



普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

医学细胞生物学

第3版

主 编 胡继鹰 李继红



科学出版社

R329.2
20136.3

阅 览

普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

医学细胞生物学

第3版



主 编 胡继鹰 李继红
副主编 王明艳 孙 媛 赵 雷 慕明涛
编 委 (以姓氏笔画为序)

王志宏 长春中医药大学
王明艳 南京中医药大学
朱登祥 河北北方学院
许 湘 湖北中医药大学
孙 媛 大连医科大学
李继红 河北北方学院
赵 雷 长春中医药大学
胡继鹰 湖北中医药大学
倪 娅 湖北中医药大学
徐云丹 湖北中医药大学
慕明涛 延安大学
霍满鹏 延安大学

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书是普通高等教育“十二五”规划教材之一,为第3版。全书内容共分15章,主要介绍了细胞的化学组成,人体细胞的类型和特征,细胞及细胞器的结构和功能,细胞增殖、分化的过程以及细胞衰老、死亡、保护的原理;另外还介绍了细胞的病变与疾病发生、细胞工程及其应用等内容。本书特点是内容深入浅出、适合教学,图文并茂、语言精练、简明扼要地介绍了医学细胞生物学的基本理论、基本知识和基本方法以及本学科的最新成果。

本书可供全国高等医药院校本、专科生作为教材使用,也适于生物学工作者和临床医生等其他人员阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学 / 胡继鹰, 李继红主编. —3版. —北京: 科学出版社, 2013

普通高等教育“十二五”规划教材·全国高等医药院校规划教材

ISBN 978-7-03-037176-8

I. 医… II. ①胡… ②李… III. 医学-细胞生物学-医学院校-教材
IV. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 051925 号

责任编辑:郭海燕 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2000年7月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年3月第 三 版 印张:13 1/2

2013年3月第十六次印刷 字数:320 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

细胞生物学作为研究细胞的结构、功能和生命活动规律的科学,作为联系生命宏观活动和微观活动、生物大分子和亚细胞结构表现的枢纽,是生命科学领域最为活跃、最为重要的学科,也是成果最多、发展最快的现代生命科学之一。

本书作为一本全国高等医药院校使用的细胞生物学教材,自2007年第2版发行到现在,又使用了6年。这6年来,细胞生物学学科领域取得了很大的进展,研究成果不断涌现,知识不断更新。为了及时反映本学科的最新发展和研究动态,丰富本课程的教学内容,我们组织了第3版的修订。

本教材于2000年在科学出版社出版第1版开始,因其内容简洁、层次分明、图文并茂得到了众多读者的厚爱,尤其是一些教学时数在36学时左右的学校,感觉本教材内容非常适中,老师和学生的教与学都比较得心应手。我们一直认为,教材最重要的特点是它的适用性,教材内容的选择一定要根据教学对象量体裁衣,教材要突出内容的知识点、重点和难点,做到易教易学。根据这个原则,我们在本书的编写过程中,尽量深入浅出,将复杂的问题条理化,深奥的问题图表化,使老师教得轻松,学生学得容易。

由于前两版得到了读者的肯定,本次修订在编排体系上没有做大的修改,但为了加强本课程与医学的联系,增加了“细胞的病变与疾病的发生”这一章,而且全书内容还是将细胞的结构和功能融合叙述,既强调基础知识,也尽量收集最新进展,保持本书的可读性和内容的先进性。此外,补充和更换了部分图表,使内容更容易理解。

根据编委会的意见,本次书名去掉了“导论”两字,更名为《医学细胞生物学》(第3版),主要目的是更加有利于不同学校的课程安排。另外为了方便学生阅读,本版将内页采用双色印刷,书的版式更加美观。此外,本次印刷将重要名词加粗,便于学生查阅。

参与本书修订的有6所学校的12位老师,他们是湖北中医药大学胡继鹰、倪娅、许湘、徐云丹,南京中医药大学王明艳,长春中医药大学王志宏、赵雷,大连医科大学孙媛,河北北方学院李继红、朱登祥,延安大学医学院慕明涛、霍满鹏。这些老师大多是长期工作在教学第一线的中青年教师,他们既充满活力,容易接受新知识,也具有丰富的教学经验。

尽管我们做了很大的努力,但想使本教材的各方面做到十分满意还是比较困难的,加上主编的水平所限,本书肯定还会有不少的问题,希望读者予以批评指正,在此我们致以衷心的感谢!

胡继鹰

2013年3月于武昌

目 录

前言

第一章 绪论	(1)
第一节 细胞	(1)
第二节 细胞生物学	(4)
第三节 医学细胞生物学	(12)
第二章 细胞的化学组成	(16)
第一节 组成细胞的化学元素	(16)
第二节 组成细胞的化学分子	(17)
第三章 细胞的基本形态及类型	(31)
第一节 细胞的形状和大小	(31)
第二节 人体细胞的种类及基本特征	(32)
第四章 细胞膜及细胞表面	(43)
第一节 细胞膜的化学组成	(43)
第二节 细胞膜的分子结构模型及特性	(48)
第三节 细胞表面及其功能	(51)
第四节 细胞表面的特化结构	(60)
第五章 核糖体与蛋白质的生物合成	(64)
第一节 核糖体的化学组成及形态结构	(64)
第二节 蛋白质的生物合成	(66)
第六章 细胞内膜系统的结构与功能	(72)
第一节 内质网	(72)
第二节 高尔基复合体	(77)
第三节 溶酶体	(81)
第四节 过氧化物酶体	(85)
第五节 膜流	(87)
第七章 线粒体的结构与功能	(88)
第一节 线粒体的形态结构	(88)
第二节 线粒体的氧化供能作用	(91)
第三节 线粒体的半自主性	(95)
第四节 线粒体的生物发生	(97)
第八章 细胞核与细胞遗传	(100)
第一节 细胞核的形态及化学组成	(100)
第二节 细胞核的基本结构和功能	(102)
第三节 染色体及人类染色体核型	(110)
第四节 细胞的遗传	(114)
第九章 细胞骨架与细胞运动	(124)
第一节 细胞质骨架	(125)
第二节 细胞的运动	(138)

第三节 核骨架	(144)
第十章 细胞连接与细胞外基质	(146)
第一节 细胞连接与细胞社会	(146)
第二节 细胞外基质	(149)
第十一章 细胞的增殖	(154)
第一节 细胞周期	(154)
第二节 间期细胞的主要特点	(155)
第三节 细胞分裂	(157)
第四节 细胞增殖的调控及细胞增殖理论的应用	(162)
第十二章 细胞的分化	(166)
第一节 细胞分化的概念及其特点	(166)
第二节 细胞分化的决定及影响因素	(168)
第三节 细胞分化的分子基础	(172)
第四节 干细胞及其分化	(174)
第五节 细胞癌变与分化	(178)
第十三章 细胞的衰老、凋亡及保护	(181)
第一节 细胞的衰老	(181)
第二节 细胞凋亡	(184)
第三节 细胞保护	(189)
第十四章 细胞的病变与疾病的发生	(192)
第一节 细胞膜与疾病	(192)
第二节 线粒体与疾病	(194)
第三节 内质网与疾病	(196)
第四节 溶酶体与疾病	(196)
第五节 高尔基复合体与疾病	(197)
第六节 细胞骨架系统与疾病	(198)
第七节 细胞核与疾病	(198)
第十五章 细胞工程及其应用	(202)
第一节 细胞融合	(202)
第二节 淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体	(203)
第三节 细胞核移植与动物克隆	(205)
第四节 转基因技术与转基因动物	(207)
第五节 干细胞工程	(208)
主要参考文献	(210)

第一章 绪 论

第一节 细 胞

一、细胞的概念

细胞是构成生物体的基本结构和功能单位。细胞 (cell) 一词来源于希腊文 *kytos* 和拉丁文 *cellulae*, 原意为“秘室”或“单间房”。该词首先由英国人罗伯特·胡克 (Robert Hooke) 在生物学中作“细胞”之意使用。

1665 年, 胡克出版了一本用他自己制作的显微镜 (放大倍数仅 40 ~ 140 倍) 观察物体后编绘的显微图 (*micrographia*) 画册, 画册中有一张软木薄片显微图, 该图显示软木呈现蜂房状的结构, “蜂房”小室排列规则, 室内含一些黑糊状物质, 在其说明中, 胡克将该“蜂房”小室称为 *cell* (图 1-1)。

从此以后的几个世纪, 经过历代科学家们的不懈努力, 尤其是 20 世纪 50 年代以后电子显微镜及有关先进技术的应用, 使人们对于细胞有了相当深刻的认识。现在不仅弄清了细胞的形态结构, 而且对它的发生、发展、生理功能都有了比较全面的了解, 并证明生物界除了病毒等少数种类外, 所有的生物体都是由细胞构成的。单细胞生物如细菌、原虫等, 结构简单, 仅由单个细胞构成; 而多细胞生物包括人体, 则由若干个细胞构成。构成多细胞生物体的若干个细胞, 在个体发育中由于细胞的增殖分化, 形态、结构、功能上产生了差异, 形成不同类型的细胞, 它们在同一机体中有机的结合, 共同完成生命功能。



图 1-1 胡克使用的显微镜和绘制的细胞图

二、细胞的起源和进化

细胞是地球演变和生物进化的产物。科学家们认为, 现今构成各种生物体的细胞都有一共同的祖先细胞, 这种祖先细胞大约起源于 35 亿年前。根据古生物化石 (如南非太古代地层发现的古杆菌和贝通球藻化石) 以及科学推断, 原始细胞首先由甲烷、氨、氢、水等简单有机分子和无机分子化合成较为复杂的有机物如氨基酸、核苷酸、糖、脂肪酸, 然后这些物质再聚合成更复杂的生物大分子, 如核酸和蛋白质。现有的研究表明, 核酸和蛋白质是细胞最基本的物质。核酸分子 (如 DNA) 能够自我复制, 并能指导蛋白质的生物合成。核酸和蛋白质聚合, 形成的结构所表现出的新陈代谢或称自我更新, 即最简单的生命形式。现存的非细胞生物——病毒, 仅含核酸和蛋白质, 是这种简单生命形式的例证 (图 1-2、图 1-3)。

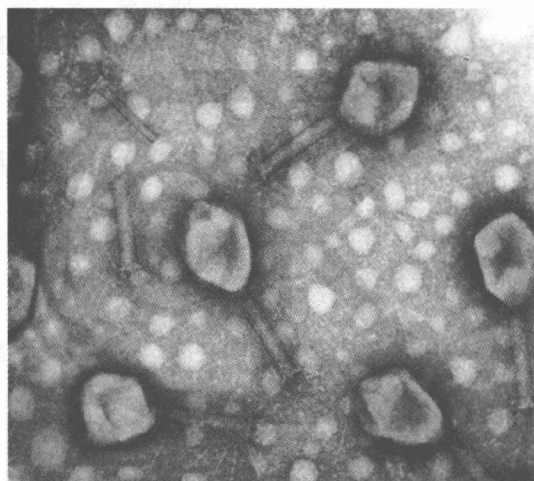


图 1-2 电镜下的病毒(T4 噬菌体)

随着细胞的进化,原始生命体的外周开始形成由类脂物质和蛋白质组成的外膜,这样的膜使生命体有了基本外形,也使生命活动得到了保护和相对的稳定。这种由膜包裹的原始生命体即形成的原始细胞,就是现存细胞的祖先。现存最简单的细胞生物——支原体为类似的结构,其具备脂质的膜,内含基本数量的核酸和 750 种左右的蛋白质。

三、细胞的类型和基本结构

原始细胞经过进化,最终形成目前的两大细胞类型,即原核细胞和真核细胞。前者有细菌(图 1-4)、放线菌、衣原体、支原体等,而后者包含原虫、真菌、植物、动物及人体的细胞。

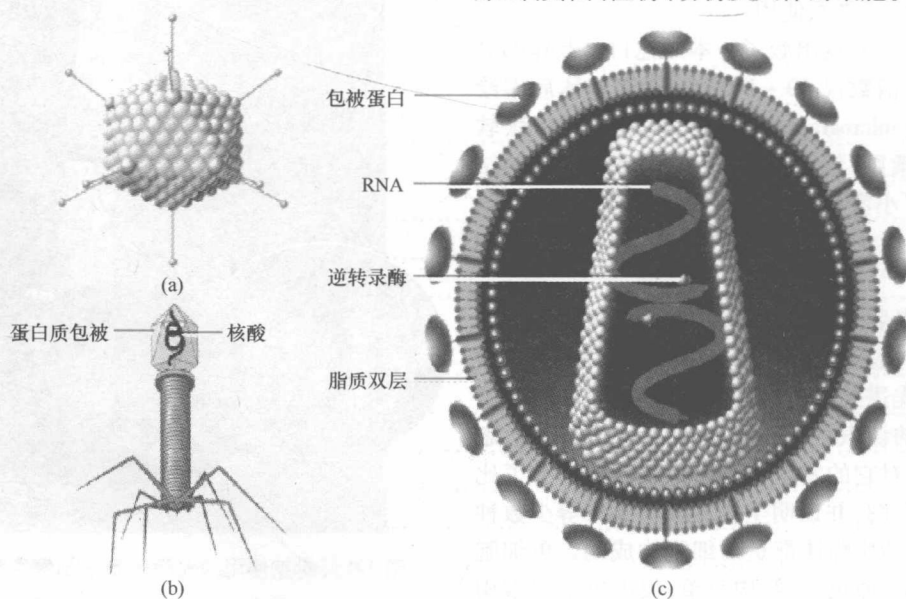
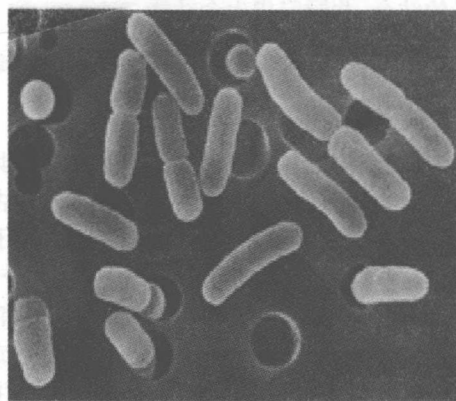
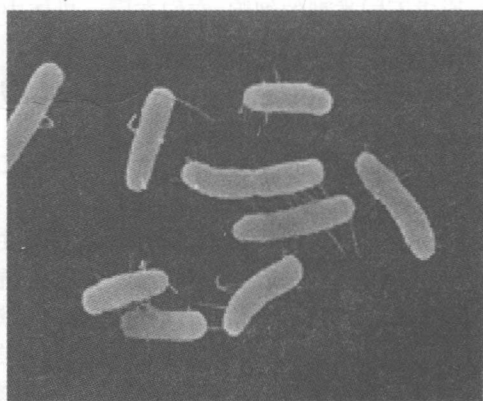


图 1-3 病毒结构模式图

(a) 腺病毒; (b) 噬菌体; (c) 艾滋病病毒



(a)



(b)

图 1-4 电镜下的细菌形态

(a) 大肠杆菌; (b) 沙门杆菌

第二节 细胞生物学

一、细胞生物学的形成和发展

自17世纪中叶细胞被发现以后,人们对于生物体的认识开始进入微观世界。到20世纪50年代,由于电子显微镜等先进仪器和先进技术在生物学中的应用,对生物体的认识又进一步深入到微观直至分子水平。因此,人们不仅了解了细胞的一般形态结构,也基本了解了细胞的内部构造、分子组成及其功能关系。因此,以细胞作为研究对象的学科——细胞生物学也随之诞生。从细胞的发现到细胞生物学的建立,经历了300多年,这段历程一般分为以下三个历史阶段。

(一) 细胞学说时期

这段时期一般认为是从1665~1875年。如上所述,1665年胡克用自制的显微镜首次观察到植物的组织细胞,现在确认胡克当时所观察到的细胞实际上是一些死亡的“栎树”韧皮部细胞,是仅存细胞壁的死细胞。1674年,荷兰生物学家列文·胡克(Leeuwen Hoek)用放大倍数较高(约300倍)的显微镜观察到水生原生生物(如纤毛虫)、单细胞藻类、动物精子及鱼类红细胞后,才算真正观察到生活状态的细胞。以后,由于显微技术的不断改进和普及,尤其是石蜡切片法和组织细胞染色技术的应用,使人们对细胞的认识也日趋深入。这段时期,发现了细胞核(Brown, 1831),发现了细胞分裂现象(Mhöl, 1835),发现了细胞的“肉样质”即原生质(Duiardin, 1835),发现了核仁(Valentin, 1836)等。这些发现,使人们对细胞的认识初具系统性。于是,德国植物学家施莱登(Schleiden)总结前人成果并结合自己的研究,于1838年出版了《关于植物的发生》一书,指出“植物,无论发展到多么高级,都是由个体化的、各自独立的、分离的物体组成的聚合体,这些物体就是细胞”。第二年,德国动物学家施旺(Schwann)(图1-6)发表了关于“动植物在结构和生长中相似性的显微研究”一文,提出“整个动物和植物乃是细胞的集合体,它们依照一定的规律排列在动、植物体内”,从而使人们对细胞的认识理论化,并建立起关于细胞的“学说”。



图1-6 德国植物学家施莱登(Schleiden)(左)和施旺(Schwann)(右)

一般来讲,细胞学说(cell theory)包括以下内容:①一切生物体,包括单细胞生物、植物和动物,都是由细胞组成的。②所有细胞在结构、组成上基本相似。③生物体通过细胞的生理活动反映其功能。现在看来,这些观点是符合实际的。

此外,还应指出的是,当时的德国医生和病理学家魏尔啸(Virchow, 1855)将细胞学说应用于医学,提出“一切病理现象都是基于细胞的损伤”,并提出了“生物体的子细胞是由已存在的母细胞分

裂而来”的新见解,不仅丰富了细胞学说的论点,而且为疾病的发生提出了重要的理论依据。

细胞学说的建立是科学史上的伟大事件,被伟大的革命导师恩格斯誉为19世纪自然科学的三大发现之一(另两大发现为“进化论”和“能量守恒及转换定律”)。但由于当时研究仪器和研究方法的局限,人们对细胞的研究只是停留在形态观察和一般的生命活动的认识层面上,而对细胞的复杂生理功能和生化活动,还不十分了解。

(二) 细胞学时期

从19世纪末期开始,由于研究技术和方法的改进,如使用苏木精、洋红等细胞染色剂,使用切片机和复式显微镜等使细胞的研究又有了许多新发现,如细胞的有丝分裂(Flemming et al., 1880)和减数分裂(Benden, 1883),马蛔虫卵中的中心体(Benden, 1883)以及线粒体(Altmann, 1894)、高尔基体(Golgi, 1898)等。同时,完善了原生质理论,提出了原生质体(protoplas)的概念(Hanstein, 1880)。这一时期还开始使用“染色体”这一名称(Waldeyer, 1888)。与此同时,卡劳尔(Carnoy)于1884年在比利时劳汶的天主教大学创办了第一本专门报道细胞研究的杂志《细胞》(*La Cellule*)。这样,使细胞学说上升到了一个新的水平,并建立起系统的学科体系,从而使细胞学说上升为细胞学(cytology)学科。由于这一时期仍以动植物细胞的形态观察描述为主,为区别于后几十年细胞的实验研究,有人将细胞学形成的这一时期称为经典细胞学时期。

20世纪上半叶,科学技术迅速发展,相邻的学科之间相互渗透,细胞学也从单一的形态结构研究转入生理功能、化学变化、发生发展的综合研究,而且广泛采用了实验的手段,因此,这一时期被称为实验细胞学时期。

最早以实验方法研究细胞活动的是赫特维希(Hertwig)等人。他研究海胆卵的受精过程,人为地去掉其细胞核,观察是否受精,同时用物理、化学的方法刺激受精卵的发育。同时,美国学者摩根(Morgan)以果蝇为材料,研究遗传因子的效应,不仅发展了19世纪孟德尔(Mendel)的遗传理论,而且将生物的遗传与细胞的作用联系起来。另外,细胞化学、细胞生理方面的研究也取得较大进展,如美国学者Harrison于1907年用蛙淋巴液成功地培养了神经细胞,1912年法裔美国人卡雷尔(Carrel)采用严格的组织培养技术,成功地培养了鸡胚胎成纤维细胞。1924年Fenlgen首创Fenlgen染色法鉴别细胞中的核酸物质。1943年克劳德(Cloude)以高速离心机从活细胞中分离出线粒体并证实线粒体是细胞氧化反应的中心场所等。

由于这一时期细胞学的发展迅速,也诞生了一些分支学科,例如以染色体为中心,研究细胞遗传现象的细胞遗传学;以研究细胞生理活动为主的细胞生理学;研究细胞化学组成及化学功能定位的细胞化学等。

(三) 细胞生物学时期

从20世纪50年代开始,具有高分辨力的电子显微镜应用于细胞学,使细胞内部结构如内质网(Porter, 1950)、溶酶体(DeDuve, 1952)、质膜(Robertson, 1958)、高尔基复合体(Sjostrand, 1950)、线粒体(Palade, 1952)得以发现或重新认识。另外,层析法和放射性核素示踪方法等在细胞学中的应用,使细胞的一些化学成分得到分析和鉴别。尤其是1953年华生(Watson)和克里克(Crick)对DNA分子双螺旋结构的阐明和“中心法则”(Crick, 1958)的提出,以及三联体遗传密码(Nirenberg and Matthaei, 1961)的证明,更为细胞分子水平的研究奠定了基础。为了更确切地表达这个学科的内涵,于是将细胞学更名为细胞生物学(cell biology),使得对细胞的研究更加丰富和系统化。细胞生物学也就定义为:从细胞整体水平、超微结构水平和分子水平三个层次综合探讨细胞生命活动规律的学科。

在1976年在美国波士顿召开的第一届国际细胞生物学会议上,将1965年DeRobertis的原著《普通生物学》更名为《细胞生物学》,这标志着细胞生物学学科的形成。一般来讲,细胞学与细胞生物学的主要区别在于前者主要从静态和光镜的水平研究细胞的形态、结构和生理功能,而后者是从动态和电镜水平综合研究细胞的生命活动规律。由于目前细胞生物学对细胞的认识已经深入到了分子水平,并与分子生物学、生物化学等形成明显的交叉,其研究范畴已不易界定,一故从20世纪80

年代后期开始,有人将细胞生物学称为分子细胞生物学或细胞分子生物学(molecular cell biology, molecular biology of the cell)。

二、细胞生物学的研究内容和范围

由于各种新技术、新方法的应用和现代生物学、物理学、化学等学科的渗入,细胞生物学的研究内容日趋深入,范围更加广泛。目前,它的基本研究内容和范围主要包括以下几个方面。

(一) 细胞的结构和化学组成

各种细胞的结构及其化学组成情况是细胞生物学的基本内容和主要研究内容。细胞结构包括细胞整体结构、超微结构及细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间的联系结构。化学组成包括细胞结构的分子组成,细胞内化学成分的分佈、含量、比例以及代谢变化规律等。如对生物膜的研究不仅要弄清它的分子组成、分子排列特点,还要分析同属于生物膜的质膜与细胞内膜的同一性、差异性以及正常细胞与异常细胞(如癌细胞膜)的区别等。

(二) 细胞及细胞器的功能

在研究细胞结构的基础上进一步研究认识细胞及细胞器的功能,特别是细胞内各种生理、生化作用的定位。如现在已经比较清楚地认识到细胞中的线粒体是细胞呼吸的中心,细胞中的物质氧化、能量转换主要发生在线粒体;溶酶体是细胞内的消化器官,能分解消化进入细胞内的异源性物质及促进自身衰亡的结构;核糖体是细胞内蛋白质合成的场所等。

此外,还从细胞的整体水平研究细胞器与细胞器的功能关系,如粗面内质网与核糖体、高尔基复合体在蛋白质的合成、加工、运输方面具有的相互联系,从而了解细胞的生命活动规律。

(三) 细胞的增殖与分化

细胞的增殖和分化是细胞的基本生命活动,细胞通过增殖增加其数目,通过分化产生新的细胞种类。尤其在多细胞生物体,两者之间存在着密不可分的关系。但细胞为什么会增殖而且如此有序?分化为什么如此稳定并总向一个方向发展?这些问题至今还没有完全解决。目前知道细胞的增殖和分化受到细胞内外许多因素的调节控制,如基因的调节、有丝分裂因子的调节、生长因子的调节、信息分子如环核苷酸的调节等。研究细胞的增殖和分化不仅对认识生物个体的发生有一定意义,而且对一些具体问题如癌的发生与防治、遗传性疾病的发生与预防有指导意义。

(四) 细胞的衰老与死亡

细胞作为生命的基本结构和功能单位有一个生命活动周期,衰老、死亡是它的必然归宿。细胞的衰老虽与机体的衰老不同,但其关系密切,从一定意义上讲,细胞的衰亡是机体衰亡的基础,尤其是一些高度分化的细胞如脑细胞、心肌细胞,其衰亡直接与机体的衰亡相关。细胞如何衰亡?特征如何?能否控制和如何控制?这都是细胞生物学所要研究的问题。

此外,细胞的运动、细胞的遗传变异、细胞的免疫以及细胞工程也都是细胞生物学的重要研究内容。

虽然细胞生物学目前已经解决了有关细胞的许多问题,但还有许多难题有待深入研究。进入21世纪以来,分子细胞生物学的研究热点主要集中在以下方面:①真核细胞基因组的结构及基因在时间和空间上的有序表达;②基因表达和基因表达产物结构蛋白对细胞结构的装配及活性因子与信号分子对细胞生命活动的影响;③生物膜的结构与功能;④细胞骨架与核骨架的结构与功能;⑤细胞生长、分化、衰老的机制及调控;⑥细胞的癌变机制及控制;⑦神经细胞的生命活动;⑧细胞信号转导及细胞社会性等。因此,作为当今的细胞生物学,这些方面的研究十分活跃,是本学科的前沿研究领域,同时也是现代生命科学的重要前沿研究领域。

三、细胞生物学的研究技术与方法

纵观细胞生物学的形成和发展过程,可以看出细胞生物学的每一进展都与相关的研究技术和方法创新密切相关。如果没有显微镜的发明和应用,就不会有细胞的发现和细胞学的诞生;没有电子显微镜技术及有关细胞形态、生理生化分析方法的应用,就不会形成今天的细胞生物学。随着细胞生物学研究的深入,技术手段和方法也要求更加先进。就目前在细胞生物学领域采用的技术和方法来讲,主要有以下几种。

(一) 光学显微技术

光学显微技术用于细胞显微结构的观察。人眼的生理分辨能力约为 $100\mu\text{m}$,而人体细胞的直径通常为 $10\sim 20\mu\text{m}$ 。因此,要看到人体细胞的结构,必须要借助于放大工具显微镜。光学显微技术是指通过光学显微镜观察物体的技术,在光学显微镜下能观察到的细胞结构通常称为显微结构(microscopic structures)。由于细胞一般无色透明,直接用显微镜观察不易分辨其结构,而往往需要经过制片处理。因此,光学显微技术包括显微镜技术和显微制片技术两部分。

光学显微镜是利用可见光作为光源,通过一组玻璃透镜包括目镜、物镜、聚光镜来放大被观察物体,提高分辨力的仪器。所谓分辨力,指人眼在 25cm 的明视距离处分辨物体细微结构最小间距的能力。普通光学显微镜的分辨力为 $0.39\mu\text{m}$,最大放大倍数可达 1600 倍。根据不同的用途,光学显微镜可分为五种类型。

1. 普通光学显微镜(light microscopes) 用于一般形态结构的观察,可看到染色后的细胞核、核仁、细胞膜、线粒体、中心体、高尔基复合体、染色体等,是应用最为广泛的显微镜(图 1-7)。

2. 相差显微镜(phase contrast microscopes) 在普通光镜的聚光器上加一个环形光阑制成,其原理是通过改变光线的振幅差,提高细胞结构的对比度而提高分辨力,主要用于活体细胞的观察。

3. 暗视野显微镜(dark field microscopes) 在普通光镜的聚光器中央加一块遮光板,使照明光线不直接进入物镜,这样视野的背景是黑暗的,而被检物体为亮点,暗视野显微镜也适于观察活细胞,但不能用于细胞内部结构的观察。

4. 荧光显微镜(fluorescence microscopes) 以非可见光紫外光和蓝紫光作为光源,激发标本中的荧光物质使其发射荧光,可用于细胞特有结构的观察。紫外光或蓝紫光由特制的滤光器或滤光系统产生。细胞中的某些物质,如叶绿体能自发产生红色荧光,而有些结构如男性体细胞的 Y 染色体等则需经过荧光染料(如吖啶橙等)染色才能产生荧光。此外,荧光显微镜还可对细胞中的某些大分子物质如 DNA、RNA 等的浓度和分布进行监测,也可对抗原、抗体的结合作定位研究。

5. 激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopes, LSCM)(图 1-8) 用普通光学显微镜观察薄的切片时,无法得到三维结构的信息,且光学显微镜是全视野照明,降低了图像的反差和分辨力。共聚焦是指物镜和聚光镜互相共焦点,这样保证了只有从标本焦面发出的光线才能聚焦成像,因此,大大提高了分辨力,使图像更加清晰。激光扫描共聚焦显微镜以单色激光作为光源,对样品焦平面进行扫描,产生二维图像,信息通过计算机处理,就可产生三维图像。激光扫描共聚焦显微镜多检测发射荧光或用荧光标记的物质,目前,在生物学和医学的研究中用途广泛,可以辨别细胞内

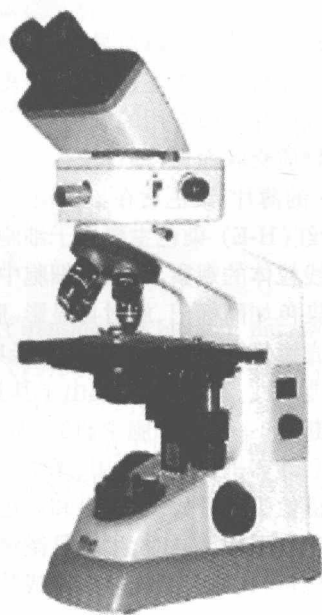


图 1-7 普通光学显微镜(Nikon YS100)

许多复杂的三维结构,包括细胞骨架、染色体的结构及基因的排列等。

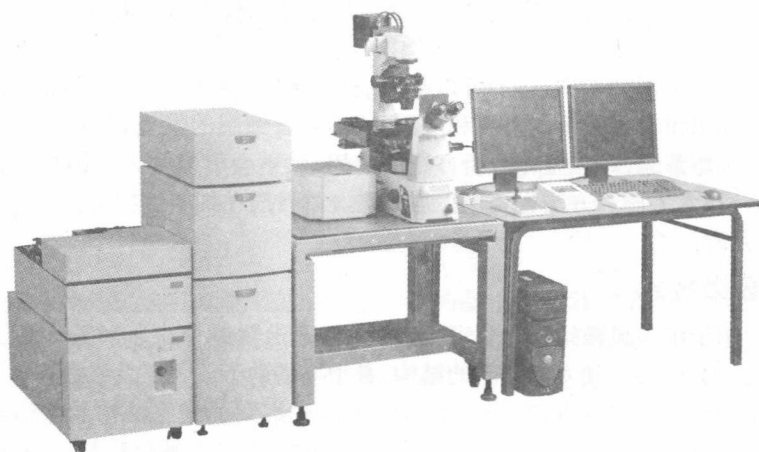


图 1-8 激光扫描共聚焦显微镜 (Nikon A1)

显微制片术是指对显微镜观察标本进行处理以提高分辨力的技术,一般包括制片和染色两个步骤。液体材料如血液、骨髓及表皮组织可直接涂片和铺片后染色观察。固体组织材料则需通过组织切片或压片。最常用的方法是石蜡包埋切片,组织材料经甲醛、戊二醛等固定剂固定,使细胞中的大分子物质交联而保持原位,再经乙醇等脱水剂脱水,然后用熔化的石蜡包埋,在切片机上切成 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 的薄片,染色后在显微镜下观察。标本的染色根据不同的目的而采用不同的方法,如铁苏木精-伊红(H-E)染色主要用于细胞形态结构观察,硝酸银染色用于高尔基复合体的观察,派若宁染色用于线粒体的观察。另外,细胞中酶的显示、化学成分(如DNA、RNA)、糖原的显示,还可通过特殊制片染色如酶标记、放射自显影、胶体金标记在光学显微镜下观察。

光学显微技术是一项比较经典的技术,虽然不能对细胞进行十分精细的研究观察,大多数情况下只能定性,不能定量,但由于其技术性要求不很高,容易普及,再加上很多实际问题(如临床细胞学诊断)和一般性细胞学研究(如染色体形态观察)的需要等,至今仍被广泛使用。目前,由于电子技术和计算机技术的应用,光学显微镜的应用范围和效率大大提高,如电视显微镜,将生物显微镜与数码摄像头、高保真录像机和彩色监视器结合,使观察效果得到很大提高,并能有效记录和随时得到高清晰度图片。同时,生物显微镜也可与计算机结合,利用图像分析软件对观察标本进行自动定性、定量分析,其称为智能显微镜或数字显微镜。

(二) 电子显微技术

电子显微技术用于细胞超微结构的分析观察。电子显微技术同样包含两个方面,即电子显微镜技术和制片技术。电子显微镜自1932年发明以来,性能和用途有了很大提高。电子显微镜与光学显微镜的最大区别在于它以高速运动的电子束代替光线,以电磁场透镜代替玻璃透镜(表1-2,图1-9)。由于光学显微镜受可见光波长和玻璃透镜镜口率(又称数值孔径, numerical aperture, N. A.)的限制,放大倍数也受到局限,而电子束在不同加速电压下可产生不同的短波,这种短波的波长仅为可见光波长的十万分之一,因此电镜的放大倍数可以大大增加。理论上讲,加速电压越高,电子运动越快,波长就越短,分辨力也越高。例如,使用100kV的加速电压,电子束的波长约为0.004nm,此时电镜的实际分辨力可达0.1nm,可以分辨原子,但由于制片技术所限,加上生物标本往往不能承受强大电子流的轰击而被损伤,所以分辨力难以达到理想值。一般普通电镜的最大分辨力约为2nm,直接放大倍数可达80万倍左右。在电镜下观察到直径小于 $0.2 \mu\text{m}$ 的细微结构称为亚显微结构(submicroscopic structures)或超微结构(ultramicroscopic structures)。

表 1-2 光学显微镜与电子显微镜的主要区别

类型	分辨力	光源	透镜	真空要求
光镜	200nm 100nm	可见光（波长 300 ~ 紫外光(波长约 200nm)	玻璃	不要求真空
电镜(TEM)	接近 0.1nm	电子束（波长 0.01 ~ 0.9nm)	电磁	要求真空($1.33\times10^{-5} \sim 1.33\times10^{-3}$ Pa)

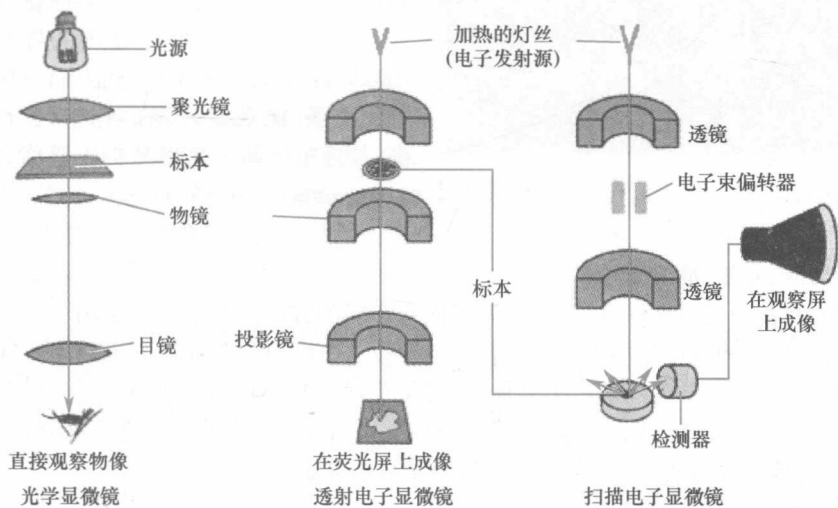


图 1-9 光学显微镜和电子显微镜原理图

电子显微镜根据性能的不同又分为两种类型,即**透射式电镜**(transmission electron microscope, TEM)和**扫描式电镜**(scanning electron microscope, SEM)(图 1-10)。透射式电镜主要用于细胞内部结构的观察,所观察的材料必须固定、脱水后用环氧树脂等包埋,以超薄切片机切成厚度为 50 ~ 100nm 的超薄片,并用硝酸铅、醋酸铀等染色后才能观察。扫描电镜采用的是二次电子成像原理,即首先由电子枪发射的电子束形成电子探针在标本上扫描,然后标本被电子电离产生的二次电子被收集、转

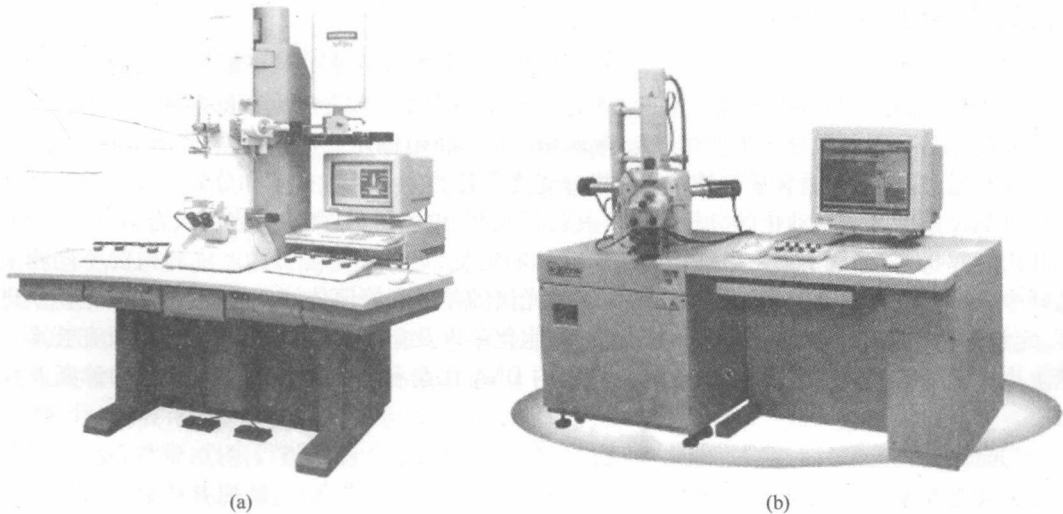


图 1-10 电子显微镜
(a) 透射式电镜(日立 H-7500);(b) 扫描式电镜(日立 S-3500N)

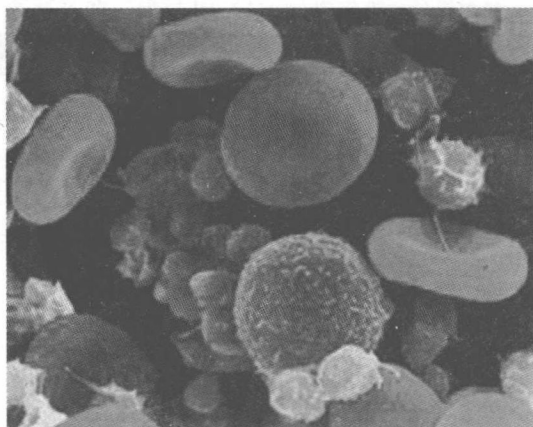


图 1-11 扫描电镜下的红细胞、淋巴细胞和血小板

换后放大,在荧光屏上成像。扫描电镜所观察的标本只需干燥、镀金(使标本导电),不需切片。因此,其常用于细胞或组织材料的表面观察分析。扫描电镜的分辨力不如透射式电镜,一般只有 $6 \sim 10\text{nm}$,但景深长,观察的图形富有立体感(图 1-11)。

近年来,电子显微技术无论是电子显微镜本身还是样品制备,都有很大的提高。从电镜本身讲,首先是电子束加速电压的提高,从普通的 100kV 提高到 500kV 甚至达到 3000kV ,这样穿透力更强,能观察较厚的标本且分辨力大大提高,加速电压超过 500kV 的电镜称为超高压电镜(ultravoltage electron microscope)。其次,是在电镜上增加辅助设施如连接计算机,这样使生物样

品的分析更加快捷、方便、准确。

电镜标本的制备同光镜一样,因其目的不同而有不同的方法。如常规方法用于普通形态结构的观察;电镜放射自显影和酶标记用于细胞内物质的定位、定性分析;冷冻蚀刻术采用速冻的方法可较好地保持细胞的生活状态并使图形产生立体感;负染色法可提高图像的对比度,对观察细胞颗粒性物质具有很好的效果。扫描电镜还可以利用电子探针扫描,配备 X 线光谱或能谱分析,对细胞微小区域的化学元素(原子序数大于 4)的含量进行定量分析测定。

(三) 扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)于 1981 年由 Binnig 和 Rohrer 等发明,曾获 1986 年度诺贝尔物理奖。扫描隧道显微镜是根据量子隧道效应而设计的,可在原子水平上显示物体的表面结构。其分辨力在常温常压下可达纳米(nm)以下,高于普通透射电镜(2nm),而且可直接获得物体表面的三维图像,不需外源电子来辐照,从而避免被观察的样品受到损伤。扫描隧道显微镜比扫描电镜的扫描速度快,因而获取数据的时间短,成像快。应用扫描隧道显微镜观察 DNA 结构、细胞膜表面以及病毒颗粒等均可获得较好效果。

(四) 定量细胞化学分析与细胞分选技术

核酸和蛋白质等生物大分子物质在细胞中或细胞群中的含量分析对了解该物质的生物学功能十分重要,显微分光光度术和显微荧光光度术是分析细胞中生物大分子含量的两种重要的技术。显微分光光度术是利用显微分光光度计(microspectrophotometer)测定细胞内各种成分如 DNA、RNA、蛋白质、酶、脂类、糖类等微含量的技术。显微分光光度计是利用显微技术和分光光度技术原理而设计的一种高灵敏度和全自动化的分析仪器。其包括光源、单色器、显微镜和光电组合器件四大部分,其工作由计算机调控,用于细胞微细结构化学成分的定量、定性和定位分析。细胞内的不同物质可以选择吸收不同波长和不同量的光线。根据吸收光谱的差异和峰值位的差异,可以对细胞物质进行定性、定量分析。显微分光光度术是组织化学、细胞化学以及免疫学、药物学中的重要研究技术。在临床上也用于某些疾病的辅助诊断,如分析细胞的 DNA 代谢和损伤情况可作为肿瘤的诊断及疗效考核。

利用显微分光光度计对细胞内能发荧光的物质或荧光标记的物质进行定性、定位、定量的测量,称为显微荧光光度术(microfluorometry)。使用的仪器称显微荧光光度计,装配有高分辨力的荧光显微镜。用于显微荧光测定的物质主要有 DNA 和 RNA、抗体、抗原、神经递质和酶等。测定 DNA 和 RNA 时,荧光标记物常用吖啶橙,吖啶橙可插入双螺旋的碱基对之间或以静电引力结合于磷酸基团之上,如以 $450 \sim 490\text{nm}$ 波长的蓝光激发吖啶橙,发射波长是 520nm ,此时 DNA 呈绿光, RNA 呈红光,

再根据荧光的强度,即可测定出含量。

显微分光光度术和显微荧光光度术均为静态测定细胞物质含量的方法。利用喷射技术、激光技术和电子计算机技术形成的流式细胞光度术和分类术(flow cytometry and sorting)则为动态测定。这一技术通过流式细胞仪,可对流动的活细胞进行分类检测,并且可对细胞中 DNA、RNA、蛋白质含量、细胞体积等多项指标(最多可达 8 项)同时测量,提供可靠参数。

最先进的流式细胞计的测量速度可达每秒数万个细胞,分析纯度可达 99% 以上。除了用于细胞生物学、分子生物学的研究外,还用于医学临床检验,如流式细胞术可鉴别癌细胞和正常细胞,有助于肿瘤的早期诊断(图 1-12)。

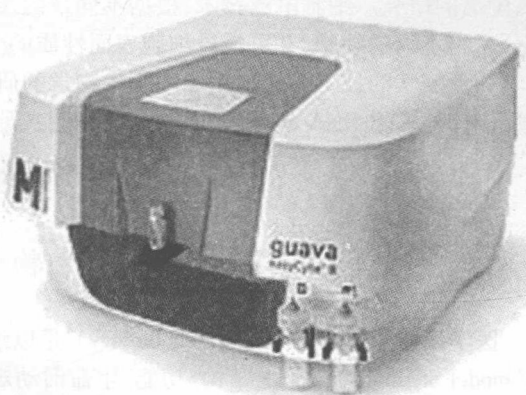


图 1-12 Cyte 8 个人型高性能流式细胞仪

(五) 细胞培养技术

细胞培养技术是指从多细胞生物的机体中用无菌操作的方法取出活体细胞,在体外模拟条件下,如给予类似机体的温度、pH、营养条件使其继续生存、生长并进行传代繁殖的技术。细胞培养根据培养细胞的来源分为原代培养(primary culture)和传代培养(subculture)。前者是直接从体内获取组织细胞的首次培养,后者是从原代培养的细胞中分取一部分以 1:2 以上的比例进行扩大培养或再次培养。无论原代培养还是传代培养,一般不能保持体内原有细胞的形态,而是分为两种基本形态,即成纤维样细胞和上皮样细胞。

细胞培养最大的优点是可直接观察生物细胞的形态及生长活动情况,在排除细胞在体内由各种复杂成分造成的相互依赖关系下,分析各种因素对它的影响及生长、繁殖所需的条件。近年来,细胞生物学中的一系列重要理论研究如细胞全能性、细胞增殖周期及其调控、癌变机制和抗癌药物研究、细胞衰老与抗衰老、染色体分析、基因表达以及细胞工程等都离不开细胞培养。

培养细胞通常情况下不能无限传代,一般 50 代左右就出现退化而不易再传。原代培养物经传代成功后形成的细胞群即为细胞系(cell line),经过生物学鉴定的细胞系由单细胞分离培养或通过筛选的方法由单细胞增殖形成的细胞群称为细胞株(cell strain)。

(六) 细胞分离技术和细胞器的分离提纯技术

为了获取一种细胞的某些信息,常常需要大量的同类细胞,而得到大量同类细胞的方法一般有两种:一是通过细胞培养,二是从组织中分离。细胞器的分离和提纯是为了更好地研究细胞超微结构的化学组成和生命活动。细胞器的分离常采用差速离心法,即首先将细胞破碎,然后在低温和适当 pH 条件下用不同转速的离心机将细胞的各种成分分开。如低速(1000 转/分)短时间(15 分钟)离心可首先将较大的细胞核沉淀下来,用高速(8000~25 000 转/分)离心可使次大的线粒体分离,再用超速(25 000~85 000 转/分)离心,可收集溶酶体等封闭小泡以及核糖体。差速离心不易得到纯净的细胞器和组分,其中常混有膜和一些颗粒结构。为了获得纯净的细胞组分,需将差速离心分离的沉淀物再经密度梯度离心(density gradientic centrifugation)。这种离心是在溶液中加入一些物质如蔗糖、甘油、氯化铯。这些物质不影响待分离颗粒的物理化学性质,但作为介质可稳定溶液的对流。离心时介质形成密度梯度,破碎细胞不同大小的颗粒在密度梯度柱内形成相应的密度带,从这些密度带中仔细收集就可获得较高纯度的细胞组分。

细胞器的分离和纯化技术是细胞生物学的基本手段,分离的细胞器及有关组分可结合电镜技术及有关化学方法,研究细胞的物质代谢,追踪分子的代谢途径,同时也可对细胞器的化学组成进行定性和定量的分析。