

因子诱导的细胞内反应事件也应分感受性和进行性两大类。这样,某些癌基因产物可能涉及感受态(如 *myc*、*myb*、*Ela*、*fos*、*sis*),另一些则与进行态有关(如 *ras*、*Blym*、*raf/mil*),也有介于两者之间(多瘤病毒的 *middle T*)。

四、摘要与小结

刺激细胞增殖的多肽生长因子,是培养细胞也可能是活体内细胞重要的生长调节分子。体外非转化细胞的生长繁殖一般需要一种以上的生长因子。通常条件下,由于生长因子较培养液中其他成分更易耗尽,因此成为增殖的限制因子。肿瘤细胞的增殖对特异生长因子需求的减少或消失是一种较普遍的现象,也是肿瘤细胞的主要特征。对各类生长因子及其癌基因产物的研究,使我们对肿瘤细胞增殖的机制有了进一步的了解:细胞增殖是通过生长因子—受体—细胞反应这一信息传递途径完成的,这一途径中任何一步改变都可能影响细胞增殖。

研究生长因子作用的分子机制刚开始,最近几年对细胞癌基因的注意力和兴奋点已逐渐转向生长因子。这不仅是由于生长因子参与了正常细胞的生长控制,而且由生长因子启动的细胞增殖过程包含着癌发生的病因学。对生长控制进行分子分析的一个重要目的是希望找出在生长调节过程中起重要作用的具体基因或蛋白。编码生长因子、受体和受体后过程的基因可能是关键性调节基因中一组重要的子集。此外,这些基因的细胞专一性提示人们有可能用只杀伤那类增殖细胞的药物来进行导向治疗,而不是目前所用的广泛性杀伤药物。比如,那些干预 *TGF β -sis-PDGF* 途径的试剂,可能抑制肉瘤中大部分间质细胞的增殖,而不影响造血系统的细胞和肠上皮细胞的正常增殖,对后者也有同样的损伤效果是目前化学药剂经常产生的副作用。

陈虹摘译自 *Cancer Research*

第 46 期(1986年)

施渭康校

植物组织培养的次生代谢产物

IV. 生物素(诱导突变与生物测定)*

渡边 克美

1. 实验材料

生物素是一类维生素。可试用细胞筛选方法分离出生物素高产株。生物素在体内几乎均作为生物素酶的辅助因子以与蛋白质结合的形态存在,而参与 CO_2 固定与转移反应。缺乏生物素则毛发脱落、皮肤发炎。筛选生物素高产株必需先以多种富含生物素的植物细胞作为筛选高产株的试验材料,选出培养细胞种^[1]。在细胞进入生物素含量最高的恒定期时测定其生物素含量,选择含有生物素最多的培养细胞种。本文将测定过的植物培养细胞中生物素含量最高的绿色薰衣草(*Lavender*)作为培养细胞的实验材料。

2. 生物素高产株的分离

A. 生物素含量的定量方法

培养细胞中生物素含量的定量采用乳酸杆菌

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 进行微生物定量法,以滤纸圆片平板法测试^[2],测定进入生物素含量最高的恒定期细胞的鲜重。将细胞进行深度冷冻,冷冻的细胞放入玻璃匀浆器(Homogenizer)加入少量蒸馏水进行破碎,细胞碎片移入离心管,加入少量蒸馏水在匀浆器中,收集残留的细胞碎片,一放入离心管,以 3000 r/m 转速离心 15 分钟,上清液移入另一试管作为生物素定量用的检测液。用滤纸圆片平板法求出检测液的生物素浓度,然后测定检测液的量,求出每一培养细胞鲜重的游离状态生物素的含量,这一数值作为高产株的筛选指标。结合态生物素在细胞中仅作为辅酶存在,因而可以认为游离型态生物素含量高的细胞中生物素总量也高。

B. 筛选方法

将培养细胞置于网孔为 250 μm 的不锈钢筛网上,筛网放于培养皿中,细胞稍稍浸没于加入的液体培养

基中。培养基系继代培养时所用的培养基,即用加入吲哚丁酸 10^{-5} mol/L 和 6-BA 10^{-6} 的 LS 培养基^[3]。用小刮铲将细胞团仔细地破碎。过不锈钢筛,筛出小细胞团在液体培养基中用孔径 $62\ \mu\text{m}$ 的尼龙网过滤。在尼龙网上残留的大约由 10 个细胞组成的游离小细胞团,以此作为筛选生物素高产株的起始材料。

直径 9 厘米培养皿中加入 1% 琼脂培养基 10 ml。将所准备的起始材料的小细胞团悬浮于液体培养基中。在琼脂培养基凝固后,用玻璃管或大口径的吸管将悬浮小细胞团植入琼脂培养基上。测定悬浮在液体培养基中小细胞的密度,按一个培养皿大约植入 150 个小细胞团,用聚氯乙烯绝缘带密封培养皿。在 27°C 、4000 Lx 条件下培养。经常进行观察,观察时特别注意聚氯乙烯绝缘带是否脱落。如果脱落则培养皿中水分蒸发,培养基干燥而细胞枯死,或增加霉菌和细菌污染的危险性。

大约培养一个月后形成的细胞团*, 逐个的分别植入新的培养基中。三周后将再生长的细胞团仔细破碎继续植入新的培养基。把经分析生物素含量很高的细胞团再继续培养三周。供分析生物素含量用的细胞,其鲜重不能少于 1 克。

从生物素含量很高的各细胞块中,每一细胞团选出 6 个左右鲜重为 10 mg 的小细胞团,分别植入新鲜培养基中。生长的细胞块形成绿色深浅不一、硬度、分化等程度各异的细胞结构。此时将具有各种特征的小细胞团分别选择保留。选出的小细胞团作为次代高产株筛选的材料进行培养。其余部分在测定鲜重后冷冻供生物素含量的分析。根据各细胞团生物素含量分析的结果,将生物素含量高的 5—6 个细胞团保留下来,合计一个细胞块只有 30 个小细胞团继续进行培养。小细胞团移植三周后,再植入新鲜培养基,此时将生长大的细胞团仔细破碎后移植。破碎的许多小细胞团比大的细胞团原样移植生长要迅速,移植后继续培养三周,生长出生物素含量分析很高的细胞团。

共计培养 6 周后再进行选择生物素高产株。将生物素含量高的细胞团保留继续培养,从生物素含量的小细胞团生长出的各细胞块按前述方法在每一细胞块中选出 6 个左右分别鲜重为 10 mg 的小细胞团,放入新鲜培养基。这些小细胞团作为次代选择材料继续培养。测定细胞团的鲜重并冷冻供生物素含量的分析。与上次筛选一样,保留生物素含量高的 5—6 个细胞团,共计 30 个小细胞团再继续培养。这一操作反复进行即能分离出生物素含量高的生产株^[14]。

C. 利用增大变异性来诱导出生物素高产株

通过细胞筛选获得有用物质的高产株,作为筛选的起始材料的细胞团有关物质生产性能的变异很大,这是获得高产株的重要因素。为了增大培养细胞有关筛选物质生产性能的变异,可进行放射性照射等物理处理或采用在培养基内添加化学试剂等化学处理。

(a) γ 射线照射使变异性扩大

γ 射线是放射线的一种,直接作用于 DNA 分子或通过游离基产生的产物间接作用于 DNA 分子而诱发突变。因此为使细胞生物素生产性能变异性增大,将绿色蕨衣草培养细胞进行 γ 射线照射。照射后的细胞团作为筛选的起始材料,试行分离出生物素含量更高的细胞株。

培养细胞放入玻璃瓶内,用硅塞为瓶盖。为了不发生 γ 射线的间接作用,瓶内不加入培养基与水。不通过 γ 射线的器皿,铝质器皿等不能使用。 γ 射线不被遮蔽的通过细胞,细胞块的大小不影响效果。以剂量为 10 kR/hr 的 γ 射线照射玻璃瓶中的细胞 1 小时**, 剂量的大小以多数细胞死亡为佳^[5],细胞的生存率低,变异的程度大,且可获得稳定的高产株,将经 γ 射线照射的细胞团用上述 B 项内筛选方法置于筛网上仔细加以破碎。从游离单细胞中取出 10 个细胞左右小细胞团。这一经 γ 射线照射的小细胞团即作为生物素高生产株筛选的起始材料,按照 B 项内小细胞团筛选法反复进行筛选,可获得能高产生生物素的细胞株。

(b) 利用添加庚二酸 (Pimelic acid) 的培养基筛选生物素高产株

庚二酸系生物素的前体,同时具有阻碍蕨衣草细胞增殖的效果。另一方面,生物素本身对细胞的增殖则无阻碍作用。因此,利用加入庚二酸高浓度的培养基反复进行细胞筛选,可筛选出将有毒的庚二酸向无毒的生物素转化能力强的细胞。所以将添加庚二酸的培养基用于反复进行细胞筛选,可以试行分离生物素高产株。

B 项内所述筛选方法的培养基,可使用加入庚二酸和 L-丙氨酸各 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的添加庚二酸的培养基***,

* 细胞团的形成率约为 30%。

** 使用钴 60,生存率是形成可见小细胞团的比率,为未经照射细胞的 10%。

*** 生存率以形成可见细胞团来衡量时为未添加培养基的 20%。

反复进行细胞筛选以获得生物素高产株。康二酸的添加浓度是使多数植入细胞达到死亡的浓度。

参 考 文 献

- [1] K. Watanabe, S. Yano and Y. Yamada, 1982, *Phytochemistry*, 21: 513.
- [2] 日本生化学会编, 1975, 生化学实验讲座, 13卷, 351页, 东京化学同人。
- [3] E. M. Linsmaier and F. Skoog, 1965, *Physiol. Plant.*, 18, 100.
- [4] K. Watanabe and Y. Yamada, 1982, *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, 357.
- [5] K. Watanabe and Y. Yamada, 1982, *Plant Cell Physiol.*, 23, 1453.

周荣仁 摘译自山田康之编著“植物细胞培养マニエアル”一书的69~73页。

周郑校

原代人胎成骨细胞体外培养方法的建立

宋新德 张文治 李兰英 王晓燕 庞智玲 谭郁彬

(天津医学院内分泌研究所)

Peck(1964)首次将胎鼠骨细胞用于体外培养^[1]。此后人们开始将体外培养技术及骨细胞培养物做为一种模型用于研究骨代谢中细胞生长及调节机制。所用骨细胞一般取材于大、小鼠、鸡等动物^[2-4]。近年 wergedal (1982)和 Farley(1983)相继报道了成人骨细胞体外培养的结果^[5,6], 为人体骨代谢的研究提供了极有价值的方法。体外研究的特点是排除了体内实验中复杂因子之间的相互干扰, 并可以从单细胞形态及代谢指标的变化, 反映某一影响因子的直接效应。

骨组织是由骨基质及多种细胞成分构成^[7], 如成骨细胞(Osteoblast OB)、骨细胞、破骨细胞、纤维母细胞(Fibroblast. FB)及大量血细胞。现在国外对骨细胞的体外培养研究尚处于改进分离技术和提高纯化手段上。骨细胞的分离培养方法多采用 Luben(1976)报道的酶消化分段收集法^[8]。为此, 我们参照 Luben方法进行改良, 从人胎长骨分离 OB 并在体外进行原代培养。并借鉴国外近年报道的 OB 定性方法, 在形态学、组织化学及特异性骨代谢指标测定等方面证实该培养物具有 OB 的典型特征, 可作为体外研究骨代谢的生物学模型。在细胞水平, 为研究骨骼衰老、激素反应及各种

因素引起的病理变化机制提供了前提条件。

材 料 与 方 法

一、原代人胎 OB 分离培养

选用人工流产的五月龄胎儿在无菌条件下分离四肢长骨, 消除骨膜、骨髓等软组织, 沿长骨轴径劈开, D-Hank's 液洗去骨髓组织。

将上述骨组织加入消化液中(含骨胶原酶 0.05%, 胰蛋白酶 0.1%, EDTA 0.1%), 37℃恒温, 缓慢搅拌 10 分钟。收集该细胞悬液为第一细胞群。再重复上述过程 4 次, 每次消化 20 分钟, 各次收集液分别为 2、3、4、5 细胞群。弃去第一群(因含有大量纤维母细胞), 将后 4 群混合, 经 100, 80, 30 μ 孔径的三层尼龙网过滤后, LXJ-64-01 型离心机(北京产)1500 转/分离心 6 分钟, 所得细胞团再加入 0.83% 氯化胺缓冲液溶解红细胞, D-Hank's 液清洗二次, 用含 10% 小牛血清的 199 培养液制成细胞悬液, 接种于培养瓶内(10⁵ 个细胞/cm²)。在 5% CO₂, 37℃, 饱和湿度中培养, 隔日换液。

二、纤维母细胞培养

参考 Karatza (1984)报道的纤维母细胞分离培养法^[9], 在无菌条件下从同一胎儿的肺组织取材, 剪碎后加入消化液(同前), 搅拌消化 30 分钟, 其余步骤同前。

三、形态学观察

使用 Nikon 倒置相差显微镜每日观察 OB 和 FB