

● 侯兰新 陈轶霞 主编

动物细胞

培养技术教程

DONGWUXIBAO
PEIYANGJISHU
JIAOCHENG



甘肃科学技术出版社

动物细胞培养技术教程

主 编:侯兰新 陈轶霞
编写人员:侯兰新 陈轶霞
 乔自林 冯若飞



甘肃科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

动物细胞培养技术教程 / 侯兰新, 陈轶霞主编. — 兰州:
甘肃科学技术出版社, 2009.9
ISBN 978-7-5424-1350-5

I. 动… II. ①侯…②陈… III. 动物—细胞培养 IV.
Q954.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 160605 号

责任编辑 毕 伟(0931-8773274)

装帧设计 毕 伟

出版发行 甘肃科学技术出版社(兰州市南滨河东路 520 号 0931-8773237)

印 刷 兰州中科印务有限责任公司

开 本 787mm × 1092mm 1/16

印 张 11

字 数 275 千

插 页 4

版 次 2009 年 9 月第 1 版 2009 年 9 月第 1 次印刷

印 数 1 ~ 1300

书 号 ISBN 978-7-5424-1350-5

定 价 26.00 元

前 言

动物细胞培养技术是一门实践性很强的课程,全国各高等院校生命科学相关的专业都尝试对本科生开设该门课程,根据不同专业的特点,已经出版了不少适用的教材。

西北民族大学自本世纪初,生物工程和生物技术专业招生以来,就给本科生开设了《动物细胞培养技术》的课程,除了理论部分以外,重点在实验操作技术的训练,为了达到这一目的,学校完全按照 GMP 的要求,装修了全净化的实验室,真正着眼于培养学生的无菌操作观念,同时也使学生摆脱了在超净台前狭小的面积中操作的不便,使实验操作更接近于企业工厂化细胞培养的过程。

本书分为上下两篇,上篇以理论为主,着重讲述了动物细胞培养的基本概念、基本理论、基本要求、基本技术以及应用等方面的内容,下篇由 24 个实验组成。本书的编写原则,除了理论和实验室操作之外,还顾及了工业化生产的过程,使培养的学生能初步具有实验室走向工厂的理念。

本书的编写组成员除了具有一定的理论、实验教学经验和长期在实验室工作的经历之外,还参与了生物工程企业的管理和质检工作,具备了丰富了理论和实践经验,使本书的编写具有了自己的特色。理论部分主要由侯兰新、陈轶霞和冯若飞负责,实验部分主要由乔自林负责,最后由侯兰新统稿。本教材由西北民族大学和甘肃省动物细胞工程中心资助出版,谨此谢忱。

虽然编者竭尽全力,缺点错误在所难免,欢迎师生和读者批评指正。

编 者

2009 年 7 月

目 录

上篇 理论部分

第一章 动物细胞培养概述	/ 1
第一节 动物细胞培养的基本概念	/ 1
第二节 动物细胞培养技术的发展历史	/ 1
第三节 动物细胞培养的优缺点	/ 2
第二章 培养细胞的生物学特性	/ 4
第一节 生存环境和细胞的关系	/ 4
第二节 培养细胞的生长类型和形态特征	/ 5
第三节 培养细胞的增殖和分化	/ 8
第四节 培养细胞的生长和增值过程	/ 15
第三章 动物细胞培养的基本要求	/ 21
第一节 实验前准备	/ 21
第二节 无菌操作要求	/ 25
第三节 培养细胞取材的基本要求和方法	/ 26
第四节 实验后的要求	/ 29
第四章 动物细胞培养的设备	/ 30
第一节 细胞培养实验室	/ 30
第二节 细胞培养的实验室设备	/ 31
第三节 大规模细胞培养设备	/ 41
第五章 动物细胞培养基和培养用液	/ 43
第一节 动物细胞培养基的基本要求	/ 43
第二节 动物细胞培养基的种类	/ 45
第三节 其他培养用液的配制	/ 53
第六章 动物细胞培养基本技术	/ 57
第一节 动物细胞培养的基本条件	/ 57
第二节 原代细胞的制备	/ 58
第三节 细胞计数和细胞活力测定	/ 60
第四节 细胞观察及形态学鉴定	/ 61
第五节 细胞传代培养和纯化技术	/ 65
第六节 细胞保存、复苏与运输	/ 67
第七章 动物细胞培养检测分析技术	/ 69

第一节	动物细胞培养常规检查	/ 69
第二节	动物细胞染色体核型分析	/ 72
第三节	同工酶检测	/ 74
第四节	动物细胞培养物的污染及检测	/ 75
第八章	动物细胞培养显微观察技术	/ 79
第一节	普通光学显微镜的光学部件及使用	/ 79
第二节	倒置显微镜的结构与使用	/ 85
第三节	荧光显微镜的结构与使用	/ 88
第九章	动物细胞培养技术的应用	/ 92
第一节	概述	/ 92
第二节	动物细胞培养技术在疫苗生产中的应用	/ 95
第三节	动物细胞培养在单克隆抗体制备中的应用	/ 96
第四节	外源基因在动物细胞中的表达与产物纯化	/ 101
第五节	动物细胞培育法生产基因重组蛋白药物	/ 104
第六节	动物细胞培养在组织工程中的应用	/ 109

下篇 实验部分

实验一	细胞培养实验室介绍及使用卫生要求	/ 113
实验二	细胞培养的常用设备	/ 116
实验三	实验器材的清洗、包装和灭菌	/ 117
实验四	细胞培养用液的配制	/ 120
实验五	培养细胞的观察	/ 122
实验六	细胞计数及活力检查	/ 123
实验七	细胞原代培养——组织块培养法	/ 124
实验八	细胞原代培养——热消化培养	/ 126
实验九	动物细胞传代培养	/ 127
实验十	细胞冷冻保存	/ 128
实验十一	细胞复苏	/ 129
实验十二	细胞分裂指数和贴壁率测定	/ 130
实验十三	细胞克隆及克隆率的测定	/ 131
实验十四	细胞生长曲线的绘制	/ 132
实验十五	细胞融合	/ 133
实验十六	细胞污染支原体检测	/ 134
实验十七	细胞凋亡的检测	/ 136
实验十八	饲养层细胞的制备	/ 138
实验十九	胚胎干细胞培养	/ 141
实验二十	肿瘤细胞的培养	/ 142
实验二十一	动物细胞大规模培养——转瓶培养法	/ 143

实验二十二	动物细胞大规模培养——微载体培养	/ 144
实验二十三	细胞培养技术的应用——细胞病变试验	/ 145
实验二十四	细胞培养技术的应用——蚀斑形成试验	/ 146
附录 I	细胞培养基应用选择	
附录 II	国内外细胞库	
附录 III	细胞培养常用名词解释	
附录 IV	细胞培养中常用术语的译名	
参考文献		

上篇 理论部分

第一章 动物细胞培养概述

第一节 动物细胞培养的基本概念

动物细胞培养是指将动物活体内取出的组织用机械或化学的方法分散成单个细胞,用培养基制成细胞悬液,在体外适宜的条件下,使细胞生长增殖,并保留其一定的结构和功能特性。动物细胞培养工作侧重于单个细胞或细胞群体的培养,培养过程中细胞再不会形成组织。

动物细胞培养与动物组织培养的不同点在于原始培养的对象不同。细胞培养是单个细胞的悬液,而组织培养则是从生物体内取出的组织块或薄片在体外进行培养,培养的对象可以在体外发生分化并保持组织的结构和功能。细胞培养也并不意味着细胞彼此是独立的,细胞在培养中的生命活动和体内细胞一样,依然相互依存,呈现一定的“组织”特性。从某种意义上,组织培养和细胞培养没有严格的界限,而且组织培养这一概念常常泛指所有的体外培养,也就是器官培养、组织培养和细胞培养的总称。

第二节 动物细胞培养技术的发展历史

动物细胞培养技术发展的历史最早可以追溯到 19 世纪末。当时为了探讨神经轴突形成的理论,开始尝试神经组织的体外培养。

1885 年德国人 Wilhelm Roux 在温热的生理盐水中培养鸡胚神经板组织数天,并且提出了“tissue culture”的概念,这表明了动物细胞培养的萌芽已经诞生。

1887 年,Arrold 把白细胞收集到有生理盐水的小碟中,不仅

观察到白细胞的活动,还存活了一段时间。Jolly 于 1903 年用蝾螈的白细胞作了类似的工作。Beebe 等人在 1906 年运用动物血清培养了犬传染性淋巴瘤细胞达到 3d 的时间,这些工作为动物细胞培养积累了经验,开创了先河。

作为真正意义上的动物细胞培养或者说是组织培养,目前普遍认为是在 1907 年,归功于美国的实验胚胎学家 Ross Granville Harrison 的工作,他在多次组织培养失败的基础上,逐步改进和摸索出了一套有效的方法,被称为“哈里森悬滴培养法”。Harrison 用单盖片覆盖凹穴玻璃,将蛙的胚髓管部的小片组织接种到蛙的淋巴液,对神经细胞突起的生长过程进行了观察,采用这种方法,只要掌握严格的无菌操作,组织能够存活一周,甚至更长的时间。由此为实验动物学家们的工作指出了一条可行之路,Harrison 也被尊称为“组织培养之父”。

作为对这项技术进一步发展做出贡献的不得不提到一位在 Harrison 实验室工作的美国医生 M. T. Burrows,他的创新工作是用鸡血浆代替淋巴液,作为鸡胚组织的支持和营养物质,甚至尝试用胚胎提取液作为培养液同样取得了良好的效果。Burrows 的同事 Carrel 的工作虽然一直为后人所质疑,但其用鸡胚浸出液培养细胞和无菌操作的方法竟然使鸡胚的心脏细胞维持生存了 34 年,传代 3400 次。值得一提的是,Carrel 于 1923 年设计了卡氏瓶培养法,彻底改善了原有的悬滴培养的缺点,不仅扩大了培养的组织细胞的生存空间,方便换液传代,最重要的是减少了由于人为操作不当而带来的污染的机会。近年来相继出现的各种类型的培养瓶、培养皿、试管和多孔培养板等方法都是在此基础上发展起来的。

1933 年前后,Gey 和 Lewis 建立了一种旋转管培养法,也就是将培养物接种到管状培养器皿,再将其固定在一个旋转装置上,这种培养方法的明显优点就是培养物可以在培养液和空气之间交替接触,有利于细胞或者组织的生长。1951 年,Pomerat 建立的灌注小瓶培养法,可以不断地给细胞培养的小室注入新鲜的培养液,又可以排出旧的培养液,为以后培养罐培养细胞提供了一种模式。

在细胞培养方法上的另一个进展就是建立单层细胞培养法。从 1955 年开始,Sanford 等人发明了用胰蛋白酶消化分离组织的方法,使这一技术应运而生。在培养液的研究和改进方面,主要来自于 1951 年 Eagle 研发的用人工合成的培养基来代替天然培养基,虽然目前大多数的人工合成培养基依然需要添加血清,但已经有研究表明无血清培养基的研发工作正在一些细胞培养的领域中得以不断探索和成熟。

第三节 动物细胞培养的优缺点

动物细胞培养技术在长期的理论研究和应用的过程中逐渐形成了自己的一套体系,成为一门新的学科,其优点可以从以下几点来总结:

(1) 无论是原代培养还是传代培养,都是活的动物细胞,可以根据实验的需要,长期保持细胞的活力;可以不断地传代,长时间地进行监控;可以获得细胞在脱离了生物有机体以后,在孤立生存的条件和培养条件下表现出来的各种生物学功能。

(2) 可以人为地控制细胞培养的条件,除了培养液可以有效地控制之外,根据不同的要求也可以设计其他的实验条件,包括 pH、温度、O₂ 和 CO₂ 的浓度等各种物理和化学的条件,也可以包括控制某些生物因素的影响。

(3) 可以获得均一性比较好的大量的细胞群体,即便是原代细胞,经过一定次数的传代

之后,也会改变原有的组织特性,得到类型很单一的细胞,使得细胞的生物学性状基本相同,对实验因素的反应也会变得比较一致。这对于某些需要大量样本的活体实验,除了克服了个体差异可能带来的偏差,同时也大大降低了实验成本。

(4) 易于观察到实验的结果,利用细胞培养技术,结合多种研究手段,可以揭示细胞的生命活动规律。运用倒置显微镜、计算机分析技术、显微摄像等直接可以获得活细胞研究的结果。电子显微镜的应用,使得活细胞的超微研究已经取得了辉煌的成就。

(5) 可以提供的动物细胞种类极其广泛,从最低等的生物一直到高等动物的细胞,甚至于人类的细胞,均可以进行培养而作为研究的材料。同一个动物物种又可以从不同的组织和器官获取细胞培养的材料,即便是一些病理性的组织同样可以用于细胞培养,比如肿瘤细胞。

(6) 研究领域十分广泛,多种学科都可以应用动物细胞培养技术,例如免疫学、遗传学、肿瘤学等等。目前由于流式细胞仪的运用,细胞培养已经成为临床诊断的一个辅助手段;在生物制药企业,大规模细胞培养依然是疫苗生产的一个重要环节。

动物细胞培养虽然给我们带来了诸多的优点,但也有其局限性。由于培养的细胞脱离了机体复杂的环境条件,其细胞生物学行为,如增殖、生长、形态、功能和分化等,发生了与在体内时不同的一些特殊变化,出现很多与在原体内时不同的规律。尤其是体外反复传代、长期培养的细胞,有可能发生染色体非二倍体改变等情况。因此,应将体外培养的细胞视为一种既保持动物体内原细胞一定的性状又具有某些改变的特定的细胞群体。体外培养细胞特殊行为的表现,仍然是以一般生物学为基础,实际上也是细胞生物学知识的扩展。

(侯兰新)



第二章 培养细胞的生物学特性

第一节 生存环境和细胞的关系

体内和体外是细胞两个不同的生存环境,体内如同一个有序的社会,个体细胞间互相依赖,每个成员既有一定的“自由”,也必须服从整体的调控。体外培养条件是人们模拟体内环境而创建的,虽与体内有相似性,但尚不完备;尤其单层环境是静止的,与体内差异更大(表 2-1)。

表 2-1 体内细胞和体外培养的大体差异

生存环境和条件	体内	一般单层培养	三维培养(灌流)
环境	自然	人工	人工
存在形式	立体	平面(二维)	立体(三维)
生命运作方式	动态	静态(相对)	人工动态
营养物质供应	自动更新	周期性人工更换	相对稳定
代谢物排除	随时更新	周期性积累和更新	相对稳定
生长因子	自控	周期性调控	可调控
分化调控因子	自控	紊乱(也可调控,困难)	可调控
温度	稳定	相对稳定	相对稳定
pH	稳定	相对稳定	相对稳定

体内细胞生存在动态环境中,所处微环境随血液和淋巴液的循环不断更新,营养成分不会枯竭,代谢产物不会堆积。而一般培养中,细胞处于相对静态,细胞从培养液中摄取所需营养成分和各种调控因子,它们的代谢产物也直接排入培养液中,随培养时间的延长和细胞数量的增多,会出现培养液衰败现象和 pH 改变,从而必须周期性更新培养液。近年来发展起来的一些大规模细胞培养技术,如中空纤维细胞培养,反应器内数千根中空纤维纵向布置,模拟细胞在体内生长的动态环境,提供近似生理条件的体外生长微环境。纤维管内灌流培养液,管外壁则供细胞黏附生长,营养物质通过半透膜从管内渗透出来供细胞生长;细胞的代谢废物通过半透膜渗入管内被带走。是具有很多优点且最具应用前景的培养方法之一。

在细胞和培养液的关系上,细胞完全依赖于培养液,但也非完全被动,细胞对培养液具有同化作用,表现在消耗营养液的同时也能向培养液中释放一些类生长因子和酶类,使培养液更易被细胞自身所利用。尤其是永生细胞系和肿瘤细胞,它们同化培养液的能力更为强烈,致使他们生存过的培养液能被用做条件培养基(Conditional Medium),用做培养其他细胞之用。

现已证明,组织细胞的各种生命活动,如增殖生长、形态、功能和分化等,都与细胞外基

质有关。体外单层培养细胞因附在底物平面上生长,缺少立体支架,只能向二维发展,是细胞发生改变的重要原因。这一结论已成为创建三维培养的根据,用来创建与体内组织近似的生存构型,使细胞恢复或保持与体内生理状态相似的方法,如前述的中空纤维细胞培养方法。

随组织细胞生存环境的不同,细胞性状呈不同的生理状态(表 2-2)。

表 2-2 不同环境中细胞的性状

细胞性状	体内	一般单层培养细胞表型	三维培养细胞表型
空间结构	立体	长宽(扁形)	立体
细胞群	异质群	单一类型细胞增多	分化群
形态	固有	改变	与固有近似
增殖性	受控	旺盛(趋向自主)	趋向正常
增殖规律	有协调性	有周期性(随传代而变)	趋向协调
固有功能	有	降低或丧失	可诱导发生
分化现象	有	紊乱、降低或丧失	趋向增加(或有限)
生命期	有限	有限(趋向无限)	有限
遗传稳定性	稳定	较易转化	趋向稳定

由于单层培养细胞具有遗传不稳定性的特点,因此,一旦初代培养成功,若不很快作为各种实验目的之用,传很少几代后,就需要低温冻存。否则,经反复传代后,很容易发生细胞遗传性状的改变,甚至发生永生(Immortalization)或恶变(Malignancy)。

第二节 培养细胞的生长类型和形态特征

一、培养细胞的生长类型

按细胞的贴附性,体外培养细胞分为贴附型和悬浮型两种类型。

(一) 贴附型细胞

目前已有很多种细胞能在体外培养生长,包括正常细胞和肿瘤细胞。例如:成纤维细胞、骨骼组织(骨及软骨)、心肌和平滑肌、肝、肺、肾、乳腺、皮肤、神经胶质细胞、内分泌细胞、黑色素细胞及各种肿瘤细胞等。这些细胞在活体体内时,不同种类的细胞均具有其特殊的形态。但处于体外培养状态下时,贴附生长型细胞常在形态上表现的比较单一化,失去其在体内原有的一些特征,并且反映出其胚层起源情况,判断细胞形态时不能按体内组织学标准判定,仅大致分成以下四型(见图 2-1):

1. 成纤维细胞型:本型细胞的形态类似在体内生长的成纤维细胞,胞体呈梭型或不规则三角形,中央有卵圆形核,胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起。除真正的成纤维细胞外,凡由中胚层间充质起源的组织细胞,如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮细胞等常呈本型状态。另外,凡培养中细胞的形态与成纤维类似时皆可称之为成纤维细胞。因此组织培养中的成纤维细胞一词是一种习惯上的称法,此点与体内细胞不同。

生长特点:排列成放射状,漩涡状生长。

2. 上皮细胞型:指形态上类似上皮细胞的多种培养细胞,细胞呈扁平不规则多角形,中

央有圆形核,细胞相互依存性强,彼此紧密相连成单层膜。生长时呈膜状移动,处于膜边缘的细胞总与膜相连,很少单独行动。起源于内、外胚层的细胞如皮肤表皮及其衍生物、消化管上皮、肝胰、肺泡上皮等皆呈上皮型形态。

生长特点:细胞紧密相连成单层膜,呈铺石状。

3. 游走细胞型:细胞呈散在生长,一般不连成片,胞质常突起,呈活跃游走或变形运动,方向不规则。此型细胞不稳定,有时难以和其他细胞相区别。在一定条件下,由于细胞密度增大连接成片后,可呈类似多角形;或因培养基化学性质变动等,也可能变成成纤维细胞形态。

4. 多型细胞型:有一些细胞,如神经细胞难以确定其规律和稳定的形态,可统归于此类。

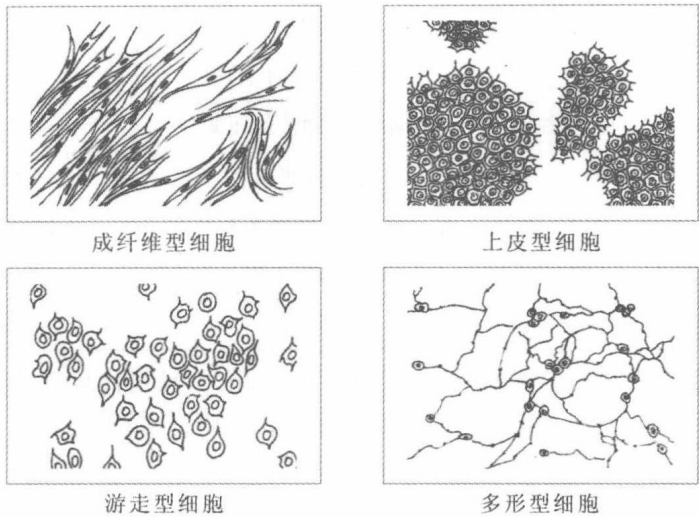


图 2-1 体外培养细胞分型

(二) 悬浮型细胞

见于少数特殊的细胞,如某些类型的癌细胞以及取自血、脾或骨髓的细胞,尤其是血液白细胞和癌细胞。胞体圆形,不贴附于支持物上,在悬浮状态下即可生长,可以是单个细胞或微小的细胞团。这类细胞容易大量繁殖且传代方便。

对组织培养细胞形态的分类,主要根据细胞在培养中的表现以及描述上的方便而定。众多培养细胞的形态稳定性,是在培养液成分、pH、温度、体外生存时间以及细胞本身的性状等条件不变的情况下才能维持。因此形态上只有相对的稳定性,仅在一定程度上能反映细胞的起源,正常和异常(恶性)也可能区别开来。但是培养条件的稳定性在一般情况下很难做到,所以,培养细胞虽然在良好培养条件和传代不多的情况下,各类特点基本能表现出来,但可因 pH 改变、反复开关温箱、支原体污染、细胞数量增多等条件的变化而发生改变。例如, Hela 细胞本身是上皮细胞型,但若培养的条件过酸或过碱时,则可呈现为梭形而似成纤维细胞样;有些细胞在高血清浓度中生长时为细长的成纤维细胞状,在低血清浓度中则更似上皮样。贴附型和悬浮型细胞性质也不是绝对一成不变的,在一定条件下,悬浮型细胞可呈贴附状生长,贴附型细胞也可呈悬浮状生长。当细胞发生转化后,细胞形态变化更大,如成纤维细胞转化后可变成上皮形态。另外在一些类型相同的细胞之间,如癌细胞等,也难以在形态上看出有什么明显区别。因此,培养细胞的一般形态,作为判定细胞生物学性状的一个指标或依据时,并不是一项十分可靠的标志,只能作为一般性参考,不应仅仅依赖光学显微镜观

察所见,必要时须做超微结构和其他方法的分析,如电镜下观察到桥粒时,可确认为上皮型细胞,因为桥粒是上皮细胞所特有的结构,光镜下不可见,只有在电子显微镜下才能观察到。因此电子显微镜所提供的形态学论据显然更为可靠。

二、培养细胞的形态结构

培养细胞的形态结构与体内细胞基本相同,但在大体形态以及某些细微结构方面仍存在着一定的差异。

(一) 大体形态

根据细胞是否贴附于支持物上生长和支持物的构型不同,形态有所不同。呈悬浮生长时,不论细胞来源于体内何种类型细胞,由于生长在液体环境中,胞体基本呈圆形。当贴附于支持物表面后,开始仍为圆形,但为时很短,很快便经过形态演变过渡成扁平形态。附于球体表面时,细胞与球体呈同心圆层;支持物表面平坦时,细胞先由圆形延展成圆饼形,此时的细胞可称之为放射延展细胞(Radial Spread Cell)。其细胞质可区分为:①中心区或内质,细胞中央为细胞核,核周围胞质稠密区即内质(Endoplasm),内含有较多的细胞器(主要为线状或颗粒状线粒体和内质网);②外质(Exoplasm)或板层区,是胞质外周部分,无色透明,包绕内质,用特殊的染色法,在外质中可显示出微丝和微管。放射延展细胞持续0.5~2小时便过渡为极性细胞(Polarized Cell)。极性细胞可呈纺锤形、三角形、不规则多角形等多种形态。极性细胞形态常随细胞运动发生改变。它们外质的周边部可分为活跃与不活跃的两部分,不活跃部分比较稳定,活跃部常伸出伪足,使细胞发生定向运动。有时细胞从悬浮状贴附于支持物上后,也可不经过放射延展阶段直接进入极性细胞。当细胞相互接壤成片后,极性常变得不明显,外质周边部也无明显活跃部分与不活跃部分的差别。

在一般光镜下直接观察体外培养健康活细胞时,细胞是均质而透明的,结构极其不明显。只有用相差显微镜才能看清细胞轮廓和内部结构。在细胞机能状态不良时,细胞轮廓会增强,反差增大。在胞质中会出现颗粒、脂滴和空泡等,是细胞代谢不良的表现。反差很大的暗色小颗粒是变形的线粒体。细胞形态结构与细胞在体外生存时间的长短、细胞种类等有直接关系。初代培养的正常二倍体细胞,除大体形态外,在构造和生物学性状上与原体内细胞近似性大,细胞均质性和透明度都很强。随细胞在体外生活时间的延长和反复传代,会发生一定的变化,如轮廓增强、核仁增多、有时出现双核或多核巨细胞等。如细胞发生转化,它们的形态发生的变化更大。

(二) 超微结构

电镜下观察培养细胞膜亦分为三层结构,总厚度约7.5nm,由双层类脂分子组成,亲水极互相对应,疏水极向外,双层分子间嵌有蛋白质分子。细胞膜向外凸出形成泡状、叶状、丝状和指状突起,长度比较一致,存在时间也长,这类突起称微绒毛。随细胞类型、正常或异常(肿瘤细胞),以及处于周期阶段不同,微绒毛的形状和数量均有差别。即使细胞连接成片时,在细胞之间仍存在着一定的间隙。成纤维细胞之间的间隙不恒定,上皮细胞相互之间一般有1.5nm~15nm的间隙,细胞相互接触部可见到桥粒(Desmosome);桥粒的有无可作为识别上皮细胞的标志。细胞膜表面常附有由细胞分泌形成的糖蛋白膜,即细胞外衣,它对细胞的运动,尤其对细胞贴附于支持物生长有很大作用。用胰蛋白酶消化处理细胞,能改变细胞外衣的性质,使细胞易从支持物上脱落下来,此外细胞外衣与物质交换、酸碱平衡及膜电位等均有一定的关系。在细胞膜下面有一层厚100nm~500nm的胞质区,称膜下皮质层。该层具有

中等电子密度,其中常见有直径 5 nm ~ 7nm 的微丝。微丝在膜下皮质层中分布甚广,它们主要由多聚肌动蛋白组成。它们在膜下皮质层中有两种存在形式,一是呈不定形基质,二是组成微丝束,后者可观察到。当细胞在悬液中生长或从支持物脱离时,微丝可能消失再变成不定形基质,当细胞贴附于支持物后,胞质延展,微丝又出现。微丝受温度的影响,低温时解聚,温度恢复又重新组装再现。微丝可逆性变化存在形式,与微丝组成成分肌动球蛋白有密切关系。微管是另一种细丝,比微丝粗而长,由微管蛋白(Tubulin)组成,呈中空状,分散在细胞中各处。微丝和微管构成细胞质中骨架系统(Cytoskeleton System:CSS);CSS除与细胞形态和细胞运动有关外,对细胞膜的功能如吞饮、免疫反应等都有关系。细胞松弛素 B(Cytochalasin B)、秋水仙素(Chochicine)和刀豆球蛋白等对细胞的特殊效应也与 CSS 有关。转化细胞中的 CSS 的排列状态与正常细胞不同,正常细胞中的微丝微管走行有一定方向性,细胞转化后走行紊乱(组装差),被视为一项检测的标志。微丝和微管在光学显微镜下也可观察到。

细胞质中的其他结构如线粒体、内质网、高尔基复合体、中心体和溶酶体等多集中在细胞内质。线粒体形态结构与体内细胞相似,但常随细胞生长状态不同有很大变化,在机能状态良好的细胞中,呈杆状或卵圆形,数量较多;当细胞机能低下或代谢不良时,能变成颗粒形或集聚成更大的团粒,在光镜下明显可见。

细胞核超微结构与体内细胞无大差别,核膜仍为双层结构,也能看到核孔。女性细胞核仍可见到 Barr 氏体。永生性细胞系和肿瘤细胞的细胞核一般比较大,染色质比较丰富,核仁大而多。

第三节 培养细胞的增殖和分化

细胞增殖和分化是细胞生命过程中两个最基本的生命活动。细胞增殖就是细胞自我复制,分化是其形态和功能上发生的变化;分化比增殖更为复杂。增殖和分化是细胞一切正常和异常包括癌变在内的生理表型(Phenotype)发生的基础。分化态也可视为细胞的功能态,是所有细胞完成主要特定表型的阶段。一般说,处于增殖态的细胞不进行分化活动,而处于分化态的细胞不进行增殖,两者相依、协调和平衡,又相互制约。在机体发育畸形和发生癌变时,细胞分化的特征和意义会表现的更加明显。而体外培养的细胞,培养一经开始,细胞分化异常便显现出来,培养细胞的形态和功能与体内存在明显不同。培养细胞的增殖和分化在组织工程中,尤其是在干细胞的三维培养中有着极为重要的实际意义。

一、培养细胞的分化

细胞离体培养因环境的改变,可能发生如下的变化:

1. 不适应(Deadaption):表现在因生存条件的改变使细胞在原体内时所拥有的分化特性减弱或不显,分化发生阻抑。细胞刚离体培养时,先出现的现象可能属不适应,即由于环境的改变而出现的变化。

2. 去分化或脱分化(Dedifferentiation):是指细胞失掉发生分化的能力,表现出类似未分化的间充质细胞的特性。不适应和脱分化两者概念不同。不适应是因生存条件的改变使分化发生阻抑;从分子水平考虑,脱分化很可能是基因变异所致,因此应分析体外培养细胞分化的改变属何种性质。很多细胞在培养中的改变只是因培养环境的改变和分化因子的缺乏,导致细胞分化表达受阻、分化基因表达抑制或不充分而已。但即便是脱分化也并不意味着细胞

分化能力完全丧失,关键在于是否存在使细胞分化的条件,如小鼠红白血病细胞(Friend,s cell)在一定的因素作用下可以合成血红蛋白;血管内皮细胞在类似基膜物质底物上培养时能长成血管状结构;杂交瘤细胞能产生特异的单克隆抗体,这些均属于细胞分化行为。

3. 体外培养细胞具有“返祖”现象:

(1) 去分化并不意味着完全返回胚胎时期的原始细胞状态。如高度分化的神经细胞和肌细胞已经丧失的增生活性不可能恢复,但已经具备的生物电活动特性不会完全失去。

(2) 可重新表现出分化特点。各种分化细胞,逐渐失去各自的形态与功能“个性”,表现出某种趋同性。如:培养的成纤维细胞在适当刺激下,可分化为其他结缔组织细胞和肌组织细胞。

总之,体外培养使细胞结构与功能上的“可塑性”增大。体外培养细胞不仅有分化潜能,实际上随细胞来源、种属和遗传性状的不同,很多细胞也仍然呈现着一定程度的分化表达现象(表 2-3)。

表 2-3 一些呈现有分化特性的细胞系和细胞株举例

组织来源	细胞系	增殖性	物种	分化性状
脾	Friend	永生	小鼠	合成血红蛋白
Morris 肝癌	HTC	永生	大鼠	酪蛋白转移酶诱导
髓性白血病	K562	永生	人	合成血红蛋白
垂体瘤	GH ₂ 和 GH ₃	永生	大鼠	产生生长激素
黑色素瘤	B16	永生	小鼠	产生色素
髓性白血病	HL60	永生	人	合成球蛋白
胶质瘤	CCM	永生	人	胶质纤维酸蛋白
成神经细胞瘤	C1300	永生	人	生长轴突

二、细胞增殖周期(Cell Proliferational Cycle)

(一) 细胞增殖周期的概念

细胞周期是描述细胞增殖和分化交替发生变化的概念。而细胞增殖周期主要是从细胞增殖角度赋予细胞活动的概念,两者不应混为一谈。细胞增殖周期是指细胞从一次分裂结束开始生长,到下一次分裂结束所经历的过程。根据细胞增殖周期不同时期的生化特点,划分为四个连续的时期,即 G₁ 期(DNA 合成前期),S 期(DNA 合成期),G₂(DNA 合成后期),M 期(有丝分裂期)。如以 G₁ 期为起点,那么细胞增殖周期的各时期应循着 G₁-S-G₂-M 的顺序进行,G₁、S、G₂ 三期合称为细胞间期,此期完成细胞生长过程。M 期完成遗传物质的分配(见图 2-2)。

因此,细胞增殖周期 = 间期(G₁ 期 + S 期 + G₂ 期) + 分裂期(M 期)

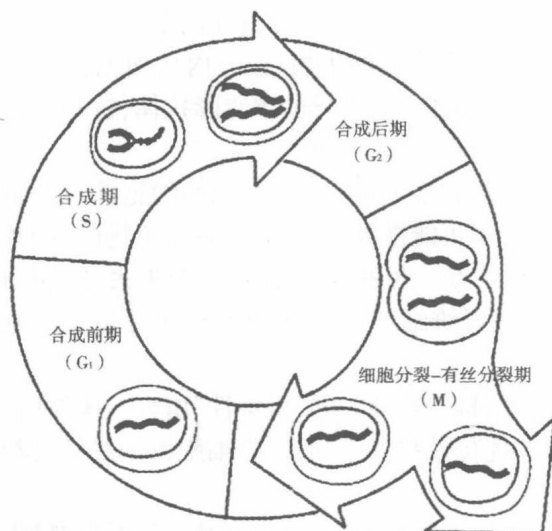


图 2-2 细胞增殖周期

(二) 细胞增殖周期各阶段要点

1. DNA 合成前期(G_1 期):发生于上一个增殖周期的分裂期后,即 DNA 合成前期,也是分裂后期。 G_1 期是细胞进入增殖的始动阶段,标志细胞已进入增殖态。此期细胞内进行着一系列极为复杂的生物合成变化,如合成各种核糖核酸(RNA)及核蛋白体等,没有 G_1 期,细胞不能发生 DNA 的合成。上一次细胞增殖完成后,是否再进入 G_1 期取决于外源生长因子(Growth Factor)和其他增殖相关因子的调控。细胞进入 G_1 期后,仍然受其他因子以及营养物质的影响。近年证明, G_1 期因营养物质缺乏和在调节因子的作用下,可发生阻滞,使 G_1 期延长,发生阻滞的 G_1 期可称为 G_0 期。体外培养细胞在营养不充分或缺少生长因子时,细胞可长时间停留在 G_0 期。各种细胞 G_1 期持续时间差异很大,短则 4~6 小时,长者可达数日。增殖旺盛细胞的 G_1 期持续时间短,衰退细胞则时间长。处于 G_1 期末的细胞体积较大,是显微镜下唯一可感知的变化。

2. DNA 合成期(S 期):从 G_1 末期到 S 初期,细胞内迅速形成 DNA 聚合酶及四种脱氧核苷酸。S 期主要特点是利用 G_1 期准备的物质条件完成 DNA 复制,并合成一定数量的组蛋白,供 DNA 形成染色体初级结构。在 S 期末,细胞核 DNA 含量增加一倍,为细胞进行分裂做了准备。本期为遗传物质较易受损的时期,因 DNA 在合成过程中,其核苷酸双链分离,易于受到致突变或致癌物的影响。各种细胞的 S 期持续时间差别不大,平均 6~8 小时。

3. DNA 合成后期(G_2 期):又称细胞分裂前期。这一时期的主要特点是为细胞分裂准备物质条件,DNA 合成终止,但 RNA 和蛋白质合成又复旺盛,染色质完成螺旋化等。在 G_2 期,蛋白质的合成与细胞的分裂有关,若阻断这些合成,细胞便不能进入有丝分裂期。细胞在本期中对周围环境较敏感,易因温度、pH 等因素的影响而受干扰,停滞于 G_2 期;但当这些不利因素去除后常能恢复。本期持续时间较短而恒定,约 2~5 小时。

4. 分裂期(M 期):又称有丝分裂期。是细胞周期的终结期,此时每个细胞将分裂成两个子细胞。细胞处于分裂状态时称为分裂相。细胞分裂相的多少可作为判断细胞生活状态和增殖旺盛情况的重要参考指标。M 期整个持续时间很短,也较稳定,一般只有 1~2 小时左右。细胞的分裂期根据其主要变化特征,可分为前期、中期、后期和末期四个分期。