

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

医学细胞生物学

Medical Cell Biology

第五版

杨抚华 主编

胡以平 胡火珍 王大忠 副主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是以杨抚华主编的《医学细胞生物学》第四版为基础进行编写的,在新版中处处体现与生命科学各分支学科的交叉与整合。本书根据当前细胞生物学发展的特点和趋势,从细胞、亚细胞和分子三个层次阐述细胞生命活动及其机制,特别注意了医学各专业的特点,着重介绍与医学实践有关的一些细胞生命活动,细胞生物学学科研究热点,以有别于普通细胞生物学。

本书是医学院校各专业本科生的基础课教材,同时也是医学各专业研究生、教师以及临床医师、药师获得这方面系统知识的一本有益读物。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学/杨抚华主编.—5版.—北京:科学出版社,2007
(普通高等教育“十一五”国家级规划教材)
ISBN 978-7-03-019180-9

I. 医… II. 杨… III. 人体细胞学:细胞生物学-高等学校-教材
IV. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 125324 号

责任编辑:周 辉 彭克里 席 慧/责任校对:李奕莹
责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年8月第五版 开本:787×1092 1/16
2007年8月第一次印刷 印张:27 1/2
印数:1—10 000 字数:582 650

定价:33.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

《医学细胞生物学》(第五版)

编者委员会

主 编 杨抚华
副主编 胡以平 胡火珍 王大忠
编 者 (按篇章顺序)
杨抚华 陶大昌 陈誉华 梁素华
李 虹 杨春蕾 朱海英 胡火珍
罗素元 李学英 何永蜀 王大忠
宋土生 李晓文 郑 红 张 闻
魏会平 潘克俭 胡以平 訾晓渊
陈俊霞

第五版前言

应使用本书的老师和同学们的要求，以及细胞生物学蓬勃发展的现状，正拟在本书第四版（2002）的基础上进行修订，恰逢教育部通知全国各出版社及高等院校申报“十一五”国家级规划教材，科学出版社经过研究并征得主编所在单位的同意，决定向教育部申报本书为“十一五”国家级规划教材，经教育部组织专家评审，批准本书为“十一五”国家级规划教材。

细胞生物学是生命科学中的四大前沿学科之一，它的基础理论和基本知识已经渗透到医学科学的诸多方面，并成为认识人类生命现象和解决医学科学中很多问题的基础。因此，作为医学各专业的学生必须具备医学细胞生物学的基础理论和基本知识。

此次修订是在第四版的基础上，根据细胞生物学的发展特点和趋势，结合我国医学教育现阶段对医学基础课的需要，总结本书已使用四年多的教学实践，保持第四版的思想性、科学性、先进性、启发性和可接受性，吸收了教师及学生在使用本书过程中提出的建议，在某些章节有较大的修改，使其更好地适应医学科学的发展和医学教育的需要。

参加此次修订工作的除第四版参编单位的作者外，还增加了中国医科大学、昆明医学院、重庆医科大学、河北北方学院及成都医学院的教授。

另外，本书配有编者制作的教学课件，可供教师选用教材备课时参考使用。

在修订的过程中得到各编者所在单位的领导和有关单位的大力支持。在审定稿中，特别得到遵义医学院及其珠海校区的领导和同志们热情关心。科学出版社领导和周辉编辑给以极大的关注，并对修订中应注意的问题提出了宝贵意见。四川大学陶大昌和杨春蕾同志在整个修订过程中的打印、编辑和文稿的整理等具体工作上花了不少时间和精力。对以上各单位及同志们为此次修订所付出的辛勤劳动致以崇高的敬意和诚挚的感谢。

细胞生物学是一门新兴的学科，进展迅猛，许多内容日新月异。同时，与医学的关系日趋紧密。由于受知识水平的限制，尽管各位编者做了极大的努力进行修订，但本书中仍难免存在这样那样的缺点和不足，我们热忱欢迎来自老师和同学的批评，使本书再版时，日臻完善，以适应我国医学教育迅猛发展的需要。

杨抚华

2007年4月于四川大学华西医学中心

目 录

第五版前言

第一篇 概 论

第一章 细胞生物学概述	(3)
第一节 细胞生物学及其研究对象与目的	(3)
第二节 细胞生物学的发展历史	(5)
第三节 细胞生物学与医学	(9)
第二章 细胞生物学的研究技术和方法	(12)
第一节 细胞形态结构研究技术	(12)
第二节 细胞的分离和培养	(19)
第三节 细胞组分的分离和纯化技术	(23)
第四节 细胞和亚细胞组分的测定	(27)
第五节 基因与蛋白质组研究技术	(30)
第三章 细胞的分子基础	(37)
第一节 细胞的小分子物质	(37)
第二节 细胞的大分子物质	(39)
第三节 细胞结构的组装	(49)
小结	(49)
第四章 细胞的进化及其基本结构	(51)
第一节 细胞的起源与进化	(51)
第二节 细胞结构的一般特征	(53)
第三节 原核细胞和真核细胞	(56)
小结	(59)

第二篇 细胞膜及其表面

第五章 细胞膜的分子结构和特性	(63)
第一节 膜的化学组成	(63)
第二节 膜的分子结构	(70)
第三节 膜的特性	(74)
第六章 细胞表面及其特化	(82)
第一节 细胞外被与胞质溶胶	(82)
第二节 细胞表面的特化结构	(83)
第三节 细胞间的连接	(85)
第四节 细胞外基质	(92)

第七章 细胞膜与物质转运	(98)
第一节 穿膜运输	(98)
第二节 膜泡运输	(107)
第八章 细胞膜与细胞识别	(113)
第一节 细胞识别与膜受体	(113)
第二节 细胞膜受体的结构和特性	(116)
第九章 膜受体与细胞的信号转导	(122)
第一节 细胞的化学信号分子及其受体	(122)
第二节 通过 G 蛋白偶联受体进行的信号转导	(123)
第三节 具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体信号通路	(130)
第十章 细胞膜与医药学	(132)
第一节 膜转运系统异常与疾病	(132)
第二节 膜受体异常与疾病	(132)
第三节 癌变与细胞表面的关系	(134)
第四节 膜生物工程与医药学	(137)
小结	(139)

第三篇 细胞质和细胞器

第十一章 细胞质基质	(143)
第一节 细胞质基质的化学组成及某些物理特性	(143)
第二节 细胞质基质的生物学特性	(144)
第三节 细胞质基质的功能	(145)
第十二章 内膜系统	(146)
第一节 内质网	(146)
第二节 高尔基复合体	(155)
第三节 溶酶体	(160)
第四节 过氧化物酶体	(167)
第五节 内膜系统与细胞内蛋白质的分选	(170)
第六节 内膜系统与膜流	(172)
第七节 内膜系统的起源	(173)
第十三章 线粒体	(176)
第一节 线粒体的结构	(176)
第二节 线粒体的化学组成及酶定位	(179)
第三节 线粒体的功能	(181)
第四节 线粒体的半自主性	(189)
第五节 线粒体的生物发生	(191)
第六节 线粒体与医学	(193)
第十四章 核糖体	(196)
第一节 核糖体的形态结构与存在形式	(196)

第二节	核糖体的基本类型与化学成分	(197)
第三节	核糖体的生物发生与自组装	(198)
第四节	核糖体的功能	(199)
第五节	核糖体与医学	(204)
第十五章	细胞骨架	(207)
第一节	微管	(207)
第二节	微丝	(214)
第三节	中间纤维	(218)
第四节	中心体和中心粒	(223)
第五节	鞭毛与纤毛及其运动	(224)
小结		(228)

第四篇 细 胞 核

第十六章	核膜	(231)
第一节	核膜的主要化学成分	(231)
第二节	核膜的亚微结构	(231)
第三节	核膜的主要功能	(233)
第十七章	核纤层和核骨架	(237)
第一节	核纤层	(237)
第二节	核骨架	(239)
第十八章	染色质和染色体	(242)
第一节	染色质和染色体的化学组成	(242)
第二节	染色质和染色体的亚微结构	(244)
第三节	异染色质与常染色质	(248)
第四节	染色体	(249)
第十九章	核仁	(256)
第一节	核仁的化学组成与亚微结构	(256)
第二节	核仁的形成与周期性变化	(257)
第三节	核仁的功能	(258)
第二十章	细胞核的功能	(261)
第一节	遗传信息的储存	(261)
第二节	遗传信息的复制	(261)
第三节	细胞核内遗传信息的传递	(264)
小结		(272)

第五篇 细胞分裂繁殖与生长发育

第二十一章	细胞的分裂	(275)
第一节	无丝分裂	(275)
第二节	有丝分裂	(276)

第三节	减数分裂·····	(281)
第四节	有丝分裂和减数分裂的比较·····	(288)
第二十二章	细胞周期 ·····	(290)
第一节	细胞周期的一些基本概念·····	(291)
第二节	细胞周期各时相的动态·····	(293)
第三节	细胞周期的驱动力·····	(295)
第四节	细胞周期的检控点·····	(299)
第五节	细胞周期与医学·····	(301)
第二十三章	细胞分化 ·····	(306)
第一节	细胞分化的一般概念·····	(306)
第二节	细胞决定与细胞分化·····	(307)
第三节	基因与细胞分化·····	(312)
第四节	影响细胞分化的因素·····	(318)
第五节	细胞分化与肿瘤细胞·····	(322)
第二十四章	细胞衰老和死亡 ·····	(325)
第一节	细胞的衰老·····	(325)
第二节	细胞死亡·····	(331)
第二十五章	个体发育中的细胞 ·····	(340)
第一节	干细胞·····	(340)
第二节	成体细胞·····	(354)
第三节	肿瘤细胞·····	(357)
小结 ·····		(360)

第六篇 细胞工程

第二十六章	动物细胞工程所涉及的主要技术领域 ·····	(365)
第一节	大规模细胞培养·····	(365)
第二节	细胞核移植·····	(371)
第三节	基因转移技术·····	(374)
第二十七章	动物细胞工程的应用 ·····	(378)
第一节	医用蛋白质的生产·····	(378)
第二节	基因工程动物的制备·····	(379)
第三节	组织工程·····	(381)
第四节	细胞治疗·····	(384)
小结 ·····		(388)

第七篇 细胞生物学的现状和前瞻

第二十八章	现代生命科学发展的主要特点和趋势 ·····	(393)
第一节	生命科学研究的多层次体系·····	(393)
第二节	生命科学研究向微观世界的深入·····	(393)

第三节	生命科学研究向宏观领域扩展	(394)
第四节	自然科学各学科间的相互渗透和彼此促进	(394)
第五节	生命科学实验手段的日益现代化	(395)
第六节	人工改造生命物质体系愈趋工程化	(396)
第七节	生命科学研究思维模式的变化	(396)
第二十九章	细胞生物学的研究动态和发展趋势	(398)
第一节	基因组与蛋白质组	(398)
第二节	细胞信号转导	(400)
第三节	细胞增殖周期及其调控	(401)
第四节	干细胞研究及其应用前景	(402)
第五节	细胞分化、细胞衰老与细胞死亡	(404)
第六节	siRNA 与 miRNA	(408)
结语		(410)
主要参考文献		(412)
细胞生物学部分相关网站		(415)
索引		(416)
图版		

第一篇 概 论

第一章 细胞生物学概述

细胞 (cell) 是有机体形态、结构和功能的基本单位。恩格斯说：“在整个有机界里，所看到的最简单的类型，是细胞；它确实是高级有机体的基础”^①。因此，要了解有机体生命活动的规律，就必须从它的基础——细胞入手。

第一节 细胞生物学及其研究对象与目的

细胞学 (cytology) 是研究细胞生命现象的科学。其研究范围包括：细胞的形态结构和功能、分裂和分化、遗传和变异以及衰老和病变等。

但是，现代细胞学的研究，在形态方面，已经远远超出了光学显微镜下可见结构的范围；在功能方面，也已经大大超越了对于细胞生理变化的纯粹描述。20世纪50年代以来，随着分子生物学 (molecular biology) 的发展，生命科学中新理论、新方法和新技术不断涌现，对于细胞的研究，已从细胞的整体层次和亚细胞层次深入到分子层次，从三个层次来研究细胞的结构和功能，并将三个层次有机地结合起来，以动态的观点考察细胞的结构和功能，并探索细胞的基本生命活动。例如，细胞的代谢、繁殖、生长、发育、遗传和变异、分化、运动以及衰老和死亡等一系列生命现象。它已经不仅仅是孤立地研究一个个细胞、细胞器和生物大分子或一个个生命活动的现象，而是研究它们的变化发展过程，研究它们之间的相互关系，以及它们与环境之间的相互关系。其研究范围大大超出了过去的细胞学范畴，所以称为细胞生物学 (cell biology)。概括说来，细胞生物学是运用近代物理、化学技术和分子生物学方法，从不同层次研究细胞生命活动规律的学科，是20世纪以来实验细胞学发展的新阶段。它研究细胞各种组成部分 (细胞膜、细胞质、细胞器和细胞核) 的结构、功能及其相互关系；研究细胞总体的和动态的功能活动，包括以上提到的细胞生长分裂、发育分化、遗传变异和演化，以及研究这些相互关系和功能活动的分子基础。因此，现代细胞生物学实际上是分子生物学与细胞生物学的结合，即细胞分子生物学 (molecular biology of the cell)。

细胞生物学的研究范围极其广泛，但其核心问题是发育与遗传的关系。遗传是在发育过程中实现的，而发育又要以遗传为基础。在分子层次上这两方面的问题交织在一起，所以，分子遗传学 (molecular genetics) 的成就对细胞生物学的形成和发展起了关键作用。

细胞生物学的兴起是与分子生物学的发展不可分割的。分子生物学特别是分子遗传学的突出成就之一，是在微生物上阐明了蛋白质合成遗传控制的信息传递

^① 恩格斯. 反杜林论. 吴黎平译. 北京: 人民出版社, 1974.

途径, 以及基因作用的操纵子学说 (operon theory)。然而, 这些在原核细胞研究上取得的成果并不能完全代表真核细胞, 更不能解释真核细胞的遗传和发育现象。真核细胞遗传物质的组成和结构, 核质之间、细胞之间、细胞及其环境之间的关系是极其错综复杂的, 由此调节和控制着基因作用系统, 使其按一定的时空顺序表达, 从而实现细胞的分化和个体的发育, 并在成体细胞中表现出种种特殊的功能活动。因此, 分子生物学已不能停留在以微生物为材料的分子遗传学的研究上。从 20 世纪 70 年代开始, 一些研究微生物的分子遗传学家, 如曾获诺贝尔奖的 Brenner 和 Benzer 等, 纷纷转向利用线虫、蚜蠹、果蝇及小鼠等模式生物来研究真核生物的发育和遗传, 反映了这一主要的发展趋向。

从生命结构层次来看, 细胞生物学介于分子生物学和个体生物学之间, 同它们互相衔接, 相互渗透。因此, 细胞生物学是一门承上启下的学科, 和分子生物学一起同是现代生命科学的基础, 广泛渗透到遗传学、发育生物学、生殖生物学、神经生物学和免疫生物学等的研究中, 并同医学和生物高技术发展有极其密切的关系。

许多著名的科学家认为, 21 世纪是生命科学的世纪, 生命科学将成为整个自然科学中的带头学科, 从分子层次研究细胞生命活动的细胞分子生物学, 无疑将在其中发挥很大的作用。似乎可以认为, 细胞生物学和分子生物学是现代生命科学新的生长点, 也是现代生命科学的重要基础。因此, 将其视为当今生命科学中的前沿学科之一。

细胞生物学的主要分支学科有:

细胞形态学 (cytomorphology): 研究细胞形态和结构及其在生命过程中变化的科学。

细胞化学 (cytochemistry): 研究细胞结构的化学成分 (主要是生物大分子成分) 的定位、分布及其生理功能。用切片或分离细胞成分, 对单个细胞或细胞各个部分进行定性和定量的化学分析。

细胞生理学 (cytophysiology): 研究细胞的生命活动规律。包括细胞如何从环境中摄取营养, 经代谢而获得能量, 进行生长、分裂或其他功能活动, 以及细胞如何对各种环境因素产生反应, 而表现感应性和运动性活动 (如神经细胞传导、肌肉细胞收缩、腺细胞分泌) 等。晚近特别着重于从分子和胶体水平去阐明细胞生理活动过程的物理化学基础。

细胞遗传学 (cytogenetics): 根据染色体遗传学说发展起来的、一门属于细胞学与遗传学之间的边缘学科。主要是从细胞学的角度, 特别是从染色体的结构和行为以及染色体和其他细胞器的关系来研究遗传现象, 对遗传和变异机制的阐明、动植物育种理论的建立、人类遗传的有关问题以及生物进化学说的发展, 都有一定的意义。结合医学, 特别是对人类染色体病的诊断、治疗和预防都有极其现实的意义。

其他分支学科还有细胞生态学 (cytoecology)、细胞能力学 (cytoenergetics)、细胞动力学 (cytodynamics) 等。

细胞生物学是生命科学研究的基础, 因此, 生命科学上的许多基本问题, 就

必须在细胞中谋求解决。所以细胞生物学的研究目的，不仅在于阐明各种生命活动的现象和本质，还必须进一步对这些现象的发展规律加以控制和利用，以达到为生产实践服务，造福于人类的目的。

因此，细胞生物学研究的任务是多方面的，应采取分析与综合的方法，在三个不同层次上将结构与功能统一起来，加以考察和探讨。细胞生物学不仅要研究理论问题，也要解决实际问题。它和其他学科一样，理论与实践结合，正确揭露自然规律，并不断地提出新任务，来寻找控制这些规律的途径。这样，就能使这门学科无止境地揭开细胞的奥秘，为解决实践问题做出贡献。

细胞生物学研究的问题很多，任务也很繁重，要正确对待和解决这些问题，就必须有一个正确的世界观，才能确定正确的研究方向和树立科学的研究方法，这就是辩证唯物主义的世界观。如不这样，就可能谬误百出，陷入到唯心主义形而上学的泥坑中去。例如，著名的瑞典生物学家、分类学的奠基者林奈（Carl von Linneaus, 1707~1778），曾进行了不少出色的工作，但限于他的世界观，认为物种是不变的，因而陷入谬误而不能自拔。因此，“自然科学家就应该做一个现代的唯物主义者，做一个以马克思为代表的唯物主义的自觉的拥护者，也就是说应当做一个辩证唯物主义者”^①。细胞生物学的研究，也必须以辩证唯物主义的哲学为指导，紧密联系实际，才能使细胞生物学获得更大的成就和发展。

第二节 细胞生物学的发展历史

细胞生物学是生命科学中一门前沿学科，在其历史发展过程中的一些新成就，对整个生命科学起了巨大的推动作用，为了认识细胞生物学的现状及其发展，有必要对其历史做简要的回顾。历史的回顾是追溯过去，但科学的发展往往在某些方面有相似之处，所以，回顾历史有其现实意义。

一、细胞生物学发展的萌芽阶段

这一阶段大致是从显微镜（microscope）的发明到19世纪初叶，开始了细胞学的研究。

科学的发展总是与装备水平相适应的，细胞学的兴起也不例外，细胞的发现是与显微镜的发明分不开的。1590年，荷兰眼镜制造商Z. Janssen兄弟试制成第一台复式显微镜。半个多世纪以后，英国科学家R. Hooke用自制的显微镜观察了软木及其他植物组织。1665年，他发表了《显微图谱》（micrographia），其中关于软木的描述是最值得称道的，他将在软木中看到的许多小室，称为“细胞”（cell，原意为小室），实际上他所见到的仅仅是植物死细胞的细胞壁，因为他首先描述了这一结构，所以，“细胞”一词也就沿用至今。

与此同时，值得一提的是荷兰科学家A. Van Leeuwenhoek（1632~1723），他于1677年用自制的显微镜观察了池塘中的纤毛虫类、人和哺乳动物的精子以及

^① 列宁. 论战斗唯物主义的意义. 《列宁选集》第四卷, 609页, 北京: 人民出版社, 1972.

细菌等，后来他又观察到了鲑鱼红细胞及其核。由于他的卓越贡献，从而当选为英国皇家学会会员，并被授予“巴黎科学院通讯院士”的荣誉称号。他由一名书店学徒成为一位著名的科学家，他刻苦勤奋的一生，为后人树立了自学成才的光辉榜样。

二、细胞学说的创立阶段

这一阶段大致从 19 世纪初叶到 19 世纪中叶。这一时期的突出成就是创立了细胞学说。

在 R. Hooke 发现细胞后的近 200 年中，由于显微技术未得到成功的改进，所以，对细胞的研究没有任何突破性进展。1827 年，K. E. V. Bear 在蛙卵和几种无脊椎动物的卵中看到了细胞核。1831 年，R. Brown 也见到了兰科和其他几种植物表皮细胞中的细胞核。1835 年，E. Dujardin 将根足虫和多孔虫细胞内的黏稠物质称为肉样质 (sarcode)。1839 年，捷克学者 Purkinje 首先提出原生质 (protoplasm) 的概念。后来被 H. Von Mohl 应用到植物细胞。虽然当时细胞的一些主要结构都见到了，但是，一直没有从理论上加以概括。

这一时期最值得称颂的是细胞学说的建立。德国植物学家 M. J. Schleiden (1838) 和动物学家 T. Schwann (1839)，根据前人的研究成果结合自己的工作，首次提出了细胞学说 (cell theory)。其主要内容是：①系统地论证了细胞是动、植物有机体的基本结构单位，也是有机体功能的基本单位；②论证了动、植物各种组织的细胞具有共同的基本结构、基本特性，并按共同规律发育，有共同的生命过程；③论证了细胞也有自己的生长发展过程。细胞学说的建立，明确了动、植物界的统一。恩格斯对此给予了极高的评价，认为这是 19 世纪自然科学的三大发现之一。

虽然细胞学说建立了，但对细胞的认识还是经过了一番周折。直到 1861 年，M. Schultze 才给细胞下了一个定义：“细胞是赋有生命特征的一团原生质，其中有一个核”。

三、经典细胞学阶段

这一阶段大致从 19 世纪中叶到 20 世纪初叶。这一时期细胞学有了蓬勃的发展。

首先是实验技术的进步。1865 年，Böhm 首先使用苏木精，而 Corti (1851) 和 Hartig (1854) 则使用洋红对细胞进行染色。Oschatz 设计出第一台切片器；1878 年，Ernest Abbe 设计出近代的复式显微镜，这种显微镜具有消色差物镜，连同载物台下照明的聚光器。这些仪器和技术对细胞学的发展起到了极大的推动作用。

19 世纪 70 年代，有三位细胞学家 (Stasburger、Bütschli 及 O. Hertwig) 几乎同时描述了细胞核分裂时的变化。其中 O. Hertwig 曾用硼酸洋红染色，他看到在赤道板上有着色的线状或棒状物体。后来这种着色的线被 Waldeyer 命名为染色体。Flemming 将细胞分裂命名为有丝分裂 (mitosis)。Strasburger 根据染色体

的行为将有丝分裂分为前期、中期、后期和末期。

1882年 Strasburger 首先发现一种百合科植物总是有 12 条染色体，一种石蒜科植物总是有 8 条染色体，随后 Rabl (1885) 在蝶螈中看到 24 条染色体。这些发现都说明了物种染色体数目的恒定性。

以上研究说明，当时对细胞核的观察已经相当深入，但相比之下，关于细胞质却了解得不够清楚。1875年 O. Hertwig 和 Bütschli 在细胞分裂时看到中心体。1898年 Golgi 发现高尔基体。同年，Benda 发现了线粒体。

至于细胞质是什么结构，则议论纷纷，莫衷一是。对此，Altmann 提出颗粒学说，而 Bütschli 提出蜂房学说等，显然两者都是错误的。说明当时对细胞质的结构还没有一个正确的认识。

四、实验细胞学阶段

这一阶段大致从 20 世纪初叶到 20 世纪中叶。

这一阶段的显著特点是：细胞学的研究，在相邻学科的渗透下，应用了实验的方法，因而学科的研究内容更广泛而深入。细胞遗传学、细胞生理学、生化细胞学、细胞化学、显微及亚显微形态学这样一些分支学科也逐渐形成。

继 1907 年，Harrison 用淋巴液成功地培养神经细胞之后，1912 年 A. Carrel 在此基础上发展起一整套包括严格消毒、应用鸡胚抽提液和一些专用器皿在体外培养动物组织的组织培养技术。这套技术到目前虽有所改进，但基本上还在应用。组织培养早期，主要是成功地培养各种组织，以后发展到用培养物做实验研究。这样，细胞学就增加了一个重要的研究手段。J. Brachet 用组织化学方法研究核酸在发育中的变化，最早提出核酸与细胞生命活动的关系。另外，Caspersson 设计十分精密的显微分光光度计，根据极小范围内的吸收光谱可以超微量地测定细胞中的核酸含量。这两方面的成就，对细胞学均产生了重大影响。

主要由 A. Claude 发展起来的组织匀浆的差速离心方法及以后出现的放射性同位素技术，均应用到细胞的研究中，这样就使人们对细胞的代谢以及某些细胞器的功能获得了新的认识。

从 20 世纪 40 年代开始，电子显微镜的应用使细胞形态学的研究深入到亚显微层次。不仅搞清了大部分细胞器的结构（如线粒体、叶绿体、高尔基复合体、中心体等），而且结合着细胞生化的成果，逐渐把结构和功能统一起来，同时对细胞质也有了更为深入的了解。

五、细胞生物学阶段

这一阶段始自 20 世纪 60 年代。

这一阶段对细胞的研究从各个方面深入和扩展。形态方面，从显微层次深入到亚显微层次，甚至分子层次，进而扩展到对活细胞的观察和实验研究；从单纯的形态描述，进入到形态与功能和生化研究的结合。生命科学各分支学科——遗传学、胚胎学、生理学以及进化的研究，都力求深入到细胞层次和亚细胞层次来解释各种生命现象。细胞学的发展已经超出原有的范围，并向细胞生物学转变。

可以说,细胞生物学是在分子遗传学和分子生物学取得巨大成就,以及亚显微层次的研究获得重大进展的共同推动下发展起来的。

目前,细胞生物学就是用分子生物学及物理、化学方法,进行各个领域的深入研究,以期从根本上解决本学科的一些重大问题。

六、我国细胞生物学的发展概况

中华人民共和国成立之前,我国细胞学研究的基础十分薄弱,在十分艰苦的条件下,为数不多的老一辈留学归国科学家坚持在教学和科研第一线开展工作,并取得了一定成绩。主要在胚胎发育、原生动植物以及植物细胞的核穿壁和核更新等方面,打下了比较好的基础。此外。在亚显微形态学、细胞化学、组织化学、细胞生理、细胞遗传等方面也进行过一些工作。尽管这些工作还不是很全面和系统,但是,老一辈科学家的刻苦钻研、勤奋工作,的确为我国细胞学的发展奠定了坚实的基础。

文化大革命期间,我国细胞学的研究正如其他科学研究一样,几乎完全中断。但是,在此期间仍然有部分细胞学工作者,在极其困难的条件下坚持研究,并在细胞核移植、癌细胞培养、细胞融合、花药培养、单倍体育种等若干领域,取得了一定的进展。但从当时国际上细胞学研究的发展来看,不论研究水平、研究规模,还是研究队伍以及装备条件,与国际先进水平的差距越来越大了,这一时期正是国际上生命科学发展突飞猛进的时候,而我国细胞学的许多重要领域几乎是空白。

1977年全国自然科学规划会议制定了我国第一个细胞生物学发展规划,细胞生物学的研究机构进行了充实和调整,如原中国科学院实验生物研究所改建为细胞生物学研究所,新建了中国科学院发育生物学研究所。有条件的高等院校纷纷建立了细胞生物学研究所、研究室和教研室,开设了细胞生物学课程。在高等院校及科研院所建立了学位制度,开始培养细胞生物学专业的硕士、博士研究生,从而形成了一支从事细胞生物学的研究队伍。

全国细胞生物学发展规划制定以后,除了原来较有基础的工作继续开展以外,一些细胞生物学中的重要领域,如细胞毒作用、细胞骨架、核骨架、细胞免疫、染色体分子生物学、细胞周期及其调控等,也开始进行研究。在实验装备方面也有一些改善,一些重要的新技术、新方法也陆续引进,如重组DNA技术、杂交瘤技术、免疫荧光技术、流式细胞光度术、PCR技术、原位分子杂交及转基因技术等,并在研究工作中加以应用,从而为缩短研究周期,提高研究质量创造了条件。

特别值得提出的是在植物细胞工程研究方面的进展尤为突出,并取得了显著的成果。例如,花药培养和单倍体育种在国际上已进入先进行列,并培育成功20多种农作物、林木、蔬菜等,其中小麦、玉米、橡胶、柑橘等10多种花粉植株是在我国首先培育成功的。

1986年我国设立了国家自然科学基金,为我国自然科学的基础研究提供了巨大的经济支持,加上其他的攻关项目,如攀登计划、“863计划”及“973计划”

等基金制的建立，以及建立了一系列国家及部门的重点实验室，其中包括细胞生物学及相关学科的重点实验室，均有力地推动了我国细胞生物学研究的迅猛发展，开创了前所未有的美好前景。

第三节 细胞生物学与医学

当前，人类正面临着环境污染、自然资源破坏、粮食匮乏、能源枯竭以及人口爆炸等重大社会问题的挑战。人类将解决这些问题的希望寄托于生命科学的发展，而细胞生物学是生命科学发展的重要支柱之一。细胞既是人体正常结构和功能的基本单位，也是病理发生的基本单位，细胞结构与功能的异常是疾病发生的基本原因或结构基础。例如，溶酶体的研究对了解细胞的变性坏死，特别是风湿性关节炎、痛风的发生有所帮助，为治疗药物的设计提供了理论依据。细胞的衰老和死亡均与基因活动的调控有密切关系。单克隆抗体的研究使多种疾病快速明确诊断成为可能，也为“导弹药物”治疗癌症带来了希望。这表明细胞生物学与现代医学的关系越来越密切，它正成为现代医学的一门重要的基础学科，受到现代医学有关领域专家学者的广泛关注和重视。

就当前严重威胁人类健康的癌症来看，即可说明细胞生物学与医学的密切关系。癌细胞恶性生长和无休止分裂是其主要特征之一。同时，在性质上又转变成类似于未分化的原始细胞，失去了专一的功能，这种现象叫做细胞的去分化(dedifferentiation)。癌细胞不仅失去了原有细胞所具有的正常功能，而且还获得了原始的未分化细胞也没有的破坏能力。它脱离了细胞间接触抑制的控制，不停地分裂，四处扩散，并在这种无法控制的恶性生长中夺取机体营养、释放毒素和严重侵袭其他组织，最后使机体消耗殆尽，枯竭而死。假如人们对正常细胞的分化和对癌细胞的去分化机制有所了解，并能在分子层次上弄清其变化，就有可能找到使癌细胞逆转，变为正常分化细胞的方法。总之，研究细胞生长、分裂和分化，也是与癌症防治密切相关的重大的细胞学问题。

动物的大量细胞在一定发育时期出现的正常死亡，称为程序性细胞死亡(programmed cell death)，也常称为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡与医学的关系极为密切。据研究，程序性细胞死亡是引起一些疾病的病因。人类的免疫系统是最有代表性的例子。在 T、B 细胞分化成熟的过程中，由于免疫系统的选择作用，95%的前 T、前 B 细胞均要死亡，而成熟的白细胞寿命也只有一天，这样死一批，再生一批，互相交替，非常严格有序，若程序性细胞死亡发生障碍，只生不死，就会出现白细胞堆积，发生白血病。该死的不死，还会发生自身免疫病，可见这一程序失常可能是血癌和自身免疫病的原因之一。在对肿瘤的研究中，人们发现，肿瘤的发生不仅与肿瘤细胞的生长速度有关，而且与肿瘤细胞的死亡速度也有关。程序性细胞死亡的规律失常是肿瘤发生与发展的一个重要因素。在人类神经系统中，神经元细胞的程序性死亡规律异常是中风和其他神经损伤性疾病的直接原因。哺乳动物中，癌基因和抑癌基因也可能参与程序性细胞死亡的调控。*c-myc* 原癌基因的过表达可以导致程序性细胞死亡；而 *bcl-2* 原癌基因的过表达却

可以阻止 *c-myc* 诱导的细胞死亡。抑癌基因 *p53* 在诱发程序性细胞死亡中起重要作用。淋巴细胞经辐射或化疗引起 DNA 损伤时, P53 蛋白大量增加, 同时出现程序性细胞死亡, 进一步分析还发现, DNA 损伤引起的程序性细胞死亡必须需要 *p53* 基因产物的存在; 而糖皮质激素、 Ca^{2+} 载体和衰老引起的程序性细胞死亡, 则无需 P53 蛋白的存在。 *p53* 基因产物诱发程序性细胞死亡可提供一种防御机制, 使 DNA 损伤的突变细胞不能存活下去演变成癌细胞。当 *p53* 基因失活或 P53 蛋白被其他癌基因产物抑制时 (如 MDM α 癌蛋白能掩盖 P53 蛋白的活化结构域而使其失活), 突变细胞便得到继续存活的机会, 并发展成癌细胞。

近来, 一些新的细胞生物学实验技术运用到医学研究中, 引起广大学者的普遍关注。如用病毒将动物的正常细胞和癌细胞融合, 或用癌细胞的细胞核移植到去核的卵细胞内, 让它发育一段时间, 以减轻毒性, 然后再将它们制成疫苗, 注入患有癌症的动物体内, 发现有抑制癌发生的作用, 这就有可能为治疗人的癌症提供新的途径。

目前, 应用转基因技术, 可以检测同样的癌基因在不同细胞环境中的活动, 或同一种细胞环境中不同癌基因的活动。因此, 转基因系统将提供一种独特的方法, 去解剖癌基因发生的机制, 为癌症的防治提供依据。

最近, 人工细胞的提出和应用, 对某些疾病的治疗起到了很好的作用。人工细胞是为了防止有机体的排他性而设计的、达到细胞功能的一种结构。例如, 利用微囊包封的过氧化氢酶, 治疗小鼠的遗传性过氧化氢酶缺乏症; 用微囊封入大鼠胰岛细胞, 移植大鼠腹腔以治疗大鼠的糖尿病; 用含有吸附剂和解毒剂的人工细胞作为血液解毒剂而形成的人工肝, 以解除肝昏迷等。此外, 还可采用易被生物降解合成聚合物聚乳酸微囊封入激素、疫苗等其他药物, 以起到缓解释放的作用。

近年来, 甚至在古老的中医领域内, 国内外也有不少人试图从分子层次寻求中西医理论的基本点。研究中医药对环磷酸腺苷 (cAMP) 作用的影响, 即为一突出的例证。1973 年 Nelson Goldberg 提出生物控制的阴阳学说 (Yin Yan hypothesis), 认为 cAMP 与 cGMP 是人体内两种对立的调节系统, 可能是中医阴阳理论的物质基础, 提出 cAMP 为阴, cGMP 为阳 (用放射免疫法测出)。对 cAMP 和 cGMP 的研究, 不仅对生命现象本质的阐明有着重要的意义, 而且为探索中医阴阳理论的物质基础提供了线索。阴阳学说表明 cAMP 和 cGMP 相互拮抗, 相互制约, 共同调节着细胞的正常生理功能, 两者必须维持一定的比例, 若比例发生改变 (偏高或偏低), 就会引起机体功能失调而导致疾病。

细胞生物学是一门极为重要的基础学科, 它不仅与基础医学的组织胚胎学、生物化学、生理学、微生物学、免疫学、药理学、病理解剖学和病理生理学等有极为密切的关系, 而且也是临床医学有关学科的重要基础之一。要能正确认识某些疾病, 达到预防和治疗的目的, 很显然细胞生物学的基础理论和基本知识也是不可缺少的。

综上所述, 细胞生物学对医学科学的发展极其重要, 研究现代医学不但应该而且必须具备细胞生物学的基础理论、基本知识和基本技能。

复习思考题

1. 什么是细胞生物学？它与医学科学的关系如何？
2. 细胞生物学的历史发展对我们有什么启示？

推荐读物

1. 郑国锷等. 1989, 1991, 1994. 细胞生物学进展 (1、2、3 卷). 北京: 高等教育出版社
2. 郑国锷. 1992. 细胞生物学. 第二版. 北京: 高等教育出版社
3. 国家自然科学基金委员会. 1997. 细胞生物学. 北京: 科学出版社

(四川大学 杨抚华)

第二章 细胞生物学的研究技术和方法

细胞生物学的发展，在很大程度上依赖于研究技术的进步与仪器设备的改进。一种新技术或新方法的创立与应用，常常会给学科开辟一个新的领域，或带来革命性的变化。当今许多细胞生物学方面的新成就，都是与物理学、化学和数学的新理论、新方法及新技术的应用息息相关的。细胞生物学的研究方法很多，原理和操作步骤各不相同。本章从形态观察、细胞的分离和培养、细胞组分的分离纯化和测定，以及基因与蛋白质组的研究技术等方面，对一些常用技术的原理、方法和应用做一简要介绍，以期同学们能对细胞生物学研究方法有个概括的了解。在实际工作中可根据需要，有选择地掌握某些特定的方法，以达到自己的研究目的。

第一节 细胞形态结构研究技术

光学显微镜和电子显微镜是进行细胞形态结构观察研究的主要工具，它们分别用于细胞的显微和亚显微结构层次的研究。

一、细胞的显微结构观察

(一) 普通光学显微镜

光学显微镜 (light microscope) 主要由聚光镜、物镜和目镜三部分组成。影响显微镜成像清晰度的最关键的因素，是显微镜的分辨力 (率) (resolution)。分辨力是指能够区分相近两点的最小距离。能够区分的两点距离越小，表示显微镜的分辨力越高。显微镜的分辨力是由物镜决定的，它和物镜的镜口率 (数值孔径)、照明光线的波长有直接关系。可按下式计算：

$$R = 0.61\lambda / N.A. \quad (N.A. = n \cdot \sin \alpha / 2)$$

式中， R 表示分辨力； $N.A.$ 表示镜口率，亦称数值孔径 (numerical aperture)； λ 表示波长； n 表示介质的折射率； α 表示物镜的镜口角。

从上式可以看出，为提高分辨力，光源波长 λ 越小越好，而物镜的镜口率越大越好。要增大镜口率必须提高物镜与标本间介质的折射率。空气的折射率为 1，香柏油的折射率为 1.515。因此要增大镜口率需用油浸物镜。

一般光学显微镜最大的分辨力约为 $0.2\mu\text{m}$ ，最大放大倍数为 $1000\sim 1500$ 倍，细胞内的结构，如线粒体、中心体、核仁、高尔基复合体、染色体等都大于 $0.2\mu\text{m}$ ，只要用染料分别对细胞的不同组分进行选择染色，就能在光学显微镜下观察到。在光学显微镜下所观察到的细胞结构，称为显微结构 (microscopic

structure)。

(二) 相差显微镜

利用普通显微镜观察标本时，往往需用染色法将标本切片染色，依靠颜色（光的波长）和亮度（光波的振幅）的差别观察被检物的结构。活细胞近于无色透明，当光波通过时，波长和振幅变化不大，因此，在普通显微镜下细致观察活细胞的结构是困难的。

观察活细胞的微细结构和变化，一般要使用相差显微镜（phase contrast microscope）（图 2-1）。其原理是利用光的衍射和干涉特性，通过在物镜后焦面上添加一个相板和聚光镜上增加的环状光阑的作用，把透过标本不同区域的光波的光程差（相位差）转变成振幅差（明暗差）。从而提高细胞的内各结构之间的对比度，使未经染色的细胞内的各种结构变得清晰可见。

倒置相差显微镜（inverted phase contrast microscope）是为了适应生物学、医学等领域中的组织培养、细胞离体培养、浮游生物、环境保护、食品检验等显微观察的一种显微镜。

由于上述样品特点的限制，被检物体均放置在培养皿（或培养瓶）中，这就要求倒置显微镜的物镜和聚光镜的工作距离很长，能直接对培养皿中的被检物体进行显微观察和研究。因此，物镜、聚光镜和光源的位置都颠倒过来，故称为“倒置显微镜”。

倒置相差显微镜一般用于观察培养的活细胞，其光源在载物台上方，物镜在下方，这样特别适用于观察研究体外培养的活细胞的结构和活动，如再装配上显微定格摄影或录像设备，可在镜下连续拍摄记录体外培养细胞的活动，如细胞分裂、细胞迁移运动等。

(三) 暗视野显微镜

暗视野显微镜（dark field microscope）是利用暗视野聚光器代替普通光学显微镜上的聚光器，或用中央遮光板遮去中央光束的照明法，不使照明光线直接进入物镜，因而视野的背景是暗的，只有经过标本散射的光线才能进入物镜被放大，在黑暗背景中呈现明亮的图像。这种显微镜虽然对物体内部结构看不清，但却可以提高分辨率，能观察到 0.04nm 以上的微粒子的存在和运动。因此适合用来观察活细胞内某些细胞器如线粒体、细胞核以及液体介质中的细菌和真菌等。

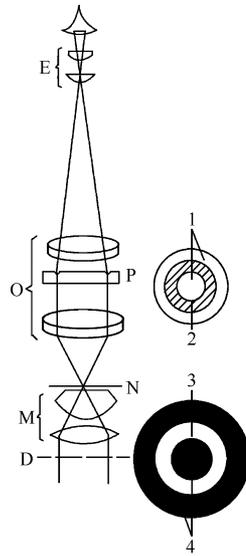


图 2-1 相差显微镜光路图解

（引自 郑国辑，1992）

E. 目镜；O. 物镜；M. 集光器；
N. 载玻片；P. 相板；D. 环状光阑。
1. 金属层（吸光区）涂有一层吸光物质；
2. 电解质层为半透明的圆环；
3. 透明的环状部分；
4. 不透明的涂漆部分

(四) 荧光显微镜

荧光显微镜 (fluorescence microscope) 由光源、滤色系统 (由激发和阻断滤光片组成) 和光学系统等主要部件构成。光源多采用高压汞灯, 它能发射很强的光, 经激发滤片过滤, 形成一定波长的激发光 (如紫外光、蓝紫光等) 来激发标本内天然物质或结合的荧光物质, 发射出不同颜色的荧光。荧光再通过物镜和目镜的放大以及阻断滤光片的作用, 使特异的荧光透过, 即可观察到标本中的荧光现象。

荧光显微镜是细胞荧光化学, 特别是免疫荧光技术中的重要工具。据其光路可分为透射式荧光显微镜和落射式荧光显微镜 (图 2-2 和图 2-3)。

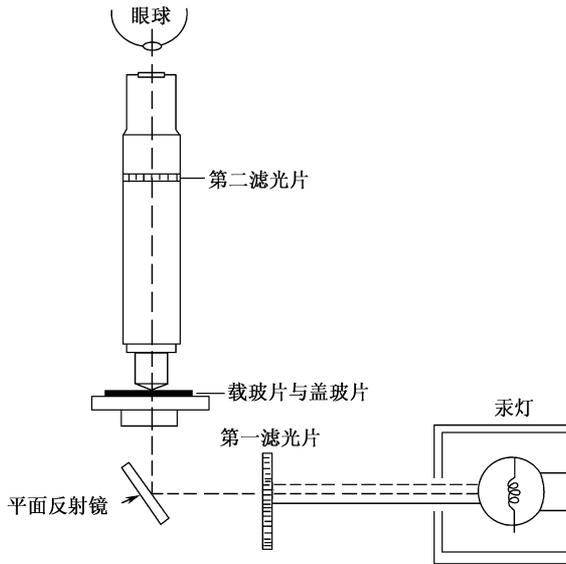


图 2-2 透射式荧光显微镜图解 (引自 郑国锴, 1992)

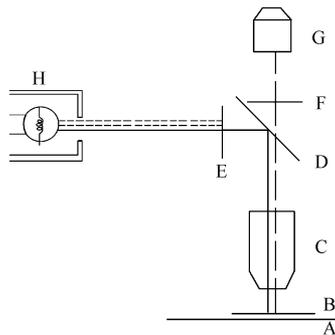


图 2-3 落射式荧光显微镜图解

A. 载物台; B. 标本; C. 物镜; D. 双色束分离器; E. 激发滤片;
F. 阻断滤片; G. 目镜; H. 汞灯

(五) 共聚焦激光扫描显微镜

共聚焦激光扫描显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一项具有划时代意义的图像仪器之一。共聚焦激光扫描显微镜由显微镜光学系统、激光光源、扫描装置和检测系统四部分组成。共聚焦是指物镜和聚光镜同时聚焦到一个点, 激光光源经过物镜成像面上的针孔聚集成一点, 照射到样品上, 保证了只有从标本焦面发出的光线聚焦成像, 即只有标本被照亮点发出的光才能通过共焦孔, 偏离这一点的慢射光被挡去 (不能成像), 大大增加了对比度, 因而可以获得样品的清晰图像 (图 2-4)。与传统光学显微镜相比, 共聚焦激光显微镜具有更高的分辨率。整套仪器由计算机控制, 计算机对所观察的对象进行数字图像处理, 各部件之间的操作切换都可在计算机操作平台上方便灵活地进行。

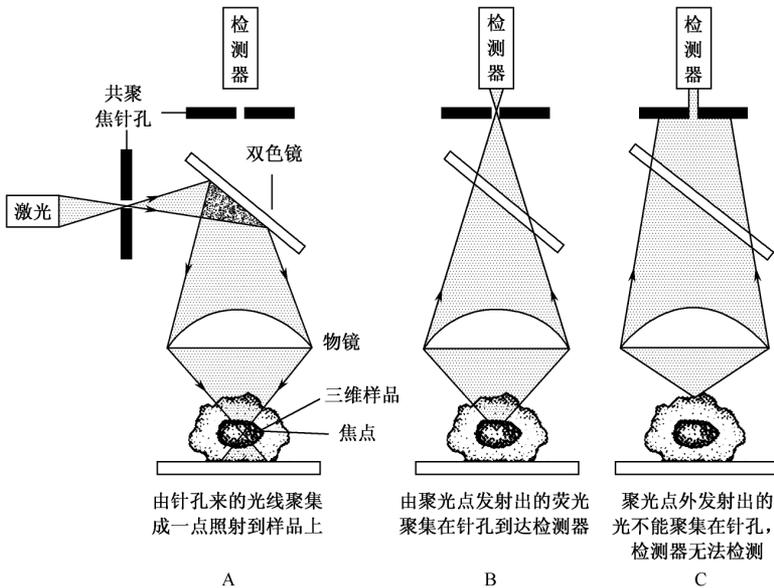


图 2-4 共聚焦扫描显微镜的原理示意图 (引自 宋今丹等, 2004)

- A. 激光经针孔聚在样品的一个点;
- B. 从样品点上发出的荧光聚焦在第二个共聚焦针孔处;
- C. 从样品其他部位发出的光不能聚焦于第二个针孔上 (不能成像)

以单色激光对样品焦平面进行扫描, 得到的是二维图像, 不断切换焦平面将获得一系列二维图像, 图像经计算机处理后, 就可得到完整的三维图像。共聚焦激光扫描显微镜常检测发射荧光或用荧光标记的物质。例如, 对细胞或组织切片进行连续扫描, 可以得到比普通荧光显微镜更高对比度和高解析度的细胞骨架、染色体、细胞器和细胞膜系统的三维图像; 也能检测荧光标记的细胞内钙、镁等离子浓度等。

二、细胞的亚微结构观察

细胞内小于 $0.2\mu\text{m}$ 的一些细微构造，称为亚微结构 (submicroscopic structure)，分子结构归为超微结构 (ultramicroscopic structure)。但在一般书刊上两者间并无严格界限，往往把亚微结构也称为超微结构。目前常用于亚微结构研究的工具是电子显微镜。

(一) 电子显微镜

电子显微镜 (electron microscope) 的发明对生命科学的发展做出了很大的贡献，是人类迄今为止进行亚微结构观察中最有力的工具。

1. 透射电子显微镜

透射电子显微镜 (transmission electron microscope) 习惯上称透射电镜，其成像原理与光学显微镜不同 (图 2-5)，它是用电子枪发射的高速电子束 (电子流) 代替了照明的光线，用特殊的电极或磁极 (静电透镜和磁透镜) 代替了光学显微镜的聚光镜、目镜和物镜的作用，达到聚焦和放大的目的。当电子束透射样品时，由于样品不同部位对入射电子具有不同散射度，而形成不同电子密度 (即浓淡差) 的高度放大图像，最后就显示在荧光屏上或记录在照相感光胶片上。因为电子波的波长远比光波的波长短，所以电镜的分辨本领比光学显微镜显著提高，最高可达 0.08nm 。目前已在电镜照片上直接看到生物大分子的粗糙轮廓。

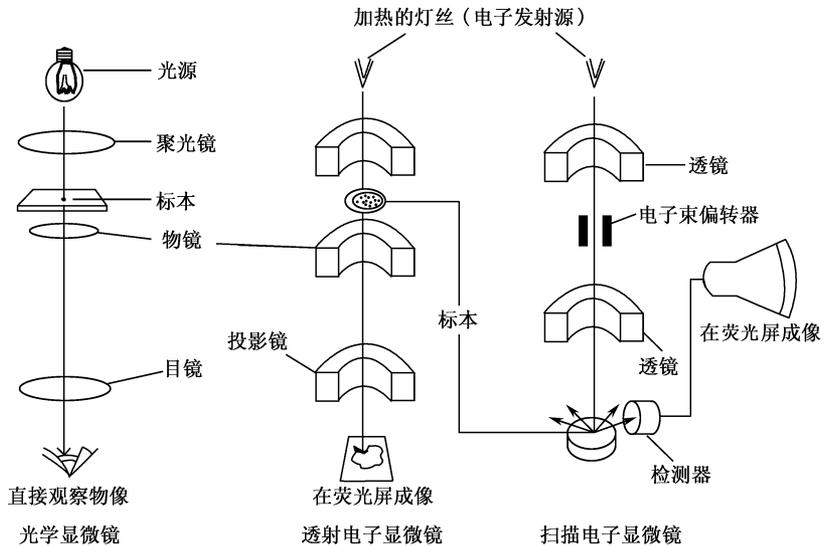


图 2-5 光镜、透射电镜和扫描电镜的主要特征示意图 (引自 Alberts B et al., 1989)

着重表明相似之处，电镜标本需放置于真空中

透射电子显微镜主要用于观察和研究细胞内部的细微结构。透射电子显微镜的分辨率为 $0.1\sim 0.3\text{nm}$ ，加速电压为 $20\sim 200\text{kV}$ ，放大倍数为 $50\sim 500\,000$ 倍。

2. 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜 (scanning electron microscope) 习惯上简称扫描电镜。扫描电镜中电子枪发射出的电子束, 经过磁透镜会聚成极细 (约 0.5nm) 的电子束 (“电子探针”), 它由扫描线圈控制在样品整个表面进行 “栅状扫描”。电子束可以激发样品表面产生二次电子, 二次电子产生的多少与电子束在标本表面的投射角有关, 也与样品表面的起伏形态有关。与此同时, 在观察用的荧光屏上也在进行同步扫描。二次电子被收集并变成光信号, 再经放大, 样品发放电子多的地方, 在荧光屏上相应的点就亮, 反之则暗, 最后在荧光屏上就显示出样品表面形貌的立体图像 (图 2-5)。

扫描电镜的分辨力不及透射电镜, 一般在 3nm, 但它观察细胞等生物标本可以得到富有真实立体感的三维结构图像, 这是透射电子显微镜所不能做到的, 而且景深大, 形成的图像具有强烈的立体感, 且样品制备简单, 不必制作超薄切片。一般样品经固定、脱水干燥后, 在其表面喷涂一层金属膜后 (镀膜可增加二次电子, 以产生鲜明的影像) 即可观察。它已被广泛应用于观察标本表面精细的三维形态结构。

此外, 在电子束的轰击下, 样品中的不同原子还会发出具有特定波长的 X 射线, 收集 X 射线信号, 就可以利用扫描电镜对样品各个微区的元素成分进行分析。目前生产的扫描电镜, 几乎都附有 X 射线微区分析仪或能谱仪。

3. 高压电子显微镜

高压电子显微镜 (high-voltage electron microscope) 也是一种透射电子显微镜。一般把电子束加速电压小于 120kV 的透射电镜称为常规电镜, 它观察的样品厚度至多不能超过 0.1 μ m; 而加速电压大于 120kV 的电镜称为高压电镜; 加速电压超过了 500kV 的电镜则可称为超高压电镜 (ultravoltage electron microscope)。目前世界上最高的加速电压可达 3000kV。高压电镜的穿透力强, 不仅可提高分辨力, 而且可以观察近 0.1nm 厚的样品。由于高压电镜景深很大, 厚样品在不同高度上的细节都能同时清楚地成像在同一平面上, 因而得到的图像实际上是一张在不同高度的叠加像。所以, 如在样品的同一部位从两个不同的角度得到的两张照片, 再用立体镜进行观察, 就如同看立体电影一样, 可观察到细胞内的三维空间的微细结构。现在已经采用这种方法得到了细胞内的细胞器的三维结构, 如细胞骨架系统等。

(二) 电子显微镜样品的制备技术

电子显微镜以 “电子束” 代替了光学显微镜的照明光源, 电镜标本需放置于真空中, 因此对标本的要求较高。电镜样品制备的方法很多, 下面仅介绍几种制样技术。

1. 超薄切片制备技术

超薄切片 (ultramicrotomy) 是透射电镜中最常用的样品制备方法。由于电子束的透射能力有限, 因此要求样品的厚度在 50nm 左右, 且能承受电子束的轰击, 并使切片有足够的反差, 结构真实可靠。

电镜标本需要的超薄切片的制备步骤主要有固定、包埋、超薄切片和染色等。其中固定剂常用锇酸、戊二醛和高锰酸钾等。以树脂类物质作包埋剂，用超薄切片机切成 50nm 左右的薄片，然后捞在铜网上，再经重金属盐对超薄切片进行电子染色。通常是进行正染色，即染色剂与样品和微细结构成分相结合，以增加结构成分对电子的散射能力，最后在荧光屏上形成反差较好的正像。

2. 负染色技术

负染色技术 (negative staining) 是电镜中常用的生物样品制备技术之一。尤其是在观察某些微小的生物材料，如病毒、噬菌体、细菌、分离的亚细胞碎片及细胞器时。所谓负染色是染背景而不染样品的方法，它利用高密度的在透射电镜下不显示结构的重金属物质，如磷钨酸或醋酸铀把生物标本包绕起来，增加背景对电子的散射，生物样品相对地透过较多的电子，反差即得以增强，最后在荧光屏上形成黑暗背景上的“亮像”，从而显示出标本的细微结构。

3. 冰冻蚀刻复型技术

冰冻蚀刻复型技术 (freeze etching replica technique) 是将样品割断面各种结构的形貌印在复型膜上，在透射电镜下观察复型膜。它的优点是：可以保持细胞原来的结构，使之更接近于生活状态；立体感强，分辨力远远优于一般扫描电镜；且复型膜可长期保存。

其基本操作方法是：将样品用液氮超低温冷冻，置于真空蒸发仪中，利用特殊的断裂装置将冷冻后的样品骤然断开，当断裂面的冰升华（蚀刻）后，就浮雕出细胞的亚微结构。再喷涂铂与碳制作断面复型膜，最后在腐蚀液中除去样品，剩下的碳铂膜就是复型膜，打捞在铜网上，就可在电镜下观察。

通过对复型膜的观察，可得到细胞断面结构生动的立体浮雕图像。由于冷冻样品的断裂面通常是沿着结构内部阻力最小的地方进行的，从而将生物膜从脂质双层内外两半纵向撕开，暴露出膜的内部结构。因此，这一技术也是研究生物膜结构十分有用的方法。

三、细胞的超微（大分子）结构观测

（一）扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscope) 是 20 世纪 80 年代初发展起来的、研究物质表面结构的新型显微镜和表面分析仪器。它的应用，使人们的视野延伸到了原子的尺度。扫描隧道显微镜的工作原理是利用了量子力学中的隧道效应，通过一个尖端为原子尺度的针尖，在压电陶瓷的驱动下沿样品表面扫描，以获得样品表面的高分辨甚至原子的分辨图像。它不仅能够提供样品表面的原子分辨的形貌，而且可以在多种环境（真空、大气、水、电介质溶液等）下，对样品进行观察，特别是它能使生物体在保持正常形态及功能的自然环境下工作。

扫描隧道显微镜具有很高的分辨率（横向分辨率 0.1~0.2nm，纵向分辨率达 0.001nm），已用于研究 DNA 分子的双螺旋结构、tRNA 结构及细胞膜表面结构等。

(二) 原子力显微镜

原子力显微镜 (atomic force microscopy) 是在扫描隧道显微镜基础上发展起来的一种扫描探针显微镜。原子力显微镜工作原理是利用激光束偏转法, 将针尖制作在一个对微弱力极敏感的 V 字形的微悬臂上, 微悬臂的另一端固定住, 使针尖趋近样品表面并与表面轻轻接触, 由于针尖尖端原子与样品表面原子之间存在着微弱的排斥力, 当针尖进行扫描时, 可通过反馈系统控制压电陶瓷管伸缩来保持原子间的作用力恒定, 带有针尖的微悬臂将随着样品表面的起伏而颤动, 利用光学检测方法得到样品表面形貌的信息。

原子力显微镜的工作范围与隧道扫描显微镜相似, 可以在固态和气态条件下, 以及在液体中对样品进行观察 (横向分辨率为 $0.1\sim 0.2\text{nm}$, 纵向分辨率 0.01nm), 观测的生物学样品可以从单个分子到整个细胞, 能够在纳米尺度上研究生物的反应机制。目前主要应用方面包括: 生物细胞的表面观测, DNA 和蛋白质等生物大分子的表面立体结构及其结晶体观测, 生物分子之间力谱曲线的观测等。

(三) X 射线衍射技术

研究生物大分子中的原子排列是高分辨电镜不能做到的, 而用 X 射线衍射技术 (X-diffraction technique) 则可解决这一问题。X 射线是波长很短的电磁射线, 与可见光或电子束不同, 穿过标本的 X 射线无法聚焦成像, 但能根据物质对 X 射线的衍射效应分析出其微细结构。单个样品分子受到波长比它小的 X 射线照射时, 会散射一部分射线, 散射的射线是由分子的不同部位发出的射线的光波重叠、干涉而成的。在离样品分子一定距离处放置一屏幕, 则可记录下样品向各个方向散射的射线量, 即 X 射线衍射图。仅用单个分子难以获得清晰的衍射图, 为获得强的衍射图, 需要对样品分子进行结晶, 只有由许多同一分子制成的晶体按同一方向形成有规律的晶格排列时, 才可能获得有效的 X 射线衍射图。衍射点的强度与分布反映出样品分子的构造 (原子排列), 由此推算出分子的三维结构。应用该技术, 已测定了许多种蛋白质、小分子 RNA 及 DNA 的分子结构。

第二节 细胞的分离和培养

几乎所有高等生物 (包括动物和人) 的组织都是由许多种不同类型细胞组成的, 为了解某一种细胞的生命活动过程, 常需要大量的同一种细胞, 这就要求从组织中分离和纯化目的细胞, 并能够在体外进行培养。细胞的分离和培养是细胞生物学的基本研究技术。

一、不同类型细胞的分离

从组织中分离细胞的第一步是将组织制备成游离的细胞悬液, 通常是将组织剪成小块, 然后用胰蛋白酶、胶原酶去消除细胞间的连接和细胞外基质, 用金属离子螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 除去细胞黏着所依赖的钙离子。在操作过程

中必须遵守以下几个最基本的原则：①分离体系所用的溶液必须是等渗的，要具有缓冲性的离子强度；②分离体系应保持低温，以降低细胞的代谢活动；③无菌操作，以备进一步用于细胞培养和分离纯化某些成分；④所用的试剂、器皿需要高压灭菌或过滤除菌。细胞分离需根据不同细胞的特征采用不同的方法。

（一）差速离心或密度梯度离心

根据细胞的大小和细胞密度不同，可通过差速离心或密度梯度离心进行分离。差速离心和密度梯度离心的基本要点见本章第三节。

（二）流式细胞技术

流式细胞仪 (flow cytometer)，也称荧光激活细胞分选仪 (fluorescence activated cell sorter, FACS) 是从多细胞悬液中分离目的细胞的精密仪器。流式细胞仪一般由液流系统、激发光器件、信号检测和控制系統四部分组成。通常用氩离子激光发出的激光束为激发光，通过调节液压，迫使悬浮细胞排成单列，按重力方向流动，当细胞通过激光束检测区时，细胞被激光束照射而向各个方向发出散射光，若经荧光染色的细胞，就会发出一定强度的荧光。仪器的检测系统可逐个对细胞的散射光和荧光强度进行测定，并将测得的光信号转变成电信号，由电子控制台放大和显示。因此，流式细胞仪具有更广泛的用途。在用于细胞分离上，其特点是用带有荧光的特异抗体标记待分离的细胞，然后在流式细胞仪中从未标记的细胞中分选出标记细胞。当一个有荧光抗体标记的细胞液滴通过激光检测器时，将被带上负电，不含荧光标记的细胞被带上正电，这些带电细胞液滴通过电场时将偏离原来流动的方向，分别收集带正、负电荷的细胞即可得到想要分离的细胞 (图 2-6)。流式细胞仪可以 2 万个/s 的速度对细胞进行分选，其纯度可超过 95%。

（三）免疫磁珠法

免疫磁珠 (immunomagnetic microsphere) 是一种人工合成的内含磁性氧化物核心的免疫微球颗粒，其中心是 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 颗粒，外包一层聚苯乙烯或聚氯乙烯等高分子材料。在外部磁场作用下，磁性微球可迅速从介质中分离出来，当外部磁场撤离后，微球又可重悬于介质中。由于微球的外表面为聚乙烯性质的高分子材料，很容易包被不同类型的单克隆抗体。因此利用带有特定单抗的免疫磁珠与靶细胞特异结合的特点，能快速地从多细胞悬液中将目的细胞分离出来。在操作过程中，首先将待分离细胞与包被有特定单抗的免疫磁珠混合孵育，并将分离柱安装于磁场中，然后将磁珠-细胞混合液缓慢过柱，此时在柱外磁场的作用下，与磁珠结合的细胞被磁场吸附，未结合的细胞从柱中流出，进一步洗去未结合的细胞后，去除磁场，回收目的细胞。免疫磁珠法操作简便，特异性强，具有很好的细胞回收率，同时磁珠颗粒对细胞无影响。连续两次过柱分选可进一步提高分选细胞纯度，通常可达 95%~99%。

（四）激光捕获显微切割技术

近年发展起来的激光捕获显微切割技术 (laser capture microdissection,

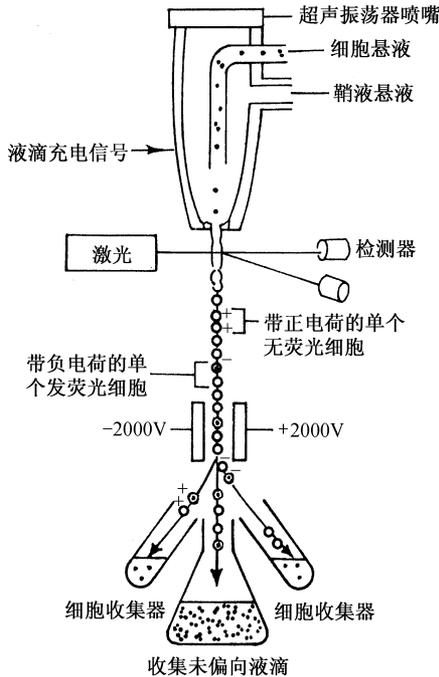


图 2-6 流式细胞仪原理图解 (引自 宋今丹等, 2004)

LCM) 虽然不能用于分离活细胞, 但其突出优点是能够从组织切片中精确地分离一个单一的细胞。其一般过程是: 制备组织切片 (通常是冰冻切片), 在显微镜下将组织切片覆以特制的透明薄膜, 用激光束切割所需的细胞区域, 薄膜在激光束经过的地方被溶化, 并与下面的细胞紧密连在一起, 然后再用另一激光束将其弹出到细胞收集管。分离的细胞可用于生化与基因组分析等研究。激光捕获显微切割技术将形态学观察与分子水平研究有机结合起来, 特别适用于待分离细胞所占组织 (切片) 中的数量较少或呈散在分布。目前迅速发展的激光捕获显微切割技术正在与高通量的基因芯片技术相结合, 将在生物医学领域中得到广泛应用。

二、细胞培养

细胞培养 (cell culture) 是指细胞在体外的培养技术, 即在无菌条件下, 从机体中取出组织或细胞, 模拟机体内正常生理状态下生存的基本条件, 让它在培养器皿中继续生存、生长和繁殖的方法。通过细胞培养可以获得大量的、性状相同的细胞, 以便于研究细胞的形态结构、化学组成及功能和机制。

(一) 细胞培养的条件

细胞培养的全过程必须在无菌的环境下进行。为避免环境中的微生物及其他有害物质的影响, 需要特殊的无菌室。无菌室应包括操作间和缓冲间两部分。操作间要求有供无菌操作的超净工作台、观察培养细胞的倒置显微镜、离心细胞的

小型离心机及复苏细胞和预热培养基的水浴锅等。培养细胞所需要的氧和二氧化碳由接有二氧化碳钢瓶的培养箱提供。培养箱中充填二氧化碳的目的是用来缓冲和维持细胞培养基的 pH，提供适宜细胞生长的酸碱度。细胞生长的营养物质由培养基供给。目前常用的基础培养基有 Eagle 氏培养基、RPMI1640、DMEM 及 F₁₂ 培养基等。这些基础培养基虽然组成不尽一致，但都含有细胞所需要的氨基酸、维生素和微量元素等成分。基础培养基只能提供细胞生长的简单营养物质，在细胞实际培养时，还需要添加一些天然的生物成分，其中主要是血清。血清含有许多生长因子，促进细胞贴壁和增殖。不同的细胞培养需要选择不同的培养基。

（二）原代培养与传代培养

体外培养的细胞可分为原代细胞和传代细胞。直接从体内获取的组织或细胞进行首次培养为原代培养 (primary culture)；当原代细胞经增殖达到一定密度后，将细胞分散，从一个培养器以一定比例移到另一个或几个容器中的扩大培养，为传代培养 (secondary culture)。传一次习惯上就称为一代。用这种方法可以重复传代数周、数月以至数年。但若反复传代，不仅会消耗大量的培养皿和培养基，而且传代次数的增加、在体外环境中的生长时间过长也会引起细胞特性的逐渐变化，特别是大部分组织来源的细胞不能在体外“永生”，因此，需要将培养的细胞及时冷冻在 -196℃ 的液氮中长期保存，待需要时将细胞复苏后再培养。

（三）细胞建系

多数原代培养的脊椎动物细胞，在体外经过有限次数的传代培养之后就会死亡。来源于人和动物正常组织的细胞，在体外传代次数一般不超过 50 代。例如，从胎儿中分离到的成纤维细胞可传 50 代，来源于成人肺组织的成纤维细胞只能传 20 余代。通常来源于恶性肿瘤组织的细胞能够在体外无限繁殖、传代，称为细胞系 (cell line)。例如，来源于宫颈癌组织的 HeLa 细胞系，于 1951 年建立，至今仍在世界各地的实验室应用，成为“永生”细胞。正常组织培养的细胞在某些特殊条件下，如放射线照射、化学致癌物处理或癌基因转染等，也能形成“不死”的变异细胞，成为具有肿瘤细胞系性质的细胞。

在细胞建系过程中，无论是自肿瘤组织中分离的细胞，还是正常组织细胞经特殊诱导后产生的“不死”细胞，均需对其生物学特性加以鉴定。还可以用细胞克隆化 (cloning) 的方法进一步改善细胞系的均一性，即分离出单个细胞使之增殖形成细胞群 (colony)。由此产生的细胞群称为细胞株 (cell strain)，它来源于一个克隆 (clone)，是一个具有相同性质或特征的培养细胞群体。

迄今世界上所建立的各种能连续传代的细胞系和细胞株达 5000 余种。许多国家的研究机构均设有细胞库，随时可以供研究者使用。

（四）细胞融合

细胞融合 (cell fusion) 又称细胞杂交 (cell hybridization)，它是指细胞彼此接触时，两个或两个以上的细胞合并形成一个细胞的现象。在自然情况下，体内