

特点。

MK-8611 细胞在建系初期, 采用延长传代时间和 28℃、37℃交替培养的方法。细胞通过延长传代时间, 使一些易于退变、衰老的细胞被淘汰而保留了形态均一、生命力较强的极少数细胞, 再由这些细胞增殖发展成细胞系。这样既提高了细胞群体的纯度, 同时又可筛选出能够在较长时间内不传代而仍保持正常形态的细胞, 克服了很多传代细胞非特异性退化出现快, 维持正常形态时间短的缺点, 有利于各种敏感病毒的分离, 特别对一些增殖缓慢的病毒可提高分离机会。

MK-8611 细胞系对多种病毒具有较高的敏感性。接种脊灰、柯萨奇、ECHO, 麻疹等病毒后, 病变速度快且典型, 接种乙型流感病毒, 24小时后即可观察到细胞病变, 并且有明显的血球吸附现象。接种流行性出血热病毒后, 中途不需要换液, 一般 7—10天即可用免疫荧光或酶联免疫试验检测出病毒抗原。接种轮状病毒 wa 和 SA₁₁ 株后, 在第 3 天即可出现典型病变。对这些病毒的研究和分离培养提供了一株新的敏感细胞。实验表明该细胞系是有较大的应用前景, 为病毒培养及研究提供了一个很好的细胞实验模型。

摘 要

从健康雄性恒河猴肾脏, 经胰酶——EDTA 二钠液消化, 获得的细胞悬液, 采用延长传代时间和 28℃及 37℃交替单层静置培养, 建立一株能稳定传代的细胞系, 命名为 MK-8611 细胞系。该细胞退变缓慢、维持正常形态时间长, 未发现细菌、霉菌、支原体等微生物污染, 对异种动物无致癌性, 经试验对脊灰、麻疹、腺病毒、ECHO、COXB、乙型流感、轮状病毒、呼吸道合胞、流行性出血热等病毒敏感。

参 考 文 献

- [1] Westwood J. C. et. al, 1957, *Brit J. exp. pathol.*, 38(2) P 138—154.
- [2] Hull, R. N. et. al., 1956, *Anat. Rec.*, 124:490.
- [3] 李昌尊等, 1979, 中国医学科学院学报 1: 97.
- [4] [苏] o. r. 安札柏里哲著, 组织培养, 人民卫生出版社, 1965, P 246—252.
- [5] William B. et al., *Methods in Enzymology*, 1979, V 58, P 150.
- [6] 赵天寿等, 1964, 科学通报 (9):817.
- [7] Hull R. N. et al., 1962, *J Exp Med*, Vol, 115 No 5 P 903—917.

角膜内皮和角膜上皮的细胞培养研究*

林 宁

(中山医科大学中山眼科中心眼科研究所)

Dale R Meyer James P. McCulley

(美国德克萨斯大学达拉斯健康科学中心眼科)

近年对角膜病研究的一个重要方面是角膜内皮细胞和角膜上皮细胞的培养, 并在此基础上进行一系列的实验研究。早在 50 年代末 Stocker 等^[1]已进行兔角膜内皮细胞的组织培

养, 1974 年 Perlman 和 Baum^[2]改进了培养方法, 获得具有兔角膜内皮细胞形态学特点的培

* 本实验在美国德克萨斯大学达拉斯健康科学中心眼科完成。

养细胞。1965 年 Mannagh 等^[9]成功地培养了人角膜内皮细胞,最近 Lin 和 McCulley 等^[4,5]在不用任何促细胞分裂剂的条件下培养成功人的角膜内皮细胞,并用于角膜内皮移植的实验研究。由于细胞在培养时的条件容易控制,受各种因素影响较少,没有活体眼内实验时于扰因素多的弊病,所以培养细胞被广泛应用于各种实验研究中,大大丰富了人们对角膜内皮细胞和角膜上皮细胞的认识。随着研究的深入,对细胞培养技术亦提出了更高的要求,以满足各种实验研究的需要,如细胞层的渗透性,细胞转运功能试验及进行粘弹性物质(Viscoelastic Substances)等药物的毒性实验,传统的培养方法就显得不足了。本研究的目的是建立一种新的培养方法,即带塑料环的明胶培养膜,并与传统的培养方法(塑料培养皿)进行比较研究。

材 料 和 方 法

一、材料

实验动物为新西兰白兔,兔角膜取出后保存于 McCarey-Kaufman Medium (M-K 液)中。人角膜来自眼库,取自猝死的婴幼儿,年龄在 1 岁半以下,还有角膜移植术后剩下的成年人角膜片的周边部分即角膜环,均保存在 M-K 液或 K 液(K-Sol)中。M-K 液^[6]和 K 液^[7]均为角膜保存液。

二、方法

1. 带塑料环的明胶培养膜

明胶膜的制作是以 Jumblatt 的方法^[8]为基础改进而成。简介如下:配制 3%的明胶水溶液,每 5 ml 加 1 滴 Kodak Photo-Flo 200 溶液,35℃放置半小时,再于 29 至 33℃中加温半小时即可用于薄膜制作。在微孔滤膜(直径 25 mm,孔径 0.45 μm)的中央钻出 13 mm 的孔,然后把此环状滤膜浸于明胶溶液中。取出滤膜放于 16 mm 直径的塑料圆环上,自然干燥后,于盛有 5%戊二醛的密闭容器内半固定 1 小时,再于 5%戊二醛溶液中固定 2 小时,经灭菌蒸馏水漂洗数次,保存在 EMEM 中。这种培养膜厚约 1—3 μm,坚韧透明,可透水 and 溶质,适于细胞生长。在种植细胞之前,把培养膜移至盛有 2 ml 培养液的 35 mm 直

径培养皿中,细胞种植于塑料环内的明胶膜上。

2. 培养液

1) 角膜内皮细胞培养液,与 Jumblatt 等的相似^[9]。由 EMEM,双倍浓度的维生素、氨基酸等组成,但加入 15%的胎牛血清。

2) 角膜上皮细胞培养液,与 Jumblatt 等的相似^[10]。由 DMEM 和 Hams F 12 (两者比例为 1:1),胎牛血清、霍乱毒素、胰岛素、二甲亚砷和庆大霉素组成,但没有加入上皮生长因子。

3. 细胞的收集

1) 角膜内皮细胞

兔眼经 1:1,000 Lugol 氏碘溶液消毒后,剪下带 2 mm 巩膜环的角膜片。然后把内皮细胞层和后弹力膜一起从基质层上剥离出来,放在 0.2%胰蛋白酶中消化,室温下 5 分钟,更换为 0.2%细菌胶原酶和 0.05%透明质酸酶溶液,于 35℃消化 90 分钟,后弹力膜变成很小的碎片,内皮细胞亦从后弹力膜上分离出来成为细胞团。离心除去酶溶液,更换为细胞培养液,使最后的细胞密度达到 10⁴个/ml。

人角膜内皮细胞的收集与兔的相似。角膜内皮层和后弹力膜剥离出来后,经胰蛋白酶消化,离心后,用胶原酶和透明质酸酶溶液在 35℃条件下消化 30—45 分钟,离心后加入细胞培养液,以 1 个角膜 1 ml 计算加入量。

2) 角膜上皮细胞

兔眼的角膜取出后,除掉内皮层和后弹力膜,将角膜面朝上放在培养皿中,加入适量的 0.25%胰蛋白酶/Hanks 平衡盐溶液(不含 Ca⁺⁺),于 4℃中处理 14—16 小时,然后把角膜上皮细胞刮下,用平衡盐溶液漂洗,离心后按 1 个角膜 10 ml 的比例加入新的细胞培养液。

4. 细胞培养

1) 明胶培养膜

每个培养膜加入兔角膜内皮细胞或角膜上皮细胞悬液 0.5 ml,24 小时后第一次换液,以后每两天换液 1 次。人角膜内皮细胞悬液则为 1 ml,每两天换液 1 次。换液时培养膜内外的溶液均需更换。

2) 塑料培养皿

我们选用 Costar 24 孔塑料培养板(每孔直径 16 mm)作对照,加液量及换液时间同明胶培养膜。

三、观察

用倒置相差显微镜观察细胞的形态及生长繁殖情况, Kodak 黑白胶卷摄影记录。

结 果

1. 角膜内皮细胞

培养在明胶培养膜上的兔角膜内皮细胞在7至10天即可达到生长密集状态,而培养皿培养的细胞则需10至14天达到同样状态。两组的细胞种植后,有活性的细胞很快附壁,向四周展开,移行生长。可见细胞胞体变平增大,向周围伸出胞突。培养膜的细胞胞突细长,甚至在膜上造成压迹。培养膜的柔韧性易使胞突伸出并沿其方向伸展。培养皿的细胞胞突较短小。两组细胞在形态上均为扁平多角形的单层细胞,中央区的细胞较密集,呈较规则的多角形,胞体较小,在形态学与正常眼内的角膜内皮细胞较类似;而周边区的细胞较稀疏,大部分为新生的细胞,或是从中央区移行而来,呈不规则的多角形、星形等,胞体较大,为中央区细胞的2至5倍。随着这些细胞的增殖,数量增多,每个细胞的生存面积逐渐减少,胞体亦变小,与中央区的细胞无明显差异(图版图1),有时培养膜会出现微小皱折,周边部较常见,塑料培养皿则没有这一缺点。

人角膜内皮细胞生长繁殖的情况与兔角膜内皮细胞类似。但达到生长密集状态的时间比兔角膜内皮细胞要长,需2至3周,两种方法培养的细胞在形态和生长繁殖方面均没有明显差异。刚种植细胞呈团块状分布,然后细胞相继分散、附壁,向四周移行。达到生长密集状态时,细胞呈扁平多角形,与正常眼内角膜内皮细胞类似,但排列不很规则。周边区的细胞比中央区细胞较大,但不象兔角膜内皮细胞那样相差显著。周边区的细胞常有短小的胞突,细胞呈星状,稀疏区的细胞胞突交叉形成网状,而胞体不象兔角膜内皮细胞那样明显扩张(图版图2)。从角移术后剩下的角膜环获取的内皮细胞数量较少,培养细胞常常不能形成生长密集状态。从猝死婴幼儿供体获取的角膜内皮细胞数量多,生长繁殖快,易达到生长密集状态,其排列亦较规则。

2. 角膜上皮细胞

兔角膜上皮细胞在种植24小时后,具有活性的细胞均贴壁生长,其生长分裂速度较快,两种方法培养的细胞均在7—10天达到生长密集状态。它们之间在形态学上没有差异,与正常眼中的上皮细胞类似,呈多角形,排列不规则(图版图3)。位于中央区的细胞密集,细胞较小,排列较规则,而位于周边区的细胞数量较少,故细胞较大,约为中央区的2—5倍。培养超过20天后,有时会出现大片的细胞坏死脱落,裸露出培养皿底部或培养膜。但周围残存的细胞可继续生长繁殖,3—5天后即可重新覆盖裸露区域,形成新的密集状态。两组标本均未发现纤维母细胞污染。

讨 论

角膜内皮和角膜上皮的细胞培养为角膜病的基础研究开拓了新的领域。和传统的培养方法相比,我们创立的带塑料环的明胶培养膜方法,其优点在于使培养液有机会接触细胞的顶面和底面,使细胞吸取养分的方式更接近正常眼内的环境条件。利用培养膜可分隔细胞顶面和底面的培养环境,分别进行独立的研究。在进行药物毒性试验时,如Viscoelastic Substances,除去塑料环内的培养液,使细胞顶面暴露于试验药物,而细胞的底面可继续从膜外的培养液中吸取养分,维持细胞活性,比较接近体内试验情况^[11]。培养膜上的细胞易于制作电镜标本。在形态和生长繁殖方面,培养在明胶培养膜上的细胞与培养于塑料培养皿的细胞没有差异,形态上与正常眼内角膜内皮细胞和角膜上皮细胞相类似,并以正常速度达到生长密集状态,而兔角膜内皮细胞则可快3—4天。

目前,人角膜内皮细胞培养仅少数实验室有成功的报道,有的需要加入促细胞分裂剂才能使细胞达到生长密集状态^[3,12,13]。我们从猝死婴幼儿供眼中获取角膜内皮细胞,不论是培养在明胶膜上还是培养在塑料皿上,均能达到

生长密集状态,这可能得助于婴幼儿角膜内皮细胞具有较高的生长分裂潜力,因此成年人角膜内皮细胞用此方法培养难以成功,细胞不能达到密集状态。我们曾将培养的人角膜内皮细胞种植于除去内皮细胞的兔角膜植片上,再将此植片移植到兔眼中,获得成功^[4,5],移植的角膜内皮细胞具有正常的形态特征和生理功能,能维持角膜的正常厚度及透明度。

摘 要

本文报告了用带塑料环的明胶培养膜培养角膜内皮细胞和角膜上皮细胞的结果。两种细胞在达到生长密集状态后,均具有正常眼角膜内皮和角膜上皮细胞的形态特征。此方法可用于各种培养细胞的研究,特别是需分隔细胞层顶面和底面培养环境的实验及药物毒性等研究,使实验条件更接近于正常眼内的环境条件。

参 考 文 献

[1] Stocker FW, et al., *Am J Ophthalmol*

1958, 20:294.

[2] Perlman M, Baum JL. *Arch Ophthalmol* 1974, 92:235.

[3] Mannagh J, Ray Irving A. *Arch Ophthalmol* 1965; 74:847.

[4] Lin N, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (abstract) 1987; 28(suppl): 171.

[5] McCulley, JP, et al., *Cornea* (abstract) 1987; 6:67.

[6] McCarey BE, Kaufman HE. *Invest Ophthalmol* 1974; 13:165.

[7] Kaufman HE, et al., *Am J Ophthalmol* 1984; 98:112.

[8] Jumblatt MM, et al., *Transplantation* 1980; 29:498.

[9] Jumblatt MM, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:1135.

[10] Jumblatt MM, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:8.

[11] 林宁等, 中山医科大学学报, 1989, 10:17.

[12] Nayak SK, Binder PS. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25:1213.

[13] Inslar MS, Lopez JG. *Curr Eye Res* 1986; 5:967.

茯苓素对人白血病细胞系 HL-60 的诱导分化作用

范 勇 杜德林 李秀森·唐佩弦
(军事医学科学院基础医学研究所)

茯苓素是从茯苓多糖的粗提物中得到的一组小分子化合物。它的抗肿瘤活性已被吕丁等和我们以前的工作所证实^[1]。在体外,茯苓素可以明显地抑制小鼠 L₁₂₁₀ 和人白血病细胞系 HL-60 的增殖。在本文中,我们以 HL-60 细胞为模型,对茯苓素的诱导分化活性进行了研究。结果发现,在培养体系中加入 12.5—100 $\mu\text{g/ml}$ 的茯苓素,HL-60 细胞分化为单核—巨噬细胞。硝基蓝四唑(NBT)阳性率明显高于对照组,细胞形态、细胞化学染色及吞噬功能均发生显著变化。

材 料 与 方 法

1. 细胞

由中国医学科学院药物研究所韩锐教授提供 HL-60 细胞系。RPMI 1640 培养液加 20% 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 分钟灭活的小牛血清,再加入青霉素、链霉素、卡那霉素各 100 U/ml,在 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度条件下培养。每 3—4 天传代 1 次。实验时取对数生长期的细胞,离心 1500 rpm, 7 分钟,弃上清,细胞再悬于新鲜培养液内,加入 12.5—100 $\mu\text{g/ml}$ 茯苓素进行培养。

2. 药物与试剂

茯苓素由中国医学科学院医药生物技术研究所生