

一种組織培养的方法

陈 瑞 銘

(中国科学院实验生物研究所)

組織培养是一种以人为簡化的无 菌 的 条件,維持活的細胞,組織,和器官,使之繼續生長發育,藉以观察研究生命現象的方法。方法本身的原理是簡單容易懂得的。

从 1907 年哈利遜氏 (Harrison)^[4] 用悬滴法培养神經纖維成功之后,到現在已經有五十年的历史;在这五十年中,由于各科門知識的进展,組織培养的方法,也有了許多改进。利用已有的各种培养組織的方法,来研究生物学上和医学上的問題,工作很多,为數可以万計。

当我们用适当的方式和营养液来培养一片組織時,在短短的几个鐘點內,就可以看到有一些細胞,主要是梭形的細胞(普通称为成纖維細胞)从組織片的邊緣爬出。由于這類細胞从組織片繼續地爬出,不繼地分裂增殖,在一兩天內,就有無數的細胞圍繞着組織片(或称培养体),成为呈圓形的生長暈 (Outgrowth)。生長暈随着培养時間的延續,而逐漸扩大。这种的生長方式,普通叫做无組織性的生長 (Unorganized Growth)。事实上,在无組織性的生長的同時,还可以有另一种常被人們所忽視的生長方式,就是組織片本身,可以进行所謂的有組織性的生長 (Organized Growth)。

培养的組織片的有組織性的生長,就是在培养过程中,它可以保持着或發育成如同在机体上一样的組織結構和形态。

早在 1914 年,湯姆遜氏 (Thomson)^[9] 是第一人,首先观察到一些未分化的雞胚組織,如脚趾、羽毛、水晶体的原基,在培养过程中,逐漸扩大,而且进行分化。从那个时候起,一直到現在,有許多的工作者,培养了許

多种未分化的組織或器官原基,如軟骨,骨骼,牙齒,眼睛,中腎,唾液腺,毛髮,生殖腺,以及內分泌腺等,都能够得到一定程度的生長和分化。但是,过去的这些工作,几乎全限于形态方面,生化方面的工作,近年来才開始,也多半只限于无組織性的生長(細胞培养)的材料,利用培养的有組織性的生長的組織或器官做研究材料的,則很少。主要原因之一,是培养的方法不宜于生化研究。事实上,以有組織性的生長来做生化以及营养方面的工作,應該是极方便和有利的材料。

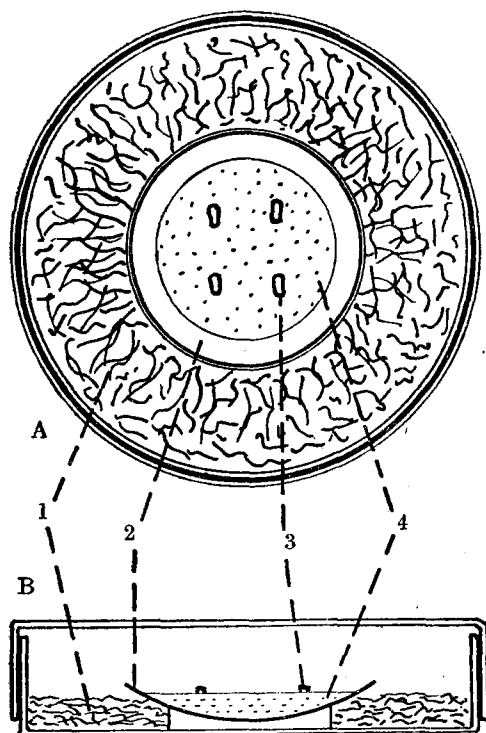
直到目前,除了已經能够培养的組織和器官,尚未进一步广泛的被利用于生化方面的工作外,还有許多种組織和器官本身的培养,仍然是有困难的。这里面,一部分原因是歸咎于已有的培养方法(包括培养液在內)未能尽美尽善;另一部分原因是对于各种組織和器官的特性,尚未能十分明了。如果不是这样的话,那我們可以大胆地說,任何一种組織或器官,都可以培养成功的。假如我們有办法,能够多了解一些某种組織或某种器官的特殊性,那就有可能在培养的方法上,予以改进;反之,如果我們有了比較合适的培养方法,那也就有希望使我們多知道一些某种組織或某种器官的特殊性何在。現在問題就在于怎样来培养? 方法和培养液應該是什么,才能够達到兼收的成效? 因此,我們不难理解,为什么目前还有許多文章發表,为了同一种的組織或同一种的器官的培养,在在改进方法,以期能培养近乎理想的結果而努力。

当然,一种組織或一种器官,是否能够培养,而達到如意的結果,也必須看工作者,在

从个体上解取該組織或器官時的一些必要操作，是否够小心地維護該組織或該器官的完整无損，而决定的。解取時的撕拉動作，是最不利于組織或器官的正常發育和生長的。这方面的重要性，勿須多贅。

已有的組織培养方法中，有的是合于組織或器官的生長和分化的条件，但又不便于利用在生化方面的研究。相反地，有的方法是符合于后者的要求，但对于組織或器官的生長和分化，又不是十分理想的。在許多培养組織和器官的方法中，錶玻璃培养法算是比較优越的。茲先簡述如下。

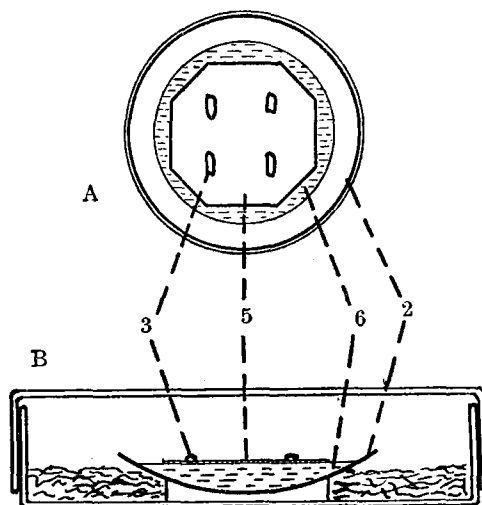
1929年，費尔氏(Fell)和罗畢遜氏(Robison)^[3]首先創用錶玻璃培养法(Watch glass culture method)。是在一套小的培养皿內鋪上一薄層脫脂棉花(如圖一)，棉花的中央，剪成一



圖一 錶玻璃培养法

小圓洞，以便透光，在圓洞上放一小錶的玻璃，錶玻璃里儲培养液(平常用雞胚提取液和雞血漿，各6—7滴，混勻后便凝成固体培养

基)，培养基表面便是培养組織的地方。組織或器官必須在支持面上，才能够正常的生長發育。一般在同一培养基面上，可以培养4—5塊組織或器官。为保持培养皿內的一定濕度，而用煮过后冷却的蒸餾水10毫升，灌注到棉花里去。每过2—3天，便將組織或器官，逐一从培养基面上小心地移下，經過2—3次的生理鹽水洗滌后，再种植于新备的一套培养皿里的培养基上，繼續培养。这种方法的优点，在于有較大的固体培养基面，支持培养体在上面生長發育，同時又有充分的营养物質和气体的供应。但是固体培养基有它的缺點，就是培养体的代謝产物不能排除，而积聚于培养体的周圍，不利于組織的生長發育；此外，某些組織能分泌液化培养基的物質，液化了培养基，以至于使培养体在培养过程中，逐漸下沉而浸沐于培养基的深



圖二 擦鏡紙培养法

培养皿：直徑——70—75公方

高——1.5公方

錶玻璃：直徑——38公方

深——0.6公方

A 从上面看；

B 从侧面看。

1. 脫脂棉花，

2. 錶玻璃，

3. 培养体，

4. 固定培养基，

5. 擦鏡紙，

6. 液体培养液。

处，这样就失去了应用固体培养基的意义。另外尚有的缺點，就是在更換培养基時，將培养体从

舊培养基上移下,經生理鹽水洗滌后,再种植于新的培养基上的操作处理,常常要引起培养体的收縮,尤其是一些腺体培养,收縮較強,如作者曾用这种培养方法,培养过小白鼠胚胎的胰臟,在開始的2—3天内,腺体生長發育得很好,但是通过移植再培养的操作后,引起了該腺体的收縮,而成球团,以至于扰乱了該腺体的組織結構,阻碍了养分不能及時到達該腺体的中部,結果很快地就發生組織坏死。

为謀克服这种方法的短处,1953年馬丁諾維支氏(Martinovitch)^[5]曾用細玻杆數根,在固体培养基面上,在一定的間隔下,排成兩組,把培养体支持在一組的細玻杆上培养。每天將培养体沿玻杆的一端向另一端推移兩次,等到培养体被推到玻杆的末端后,再把它移到另一組的玻杆上,每天照樣地推動兩次。这样,他可以使培养体不至于因液化培养基而下沉,并且还可以因每天有兩次的推移,而限制那不利于有組織性的生長的生長量的發展。他成功地培养了一些腺体組織和器官。但是这种改进的方法,仍有美中不足的地方,就是培养体的代謝产物,一直是跟隨着培养体的推動而前进,未能排除。此外,一个培养皿里的培养基,只能有一个培养体,而且每天去推動兩次,这不但是培养基材料和時間都不經濟,同時在污染方面,將創造出更多的机会。

应用固体培养基,不仅是代謝产物的不能排除,也限制了某些物質,如維生素,激素,及其他的生化分析。如想在培养过程中,从培养基里隨時提取一部分,来作生化的分析,或者隨時要加进某些物質或試剂到培养基里去,而不撓扰培养体,是有困难的。从這點来看,势必採用液体培养液来替代的。

上面已經提到,一般的組織或器官,如果浸沐在液体培养基中,往往是長不好的。1952年托罗偉尔氏(Trowell)^[10]为要应用液体培养液,同時又要使培养体不至于下沉,曾用小玻璃杯,杯內塞紧了脫脂棉花,做为支持面,棉花里灌注液体培养液,来培养淋巴結。这种方法

固然是为液体培养液而备有的支持面,但是棉花是不透光的,不能作显微鏡下的观察,并且棉花纖維常常要粘着于組織,不利于組織切片。至于代謝产物的排除,也不是十分理想的。后来在1954年^[11],他又改用鉚絲綢(Tantalum gauze)做成小架子,立在液体培养液里,架上放一張擦鏡紙做为支持面。表面上看来,这應該是理想的方法,但是考虑到鉚絲綢的珍貴,就足以說明这种方法之不可能普遍应用;同時,在紙面上的培养体,因被下面的架子高举在上,高度被限制住了,升降就不能自如,如果培养液的用量有所增減時,則不免有浸沐或供应不足之虞。

由于多方面間接地了解一些組織或器官的特性,和綜合已有的許多培养方法的优缺点,为謀組織培养更广泛的被应用,作者^[2]曾設計了一种簡單培养組織或器官的方法。这种方法主要是以鍍玻璃培养法为基础,加以改进的。今特介紹于下。

此法应有的設備,一概可与鍍玻璃培养法相同,所不同之點,乃在于液体培养液,液上浮一張擦鏡紙来替代固体培养基的支持面(如圖二)。

一、擦鏡紙的預备 擦鏡紙在特別小心的操作下,可以不用支持架子,能長期地浮游于培养液上。首先將紙剪成八角形,直徑約为25毫米;这是根据鍍玻璃的尺寸(如圖所示)和培养液的容量来决定的。用多边形的或圓形的紙均比用方形的理想,理由:(1)可以自如浮游,(2)面积也較大。剪好的紙,15—20張放在大的培养皿內,先用乙醚洗滌兩小時,其間更換乙醚2~3次;繼用純酒精洗滌兩小時,其間也更換純酒精2~3次;最后用玻璃蒸餾水洗滌5~10次,历时12小時以上。將蒸餾水倒干后,使紙在同一培养皿內,在攝氏70~80度的温箱內燻干,烤干后用干淨的小鑷子把紙在同一培养皿內,一張一張分開,然后把它和其他用具一起进行高温干燥消毒(攝氏120~150度)一小時左右。

二、培养液 普通用的培养液有血清, 胚胎提取液, 和人造的培养液:

1. 血清——一般用一岁左右的健康的公鸡; 取血前先把它绝粮 24 小时, 在绝粮阶段中, 仅给它水喝, 然后在无菌的环境下进行取血, 做成血清。

2. 胚胎提取液——一般用孵化过 12—14 天的鸡胚; 先将卵壳用 70% 酒精擦干净消毒, 后用小刀柄将卵的大端(有气室的一端)打开, 用小镊子夹住胚胎的颈部, 将它吊取出来, 放在大的培养皿内的大的玻璃里。用一小直剪, 将胚胎剪成几大块, 继用生理盐水尽量将血液洗去, 然后用一弯剪子, 把它剪成细浆; 用一大孔的滴管将细浆定量地取出, 放到一厚壁的短管内, 继用粗的玻璃杆把它用劲绞磨, 然后用等量(或两倍)的生理盐水, 加到玻璃管内, 混匀后, 置于工作台上任其提取 10~20 分钟, 最后离心沉淀, 以每分钟 2,000~2,500 转的速度, 离心五分钟, 取出上面的清液, 就是所谓的胚胎提取液。

3. 人造的培养液——人造的培养液有派克尔氏(Parker)的, 摩尔根氏(Morgan)的, 费舍尔氏(Fischer)的培养液等种。

三、滴管 滴管应备细孔, 小孔, 和大孔三种。细孔的滴管是为吸取多余的培养液或更换培养液时用的; 小孔的滴管用处很多, 如在洗滌胚胎的血液时, 在傳遞解取完畢的組織片到培养液上面去时, 或从培养液上取下时用的; 大孔的滴管可用为衡量细胚浆和生理盐水的份量, 也可用以傳遞未解取前的組織塊。

四、解取的刀和針 解取所用的刀, 就是普通眼科用的白內障小刀; 用前須先把它磨成細薄尖銳, 而富有彈性, 才能合用。針就是普通縫衣用的粗針, 先把它和小玻杆焊接在一起, 然后磨光滑尖銳即可。刀和針在解取組織或器官時, 是极重要的工具, 兩者是互相合作的。

五、培养的操作步骤:

1. 从消毒过的用具筐里, 取出小培养皿; 培养皿內的佈置, 与上面提到的费尔氏和罗畢

遜氏的玻璃培养法相同。

2. 用消毒过冷却后的蒸馏水, 小心灌注 10 毫升于培养皿內的脱脂棉花里, 勿使水溅入于玻璃內。

3. 用小滴管将培养液滴在玻璃的中央; 如果用两种培养液时, 則須將兩者先混匀, 或者將兩者先后滴在玻璃的中央, 然后用弯的細玻杆把兩者混匀。

4. 用一把干燥的小镊子, 取出一張擦鏡紙, 作飄波式的動作, 將紙鋪在培养液上; 平常在同一張的紙面上, 可以培养 4~6 个体积为 $2 \times 2 \times 0.5$ 毫米的組織片或器官。

5. 將解取好的組織片或器官, 先用生理盐水冲洗兩三遍, 末了一次則用培养液浸洗, 繼用小孔的滴管連組織或器官帶培养液, 一个个地傳遞到擦鏡紙的一定位置上。这里应当特別要注意一點, 就是在傳遞組織片或器官在下滴于擦鏡紙上面時, 滴管和紙面的距离不宜太高, 如果距离太高, 則下滴的點就可能扩大, 紙面潮濕的面积越扩大就越不容易長期維持上浮的作用; 因此, 这一步驟最好要在解剖鏡下进行。

6. 在解剖鏡下同時觀察紙上的組織片是否平鋪而沒有重摺, 如果有重摺時, 則須借解取刀和針之助, 小心將它鋪開, 但仍要注意液体在紙上的扩大。

7. 放到保温箱里去, 进行培养; 每天將培养皿从保温箱里取出, 作一次輕微的螺旋式的振盪, 这样是有助于培养体的代謝产物, 从紙的間隙孔下沉, 而保持培养体周圍的清淨。

六、再培养的操作步骤 每次培养 2~3 天后, 須照例將培养体和擦鏡紙的下面, 用生理盐水加以洗滌, 然后放到新备的培养液上去再培养。

1. 用一把干燥的镊子, 夾住擦鏡紙的一角, 將紙和紙上的培养体一起取出, 以飄波式的動作, 把它浮在一个已备有生理盐水的大凹玻片或大玻璃里, 保持其浮游。

2. 置于解剖鏡下觀察, 用細的滴管將培养体上面和周圍的液体吸掉, 同時就在培养体的

周圍，將紙下的生理鹽水吸取上來；如果在同一張紙上有四個培養體時，則吸取要從每一個培養體上平均各吸取一些，這樣是使各培養體的洗滌機會均等；隨着生理鹽水的減少，紙和紙上的培養體就一起下沉，而幾乎與大錶玻璃面接觸。

3. 用一細滴管吸取一些清淨的生理鹽水，小心地靠近於每一個培養體上面，各滴淋數滴；這樣，紙和培養體又重新上浮。（2、3兩步驟重複兩次即可）。

4. 用干燥的鑷子，夾住紙的一角，將紙沿着大錶玻璃的邊緣作拖拉帶刮的動作而取出；這樣，就可以把紙的下面的生理鹽水和污積刮去一部分。

5. 以飄波式的動作，把它浮在新備的培養液上，繼續培養。

七、培養體的固定 在培養過程中，隨時可固定紙面上的一二培養體。用小剪刀把紙上有培養體的一角剪下，或將培養體小心地從紙上移下，用固定劑固定之；余下的紙和紙上的培養體，可以繼續浮在培養液上，繼續培養下去。在培養結束時，將紙整張取出，浸沐在固定劑里固定之。在脫水階段或封蜡之前，應在解剖鏡下，小心地把培養體從紙上解取下來，并仔細檢查培養體里是否帶有紙纖維。一般作檢查工作，最好在水里或在低度的酒精里進行，以免組織干燥。

這種能培養體積較大的組織片或器官的方法，是簡單容易的。方法的主要關鍵，乃在於如何使擦鏡紙在培養液上能繼續浮游着。前面已經一再着重地提到，如放紙於培養液時，應作飄波式的動作，不然，紙的一角或其一邊不小心地插入到培養液或生理鹽水里去，那就有困難維持其浮游了。其次，在種植和再培養組織片或器官時的洗滌，滴管與紙面的距離不宜太高，高度大了，那麼下滴的溶液就會擴大紙面的潮濕，這樣同時也會增加紙面上的載重量，影響所及，紙就逐漸下沉。如果注意這主要的兩點，那麼一般擦鏡用的紙，用不着架子

來支持它，就有可能長期維持它的浮游，甚至於浮在蒸餾水上，也不會下沉的。

此法系根據一些已有的組織培養法，取長補短地加以改進而來的。方法本身至少有下面五個優點：

1. 利用擦鏡紙來做組織培養或器官培養的支持面，因此可以用液體培養液，便於做液體的生化分析。在培養過程中，可以隨時加進某些試劑到培養液里去，也可以隨時從培養液里取出一部分，來分析某種物質的得失為何。

2. 一些具有高度分泌和代謝性能的組織或器官，它們的產物可以很方便地從紙纖維間的孔隙擴散出去，或因輕微的振盪而下沉，保持培養體的清淨，這樣就裨益組織的健康生長和發育。

3. 從開始培養之時起，到結束實驗為止，培養體一直是保持在紙面上；在再培養的操作時，不必用移動種植的手續，這樣就不至於引起培養體因移動而收縮或損傷。

4. 再培養時是把整張紙連培養體一起從舊培養液上取出，經生理鹽水的沖洗，再放到新備的培養液上去，紙面不論是有幾個培養體，不必一個個地去移動和傳遞，這樣就可以節省許多操作的時間。

5. 從培養體的周圍長出去的無組織性的生長，它的速率是比一般在固體培養基上生長的速率慢些，這樣也就合乎有組織性的生長的基本要求。

正因為如此，作者曾成功地培養了下列幾種大白鼠胚胎的組織和器官，如肝臟、胰臟、肺、腦垂腺、甲狀腺、腎上腺等。其中特別是肝臟和胰臟的結果，較文獻中所見的，都令人滿意些；不過，取自胚胎末期的這兩種器官和腎上腺，仍然是不容易培養的，這恐怕是我們對於這三種器官的特性以及應該用那種培養液來培養，目前尚未明瞭；有進一步深入去探討的必要。

以上所舉的大白鼠胚胎的各種組織和器官，一概用12—14天的雞胚提取液（25%）和

鷄血清來做培養液，分量各占其半。培養時間1—2個星期，培養的溫度為攝氏37度。生長發育都健康和正常(圖三、四)。

此法可能推廣應用於華堡氏(Warburg)的呼吸器上，也有可能應用在旋轉管的培養法上，或其他。至於利用人造的培養液的，最近有施德曼氏(Sidman)^[7,8]培養大白鼠胚胎的褐脂體(Brown fat)，觀察胰島素的影响的工作；有彼各爾斯氏(Biggers)^[1]培養鷄胚的長骨原基，研究葡萄糖和氨基酸的利用的工作，兩氏採用派克爾氏的人造培養液(No.770和No.886)。

作者曾考慮到紙纖維參雜到組織里的缺點，屢次嘗試其他代用品，但都不如擦鏡紙方便和理想。最近夏費爾氏(Shaffer)^[6]試用了醋酸纖維布(Cellulose acetate fabric)來代替擦鏡紙，似乎亦告成功。

參考文獻

- [1] Biggers, J. D. 1954 The Utilisation of Glucose and Amino-acids by Limb-bone Rudiments cultivated in Synthetic Media Nos. 770 and 886. Annual Report for 1954, The Strangeways Research Lab. Cambridge, p.7.
- [2] Chen, J. M. (陳瑞銘) 1954 The Cultivation in Fluid Medium of Organised Liver, Pancreas and Other Tissues of Foetal Rats. *Exptl. Cell Research*, 7: 518-529.
- [3] Fell, H. B., and R. Robison. 1929 The Growth, Development and Phosphatase Activity of Embryonic Avian Femora and Limb-buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.* 23: 767-783.
- [4] Harrison, R.G. 1907 Observations on the Living Developing Nerve Fibre. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 4: 140-143.
- [5] Martinovitch, P.N. 1953 A Modification of the Watch-glass Technique for the Cultivation of Endocrine Glands of Infantile Rats. *Exptl. Cell Research*, 4: 490-493.
- [6] Shaffer B. M. 1956 The Culture of Organs from the Embryonic Chick on Cellulose-acetate Fabric. *Exptl. Cell Research*, 11: 244-248.
- [7] Sidman, R. L. 1956 Histogenesis of Brown Adipose Tissue *in vivo* and *in vitro*. *Anat. Rec.*, 124: 581-602.
- [8] Sidman, R. L. 1956 The Direct Effect of Insulin on Organ Cultures of Brown Fat. *Anat. Rec.*, 124: 723-739.
- [9] Thomson, D. 1914 Some Further Researches on the Cultivation of Tissues *in vitro*. *Proc. Roy. Soc. Med. Lond.*, 7: 21-44.
- [10] Trowell, O. A. 1952 The Culture of Lymph Nodes *in vitro*. *Exptl. Cell Research*, 3: 79-107.
- [11] Trowell, O. A. 1954 A Modified Technique for Organ Culture *in vitro*. *Exptl. Cell Research*, 6: 246-248.

