

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

的细胞形态及生长情况。

培养 10 天的 OB 用 0.05% EDTA 液作用脱壁后, 经 LXJ-64-01 型离心机 1000 转/分离心 5 分钟。将细胞团按常规电镜方法固定并制成 600 Å 的切片。在 JEM-100 CX 型电镜(日本)下观察 OB 超微结构。

四、组织化学方法

1. 碱性磷酸酶(AKP) 染色及阳性细胞计数: 取接种后 90 分钟和 10 天的 OB、FB 细胞载片, 用特异性较强的偶氮偶合技术染色^[10], 底物为 α -萘基磷酸钠, 偶联剂是坚牢兰 RR, 条件为 37°C 20 分钟。阳性反应的 OB 计数方法为, 随机计数三张染片, 每张随机计数 500 个细胞, 算出 AKP 阳性细胞百分比, 取均值。

2. Von Kossa 染色, 为检测 OB 在体外钙化能力, 从接种细胞开始, 使用特定培养基分别培养 OB 和 FB (199 培养液含 10% 小牛血清、维生素 C 50 μ g/ml、 β -甘油磷酸钠 10^{-3} mol/L,) 10 天后每天进行 Von Kossa 染色, 检查两种细胞的钙化能力。

五、生化指标测定

1. AKP 定量: OB、FB 在接种后 2、5、10、15 天, 使用鲍氏法^[11]测定其 AKP 含量。

2. 细胞蛋白生化定量: 使用 Bradford (1976) 建立的染料蛋白结合法^[12], 染料为考马斯亮蓝 G-250。在各期 AKP 测定的同时, 测定 OB、FB 的细胞总蛋白含量。

3. ^{45}Ca 摄入率测定: 根据 Binderman (1974) 报道的方法测定培养 10 天的 OB、FB 钙摄入率^[13]。

结 果

一、活细胞观察

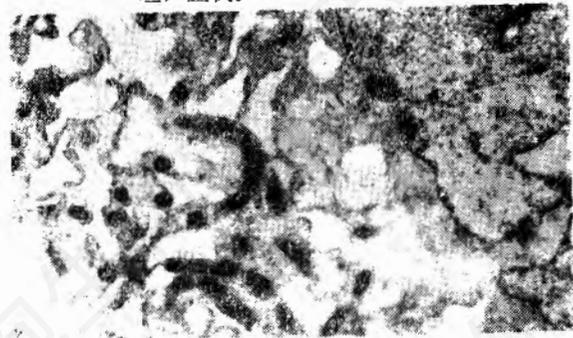
接种 24 小时后, 可见 OB 群含几种形态不同的细胞: 1. 单核星形细胞, 2. 单核梭形细胞, 3. 小圆形细胞。4. 偶见多核巨细胞。前两者为贴壁细胞, 其中以单核星形细胞的数量明显占优势。后两种细胞可因培养时间长及换液而消失(照片 1)。10 天时 OB 胞体增大, 突起变粗且数量增多。核居中, 有 1—2 个核仁。FB 在接种早期不易与 OB 区别, 但一般在培养 4 天时出现典型的 FB 形态(梭形)。10 天时呈复层排列。

二、电镜观察

OB 胞浆丰富, 核位于一侧, 核仁居中,



照片 1 400×接种 2 小时的 OB, 胞体呈平坦, 星状。



照片 2 8000×培养 10 天 OB 特点
胞浆含丰富的线粒体, 扩张的粗面内质网和游离核糖体, 并有分泌空泡。

核膜清楚。胞浆内含较多的线粒体, 扩张的粗面内质网及分泌空泡, 胞膜下可见丰富的颗粒状电子致密物(照片 2)。

三、AKP 染色及计数

OB 接种后 1—2 小时内贴壁细胞多数呈星形, 少量为梭形。其中 95% 以上的细胞 AKP 染色呈强阳性, 该细胞胞浆染色阳性, 细胞核阴

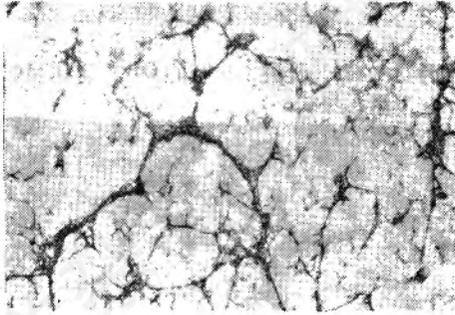


照片 3 100×培养 10 天之 OB, AKP 染色阳性。

性(照片3)。培养10天时,阳性OB数量占85%以上。作为阴性对照物的FB,无论培养早期或10天时,AKP染色全部为阴性。

四、钙化力测定

培养20天时,OB Von Kossa 染色阳性,可见黑色沉着物沿胶原纤维走向分布(照片4)。FB呈阴性反应。



照片4 200×培养20天OB Von Kossa 染色阳性。

五、AKP 定量

不同发育时期OB、FB的AKP变化曲线见图1。OB的AKP活性随培养时间的延长而变化显著,其高峰出现在培养第10天。FB的AKP活性在整个培养周期内呈低平曲线,表1为三次实验数据的平均值,经统计学处理,各期OB与FB的AKP含量均有显著性差异。

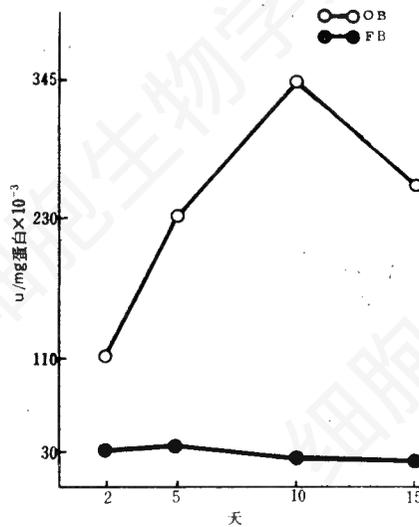


图1 各期OB、FB 碱磷酶活性增长曲线

表1 各期OB和FB 碱磷酶含量变化 (u/mg蛋白 × 10⁻³)

天	2	5	10	15
OB	110 ± 10**	230 ± 30**	345 ± 40**	258 ± 30**
FB	30 ± 3	34 ± 3	23 ± 1	22 ± 2

注: 1. 二组细胞零天接种细胞数均为 4×10^5 个/ml
2. $n=9$ ** $P < 0.01$ $\bar{x} \pm SD$

六、⁴⁵Ca 摄入量测定

表2 培养10天时OB、FB⁴⁵Ca 摄入量 ($\bar{x} \pm SD$ $n=9$)

结果	⁴⁵ Ca 计数 cpm计数/瓶	蛋白含量 μg/瓶	⁴⁵ Ca 摄入量 cpm/mgpro × 10 ⁻³
OB	3268 ± 528	94 ± 6	34.7**
FB	1146 ± 344	548 ± 37	2.1

注: 1. $n=9$, ** $P < 0.01$

10天时OB的⁴⁵Ca摄入量大于FB10倍以上($P < 0.01$), 结果见表2。

讨 论

纤维母细胞存在于体内多种组织中, 故由长骨分离纯化OB群应排除FB大量存在的可能。根据Luben的骨细胞分离方法, 在酶作用下首先从骨组织脱离的细胞群主要含FB, 而其它各群则以OB为主要成分。故在纯化OB时应弃去第一群细胞。为证实OB的存在, 用纯化FB进行比较为一有效方法。

Vander(1978)由电镜观察证实骨内膜, 骨小梁上的单层覆盖细胞是成骨细胞^[14]。在分离骨细胞过程中用营养液冲洗骨髓组织不会导致该细胞层的丢失^[15]。活细胞形态学观察说明培养早期的OB、FB不易区别, 而中、晚期则有不同细胞形态及排列象。培养早期OB群贴壁细胞绝大多数为单核星形, 而同时存在的小圆细胞可能是各种类型的造血细胞及一小部分受损不能贴壁的骨细胞^[16]。这些细胞可因换液而被清除。多核巨细胞为破骨细胞, 因不能分裂可因OB增殖而消失^[17]。

Tonna(1981)^[20]在电镜下观察OB超微结

构有下述特点:带有凹陷的细胞核,胞浆内含有大量的线粒体,扩张的粗面内质网及分泌空泡并富含电子致密物。可能与骨质生成有关。本实验 OB 超微结构具有上述特点。

由于培养细胞的形态不能做为识别细胞类型的标志^[18],本实验 OB 的鉴定主要依靠:(1) OB 在培养各期 AKP 染色始终强阳性,FB 阴性。此点亦为其他学者证实^[19]。阳性 OB 的计数可直接代表该细胞群中 OB 的纯度^[15]。(2) Urist(1976)指出,OB 富含 AKP,骨组织 AKP 含量较非骨组织高 5—40 倍^[20]。在实验中我们使用生化定量方法直接证实了 OB 的 AKP 含量高于 FB 数倍至数十倍。培养晚期 AKP 活性下降可能与细胞的密度增加有关。Liberman(1983)使用分离培养的动物 OB 和 FB 也获得同样结果^[21]。(3) 已知 OB、骨细胞直接参与钙、磷代谢,与非骨细胞相比有更高的钙摄入量^[22]。Binderman (1974)将此作为识别骨细胞的特异性指标,证实鼠 OB 比 FB 摄钙率高 4 倍以上^[13],与本实验结果相吻合。(4) 大量文献报道体外培养条件下 OB 可产生特异性钙化^[23,24],而 FB 无此能力,故亦成为 OB 鉴定的重要依据之一。Tenenbaum(1982)首先描述了在特定培养条件下 OB 发生钙化的机理,认为在培养基中加入 β -甘油磷酸钠作为 AKP 的底物可促进有机磷向无机磷转化,加速生理性钙沉着^[25]。我们使用人胎 OB 证实,其可在体外发生钙化,而 FB 在同样条件下不能形成钙沉着。

目前,我们使用原代培养的 OB 建立了体外人类骨细胞氟中毒模型,并探讨了高氟的致病机理^[27]。

总之,使用人胎 OB 可以作为生物学模型,研究人体骨代谢的生理、病理学机制,并可为临床和其它研究提供良好的实验手段。

摘 要

我们分离、纯化人胎成骨细胞群,并在体外培养达 15 天。骨细胞群由 5—6 月龄的人

胎长骨获得。使用形态学及生化指标测定,证实具有成骨细胞的典型特征:(1) 形态学与外国学者报道的相一致;(2) 碱性磷酸酶染色强阳性;(3) 碱性磷酸酶含量较纤维母细胞酶含量高数倍至数十倍;(4) 与纤维母细胞相比,成骨细胞有更高的钙摄入量;(5) 在体外培养条件下可以发生钙化。纤维母细胞不具上述特点。

使用成骨细胞做为生物学模型,可为体外条件下研究人体骨细胞的生理、病理及临床研究提供良好的实验手段。

参 考 文 献

- [1] Peck, W. A. et al., 1964, *Science*, 146: 1476.
- [2] Wong, G. L. et al., 1974, *Nature*, 252: 713.
- [3] Hefley, T. J. et al., 1982, *Calcif. Tissue Int.*, 34: 480.
- [4] Kumegawa, M. et al., 1983, *Calcif. Tissue Int.*, 35: 542.
- [5] Wergedal, J. E. et al., 1982, *Calcif. Tissue Int.*, 34(Suppl 1): S 16.
- [6] Farley, J. R. et al., 1983, *Science*, 222: 330.
- [7] Owen, M. et al., 1971, In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Ed: Bourne, G. H., Vol. 1, PP. 271—298, Academic Press, New York.
- [8] Luben, R. A. et al., 1976, *Endocrinology*, 99: 526.
- [9] Karatza, C. et al., 1984, *J. Cell Sci.*, 65: 163.
- [10] Kiernan, J. A. et al., 1981, In: *Histological and Histochemical Methods*. Ed: Kiernan, J. A., P. 213, Oxford Pergamon.
- [11] 上海市医学化检所主编: 磷酸酶测定。临床生化检验(上册) P 350 1982年2月上海科学技术出版社
- [12] Bradford, M. M. et al., 1976, *Anal. Biochem.*, 72: 248.
- [13] Binderman, I. et al., 1974, *J. cell Biol.*, 61: 427.
- [14] Vander, C. J. et al., 1978, *Clin. Orthop. Rel. res.*, 134: 350.
- [15] Yee, J. A. et al., 1983, *Calcif. Tissue Int.*, 35: 571.

- [16] Porter, R. P. et al., 1973, In: *Tissue culture Methods and Applications*. Ed: Kruse, P. F., PP. 93—105, Academic Press, New York.
- [17] Auf'mkolk, B. et al., 1985, *Calcif. Tissue Int.*, **37**: 228.
- [18] Rao, L. G. et al., 1977, *Endocrinology*, **100**: 1233.
- [19] Vergedal, J. E. et al., 1969, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 799.
- [20] Urist, M. R. et al., 1976, In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Ed: Bourne, G. H., Vol. 4. PP. 29—35, Academic Press, New York.
- [21] Liberman, U. A. et al., 1983, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**: 958.
- [22] Nichols, G. Jr. et al., 1971, In: *cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis*. Ed: Nichols, G. Jr., and R. H. Wasserman, PP. 211—215, Academic Press Inc, New York.
- [23] Sudo, H. et al., 1983, *J. Cell Biol.*, **96**: 191.
- [24] Bellows, C. G. et al., 1984, *Calcif. Tissue Int.* **36**: 452.
- [25] Tenenbaum, H. C. et al., 1982, *Calcif. Tissue Int.*, **34**: 76.
- [26] Tonna, E. A. et al., 1981, In: *Aging and Cell Structure*. Ed: Johnson, J. E., Vol. 1. PP. 251—266. Academic Press, New York.
- [27] 宋新德等, 1987, 氟对人胎成骨细胞培养物生长、分化影响的探讨, 中国地方病学杂志, **6**(1):21.

抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞结构、 表面形态和聚集能力的影响*

樊景禹

(北京医科大学生物物理教研室)

周爱如 李敏媛** 陈明

(北京医科大学生物化学教研室)

抑癌因子是从 Ehrlich 腹水癌小鼠腹水中提取的具有抑癌活性的肽类物质^[1]。利用 ³H-TdR 参入, 台盼蓝染色、钾离子释放等方法, 已证明抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞的 DNA 合成具有明显抑制作用, 并可杀伤肿瘤细胞^[1,2]。这些作用具有肿瘤专一性^[2,3]。同时证明, 在抑癌因子作用于肿瘤细胞的早期即可影响细胞膜的物理性质而使其流动性降低^[4]。本文用电镜下的形态学方法进一步研究了抑癌因子对肿瘤细胞作用的性质和特点。

材料和方 法

1. 抑癌因子的分离 取接种 Ehrlich 腹水癌后 8—12 天小鼠的无细胞腹水液用 80% 乙醇沉淀, 无水乙醇回流, 经 Sephadex G 25 及 Sephadex LH 20 柱层

析分离, 收集第一峰, 冷冻干燥^[1]。

2. 细胞处理 取接种 7 天的 Ehrlich 腹水癌细胞用 PBS 洗涤后悬浮于 5 ml Eagle's 液内, 使细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 。在细胞悬液内加入抑癌因子, 浓度为 $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。将上述细胞在 37°C 下分别温育 4、8 和 16(或 18)小时。温育毕, 细胞经 PBS 洗涤, 用于制备电镜样品。对照细胞经同样处理, 但不加抑癌因子。

另取正常小鼠股骨, 用 Eagle's 液冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞并悬浮于 Eagle's 液内, 在其中加入抑癌因子($600 \mu\text{g}/\text{ml}$), 于 37°C 下温育 4 小时。另一管细胞

* 本文部分实验工作由中国科学院科学基金生字 376 号资助。

** 现在通讯地址: 预防医学中心。

生物物理教研室刘智、卫之涓, 生化教研室罗培良等同志参加有关技术工作, 谨致谢意。