

同方式进入细胞,细菌与宿主细胞之间的相互作用始终贯穿其中。同时,在进入宿主细胞过程中细菌所分泌的一些毒力因子已成为进行细胞微生物学研究的工具,有助于人们进一步探索肌动蛋白细胞骨架系统的功能,同时也为发现新一代抗菌药物靶点提供了方向^[29]。

摘 要

细菌进入非吞噬细胞的机制包括拉链式机制和触发式机制。细菌的效应因子或毒力因子激活宿主细胞信号转导系统,引起肌动蛋白细胞骨架改变,从而进入非吞噬细胞。拉链式机制中,细菌通常需与宿主细胞相应受体结合,且不引发宿主细胞骨架大规模重排;触发式机制中,有更多细菌成分参与其中,且迅速引发大规模宿主细胞骨架反应,引起宿主细胞形态发生明显改变。两种机制中均贯穿着细菌因子与宿主细胞肌动蛋白细胞骨架成分之间的相互作用。这些机制为研究细菌致病以及探索新一代抗菌药物提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Brian H, et al., 1999, *Cellular Microbiology*:223-272.
- [2] Van Nhieu G T, et al., 1996, *J Biol Chem*, **271**:7665.
- [3] Clark M A, et al., 1998, *Infect Immun*, **66**(3):1237-43.
- [4] Cornelis G R, et al., 1997, *Mol-Microbiol*, **23**(5):861-7.
- [5] Hartland E L, et al., 1998, *FEMS-Microbiol-lett*, **162**(2):207-13.
- [6] Hall A. 1998, *Science*, **279**:509-15.
- [7] Andor A, et al., 2001, *Cell Microbiol*, **3**(5):301-10.
- [8] Iriarte M, et al., 1998, *Mol-Microbiol*, **29**(3):915-29.
- [9] Sorg I, et al., 2001, *Infect Immun*, **69**(12):7535-43.
- [10] Zalevsky J, et al. 2001, *J Biol Chem*, **276**(5):3468-75.
- [11] May RC. 2001, *EMBO J*, **20**(19):2131-9.
- [12] Mengaud J, et al., 1996, *Cell*, **84**:923-32.
- [13] Cossart P, et al., 1998, *EMBO-J*, **17**(14):3797-806.
- [14] Dramsi S, et al., 1997, *Infect Immun*, **65**:1615-25.
- [15] Cornelis G R, et al., 2000, *Annu-Rev-Microbiol*, **54**:735-74.
- [16] Sansonetti P J, et al., 1999, *Clin Infect Dis*, **28**(3):466-75.
- [17] Van Nhieu G T, et al., 1997, *EMBO J*, **16**:2717-29.
- [18] Davis R, et al., 1998, *Biochim-Biophys-Acta*, **1429**(1):45-56.
- [19] Van Nhieu G T, et al., 1999, *EMBO J*, **17**:3249-62.
- [20] Fu Y X, et al., 1998, *Mol Microbiol*, **27**:359-68.
- [21] Hardt W D, et al., 1998, *Cell*, **93**:815-26.
- [22] Fu Y X, et al., 1999, *Nature*, **284**:1322-28.
- [23] Zhou D. 2001, *Microbes Infect*, **3**(14-15):1293-8.
- [24] Murli S, et al., 2001, *Cell Microbiol*, **3**(12):795-810.
- [25] Hayward R D, et al., 1999, *EMBO J*, **18**:4956-34.
- [26] Zhou D, et al., 1999, *Science*, **283**:2092-95.
- [27] McGhie E J, et al., 2001, *EMBO J*, **20**(19):2131-9.
- [28] Danika L, et al., 1999, *Emerg Infect Dis*, **5**:216-23.
- [29] Finlay B B, et al., 1997, *Science*, **276**(5313):718-25.

单个活细胞分析技术进展*

肖松山 范世福

(天津大学生物医学工程与科学仪器系 天津 300072) (中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

李小兵 江丕栋

一、单个活细胞分析的重要意义

一切生物从单细胞到高等动、植物都是由细胞组成的,细胞是生物体和生命活动的基本单位。因此,研究生命活动过程的本质,需要从生命有机体的基本单位——细胞着手。1665年英国物理学家 Robert Hooke 发现细胞结构,将人类的认知视野史无前例地带进细胞这个微观世界^[1]。随着生命科学的不断发展,人们不仅可以在“死”的状态下研究细胞的结构和组成,而且已经开始在“活”的状态下研

究细胞的功能以及生命活动现象。细胞的新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动都与细胞“活”的状态有关^[2]。研究活细胞的性质是研究生命活动规律和本质的关键所在。单个活细胞分析对于研究细胞的结构和功能、生命活动的规律和本质、疾病的诊断、药物的设计具有十分重要的意义,甚至有望回答生命的起源等一些悬而未决的问题。单个活细胞分析不论对细胞生物学基本理

* 国家重点自然科学基金资助项目(397301760-II)。

论研究还是对实际应用都具有十分重要的意义和价值。因此,用于研究单个活细胞的分析技术本身也已成为生命科学中的一个重要课题。

二、单个活细胞分析技术进展

活细胞是一个由电磁场能量转换支配着的互相联系着的时空结构,细胞处于时间和空间的多维空间,细胞分析具有多维性^[2]。细胞的体积小,细胞内的生化反应速度快,一些重要的生物活性分子的含量低,不具有传统检测和分析方法所熟知的典型物理化学性质。因此,单个活细胞分析手段的基本要求和特点是:实时、连续、快速、高灵敏度、高分辨率、无损或微损检测。

目前已用于单个活细胞分析的技术和方法主要有显微分析及显微操作技术、数字图像技术、荧光分析技术、流式细胞技术、微电极技术、膜片钳技术、光镊技术、蒙特卡洛方法等。

1. 显微技术

显微镜一直是观测细胞形态、结构和生命现象的有力工具。Robert Hooke 首先运用自制显微镜观察到栎树皮具有细胞结构。在此后的 300 多年里,各种显微设备在细胞生物学和分子细胞生物学实验中得到了广泛应用。最早发展起来的可见光显微镜将人们引入到一个以前一无所知的单细胞世界。后续发展起来的暗视野显微镜、相差显微镜和微分干涉显微镜可以观察到较大细胞器及其运动。结合活体染料或荧光染色可以对核酸、蛋白质和一些酶或受体等生物大分子进行定位观察。近年来,显微技术在空间分辨率、检测灵敏度、图像与数据的记录和处理等方面获得了长足发展。

(1) 共焦显微镜 共焦显微镜以激光扫描技术为基础,其照明光经过光源针孔再聚焦,在透明或半透明样品中某一深度形成一个光点。其反射光经聚焦后需通过观察针孔才能到达像平面。在样品中高于或低于焦平面的反射光以及杂散光都被滤掉。由于针孔非常小,甚至挡住了光点的衍射环,因而使得共焦显微镜的空间分辨率超过了常规光学显微镜分辨率的极限^[3]。共焦显微镜已成为活细胞结构和细胞生理行为研究中重要的检测和分析工具。

利用共焦显微镜进行单个活细胞分析,一般来说,首先应获得试样的系列“光学切片”,然后对这些“光学切片”进行三维图像重建,给出观测对象的三维空间信息。结合荧光探针、时间分辨荧光技术、寿命荧光技术,能够提供 200nm 空间分辨率、毫秒级

时间分辨率和 10^{-9} mol/L 离子浓度变化的三维重构图像。可以获得单个活细胞尺寸、形状、细胞膜和细胞器等结构信息,也可以获得细胞膜及细胞质流动性、膜电势、细胞内及细胞器内离子浓度如 Ca^{2+} 的三维空间分布图像^[4]。

(2) 扫描隧道显微镜和原子力显微镜 扫描隧道显微镜 (STM) 利用“隧道效应”实现对生物试样表面形貌的观测^[5]。当 STM 探针在试样表面上方附近作扫描运动时,隧道电流对空气隙的宽度存在指数依赖关系,因此隧道电流的变化可以反映试样表面的形貌。应用 STM 进行单个活细胞分析,往往需要在生物试样表面沉积一层极薄的导电膜,以增加 STM 像的可视性。

与 STM 不同,原子力显微镜 (AFM) 可以观测绝缘试样^[6],它的探针安装在柔软且具有弹性的微悬臂上,扫描过程中探针与试样表面原子的相互作用力使微悬臂偏转,通过检测悬臂状态的变化可以测得试样结构。

STM 和 AFM 具有独一无二的原子尺度超高分辨率,已能直接用于亚细胞结构和 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子构像的研究^[7]。因此,在单个活细胞的分析中,可以获得这些生物大分子构像的动态变化信息,为活细胞的生命活动、生化反应等提供分子水平的解释。

(3) 软 X 射线显微镜 软 X 射线显微镜的空间分辨率处于光学显微镜和电子显微镜之间^[2]。与传统的电子显微镜成像不同,X 光显微镜成像术可以使分析试样保留在空气或水中,因此成像 X 射线显微镜可以对单个活细胞的动态过程进行检测,并对单个细胞的元素分布进行定量测量^[8]。此外,配合 X 射线晶体学方法,还可以获得蛋白质等大分子的三维结构信息,但进行检测时,首先必须制备能对 X 射线产生强衍射作用的晶体,因此具体应用时受到一定的限制。

(4) 双光子激发荧光显微镜 由于非线性激光技术的发展,特别是飞秒激光的应用使得双光子激发荧光成为可能。双光子激发荧光是指一个荧光分子同时吸收两个光子的能量经内部转换后发出荧光,其原理如图 1 所示。

由于双光子激发的特殊性使得其只能在焦平面上才能得到激发荧光,不但图像的杂散光少而对比度高,而且还同共焦显微镜一样具有纵向分辨能力^[9]。由于双光子激发荧光显微镜激发光一般采用 700 - 900nm 的近红外光,而生物试样对近红外光

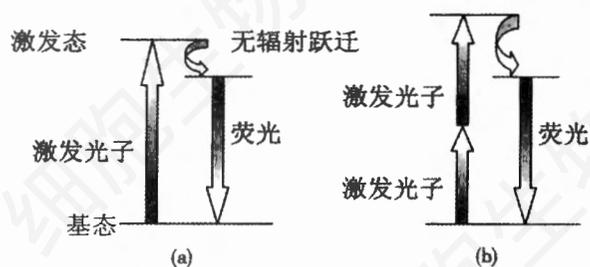


图1 单光子吸收和双光子吸收示意图^[9]
(a)单光子吸收,(b)双光子吸收。

几乎是透明的,从而有效地去除了杂散光的影响,同时大大降低了光毒性,使试样褪色的时间大为延长,更加适合“活”细胞的分析,给活细胞的荧光图像带来了革命性的变化^[9],使荧光分析方法焕发了青春。值得一提的是,尽管双光子荧光显微镜十分昂贵,但我国目前至少已经拥有三台,为研究人员提供了必要的技术设备保障。

(5) 超声显微镜 超声显微镜是利用超声波与物体相互作用时能透过物体的特性,结合激光、压电换能和信息处理等技术发展起来的一种新的显微工具。它能将超声信息转换为电信息,加以放大后,可以在电视或计算机屏幕上对超声显微图像进行直接观察。超声显微镜能够用于观察细胞的细微组织结构。工作时,一般将样品放在水中,因此有利于活细胞的分析,但如何解决亲水性生物大分子带来的不利影响还值得深入研究。此外,在观测过程中,超声波对于活细胞的损伤同样值得关注。

除以上介绍的这些典型的显微设备之外,近场光学显微镜^[10,11]和一些自制的特殊显微设备^[12]在单个活细胞的检测和分析中也得到了很好应用。

2. 数字图像技术

用于单个活细胞分析的数字图像技术是在显微镜基础之上,随着光电检测技术、计算机技术、图像处理与识别技术的进步而逐渐发展起来的。由于CCD在分辨率、动态范围、灵敏度、实时传输等方面具有较大优越性^[13],因此目前数字图像技术主要是运用CCD将显微镜所成的图像按照一定速率和精度通过图像采集卡采集到计算机内存或硬盘,然后利用特定的图像处理和分析软件对图像进行处理和分析,得到相应的结果,如图2所示。

图2是我们研制的一套数字荧光显微图像系统。其中摄像器件采用的是PI公司的MicroMAX-5MHz-782Y型致冷CCD^[14]。随着电子技术和半导体制造技术的不断发展,目前科学级的CCD单项性能指标可以分别达到^[15,16]:空间分辨率:4096×

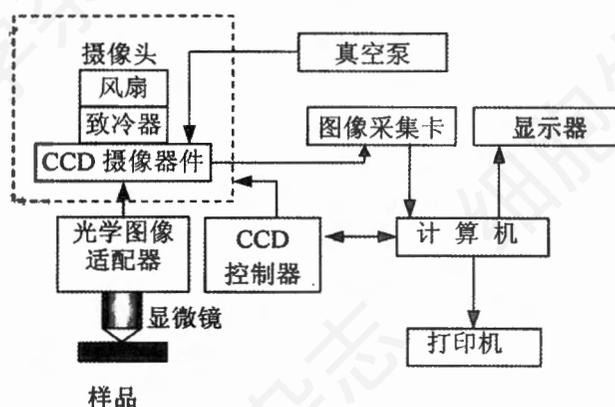


图2 数字荧光显微图像系统的框图

4096 像素;时间分辨率:4000 幅/秒以上;数据精度:16 位;检测灵敏度: 10^{-5} Lux 以下。CCD 的优越性能使得其在单个活细胞的检测和分析中得到了广泛应用^[17]。

数字图像技术的最大优势在于可以方便、客观地记录和分析观察对象,特别是“活”的对象的二维动态信息。利用其进行单个活细胞分析,首先要实时记录运动对象的动态过程或观测区域随时间的变化过程,然后再利用“动态图像分析技术”或“时间序列图像分析技术”^[18]得到相应结果。利用数字图像技术,我们实现了对 LDL 受体等膜生物大分子实时运动状况的跟踪,以及对细胞内有关离子浓度随时间变化状况的检测。

3. 荧光分析技术

荧光的灵敏度高、特异性好,在细胞生物学中的应用已有多年。但其强大的分析功能在单个活细胞结构和功能的研究中真正得以应用还要归功于特异结构荧光探针及其装载方法的进展,同时,微弱荧光信号的检测、分析和处理方法的发展也为其提供了必要的技术支持。

荧光探针将活细胞光学特性与生物学特性紧密地联系起来,对研究细胞结构、生理行为、物理化学特性极为重要。目前荧光探针技术已发展得相当完善,利用适当的荧光标记物,可以对细胞器、细胞膜元素的运动、细胞膜电位、离子浓度、酶活性和基因转移等进行有效的观测^[19]。将荧光标记了的蛋白质、多肽、激素、毒素、抗原等生物大分子注入细胞体内,通过检测荧光来研究活细胞的结构,研究细胞内生物大分子之间的相互作用及其机理。利用绿色荧光蛋白(GFP)及其衍生物研究细胞内反应动力学、原位跟踪细胞的运动、选择性地杀死被 GFP 表达的

细胞已成为荧光分析技术应用研究的热点^[20]。此外利用荧光分析技术,配合电泳等分离手段,还可有效检测细胞的化学组成。

荧光分析技术作为单个活细胞最基本的分析方法之一,伴随着染色技术和检测技术的不断发展,必将焕发出新的活力。

4. 流式细胞术

流式细胞仪集激光技术、计算机技术、机械、电子学、流体动力学和细胞化学染色技术等技术于一体,是能够对高速流动的单粒子样品进行快速多参数定量测定和“群体”细胞分离的现代生物医学仪器。它的发展和给生物和医学研究带来新的动力。用传统的显微镜进行细胞测量需要几小时才能测出上百个细胞,而用流式细胞仪进行细胞测量和分析的速度可达到 3×10^5 个/分钟。目前国内引进的商品化FACS流式细胞仪已达200多台。我国科学家林波海等也于20世纪80年代成功地研制出了具有自主知识产权的流式细胞仪^[21,22],并通过对仪器本身和细胞样品制备技术的不断改进,使得其能对细胞试样进行快速定量测量。基于流式细胞术,利用特定的荧光染料可以实现对特定参数的测定,如细胞周期和倍体分析、细胞表面标志的检测、细胞内pH值、细胞内离子浓度、细胞膜电位、DNA和蛋白质含量的分析等^[21-23]。荧光探针的发展还将进一步拓宽流式细胞仪的应用,但其对同一细胞的连续观测及其动力学的测定仍难以解决。

5. 微电极、电压钳和膜片钳技术

微电极具有响应速度快、灵敏度高和能够准确定位检测等优点。随着精密制造技术和检测技术的不断发展,现在微电极的探头可制作到微米级甚至纳米级^[24],最小检测电流可达到 10^{-16} A。应用微电极技术进行单个活细胞分析的关键问题之一是要降低微电极对活细胞的损伤。80年代中后期,显微操作技术的发展使得微电极可以在不影响细胞生理功能的情况下插入细胞体内,从而实现了对单个活细胞的微损检测。微电极技术非常适合细胞或亚细胞微环境分析、实时定点定量检测单个活细胞内电活性物质的含量及其变化。活细胞具有多种维持细胞生物活性的电活性物质,所以微电极技术在单个活细胞分析中的应用对阐明细胞内发生的生化反应具有重要意义。利用微电极技术不但可以实现对细胞内自由离子和电活性物质的测定,而且能够对外排作用^[25]、受激释放作用^[26]、光合作用^[27]、细胞膜渗透作用和细胞内神经信息的传递^[28]等生物学

事件进行深入研究,并且取得了一些富有意义的研究成果。

电压钳一般使用两根微电极,其中一根电极插入活细胞内,以记录跨膜电位;用另一根微电极注入适当电流。当跨膜电位突然变化到某个选定的电压值时,通过负反馈放大电路输出电流注入到细胞内,使膜电位在一定时间内维持在一定水平上。观察在这个过程中跨膜电流的变化,从而得到电流和电位的关系以及电流的动态变化规律。用这种方法可以测量钙、钠等离子通道电流^[29]。

膜片钳技术是在电压钳技术的基础之上发展起来的一种新技术,是将尖端仅为1微米的玻璃微电极吸附到细胞表面上,对微电极施加负压,微电极与细胞膜形成高于10G欧姆的高阻封接,可记录到膜上皮安级的离子通道电流。膜片钳不仅可以观察离子通道电流,而且可以方便地对细胞进行电压钳制和电流钳制,与分子生物学技术相结合还能进行离子通道和受体分子结构和功能的研究^[5]。

需要说明的是:如何避免微电极对活细胞的直接微小损伤以及电压钳和膜片钳的间接损伤仍然值得认真研究。

6. 光镊

当具有梯度光强分布的激光光源垂直照射到可极化材料如生物大分子等物质时,由于生物组织对光的吸收、反射和折射作用,使得光源中光子动量的方向发生改变,并产生水平方向上的分量^[30,31],其效果相当于在水平方向上生物组织获得了一个推力。尽管它的大小只有几 10^{-12} N,但如果能够排除分子热运动的影响,对于操控细菌和生物大分子已经足够。利用光镊进行单个活细胞分析,正是通过检测这些“力”的分布状态来确定有关信息。

AT&T贝尔实验室的Ashin和他的同事首先研制出了能对显微粒子进行操控的“光镊”^[30]。现在,光镊已成功地用于实时、高分辨地观察单个活细胞骨架的三维网络结构、细胞连接和细胞间相互作用。定量检测细胞骨架张力和弹力是近年来光镊技术在单个活细胞检测和分析中的又一重要应用^[30]。

7. 利用蒙特卡罗方法进行单个活细胞分析

蒙特卡罗方法,又称随机抽样技巧或统计实验方法,是随着科学技术的发展和电子计算机的发明而被独立提出来的。蒙特卡罗方法不是通过真实的实验来完成的,而是抓住事物运动过程的数量和几何特征,利用数字方法来加以模拟,即进行一种数字模拟实验。

蒙特卡罗方法可直接用于具有随机性质问题的分析,如对 LDL 受体运动状况的研究。对于不具有随机性质的问题,首先要转化为随机问题,然后再建立其运行过程的理想模型。活细胞系统本身的复杂性,特别是一些问题目前难以通过实验方法加以解决,为蒙特卡罗方法提供了广阔的应用空间。Saxton 首先将蒙特卡罗方法用于单粒子追踪实验,并取得了丰硕的研究成果^[32-35],如对 LDL 受体在细胞膜“栅栏”中运动状况的分析,对 LDL 受体扩散常数分布的研究,对细胞膜表面“地形”的研究和 LDL 受体与细胞骨架之间的相互作用关系等,取得了科学实验难以取得的研究成果,达到了与科学实验相得益彰的目的。可以预见,蒙特卡罗等计算机模拟方法将在生命的起源、思维的过程等异常繁难的研究领域发挥重要的作用。

8. 其他检测和分析方法

除用光衍射分析、光散射分析、Coulter 换能器、电阻脉冲技术测量悬浮细胞的大小外,还可用离子选择性微电极测定细胞的体积,利用细胞形态生物传感器^[2]实时、连续、定量检测细胞的形态变化;利用色谱、质谱和色-质联用技术实现对细胞的分类、筛选和细胞器、细胞质各组分的测定;利用中子反射法研究蛋白质与细胞膜的相互作用;利用表面质粒共振旋光原理^[2]的生物传感术还能对蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA、配体-受体间特异相互作用的动力学和功能进行实时和无标记测定^[2]等。

三、展 望

展望 21 世纪,生命科学将发展到基因和分子生物学水平,从而对单个活细胞的分析提出新的要求^[2]。单个活细胞内各组分的联系及其作用机理研究将推动生命本质的探索;活细胞之间的通信和识别、单个活细胞生物学事件和生命活动过程的研究可能对思维的研究,特别是对生物计算机的研制具有重要指导意义。联合多种检测和分析手段,有望获得单个活细胞更为丰富的结构和组成信息以及生命活动的动态信息。配合计算机模拟技术,可能在细胞水平上对生命起源的过程和条件进行解释。经过各学科科学工作者的共同努力,发扬“大科学”时代所需要的紧密协作精神,甚至有望为细胞建立一套类似于“数字地球”的数据信息系统——“数字细胞”,从细胞整体水平、亚显微结构水平和分子水平等不同层次和学科将目前关于细胞研究的成果有机地结合、集成起来,最大限度地为相关工作人员提供

信息和服务,以为单个活细胞的分析乃至整个生命科学研究的进展奠定坚实的基础。

摘 要

单个活细胞的分析是生命科学领域的研究热点之一。本文叙述了单个活细胞分析技术的现状,并对其发展方向进行了展望。

参 考 文 献

- [1] 罗深秋等,医用细胞生物学,军事医学科学出版社,1998,2-6.
- [2] 高体玉等,1999,科学通报,43(7):673-681.
- [3] 刘守忠等,1993,电子显微学报,(4):362-366.
- [4] 横山慶一等,1997,蛋白质 核酸 酵素,42(7):1221-1226.
- [5] 赵勇刚等,2000,国外医学生物医学工程分册,23(2):65-69.
- [6] 岡田孝夫等,1998,蛋白质 核酸 酵素,43(6):805-811.
- [7] 德永万喜洋等,1997,蛋白质 核酸 酵素,42(7):1209-1213.
- [8] Pouns J G, et al., 1998, *Microscopy, Berlin, Springer-Verlag*, 200-227.
- [9] 佐甲靖志等,1998,蛋白质 核酸 酵素,43(6):1926-1930.
- [10] 石岛秋彦等,1998,蛋白质 核酸 酵素,43(10):1365-1370.
- [11] 船津高志,1998,医用電子と生体工学,36(3):228-234.
- [12] 横田秀夫等,1998,医用電子と生体工学,36(3):244-251.
- [13] Princeton Instruments, MicroMAX-5MHz-782Y 用户操作手册.
- [14] 王庆有等,CCD 应用技术,天津大学出版社,1993.
- [15] High Performance Digital CCD Cameras, January, 1997, Princeton Instruments Inc.
- [16] The Leader in Spectroscopic Detection, April 1997, Princeton Instruments inc.
- [17] Imaging Solutions for Biology from Roper Scientific, May 1998, Princeton Instruments inc.
- [18] 肖松山,2001,单个活细胞的图像分析技术和应用研究,天津大学博士学位论文,天津大学研究生院.
- [19] 工藤佳久,1998,蛋白质 核酸 酵素,43(6):1912-1916.
- [20] Chalfie M, et al., 1994, *Science*, 263:802-805.
- [21] 徐波等,1998,生物物理学报,14(3):559-564.
- [22] 林波海等,1992,生物物理学报,8(1):81-85.

- [23] Naggover A K, et al., 1995, *Cytometry*, 256.
- [24] Strein T G, et al., 1992, *Anal. Chem.*, 64:1368-1374.
- [25] Wightman R M, et al., 1991, *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 88:10754-10758.
- [26] Chow H R, et al., 1992, *Nature*, 356:60-62.
- [27] Chien J B, et al., 1990, *J Neurochem*, 54:633-638.
- [28] Lau Y Y, et al., 1993, *Microchem J*, 47:307-316.
- [29] Quandt F N, 1994, *Methods in Neurosci.*, 19:3-20.
- [30] Steven Chu, 1991, *Science*, 253(8):861-866.
- [31] Steven M. Block, 1992, *Nature*, 360(12):493-495.
- [32] Michael J. Saxton, 1994, *Biophysical Journal*, 67(11):2110-2119.
- [33] Michael J. Saxton, 1997, *Biophysical Journal*, 72(4):1744-1753.
- [34] Michael J. Saxton, 1995, *Biophysical Journal*, 69(8):389-398.
- [35] Michael J. Saxton, 1993, *Biophysical Journal*, 64(6):1766-1780.

肝细胞培养方法研究进展

陈慧梅 廖红高 静

(南京大学医学院 南京 210093)

肝细胞分离、培养是一种研究肝脏和肝细胞的良好方法。虽然离体培养的肝细胞没有完整机体所存在的神经体液调节作用的影响,却可利用控制其外环境的理化因素实现稳定条件下药物和其他作用的观察及监测,从而用于多方面的研究:肝细胞和其他细胞之间的作用;肝细胞对外界刺激的反应、药物对细胞的作用、细胞内产物的分泌;细胞内胞质的活动和胞质与胞核之间的流动等。事实上肝细胞培养是简化、分析肝细胞功能的有效方法之一,已广泛应用于病毒学、免疫学、细胞毒理实验、临床医学及生物技术等各方面^[1]。

60年代初, Hillis 等人成功地培养了人胚胎肝细胞。30多年来,肝细胞培养技术已由外植块培养发展到单一细胞成分培养、由短期培养到现在的长期培养。本文就肝细胞分离及培养技术的发展、演变、特点和面临的问题作一综述。

一、肝细胞分离方法

1. 机械分离法

(1) 直接剪切法 1961年, Hillis 等最早进行了人胚肝细胞培养^[2]。将手术取得的肝组织切成小块,直接置于简单培养液中即可。此方法操作简单,成本低,所分离的细胞膜上的蛋白质成分性质不易改变。但外植块上长出的上皮细胞时间长,各部分间不均一,获得的肝细胞数量也有限。成纤维细胞也会迅速增殖,在其增殖与分化的过程中,与肝实质细胞形态相似,不易区分,从而难以观察肝细胞的数目和生长、分化程度。此外,未分化的细胞在培养过程中其分化及功能的获得与正常肝细胞有一定差

异,因而此法显得比较局限^[3]。Watanabe, Alexander 等也进行了类似的培养,在细胞呼吸作用研究及形态观察方面有一定进展。

(2) 剪切消化法 此法将肝脏直接分离置于冷的培养基中,剪碎,加入溶解的酶(多为胰酶或胶原酶)破坏肝细胞间的连接,再经震荡、沉淀,最后在上清液中得到游离的肝细胞悬液^[4]。此法操作简单,在成年肝与胎肝中均有采用,仅在酶的浓度和消化时间上有细微的差别。一些实验室采用该法,用于肝细胞功能和对外界的反应等少部分研究,但有许多不足之处。若采用成年鼠肝脏:由于成年的肝组织连接多而紧密,分离困难,刀剪的机械损伤,使得细小组织块周围的肝细胞多受损,不易成活;消化时,中心的细胞未分离,周边的常消化过分而被破坏。若用胚肝培养时,又有细胞未分化的缺点,成纤维细胞大量增生。此外,细胞多呈团块,混有大量血细胞,故不常采用。

2. 门静脉灌流消化法

分离肝细胞的关键是破坏细胞之间的紧密连接,以获得实质细胞。Howard 等首创用胶原酶和透明质酸酶共同灌流肝脏,提高了分离的肝细胞的存活率。以后,又发现胶原酶也可消化、分解大白鼠胎肝以及人胚肝^[5]。此法不断被改进及应用,将分离的肝细胞存活率提高到了80%。

1971年, Williams 等建立了用胶原酶、EDTA 联合灌流分散肝细胞的方法。许多学者也随后进行了研究, Segalen 首先将 EDTA 先灌流过肝脏,后用胶原酶分离肝连接,形成了经典的门静脉二步灌流法^[6];现在,各种肝脏灌流的基本方法多为:先从门