

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。

以下简称我室在离心淘洗方面开展的初步工作。

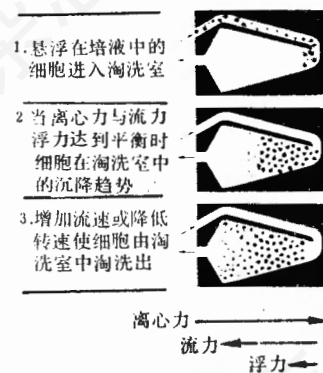


图 1 分离淘洗室

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。

### 一、基本原理<sup>[1,2,3]</sup>

在离心状态下,将细胞悬液装入淘洗转子的淘洗室中,此时细胞或其它质点将受到两种方向相反的力的作用,即方向朝外的离心力(FC)和方向朝内的流力(FD)与浮力(FB)。当这两种方向的力达到平衡时,每个质点依照它的沉降速度到达其平衡位置。沉降速度与细胞或质点的体积、密度和形状有关。于是具有相同(或很接近相同)体积、密度和形状 of 细胞或质点将聚集在淘洗室的一定区带。如图1所示。在平衡状态下,细胞或质点的体积(V),转子转速( $\omega$ )和液体进入淘洗室的流速( $\gamma$ )之间的关系式如下:

$$F_C + F_B + F_D = 0 \quad (1)$$

$$\text{其中 } F_C = V\rho\omega^2 R$$

$$F_B = V\rho_0\omega^2 R$$

$$F_D = -3\pi\eta d v$$

式中 R = 从质点到转子中心的距离;

$\rho_0$  = 液体介质的密度

$\rho$  = 细胞或质点的密度

$\eta$  = 液体的粘滞系数

$v$  = 流速

$V$  = 细胞或质点的体积

$d$  = 细胞或质点的直径

由公式(1)可以推导出在一定的流速和转速下,由淘洗室中淘洗出的细胞或质点的体积为:

$$V = K_1 \omega^{-3} \quad (\text{当固定流速 } v \text{ 时}) \quad (2)$$

式中  $K_1 = 9\sqrt{2\pi}[\eta/\omega^2 R(\rho - \rho_0)]^{3/2}$

$$V = K_2 v^{1.5} \quad (\text{当固定转速 } \omega \text{ 时}) \quad (3)$$

式中  $K_2 = 9\sqrt{2\pi}[\eta/\omega^2 R(\rho - \rho_0)]^{3/2}$

反之,根据公式(2)或(3),对于已知体积的细胞

或质点,可以推算出分离该种质点所需采用的流速和转速。这样,通过逐步减少转速或增大流速,可以依次淘洗出体积递增的各档次细胞。

### 二、装置

JE-6B 淘洗转子安装在 Backman J2-21 高速离心机上即可用来进行细胞离心淘洗分离<sup>[1]</sup>。装在淘洗转子中的淘洗室是整个仪器的核心部份。目前该公司生产两种类型淘洗室。一为标准淘洗室,另一种为 Sanderson 淘洗室。后者是前者的改良,更适用于细胞离心淘洗,其基本性能相似。我们采用标准淘洗室工作。图2是该仪器的整体系统图。

贮液瓶内存放淘洗液。淘洗活细胞应使用含有10%小牛血清的完全培养液。整个容器在淘洗过程中应置于冰浴中冷却。实验时通过调节泵的旋钮改变流量,但精确的监视流量是通过流量计进行的。用注射器装入细胞样品,一般装20ml即可。在离心状态下,用蠕动泵将细胞悬液和淘洗液注入淘洗室。气泡室用于排除气泡。淘洗转子是整个系统的主体部份,使用前必须按操作程序安装、调试、检漏。整个体系不能有渗漏,也不能有一个气泡,否则实验失败。由于淘洗时,往往需要在固定流速下改变转速来进行,因而需要快速而精确地改变转速。原来的高速离心机的转速调节甚为粗放,很不适用。我们用螺旋电位器代替原装调节电位器来调节转速。稳定范围为 $\pm 3$  rpm。实测转速通过频闪计数器(Stroboscopic counting)进行测定。转子每转一圈,频闪灯亮一次。因为频闪光位于转子下面,因此在离心时,透过离心机盖子上的玻璃窗就可以直接看到淘洗室中工作状态。

### 三、校正

如前所述,离心淘洗主要靠控制流速或转速来分离细胞。培养液是用带有速度调节旋钮的蠕动泵(multiperplex pump)作为动力灌入淘洗室,观察玻璃流量计的刻度所指示的流量来调节控制流速(玻璃流量计铁球所指示的最低或最高流速,单位是 mL/min)。由于流量计

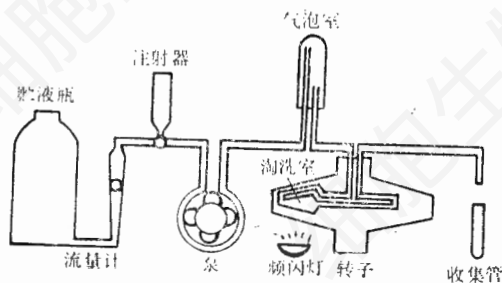


图2 离心淘洗分离系统

指示的流量和实测流量不完全一致,所以有必要进行校正,给出流量计刻度—实测流量校正曲线。正式淘洗时,对于所要求的实际流速,可从校正图上迅速确定蠕动泵旋钮应取的位置以及与此相对应的玻璃流量计铁球所指示的刻度。

转速的校正也是同样重要。我们改装了一个转速微调装置(即螺旋电位器),每转动到一定刻度,离心机上的转速显示器就给出一个实际转速 RPM,依此类推可得到一个校正图。实际使用时,能很快查到所需转速对应的电位器读数。

#### 四、淘洗方案的制定

淘洗方案的拟定至关重要,否则装入的细胞将全部流失,或完全淘洗不出来,或分离不佳。制定方案时,根据被分离细胞的体积分布,由公式

$$V = K_1 \omega^{-3}$$

$$\text{和 } V = K_2 v^{1.5}$$

计算出欲分开的各种特定体积细胞所需要的转速或流速。淘洗方案可有二种:一为固定流速,稍稍降低转速将细胞由小到大逐级淘出;二为固定转速,稍稍加大流速将细胞淘出。无论固定流速或转速,一般都采用适中值。如流速经常固定在 25—35 mL/min 左右,转速则经常固定在 2,000 RPM 左右。淘洗开始前,用注射器装入细胞。届时采用适中的流速和最大转速(例如对 Friend 红白血病细胞,用流速 35 mL/min,转速 3,500 ± RPM)以便细胞全部装入淘洗室而不致被冲出。装完细胞立即开始淘洗收集。每管收集 40 mL。最初收集的 2—4 管,主要是细胞碎片和小细胞等,大约占细胞总量的 5% 左右。以后,在流速不变的情况下,每改变一个转速,收集两管,这种方法称为“常规收集法”。1980 年,耿中平教授发展了一种长收集法<sup>[1]</sup>,即在某些重要点上,维持其转速,收集 10—15 管,这样得到体积分布集中、变异系数(CV 值)很小,也即是交叉很小的单纯细胞群体。

#### 五、分离细胞的检测

通常采用三种方法。

##### 1. 细胞体积分布测定<sup>[4]</sup>

使用 Coulter 计数器(Coulter Counter Model D)与多道脉冲高度分析器,即可在 1—2 分钟内得到细胞群体的体积分布图,如图 3 所示。

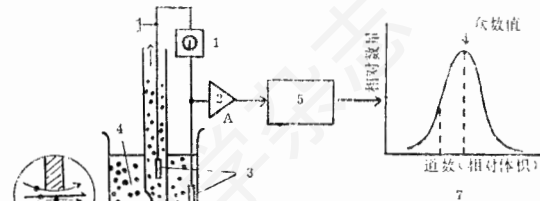


图 3 细胞体积分布测定仪示意图

1. 孔电流电源 2. 放大/衰减器 3. 铂电极  
4. 细胞悬液 5. 多道脉冲高度分析器 6. 小孔  
7. 细胞体积分布图

当细胞通过孔管(6)下端小孔时,仪器给出相应的电脉冲讯号。脉冲高度与细胞体积和 I、A 值成比例。在多道脉冲高度分析仪中,全部脉冲按脉冲高度分别累计。得到细胞体积分布图。进而用公式(4)可计算对应于任何 ch-N 值的细胞体积。其中,众数体积,即图像峰值对应的体积,往往用来代表整个群体细胞的体积。

$$V = K(A \cdot I \cdot \text{ch} \cdot N) \quad (4)$$

其中 K = 仪器常数

A = 放大倍数

V = 细胞体积

I = 孔电流电源的电压值

ch-N = 多道脉冲高度分析器指示的道数

K 值的求法,是用已知体积的标准微球作校样,测得体积分布图,将 V、A、I、ch-N 等数值代入公式(4)求出。

##### 2. 流式细胞仪(FCM)<sup>[5]</sup>测定 DNA、DNA/RNA

测定已经分离的细胞群体之 DNA、DNA/RNA

RNA, 以此确定它们所处的周期时相(G<sub>0</sub>、G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>和M)。还可通过测定细胞中抗原(免疫荧光)鉴别不同的细胞亚群, 例如T、B淋巴细胞。

3. 目测细胞大小和形态

用细胞离心涂片机, 使细胞均匀涂布于载玻片上。染色后, 用测微尺测细胞大小。并由其形态统计不同类型细胞的百分率, 从而判断分离效果。

六、实例

表 1 体外培养的 Friend 红白血病细胞 (FC)同步化分离

收集管号	预定转速 (RPM)	电位器读数	实际转速 RPM
Ro1, 2	3,500	1.175	3,510
1 AB	3,250	1.03	3,196
2 AB	3,000	0.95	3006
3 AB	2,900	0.90	2,890
4 AB	2,800	0.88	2,837
5 AB	2,700	0.82	2,704
6 AB	2,600	0.78	2,606
7 AB	2,500	0.72	2,471
8 AB	2,400	0.68	2,378
9 AB	2,300	0.65	2,310
10 AB	2,200	0.62	2,248
11 AB	2,100	0.56	2,112
12 AB	2,000	0.52	2,020
13 AB	1,900	0.47	1,897
14 AB	1,800	0.43	1,814
15 AB	1,700	0.37	1,688
Bo1, 2	—	—	—

细胞总量:  $1.2 \times 10^8$

装入的细胞悬液体积: 20 mL

细胞初始流速 35 ml/min

淘洗液: Eagle MEM + 10% BCS

收集过程: FC 在 35 mL/min 流速, 3500 RPM 条件下装入淘洗室, 并在同样流速、逐渐减少转速的情况下收集。

淘洗结果见图 4。

(表 2)细胞总量:  $\sim 1.76 \times 10^8$

(表 2)淘洗结果见图 5。

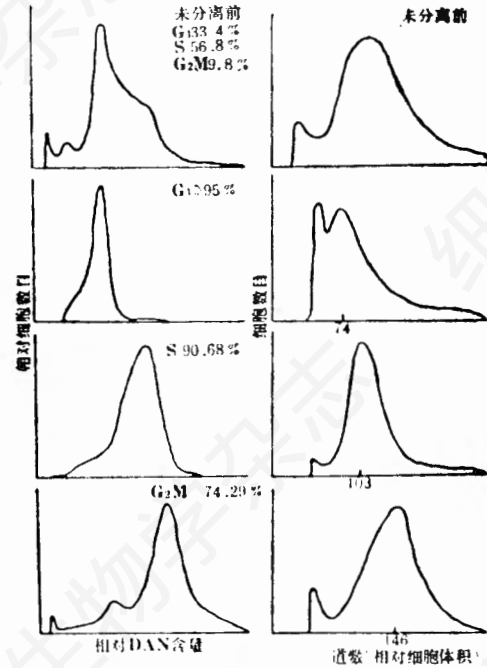


图 4 离心淘洗分离前后的小鼠 Friend 红白血病细胞的相对 DNA 含量(左)以及相对细胞体积(右)分布图

表 2 小鼠骨髓细胞的淘洗分离

收集管号	预定转速 RPM	电位器读数	实际转速 RPM	流速 mL/min
Ro1-3	4,050	1.415	4,032	24
1 AE	3,750	1.28	3,737	30
2 AE	3,450	1.15	3,446	30
3 AD	2,750	0.845	2,752	30
4 AB	2,500	0.72	2,469	30
5 AB	2,300	0.65	2,304	30
Bo1.2	—	—	—	—

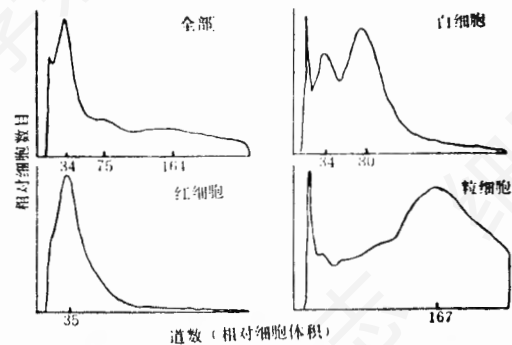


图 5 小鼠骨髓细胞离心淘洗分离前后的相对细胞体积分布情况

装入的细胞悬液体积: 20 mL

细胞初始流速 15 mL/min

淘洗液: Eagle MEM + 10% BcS

收集过程: 骨髓细胞在流速 15 mL/min, 转速 4,032 RPM 条件下装入淘洗室。以后根据上表条件进行收集。

### 摘 要

离心淘洗的原理是当外向的离心力和内向的流力与浮力之间达到平衡时, 由于不同大小的细胞具有不同的沉降系数, 它们分别停留在一定的位置, 从而可通过淘洗将不同大小的细胞分离开。它的突出优点是速度快(1—1.5小时), 可分离大量活细胞( $10^7$ — $10^9$  细胞); 可以

得到各种不同周期时相的细胞, 以便进行细胞增殖及其调控的研究。目前使用该法已经可以分离血细胞、骨髓细胞、自然杀伤细胞、培养细胞、实体肿瘤细胞及其宿主细胞等等。本文主要介绍我室开展此项工作的初步结果。

### 参 考 文 献

- [1] P. C. Keng et al., 1981, *Cell Biophysics* 3: 41-56.
- [2] M. L. Meistrich et al., 1977, *Methods in Cell Biology* Vol. 15, 15-51.
- [3] R. J. Sanderson et al., 1977, *Methods in Cell Biology* Vol. 15, 1-14.
- [4] V. Kachel, 1982, *Cell Analysis* Vol. 1, 195-331.
- [5] 薛绍白, 1985, 中国医学百科全书, 生物物理学分册, 83—85.

## 食管癌旁粘膜细胞的组织块培养法

裴许芳 周佳农 王秀琴 丁志侠 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所)

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 具有明显的地区性和家族聚集性<sup>[1,2]</sup>。建立起人的食管粘膜上皮培养系统, 在食管癌的病因和发病原理实验研究中具有重要的意义。但是成人的上皮很难长期培养, 食管又是一个开放性器官, 上皮易受细菌或霉菌的污染, 所以更难培养。国内以往所进行的食管癌的癌旁粘膜培养仅能使成纤维细胞获得较长期的生长<sup>[3,4]</sup>。本文参考国内外有关食管培养方面的为数不多的文献<sup>[5,6]</sup>, 结合我们在胎儿肝脏组织培养中的经验<sup>[7]</sup>, 经过探索, 成功地获得了成人食管粘膜上皮细胞的较长期培养。

### 材 料 和 方 法

#### 一、标本的来源及处理

以离体 3 小时以内的食管癌病人手术切除的食管标本为材料。肉眼选取距肿瘤边缘 4—5 cm 以外的食

管粘膜, 用加有庆大霉素 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、青霉素 200  $\text{u}/\text{ml}$ 、二性霉素 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 L-15 培养液充分洗涤, 再用锋利的眼科剪剪成 2—3 mm 大小的组织块。

#### 二、细胞的组织块培养法

基本方法按裴许芳等<sup>[7]</sup>先用新生牛血清将 60 mm 直径的塑料培养皿润湿, 再将剪好的组织块贴置平皿中, 每皿 6—7 块, 粘膜表面均向上。培养液为无钙 199 加氯化钙  $0.6 \times 10^{-3} \text{mol}/\text{L}$ 、新生牛血清 1.25%、胰岛素 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、氢化可的松  $5 \times 10^{-7} \text{mol}/\text{L}$ 、表皮生长因子(EGF) 5  $\text{ng}/\text{ml}$ 、庆大霉素 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、青霉素 100  $\text{u}/\text{ml}$ 、二性霉素 0.2—0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、微量元素液<sup>[7,8]</sup> (为美国 NCI 的 Lechner 博士所赠)、HEPES  $15 \times 10^{-3} \text{mol}/\text{L}$ 、pH 7.2。贴壁前加入少量的培养液以免组织块漂浮。将培养皿放入可以密封的培养盒内, 充以含 50%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 45%  $\text{N}_2$  的混合气体, 置 37°C 温室中培养。贴壁后, 每皿加 2 ml 培养液, 2—3 天换液一次。组织块周围的上皮细胞晕长到一定大小, 或需要用细胞作实验时, 将组织块迁移到新的平皿继续培养; 也可收集细胞后置留组织块以重新外长出上皮