

58.6055

1107

细胞营养 与组织培养

上海市肿瘤研究所细胞生理组编著

上海科学技术出版社

細胞营养与組織培养

上海市肿瘤研究所細胞生理組 編著

上海科学技术出版社

內 容 簡 介

組織培养是一门新兴的科学技术,目前已应用于实验生物学和医学等领域中,特别在细胞学、细胞生理学、病理学、肿瘤学、病毒学、组织胚胎学及实验形态学等方面应用得比较广泛。本书参考了国内外文献资料,将有关细胞营养与组织培养的问题作了较系统的阐述。全书共分十章,对组织培养的设备、器材、营养物质、培养方法、生长测量、影响生长的因素和形态学的观察等方面不但作了技术性的介绍,同时也结合了基本理论的探讨,尤其对细胞的营养和培养的方法这两个比较重要的问题作了重点的介绍。本书可供上述各学科实验研究人员及有关教学人员参考。

細胞营养与組織培养

上海市肿瘤研究所细胞生理组 編著

上海科学技术出版社出版 (上海瑞金二路 450 号)

上海市书刊出版业营业许可证出 093 号

上海洪兴印刷厂印刷 新华书店上海发行所发行

开本 850×1156 1/32 印张 13 24/32 插页 1 排版字数 363,000

1966 年 7 月第 1 版 1966 年 7 月第 1 次印刷

印数 1—3,000

統一书号 14119·1253 定价(科七) 2.30 元

編 者 的 話

組織培养是在离体的情况下,用活体細胞作为对象,进行研究工作的一种有力的工具。几十年来,組織培养的发展是十分迅速的。这一方面是由于近代自然科学的发展,为組織培养的发展奠定了理論与物质的基础。另一方面也由于客观形势的要求,特别是近年来病毒学的发展对組織培养的发展提出了迫切的要求。

我国的組織培养工作解放后有了迅速的发展,从事于組織培养的专业队伍也在逐渐地壮大。当然,組織培养在我国还是一项新兴的工作,目前的主要問題是如何普及与提高相結合,进一步改进方法,提高理論技术,在仪器、設備、药品等方面自力更生,以滿足实际工作的需要。正因为这是一項新兴的工作,在实际工作中碰到的問題也特別多,深感在这方面的知識的不足。但目前有关組織培养的专业书籍却很缺少,这也就是决定写这本书的动机。由于編者的学識淺薄,写作方面也缺乏經驗,希望讀者們能提供宝贵的意見,以便在再版时能作适当的修改与补充。

上海市肿瘤研究所細胞生理組

一九六四年五月

目 录

第一章 緒言	1
第一节 組織培养发展簡史	2
第二节 細胞株的种类	7
第二章 設备 及器械	18
第一节 实驗室	18
一、准备室	18
二、培养室	21
第二节 大型器械	23
第三节 小型器械	27
第四节 玻璃器皿	29
第五节 器械的清洗与消毒	36
一、玻璃器皿的清洗与消毒	36
二、其它器材的清洗与消毒	39
第三章 細胞的营养	40
第一节 营养物质进入細胞的机制	41
第二节 水	46
一、水的性质与种类	46
二、离子交换树脂处理的水	48
第三节 生理盐水	49
一、生理盐水的性质和种类	49
二、生理盐水中的几种主要成分	50
三、几种保护剂	64
四、配制生理盐水时应注意的几个問題	66
第四节 血浆	74
一、血浆的制备	74
二、血浆的成分	77
三、代替血浆的基质	80

四、防止血浆液化的方法	86
第五节 血清	87
一、对培养物的作用	87
二、影响血清作用的因素	97
三、常用的几种血清	112
四、血清代替物的研究	120
第六节 胚胎浸出液	132
一、胚胎浸出液的成分	132
二、胚胎浸出液对细胞的作用	141
三、常用的几种胚胎浸出液	145
第七节 组织浸出液	150
第八节 “生物原刺激素”	153
第九节 创伤激素	154
第十节 人工培养液	155
一、人工培养液的种类	155
二、人工培养液中的主要成分	176
三、人工培养液的配制方法	220
第四章 抗菌素的应用	232
第一节 青霉素	232
第二节 链霉素	235
第三节 抗霉菌剂	236
第五章 培养方法	240
第一节 盖片悬滴培养法	241
一、单盖片法	241
二、双盖片法	243
三、灌注小室法	244
第二节 卡氏瓶培养法	253
第三节 旋转管培养法	257
一、旋转管法	257
二、连体的细胞培养法	258
三、海绵基质培养法	262
第四节 细胞悬液培养法	263

一、单层細胞培养	263
二、悬浮細胞培养	269
第五节 器官培养法	275
一、表玻璃培养法	276
二、擦鏡紙培养法	277
三、醋酸纖維布培养法	278
四、II 型培养小室	279
五、滤紙层析式器官培养器	280
第六节 分級培养法	281
第七节 单細胞分离培养法	283
一、毛細管法	283
二、飼养层法	286
三、玻皿篩选法	288
四、电烙篩选法	288
五、玻璃小珠附着法	289
第八节 細胞的冰冻保藏	290
第六章 消化液的应用	298
第一节 胰蛋白酶	298
第二节 弹性蛋白酶	303
第三节 Pronase	305
第四节 乙烯二胺四乙酸	305
第七章 影响細胞生长的因素	308
第一节 温度	308
第二节 酸碱度	312
第三节 氧张力	314
第四节 輻射綫	317
一、可见光	317
二、紫外綫	320
三、X綫	322
四、 β 綫	324
五、 γ 綫	325
第五节 超声波	327

第六节 橡皮	329
第七节 离心速度	331
第八节 細胞接种浓度	332
第九节 容器轉动速度	335
第八章 生长的測量	336
第一节 組織块生长面积的測量	336
第二节 分裂細胞的計数	338
第三节 培养物干重或湿重的秤重	340
第四节 細胞去氧核糖核酸的測量	341
第五节 蛋白质的測定	341
第六节 培养液內化学变化的測定	344
一、葡萄糖含量的測定	344
二、乳酸含量的測定	345
第七节 生长曲綫与平均核分裂時間的測定	345
第九章 形态学的观察法	348
第一节 离体活体染色	348
一、中性紅	349
二、藻紅 B	349
三、苯胺黑	349
四、番紅花紅	350
第二节 标本的固定及染色	350
一、固定	350
二、染色	354
第三节 組織的包埋及切片	364
一、石蜡包埋法	364
二、火棉胶包埋法	365
三、石蜡切片及附貼法	366
第四节 离体細胞的生长行为	366
一、游走細胞的生长	367
二、成纖維样細胞的生长	367
三、上皮样細胞的生长	370
四、其他細胞的生长	371

第五节 染色体的检查	372
一、染色体研究的价值	372
二、染色体的检查方法	381
第十章 組織培养的应用价值	385
第一节 在細胞学方面的研究	385
第二节 在肿瘤学方面的研究	386
一、肿瘤細胞生物学特性的研究	386
二、肿瘤的病因和发病机制的研究	387
三、异种移植的研究	389
第三节 在病毒学方面的研究	392
一、組織培养用于病毒学研究的优点	392
二、病毒組織培养的方法	394
三、判別病毒生长繁殖的方法	396
四、病毒組織培养中应该注意的問題	398
第四节 在免疫学方面的研究	399
第五节 在药理学方面的研究	401
第六节 在細菌学方面的研究	411
第七节 在組織发生学方面的研究	412
参考文献	415

第一章 緒 言

組織培养是一门新兴的科学技术,最早由 Roux (1885)^[42] 命名。这是一个比較通用的名詞,实际上它包括細胞培养、組織培养和器官培养在內,目前用得比較多的是細胞和組織培养。

运用組織培养的方法,可以在比較简单的、容易观察的条件下研究細胞、組織或器官。

組織培养技术的发展,有賴于近代自然科学的发展。正是由于物理、化学、生理、生化、药理等学科的迅速发展,組織培养技术也有了迅速的发展。

組織培养技术可应用于生物学、医学、药学等許多方面。它广泛地应用于医学的各个部门,目前应用得最多的是病毒学的研究。病毒是一种特殊的生物,必須在有生活能力的細胞中才能生存,用組織培养来研究病毒比用鸡胚或易感动物更为优越。組織培养在病毒学方面除了用作病原分离和鉴定外,还可进行病毒抗原的制作及疫苗的生产,以及一系列理論机制的研究。不久以前,原来认为难以培养的病毒,如帶状疱疹、水痘、伤风、流行性角膜結膜炎、传染性肝炎等病毒,都已初步培养成功。利用組織培养还不断地发现了新的病毒,如腺病毒、ECHO 病毒等。

組織培养也可用于立克次体、螺旋体以及某些細菌的研究,例如培养人皮肤或其它組織来研究麻风杆菌的致病过程,用鸡胚組織培养鸡瘟并研究其紅細胞外型的问题。

在肿瘤的研究方面,組織培养的技术也应用得十分广泛,例如利用組織培养以研究肿瘤的病因与正常細胞的癌变过程,研究肿瘤細胞新陈代謝的特殊规律以及各种药物对肿瘤細胞的作用等。在临床上,也曾有人利用組織培养来区别良性与恶性肿瘤,以帮助病理形态学的診斷。

組織培养技术也可用于胚胎組織的組織发生与分化的研究,以及正常細胞的形态学、生理学及生物化学的研究。

此外,我們还可利用組織培养的細胞来研究宇宙輻射对生活細胞的影响和細胞遗传学的研究,研究体細胞杂交和各种細胞的染色体組型。利用組織培养还可进行体外受精和体外培养的研究,进一步开展人卵及其它哺乳类的单性发育的研究等。

有不少人认为組織培养方法是现代实验生物学最有前途的方法,但也有不少人反对这种說法,认为从机体取出的事实本身就使得細胞和組織处于不正常的条件下,如果认为在体外所获得的结果与在体内的情况是完全一致的,那是很危险的。但无论如何,尽管組織培养方法还存在着一定的缺陷,它仍然还是有价值的和重要的研究方法,因为它可以在技术上比較便利的、原則上简单且明确的条件下闡明一系列基本的生物学规律,只要經過慎重考虑和修改后,便可运用到生活在原有的一般环境中——机体内的正常組織和細胞上。

从組織培养本身的发展历史看来,培养的材料方法和营养物质的研究是两个比較主要的方面。近年来,由于各种人工培养液的应用,对組織培养中細胞营养代謝問題的研究有了很大的进展。实际上,营养物质在組織培养中的确占有特別重要的地位,它对組織培养的能否成功起着很重要的作用。由于組織培养的理论和技术的发展,我們不仅可以提出在机体外培养器官、組織和細胞的任务,而且可以希望培养細胞器和非細胞生命形态——纖維状結構和原始无定形的生活物质,这种物质繼續发展时应生成更高級組織的結構。我們可以相信,随着組織培养的发展,不久的将来,人类在病毒学、細菌学、免疫学、肿瘤学、药理学、寄生虫学、胚胎发生学等方面,必然将会取得更大的成就。

第一节 組織培养发展簡史

組織培养的发展史大致可以分为两个初步阶段与三个实验阶段(表1)。第一个阶段是从公元前360年至公元1839年。在这个

阶段中，只能說是初步奠定了細胞学說的理論。最初，Aristotle（公元前360年）与 Theophrastus^[575] 认为植物与动物是由相同性质的成分所組成：例如植物汁与血液，纖維与肉，脉絡与神經，木质与骨骼。当时由于沒有放大鏡作精細的研究，因此他們不能对这些成分的结构作出比較肯定的描写。二千年以后，由于发明了显微鏡，根据显微鏡观察的結果，Hooke(1667)^[575] 指出当初 Theophrastus 所称的“纖維”与 Aristotle 所称的“骨”是由較小的相同性质的单位所組成，这种单位称之为“細胞”。1828年Brown^[575] 发现了細胞的“核”。接着 Dujardin (1835)^[575] 也注意到了动植物細胞的原生质。直到1837年，Schleiden 和 Schwann^[575] 把这些发现归納起来組成了一个比較完整的細胞学說。

第二个阶段是从1839至1902年，同样是个相当不活跃的阶段。Скворцов^[58] 在1855年8月最先用悬滴法进行了血細胞的培养。培养液是用少量脊椎动物的血液加1%蛋白胨溶液和小牛肉汁的混合液。在培养过程中，他发现血細胞不但在机体外保持着活动性，而且保持着变形和形成細胞突的能力。1885年Скворцов 創造了机体外培养細胞的原理，但未能引起广大学者的注意。1878年Bernard^[575] 指出了机体內在环境在維持組織生活能力上的重要性。1885年Roux^[575] 从鸡胚內解剖出髓板，把它培养在温暖的盐水中，并研究与髓管封閉有关的因素。1887年Arnold^[575] 用一种巧妙的方法培养白細胞，他将赤杨木髓的薄片浸于蛙的体液中，然后种植到蛙的腹腔或皮下，很快地可看到有白細胞的侵入。于不同时期，将髓片取出置于盐水內，可观察到白細胞自髓片上向盐水內移动，并能較长时期保持它的生活力。Ljunggren(1898) 及 Jolly (1903)^[575] 也曾分別将皮肤及白細胞培养于腹水及血清中，可保持一周多到一月不等的生活力。1902年Leo Loeb^[575] 将游移到血凝块或凝胶块中的白細胞种植到兔耳或腹膜內。所有这些实验，都只是将由正常机体內取得有生活能力的組織保存下来，說明离体的組織在适当的环境下仍能生存，而并不能获得新細胞的增生。

第三个阶段是从1902至1923年。Haberlandt(1902)^[575]开始进行了关于单细胞方面的工作,由于采取的是植物组织,在工作中又遇到了很多的困难,最后只得半途而废。直到1907年, Harrison^[575]把蝌蚪的髓管放在一滴淋巴液内,第一次培养出神经纤维(图1)。1910年,Авроров 及 Тимофеевский^[58]成功地实现了机体外血细胞的培养。从那时起,Тимофеевский^[58]利用组织培养方法解决了许多病理学问题,特别是肿瘤细胞的生物学问题。1910年 Burrows^[575]用血浆代替淋巴液培养鸡的细胞,接着与 Carrel(1912, 1913)^[575]共同采用胚汁作为刺激生长的营养物质,并用这种方法培养了各种动物组织。这种方法后来经过改进

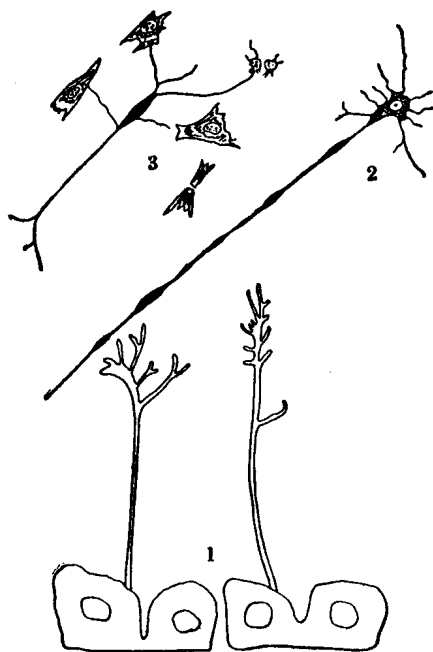


图1 神经细胞生长的各种型式

1. 蛙的神经母细胞生长在淋巴液中 (Harrison, 1908);
2. 鸡胚肠的交感神经培养在生理盐水中 (W. H. Lewis 和 M. R. Lewis, 1912);
3. 人脑细胞培养在血浆凝块上 (Costero 和 Pomerat, 1951)。

即被广泛地应用，一直沿用了几十年。Harrison、Burrows 与 Carrel 等所創用的血浆、胚汁营养液培养动物細胞的方法是相当简单并容易复制的，但血浆与胚汁是成分不明的有机复合物，他們并未說明这些細胞与組織的、真正的、营养的需要。为了搞清楚这个問題，Ebeling (1921)^[575]、Carrel 和 Baker(1926)^[575]、Fischer 和 Demuth(1928)^[575]、Drew(1923)^[575] 等曾对其成分的分析作了一些工作。

大約在 Carrel (1912) 开始其工作的同时，Lewis W. H. 和 Lewis M. R. ^[575] 同样在 Harrison 的影响下开始研究个别营养成分的作用，他們研究了盐类、碳水化合物、渗透压与类似的因素对短期生长的动物細胞的作用。虽然这些营养物质的研究并未对延长細胞的生活与增加細胞的增殖有十分明显的作用，但他們的努力为以后的工作打下了很好的基础。1913 年 Steinhardt^[9] 采用血浆悬滴培养法培养痘苗病毒，为組織培养应用于病毒学上奠定了基础。在 1910~1920 年，組織培养大部分还是研究哪一些不同动物的組織可以在体外生长的時間比較长一些，大約从 1920 年以后才开始了其它方面的一些研究。

1923 年 Carrel^[575] 設計了一种卡氏瓶，第四阶段也就从这时开始。卡氏瓶的应用代替了悬滴法的培养，大大地减少了常规的工作量，并允許比較定量地研究許多有关的问题。这种技术上的改进，使有可能进一步研究营养上的問題。Carrel, Ebeling 与 Baker 等用简单的方法，例如过滤、透析、沉淀与不同的浸出法来分析組織浸出液，在 1923 与 1939 年間，他們在这方面进行了許多重要的工作。当 1939 年 Carrel 退休以后，有許多学者分散在各地(例如 Fischer 在丹麦；Barski 在巴黎；Harris 在加利福尼亚等地)，分別繼續了这部分的工作。在卡氏瓶发明以后，Fell(1928, 1931)^[575] 設計了一种表玻璃的器官培养方法，将整个胚胎性器官，例如骨、牙、眼与腺体培养在較大量的营养物质中，并研究了这些器官的新陈代谢。接着 Gaillard (1948) ^[575]，Martinovitch (1938, 1950) ^[575] 与 Carpenter (1942)^[575] 等都在这方面做了許

多工作。Fell 等的工作为研究动物器官在体外的发育与功能作出了贡献。

第五个阶段的工作从 1934 年开始, 这时 Gey 与 Lewis 首先采用了旋轉管的方法代替卡氏瓶, 这种方法不但經濟, 而且方便, 可以达到許多实验的目的。Gey 不但繼續研究方法上的改进, 并培养了許多細胞株, 以观察它們体外生长的情况。有許多学者还采用这一方法做出了許多实验的結果。1943 年 White 把培养植物細胞的兴趣轉向动物組織营养的研究, 并設計出了一种能长期維持动物組織生存的人工培养液 (1946, 1949)^[572, 574]。大約在同一时期, Fischer(1941)^[194] 采用了与当初 Carrel、Baker 与 Ebeling 等不同的、比較近代的方法分析了血清、血浆与胚胎浸出液的成分, 并設計出了人工培养液 V-614、V-605 等 (1948)^[196]。1950 年 Morgan、Morton 与 Parker 等也在人工培养液方面进行了大量的研究, 并設計出了人工培养液 199^[383]。

近年来, Earle 在各种基本技术的改进方面作出了不少的贡献, 例如用有孔透明紙代替血浆底质, 改进了卡氏瓶的形式, 使其更适合于观察, 并可作定量生长的研究, 他还設計出比过去滿意的营养物质的消毒方法等。Murray 与 Kopech^[390] 編写了組織培养的文集, 收集了 1951 年以前世界上有关組織培养方面的主要研究。自从 1946 年以后, 組織培养的研究工作有了更进一步的发展, 例如細胞的亚显微結構的形态学研究, 利用显微操纵器作亚細胞結構移植的研究, 电视显微操作技术的发展, 細胞自身放射显影的应用等。此外, 为了满足实际工作的需要, 各种純系細胞株的建立, 細胞的冰凍保藏, 細胞的大量繁殖和各种新的培养方法, 新的人工培养液等也都有了迅速的发展。

我国的組織培养工作在解放后有了很快的发展。鮑鉴清 (1953)^[41] 用 Ringer 氏液、人血清等培养了皮肤、睪丸、卵巢、羊膜、腹膜等組織, 并詳細地观察了这些組織离体后的生活情况。陈瑞銘 (1957)^[23] 設計了一种擦鏡紙的器官培养法, 成功地培养了大白鼠的肝、胰、肺、脑垂体、甲状腺、肾上腺等組織。上海生物制

品研究所用猴腎細胞培养脊髓灰质炎病毒制成了安全有效的脊髓灰质炎疫苗(1958)^[1]。湯飞凡等(1958)^[35]利用人胚腎組織分离麻疹病毒成功。刘年翠等(1958)^[12]培养成功家蚕的各种組織,并将脓病病毒接种在各种組織的单层細胞上。中国科学院武汉微生物研究室(1959)^[4]为了研究脑炎病毒与蚊子之間的关系,以及用来分离脑炎病毒,进行了蚊子的組織培养和单层細胞培养,并已取得初步的成就。长春、武汉、成都等地生物制品研究所(1959)^[29]利用鸡胚单层細胞对乙型脑炎病毒进行了研究。此外,中国医学科学院实验医学研究所(1959)^[2]已培养出了四株人类的肿瘤細胞。中国科学院实验生物研究所肿瘤組(1960)^[26]已培养出了一株人类的肝癌細胞。

第二节 細胞株的种类

体外培养的細胞,由于組織的来源不同,因此在形态上、生物学特性上都是不同的。例如肿瘤細胞和正常細胞就是两个完全不同的类型。即使同样都是正常的細胞,而上皮細胞和成纖維細胞在形态上和生物学特性上也是完全不同的。因此,当我们利用組織培养的細胞来进行各項研究工作时,必須首先了解所用細胞的来源和性质,这是十分重要的。例如一种細胞对某些病毒敏感,而对另一些病毒則不敏感,我們就必须选用对病毒敏感的細胞来进行研究。在研究中,还必须注意采用已經经过純系分离的細胞株,这样对实验的結果才能得出一个比較正确的結論。因此,建立細胞株的工作是組織培养研究工作中一項最基本的工作。

根据 Foley 等(1960)^[204]的意见,一个体外培养的新的細胞株,至少要在实验室内連續地培养6个月,在这个过程中并能定期地进行传代(一般7~10天传一代),这样才能算是在体外新建立了一个細胞株。关于細胞株的命名問題,根据1957年一次組織培养會議的意见^[250],一般是取作者的工作单位、地点和姓氏的英文字母的第一个字拼合而成。例如 Hayflick^[250]培养了一株人的羊膜細胞,根据此原則取名为 WISH (Wistar Institute, Susan

Hayflick)。

随着組織培养技术的迅速发展,世界各国已先后建立了許多动物与人类的正常的和肿瘤的細胞株。其中有些細胞株如 HeLa、L 和 BEL-16 等是比較常用的,对它們的生物学特性也已經了解得比較清楚。有些細胞株刚建立不久,对它們的生物学特性等方面还正在进行一系列的研究工作。为了便于参考起见,茲将目前已建立的細胞株分类列表如下:

組織培养中建立的細胞株

一、人类細胞

1. 正常組織:

株 名	来 源	报 告 者	文 献
Conjunctiva (C)	眼球結膜	Chang (1954)	[126]
Appendix (A)	阑尾粘膜	"	[126]
Liver (L)	肝	Chang (1954)	[126]
Kidney (K)	腎	"	[126]
NCTC1814	筋膜成纖維細胞	Earle 等 (1954)	[163]
NCTC1783	皮肤上皮細胞	"	[163]
FS ₁	包皮	Swim 等 (1955)	[523]
Detroit52	胸骨骨髓	Berman 等 (1956)	[92]
Detroit98	"	"	[92]
LLC-H ₁	胎儿足根骨	Hull 等	[48]
Det-173 B	末梢血	Berman 等	[48]
DHOV	鼻粘膜上皮	Jordan (1956)	[286]
DMB	"	"	[286]
D-189	嬰兒包皮成纖維細胞 (已惡變)	Leighton 等 (1956)	[330]
1769	皮肤	Perry 等 (1956)	[435]
MAF66	胚胎成纖維細胞	美国微生物学会 (1956)	[159]
JeRe-N	軟骨成纖維細胞	Ehrmann 等 (1956)	[173]
RoHa	腎成纖維細胞	"	[173]
JoBe	"	"	[173]
CaRh-N	"	"	[173]
Intestine-407	胚胎的肠	Henle 等 (1957)	[257]