

8. 透射电镜观察 培养细胞在电镜下可见明暗两型细胞, 细胞大小形态不一, 核大, 不规则, 核仁明显, 细胞表面可见微绒毛, 胞浆内游离核糖体及线粒体较多, 并见分泌空泡(图版图4), 裸小鼠移植瘤在电镜下除见以上结构外, 尚可见到瘤细胞间的细胞连接, 如桥粒等(图版图5)。

9. 扫描电镜观察 将在盖片上生长旺盛的细胞, 经固定、喷镀后, 在H-500型扫描电镜下观察细胞的表面特征; 见胞核大, 有的胞浆呈膜状铺展, 可见微绒毛及丝状突起, 有的细胞表面有成簇较大的泡状突起, 可能是该细胞的粘液泡(图版图3)。

讨 论

以上各项实验结果表明, AP-213细胞系是具有恶性生物学行为和形态学特征, 并能产生癌胚抗原(CEA)的腺癌细胞, 其生物学特征与该细胞所来自的人阑尾粘液腺癌相似, 但分化却较体内肿瘤为差; 如细胞异形性较明显, 大多不形成腺管结构等, 这种差异的出现, 既可能与肿瘤的异质性有关, 也不排除较长时间的体外培养促成细胞发生变异的因素, AP-213人阑尾粘液腺癌细胞系的建立, 为肠癌的研究

提供了一个实验材料。

摘 要

AP-213细胞系是从一例阑尾粘液腺癌尸检病例取材培养建系的, 已历时2年余, 传代135次, 细胞生长稳定, 多次冻存, 复苏生长良好, 细胞倍增时间35.4小时, 分裂指数29%, 染色体为超3倍体, 并有巨大具顶端着丝点的标记染色体, 异种动物接种致瘤率为100%, 并具有产生CEA的能力, 其生物学特性与体内肿瘤相似, 但分化较差, 该细胞系的建立, 为肠癌的研究提供了一个实验材料。

参 考 文 献

- [1] Wood, D. A., 1967, Tumors of Intestine. Atlas of tumor pathology, Fascicle 22, First series, P. 177.
- [2] Menon, N. K. et al., 1980, *Postgrad Med J.*, 56: 448.
- [3] 许沈华, 1983, 国外医学, 肿瘤分册, (4): 217.
- [4] Jakoby, W. B. ed., 1979, *Methods in Enzymology*, III: 141, Cell Culture Academic Press Inc, London.
- [5] 陈德蕙等, 1985, 中华医学杂志, 65: 530.
- [6] 程明等, 1984, 中华肿瘤杂志, 6: 250.
- [7] Goldenberg, D. M. et al., 1978, *Cancer*, 42: 1546.

聚赖氨酸与胶原对培养的鸡胚大脑皮层细胞的影响

王天佑 阎军 梁实 居俐

(北京市神经外科研究所)

随着细胞培养技术的发展, 现在已能做到由中枢神经组织选择性地培养某一类型细胞, 称为单一型培养(Monotypic Culture)^[1]。通常有两种方法可以得到以神经细胞为主的培养物。一种是用胶原做支持物, 但因胶原有利于星形细胞增殖, 所以须用抗有丝分裂药物抑制其增殖^[2]。另一种方法是培养前用聚赖氨酸处理培养皿表面, 可帮助细胞贴附而不利于星形

细胞增殖^[3]。本文拟比较这两种方法的优缺点, 从而了解它们的实用意义。

材 料 和 方 法

1. 组织来源: 8天来亨鸡胚, 取双侧大脑半球

本工作得到军事医学科学院赵林普、肖定华, 北京医科大学吴希如, 中国药品生物制品检定所徐锡荣等同志指导, 特此致谢。

在侧脑室外上方的脑组织,包括灰质及少量白质。

2. 培养基: Eagle 氏基本培养基 (MEM) 加 10% 灭活小牛血清或马血清。每升内加葡萄糖 5 g, 谷氨酰胺 300 mg, 胰岛素 5 mg, HEPES 5 g, 庆大霉素 40000 单位。

3. 支持物: 大鼠尾胶原按 Bornstein 氏法^[4]制备, 涂于盖玻片上, 氨水薰, 蒸馏水充分洗去残余氨, 然后用 MEM 或完全培养液浸泡待用。

聚左旋赖氨酸 (Sigma), 分子量 300 000, 用不含钙和镁的 Dulbecco 氏磷酸缓冲液 (PBS) 配成 1 mg/100 ml, 冻存, 用前融化以浸泡盖玻片, 37°C 过夜, 然后换 MEM 浸泡一天。

4. 培养: 将脑组织切碎, 加 0.05% 胰酶, 37°C 下解育 15 分钟, 用细口滴管吹打 15 下 (约 1 分钟), 使细胞充分分散, 过 200 目尼龙网, 将细胞浓度调至 $0.8-1.0 \times 10^6$ 细胞/ml。每个 60 mm 直径平皿中 (内有经胶原或聚赖氨酸覆盖的盖玻片) 接种细胞悬液 5 ml, 在 95% 空气和 5% CO₂ 的混合气中培养, 温度 37°C。先用含 10% 小牛血清的 MEM 培养 5 天。聚赖氨酸组, 第 5 天各皿内 1/2 培养液换以含 10% 马血清的 MEM, 第 6 天全部换为含 10% 马血清的 MEM, 第 8 或 9 天用含 10% 马血清的 MEM 作半量换液, 此后不再换液。胶原组, 第 5 天加阿糖胞苷 3 μg/ml, 或氟尿嘧啶 15 μg/ml, 作用 24 小时, 第 6 天后每 2—3 天用含 10% 马血清的 MEM 换液一次。用相差显微镜观察。

5. 免疫荧光法: 采用破伤风毒素免疫荧光法^[5]显示神经细胞。培养物用 PBS 洗后加破伤风毒素* (5 mg/ml), 4°C 下作用 2 小时, PBS 洗, 加异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的马抗破伤风毒素血清, 37°C 温育 30 分钟, PBS 洗, 荧光显微镜下观察盖玻片上生长的神经细胞的表现。

神经细胞计数: 将培养细胞用 0.25% 胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化, 使绝大部分细胞团块分散, 此后步骤同上述破伤风毒素免疫荧光法, 只是因细胞为悬液, 加液解育与洗涤均在试管中用离心法进行。最后将细胞悬液滴于载玻片上, 加盖片后, 在显微镜下对每个高倍视野先用相差显微镜术计细胞数, 随后将相差光源改为紫外光 (加滤片), 对同一视野内的荧光细胞进行计数。按骨髓细胞计数的原则, 连续选取多个视野, 直至相差计数总量达 200 个, 求得该样品中荧光细胞所占百分数。

另外, 用胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫荧光法^[6]显示星形细胞。

6. 神经细胞染色: 用 Holmes 氏镀银染色^[7]显示神经细胞内及突起内的神经原纤维 (Neurofibril), 用焦油紫染色^[7]显示神经细胞胞体内的尼氏体。

结 果

聚赖氨酸处理组, 接种后半小时内几乎全部细胞已贴附于皿壁。此时细胞分散, 少数细胞带有小突起, 此后大部分细胞逐渐出现神经细胞的特点, 5—6 天时呈现强折光的胞体, 核不可见, 细胞伸出细丝状带有分枝的突起, 小的细胞团块与丰富的突起交织成网 (图 1), 每团内细胞数逐渐增多而团块数逐渐减少。上述形态变化于第 12—14 天达高峰 (图 5), 18—19 天开始退化, 细胞折光性下降, 胞浆内颗粒增多, 突起松弛并逐渐自盖玻片附着点脱落。接种后有少量细胞呈现另一类形态特点, 即逐渐伸展成多角形或梭形的扁平状细胞, 紧贴玻片, 多位于神经细胞团块的下方。它们不表现明显的增殖, 在神经细胞退化脱落后仍活存。

胶原组, 接种后 2 小时细胞开始贴附, 此时已形成数个细胞聚集的小团块。24 小时完全贴附, 有些细胞已伸出短突起。在胶原上, 突出的特点是 2 天后有大量的扁平状细胞增殖, 5 天时可形成单细胞层。与在聚赖氨酸玻片上的扁平状细胞相比, 形态相似, 但数量多, 分裂活跃。在这层细胞上方有许多分散或成团的神经细胞, 与聚赖氨酸玻片上的神经细胞形态相似, 但团块较为松散, 团块外细胞较多 (图 3, 7)。阿糖胞苷或氟尿嘧啶作用后, 扁平状细胞的增殖受到暂时抑制, 但不影响神经细胞的生长。约 21 天后出现神经细胞退化, 胞浆颗粒增多, 突起松弛, 23—24 天大部分神经细胞死亡脱落, 而扁平状细胞仍完好。

在上述两种支持物上, 培养 5 天后经染色均可显示神经细胞内的神经原纤维与尼氏体

* 中国药品生物制品检定所赠品。

表 1 不同培养条件下破伤风毒素结合细胞所占百分数[△] (N=4)

培养天数	0	1	3	6	9	14
聚赖氨酸	57.5±1.4	68.4±3.7	75.5±4.5	83.1±0.8	86.4±0.8	80.0±1.1
胶原	57.5±1.4	62.6±2.9*	66.6±1.8*	69.6±2.4***	54.9±4.7***	40.5±7.7***

[△] 平均值±标准差

* p<0.05, *** p<0.001, 同一天的两组相比

(图 2、6)。破伤风毒素免疫荧光法能使大部分神经细胞显示膜荧光而不能显示扁平状细胞(图 4)。**GFAP** 免疫荧光法可在培养 7 天后显示扁平状细胞胞浆内荧光,不能显示神经细胞。培养 14 天时大部分扁平状细胞对 **GFAP** 呈阳性荧光反应(图 8),说明扁平状细胞中大部分为星形细胞。

用破伤风毒素免疫荧光反应对培养细胞进行分类计数,可见在聚赖氨酸玻片上荧光阳性细胞比例于第 9 天达高峰(86.4%),第 14 天已下降。在胶原上第 6 天达高峰(69.6%),然后明显下降。培养 1 天后,聚赖氨酸玻片上荧光细胞的比例显著高于胶原上者(表 1, 图 9—12)。

讨 论

用普通染色和破伤风毒素免疫荧光法对两种支持物上的神经细胞所显示的形态学特征没有明显差别。在胶原上神经细胞较早聚集,在培养过程中团块内细胞松散,细胞寿命较长。因生长在大量扁平状细胞的背景上,形态观察较困难。在聚赖氨酸玻片上神经细胞往往形成大而紧密的团块,较早退化,但背景清楚,容易观察。

分散细胞重新聚集成团是神经细胞培养的一个特点,鸡胚大脑细胞较鼠胚的更为突出。这一特点可能与细胞表面的一种糖蛋白有关,称为神经细胞粘附分子(**Neural Cell Adhesion Molecule**, 简称 **N-CAM**)^[8],与胚胎时神经组织的形态发生有密切关系。

神经细胞表面普遍存在有破伤风毒素受体,化学成分为神经节苷脂。在培养时,神经细胞与破伤风毒素的结合能力随培养时间延长

而逐渐成熟^[9]。我们观察到少数细胞具有典型的神经细胞特点,但破伤风毒素免疫荧光阴性。因此,用这种方法所做的神经细胞计数只是对神经细胞所占比例的一种保守的估计,或用来在同样条件下比较不同支持物上神经细胞比例的差别。结果表明,聚赖氨酸玻片上神经细胞比例可达 86% 以上,基本上实现了单一类型的神经细胞培养。

在两种支持物上培养的突出差别是扁平状细胞的贴附与增殖。这些细胞以星形细胞为主,可能还有内皮细胞和成纤维细胞。它们在胶原上迅速增殖,药物仅能对其增殖起到暂时抑制。因此,胶原上的培养物适合于研究神经细胞与星形细胞的相互关系。在赖氨酸玻片上扁平状细胞很少贴附,即使贴附,展开后也不增殖或增殖极慢。这种培养物以神经细胞为主,基本上排除了其他细胞的影响,适合于单独研究神经细胞。至于要制备纯星形细胞的原代培养,则应取胚龄更大的胚胎材料,在胶原上培养^[1]。

摘 要

将 8 天鸡胚大脑皮层制成单细胞悬液,进行静止培养。若接种于鼠尾胶原上,并于第 5 天加用药物以抑制有丝分裂,可见仍有大量胶质细胞生长。神经细胞在总细胞数中不足 70%,三周后开始退化。若接种于聚赖氨酸处理过的玻片上,则胶质细胞很少出现,神经细胞占总细胞数的 80% 以上,但两周后开始退化。因后一方法可以基本上排除胶质细胞的干扰,故适用于单独观察神经细胞的研究工作。

图 版 说 明

图 1 聚赖氨酸玻片上培养 6 天。神经细胞折光

强,形成小团,突起交织成网。可见一个扁平状细胞(箭头)与神经细胞不在同一水平,故不清晰。相差 $\times 400$

图2 聚赖氨酸玻片上培养6天。神经原纤维穿过细胞团块中的细胞体,进入突起中。Holmes氏镀银染色 $\times 1900$

图3 胶原上培养9天。神经细胞成团(在三个箭头之间),下方有一扁平状细胞层。相差 $\times 400$

图4 与图3为同一视野,破伤风毒素免疫荧光。神经细胞胞体及突起的膜荧光阳性,背景中的扁平状细胞则阴性。荧光显微镜 $\times 400$

图5 聚赖氨酸玻片上培养14天。神经细胞团块加大,团内难以分辨单个细胞,团块间突起相连,背景中无扁平状细胞。相差 $\times 400$

图6 聚赖氨酸玻片上培养14天。示胞浆内尼氏体。焦油紫染色 $\times 1000$

图7 胶原上培养14天。神经细胞团块趋于分散,但神经细胞仍可分辨(箭头),背景扁平状细胞高度增殖。相差 $\times 400$

图8 与图7为同一视野,GFAP免疫荧光。大量扁平状细胞胞浆荧光阳性,而神经细胞(图7中箭头指示者)阴性。荧光显微镜 $\times 400$

图9、10 为同一视野,聚赖氨酸玻片上培养6天后,消化分散,破伤风毒素免疫荧光染色。相差镜下可见25个细胞(图9),其中23个荧光阳性(图10),2个阴性(图9中箭头指示者)。 $\times 400$

图11、12 为同一视野,胶原上培养6天后消化分散,破伤风毒素免疫荧光染色。相差显微镜下有47个细胞(图11),其中31个荧光明显阳性,8个荧光模糊(图12),另外8个荧光阴性(图11中箭头指示者)。 $\times 400$

参 考 文 献

- [1] Hertz, L. et al., 1985, *Cell Cultures, in Handbook of Neurochemistry, 2nd Ed., Vol. 8, ed. by Lajtha A. pp. 603-661, Plenum Press, New York.*
- [2] 吴希如等, 1983, *北京医学院学报*, 15:169-172。
- [3] Yavin E. and Yavin Z., 1974, *J. Cell Biol.*, 62:540-546.
- [4] Bornstein, M. B., 1958, *Lab Invest* 7:134-137.
- [5] Mirsky, R., 1978, *Brain Res* 148:251-259.
- [6] 居俐等, 1985, *细胞生物学杂志* 7:25-28。
- [7] Sheehan, D. C. and Hrapchak, B. B., 1980, *Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Ed., Chapter 14, pp. 252-266, The C. V. Mosby Company, St. Louis.*
- [8] Pollerberg, E. G. et al., 1985, *J. Cell Biol.*, 101:1921-1929.
- [9] Yavin E. et al., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256:7014-7022.

应用图象分析仪及显微分光光度计分析

转化细胞的一些生物学特性

陆寿珍 韦正 苏兆众 罗祖玉
(复旦大学)

转化细胞和正常细胞在生物学特性上存在一系列差异。Dipaold, J. A. 等^[1]提出细胞恶性转化的标准,李申德^[2]等总结过细胞培养中区别正常成纤维细胞及恶性转化细胞的常用指标,1984年潘琼婧^[3]总结的,人的恶性肿瘤连续性细胞系(株)的建系(株)标准的建议及鉴定指标,为细胞培养中正常细胞恶性转化的鉴定提供了依据。以上作者给出的正常细胞与恶

性转化细胞的鉴定指标包括:细胞表面、形态结构、生长特性、增殖速率、细胞化学、生化指标和核型上的差异,而鉴别这些差异的测试仪器,最常用的是光学显微镜和电子显微镜。

图象分析作为一门现代化技术可应用于生物学和医学研究。我们从1985年以来,用西德Opton公司生产的带有图象分析系统IBAS