

- [5] Yamaizumi, M., T. Uchida, Y. Okada, 1978. *Nature*, 273:782—784.
- [6] Yamaizumi, M., T. Uchida, Y. Okada and M. Furusawa, 1978. *Cell*, 13:227—232.
- [7] Yamaizumi, M., T. Uchida, E. Mekada, Y. Okada, 1979. *Cell*, 18:1009—1014.
- [8] Furusawa, M., T. Mishimura, M. Yamaizumi and Y. Okada, 1974. *Nature*, 294:449—450.
- [9] 中山大学生物系生化微生物学教研室编 1978, 生化技术导论, 259—267, 人民教育出版社.
- [10] 王世中主编 1980, 免疫化技术 120—121 科学出版社.
- [11] Rechsteiner, M. C., 1975. *Exp. Cell Res.*, 93:487—492.
- [12] Seeman, P., 1967. *J. Cell Biol.*, 32:55—70.
- [13] Loyter, A., N. Zakai and R. G. Kulka, 1975. *J. Cell Biol.*, 66:292—304.
- [14] Ihler, G., R. Glew and F. Schnure, 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70:2663—2666.
- [15] Mekada, E., M. Yamaizumi and Y. Okada, 1978. *J. Histochem. Cytochem.*, 26:1067—1073.
- [16] Furusawa, M., M. Yamaizumi, T. Mishimura, T. Uchida and Y. Okada, 1976. *Methods in cell Biology*, Vol. XIV: 73—80.
- [17] Schlegel R. A. and M. C. Rechsteiner, 1978. *Methods in cell Biology*, Vol. xx: 341—354.
- [18] Wasserman, M., N. Zakai, A. Loyter and R. G. Kulka, 1976. *Cell*, 7:551—556.

人参细胞悬浮培养的研究*

I、悬浮培养细胞的形态结构和繁殖

丁葆祖 柏淑华 吴逸 樊小平

(山西省生物研究所)

人参是一种珍贵的药材,为人所知至少有四千年的历史。对人参的研究,由来已久^[3]。然而研究人参的组织培养只是近十几年的事。罗士韦(1964)^[5]、朱蔚华等(1978)^[4]先后诱导出了人参的愈伤组织并进行了继代培养,德国(1972)、日本(1973)已有用组织培养法生产与天然人参相同成分的皂甙和甙元的专利^[6],丁家宜等(1979)^[1]报道了人参细胞的液体培养及粗皂甙含量。但是,在悬浮培养条件下人参细胞的形态结构和繁殖方式的研究还未见报道。本文是研究人参悬浮培养细胞的形态结构和繁殖方式的初步结果。

材料和方法

供试人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)由山西降县南繁药材场、吉林特产所、抚松第一参场供给。悬浮

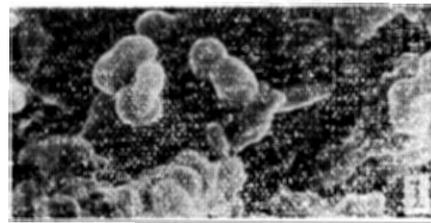


图1 人参愈伤组织细胞形态

培养细胞来源于人参鲜根诱导的愈伤组织,参龄为二年和五年。愈伤组织经六次继代培养,已分化出根,根上又长愈伤组织(图1)。将这样的愈伤组织接种于液体培养基 V-MS(6,7-V 培养基^[11]的大量元素,MS 培养基^[9]的微量部份,附加 2,4-D, 1毫克/升)。用 150 毫升三角瓶装 30 毫升培养基,在每分钟 25 转的转床上进行悬浮培养。30—40 天换一次新鲜培养液

* 本文承王伏雄、段续川教授审阅,并提出宝贵意见。扫描电镜制片、照相由山西电镜中心范建、孔繁荣,白春生、高小丁协助,特此致谢。

继代培养,连续培养130天。温度23—28℃。活体观察、记数。扫描电镜标本制备,用戊二醛、锇酸双固定,缓冲液二甲砷酸钠冲洗,丙酮脱水,国产临界点干燥器干燥,镀金,扫描电镜观察。

结果与讨论

一、人参悬浮培养细胞的形态和结构

将转接10天左右的新生愈伤组织接种于液体培养基,培养2—5天,单细胞和部份小细胞团从结构松散的愈伤组织上脱落下来。用此法获得的单细胞作为悬浮培养的材料。每隔5—7天取样观察。在培养的第一个月,悬浮培养的人参细胞形状和大小是不一致的(图2—4)。有圆形(直径4—10毫微米)、葫芦形(26—28×7—22毫微米)、长形(3—16×12—100毫微米、最长的可达700毫微米)、履形(53—68×9—11毫微米)、肾形(8—15毫微米)等。之后,随着悬浮培养时间的增长,细胞的形态和大小逐渐一致。当第二次转换液体培养基继代培养时,生活状态的人参细胞以肾形、圆形、近圆形细胞占多数。第三次转换培养基,人参细胞以圆形、近圆形为主,偶有比一般细胞大许多倍的巨形细胞存在(图5)。连续培养的时间越长,细胞彼此集聚在一起的程度

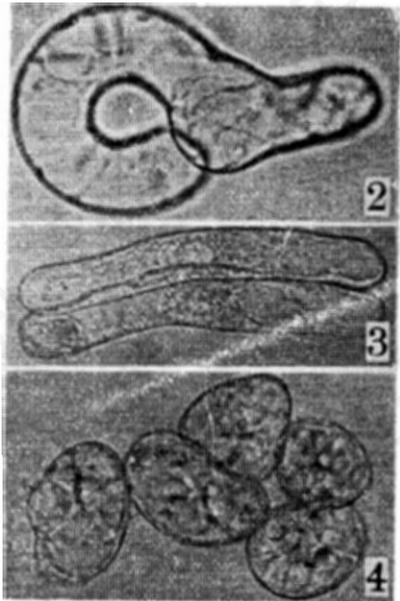


图2—4 人参培养细胞形态

图2 ×1000 图3 ×490 图4 ×480

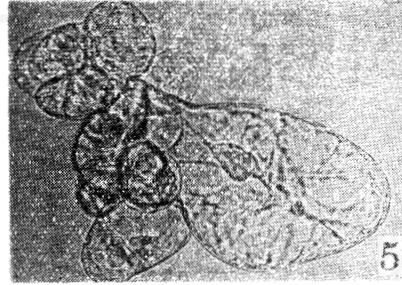


图5 人参培养细胞形态

巨形细胞和普通细胞在一起×300

越高,由单细胞逐渐形成小细胞团。进而形成愈伤组织块悬浮于液体培养基。悬浮培养细胞的形态特点,在别的植物中已有描述,Steward等^[10]报道过胡萝卜悬浮培养中有圆形细胞,巨形细胞以及很长的管状细胞。马铃薯和花生叶组织悬浮培养细胞也有类似的形态。而人参悬浮培养细胞即为圆形和近圆形。我们在悬浮培养的第一个月所观察到的人参细胞形态的不一致性,可能与选用的愈伤组织有关。连续培养结果证实,人参细胞形态比较一致。与丁家宜等^[1]观察结果相似。

关于悬浮培养细胞的结构特征,在光学显微镜下观察,悬浮培养的人参细胞结构与烟草^[8]、单冠毛菊、颠茄等类似^[7]。在旺盛分裂的人参悬浮细胞中,细胞核通常离开细胞壁,有的核处于近细胞中心的部位。围着核的细胞质由不定数目的细胞质丝和周缘细胞质相连(图6)。细胞质丝中的细胞质是流动的,细胞质流动是由于在细胞质丝中有许多颗粒状物质

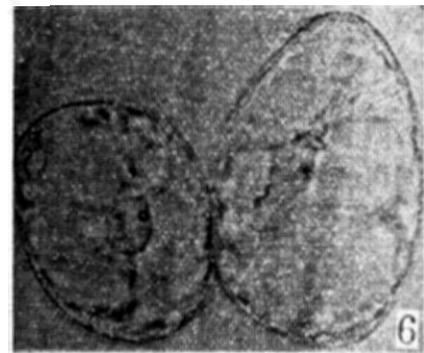


图6 人参培养细胞形态

已分裂的两个细胞,可见核、细胞质丝、液泡。×840

沿着丝方向作“布朗”式的运动而显示出来。定位观察液体培养基中人参细胞的生长情况证实,细胞核也在缓慢地移动着。

二、人参悬浮培养细胞的繁殖

观察二年生和五年生人参根的悬浮培养细胞的分裂情况表明,人参细胞的繁殖方式不受参龄的影响。无论二年还是五年的人参悬浮培养细胞,它们的繁殖方式是一致的:(1)一般的分裂繁殖。由一个细胞分裂成两个独立的个体(图6、7),或连续分裂几次,使细胞成串(图8)。(2)在细胞表面产生小突起或头状物,

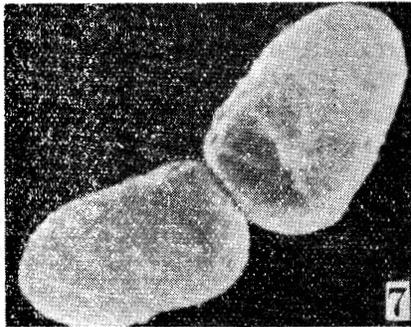


图7 人参培养细胞形态
一个细胞分裂成两个细胞。×1100

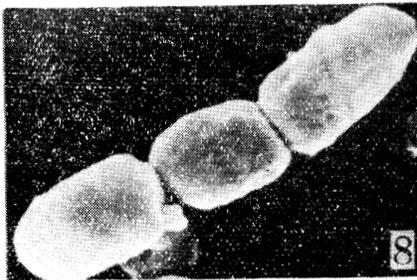


图8 人参培养细胞形态

连续分裂成三个在一起的细胞。×900

一部份细胞质和一个核进入到此突起中,突起逐渐扩大,与母细胞连接处产生新壁,最后基部与母细胞分开,形成新细胞。这一过程类似酵母一样的“出芽”繁殖(图9—11)。人参悬浮培养细胞的分裂方式与Steward等报道的在胡萝卜、花生的细胞培养中观察到的情况相类似。人参细胞分裂方式的第一种,近似正常的有丝分裂,在最初培养的45天内,绝大多数细胞分裂属于这一类型。此外,在这一时期,

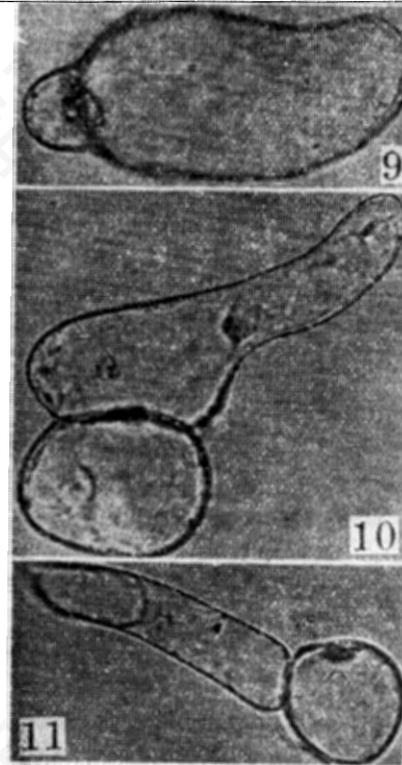


图9-11 人参培养细胞类似“出芽”繁殖的几个不同时期

图9 出现突起。×530

图10 一个核和部份细胞质进入突起中。×720

图11 形成两个细胞。×700

类似酵母一样的“出芽”现象,也是容易观察到的。据统计,二年生人参细胞1128个,有99个细胞有此现象,占8.8%;五年生人参细胞711个有75个细胞有此现象,占10.5%。但是,随着连续培养时间的加长,这种“出芽”现象越来越少。是否为正常现象,有待进一步研究。

关于悬浮培养细胞在分裂过程中细胞质的流动情况, Bergmann的观察和 Jones等的观察结果不一致。Bergmann认为,在细胞分裂中伴随着核运动,整个细胞有活跃的细胞质流动, Roberts和 Northcote(1970)对分裂的假挪威槭细胞进行观察,得出的结果和 Jones等(1960)所述相反,认为在细胞分裂时没有细胞质流动完全停止的时期^[2]。我们在光学显微镜下用活体材料观察人参悬浮培养细胞分裂时,看到了伴随着核的运动,整个细胞有很活跃的

细胞质流动, 没有细胞质流动完全停止的时期。此外, 通过固定等手段处理悬浮的人参细胞, 在扫描电镜下观察。我们看到了, 当一个细胞已分成两个细胞, 而且分裂的两细胞彼此之间已有一段距离时, 两细胞之间的连接还清楚可见(图12)。这一结果同样说明两细胞之间有很活跃的物质联系。



图 12 人参培养细胞形态
细胞间的联系。×1300

参 考 文 献

[1] 丁家宜等, 1979, 南京药学院 (1):94—

95.
[2] 中国科学院上海植物生理所细胞室编译, 1978, 植物组织和细胞培养, 上海科学技术出版社, 108—128.
[3] N. N. 布列贺曼著, 黄厚聘、徐淑云译, 1959, 人参, 人民卫生出版社。
[4] 朱蔚华等, 1978, 中草药通讯, (4):39—42。
[5] 罗士韦等, 1964, 植物生理学通讯, (2):26。
[6] 罗士韦, 1978, 生物科学动态, (1):1—21。
[7] Edited by H. E. Street., 1977. Plant tissue and cell culture, Blackwell Scientific Publications, 158—166。
[8] Jones L. E. et al., 1960, *Am. J. Bot.* 47 (6) 468—475。
[9] Murashige T. and Skoog F. 1962, *Physiol Plant.* 15:473—493。
[10] Steward F. C. et al., 1958, *Am. J. Bot.* 45(8—9), 693—703。
[11] Veliky I. et al., 1969, *Biotech. Bioeng.* 11:1247—1254。

原代心肌细胞培养连续搏动 106 天的观察

(功能、形态及药物反应)

李连达 高凤辉 张金妹

李映欧 张 京 刘建勋 唐日晶

(中医研究院西苑医院基础研究室药理组)

心肌细胞培养是从细胞及分子水平进行心肌形态、功能、病理和药理研究的有用工具, 近年国外进展较快。本实验室自 1978 年初建立培养方法后, 曾对附子 I 号(消旋去甲乌药碱)⁽¹⁾及秃毛冬青 II 号(3,4-二羟基苯乙酮)⁽²⁾的作用进行了研究。最近又对长期体外培养维持搏动达 106 天的心肌细胞的功能、形态及其对药物的反应性等方面, 进行了研究, 现报告如下。

材 料 及 方 法

心肌细胞单层培养: 方法详见前文^[1,2], 即取新生 1~3 天的 Wistar 种大白鼠, 在无菌条件下取心

室肌剪成碎块, 经 0.06% 胰蛋白酶消化分离成单个心肌细胞, 制成细胞悬液, 接种于玻璃培养瓶, 在含 20% 小牛血清的 199 培养基中 37℃ 培养, 隔日换培养基一次, 一周后改用 Eagle 培养基。

每日在倒置显微镜下观察细胞形态, 搏动频率、节律及强度; 并以本实验室组装的光电监测记录仪描记细胞的搏动图。本装置是参照国外资料^[3], 利用心肌细胞搏动时对光通量的影响, 转变为电流变化, 进行记录。包括(1)显微镜, (2)光电转换, (3)放大, (4)滤波, (5)监测与记录等部分。心肌细胞在显微镜下每次搏动都会引起光路中光通量的变化, 这种变化被安置在目镜上的光敏元件(光电池)(2)所接受, 将光讯号转换成电讯号, 经放大器(3)将极为微弱的电

讯号放大,再经双道滤波器(4)滤除干扰信号,最后显示在示波器上,同时在记录器上进行描记。由各种因素引起的变化,如给药、刺激、损伤等,使心肌细胞搏动的频率、节律及强弱发生改变,均可反映在搏动图上,并可进行定性及定量测定及互相比较。

在培养不同时期,在倒置显微镜下拍摄照片及电影。

为了观察不同培养时期心肌细胞对药物的反应性,在培养的不同时期分别给予异丙肾上腺素(北京制药厂,批号7610122,1毫克/毫升)50微升;心得安(北京制药厂,批号770529,1毫克/毫升);野菊花提取物(CI₂,本实验室制备,80毫克/毫升,pH6—7,不含钾及钙离子)50微升,以观察心肌细胞对药物的反应性,每次给药后观察15分钟。

结果与讨论

一、搏动的观察

心肌细胞培养后4—24小时开始贴壁生长,并互相接触,逐渐形成单层细胞或细胞簇。本实验用20只乳鼠,培养15瓶心肌细胞,其中A瓶长期培养达106天,该瓶在培养第3天出现搏动,由心肌细胞簇逐渐向外围生长发展,形成范围较大的单层细胞,直径约1毫米,以后达2毫米,肉眼可见。单个心肌细胞可有速率不同的自发性搏动,但当细胞间互相接触形成单层细胞后,立即变为同步搏动。一周后搏动更为规则有力,频率增加。培养1~4周,心肌细胞搏动频率经常为160—170次/分,个别时候9—187次/分。培养第5—8周,则经常为100次/分左右,个别时候13—136次/分。培养第9~15周,搏动频率不稳定,且降至40次/分左右(2—60次/分),偶有节律失常或停搏。说明随着培养时间的延长,特别是至9周以后,心肌细胞老化,功能逐渐失常,搏动的频率、节律及强度均有明显改变,但直至培养106天仍有自发性搏动。Kasten曾指出^[4]培养的乳鼠心肌细胞搏动频率范围为15—130次/分,形成细胞簇后为50—100次/分,与本实验室观察结果基本相符。Harary等报告乳鼠心肌细胞培养可维持搏动40天^[5,6];Kasten

报告的原代心肌细胞的老化实验,细胞单层最长存活100天,但该作者指出搏动早已停止,未能达到100天(未说明具体停搏日期)。本实验维持原代培养单层心肌细胞搏动至培养后106天,仍未停搏。搏动是心肌细胞功能的重要指标,只要培养条件适宜,例如定期更换培养基以保证营养;严格控制培养基的酸碱度、离子浓度及各种化学成分;避免强烈震动和机械刺激,以及温度恒定等,就可以较长期的维持心肌细胞搏动。

二、形态观察

心肌细胞培养2—3天后,由单个细胞逐渐形成细胞单层,直径可达1—2毫米,贴壁牢固,至培养第17天,细胞簇周围有部分脱落,使细胞簇由椭圆形变成梭形,其搏动也由周缘向心搏动变为从两端向中心方向收缩,颇似肌纤维束的收缩。培养24天,心肌细胞浆开始出现空泡及颗粒,以后空泡逐渐增多加大,有的互相融合,使细胞簇呈不规则形状,搏动时快时慢,不够稳定,偶有停搏。有人认为^[7],这反映了心肌细胞中线粒体、溶酶体及内质网等结构及功能逐渐发生改变,使搏动功能及形态也发生了相应的变化。至培养38天后,培养瓶中仅有一个细胞簇继续搏动,其他逐渐脱落。在培养106天时曾在显微镜下拍摄电影,记录了该细胞簇的搏动情况。

三、药物反应

为了观察老化的心肌细胞对药物反应是否敏感,在培养第104及106天作了药物实验,第1个实验(重复4次),给药前平均搏动频率为26.5次/分,加入异丙肾上腺素后15分钟,平均搏动频率增至54次/分,再加入野菊花提取物后15分钟,下降至2.3次/分。第2个实验(重复2次),给药前平均搏动频率为53.5次/分,加入异丙肾上腺素后15分钟增至69次/分,再加入心得安后15分钟,下降至26次/分。表明原代长期培养的心肌细胞对不同药物的相互影响,仍然反应灵敏,说明这种细胞虽然在功能及形态上有某些老化的表现,但

仍然存在着各种受体,对 β -肾上腺素能激动剂和拮抗剂,以及中草药提取物均有反应。另外也表明体外培养的心肌细胞是一种可以应用于生理、病理及药理研究的较好的实验细胞模型,值得进一步推广。

结 语

本文报告体外原代培养 Wistar 种乳鼠心肌单层细胞,在适宜条件下可长期维持搏动达 106 天。长期培养的心肌细胞在功能及形态上有某些老化的表明,但仍保存对 β -受体激动剂、拮抗剂及中草药提取物的反应性,并能反映出不同药物的相互影响,说明体外培养的心肌细胞是一种较好的实验材料,可广泛用于细胞或分子水平的生理学、病理学、药理学及生

物学研究。

参 考 文 献

- [1] 李连达等 1980, 中华心血管病杂志 2: 141.
- [2] 李连达等 1980, 中医杂志 6:68.
- [3] Okarma, T. B., et al. 1971, *Exp Cell Res.* 69:128.
- [4] Kasten, F. H.: *Cell Impairment in Aging and Development* (VJ Cristofalo et al eds) 389, Plenum Press, New York 1975.
- [5] Harary, I. et al., 1960, *Science* 131: 1674.
- [6] Harary, I. et al., 1963, *Exp Cell Res.* 29: 451.
- [7] Acosta, D. et al., 1977, *In Vitro* 13:818.

快速制备小鼠外周血细胞染色体*

杨丽君 王天宇 陶毓顺 周素华

(南京医学院)

在实验研究中,选择和建立适当的动物模型是一项很重要的工作。我们在急性辐射损伤的有关实验中,从细胞染色体观察的需要出发,常选用小白鼠。由于应用外周血细胞体外培养一般费时较长(需3—5天)^[1,2],加上培养条件要求较高,因此带有一定局限性。同时,由于人为培养条件常引起一些不应有的染色体变化,如间隙、断裂和其他结构异常等;或由于培养过程中细胞死亡,和随后生长过程中自然修复,而使某些染色体畸变丢失,会影响一些研究的真实性。我们参考部分资料^[1,2,3],并结合实验室中具体条件,在操作上作了一些改进,仅需7—8小时,即可从小鼠外周血细胞中制备细胞染色体;并同时制取骨髓细胞染色体以作平行比较。本文着重介绍快速制备小鼠外周血细胞染色体方法以及讨论与分析实验中观察到的有关问题。

材 料 与 方 法

一、实验小鼠的选择

从南京生物制品厂引入的繁殖鼠,体重为17.5克至25克。挑选毛色光泽,表现灵活,体表健康,无瘤结节的正常小鼠(♂10只,♀18只)。

二、染色体制备方法

每只小白鼠按每克体重腹腔注射5微克国产秋水仙素(配制浓度为0.6毫克/毫升)。在注射秋水仙素5小时后,行眼球摘除术,从眼窝内吸取0.5毫升全血(加肝素抗凝)。然后加入经37℃预温的0.05—0.06M KCl溶液至8毫升。混合后,置于37℃水浴中低渗处理20分钟左右,即可加入1毫升新鲜配制的甲醇冰醋酸固定液,待充分混匀后低速离心(转速为700—800rpm)5分钟,弃去上清液,留沉淀约0.5毫升。此时滴加3:1的甲醇冰醋酸固定液4.5毫升,固定30分钟。

* 文中照片承本院摄影室朱玉喜同志拍制,在此表示感谢。