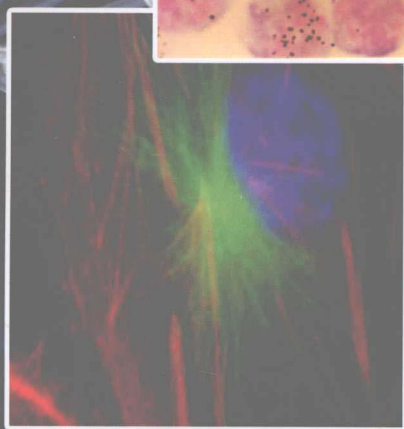
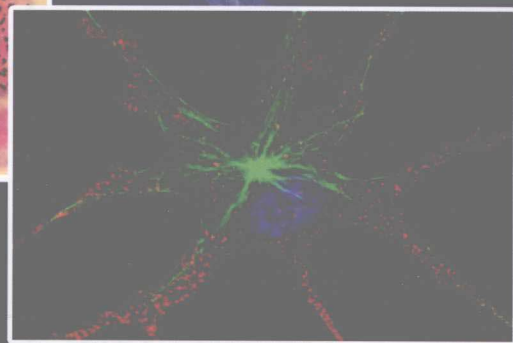
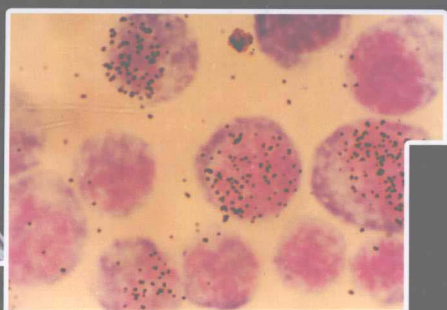


细胞生物学技术

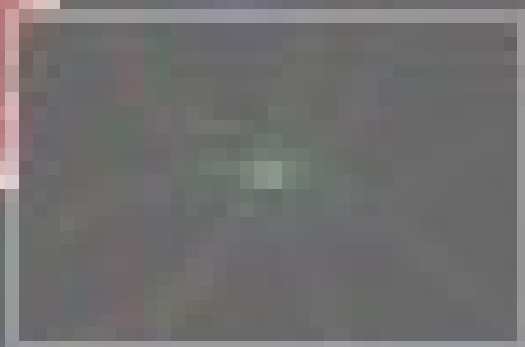
吕冬霞 主编



科学出版社
www.sciencep.com

细胞生物学技术

第2版



高等教育出版社
Higher Education Press

细胞生物学技术

主 编 吕冬霞
主 审 罗佳滨
副主编 侯 霞 张金波
编 委 (按姓氏笔画排序)
马红星 吕冬霞 朱金玲
刘 爽 吴庆田 张玉萍
张金波 张春斌 张淑红
范晓艳 林红霞 罗 兰
罗佳滨 金岳雷 侯 霞

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

细胞生物学技术是生命科学工作者必备的知识和技术。本书编写内容由浅入深,既注重了对从事生命科学研究新手的基础实验技术培养,又介绍了近年来所发展的高新技术。每项技术都列出了基本原理、实验准备、实验步骤、结果分析、注意事项等条目,便于教学和学生自学。本书共分7章:第一章绪论;第二章介绍组织培养的知识与技术基础;第三章介绍细胞形态结构观察技术;第四章介绍细胞内化学组分测定分析技术;第五章介绍细胞生命现象研究技术;第六章介绍细胞工程技术;第七章介绍最常用的细胞分子生物学技术。

本书系统地介绍了细胞生物学实验技术体系,侧重对实验技能的培养,是一本从事生命科学研究实验技术工具书,适合高等医药院校从事生命科学研究的研究生和工作者使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学技术 / 吕冬霞主编. —北京:科学出版社,2010.3

ISBN 978-7-03-026834-1

I. 细… II. 吕… III. 细胞生物学 IV. Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 030706 号

策划编辑:朱 华 李国红 / 责任编辑:许贵强 李国红 / 责任校对:林青梅
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>

铭浩彩色印装有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年3月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010年3月第一次印刷 印张:17 1/2

印数:1—2 000 字数:415 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生命科学是实验科学,细胞生物学理论体系的形成与发展,更是以细胞生物学实验技术的拓展与创新为基础的。近年来,细胞生物学与分子生物学实验技术体系趋于融合,构成了从事生命科学研究的核心技术体系,是生命科学工作者必备的知识和技术。在本科教育阶段,开设的细胞生物学课程侧重学习细胞生物学理论基础,由于学时有限,对于细胞生物学实验技术缺乏系统的学习;由于实验条件有限,对实验技能的培养更是严重不足。因此,在研究生教育阶段,开设水平较高的细胞生物学实验技术课程,已经成为高校生命科学相关专业教师的共识。

早在1987年我们就为佳木斯大学生命科学类专业研究生开设了《细胞生物学实验技术》课程,经过多年的教学实践,积累了一定的经验,形成了比较系统的细胞生物学实验技术教学内容体系。我们的教学参考书借鉴了国内外同行的多部著作,而自编一本较为系统地反映现代细胞生物学实验技术体系的研究生教材更是我们多年的愿望。同时,这本书也应该是一本从事生命科学研究的实验技术工具书。

本书共分7章:第一章绪论;第二章介绍组织培养的知识与技术基础;第三章介绍细胞形态结构观察技术;第四章介绍细胞内化学组分测定分析技术;第五章介绍细胞生命现象研究技术;第六章介绍细胞工程技术;第七章介绍最常用的细胞分子生物学技术。

本书编著的特点是:①编写内容顺序由浅入深,既较全面地概括了细胞生物学实验技术体系,又注意了繁简得当和著作篇幅的控制;②文章的编写既注重了对从事生命科学研究新手的基础实验技能培养,又加强了对近年来所发展的高新技术的介绍;③每项技术的介绍都列出了实验准备、实验步骤、结果分析、注意事项等条目,这样便于教师教学,也便于学生自学;④选编的细胞分子生物学技术仅是科学研究实践中最常用的技术,避免了编写篇幅太大,又体现了细胞生物学与分子生物学融合的趋势。

本书编写借鉴了国内外多部著作的内容,在本书的参考文献中均有体现。本书由多位有实验室工作经验的教授、博士、留学回国学者参与编写,但水平仍觉不足,书中错误和欠妥之处在所难免,敬请批评指正。

本书编写过程中得到了佳木斯大学研究生学院、基础医学院等部门领导的支持,在此一并表示感谢!

吕冬霞

2009年9月

目 录

前言

第一章 绪论	(1)
第二章 组织培养的知识与技术基础	(5)
第一节 组织培养的知识基础	(5)
第二节 组织培养的技术基础	(20)
第三章 细胞形态结构观察技术	(57)
第一节 光学显微镜技术	(57)
第二节 激光扫描共聚焦显微镜技术	(76)
第三节 电子显微镜技术	(78)
第四节 细胞形态结构观察样品制备技术	(82)
第四章 细胞内化学组分测定分析技术	(90)
第一节 免疫组织化学技术	(90)
第二节 放射自显影术	(101)
第三节 流式细胞术	(109)
第四节 细胞器组分的分析、分离技术	(118)
第五章 细胞生命现象的研究技术	(129)
第一节 细胞生长增殖研究技术	(129)
第二节 细胞凋亡研究技术	(138)
第三节 细胞遗传学研究技术	(158)
第四节 肿瘤细胞学研究技术	(178)
第五节 药物测试的细胞模型	(183)
第六节 膜片钳术	(193)
第六章 细胞工程技术	(199)
第一节 细胞融合技术	(199)
第二节 单克隆抗体制备技术	(206)
第三节 细胞拆合与显微操作技术	(219)
第四节 DNA 转染技术	(224)
第五节 转基因动物技术	(229)
第七章 常用细胞分子生物学技术	(238)
第一节 电泳技术	(238)
第二节 细胞基因组 DNA 提取及目的基因鉴定分析技术	(247)
第三节 细胞总 RNA 提取及目的 RNA 鉴定分析技术	(259)
第四节 细胞总蛋白质提取及目的蛋白鉴定分析技术	(266)

第一章 绪 论

细胞是生命体的基本结构和功能单位。细胞生物学是以细胞为研究对象,从细胞整体、细胞超微结构和生物大分子水平上把细胞的形态结构与生理机能联系起来研究,把细胞的生命活动与生物体整体生命活动联系起来研究,从而揭示各种生命现象的物质本质及其规律的学科。细胞生物学是实验科学,其理论体系的发展依赖实验技术的进步。现已形成的丰富的细胞生物学实验技术体系,是生命科学工作者从事科学研究的重要工具。

一、从生命科学的发展趋势谈细胞生物学

从 19 世纪中叶以来,生命科学迅猛发展,呈现出以下发展趋势。

(一) 由宏观向微观

光学显微镜的发明使人类观察到了生命体的基本结构单元——细胞。20 世纪 40 年代,电子显微镜问世,对生命物质本质的研究进入细胞超微结构水平。20 世纪 50 年代,高速离心机、电泳层析、分光光度计和分子标记等物理和化学技术方法引入生命科学研究,增强了细胞超微结构的化学组分和生物大分子的分离分析能力。20 世纪 70 年代以来,不断发展的基因操作技术推动了对生物大分子的结构和功能研究。上述实验研究的成果提升了人类揭密各种生命现象物质本质的能力,奠定了细胞生物学理论体系形成的基础。

(二) 由分析到综合

人类对生命的认识,是一个由简单到复杂的过程。对于简单生命现象的分析研究比较容易取得成果,促进了知识的积累。而对复杂生命现象的研究,则需要综合多方面、多层次的研究成果,经归纳、联系、推理的过程,从而揭示复杂生命现象的本质和规律。19 世纪生命科学杰出的成就之一——生物进化论,是达尔文综合了当时的诸多学科领域的研究成果,包括生物分类学、比较解剖学、古生物学、胚胎学、细胞学等,科学地揭示了物种起源这一复杂生命现象的本质和规律。可以认为,细胞与分子生物学理论体系的形成是生命科学的又一重要成就。细胞生物学不是研究单一生命现象的学科,而是综合了在细胞超微结构水平和分子水平上对各种生命现象的现代研究成果而形成的理论体系,是生命科学的综合性基础学科,是进一步研究复杂生命现象,探索生命奥秘的工具学科和前沿学科。

(三) 由解释生命到改造生命

由于现代生命科学的发展,使人类解释生命的能力大大增强。然而,人们更感兴趣于改造生命,创造超自然的生物品种以及生命现象为人类所利用。在生命科学发展中,形成了细胞工程和基因工程系列理论和技术,就其内容而言,也应属于细胞和分子生物学的组成部分。这是一个可以同生产实践产生密切联系的高科技领域,其派生的生物产业已经产生了

巨大的经济效益。因此,细胞生物学是生命科学基础理论与生产实践相结合的桥梁学科。

二、细胞生物学的学科地位和研究任务

细胞生物学在生命科学的各基础分支学科中发挥纽带和核心作用是很自然的,在生物界,无论是单细胞生物,还是多细胞生物体的一个细胞都表现出生命的本质属性,即是一个在一定条件下能独立生存、新陈代谢、自我调节的开放体系。生命体所表现出的一切生命现象,如新陈代谢、生长发育、遗传变异、繁殖、应激等,都是以细胞作为基本结构和功能单位的生命活动体现。正像著名的生物学家 E. B. Wilson 所说:“一切生物学问题的答案最终都要到细胞中去寻找。因为所有生物体都是,或曾经是一个细胞。”对细胞物质本质和细胞生命活动规律认识的发展,自然地直接推动生命科学其他分支学科的进步。

细胞生物学的研究任务主要表现为两个方面,一是为生命科学各分支学科提供理论基础,二是在应用科学方面为生产实践提供技术方法。

细胞生物学基础理论研究任务:①从细胞整体、细胞超微结构和生物大分子三个水平上阐明细胞的结构基础;②对细胞表现出的生理机能和生命活动进行相关化学组分定性和结构区域定位;③探索细胞器之间,细胞与细胞之间,细胞与环境之间的联系、影响、物质和信息交换规律;④说明细胞的生命活动与生物体整体生命活动的关系,从而揭示生物体各种生命现象的物质本质和规律。

细胞生物学在应用科学研究中已发挥的主要作用:①培育具有研究价值和经济价值的新物种。如通过细胞杂交技术培育杂种细胞株,通过基因工程技术培育基因重组细胞株,通过转基因技术培育转基因动物或植物。②把细胞生物学研究成果应用于人类疾病的诊断和防治。如应用单克隆抗体技术已研制推广了数百种疾病的诊断试剂盒,使疾病的诊断工作简便而精确;应用组织工程技术已成功地在体外培养了组织工程皮肤、结缔组织、血管、肠管等,用于临床治疗;干细胞技术是近年来新兴的研究领域,目前已能在体外以干细胞为种子,培育人类的多种组织和器官的细胞,来代替病变或衰老的组织细胞,用于疾病的防治;应用克隆人类胚胎技术,从患者的克隆胚胎取材,用于组织器官移植,替代患者的病变组织器官,可降低免疫排斥的风险。③研制生物药剂和其他生物产品。如应用细胞工程和基因工程技术已可以大量生产纯度很高的蛋白质制剂,有各种抗体、受体、生长因子、细胞因子、血液因子、激素肽、神经递质等,这些产品已商品化,广泛应用于医学诊断和治疗实践。基因组学和蛋白质组学研究的快速进展,必将促进生物制剂产业更快地发展,取得更大的经济效益。

三、细胞生物学的实验技术体系

细胞生物学的发展对实验技术的发展有很大的依赖性。细胞生物学以其丰硕的研究成果当之无愧地成为生命科学的核心基础学科和前沿学科,同时也形成了一套丰富的、有广泛应用价值的实验技术体系。细胞生物学实验技术体系可以大致归纳成以下几个方面。

(一) 细胞离体培养技术

细胞生物的几乎所有组织细胞都可作为细胞离体培养的材料。针对不同的细胞培养对

象,已形成了丰富多样的培养方法,积累了丰富的经验。细胞离体培养技术在生命科学基础理论研究和应用科学研究中是应用极广泛的基础技术,在分子生物学研究和细胞工程及基因工程高科技领域也是不可或缺的技术基础。

(二) 细胞形态结构观察技术

细胞显微结构观察,主要体现于各种光学显微镜技术,包括复式显微镜、倒置显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜等。细胞超微结构观察主要依靠 X 射线衍射仪和电子显微镜技术。观察方式分为活体细胞观察、细胞固定染色观察和组织切片固定染色观察。记录观察结果可采用静态显微摄影和动态显微拍摄电影术。

(三) 细胞亚显微结构和化学组分分离分析测定技术

细胞中的某些细胞器、亚细胞组分和生物大分子的分离主要靠高速离心和差速离心技术,配合相应的提取纯化方法。一些生物大分子组分,如 DNA、RNA、蛋白质、酶类、脂类、糖类,可依据研究需要,选用细胞分化染色技术、免疫组织化学技术、分子标记及放射自显影技术、分光光度技术、流式细胞术等。上述技术是研究细胞的结构与功能的关系,或判定评价细胞的功能状态的重要手段。

(四) 细胞各种生命现象的研究技术

生物体的一切生命现象都是其物质构成的基本单元——细胞的生命活动体现。研究细胞生命活动的规律,对揭示生物体整体生命现象的物质本质和规律具有重要意义。这方面已积累了丰富的研究方法和技术,如细胞增殖和细胞周期研究技术、细胞凋亡研究技术、细胞遗传研究技术、细胞免疫研究技术、细胞信号传导研究技术、细胞代谢研究技术和肿瘤细胞研究技术等。

(五) 细胞工程技术

所谓细胞工程即按研究者的意愿,运用细胞生物学和分子生物学技术改造细胞的结构和性状,使之满足科学研究和生产实践的需要。如人工诱变培育突变细胞株技术;经细胞杂交,筛选杂种细胞株技术;经细胞拆合、细胞核质杂交,获得克隆动物技术;DNA 转染获得基因重组细胞株技术;转基因动物技术等。

(六) 细胞分子生物学技术

细胞生物学研究的深入,必然进入生物大分子水平。对基因及其产物蛋白质的功能验证,最终要到细胞中去寻找答案。细胞生物学和分子生物学的研究目标任务及方法技术自然趋于融合。这个技术领域包括:①细胞基因组 DNA 提取、纯化、定量分析技术;目的基因鉴定,即探针与 DNA 分子杂交技术;目的基因的克隆扩增及表达技术;基因芯片技术;目的基因结构分析技术,包括 PCR、RFLP、SSCP、AFLP 和 DNA 测序等技术;基因敲除技术等。②细胞总 RNA 提取、纯化、定量分析技术;目的 RNA 的鉴定,即探针与 RNA 分子杂交,分别有斑点印迹杂交、Northern blotting 印迹杂交和 RT-PCR 技术,可定量分析目的 RNA 的表达量。③细胞总蛋白质提取、纯化、定量分析技术;目的蛋白质的鉴定,即蛋白质分子杂

交,分别有免疫组织化学技术和 Western blotting 杂交技术,可定量分析目的蛋白质的表达水平;目的蛋白质的结构分析技术,有氨基酸序列测定和蛋白质结构的生物化学分析方法。

(罗佳滨)

参 考 文 献

- 鄂征. 2001. 组织培养和分子细胞学技术. 北京:北京出版社
王培林. 2005. 医学细胞生物学. 北京:人民卫生出版社
章静波. 2002. 组织和细胞培养技术. 北京:人民卫生出版社

第二章 组织培养的知识与技术基础

第一节 组织培养的知识基础

一、组织培养的概念及技术评价

组织培养(tissue culture)指的是从体内取出组织,在体外模拟体内生理环境,在无菌、适当温度和一定营养条件下,使之生存和生长并维持其结构和功能的方法。细胞培养(cell culture)用的也是同样的方法,培养物是单个细胞或细胞群。在培养组织过程中,现代的培养技术尚不能在体外维持组织的结构和机能长期不变,因此在进行培养时,不论培养物是组织或细胞都要生活在人工环境中。生存环境的改变,细胞的移动(运动)、培养时间过长特别是反复传代,很容易导致细胞发生变动或出现单一化现象,即趋向于变成单一类型细胞,最终也变成了细胞培养。另外所谓细胞培养,也并不意味细胞彼此是独立的。细胞在培养中的生命活动和在体内时一样,仍然是相互依存的,呈现着一定“组织”特性。所以,组织培养和细胞培养并无严格区别。因此在本书的叙述中,这两个词将作为同义语使用。

所谓器官培养(organ culture),指的是应用与组织培养相似的条件,培养的是器官的原基、器官的一部分或整个器官,使之在体外生存、生长和保持一定功能的方法。以上三个层次的培养,又可统称之为体外培养(in vitro)。

组织培养不仅是一种技术,也是一门科学。从广义上说组织培养分为动物组织培养和植物组织培养两大类,本书主要叙述动物特别是人体组织培养。被用于组织培养的细胞或组织是非常好的实验对象。组织培养在现代医学和生物科学研究中应用极为广泛,这与其有一系列优点是分不开的。

(1) 能长时间直接观察活细胞的形态结构和生命活动,可用于细胞学、遗传学、免疫学、实验医学和肿瘤学等多种学科的研究工作。

(2) 便于使用摄影、摄电影和闭路电视等方法进行记录,能直接观察细胞变化。

(3) 可供研究的细胞种类极为广泛,从低等生物到高等动物以及人类、从胚胎到成体、从正常组织到肿瘤细胞,皆可用于培养。

(4) 便于使用各种不同的技术方法,如相差显微镜、荧光显微镜、电子显微镜、组织化学、核素标记等方法观察和研究细胞。

(5) 培养细胞携带有与体内细胞同等的基因组(genome),也是分子生物学和基因工程学的研究对象;细胞培养技术已是分子生物学和基因工程的重要组成部分。

(6) 易于使用物理、化学和生物因素等进行实验研究。

(7) 可同时提供大量生物性状相似的实验对象,耗资少,比较经济。

(8) 已成为生物制品、单克隆抗体生产和基因工程制品等的生产手段。

组织培养做为一种技术仍有其局限性,主要是组织和细胞离体以后,生存在人工培养环

境中,而人工模拟体内环境的技术还有很大差距。因此在利用培养细胞做实验对象时,不应视为与体内细胞完全一样,实验结果不可以轻易认同为体内实验,细胞培养实验模型不能取代动物实验和临床实验。

二、离体培养细胞的生物学特点

细胞在体外培养后,如一切条件适宜,便可生存和进行生命活动,如移动等,但最主要的是生长和增殖。生长和增殖并非同一概念,细胞生长指的是细胞体积增大,而细胞增殖是细胞数量增多。体外培养细胞来源于体内,其基本细胞生物学规律和体内相同,但随生活环境的改变,很多方面如形态结构和增殖规律等,与体内时又有所差别。这里所叙述的是“体外培养细胞生物学”,即有关细胞体外培养条件下的细胞生物学行为,它具有自身的特点和规律,不能为一般细胞生物学完全替代,是组织培养工作者应熟知的知识。

(一) 离体培养细胞的差异和分化

已如前述,目前人体内所有细胞基本上皆可进行培养。培养细胞已成为人们借以研究人体内相应器官、组织和细胞的正常和异常生命活动的重要对象。但却面临一个重要的问题,即体外培养细胞和体内细胞是否有差异,是否可视为同一。如否,则培养细胞将失掉其应用价值。因此这是一个十分重要和应首先阐明和回答的理论问题。比较体内、外细胞,它们的增殖方式是相同的,均为有丝分裂。体内、外细胞的差异关键在于细胞的分化,因此细胞分化是检测细胞差异的核心问题。

当前人工模拟体内环境的技术水平已经很高,细胞生活在人工培养条件下不仅能很好的生存、生长和增殖,在一定程度上,人们已能控制细胞的分化。

但当前我们毕竟尚未能彻底了解人体内一切细胞活动的内在联系,人工所模拟的条件与体内实际情况仍不完全相同。这样,当细胞被置于体外培养后,一旦失去神经体液的调节和细胞相互间的影响、生活在缺乏动态平衡的环境中,最终发生变化是必然的。

离体培养细胞在分化方面主要表现出以下特点:

(1) 失去原有的组织结构和细胞形态,形态上的分化减弱,趋于单一化,类似返祖现象。

(2) 由于生存环境的改变,细胞的外源信号来源切断,特定基因分化表达减弱或停止,导致特定的蛋白或酶类的合成减弱或停止,进而导致细胞在体内时原有的分化功能减弱或消失。但一种分化特性的丧失,不等于彻底消除了分化能力,从细胞遗传学角度分析,离体培养细胞含有与体内细胞相同的基因组。只有当特定基因的表达的减弱或停止是基因突变所致,细胞的特定去分化表现才是不可逆的。以肝细胞为例,离体肝细胞合成酪氨酸转移酶停止,有人证明肝细胞产生酪氨酸转移酶需要激素的诱导和与相应细胞基质的相互作用,只要这些条件存在,离体肝细胞仍可产生酪氨酸转移酶。

(3) 离体细胞在一定条件下有产生不同于体内时的新的分化方向的潜能。在体内胶原蛋白是成纤维细胞和骨细胞的主要产物。而在一定条件下,离体培养的上皮细胞、神经细胞甚至一些肿瘤细胞也能产生胶原蛋白。

(4) 离体细胞仍保持在体内时在寿命上的分化。如人类成纤维细胞在适宜的条件下体外可以传 30~50 代,相当于 150~300 个细胞周期,最后衰老死亡。胚胎期细胞的传代次数

显著多于成人期细胞。

(二) 培养细胞形态分类

体外培养细胞大多培养在瓶皿等容器中,根据它们是否能贴附在支持物上生长的特性,可分为贴附型和悬浮型两大类。

1. 贴附型(图 2-1) 这类细胞在培养时,能贴附在支持物表面生长。大多数培养细胞呈贴附型生长;只赖于贴附才能生长的细胞称贴附型细胞或锚着依存型细胞(anchorage-dependent cell)。关于细胞的贴附过程和机制将另加叙述。当单细胞贴附在支持物上后,易失去它们在体内时原有的特征,细胞分化现象常变得不显著。在形态上常表现单一化的现象,并常反映其胚层起源,呈现类似前述返祖现象。如来源于内、外胚层的细胞多呈上皮细胞型;来自中胚层的细胞则易呈成纤维细胞型(这种现象又与供体的年龄有密切的关系,原供体越幼稚则“返祖”越明显);显然与细胞分化有关。由于上述原因,体外培养细胞形态常表现有一般化的倾向。因此在判定细胞形态时,很难再按体内细胞标准确定,仅能大致作如下分类。

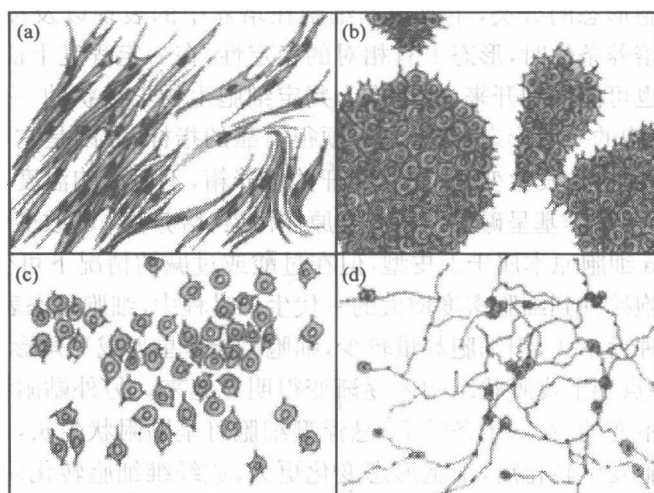


图 2-1 体外培养的贴附型细胞

(a)成纤维细胞型;(b)上皮细胞型;(c)游走细胞型;(d)多形细胞型

(1) 成纤维细胞型:本型细胞因形态与体内成纤维细胞的形态相似而得名;细胞体呈梭形或不规则三角形,中央有卵圆形核,胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起。细胞在生长时多呈放射状、火焰状或漩涡状走行。除真正的成纤维细胞外,凡由中胚层间充质起源的组织,如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮等常呈本类形态。另外在培养中的细胞凡形态与成纤维细胞类似时,皆可称为成纤维细胞。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。

(2) 上皮细胞型:本型细胞具有扁平不规则多角形,中有圆形核,细胞紧密相连成单层膜。细胞增殖数量增多时,整块上皮膜随之移动;处于上皮膜边缘的细胞多与膜相连,很少脱离细胞群单独活动。起源于内、外胚层细胞如皮肤表皮及其衍生物、消化管上皮、肝、胰和肺泡上皮等组织培养时,皆呈上皮型形态。上皮型细胞生长时,尤其是外胚层起源的细胞,

细胞之间常出现所谓拉网(netting)现象,即在构成上皮膜状生长的细胞群中一些细胞常相互分离卷曲,致使上皮细胞膜中形成网眼状空洞。拉网的形成可能与细胞分泌透明质酸酶有关。

(3) 游走细胞型:本型细胞在支持物上散在生长,一般不连接成片。细胞质经常伸出伪足或突起,呈活跃的游走或变形运动,速度快而且不规则。此型细胞不很稳定,有时亦难和其他型细胞相区别。在一定条件下,由于细胞密度增大连接成片,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) 多形细胞型:除上述三型细胞外,还有一些组织和细胞,如神经组织的细胞等,难以确定它们规律的形态,可统归入多形型细胞。

2. 悬浮型 有的细胞在培养时不贴附于支持物上,而呈悬浮状态生长,如某些癌细胞和血液白细胞可呈悬浮型。细胞悬浮生长时,胞体为圆形,观察时不如贴附型方便。其优点是细胞悬浮在培养液中生长,生存空间大,允许长时间生长,能繁殖大量细胞,便于做细胞代谢等研究。

本书所叙述的内容主要是贴附型细胞培养法及其有关问题的探讨。

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。当细胞处于较好的培养条件时,形态上有相对的稳定性,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,故可作为判定细胞生物学性状的一个指标或依据。但必须意识到,培养细胞的一般形态,并不是一项很可靠的指标,原因是它可受很多因素的影响而发生改变,当培养条件发生变化,如反复开关培养箱,不但影响温度,使之波动,还能放出培养箱内的 CO_2 ,使培养基呈碱性。还有支原体污染、培养基 pH 改变等都可使细胞形态发生变化。如 HeLa 细胞原本属于上皮型,但在过酸或过碱的情况下可变成梭形,pH 适宜时又可恢复。从细胞接种到细胞密度增大的一代生长过程中,细胞形态表现也有所不同,如上皮型细胞在刚接种后不久,因细胞数量较少,细胞可能呈星形或三角形。只有当细胞数量增多后,多角形态特点和上皮膜状结构才逐渐变得明显起来。另外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;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,也很难在形态上看出有什么明显区别。

由于培养细胞形态的易变性,在利用形态学指标判定细胞类型和其他一些性状时应持谨慎态度。不应仅仅依赖光学显微镜观察的结果,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,因桥粒是上皮细胞所特有的结构,但在光镜下不可见,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依据显然更为可靠。

(三) 离体培养细胞的增殖规律

体内细胞生长在动态平衡环境中,而组织培养细胞的生存环境是培养瓶、皿或其他容器,生存空间和营养是有限的。当细胞增殖达到一定密度后,则需要分离出一部分细胞和更新营养液,否则将影响细胞的继续生存,这一过程叫传代(passage 或 subculture)。每次传代以后,细胞的生长和增殖过程都会受一定的影响。另外,很多细胞特别是正常细胞,在体外的生存也不是无限的,存在着一个发展过程。所有这一切,使组织细胞在培养中有着一个系

列与体内不同的生存特点。

1. 组织培养细胞生命期(life span of culture cells) 所谓培养细胞生命期,是指细胞在培养中持续增殖和生长的时间。体内组织细胞的生存期与完整机体的死亡衰老基本一致。组织和细胞在培养中生命期如何,这要看细胞的种类、性状和原供体的年龄等情况。人胚二倍体成纤维细胞培养,在不冻存和反复传代条件下,可传 30~50 代,相当于 150~300 个细胞增殖周期,能维持一年左右的生存时间,最后衰老死亡。如果供体为成体或衰老个体,则生存时间更短;如果培养的为其他细胞如肝细胞或肾细胞,生存时间更短,仅能传几代或十几代。只有当细胞发生遗传性改变,如获得永生性或恶性转化时,细胞的生存期才可能发生改变。对此以后将详述。

在进行正常细胞培养时,不论细胞的种类和供体的年龄如何,在细胞全生存过程中,大致都经历以下三个阶段(图 2-2)。

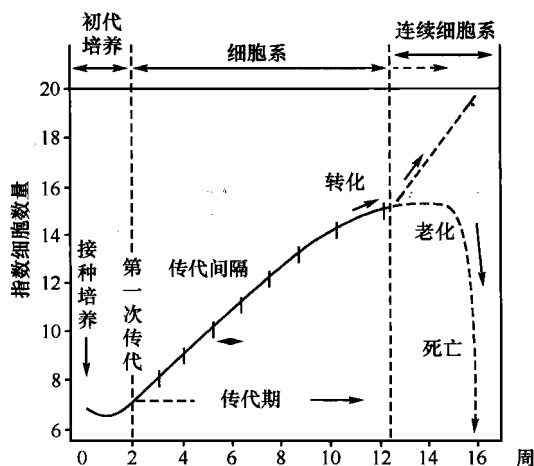


图 2-2 正常培养细胞生命期

(1) 原代培养(primary culture)期:原代培养也称初代培养,即从体内取出组织接种培养到第一次传代阶段,一般持续 1~4 周。此期细胞呈活跃移动,可见细胞分裂,但不旺盛。初代培养细胞与体内原组织在形态结构和功能活动上相似性大。细胞群是异质的(heterogeneous),也即各细胞的遗传性状互不相同,细胞相互依存性强。如把这种细胞群稀释分散成单个细胞,在软琼脂培养基中进行培养时,细胞克隆形成率(cloning efficiency)很低,即细胞独立生存性差。克隆形成率是指细胞群被稀释分散成单个细胞进行培养时,形成细胞小群(克隆)的百分数。初代培养细胞多呈二倍体核型;由于原代培养细胞和体内细胞性状相似性大,是检测药物很好的实验对象。

(2) 传代期:初代培养细胞一经传代后便改称做细胞系(cell line)。在全生命期中此期的持续时间最长。在培养条件较好情况下,细胞增殖旺盛,并能维持二倍体核型,呈二倍体核型的细胞称二倍体细胞系(diploid cell line)。为保持二倍体细胞性质,细胞应在初代培养期或传代后早期冻存。当前世界上常用细胞均在十代内冻存。如不冻存,则需反复传代以维持细胞的适宜密度,以利于生存。但这样就有可能导致细胞失掉二倍体性质或发生转化。一般情况下当传代 30~50 次后,细胞增殖逐渐缓慢,以至完全停止,细胞进入第三期。

(3) 衰退期:此期细胞仍然生存,但增殖很慢或不增殖;细胞形态轮廓增强,最后衰退死亡。在细胞生命期阶段,少数情况下,在以上三期任何一点(多发生在传代末或衰退期),由于某种因素的影响,细胞可能发生自发转化(spontaneous transformation)。转化的标志之一一是细胞可能获得永生性(immortality)或恶性性(malignancy)。细胞永生性也称不死性,即细胞获得持久性增殖能力,这样的细胞群体称无限细胞系(infinite cell line),也称连续细胞系(continuous cell line)。在早期文献中无限细胞系也称已建立细胞系(established cell line),现已不用。无限细胞系的形成主要发生在第二期末或第三期初阶段。细胞获得不死性后,核型大多变成异倍体(heteroploid)。细胞转化亦可用人工方法诱发,转化后的细胞也

可能具有恶性性质。细胞永生性和恶性性并不是同一性状。

2. 组织培养细胞一代生存期 所有体外培养细胞,包括初代培养及各种细胞系,当生长达到一定密度后,都需做传代处理。传代的频率或间隔与培养液的性质、接种细胞数量和细胞增殖速度等有关。接种细胞数量大、细胞基数大、相同增殖速度条件下,细胞数量增加与饱和速度相对要快(实际上细胞接种数量大时细胞增殖速度比稀少时要快)。连续细胞系

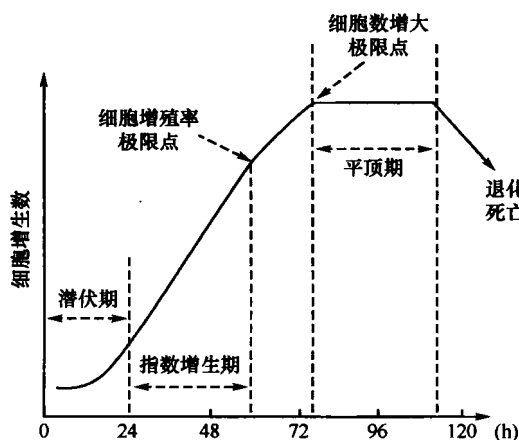


图 2-3 体外培养细胞一代增殖生长过程

和肿瘤细胞系比初代培养细胞增殖快,培养液中血清含量多时细胞增殖比少时快。以上情况都会缩短传代时间。

所谓细胞“一代”一词,是指从细胞接种到分离再培养时的一段时间,这已成为培养工作中的一种习惯说法,它与细胞倍增一代的含义并不相同。如某一细胞系为第 153 代细胞,即指该细胞系已传代 153 次。它与细胞世代(generation)或倍增(doubling)不同;在细胞一代中,细胞能倍增 3~6 次。细胞传一代后,一般要经过以下三个阶段(图 2-3)。

(1) 潜伏期(latent phase):细胞接种培养后,先经过一个在培养液中呈悬浮状态的悬浮

期。此时细胞胞质回缩,胞体呈圆球形。接着是细胞附着或贴附于底物表面上,称贴壁,此时悬浮期结束。各种细胞贴附速度不同,这与细胞的种类、培养基成分和底物的理化性质等密切相关。初代培养的细胞贴附慢,可长达 10~24h 或更多;连续细胞系和恶性细胞系快,10~30min 即可贴附。细胞贴附现象是一个非常复杂和与多种因素相关的过程。支持物能影响细胞的贴附,底物表面不洁不利贴附,底物表面带有阳性电荷利于贴附。另外在贴附过程中,有一些特殊物质如纤维连接素(fibronectin,又称 LETS,large external transformation substance)、细胞表面蛋白(cell surface protein,CSP)等也参与贴附过程。这些物质都是蛋白类成分,它们有的存在于细胞膜的表面(如 CSP),有的则来自培养基中的血清(LETS)。近年又从各种不同组织和生物成分中提取出了很多促贴附物质。贴附是贴附类细胞生长增殖条件之一。

细胞贴附于支持物后,除先经过前述延展过程变成极性细胞,还要经过一个潜伏阶段,才进入生长和增殖期。细胞在潜伏期时,可有运动活动,基本无增殖,少见分裂象。细胞潜伏期与细胞接种密度、细胞种类和培养基性质等密切相关。初代培养细胞潜伏期长,约 24~96h 或更长,连续细胞系和肿瘤细胞潜伏期短,仅 6~24h,细胞接种密度大时潜伏期短。当细胞分裂象开始出现并逐渐增多时,标志着细胞已进入指数增生期。

(2) 指数增生期(logarithmic growth phase):这是细胞增殖最旺盛的阶段,细胞分裂象增多。指数增生期细胞分裂象数量可作为判定细胞生长旺盛与否的一个重要标志。一般以细胞分裂指数(mitotic index,MI)表示,即细胞群中每 1000 个细胞中的分裂象数。体外培养细胞分裂指数受细胞种类、培养液成分、pH、培养箱温度等多种因素的影响。一般细胞的分裂指数介于 0.1%~0.5%,初代细胞分裂指数低,连续细胞和肿瘤细胞分裂指数可高达 3%~5%(肿瘤细胞偏高)。pH 和培养液血清含量变动对细胞分裂指数有很大影响。指数

增生期是细胞一代中活力最好的时期,因此是进行各种实验最好的和最主要的阶段。在接种细胞数量适宜情况下,指数增生期持续 3~5 天后,随细胞数量不断增多、生长空间渐趋减少,最后细胞相互接触汇合成片。如果培养的是正常细胞,由于细胞的相互接触而抑制了细胞的运动,这种现象称接触抑制(contact inhibition)。而恶性细胞则无接触抑制现象,因此接触抑制可作为区别正常与癌细胞标志之一(图 2-4)。肿瘤细胞由于无接触抑制能继续移动和增殖,导致细胞向三维空间扩展,使细胞发生堆积(piled up)。细胞接触汇合成片后,虽发生接触抑制,只要营养充分,细胞仍然能够进行增殖分裂,因此细胞数量仍在增多。但当细胞密度进一步增大,培养液中营养成分减少,代谢产物增多时,细胞因营养的枯竭和代谢物的影响,则发生密度抑制(density inhibition),导致细胞分裂停止。因此细胞接触抑制和密度抑制是两个不同的概念,不应混淆。

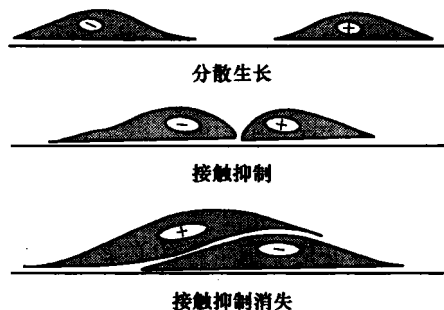


图 2-4 细胞接触抑制

(3) 停滞期(stagnate phase):细胞数量达饱和密度后,细胞就停止增殖,进入停滞期。此时细胞数量持平,故也称平顶期(plateau)。停滞期细胞虽不增殖,但仍有代谢活动,继而培养液中营养渐趋耗尽,代谢产物积累,pH 降低。此时需做分离培养即传代,否则细胞会中毒,发生形态改变,甚至从底物脱落死亡,所以传代应越早越好。传代过晚(已有中毒迹象)将影响下一代细胞的生长增殖。

三、离体培养细胞的生存条件

严格准确地模拟细胞在体内生存时的环境条件,是保证离体培养细胞生存和增殖的基础。目前,人工模拟体内环境的技术仍有局限性,但已积累了丰富的经验,应注重严格控制以下要素。

(一) 无污染环境

培养环境无毒、无菌是保证培养细胞生存的首要条件。人体内环境同样需要无菌、无毒。但在有害物侵入体内或代谢产物积累时,由于体内存在着强大的免疫系统和解毒器官(肝脏等),对它们可进行抵抗和清除,使细胞不受危害。当细胞被置于体外培养后,便失去了对微生物和有毒物质的防御能力,一旦被污染或自身代谢物积累等,可导致细胞死亡。因此在培养中,保持细胞生存环境无任何污染、代谢物及时清除等,是维持细胞生存的基本条件。

(二) 温度

维持细胞增殖生长,必须有适宜的温度。人和哺乳动物培养细胞标准温度为 $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,偏离这一温度范围,细胞的正常代谢会受到影响,甚至死亡。只有鸟类细胞要求温度为 38.5°C ,一般细胞在 36.5°C 中培养即可。总的来说,培养细胞对低温的耐受力比对高温强。温度上升不超过 39°C 时,细胞代谢强度与温度成正比。培养细胞在 $39\sim 40^{\circ}\text{C}$ 1h,即能