中 国 科 学
1982 年 11 月　　B 辑　　第 11 期

骨巨细胞瘤组织块的冻存与复温培养观察

孙德青　冯传汉　张嘉庆　郭振泉*　蔡玉辉　蒋化龙
（北京医学院附属人民医院肿瘤研究室骨瘤组）

摘　　要

本文以 10% 二甲亚砜或 15% 甘油为保护剂，在液氮温度（−196℃）下将 6 例骨巨细胞瘤的组织块保存了 3—180 天．在复温培养中冻存组织块的各种细胞成分均能存活，其细胞形态、生长行为及乳酸脱氢酶同功酶谱等特点均与用新鲜组织块培养的细胞相同．电子显微镜观察显示二甲亚砜对细胞超微结构的冷冻保护作用优于甘油．本实验证明骨巨细胞瘤组织块的冻存以缓慢降温、快速复温为宜，因为在上述条件下冰晶主要形成于细胞间隙，对细胞损伤较小．

体外培养是研究骨巨细胞瘤的重要途径之一，目前肿瘤组织的来源主要依靠数量有限的新鲜手术标本，这就限制了有计划地进行经常研究．同时，这种肿瘤的巨细胞在体外培养中不能长期存活[1,2]，其间质细胞经过反复传代培养，生物学特性也能发生变化[3]，因而有必要寻找一种能保存新鲜标本中各种细胞成分及其生物学特性的方法．

本项研究的目的，是用低温保存肿瘤组织，复温后进行培养，以观察各种细胞成分能否存活，生物学行为是否改变，试图改变目前骨巨细胞瘤体外培养研究等待新鲜标本的被动状况，并为建立骨肿瘤组织库作初步探讨，提供一些参考资料．

一、材料与方法

材料取自 6 例骨巨细胞瘤新鲜手术标本，病变均经病理检查证实（表 1）．

关于骨巨细胞瘤组织块的冻存，文献中未见现成方法可循，所以首先确定合适的冻存条件．

1. 组织块体积　我们采取约 1 毫米^{3}大小的组织块，有利于保护剂之迅速渗透，同时，复温后略加冲洗即可接种培养．

2. 保护剂浓度和平衡时间（保护剂充分渗入组织、细胞所需的时间）　用 10% 二甲亚砜（DMSO），15% 及5%甘油，分别浸泡标本 15 或 30 分钟，然后进行冻存及复温培养，从培养结果（表 2）可以看出：用 10% DMSO 或 15% 甘油浸泡标本，平衡 30 分钟的冻存组织块细胞生长旺盛，并能够传代，所以均采用这种平衡条件处理各例标本的组织块．

3. 冻存、复温与培养　经实验确定冻存程序如下：新鲜标本在无菌条件下以 Hanks 溶液

本文 1981 年 8 月 13 日收到．

* 北京大学生物系

冲洗，剪成 1 毫米³的小块，装入安瓿．每安瓿装 0.2 毫升组织块，浸没在 2 毫升冻存介质中．冻存介质是含有 10% DMSO 或 15%甘油的 1640 培养液，内有 20—30%小牛血清．

安瓿以火焰封口，室温下放置 30 分钟，使保护剂充分渗入组织达到平衡．然后将安瓿置入冰箱内的冰盒中(−8℃)，实测安瓿在冰盒中的降温速度平均为 0.4℃/分．安瓿在冰盒内放置 2 小时以上，再转移至液氮罐的金属容筒中，容筒先不浸入液氮中，从罐口缓缓下降，利用液

表 1 骨巨细胞瘤标本资料

标 本	年 龄	性 别	部 位	冻存日数
1*	17	女	股骨下端	3 180
2	31	男	胫骨上端	10 180
3*	65	女	尺骨下端	60 180
4	45	男	股骨下端	60 180
5	46	男	股骨下端	87
6*	35	男	桡骨下端	7 90

* 复发病例

表 2 保护剂浓度及平衡时间试验

保 护 剂	平衡时间	成活块/计数块*	传 代
10%DMSO	30(分)	28/30	+
	30	30/24	+
15%甘油	15	12/30	(−)
	30	10/32	(−)
5%甘油	15	3/30	(−)

* 计数块：复温培养二周，粘附瓶壁组织块．
成活块：有细胞移出组织块．

氮蒸气使之继续降温，使安瓿在 30 分钟内自−8℃ 降至−40℃，降温速度约为 1℃/分．然后加快降温速度至 2℃/分，再经 20 分钟，下降至−80℃．此时，将金属容筒直接放入液氮中，使安瓿温度达−196℃进行保存(图 1，2)．

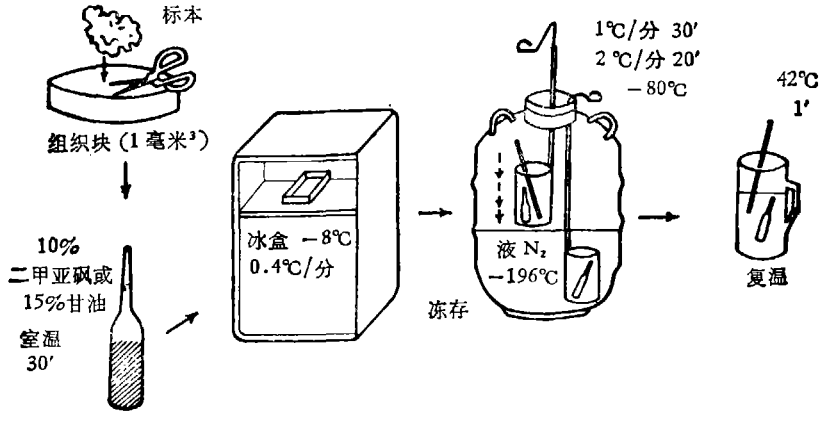


图 1 冻存及复温过程图解

经过不同时间的保存，在需要进行复温培养时，将安瓿取出迅速置入 42℃ 之水浴中，使组织块在 1 分钟内完全融化．将组织块从安瓿中取出，用 Hanks 溶液充分冲去含有保护剂之冻存介质，然后接种于扁平培养瓶或带有盖玻片的小瓶中，进行常规静置培养[1]．培养二周后，在显微镜下观察粘附于培养瓶壁的组织块总数及有细胞移出形成细胞晕的组织块数，以估算成活组织块的比率．对细胞的移出、运动、增殖拍摄了定格显微电影．对生长在盖玻片上的单层培养细胞，则以 Giemsa 染色后进行镜下观察．例 5 标本的一部分组织块未采用保护剂进行平衡，而进行前述同样的冻存和复温培养作为比较．对每一标本的新鲜组织块都进行了培养和相应的观察作为对照．

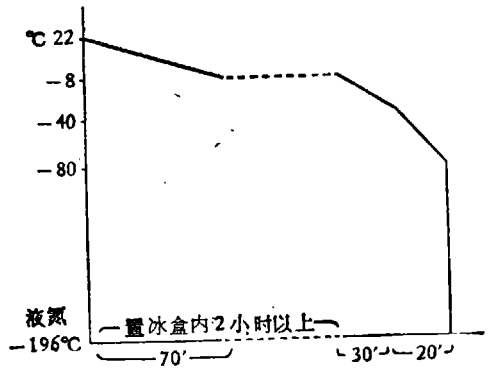


图 2　骨巨细胞瘤组织块标本缓慢降温过程

4. 培养细胞乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的观察　用圆盘电泳方法[4]对例 4 和例 6 的新鲜组织块和冻存组织块培养细胞的乳酸脱氢酶同工酶进行了观察，并以大鼠心、肝组织的乳酸脱氢酶谱作为对照．

5. 超微结构的观察　为了观察冷冻对细胞超微结构的影响，对使用与不使用保护剂处理的冻存组织块及新鲜组织块，以戊二醛、锇酸双重固定，丙酮系列脱水，环氧树酯 618 包埋，作超薄切片，铅、铀染色，用 JEM6C 电镜进行观察比较．

盖玻片上之单层培养细胞则经戊二醛、锇酸固定，丙酮系列脱水，经包埋剂预浸后，将玻片上之细胞层刮下置于胶囊中，以 618 树酯包埋，超薄切片电镜观察．

二、结　　果

1. 复温培养结果　以 10% DMSO 或 15% 甘油为保护剂对 6 例骨巨细胞瘤标本进行了冻存，在不同的间隔时间 (3—180 天)进行了 18 次复温培养，例 5 标本部分组织块未经保护剂平衡而进行冻存、复温培养一次，连同 6 例标本新鲜组织块的对照培养，共培养 25 次，结果见表 3．各例新鲜标本合并的成活比率为 90% (成活组织块数/计数组织块数 = 163/180)，各次冻存组织块合并的成活比率为 88% (429/489)，二者结果很相近．

未经保护剂处理的例 5 组织块，复温培养观察 60 天，完全无细胞移出．所有经保护剂处理的冻存标本原代培养均获成功，有成活细胞自组织块边缘移出，形成细胞晕．细胞成分主要是大量梭形间质细胞和散在其间的多核巨细胞 (图 3)．有二次培养未见巨细胞移出，这可能与取材部位有关，此点曾在以前报道中提及[1]．

除例 3 标本外，其余各例冻存组织块移出的细胞均生长旺盛，并能传代．例 3 标本新鲜组织块的培养细胞增殖不明显，后来渐变稀疏脱落，未能传代．它的冻存组织块成活也较少，细胞不见明显增殖，无法传代．

3. 定格显微电影观察　从冻存组织块与从新鲜组织块移出之细胞的形态、运动特点和生长行为没有差异[5]．在显微电影中可见巨细胞与间质细胞均呈活跃的运动，常可见到间质细胞的有丝分裂．曾观察到一个巨细胞中段变窄、拉长，逐渐分为两部分，中间以细丝状桥连接，

表 3 新鲜与冻存组织块培养结果

标本	组织块	成活块/计数块	间质细胞		巨细胞存活(日)
			存活(日)	培养(代)	
1	鲜	35/35	141	9	21
	冻	143/152	165—362	4—22	20—21
2	鲜	30/35	16	1	14
	冻	82/94	127—166	2—6	8—22
3	鲜	18/28	104	1	17
	冻	29/60	27—82	1	5—10
4	鲜	22/22	81	5	25
	冻	87/93	7—77	1—4	7—38
5	鲜	30/30	201	2	35
	冻	26/27	119	2	20
	无保护剂冻存	0/30	—	—	—
6	鲜	28/30	199	10	7
	冻	62/63	143—192	8—9	11—12



图 3 从组织块移出的多核巨细胞和间质细胞
冻存 180 天(保护剂 DMSO),培养12天,×140

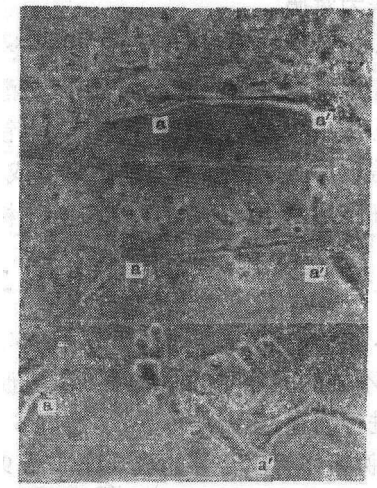


图 4 一个巨细胞通过胞浆拉长、变窄、断裂变为两个巨细胞
×140

最后分成两个巨细胞(图 4). 还观察到一个间质细胞经有丝分裂后，形成一个单核细胞和一个双核细胞的完整过程(图 5).

2. 复温培养细胞的乳酸脱氢酶同工酶 对例 4 新鲜组织块和冻存 60 天组织块的培养细胞，及例 6 新鲜组织块和冻存 7 天组织块的培养细胞进行了乳酸脱氢酶同功酶的圆盘电泳，结果显示新鲜组织块与冻存组织块培养细胞之特点相同，均以 $LDH_{4,5}$ 活性最强，并呈现微弱的 LDH_3 活性.

对照大鼠心和肝组织则分别显示 LDH_1 和 LDH_5 活性最强.

3. 电镜观察 未经保护剂处理的冻存组织块，在电子显微镜下可见细胞结构严重破坏，核

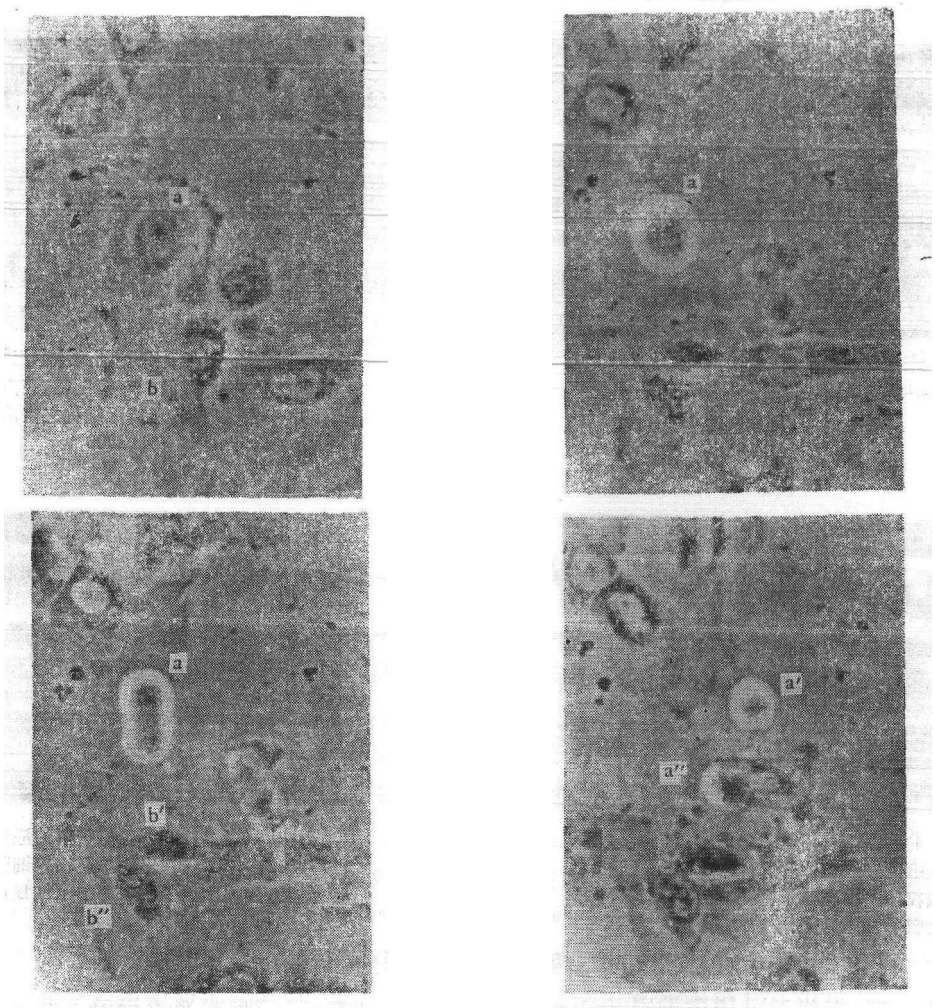


图 5　间质细胞的有丝分裂和双核细胞的形成，细胞 a 分裂为二个子细胞a′和a″，细胞 b 分裂后形成一个单核细胞b′和一个双核细胞b″
×140

结构崩解，核膜破裂，各种细胞器变形和破碎，许多区域胞浆结构无法辨认，浆膜也可见断裂(图 6a).

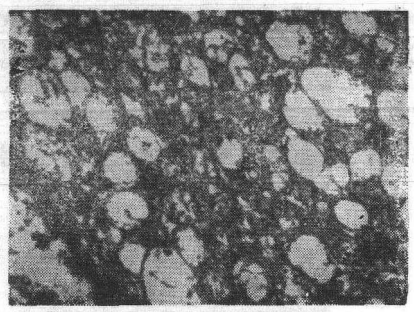
经保护剂处理的冻存组织块与新鲜组织块比较，在光镜下观察细胞结构未见明显改变.但在电子显微镜下则发现冻存标本的超微结构有相当大的变化 (图 6b, c). 在冻存的细胞内可见染色质聚集，线粒体肿胀，其嵴排列紊乱，腔内基质可出现电子密度减低之“空白区”. 内质网也常见扩张，但溶酶体形态未见明显变化.

比较甘油和 DMSO 两种冷冻保护剂所处理的冻存组织块，可见前者超微结构变化明显，许多线粒体呈几乎没有结构的空泡状(图 6b)，内质网也明显扩张变形，有些粗面内质网表面的核糖体颗粒脱离. DMSO 处理的冻存组织块超微结构变化则相对较小(图 6c)，有的细胞甚至保持着正常的超微结构.

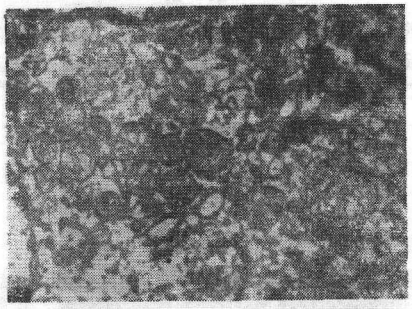
例 5 和例 6 的冻存组织块分别培养 67 天与 39 天后，电子显微镜观察其单层培养细胞，其



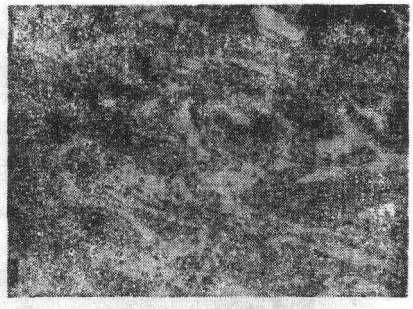
a. 未用保护剂处理的冻存组织块，核膜断裂，大片胞浆崩解，细胞器破坏无法辨认。×6560



b. 以 15% 甘油为保护剂的冻存组织块，巨细胞的许多线粒体嵴短而稀，腔内基质电子密度减低，形成无结构之空泡状 ×12800



c. 以10% DMSO为保护剂的冻存组织块，巨细胞之线粒体肿胀，线粒体嵴排列紊乱，线粒体内出现电子密度减低区，其结构变化较甘油组为轻。 ×12800



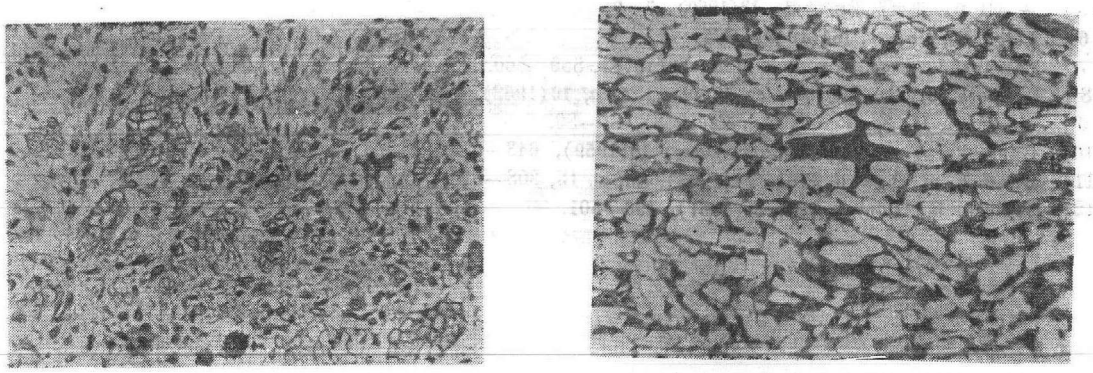
d. 以 10% DMSO 为保护剂的冻存组织块，培养 39 天移出的单层培养细胞超微结构，线粒体与内质网形态已恢复正常 ×20800

图 6 电子显微镜观察

超微结构已完全恢复新鲜组织块中所见的形态（图 6d），胞核完整，染色质分布均匀，线粒体轮廓规则，线粒体嵴排列整齐，线粒体腔内基质分布均匀，多数内质网呈正常外形．这些现象说明，冻存过程中组织块内细胞发生的超微结构变化，经过 1—2 个月的培养已经得到修复．

4. 冰晶分布之观察 为了了解在不同的降温速度下，组织块中冰晶的分布，我们做了下述观察：

将一个安瓿组织块经过缓慢降温过程置入液氮中，另一安瓿组织块则快速降温，在室温下直接投入液氮内．这二个安瓿分别在液氮中冷冻 1 分钟后，即将组织块转移到预冷至−8℃的 95% 酒精中，使组织块在冰晶尚未融化的状态下进行低温固定．12 小时后将组织块移至室温的福尔马林中固定，进行常规组织切片制作．冰晶融化后组织内所遗留之空泡即代表冰冻过程中形成冰晶的位置．光镜观察快速降温的组织，可见冰晶形成于细胞之内，造成细胞结构破坏．巨细胞中冰晶更为显著，细胞结构丧失殆尽（图 7a）．缓慢降温时，冰晶主要形成于细胞间隙，尽管细胞受到冰晶挤压而呈不规则形状，细胞的完整性和结构却得以保存（图 7b）．



a. 快速降温时冰晶形成于细胞内部，细胞结构受到破坏，巨细胞所受之破坏尤为显著 HE×140

b. 缓慢降温时冰晶形成于细胞间隙，细胞受挤压呈不规则状，但其结构得以保存。HE×140

图 7

三、讨　论

1949 年 Polge 等[6]即成功地冻存了动物精子，冷冻方法可以保存细胞，防止其衰老和死亡．目前低温技术在许多领域都得到广泛应用，低温生物学也在迅速发展．本项研究目的在于建立保存骨巨细胞瘤瘤组织的方法，以便随时提供标本，有计划地重复进行培养研究．本文结果表明：冻存的骨巨细胞瘤组织块在复温培养中巨细胞和间质细胞均能存活，其形态、运动、乳酸脱氢酶同功酶等生物学特性也得以保持．尽管冻存组织的超微结构有不同程度的改变，但经过培养一个月或更长时间，电子显微镜观察超微结构已恢复正常．可以认为冻存的骨巨细胞瘤组织块适宜用作培养研究的材料．实验结果表明，冷冻保护剂的应用是必要的，缓慢降温中冰晶形成引起的细胞损伤较快速降温为小．冻-融过程会造成细胞之损伤，如冰晶形成所造成的机械损伤和盐类浓度上升及脱水所致的化学损伤等[7—9]．但许多报告指出，适当的冰冻有可能长期保存组织或细胞[10—12]，我们在液氮中保存骨巨细胞瘤组织长达半年，培养获满意结果．鉴于在液氮温度下组织代谢几乎停止，因此我们预期，只要温度保持稳定，冻存更长时间是完全可能的．

骨肿瘤实验研究的发展提出了建立骨肿瘤组织库的要求．本文的工作是这方面的初步尝试．尽管各种肿瘤的最佳冻存条件不一定完全相同，本项研究可为建立类似类型的骨肿瘤库提供一些参考资料．

本工作的电子显微镜观察由北京大学生物系郭振泉副教授指导和协助，北京友谊医院罗先正主任协助提供标本，特此一并致谢．

参　考　文　献

[1] Feng Chuan-han (冯传汉) & et al., *Chinese medical Journal*, **94**(1981), 709—717.
[2] 藤原佑三，日本外科宝函，**36**(1967)，803—812。
[3] Ishii, S., *Intern. Orthop.*, **2**(1978), 77—86.
[4] Dietz, A. A., *Anal. Biochem.*, **20**(1967), 246—257.

[5] 张嘉庆等，北京医学院学报，12(1980)，7—9.
[6] Polge, C., *Nature*, 164(1949), 666.
[7] Farrant, J., *Proc. Roy. Soc. Med.*, 69(1976), 559—560.
[8] Lovelock, J. E., *Biochim. et Biophys. Acta*, 10(1953), 414—426.
[9] Meryman, H. T., *Fed. Proc.*, 22(1963), 81—89.
[10] Hauschka, T. S., et al., *Cancer Res.*, 19(1959), 643—653.
[11] Kline, I., et al., *Fed. Proc.*. 24(1965), Suppl. 15, 308—313.
[12] Sugiura, K., *Cancer Res.*, 21(1961), 496—501.