

- 质 × 100
2. 蜕膜化刺激后 90 小时的子宫内  
膜示蜕膜瘤(D), 其上皮剥离 E. 上皮 S. 基质 × 50
  3. 孕酮(加微量雌二醇)处理第三天的子宫上皮  
示腺体和细胞顶浆分泌开口以及分泌颗粒 ×  
5000
  4. 蜕膜化刺激后 6 小时的子宫上皮  
示细胞肿胀、多裂孔、绒毛短而稀 × 3600
  5. 蜕膜化刺激后 24 小时的子宫上皮  
示大量细胞凹陷 × 960
  6. 蜕膜化刺激后 48 小时的子宫上皮  
示子宫上皮折皱, 局部蜕膜化(箭头) × 300

## 图版 II

1. 正常幼龄大鼠(出生 13 天)的子宫基质  
示基质细胞的异染色质, 基膜与透亮带(箭头)  
× 6000
2. 孕酮(加微量雌二醇)处理第三天的基质  
示基质细胞的异染色质消失, 基膜折迭, 有物  
质积聚(箭头) × 6000
3. 蜕膜化刺激后 12 小时的基质  
示基质细胞蜕膜化, 基膜与透亮带处无定形物  
质增多, 深染(箭头) × 8000
4. 蜕膜化刺激后 24 小时的基质  
示基膜与透亮带分界清楚, 无定形物质向基质  
转移(箭头) × 8000

## 参 考 文 献

- [1] Loeb, L. 1907, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4 : 93-94.
- [2] Riddick, D. H. & Kusmik, W. F. 1977, Am. J. Obstet. Gynecol. 127 : 167-190.
- [3] Hochner-Celnikier, D., Ron, M., Elder,

- A., Segal, S., Palti, Z., Fuks, Z. & Vlodavsky, L. 1984, Biol. of Reprod. 31 : 827-836.
- [4] Searle, R. F., Elcock, J. M. & Matthews, C. J. 1987 Antigen presentation by mouse decidua and placenta. in "Immunoregulation and fetal survival" Eds. Gill & Wegmann Oxford Univ. press pp. 96-110.
- [5] Sananes, N. & Goascogne, C. Le. 1976, Differentiation 5 : 133-144.
- [6] Clark, J. H. & Gorski, J. 1970, Science 169 : 76-77.
- [7] Finn, C. A. & Publicover, M. 1981, Cell proliferation and cell death in the endometrium. in "Cellular and molecular aspect of implantation" Eds. Glasser & Bullock Plenum press pp. 181.
- [8] 程秀娟等, 1984, 生殖与避孕, 4 : 31-34.
- [9] Sheleanyak, M. C. 1933c, Anat. Rec. 56 : 211.
- [10] Tachi, C. & Tachi, S., 1974, Cellular aspects of ovum implantation and decidualization in the rat. in "Basic life sciences vol. 4B Physiology and genetics of reproduction" Eds. Coutinho & Fuchs Plenum press pp. 263-286.
- [11] Lejeune, B. & Leroy, F. 1980, Prog. Reprod. Biol. 7 : 92-101.
- [12] O'Grady, J. E. & Bell, S. C. 1977, The role of the endometrium in blastocyst implantation. in "Development in mammals" vol. 1 Ed. Johnson, M. H. Nolland-Holland Publishing company pp. 165-243.

## 原代培养的二倍体上皮细胞和成纤维细胞的纯化

沈翠英 肖志明

(上海市肿瘤研究所免疫学与细胞生物学研究室)

人体包皮原代培养物所长出的两种细胞——上皮细胞和成纤维细胞, 通过本文介绍的纯化方法可以分别收集提供不同实验的需要。如正常上皮细胞在肿瘤实验及烧伤病人植皮等方面都有一定的实用价值。而成纤维细胞在转化试验及干扰素等的制备物中都是有用的实验材

料。

## 材 料 和 方 法

## 一、标本来源

在无菌条件下用手术取下正常人包皮组织, 立即放置于含有 40% 小牛血清的 MEM 培养液内(含 500 U/

ml青霉素、500 µg/ml链霉素)半小时内即行培养。

### 二、培养方法

将组织块用眼科剪刀把真皮与表皮分开,用Hanks液漂洗数次,去血迹,然后剪成0.5左右大小组织块,贴于200 ml和50 ml培养瓶的壁上,置37°C 2小时左右,才能接触培养。

### 三、培养液的配制

MEM人工培养液(日本)加49%小牛血清(由上海牛奶公司第二牧场提供),增补2 mol/L谷氨酰胺,1 mol/L丙酮酸钠,100 U/ml青霉素,100 µg/ml链霉素,对纯化后的上皮细胞再添加10 ng/ml EGF(上皮生长因子)

### 四、培养物的纯化方法

1. 镜下见组织块周围长出上皮及成纤维细胞后,吸去旧液,用Hanks液清洗两次,然后换入0.2% EDTA(乙二胺四乙酸二钠)和0.25%胰蛋白酶混合液中,37°C温育3-10分钟(在镜下可见成纤维细胞缩成球形,而上皮细胞维持原状),然后立即吸出消化液。

2. 加Hanks液或上述消化液用滴管轻轻敲打,成纤维细胞脱落,离心(500转/分)5分钟,收集待用。此时上皮细胞仍贴壁,故敲打不能过重,否则会把组织打下而使上皮细胞成片脱下。收集到的成纤维细胞可继续培养作代,并可作染色体检查。

3. 留存之组织块和上皮细胞,用Hanks液轻轻漂洗3次,然后换入已加半量条件培养液的上述MEM培养液并添加EGF,37°C继续培养。这样每周处理1次,重复数次。

## 结 果

按上述方法培养人包皮组织,一般3-7天可见组织块周围先有上皮细胞成片长出,成纤维细胞亦同时长出。由于上皮细胞生长缓慢,成纤维细胞生长迅速(图版图1)。两周后,镜下可见成纤维细胞铺满瓶壁。此时即刻用上述方法去除成纤维细胞,第二天镜检可见成纤维细胞明显减少(图版图2),新的上皮细胞明显增长1圈。这样每周1次,可反复处理多次,直至上皮细胞铺满瓶壁(图版图3)。标本培养3个月以上生长晕直径可达1至1.5厘米,无退化迹象。纯化后的成纤维细胞仍能继续培养(图版图4)。用同代成纤维细胞作染色体核型

分析,显示正常二倍体(图版图5)。上皮细胞经鳞状上皮抗血清ABC酶标法检查显示为阳性(图版图6)。

## 讨 论

在采用此法时,必须在成纤维细胞占优势的情况下,要掌握好消化时间,利用两种细胞对消化液的不同耐受性。去除成纤维细胞、纯化的上皮细胞培养物中加入EGF,这是维持上皮细胞生长的关键<sup>[1]</sup>。但由于EGF也能促进成纤维细胞的增殖,所以EGF必须在上皮细胞纯化后方能加入。一次消化不能去尽成纤维细胞,所以要反复进行处理。

本实验曾用胶原酶消化纯化之上皮细胞,结果大部分细胞不贴壁,贴壁之少部分细胞聚积成团,并逐渐退化,脱落,故未能得到纯的传代上皮细胞株。本法建立原代上皮细胞是行之有效的。多例标本证明重复性好,结果满意。

目前,国外报道的纯化上皮细胞方法较多,如PETER等用精胺(spermine)有选择性地抑制成纤维细胞的生长<sup>[2]</sup>。James等用Swiss 3 T 3细胞来纯化人的上皮细胞<sup>[3]</sup>,效果也不错。但这些方法需要加X射线、饲养细胞等条件,技术要求比较严格,涉及的某些药品国内尚未生产,在一般条件实验室难以应用,本法用组织培养常用药品,且手续简便、易于推广应用。

## 图 版 说 明

1. 上皮细胞生长缓慢,成纤维细胞生长旺盛
2. 经纯化后上皮细胞(HE染色)
3. 反复3次以上纯化后上皮细胞铺满瓶壁(HE染色)
4. 纯化以后,成纤维细胞的再培养(HE染色)
5. 同代成纤维细胞核型分析显示正常二倍体。(Giemsa染色)
6. 纯化后上皮细胞经鳞状上皮抗血清A、B、C酶标测定显示阳性

## 参 考 文 献

- [1] FREEMAN, A. E. et al., 1976, *In Vitro*, 12: 3-2-362.

[2] PETER K. A. JENSEN et al., 1982. In *Vitro*, 18 : 867 -871.

[3] JAMES G. RHEINWALD et al., 1975, *Cell*, 6 : 331-344.

## 在细胞培养无菌操作中试用火焰消毒无菌连接器\*

张君奎

(中国医学科学院天津血液学研究所)

在细胞培养工作中目前主要还是依靠无菌室、超净台等进行无菌操作。某些细胞培养装置,虽采用了管道密封技术,但也必须在净化环境中进行操作。现有技术的不足之处是:1. 无菌室与超净台等,其净化空间范围较大,难以达到绝对无菌的程度,故污染现象时有发生,而且这些设备造价较高,难以普遍应用;2. 在采用管道密封方式进行细胞培养时,当培养装置整体消毒运行之后就不能随意打开,也不能更换组件,操作很不灵活,而且改变连接方式时必须重新组装连接,再进行整体消毒,劳动量较大。

美国杜邦公司发明了一种无菌连接装置<sup>[1]</sup>,主要用于热熔塑料管道的无菌连接,在普通带菌空间就可操作。在家庭透析治疗尿毒症时有人使用这种装置,能显著地减少连接处的污染发生率,也减少了其并发症腹膜炎的发病率<sup>[2]</sup>。该连接装置打破了传统的无菌操作方式,在无菌操作技术上是一个进步;其局限性在于,它仅能适用于热塑管道的无菌“焊接”。

作者研制成功的火焰消毒无菌连接器(Flame-disinfecting Sterile Connector, FSC)突破了这一局限性,可用于各种管道进行无菌操作<sup>[3]</sup>。本文对其结构以及在细胞培养无菌操作中的试用情况作一报道。

### 一、FSC 构造原理与操作程序

火焰可用一般灯火,如酒精灯,其温度为1400℃。空气中以及物体表面的任何细菌和真菌孢子在火焰中都会在瞬间被烧毁。故在局部

用火焰灭菌是最彻底最迅速的消毒方法。本连接器的设计即基于这一原理。FSC 主要由双阀门体(1)(2)、插针(3)和插座(4)三部分组成(图1)。阀门由不锈钢等金属材料制造,另外也设计了一次性使用的非金属阀门。插针为医用不锈钢针管。插座由硅橡胶制成。双阀门体由阀门(1)和(2)以可拆卸的方式连接而成,在两个阀门的接口处装有耐火密封垫圈(5),此处为火焰消毒区。当双阀门断开时,每个阀门呈关闭状态。阀门具有良好的气体密封性能,可阻止外界带菌空气进入无菌管道系统。连接时,将两个阀门的接口用酒精灯火焰烧烤约1分钟,并在火焰中进行密封连接;待冷却至37℃以下时,可开启阀门孔道,这样,管道内部的无菌空间贯通而不会被污染。使用前,连接器及其保护的管道系统皆要经过高压蒸汽灭菌,然后在普通带菌空间进行断接操作。由于解决了高温密封、高温润湿以及双阀门体严格的气密性等问题,这种从结构设计上保证了杜

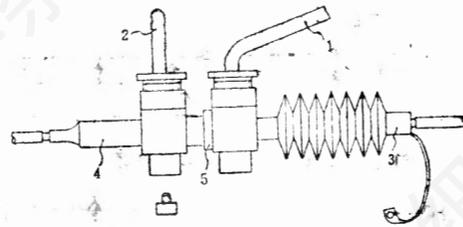


图1 火焰消毒无菌连接器

\* 已申请专利并获中国专利局授权<sup>[3]</sup>。  
卢润生和赵一维同志参加了部分试制工作,特此致谢。