

## 生物细胞中钙调素分布研究及其意义

李家旭 孙大业  
(河北师范大学生物系)

钙调素(Calmodulin, 简称CaM)是一种多功能的钙受体蛋白,参与动植物细胞中多种酶和生理过程的调节。研究细胞中CaM的分布是阐明CaM生理功能的一个重要手段。体外验证的CaM的某些作用只有在生物体内相应功能部位被确认存在CaM后,才有真正的生物学意义。另一方面,如果细胞内某一部位有CaM,那么这一部位的某些生理过程就可能与CaM有关或受其调节。如Means等在以免疫荧光法研究分裂细胞内CaM的分布时,观察到CaM特异地定位在纺锤体上,他们推测CaM可能是通过调控纺锤体微管的解聚而参与染色体运动调节。由此,进一步研究终于发现 $Ca^{2+} \cdot CaM$ 可以调节微管的解聚与聚合。可见,研究CaM在细胞中的分布不仅对于揭示细胞内CaM的作用位点有重要意义,而且由分布研究中获得的信息还可以为进一步深入探讨CaM的功能指明方向。目前已知CaM广泛地存在于各种真核生物中,这反映了CaM在细胞生命活动中的重要性。CaM的各种细胞生理功能正是CaM亚细胞功能的整合表现。通过研究CaM在亚细胞结构中的分布有助于阐明CaM功能多样性的结构基础。本文根据近年的文献资料并结合我们自己的工作,着重介绍CaM定位的研究方法及动植物细胞中CaM的分布,同时就各种亚细胞结构中CaM的一般功能作一概述。

### 一、CaM分布的研究方法

目前已应用于研究CaM分布的方法大致可分为生物化学法和亲和组织化学法两类(见表)。前者是以分级分离法将细胞中的各种亚细胞组份分离出来,然后分别定量各组份中的

CaM。后者则是将组织经固定剂固定后制成的切片(或固定的培养细胞)与可专一结合CaM的亲合标记物作用,然后用光学或电子显微镜观察组织或细胞中的标记物,从而确定CaM的存在部位。

CaM的生物化学方法又可分为靶酶激活分析法(酶法)和免疫学检测法。酶法是基于CaM含量与其对靶酶激活活性成一定的剂量关系,以系列量标准CaM对某一固定量靶酶的相应激活活性作出标准曲线,再测出系列量待测样对该酶的激活活性曲线,对比两条曲线就可得出待测样中CaM的含量。环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)和NAD激酶是酶法测定CaM中较为常用的两种酶。酶法的优点是可以测定有生物活性的CaM,但是易受CaM结合蛋白的干扰。

免疫学检测法包括放射免疫分析(RIA)和酶联免疫测定(ELISA)两种方法。它们的基本原理都是利用标记的抗原(CaM)或抗体与其相应抗体或抗原结合,然后测定标记物来定量CaM。因此制备出专一性强、滴度高的CaM抗体是免疫学检测法的前提。免疫学检测法的优点是可以测定总量CaM(即活性与非活性CaM的总和)。

生物化学方法的优点是可以定量地研究各细胞组份内的CaM。但是在分离细胞组份时很难避免不混杂其他的细胞组份;分离过程中造成的细胞器膜损伤也将导致可溶性CaM的流失;这些都会影响测定结果的准确性。此外生化分析方法难以显示细胞和细胞器内CaM的精确分布情况。

亲和组织化学特别是免疫细胞化学方法可以克服生化方法的某些缺点,如经过适当固定

表 CaM 分布研究方法一览表

方 法		优 缺 点	
生物化学法	酶 法	PDE 酶法	PDE 制备比较简便; 酶较稳定, 较易保存。 PDE 活性受脂类物质干扰。
		NAD 激酶法	该法非常灵敏; 酶活性不受脂类物质干扰。 NAD 激酶不如 PDE 易保存。
	免疫检测法	RIA	灵敏度较高。 同位素标记抗原使用期较短, 检测所需试剂设备昂贵。
		ELISA	工作程序较简单; 酶标记物使用期长。
亲和组织化学法	光镜水平	免疫荧光法	程序简单; 染色鲜明。 染色结果保存时间很短; 荧光易弥散; 有自发荧光等干扰。
		CaM 拮抗剂 荧光法	程序更为简便迅速; 可观察活性 CaM(Ca <sup>2+</sup> ·CaM) 的分布。 该法专一性不如免疫荧光法。
		免疫酶标法	染色结果能长期保存; 可作对比染色。 组织内源酶会干扰酶标染色; 酶底物大多有毒。
	电镜水平	酶 标 法	可先以光镜找出阳性反应部位, 再制成电镜样品进一步观察。 酶反应产物常弥散, 并会遮盖部分超微结构。
		铁蛋白法	定位比较精细, 可对抗原作半定量分析。 铁蛋白不如胶体金易观察辨认, 并对树脂有非特异吸附。
		金 标 法	定位精细, 可对相关抗原进行双重或多重免疫标记; 可对抗原 作半定量分析。 胶体金有时会漂移。

可以防止处理过程中细胞内 CaM 流失或再分布, 利用免疫电镜技术可以观察细胞器中 CaM 的精确分布。因而免疫细胞化学方法在 CaM 分布研究中被广泛采用。

免疫荧光技术是定位 CaM 的一种常用方法。它是对固定的组织切片或细胞以 CaM 抗体进行荧光标记。最近又发展了一种以显微注射方法将荧光色素标记的 CaM 抗体注入生活细胞中, 进而观察大型活体细胞中 CaM 分布的新技术<sup>[1]</sup>。CaM 拮抗剂 TFP(Trifluoperazine)、CPZ(chlorpromazine)和 FPZ(fluphenazine)与 Ca<sup>2+</sup>·CaM 复合体结合后, 经光氧化可产生荧光。利用这一特性就可以观察组织细胞中 Ca<sup>2+</sup>·CaM 的分布<sup>[2]</sup>。除荧光法外, 在光镜水平, 免疫酶标法也是定位 CaM 的一种较常用的方法。

荧光和一般光学显微镜的分辨力很有限。

欲研究 CaM 的精确分布, 还需要免疫电镜技术。免疫电镜中常用的标记物有辣根过氧化物酶、铁蛋白和胶体金等三种。能否使组织材料的抗原性和超微结构都保存良好是免疫电镜技术的关键。

上面提到的这些方法各有优缺点(见表), 不可互相替代。只有结合并用, 取长补短, 互相印证, 才能全面地认识细胞内 CaM 分布的真实情况。

## 二、细胞内 CaM 的分布

### 1. 动物细胞中 CaM 的分布

CaM 分布可因不同的细胞类型而有所变化。将鸡胚成纤维细胞分级分离为细胞核、线粒体、溶酶体、微粒体及溶质等部分, 用 PDE 酶法和 RIA 分别测定 CaM, 结果表明各部分均有 CaM, 其中以溶质部分 CaM 最多<sup>[3]</sup>。Lin

等<sup>[4]</sup>用免疫电镜研究大鼠小脑 Purkinje 氏细胞和颗粒细胞时则发现, CaM 主要分布在核膜、内质网膜、质膜、线粒体膜和突触后膜等内膜结构以及游离的和结合态的核糖体上。他们认为 CaM 可能是在核糖体中合成, 然后释放到细胞溶质中再与细胞器膜发生作用。在由大鼠肝分离得到的线粒体中, 用胶体金免疫电镜可在线粒体内膜和基质上定位到 CaM<sup>[5]</sup>。新生的山羊精子细胞中, CaM 被定位在细胞核、细胞质及发育着的顶体上, 在精子发生和附睾成熟过程中, CaM 转移到细胞核周围, 最后集中在顶体后区域<sup>[6]</sup>, 这种伴随精子发育过程 CaM 分布发生规律性变化, 表明 CaM 可能参与精子发生和成熟过程。

在细胞周期的不同时期, CaM 分布也不同。用免疫荧光法观察一些动物培养细胞中 CaM 分布时发现<sup>[7]</sup>: 在间期 CaM 主要分布在细胞质的纤维性结构上, 到了前期细胞质中 CaM 则变为弥散状分布, 前中期时 CaM 主要分布在半纺锤体上, 中期及后期 CaM 转移到染色体与纺锤体极之间, 而末期则只在两极有 CaM 分布。这些结果揭示 CaM 可能参与了有丝分裂过程中染色体运动的调节。用铁蛋白免疫电镜定位方法, Willingham 等<sup>[8]</sup>研究了一些动物培养细胞中 CaM 在超微结构水平的分布。与前者免疫荧光观察相似, 在间期细胞中 CaM 也是主要分布在细胞溶质, 但 CaM 在微管组织中心比较集中。分裂期细胞中 CaM 集中分布于中心粒周围区域, 到了晚末期 CaM 则聚集在两分裂细胞的细胞间桥 (intercellular bridge) 末端, 而其间的中体大部分无 CaM。这表明 CaM 可能对细胞分裂过程中微管的组装有调节作用。

一些刺激因子如激素可使细胞内 CaM 分布发生变化。Harper 等<sup>[9]</sup>观察到, 大鼠肝细胞中细胞质有密集点状的 CaM 荧光, 质膜及细胞核中也有 CaM 荧光。有趣的是在给大鼠注射促肾上腺皮质激素后, 细胞核中 CaM 荧光明显增强。他们认为 CaM 可能参与了激素

作用于核过程的调节。Conn 等<sup>[10]</sup>用 RIA 法测定大鼠垂体匀浆物各部分 CaM 时也发现, 促性腺激素释放激素可刺激 CaM 从细胞溶质向质膜的再分布。Serratos 等<sup>[11]</sup>通过部分切除大鼠肝以诱发细胞增殖, 结果肝细胞核中 CaM 水平增加了约 3 倍, 同时细胞核中 CaM 的分布也发生了变化。

## 2. 植物细胞中 CaM 的分布

植物 CaM 一般是在生长活跃、积极进行分裂的细胞中比较多。Lin 和孙大业等<sup>[12,13]</sup>用酶标免疫组化方法定位植物组织 CaM 时发现: 玉米根尖中 CaM 主要分布在分生组织细胞和根冠细胞; Allan 和 Trewavas<sup>[14]</sup>用 NAD 激酶法也发现, 豌豆根尖分生区细胞和根冠细胞中 CaM 水平远远高于其他部位。最近我室用酶标法在小麦上的研究表明: 根尖未成熟的导管原始细胞, 成熟茎维管束的筛管细胞以及导管周围的活细胞中 CaM 较多, 这说明 CaM 可能与植物输导组织的运输功能有关。

Vantard 等<sup>[15]</sup>对绣球百合胚乳细胞进行免疫荧光观察发现: 间期细胞中 CaM 呈弥散状分布; 随着前期的开始, CaM 逐渐地集中在星状的微管组织中心; 中期后, CaM 主要分布在着丝点微管束上; 在后期, 随着着丝点纤维的缩短, CaM 向分裂细胞的极区转移; 到了末期 CaM 则聚集在极区的着丝点微管上。Wick 等<sup>[16]</sup>在豌豆和洋葱分裂细胞中也得到类似的结果, 并在纺锤体及末期的成膜体上观察到 CaM。这些结果表明 CaM 可能与植物纺锤体微管功能有关。

目前对植物 CaM 在亚细胞水平分布的认识, 主要是来自生化测定方法。如 Muto<sup>[17]</sup>以 NAD 激酶法和 RIA 法测定小麦叶细胞中 CaM 分布时发现: 大部分 CaM 是存在于细胞溶质部分, 只有小部分 CaM 存在于线粒体、叶绿体和微粒体中。Biro 等<sup>[18]</sup>用 RIA 法在黄化燕麦的细胞核、线粒体、白色体 (ctioplast) 和细胞壁中均检测到 CaM。这些结果表明 CaM 在细胞内的分布是十分广泛的。

Dauwalder 等<sup>[19]</sup>曾用免疫荧光法研究燕麦黄化苗中的 CaM 分布, 在胚芽细胞的细胞质和核质以及根冠细胞的造粉质体上均观察到标记物荧光, 但却未能在细胞壁及核仁中观察到阳性荧光。最近我们与刘杰文合作完成了植物细胞 CaM 的免疫电镜定位工作。在玉米根尖细胞中, 除了发现细胞核、质体、线粒体等部分有 CaM 外, 胶体金颗粒还清楚地显示: 核质中 CaM 主要是在异染色质上, 核仁中亦有 CaM; 细胞质部分、粗糙内质网膜外侧及质膜内侧有 CaM, 造粉质体中 CaM 则主要存在于淀粉粒; 此外细胞壁中也有少量 CaM。植物 CaM 超微水平定位工作, 国内外至今未见报道, 我们的这些结果为深入研究植物 CaM 的细胞生理功能提供了新的形态学依据。在植物细胞所特有的一些结构中含有 CaM, 表明植物 CaM 可能具有一些不同于动物 CaM 的特殊功能。

### 三、亚细胞结构中 CaM 的功能

细胞核中 CaM 最引人注目的是它与 DNA 的关系。Chafouleas 等(1982)发现中国仓鼠细胞在由 G<sub>1</sub> 期转变为 S 期时 CaM 水平剧增, 到 S 期的早期 CaM 达到最高水平, CaM 拮抗剂则可使细胞阻断在 G—S 期间。细胞进入 DNA 合成期时需有足够量 CaM, 表示 CaM 可能影响 DNA 的合成。Boynton 等(1980)曾指出 CaM 拮抗剂可抑制大鼠肝细胞中依赖于 Ca<sup>2+</sup> 的 DNA 合成的启动, 而外加 CaM 便可恢复启动。Rasmussen 等<sup>[20]</sup>报道了将鸡 CaM 基因导入小鼠细胞中, 在使细胞中 CaM 增加 2—4 倍的同时, 细胞周期缩短而增殖速度加快。这最有力地证实了 CaM 参与 DNA 合成和细胞增殖的调控。在一些动物细胞中还发现 CaM 拮抗剂可抑制 DNA 的修复, 暗示 CaM 在 DNA 修复过程中亦起着某种调节作用 (Chafouleas 等, 1984; Charp 等, 1985)。研究表明细胞核中大部分 CaM 是与活性 DNA 相伴随存在<sup>[21]</sup>, CaM 可激活组蛋白激酶 (Waiman 等,

1978)。在植物方面也有实验证实细胞核中 CaM 与组蛋白相伴存在并对一些蛋白质激酶起调控作用<sup>[22]</sup>。根据组蛋白转移模型假说: 组蛋白能使基因的转录过程关闭, 一些非组蛋白则可通过与组蛋白牢固结合而使组蛋白脱离 DNA, 进而有选择地使基因活化 (Stein 等, 1978)。CaM 或通过激活组蛋白激酶使组蛋白磷酸化带负电荷, 或通过激活某些蛋白激酶使一些非组蛋白磷酸化而与组蛋白结合, 最终都可能促使组蛋白脱离 DNA, 导致基因组的解抑, 实现基因的选择性表达。在动物方面已有证据证实 CaM 可调节催乳激素基因的表达<sup>[23]</sup>。上述事实说明: 遗传物质 DNA 的合成、修复及转录过程(或基因表达)均与 CaM 有关。另外, 植物染色质上的 NTP 酶受 CaM 调控<sup>[24]</sup>, NTP 酶活性的改变又可导致核苷水平的变化, 进而影响到细胞有丝分裂能力或 RNA 合成过程<sup>[25]</sup>。总之, 细胞核 CaM 对核功能的影响是广泛而深刻的, 其作用机理的详情还有待深入研究。

许多 CaM 靶酶存在于细胞溶质部分, 如动物细胞中的糖原合成酶, 菠菜细胞中的 NAD 激酶等等。细胞溶质中的一些蛋白质磷酸化过程也受 CaM 调节 (Yamauchi & Fujisawa, 1979)。细胞溶质 CaM 可能是通过直接影响其靶酶活性或通过对蛋白质磷酸化过程的控制而调节细胞生理过程。

线粒体 CaM 的功能目前还不清楚。但在动物线粒体中有 CaM 结合蛋白 (Hatase 等, 1983; Gazzoti 等, 1984); 也有实验证明玉米根线粒体内膜和外膜上有依赖于 CaM 的 NAD 激酶<sup>[26]</sup>。CaM 拮抗剂可同时抑制苹果线粒体对 Ca<sup>2+</sup> 吸收和线粒体膜上的 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性 (Fubumoto & Nagai, 1982)。也有报道说明 CaM 与线粒体的呼吸调节有关<sup>[27]</sup>。

叶绿体是绿色植物细胞所特有的细胞器。NAD 激酶受控于 CaM 的研究 (Muto 等, 1977; Anderson & Cormier, 1978) 导致人们对 CaM 是否参与光合作用调节的研究兴趣。已有证据说

明 CaM 与 NAD 激酶都存在于叶绿体内 (Muto, 1982)。光照可激活 NAD 激酶并提高 NADP 水平 (Muto, 1981; Jarrett & Cormier, 1982)。CaM 拮抗剂可抑制 NADP 形成并同时抑制放氧活性 (Jarrett & Cormier, 1982)。因此有人认为叶绿体内 CaM 可能通过激活 NAD 激酶活性, 增加 NADP 水平, 从而影响光合作用水平。但也有不同意见, 如 Simon 等 (1982, 1984)、Roberts 等 (1983) 指出 CaM 激活的 NAD 激酶只存在于叶绿体被膜上, 间质内 NAD 激酶不受  $Ca^{2+}$  与 CaM 影响, 而光激活的 NAD 激酶只存在于间质<sup>[28]</sup>, 因此 CaM 并不影响光激活的 NAD 激酶活性及 NADP 水平。还有实验表明 CaM 拮抗剂抑制光系统 II 活性 (Barr 等, 1982; England 等 1983; Nakatani, 1984) 以及 CF- $Ca^{2+}$ -ATP 酶基础的和胰酶激活的活性<sup>[29]</sup>。叶绿体 CaM 与光合作用关系的细节尚需更多的实验来阐明。

一般认为根冠细胞造粉质体中的淀粉粒是植物向重力性反应的细胞传感器。近年来的一些研究表明向重力性反应过程中有  $Ca^{2+}$  · CaM 参与 (Biro 等, 1982; Lee 等, 1983; 孙大业等<sup>[30]</sup>, 1984)。在定位研究方面, Lin 和孙大业等<sup>[12, 18]</sup>首先发现玉米根尖中 CaM 以根冠部分最多; Dauwalder 等<sup>[19]</sup>观察到豌豆根冠细胞造粉质体中有 CaM; 我们最近发现玉米根冠造粉质体中 CaM 主要是分布在其淀粉粒内。Macherel 等<sup>[31]</sup>证实造粉质体中的蛋白质磷酸化可受  $Ca^{2+}$  · CaM 调控。基于上述实验结果, 我们认为造粉质体中 CaM 可能是以某种方式参与了根对重力刺激感应的系列生化调控过程。

质膜和内质网膜上的 CaM 可能对维持细胞溶质内低  $Ca^{2+}$  水平有重要意义。在动物细胞方面已证实质膜上的  $Ca^{2+}$ -ATP 酶 (将  $Ca^{2+}$  泵出细胞) 以及某些内膜上的  $Ca^{2+}$ -ATP 酶 (将  $Ca^{2+}$  泵入内质网等胞内钙库) 可受 CaM 调控; 也有实验证实 CaM 可调节植物细胞质膜和内质网膜上的  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性<sup>[32]</sup>。另外质膜和

内质网膜上的 CaM 也可能与膜蛋白磷酸化的调节有关<sup>[33]</sup>。

CaM 不仅在细胞内广泛分布, 而且胞外亦存在<sup>[18, 34, 35]</sup>。关于其功能, 目前还很不清楚。但在动物方面, Crocker 等<sup>[34]</sup>发现人白血病淋巴细胞的胞外 CaM, 对其 DNA 合成和细胞增殖起调节作用。植物细胞壁方面, 叶正华等<sup>[36]</sup>采用以 CaM 为配体的亲和层析法, 发现小麦细胞壁蛋白组份中含 CaM 结合蛋白, 即可能是 CaM 的靶蛋白。最近 Sanchez 等<sup>[37]</sup>指出 CaM 可能对细胞壁过氧化物酶活性进行负调节。相信随着研究的深入, 胞外 CaM 的功能将被阐明。

### 摘 要

研究细胞中钙调素 (CaM) 的分布是探明 CaM 细胞生理功能的一个重要方面。本文根据近年的文献资料并结合自己的工作综述了研究细胞中 CaM 分布的意义, 动物和植物细胞内 CaM 的分布以及各种亚细胞结构中 CaM 的功能。比较全面地介绍了目前用于定位 CaM 的研究方法, 并对各种方法的特点和有关注意事项进行了评述。

### 参 考 文 献

- [1] Momayezi, M. et al., 1986, *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 1621—1638.
- [2] HauBer, I. et al., 1984, *Planta*, 162: 33—39.
- [3] Van Eldik, L. J., et al., 1982, *Int. Rev. Cytol.*, 77: 1—21.
- [4] Lin, C. T. et al., 1980, *J. Cell Biol.*, 85: 473—480.
- [5] Hatase, O. et al., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132: 63—66.
- [6] Weinman, S. et al., 1986, *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 1181—1193.
- [7] Welsh, M. J. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75: 1867—1871.
- [8] Willingham, M. C. et al., 1983, *J. Histochem. Cytochem.*, 31: 445—461.
- [9] Harper, J. F. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 366—370.
- [10] Conn, P. M. et al., 1981, *Nature*, 292: 264—265.

- [11] Serratos, J. et al., 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150: 1162—1169.
- [12] Lin, C. T. et al., 1983, *J. Cell Biol.*, 97: 40 a.
- [13] Lin, C. T. et al., 1986, *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 561—567.
- [14] Allan, E. and Trewavas, A., 1985, *Planta*, 165: 493—501.
- [15] Vantard, M. et al., 1985, *J. Cell Biol.*, 101: 488—499.
- [16] Wick, S. M. et al., 1985, *Protoplasma*, 126: 198—206.
- [17] Muto, S., 1982, *FEBS Lett.*, 147: 161—164.
- [18] Biro, R. L. et al., 1984, *Plant Physiol.*, 75: 382—386.
- [19] Dauwalder, M. et al., 1986, *Planta*, 168: 461—470.
- [20] Rasmussen, C. D. et al., 1987, *EMBO J.*, 6: 3961—3968.
- [21] Bachs, O. and Carafoli, E., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 10786—10790.
- [22] Polya, G. M. et al., 1982, *FEBS Lett.*, 150: 167—171.
- [23] White, B. A. 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 1213—1217.
- [24] Chen, Y. -R. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 10689—10694.
- [25] Grossmann, K. and Seitz, U., 1979, *Nucleic Acid Res.*, 7: 2015—2029.
- [26] Sauer, A. and Robinson, D. G., 1985, *Planta*, 166: 227—233.
- [27] Owen, J. H. et al., 1987, *J. Exp. Bot.*, 38: 1356—1361.
- [28] Roberts, D. M. et al., 1986, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 4: 311—339.
- [29] 孙大业等, 1987, 科学通报, 24: 1887—1891.
- [30] Sun, D. Y. (孙大业) et al., 1984, *Physiol. Plant.*, 61: 449—454.
- [31] Macherel, D. et al., 1986, *Plant Physiol.*, 80: 1041—1044.
- [32] Robinson, C. et al., 1988, *Physiol. Plant.*, 72: 177—184.
- [33] Veluthambi, K. and Poovaiah, B. W., 1984, *Plant Physiol.*, 76: 359—365.
- [34] Crocker, G. et al., 1988, *Biochem. J.*, 253: 877—884.
- [35] 叶正华等, 1988, 科学通报, 8: 624—626.
- [36] 叶正华等, 1989, 植物生理学报, 15: 223—229.
- [37] Sanchez, O. J. et al., 1989, *Physiol. plant.*, 75: 275—279.

(上接47页)

72 h, EDTA-胰酶: 72 h.

以上数据为5次消化后所得的均数。

### 三、小 结

综上所述,三种消化剂均可用于清除成纤维细胞。其中,0.25%胰酶和EDTA-胰酶虽消化细胞的速度快于0.25%柠檬酸胰酶,但其对细胞活力的影响也明显大于后者。比较而言,用0.25%柠檬酸胰酶消化清除成纤维细胞为较满意的方法(见图版),主要有以下几个优点:1.作用温和,对内皮细胞无损伤;2.对成纤维细胞的消化分散力强于对内皮细胞;3.作用后内皮细胞附壁、复苏和繁殖速度快;4.作用后的细胞通常只需洗一次;5.试剂便宜,比传统的胶原酶法经济得多。因此柠檬酸胰酶法不失为消除成纤维细胞和细胞传代的一种简

单、实用、经济和有效的方法。

### 图 版 说 明

1. 消化清除成纤维细胞前,内皮细胞与成纤维细胞混杂。相差显微镜×100
2. 第一次消化清除成纤维细胞后,成纤维细胞减少。相差显微镜×100。
3. 第二次消化清除成纤维细胞后,成纤维细胞明显减少。相差显微镜×100
4. 第三次消化清除成纤维细胞后,成纤维细胞完全消失。相差显微镜×100

### 参 考 文 献

- [1] 鄂征,组织培养技术,人民卫生出版社,1986年,第二版:171.
- [2] 熊绍银、肖成祖,细胞生物学杂志,1987年,9(4),190—191.