

对细胞培养中一种黑色运动颗粒性质的研究

韩雪梅 王永春 吴翠娇 刘继民

(青岛医学院肿瘤研究室)

在细胞培养中常可见到细胞及培养液中有一些大小不等、形态不同的黑色颗粒在运动。如果镜下检查(100×)每视野计数在10个以上者就可能使细胞生长受到影响,如果其数量再增多细胞可停止增殖继而死亡⁽¹⁾。人们常称这种颗粒为黑焦虫或中毒颗粒。近凡年来,国内凡与细胞培养有关的科研工作者对此十分关注。本室对这种黑色的运动颗粒进行了较系统的研究,证明这种黑色运动颗粒为硅复合物。我们称之为硅小体,简称B,本文报告了这方面的工作结果。

材料和方法

1. 组织培养方法 应用RPMI 1640完全培养液(内含10%小牛血清、谷胺酰胺2 mmol/ml, 0.2%碳酸氢钠, 100 IU/ml青霉素, 100 μg/ml链霉素)对人肺癌、胃癌、Hela、VERO细胞株及人胚肺细胞等在含5% CO₂培养箱中培养,直接观察B运动情况,部分进行定格缩时摄影。

2. 收集不同产地的小牛血清,包括来自英国、美国、澳大利亚、日本以及本室生产的。取来直接进行显微镜观察,部分进行了定格缩时摄影观察。

3. 常规石蜡包埋切片, HE染色。

4. 常规电镜包埋,超薄切片,透射电镜观察(日立-600型)。

5. 能谱扫描电镜观察分析(EDX), (美国Camb-ridge牌)选用小牛血清进行扫描电镜观察和能谱分析。

6. 紫外分光光度计(日本岛津UV-260)测定。

7. 超速离心机(日本日立SCP 85 H)离心转速60000 rpm, 4℃下, 4小时后分别取上清各层次及沉淀,直接镜下观察B颗粒的分布情况。

8. 电泳透析: 10%小牛血清装入透析带内(分子量小于3500)进行电泳。电泳液为pH值7.0的0.1M PBS 电压100—110 V 时间2小时。

9. 电感耦合等离子发射光谱分析仪(ICP): Plasma 300型。对下述各样品分别经0.45 μm滤膜过滤后进行ICP分析,分析波长为251.6 nm, 正向耦合功率1.8 kW, 观测高度18 mm。

① 1640完全培养液50 ml, 分别装入国产玻璃培养瓶, 美国Pyrex玻璃瓶和塑料瓶。另将50 ml双蒸水装入国产玻璃瓶做对照, 置入37℃CO₂培养箱中, 分别于3、10、20天取出, 进行ICP分析, 测定其硅含量。

② 1640完全培养液分别装入相同的塑料管中, 一管做对照, 另一管加入SP 2/0骨髓瘤细胞, 浓度为 5.5×10^4 /ml, 在37℃, CO₂培养箱中培养3天, 然后进行ICP分析。

结果与讨论

一、黑色运动颗粒并非是有生命的物质

1. 用各种杀死微生物的手段都不能“杀死”B。从培养液中分离出来的运动B, 用物理方法(CO₂激光、钴60、微波、紫外线、高温、高压)和化学方法(浓盐酸、浓硫酸、硝酸及高氯酸混合液、氢氧化钠、福尔马林)以及生物学方法(小鼠腹腔吞噬细胞)处理, 除浓氢氧化钠溶液可致B连成片漂浮在液面上停止运动外(可能是氢氧化钠浓度大比重大导致B浮起而联结在一起, 失去布朗运动的条件)。其余的方法均不能终止B的运动。经CO₂激光及钴60照射后B可变得更小, 但运动仍然存在。一般说来生命体在上述强烈的理化条件的处理下是不可能存活的, 故更难以想像它是一种生命体的活动。

2. 黑色运动颗粒的形态观察, 包括光镜、透射和扫描电镜, 都只看到大小不等的颗粒, 未见到细胞核、核膜、细胞器、细胞膜及绒毛等生物体的结构。在透射电镜中看到B中间密

度较低,但大致是均匀的。周围的透明区是因为质地硬的硅与周围包埋树脂之间形成了空隙(图版图1)。扫描电镜也见到形状不同、大小不一,边缘密度略高、中间密度略低的小体(图版图2),未见到微绒毛结构。

3. 紫外分光光度计测定将牛血清中收集的透动颗粒分别洗涤后匀浆,进行紫外分光光度计测定,未见蛋白质的吸收峰,说明B无蛋白质成份。

4. 超高速低温离心,B颗粒在水中以60,000 rpm(4℃)离心4小时后,上清液中仍有许多B存在。一般情况下,大部分病毒颗粒在这样的条件下可以离心沉淀下来,所以B的这种表现使得它是具有生命物质的可能性很小。

5. 电泳加透析结果把透析带内装入10%牛血清,架在电泳槽上,经2小时后大部分B集中在负极电泳槽的缓冲液中。说明:①B可透过透析带,其分子量小于3500,属小分子物质;②B在中性条件下带正电荷。有生命的物质必然具有大分子的DNA或蛋白质成分,一般在中性条件下带负电荷。

6. 能谱扫描电镜(EDX)观察分析B颗粒是一种硅化合物,对在扫描电镜下观察到的边缘密度略高区和中间低密度区以及整体部分,分别进行能谱分析,其成分均以硅为主,其次为钙和钾(图1)。

7. 电感耦合等离子发射光谱分析结果

①完全培养液在不同质量的器皿中存放不同时间后硅含量的改变见表1;

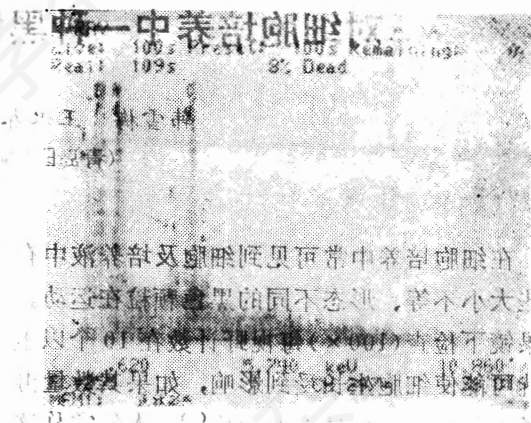


图1 扫描电镜能谱分析

↑所指之峰 Si、Ca、K 为 B 小体成份, Ca 为 α、β 峰, Au (金)和 Th (钍)为标本镀金之元素。

表1 所见用国产培养瓶盛入 1640 培养液, 37℃保温 8 天后, 硅的含量就有较显著的增加, 并随时间的延长而逐渐增加, 它与用 Pyrex 玻璃瓶盛的培养液中的硅含量相比, 差别十分显著。用塑料瓶装的培养液中硅含量几乎没有改变。用国产玻璃瓶装的双蒸水虽经 20 天的保温也未测出有硅。综合上述结果说明完全培养液中除其本身含极少量硅(0.056 ppm)外, 培养液还侵蚀玻璃的硅酸盐成分而使培养液中的硅增加, 显而易见, 国产玻璃器皿和 Pyrex 器皿在玻璃被侵蚀的程度上有很大不同。张鸿卿^[1]指出镜下(100×)有 10 个以上的黑色运动颗粒就可影响细胞生长。因而使细胞培养能顺利进行, 必须严格选用培养器皿。

②硅除来源于培养液对玻璃的侵蚀外还来

表 1 完全培养基在不同容器中存放不同时间的硅含量(ppm)的改变

物 质	容 器	时 间 (天)			
		0	3	10	20
完全培养基	玻璃培养瓶(国产)	0.056	2.020	7.420	8.440
	玻璃 Pyrex 瓶(美制)	0.056	0.207	0.730	1.126
	塑料瓶(美制)	0.056	0.056	0.084	0.050
双 蒸 水	玻璃培养瓶(国产)	0.000	0.000	0.000	0.000

源于培养细胞本身：我们取完全培养液经 ICP 测定其硅含量为 0.050 ppm，然后分别装入两个塑料瓶中（已证明此塑料瓶没有硅被侵蚀出），其中 1 瓶加入 SP 2/0 骨髓瘤细胞（浓度为 $5.5 \times 10^4/ml$ ），另 1 瓶做为对照。在 37°C 下培养 3 天后测得对照组培养液中硅含量为 0.028 ppm，骨髓瘤细胞组的培养液中硅的含量为 0.110 ppm，与对照组相比明显的多。显而易见，多余的硅是细胞本身携带的。用胎儿肺做二倍体细胞培养时本室曾注意到不同个体的肺细胞含黑颗粒多少不同，一般说含量多的难以培养成功。因此，进行细胞培养时除选择培养器皿外，对培养的材料也必须适当选择。

总之，从 B 的抗强性（抗强酸硷、抗高温高压等），以及对其形态观察、生化分析、特别是 EDX 分析结果都支持 B 是非生命物质。ICP 测定结果进一步揭示了 B 在培养液中随培养时间增加是由于培养液侵蚀玻璃的结果而不是它本身的增殖。

二、黑色运动颗粒在培养液中的运动是布朗运动

用定格缩时摄影拍摄了 VERO 细胞培养液中的 B 的运动过程，可看到 B 像一个虫体似的不断的撞击细胞，最后进入细胞内而不再动了（图 2），穿过细胞膜进入细胞内的机理有待进一步研究。

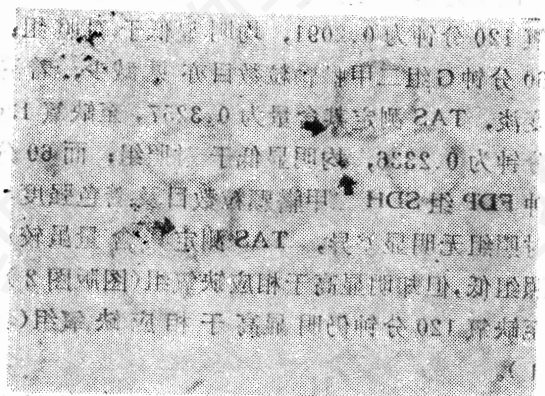


图 2 培养的绿猴肾细胞

↑ 所指示 B 小体，靠近细胞膜，进入细胞膜、细胞内。定格缩时摄影照片，间隔 1 秒。×40

众所周知布朗运动是由于体系中分散相质点周围的介质分子处于热运动状态所引起的，处于热运动的分子在各个方面不断撞击质点，由于各方面的撞击力不均匀，因而使质点做无秩序的间断运动（图 3）。我们曾将金黄色葡萄球菌经高温高压处理，使其失去繁殖力和致病性，或者说是“死了”，把处理后的球菌放在镜下观察，可清楚的看到它们仍在运动，其速度随液体温度增高而加快。这种运动可认为是死了的金黄色葡萄球菌菌体作为体系中的分散相质点受周围介质分子热运动的影响而引起的。上述现象和生命现象中生命体的运动以及对外界环境的应答性很容易混同。

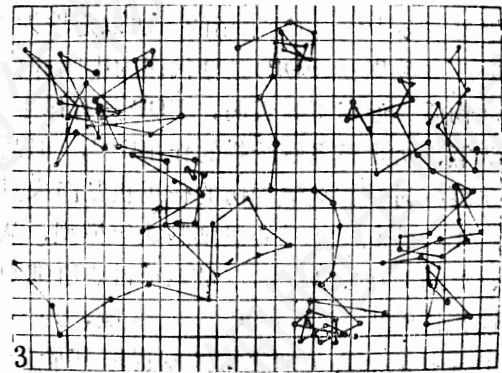


图 3 布朗运动的示意图，质点呈无秩序的间断的运动

摘 要

在组织培养中常观察到一种大小不等、形态不同的黑色运动颗粒，它对培养细胞的生长有不良影响，有时甚至导致细胞死亡，并能在一定条件下随培养时间的增长而增加其数量。我们取细胞培养用的小牛血清、培养基和其他材料中的黑色运动颗粒，应用光学显微镜、透射电镜、扫描电镜对其形态学进行系统观察，并用显微摄影观察其活动情况；用紫外分光及电泳透析进行生化分析，结果均证明该颗粒为无膜式结构，无蛋白质成分，中性环境下带正电荷，能谱扫描电镜分析为硅复合物，我们称

之为硅小体(B)。证明其活动属布朗运动。本文进一步用电感耦合等离子发射光谱分析了培养液及双蒸水中可溶性的硅含量在不同质量的容器及不同时间的变化,证明了硅小体的增多主要来源于培养液对玻璃器皿的侵蚀,部分来

源于被培养的细胞。

参 考 文 献

- [1] 张鸿卿, 1988, 细胞培养中一种新微生物污染的初步研究, 中国细胞生物学会动物细胞和组织培养第四次学术讨论会论文摘要。

1,6-二磷酸果糖抗心肌细胞缺氧性 损伤作用的定量组织学研究

程 薇 李 鹏 卢 兴 杨继声

(西安医科大学病理生理教研室)

关于培养心肌细胞缺氧性损伤的研究, 近年报道较多^[1,2], 但所采用的方法以定性为主。1,6-二磷酸果糖(FDP)是糖代谢的中间底物和驱动物质。近年研究表明, FDP具有保护心肌缺氧、防止膜系统受损的作用^[3,4], 但从定量角度探讨其抗缺氧损伤的作用机制尚未见报道。本实验利用培养心肌细胞缺氧模型, 从代谢、形态和功能3方面定量地探讨心肌细胞缺氧性损伤的规律及FDP对其影响, 为阐明FDP保护缺氧心肌细胞的机制提供实验依据。

方 法

1. 选新生2—3天Wistar乳鼠, 参照Acosta等^[1]方法培养心肌细胞, 在培养72小时后分为对照组、缺氧组、缺氧加葡萄糖组(G组)、缺氧加FDP组(FDP组)。参照Deluca等^[2]方法建立缺氧模型(氧分压 ≤ 30 mmHg)。心肌细胞搏动的振幅和频率采用光电转换搏动器记录。

2. 琥珀酸脱氢酶(SDH)和乳酸脱氢酶(LDH)均以Pearson法显示^[5], PAS阳性物质以Horobin法显示^[6]。每张标本选30个细胞, 用图像分析系统(Leitz-TAS)在波长为589 nm下测定心肌细胞内SDH、LDH及PAS阳性物质的含量, 并同时测定心肌细胞面积的大小, 结果输入电子计算机, 得出单个细胞的SDH、LDH和PAS的相对含量。

3. 每个光、电镜标本分别以 10^3 和 10^4 倍率随机拍照5—6张照片, 每组各取30张, 电镜照片放大

倍数经光栅复型校正。用TAS分别测量每张照片的心肌细胞线粒体和核的横截面积及周长, 数据的其他获得及立体学计算公式, 均参照郑富盛等^[7]方法。采用比表面法, 将所有参数经电子计算机处理, 得出各组线粒体的平均体积及平均单个心肌细胞的线粒体数目。

结 果

一、心肌细胞SDH、LDH及PAS阳性物质的含量变化

1. SDH定量 对照组心肌细胞胞浆中SDH二甲腈颗粒数目多, 呈深紫色, TAS测定其相对含量为0.4615; 缺氧组在缺氧60分钟后SDH二甲腈数目有所减少, 着色变淡(图版图1), TAS测定其含量为0.3079, 至缺氧120分钟为0.2091, 均明显低于对照组; 60分钟G组二甲腈颗粒数目亦见减少, 着色变淡, TAS测定其含量为0.3257, 至缺氧120分钟为0.2336, 均明显低于对照组; 而60分钟FDP组SDH二甲腈颗粒数目及着色强度与对照组无明显差异, TAS测定其含量虽较对照组低, 但却明显高于相应缺氧组(图版图2), 至缺氧120分钟仍明显高于相应缺氧组(表1)。

2. LDH定量 对照组心肌细胞胞浆中LDH的二甲腈颗粒数目多, 呈深紫色, TAS测定其相对含量为0.5417, 镜下未发现60、