



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医学院校规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、
护理、法医等专业使用



医学细胞生物学

王尔孚 蔡绍京 霍正浩 主编



科学出版社
www.sciencep.com

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医学院校规划教材

案例版TM

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医等专业使用

医学细胞生物学

主 编 王尔孚 蔡绍京 霍正浩
副主编 潘克俭 单长民 陈立梅
编 者 (以姓氏笔画为序)

卫荣华 (郧阳医学院)

王尔孚 (北华大学基础医学院)

阮绪芝 (郧阳医学院)

沈国民 (河南科技大学医学院)

张 晓 (成都医学院)

陆 宏 (宁夏医学院基础学院)

陈立梅 (北华大学基础医学院)

周 勇 (新疆医科大学)

单长民 (滨州医学院)

钟慧军 (宁夏医学院基础学院)

骆 延 (河南科技大学医学院)

蔡绍京 (徐州医学院)

潘克俭 (成都医学院)

霍正浩 (宁夏医学院)

科学出版社

北 京

郑 重 声 明

为顺应教育部教学改革潮流和改进现有的教学模式,适应目前高等医学院校的教育现状,提高医学教学质量,培养具有创新精神和创新能力的医学人才,科学出版社在充分调研的基础上,引进国外先进的教学模式,独创案例与教学内容相结合的编写形式,组织编写了国内首套引领医学教育发展趋势的案例版教材。案例教学在医学教育中,是培养高素质、创新型和实用型医学人才的有效途径。

案例版教材版权所有,其内容和引用案例的编写模式受法律保护,一切抄袭、模仿和盗版等侵权行为及不正当竞争行为,将被追究法律责任。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学:案例版/王尔孚,蔡绍京,霍正浩主编. —北京:科学出版社,2007

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等医学院校规划教材
ISBN 978-7-03-019879-2

I. 医… II. ①王…②蔡…③霍… III. 人体细胞学: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(2007)第 136558 号

责任编辑:夏 宇 李国红 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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>

天竺彩色印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 8 月第 一 版 开本:850×1168 1/16

2007 年 8 月第一次印刷 印张:10

印数:1—5000 字数:339 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

前 言

细胞生物学是生命科学领域的前沿学科,也是医学的重要基础学科。在 21 世纪生命科学和医学快速发展的今天,为使医学生能够在有限的时间内掌握细胞生物学的基础理论和基础知识,同时也为适应五年制医学院校教学改革和教学实践,加强基础理论与医学实践联系的需求,我们尝试编写了这本案例版《医学细胞生物学》教材。

本教材共分 13 章,内容上注重细胞生物学的基础知识与基本技能,对近年来细胞生物学的热点问题及进展内容也有适量介绍。本教材注重实用性,能满足五年制医学院校各专业细胞生物学教学要求。

本教材由北华大学、徐州医学院、宁夏医学院、河南科技大学、新疆医科大学、滨州医学院、成都医学院、邵阳医学院等 8 所院校 14 位教师编写完成。

在了解各院校教学实际的基础上,我们对与其他学科有较多重复的内容做了必要的删减。例如,在细胞核一章,将基因的转录、翻译及其调控的过程做了删减。这样更有利于把细胞生物学的最基本内容阐述清楚。

本教材的编写得到了河南科技大学医学院、宁夏医学院领导及生物学教研室全体同仁的支持、帮助,特此表示感谢。

编写案例版教材是一种新的尝试,受专业水平和编写能力的限制,加之时间仓促,难免存在错误或不当之处,望同行及使用本教材的师生给予批评指正,以便再版时修正、完善。

主 编

2007 年 6 月

目 录

前言	
第1章 细胞生物学概述	1
第一节 细胞生物学的研究内容	1
第二节 细胞生物学的发展简史	1
一、细胞学说的建立	1
二、细胞学的经典时期	1
三、实验细胞学阶段	1
四、细胞生物学的形成	2
第三节 原核细胞和真核细胞	2
一、原核细胞	2
二、真核细胞	3
三、原核细胞与真核细胞的比较	3
第2章 细胞生物学研究方法	4
第一节 显微成像技术	4
一、光学显微镜	4
二、电子显微镜	6
第二节 细胞组分的分析方法	8
一、离心技术	8
二、免疫细胞化学技术	9
三、放射自显影术	9
四、流式细胞术	9
第三节 细胞培养与细胞工程技术	9
一、细胞培养	9
二、细胞融合	11
第3章 细胞的分子基础	13
第一节 生物小分子	13
一、无机化合物	13
二、有机化合物	13
第二节 生物大分子	14
一、核酸	14
二、蛋白质	18
第4章 细胞膜和细胞表面	21
第一节 细胞膜化学组成	21
一、膜脂	21
二、膜蛋白	23
三、膜糖类	24
第二节 细胞膜的分子结构	24
一、片层结构模型	24
二、单位膜模型	25
三、流动镶嵌模型	25
四、脂筏模型	25
第三节 细胞膜的特性	26
一、流动性	26
二、不对称性	27
第四节 细胞膜的物质运输	28
一、被动运输	28
二、主动运输	30
三、协同转运	31
四、胞吞作用	31
五、胞吐作用	32
第五节 细胞表面	33
一、细胞外被	33
二、膜下溶胶层	34
三、微绒毛	34
四、纤毛和鞭毛	34
第5章 细胞的信号转导	36
第一节 信号分子	36
一、细胞间的信号分子	36
二、细胞内的信号分子	36
第二节 受体	36
一、受体的类型	36
二、受体的作用特点	38
第三节 信号转导的主要途径	39
一、信号转导途径概述	39
二、G蛋白耦联受体及信号转导	39
三、酶联受体信号转导	44
第四节 信号转导途径的共同特点	45
第6章 细胞连接与细胞外基质	47
第一节 细胞连接	47
一、封闭连接	48
二、锚定连接	49
三、通讯连接	51
第二节 细胞外基质	53
一、氨基聚糖与蛋白聚糖	53

二、胶原与弹性蛋白	55	三、微管的装配	89
三、非胶原糖蛋白	57	四、微管结合蛋白	91
第7章 内膜系统和核糖体	60	五、微管特异性药物	91
第一节 核糖体	60	六、微管的功能	91
一、核糖体的组成	60	第二节 微丝	93
二、核糖体的功能	60	一、微丝的化学组成与形态结构	93
第二节 内质网	62	二、微丝的装配	94
一、类型、形态与组成	62	三、微丝结合蛋白	95
二、粗面内质网的功能	63	四、微丝特异性药物	95
三、滑面内质网的功能	66	五、微丝的功能	96
第三节 高尔基复合体	66	第三节 中间纤维	97
一、形态、结构与组成	66	一、中间纤维的类型	97
二、功能	67	二、中间纤维的结构	97
第四节 溶酶体	69	三、中间纤维的装配	97
一、形态与组成	69	四、中间纤维结合蛋白	98
二、类型	70	五、中间纤维的功能	99
三、功能	71	第10章 细胞核	100
四、形成	72	第一节 核被膜	101
第五节 过氧化物酶体	73	一、外核膜和内核膜	101
一、形态与组成	73	二、核周隙	101
二、功能	73	三、核孔及核孔复合体	101
三、过氧化物酶体的发生	74	四、核纤层	102
第六节 膜泡与膜泡运输	74	第二节 染色质和染色体	103
一、有被小泡的类型	74	一、染色质的化学成分	103
二、膜泡的定向运输	77	二、染色质的类型	104
第8章 线粒体	78	三、染色质的包装	105
第一节 线粒体的形态结构和化学组成	78	四、染色体	107
一、形态、数目和分布	78	第三节 核仁	111
二、超微结构	79	一、化学成分	111
三、线粒体的化学组成	80	二、超微结构	111
第二节 细胞呼吸	81	三、功能	112
第三节 线粒体的半自主性	84	四、核仁周期	114
一、线粒体 DNA	84	第四节 核骨架	114
二、线粒体内蛋白质合成	85	一、形态结构与化学成分	114
三、核基因编码的线粒体蛋白质及其转运	85	二、功能	115
第四节 线粒体的增殖与起源	86	第五节 核遗传信息的储存和传递	115
一、线粒体的增殖	86	一、核遗传信息的储存	115
二、线粒体的起源	87	二、DNA 复制	116
第9章 细胞骨架	88	三、基因表达	117
第一节 微管	88	四、基因表达的调控	120
一、微管的化学组成	88	第11章 细胞周期	122
二、微管的形态结构	89	第一节 细胞分裂	122
		一、无丝分裂	122

二、有丝分裂	122	三、细胞间的相互作用	137
三、减数分裂	125	第三节 干细胞	137
第二节 细胞周期的基本概念	128	一、干细胞的生物学特征	138
一、细胞周期	128	二、胚胎干细胞	138
二、细胞周期检验点	129	三、成体干细胞	138
第三节 细胞周期的调控机制	129	第四节 细胞分化与肿瘤	139
一、MPF 的发现	129	一、肿瘤干细胞假说	139
二、周期蛋白	130	二、肿瘤细胞的生物学特性	140
三、周期蛋白依赖性激酶	130	三、癌基因与抑癌基因	140
四、周期蛋白依赖性激酶抑制因子	131	第 13 章 细胞衰老与凋亡	141
五、细胞周期的调控	131	第一节 细胞衰老	141
第 12 章 细胞分化	134	一、细胞衰老的特征	141
第一节 细胞分化	134	二、细胞衰老的分子机制	142
一、全能性细胞与全能性细胞核	134	第二节 细胞凋亡	143
二、去分化和转分化	135	一、细胞凋亡的生物学意义	143
三、细胞分化的机制	135	二、细胞凋亡的特征	144
第二节 细胞分化的影响因素	136	三、细胞凋亡的分子机制	145
一、细胞决定	136	参考文献	148
二、细胞质的作用	137		

第1章 细胞生物学概述

第一节 细胞生物学的研究内容

细胞生物学(cell biology)是生命科学中发展迅速的重要基础学科之一,是从细胞的显微、亚显微和分子3个水平对细胞的各种生命活动进行研究的学科。细胞是生命活动的基本单位,细胞生物学在3个不同水平上把结构和功能结合起来,以动态的观点探索细胞的各种生命活动。在形态方面,除应用光学显微镜技术描述细胞的简单结构外,还采用电子显微镜技术和生物化学方法等精细手段,观察和分析细胞内各部分的超微结构和分子结构。在功能方面,除研究细胞内各部分化学组成和代谢活动外,还把代谢活动和形态结构结合起来探索细胞的各种生命活动的具体反应过程。细胞生物学的深入研究,有助于阐明生物体的生长、发育、分化、繁殖、运动、遗传、变异、衰老和死亡等基本生命活动的规律。

第二节 细胞生物学的发展简史

细胞生物学的形成和发展经历了漫长的过程,细胞的发现至今已有300多年的历史。随着技术手段的创新和理论上的突破,细胞生物学学科逐渐形成并迅速发展。细胞生物学的发展大致可分为以下几个阶段。

一、细胞学说的建立

1665年,英国学者胡克(Robert Hooke)用自制的显微镜观察软木及一些其他的植物组织的薄片,发现了许多蜂窝状的小室(实际上只是观察到纤维质的细胞壁),将其称为cell(小室之意,由拉丁文cellulae演变而来)。真正观察到活细胞的是荷兰学者列文·虎克(A. V. Leeuwenhoek)。他于1667年用设计较好的显微镜,观察了许多动植物的活细胞与原生动物;1674年,他观察并描述了鱼的红细胞核的结构。在同一时期,意大利的Malpighi与英国的Grew注意到了植物细胞中细胞壁与细胞质的区别。

1838年,德国植物学家施莱登(M. J. Schleiden)发表了《植物发生论》,指出细胞是构成植物的基本

单位。1839年,德国动物学家施旺(M. J. Schwann)发表了《关于动植物的结构和生长的一致性的显微研究》论文,指出动植物都是细胞的集合体。施旺和施莱登两人共同提出:一切生物,从单细胞生物到高等动物和植物都是由细胞组成的;细胞是生物形态结构和功能活动的基本单位,这就是著名的“细胞学说”(cell theory)。

1858年,德国医生和病理学家魏尔啸(Virchow)提出“一切细胞只能来自原来的细胞”的论点。此外,他还提出机体的一切病理表现都基于细胞的损伤。他的这些观点是对细胞学说的重要补充。

二、细胞学的经典时期

19世纪中叶到20世纪初期是细胞学的经典时期,这一时期的细胞生物学研究重点是应用固定和染色技术,在光学显微镜下观察细胞的形态结构和细胞的分裂活动。

1861年,舒尔茨(Max Schultze)提出了原生质理论,认为有机体的组织单位是一小团原生质(plasma),这种物质在有机体中是相似的。1880年,Hanstein提出“原生质体”(protoplast)概念,认为细胞是由细胞膜包围的一团原生质,原生质分化为细胞核和细胞质。

1841年,Remak发现鸡胚血细胞的直接分裂。1880年,Flemming发现了动物细胞的间接分裂。1882年,Flemming把直接分裂称为无丝分裂(amitosis),间接分裂称为有丝分裂(mitosis)。van Beneden(1883年)和Strasburger(1886年)分别在动物与植物细胞中发现了减数分裂(meiosis)现象。

保存细胞结构的固定液和染色技术的应用,使人们相继发现了细胞内几种重要细胞器。1883年,van Beneden和Boveri发现了中心体;1894年,Altmann发现了线粒体;1898年,Golgi发现了高尔基复合体。

三、实验细胞学阶段

20世纪初期到20世纪中叶为实验细胞学阶段,这一阶段的细胞学研究不再只着重于形态

结构的观察,而且采用了多种实验手段进行功能的研究;这一阶段,细胞学还与相邻学科相互渗透形成了一些重要的分支学科。

1902年,德国的 Boveri 同美国的 Sutton 同时提出了“染色体遗传理论”,把染色体的行为同孟德尔的遗传因子联系起来。1910年,根据大量的实验材料,摩尔根(Morgan)证明了遗传因子位于染色体上,并提出了基因学说,从而使细胞学与遗传学相结合,奠定了细胞遗传学的基础。

1909年,Harrison 和 Carrel 创立的组织培养技术,为开展细胞生理学研究,直接观察和分析细胞的形态结构和生理活动提供了有利条件。1943年,Claude 用高速离心法从活细胞内把核和各种细胞器,如线粒体、叶绿体分离出来,分别研究它们的生理活性,这对研究细胞器的功能和化学组成,以及酶在细胞器的定位起了很大的作用。

在这期间,人们对生物体的化学成分和基本生化反应开展了大量的研究工作。1924年,福尔根(Feulgen)等首创 Feulgen 染色法,测定了细胞核内的 DNA。1940年,Brachet 用甲基绿-派洛宁染色法测定了细胞中的 RNA。1940年,Casperson 用紫外光显微分光光度法测定 DNA 在细胞中的含量,并认为蛋白质的合成可能与 RNA 有关。

1933年,Ruska 设计制造了第一台电子显微镜,其性能远远超过了光学显微镜。目前,电子显微镜的分辨率由最初的 500nm 改进到现在的零点几纳米,放大倍数达到几十万。从 20 世纪 50 年代开始,人们应用电子显微镜相继观察到了细胞内各种细胞器的微细结构,如内质网(Porter, 1950 年)、高尔基体(Sjostrand, 1950 年)、溶酶体(De Duve, 1952 年)、线粒体(Palade, 1952 年)和质膜(Robertson, 1958 年)等。

四、细胞生物学的形成

自 20 世纪 50 年代开始,人们逐步开展了分子水平探讨细胞的各种生命活动的研究工作。这方面的研究成果对细胞生物学的形成和发展起到了巨大的推动作用。

1944年,O. Avery 等从微生物的转化实验证实 DNA 为遗传物质。1953年,J. Watson 和 F. Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型。同年,M. Meselson 和 F. Stahl 证明 DNA 的复制方式为半保留复制。同年,F. Crick 提出“中心法则”(central dogma)。1955年,Gamov 提出三联体密码假说。1960年,F. Jacob 和 J. Monod 提出蛋白质合成的操纵子学说(operon theory)。1961年,M. Nirenberg 和 Mathaei 根据核糖核酸实验获得的结果确定了每一种氨基酸的“密码”。

随着分子水平对细胞生命活动机制的探讨受到越来越多的重视,并且积累了一定的实验成果,“分子生物学”应运而生。分子生物学是研究生物大分子,特别是核酸和蛋白质的结构与功能的学科。分子生物学渗透到细胞学各领域,使细胞的形态结构和生理功能研究深入到分子水平。这样,20 世纪 60 年代形成了从分子水平、亚细胞水平和细胞整体水平探讨细胞生命活动的学科,即细胞生物学。近年来,细胞生物学在分子水平上的研究取得了广泛而深入的进展,故也有人将细胞生物学称为细胞分子生物学或分子细胞生物学。

第三节 原核细胞和真核细胞

在种类繁多、浩如烟海的细胞世界中,根据进化地位、结构的复杂程度、遗传装置的类型与主要生命活动的方式,将细胞分为原核细胞(prokaryotic cell)和真核细胞(eukaryotic cell)两大类。据此,将生物界分为原核生物和真核生物。原核生物为低等单细胞生物,整个有机体仅为一个原核细胞;真核生物进化程度高,包括单细胞真核生物和多细胞真核生物。

一、原核细胞

顾名思义,原核细胞因没有典型的细胞核而命名,即没有核膜将其遗传物质与细胞质分开。细胞中的低电子密度区为遗传物质所在之处,称为拟核(nucleoid)(图 1-1)。拟核内无 DNA 结合蛋白,仅含裸露的环状 DNA 分子。原核细胞较小,直径为 1 至数微米;细胞质中无线粒体及内质网、高尔基复合体、溶酶体等内膜系统的结构,但含有核糖体。原核细胞的另一特点是细胞膜之外有坚韧的细胞壁。



图 1-1 大肠杆菌
低电子密度区为拟核

二、真核细胞

与原核细胞不同,真核细胞进化程度高,结构复杂,最主要的特征是有核膜包围的细胞核。

核膜将核内遗传物质 DNA 与细胞质完全隔开。细胞质内除核糖体外,还有许多膜性细胞器,如内质网、高尔基体、溶酶体、线粒体或叶绿体及细胞骨架等(图 1-2)。

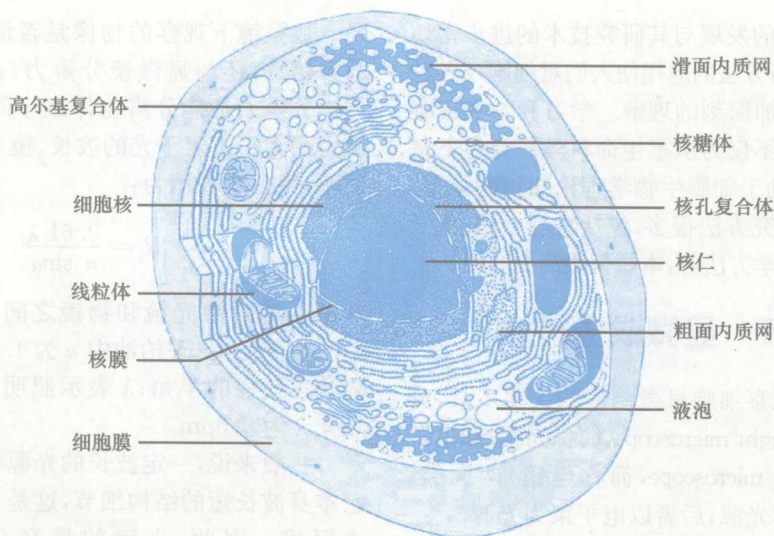


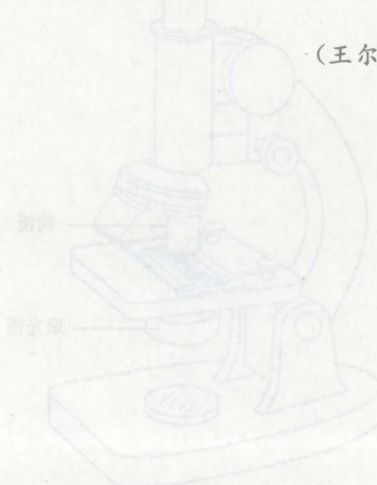
图 1-2 真核细胞模式图

三、原核细胞与真核细胞的比较

归纳起来,真核细胞与原核细胞的主要区别包括:①真核细胞具有由核膜、染色质、核仁、核基质构成的细胞核;原核细胞无核膜、核仁,仅有核物质构成的拟核。②除某些低等类群(如甲藻等)的细胞外,真核生物染色体 DNA 均与组蛋白结合,形成核小体;而在原核细胞核 DNA 无组蛋白与之结合,也不构成染色体。③真核细胞的 DNA 复制在细胞周期的 S 期,原核细胞 DNA 复制常是连续进行的。④真核细胞的基因表达具有时空性,转录先在细胞核中进行,蛋白质合成后在细胞质中进行;原核细胞的转录与蛋白质合成在细胞质中同时进行。⑤真核细胞有内质

网、高尔基体、溶酶体等细胞器构成的内膜系统,原核细胞没有。⑥真核细胞内含微管、微丝和中间纤维等构成的细胞骨架,与细胞运动、细胞分裂、胞质环流及吞噬作用密切相关;原核细胞内无细胞骨架。⑦真核细胞的核糖体为 80S 型,原核细胞核糖体为 70S 型。⑧真核细胞含有双层单位膜包裹而成的线粒体或叶绿体,内含 DNA 及基因表达体系,其内膜上有与氧化磷酸化或光合磷酸化相关的电子传递链;原核细胞功能上与线粒体、叶绿体相应的结构是质膜和质膜内褶,但质膜内褶内无 DNA 及基因表达体系。⑨真核细胞的细胞分裂方式包括有丝分裂和减数分裂,原核细胞则进行无丝分裂。

(王尔孚)



第2章 细胞生物学研究方法

细胞生物学的发展与其研究技术的进步密切相关。新技术、新方法的应用使人们对细胞及各种生命现象有了更加深刻的理解。学习和掌握细胞生物学实验技术不仅为从事生命科学研究打下坚实基础,而且有助于细胞生物学理论知识的学习。细胞生物学的研究方法很多,包括物理方法、化学方法和实验生物学方法等,本章仅做简要介绍。

第一节 显微成像技术

显微镜是观察细胞显微结构的主要工具,分为光学显微镜(light microscope,简称光镜)和电子显微镜(electron microscope,简称电镜)两大类。前者以可见光为光源,后者以电子束为光源。

借助于显微镜,人们能够观察到细胞的细微结构。通常情况下,肉眼的分辨率为0.2mm;光镜的分辨率为0.2 μ m,放大近千倍;电镜的最大分辨率可达0.14nm,放大可达百万倍。

一、光学显微镜

(一) 普通光学显微镜

普通光镜由3部分构成,即:①照明系统,包括光源和聚光器。②光学放大系统,由两组玻璃透镜物镜和目镜组成,是显微镜的主体。③机械装置系统,用于固定材料、照明及光学放大系统的准确调控(图2-1)。

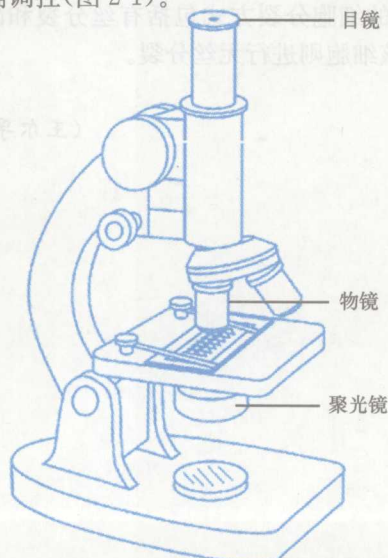


图2-1 普通光镜的基本结构

显微镜下观察的物像是否清晰不仅取决于放大倍数,还与显微镜分辨力(resolution, R)有关。分辨力是能分辨物体最小间隔的能力。分辨力的大小决定于光的波长、镜口率和介质的折射率,用公式表示为:

$$R = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

其中, n 表示聚光镜和物镜之间介质的折射率,空气中 n 为1,香柏油中 n 为1.5; α 表示样品对物镜角孔径的半角; λ 表示照明光源的波长,可见光 λ 为0.5 μ m。

一般来说,一定波长的光源不能用以探查比它本身波长短的结构细节,这是一切显微镜的基本限度。因此,光镜的最高分辨极限(limit resolution)受可见光波长(0.4~0.7 μ m)的限制。细菌和线粒体的长径约0.5 μ m,是光镜下能够观察的最小结构。通常将光镜下所能观察到的细胞结构称为显微结构(microscopic structure),线粒体、中心体、核仁等可以在光镜下观察到,均属显微结构。

(二) 荧光显微镜

波长较短的紫外光照射样品吸收光辐射变为激发态所产生的波长较长的光称荧光。荧光分为自发荧光与次生荧光。自发荧光是指生物体内某些物质受激发光(如紫外线)照射直接发出的荧光。这些物质称为自身荧光物质,如FAD、FMN、NADH、木质素(绿色)、叶绿素(红色)等。次生荧光(染色荧光、二次荧光)是指标本本身不发荧光,经荧光染料处理后,标本中对荧光染料有选择性吸收的部分受激发所发出的荧光。常用的荧光染料包括:荧光素(免疫荧光的经典染料)、丫啶橙、罗丹明、伊红、Texas红、GFP(用于特异蛋白质的定性定位)、PI、PE、DAPI(用于显示细胞核和染色体)等。

荧光显微镜(fluorescence microscope)的基本结构包括:光源装置、滤色系统(包括激发光的滤光片和阻断滤光片)和光学系统。光源采用发光很强高压汞灯,这种高压汞灯的光通过激发滤光片后,可以产生特定波长的激发光(如紫外光或蓝紫光);一定波长的激发光通过所观察标本,可激发细胞内的荧光物质,使之发出一定颜色的

可观察到的荧光;再通过物镜、目镜的放大及目镜中阻断滤光片对激发光过滤,便可在显微镜下观察到细胞中荧光的存在(图 2-2)。

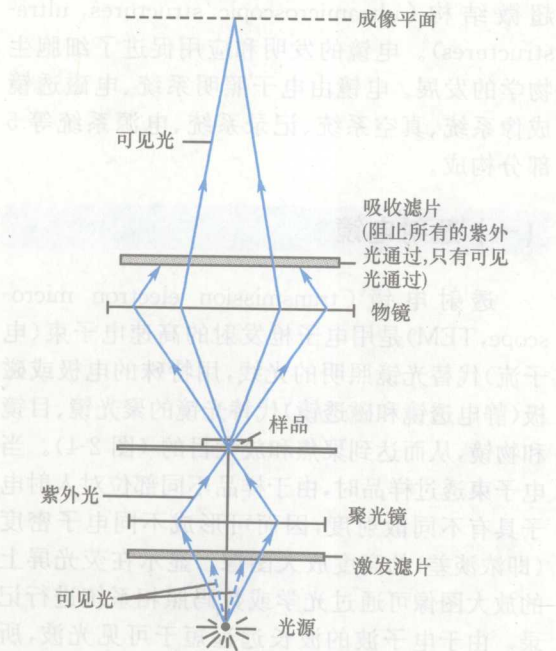


图 2-2 荧光显微镜的光学原理

荧光显微镜用于免疫荧光观察、基因定位、疾病诊断等。近年来,随着分子生物学研究手段的不断发展,荧光显微技术在特定蛋白质分子的细胞内定位方面的应用越来越广泛。

(三) 相差显微镜

相差显微镜(phase contrast microscope)能够将标本对光的衍射差异转变成明、暗差异,从而能够用肉眼区分难以用普通光镜观察的未经染色的样品(如活细胞)。

相差显微镜的基本原理是利用光的衍射和干涉特性,在物镜后面添加一个相板,并在聚光镜上增加环状光阑,由此把透过标本不同区域的光程差(相位差)转变成振幅差(明暗差),从而提高细胞内各种结构之间的明暗对比度,使标本在未经染色的情况下也能清晰地被观察到(图 2-3)。

相差显微镜广泛用于观察活细胞及未经染色的生物标本的形态结构。观察培养细胞常采用倒置相差显微镜,与普通相差显微镜不同,倒置相差显微镜的光源和聚光器装在载物台下方,便于观察在培养瓶中贴壁生长的活细胞,故习惯上称其为倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope)。倒置相差显微镜特别适宜观察体外培养活细胞的结构和活动,如再装配

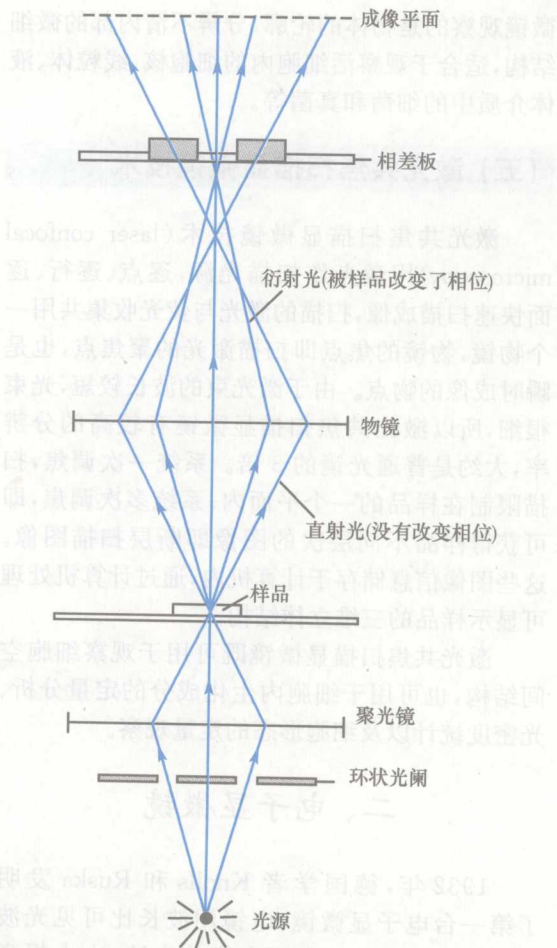


图 2-3 相差显微镜的光学原理

上影像记录设备,则可在镜下拍摄记录体外培养细胞的生长状态或活动状况,如细胞分裂、细胞迁移运动,以及细胞内部结构或组分在细胞各种生命活动中的动态过程。

(四) 暗视野显微镜

日常生活中,人们都有这样的体验,由于光的反射和衍射,可在暗处观察到光线斜射时的尘埃,并且尘埃颗粒似乎体积增大;在光线很强或有衍射存在的情况下则看不出尘埃的颗粒。根据此原理,如果使光线不直接通过样品而是斜射到样品上,则可在暗视野下观察到样品的细微颗粒。

暗视野显微镜(dark field microscope)使用了特殊的聚光器(通光孔中央有一个圆形遮光板)将照明光源的中央部挡住,使照明光线不能进入物镜和目镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,使被检物体在黑暗的背景下呈现明亮的像。这种特殊的照明方式,使标本反差增大,分辨率提高,可观察到直径 4~200nm 的颗粒,分辨率比普通显微镜提高 50 倍。暗视野显

显微镜观察的是物体的轮廓,分辨不清内部的微细结构,适合于观察活细胞内的细胞核、线粒体、液体介质中的细菌和真菌等。

(五) 激光共焦扫描显微镜技术

激光共焦扫描显微镜技术(laser confocal microscopy)用激光作扫描光源,逐点、逐行、逐面快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短,光束很细,所以激光共焦扫描显微镜有较高的分辨率,大约是普通光镜的3倍。系统一次调焦,扫描限制在样品的一个平面内;系统多次调焦,即可获得样品不同层次的图像即断层扫描图像。这些图像信息储存于计算机内,通过计算机处理可显示样品的三维立体结构。

激光共焦扫描显微镜既可用于观察细胞空间结构,也可用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的定量观察。

二、电子显微镜

1932年,德国学者 Knolls 和 Ruska 发明了第一台电子显微镜,电镜用波长比可见光波长短 100 000 倍的电子束代替光波,大大提高了显微镜的分辨率。应用电镜可观察到细胞

膜、线粒体、细胞核、高尔基体、中心粒等的详细结构。这些只在电镜下才能观察到的结构称为亚显微结构(submicroscopic structures)或超微结构(ultramicroscopic structures, ultra-structures)。电镜的发明和应用促进了细胞生物学的发展。电镜由电子照明系统、电磁透镜成像系统、真空系统、记录系统、电源系统等5部分构成。

(一) 透射电镜

透射电镜(transmission electron microscope, TEM)是用电子枪发射的高速电子束(电子流)代替光镜照明的光线,用特殊的电极或磁极(静电透镜和磁透镜)代替光镜的聚光镜、目镜和物镜,从而达到聚焦和放大目的(图2-4)。当电子束透过样品时,由于样品不同部位对入射电子具有不同散射度,因而可形成不同电子密度(即浓淡差)的高度放大图像。显示在荧光屏上的放大图像可通过光学或数码照相系统进行记录。由于电子波的波长远短于可见光波,所以,电镜的分辨率远远高于光镜的分辨率,电镜的放大倍数可达近百万。透射电镜的电子穿透能力较弱,被观察的样品需做成超薄切片,厚度要求为40~50nm。透射电镜主要用于观察和研究细胞内部超微结构。

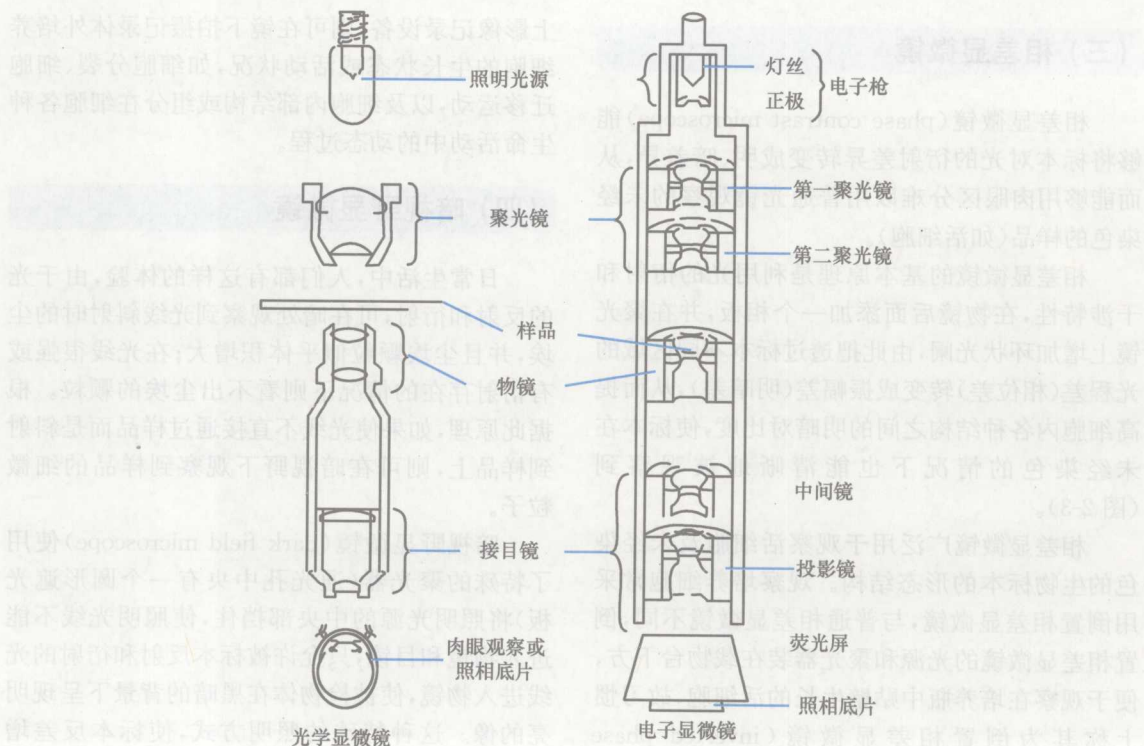


图2-4 光镜与电镜的比较

(二) 扫描电子显微镜

扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 20 世纪 60 年代问世, 用来观察标本表面结构。与透射电镜的成像方式完全不同, 扫描电镜用电视的方式成像。扫描电镜主要由电子光学系统和显示单元组成, 光学系统结构见图 2-5。

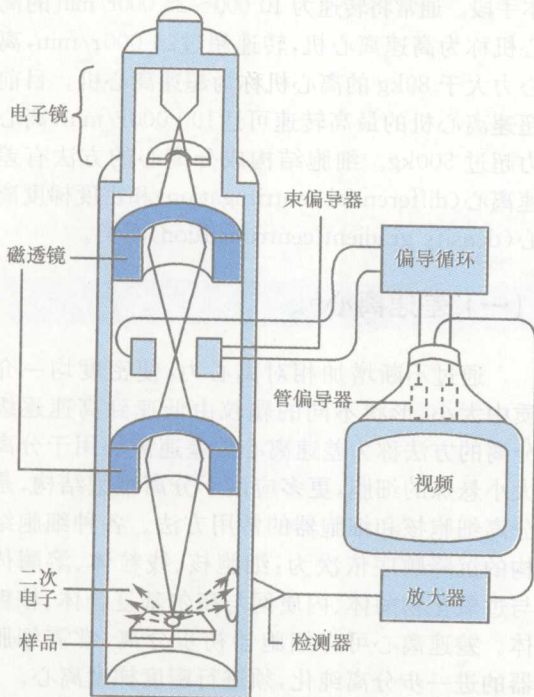


图 2-5 扫描电镜的光学系统

扫描电镜原理: 用一束极细的电子束扫描样品, 激发样品表面释放出次级电子, 次级电子的多少与样品表面结构有关; 次级电子由探测器收集并转变成光信号, 经光电倍增管和放大器转变成电压信号并控制荧光屏上电子束的强度; 电子束强度反映在荧光屏上即为相应部位亮或暗的差异。为使标本表面能发射出次级电子, 标本在固定、脱水后, 要喷涂上一层重金属膜, 重金属在电子束的轰击下可发出次级电子信号。

扫描电镜的分辨率不及透射电镜, 一般在 3nm 左右, 但所形成图像的立体感很强, 而且样品制备简单, 不需做超薄切片。一般样品只需经固定、脱水、干燥后, 在其表面喷镀一层金属膜后 (镀膜可增加二次电子, 以产生鲜明的影像) 即可进行观察。扫描电镜广泛应用于观察标本表面精细的三维形态结构。此外, 在电子束轰击下, 样品中的不同原子还会发出具有特定波长的 X 线。若在扫描电镜的基础上, 增加一个能谱仪, 收集发射的 X 线信号, 可对样品各个微区的元素成分进行分析。电镜与光镜的基本区别见表 2-1。

表 2-1 电镜与光镜的基本区别

	分辨率	光源	透镜	真空
光镜	200(油镜)~300nm	可见光	玻璃透镜	不需真空
电镜	0.1nm	电子束	电磁透镜	真空

(三) 电镜的样品制备

1. 超薄切片技术 制作超薄切片, 通常先用锇酸和戊二醛双重固定样品, 以保持所观察样品的真实性; 然后用丙酮逐级脱水, 环氧树脂包埋, 以保持所观察样品有良好的支撑; 再用热膨胀或螺旋推进的方式进行切片, 以控制切片的厚度; 最后用重金属 (铀、铅) 盐染色, 制成的标本形成明暗反差。

2. 负染色技术 所谓负染色技术是染背景而不是染样品的方法。主要过程是, 用重金属盐 (如磷钨酸钠) 对铺展在载网上的样品染色, 样品经干燥后, 整个载网都铺上一层重金属盐, 有凸出颗粒的地方没有染料沉积, 在图像中背景是黑暗的; 而未被包埋的样品颗粒则透明光亮, 从而衬托出样品的精细结构, 出现负染效果。

负染色技术使分辨率提高 1.5nm 左右。某些微小生物标本、细胞内生物大分子组成的结构, 如病毒、线粒体基粒、核糖体和蛋白质组成的纤维等, 可通过负染色电镜技术观察其精细结构, 还可从不同角度观察其三维结构 (图 2-6)。

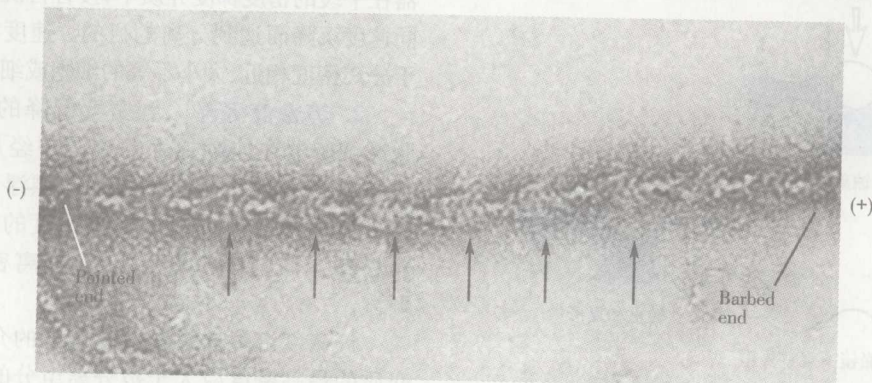


图 2-6 肌动蛋白纤维的负染电镜照片

3. 冷冻断裂复型 (freeze-fracture replication) 技术 是先将生物样品在液氮中 (-196°C) 快速冷冻, 防止形成冰晶; 然后将冷冻的样品迅速转移到冷冻装置中, 并抽成真空; 在真空条件下, 用冰刀横切冷冻样品, 使样品的内层被分开露出两个表面。如用冰刀可将细胞膜切成两个面, 胞质侧的一面称为 P 面 (protoplasmic face), 另一面称为 E 面 (exoplasmic face), 在切开的膜面上可清楚地观察到镶嵌蛋白。

4. 冷冻蚀刻技术 (freeze-etching) 是在冷冻断裂技术基础上发展起来的, 更复杂的复型技术。将冷冻断裂的细胞膜样品的温度稍微升高, 让样品中的冰在真空中升华, 则细胞膜表面显示出浮雕样结构, 对浮雕表面进行铂-碳复型, 并在腐蚀性溶液中除去生物材料, 复型经重蒸水多次清洗后, 捞在铜网上即可进行电镜观察 (图 2-7)。

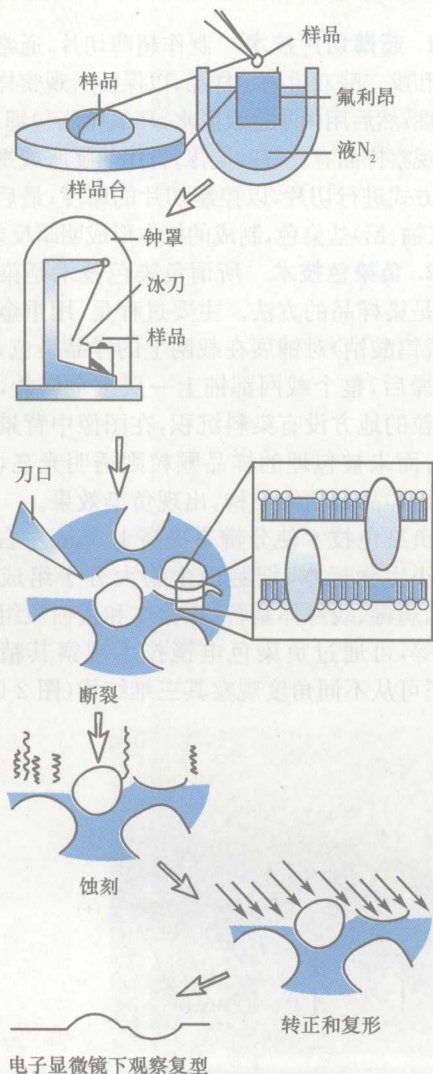


图 2-7 冰冻断裂与冰冻蚀刻技术

第二节 细胞组分的分析方法

一、离心技术

离心是研究细胞器, 如细胞核、线粒体、高尔基复合体、溶酶体和过氧化物酶体及各种大分子的基本手段。通常将转速为 $10\,000\sim 25\,000\text{r/min}$ 的离心机称为高速离心机, 转速超过 $25\,000\text{r/min}$, 离心力大于 89kg 的离心机称为超速离心机。目前超速离心机的最高转速可达 $100\,000\text{r/min}$, 离心力超过 500kg 。细胞结构成分离心的方法有差速离心 (differential centrifugation) 和密度梯度离心 (density gradient centrifugation) 两类。

(一) 差速离心

通过不断增加相对离心力, 使密度均一介质中大小、形状不同的颗粒由低速到高速逐级分离的方法称为差速离心。差速离心用于分离大小悬殊的细胞, 更多应用于分离细胞结构, 是分离细胞核和细胞器的常用方法。各种细胞结构的沉降顺序依次为: 细胞核、线粒体、溶酶体与过氧化物酶体、内质网与高尔基复合体、核糖体。差速离心可将细胞器初步分离, 常需细胞器的进一步分离纯化, 须进行密度梯度离心。

(二) 密度梯度离心

密度梯度离心是用一定的介质 (氯化铯、蔗糖和多聚蔗糖) 在离心管内形成连续或不连续的密度梯度, 将细胞悬液或匀浆置于介质的顶部, 通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离。密度梯度离心分为速度沉降和等密度沉降两种方法。

1. 速度沉降 速度沉降方法采用的介质最大密度, 应小于被分离生物颗粒的最小密度, 细胞器在平缓的密度梯度介质中, 按各自沉降系数以不同速度沉降而达到分离的目的。速度沉降主要用于分离密度相近、大小不等的细胞或细胞器。

2. 等密度沉降 等密度沉降的原理是, 细胞或细胞器在连续梯度的介质中经足够大离心力和足够长时间的离心, 沉降或漂浮到与自身密度相等的介质处, 从而将不同密度的细胞或细胞器分离。等密度沉降适用于分离密度不等的颗粒。

等密度沉降通常在较高密度的介质中进行, 介质的最高密度应大于被分离组分的最大密度, 而且介质的梯度变化不能太平缓; 再者, 离心力

场通常比速率沉降法大 10~100 倍,故往往需要高速或超速离心,离心时间也较长。离心力大、离心时间长都对细胞不利,大细胞比小细胞更易受高离心力的损伤,而且停留在等密度介质中的细胞比处在移动中的细胞受到更大的损伤。因此,等密度沉降方法适于分离细胞器,不适于分离和纯化细胞。

二、免疫细胞化学技术

免疫细胞化学(immunocyto chemistry)技术是根据免疫学原理,利用抗体同特定抗原专一结合,对抗原进行定位测定的技术。结合上标记物的抗体与组织中的抗原反应,可在光镜或电镜下显示出该抗原所在组织中的位置。

根据标记物的不同,免疫细胞化学技术分为免疫荧光法和酶标免疫法等。免疫荧光法常用的荧光素有异硫氰酸荧光素、罗丹明等;酶标免疫法常用的酶是辣根过氧化物酶,酶与底物发生反应后形成不透明的沉积物,从而显示出抗原存在的部位。

根据抗体与抗原结合方式,免疫细胞化学技术分为直接法和间接法两种。直接法是将带有标记的抗体与抗原反应,直接显示出细胞中抗原存在的部位;间接法则是在抗体抗原初级反应的基础上,再用带标记的次级抗体同初级抗体反应,从而使初级反应放大,显示增强。

三、放射自显影术

放射自显影术(radioautography; autoradiography)的原理是,将放射性同位素(如 ^{14}C 和 ^3H)标记的化合物导入生物体内;经过一段时间后,取材制成切片或涂片,涂上卤化银乳胶;经一定时间的放射性曝光,带有放射性物质的组织结构使乳胶感光;经显影、定影处理,即可观察到相应的组织结构。

实验室常用 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷标记(^3H -TDR)显示 DNA,用 ^3H 尿嘧啶核苷(^3H -UDR)标记显示 RNA;用 ^3H 氨基酸标记显示蛋白质,用 ^3H 甘露糖、 ^3H 岩藻糖标记显示多糖。放射自显影术用于研究标记化合物在机体、组织和细胞中的分布、定位、排出以及合成、更新、作用机制、作用部位等。

四、流式细胞术

流式细胞术是用流式细胞仪(flow cytome-

ter,FCM)对细胞进行快速定量分析与分选的技术。

流式细胞仪主要组成部分包括:①激光光源,可发出合适波长的光。②流室(flow chamber),生物颗粒与鞘液(sheath fluid)相混的场所。包裹细胞的鞘液经喷嘴(tip)流出,当液滴向下流至适当位置,受激光照射可发射出不同的光信号。③信号接受器(detector),由光学透镜装置和光电倍增管组成,接收放大各种光信号,并把它们转变成电脉冲信号。④信号分析部件,为微型电子计算机装置,对信号做出分析。

流式细胞仪的工作原理:根据免疫细胞化学原理,用荧光特异性抗体与相应抗原结合的方式,标定欲分离的细胞;包在鞘液中的细胞通过高频振荡控制的喷嘴,形成包含单个细胞的液滴;在激光束照射下,细胞发出散射光和荧光;经探测器将检测的散射光和荧光转换为电信号,送入计算机处理,输出统计结果。由此可分选出高纯度的细胞亚群,分离纯度可达 99%(图 2-8)。

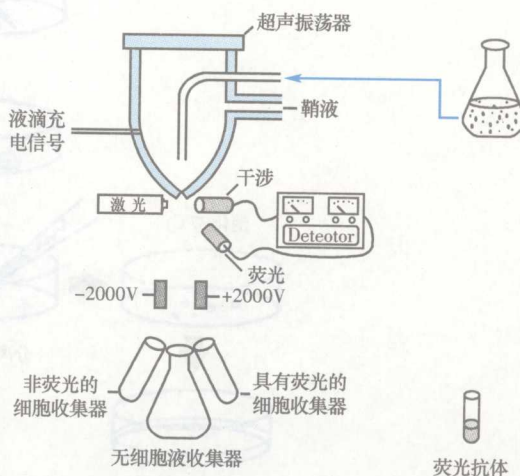


图 2-8 流式细胞仪分选细胞示意图

第三节 细胞培养与细胞工程技术

一、细胞培养

高等生物是由多细胞构成的整体,要想研究单个细胞或某一群细胞在体内(*in vivo*)的功能活动是十分困难的。但是如果将活细胞置于体外(*in vitro*)培养,并进行观察和研究,则方便得多。离体的活细胞要在一定的生理条件下才能存活并进行生理活动,高等动物细胞要求的生存条件更高。因此,活细胞离体培养必须具备最佳生存条件。

(一) 细胞培养过程

从机体取出细胞,模拟体内的生理环境,使之生存和生长的技术称为细胞培养(cell culture)。体外细胞培养的主要步骤是:①准备:包括器皿的清洗、干燥与消毒,培养基与相关试剂的配制、分装及灭菌,无菌室或超净台的清洁与消毒,培养箱及相关仪器的检查与调试。②取材:在无菌环境下,从机体取出某种组织,经过消化分散细胞、分离等处理的过程称为取材。细胞株的扩大培养无取材环节。③培养:将取得的组织细胞接种入培养瓶或培养板的过程称为培养。如进行组织块培养,则直接将组织块接入培养器皿底部,几个小时后组织块可贴牢在底部,再加入培养基。如进行分散细胞的培养,一般应在接种于培养器皿之前进行细胞计数,按要求以一定的量(以每毫升细胞数表示)接种于培养器皿并直接加入培养基。细胞接种于培养器皿后,立即

放入培养箱中,使细胞尽早进入生长状态。

(二) 原代培养和传代培养

根据培养细胞的来源,细胞培养分为原代培养(primary culture)和传代培养(subculture)。

原代培养是从生物供体分离取得组织或细胞后,在体外进行的首次培养,是建立各种细胞系的第一步(图 2-9)。培养的细胞通过增殖达到一定数量后,为避免因生存空间不足或密度过大,造成细胞营养障碍,进而影响其生长,需要及时对细胞进行分离、稀释和移瓶培养。将培养的细胞从原培养瓶中分离,经培养基稀释后再接种于新的培养基中培养的过程称为传代培养。培养细胞的“一代”不表示细胞分裂一次,而是指培养细胞从接种到下一次再次转移培养的时间。在一次传代培养中,细胞能倍增 3~6 次。

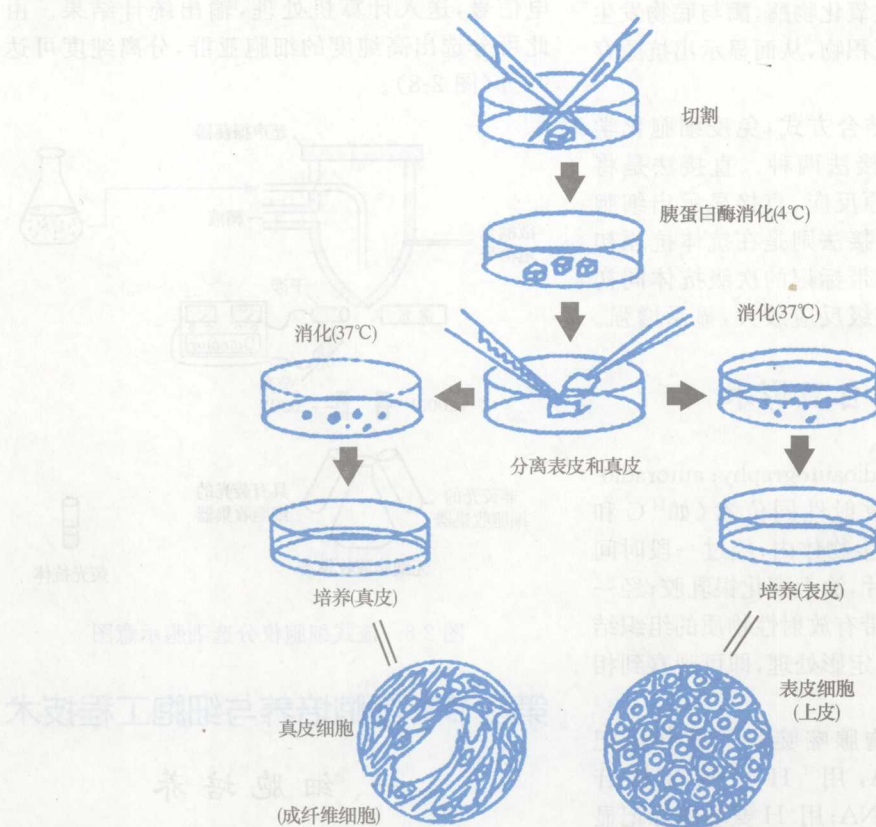


图 2-9 细胞原代培养

原代培养的动物和人组织细胞首次传代获得的细胞群体称为细胞系(cell line)。通常将在体外生存期有限、传代不超过 50 次的细胞系称为有限细胞系(finite cell line);已获无限繁殖能力,能持续生存的细胞系称为连续细胞系或无限细胞系(infinite cell line)。无限细胞系大多已发

生染色体改变,常见于来自肿瘤组织的细胞系,因此,无限细胞系本质上是已发生转化的细胞系。经过严格的生物学鉴定,来源于单细胞分离培养或筛选后增殖的细胞群称为细胞株(cell strain),细胞株是一个具有相同性质或特征的培养细胞群体。