

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 $\times 1000$

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

I、II的扫描显微分光光度计 SMP 03, 对两例人胚胃、肾转化细胞系和其相应的对照细胞的图象进行处理, 通过人机对话, 使其高速模拟数字化, 在计算机控制下, 自动测算细胞的周长、面积、形态因子等几何参数以及核质比, 并用显微荧光法测定细胞 DNA 含量, 用以判别正常与转化细胞, 取得了若干定量的描述和具有特征性的结果。

材料与 方法

一、细胞来源

本实验所用四例细胞均由苏兆众等^[4,5]建系或原代培养。对照组的胃、肾细胞来自人工水囊引产胎儿(胎龄5—6月)的相应器官, 用组织块贴瓶法原代培养成活建系。胃细胞用传代后的第三代细胞(系成纤维细胞)为本文对照细胞; 肾细胞取自传代后第四代细胞(系上皮样细胞)为本文对照细胞。胃细胞和肾细胞的转化方法是: 先经2537 Å紫外线照射细胞(第五代)7 J/m²(剂量率为0.5 J/m²/s), 再分别用化学诱变剂ENU(乙基亚硝基脒, 溶剂为pH 6.5的PBS, 10 mmol/L)及DMBA(7,12-二甲基苯蒽, 溶剂为DMSO, 0.5 µg/ml)处理。12代后, 在大部分细胞萎缩、死亡的情况下, 挑选成活克隆, 再经胰酶消化、传代, 由此获得的细胞系, 分别命名为GTS 8502(胃)和HER 8502(肾), 目前已传至八十多代, 性状稳定。

二、样品制备及测量

将四例细胞分别以1—2×10⁴细胞/ml(转化细胞)、5×10⁵细胞/ml(对照细胞)的细胞密度接种于放有盖玻片的培养皿中, 培养液为RPMI 1640, 含牛血清10%及青、链霉素各100单位/ml, 卡那霉素50单位/ml, pH 7.2—7.4。培养皿置于5%CO₂培养箱通气培养24—48小时, 弃培养液, 37℃温热PBS漂洗, 甲醇-冰醋酸(3:1)固定, 75%、50%、25%乙醇依次脱醇, 三重蒸馏水淋洗后, 自然干燥备用。

1. 细胞形态观察

上述样品经H.E.或Giemsa染色, 二甲苯透明后封片, 在扫描显微镜高倍镜下观察细胞形态。经吖啶橙染色, 在荧光显微系统蓝光激发下计核仁数。

2. 细胞的几何特征及核质比

将染色的标本置于载物台上, 选定所测视野, 聚焦, 细胞图象通过TV摄像管送至图象分析仪的监视器屏幕显象。经系统IBAS II处理细胞图象至清晰后,

在图形输入板上, 用游标跟踪描绘显示器上所显示的细胞和细胞核轮廓, 计算机系统按指令测出细胞的周长、面积、最大直径和形态因子等几何参数, 并将数据存入计算机软磁盘内, 由IBAS I及其软件作数据处理, 求得核质比及各参数的平均值。

3. 用显微荧光法测定细胞DNA含量

生长并固定于盖玻片上的细胞, 参照Everson Pearse, A.G.提供的荧光染色法, 用吖啶橙染色, 经pH 6.5的Krebs-Ringer液漂洗, 封片后, 置于SMP 03的自动扫描台上检测。经仪器的荧光显微系统在蓝光激发下, 细胞DNA发黄绿色荧光, RNA发红橙色荧光。

测量条件: 激发光源为HBO 100瓦汞灯, 入射聚光器Opi-III RS, 激发光为蓝光(450—490 nm), 物镜为平象场萤石消色差物镜(16×/0.4)。照明光阑φ0.63 mm, 测量光阑φ0.16 mm, 测量曝光时间为150 ms, 用阻挡滤片(510—560 nm)滤去红橙(胞质和核仁RNA所贡献的)荧光。

样品在扫描台上通过操纵杆调节载物台X、Y轴向位置, 随机指定200个被测细胞核, 用标准铀玻片GG 17, 297调节光电倍增管的增益和高压, 所测荧光强度作为标准(100%), 再测量被标定细胞核的荧光强度, 扣除细胞质中微量RNA和背景杂散光的荧光后, 由计算机直接打印得出表示DNA含量的相对荧光强度和直方图。

结 果

一、细胞形态比较

在SMP 03用40倍物镜观察上述四例细胞形态, 统计核仁数和分裂相。人胚胃的对照细胞形态以梭形和不规则三角形为主, 生长呈火焰状走向, 细胞排列有序(见图1a); 而其相应的转化细胞虽也以梭形为主, 但核质比大, 细胞重叠生长, 排列无序, 分裂相多见(见图1b)。人胚肾的对照细胞为梭形、三角形和多边形, 生长排列规则(见图1c); 而转化肾细胞在增殖期为卵圆形, 当达到汇合时为多边形上皮样细胞, 巨核细胞多见, 核和核仁大, 染色质增加, 核分裂相由对照的3%左右增至28%左右, 可见三极和多极分裂(图1d)。用吖啶橙染色后, 在荧光显微镜下可检出较高

表1 两株人胚胃、肾细胞系和其相应的对照细胞的形态观察

细胞数	细胞形态	细胞形态				
		梭形	三角形	不规则三角形	多边形	核分裂相
人胚胃 转化细胞	个	110	51		40	26
	%	48.46	22.47		17.60	11.45
人胚胃 对照细胞	个	102	21	109		9
	%	42.32	8.71	45.23		3.73
人胚肾 转化细胞	个	10			227	28
	%	3.77			85.66	10.57
人胚肾 对照细胞	个	128	20		46	6
	%	64.0	10.0		23.0	3.0

表2 两株人胚胃、肾转化细胞系和其相应的对照细胞的核仁数

细胞数	核仁数	核仁数					
		1	2	3	4	5	6
人胚胃 转化细胞	个	9	52	94	65	19	2
	%	3.7	21.6	39.0	27.0	7.9	0.4
人胚胃 对照细胞	个	40	60	64	52	3	
	%	18.3	27.4	29.2	23.7	1.4	
人胚肾 转化细胞	个	58	98	40	16	8	9
	%	23.3	39.4	24.1	6.4	3.2	3.6
人胚肾 对照细胞	个	137	74	19	2		
	%	59.1	31.9	8.2	0.9		

的微核率。当细胞汇合后重叠生长明显。结果列于表1、表2、表3。

转化的胃、肾细胞核仁数趋向增多。例如对照肾细胞，绝大多数含1个或2个核仁，而它的转化细胞，除含1至3个核仁以外，约有13%的细胞具有4—6个核仁。详见表2。

二、几何参数与核质比

由扫描台分别随机选择上述四例细胞各100个，测量细胞和细胞核的周长、面积、最大直径。并测算其核质比、形态因子，求得平均数，结果列于表3。

由表3可以看出，对照细胞的平均面积大于转化细胞，而核面积则后者略大。转化细胞的核质比明显大于相应的对照细胞。分析被测

细胞的平均最大直径和形态因子，胃、肾对照细胞以梭形为主，但转化后，肾细胞为椭圆形。这与显微镜下观察到的不规则多边状上皮样细胞相一致。

三、细胞DNA含量

细胞DNA相对含量及平均单位面积(μm^2)的DNA含量见表4。胃、肾对照细胞DNA含量基本一致，分别为7.86及7.72，两转化细胞DNA含量明显高于对照细胞，各为21.20及23.59。由于肾转化细胞平均核面积($238.08 \mu\text{m}^2$)远大于胃转化细胞的平均核面积($131.37 \mu\text{m}^2$)，因而其单位核面积的DNA含量反而小于胃的转化细胞；胃、肾的转化细胞及其相应正常细胞的二倍体DNA峰值比，分别为2.58

表3 两例人胚胃、肾转化细胞系与其对照细胞的几何参数

细胞类别	测定部位	周长 μm	面积 μm^2	最大直径 μm	核/质 ($\bar{x} \pm S, E$)	形态因子*
		($\bar{x} \pm S, E$)	($\bar{x} \pm S, E$)	($\bar{x} \pm S, E$)		($\bar{x} \pm S, E$)
人胚胃转化细胞	核	47.68 \pm 0.76	131.37 \pm 3.77	17.11 \pm 0.31	0.28 \pm 0.007	0.73 \pm 0.001
	质	133.46 \pm 3.20	497.70 \pm 16.56	49.52 \pm 1.37		0.37 \pm 0.01
人胚胃对照细胞	核	53.07 \pm 1.32	127.55 \pm 6.03	20.80 \pm 0.51	0.20 \pm 0.008	0.58 \pm 0.01
	质	192.81 \pm 6.00	671.03 \pm 29.62	81.84 \pm 2.77		0.25 \pm 0.01
人胚肾转化细胞	核	61.08 \pm 0.79	238.08 \pm 6.27	20.56 \pm 0.29	0.39 \pm 0.008	0.79 \pm 0.008
	质	105.24 \pm 1.69	596.49 \pm 12.72	36.28 \pm 0.70		0.71 \pm 0.01
人胚肾对照细胞	核		219.14 \pm 4.99	21.98 \pm 0.30	0.19 \pm 0.008	0.76 \pm 0.006
	质		1465.50 \pm 87.42	134.28 \pm 4.94		0.19 \pm 0.01

* 形态因子(Form factor)的几何含义为: $\frac{4\pi \times \text{面积}}{\text{周长}}$. 圆 = 1, 椭圆 < 1, 不规则构形 < 1.

表4 细胞核 DNA 相对含量

细胞类别	DNA 荧光强度(1%)*		DNA(转化细胞)** DNA(对照细胞)
	$\bar{x} \pm S, E$	DNA 核面积 μm^2	
胃转化细胞(第47代)	21.20 \pm 0.63	0.16	2.58
胃正常细胞(第3代)	7.86 \pm 0.32**	0.06	
肾转化细胞(第44代)	23.59 \pm 0.63	0.10	2.85
肾正常细胞(第4代)	7.72 \pm 0.22	0.04	

* 以标准铀玻片 GG 17,297 的荧光强度为 100%, 测量 200 个细胞核, 去本底后的相对荧光强度的平均值(因是非同步的群体细胞)。

** 为 120 个细胞核 DNA 荧光强度的平均值。

*** 为细胞 G₁ 期峰 DNA 量比值。

及 2.85。以上结果反映了转化细胞 DNA 含量的异常和增高, 与文献报道肿瘤和恶变细胞 DNA 含量异常的结果相符^[7]。

图 2 中 a、b、c、d 是这四例细胞 200 个被测细胞核 DNA 含量的直方分布图。横座标为 DNA 荧光强度相对百分值, 纵座标为 DNA 量出现的频数。测量结果表明四例细胞的 DNA 直方图都是双峰模式, 但两例转化细胞双峰右移, 提示 DNA 含量的增高和其异倍体 DNA 特征。胃、肾对照细胞 G₁ 期峰值 DNA 各为 6.98 和 6.53, 而它们相应的转化细胞则为 18.03 和

18.58, 即转化细胞 DNA 含量为对照细胞的 2—3 倍, 由此揭示细胞 DNA 已由二倍体向异倍体转化, 并充分显示这两对配对细胞相互间存在着质的差异。核型分析结果^[5,6], 胃转化细胞属三倍体(染色体众数为 70), 肾转化细胞属亚四倍体(染色体众数为 88), 这与本文 DNA 测量结果相对应, 反映了 DNA 分布异常同细胞遗传决定之间存在的相关性。

讨 论

1. 两例人胚胃、肾转化细胞系, 经本文

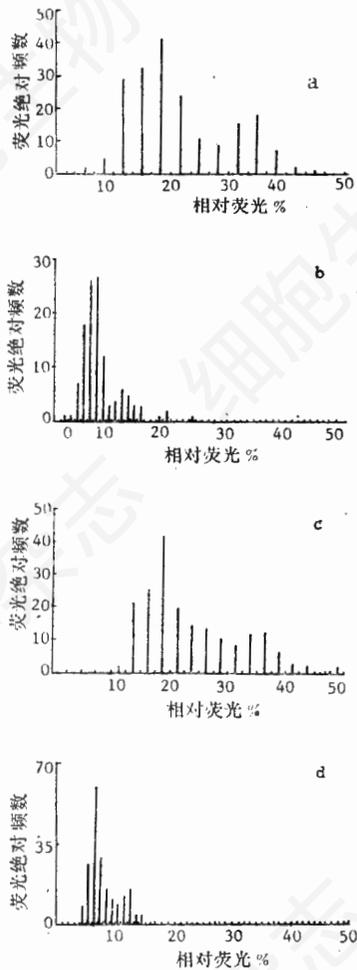


图2 人胚胃、肾转化细胞和其对照细胞DNA含量直方分布

a. 人胚胃转化细胞DNA直方分布 b. 人胚胃对照细胞DNA直方分布 c. 人胚肾转化细胞DNA直方分布 d. 人胚肾对照细胞DNA直方分布

所建方法测定的一系列指标,表明转化细胞生物学特性与其相应的对照细胞相比,由表型到核型已发生了一系列变化,即细胞形态的改变、核仁增多、分裂指数高、核质比大、细胞几何参数改变、DNA含量显著增高等。这些特征变化与我们用其他方法测得的另一些指标^[4,5],如生长速率加快、与Con. A培养可产生凝集、在软琼脂中能成集落生长,异种接种至免疫反应受到抑制的大、小白鼠及裸鼠能形成瘤块,瘤切片中可见种入的转化细胞(图1e, f),证

明这两株细胞已具有恶性转化的生物学性状。

2. 用显微分光光度计测量DNA,文献报道一般选用经典的福尔根染色后,用显微分光光度计测定其光密度^[8]。用荧光法定量测定细胞核中DNA,因存在荧光衰减而有一定难度,通常只用在定性观察上。荧光法用于定量必须满足以下条件:不仅所选用的染料能与DNA结合产生的复合物,在一定波长光的激发下产生荧光,而且所结合荧光染料的量和被测DNA量成化学计量关系。这种关系又只在一定低浓度范围内才成立,否则引起荧光淬灭。DNA染料复合物的荧光强度还易受pH及其他理化因素的影响,如光分解造成的衰减,因此,用作定量分析难度高,不易重复。

我们选用吖啶橙(1:1000)作荧光染料,按Ploem, J. S.^[8]评述的定量荧光显微术基本原理,结合本仪器特点作了改进和选定。测量中由于采用低光强度照明光源,在暗场进行标定被测细胞,测量曝光时间仅为150毫秒,因而,在测量期间不致造成因光分解作用而导致的荧光衰减。加以有标准作参比,可重复测量样品的相对荧光强度。

选用不同波长的阻挡滤片,对吖啶橙染色的样品,可选择性地测定DNA、RNA,或同时测定DNA及RNA量,而免去较为繁琐的用DNA酶、RNA酶消化后测定RNA和DNA含量,样品的染色和测量都较易掌握,用作相对测量有其优越性。

3. 图象分析仪和扫描显微分光光度计相连接,使原位定量细胞化学组份方面有所发展。本文用该仪器作细胞形态、几何参数测量及显微荧光定量DNA,对细胞生物学特性的鉴定提供了某些独特的定量指标,取得了良好的效果。

摘 要

本文用扫描显微分光光度计(西德,Opton)观察比较了两例经紫外线和化学诱变剂(ENU或DMBA)转化的人胚胃、肾细胞系的形态特

征,用测微荧光法原位定量细胞核的DNA,用仪器的图象分析系统测量细胞和细胞核的周长、面积、最大直径、核质比等几何参数,测定结果对转化细胞及正常细胞生物学特性的鉴定,提供了某些独特的定量指标,取得了良好的效果。

参 考 文 献

- [1] Dipaold, J. A. et al., 1969, *J. Nat. Cancer Inet.*, 42:867—876.
[2] 李申德, 1977, 国外医学参考资料, 肿瘤

分册(6):241—247。

- [3] 潘琼婧, 1985, 细胞生物学杂志, 7卷第2期。
[4] 苏兆众等, 1987, 离体培养的人胎儿胃成纤维细胞的转化, 中国科学, 第2期。
[5] Su Zhao-Zhong, et al., (已投, 待发表)。
[6] Everson Pearse, A. C., 1960, *Histochemistry Theoretical and Applied*, p 950. Second Edition.
[7] Barlogie, B, et al., 1980, *Amer. J. Med.*, 69:195.
[8] Ploem, J. S., 1977, In "Analytical and Quantitative methods in microscopy" p 55—84, Edited, by Meek, G. A. and Elder, H. Y., Cambridge University Press.

活细胞的离心淘洗分离

张鸿卿 连慕兰 宋平根 李素文 柳惠图 游劲松 薛绍白
(北京师范大学生物系细胞生物学研究室)

多细胞有机体是由不同类型细胞组成的,所以在研究多细胞有机体的细胞结构与功能时,常需要获得单纯类型的活细胞。此外,即使在同一种类型的增殖细胞群体中,细胞所处的周期时相(G_0 , G_1 , S , G_2 和 M)也不相同。为了研究细胞增殖与调控,也需要获取同步的活细胞。

通常根据细胞的不同物理性质,如细胞大小、形状、密度、表面电荷、表面结构的差异,利用沉降法、电泳、电磁场、纤维柱(碟)、带孔的柱、分配分离(亲水对疏水)和流式细胞分类术(FCS)来分离单纯类型的细胞。

细胞离心淘洗是细胞沉降分离的一种。该方法的原理是Lindehl于1948年提出的。它的优点是:可以分离出大量活细胞(10^7 — 10^9 个);分离速度快(1—1.5小时),由于是在稍大于1g的离心场条件下、在培养液中进行分离,对细胞活性的影响最小,能够进行选择性同步,获得不同周期时相的细胞。目前,该方法已广泛用于分离细菌、酵母、原生动物、培养的哺乳类细胞、血细胞、骨髓细胞、脑细

胞、上皮细胞、肝细胞、肺细胞、巨噬细胞、浆细胞、自然杀伤细胞、胰细胞、腹壁细胞、腹膜渗出细胞、垂体细胞、脾细胞、睾丸细胞、胸腺细胞、实体瘤细胞,以及从实体瘤中分离出宿主细胞等。 G_0 期细胞、乏氧细胞也能用此方法较有效地分离。

以下简介我室在离心淘洗方面开展的初步工作。

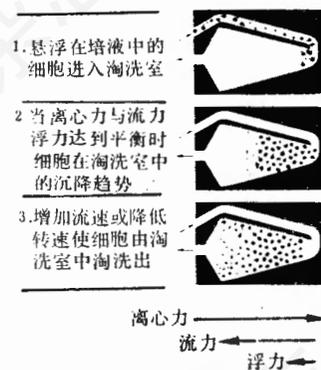


图 1 分离淘洗室

本工作是在美国 Rochester 大学癌中心耿中平教授指导下进行的,特此表示感谢。