

# 动物组织培养技术及其应用

陈瑞铭 主编

科学出版社

# 动物组织培养技术及其应用

陈瑞铭 主编

科学出版社

## 内 容 简 介

本书是作者在自己多年积累的工作经验和成果的基础上,吸收国内外实验室动物组织培养技术的精华编写而成的。全书共 31 章,除系统描述了动物组织培养的基本设备、所使用的各种培养液和细胞株的建立等技术外,还对单克隆抗体、基因转染、器官的培养及组织培养技术在生物学、医学上的应用作了详细介绍,是一本实用的实验室工具书。

本书可供从事细胞生物学、动物学、遗传学、病毒学、免疫学、肿瘤学和基础医学研究的科研人员、实验室技术人员和大专院校师生参考。

## 动物组织培养技术及其应用

陈瑞铭 主 编

责任编辑 吴瑰琦

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

北京科地亚印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1991 年 6 月 第 一 版 开本:787×1092 1/16

1998 年 9 月 第二次印刷 印张:17 1/2

印数:1 501—3 500 字数:397 000

ISBN 7-03-002215-7/Q · 300

定价: 35.00 元

# 目 录

|                  |    |
|------------------|----|
| 第一章 绪论           | 1  |
| 第二章 实验室及实验室装备    | 6  |
| 一、实验室            | 6  |
| (一) 准备室          | 6  |
| (二) 培养室          | 7  |
| (三) 恒温暖房         | 7  |
| (四) 其他实验室        | 8  |
| 二、实验室设备          | 8  |
| (一) 培养箱或恒温箱      | 9  |
| (二) 消毒器          | 9  |
| (三) 冰箱           | 10 |
| (四) 清洗装置         | 10 |
| (五) 水质纯化装置       | 10 |
| (六) 显微镜          | 10 |
| (七) 离心机          | 11 |
| (八) 酸度计          | 11 |
| (九) 真空泵          | 11 |
| (十) 其他           | 11 |
| 三、实验室应用的器具       | 11 |
| (一) 组织培养中常用的金属器具 | 11 |
| (二) 玻璃器皿和塑料器皿    | 12 |
| (三) 辅助工具类        | 14 |
| 主要参考文献           | 15 |
| 第三章 清洗、包装、消毒     | 16 |
| 一、纯净水的制备         | 16 |
| 二、清洗和包装          | 17 |
| (一) 玻璃器皿类的清洗和包装  | 17 |
| (二) 螺旋盖的清洗和包装    | 19 |
| (三) 橡皮帽和橡皮塞的清洗   | 19 |
| (四) 橡皮管的清洗       | 19 |
| (五) 砂芯玻璃过滤器的清洗   | 19 |
| (六) 去污剂的选择       | 19 |
| 三、消毒             | 20 |
| (一) 蒸气消毒         | 20 |
| (二) 干燥高温消毒       | 22 |
| (三) 过滤消毒         | 23 |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| (四) 其他消毒方法 .....                                         | 27 |
| 主要参考文献 .....                                             | 27 |
| <b>第四章 培养液的组成和制备</b> .....                               | 28 |
| 一、培养液的基本成分 .....                                         | 28 |
| (一) 培养液的组成成分 .....                                       | 28 |
| (二) 培养液的物理性质 .....                                       | 30 |
| (三) 培养液水质 .....                                          | 30 |
| 二、平衡盐溶液 .....                                            | 30 |
| 三、培养液中天然成分 .....                                         | 32 |
| (一) 血浆 .....                                             | 32 |
| (二) 血清 .....                                             | 34 |
| (三) 胚胎浸出液 .....                                          | 35 |
| 四、人工合成培养液 .....                                          | 36 |
| (一) 人工合成培养液的发展 .....                                     | 36 |
| (二) 几种常用人工合成培养液的组成成分及其含量 .....                           | 41 |
| 五、培养液的配制 .....                                           | 41 |
| (一) $\text{HCO}_3^-$ , $\text{CO}_2$ 和 HEPES 浓度的关系 ..... | 41 |
| (二) 基本配制法 .....                                          | 42 |
| 六、培养液的选择 .....                                           | 43 |
| 七、抗生素的选择和应用 .....                                        | 44 |
| 主要参考文献 .....                                             | 45 |
| <b>第五章 无血清培养液</b> .....                                  | 46 |
| 一、无血清培养液的补充成分及其作用 .....                                  | 47 |
| (一) 可取代血清的补充成分 .....                                     | 47 |
| (二) 促进有丝分裂因子 .....                                       | 47 |
| (三) 贴壁和铺展因子 .....                                        | 50 |
| 二、建立成细胞系和细胞株的无血清培养 .....                                 | 51 |
| (一) 基础培养液的选择 .....                                       | 58 |
| (二) 不同哺乳类细胞的低蛋白和无血清培养液的配方 .....                          | 58 |
| 三、无血清培养的实际操作问题 .....                                     | 58 |
| 四、最适培养液选择步骤的设计 .....                                     | 59 |
| 主要参考文献 .....                                             | 59 |
| <b>第六章 污染及污染检测</b> .....                                 | 61 |
| 一、细胞微生物污染的类型 .....                                       | 61 |
| 二、微生物污染的检测 .....                                         | 61 |
| 三、细菌和真菌 .....                                            | 62 |
| 四、支原体 .....                                              | 63 |
| (一) 支原体的检测 .....                                         | 64 |
| (二) 污染支原体的处理 .....                                       | 65 |
| 五、病毒 .....                                               | 66 |
| 六、细胞间的交叉污染 .....                                         | 67 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 主要参考文献·····                | 67 |
| <b>第七章 组织培养方法的选择</b> ····· | 68 |
| 一、悬滴培养法·····               | 68 |
| (一) 单盖玻片悬滴培养法·····         | 69 |
| (二) 双盖玻片悬滴培养法·····         | 70 |
| 二、培养瓶培养法·····              | 70 |
| 三、旋转管培养法·····              | 73 |
| 四、灌注小室培养法·····             | 74 |
| 五、各种培养方法的交替使用和改良·····      | 76 |
| 主要参考文献·····                | 76 |
| <b>第八章 原代细胞培养</b> ·····    | 77 |
| 一、解离组织·····                | 77 |
| (一) 剖取小鼠胚胎·····            | 77 |
| (二) 剖取鸡胚·····              | 78 |
| (三) 解取胚胎组织或器官原基·····       | 78 |
| (四) 人体活检(或手术)材料·····       | 78 |
| (五) 成体动物组织的剖取·····         | 79 |
| 二、解离释放细胞·····              | 79 |
| (一) 胰蛋白酶解离细胞法·····         | 79 |
| (二) 胶原酶解离细胞法·····          | 81 |
| (三) 机械解离细胞法·····           | 82 |
| (四) 螯合剂解离细胞法·····          | 82 |
| 三、细胞原代培养·····              | 83 |
| (一) 外植块培养·····             | 83 |
| (二) 单层细胞培养·····            | 84 |
| (三) 悬浮细胞培养·····            | 84 |
| (四) 细胞培养中应注意的要点·····       | 85 |
| 主要参考文献·····                | 86 |
| <b>第九章 细胞系与细胞克隆</b> ·····  | 87 |
| 一、再培养·····                 | 87 |
| (一) 提示需要更换新的培养液的因素·····    | 87 |
| (二) 再培养确定·····             | 87 |
| (三) 再培养的方法·····            | 88 |
| 二、细胞系的建立·····              | 89 |
| 三、细胞克隆·····                | 89 |
| (一) 细胞克隆技术·····            | 90 |
| (二) 影响群落形成效率的因素·····       | 92 |
| (三) 克隆的分离·····             | 95 |
| 主要参考文献·····                | 97 |
| <b>第十章 培养细胞的生物学</b> ·····  | 98 |
| 一、培养物·····                 | 98 |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 二、细胞系·····                       | 99  |
| (一) 原代培养·····                    | 100 |
| (二) 细胞系的演化·····                  | 100 |
| (三) 连续细胞系·····                   | 101 |
| 三、生长曲线·····                      | 101 |
| 四、分化·····                        | 102 |
| 主要参考文献·····                      | 104 |
| <b>第十一章 组织培养方法的发展</b> ·····      | 105 |
| 主要参考文献·····                      | 107 |
| <b>第十二章 动物细胞的大规模离体培养技术</b> ····· | 109 |
| 一、大规模细胞体外培养系统的基本要求·····          | 109 |
| (一) 新型培养系统的设备·····               | 109 |
| (二) 细胞株(系)的选择·····               | 110 |
| (三) 培养液的选择·····                  | 110 |
| (四) 细胞生长状况的监测·····               | 110 |
| 二、几种大规模细胞培养系统·····               | 111 |
| (一) 气升式深层培养系统·····               | 111 |
| (二) 微载体培养系统·····                 | 112 |
| (三) 微囊培养系统·····                  | 112 |
| (四) 大载体培养系统·····                 | 113 |
| (五) 中空纤维培养系统·····                | 115 |
| 三、大规模细胞培养技术的应用·····              | 118 |
| (一) 疫苗·····                      | 118 |
| (二) 干扰素·····                     | 118 |
| (三) 单克隆抗体·····                   | 118 |
| (四) 基因重组产品·····                  | 119 |
| 主要参考文献·····                      | 119 |
| <b>第十三章 细胞生长指标的测定</b> ·····      | 120 |
| 一、生长晕的测量·····                    | 120 |
| 二、有丝分裂指数的计算·····                 | 121 |
| 三、细胞计数·····                      | 121 |
| 四、生长周期的检测·····                   | 122 |
| 五、细胞周期·····                      | 123 |
| 六、细胞 DNA 的测定·····                | 124 |
| 主要参考文献·····                      | 124 |
| <b>第十四章 显微缩时电影</b> ·····         | 125 |
| 一、连续灌注培养小室·····                  | 125 |
| 二、倒置相差显微镜和保温装置·····              | 125 |
| 三、显微缩时电影仪·····                   | 125 |
| 四、拍摄步骤·····                      | 126 |



|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 主要参考文献·····                     | 127 |
| <b>第十五章 细胞同步化</b> ·····         | 128 |
| 一、各期细胞的分离·····                  | 128 |
| (一) 离心洗脱法·····                  | 128 |
| (二) 细胞分类拣选法·····                | 129 |
| (三) 梯度沉降法·····                  | 129 |
| 二、G <sub>1</sub> /S 期细胞的分离····· | 130 |
| (一) 血清饥饿法·····                  | 130 |
| (二) 异亮氨酸饥饿法·····                | 130 |
| (三) 精氨酸饥饿法·····                 | 131 |
| (四) 胸腺嘧啶核苷阻断法·····              | 131 |
| (五) 其他·····                     | 131 |
| 三、M期细胞的分离·····                  | 131 |
| (一) 震荡脱落法·····                  | 131 |
| (二) 胰蛋白酶分离法·····                | 132 |
| (三) 秋水仙素阻抑法·····                | 132 |
| 主要参考文献·····                     | 132 |
| <b>第十六章 突变型细胞</b> ·····         | 133 |
| 一、化学诱变剂·····                    | 133 |
| 二、CHO 突变型细胞系列·····              | 134 |
| 三、HeLa 突变型细胞系列·····             | 138 |
| 主要参考文献·····                     | 140 |
| <b>第十七章 细胞系的鉴定及其特征(一)</b> ····· | 141 |
| 一、形态学·····                      | 141 |
| (一) 活细胞观察·····                  | 141 |
| (二) 固定染色观察培养细胞·····             | 141 |
| 二、染色体·····                      | 142 |
| (一) 染色体数目和核型分析·····             | 143 |
| (二) 染色体分带技术·····                | 145 |
| 三、同工酶谱系·····                    | 147 |
| (一) 同工酶酶谱检测·····                | 147 |
| (二) 同工酶酶谱在细胞培养中的应用·····         | 151 |
| 主要参考文献·····                     | 154 |
| <b>第十八章 细胞系的鉴定及其特征(二)</b> ····· | 155 |
| 一、软琼脂细胞群落形成法·····               | 155 |
| (一) 软琼脂细胞群落形成法的基本步骤·····        | 155 |
| (二) 软琼脂法的应用·····                | 156 |
| 二、细胞特异表达功能的检测·····              | 157 |
| 三、细胞 DNA 遗传特征的检测·····           | 158 |
| 主要参考文献·····                     | 159 |
| <b>第十九章 基因转染技术</b> ·····        | 160 |



|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 一、方法                          | 160 |
| (一) 磷酸钙沉淀法                    | 160 |
| (二) DEAE-dextran 法            | 164 |
| (三) 原生质体融合法                   | 164 |
| (四) 仙台病毒被膜重建法                 | 167 |
| 二、应用                          | 169 |
| 主要参考文献                        | 170 |
| <b>第二十章 组织培养细胞的显微注射法</b>      | 171 |
| 一、玻璃毛细管的制备                    | 171 |
| 二、培养细胞                        | 172 |
| 三、注射样品                        | 172 |
| 四、显微注射                        | 172 |
| 主要参考文献                        | 173 |
| <b>第二十一章 原位杂交技术</b>           | 174 |
| 一、细胞、组织样品的制备                  | 174 |
| (一) 盖玻片和载玻片的预处理               | 174 |
| (二) 固定                        | 175 |
| (三) 标本的制作                     | 176 |
| 二、探针的制备和标记                    | 176 |
| (一) 探针的制备                     | 176 |
| (二) 探针的标记                     | 177 |
| 三、杂交反应                        | 182 |
| (一) 杂交前的预处理步骤                 | 183 |
| (二) 杂交反应步骤                    | 184 |
| (三) 杂交反应后去除非专一性结合             | 184 |
| 四、杂交结果的检测                     | 185 |
| (一) 放射自显影术                    | 185 |
| (二) 生物素标记探针的追踪和检测             | 186 |
| 主要参考文献                        | 189 |
| <b>第二十二章 放射自显影术</b>           | 190 |
| 一、基本原理——径迹形成原理                | 190 |
| 二、放射自显影术的分辨率和效率               | 190 |
| 三、标记物                         | 190 |
| 四、培养细胞标本的制备                   | 192 |
| 五、光学显微镜自显影                    | 193 |
| 六、放射自显影术在组织培养中的应用             | 194 |
| 主要参考文献                        | 194 |
| <b>第二十三章 荧光激活细胞分选仪的简介及其应用</b> | 196 |
| 一、仪器的工作原理                     | 196 |
| 二、数据资料的表达形式                   | 198 |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 三、使用仪器的要点·····                       | 199 |
| 四、仪器的用途·····                         | 200 |
| 主要参考文献·····                          | 203 |
| <b>第二十四章 B 淋巴细胞杂交瘤技术和单克隆抗体</b> ····· | 204 |
| 一、杂交瘤技术的原理·····                      | 204 |
| 二、人源单克隆抗体·····                       | 205 |
| (一) 抗原致敏的 B 淋巴细胞的来源·····             | 206 |
| (二) 细胞融合·····                        | 207 |
| 主要参考文献·····                          | 209 |
| <b>第二十五章 器官培养的方法</b> ·····           | 210 |
| 一、一般原则·····                          | 211 |
| (一) 细胞迁移的抑制·····                     | 212 |
| (二) 营养和气体的保证·····                    | 212 |
| 二、培养液·····                           | 212 |
| 三、气相的组成·····                         | 214 |
| 四、不和气相接触的培养·····                     | 215 |
| (一) 悬浮培养·····                        | 215 |
| (二) 在液-液界面上的支持培养·····                | 215 |
| (三) 放置在琼脂凝胶中的培养·····                 | 216 |
| (四) 与赛璐玢接触的移植物·····                  | 216 |
| (五) 旋转管培养法·····                      | 216 |
| 五、在气液界面上的培养·····                     | 216 |
| (一) 没有支持物的漂浮法·····                   | 216 |
| (二) 飘浮的“救生圈”·····                    | 217 |
| (三) 硬平板或格栅培养法·····                   | 217 |
| 六、在固体基质上的培养法·····                    | 218 |
| (一) 血浆凝块培养法·····                     | 218 |
| (二) 琼脂凝胶培养法·····                     | 219 |
| 七、循环融合系统·····                        | 219 |
| 八、器官灌注系统·····                        | 220 |
| 九、器官组建·····                          | 220 |
| 十、其他一些专门的方法·····                     | 221 |
| (一) 卡氏瓶法和试管法·····                    | 221 |
| (二) 表玻璃培养法·····                      | 221 |
| (三) 滤纸虹吸法·····                       | 221 |
| 十一、关于技术的一些讨论·····                    | 222 |
| (一) 胚胎器官的培养·····                     | 222 |
| (二) 成年器官的培养·····                     | 222 |
| (三) 培养物的体积·····                      | 222 |
| 主要参考文献·····                          | 223 |
| <b>第二十六章 器官培养物的分化与发育</b> ·····       | 224 |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 一、环境影响                        | 224 |
| 二、团块影响                        | 225 |
| 三、不同组织间的相互作用                  | 225 |
| 四、肿瘤细胞的相互作用和分化                | 226 |
| 五、病毒、致癌剂和分化                   | 226 |
| 六、诱导物和肿瘤的再分化                  | 227 |
| 主要参考文献                        | 228 |
| <b>第二十七章 器官培养物的癌变</b>         | 229 |
| 一、化学致癌                        | 229 |
| 二、病毒致癌                        | 231 |
| 主要参考文献                        | 231 |
| <b>第二十八章 器官培养物的免疫学现象</b>      | 232 |
| 一、淋巴样分化                       | 232 |
| 二、原发性免疫反应的诱导                  | 233 |
| 三、继发性免疫反应和持续产生抗体              | 233 |
| 四、化疗药物对器官培养物的毒性               | 234 |
| 主要参考文献                        | 236 |
| <b>第二十九章 人体胚胎和肿瘤器官培养</b>      | 237 |
| 一、胚胎的器官培养法                    | 238 |
| 二、体外胚胎器官的异源性嵌合                | 238 |
| (一) 鸡和小鼠器官的异源性嵌合              | 238 |
| (二) 哺乳类动物肿瘤与鸡胚的异源性嵌合          | 238 |
| 三、人瘤的器官培养法                    | 239 |
| (一) 在中肾上的人瘤器官培养法              | 239 |
| (二) 隔以卵黄膜或透析膜的人瘤中肾上器官培养法      | 239 |
| (三) 以酵母渗析物为基质的人瘤器官培养法         | 240 |
| (四) 以鸡胚中肾和杨氏鸡肝的渗析物为基质的人瘤器官培养法 | 240 |
| 四、体外人瘤器官的重建                   | 241 |
| 五、人瘤的短期器官培养                   | 241 |
| 主要参考文献                        | 242 |
| <b>第三十章 器官培养在生物学研究上的应用</b>    | 243 |
| 一、形态发生的研究                     | 243 |
| (一) 肢芽的形态发生                   | 243 |
| (二) 胸骨的形态发生                   | 243 |
| 二、腺体发育分化的研究                   | 246 |
| (一) 乳腺发育及维持分泌功能的激素依赖          | 246 |
| (二) 唾液腺的分化                    | 247 |
| (三) 甲状腺的分化                    | 248 |
| (四) 胰腺的发育分化                   | 248 |
| (五) 脑垂体的发育分化                  | 248 |

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| 三、生殖腺的培养·····                   | 251        |
| 四、骨骼和软骨的器官培养·····               | 252        |
| 五、神经组织的器官培养·····                | 255        |
| 主要参考文献·····                     | 257        |
| <b>第三十一章 器官培养在医学研究上的应用·····</b> | <b>258</b> |
| 一、肿瘤细胞重聚体和浸润行为的研究·····          | 258        |
| 二、诱导物与肿瘤分化的关系·····              | 259        |
| (一) 胚胎诱导物方面·····                | 259        |
| (二) 培养液的作用·····                 | 260        |
| 三、器官培养在癌变发生上的应用·····            | 261        |
| (一) 乳腺·····                     | 261        |
| (二) 前列腺·····                    | 262        |
| (三) 肺和气管·····                   | 263        |
| (四) 唾液腺·····                    | 264        |
| (五) 卵巢·····                     | 264        |
| (六) 肠道·····                     | 264        |
| (七) 皮肤·····                     | 265        |
| (八) 肾和膀胱·····                   | 265        |
| 四、器官培养物在肿瘤治疗上的应用·····           | 266        |
| 主要参考文献·····                     | 268        |

# 第一章 绪 论

人们不但已知活细胞是构成所有活的有机体的基本单位,而且对其结构、功能、生命活动,以及在机体内不同细胞间构成的细胞社会、各种细胞与细胞周围环境间的关系等方面,进行了不同水平、不同层次、不同深度的探索,并随着科学技术水平的不断提高而向纵深发展。因而,人们对活细胞的生命现象和特征已有一定深度的阐明。尽管如此,许多问题仍有待探索,而活细胞生命科学的发展可帮助人类揭开生、老、病、死的规律,探索优生、抗衰老、防治疾病的手段或途径,人为地诱导细胞遗传性状的改变,使其向更有利于人类和自然界的方向发展。因此,对活细胞的研究,仍是当前生命科学的中心问题之一。

早在 1878 年 Bernard 就指出,机体的内环境在调节活组织的生命活动上是重要的。组织的代谢产物释放到内环境中,又反过来作用于组织。内环境既包括血液、淋巴系统,也包括相同或不同的细胞间的相互关系。由于机体内环境相当复杂,同时又随时间、空间呈动态变化,要想用这样复杂的机体系统研究各种活细胞对不同因素作用的不同反应是很困难的。即使观察到一些现象,也难以重复,并且不容易做出准确的解释。所以要想研究细胞的功能、代谢、细胞对环境诸因素影响的反应等,需要创造条件,使细胞既能脱离复杂的机体内环境的直接影响,又能维持正常生命活动。也就是说,把细胞或组织从整体中分离出来,然后使其在人工的环境中生长,便于直接或间接地观察其对不同因素作用的反应。

1885 年 Roux 最先开始尝试使组织脱离机体而生存。他取出鸡胚神经板,培养于温暖的生理盐水中,能存活一段时间。他首次采用了“组织培养”这个名词。1887 年 Arnold 将赤杨木髓小片浸于青蛙的体液中,然后将其接种到青蛙的皮下和腹腔内,看见有白细胞的侵入。过一段时间,取出髓片置于盐水中,又可看见有白细胞从髓片上移出。1898 年 Ljunggren 将人体皮肤保存在腹水中几天到几周后作移植手术得到成功。1902 年 Loeb 将豚鼠的皮肤小片,埋在琼脂和血浆凝块中,放在另一只动物的皮下进行培养。1903 年 Jolly 使体外培养的两栖类白细胞存活一个月,并对其在体外培养条件下细胞分裂作了一系列观察。1905 年 Beebe 等培养了狗的传染性淋巴肉瘤达 72 小时。这些工作为以后组织培养方法的建立和发展提供了依据。

1907 年 Harrison 和 1912 年 Carrel 开始把组织培养作为一种方法,用于研究离体动物细胞。Harrison 把蝌蚪的髓管放在一滴淋巴液内,结果培养出神经元,观察到轴突从成神经细胞长出,这个实验才被公认是组织培养真正的开始。Carrel 则采用胚胎抽提液作为刺激生长的营养物,并培养了各种动物组织的组织块。从组织块向外生长的生长晕内,可观察到细胞的有丝分裂相。这个组织块培养方法被广泛应用,一直延用到细胞培养技术的出现。1911 年 Lewis 等人研究了盐类、碳水化合物、渗透压等对短期生长的动物细胞的作用。1913 年 Steinhardt 建立了单盖片悬滴培养法,为组织培养应用于病毒学研究打下基础。1923 年 Carrel 设计了卡氏培养瓶,使人们有可能进一步研究细胞营养问题。1925 年 Maximow 采用了双盖片法。但是,盖片法中培养组织块所加的营养液

和空间均是有限的,所以不能持久培养。1926年 Strangeways 设计了表玻璃培养法。1928年 Fell 利用表玻璃培养法研究了软骨和骨的发生与形成,为器官培养开了先例,并为研究动物器官在体外的发育与功能作出贡献。陈瑞铭在 Fell 的工作基础上,创造了擦镜纸培养法(1954)和滤纸层析法(1963),使培养技术更适于研究器官间和组织间的相互关系。1934年 Gey 和 Lewis 用旋转管培养法代替卡氏瓶培养法,培养了许多细胞系。1950—1954年 Dulbecco, Earle, Evans, Parker, Syverton 等分别采用机械法或胰蛋白酶消化法分散细胞,进行了细胞培养或定量细胞培养,并应用于病毒研究。

由于组织培养在医学研究上的应用,如抗病毒疫苗的生产等,到近代已逐渐发展成为一门成熟的精细技术。许多细胞株、系的建成,尤其是以人的肿瘤组织为材料建立的各种细胞系,如 HeLa 细胞系 (Gey 等, 1952), 可用来进行一系列研究,更加促进组织培养技术的发展。在两种不同类型的细胞混合培养物中发现有自发的两类不同细胞间的融合细胞 (Barski 等, 1960) 后, 岡田善雄 (1962) 又发现仙台病毒可以诱发体内艾氏腹水细胞的细胞融合。Harris 等 (1969) 诱发恶性细胞和非恶性细胞融合后, 观察到融合细胞染色体的丢失和恶性特征受到抑制。这些工作奠定了细胞融合技术的发展和應用, 并成为杂交瘤和单克隆抗体筛选技术的基础。在研究细胞核、质关系中发展起来的细胞拆合技术, 打下了细胞重组技术的基础。这些技术的发展和應用, 推进了细胞生物学、细胞免疫学、病毒学、细胞遗传学和医学等方面的研究进展。

随着细胞生物学和分子生物学间的相互渗透, 分子克隆技术与细胞培养技术相结合, 在阐明基因的结构与功能、基因在细胞生长和分化中的作用, 以及细胞癌变机制等方面起了重要的作用。诸如癌基因的克隆、克隆癌基因在细胞转化中的作用、克隆癌基因与细胞生长分化的关系, 以及反义癌基因 RNA 对细胞转化的抑制作用等方面都取得不少成果。又如可用人工合成某基因的不同区域片段顺序, 克隆扩增后用来转染细胞, 用单克隆抗体检测基因表达产物, 观察各片段在基因表达中的作用。所以说, 组织培养技术不单单被细胞生物学工作者或微生物学工作者所采用, 而且也為分子生物学工作者所利用。

自从杂交瘤和单克隆抗体技术建立后, 组织培养技术从简单的培养感染病毒制备疫苗, 演变到定向筛选能产生专一抗体的细胞, 提高了组织培养技术的实际应用价值。为了适应实际应用要求, 各式大量细胞繁殖的仪器设备应运而生, 为从实验阶段过渡到应用阶段提供了必备的条件。又由于培养液的不断改进, 用完全人工培养液代替自然培养液, 这不但能测定不同因子对细胞生长的作用, 而且有利于从培养液内回收抽提培养细胞分泌或排泄物。或者在了解培养物分泌功能的基础上, 为临床治疗提供能显示具有专一功能的细胞。

组织培养中令人感兴趣的研究领域有: 1) 细胞内部的种种活动, 如 DNA 的复制和转录、蛋白质合成、能量代谢; 2) 细胞内部的流动, 如 RNA 从细胞核向细胞质方向运转, 激素受体复合体的移位、代谢库中的变动; 3) “生态学”, 如营养、感染、病毒或化学诱变、药物作用; 4) 细胞与细胞之间的相互作用, 如胚胎诱导、细胞群体的动力学、细胞与细胞之间的固着吸附作用等。

组织培养是一个通用名词, 其实际内容可概括为三个不同概念, 也就是包括有三种主要方法: 1) 器官培养, 培养物保持全部或部分体内组织结构, 培养于液体/气体的交界处; 2) 原代外植块培养, 将一小片组织放在玻璃的或塑料培养器皿与液体的交界处, 待组织块

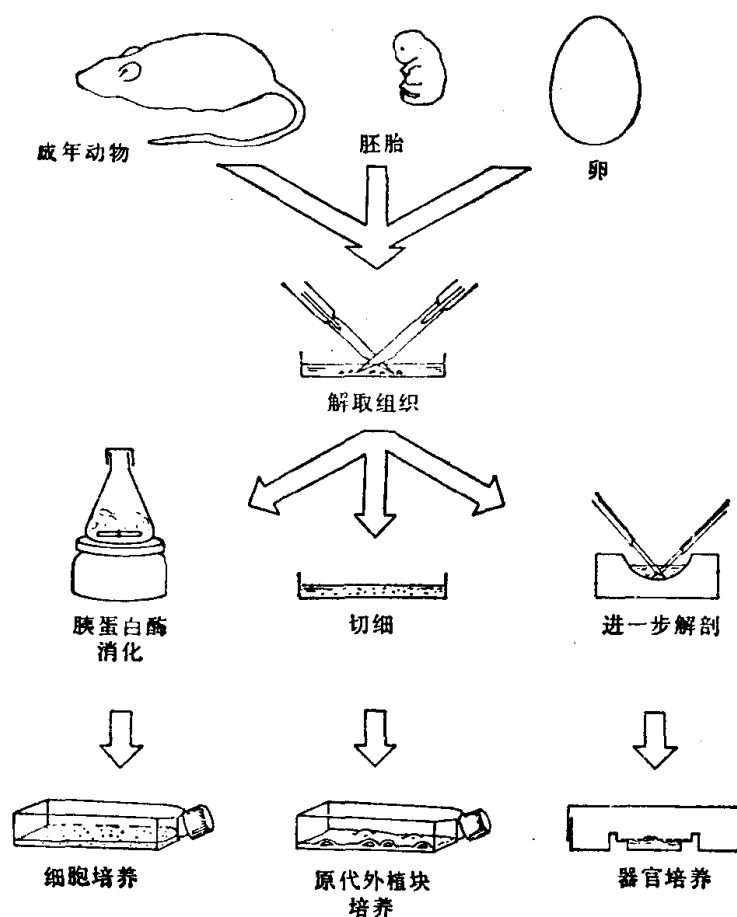


图 1-1 组织培养的类型

粘着后,沿底平面移动生长; 3) 细胞培养, 将原代外植块生长晕用机械法或酶法分离细胞, 作成细胞悬液, 再培养于固体基质上, 成单层细胞生长, 或在培养液中呈悬浮状态培养, 如图 1-1 所示。材料可取自成年动物, 也可取自胚胎或卵细胞。取得组织或器官, 用解剖刀解取所需要部位。组织块经胰蛋白酶消化成为细胞悬液, 进行细胞培养。将组织块切细, 铺在培养瓶底面上, 进行外植块原代培养。将组织或器官进一步解剖, 切除不需要的部位, 进行器官培养。选择哪一种组织培养类型, 则依实验所需要回答的问题、实验材料的特性和现有实验条件所决定。三种方法类型间还可互相先后交叉选用。如有的组织, 当直接采用胰蛋白酶消化法做细胞培养时, 细胞受损严重, 不易生长; 或者虽然受损不严重, 但由于不适应体外环境也不易生长。可以将组织块先进行外植块原代培养, 使之逐步适应体外环境后, 再用胰蛋白酶消化, 做细胞培养。如要观察细胞与细胞间的组织关系时, 可将培养的细胞株或细胞系的细胞, 通过一定技术使同种或不同种细胞团聚成类组织, 进行器官培养。总之, 三种类型方法虽可互相交叉使用, 但其分别代表的是细胞水平、组织水平或器官水平的培养。

原代培养物吸收营养成分不是通过血管, 而是依靠培养物与培养液的直接接触。原代培养物经过一段时间的适应后, 逐步生长。生长到一定程度, 培养液中营养成分减少, 或生长的培养物与培养液的接触面积减少。培养物由于吸收不到营养成分或营养不足而停止生长, 或生长减慢, 甚至在培养物中央出现坏死现象。此时, 即使更换新鲜培养液也不能起促生长作用。因此, 必须进行再培养, 也就是把生长大的组织块切成小块再培养, 或将生长茂密的细胞分瓶再培养。原代培养物再培养成为细胞系。细胞系的含意是:



1) 经过几次传代培养后,细胞的总数目增加;2) 生长能力相近似的细胞或细胞体系占优势,其结果是细胞群体的相似性程度较均一。细胞系经过克隆化或其他方法而得的亚系,则称之为“细胞株”。从原代培养到细胞株的形成经过了适应选择过程。

组织培养技术的优点有: 1) 理化环境是可控制的,培养液可根据实验目的要求而补充已知成分; 2) 经多次传代再培养形成的细胞系,细胞呈均质或是均匀的,特征基本相同,经克隆化后筛选得的细胞株,细胞类型单一,对外界影响的反映更加一致; 3) 培养物可直接暴露在预测的试剂中,预测样品用量少,并可直接观测反应; 4) 通过大量繁殖,可提供大量均匀的细胞供制备用,供比较分析不同因素或同一因素的不同剂量对同一细胞株的作用; 5) 可人工筛选具有一定特征变异的突变株或细胞融合体,有利于进行基因功能的研究; 6) 组织培养结合缩时电影技术,可直接观察活细胞的活动和对外界作用的反应。

组织培养技术手续繁杂,要求严格,费时费力,给组织培养技术的应用带来一定的困难。但是,由于组织培养不但在探索生命活动规律的研究中是一种必不可少的技术,而且在医药工业生产上也起着重要的作用,因此,应用于组织培养的仪器设备,包括培养瓶等用品都在不断地发展着,特别是培养液及其组成成分的商品化,给组织培养工作者带来极大的便利。另外,在培养传代过程中,由于细胞群体的不均一性,会产生变异;或者在培养传代过程中,由于未知因素的影响,使细胞株或细胞系发生变异。这是组织培养中值得注意的问题。液氮保种技术的发展和运用,对减缓、避免或减少变异机率的发生起到很好的作用,同时还可减少工作人员的工作量。换句话说,人们不但不断发展组织培养新技术,而且发展一些附加而又不可少的技术,既可保持和发展组织培养技术的优点,又有利于克服它的不足之处,使组织培养技术更加完善,便于推广应用。

培养细胞与体内细胞相比是有许多差异的,如在机体内,各种特异细胞间,分别以不同组织形式组织在一起,构成组织或器官,各类细胞间相互协调起作用。细胞培养中这种组织结构特征遭到破坏。细胞系形成时,它代表一个或两个细胞类型,而许多异型细胞间的相互作用则易于丢失。外植块和器官培养法中原代外植块和器官培养物中,虽仍保持一定的组织结构和器官结构,但也失去血管浸入组织或器官的结构。另外,组织和器官在机体内,除去它本身各类细胞间协调作用外,仍在神经体液的调控下起作用。在组织培养系统中,培养环境中缺少这种调节,特别是神经系统的调节。其实,这些差异是组织培养的优点之一。可在离体培养条件下,观察内分泌组织或细胞的分泌功能,观察神经细胞的生长和活动。利用在培养液内加入激素类物质直接作用于培养细胞,观察细胞对激素类物质作用的反应。有些化学物质不是直接作用于靶细胞,而是先通过机体内代谢成中间产物才能起作用。在这种情况下,将这类化学物质直接加到培养液内是不能得到预期结果的。所以,必须将此类化学物质先通过动物体内代谢成为有效的中间产物,再用含有此中间产物的血清培养靶细胞。因此提示人们,除去经典和常规的组织培养方法外,仍需探寻新的技术。人工模拟机体内的组织结构或培养环境,使观察的结果更接近整体正常生理状况。如同种或异种细胞群体间的聚合培养法,可分析不同细胞群体在培养物中的特异的相互作用。

组织培养工作在我国开展得比较早的是植物组织培养。1933年李继侗、沈同于北京清华大学进行了银杏胚胎培养;罗宗洛在南京前中央大学进行玉米等根尖生长锥的培养。

后来还有崔激关于器官发生的研究,罗士韦等关于幼胚、根尖、茎尖、愈合组织、肿瘤组织的培养及其生理的研究。此后,在动物组织培养方面,张鋈在上海,鲍鉴清等在北平大学医学院分别开展了一些工作,并建立了组织培养工作环境。但由于当时是在国民党统治下,科研工作难以开展。解放后,随着其他各门科技工作的发展,组织培养工作也有了很大的进展。1952年鲍鉴清于天津军医大学开始建立显微操作术及组织培养室,并于1954年出版了我国第一本《组织培养术》。陈瑞铭在器官培养等方面,发明了擦镜纸培养法及滤纸层析装置,使方法更为实用,可用来研究器官生长与分化发育之间、组织与组织之间的相互关系。高尚荫、刘年翠(1958,1959)进行了昆虫组织培养研究。当时这方面的研究在国外都少见。吴旻(1959—1963)开展了染色体方面的研究,建立了人体肿瘤细胞、羊膜细胞纯系,并研究了其遗传性质。值得一提的是我国微生物学者、北京血清研究所及生物制品研究所的诸同品、王潜渊,在50年代初利用组织培养开展病毒研究和制作疫苗,并推动了组织培养技术在病毒研究中的应用。汤飞凡(1958)开展了麻疹病毒的研究;陈立夫(1963)、王用楫(1963)开展了流行性乙型脑炎病毒的研究。研究甲型脑炎病毒的有陶三荀等(1963)。研究恙虫病立克次体的有冯丽敏(1963)等。在肿瘤研究方面何申、陈泉光、白月清、余新生、许良中、邵文钊等开展了一系列工作。50年代末、60年代初,用组织培养术开展了细胞学、生物化学及生物学方面的研究,如吕家鸿(1958)用同位素追踪实验观察培养细胞的核酸代谢;潘琼婧(1960—1964)测定细胞中的化学成分;韩锐、吴云翠、朱天锡(1962)等研究各种不同药物对培养细胞和形态变化的影响。此外,鲍璐(1962)、邵文钊等(1963)和郭晚华(1963)最早开展神经细胞的培养和研究;蔡靖妍等则应用组织培养术研究粉尘从肺细胞中排除的问题。至于培养建立细胞株(系)的工作更多。现全国已有动物正常细胞株(系)和肿瘤细胞株(系)近几百种。70年代末和80年代期间组织培养工作人员迅速增加,工作内容也越来越广泛,应用于生物学和医学的理论方面的研究仍在不断地发展,在应用研究方面更加发挥了组织培养术的优越性。中国科学院上海细胞生物研究所在这方面已取得不少工作成果,如利用培养的人体肝癌细胞筛选抗肝癌细胞的单克隆抗体(谢弘、杨正洪等,1985);用培养的人体肺癌细胞筛选抗肺癌的单克隆抗体(葛锡锐等,1982);建立了一套大量繁殖技术并应用于实际(朱德原等,1985);现正着手建立培养细胞的细胞库(沈鼎武等,1988)。中国科学院上海药物研究所杨金龙等则利用组织培养术建立了微量的药物筛选方法(1987)。我国组织培养术与国际上比虽然起步晚,但在短期内仍取得不少成果,这是组织培养工作者共同努力的结果。在中国细胞生物学会下设的组织培养专业组,1982年以来,每两年一次,已召开过四次专业组会议。每次会议各地出席参加学术报告的人数都在100多人以上,并出版了会议专刊。今后愿组织培养工作同道者团结一致,奋发图强,自力更生,互相帮助、支持和鼓励,为我国组织培养的进一步发展贡献出最大的力量。

(陈瑞铭)