

718

Q954.6-33

X89

体外培养的原理与技术

薛庆善 主编

肖渝平 林娟 副主编

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书包括五个部分。第一部分“体外培养的基本原理与技术”集中介绍细胞培养、组织培养及器官培养的基本概念、基本原理和基本技术等基础性内容。第二部分“动物基本组织的体外培养”围绕上皮组织、结缔组织、肌肉组织和神经组织四大基本组织,对各种细胞的体外培养原理与技术分别进行介绍。第三部分“特殊类动物细胞的体外培养”着重介绍动物肿瘤细胞、病原微生物、医学寄生虫以及无脊椎动物细胞的培养原理与技术。第四部分“体外培养技术的应用”主要介绍一些同体外培养技术非常密切有关的应用技术,如细胞分化与体外诱导分化、细胞融合技术、体外受精技术、基因转染技术、杂交瘤技术等,以及动物细胞大规模培养的原理与技术。第五部分“植物组织细胞的培养”除了简要介绍植物组织细胞培养的基本原理与技术之外,着重从植物体的整体、器官、组织和细胞几个层次上介绍常见的、重要的植物种类的培养技术与应用技术。

本书在内容设置上既适合初次学习和应用体外培养技术的广大青年科技工作者、研究生或者临床医生等人员一般层次的需要,同时又能满足特殊科学研究领域的研究人员以及相关生产领域的工作人员等较深层次的要求,对体外培养技术领域的高级学者也有参考价值。有泛有专,经典理论与现代进展兼顾,一般技术与专门应用并重。广泛适应于从事生物学、医学、生物制药、农林业以及环境检测等领域的各类人员之需要。

图书在版编目(CIP)数据

体外培养的原理与技术/薛庆善主编.-北京:科学出版社,2001.2

ISBN 7-03-008125-0

I. 体… II. 薛… III. 动物-离体培养:组织培养 IV. Q954.6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 61452 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2001 年 2 月第一次印刷 印张:77 1/4 插页:1

印数:1—3 000 字数:1 777 000

定价:148.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

前 言

生命科学研究中的活体实验可以笼统地分为体外实验和体内实验两大类型。在体外实验中,体外培养技术是一门以模拟体内生长条件为基础而建立的“活体”实验技术。体外培养实验相对于体内实验,具有能够简化细胞生长环境、明确生长条件、便于施加实验因素、容易获得活体直接观测结果以及方便控制培养产物等优点。该技术自从 20 世纪初被创立以来,通过无数科学工作者的改良和发展,并与多种现代科学技术结合,在生命科学研究和生产活动各领域发挥了重大作用。例如,20 世纪 50 年代,Levi-Montalcini 及其同事就是利用体外培养技术发现了神经生长因子而获得 1986 年诺贝尔医学和生理学奖的。又如,当今医学领域治疗不孕症的重要手段即体外受精技术以及生物工程领域的基因转移技术也是以体外培养技术为操作基础的。再如,现代微生物制药与生物工程产品的生产活动也都主要利用了体外培养技术。一直以来,利用体外培养技术研究生命现象的项目和人次、从事生产活动所获得的成果及其普遍性几乎无法估计和衡量。体外培养这门技术不仅在过去、现在以至将来都是生命科学研究领域与生物工程领域生产实践所必需的一门经典技术。编写有关体外培养原理与技术方面的书籍,对于推广、应用和发展这门技术将起到很重要的作用。

迄今为止,国内外有关体外培养技术方面的书籍也不少,但较新的版本不多。国外的有关书籍多为 1996 年以前的版本,且以外文出版,不便在国内推广。国内从 20 世纪 50 年代至今,也出版过数种有关书籍。比较新的专著有,由鄂征教授主编(北京出版社于 1995 年出版)的《组织培养和分子细胞学技术》,由 RI Freshney 编著、潘李珍等人翻译(世界图书出版公司北京公司于 1996 年出版)的《实用动物细胞培养技术》以及司徒镇强等人编著(世界图书出版公司西安公司于 1996 年出版)的《细胞培养》。国内目前关于体外培养方面的著作有以下几个特点:①少:有关书籍不仅种类较少,而且每一种的发行量也较小,市面上一般买不到;②需求者多:现今许多科研工作都用到体外培养技术,不少与我们探讨体外培养技术方面问题的同事都希望能够购买到这类工具书籍;③市面上的几种有关书籍不大实用:国内迄今出版的体外培养方面的著作,主要论及了体外培养的常规技术和原理,对于各类组织、细胞的实用性技术谈得较少、较浅;④版本旧:对于体外培养新技术很少涉及,也没有论及特殊类动物细胞的体外培养技术。而我们组织编写的《体外培养的原理与技术》一书,有以下几方面的特点:第一,在内容设置上,除了以一定篇幅介绍了体外培养的基本原理与技术之外,重点论述动物四大基本组织的各种细胞、特殊类动物细胞以及植物组织细胞的体外培养原理和技术,是为内容上“全”的特征。第二,参加编写的人员均是目前活跃在科研第一线的体外培养方面的专家,绝大多数为 40 岁以下的教授、副教授、博士后及留学归国人员,他们在体外培养方面有丰富的“一线”工作经验,所写出的内容有“实用”之特点。第三,本书的主要编著者因为一直从事科研实践、部分著者具有出国留学研究经历,对国内外有关领域的发展动向较为熟悉,编写时尽量注意将各个领域的新技术融进相关章节之中。同时,本书在内容上也增设了“体外培养技术的应用”这一

部分。因此,本书具有内容上“新”的特征。第四,本书在内容设置上既如以往体外培养方面的著作一样,以“科学工作者”为读者对象,又考虑到一些应用领域如生物制药与生物产品生产领域以及植物细胞工程领域的人员所需,增设了相关的技术内容,此即为本书“适应面广”的特征。

综上所述,本书对于我国生命科学研究事业、社会生产活动以及推广应用新技术都有重要意义。相信广大生物与医学科研工作者、生物医学技术人员、从事生物制品和环境检测领域的工程技术人员以及从事农林业与植物生物技术等多个行业领域的同行都可以参考本书。

国际上在体外培养领域关于细胞密度的单位,一般使用“cells/ml”。笔者以为它的确切中文含义宜为“个细胞/ml”。鉴于国内有关细胞密度的单位尚不统一,本书一律使用了“个/ml”(可能仍是不太规范的单位)。

对于以固体溶质所配水溶液的质量浓度(m/V),本书多处仍使用了不符合新的国家标准要求的百分比表示法,例如,0.9%的生理盐水、0.25%的胰蛋白酶溶液等。而对于以液体溶质所配溶液,本书通常用体积百分数,(V/V)表示其浓度。例如,含10%小牛血清的RPMI 1640培养液、70%乙醇溶液等。鉴于使用上的传统习惯,本书没有对有关溶液以物质的量浓度(mol/L)表示。

本书经过国内10多家单位50余位学者的共同努力,终于要同广大读者见面了。欣喜之余,笔者又感惴惴不安。限于主编本人学识尚浅,书中难免疏漏舛错之处,敬祈广大读者不吝指正。由于本书涉及的组织、细胞或者其它培养对象种类繁多,对于大多数组织细胞的体外培养实验都有不少国内同行做过,到底谁最适合于执笔撰写某一种细胞的体外培养方法,不易发现,因而对于有些细胞类型的培养技术难以邀请到最合适的执笔人。笔者希望本书亦有抛砖引玉之用,欢迎各位同行毛遂自荐,在本书以后再版时参加编写,将各自的经验、技术介绍给大家。

本书获得中山医科大学“211工程”重点学科建设经费资助。

本书在编写与出版过程中,得到科学出版社与中山医科大学的大力支持。在此,作者谨向科学出版社科学出版中心、中山医科大学科研处以及中山医科大学生理学教研室等单位致以诚挚的谢忱。科学出版社科学出版中心生物编辑部的丁海珈女士在本书的编写与出版过程中,一直予以热情的鼓励、诚恳的帮助和全力的支持。50多位编者在各自的百忙工作中抽暇鼎力支持本书组稿,积极配合,为本书撰写了尽可能好的稿件。我的老师,中山医科大学组织学与胚胎学教研室郭晓华教授欣然审阅了部分书稿,并对本书的构架和内容提出了许多建设性意见。中山医科大学附属第一医院肝胆外科的汪谦教授在本书的形成与出版事务上提供了诸多帮助。广东医学院组织学与胚胎学教研室孙宏主任专程赴广州帮助主编编审整理文稿。我的研究生葛庆波同学在书稿的编排及其它事务上做了大量工作。中山医科大学教务处王淑珍小姐、生理学教研室叶美红小姐协助制作插图。我的朋友胡昱亮先生慷慨贡献出自家的个人电脑供编辑书稿之用。中国医学科学院医药生物技术研究所的刘小云博士参加了终稿的核校工作。主编愿意向以上单位、个人以及其他关心、支持和促成本书形成的各位师长、同事和朋友致以最衷心的感谢。

薛庆善谨识

一九九九年十一月

绪 论

一、体外培养的概念

体外培养(*in vitro* culture),顾名思义,就是将活体结构成分(诸如活体组织、活体细胞或者活体器官等)甚或活的个体从体内或其寄生体内取出,放在类似于体内生存环境的体外环境中,让其生长和发育的方法。按照体外培养的结构成分,可以将体外培养人为地分为组织培养(tissue culture)、细胞培养(cell culture)及器官培养(organ culture)等类别。其中,组织培养是指从生物体内取出活的组织(多指组织块)在体外进行培养的方法。细胞培养是指将活细胞(尤其是分散的细胞)在体外进行培养的方法。而器官培养是指从生物体内取出活的器官(一般是胚胎器官)、器官的一部分或者器官原基在体外进行培养的方法。组织培养这一概念在过去常常被用来泛指各种各样的培养技术。组织培养的对象在体外可以发生分化并保持组织的结构和功能,但不具备器官的结构与功能特点。细胞培养强调在培养过程中分散的细胞不再形成组织。细胞培养的概念包括单(个)细胞的培养,单(个)细胞可以在体外条件下分裂增生形成细胞克隆(cell clone)。器官培养的对象在体外环境下也可能发生一定程度的分化,但始终保持器官的基本结构和功能特征。事实上,组织培养、细胞培养和器官培养这三种方法是没有截然界限的。器官培养中所培养的器官必然包含各种各样的组织和细胞。组织培养中所培养的组织(即植块)一般情况下都包含不同的细胞。只有细胞培养,在一定的情况下才可能实现纯粹的某种单一细胞成分的培养。

既然有体外培养,人们不仅要问,那么有没有体内培养(*in vivo* culture)呢?答案是肯定的!众所周知,细胞生存的最佳环境是其在有机体内所处的自然环境。而仅次于有机体内的环境就是另一机体内的相似环境。所谓体内培养,就是将活体结构成分(如活体组织、活体细胞、活体器官等)甚至活的个体从体内或其寄生体内取出,放在其它生物体内让其生长和发育的方法。体内培养技术最大限度地模仿了活体结构的自然生长环境。最常见的体内培养方式就是移植(transplantation)。移植这种技术,在植物界早已获得成功并被普遍应用,例如,大家熟知的果树之间的嫁接。在动物界,移植工作虽经艰苦历程但也已获得成功并有多方面应用,如临床上的同种异体器官移植。迄今为止所进行的大多数移植工作,其主要目的在于使植入的供体成分与宿主发生整合关系。医学上的器官移植,其目的就是希望植入的器官能够代替宿主已发生病变或者已失去功能的器官。而随着体外培养技术的发展,真正像体外培养技术那样,以“培养”为目的的体内培养技术也已建立。第十一章介绍的造血祖细胞体内扩散培养技术与第十五章介绍的肿瘤细胞的过继培养法就是体内培养的例子。

二、体外培养技术的发展历史

大凡提及体外培养的发展历史,人们都会提到以下这些令人敬慕的名字:W Roux, G Haberlandt, RG Harrison, A Carrel, A Maximow, TSP Strangeways, HB Fell, GO Gey, WR Earle, A Fischer, KK Sanford, PR White, JH Hanks, JF Morgan, CM Pomerat, H Eagle, R Dulbecco, AL Van Wezel, RA Knazek 等等。正是他们开创、建立了体外培养这门技术,并为这门技术的发展和成熟作出了一次又一次的革命性贡献。

一种新技术或方法的诞生常常是以某些与此相关的其它技术和方法为契机或者基础的。虽然这些作为契机或基础的技术和方法并不代表新技术或新方法本身,甚至不能作为新技术或新方法的标志,但终究为新技术或新方法的诞生作了铺垫,因而可以被看作是这些新技术或新方法的前身或者雏形。体外培养技术在出现的早期,也有类似情形。19世纪后叶,胚胎学的发展较为迅速,尤其是实验胚胎学的兴起,人们在研究胚胎学时,将一些活的组织或细胞放在体外进行观察,自觉不自觉地使得这些组织在体外存活了一段时间,从而拉开了体外培养技术的序幕。一些著名的实验如下:

1859年,法国解剖学家 Vulpian 最早尝试将蛙胚尾部组织切下,放到普通水内进行“培养”,结果观察到了生长和分化现象。

1885年,德国人 W Roux 用温热的生理盐水在体外使鸡胚髓板组织存活了数天之久,被认为是体外培养的萌芽实验。他首次提出组织培养这一概念。

1887年,Arnold 将赤杨髓质小片在蛙的体液中浸过,然后将这些木片分别种植到蛙的皮下或腹腔内,当木片被白细胞浸润后,于种植后不同时间将木片取出并置于温盐水中,观察到有白细胞从木片迁移到盐水内,而且能短期存活。

1897年, B Loeb 首次在含有少量血浆凝块的试管中培养成年兔的肝、肾、甲状腺与卵巢植块,发现这些植块在 3d 内仍能保持正常的组织学结构。他的工作被认为是器官培养的最早尝试。

1903年, J Jolly 用悬滴法将蝶螈的白细胞在体外维持存活了近一个月时间。

1906年, SP Beebe 和 J Ewing 以盖片悬滴培养法用动物血清使狗的淋巴肉瘤细胞在体外存活了约 72 h。

虽然这些学者在进行上述体外实验时并没有明确意识到他们的研究工作代表了一种新技术的开端,然而,正是这些处于萌芽状态的看似简陋的研究工作发展衍生了体外培养这门新的具有划时代意义的技术。它使人们意识到,活的组织或细胞在体外真的能够存活。

(一) 体外培养技术的创立

1907年,实验胚胎学家 R Harrison 为了研究神经突起的起源问题而进行了一项著名的体外培养实验。他借鉴前人培养技术上的经验,在无菌条件下,将蛙胚髓管部的小片组织接种于蛙的淋巴液中,共同保持在一盖玻片上,然后翻转盖玻片,使组织小片和淋巴凝块悬挂在盖玻片的表面,再将这块玻片密封在一凹载板之上。一定时间后,更换用于培养

组织的淋巴液。Harrison 用这种方法,将蛙胚髓管部的小片组织在体外培养了数周之久,并观察到有神经突起从种植的神组织块长出。Harrison 的实验,较为完善地建立了体外培养活体组织的培养体系,第一次较为系统地观察了体外培养活体组织的结果。因此,Harrison 的工作被公认为是体外培养技术的开始。通过 Harrison 的研究,也解决了关于神经突起的起源这个在当时争论非常激烈的胚胎学问题。Harrison 的工作,标志着体外培养技术的创立,标志着盖玻片悬滴培养法的建立,标志着神组织体外培养的开始,也标志着神经突起是由神经细胞长出的这一重大理论的诞生。

体外培养的基本条件之一是无菌操作。如何避免培养物被细菌污染,在 19 世纪前后曾是令生物学家甚为头痛的问题。严格而漫长的无菌操作过程使得许多学者对应用体外培养技术产生了畏惧情绪,认为体外培养技术麻烦而且不易控制。A Carrel 在这一方面有卓越的贡献。Carrel 是一位外科医生,具有丰富的无菌外科操作经验,他把外科手术的无菌操作观念带到了体外培养实验之中,在进行实验时特别注意无菌操作。一个典型的例子是从 1910 年开始他在没有抗生素的情况下,仅仅依靠小心而细致的缓慢操作,使鸡胚心脏植块连续培养长达数年之久(Carrel. 1912)。当然,后来的培养物已不再是心脏植块,甚至亦不是心脏组织碎片,而仅仅是一些成纤维细胞。但 Carrel 通过他的创造性工作表明,离体的动物组织在培养条件下可以连续生长和增生。除了将无菌操作观念带入体外培养过程之中外,Carrel 的第二个重要贡献是将培养组织包埋技术、营养供应以及继续培养(也称传代或继代培养)等许多重要的培养条件和方法引入盖玻片悬滴培养系统,从而完善了 Harrison 创立的盖玻片悬滴培养法。1910 年以后,体外培养技术开始稳定发展。具有代表性的工作如下:

1910 年,MT Burrows 以血浆凝块代替前人的淋巴凝块来包埋要培养的组织,延长了组织在体外存活的时间。

1912 年、1913 年 Burrows 以及 Carrel 等学者共同采用胚胎浸液作为刺激生长的营养物,培养了多种动物组织。通过深入研究胚胎浸液与培养物生长的关系,Carrel 等学者发现鸡胚浸液能够非常明显地促进多种细胞的体外生长。因此,以血浆包埋组织块再辅以鸡胚浸液的体外培养方法,成为当时和以后一直沿用了数十年的标准技术。通过 Carrel 等学者的工作,使得体外连续营养供应和传代培养成为可能。

鉴于 Harrison 和 Carrel 在体外培养技术上所做的开创性工作以及最早利用这项技术进行研究所取得成功的成果,现在一般认为体外培养技术是从 Harrison 和 Carrel 两人真正开始的。

(二) 体外培养技术的发展

体外培养技术创立以后,这门技术的发展非常迅速。这些发展主要包括几个方面:①一些学者致力于探讨体外培养的营养条件;②试图培养不同类别的生物体组织细胞;③有些学者致力于建立不同的培养技术。从发展的时期上看,大致可以 20 世纪 50 年代为界分为三个时期。50 年代之前是培养技术在多个领域广泛发展的时期。50 年代是培养技术迅猛发展的时期,多种培养技术相继被建立。50 年代之后则是体外培养技术与生命科学其它技术结合发展的新时期,诞生了多种培养的应用技术。

1. 在营养条件方面

如上所述,最早开展的体外培养工作所采用的营养供应完全来自于天然的、化学成分不清楚的生物物质。应用天然物质作为培养基在研究上有其明显的不足。体外培养技术创立之后,一个很重要的发展方面就是对体外培养的营养条件的研究。人们试图建立化学成分明确的人工合成培养基配方以代替成分不明确的天然物质。重要的研究工作如下:

1911年前后,MR Lewis 和 WH Lewis 对细胞在体外存活和生长所必需的营养条件进行了研究,发表了一些重要论文,初步探讨了 NaCl 、 CaCl_2 、 KCl 、 NaHCO_3 等生理盐溶液成分与培养物体外生长的关系,并尝试性提出了简单的人工合成培养基(实质上是生理盐溶液)配方。

Ebeling(1921)、Drew(1923)、Carrel 和 Baker(1926)、Fischer 和 Demuth(1928)等学者分别分析和研究了当时甚为常用的血浆与胚胎浸液中的营养成分,以便弄清楚培养细胞真正的营养需求。

对营养条件的研究工作后来得到了众多学者的继续和发展,最终导致了人工合成培养基的诞生。当时比较重要的合成培养基与生理盐溶液配方包括:Tyrode 盐溶液(1910)、JPM Vogelaar 和 E Erlichman 人工培养液(1933, 1938)、LE Baker 人工培养液(1936)、LE Baker 和 AH Ebeling 人工培养液(1939)、H Wilson 等(1942)、WR Earle 盐溶液(1943, 1948)、PR White 培养基(1942, 1946, 1949)、A Fischer 辅助培养基 V-614 与 V-605(1948)、Gey 盐溶液(1949)、JH Hanks(1949)平衡盐溶液、JF Morgan 等人的 199 培养基(1950)、Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液(1954)、RC Parker 和 GM Healy 的 858 培养液(1955)、H Eagle 人工合成培养基(1955)、VJ Evans 等的 NCTC107 培养液(1956)、RC Parker 等的 CMRL-1066 培养液(1957)、C Waymouth 的 MB752 培养液(1959)、OA Trowell 的器官培养液 T8, 等等。现在,不少商品化的培养基配方就是源自于这些学者当时的配方及其改良配方。

2. 在其它生物组织细胞的培养方面

除了对动物组织细胞的培养技术、培养条件的研究外,一些学者开始尝试培养不同类别的生物组织细胞。

1913年,Steinhard 以血浆凝块悬滴培养法培养痘苗病毒,为体外培养技术在病毒学上的应用奠定了基础。

1915年,Goldschmidt 最早进行无脊椎动物组织的体外培养,他成功地培养了鳞翅目昆虫组织。后来,MR Lewis(1921)用补加葡萄糖的灭菌海水培养甲壳类的各种组织,见到细胞从植块迁出及细胞分裂现象。

在植物组织培养方面,G Haberlandt 的工作具有开创性意义。他第一次提出了植物细胞具有全能性的观点,并于 1902 年对某些叶组织细胞进行过尝试培养,结果观察到植物组织细胞在离体条件下能够生存与生长的现象。Hanning(1904)也在离体环境中培养了萝卜和辣根的胚,发现离体胚在由无机盐和有机成分组成的培养基上培养能够充分发育并提早萌发形成小苗,首次获得胚培养的成功。此后,M Molliard(1921)成功培养了植

物胚胎, W Kotte(1922)培养了植物的根。WJ Robbins(1922)以豌豆、玉米及棉花的茎尖为材料,成功地培养出根和叶。植物组织细胞的培养技术后来得到 RJ Gautheret、Nobécourt、PR White、Braun、F Skoog 等人的大力发展,逐渐建立了适合于植物材料离体生长的培养基配方,并在培养基中引入了水解酪蛋白、吲哚乙酸、椰子汁等能刺激和调控植物细胞生长和分化方向的附加物。1948 年, Skoog 和 Tsui 发现腺嘌呤/生长素的比例与植物芽/根分化方向的关系,标志着植物组织细胞培养进入了一个新的时期。以后的培养中都参考了这一比例关系,逐渐以腺嘌呤衍生物或其类似物代替腺嘌呤,并结合生长素调节植物组织细胞的生长发育。

3. 体外培养技术在 20 世纪 50 年代之前的发展

早期的体外培养所培养的对象一般是小块组织,因而应该归为组织培养。1914 年, D Thomson 等人成功地进行了器官培养。早期的器官培养都是以血浆凝块支持培养植块并提供营养。

1925 年, A Maximow 改良了 Harrison 创立的单盖片悬滴培养法,使之成为双盖片悬滴培养法。双盖片悬滴培养法将接种组织的盖玻片与用于封闭培养环境的盖玻片分成两张盖玻片,从而极大地方便了更换培养液的手续,大大降低了污染的概率。Maximow 的双盖片悬滴培养法在体外培养的历史上发挥过极为重大的作用,不少学者现在仍然使用这一方法。

为了扩大组织的生存空间,增加体外培养的细胞数量, Carrel 于 1923 年又设计了卡氏瓶培养法。卡氏瓶培养法是后来使用培养瓶进行体外培养的技术基础。20 世纪 40 年代前后,大多数的体外培养工作都过渡到用培养瓶进行培养。其它重大的技术进展如下:

1926 年, TSP Strangeways 设计了试管培养法,他和 HB Fell(1926)改良了器官培养的营养供应方式,开始以血浆和胚胎提取液混合物代替单纯的血浆凝块。但早期所建立的器官培养方法实质上只是 Harrison 创立的植块培养法的延续。

1929 年, HB Fell 和 R Robison 设计了表玻璃器官培养法并以这种培养方法研究了软骨与骨的生长发育。

1933 年, GO Gey 创立了旋转管培养法,并以此建立了许多细胞系。例如, Gey 等人于 1952 年以人的肿瘤组织为材料成功地建立了 HeLa 细胞系。WH Lewis(1935)进一步作了改良,用血浆在普通试管壁上作成薄层培养基以培养组织。

1948 年, KK Sanford 创立了分离细胞培养法,第一次成功地从单层细胞分离出单个细胞,使得建立遗传性状相同的细胞株成为可能。

1949 年, Polge 等人发现了甘油能够用于保护低温下贮存的细胞。

4. 培养技术在 20 世纪 50 年代的重要发展

从 20 世纪 50 年代开始,体外培养技术进入了又一个迅猛发展的时期。相继有许多学者在体外培养的操作技术、培养的器皿以及培养基的组成等方面做了大量的改良工作,取得了许多重大成果和发现。

1950 年, JF Morgan 等人提出 199 培养基配方。

1951 年, JE Shannon 和 Earle 建立了 T 瓶(Earle 瓶)培养法。

1951 年, CM Pomerat 改良和设计了结构简单且易于消毒的灌流小室, 使得体外培养的细胞能够在不断更新的培养液中生长。

OA Trowell (1952, 1954) 在器官培养技术的改良方面作出了许多贡献。1954 年, 我国学者陈瑞铭先生在 Fell 等人的表玻璃器官培养法的基础上, 改良和建立了擦镜纸培养法(JM Chen, 1954)。

1954 年, Earle 等建立了悬浮培养法。

1955 年, H Eagle 建立著名的 Eagle 培养基配方。

1957 年, Dulbecco 等人开始采用胰蛋白酶消化处理来分离细胞的方法以及应用液体培养基的方法, 使得体外培养单层细胞成为可能。后来的学者应用单层细胞培养法建立了许多细胞株。

1959 年, Lovelock 等人发现了一种新的化学冷冻保护剂——二甲基亚砷。

1960 年, G Barski 等人在两种不同类型的细胞混合培养物中, 发现不同细胞间存在自发融合现象。

5. 20 世纪 50 年代之后的新进展

20 世纪 50 年代以后体外培养技术进入了另一个蓬勃发展的新时期。这一时期生命科学的一项重大进展是诞生了分子生物学。同时, 生命科学和技术科学相互渗透、相互结合, 从而出现了许多新兴学科。体外培养技术在其中也扮演了极为重要的角色, 既在其它学科中得以广泛应用, 又受到其它学科的大力促进。这一时期体外培养技术的发展主要在于出现了许多应用技术。例如, 以体外培养技术为基础的应用杂交瘤技术制备单克隆抗体的技术、动物细胞大规模培养技术、微生物制药技术、基因转染与细胞融合以及细胞转化等细胞工程技术。

在体外大规模培养的技术方面, 值得一提的是 1967 年 AL Van Wezel 创立的微载体培养系统。其基本原理是以固体微珠(微载体)作为锚着(贴壁)依赖型细胞体外生长时的黏附表面, 将微载体与培养液共同置于生物反应器内, 通过连续搅拌使微载体悬浮于培养液中, 细胞附着于微载体表面生长和繁殖。这种培养技术极大地增加了细胞的附着表面, 充分利用生长空间和营养液, 细胞生长环境均一, 因而可以大大提高培养的细胞数量和细胞产生的生物制品产量。制备微载体的材料一般是对细胞有亲和性的天然材料如葡萄糖聚合物或者人工合成的聚合物。微珠的直径在 $500 \sim 200 \mu\text{m}$ 左右, 已有商品化产品。

1972 年, RA Knazek 等人创立了中空纤维细胞培养技术。众所周知, 传统的各种实验室内体外培养技术, 一般采用培养瓶皿或培养板来维持培养对象在体外的生长。常规培养器皿能够给培养物提供的生长空间只有其表面, 这是一种有限的二维的生长空间。而在体条件下, 所有的细胞都是生长在一种三维空间中。组织内的毛细血管为在立体环境中生长的细胞提供营养和物质代谢环境。中空纤维细胞培养技术就是模拟细胞在体内生长的三维状态, 利用一种人工的“毛细血管”即中空纤维来给体外培养的细胞提供物质代谢条件。这一技术的建立, 标志着体外培养技术从过去以二维生长条件跨越到以三维生长条件进行体外培养的新阶段。同时, 应用这种培养技术, 可以使得体外培养从实验室内的微量或小量水平提高到大规模水平。

低温冷冻保存技术是对培养物进行后处理的一种重要技术。通过这项技术, 可以将

任何希望被保存的培养物几乎无限期地保存起来,同时保持细胞的生命力。从 Gey 等人 1952 年建立 HeLa 细胞系至今,已建立和保存的细胞系、株几不胜枚举。数十年来,HeLa 细胞系之所以能传遍世界各地,被应用于无数的科学研究之中,主要就是利用了低温冷冻保存技术。现在,包括我国在内的许多国家都已建立了用于统一保藏典型培养物的“培养物银行”或者冻存中心。如,美国的 ATCC(American Type Culture Collection)、中国武汉的典型培养物宝藏中心等。任何经鉴定的典型培养物都可以在此申请登记、贮存、随时取用,甚至交换及进行商业化供应。

随着科学技术的发展,用于体外培养的各种物质条件如今都已进入商品化、规范化和系列化的时代。在体外培养工作中使用一次性用品越来越普遍。从培养瓶皿、培养系统、操作器械、仪器设备、培养用水、培养基、血清、特殊添加剂等物品到细胞生存的理化环境控制条件、观测分析与记录仪器、培养物的后处理设备等各种相关技术条件都有专业化生产厂家,可以通过商业部门得到供应。

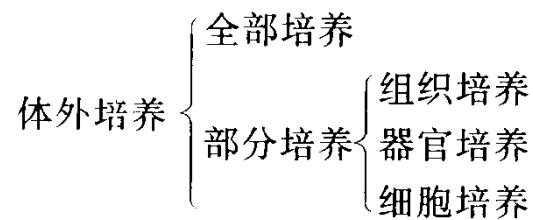
(三) 我国体外培养工作的发展情况

体外培养技术早在 20 世纪 30 年代就传入我国。当时的体外培养研究主要集中在植物组织的培养方面。最早的工作是 1933 年李继侗与沈同教授对银杏胚胎的培养。罗宗洛和罗士伟(1935)对玉米根尖生长锥也进行了培养。罗士伟(1943, 1945~1947)曾对植物幼胚、根尖、茎尖、愈伤组织等分别进行了培养和研究。但我国体外培养工作的真正开始基本上是 20 世纪 50 年代以后了。老一辈学者张钧、鲍鉴清教授曾分别在上海与北平(现北京)进行过一些有关动物组织体外培养的实验工作。1952 年,鲍鉴清教授首先在天津建立了国内第一个体外培养实验室,并于 1955 年编写了一本《组织培养术》。此后,北京、上海、武汉、长春等地也相继建立了组织培养室。体外培养技术被分别应用到微生物的培养(唐仲章, 1953;王潜渊, 1957;汤飞凡等, 1958;郭辉玉, 1960)、昆虫组织的培养(高尚荫, 1956;高尚荫等, 1957;刘年翠等, 1958)、肿瘤细胞的培养(潘琼婧 1960, 鄂征 1962)、神经细胞的培养(鲍璇 1962, 邵文钊 1963, 郭晚华 1963)等方面。20 世纪 70 年代以后,体外培养这门技术在国内的发展更为迅速,应用更为广泛。新的培养技术不断被引入和改良,已建立的细胞系不断增多。而今,体外培养实验室在我国可以说是遍地开花,几乎所有的高等学校、科研院所和一些医药卫生部门、生物制品产业部门等都拥有了体外培养实验室。利用体外培养技术从事生产劳动和其它活动的项目和人次以及所取得的成就几乎无法估量。

从鲍鉴清教授(1955)编写的《组织培养技术》开始至今,国内先后有几本相关著作出版。向近敏与朱宝莲(1965)编译的《细胞与组织培养》、鲍鉴清与郭绢霞(1965)合编的《组织培养术》、上海市肿瘤研究所细胞生理组(1966)合作编写的《细胞营养与组织培养》、鄂征教授(1982, 1988, 1993, 1995)先后主编的《组织培养技术》与《组织培养和分子细胞学技术》、陈瑞铭先生(1991)主编的《动物组织培养技术及其应用》以及近年来几位学者先后编写、翻译的几本著作,对于在我国传播、推广和发展体外培养技术发挥了很大的作用。

三、体外培养技术的主要类别

按照体外培养的对象,体外培养技术可分为全部培养和部分培养两大类。全部培养是指对生物个体进行培养。全部培养的对象一般是微小的生物个体,诸如微生物、寄生虫等。本书第十六章病原微生物的体外培养所讲述的主要就是全部培养的内容。部分培养是体外培养更为普遍的类别,就是指对生物个体的一部分(如某个器官、器官的一部分、某种组织或者某些细胞等)进行培养的技术。如前所述,按照部分培养的具体对象,可将部分培养分为器官培养、组织培养和细胞培养三类。如果按照体外培养物的结构成分的组织学特征,则可将体外培养分为植块培养法和分(离)散细胞培养法。植块培养法所培养的结构成分是从生物体内取出的小块结构,细胞之间的组织关系未受到破坏。而分(离)散细胞培养法是将要培养的结构成分先制备成单个细胞,再对制成的细胞悬液进行培养的技术。如果将培养对象从生物体内取出,在体外初次进行培养,这个过程就称为原代培养。原代培养经过一定时间的生长发育,逐渐分裂增生,甚至会长满培养瓶皿的壁,细胞之间可能发生接触抑制现象,这时就需要将原代培养物分割成若干小的部分分别重新接种和再培养,再培养的过程就称为传代培养。不同的培养技术,各有其优势和不足之处,选择时宜根据具体的实验目的而定。



四、体外培养技术的应用

理论上,几乎所有类型的生物组织、细胞甚或器官、个体都可以按一定方式在体外环境中进行培养。细胞生命活动的主要方面都可以在体外再现。因此,体外培养技术几乎可以应用到生物、医学研究的各个领域。这门技术自创立至今,已在多个学科领域甚至生产实践上发挥了巨大的作用。

(一) 在组织学与胚胎学以及细胞生物学领域的应用

1. 在组织学与胚胎学上的应用

组织培养是组织学与胚胎学领域科学研究的重要方法。Harrison(1907)最早在体外培养了蛙胚的神经管组织,发现从培养的神经组织植块能够长出神经突起,基于此项标志着体外培养技术创立的研究工作,建立了神经突起是由神经细胞长出的这一重大理论。后来,体外培养技术被广泛应用于实验胚胎学与组织发生学。

在以体外培养技术研究器官发生与组织发生方面,有许多重要课题,包括鸟类胚胎肢芽发育、骨与软骨的发生、胚胎心脏原基发育、牙胚的发育、听觉器官的发育、视网膜的组织发生、皮肤的发生和发育的研究等。Thomson(1914)曾在固体培养基上培养了鸡胚的

某些器官原基,如脚趾、羽基、晶状体等,发现这些器官原基都能逐渐长大并发生一定的形态分化,其分化程度与体内的相似。Strangeways 和 Fell(1926)以及 Fell 等人(1934, 1929)以他们创立的表玻璃器官培养法培养了胚胎肢芽、眼球、骨与软骨、听囊、牙胚、未分化的视网膜等多种器官原基,均获得成功发育和分化。他们将听囊进行培养,成功地发育成 Cortis 器;将牙胚在体外培养,形成了正常齿尖;培养了未分化的视网膜,发育成视锥及其它相关结构;将长骨原基在体外培养,形成了颇具体内长骨形态并发生骨化的骨组织;将胚胎肢芽进行培养,形成了关节。还有学者发现培养的牙胚能够分化出牙质和釉质;培养的胚胎皮肤能够分化出毛发;培养的甲状腺上皮在有结缔组织存在时能够分化成管状或腺泡样结构;培养的鸡胚(3 天龄)心肌组织在有血清培养液中,能够维持其收缩性能,而在营养丰富的鸡胚浸出液中会发生去分化,逐渐失去其收缩能力。我国学者陈瑞铭(1953)以器官培养法培养了小鼠胚胎的胸骨,研究了胸骨的胚胎起源,观察了胸骨发生过程中的细胞迁移与运动,探讨了影响胸骨发生的因素。现在,以体外培养技术培养胚胎器官研究其分化和发育过程,已经与多种其它实验因素结合起来。甚至开始尝试在体外将胚胎干细胞进行诱导分化,使之向人们期望的细胞方向、组织方向或者器官方向分化和发育,希望能够在体外“制造”出人工器官。体外培养技术是研究胚胎发生、发育过程中的诱导现象、发育潜能、胚胎致畸作用、环境诱变等衍生、演化生长行为及其机制的重要手段。

2. 在细胞生物学上的应用

利用体外培养技术研究细胞生命现象是这门技术的基本应用。

(1)在细胞形态学方面:借助体外培养技术尤其是通过与显微缩时电影技术结合,已观察到许多细胞生长行为。培养中的细胞虽然与其在体内的形态结构有所差异,但直接观察体外生长的细胞,相对于常规的组织学切片,能够看到细胞的全貌。体内细胞的基本形态可以大致由培养的细胞反映出来。借助这一技术,能够看到细胞分裂的全部过程。另外,直接观察培养中的细胞运动是体外培养技术非常突出的优势。通过观察发现,培养细胞(cultured cell)的细胞核并不是静止不动的,有些细胞核会发生旋转运动。在培养细胞中观察到的胞饮作用,进一步证实了细胞膜的运动性。通过观察培养的细胞,直接看到了细胞运动行为,揭示了胞质突起(伪足)与细胞运动的关系,提出了生长锥的概念,弄清了其基本形态和运动方式。通过体外培养技术,发现了正常细胞生长的接触性抑制现象,而肿瘤细胞没有接触性抑制特征;也证实了某些细胞可以通过相互接触实现机械导向作用,如神经胶质细胞对于培养中的神经元迁移有导向作用;基于神经元与其它细胞之间的相互接触,实现神经元对其它细胞的神经支配。通过将支配神经元与其靶细胞联合培养,可以直接观察靶细胞对神经突起生长方向的诱向作用。

(2)在细胞生理方面:在细胞的营养生理方面最富有成果。正是根据培养细胞的营养条件与细胞生长状况的关系,才确定了培养细胞的营养需求,才建立了各种培养基的合理配方。而将细胞培养在不同的营养条件下、不同的离子环境中或者在培养液中加入不同的药物成分,研究细胞电活动的变化也是对细胞生理功能研究的一个重要方面。培养细胞也可以用于细胞代谢研究。从条件培养液中收集细胞分泌产物是该项技术应用于生产实践的主要途径。另外,研究环境因素如温度、渗透压、酸碱度、氧张力、射线、超声波以及其它化学试剂等作用下,细胞生理功能的改变也已取得重大进展。近年来,以膜片钳技术

研究细胞膜离子通道活性,很大一部分工作就是对培养细胞进行的。

(3)在细胞遗传学方面:利用培养的细胞进行染色体分析及其它分子生物学研究是一种常见的方法,借此实现对细胞遗传基础的分析和改造。尽管培养的细胞有时会发生遗传变异,但变异也会带来好处。近年来兴起的细胞工程技术,如体外受精、基因转染等技术对于促进濒临灭绝的动物繁殖、对于产生新的细胞性状以及植物育种等都带来极大潜力。另外,通过对培养细胞绘制生长曲线或者测定细胞的增殖活力及细胞活性程度,来研究细胞周期及其调控因素和过程均已取得重大进展。

(二) 在肿瘤学方面的应用

由于细胞培养是研究细胞分裂增殖活动的很好手段,因而也成为研究肿瘤细胞生物学特性、肿瘤发生发展病理以及肿瘤药物筛选等的重要技术。组织培养尤其是肿瘤组织与正常组织联合培养对研究它们之间的相互作用、相互关系很有意义。

1. 肿瘤细胞生物学特性研究

通过比较肿瘤细胞与正常细胞在体外培养条件下生长行为的差异,研究肿瘤细胞生物学特性的改变,对于建立诊断标准是有益的。研究表明,肿瘤细胞的显微结构、亚细胞成分及其它细胞学表现上与正常细胞均有不同。肿瘤细胞或恶性转化细胞相对于正常细胞,其核分裂的时间普遍缩短(Cowdry 1955)。例如,大鼠角膜上皮细胞的核分裂时间为60min以上,而Jensen鼠肉瘤细胞为30min左右;鸡胚成纤维细胞的核分裂时间一般为20~40min,而大鼠Walker癌细胞约为25min。另外,一些肿瘤组织或细胞能够分泌生物活性物质,促进联合培养的其它组织细胞生长。例如,肉瘤180细胞与交感或感觉神经节联合培养时,能够促进神经组织的突起生长。

2. 肿瘤发病机制研究

Earle(1943)曾发现,在小鼠皮下成纤维细胞的培养液中加入甲基胆蒽,继续培养一定时间后,正常的成纤维细胞能够转化为恶性肉瘤细胞。而Sanford等(1950)报告,即便是在正常细胞的培养液中不加甲基胆蒽,只要进行长期培养,也可能转化为恶性细胞。有些学者认为,正常细胞生长在含异种动物血清的培养液中,常常可以发生恶性转化。较为一致的看法是,体外培养的细胞由于没有机体内调节,经过长期培养的“正常”细胞,有可能不再正常。若长期培养,有可能产生恶变。

恶性肿瘤细胞在体内具有浸润周围组织的能力,但若以在体方法研究肿瘤细胞的浸润行为,会因为动物体内的血液供应、机体免疫力、间质反应以及新血管的生成等多种因素影响肿瘤细胞的生长行为而制约对肿瘤细胞浸润机制和过程的研究与观察。相反,利用体外培养技术则可以方便地观察肿瘤细胞的浸润过程。因而,体外培养技术有利于研究肿瘤细胞浸润机制以及各种因素包括细胞因子、激素和药物对浸润过程的影响。体外研究肿瘤细胞浸润,最常用的模型是将肿瘤组织或细胞与宿主组织(如鸡胚肾、肺、肝和心脏等组织以及动物羊膜组织甚或骨组织等)进行联合培养,培养一定时间后,观测肿瘤细胞的生长行为以及对宿主组织的浸润结果。联合培养的方式有多种。可以将肿瘤组织块

与正常组织块(如鸡胚的中肾组织块)相距一定的距离,共同培养在同一生长表面上。可以将肿瘤细胞与正常细胞混合起来进行培养。也可以将肿瘤植块放在正常组织之上进行培养。例如,将肿瘤组织或细胞接种在鸡胚(常选 12 天龄者)的尿囊绒毛膜上进行联合培养,可观察到肿瘤细胞能够向下穿过尿囊绒毛膜的上皮层侵入中部的结缔组织之中(Easty et al. 1976)。通过测量肿瘤细胞穿过尿囊绒毛膜上皮层的距离,反映不同肿瘤细胞的浸润和转移能力。也可以直接观察甚至通过显微缩时电影记录肿瘤细胞的浸润和转移行为以及对正常组织、细胞的影响。如果在联合培养的或者单独培养肿瘤组织细胞的培养液中加入某些药物或拟筛选药物,可以用来研究药物的化疗作用或者用于筛选肿瘤药物(可参考本书第十五章)。

3. 异种移植研究

Gey 等(1954)报道,将 HeLa 细胞接种到豚鼠的眼球中,能够产生移植瘤。而腹腔注射 HeLa 细胞悬液至经过 X 射线照射与可的松处理的大鼠,也可以形成移植瘤块(Suskind et al. 1957)。Coriell 和 Mcallister(1958)将经过体外培养的肿瘤细胞或正常细胞等多种细胞分别接种到经 X 射线与可的松处理过的大鼠腹膜内,结果都产生了肿瘤,因而认为体外培养能够改变某些正常细胞,使之具有类似肿瘤细胞的致瘤性和浸润性。Mcallister 和 Coriell(1959)研究了接种的细胞数量与肿瘤发生的关系,发现经过长期培养的细胞,接种 10^7 个细胞时产生肿瘤的百分率最高,而接种原代培养的细胞到 X 射线及可的松处理过的大鼠,即使多达 10^8 个细胞,照样不致瘤。后来,将不同种类细胞通过不同的接种途径移植到不同条件处理过的动物或者不同年龄(如胚胎动物与成年动物)的动物体内而研究其致瘤性的工作有很多。除了用 X 射线全身照射与注射糖皮质激素外,还包括摘除动物胸腺以及注射抗胸腺依赖淋巴细胞血清等方法。藉之基本上都成功地建立了动物移植瘤模型。

20 世纪 60 年代以后,随着裸小鼠的发现和应用,移植瘤技术和研究取得了飞跃性进展。通过将肿瘤细胞移植到缺乏 T 细胞免疫反应的裸小鼠体内,“借腹”生长,并结合使用一定的实验因素,在肿瘤细胞的鉴定、肿瘤细胞体内分化和诱导分化、肿瘤细胞病毒检测、抗癌药物筛选以及基因治疗等方面得到广泛的应用。

当前,研究肿瘤细胞凋亡以及肿瘤细胞体外分化又成为新的热点。利用体外培养条件诱导肿瘤细胞发生凋亡已取得令人瞩目的成就。通过施加凋亡诱导因素或者借助基因转移技术诱导凋亡,可望成为研究抑制肿瘤细胞生长以及治疗肿瘤病的一条新途径。通过检测肿瘤细胞端粒酶活性,为临床上诊断肿瘤疾病提供了又一有力手段。

(三) 在微生物学领域的应用

1. 在病毒学上的应用

体外培养技术在病毒学方面的应用是极为广泛的。除了作为分离病原体的重要手段之外,还为研究病毒的亲细胞性和亲组织性提供了非常方便的方法。用培养的技术研究病毒传染时,可以方便地观测探讨细胞的致病作用及包含体的形成、细胞的新陈代谢变化、抗病毒抗体与抗病毒物质对病毒的作用方式及机制,以及病毒干扰现象的本质与病毒

变异的规律性等。在实际应用方面,还可以藉培养技术进行病毒的鉴定、研究理化因素对病毒的作用、进行病毒抗原的制作和疫苗的生产,并用于病毒病患者血清学诊断及病毒传染病的流行病学调研等。

以培养的方法进行病毒学研究有几方面优点:①没有隐性感染,避免动物体内实验时可能因动物所带其它病毒的隐性感染而发生的假阴性或假阳性结果;②没有免疫抵抗力,避免动物可能带有隐性感染而对接种的同类病毒产生抵抗现象;③少数病毒具有严格的宿主及组织亲和性,应用培养方法可以选择出最易感的细胞进行研究;④利用培养方法可以增加接种量,避免成年动物或鸡胚因年龄或接种途径的限制而不能大量接种;⑤由于体外培养的各种条件容易控制,故藉此获取减毒株或无毒株较其它方法容易;⑥利用大规模培养技术制备病毒疫苗,不仅可以提高产量,降低成本,还可以使培养液中的异性蛋白减低至最低限度,提高疫苗的质量;⑦利用体外培养技术可以快速分离、鉴定病毒。

2. 在细菌学上的应用

体外培养技术在细菌学上的应用也很广泛。在这门技术建立的初期,常用于研究培养的组织细胞与致病菌之间的作用现象、过程和机制。另外,培养技术可用来分离纯化或在体外进行大量繁殖细菌。

(四) 在免疫学方面的应用

体外培养技术曾在研究抗体产生的机制方面发挥了重要作用。20 世纪 50 年代就有研究表明,培养物能够产生抗体。在体外培养的鸡胚成纤维细胞培养液内预先加入很少量异种蛋白,培养一定时间后再加入大量的异种蛋白,结果发现后来加入的大量异种蛋白并不影响细胞的生长。而对照组没有经历预先加入很少量异种蛋白的处理,如果在其培养液中直接加入比实验组少得多的异种蛋白,细胞的生长就会停止。因此认为,体外培养的细胞也能够产生抗体。将经过免疫的家兔的脾脏组织进行体外培养,证实培养液中有抗体产生(Fagraeus 1948, Mountain 1955)。

杂交瘤细胞与单克隆抗体的制备技术是体外培养技术在免疫学方面的重大实际应用(细节可参见本书第十九章)。目前,已能够利用大规模培养技术培养杂交瘤细胞生产抗体,不仅可以提高产量、简化工艺、降低成本,而且可以提高抗体质量。

(五) 在药理学领域的应用

早在 20 世纪 50 年代,就有学者(Pomera & Leake 1954, Livingood & Hu 1954)以体外培养技术检测了很多种药物对不同细胞的毒性作用,基本上能够确定这些药物对不同细胞的毒性剂量范围并观察到药物对细胞所产生的毒性作用。随着各种新的肿瘤化疗药物的不断开发以及与人类生产实践和生活实际密切相关的化合物(包括药品、化妆品、食品添加剂、杀虫剂与工业化合物等)大量涌现,均需要利用方便快捷的有效方法对它们进行筛选、临床前评估或投入生产之前的安全评估。体外培养技术从 50 年代前后开始,就成为药物筛选、细胞毒性和活性检测中极为重要的手段。尽管对上述这些化合物的药

效、不良反应与安全性评估必须进行一定的动物实验,但体外培养技术已经成为国际上进行药效测试和细胞毒性研究的常用手段。以这种方法进行检测和研究的优点在于:①已建立的细胞系(株)能够为体外检测提供大量的遗传特性均一或相似的细胞来源,加上现在的体外培养技术日益成熟和培养用品商业化,使得对很多种药物的筛选研究工作变得很稳定、很方便、很经济;②可以准确控制药物作用的对象、作用的时间和剂量以及细胞的生长条件。例如,研究临床用药,可以选用人体细胞进行检测。对于有组织特异性的药物,还可以有针对性地选用相应的细胞进行检测。抗癌药物可直接以肿瘤细胞进行实验,可以从细胞学的角度直接观察药物对肿瘤细胞的作用。因此,这种检测手段避免了活体研究时效应细胞针对性不强、体内药物代谢反应、物种间及个体间的耐药性差异等缺陷;③将待检测药物或其它化合物直接加到培养系统中,使之直接与效应细胞相接触。必要时还可以将药物直接注入细胞内。这样容易区分药物的直接作用与体内的间接作用;④出于对动物的保护道义,国际上要求减少动物实验的呼声渐高。因而,利用体外培养技术进行药物检测的研究工作越来越普遍。

当然,以体外培养的方法观测研究各种药物及不同剂量下对离体生长的细胞之作用不完全适合于在体情况(鄂征 1995)。体外检测方法的不足之处在于:①体外检测的细胞生长环境简单而体内生长环境极为复杂,后者不仅有广泛的功能调节系统,而且还存在对药物进行代谢、修饰(如肝、肾等脏器对药物的生化增强或减弱)、免疫等方面的作用;②用体外培养技术进行细胞毒和活性检测时,比较容易和适宜于单质药物,而对于复方药及中成药的分析就较为困难,必须综合评估;③检测水溶性药物一般比较容易,而对非水溶性药物检测时,需要使用适当的溶剂,同时要设立溶剂对照组以排除溶剂本身对细胞的作用;④体外检测主要适用于研究急性毒性作用,要分析药物的慢性作用需要改进培养系统。

一致的看法是,必须综合考虑体内、外的检测研究成果。

1. 体外培养细胞毒和活性检测主要应用范围

体外培养检测系统比较适宜于研究抗癌药物和能够致畸、致癌、致突变的化合物。主要应用范围(弗雷什尼 1996)包括:①鉴定具潜在活性的化合物;②研究化合物发挥毒性作用的机制;③预测可能用于治疗癌症患者的有效的细胞毒性药物;④从多种化合物中筛选有效成分及其活性范围;⑤确定效应细胞类型;⑥确定毒性范围;⑦研究药物浓度与暴露时间的关系。

致突变试验是新药临床前研究中必须要做的试验,其中包括微生物回复突变试验、哺乳动物培养细胞染色体畸变试验以及动物微核试验等。每种试验都有比较具体的细胞或菌株要求。例如,微生物回复突变试验要求的菌株为组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌,一般采用 TA98、TA100、TA97 及 TA102 等菌株。哺乳动物培养细胞基因突变试验要求的细胞为中国仓鼠 V79、CHO 细胞或者 L5178Y 细胞系,基因位点为 HGPRT 位点突变系统或其它哺乳动物培养细胞位点突变系统。在啮齿类动物微核试验中可能会选用程序外 DNA 合成试验。该试验须选用大鼠肝原代培养细胞或其它细胞系(株)。

早期的毒性研究主要是定性的。一般以有血清培养液培养植块来观测药效。评判的指标主要是看细胞形态的变化以及对植块内的细胞向外迁移和生长的抑制作用。后来,