

人羊膜細胞制备方法的改进

陈嘉乃 顧葆良 吳鴻萍 李向印 張玉芬

(河北医学院微生物学教研组, 石家庄)

1955年 Zitter 氏^[1]等首先制备人羊膜单层細胞成功, 并用以培养脊髓灰質炎病毒。之后, 很多学者^[2-5]証明人羊膜細胞对多种病毒具有敏感性, 因而引起了国内外病毒工作者的广泛注意。1958年以来, 国内亦开始采用人羊膜細胞进行病毒的研究工作^[6]。由于人羊膜細胞的培养很不稳定, 因而在实际应用上受到了一定限制。我們在实验室进行此项工作时, 初步掌握了一些规律。现在报导如下。

一、材料和方法

人羊膜細胞的制备过程, 基本上按照协和医院检验科采用的方法^[7], 其中某些条件作如下的改变和规定。

1. 羊膜的处理: 采用两种方法, 一种方法是羊膜除用 Hanks 液輕輕洗滌外, 不作任何处理, 尽量保留附着于羊膜細胞上的粘液。另一种方法是用三角形玻棒尽量将粘液刮除干净。

2. 消化: 胰酶 (Difco 1:250) 采用 0.25% 浓度。羊膜与胰酶的比例均按 1:3—5 加入。37℃ 靜置消化 3—5 小时。

3. 接种及培养: 培养用鏈霉素小瓶, 每瓶接种 40 万/毫升。5° 傾斜放置, 37℃ 培养貼管后, 36—40 小时換液。

4. 血清及营养液: 共采用綿羊、牛、馬和驢等四种动物血清。从屠宰場取血, 于血清分离后, 經玻璃滤器除菌后备用。

营养液含血清 20%, 乳白蛋白水解物 (0.5%) 80% 及青霉素和鏈霉素各 100 单位/毫升。

5. 羊膜細胞的判定标准: 收集到的羊膜不加选择地应用, 但每个羊膜均按下列标准判定优劣。除肉眼观察及鏡检外輔以中性紅染色。細胞优劣的标准是:

优: 肉眼观察肉色, 鏡检細胞界限明显, 顆粒少, 胰酶分散后染色活細胞占 95% 以上。

劣: 肉眼观察灰色, 鏡检細胞界限不清, 顆粒多, 胰酶分散后活細胞仅占 50—70%。

良: 介于以上二者之間。

二、实验結果

1. 常规法(刮除粘液层)与改进法(不刮除粘液层)經胰酶消化后分散細胞粘管及生长情况:

1962年以前我們制备人羊膜細胞的常规方法是用玻棒尽量刮除粘液以利消化。但細胞培养的成功率一直很低, 后来在工作中发现未經刮除粘液的羊膜, 細胞生长良好。因而进行了下列实验。同一羊膜, 从臍带部均分为两半, 除羊膜的处理不同外, 在相同的条

件下进行消化和培养。实验共进行了 4 次，得到了类似的结果。其中典型的结果见表 1。

从表 1 可见，同一羊膜细胞，因处理方法不同，其增殖力有很大差异。当粘液附着于细胞上消化时则生长良好，当粘液刮除后则不贴管壁。

在上述实验的基础上，又连续不加选择地用常规法制备了 10 批细胞；用改进法制备了 30 批细胞。结果见表 2。

表 1 细胞粘液与细胞增殖的关系 (一)

羊膜批号	处 理 方 法	细胞贴管及生长情况	
		40 小 时	7 天
62-16	用玻棒尽量将粘液刮净，Hanks 液洗 2 次	细胞贴管很少	仅个别瓶内的细胞胀大
	不作任何处理，Hanks 液洗 3 次	细胞贴管量多且均匀，有的细胞开始胀大	全部细胞管增殖成层

表 2 细胞粘液与细胞增殖的关系 (二)

羊膜处理方法	总 批 数	细 胞 生 长 情 况			
		细胞未贴管或未增殖		细胞增殖成层	
		批 数	%	批 数	%
未刮除粘液组	30	6	20	24*	80
刮除粘液组	10	9	90	1	10

* 表中所列细胞增殖成层的 24 批细胞中，全部或多数细胞管增殖成层者 9 批，半数增殖成层者 10 批，不到半数增殖成层者 5 批。

从表 2 可见，在改进法的 30 批细胞中，有 24 批细胞不同程度的增殖成层，占总批数的 80%。而在常规法的 10 批细胞中，只有 1 批增殖成层，占 10%。由此可知，用未刮除粘液的羊膜细胞消化培养时，能显著地提高培养成功率。

在上述实验中又发现在所有增殖成层的细胞中，优、良和劣的细胞均有。在未贴管或未增殖的细胞中亦是如此。此说明按照初步判定标准尚不能反映细胞的真实生活能力。特别应当提出的是 62-20 批羊膜，其外观灰色，镜检细胞界限不清，颗粒极多，细胞分散后用中性红染色活细胞约为 50%。按照前述标准为最劣等细胞，根据一般印象，此种细胞很难增殖，但接种后，细胞贴管甚多，仅空隙较大，换液后虽生长稍慢，但大多数细胞管均于 10 天增殖成层。

2. 常规法与改进法处理的人羊膜在胰酶消化过程中不同时间分散的细胞数比较：

本实验，将同一羊膜剪成大小相同的两块，用常规法及改进法处理，再用胰酶消化，并从开始消化时起，每隔半小时，计数细胞 1 次。结果见图 1。

图 1 表明，未刮除粘液的细胞，在 3 小时内，细胞数目直线增加，3—6.5 小时之间，出现 2 次波动，但基本维持在高水平，从 6.5 小时起则逐渐减少。此曲线表示，在 3 小时内细胞逐渐被胰酶分散脱落，故而细胞数目增加，以后一方面脱落的细胞遭受胰酶的破坏，一方面细胞仍在继续分散脱落，因而出现在 3—6.5 小时之间的大致平衡状态及 6.5 小时

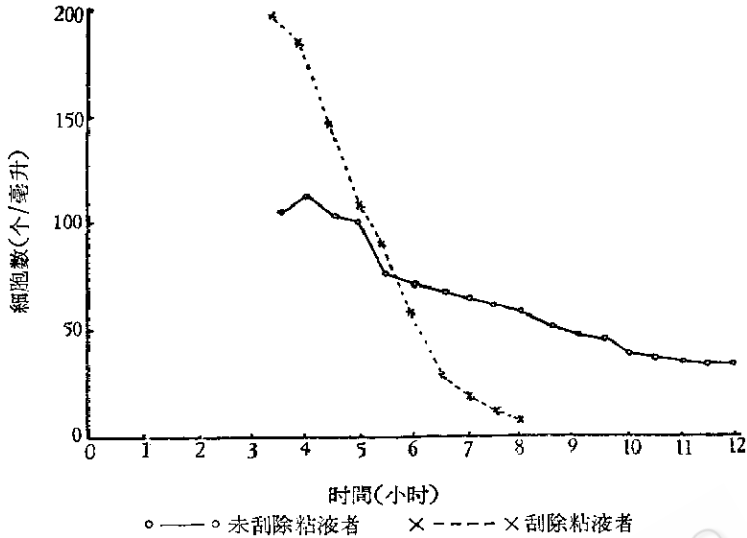


图1 不同处理的羊膜在胰酶中细胞的分散与损坏情况

以后细胞被胰酶破坏多而分散脱少的细胞总数减少的状态。

当重复上述实验时发现,不同的羊膜,细胞分散的速度不同。未刮除粘液的羊膜,有的可在 2.5 小时内出现数目减少, 2.5—4 小时之间出现波动,以后缓慢下降。波动时间虽迟早不一,多少不同,但均有波动。以上说明不同羊膜对胰酶的耐受力是不同的。

3. 常规法及改进法处理的人羊膜经胰酶消化后的分散细胞在胰酶继续作用下细胞数的变动情况:

同一羊膜,剪取大小相同的两块,用常规法及改进法处理再用胰酶消化,至 3 小时,除去羊膜块,计数细胞,并将细胞悬液继续消化,再每隔半小时计数细胞。结果见图 2。

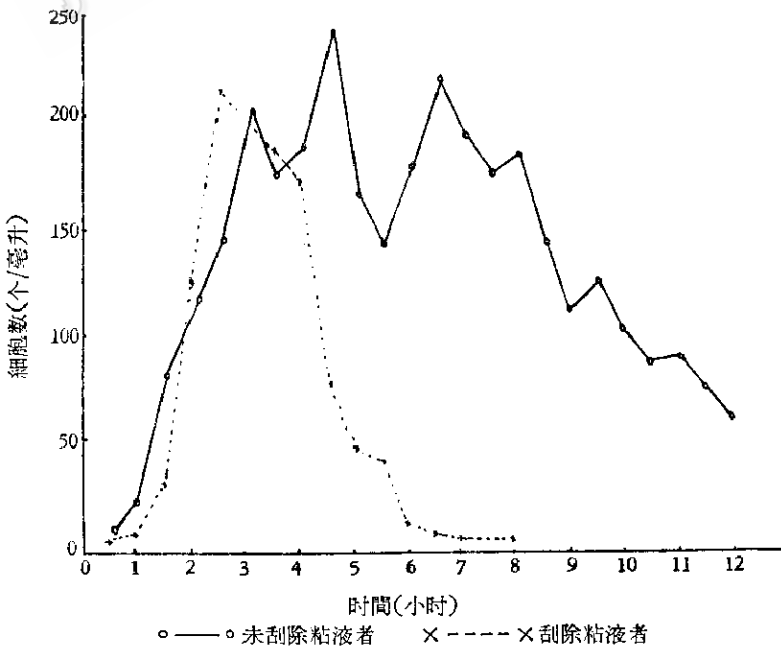


图2 不同处理的羊膜细胞,在胰酶中的损坏情况

图 2 表明,已经分散下来的细胞,不论刮除粘液或不刮除粘液,继续消化时,细胞数目均逐渐减少。此说明分散细胞与胰酶长时间接触后,可遭受破坏。所不同者,未刮除粘液的细胞破坏慢,刮除粘液的细胞破坏快。

4. 用改进法处理的人羊膜经不同时间胰酶消化的分散细胞生长的情况:

用未刮除粘液的羊膜进行消化,至 3 小时,将已分散下来的细胞离心沉淀,进行培养,并将胰酶溶液还回原来羊膜,继续消化,至 4 小时,再离心沉淀,进行培养,胰酶仍还回原羊膜,至 5 小时作最后培养。结果见表 3。

表 3 不同消化时间对细胞增殖的影响

*细胞生长情况 羊膜批号	消化时间	3 小时	4 小时	5 小时
62—25		++	+++	++
62—26		-	+	-

* 生长情况: “+++”细胞管全部增殖成层,生长甚好;
“++”细胞管多数增殖成层,生长较差;
“+”细胞管少数增殖成层,生长很差;
“-”细胞未贴管或未增殖。

表 3 表明, 62-25 批细胞,在不同消化时间培养时,均能增殖成层,但生长情况亦有差别。62-26 批细胞,则只在消化 4 小时的细胞增殖成层。且生长很差。此说明不同羊膜细胞对胰酶的耐受力不同。对胰

酶耐受力强的细胞,耐受胰酶作用的时间幅度很大,便于掌握。而对胰酶耐受力低的细胞,耐受胰酶作用的时间幅度很小,难于控制。同一羊膜不同时间消化下来的细胞生长差别的原因可能是:消化时间过短时,生活力旺盛的细胞尚未分散下来,消化时间过长时,则分散下来的细胞又可遭受胰酶损伤。

三、讨 论

根据已知的资料,人羊膜细胞培养的影响因素是很多的,这些因素可归纳为羊膜质量,胰酶作用^[8]和血清质量^[9]等三个主要方面。在这些因素中,究竟何种因素是关键性所在,它们之间的相互联系又是如何?是值得探讨的。

我们的实验证明,在产后 8 小时内收集的人胎盘羊膜,用中性红活体染色显示,全部羊膜都有活细胞存在,虽然每个羊膜上死、活细胞的比例不同,但绝大多数羊膜的活细胞数都在 95% 以上。在这些活细胞中,由于先天和后天的原因,其生活力是不同的。从我们的实验可以看出,细胞生活力旺盛者对胰酶的耐受力高,能抵抗胰酶的作用而很好增殖。在制备这类细胞时容易成功。细胞生活力衰退者,对胰酶的耐受力低,可遭受不同程度的破坏。

粘液附着于细胞上时,对细胞有一定的保护作用。所以保留羊膜细胞上的粘液,可显著提高细胞培养的成功率。根据已知资料,大家对粘液保护细胞的作用重视是不够的。一般都采用不同方法,如二次胰酶消化^[9]或机械刮除^[3,7]尽量除去粘液,并认为除去粘液有利于分散细胞。但实际上是害多而利少,应当引起注意。

当细胞的生活力衰退到一定程度时,仅只保留粘液仍然不免遭受破坏。由此可见,判定细胞的生活力是非常必要的。但用我们初步规定的标准,并不能真实反映羊膜细胞的生活力。特别是细胞颗粒问题,颗粒多者并不一定坏,因为颗粒有可能是细胞储存的食物。中性红染色亦只能观察死、活细胞的比例,而不能确定细胞的生活力。关于细胞生活

力的判定标准,有待于进一步研究。

四、摘 要

本实验比较了用常规法(刮除粘液层)及改进法(不刮除粘液层)处理人羊膜经胰酶消化后分散细胞数、粘管及生长情况,结果表明粘液附着于细胞上,能增强细胞对胰酶的耐受力,而显著提高细胞培养的成功率。

参 考 文 献

- [1] Zitcer, E. M., Fogh, J., & Dunnebacke, J. H.: *Science*, **122**:30, 1955.
- [2] Wilt, J. C., Stanfield, F. J. & Leindl, L.: *Canad. J. Public Health*, **47**:433, 1956.
- [3] Weinstein, H. J., Alexander, C. & Yoshihara, G. M.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **92**:535, 1956.
- [4] Lahelle, O.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **40**:436, 1957.
- [5] Milovanovic, M. V., Enders, J. F. and Mitus, Anna.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **95**:120, 1957.
- [6] 吴安然: 临床检验杂志, **1960**(1):1, 1960.
- [7] 北京协和医院检验科: 病毒实验诊断手册, 人民卫生出版社, 85 页, 1960.
- [8] Lahelle, O.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **39**:338, 1956.
- [9] Dunnebacke, T. H., & Zitcer, E. M.: *Cancer Res.* **17**:1043, 1957.

AN IMPROVED METHOD FOR THE PREPARATION OF HUMAN AMNION CELLS

CHEN CHIA-NEI, KOO PAO-LIANG, WU HUNG-PING, LEE SHIANG-YN

AND CHANG YU-FEN

(Hoei Medical College, Peking)

The purpose of this paper is to report the conditions under which the cultivation of human amnion cells could be successful. It was found that the injury of trypsin upon the amnion cells which had been deprived of mucoid substance was responsible for the failure of survival of the cells. When the mucoid substance was kept in good condition upon the amnion cells, it protected the cells from the action of the trypsin and promoted a success in the cultivation of these cells.