此后,美国学者 W. H. Lewis 和 M. R. Lewis 等开始创用已知成分的人工合成培养基取代血浆和胚胎提取液等天然培养基的培养方法,到 20 世纪 50 年代, Maitland、Enders 等将组织培养技术用于病毒学实验,使病毒的分离培养更加简化与成功,为建立脊髓灰质炎的计划免疫,大规模制备和开发减毒活疫苗作出极大的贡献。Earle 等建立了小鼠成纤维细胞 L 株,并进行了克隆化,他设计的 Earle 液仍应用于细胞培养中。而 Dulbecco 和 Moscona 等创用胰蛋白酶消化组织、分散单个细胞,并用液体培养基获得了单层细胞培养,确定了真正意义上的细胞(克隆)培养法,推动了细胞培养技术的发展。接着 Puck 等就成功地进行了细胞克隆培养。Eagle 等在细胞培养技术及培养基的开发研究上作出巨大贡献,Eagle 培养液至今是主要的培养基,并衍生出许多种类,应用于各种培养细胞。在其后的 30 年里,人工合成培养基大量地减少了天然培养基的比重,甚至出现了用纯合成的已知成分培养细胞的方法,即无血清培养基(serum-free medium)培养法。

从 20 世纪 40 年代,青霉素和链霉素等相继问世,并被引入细胞培养过程,有助于常规地保持培养基无菌和减少污染,使细胞培养成为一种广泛应用的实验室技术。50 年代末,组织细胞培养技术进入繁盛阶段,无论培养用器皿、培养基和培养方法等方面都有极大的改进,培养细胞在基础研究与应用领域中得到愈来愈广泛的使用,尤其在医学基础学科和临床医学中的研究与应用得到迅速发展。1952 年 Gey 用一位黑人妇女宫颈癌组织建立了一株 HeLa 细胞的连续细胞系;1961 年 Hayflick 和 Moorhead 分离出二倍体人胚肺成纤维细胞(WI-38),已成为制备很多疫苗最主要的宿主;1965 年, Harris 和 Watkins 用病毒使人和小鼠的细胞融合,1975 年 Kohler 和 Milstein 建立了第一株能分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,使细胞工程进入了一个崭新的阶段。我国也是在此时逐步开展细胞培养技术的,鲍鉴清(1952)、唐仲平(1953)、陈瑞铭(1954)、汤飞凡(1957)等学者利用该技术在自己的研究领域均获成功,为我国和世界的细胞培养技术发展作出贡献。目前,全世界已建立的细胞系有数千种,在许多领域的科研和开发应用中起着极为重要的作用。今天,细胞培养的技术队伍逐渐扩大,该技术已成为实验室常用的研究方法和应用手段,在生物学、医药学、农业、环境保护等方面,成为应用范围极广和利用价值极高的技术。具有临床应用发展前景的干细胞培养(如培养干细胞移植或在体外定向诱导分化后的干细胞移植),组织工程(如组织工程皮肤、骨和软骨缺损的修复),试管婴儿等也都离不开细胞培养技术。细胞培养日益成为生物工程

的研究与生产手段。翻过组织细胞培养发展史的一页,随着细胞生物学和细胞培养技术的迅速发展,迎来了细胞生物学的又一分支学科——培养细胞学的诞生。

三、培养细胞生物学与其研究内容

(一) 细胞生物学与培养细胞生物学

现代细胞学随着细胞体外培养的实施及相关学科进步,诞生了细胞生物学(cell biology)。细胞生物学是生命科学领域中最活跃、最富有发展前景的学科,又是一门发展中的新兴学科,其研究内容是多方面的,并将细胞的研究从细胞整体、亚细胞结构和分子结构等三个不同层面上,将细胞的结构与功能统一起来,探讨细胞生命活动的结构基础,研究细胞内各部分的化学组成和代谢活动,并研究其相互关系和作用,以阐明生物有机体的生长、分化、运动、遗传、变异、衰老死亡等基本生命活动规律。

细胞生物学具有细胞遗传学(cytogenetics)、细胞生理学(cytophysiology)、细胞化学(cytochemistry)、细胞社会学(cytosociology)、细胞形态学(cytomorphology)和分子细胞学(molecular cytology)等6个分支学科。细胞生理学是研究细胞生命活动规律的学科,研究细胞如何从环境中摄取营养,经过代谢获得能量,以进行生长、分裂及其表达功能的;分子细胞学是从遗传信息流(DNA→RNA→Protein)的角度研究细胞内遗传物质的结构和表达的调控;细胞社会学是从系统论的观点出发,研究整体和细胞群中细胞间的社会行为,包括细胞识别、细胞通信和细胞相互作用,研究整体和细胞群对细胞生长、分化和死亡等活动的调节控制。新诞生的培养细胞学要研究的内容在某种意义上和上述三个分支学科有相似之处,但后者是指细胞在体外培养的特定条件下,通过对离体细胞的研究,获取与其相似三个学科所研究的内容和信息。

细胞离体培养的同时也离开了体内神经和体液的调节,随着细胞的传代与纯化,其大部分基因先后都关闭了,不再表达其基因产物;细胞表面受体也因得不到信号刺激而丧失功能,培养条件下的细胞趋入形态与功能的单一化。用这样的细胞去研究和探讨生命的秘密是不可能的。而培养细胞学(cultural cytology)的任务就是应用细胞培养技术研究离体细胞的生命现象和规律,在比较和分析体内、外细胞差异的基础上,通过模拟生理条件的革新来减少这种差异,从细胞和分子水平上去揭示生命的奥秘,服务于生物学和医学的科研与应用。培养细胞学必须在研究与应用中去发展和完善自身,必须在细胞增长周期的调控、细胞通信和细胞信号转导、细胞的生长与分化、细胞衰老与死亡等几个方面加大研究力度,保证在细胞周期中所发生的一系列有序的生化反应,用来调控来自体内外的多种因素。机体功能上的协调统一要求细胞之间的相互作用和影响,即有一个完善的细胞通信,并要求能灵敏和正确进行,在细胞通信中细胞如何识别周围环境中存在的各种信号,并将其转换成细胞内各种分子功能的变化,从而改变细胞内的某些代谢过程,影响细胞的生长速度。随着分子生物学的进展,近年来对细胞信号、分子受体、跨膜信号转导系统及胞质内存在着多种信号转导方式和途径,这是一个十分复杂的网络系统。因此,研究与阐明细胞信号转导的机制对洞悉生命活动本质具有重要作用。这也是培养细胞学研究的重点工作。

(二) 培养细胞生物学的研究内容

随着细胞生物学和分子生物学的相互渗透,分子克隆技术与细胞培养技术相结合,在阐明基因的结构与功能,基因在细胞生长和分化中的作用,以及细胞癌变机制等方面起了重要

作用。因此,对活细胞的研究仍是当前生命科学的中心问题之一。

1. 细胞培养技术在病毒学中的应用 培养细胞为病毒的增殖提供了场所,细胞是分离病毒的最好和最方便的基质,体外培养细胞无抗体及非特异拮抗物质的影响,而且对病毒的敏感性较体内细胞为高,采用离心感染法或提取病毒核酸进行感染,并以细胞打孔器协助感染性核酸的侵入,可扩大病毒感染的宿主范围;病毒感染指标容易观察,光学显微镜下就可见到细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)、包涵体、细胞融合、血细胞吸附等现象,同时也便于用分子病毒学技术进行检测。利用细胞培养可准确进行病毒定性和定量的研究,测定TCID₅₀并用于病毒感染及防治方面的研究。在制备减毒活疫苗和诊断用抗原时,也离不开细胞这一病毒增殖的场所,所以在一定程度上可以说,组织培养技术是伴随着病毒学的发展而发展起来。

2. 细胞生物学的基础研究 单个细胞克隆便于对细胞生物学的基础理论进行研究,如细胞形态、结构,细胞器及其功能,遗传物质、核型、变异、细胞转化、生长周期等,离体培养细胞便于进行环境因素、药物等单因素及多因素的影响作用,探索其作用机制等研究。当今细胞生物学的热点,如细胞通信和细胞信号转导,细胞增殖与细胞周期的调控,细胞生长和分化,细胞的衰老和死亡等,以及干细胞的应用研究和细胞工程都要以培养细胞学为基础,以细胞培养技术为手段和工具。

3. 细胞工程学研究手段已基本建立 组织工程学是一门新兴学科,它利用生命科学和工程学的原理和方法,以生物材料为载体整合被分离的细胞,在宿主体内降解释放细胞,并形成新的具有生物活性的功能组织。利用生物组织工程学原理和手段,再生组织修复组织缺损,突破了以往的治疗模式,为生物组织的再生及修复提供了新的思路和方法。另一方面,在细胞水平上利用细胞融合及杂交技术,进行细胞工程的研究与开发。如生物反应器的开发研究,将生物活性物质的基因导入动物受精卵,随后从动物组织、体液分泌物中获得外源基因的表达产物。如获取人生长激素,先制备人生长激素的mRNA,互补成cDNA后再合成dsDNA,插入SV₄₀病毒中感染猴肾细胞,经大量扩增培养,以10⁷/ml细胞浓度计算,每日从培养液中可收获近1mg生长激素,而用化学提取法产生生长激素时,用羊脑为材料,需从10万只羊脑中仅能提取1mg,而且不是纯生长激素。

4. 干细胞的培养及应用 干细胞是机体的最原始的细胞。具有较强的再生能力,在一定条件下可分化增殖出各类细胞。但干细胞的数量极少,故需分离、保存并在体外大量培养使之长成各种组织和器官。目前干细胞的分离培养主要是集中在有很高应用前景的造血干细胞、胚胎干细胞和神经干细胞上,已成为干细胞研究的首要课题。当然,人们对干细胞的了解仍存在着很多盲区,不论从深度与广度上,还是从临床应用上,干细胞的分离培养与诱导分化等都是培养细胞学的研究重点。

干细胞的研究最终将为人类健康带来无限的益处,其前景目前尚无法估量。干细胞将利用生物学知识构建出新的、可供安全移植到患者体内的器官,而且干细胞的工作无疑会为这项突破作出巨大贡献。干细胞研究的进展为肿瘤或其他众多的不知名的,甚至起源神秘的严重危害人类健康的疾病的治疗带来希望。为患有各种各样疾病的,不同年龄、不同性别的各种背景的人们带来希望。同时,期望干细胞研究应通过适当的方法朝着治愈疾病和创伤的方向前进。这也是无数患者及其亲属们所期望的。

在人类胚胎干细胞的研究上具有伦理学争议,因为它伴随着人类胚胎的毁灭。其伦理

问题涉及毁灭人类胚胎是否为道德所允许,因此是否应当推迟胚胎干细胞的研究。从别人对胚胎的破坏中我们能否获益,我们能否为了获得胚胎干细胞而创造一个胚胎并将其破坏,为了治疗性克隆研究,我们是否可以克隆胚胎等。使用体外人工授精获得的胚胎而进行胚胎干细胞的研究,目前仍不被允许。

5. 淋巴细胞培养技术的应用 淋巴细胞在培养环境中,在受到某些生长因子的刺激下,出现旺盛的分裂增殖。淋巴细胞培养的成功对反映机体免疫功能状况起很大作用,如研究细胞标记,检测 T、B 细胞数量及功能,检测 T 细胞亚群的变化(CD3、CD8、CD4 等细胞),研究 T、B 细胞与细胞因子及体液因子的信息传递等,检测细胞因子产生能力(如 IL-2、TNF、IFN 等)、检测 CTL 细胞、NK 细胞等细胞毒作用,制备 LAK 细胞、TIL 细胞和 CIK 细胞等用于临床肿瘤治疗等。

6. 遗传疾病的产前检查 用羊膜穿刺术获得羊水水中的胎儿脱落细胞进行培养,便可在妊娠早期诊断胎儿是否患有先天性遗传病,少量胎儿脱落细胞是能分裂的,经 2~4 周生长,形成显著单层上皮样细胞,可按常规制备染色体。另可检测 AFP 等,可于产前检测出几十种代谢病与遗传病,较准确地指导优生优育。

7. 细胞作为毒性实验及生物安全性实验的工具 很多化学物质、放射线等对机体的毒性实验及其产生不良影响的安全性调查等,不能用人体试验,用动物实验成本也很高,而细胞培养技术为其提供了最简易而又可靠的方法,并对研究毒性机制提供了良好的实验对象。另一方面,利用一种可观察与检测的指标来测试某药物作用体外培养细胞的变化,如某细胞生长因子对细胞的促分裂作用;某激素促体外培养胰岛细胞分泌胰岛素的作用;某药物杀伤细胞的细胞毒作用等。临床常做肿瘤细胞对抗癌药物的药敏测试,以指导临床抗癌药物的使用及配伍。

8. 细胞培养在现代生物技术中应用很广,如基因分离、基因测序与表达、基因转移与重组、癌基因研究等。在转基因动物的研究中也广泛应用,如将生长激素的基因导入小鼠受精卵中,获得生长快、个体大的转基因巨型小鼠。在培育优良品种时,研制抗病基因、抗病毒基因等转基因动、植物,展示良好前景。在器官移植寻找器官供体上,有人将人的基因转给猪受精卵,培育出带有人类基因的猪,用猪肾供患者进行肾移植,这种做法正在试验中,如成功将会给移植外科带来突破性进展。用遗传改造过的人体细胞直接移植或转入患者体内,达到控制和治愈疾病为目的的细胞治疗,以及为修复某些人体的缺损组织或器官而进行的器官或组织克隆,现已证明有可能使胚胎干细胞(ES 细胞)分化为特殊类型的细胞,作为组织或器官体外生长的重要细胞来源。近来,动物实验进一步证明从某一种组织的活体碎片有可能产生完整的供移植器官;而人的 ES 细胞通过定向生长分化有可能成为某特定组织的细胞。这两方面的发展趋势是器官移植研究的基础和希望。

四、细胞培养的常用术语

随着细胞培养技术的深入研究和广泛应用,新的概念大量出现,常用术语不断增加,不可避免地会在正确理解和使用各种术语上出现混乱,为系统学习细胞培养技术和正确掌握细胞培养过程中经常遇到的理论问题,在此介绍细胞培养的常用术语。其中带有“*”符号的为国际组织培养协会对专业术语的统一规定与解释。

1. 培养细胞学(cultural cytology) 应用细胞培养技术研究离体细胞的生命现象和规