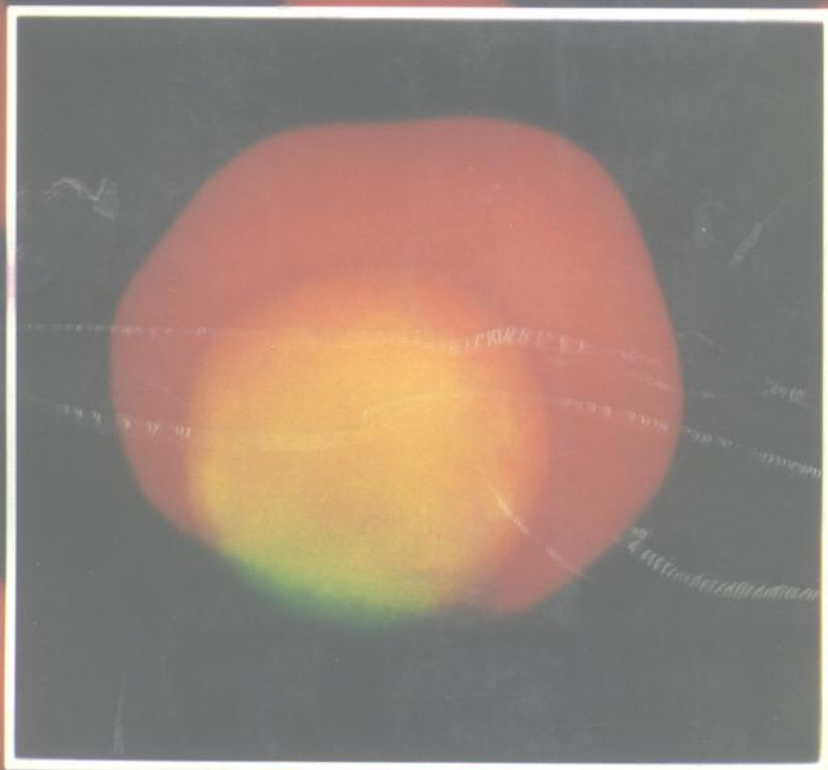


现代细胞化学技术及其 在中医药中的应用

谢锦玉 主编



中医古籍出版社
中国·北京

现代细胞化学技术及其 在中医药中的应用

(附图谱)

主 编 谢锦玉

编 委 高玉民 胡庆和 黄威权

主要编者 谢锦玉 黄威权 胡庆和 高玉民

黄 岩 吴正治 王风兰 刘艳骄

王玉萍 刘铭福 李晓光 孙常义

景向红 叶永安 李 岩 高天顺

赵立业 姚 兵

图片制作 谢锦玉 刘铭福 王玉萍

责任编辑 伊广谦

封面设计 刘艳骄

*

图书在版编目(CIP)数据

北京:中医古籍出版社,1998.4

ISBN 7-80013-749-X

I. 现… II. 谢… III. ①细胞学:生物化学-生物技术-应用-细胞诊断②细胞学:生物化学-生物技术-应用-病理学-研究 IV. R446.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 26407 号

*

现代细胞化学技术及其在中医药中的应用

谢锦玉 主编

中医古籍出版社出版发行

(北京东直门北新仓 18 号 100700)

全国新华书店经销

甘肃省平凉地区行政公署印刷厂印刷

开本:787×1092 毫米 16 开本 15.94 印张 242 千字

1998 年 4 月第 1 版 1998 年 4 月第 1 次印刷

印数:1~5000 册

ISBN—7—80013—749—X/R·745

定价:66 元

内 容 提 要

本书是一部介绍现代细胞化学技术及应用的专著。主要介绍了细胞化学的基本原理、基本技术以及显微分光光度术、流式细胞术、激光扫描共聚焦显微术、电镜细胞化学、免疫细胞化学、原位杂交技术、免疫金银技术、抗独特型抗体的制备、中间丝与肿瘤的鉴别诊断、细胞凋亡及几种基因表达等方面的知识,尤其是较详细地介绍了这些技术在中西药结合研究中的应用,内容丰富,科学性强,实用性广,并附多年研究成果的精致彩色图谱,是现代细胞化学教学和科研的重要工具书和参考书。可供中西医药教师、学生和研究人员、临床医师及农业、生物等专业人员参考应用。

序 言 一

从在试管中研究细胞的组成到在原位(in situ)研究细胞的组成和功能经历了一个漫长的过程。被称为分析细胞学之父的 T·O·Caspersson 于二十世纪四十年代第一次用紫外光显微分光光度术研究了细胞中 DNA 的分布和定量。从此,细胞化学进入了定量阶段;之后又由静态到流动状态;由研究死细胞到活细胞动态;从二维结构到三维立体结构;由分析到分选的阶段。上述进展与光学显微镜技术的改进和发展、特异性的细胞化学探针(显色染料、荧光探针、标记的抗原和抗体、标记的基因探针、绿色荧光蛋白等)以及近年发展的光电检测技术(光电倍增管、摄相机、激光),计算机技术等有着密切的关系。

由谢锦玉教授领衔主编以及其他专家撰写的《现代细胞化学技术及其在中医药中的应用》一书基本上反应了由经典细胞化学到细胞计量学(cytometry)的发展过程,从 50 年代对单个细胞定量的细胞光度术到 70 年代的流式细胞术再到 80 年代的激光扫描共聚焦显微术。书中对各种技术的仪器、原理、样品制备法做了简明的介绍,尤其是根据作者们多年的经验在样品制备各方面做了详细的介绍。

此外,本书还介绍了他们应用上述新技术在中西药研究方面所做的有益的探索,特别是在实践过程中积累了大量精致的图片,以及获得的大量成果。

最后值得一提的是我国已装备了现代细胞化学技术所使用的仪器(除多光子荧光显微镜外),并积累了多年使用的经验。本书在这种背景下出版必将为现代细胞化学术在我国中西医药研究中的更进一步应用做出贡献。

北京师范大学生物系教授 薛绍白

一九九八年三月于北京

序 言 二

《现代细胞化学技术及其在中西医药中的应用》一书,由组织化学和细胞化学专家谢锦玉教授领衔主编,是一部在现代医学和中西医结合应用中都有重要价值的著作。

伴随着分子生物学的发展,现代医学细胞化学有了长足的进步。编者献身于理论探索与中西医结合的研究,应用了流式细胞术、激光扫描共聚焦显微术等新技术。

编者从基础和应用的角度阐述了现代医学技术的基本原理和方法,引用了中国中医研究院基础理论所细胞研究室多年研究成果的精致彩色图谱。该书内容丰富、资料新颖、科学性强、实用性好。这是她数十年来和她的学生们,将现代科学技术应用到中西医结合领域的贡献。

相信本书的出版,对现代细胞化学技术及其在中西医药的发展方面将会起到促进作用。

中国中医研究院教授 张瑞祥

一九九八年三月于北京

前 言

现代科学技术的迅速发展给医学科学研究注入了新的活力,尤其是电子计算机技术在科学研究中的应用,使人们能够借助科学仪器看到更深层次的生命现象,生命科学中的微观现象研究,使许多研究领域都出现了令人惊喜的研究成果。

现代细胞生物学是探索人体微观形态与功能的重要基础学科,而细胞化学正是形态与功能研究的桥梁。特别是新的生物物理学手段的介入,为细胞化学带来了新的气息,在传统细胞化学的基础上,又新出现了免疫细胞化学、电镜细胞化学、电镜免疫细胞化学及各种标记方法;流式细胞术及图像分析技术的新方法和技术,都使细胞化学能够在定性、定位、定量研究方面有所突破。近 10 多年发展起来的激光共聚焦显微技术能够对细胞进行三维立体图象显示,对细胞内化学物质进行更深层次的研究,还可利用微型激光刀对细胞进行筛选、分离、克隆和各种细胞及染色体的微型切割手术、测定膜流动性、膜电位变化、高分子物质的扩散、细胞通透性及相互作用、受体移动等领域的科学研究,展示了良好的发展前景。

主编于 20 世纪 50 年代初得益于著名组织胚胎学专家鲍鉴清教

授亲自指导,60年代又承组织化学和细胞化学专家张作干教授的传授,即从事于医学组织和细胞化学的研究,经数十年苦心努力,不断引进、吸收、发展和应用现代新技术,才使我们能够有机会进行中西医结合的探索性研究,并取得了初步的成果。本书正是在以往工作经验基础上写成的、书内详细介绍了现代细胞化学的原理、方法和实验技术,也介绍了“细胞凋亡”、“细胞通讯”、“细胞分化”、“细胞恶变的早期诊断”等方面的内容;同时还介绍了应用中医药对细胞化学成分影响及机理探讨等方面的研究成果。所附图谱是研究细胞化学技术的重要参考资料,具有一定的科学价值。

本书的作者大多是长期从事中西医结合基础研究的科研人员,有长期从事基础研究的经验,相互之间合作多年,此书的出版正是集体智慧的结晶。相信她的出版定会对中医科学研究和中西医结合基础研究方面的研究人员有所启发,这也是我们为中西医结合事业所尽的微薄之力。

正值世纪之交,新的方法和技术还将不断地出现,只要人们不断努力,细胞化学方法与技术将为医学科学研究作出更大的贡献。

中国中医研究院基础理论研究所

谢锦玉

于一九九七年冬

目 录

前言

第一章 细胞化学概论	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 细胞化学染色标本及其方法的原理	(2)
一、金属—金属盐沉淀反应原理	(3)
二、偶氮偶联法原理	(3)
三、过碘酸 Schiff 氏剂反应法原理	(3)
四、联苯胺法原理	(3)
五、色素形成法原理	(4)
六、脱氢酶显示法原理	(4)
七、底物标记法原理	(4)
八、荧光染色与免疫荧光法原理	(4)
九、酶标抗体法原理	(5)
第三节 细胞化学染色标本制备过程中的注意事项	(5)
第二章 核酸、糖原和酶的细胞化学方法	(7)
第一节 核酸和硫氢基的显示	(7)
一、孚尔根反应显示 DNA 方法	(7)
二、甲绿—派郎宁显示脱氧核糖核酸和核糖核酸	(9)
三、吖啶橙荧光染色显示 DNA 和 RNA	(10)
四、DDD 法显示硫氢基	(11)
第二节 多糖类的显示	(13)
一、过碘酸雪夫反应显示糖元和其它多糖物质	(13)
二、爱先兰—PAS 法显示酸性和中性粘多糖物质	(14)
第三节 脂类的显示	(15)
第四节 酶的显示	(16)
一、碱性磷酸酶的显示	(16)
二、酸性磷酸酶的显示法	(18)
三、三磷酸腺苷酶显示法	(19)

(一)酸性 ATPase 显示法	(19)
(二)中性 ATPase 显示法	(20)
(三)碱性 ATPase 显示法	(21)
四、葡萄糖-6-磷酸酶显示法	(22)
五、5-核苷酸酶的显示法	(22)
六、 β -葡萄糖醛酸酶显示法	(23)
七、 α -醋酸萘酯酶显示法	(24)
八、细胞色素氧化酶显示法	(26)
九、过氧化酶显示法	(27)
十、单胺氧化酶显示法	(28)
十一、琥珀酸脱氢酶显示法	(29)
十二、乳酸脱氢酶显示法	(30)
十三、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶显示法	(31)
十四、还原型辅酶 I 显示法	(32)
十五、还原型辅酶 II 显示法	(33)
第五节 常用缓冲液配制	(34)
第三章 细胞化学定量技术——显微分光光度计	(38)
第一节 概述	(38)
第二节 原理	(39)
第三节 显微分光光度计的组成	(40)
一、光源	(40)
二、单色器和滤光片	(40)
三、显微镜	(40)
四、光电组合件	(40)
五、标本制备	(41)
六、测量方法	(41)
第四章 细胞化学定位和定量技术在中西医领域中的应用	(42)
第一节 在细胞生物学研究中的应用	(42)
第二节 对肿瘤细胞 DNA 的定量研究	(45)
第三节 对中药抗肿瘤作用机理的研究	(47)
第四节 对针刺作用机理的研究	(48)
第五节 对中医“脾气虚”证研究的应用	(49)

第六节	在酒精性肝损伤诊治研究中的应用	(51)
第七节	在运动性肌肉研究的应用	(55)
第八节	中药大蒜油对人宫颈糜烂的细胞化学研究	(60)
第五章	细胞化学技术在中医微观辨证学研究中的应用	(64)
第一节	阴阳虚实辩证的细胞化学研究	(64)
第二节	在舌苔原理研究中的应用	(67)
第三节	寒热辨证舌苔上皮定量细胞化学	(70)
第四节	脾虚患者外周血免疫细胞 ANAE 的细胞化学研究	(72)
第五节	虚实辨证红细胞免疫功能与淋巴细胞 ANAE 活性同步检测	(75)
第六节	慢性肾炎患者外周血细胞化学 ANAE 变化与中医辨证关系 的研究	(77)
第七节	胃脘痛属脾虚者舌苔上皮的细胞化学研究	(79)
第八节	潜熄宁对 2KIC—RHR 心肌糖原含量及琥珀酸脱氢酶活性的 影响	(81)
第九节	潜熄宁对 2KIC—RHR 模型淋巴细胞 ANAE 活性影响	(83)
第六章	流式细胞术及其应用	(87)
第一节	原理	(87)
第二节	标本的制备	(89)
一、新鲜标本的制备		(89)
二、石蜡包埋样品的制备		(89)
三、染色方法		(89)
四、流式细胞术检测人外周血 T 细胞亚群		(92)
五、DNA 倍体分析		(93)
六、流式细胞术分析 Bcl-2 基因蛋白		(94)
第三节	流式细胞术在细胞周期研究中的应用	(94)
一、肿瘤学方面		(94)
二、染色体核型分析		(96)
第四节	流式细胞术在免疫学方面的应用	(96)
第五节	流式细胞术在中药抗癌作用方面的应用	(97)
第六节	流式细胞术在肿瘤细胞凋亡研究中的应用	(99)

第七章 激光扫描共聚焦显微术及应用	(102)
第一节 原理	(102)
第二节 特点	(104)
第三节 功能和应用	(106)
一、单染样品的观察和分析	(106)
二、双染样品的观察和分析	(106)
三、自动图象扫描观察与分析	(106)
四、直方图分析	(106)
五、动态观察	(106)
六、荧光漂白后的光恢复—活细胞内分子运动的测定	(106)
七、细胞间通讯的测定	(107)
八、免疫荧光的定量测定	(107)
九、生物活性物质活性封闭和解封闭的测定	(107)
十、细胞膜流动性测定	(108)
十一、定量共聚焦图像分析	(108)
十二、粘附细胞分选	(109)
十三、细胞内激光显微外科	(109)
十四、应用	(109)
十五、几种荧光染料的染色方法	(112)
第四节 双光子(多光子)显微镜	(115)
一、双光子技术的原理	(115)
二、双光子显微镜的优点	(116)
第八章 电镜细胞化学及其应用	(119)
第一节 电镜细胞化学的基本技术	(119)
一、取材与固定	(119)
二、漂洗组织	(119)
三、预切片	(119)
四、置换缓冲液	(120)
五、孵育	(120)
六、二次漂洗	(120)
七、后固定	(120)
八、脱水、包埋	(120)
九、超薄切片和染色	(120)

第二节 糖类的电镜细胞化学	(120)
一、高碘酸盐—硫卡巴胍—蛋白银(PA-TCH-SP)染色法	(120)
二、透析铁染色法	(121)
三、高铁二胺染色法	(122)
第三节 脂类的电镜细胞化学	(123)
一、基本原理	(123)
二、用品	(123)
三、操作步骤	(124)
四、结果	(124)
五、注意事项	(124)
第四节 酶的电镜细胞化学	(125)
一、酸性磷酸酶	(125)
二、胞嘧啶单核苷酸酶	(126)
三、碱性磷酸酶	(127)
四、5-核苷酸酶	(129)
五、葡萄糖-6-磷酸酶	(130)
六、三磷酸腺苷酶	(131)
七、腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶	(132)
八、烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸酶	(134)
九、焦磷酸硫酸素酶	(134)
十、乙酰胆碱酯酶	(136)
十一、髓过氧化物酶	(137)
十二、血小板过氧化物酶	(138)
十三、单胺氧化酶	(138)
十四、细胞色素氧化酶	(139)
十五、琥珀酸脱氢酶	(140)
第五节 酶电镜细胞化学的注意事项	(142)
第六节 缓冲溶液的配制	(143)
第七节 电镜细胞化学的应用	(147)
 第九章 免疫组织、细胞化学及其应用	 (150)
第一节 免疫组织、细胞化学的原理	(150)
第二节 免疫组织、细胞化学的常用染色方法	(150)
一、免疫荧光法	(150)

二、免疫酶法	(151)
三、抗生物素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物(ABC 法)	(153)
第三节 非特异性染色及染色对照	(154)
一、非特异性染色及其消除方法	(154)
二、染色对照	(155)
三、抗体稀释度	(156)
第四节 原位杂交	(157)
一、探针	(157)
二、试剂配制	(157)
三、标本制备	(159)
四、杂交与显色	(159)
五、原位杂交对照试验	(160)
第五节 免疫组织细胞化学在医学研究中的应用	(161)
一、大鼠胃肠胰系统 IAPP 免疫反应细胞的定位及发育研究	(161)
二、大鼠实验性胃溃疡自愈机制研究	(163)
三、免疫组织细胞化学在消化系统中的应用	(164)
第十章 免疫金银染色技术和抗独特型抗体制备及其应用	(169)
第一节 免疫金银染色技术的基本原理	(169)
第二节 溶胶的基本概念及内涵	(169)
一、分散体系	(169)
二、溶胶的制备	(170)
三、溶胶的纯化	(170)
四、溶胶的颜色	(171)
五、溶胶的稳定性和聚结	(171)
六、影响溶胶稳定性的因素	(171)
第三节 胶体金的制备方法	(172)
一、制备前的准备	(173)
二、制备方法和步骤	(173)
第四节 胶体金标记蛋白质的制备	(175)
一、待标记蛋白和金溶胶的准备	(175)
二、胶体金与待记蛋白质用量比例的确定	(175)
三、胶体金与待记蛋白质的结合	(176)
四、胶体金标记蛋白质的纯化	(176)

五、胶体金标记蛋白质的质量鉴定	(177)
第五节 应用于光镜水平的免疫金银法	(177)
一、免疫组化滤纸模型的应用	(177)
二、石蜡切片的 IGSS 染色	(179)
三、冰冻切片的 IGSS 染色	(180)
四、半薄切片的 IGSS 染色	(180)
第六节 应用于电镜水平的免疫金法	(182)
一、包埋前染色	(182)
二、包埋后染色	(184)
第七节 双重和多重免疫标记方法原理简介	(185)
一、应用胶体金标记特异性抗体的直接法	(186)
二、应用不同种动物产生的特异性抗体及相应的标记二抗的间接法	(186)
三、应用同种动物特异性抗血清及相应的标记二抗的间接法	(186)
四、应用同种动物特异性抗血清及胶体金—葡萄球菌 A 蛋白法	(187)
五、标记抗原法	(187)
第八节 抗独特型抗体在免疫学中的应用	(189)
一、抗体的独特型与抗独特型	(189)
二、抗独特型抗体 Ab ₂ β 的制备与检测	(189)
三、抗独特型抗体在疫苗研究中的应用	(190)
四、抗独特型抗体应用于受体的纯化及定位	(191)
五、抗独特型抗体在实际应用中的利与弊	(192)
第十一章 中间丝的免疫细胞化学及应用	(196)
第一节 中间丝与肿瘤的鉴别诊断	(196)
一、中间丝	(196)
二、抗角蛋白抗体及癌的鉴别诊断	(197)
三、波纹蛋白、结蛋白抗体及软组织肉瘤的诊断	(199)
四、胶质细丝蛋白抗体与胶质瘤的诊断	(200)
五、抗神经丝蛋白抗体与神经瘤的诊断	(200)
第二节 中间丝肿瘤鉴别法遇到的新问题	(201)
一、中间丝的分布似乎并非一定“特异”	(201)
二、中间丝的分布似乎也不是一成不变	(201)

第十二章 细胞凋亡和几种基因表达	(205)
第一节 细胞凋亡的研究简史	(205)
一、细胞凋亡的概念	(206)
二、细胞凋亡的特点	(206)
第二节 细胞凋亡与肿瘤	(207)
第三节 细胞凋亡的机理	(209)
一、核酸内切酶在细胞凋亡中的作用	(209)
二、谷氨酰胺转移酶	(210)
三、蛋白激酶 C(PKC)	(211)
四、细胞凋亡相关基因	(211)
第四节 细胞凋亡的分子调节	(212)
一、c-myc 癌基因与细胞凋亡	(212)
二、- abl 原癌基因	(213)
三、Bcl-2 抑制细胞凋亡及其机理	(213)
四、抑癌基因 p53 与细胞凋亡	(215)
五、ICE 基因	(216)
六、APO - I(Fas)系统	(216)
七、p21 基因和细胞分化及细胞凋亡	(217)
第五节 影响细胞凋亡的因素及肿瘤治疗	(220)
一、诱导细胞凋亡的因素或因子	(220)
二、细胞生长因子去除后细胞凋亡	(220)
三、细胞凋亡的抑制	(220)
四、细胞凋亡与肿瘤治疗	(221)
五、中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究	(222)
第六节 细胞凋亡的检测	(225)
一、细胞通讯检测	(225)
二、细胞凋亡检测	(226)
 中、英文索引	(233)
图谱说明	(237)