

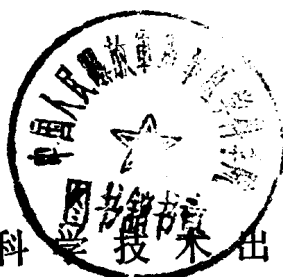
72863

人 体 保 存

——细胞、组织和器官的保存技术——

柏 乃 庆 编著

C0123010



上海科学技术出版社

内 容 提 要

人体保存是研究人体细胞、组织和器官的保存问题的科学,是医学科学分支之一。本书是根据作者多年从事细胞、组织和器官保存工作的经验,以及吸收国内外有关资料编写而成。全书共分五篇(细胞形态的生化、细胞保存、组织保存和器官保存以及其它),十八章(精子、卵细胞、肿瘤细胞、单细胞、血细胞、胚胎细胞、皮肤、骨、血管、神经、角膜、肾脏、肝脏、心脏、肺脏、胰脏、小肠、血液代用品在细胞、组织和器官保存中的应用以及低温生物学技术在细胞、组织和器官保存中的应用)。重点阐述细胞、组织和器官的保存。

本书内容比较全面系统,资料丰富,文字扼要,是有关细胞、组织和器官保存方面的专著。可供细胞、组织和保存,外科、内科、血液病、中心血站、医院血库、免疫等医务人员以及高等院校生物系和医疗系师生参考。

2487/2804



前 言

人体保存是随着细胞、组织和器官的移植的发展而逐步发展起来的。细胞、组织和器官移植是现代医学的新领域,为医学发展开拓了一条新途径。

随着移植工作的开展,移植物的来源就成为一个中心问题。因此,临床上在未有需要移植器官的病例时,必须对移植的供体(细胞、组织和器官)进行保存,即使几个小时也得进行保存;此外有些患者有严重的免疫反应或血型特殊,如果没有可选择的供体,则他们的移植,也是难以进行的,所以对供体保存的研究就成为必要的了。由此看来,移植物的保存是细胞、组织和器官移植获得成功的重要条件之一。

人体细胞、组织和器官保存的研究,近年来发展非常迅速,并取得一定的成就,不少国家如美国、法国、苏联、日本等已经成立组织和器官保存研究室,国际上已召开了两次器官保存会议。我国器官移植目前也在迅速开展,近几年来上海、武汉、兰州和河南等地均开展了移植植物保存的研究工作。而从事人体细胞、组织和器官保存工作者迫切需要这方面的基础理论和应用技术的书籍,但国内外至今还没有这方面系统的专著。为了适应读者的需要,为我国医学科学的现代化添砖加瓦,故初步尝试编写《人体保存》一书。

本书收集总结了1982年以前国内外和我们实验室关于细胞、组织和器官的代谢和保存的研究成果、动态以及某些实验操作技术。其中以细胞、组织和器官保存为重点,从基本概念到研究途径、方法和结果等方面作了详细的介绍,而其它只作选择性的叙述。

由于本人学识水平有限,书中不妥之处在所难免,敬希广大读者批评指正,使本书能不断地充实提高,日臻完善。

编著者 1983.7.

目 录

第一篇 概 况

第一章 细胞、组织和器官保存的一般原理..... 1	三、核仁.....10
第一节 研究方法 1	四、核液.....10
一、整体人或动物的研究..... 1	第二节 线粒体11
二、分离器官的灌注法的研究..... 2	一、线粒体的结构11
三、组织和细胞培养技术..... 2	二、线粒体的化学组织11
四、细胞、组织和器官的保存技术 2	三、线粒体的功能12
（一）保存液 2	第三节 微粒体、内质网、高尔基复合体
（二）保存温度 4	和核蛋白体12
五、器官和组织切片技术 6	一、微粒体12
第二节 保存容器 6	二、内质网12
一、盛物容器..... 6	三、高尔基复合体13
（一）玻璃容器 6	四、核蛋白体13
（二）塑料容器 6	（一）核蛋白体的化学组成13
（三）金属容器和搪瓷容器 6	（二）核蛋白的结构及亚基13
二、保存容器 6	第四节 溶酶体14
（一）4℃保存容器 6	一、溶酶体中的酶类14
（二）-80℃保存容器 6	二、溶酶体的功能14
（三）-196℃保存容器 7	三、影响溶酶体膜的因素15
第二章 细胞形态的生化 7	第五节 过氧化物酶体15
第一节 细胞核 8	第六节 上清部分(胞液)15
一、细胞核的化学成分 8	一、微管15
（一）核酸 8	二、微丝16
（二）蛋白质 8	第七节 质膜.....16
二、染色质和染色体10	一、质膜的化学组成与结构16
（一）脱氧核糖核酸(DNA)10	二、质膜的功能17
（二）核糖核酸(RNA)10	第八节 细胞器的相互关系18
（三）蛋白质10	

第二篇 细胞的保存

第三章 概况20	第四章 单细胞的保存23
一、冷冻损伤的机制20	第一节 精子的保存23
二、防止细胞在冷冻时损伤的方法21	一、引言.....23
（一）采用适宜的冷冻和加温操作规程21	二、精子的保存方法24
（二）使用低温保护剂21	三、保存后的精子妊娠效果24
三、今后的研究方向22	第二节 卵细胞保存24
四、细胞的保存23	第三节 肿瘤细胞保存25

第四节 单细胞及二倍体细胞培养和保存	26	(二) 粒细胞的杀菌作用机理	85
一、原代细胞的培养	26	三、细胞的免疫生化	86
(一) 培养容器	26	(一) 移动抑制因子	86
(二) 试剂配制	26	(二) 淋巴毒素	86
(三) 原代细胞培养	27	(三) 趋化因子	87
二、细胞传代培养	27	(四) 有丝分裂因子	87
三、成片细胞的维持	28	(五) 通透性因子	87
四、细胞的保存	28	(六) 转移因子	87
(一) 细胞保存的意义	28	(七) 干扰素	87
(二) 细胞的保存方法	28	四、白细胞的保存	89
第五章 血细胞的保存	29	(一) 颗粒细胞的冰冻保存法	90
第一节 红细胞的保存	29	(二) 淋巴细胞的冰冻保存法	90
一、红细胞数量、结构和功能	29	第三节 血小板的保存	90
(一) 红细胞膜	30	一、血小板的结构和功能	90
(二) 血红蛋白	31	(一) 血小板的结构	90
二、红细胞的化学组成	34	(二) 血小板的功能	92
三、红细胞代谢	39	二、血小板代谢	95
(一) 红细胞的代谢能力	39	(一) 血小板代谢的概况	95
(二) 成熟红细胞的代谢特征	40	(二) 血小板代谢	96
(三) 影响红细胞代谢的因素	50	(三) 血小板代谢和功能之间的关系	97
(四) 葡萄糖代谢的酶	53	三、血小板的保存	97
(五) 其它酶系	55	(一) 血小板的制备	97
(六) 葡萄糖以外的能源底物之应用	58	(二) 血小板的保存	97
四、红细胞中阳离子(K^+ 和 Na^+)的 转运及红细胞膜的透过性	59	第四节 骨髓的保存	98
五、红细胞的溶血(溶解作用)	60	一、引言	98
六、载体转运	61	二、骨髓移植的途径	99
七、红细胞在呼吸气体运输中的功能	62	(一) 自家骨髓移植	99
(一) 呼吸气体的运输	62	(二) 同基因型骨髓移植	99
(二) 影响红细胞带氧能力的因素	65	(三) 同种异体骨髓移植	99
八、红细胞的保存	72	(四) 异种骨髓移植	99
(一) 液体保存法($4^{\circ}C$ 保存)	72	三、人体骨髓的采集	99
(二) 低温和超低温保存法	73	四、人体骨髓的移植法	100
第二节 白细胞的保存	76	五、人体骨髓的保存	100
一、白细胞代谢的特点	76	(一) $4^{\circ}C$ 保存	100
(一) 白细胞代谢的一般概况	76	(二) 低温冰冻保存	100
(二) 白细胞的能量代谢	76	六、骨髓的临床应用	102
(三) 脂类代谢	80	七、骨髓移植的副作用和并发症	102
(四) 核酸代谢	81	八、骨髓的质量检定——活性鉴定	103
(五) 蛋白质代谢	82	第五节 干细胞的保存	105
(六) 其他	84	第六节 鞣化致敏红细胞的保存	105
二、粒细胞吞噬作用的生化	84	第六章 胚胎的保存	106
(一) 粒细胞溶酶体的成分及其作用	85	一、引言	106
		二、保存的方法	106

第三篇 组织的保存

第七章 皮肤的保存	107	第一节 角膜的生化	122
第一节 表皮代谢	107	一、角膜的有机化学组成	122
一、表皮的糖代谢	107	二、代谢和营养	122
(一) 糖的分解代谢	107	(一) 葡萄糖的供给	123
(二) 糖的合成代谢	108	(二) 氧的供给和消耗	123
二、表皮的脂类代谢	108	(三) 乳酸和二氧化碳的清除	123
(一) 体表脂膜	109	三、渗透性	124
(二) 表皮的正常脂类代谢	109	四、透明度	124
第二节 皮肤的保存	110	五、伤口愈合作用	124
一、引言	110	六、角膜的血管新生	124
二、保存方法	110	第二节 角膜的保存	125
(一) 零上 4℃ 保存	110	一、引言	125
(二) 低温冰冻保存	111	二、国外角膜保存概况	125
三、皮肤内琥珀酸脱氢酶活性的定量测定法	114	三、国内角膜保存概况	126
第八章 骨的保存	115	四、移植材料的采取和选择	126
第一节 骨的代谢	115	(一) 年龄	126
一、骨的组成	116	(二) 死亡原因	126
二、骨的生成	118	(三) 眼的病理	127
三、骨的吸收	119	(四) 死亡时间	127
四、骨的重建	119	(五) 眼球处理	127
第二节 骨骼的保存	119	五、角膜的保存	127
一、概况	120	(一) 板层移植材料的保存	127
二、骨骼的真空干燥保存	120	(二) 穿透移植材料的保存	128
三、冻干骨的临床应用	121	六、角膜内皮活性评定的方法	131
第九章 血管的保存	121	(一) 生物显微镜检查	131
一、引言	121	(二) 电镜检查法	131
二、生物血管(牛血管)的保存	121	(三) 锥蓝和丽丝胺绿染色	131
第十章 角膜的保存	122	(四) 组织化学酶染色	132
		(五) 温度逆转试验	132
		(六) 角膜内皮显微镜	132

第四篇 器官的保存

第十一章 器官移植和保存的概况	133	第二节 器官保存的概况	146
第一节 器官移植的概况	133	一、概况	146
一、同种异体器官移植的基本概念	133	二、国外器官保存概况	146
(一) 组织相容性抗原	133	三、国内器官保存概况	147
(二) 人体白细胞抗原系统(HLA)的遗传性	136	第十二章 肾脏的保存	147
(三) 组织配型相容性测定	137	第一节 肾脏的生化	147
(四) 同种供体器官的灌注与保存	138	一、尿液的生成与肾功能测定的原理及意义	148
(五) 免疫抑制药物应用	138	(一) 尿液的生成	148
二、同种异体器官移植的意义	141	(二) 肾脏对某些物质的清除作用	150
(一) 国外器官移植概况	141		
(二) 国内器官移植概况	145		

二、肾脏在维持内环境恒定上的作用	152	(三) 糖原的生成和分解	251
(一) 肾脏的排泄机理及水、电解质平衡	152	(四) 有氧糖酵解	255
(二) 肾脏在调节酸碱平衡中的作用	153	二、氧化代谢	256
(三) 非电解质的重吸收与排出	156	(一) 脂肪酸代谢	257
第二节 肾脏的保存	157	(二) 三羧酸循环中乙酰-CoA 的氧化	259
一、引言	157	(三) 还原型NADH从胞浆到线粒体的转运	261
(一) 国外肾脏保存概况	157	(四) 氧化磷酸化	263
(二) 国内肾脏保存概况	163	(五) 能量平衡	264
二、肾脏的保存	163	(六) 氧化磷酸化的机制	265
(一) 肾脏保存的意义	163	(七) 氧化磷酸化控制	266
(二) 肾脏保存的方法	164	(八) 糖酵解和呼吸的整合	267
(三) 灌注保存时影响肾功能的因素	189	(九) 控制心脏产能的总体现	268
(四) 延长低温保存期对肾组织的影响	189	三、能量的贮存和利用	268
(五) 肾脏在长期保存中所存在的问题	190	第二节 心脏的保存	269
(六) 输血对肾移植存活率的影响	191	一、引言	269
(七) 肾脏保存的质量检查	192	二、心脏的保存	270
(八) 结尾	195	(一) 心脏在零上温度(4~10℃)的保存	270
第十三章 肝脏的保存	195	(二) 心脏在低温下冰冻保存	271
第一节 肝脏的生化	195	第十五章 肺的保存	273
一、肝脏的结构与化学组成的特点	195	第一节 肺的生化	273
(一) 肝脏结构的特点	195	一、糖代谢	274
(二) 肝脏化学组成的特点	196	二、蛋白质代谢	274
二、肝脏在物质代谢中的作用	197	三、脂质代谢和肺泡表面活性物质	274
(一) 肝脏在糖代谢过程中的作用	197	第二节 肺的保存	275
(二) 肝脏在脂类代谢中的作用	217	一、引言	275
(三) 肝脏在蛋白质代谢过程中的作用	232	二、肺的保存	275
(四) 肝脏在维生素代谢中的作用	234	(一) 单次低温液灌流保存	275
(五) 肝脏在激素代谢中的作用	234	(二) 连续低温脉冲灌洗保存	276
第二节 肝脏的保存	235	(三) 低温非脉冲灌洗保存	277
一、引言	235	(四) 低温高压氧	277
(一) 国外肝脏保存的概况	235	三、缺血对肺功能的影响	277
(二) 国内肝脏保存的概况	236	(一) 肺对非低温缺血的耐受程度	278
二、肝脏的保存	236	(二) 对非低温或低温缺血的功能肺的反应	278
(一) 概况	236	第十六章 胰腺和胰岛的保存	280
(二) 肝脏在零上(2~6℃)温度保存	237	第一节 胰腺的保存	280
(三) 肝脏在低温下的冰冻保存	243	一、引言	280
(四) 用高渗细胞内溶液保存肝脏的		二、胰腺的保存	281
作用机制的研究	243	(一) 胰腺在零上温度(4~10℃)的保存	281
(五) 肝脏在保存过程中所存在的问题	245	(二) 胰腺在低温下的冰冻保存	283
(六) 肝脏保存体外质量检查指标	246	第二节 胰岛细胞的保存	285
第十四章 心脏的保存	247	一、供体胰岛组织的制备	285
第一节 心脏的生化	247	(一) 大鼠胰岛的分离	285
一、无氧糖酵解与有氧糖酵解	247	(二) 成年人胰岛分离	285
(一) 糖酵解途径	247	(三) 胚胎胰腺	285
(二) 糖酵解的控制	248		

二、胰岛细胞的保存	286	一、实验性胰岛移植	291
(一) 胰岛细胞在零上温度(4~10℃)的保存	286	(一) 胚胎移植研究	291
(二) 胰岛细胞在低温下的冰冻保存	286	(二) 啮齿类胰岛移植研究	292
第三节 胰岛细胞和胰腺组织的培养技术	288	(三) 大动物胰岛移植研究	292
一、胰岛细胞的培养	288	二、胰岛移植的临床研究	292
(一) 实验动物胰岛细胞的培养	288	(一) 胰岛异体移植	292
(二) 胚胎胰岛的组织培养	290	(二) 胰岛自体移植	293
(三) 人胰岛细胞的培养	290	第十七章 小肠的保存	293
二、人体胰腺节段组织的培养	290	一、小肠在零上(4~6℃)温度保存	293
第四节 胰岛移植	291	二、小肠在零下温度的保存	294

第五篇 血液代用品

第十八章 血液代用品在细胞、组织和器官 保存中的应用	295	(二) 明胶溶液	300
第一节 血液代用品应用概况	295	四、含植物胶体的血液代用品	301
一、全血保存	296	(一) 植物糖类	301
二、红细胞分离和保存	296	(二) 植物蛋白	302
(一) 在4℃的分离和保存	296	五、含合成胶体的血液代用品	302
(二) 在-196℃液氮中保存	296	(一) 右旋糖酐	302
三、白细胞和血小板的分离和保存	296	(二) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)溶液	303
(一) 分离	296	(三) 聚乙烯醇溶液	304
(二) 保存	296	六、蛋白质水解产物和脂肪乳剂	304
四、肾脏保存	296	(一) 蛋白质水解产物	304
五、小肠保存	296	(二) 脂肪乳剂	305
六、心脏保存	297	七、人工血或称带氧血液代用液	306
第二节 国内外血液代用品的概况(类型、 性能)	297	(一) 人工血红蛋白	306
一、晶体盐类溶液	297	(二) 人工细胞	306
二、含人血成分的血液代用品	298	(三) 全氟碳化合物乳剂	307
(一) 全血注射液	298	第三节 血液代用品的临床应用	308
(二) 血清注射液	298	一、防治失血性休克	308
(三) 血浆注射液	298	二、治疗感染性休克	309
(四) 血清白蛋白溶液	298	三、治疗某些心血管疾病	309
(五) 血红蛋白	299	四、用作心肺机的预充剂	309
(六) 多种血浆蛋白溶液	300	五、烧伤补液	310
三、含异种蛋白的血液代用品	300	六、其他用途	310
(一) 以动物血液成分制成的蛋白溶液	300	七、血液代用品的副作用	310
		第四节 结语	310

附 录

一、基础试剂	312	六、氨基酸的一些物理常数	326
二、细胞培养液	319	七、常用缓冲液的配制	321
三、本书引用的略号	321	八、离心机转数(RPM)与离心力(G)的换算	326
四、糖酵解酶英汉名称对照表	322	九、本书常用度量衡	337
五、核苷酸及其衍生物的一些物理常数	323	参考文献	338

第一篇 概 况

人体保存是研究人体细胞、组织和器官保存的一门学科,它是随着输血学、外科学、生化学、低温生物学和免疫学的发展而逐渐发展起来的,尤其是随着细胞、组织和器官移植的开展和血液成份疗法的开展而逐渐形成的。由于器官移植的广泛开展,移植物的来源就成为一个中心问题,往往有供体来源,而无受体,则造成移植物的浪费;或者有许多受体(患者),而无供体,则患者得不到及时的医治,甚至造成死亡。所以对供体保存的研究是很必要的,是细胞、组织和器官移植获得成功的主要条件之一。

到目前为止,细胞、组织和器官保存已成为现代医学中的一个新领域,为医学发展开拓了一条新途径。

人体保存和其它学科(人体生理学、人体解剖学)一样,它涉及到人体各部分的细胞、组织和器官,但是由于目前科学技术的局限性,还不能对人体各部分进行保存,所以只能根据现有的材料加以综合分析以及我们实验室研究的结果,进行一些必要的描述如:

1. 细胞保存:包括单细胞保存(精子、卵、肿瘤细胞和单细胞保存),血细胞保存(红细胞、白细胞、血小板、骨髓细胞和干细胞以及鞣化致敏红细胞保存)和胚胎细胞保存等。
2. 组织保存:包括皮肤、骨、血管和角膜保存等。
3. 器官保存:包括肾、肝、肺、心、胰腺和小肠等。

由于细胞、组织和器官在机体内所担负的功能各不相同,所以它们在形态、结构、物质代谢及生理活动等方面,都具有一定的特性和规律,从而使机体生命活动能顺利进行。细胞、组织和器官之所以能具有这些特性和规律,是神经系统和体液对机体各部分机能和物质代谢过程进行自动调节的结果。当细胞、组织和器官离体后,由于失去神经和体液调节,生化活动的规律遭到破坏,从而使它们的寿命逐渐缩短,这是影响机体各部体外保存的主要因素。为了更好地了解和探讨离体的保存,必须首先了解机体各部的形态、结构、功能和代谢的特性和规律,所以在叙述机体各部的保存工作之前,尽可能先介绍一些生化内容。

此外,由于细胞、组织和器官保存的研究有许多共同之点,为此首先介绍细胞、组织和器官保存的一般原理和细胞形态的生化。

第一章 细胞、组织和器官保存的一般原理

第一节 研究方法

一、整体人或动物的研究

在人类中要检测一种化合物在给药以后的去向,唯一的手段是测定这种化合物和它的代谢物在血液、尿、粪便、胆汁、呼出气、汗水和唾液中的水平,通过测定血清中谷氨酸-草酰

乙酸转氨酶和乳酸脱氢酶等,可以得到关于器官损伤的指标;其次实验动物在给予化合物后可以杀死,处死后的动物可以进行整体研究或者取出各别的器官、细胞和组织,检查其形态学的变化,或分析其特殊的成分。也可以将一个细针头插入器官的动脉中,通过这针头把化合物灌注到器官中,从相应的静脉收集从器官流出的血液样品,随后进行分析。

二、分离器官的灌注法的研究

在这一技术中从动物体内取出肝、肾或心脏等器官。在一个恒定的温度下保持在一个适当的装置中,然后把待研究的化合物加到灌注液中,灌注液一般按正常的速度经动脉灌注到器官里,分析通过静脉而流出的液体,这样就可以确定灌注的化合物在器官中的代谢情况。灌注液可以只经过器官一次,或者在进行最后的分析之前可以循环几次。灌注液可通过重力或者用一个小泵使其通过器官。要使灌注液循环,必须使用后一种方法。在某些灌注系统中,通过器官的液流是脉冲样的(搏动流),而不是在一个持续的压力下通过。搏动流比非搏动流更接近于体内的状况,因为它和心脏产生的血流型相似。

三、组织和细胞培养技术

该法能在确定的条件下研究影响细胞生长、分裂和分化等现象的因素,并且能比较容易地把化合物给予细胞组织,观察各种作用。

在培养基中生长的组织和细胞,使由于有机体多细胞状态所产生的一些物理的,生理的和生化的限制作用被降低到最少程度。这种技术可以研究细胞的发育潜能,即只要具备恰当的化学和物理的环境,在它的遗传素质的范围内由一种细胞形成任何一种其它细胞类型的能力。

从目前所使用的各种培养基看来,都十分复杂,但一般都由含碳的化合物(如糖),各种无机盐,微量元素,维生素和生长因子等组成。此外,有时还补充血清,如果需要单细胞的悬浮液,需用胰蛋白酶来处理将能有助于细胞的解聚。

四、细胞、组织和器官的保存技术

(一) 保存液

1. 基本原则: 离体的细胞、组织和器官再不能由机体供应所必需的营养物质,将逐渐失去活力而趋向死亡。为了继续保持细胞、组织和器官的活力和延长寿命,它必须供给它们的营养和适宜的生活环境。此外,调整保存液的酸度及降低保存的温度,借以来减低细胞代谢能力,以期保全维持细胞活力的能量产生机构,从而延长保存期,为了达到上述要求,配制各种保存液时一般可注意以下几点:

(1) 溶液的等渗度: 一种满意的保存液虽不一定等渗,但应接近等渗,因为细胞内外环境虽不相同,但膜两侧物质所能维持的渗透压是相同的或者是相近似的。将细胞放在高渗溶液中,水分即从细胞内向外渗出,体积缩小;相反,将细胞放在低渗溶液中,水分即从细胞外向内渗入,体积膨大,所以,如果保存液偏离等渗过远,细胞的正常结构将受破坏,因此注意保存溶液的等渗度是很重要的。我们知道溶液的等渗度是由它所含的溶质的微粒数决定的,一个葡萄糖分子是一个微粒,一个氯化钠分子是两个微粒(Na^+ 和 Cl^- 各算一个微粒)。溶液中微粒的浓度又决定着溶液冰点下降的程度,任何一种等渗液的冰点也应该是 -0.56°C ,或

为 286mOsm 渗透压。

(2) 保存液的 pH: pH 对生物学过程的影响: 有机体和细胞一般能经受住它们的外环境在 pH 方面的很大变化, 相反, 细胞内的过程对 pH 的变化是很敏感的, 并且这些过程是发生在一个精细地调节着 pH 的介质中。但是, 细胞内可能存在着局部的 pH 变化, 例如在膜的表面, 大多数细胞内的过程发生在 pH 维持接近中性的条件下。一般在 pH 为中性时, 各种代谢过程的速度最大。在生物系统中, 实际上是通过有效的缓冲系统的作用来稳定 pH 的, 这些缓冲系统的化学性质使得它们能抵抗住由于酸(如乳酸)和碱(如氨)一类的代谢产物所引起的 pH 变化。在细胞液中发现的主要缓冲系统有磷酸盐、碳酸氢盐、氨基酸和蛋白质。

生物过程对 pH 的敏感性可能是由于某些可能的原因之一。这个过程可能被氢离子所催化, 也可能氢离子是作为这个过程的反应物或产物。另一方面, pH 的变化可能通过膜通透性的变化而改变了膜两边化合物或离子的分布。与其它许多生物结构和分子一样, 膜具有可离子化的基因, 它们精确的离子化状态影响了它们的分子构形, 从而影响了它们的生物学活性, 尤其是蛋白质, 酶也是如此。某些蛋白质依靠着它们周围 pH 的微小变化来完成它们的生物学功能。以血红蛋白为例, 它的主要功能是把氧从肺传送到组织中, 由于组织活跃的呼吸而产生 CO_2 和氢离子, 使组织的 pH 略为下降, 而有助于在必要的时候和地方释放出氧气。氧气的释放伴随着血红蛋白摄取质子, 同时也有助于使系统得到缓冲。

在体外研究代谢过程需要使用缓冲液, 这种缓冲液可能不是“生理性的”。但是, 有意的改变 pH 可能有助于用电泳和离子交换层析那样的技术来分析研究分子(例如氨基酸、蛋白质和核酸)的某些基因。

(3) 生物学研究中所用的缓冲液: 缓冲液是一种能抵抗住由于加入酸或碱而引起的氢离子浓度改变的溶液。这种抵抗力称作为缓冲作用, 缓冲作用的大小称作为缓冲能力(B), 所以通过改变一单位的 pH 所需可的强碱的量来测量。

$$\text{即} \quad B = \frac{db}{d(\text{pH})}$$

这里 $d(\text{pH})$ 是因加入 db 的碱所引起的 pH 的增加。

实际上, 缓冲液通常由一种弱酸或弱碱和它的盐的混合物组成, 例如乙酸和乙酸钠。在一个弱酸(HA)和它的盐(A^-)的溶液中, 加入的氢离子被盐的阴离子中和, 因此, 这种盐起到了一个弱碱的作用; 反之, 加入的氢氧离子通过酸的中和被除去。因此很清楚地看到, 一种特殊的酸和它相配对的碱的缓冲能力在它们的浓度相等时最大, 即当 pH 等于酸的 PK_a 时, 缓冲能力除了取决于酸和盐的比率以外, 还取决于总的浓度, 即总浓度越大, 缓冲能力越强。缓冲液中酸和盐的一般浓度在 $0.05 \sim 0.20 \text{M}$ (克分子) 左右, 一般混合物在 $\text{pH} = \text{PK}_a \pm 1$ 的范围内具有满意的缓冲能力。蛋白质也具有很高的缓冲能力。

(4) 抗凝剂的选择: 目前一般选用以下几种:

① 用化学药品防止血液凝固, 多采用钙结合剂, 其用量根据抗凝剂与钙的结合力而定, $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 与钙结合为络合物。它的结合力很强, 一克分子 $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 即可结合一克分子的 Ca^{2+} , 每 500 毫升全血(其中 Ca^{2+} 含量为 30 毫克, 相当于 0.75mM (毫克分子)) 用 1.36% $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ (相当于 1.1mM) 溶液 30ml (毫升) 即可。而枸橼酸钠与 Ca^{2+} 结合力较弱, 采集同样血液即需 2~3 克枸橼酸钠, 相当 10mM , 为血液中所含 Ca^{2+} 的毫克分子数的 10 倍

左右。主要用于红细胞和骨髓细胞保存。

② 用生物制剂防止血液凝固,如肝素,是一种酸性粘多糖,其作用是阻止凝血酶的生成,从而达到抗凝目的。10mg (1000 单位)可使 100ml 血液数天不凝固,主要用于白细胞和血小板的分离和保存,以及肾脏器官保存和细胞培养中,但因其抗凝能力有一定的时间限制和不能长期保存血液等缺点,应用受到限制。

(5) 药品的用量:一般保存液处方中的药品都注明有无结晶水,但在配制时如遇到结晶水不符时要进行换算到所需要剂量,否则要影响到保存液的质量。此外,要求所有药品对受血者无害。

2. 保存液处方的类型:由于每种细胞、组织和器官保存所需的保存液处方均不一样,所以保存液处方甚多,约有数百种,以后分别在各章中叙述。尽管如此,他们之间也有共同点,也有很多不同之点,概括起来保存液处方大致有以下几种类型:

(1) 电解质平衡盐溶液:

① 仿细胞外液型溶液:最初用复方 NaCl 溶液,单纯林格氏乳酸钠溶液。

② 仿细胞内液型溶液:已确定了很多的“生理”的等渗盐或高渗盐溶液,但均是由 Ringer 溶液派生而来的,通常使用的是 Krebs-Ringer 磷酸盐溶液和 Krebs-Ringer 碳酸氢盐溶液。这些盐溶液中含有不同量的 NaCl、KCl、MgSO₄、CaCl₂、Na₂HCO₃ 和 KH₂PO₄,并且有些溶液还应有 O₂/CO₂ 混合气体。此外,还有 Hanks 液和 Earle 溶液。

(2) 应用高渗性溶液:一般选用葡萄糖、甘露醇和蔗糖作为高渗剂。渗透压一般在 300~400mOsm 之间。

(3) 应用核苷类物质溶液:一般选用腺苷、肌苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤等物质添加到保存液中或组织培养液中。

(4) 应用含有营养物质的保存液,其中含有综合性的营养物,如氨基酸、核苷类物质以及葡萄糖物质等,通常应用 1640、TC199、Eagles 和 Hams F₁₂ 溶液等。

(5) 应用含有一定的有机成分的保存液:通常应用冷冻沉淀血浆(CPP)和血浆蛋白部分(PPF 或白蛋白)、水解乳蛋白和小牛血清等。

(6) 应用含有血浆代用液的保存液:如在保存液中添加右旋糖酐、羟乙基淀粉、明胶等物质。

(7) 其它:在保存液中有时也添加硅胶、丙酮酸、延胡索酸和草酰乙酸等。

有些保存液和培养液为了防止细菌繁殖,有时也添加抗生素,如青霉素、链霉素、卡那霉素和庆大霉素等。

(二) 保存温度

细胞、组织和器官保存的温度一般向三个方向发展。

1. 在 37°C 的保存:这一温度的保存一般用于细胞培养中,将细胞于此温度保存,观察其保存效果。

2. 在零上温度(4~10°C)的保存:

(1) 静置保存法,一般是指细胞保存,如红细胞、白细胞、血小板、骨髓等,采集后就置于 4°C 下保存。

(2) 单次低温液灌洗保存法(简称单次法),一般是指器官保存,如肝、肾、心脏和脾等,其法简单,是在迅速无损地取器官后,立即浸入 0~4°C 保存液中,并尽快用 4~6°C 保存液经

动脉灌注,通过灌注迅速使器官的浅深部均匀冷却,并洗去有害物质,如残留血中的抗原,血小板聚合物、细胞和纤维蛋白样血栓,灌注压力一米高水柱,灌注速度 200 滴/分左右,时间为 3~6 分钟,灌注液用量 200~400ml 直至器官呈苍白色为止。灌注完毕后,将器官浸在一个有 500ml 保存液的无菌防水容器内,再将容器保存在冰箱内或在装冰的苯乙烯泡沫匣内,保持温度在 4°C,可保存 24~96 小时。

(3) 连续低温灌注保存(简称灌注法):其方法是将供体取下后,立即以 4°C 含有肝素的高渗高钾电解质溶液 200ml 灌注器官,然后再与连续灌注机连接,用天然的或合成的液体进行连续灌注保存,一般使用灌注压力是 60mmHg,灌注泵搏动次数是每分钟 60~70 次,校正灌注液 pH 值在 7.4 左右,用 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气体。一般可保存 24~72 小时。

(4) 低温非脉冲灌注保存,其法同灌注法,所不同之是不进行搏动,一般也可保存 24~72 小时。

(5) 高压氧灌注保存:该法较复杂,不易推广使用。

3. 在低温和超低温下的冰冻保存:细胞、组织和器官的低温保存研究工作早在 1947 年 Florio 已就开始,到 1950 年才迅速发展起来,至今已有三十多年的历史。在此期间,在冰冻方法,保护剂选择,容器的选择,低温保护剂洗脱方法,洗脱液和稀释液成分等方面都有很大的发展,现简要的概括如下。

(1) 冰冻方法,可分为:

① 慢冻法(高浓度甘油 40~50%“W/V”慢冻细胞保存):即将细胞经过高浓度甘油溶液处理后,制成的甘油化细胞悬液在 -80°C 或 -120°C 的特殊冰箱中保存,此时在细胞外液中生成较大的冰块。

② 速冻法(低浓度甘油或 DMSO 10~18%“W/V”快速保存):即将细胞、组织和器官经过低浓度低温保护剂处理以后又灌入容器内,置于液态氮中(-197°C)冰冻保存,此时细胞内也有小冰晶形成。

(2) 保护剂:根据它们能否透过细胞膜可分为:

① 细胞内的:适用于慢冻保存,有甘油、二甲基亚砷、碳水化合物(葡萄糖)、乙二醇、二元醇、三元醇、丙二醇、乙酰胺、甲酰胺、乙醇、甲醇等。

② 细胞外的:适用于快冻保存有:乳糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、高分子化合物(PVP、右旋糖酐、白蛋白、羟乙基淀粉、聚乙二醇、聚氧化乙烯)、甘露醇、山梨醇、甜乙醇等。

(3) 容器的选择:

① 慢冻法中洗脱保护剂所需的容器有:透析袋、Chon 分离器、Chon-ADL 容器、红细胞聚集器和 PVC 塑料袋等五种。

② 快冻法中盛血的容器有,扁平方盒、贝壳形的扁盒、圆筒形盒、扁平不锈钢容器、铝制空气溶胶罐和聚四氟乙烯袋等。

(4) 洗脱保护剂方法(对慢冻和快冻都适用):有透析、离心(连续和分步)沉淀和混合法等四种。

(5) 洗脱液物质:慢冻:葡萄糖、果糖、蔗糖、乳酸钠、KOH;快冻:山梨醇、NaCl、葡萄糖、甘露醇、蔗糖。

(6) 细胞的稀释液:慢冻:有血浆、生理盐水、5%白蛋白、KH₂PO₄ 等;速冻:有血浆、5%白蛋白、生理盐水、葡萄糖盐水等。

五、器官和组织切片技术

为了了解器官组织的显微变化,可通过组织化学的方法得到证明。一般采用切片机,组织块的厚度为 0.5~5 毫米然后进行各种特殊的染色,分析结果。

第二节 保存容器

一、盛物容器

(一) 玻璃容器

玻璃容器用于保存的研究已经多年,包括各种规格的玻璃瓶(贮血瓶、血浆瓶、匹力西林瓶、广口瓶、以及其它各种各样的玻璃瓶等)。

(二) 塑料容器

随着科学技术的发展,人们更深入地认识到容器对保存的影响。例如,容器内壁的光滑度,容器本身内含物的析出以及它的透气性等,都将对机体的保存产生影响。这一工作从 1950 年开始正式使用塑料输血容器,目前塑料容器有软质和硬质两种。软质塑料容器有血袋(可保存各种细胞、组织以及某些器官,其原料是由聚氯乙烯和少量其它物质(增塑剂、稳定剂、杀菌剂、去垢剂和挤压剂等)等成份制成,还有聚四氟乙烯和一些共聚物。硬质塑料容器,有塑料瓶、塑料管等,其原料是由聚乙烯、聚丙烯等制备而成。

(三) 金属容器和搪瓷容器

这些容器用于保存方面也较多,常用于器官和细胞保存,常用铝、不锈钢制成。

二、保存容器

(一) 4°C保存容器

一般采用 4°C 冰箱、冰库。

(二) -80°C保存容器

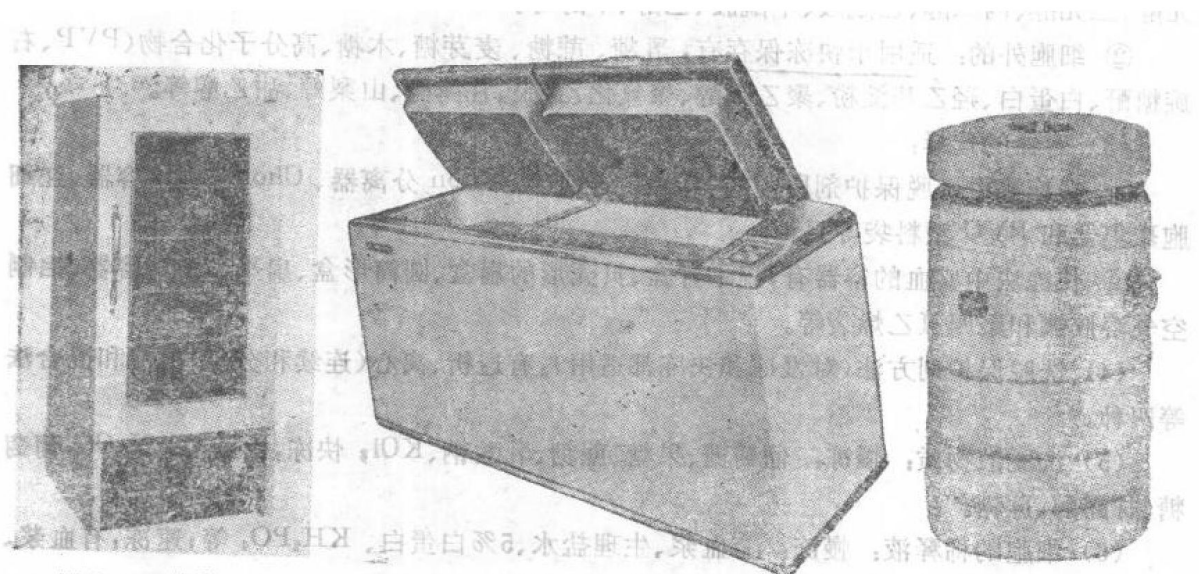


图1 4°C冰箱

图2 -80°C冰箱

图3 -196°C液氮箱

一般采用 -80°C 冰箱。

(三) -196°C 保存容器

一般采用液态箱和液态机。

见图 1, 2, 3。

第二章 细胞形态的生化(亚细胞结构生化)

细胞、组织和器官等都是由细胞构成的, 所以说细胞是生物体的结构与功能单位, 而且生命活动过程中各种生化反应绝大部分是在细胞内进行的, 为此在叙述细胞、组织和器官保存以前, 首先描叙一下细胞形态的生化还是必须的, 这是它们的共同性特点。

过去一直把细胞分为细胞膜、细胞质(又称为细胞浆)和细胞核三部分。经过近年来对细胞结构的多方研究, 特别是电子显微镜技术和超速离心等生化技术的应用, 对于细胞的认识就更加丰富深刻了。一个人体细胞大致如下图所示:

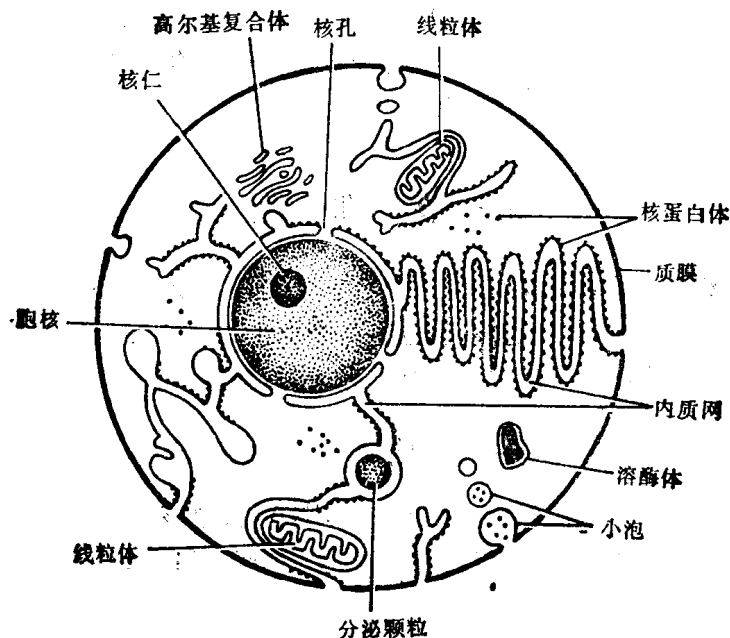


图 4 典型的动物细胞图解

细胞由细胞膜包围, 因为被包围的是胞质, 所以细胞膜也叫做质膜, 质膜有凸出, 也有内陷, 其中有些内陷还可和胞质里的内质网相连通。有些内质网的外侧面上附有颗粒, 叫做粗面内质网; 不附颗粒的就叫做滑面内质网; 附着在内质网上的颗粒叫做核蛋白体; 核蛋白体也有不附在内质网上, 而散在胞质中的。内质网还可和另一种叫做高尔基复合体的膜状结构相通, 在胞质里有比较大的棒状颗粒, 叫做线粒体, 还有其它颗粒, 如溶酶体和过氧化物酶体。人体细胞除成熟红细胞外, 都含有胞核, 胞核由一双层的核膜包裹着, 核膜上有孔, 核内含有染色质, 并有一个或多个核仁。

根据电子显微镜观察结果, 可将细胞区分为膜相结构、质相结构和核结构相三部分(见下表 1)。

表 1 膜相和质相结构

膜相结构	质相结构
细胞膜	核蛋白体
内质网	• 微管
	微丝
高尔基复合体	△中心体
线粒体	基质(胞液)
核膜	核相结构
溶酶体	核仁
过氧化体	染色质(染色体)
	核液

• 在细胞分裂时增多 △在细胞分裂时明显

膜相结构又称膜性结构,一般包括细胞膜、内质网、高尔基复合体、线粒体、核膜、溶酶体和过氧化体。尽管这些结构在分布和功能上都不同,但从形态结构的互相联系以及发展和来源来看,它们之间的关系是密切的,很多膜相结构是互相连接的,如核膜的外层可与内质网相连。质相结构是指细胞基质(胞液)及悬于其中一些无膜的颗粒成分和管丝状物质,包括核蛋白体、微管、微丝、中心体等核相结构是被核膜包围的核内物质,包括核仁、染色质(染色体)、核液等。一般集中在细胞内靠近中央的区域内。

第一节 细 胞 核

细胞核一般多呈圆形或椭圆形,少数呈杆状、纺锤状或马蹄形,大小约为细胞的 $1/4 \sim 1/3$ 。通常每个细胞只有一个细胞核,但也有两个以上的,如肝细胞。胞核被胞膜包围着,其中的 DNA 与组蛋白结合成染色质。在有丝分裂时,核膜消失,染色质成为染色体。

一、细胞核的化学成分

胞核所含物质有 DNA(脱氧核糖核酸)和 RNA(核糖核酸)两类核酸、碱性的组蛋白和非组蛋白的其它蛋白质,以及磷脂和金属离子 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等等。

(一) 核酸

DNA 是胞核中的物质,是染色体的组成成分,是遗传的物质基础。动物细胞里的 DNA 绝大部分存在胞核里,只有少量见于线粒体中。

每一种动物的每一个体细胞核所含 DNA 的量十分恒定。人的每一个体细胞核含有 $6.0 \mu\text{gDNA}$ 。当然,体细胞是二倍体、单倍体的性细胞的 DNA 含量正好是体细胞的一半。每个胞核的 DNA 含量不受各种生理条件的影响,甚至也不受病理情况影响。但在细胞进行有丝分裂的过程中,必然有一个时期 DNA 的含量比原来的增高一倍。

胞核中的 RNA 可占细胞总 RNA 的 30%,其中约 20%在核仁中,10%在染色体,核仁是合成核蛋白体 RNA 的场所。胞质中的转移 RNA 和信使 RNA 也都是在胞核里合成,然后运出胞核,在不同的组织或同一组织在不同的生理条件下,细胞对 RNA 的需求不一,胞核中 RNA 含量可有很大变动,不象 DNA 恒定不变。

(二) 蛋白质

胞核中蛋白质的性质及其总量随组织的不同而异,即使在同一组织中,蛋白质的含量也随不同生理状况而改变。胞核所含蛋白质种类很多,也很复杂,目前还了解得很不够。主要的有碱性的组蛋白、酸性的非组蛋白质以及一些酶。

关于胞核中的蛋白质,以对组蛋白的了解较为清楚,组蛋白分子量较小,大约在 11,000~21,000 之间;它们不含色氨酸或含量极小,含赖氨酸或精氨酸较多,所以属碱性蛋白质,等电点等于或大于 pH10。按组蛋白中精氨酸和赖氨酸含量的不同,可以把它们分成五类。各类组蛋白的名称和主要的特性见表 2。

表 2 组蛋白分类及一些主要性质

组蛋白分类	主要氨基酸%	分子量	氨基酸残基总数	碱性氨基酸残基总数
H ₁	赖氨酸27% 丙氨酸24% 精氨酸2%	~21500	~210	~64
H _{2b}	赖氨酸16% 精氨酸6%	13774	125	30
H ₂₂	赖氨酸11% 精氨酸9% 甘氨酸11%	14004	129	30
H ₃	赖氨酸10% 精氨酸15%	15324	135	32
H ₄	赖氨酸10% 精氨酸14% 甘氨酸15%	11282	102	28

组蛋白的碱性氨基酸多集中在 N 末端。分子内的赖氨酸、精氨酸和组氨酸常甲基化,而丝氨酸和苏氨酸则常磷酸化或乙酰化。组蛋白带正电荷,可借静电引力与 DNA 结合,形成染色质,而上述修饰作用则可引起组蛋白电荷改变,影响它和 DNA 结合,这或与其功能有关。组蛋白还和 DNA 一样,也是在 S 期合成的, DNA 的复制一旦停止,组蛋白的合成也立刻结束,可见组蛋白和 DNA 是密切相关的。

在胞核的其它蛋白质当中,还有很多也是存在于染色质中的,它们不是组蛋白,所以叫做非组蛋白或酸性蛋白,它们是很不均匀的,分子量在 10,000~15,000 之间,含量变化很大,在不同类型的细胞里,性质也很不相同。并且在同一类型细胞中,染色质由间期进到中期的含量也不相同,可从 1mg/1mgDNA 增至 2.7mg/1mgDNA。

很多酶属于这类蛋白质,如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、NAD⁺ 合成酶、核酸内切酶、多核苷酸连接酶等,它们都与核酸代谢密切相关。还有一种中性蛋白酶,最适 pH 是 7.8,分子量是 24000;还有修饰组蛋白的酶,如甲基化酶、蛋白激酶等,这些都与染色质中蛋白质的代谢以及功能有关。

值得注意的还有调节转录作用的酸性蛋白。组蛋白有抑制 DNA 转录 RNA 的作用,而酸性蛋白却能解除组蛋白的抑制作用,而且还能决定转录何种 RNA。