

欧洲细胞生物学会会议上交流的论文反映了欧洲生物学研究的传统特点即系统性、基础性与新颖性。但从各领域中又可概括出细胞生物学的一个明显的时代特征即新的蛋白分子的发现及其结构与功能的阐明。无论是基因的表达与调节,细胞周期的调控,还是细胞骨架,膜蛋白与受体,胞外基质以及细胞分化的调节与细胞衰老等领域都有一些新的,重要的结构蛋白与功能蛋白的发现。对这些蛋白结构、功能与编码基因的进一步阐明几乎成了当前细胞分子生物学的主流,细胞周期调控蛋白 Cyclin,微管结合动力蛋白 Kinesin 与 Dynein,核基质蛋白成份,膜蛋白 Ankyrin, Vinculin, Talin,胞外基质蛋白 Fibronectin, Fragmin, Gilsolin,肠上皮绒毛分化蛋白 Villin 与 Finobrin 等在会上都有系统的,深入的专题发言与讨论。

Ⅲ届欧洲细胞生物学会会议在相当程度上反映了当前细胞生物学研究的总趋势。

(翟中和 贾敬芬)

研究工作

3 T 3 细胞饲养层培养人表皮细胞最适密度研究

刘俊龙 王文正 王 韦 潘跃良 孙家岭

(第二军医大学长海医院烧伤中心)

近年来皮肤表皮细胞培养方法获得了较大进展,尤其是 3 T 3 细胞饲养层培养技术建立以来使表皮细胞传代培养取得了突破性发展⁽¹⁾。此种方法不仅对人成纤维母细胞增殖有抑制作用,而且能刺激表皮细胞分裂和生长⁽²⁾。培养成的表皮膜片具有正常结构和细胞学特征⁽³⁾。

本文着重对两种细胞的最适接种比例,表皮细胞在体外的生长曲线以及生长特点做了实验研究,现将结果介绍如下。

材料与方 法

一、表皮细胞悬液的制备

取门诊包皮环切全层皮和烧伤病人供皮区的断层皮共计 56 人例次标本。先行醋酸洗必泰和 D-Hanks 平衡液冲洗数次,剪去皮下组织,切割成 3 × 10 mm 的条块,按 1:10(v/v)的比例加入 0.3%的胰蛋白酶

(1:250 Sigma)液,置 4 °C 作用 12-18 h。取出,揭下表皮层,用培养液吹打成表皮细胞悬液,过滤,活细胞计数,最终细胞量调整到 1 × 10⁶/ml。

二、培养液的配制与培养条件

培养液为低糖 DMEM (sigma),外加 15% 小牛血清,100 u/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素,0.4 μg/ml 氢化考的松,5 μg/mL 胰岛素,10 ng/mL EGF 和 10⁻¹⁰M 霍乱毒素。pH 调至 7.2-7.4。培养器皿为 20 mL 体积玻璃 T 型培养瓶。培养条件为 5% CO₂, 37 °C, 95% 湿度的孵箱中培养。每周更换培养液两次。

三、不同浓度 3 T 3 细胞饲养层培养表皮细胞比较

取指数生长期的 3 T 3 细胞,先行 ⁶⁰Co 60 Gy 放射,用胰蛋白酶消化成细胞悬液,分别以每平方厘米面积 1 × 10⁵, 5 × 10⁴, 1 × 10⁴ 和 5 × 10³ 四种 3 T 3 细胞浓度与 5 × 10⁴ 个表皮细胞混和培养,每人皮肤例次培养均设无饲养层培养作为对照。

四、不同浓度表皮细胞培养比较

以每平方厘米面积 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 和 1×10^3 五种表皮细胞浓度接种于致死照射的 3T3 细胞饲养层上, 再补加培养液至 3 mL。

五、表皮细胞生长的判断标准

“+”表示表皮细胞膜片生长面积占培养器皿的 1—25%。“++”为 25—50%，“+++”为 50—75% 和“■”为 75—100%。

六、表皮细胞 DNA³H-TdR 标记

表皮细胞和 3T3 细胞接种量均为 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 条件下, 于培养后 10、15、20 和 30 天各取细胞 3 瓶, 先行 0.01% 的 EDTA 4 钠溶液消化排除 3T3 饲养层细胞, 然后加入含 $1 \mu\text{Ci}$ 的 ³H-TdR 培养液, 置 37°C, 2 h。等量生理盐水冲洗四次, 甲酸 80°C 水解 3 h, 最后行液闪计数。

七、细胞膜片组织学检查

培养的细胞膜片固定后直接用鲁丹尼蓝染色及 HE 染色, 或包埋切片行光镜和电镜观察。

结 果

饲养层密度对表皮细胞增殖的影响

混合接种后, 3T3 细胞贴壁快于表皮细胞 4—8 h。首先在器皿底部联网, 而后表皮细胞粘附其上, 并沿网格空隙与器皿接触, 形成无

数贴壁的细胞团块。培养 3—6 天, 贴壁细胞增殖成集落, 随着培养时间的延长, 细胞集落不断向外铺展扩大, 并使饲养层细胞逐渐向外推移。最后 3T3 细胞在表皮细胞集落间压缩成紧密的条带(图版图 1)。培养 14 天后, 3T3 细胞自行浮起脱落, 剩余的用 EDTA 排除之。继续培养数天表皮膜片形成(图版图 2)。表 1 表明表皮细胞生长快慢及成膜率高低与饲养层密度有关。虽然不同密度饲养层培养表皮细胞都能形成表皮膜片, 但成膜率和成膜速度均不相同。其中 5×10^4 组最好, 成膜片率为 100%, 形成膜片速度最快, 平均 15 天。 10^5 组效果次之。其他两组较差, 形成膜率低于 75%, 而且成膜速度较慢, 均在 30 天左右。但与无饲养层培养组比较差别显著($p < 0.05$)。

表皮细胞接种数量与成膜速度的比较

结果见表 2, 五组不同浓度的表皮细胞经饲养层培养, 15 瓶生长成细胞膜片。但随着表皮细胞接种量的递减, 成膜时间也相应延长。最快 14 天成膜, 最慢需 40 天方能生长成细胞膜片。

表 1 接种不同数量 3T3 细胞各组间比较

3T3 细胞 接种数量 (个/cm ²)	表皮细胞 接种数量 (个/cm ²)	培养 瓶数	成膜 瓶数	成膜 速度 (天)	成膜 百分率 (%)
1×10^5	5×10^4	6	5	18.4	83($p < 0.05$)
5×10^4	5×10^4	8	8	15	100($p < 0.05$)
1×10^4	5×10^4	8	6	25.5	75($p < 0.05$)
5×10^3	5×10^4	9	6	28.3	66.7($p < 0.05$)
对 照	5×10^4	9	0		

表 2 饲养层培养表皮细胞成膜时间比较

表皮细胞 接种数量 (个/cm ²)	形成膜片 瓶 数	培养成膜 时 间 (平均 d 数)
1×10^5	38	15 ± 3
5×10^4	45	14 ± 2
1×10^4	34	19 ± 4
5×10^3	25	24 ± 7
1×10^3	10	30 ± 10

两种不同培养方法表皮细胞成膜率比较发

现(表 3), 除 1×10^5 组成膜率不显著外($p > 0.05$), 其他各组饲养层培养表皮细胞成膜率均高于无饲养层培养, 在统计学上具有显著差别($p < 0.05$)。

培养表皮细胞 DNA 合成动态

细胞在培养 10 天内 DNA 合成较慢, ³H 掺入量只有 18785 cpm。10 天后开始升高, 15 天达到最高峰, cpm 值为 72602。几乎是第 10 天的 6 倍。15 天后 DNA 合成速度减慢, 但下

表3 两种培养方法表皮细胞成膜率的比较

表皮细胞 接种数量 (个/cm ²)	无饲养层培养法			饲养层培养法		
	培养瓶数	成膜瓶数	成膜率 (%)	培养瓶数	成膜瓶数	成膜率 (%)
1 × 10 ⁵	30	16	53	40	38	95(p>0.05)
5 × 10 ⁴	25	3	12	46	45	98(p<0.05)
1 × 10 ⁴	23	0	0	37	34	92(p<0.05)
5 × 10 ³	21	0	0	28	25	90(p<0.05)
1 × 10 ³	19	0	0	16	10	63(p<0.05)

降幅度不大。结果见下图。

表皮细胞膜片组织学检查

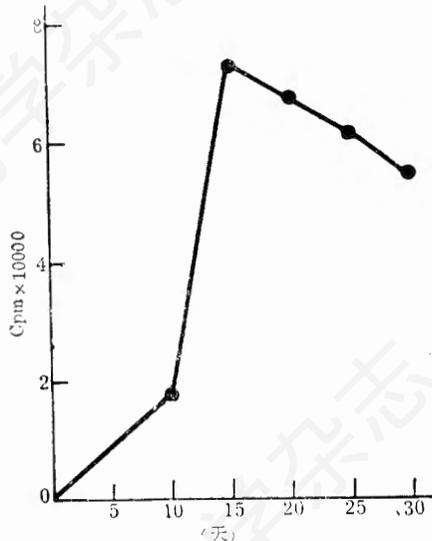


图 表皮细胞培养生长曲线为3份样品测定平均值

细胞膜片切片光镜检查证实培养的表皮膜片呈复层结构。分上、中、下3层，全层有3—8个细胞厚(图版图3)。若丹明尼兰染色为红色，HE染色细胞核为双核。

透射电镜证实培养的表皮细胞胞浆内含有大量的张力纤维，呈束状。细胞间有桥粒存在，为典型的表皮细胞。胞质内还含有线粒体，粗面内质网和高尔基小体(图版图4)。但3T3细胞胞质内只有线粒体，粗面内质网和体积大小不同的空泡。

讨 论

3T3细胞饲养层培养表皮在解决大面积

烧伤自体皮不足矛盾中显示了美好前景^[4]。表皮细胞培养成膜片的高低与3T3和表皮细胞接种数量有关。我们的实验结果证实两种细胞的混合接种比例为1:1，细胞量为5 × 10⁴/cm²时，饲养层网络适中，表皮细胞贴壁率高，集落分布均匀。培养成表皮膜片时间短。这与Hayflick的报道大致相同^[15]。但也有人认为1:3的比例培养效果更好。我们发现3T3细胞接种量过多或过少都影响表皮细胞生长。其原因可能是饲养层过厚，表皮细胞不易与器皿面接触，饲养层过稀，网络分布不均，表皮细胞不易形成集落，因而培养成膜时间延长。同时纤维母细胞混生率增加。

还有人报道在无饲养层培养中，1 × 10⁶/cm²个表皮细胞接种量，培养成表皮膜片效果同样十分理想^[6]。这主要可能是所使用的培养器皿种类，和人体不同部位的皮肤表皮细胞有关。也曾有人推测高数量细胞接种后，细胞本身分泌的各种蛋白因子浓度升高而加速细胞生长之故。

在体外培养条件下，15天表皮细胞DNA合成速度最快，之后呈缓慢下降，这与在显微镜下所见基底层细胞不断增殖，上层细胞不断角质化脱落，两者趋于平衡是一致的。

本实验与有关报道^[7]都证实3T3细胞饲养层培养表皮细胞具有以下优点：1. 表皮细胞接种量低。2. 细胞贴壁率高。3. 培养成表皮膜片快。4. 皮肤面积扩大倍数大。5. 成纤维细胞混生机会低。因此本方法为救治大面积

烧伤自体皮不足提供了一条新途径^[8]。

摘 要

本文分别以五种不同浓度的表皮细胞和四种密度的3T3细胞饲养层做了混合培养观察。接种前3T3细胞先行⁶⁰Co, 60 Gy放射。培养的表皮膜片均做了大体染色, 组织切片和电镜观察。不同培养时间的表皮细胞还分别进行了DNA合成³H-TdR掺入标记测定。

结果证实表皮细胞与3T3细胞最佳混合接种比例为1:1。最适细胞接种量为 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 。在此条件下表皮细胞生长最快, 15天形成膜片。而且饲养层培养表皮细胞接种量少, 表皮面积扩大倍数大。为此我们认为饲养层培养是表皮细胞培养的最好方法之一。

图 版 说 明

图 1 培养后第7天表皮细胞在饲养层中形成集落。剪为3T3细胞条带(倒置显微镜 $\times 100$)

图 2 表皮细胞培养后15天生长成的表皮膜片。
(倒置显微镜 $\times 100$)

图 3 培养第10天后表皮膜片组织切片 \downarrow 为基底细胞

(光镜 $\times 150$)

图 4 表皮细胞培养后21天的透射电镜。
($\times 8000$)

- A. 桥粒
- B. 张力纤维
- C. 粗面内质网

参 考 文 献

- [1] Rheinwala, G. et al., 1975, *Cell.*, 6: 331—344.
- [2] Green, H. et al., 1987, *Science.*, 200: 1385.
- [3] Milo, G. E. et al., 1980, *In Vitro.*, 16: 20.
- [4] Gallico, G. G. et al., 1984, *New England J. Medicine.*, 311: 448.
- [5] Hagflick, L. et al., 1973, *Tissue culture methods and application.* New York. PP. 220.
- [6] Gilcrest, B. A. et al., 1980, *Cell Biol Inter Reports.*, 4: 11.
- [7] Green, H. et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 5665.
- [8] Daniel, A. et al., 1986, *J. Invest Dermat.*, 86: 181.

人肺癌免疫导向药物的研究 II. 单抗和苯丁酸氮芥结合物的研究

郭 瑶 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

张鸿良

(中国科学院上海药物研究所)

早在1905年Paul Ehrlich就提出了“导向药物”的概念, 单克隆抗体技术的问世使这一概念得到相应的发展, 特别活跃的领域之一是单克隆抗体与药物的结合物作为有潜在应用价值的免疫导向药物, 俗称“生物导弹”。其次, 由于生物导弹能更集中于靶细胞, 因此有可能使达到正常组织和细胞的生物导弹的量比药物单

独作用时少, 故兼有减少副作用的可能, 有希望发展成为一种新的治疗肿瘤方法。已经结合的“弹头”包括细菌或植物毒素, 如白喉毒素, 蓖

本工作部分受国家“七五”肺癌攻关项目和上海市科学技术发展基金项目资助。工作过程中得到本实验室同仁和中科院药物所陈崇光、郭秀月同志的热情帮助, 特此致谢。