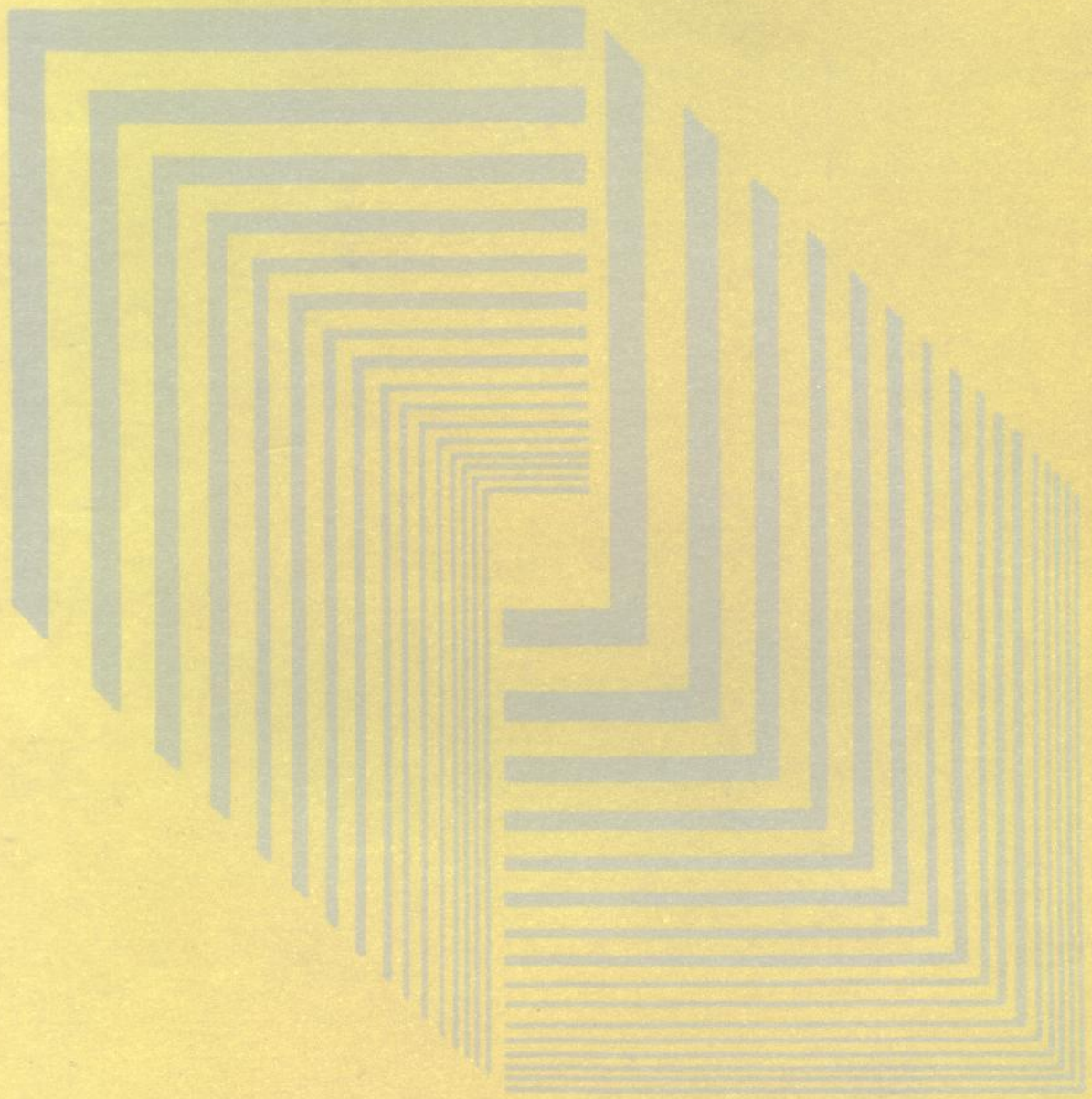


组织学

第二版

成令忠 主编



人民卫生出版社

DF 6.52

组 织 学

(第 二 版)

DF 13 / 31

主 编

成 令 忠

编 写 (按章次顺序)

许 屏	雷建章	王更新	郑怀祖	贾长恩
周开渠	彭庆康	罗政良	孟运莲	郭绢霞
祝继明	王铁霞	张端莲	何泽涌	杨美林
祝彼得	王瑞绵	常 青	戎诚兴	邓漪平
杨淑珍	郭皖华	吴良芳	李海标	黄连碧
高摄洲	谷华运	周国民	王光辉	顾文祥
欧可群	保天然	曾孝儒	章燕程	朱铭清
刘 强	路 明	郭筠秋	刘 斌	蔡文琴
郑世彬	郭仁强	杨 进	杜卓民	邹仲之
陈 东	尹 昕	冯子强	成令忠	钟翠平
朱继红	陈丽琰	李建国	薛同一	张君慧
吴明章	童凤明	高英茂	刘 凯	

人 民 卫 生 出 版 社

R329
SHY
=2

(京) 新登字 081 号

内 容 提 要

《组织学》(第二版)是由25所医学院校组织学工作者合作编写的一本大型专著。全书分研究方法、细胞、组织、器官和系统共34章,200余万字,插图1000余幅。在第一版的基础上,各章内容均大量更新,全部重写,充实了80年代后期至90年代初的许多新资料、新理论和进展概貌,包括我国学者近年的研究成果和大量实物图片,具有相当的特色。本书从分子生物、细胞生物及组织和器官水平,阐述了机体形态结构的组成及其生理和生物化学的动态变化与功能机制,并与病理和临床医学沟通联系。全书内容丰富,资料新颖,是组织学和其他基础医学及预防医学和临床医学各专业工作者教学科研的高级参考书,也适用医学生、研究生和生物学工作者阅读参考。

组 织 学

(第二版)

成 令 忠 主 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京市崇文区天坛西里10号)

人 民 卫 生 出 版 社 胶 印 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米16开本 95 $\frac{3}{4}$ 印张 4插页 2256千字

1981年3月第1版 1993年11月第2版第3次印刷

印数: 10 751—12 350

ISBN 7-117-01872-0/R·1873 定价:96.60元

[科技新书目 300—225]

继续探索组织学的
内涵性质，结合边缘学科
发展的关联，不断地为
医疗保健和论证说明
做出创新的、辉煌的
贡献。

一九九二年九月

王有琪敬题

时年93岁

再版前言

《组织学》(第一版)出版已逾10年,它作为组织学和胚胎学及相关学科的参考书,在教学和科研工作中发挥了有益作用。近10年是生命科学飞速发展的年代,分子水平的研究已成为当前生命科学的前沿和主流,新发现和新理论不断涌现,现代组织学的内容也不断更新和充实,迈入更深而广阔的境地。在这个时期,我国细胞学和组织学工作者与国外广泛交流,信息通畅,并取得大量研究成果,《组织学》的修订已属势所必然和众所要求的。这次修订是在人民卫生出版社的规划下于1990年4月起步,参加编写的单位从原18所医学院校扩展至25所,共50余位同道。1990年10月在上海医科大学召开了首次编委会,讨论和统一了全书的总体要求和各章编写提纲。1991年10月在贵阳医学院召开第二次编委会,交流讨论各章初稿。初稿经作者修改后,由主编总审和统一协调全书内容。人民卫生出版社和上海医科大学为这次修订工作会议提供了部分经费资助。谨向关心和支持本书修订的各单位领导和同行专家教授及技术人员致以衷心谢意。

本书各章均全部重写,在保持组织学基本内容的系统性基础上,着重于加深和更新,力求反映80年代后期和90年代初期的研究成果,以适应高层次的教学和培养需要。修订中也注意汲取国内近期的研究资料,包括优质图片,从中可窥视出我国组织学研究的近年概况。有些章节的作者正从事该领域的研究,编写更具特色,这是一版《组织学》所没有的。全书章次做适当调整,分为34章,“弥散神经内分泌系统”单列为一章,便于专题论述该领域的进展状况。近年有关细胞代谢、连接、分泌、识别、通讯等相互关系的研究相当深入,并有许多重大发现。诸如内皮细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、免疫辅佐细胞、神经细胞及众多分散的神经内分泌细胞等,它们往往与若干系统和器官的功能相关;因此有的内容在不同章节内难免交叉论述,甚至有不一致之处,这是各家研究结果不一和作者引用资料不同之故,只能客观介绍,不宜求其统一,供读者参考思索,不无益处。

这次的插图更新甚多,大量光镜和电镜照片选自国内制品,不少是作者自己的成果,部分照片由国外学者惠赠或取自国外书刊。白求恩医科大学尹昕教授等、河北医学院组织胚胎学教研室和上海医科大学电镜室等,为本书提供许多优质图片,在此一併致谢。

本书修订之时,编委们思念先后已故的丁肇林、张汇泉、许天禄、孙克继、尹昕诸教授,以及人民卫生出版社张元康副总编,他们曾为一版《组织学》的编著和出版做出贡献。组织学老前辈王有琪、陆振山、马仲魁、张保真诸教授曾指导和参与本书第一版的编著,也十分关怀这次修订工作。许多中青年学者参加这次修订,前拓后继,今后必然新人辈出,继续推进本书的更新再版。

主编在总审和统一全书过程中,由于学识浅薄或处理不当,难免出现错误和不妥,恳请读者评议指正,共同繁荣和推进我国组织学的发展。

成 令 忠

1992年4月

于上海医科大学

目 录

第一章	组织学研究方法.....	1
	许 屏 天津第二医学院, 天津, 300203	
第二章	细胞.....	51
	雷建章 王更新 河北医学院, 石家庄, 050017	
	郑怀祖 大连医学院, 大连, 116023	
第三章	上皮组织.....	163
	贵长恩 北京中医学院, 北京, 100029	
第四章	固有结缔组织.....	218
	周开渠 彭庆廉 同济医科大学, 武汉, 430030	
第五章	脂肪组织.....	265
	罗政良 孟运莲 湖北医学院, 武汉, 430071	
第六章	软骨、骨与关节.....	287
	郭绍霞 祝继明 王铁霞 湖南医科大学, 长沙, 410078	
	罗政良 张端莲 湖北医学院, 武汉, 430071	
第七章	血液与淋巴.....	343
	何泽涌 杨美林 山西医学院, 太原, 030001	
第八章	骨髓与血细胞发生.....	388
	祝彼得 重庆医科大学, 重庆, 630046	
第九章	肌组织.....	448
	王瑞绵 常 青 戎诚兴 湖北医学院, 武汉, 430071	
第十章	神经组织.....	484
	邓漪平 杨淑珍 郭晓华 中山医科大学, 广州, 510089	
第十一章	脊髓.....	566
	吴良芳 华西医科大学, 成都, 610041	
第十二章	小脑皮质.....	586
	李海标 中山医科大学, 广州, 510089	
第十三章	大脑皮质.....	596
	黄连碧 中山医科大学, 广州, 510089	
第十四章	脑脊膜、脑血管与脑脊液.....	615
	高摄洲 江西医学院, 南昌, 330006	
第十五章	眼.....	641
	谷华运 周国民 王光辉 上海医科大学, 上海, 200032	
第十六章	耳.....	689
	顾文祥 浙江医科大学, 杭州, 310006	

第十七章 下丘脑与脑垂体	718
欧可群 保天然 吴良芳 华西医科大学, 成都, 610041	
第十八章 甲状腺与甲状旁腺	763
曾孝儒 章燕程 天津医学院, 天津, 300071	
第十九章 肾上腺	780
朱铭清 章燕程 天津医学院, 天津, 300071	
第二十章 松果体	793
刘 强 路 明 郭筠秋 哈尔滨医科大学, 哈尔滨, 150086	
第二十一章 弥散神经内分泌系统	808
刘 斌 北京医科大学, 北京, 100083	
第二十二章 循环系统	829
蔡文琴 郑世彬 第三军医大学, 重庆, 630038	
第二十三章 免疫系统	897
郭仁强 南京医学院, 南京, 210029	
第二十四章 皮肤	988
杨 进 首都医学院, 北京, 100054	
第二十五章 口腔	1039
杜卓民 贵阳医学院, 贵阳, 550004	
第二十六章 消化管	1082
邹仲之 陈 东 尹 昕 白求恩医科大学, 长春, 130021	
第二十七章 胰腺	1144
冯子强 上海铁道医学院, 上海, 200070	
第二十八章 肝与胆	1171
成令忠 钟翠平 朱继红 上海医科大学, 上海, 200032	
第二十九章 呼吸系统	1242
陈丽琰 上海医科大学, 上海, 200032	
第三十章 泌尿系统	1281
李建国 薛同一 上海第二医科大学, 上海, 200025	
第三十一章 男性生殖系统	1345
张君慧 吴明章 上海第二医科大学, 上海, 200025	
第三十二章 女性生殖系统	1396
童凤明 上海医科大学, 上海, 200032	
第三十三章 乳腺	1457
高英茂 刘 凯 山东医科大学, 济南, 250012	
第三十四章 胎盘	1468
高英茂 刘 凯 山东医科大学, 济南, 250012	
索引	1492

第一章 组织学研究方法

许 屏

活细胞和活体组织的研究方法	3
组织培养技术	3
细胞融合技术	5
细胞融合技术的基本机理	5
利用选择培养液筛选杂种细胞	6
细胞分离技术	7
差速离心法	7
密度梯度离心法	7
荧光激活细胞分类器	8
细胞电泳技术	9
细胞电泳的基本原理	9
细胞电泳装置	9
活体和活细胞染色法	9
活体染色法	9
活细胞染色法	9
活细胞拒染法	10
透明窗活体组织观察法	10
兔耳透明窗法	10
皮管透明窗法	11
低温生物学技术	11
固定组织的研究方法	12
组织学标本基本制作方法	12
固定和固定剂	12
切片和涂片	13
染色	14
组织化学和细胞化学染色技术	15
孚尔根反应显示脱氧核糖核酸	15
过碘酸-Schiff反应显示多糖	15
脂溶性染料显示脂类	16
酶细胞化学染色法	16
免疫细胞化学技术	17
直接法	17

间接法	17
夹层法	18
过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物法 (PAP法)	18
标记亲合素-生物素法 (LAB法)	19
桥连亲合素-生物素法 (BAB法)	20
亲合素-生物素-过氧化物酶复合物法 (ABC法)	20
放射自显影技术	21
整体放射自显影术	21
显微放射自显影术	21
电镜放射自显影术	22
X-射线显微摄影术	23
X-射线衍射技术	24
核酸分子杂交技术	25
液相杂交	25
固相杂交	25
原位杂交	26
细胞和细胞化学定量技术	27
显微分光光度测量术	27
基本原理	27
主要组件	27
流式细胞术和细胞分类术	28
流式细胞仪主要组件	28
流式细胞仪的原理和应用	28
形态计量术	29
图像分析技术	29
图像分析基本原理	30
显微镜	31
普通光学显微镜	31
倒置显微镜	32
相差显微镜	33
相差显微镜基本原理	34
相差显微镜装置	34
荧光显微镜	35
光、发光和荧光	35
荧光显微镜的组成	36
荧光素	38
荧光显微镜技术的应用	39
暗视野显微镜	41

偏光显微镜	42
共焦激光扫描显微镜	43
共焦激光扫描显微镜原理	43
共焦激光扫描显微镜技术的性能和应用	43
电子显微镜	45
透射电镜	45
电镜细胞化学技术	46
免疫电镜技术	47
电镜放射自显影术	47
冷冻蚀刻法	47
扫描电镜和X-射线显微分析	48

组织学是应用多种实验技术和染色方法以及各型显微镜,对机体细胞、组织和器官的微细结构及其与功能之间的关系进行深入研究的。近年随着科学技术的发展,特别是激光光学、流体喷射技术、电子学和计算机技术的迅速发展,组织学研究方法在经典技术的基础上取得了巨大进展,不仅对细胞的形态结构及其与功能之间的关系的观察更加精细和深入,而且对细胞在功能活动中的各种酶活性和各种物质的含量变化,亦可进行精确的定位和定量。由于分子生物学,特别是染色体原位杂交技术的改进和建立,对细胞遗传学、基因工程和细胞在分化过程中基因结构的重组,以及癌基因的定位研究取得了重大的突破性进展。

组织学研究方法,可分为活细胞和活体组织研究法、固定组织研究法、定量研究法和染色体原位杂交技术。无论那种研究方法,都需要应用各型显微镜观察。

活细胞和活体组织的研究方法

组织培养技术

组织培养(tissue culture)是将离体细胞、组织或器官,放置在模拟机体生理条件的培养溶液(培养基)中,在无菌和适当的温度(37℃)下,于体外进行培养,使之生存和生长的一种技术方法。可分别称为细胞培养(cell culture)、组织培养和器官培养(organ culture)。器官培养是取整个器官、器官的一部分或早期胚胎的某种器官原基,将其置于湿室中的血浆凝块表面进行培养。通过改变培养条件,阻止细胞的移动和分散以保持原始器官的构形。经常更换新鲜血浆底物,培养的器官原基可生活数日或数周。有关器官培养最早的报道是早期胚胎骨原基在体外的生长和钙化。器官培养的目的是在没有外界影响的情况下,观察器官原基生长和分化的内在潜力,或施加一定的实验条件改变胚胎组织的分化。组织培养是取某种组织小块,进行体外培养,从组织块生长出来的细胞在生长的同时向周围移动,致使培养中的组织不能长时间保持其原有的结构,结果也成为细胞培养。因此,组织培养和细胞培养实际上无严格区别,细胞在培养皿中都是呈单层细胞向周围生长的(图1-1)。

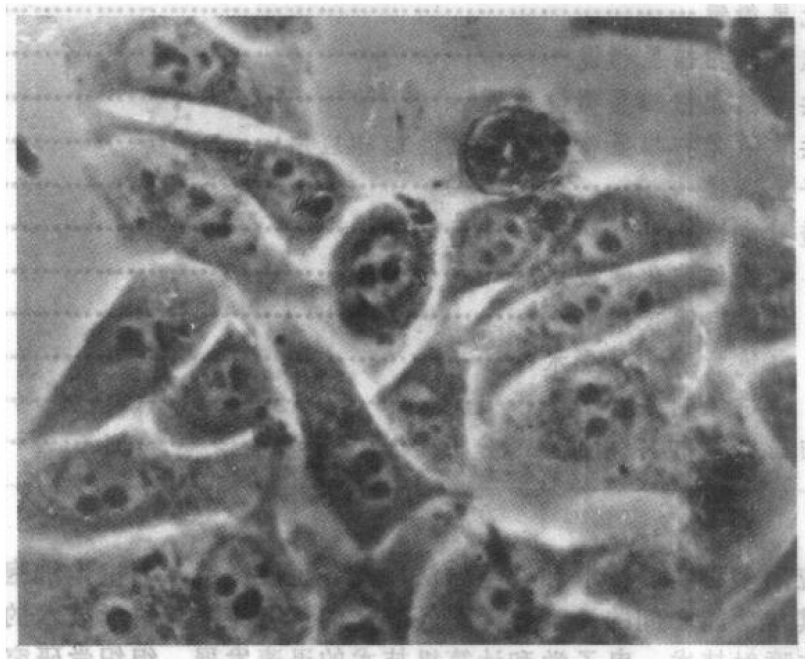


图 1-1 组织培养的上皮细胞相差显微镜观察 $\times 1,000$

(北京市肿瘤研究所鄂征教授提供)

细胞、组织或器官培养所应用的溶液有培养用液和培养液。培养用液为平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS), 其中含有钠、钾、镁等无机盐类和葡萄糖, 具有维持渗透压、控制酸碱平衡作用, 同时也供给细胞生存所需要的能量和无机离子。培养用液用于冲洗组织或细胞, 也是配制各种培养液的基础溶液。常用的平衡盐溶液有 Hanks、Ringer、Tyrode 和 Earle 液等。培养液又称培养基, 是具有适于细胞生存的 pH 和渗透压, 并含有细胞不能合成的各种营养物质。培养基分为天然培养基 (natural medium) 与合成培养基 (synthetic medium)。天然培养基使用最早, 包括血浆、血清、鸡胚浸出液, 此外还有羊水、腹水和眼房水, 它们的营养丰富, 但成分复杂, 且不稳定。合成培养基是根据天然培养基的成分, 用各种氨基酸、糖类、核苷、维生素、激素等成分合成的, 是一种较理想的培养基, 已被广泛应用, 并有力推动组织培养的发展。用合成培养基培养动物细胞, 往往还需补充细胞生长繁殖所必须的部分天然培养基 (小牛血清等), 但这对详细研究细胞生长分化的影响因素有一定妨碍。目前推崇应用无血清培养基 (serum free medium), 即在合成培养基内加入已提纯或制备的某些促生长因子和激素, 培养基的组成和含量均为已知成分, 便于研究某些具体因素对细胞生长分化的影响。近年应用无血清培养基培养成功多种细胞系或细胞株, 尤其是用于肿瘤细胞的培养和建株。目前合成培养基多达数十种, 较常用的有 TC199、Eagle 及其改良液、RPMI-1640、McCoy 5A、HAM-F12 等。TC199 含有氨基酸、维生素和激素等 69 种成分; Eagle 培养液成分较简单, 只含有 13 种氨基酸和 8 种维生素, 宜于根据实验需要增补或减少某些成分; RPMI-1640 最初是为培养淋巴细胞而设计的, 也适用于其他细胞包括肿瘤细胞的培养; McCoy 5A 适用于原代细胞和一些较难存活的细胞培养; HAM-F12 含有 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等微量元素, 常用于细胞克隆和单细胞培养。

由体内取出组织所进行的首次培养称为原代培养 (primary culture)。原代培养细胞离体时间短, 其遗传性和体内的细胞相似, 适于进行细胞形态、功能和细胞分化等研究。当原代培养细胞增殖到一定密度后, 则需要进行再培养, 或称传代培养 (subculture)。经传代后的细胞群统称为细胞系 (cell line)。细胞系来源于原代培养, 原代培养中细胞成分多, 所以细胞系往往是由多种细胞组成的。如果细胞系的生物学性状 (包括来源、生长速度、功能、有无遗传缺陷和核型等) 已经清楚, 则称为限定细胞系 (finite cell line)。用单细胞分离培养法, 由单个细胞繁殖的细胞群, 称为细胞株 (cell strain)。细胞株的生物学性状已经清楚, 则称为限定细胞株 (finite strain) 或传代细胞株 (continuous strain)。

组织培养术是研究活细胞最理想的方法, 它便于研究各种物理、化学和生物等因素对细胞的作用, 探索和揭示细胞的生命活动规律及细胞的结构和功能变化。组织培养已被广泛用于生物学和医学的各个领域, 特别是用于免疫细胞学杂交瘤单克隆抗体技术和肿瘤细胞学研究。大量悬浮细胞培养能进行生物制品的生产, 为细胞培养工业化奠定基础。

细胞融合技术

细胞融合 (cell fusion) 是指两个或两个以上的细胞合并, 形成一个细胞的过程。在正常生理情况下, 两性生殖细胞的结合过程 (受精) 即属这种现象。近年来, 用人工方法可使两种不同的细胞, 在离体情况下融合, 进行体细胞杂交, 使之成为一种新型的杂交细胞。所以说细胞融合技术是以人工实验方法定向建立新品系细胞的重要手段, 也是制备单克隆细胞系的关键技术。Okada (1962) 首创细胞融合方法, 以后经过学者们的研究和改进, 使细胞融合方法日臻完善, 不仅动物或植物种内或种间的细胞可以杂交, 而且动物和植物之间的细胞也可以融合, 培养出各种性状的新型杂种细胞。目前, 细胞融合技术已成为细胞遗传学、免疫细胞学、病毒学和肿瘤学研究的重要手段。

细胞在融合过程首先是两种细胞的细胞质融合, 形成具有两个核或多核细胞, 细胞进一步分裂时细胞核互相融合, 形成新型的杂种细胞 (hybrid cell)。常用的细胞融合诱导物为仙台病毒 (Sendai virus) 和聚乙二醇 (polyethyleneglycol, PEG)。仙台病毒圆形, 由中央部的核糖核酸 (RNA) 和周围部的脂蛋白构成, 后者是诱导细胞发生融合的物质。PEG作为细胞“融合剂”有较高的融合率, 其作用机制尚不十分清楚, 一般认为PEG能使细胞膜的脂类分子间的构型重新排列, 脂质易被打开, 促使细胞融合。常用的PEG分子量为1000~4000, 以1000为宜, 浓度为50%。

细胞融合技术的基本机理 首先将两种不同亲本体外培养的细胞等量混匀, 通常用次黄嘌呤鸟嘌呤核糖磷酸转移酶 (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT) 阴性细胞和胸腺嘧啶核苷激酶 (thymidine kinase, TK) 阴性细胞。因为HGPRT和TK二者是核酸代谢的旁路酶, 当阻断核苷酸的嘌呤和嘧啶的主要生物合成途径时, 这两种酶可利用外源的胸腺嘧啶核苷和次黄嘌呤通过旁路合成脱氧核糖核酸 (DNA)。如果在阻断嘌呤和嘧啶的主要生物合成途径的情况下, 细胞缺乏这两种酶的任何一种时, 则DNA的生物合成就不能进行, 细胞即将死亡。细胞融合后, 含有两个不同

亲本细胞核的细胞称为异核体 (heterokaryons) 或异核细胞, 而由两个亲本细胞融合形成的细胞, 称同核体 (homokaryon) 或同核细胞。双核的异核细胞通过有丝分裂, 两个不同亲本细胞的染色体合并在一个细胞核中, 称为合核体 (synkaryon) 或合核细胞, 即杂种细胞。培养24小时后, 换选择培养液筛选杂种细胞。

利用选择培养液筛选杂种细胞 选择培养液是生长培养液加HAT培养液。HAT培养液含有次黄嘌呤 (hypoxanthine)、氨基喋呤 (aminopterin) 和胸腺嘧啶核苷 (thymidine), HAT是三者的缩写。它是根据嘌呤和嘧啶生物合成途径设计的分离杂种细胞的特殊培养基。培养基中的氨基喋呤是阻断剂, 阻断嘌呤和嘧啶的主要生物合成途径。因此, 细胞只能通过HGPRT和TK酶利用外源 (培养液中) 的次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷, 通过旁路合成核苷酸和DNA, 即通过“应急”通路, 依赖外源的嘌呤和嘧啶合成核苷酸和DNA。

用HGPRT⁻、TK⁺细胞和HGPRT⁺、TK⁻细胞进行细胞杂交, 在HAT培养液中未融合的亲本细胞和融合的同核细胞 (HGPRT⁻、TK⁺或HGPRT⁺、TK⁻), 均不能利用外源的嘌呤或嘧啶作为核苷酸的原料合成DNA而死亡。只有融合的异核细胞 (杂种细胞) 由于二者的酶相互补偿, 成为HGPRT⁺、TK⁺细胞, 能通过旁路利用外源的嘌呤和嘧啶, 进行生物合成DNA, 在HAT培养液中生长而被筛选出来进行培养 (图1-2)。

Köhler和Milstein (1975) 在体细胞杂交技术的基础上, 首先创建了淋巴细胞杂交瘤技术。他们用仙台病毒将一株小鼠浆细胞瘤 (骨髓瘤细胞) 与用绵羊红细胞免疫的小

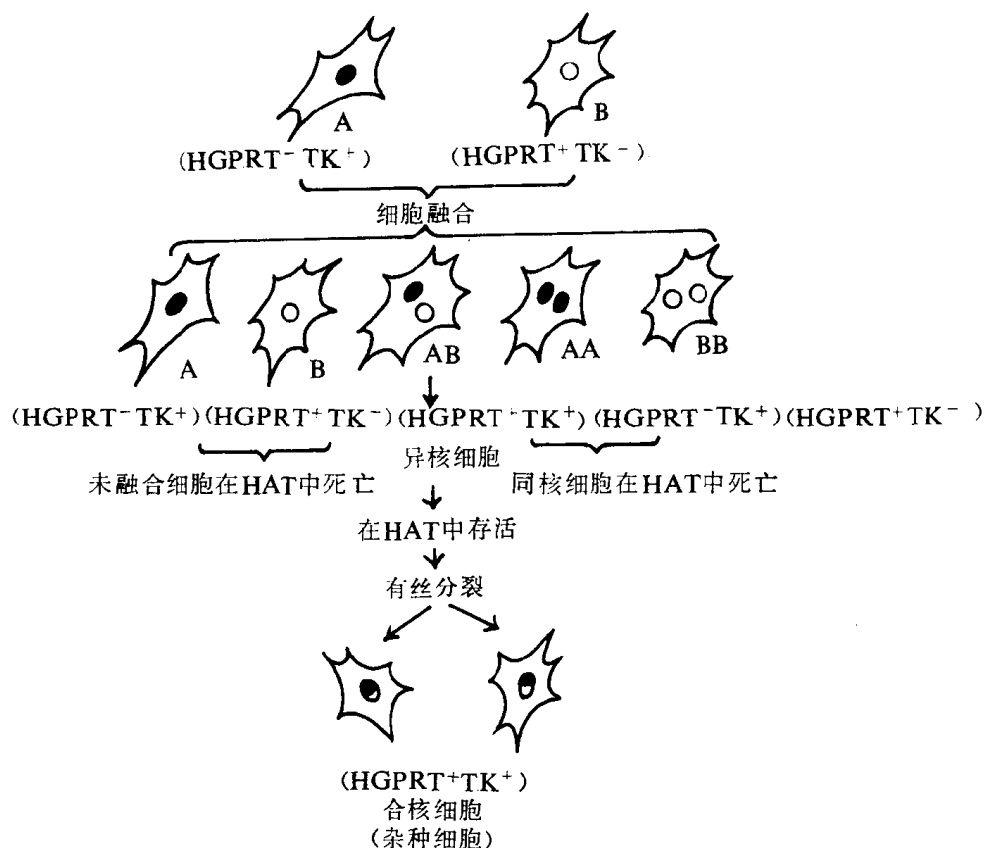


图1-2 杂种细胞筛选示意图

鼠脾细胞融合,产生一杂交体,称为融合细胞瘤或杂交细胞瘤(hybridoma)。将融合后的细胞换选择培养液进行筛选。脾细胞虽然含有HGPRT和TK二种酶,但它们不能在培养中长期存活和分裂繁殖。所以,未融合的脾细胞和脾细胞与脾细胞自相融合的同核细胞都将必然死亡。而骨髓瘤细胞本身是HGPRT和TK酶缺陷型,它们在HAT选择培养基中不能利用外源的嘌呤和嘧啶核苷合成DNA。所以,未融合的骨髓瘤细胞或瘤细胞自相融合的细胞也都将很快死亡。只有骨髓瘤细胞与脾细胞融合后形成的杂交瘤细胞,才能存活和继续繁殖生长。因为它既带有脾细胞的HGPRT和TK酶的基因,补偿了骨髓瘤细胞的缺陷,又具有骨髓瘤细胞无限繁殖能力的信息。因此,杂交瘤细胞可被筛选和培养。选出单个细胞,使之繁殖为一个细胞株,称为克隆(clone)。反复进行单个细胞培养或克隆化,它所产生的抗体是均一的,称为单克隆抗体。运用淋巴细胞杂交瘤技术产生单克隆抗体,是近年来医学界的一项重大突破性发展,获得了1984年诺贝尔医学生物奖。单克隆抗体技术灵敏度高,特异性强,广泛用于医学的各个领域。如利用该技术已证明小鼠外周血T细胞表面抗原和建立了抗人T细胞表面分化抗原单克隆抗体系统(CD系)等,为免疫细胞学的发展提供了有利手段。同时,单克隆抗体技术的发展,对纯化肿瘤抗原和对肿瘤抗原特异性的研究开辟了广阔的途径;此外,它用于对病原体的检测、鉴别细菌及病毒的种与型或亚型、寄生虫在不同生活周期的抗原性、检测病原体抗原性的变异等,以及对传染病的快速诊断和流行病学的研究方面均取得了重大进展。

细胞分离技术

利用离心方法和通过细胞分类器,可以把一种或一种以上的细胞由含有多种细胞的群体中分离出来。除血液、胸水和腹水等液体外,在分离细胞时,首先要把组织制备成细胞悬液,然后再进行分离。制备细胞悬液,一般先将组织剪碎,加入一定量的消化酶和生理溶液,置入匀浆器中挤压;亦可应用微型泵将消化酶连续灌注入某一器官内,分散组织,制成细胞悬液。胰蛋白酶可以消化和解聚细胞外的大部分蛋白质,胶原酶可以选择性地除去细胞外胶原成分,神经氨酸酶能除去细胞表面粘稠的糖衣,根据实验的需要进行选用。分离细胞时的用液,应对细胞无毒性、等渗和有缓冲性。

差速离心法 差速离心法(differential centrifugation)主要是由于细胞的密度和体积不同,在离心力的作用下,到达离心管底的速度不一样,而被分离出来。经离心后,密度和体积较大的细胞沉淀于管底,密度和体积较小的细胞位于它们的上面。例如,血液差速离心时,红细胞密度大,而且红细胞有堆积成钱串状的倾向,增加了它们的有效单位体积,使之沉淀加速,而白细胞的密度小,沉淀慢,结果红细胞位于白细胞的下面而彼此分开。

密度梯度离心法 密度梯度离心法(density gradient centrifugation)分离细胞或细胞成分,主要是根据它们的比重与分离介质的密度不同而实现的。按Stokes定律,细胞的沉淀速度(v)与细胞直径(d)的平方成正比,与细胞比重(ρ_p)和液体(分离介质)密度(ρ_L)的差成正比,与液体粘度(η)成反比,与引力(g)成正比。公式如下:

$$V = \frac{d^2 (\rho_P - \rho_L)}{18\eta} \cdot g$$

由公式中可知,细胞的沉降速度不同,主要取决于细胞的大小和细胞的比重不同。当细胞的比重大于分离介质的密度 ($\rho_P - \rho_L > 0$) 时,细胞下沉至管底;当细胞比重和分离介质密度相等 ($\rho_P - \rho_L = 0$) 时,细胞停留在介质中;当细胞比重小于介质密度 ($\rho_P - \rho_L < 0$) 时,细胞漂浮在介质上面。因此,了解被分离细胞的比重和选择适当的分离液是分离技术的关键。

一次密度梯度离心法:人红细胞比重大于1.092,粒细胞的比重为1.070~1.090,淋巴细胞和单核细胞的比重为1.060~1.075,血小板的比重为1.030~1.035。Böyum设计了由高分子聚蔗糖(商品名Ficoll)和三碘化合物泛影葡胺(Hypaque)组成的淋巴细胞分层液,比重为 1.077 ± 0.001 ,能把人的红细胞、粒细胞和单个核细胞分开,已成为获得富有淋巴细胞悬液的常规试剂。目前该试剂已商品化。小鼠淋巴细胞的比重较大,选用比重为1.090的分层液分离小鼠的淋巴细胞。

连续密度梯度分离法:一般用低密度介质不断稀释高密度介质,即可获得自下而上由高密度到低密度的连续梯度。把比重不同的细胞或细胞的不同成分放在液面上,经高速离心后,就可获得等密度的沉淀环,比重不同的细胞或细胞成分停留在与它们相等的密度层界面上。

近年来,用人工合成的聚乙烯吡咯酮包裹的硅胶(商品名Percoll)试剂,很容易制备连续密度梯度。取5.5mlPercoll液(比重1.103)加入4.5ml的磷酸缓冲液(PBS)中使之混合,放在15ml离心管中,经高速(15 000r/min)离心40min,就形成连续密度梯度。在此液面上加1ml含 $2 \sim 4 \times 10^7$ 血细胞,再离心(2 000r/min)20min后,即可获得四层细胞组分。从上而下依次为:(A)死细胞组分,(B)富含单个核细胞组分,(C)小淋巴细胞组分,(D)红细胞和粒细胞组分。

非连续密度梯度分离法:用不同浓度的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)可制备不连续梯度。如用平衡盐溶液把BSA配制成35%、29%、26%、23%和10%五个梯度,用35%BSA混悬被分离的细胞,放置沉淀管的管底,由下而上依次为高密度到低密度的梯度。经离心(20 000r/min)30min,比重轻的细胞发生漂浮,比重越轻,漂浮越高。离心后,比重不同的细胞可位于不同密度梯度之间的界面上。利用BSA不连续密度梯度离心法,可将腹腔渗出液中的巨噬细胞分为不同的区带。大量研究证明不同区带中巨噬细胞的吞噬和各种酶的活性、产生免疫原性RNA的能力及对肿瘤细胞的停滞和细胞毒作用均不相同。近年来,多用Percoll液配制40%、45%、50%、55%、60%等不连续密度梯度,分离人外周血液内的单个核细胞。其中45%~50%Percoll界面间的细胞为大颗粒淋巴细胞(LGL),是NK活性很高的组分,转化的淋巴母细胞也在这一密度梯度间。

荧光激活细胞分类器 荧光激活细胞分类器(fluorescent activated cell sorter, FACS)又称为流式细胞仪(flow cytometer)。它是流体喷射技术、激光光学技术、电子技术和电子计算机技术综合一体的高科技产品。用荧光染色或荧光抗体染色的细胞通过FACS时,该仪器能精确地计数荧光阳性和阴性细胞,并能使各类细胞微滴充电,使

之带有不同的电荷。当充电微滴通过电场时,带有不同电荷的荧光阳性细胞和荧光阴性细胞可向不同方向偏离,并被分别收集。这种分类技术能以每秒钟高达 5 000~10 000 个细胞的速度进行分类,纯度在 90%~99% 之间,细胞活性在通过 FACS 过程中不受影响(详见流式细胞术和细胞分类术)。

细胞电泳技术

细胞电泳 (cell electrophoresis) 是在显微镜下测定细胞表面电荷性质和密度,它是研究细胞表面结构和功能变化的精细灵敏的生物物理学技术。

细胞电泳的基本原理 细胞电泳和一般电泳的原理基本相同,都是把多相物质(如蛋白质溶液和血液)放在电场中,在外加电场的作用下,带有不同电荷的物质分别向两个相反电极方向泳动,即带正电荷物质泳向电场的负极,带负电荷物质泳向电场的正极。不同强度的相同电荷物质,亦出现不同的泳动速度。细胞电泳是根据细胞在电场中的不同泳动速度,在细胞完整无损的自然状态下测定活细胞表面电荷和电荷密度的差异,从而了解细胞表面结构和功能的变化。该技术方法除能从细胞水平了解细胞表面对生物体内许多重要生化过程产生的影响外,还能通过细胞表面电荷分析各种电离基团,从分子水平探讨构成细胞表面基本成分的一些生物高分子(蛋白质、脂类和聚糖类)的结构特点,及其在各种因素作用下发生的反应和变化。细胞和组织的免疫化学反应、物质运输和排泄、组织修复、细胞分化和生长(包括细胞异生和癌变)等,均与细胞膜表面生物物理特征密切相关。此外,疾病的发生和发展及药物疗效等往往与细胞表面受体的变化有关。因此,用显微细胞电泳技术观察和测定细胞表面电荷的微小变化,可为探讨疾病的发生机理、临床诊断以及研究药物作用机理提供有价值的资料。

细胞电泳装置 细胞电泳装置的种类虽然很多,但其基本结构均由直流电源、电极系统、悬液排灌系统以及显微观察电泳小室等部分组成。观察小室是细胞电泳装置的关键部件,它是一个长 6 cm,宽度和深度均为 0.5~1.5 mm 的方型玻璃毛细管,管内充细胞悬液,两端用琼脂连接管封闭。将毛细管固定在显微镜载物台的支架上,琼脂连接管与电极相连,在镜下观察计算每个细胞移动一定距离所需的时间,测出细胞电泳迁移率,利用公式可求出细胞表面的电荷密度。

活体和活细胞染色法

活体染色法 活体染色 (vital staining) 是将无毒或毒性较小的染料注入动物体内,被组织或细胞选择性地摄取。如将茜素 (alizarin) 注入动物体内,它可被骨的钙化基质选择性地摄取,沉淀在骨基质内,新沉淀的骨基质呈深红色,这种古典的标记方法为了解长骨增长和增粗的机制作出了贡献。台盼蓝 (trypan blue) 或锂卡红 (lithium carmine) 注入动物体,可被巨噬细胞吞噬,借此可观察吞噬细胞的分布和吞噬活性,或鉴别细胞类型。

活细胞染色法 分离的活细胞或体外培养的细胞直接进行染色,称为超活体染色 (supravital staining)。中性红 (neutral red) 和杰纳斯绿 (Janus green) 可单独或联合应用于活细胞研究。白细胞经中性红染色后,特殊颗粒可呈现不同颜色,中性颗粒呈

淡粉红色，嗜酸性颗粒呈黄色，嗜碱性颗粒呈砖红色。杰纳斯绿可选择性地使线粒体着色，对鉴别分离出的线粒体有一定的实用价值。活细胞用荧光素吖啶橙（acridine orange）染色后，细胞核呈黄绿色荧光，胞质为绿色荧光，细胞死亡后核的绿色荧光变红。该染色法可用于判断末梢血细胞的放射性损伤及损伤的严重程度，或检测冷冻精液中精子的死亡率，鉴定杀虫药对寄生虫和虫卵的致死有效浓度和时间。硫代黄素（thioflavine）荧光染色法可使处于分化程度不同的细胞呈现异质性荧光，可应用于有关细胞分化及免疫活性细胞的分类和功能研究（见荧光显微镜）。

活细胞拒染法 用一定浓度的台盼蓝生理溶液与细胞悬液混合，活细胞不着色，死亡细胞由于其细胞膜的通透性发生改变，染料可进入细胞内而呈蓝色。此法可用于检测细胞的存活率，但必须在染色后3分钟内进行湿片镜检计数，因为3分钟后活细胞亦开始摄取染料。伊红y（eosin y）溶液与细胞悬液等量混合，原理同台盼蓝，活细胞不着色，死亡细胞呈红色。与台盼蓝相比，伊红y染色后，活细胞的百分比恒定时间较长，10分钟内结果一致，但台盼蓝染色后的死细胞和活细胞更易鉴别。苯胺黑（aminobenzene black）染色活细胞在数小时内不着色，并不被巨噬细胞所吞噬，此染色法适于检测巨噬细胞的存活率。用二乙酸盐荧光素（fluorescein diacetate）染色，活细胞亦不着色（见荧光显微镜）。

透明窗活体组织观察法

兔耳或皮管透明窗是直接观察活体内组织生长变化或细胞分化的一种研究方法。

兔耳透明窗法 为了能直接观察活体内组织的生长和细胞分化状态，Sandison（1924）首先创建了兔耳透明窗法（transparent chamber in rabbit ear）。该方法是在兔耳

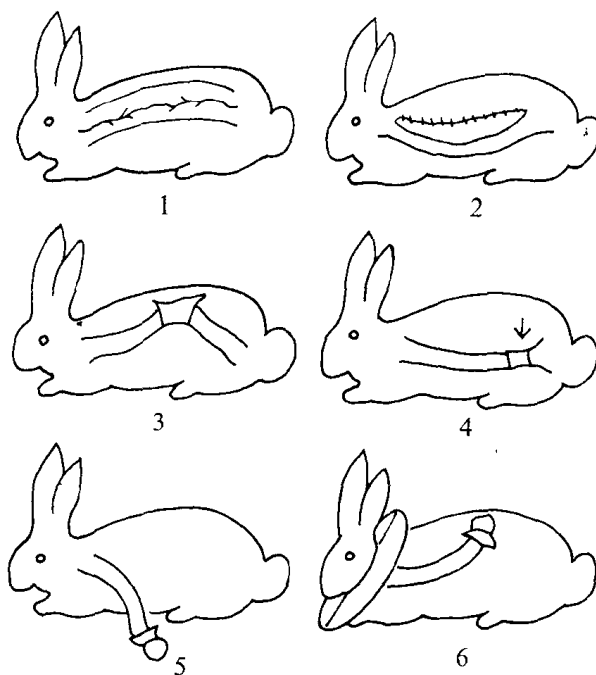


图 1-3 皮管透明窗成形术简图