

# 细胞培养技术

## 第一章 细胞培养的基本原理与技术

现代生物技术一般认为包括基因工程技术、细胞工程技术、酶工程技术和发酵工程技术,而这些技术的发展几乎都与细胞培养有密切关系,特别是在医药领域的发展,细胞培养更具有特殊的作用和价值。比如基因工程药物或疫苗在研究生产过程中很多是通过细胞培养来实现的。基因工程乙肝疫苗很多是以 CHO 细胞作为载体;细胞工程中更是离不开细胞培养,杂交瘤单克隆抗体,完全是通过细胞培养来实现的,即使是现在飞速发展的基因工程抗体也离不开细胞培养。正在倍受重视的基因治疗、体细胞治疗也要经过细胞培养过程才能实现,发酵工程和酶工程有的也与细胞培养密切相关。总之,细胞培养在整个生物技术产业的发展中起到了很关键的核心作用。

### 第一节 体外培养的概念

一、基本概念 体外培养(in vitro culture),就是将活体结构成分或活的个体从体内或其寄生体内取出,放在类似于体内生存环境的体外环境中,让其生长和发育的方法。

- 组织培养:是指从生物体内取出活的组织(多指组织块)在体外进行培养的方法。
- 细胞培养:是指将活细胞(尤其是分散的细胞)在体外进行培养的方法。
- 器官培养:是指从生物体内取出的器官(一般是胚胎器官)、器官的一部分或器官原基在体外进行培养的方法。

### 二、体内、外细胞的差异和分化

1、差异:细胞离体后,失去了神经体液的调节和细胞间的相互影响,生活在缺乏动态平衡的相对稳定环境中,日久天长,易发生如下变化:分化现象减弱;形态功能趋于单一化或生存一定时间后衰退死亡;或发生转化获得不死性,变成可无限生长的连续细胞系或恶性细胞系。因此,培养中的细胞可视为一种在特定的条件下的细胞群体,它们既保持着与体内细胞相同的基本结构和功能,也有一些不同于体内细胞的性状。实际上从细胞一旦被置于体外培养后,这种差异就开始发生了。

2、分化:体外培养的细胞分化能力并未完全丧失,只是环境的改变,细胞分化的表现和在体内不同。细胞是否表现分化,关键在于是否存在使细胞分化的条件,如 Friend 细胞(小鼠红白血病细胞)在一定的因素作用下可以合成血红蛋白,血管内皮细胞在类似基膜物质底物上培养时能长成血管状结构,杂交瘤细胞能产生特异的单克隆抗体,这些均属于细胞分化行为。

### 第二节 细胞培养的一般过程

一、准备工作 准备工作对开展细胞培养异常重要,工作量也较大,应给予足够的重视,推备工作中某一环节的疏忽可导致实验失败或无法进行。准备工作的内容包括器皿的清洗、干燥与消毒,培养基与其他试剂的配制、分装及灭菌,无菌室或超净台的清洁与消毒,培养箱及其他仪器的检查与调试。

二、取材 在无菌环境下从机体取出某种组织细胞(视实验目的而定),经过一定的处理(如消化分散细胞、分离等)后接入培养器皿中,这一过程称为取材。如是细胞株的扩大培养则无取材这一过程。机体取出的组织细胞的首次培养称为原代培养。

理论上讲各种动物和人体内的所有组织都可以用于培养,实际上幼体组织(尤其是胚胎组织)比成年个体的组织容易培养,分化程度低的组织比分化高的容易培养,肿瘤组织比正常组织容易培养。取材后应立即处理,尽快培养,

因故不能马上培养时,可将组织块切成黄豆般大的小块,置4℃的培养液中保存。取组织时应严格保持无菌,同时也要避免接触其他的有害物质。取病理组织和皮肤及消化道上皮细胞时容易带菌,为减少污染可用抗菌素处理。

三、培养 将取得的组织细胞接入培养瓶或培养板中的过程称为培养。如系组织块培养,则直接将组织块接入培养器皿底部,几个小时后组织块可贴牢在底部,再加入培养基。如系细胞培养,一般应在接入培养器皿之前进行细胞计数,按要求以一定的量(以每毫升细胞数表示)接入培养器皿并直接加入培养基。细胞进入培养器皿后,立即放入培养箱中,使细胞尽早进入生长状态。

正在培养中的细胞应每隔一定时间观察一次,观察的内容包括细胞是否生长良好,形态是否正常,有无污染,培养基的PH是否太酸或太碱(由酚红指示剂指示),此外对培养温度和CO<sub>2</sub>浓度也要定时检查。

原代培养一般有一段潜伏期(数小时到数十天不等),在潜伏期细胞一般不分裂,但可贴壁和游走。过了潜伏期后细胞进入旺盛的分裂生长期。细胞长满瓶底后要传代培养,将一瓶中的细胞消化悬浮后分至两到三瓶继续培养。每传代一次称为“一代”。二倍体细胞一般只能传几十代,而转化细胞系或细胞株则可无限地传代下去。转化细胞可能具有恶性性质,也可能仅有不死性(Immortality)而无恶性。

四、冻存及复苏(可参阅后面有关章节)为了保存细胞,特别是不易获得的突变型细胞或细胞株,要将细胞冻存。冻存的温度一般用液氮的温度-196℃,将细胞收集至冻存管中加入含保护剂(一般为二甲亚砜或甘油)的培养基,以一定的冷却速度冻存,最终保存于液氮中。在极低的温度下,细胞保存的时间几乎是无限的。复苏一般采用快融方法,即从液氮中取出冻存管后,立即放入37℃水中,使之在一分钟内迅速融解。然后将细胞转入培养器皿中进行培养。

冻存过程中保护剂的选用、细胞密度、降温速度及复苏时温度、融化速度等都对细胞活力有影响。

五、常用仪器设备 无菌室,超净工作台,三重纯水蒸馏器,抽气泵,压力蒸气消毒器,电热恒温培养箱,培养器具,CO<sub>2</sub>培养箱,恒温水浴锅,倒置显微镜,离心机,无菌过滤器,洗刷装置,细胞计数板和电子细胞技术仪等等。

### 第三节 细胞培养的无菌环境

#### 一、无菌室

无菌室的结构:一般由更衣间、缓冲间、操作间三部分组成。

无菌室的消毒和防污染:为保持无菌状态,经常消毒是必要的,通常采用每日(使用前)紫外照射(1-2小时),每周甲醛、乳酸、过氧乙酸熏蒸(2小时)和每月新洁尔灭擦拭地面和墙壁一次的方式进行消毒。实际工作中,要根据无菌室建筑材料的差异来选择合适的消毒方法。

此外,还应注意防止无菌室的污染。造成无菌室污染的可能包括:送入无菌室的风没有被过滤除菌;进出无菌室时,能使外界空气直接对流进无菌室的操作间;等。

#### 二、超净工作台

工作原理:鼓风机驱动空气通过高效过滤器得以净化,净化的空气徐徐吹过台面空间而将其中的尘埃、细菌甚至病毒颗粒带走,使工作区构成无菌环境。根据气流在超净工作台的流动方向不同,可将超净工作台分为侧流式、直

流式和外流式三种类型。

超净台的使用与保养：超净台的平均风速保持在 0.32-0.48 米/秒为宜，过大、过小均不利于保持净化度；使用前最好开启超净台内紫外灯照射 10—30 分钟，然后让超净台预工作 10—15 分钟，以除去臭氧和使用工作台面空间呈净化状态；使用完毕后，要用 70%酒精将台面和台内四周擦拭干净，以保证超净台无菌。还要定期用福尔马林熏蒸超净台。

#### 第四节 常用培养器皿及清洗消毒

细胞培养需要大量消耗性物品，如玻璃器皿、金属器皿、塑料、橡胶制品、布类、纸类等，因此掌握清洗、消毒知识，学会清洗、消毒方法是从事细胞培养工作必须的。

一、清洗 离体条件下，有害物质直接同细胞接触，细胞对任何有害物质十分敏感，极少残留物都可以对细胞产生毒副作用。因此，新的或重新使用的器皿都必须认真清洗，达到不含任何残留物的要求。

（一）玻璃器皿的清洗 一般经过浸泡、刷洗、浸酸、和清洗四个步骤。

1 浸泡 新的或用过的玻璃器皿都要先用清水浸泡，软化和溶解附着物。新玻璃器皿使用前得先用自来水简单刷洗，然后用 5%盐酸浸泡过夜；用过的玻璃器皿往往附有大量蛋白质和油脂，干涸后不易刷洗掉，故用后应立即浸入清水中备刷洗。

2 刷洗 将浸泡后的玻璃器皿放到洗涤剂水中，用软毛刷反复刷洗。不要留死角，并防止破坏器皿表面的光洁度。将刷洗干净的玻璃器皿洗净、晾干，备浸酸。

3 浸酸 浸酸是将上述器皿浸泡到清洁液中，又称酸液，通过酸液的强氧化作用清除器皿表面的可能残留物质。浸酸不应少于六小时，一般过夜或更长。放取器皿要小心。

4 冲洗 刷洗和浸酸后的器皿都必须用水充分冲洗，浸酸后器皿是否冲洗的干净，直接影响到细胞培养的成败。手工洗涤浸酸后的器皿，每件器皿至少要反复“注水—倒空”15 次以上，最后用重蒸水浸洗 2—3 次，晾干或烘干后包装备用。

（二）橡胶制品清洗

新的橡胶制品洗涤方法：0.5mol/L NaOH 煮沸 15 分钟，流水冲洗，0.5mol/L HCl 煮沸 15 分钟，流水冲洗，自来水煮沸 2 次，蒸馏水煮沸 20 分钟，50℃烤干备用。

（三）塑料制品的清洗

塑料制品特点：质软、易出现划痕；耐腐蚀能力强、但不耐热。

清洗程序：使用器皿后立即用清水清洗，浸于自来水过夜，用纱布或棉签和 50℃清洗液刷洗，流水冲洗，晾干，浸于清洁液 15 分钟，流水冲洗（15—20 遍），蒸馏水浸洗三次，双蒸水泡 24 小时，晾干备用。

（四）包装：对细胞培养用品进行消毒前，要进行严密包装，以便于消毒和贮存。常用的包装材料：牛皮纸、硫酸

纸、棉布、铝饭盒、较大培养皿等,近几年用铝箔包装,非常方便,适用。培养皿、注射器、金属器械等用牛皮纸包装后再装入饭盒内,较大的器皿可以进行局部包扎。

## 二、消毒和灭菌 微生物污染是造成细胞培养失败的主要原因

### (一) 物理消毒法

1.紫外线消毒 紫外线是一种低能量的电磁辐射,可杀死多种微生物。革兰阴性菌最为敏感,其次是阳性菌,再次为芽孢,真菌孢子的抵抗力最强。紫外线的直接作用是通过破坏微生物的核酸及蛋白质等而使其灭活,间接作用是通过紫外线照射产生的臭氧杀死微生物。直接照射培养室消毒,用法简单,效果好。

紫外灯的消毒效果同紫外灯的辐射强度和照射剂量呈正相关,辐射强度随灯距离增加而降低,照射剂量和照射时间呈正比。因此紫外灯同被照射物的距离和照射时间要适合。离地面 2 米的 30W 灯可照射 9 平方米房间,每天照射 2—3 小时,期间可间隔 30 分钟。灯管离地面 2 米以外要延长照射时间,2.5 米照射效果较差。紫外灯照射工作台的距离不应超过 1.5 米,照射时间 30 分钟为宜。

紫外灯不仅对皮肤、眼睛伤害,且对培养细胞与试剂等也产生不良影响,因此,不要开着紫外等操作。

2.高温湿热灭菌 压力蒸汽灭菌是最常用的高温湿热灭菌方法。对生物材料有良好的穿透力,能造成蛋白质变性凝固而使微生物死亡。布类、物、璃器皿、属器皿、胶和某些培养液都可以用这方法灭菌。

不同压力蒸汽所达到的温度不同,不同消毒物品所需的有效消毒压力和时间不同。从压力蒸汽消毒器中取出消毒好的物品(不包括液体),应立即放到 60-70℃烤箱内烘干,再贮存备用,否则,潮湿的包装物品表面容易为微生物污染。煮沸消毒也是常用的湿热消毒方法,它具有条件简单、使用方便等特点。

3.高温干热消毒 干热灭菌主要是将电热烤箱内物品加热到 160℃以上,并保持 90—120 分钟,杀死细菌和芽孢,达到灭菌目的。主要用于灭菌玻璃器皿(如体积较大的烧杯、培养瓶)、金属器皿以及不能与蒸汽接触的物品(如粉剂、油剂)。

干热灭菌后要关掉开关并使物品逐渐冷却后在打开,切忌立即打开,以免温度骤变而使箱内的玻璃器皿破裂。干烤箱内物品间要有空隙,物品不要靠近加热装置。

烧灼也是灭菌方法之一,常利用台面上的酒精灯的火焰对金属器皿及玻璃器皿口缘进行烧灼消毒。

4.过滤除菌:是将液体或气体用微孔薄膜过滤,使大于孔径的细菌等微生物颗粒阻留,从而达到除菌目的。在体外培养时,过滤除菌大多用于遇热容易变性而失效的试剂或培养液。目前,大多实验室采用微孔滤膜滤器除菌。关键步骤是安装滤膜及无菌过滤过程。

(二) 化学消毒:新洁而灭,其 0.1%水溶液可对器械、皮肤、操作表面进行擦拭和浸泡消毒。

(三) 抗生素消毒:抗生素主要用于消毒培养液,是培养过程中预防微生物污染的重要手段,也是微生物污染不严重时的“急救”方法。不同抗生素杀灭微生物不同,应根据需要选择。

可用于细胞培养的消毒灭菌方法很多,但每种方法都有一定的适应范围。如常用的过滤除菌系统、紫外照射、电子

杀菌灯、乳酸、甲醛熏蒸等手段消毒实验室空气；多用新洁而灭消毒实验室地面；常用干热、湿热消毒剂浸泡、紫外照射等方法消毒培养用器皿；采用高压蒸汽灭菌或过滤除菌方法消毒培养液。

## 第二章 细胞培养液

现代生物技术均通过细胞作为载体来进行，无论是基因治疗、干细胞、克隆技术都在细胞内进行的。细胞的生长需要一定的营养环境，用于维持细胞生长的营养基质称为培养基，即指所有用于各种目的的体外培养、保存细胞用的物质，就其本意上讲为人工模拟体内生长的营养环境，使细胞在此环境中具有生长和繁殖的能力。它是提供细胞营养和促进细胞生长增殖的物质基础。细胞培养基其组成成分主要有：水、氨基酸、维生素、碳水化合物、无机离子及其他一些核酸降解物、激素等。

随着动物细胞大规模培养技术的迅速发展，作为细胞培养领域中最基本的原料—细胞培养基的用量也迅速增加，被广泛应用于细胞生物学科和医学研究的各个领域，如疫苗生产（人用疫苗如乙脑、狂犬、甲肝、乙肝、出血热、麻疹等，兽用疫苗如口蹄、马立克、伪狂犬等），基因药物生产（如 EPO、TPA 等），临床用单抗（如抗人肝癌单抗、抗人肺单抗、WT3）等。

### 第一节 水与平衡盐溶液

1.培养用水 体外培养的细胞对水质特别敏感，对水的纯度要求较高。培养用水中如果含有一些杂质，即使含量极微，有时也会影响细胞的存活和生长，甚至导致细胞死亡。用金属蒸馏器制备的蒸馏水，可能会含有某些金属离子，一般不作为培养用水。配制培养用液应使用经石英玻璃蒸馏器三次蒸馏的三蒸水或超纯水净化装置制备的超纯水。最好用龙头瓶贮存，存放时间一般不应超过 2 周。

2.缓冲溶液、生理盐水、平衡盐溶液：稍后介绍。

### 第二节 细胞培养基的基本要求

体外培养的细胞直接生活在培养基中，因此培养基应能满足细胞对营养成分、促生长因子、激素、渗透压、pH 等诸多方面的要求。

一、营养成分 维持细胞生长的营养条件一般包括以下几个方面：

1 氨基酸：是细胞合成蛋白质的原料。所有细胞都需要 12 种必须氨基酸：缬氨酸、亮、异亮、苏、赖、色、苯丙、蛋、组、酪、精氨酸、胱氨酸。此外还需要谷氨酰胺，它在细胞代谢过程中有重要作用，所含的氮是核酸中嘌呤和嘧啶合成的来源，同样也是合成三、二、一磷酸核苷所需要的基本物质。

体外培养的各种培养基内都含有必需氨基酸。

2 单糖：培养中的细胞可以进行有氧与无氧酵解，六碳糖是主要能源。此外六碳糖也是合成某些氨基酸、脂肪、核酸的原料。细胞对葡萄糖的吸收能力最高，半乳糖最低。

体外培养动物细胞时，几乎所有的培养基或培养液中都以葡萄糖作为必含的能源物质。

3 维生素：主要扮演辅酶、辅基的角色，必不可少。生物素、叶酸、烟酰胺、泛酸、吡哆醇、核黄素、硫胺素、维生素 B12 都是培养基常有的成分。



4 无机离子与微量元素: 细胞生长除需要钠、钾、钙、镁、氮和磷等基本元素, 还需要微量元素, 如铁、锌、硒、铜、锰、钼、钒等。

二、促生长因子及激素 已证实: 各种激素、生长因子对于维持细胞的功能、保持细胞的状态(分化或未分化)具有十分重要的作用。有些激素对许多细胞生长有促生长作用, 如胰岛素, 它能促进细胞利用葡萄糖和氨基酸。有些激素对某一类细胞有明显促进作用, 如氢化可的松可促进表皮细胞的生长, 泌乳素有促进乳腺上皮细胞生长作用等。

三、渗透压 细胞必须生活在等渗环境中, 大多数培养细胞对渗透压有一定耐受性。人血浆渗透压 290mOsm/kg, 可视为培养人体细胞的理想渗透压。鼠细胞渗透压在 320mOsm/kg 左右。对于大多数哺乳动物细胞, 渗透压在 260—320mOsm/kg 的范围都适宜。

四、pH 气体也是细胞生存的必需条件之一, 所需气体主要是氧和二氧化碳。氧参与三羧酸循环, 产生能量供给细胞生长、增殖和合成各种成分。一些细胞在缺氧情况下, 借糖酵解也可获取能量, 但多数细胞缺氧不能生存。在开放培养时, 一般置细胞于 95% 空气加 5% 二氧化碳的混合气体环境中培养。二氧化碳既是细胞代谢产物, 也是细胞所需成分, 它主要与维持培养基的 pH 有直接关系。动物细胞大多数需要轻微的碱性条件, pH 值约在 7.2~7.4。在细胞生长过程中, 随细胞数量的增多和代谢活动的加强, 二氧化碳不断被释放, 培养液变酸, pH 值发生变化。由于  $\text{NaHCO}_3$  容易分解为二氧化碳, 很不稳定, 致使缓冲系统难以精确地控制。故这一缓冲系统适合密闭培养。HEPES 结合碳酸氢钠使用, 可提供更有效的缓冲体系, 主要是防止 pH 值迅速变动, 但最大缺点是在开放培养或观察时难以维持正常的 pH 值。造成 pH 波动主要是代谢产生的  $\text{CO}_2$ , 在封闭式培养过程中  $\text{CO}_2$  与水结合产生碳酸, 培养基 pH 很快下降。为解决这一问题, 合成培养基中使用了  $\text{NaHCO}_3\text{-CO}_2$  缓冲系统, 并采用开放培养, 使细胞代谢产生的  $\text{CO}_2$  及时溢出培养瓶, 再通过稳定调节温箱中  $\text{CO}_2$  浓度 (5%), 与培养基中的  $\text{NaHCO}_3$  处于平衡状态。

五、无毒、无污染 体外生长的细胞对微生物及一些有害有毒物质没有抵抗能力, 因此培养基应达到无化学物质污染、无微生物污染(如细菌、真菌、支原体、病毒等)、无其他对细胞产生损伤作用的生物活性物质污染(如抗体、补体)。对于天然培养基, 污染主要来源于取材过程及生物材料本身, 应当严格选材, 严格操作。对于合成培养基, 污染主要来源于配制过程, 配制所用的水, 器皿应十分洁净, 配制后应严格过滤除菌。

### 第三节 天然细胞培养基

天然培养基是指来自动物体液或利用组织分离提取的一类培养基, 如血浆、血清、淋巴液、鸡胚浸出液等。组织培养技术建立早期, 体外培养细胞都是利用天然培养基。但是由于天然培养基制作过程复杂、批间差异大, 因此逐渐为合成培养基所替代。目前广泛使用的天然培养基是血清, 另外各种组织提取液、促进细胞贴壁的胶原类物质在培养某些特殊细胞也是必不可少。

一、血清(serum)细胞培养的发展, 培养基的质量又是关键, 而培养基的主要成份中动物血清对细胞的生长繁殖发挥着重要甚至是难以替代的作用。在动物血清的应用中牛血清又是最为广泛的, 所以血清是医药生物技术产品中重要的原材料之一。保证血清质量也是促进生物制品质量提高的重要环节。

1. 血清种类: 目前用于组织培养的血清主要是牛血清, 培养某些特殊细胞也用人血清、马血清等。选择用牛血清培养细胞的原因: 来源充足、制备技术成熟、经过长时间的应用考验人们对其有比较深入的理解。牛血清对绝大多数哺乳动物细胞都是适合的, 但并不排除在培养某种细胞时使用其他动物血清更合适。

牛血清是细胞培养中用量最大的天然培养基, 含有丰富的细胞生长必须的营养成份, 具有极为重要的功能。牛血清

分为**小牛血清、新生血清、胎牛血清**。胎牛血清应取自剖腹产的胎牛；新生血清取自出生 24 小时之内的新生牛；小牛血清取自出生 10—30 天的小牛。显然，胎牛血清是品质最高的，因为胎牛还未接触外界，血清中所含的抗体、补体等对细胞有害的成分最少。

2.血清的主要成分:血清是由血浆去除纤维蛋白而形成的一种很复杂的混合物，其组成成份虽大部分已知，但还有一部分尚不清楚，且血清组成及含量常随供血动物的性别、年龄、生理条件和营养条件不同而异。血清中含有各种血浆蛋白、多肽、脂肪、碳水化合物、生长因子、激素、无机物等，这些物质对促进细胞生长或抑制生长活性是达到生理平衡的。对血清的成分和作用的研究虽有很大进展，但仍存在一些问题。主要是：

第一、血清的成份可能有几百种之多，目前对其准确的成份、含量及其作用机制仍不清楚，尤其是对其中一些多肽类生长因子、激素和脂类等尚未充分认识，这给研究工作带来许多困难；

第二，血清都是批量生产，各批量之间差异很大，而且血清保存期至多一年，因此，要保证每批血清的相似性极为困难，从而使实验的标准化和连续性受到限制；

第三，不能排除血清中含有易变物质，这被认为是“瓶中恶化”的原因之一。

3.血清主要作用：

- 提供基本营养物质：氨基酸、维生素、无机物、脂类物质、核酸衍生物等，是细胞生长必须的物质。
- 提供激素和各种生长因子：胰岛素、肾上腺皮质激素（氢化可的松、地塞米松）、类固醇激素（雌二醇、睾酮、孕酮）等。生长因子如成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、血小板生长因子等。
- 提供结合蛋白：结合蛋白作用是携带重要地低分子量物质，如白蛋白携带维生素、脂肪、以及激素等，转铁蛋白携带铁。结合蛋白在细胞代谢过程中起重要作用。
- 提供促接触和伸展因子使细胞贴壁免受机械损伤。
- 对培养中的细胞起到某些保护作用：有一些细胞，如内皮细胞、骨髓样细胞可以释放蛋白酶，**血清中含有抗蛋白酶成分**，起到中和作用。这种作用是偶然发现的，**现在则有目的的使用血清来终止胰蛋白酶的消化作用**。因为胰蛋白酶已经被广泛用于贴壁细胞的消化传代。血清蛋白形成了血清的粘度，可以保护细胞免受机械损伤，特别是在悬浮培养搅拌时，粘度起到重要作用。血清还含有一些微量元素和离子，他们在代谢解毒中起重要作用，如  $\text{SeO}_3$ 、硒等。

4.细胞培养中使用血清的缺点

血清成分复杂，虽含许多对细胞有利成分，也含有对细胞有害的成分，使血清有几个明显的缺点：

- 对大多数细胞，在体内状态，血清不是它们接触的生理学液体，只是在损伤愈合以及血液凝固过程中才接触血清，因此使用血清有可能改变某种细胞在体内的正常状态，血清可能促进某些细胞的生长（成纤维细胞）同时抑制另一类细胞生长（表皮细胞）。
- 血清含一些对细胞产生毒性的物质，如多胺氧化酶，能与来自高度繁殖细胞的多胺反应（如精胺、亚精胺）形成有细胞毒性作用的聚精胺。补体、抗体、细菌毒素等都会影响细胞生长，甚至造成细胞死亡。
- 动物个体不同，血清产地、批号不同，每批质量差异甚大，其成分不能保持一致。
- 取材中可能带入支原体、病毒，对细胞产生潜在影响，可能导致实验失败或实验结果不可靠性。
- 血清的使用使得实验和生产的标准化困难，其中的蛋白质使得某些转基因蛋白生物药品生产中的分离纯化工作很难完成。
- 大规模生产中，血清来源越来越困难，价格昂贵，是构成动物细胞培养对生产成本的主要部分之一。

5.血清的质量标准:血清质量高低取决于两方面因素:一是取材对象,二是取材过程。用于取材的动物应健康无病并且在指定的出生天数之内,取材过程应严格按照操作规程执行,制备出的血清要经过严格的质量鉴定。WHO 公布的《用动物细胞体外培养生产生物制品规程》中的要求:

▲牛血清必须来自有文件证明无牛海绵状脑病的牛群或国家。并应具备适当的监测系统。

▲有些国家还要求牛血清来自未用过反刍动物蛋白饲料的牛群。

▲证明所用牛血清中不含对所生产疫苗病毒的抑制物。

▲血清要通过滤膜过滤除菌,保证无菌。

▲无细菌、霉菌、支原体和病毒的污染,有些国家要求无细菌噬菌体污染。

▲对细胞有良好的支持繁殖作用。

我国在对牛血清的质量 2000 年版《中国生物制品主要原辅料质控标准》中提出比较严格的标准要求。包括蛋白质含量,细菌、真菌、支原体、牛病毒、大肠杆菌噬菌体、细菌内毒素,支持细胞增殖检查。

血清质量的鉴定一般包括以下几个方面:

●理化性质:如渗透压、pH 值、蛋白电泳图谱、蛋白含量、激素水平、内毒素等。蛋白含量包括血清总蛋白含量(不低于 35-45g/L)、球蛋白含量(应小于 20g/L)、血红蛋白含量等。其中球蛋白含量是一项非常重要的指标,血清中球蛋白主要是抗体,球蛋白含量越低血清质量越高。血红蛋白也是越低越好。

●微生物检测:包括细菌、真菌、支原体、病毒等。特别是对支原体、病毒的检测,支原体是一种很小的微生物,可通过孔径 22μ 的滤膜。支原体、病毒污染在光学显微镜下难于察觉,细胞也能生长繁殖,但会影响实验结果。检测支原体的方法很多,如培养法、PCR 法、荧光染色法、电镜观察法等。

●促生长效果:这是血清重要的特性之一,应当以培养的细胞来检测。有两种方法:克隆形成率、贴瓶率测定法和连续传代培养法。

(1)克隆形成率测定:一般以悬浮生长的细胞为培养对象,按有限稀释法做克隆化培养,将不同批号的血清配制成不同浓度的培养基,细胞也稀释成不同浓度,接种到 96 孔板,每孔 200μl,培养一定时间,统计有克隆生长的孔,计算出百分比,再与对照的标准血清相比较,就可看出不同批号血清间的区别。比较低的浓度,更能观察出血清质量间的细微差别。

(2)贴瓶率测定:是以贴壁细胞为培养对象,将细胞稀释至低密度,接种至平皿,每皿 200 或 100 个细胞,以不同浓度的血清培养基培养,培养一定时间后弃培养基,染色后统计集落数,计算出集落数占接种细胞数的百分比,同样再与标准血清比较,判断血清质量高低。

(3)连续传代培养法:是将细胞培养于 3 个一定体积的培养瓶中,待测血清配制为 5%浓度,一般于第七天收集细胞,计数,取平均值,中间可以更换一次培养基。连续测试三个周期以上,观察细胞生长状况,并将每次的计数结果与标准血清的测试结果比较。

●对于使用者,判断血清质量先从外观入手。好的血清应该是透明清亮,土黄色或棕黄色,无沉淀或极少沉淀,比较粘稠。如发现血清浑浊、不透明、含许多沉淀物,说明血清污染或血清中的蛋白质变性;若血清呈棕红色,说明血清中的血红蛋白含量太高,取材时有溶血现象;如果摇晃时感觉液体稀薄,说明血清中掺入的生理盐水太多。如果要进一步了解血清的质量,则应连续培养某些细胞,观察细胞生长状况。

6.血清的使用与储存:正确的使用及保存血清,才能使血清发挥应有的作用。



●使用前处理：大部分血清在使用前必须灭活处理，即 56℃30 分钟。灭活的目的是去除血清中的补体成分，避免补体对细胞产生毒性作用。血清经过灭活也会损失一些对细胞有利的成分，如生长因子，因此也有人提出血清不经灭活直接用于培养，这样做的前提是确认血清中不含补体成分。对于一些品质高的胎牛血清和新牛血清可以考虑不经灭活直接用于细胞培养。

●储存条件：血清一般储存于-20℃，同时应避免反复冻融。购买大包装的血清后，首先要灭活处理，然后分装成小包装，储存于-20℃，使用前融化。融化时最好现置于 4℃。融化后的血清在 4℃不宜长时间存放，应尽快使用。

●使用浓度：自从有了合成培养基，血清就是作为一种添加成分与合成培养基混合使用，使用浓度一般为 5—20%，最常用是 10%。过多血清容易使培养中的细胞发生变化，特别是一些二倍体的无限细胞系，迅速生长之后容易发生恶性转化。

●采购血清时，最好先从供应商处索取样品进行试验，选定一批后就要保留足够使用 6 个月至 1 年的量，直至用另一批经过预先试验的样品代替。

## 二、胚胎浸出液

胚胎浸出液(embryonic extract)是早期动物细胞培养中应用的天然培养基，现已很少使用。

三、水解乳蛋白 水解乳蛋白(lactalbumin hydrolysate)为乳白蛋白经蛋白酶和肽酶水解的产物，含有丰富的氨基酸，是常用的天然培养基，可用于许多细胞和原代细胞的培养。

## 第四节 合成细胞培养基

合成培养基是根据天然培养基的成分，用化学物质模拟合成、人工设计、配制的培养基。它有一定的配方，是一种理想的培养基。目前合成培养基多达 10 多种，有的培养基仍在不断进行改良。早期组织培养是利用天然培养基，目前合成培养基已经成为一种标准化的商品，从最初的基本培养基发展到无血清培养基、无蛋白培养基，并且还在不断发展。合成培养基的出现极大的促进了组织培养技术的普及发展。

一、基本组分 基本培养基包括四大类物质：无机盐、氨基酸、维生素、碳水化合物。

●无机盐：CaCl<sub>2</sub> KCl MgSO<sub>4</sub> NaCl NaHCO<sub>3</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。对调节细胞渗透压、某些酶的活性以及溶液的酸碱度都是必须的。

●氨基酸：缬氨酸、亮、异亮、苏、赖、色、苯丙、蛋、组、酪、精氨酸、胱氨酸(L 型)。它们都是细胞用以合成蛋白质的必需原料，不能由其他氨基酸或糖类转化合成。除此之外，还需要谷氨酰胺(glutamine)。谷氨酰胺具有特殊的作用，对细胞的培养特别重要，能促进各种氨基酸进入细胞膜；它所含的氮是核酸中嘌呤和嘧啶的来源，还是合成一磷酸腺苷、二磷酸腺苷和三磷酸腺苷的原料。细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质，谷氨酰胺缺乏可导致细胞生长不良甚至死亡。在配制各种培养液中都应补加一定量的谷氨酰胺。值得注意的是：谷氨酰胺在溶液中很不稳定，故 4℃下放置 1 周可分解 50%，使用中最好单独配制，置-20℃冰箱中保存，用前加入培养液中。

●维生素：是维持细胞生长的一种生物活性物质，在细胞中大多形成酶的辅基或辅酶，对细胞代谢有重大影响。脂溶性维生素(A、D、E、K)常从血清中得到补充。水溶性维生素包括牛磺素、叶酸、烟酰胺、泛酸、吡哆醇、核黄素、硫胺素和 B12。维生素 C 也是不可缺少的，对具有合成胶原能力的细胞更为重要。

●**碳水化合物**：是细胞生命的能量来源，有的是合成蛋白质和核酸的成分。主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖和丙酮酸钠等。体外培养动物细胞时，几乎所有培养基或培养液中都以葡萄糖作为必含的能源物质。

●**葡萄糖和谷氨酰胺的合理使用**：乳酸是葡萄糖不完全氧化的产物。研究表明，体外培养条件下 95% 的葡萄糖转变为乳酸，这降低了营养物质的代谢效率，降低培养基 pH 值，增加渗透压。在氧气供给不足的情况下，NADH 转运系统苹果酸-天冬氨酸穿梭系统活性低而不能将糖酵解产生的 NADH 氧化磷酸化为 NAD<sup>+</sup>，细胞只得以降低能量需求的方式如激活乳酸脱氢酶将糖酵解产生的丙酮酸与 NADH 反应生产乳酸和 NAD<sup>+</sup>，从而保证了糖酵解的顺利进行。另一个可能的解释是连接糖酵解与 TCA 循环的特异性酶如丙酮酸脱氢酶复合物、磷酸丙酮酸羧化酶激酶和丙酮酸羧化酶活性低下，直接导致糖酵解与 TCA 循环的失衡。因此体外培养条件下，葡萄糖主要经糖酵解降解，产生过量的乳酸。减少乳酸生产最常用的方法是限制培养基中葡萄糖的含量，但葡萄糖含量过低可造成细胞营养供应不足，细胞生长抑制。该方法需要对葡萄糖的消耗与需求、乳酸的生产速率以及目的蛋白的表达量等参数进行综合考虑方可应用。

在目前常用的培养基中，葡萄糖和谷氨酰胺是体外培养动物细胞的主要能源，其能量代谢通路与体内完全不同，表现为葡萄糖主要经糖酵解途径为细胞提供能量，谷氨酰胺大部分通过不完全氧化途径，另一小部分通过完全氧化为细胞供能。因此，适当的调整细胞内的代谢途径，使之能促进细胞的快速生长和产物合成，同时减少代谢抑制物的生成是行之有效的一种策略。

许多动物细胞如 CHO、BHK 和杂交瘤细胞对营养物质葡萄糖和谷氨酰胺的消耗利用很快。然而对于细胞生长而言，二者的快速利用并非细胞必需；相反相当一部分转化为代谢废物乳酸和氨，以及一些非必需氨基酸如丙氨酸，脯氨酸。其中，乳酸和氨是两种主要代谢废物，其积累可影响细胞生长以及产品质量。减少这两种代谢产物的积累，是大规模细胞培养技术研究的重要方向。

氨是由谷氨酰胺和天冬酰胺产生的。限制培养基中谷氨酰胺的含量亦是减少氨生成的常用方法。

●除了以上与细胞生长有关的物质以外，培养基中一般还要加入酚红（当溶液酸性时 pH 小于 6.8 呈黄色；当溶液碱性时 pH 大于 8.4 呈红色），一种 pH 指示剂。

●在较为复杂的培养液中还包括核酸降解物(如嘌呤和嘧啶两类)以及氧化还原剂(如谷胱甘肽)等。有的培养液还直接采用了三磷酸腺苷和辅酶 A。

## 二、常用细胞培养基

- (1).MEM 细胞培养基系列（参看本网站-产品展示）
- (2).DMEM 细胞培养基系列（参看本网站-产品展示）
- (3).RPMI-1640 细胞培养基系列（参看本网站-产品展示）
- (4).199 细胞培养基系列（参看本网站-产品展示）
- (5).水解乳蛋白细胞培养基（参看本网站-产品展示）
- (6).欧氏平衡盐（参看本网站-产品展示）
- (7).F-10,F-12 细胞培养基系列（参看本网站-产品展示）
- (8).其它类型细胞培养基

## 三、干粉培养基的配制

配制培养基要注意以下问题：

- 认真阅读说明书。说明书都注明干粉不包含的成分, 常见的有  $\text{NaHCO}_3$ 、谷氨酰胺、丙酮酸钠、HEPES 等。这些成分有些是必须添加的, 如  $\text{NaHCO}_3$ 、谷氨酰胺, 有些根据实验需要决定。
- 配制是要保证充分溶解,  $\text{NaHCO}_3$ 、谷氨酰胺等物质都要等培养基完全溶解之后才能添加。
- 配制所用的水应是三蒸水, 离子浓度很低。
- 所用器皿应严格消毒。
- 配制好的培养基应马上过滤, 无菌保存于 4 度。
- 液体培养基主要是为了科研工作的方便而设计的培养基, 它是一种灭菌后保证无菌的溶液, 必要时可制成无内毒素等的溶液, 可节省科研人员的工作量。

#### 配制方法

- 在一个尽可能接近总体积的容器中加入比预期培养基总体积少 5% 的双蒸水。
- 在室温 (20℃ 到 30℃) 的水中加入干粉培养基, 轻轻搅拌, 不要加热。
- 水洗包装袋的内部, 转移全部的痕量干粉到容器内。
- 加  $\text{NaHCO}_3$  到培养基中。
- 用双蒸水稀释到想要的体积, 搅拌溶解。注意不要过分搅拌。
- 通过缓慢搅拌加入 1N NaOH 或 1N HCL 调节 pH 值, 由于 pH 值在过滤时会上升 0.1 到 0.3, 因而调节 pH 值使它比最终想要的 pH 值低 0.2 到 0.3。培养基在过滤前要保持密封。

#### 第五节 无血清技术及其培养基

经历了天然培养基、合成培养基后, 无血清培养基和无血清培养成为当今细胞培养领域的一大趋势。采用无血清培养可降低生产成本, 简化分离纯化步骤, 避免病毒污染造成的危害。

无血清培养基(**serum free medium, SFM**)是不需要添加血清就可以维持细胞在体外较长时间生长繁殖的合成培养基。但是它们可能包含个别蛋白或大量蛋白组分。虽然基础培养基加少量血清所配制的完全培养基可以满足大部分细胞培养的要求, 但对有些实验却不适合, 如观察一种生长因子对某种细胞的作用, 这时需要排除其他生长因子的干扰作用。而血清中可能含有各种生长因子; 又如需要测定某种细胞在培养过程中分泌某种物质 (抗体、生长因子) 的能力; 或者要大规模的培养某种细胞, 以获得它们的分泌产物。因此研制出无血清培养基一直是生物科学工作者努力的目标。上海恒利安生物科技有限公司已成功开发了商业化的多种无血清培养基, 可满足众多厂商的需求。

##### 一、无血清培养基的基本配方 基本成分为基础培养基及添加组分两大部分。

用于生物制药和疫苗生产的细胞在体外培养时, 多数呈贴壁生长或兼性贴壁生长; 而当其在无血清、无蛋白培养基中生长时, 由于缺乏血清中的各种粘附贴壁因子如纤粘连蛋白、层粘连蛋白、胶原、玻表粘连蛋白, 细胞往往以悬浮形式生长。

添加组分包括以下几大类物质:

(1) 促贴壁物质: 许多细胞必须贴壁才能生长, 这种情况下无血清培养基中一定要添加促贴壁和扩展因子, 一般为细胞外基质, 如纤连蛋白、层粘连蛋白等。它们还是重要的分裂素以及维持正常细胞功能的分化因子, 对许多细胞的繁殖和分化, 起着重要作用。纤连蛋白主要促进来自中胚层细胞的贴壁与分化, 这些细胞包括成纤维细胞、肉瘤细胞、粒细胞、肾上皮细胞、肾上腺皮质细胞、CHO 细胞、成肌细胞等。

(2) 促生长因子及激素: 针对不同细胞添加不同的生长因子。激素也是刺激细胞生长、维持细胞功能的重要物质,

有些激素是许多细胞必不可少的, 如胰岛素。

(3) 酶抑制剂: 培养贴壁生长的细胞, 需要用胰酶消化传代, 在无血清培养基中必不可少须含酶抑制剂, 以终止酶的消化作用, 达到保护细胞的目的。最常用的是大豆胰酶; 抑制剂。

(4) 结合蛋白和转运蛋白: 常见如转铁蛋白和牛血清白蛋白。牛血清白蛋白的添加比较大, 可增加培养基的粘度, 保护细胞免受机械损伤。许多旋转式培养的无血清培养基都含有牛血清白蛋白。

(5) 微量元素: 硒是最常见的。

二、使用方法 目前, 血清仍是动物细胞培养中最基本的添加物, 尤其是在原代培养或者细胞生长状况不良时, 常常会先使用有血清的培养液进行培养, 待细胞生长旺盛以后, 再换成无血清培养液。细胞转入无血清培养基培养要有一个适应过程, 一般要逐步降低血清浓度, 从 10% 减少到 5%, 3%, 1%, 直至无血清培养。在降低过程中要注意观察细胞形态是否发生变化, 是否有部分细胞死亡, 存活细胞是否还保持原有的功能和生物学特性等。在实验后这些细胞一般不再继续保留, 很少有细胞能够长期培养于无血清培养基而不发生改变的。细胞转入无血清培养之前, 要留有种子细胞, 种子细胞按常规培养于含血清的培养基中, 以保证细胞的特性不发生变化。

为了使细胞适应无血清培养, 关键的是使所培养细胞:

- 处于对数生长中期
- >90% 活细胞率
- 适应时以较高的起始细胞接种

有两种方法使细胞适应无血清培养基 (SFM):

1. 直接适应——细胞从添加血清的培养基转换到无血清培养基 (SFM) 中。

一些类型细胞可直接从包含血清的培养基适应无血清培养基。对于直接适应, 接种细胞密度应该:  $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$  细胞/ml。当细胞密度达到  $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  细胞/ml 时, 传代培养细胞。当细胞密度在培养 4 到 7 天后达到  $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  细胞/ml 时, 细胞完全适应了无血清培养基。每隔 3~5 天, 当细胞密度达到  $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  细胞/ml, 细胞活率在 90% 时, 贮备的适应了无血清培养基的细胞培养物应该再次传代培养。

2. 连续适应——分好几步把细胞从添加血清的培养基转换到无血清培养基 (SFM) 中, 与直接适应相比较, 连续适应趋向对于细胞更加温和一些。

- 以 2 倍正常接种密度接种生长活跃的细胞培养物到 75% 有血清培养基: 25% SFM 混合培养基中, 传代培养。
- 当细胞密度  $> 5 \times 10^5$  细胞/ml 时, 以  $2 \times 10^5$  到  $3 \times 10^5$  细胞/ml 细胞密度, 在有血清培养基: SFM 为 50 : 50 的混合培养基中传代培养。
- 以  $2 \times 10^6$  到  $3 \times 10^6$  细胞/ml 细胞密度, 25% 有血清培养基和 75% SFM 中传代培养。
- 当细胞密度达到  $1 \times 10^6$  到  $3 \times 10^6$  细胞/ml (接种后 4 到 6 天), 在 100% SFM 培养基中传代培养。
- 每隔 3 到 5 天, 当细胞密度达到  $1 \times 10^6$  到  $3 \times 10^6$  细胞/ml, 细胞活率在 90% 时, 贮备的适应了无血清培养基的细胞培养物应该再次传代培养。

建议备份前一次混合培养的培养物, 直到每一次细胞适应了新的混合培养基。每一次减少血清前, 可能需要在 SFM/ 有血清混合培养基中进行几次传代。

在适应过程中, 最好不要让细胞生长过度。这将增加选择亚群的可能性。需要注意, 与有血清培养基相比, 大部分



SFM 包含非常少的蛋白质, 因而更易于受外界因素的影响。

细胞培养适应替代血清: 许多细胞利用连续适应方法能很好的适应, 用包含 FBS 的培养基和包含有替代血清的培养基 1:1 (v:v) 的混合培养基培养细胞。通过下列的混合培养基的方式, 连续几代减少当前培养基的量: 1:2, 1:4, 1:16 和 100% 替代培养基。每次适应改变血清比例时, 传代细胞 2 到 3 次。

培养可以直接从 FBS 转换到替代血清。一开始就使用相同于 FBS 的浓度的替代物或血清, 生长的延迟可能会发生, 4 允许进行 2 到 3 次的传代, 使生长率恢复到以前的水平。

特别需要强调的是: 配制无血清培养液必须使用高质量的水, 如石英玻璃蒸馏器经三次蒸馏或超纯水净化装置制备的水。因为无血清培养基缺乏了血清中天然成分中和毒素、保护细胞的大分子, 即便水中的有毒物质含量甚微, 也可能对细胞产生致死性损害。这是无血清培养能否成功的关键因素之一。

### 三、使用无血清培养基的优点

- 增加确定性
- 性能更加一致
- 容易进行纯化和下游加工
- 细胞功能的精确评估
- 增强生长和/或产量
- 生理反应性的较好对照
- 增强细胞内中介物的检测

## 第六节 无蛋白培养基与限定化学成分培养基

一、无蛋白培养基 (protein free medium, PFM) 即不含有动物蛋白的培养基。无血清培养基仍含有较多的动物蛋白, 如胰岛素, 转铁蛋白、牛血清白蛋白等。从生物技术发展的趋势来看, 不含动物蛋白的培养基又广泛的应用前景, 许多利用基因工程技术重组的蛋白质最终要应用于人体, 如果再生长过程中使用了含有动物蛋白质的培养基, 纯化过程就比较复杂, 最终要达到一定的质量标准也有一定的难度。无蛋白培养基就是为了适应这发展趋势而出现的, 许多无蛋白培养基添加了植物水解物以替代动物激素、生长因子的作用。市场上已有适合多种细胞生长的无蛋白培养基。

二、限定化学成分培养基 (chemical defined medium, CDM) 是指培养基中的素有成分都是明确的, 它同样不含有动物蛋白, 同样也不是添加了植物水解物, 而是使用了一些已知结构与功能的小分子化合物, 如短肽、植物激素等。这种培养基更有利于分析细胞的分泌产物。目前已经有适合于 293 细胞、CHO 细胞、杂交瘤细胞生长的 CDM 问世, 上海恒利安生物科技有限公司生产的水解乳蛋白培养基就属于 CDM。

## 第七节 其他细胞培养用液

在细胞培养过程中, 除了培养基外, 还经常用到一些平衡盐溶液、消化液、pH 调整液等。

一、平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS) 主要是由无机盐、葡萄糖组成, 它的作用是维持细胞渗透压平衡, 保持 pH 稳定及提供简单的营养。主要用于取材时组织块的漂洗、细胞的漂洗、配制其他试剂等。最简单的 BSS 是 Ringer。D-Hank's 与 Hank's 的一个主要区别是前者不含有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ , 因此 D-Hank's 常用于配制胰酶溶液。Earle 平衡液含有较高的  $\text{NaHCO}_3$  (2.2g/L), 适合于 5%  $\text{CO}_2$  的培养条件, Hank's 平衡液仅含有 0.35g/L  $\text{NaHCO}_3$ , 不能用于

5%CO<sub>2</sub> 的环境, 若放入 CO<sub>2</sub> 培养相, 溶液将迅速变酸, 使用时应注意。

配制溶液应使用双蒸水或去离子水。如果配方中含有 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>, 应当首先溶解这些成分。配好的平衡盐溶液可以过滤除菌或高温灭菌。

二、消化液 取材进行原代培养时常常需要将组织块消化解离形成细胞悬液, 传代培养时也需要将贴壁细胞从瓶壁上消化下来, 常用的消化液有胰酶 (Trypsin) 溶液和 EDTA 溶液, 有时也用胶原酶 (collagenase) 溶液。

1.胰酶溶液: 胰酶活性可用消化酪蛋白的能力表示, 常见有 1: 125 和 1: 250, 即一份胰酶可消化 125 或 250 份酪蛋白。组织培养用胰酶溶液一般配制成 0.1-0.25%浓度, 配制时要用不含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>及血清的平衡盐溶液 (如前面的 D-Hank's), 因为这些物质会对胰酶产生抑制作用。胰酶作用及溶解的最佳 pH 是 8-9, 配制胰酶溶液应将液体调至 pH8 左右, 充分溶解, 过滤除菌。过滤后可以再调只 pH7.5, 也可不调。

使用细胞清洗液配制胰酶消化液: 含 0.5%胰酶的细胞清洗液 (100ml 细胞清洗液加 0.5g 胰酶), 过滤除菌, 分装于 4 度保存。

2.EDTA 溶液: EDTA 溶液也常用来解离细胞, 它的作用机制是破坏细胞间的连接。对于一些贴壁特别牢固的细胞, 还可以用 EDTA 和胰酶的混合液进行消化。EDTA 溶液的使用浓度为 0.02%, 配制时应加碱助溶, 配制后可过滤除菌, 也可高温消毒灭菌。

3.胶原酶溶液: 胶原酶在上皮类细胞原代培养时经常使用, 胶原酶作用的对象是胶原组织, 因此不容易对细胞产生损伤。胶原酶的使用浓度为 0.1-0.3mg/L 或 200000U/L, 作用的最佳 pH 为 6.5。胶原酶不受 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>及血清的抑制, 配制时可用 PBS。

三、pH 调整液 常用的有 HEPES 液和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液。

1.NaHCO<sub>3</sub> 溶液: NaHCO<sub>3</sub> 是培养基中必须添加的成分, 一般情况下按说明书的要求准确添加, 以保证培养基在 5%CO<sub>2</sub> 的环境下 pH 达到设计标准。如果是封闭式培养, 即不与 5%CO<sub>2</sub> 的环境发生交换达到平衡, 所使用的培养基就不能按照说明书所要求加入 NaHCO<sub>3</sub>。此时常用 5.6%或 7.4%的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液调节培养基, 使之达到所要求的 pH 环境。

2.HEPES 溶液: 是一种弱酸, 中文名字是羟乙基哌嗪乙硫磺酸, 对细胞无毒性, 主要作用是防止培养基 pH 迅速变动。在开放式培养条件下, 观察细胞时培养基脱离了 5%CO<sub>2</sub> 的环境, CO<sub>2</sub> 气体迅速逸出, pH 迅速升高, 若加了 HEPES, 此时可以维持 pH7.0 左右。一般在进行克隆化培养时要添加 HEPES。

四、抗生素 常用的是青链霉素, 俗称“双抗溶液”。青霉素主要是对革兰阳性菌有效, 链霉素主要对革兰阴性菌有效。加入这两种抗生素可预防绝大多数细菌污染。通常使用青霉素终浓度 0.007-0.008g/100ml, 链霉素终浓度 0.01g/100ml。一般配制成 100 倍浓缩液, 可用 PBS 或培养基配制。

五、谷氨酰胺补充液 谷氨酰胺在细胞代谢过程中起重要作用, 合成培养基中都要添加, 由于谷氨酰胺在溶液中很不稳定容易降解, 4℃下放置 7 天即可分解约 50%, 所以都是在使用前添加。配制好的培养液 (含谷氨酰胺) 在 4℃放置 2 周以上时, 要重新加入原来量的谷氨酰胺, 故需单独配制谷氨酰胺, 以便临时加入培养液内。谷氨酰胺使用终浓度为 0.002mol/L。一般配制为 100 倍浓缩液, 即浓度为 200mmol/L (29.22g/L), 配制时应加温 30℃, 完全溶解后过滤除菌, 分装至小瓶, 储存于 -20℃。使用时, 在每 100ml 培养液中加入 0.5~2ml 谷氨酰胺浓缩液, 终浓度为 1~4mmol/L。

## 六、二肽谷氨酰胺 (L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)

在细胞培养液中 L-谷氨酰胺是大部分细胞培养基的基本成分; 而 L-谷氨酰胺是一种并不稳定的氨基酸, 在中性的水溶液中会自发降解; 需要频繁地补加 L-谷氨酰胺。因而在培养操作过程中经常:

- (1) 频繁打开盖子, 增加了破坏无菌状态的可能性;
- (2) 过多的追加 L-谷氨酰胺, 增加了培养基中氨的毒性水平。

上海恒利安生物科技有限公司已成功开发出用于细胞培养的二肽谷氨酰胺商业化产品。

二肽谷氨酰胺在细胞培养中稳定而不降解, 可高压灭菌, 释放毒性氨最少!

二肽谷氨酰胺在细胞内被氨肽酶 (E.C.3.4.11.2) 所水解, 产生 L-谷氨酰胺和 L-丙氨酸; 因此在大部分细胞系统中二肽谷氨酰胺就可以象 L-谷氨酰胺同样有效地被利用。二肽谷氨酰胺是最优替代物, 它无需适应; 既可用于贴壁细胞培养, 也适合于悬浮细胞的培养。

## 第三章 细胞培养的基本方法

### 第一节 培养细胞的细胞生物学

一、基本概念通常, 体外培养的生物成分无外乎两种结构形式:

其一是小块组织或称为组织块 (tissue block), 一般称为外植块;

其二是将生物组织分散后制成的单个细胞, 一般称为分离的细胞 (isolated cell) 或者分散的细胞 (dissociated cell)。

分散的过程通常在培养液或平衡盐溶液中进行, 分散的细胞被悬浮于培养液或平衡盐溶液中。

单个细胞分散存在于培养液或其它平衡盐溶液中、缓冲溶液中, 就称为细胞悬液 (cell suspension)。

狭义的细胞培养 (cell culture) 主要是指分离 (散) 细胞培养, 广义的细胞培养的概念还包括单 (个) 细胞培养 (single cell culture)。一种是群体培养 (mass culture), 将含有一定数量细胞的悬液置于培养瓶中, 让细胞贴壁生长, 汇合 (confluence) 后形成均匀的单细胞层; 另一种是克隆培养 (clonal culture), 将高度稀释的游离细胞悬液加入培养瓶中, 各个细胞贴壁后, 彼此距离较远, 经过生长增殖每一个细胞形成一个细胞集落, 称为克隆 (clone)。一个细胞克隆中的所有细胞均来源于同一个祖先细胞。

现今, 用于疫苗生产的细胞基本有 3 类, 即原代细胞、二倍体细胞株及传代细胞系。经过几十年的研究和发展, 目前我国已经拥有了可以进行大规模疫苗生产的动物原代细胞、二倍体细胞和 Vero 细胞等生产技术, 用于生产多种人用、动物疫苗。其中二倍体细胞 (如我国 70 年代建立的人胚肺二倍体细胞株 KMB17 和 2BS) 对多种病毒具有广泛的敏感性, 用其制备病毒性疫苗可以克服使用原代细胞时在其培养物中可能存在的各种潜在致病因子的危险, 是当前病毒性疫苗生产较为理想的细胞基质。Vero 细胞是 1962 年由日本 Chiba 大学的 Yasumura 等人从成年非洲绿猴肾中分离获得的, 是一种贴壁依赖性成纤维细胞, 核型为 2n 60, 高倍增率约为 1.7%, 可持续地进行培养, 不含任何污染因子。通常使用 199 培养基添加 5% 胎牛血清进行培养。该细胞可用于多种病毒的增殖, 已被 WHO 批准广泛用于人用、动物用疫苗生产。

## 二、体外培养细胞的分型

(一) 贴附型: 大多数培养细胞贴附生长, 属于贴壁依赖性细胞, 大致分成以下四型:

1、成纤维细胞型：胞体呈梭型或不规则三角形，中央有卵圆形核，胞质突起，生长时呈放射状。除真正的成纤维细胞外，凡由中胚层间充质起源的组织，如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮等常呈本型状态。培养中细胞的形态与成纤维类似时皆可称之为成纤维细胞。

2、上皮型细胞：细胞呈扁平不规则多角形，中央有圆形核，细胞彼此紧密相连成单层膜。生长时呈膜状移动，处于膜边缘的细胞总与膜相连，很少单独行动。起源于内、外胚层的细胞如皮肤表皮及其衍生物、消化管上皮、肝胰、肺泡上皮等皆成上皮型形态。

3、游走细胞型：呈散在生长，一般不连成片，胞质常突起，呈活跃游走或变形运动，方向不规则。此型细胞不稳定，有时难以和其他细胞相区别。

4、多型细胞型：有一些细胞，如神经细胞难以确定其规律和稳定的形态，可统归于此类。

（二）悬浮型：见于少数特殊的细胞，如某些类型的癌细胞及白血病细胞。胞体圆形，不贴于支持物上，呈悬浮生长。这类细胞容易大量繁殖。

三、培养细胞的生长和增殖过程 体内细胞生长在动态平衡环境中，而组织培养细胞的生存环境是培养瓶、皿或其它容器，生存空间和营养是有限的。当细胞增殖达到一定密度后，则需要分离出一部分细胞和更新营养液，否则将影响细胞的继续生存，这一过程叫传代（Passage 或 Subculture）。每次传代以后，细胞的生长和增殖过程都会受一定的影响。另外，很多细胞在体外的生存也不是无限的，存在着一个发展过程。所有这一切，使组织细胞在培养中有着一系列与体内不同的生存特点。

（一）培养细胞生命期（Life Span of Culture Cells）所谓培养细胞生命期，是指细胞在培养中持续增殖和生长的时间。体内组织细胞的生存期与完整机体的死亡衰老基本相一致。人胚二倍体成纤维细胞培养，在不冻存和反复传代条件下，可传 30~50 代，相当于 150~300 个细胞增殖周期，能维持一年左右的生存时间，最后衰老凋亡（Apoptosis）。如供体为成体或衰老个体，则生存时间较短；如培养的为其它细胞，如肝细胞或肾细胞，生存时间更短，仅能传几代或十几代。只有当细胞发生遗传性改变，如获永生性或恶性转化时，细胞的生存期才可能发生改变。正常细胞培养时，不论细胞的种类和供体的年龄如何，在细胞全生存过程中，大致都经历以下三个阶段：

1. 原代培养（Primary Culture）期：也称初代培养，即从体内取出组织接种培养到第一次传代阶段，一般持续 1—4 周。此期细胞呈活跃的移动，可见细胞分裂，但不旺盛。初代培养细胞与体内原组织在形态结构和功能活动上相似性大。细胞群是异质的（Heterogeneous），也即各细胞的遗传性状互不相同，细胞相互依存性强。

2. 传代期：初代培养细胞一经传代后便改称做细胞系（Cell Line）。在全生命期中此期的持续时间最长。在培养条件较好情况下，细胞增殖旺盛，并能维持二倍体核型，呈二倍体核型的细胞称二倍体细胞系（Diploid Cell Line）。为保持二倍体细胞性质，细胞应在初代培养期或传代后早期冻存。当前世界上常用细胞均在不出十代内冻存。如不冻存，则需反复传代以维持细胞的适宜密度，以利于生存。但这样就有可能导致细胞失掉二倍体性质或发生转化。一般情况下当传代 10~50 次左右，细胞增殖逐渐缓慢，以至完全停止，细胞进入第三期。

3. 衰退期：此期细胞仍然生存，但增殖很慢或不增殖；细胞形态轮廓增强，最后衰退凋亡。

在细胞生命期阶段，少数情况下，在以上三期任何一点（多发生在传代末或衰退期），由于某种因素的影响，细胞可能发生自发转化（Spontaneous Transformation）。转化的标志之一是细胞可能获得永生性（Immortality）或恶性性（Malignancy）。细胞永生性也称不死性，即细胞获持久性增殖能力，这样的细胞群体称无限细胞系（Infinite Cell



Line), 也称连续细胞系 (Continuous Cell Line)。无限细胞系的形成主要发生在第二期末, 或第三期初阶段。细胞获不死性后, 核型大多变成异倍体 (Heteroploid)。细胞转化亦可用人工方法诱发, 转化后的细胞也可能具有恶性性质。细胞永生性和恶性非同一种性状。

(二) 组织培养细胞一代生存期 所有体外培养细胞, 包括初代培养及各种细胞系, 当生长达到一定密度后, 都需要传代处理。传代的频率或间隔与培养液的性质、接种细胞数量和细胞增殖速度等有关。接种细胞数量大、细胞基数大、相同增殖速度条件下, 细胞数量增加与饱和速度相对要快 (实际上细胞接种数量大时细胞增殖速度比稀少时要快)。连续细胞系和肿瘤细胞系比初代培养细胞增殖快, 培养液中血清含量多时细胞增殖比少时快。以上情况都会缩短传代时间。

所谓细胞“一代”一词, 系仅指从细胞接种到分离再培养时的一段时间, 这已成为培养工作中的一种习惯说法, 它与细胞倍增一代非同一含义。如某一细胞系为第 153 代细胞, 即指该细胞系已传代 153 次。它与细胞世代 (Generation) 或倍增 (Doubling) 不同; 在细胞一代中, 细胞能倍增 3~6 次。

细胞传一代后, 一般要经过以下三个阶段:

1. 潜伏期 (Latent Phase): 细胞接种培养后, 先经过一个在培养液中呈悬浮状态的悬浮期。此时细胞胞质回缩, 胞体呈圆球形。接着是细胞附着或贴附于底物表面上, 称贴壁, 悬浮期结束。各种细胞贴附速度不同, 这与细胞的种类、培养基成分和底物的理化性质等密切相关。初代培养细胞贴附慢, 可长达 10~24 小时或更多; 连续细胞系和恶性细胞系快, 10~30 分钟即可贴附。细胞贴附现象是一个非常复杂和与多种因素相关的过程。支持物能影响细胞的贴附; 底物表面不洁不利贴附, 底物表面带有阳性电荷利于贴附。另外在贴附过程中, 有一些特殊物质如纤维连接素 (Fibronectin), 又称 LETS (Larger External Transformation Substance), 细胞表面蛋白 (Cell Surface Protein: CSP) 等也参与贴附过程。这些物质都是蛋白类成分, 它们有的存在于细胞膜的表面 (如 CSP), 有的则来自培养基中的血清 (LETS)。近年又从各种不同组织和生物成分中提取出了很多促贴附物质。贴附是贴附类细胞生长增殖条件之一。

细胞贴附于支持物后, 除先经过前述延展过程变成极性细胞, 还要经过一个潜伏阶段, 才进入生长和增殖期。细胞处在潜伏期时, 可有运动活动, 基本无增殖, 少见分裂相。细胞潜伏期与细胞接种密度、细胞种类和培养液性质等密切相关。初代培养细胞潜伏期长, 约 24~96 小时或更长, 连续细胞系和肿瘤细胞潜伏期短, 仅 6~24 小时; 细胞接种密度大时潜伏期短。当细胞分裂相开始出现并逐渐增多时, 标志细胞已进入指数增生期。

2. 指数增生期 (Logarithmic growth Phase): 这是细胞增值最旺盛的阶段, 细胞分裂相增多。指数增生期细胞分裂相数量可作为判定细胞生长旺盛与否的一个重要标志。一般以细胞分裂 (Mitotic Index: MI) 表示, 即细胞群中每 1000 个细胞中的分裂相数。体外培养细胞分裂指数受细胞种类、培养液成分、pH、培养箱温度等多种因素的影响。一般细胞的分裂指数介于 0.1%~0.5%, 初代细胞分裂指数低, 连续细胞和肿瘤细胞分裂指数可高达 3%~5%。pH 和培养液血清含量变动对细胞分裂指数有很大影响。指数增生期是细胞一代中活力最好的时期, 因此是进行各种实验最好的和最主要的阶段。在接种细胞数量适宜情况下, 指数增生期持续 3~5 天后, 随细胞数量不断增多、生长空间渐趋减少、最后细胞相互接触汇合成片。细胞相互接触后, 如培养的是正常细胞, 由于细胞的相互接触能抑制细胞的运动, 这种现象称接触抑制 (Contact Inhibition)。而恶性细胞则无接触抑制现象, 因此接触抑制可作为区别正常与癌细胞标志之一。肿瘤细胞由于无接触抑制能继续移动和增殖, 导致细胞向三维空间扩展, 使细胞发生堆积 (Piled up)。细胞接触汇合成片后, 虽发生接触抑制, 只要营养充分, 细胞仍然能够进行增殖分裂, 因此细胞数量仍在增多。但当细胞密度进一步增大, 培养液中营养成分减少, 代谢产物增多时, 细胞因营养的枯竭和代谢物的影响, 则发生密度抑制 (Density Inhibition), 导致细胞分裂停止。因此细胞接触抑制和密度抑制是两个不同的概念, 不应混淆。

3. 停滞期 (Stagnate Phase): 细胞数量达饱和密度后, 细胞遂停止增殖, 进入停滞期。此时细胞数量不再增加, 故也称平顶期 (Plateau)。停滞期细胞虽不增殖, 但仍有代谢活动, 继而培养液中营养渐趋耗尽, 代谢产物积累、pH 降低。此时需做分离培养即传代, 否则细胞会中毒, 发生形态改变, 重则从底物脱落死亡, 故传代应越早越好。传代过晚 (已有中毒迹象) 会影响下一代细胞的机能状态。在这种情况下, 虽进行了传代, 因细胞已受损, 需要恢复, 至少还要再传 1~2 两代, 通过换液淘汰掉死细胞和使受损轻微的细胞得以恢复后, 才能再用。结果反而耽误了时间, 这是在实验中应特别注意的。

四、原代培养 即第一次培养, 是指将培养物放置在体外生长环境中持续培养, 中途不分割培养物的培养过程。有以下几方面含义:

- 培养物一经接种到培养器皿 (瓶) 中就不在分割, 任其生长繁殖;
- 原代培养中的“代”并非细胞的“代”数, 因为培养过程中细胞经多次分裂已经产生多代子细胞;
- 原代培养过程中不分割培养物不等于不更换培养液, 也不等于不更换培养器皿。

正常细胞培养的世代数有限, 只有癌细胞和发生转化的细胞才能无限生长下去。所谓转化即是指正常细胞在某种因子的作用下发生突变而具有癌性的细胞。目前世界上许多实验室所广泛传用的 HeLa 细胞系就是 1951 年从一位名叫 Henrietta Lacks 的妇女身上取下的宫颈癌细胞培养而成。此细胞系一直沿用至今。

原代培养的细胞一般传至 10 代左右就不容易传下去了, 细胞的生长就会出现停滞, 大部分细胞衰老死亡。但是有极少数的细胞能够度过“危机”而继续传下去, 这些存活的细胞一般能够传到 40~50 代, 这种传代细胞叫做细胞株。细胞株的遗传物质没有发生改变, 在培养过程中其特征始终保持。当细胞株传至 50 代以后又会出现“危机”, 不能再传下去。但是有部分细胞的遗传物质发生了改变, 并且带有癌变的特点, 有可能在培养条件下无限地传代下去, 这种传代细胞称为细胞系。

原代培养是建立各种细胞系 (株) 必经的阶段, 其是否成功与组织污染与否、供体年龄、培养技术和方法、适宜培养基的选择等多种因素有关。由于原代培养的细胞转化性极小, 对病毒敏感性好, 因此适应制备疫苗等生物制品; 但也存在有潜在外源因子、不能事先检查标本、且受供体年龄健康状况的影响而导致批间差异大等缺陷。目前常用的原代细胞培养有鸡胚成纤维细胞及猪肾、猴肾、地鼠肾等原代细胞。

原代培养的基本过程包括取材、培养材料的制备、接种、加培养液、置培养条件下培养等步骤, 在所有的操作过程中, 都必须保持培养物及生长环境的无菌。

多数情况下, 分散的细胞若属于贴壁依赖型细胞, 就能黏附、铺展于培养器皿和载体表面生长而形成细胞单层, 这种培养方式称为单层细胞培养 (monolayer culture), 又叫贴壁培养 (adherent culture)。少数情况下, 培养的细胞没有贴壁依赖性, 可通过专门设备使细胞始终处于悬状态而在体外生长, 这种形式称为悬浮培养 (suspension culture)。如何让接种的细胞尽快贴壁, 是决定培养成功的关键步骤:

- 取决于适当的生长基质表面;
- 可降低接种后培养液对细胞的浮力, 如先少补加少量培养液, 待细胞贴壁后再补足营养液继续培养;
- 注意适当的细胞接种密度, 一般  $10^5$  个/ml 左右。

五、传代培养 当原代培养成功以后, 随着培养时间的延长和细胞不断分裂, 一则细胞之间相互接触而发生接触性抑制, 生长速度减慢甚至停止; 另一方面也会因营养物不足和代谢物积累而不利生长或发生中毒。此时就需要将

培养物分割成小的部分, 重新接种到另外的培养器皿(瓶)内, 再进行培养。这个过程就称为传代(passage)或者再培养(subculture)。对单层培养而言, 80%汇合或刚汇合的细胞是较理想的传代阶段。

体外培养技术中所谓的传“代”概念并不等于细胞生物学中“亲代细胞”与“子代细胞”中“代”的概念。传代培养的实质就是分割后再一次培养, 可以相对地衡量培养物的培养年龄。

六、生长曲线 细胞接种入培养瓶后, 先进入 2-24h 的延迟期(lag period), 然后进入指数生长期(即对数期)(log phase), 汇合成单层进入缓慢生长或停滞期(即平台期)(plateau phase)。每种细胞系(cell line)的这些生长期(growth phase)都是特征性的, 只要环境条件保持恒定, 每一次测定结果应该是可重复的。

## 第二节 细胞分离技术

一、从原代组织中分离细胞 将组织块分离(散)成细胞悬液的方法有多种, 最常用的是机械解离细胞法、酶学解离细胞法以及螯合剂解离细胞法。

从原代组织中获得单细胞悬液的一般方法是酶解聚。细胞暴露在酶中的时间要尽可能的短, 以保持最大的活性。下列步骤可以解聚整个组织, 获得较高产量的有活性细胞。

### 1.胰蛋白酶 (Trypsin)

- 在去除不需要的组织后, 使用无菌的解剖刀和剪子把剩余的组织切成 3~4mm 小片, 通过悬浮在无钙镁的平衡盐溶液中清洗组织碎片。让组织碎片沉淀, 去除上清液。重复清洗 2 到 3 次。
- 将盛有组织碎片的容器置于冰上, 去除残留的上清液。加入 0.25% 溶解在无钙镁的平衡盐溶液中的胰蛋白酶(100mg 组织加入 1ml 胰蛋白酶)。
- 在 4℃ 孵育 6 到 18 小时, 使几乎没有胰蛋白酶活性的酶尽可能渗透进去。
- 移弃组织碎片中的胰蛋白酶, 在 37℃ 孵育包含残留胰蛋白酶的碎片 20 到 30 分钟。
- 在组织碎片加入热的完全培养基, 用移液管轻轻地分散组织。如果使用无血清培养基, 要加入大豆胰蛋白酶抑制剂。
- 通过无菌不锈钢丝网(100~200mm)过滤, 分散所有剩余组织。计数和接种细胞, 进行培养。

### 2.胶原酶 (Collagenase)

- 用无菌解剖刀和剪子把剩余组织切成 3~4mm 小片, 用 Hanks'平衡液(HBSS)清洗组织碎片几次。
- 加入胶原酶(50~200 单位/ml, 溶解在 HBSS 中)。
- 在 37℃ 孵育 4 到 18 小时。加入 3mM CaCl<sub>2</sub> 增加解离效率。
- 通过无菌不锈钢丝网或尼龙网过滤细胞悬液, 以分离分散细胞、组织碎片和较大的碎片。如果需要进一步的解聚, 在碎片中加入新鲜的胶原酶。
- 通过离心在 HBSS 中清洗悬液几次。
- 再一次在培养基中悬浮细胞, 计数和接种细胞, 进行培养。

### 3.Dispase

- 用无菌解剖刀和剪子把剩余组织切成 3~4mm 小片, 用不含钙镁的平衡盐溶液清洗组织碎片几次。
- 加入 Dispase(0.6~2.4 单位/ml 溶解在无钙镁的平衡盐溶液)。
- 在 37℃ 孵育 20 分钟到几个小时。
- 通过无菌不锈钢丝网或尼龙网过滤细胞悬液, 以分离分散细胞、组织碎片和较大的碎片。如果需要进一步的解聚, 在碎片中加入新鲜的 Dispase。
- 通过离心在平衡盐溶液中清洗悬液几次。

●再一次在培养基中悬浮细胞，计数和接种细胞，进行培养。

二、从原培养容器中分离细胞 以下是从基层迅速分离细胞，且保持细胞完整性的一般步骤。这一过程并不意味着对于所有细胞系的广泛应用，每一种系统最佳条件和施用浓度应该根据经验加以确定。

●再次培养时检测细胞的活性。

●细胞的活率应该超过 90%

●对于无血清培养基，降低胰蛋白酶使用量。

1. 移弃使用过的细胞培养基。

2. 使用不含有钙镁的平衡盐溶液或 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)清洗细胞(看表确定正确的清洗溶液)。在培养瓶对着细胞的一面加入清洗溶液，通过转动培养瓶 1 到 2 分钟清洗细胞层，然后去除清洗液。

3. 以 2~3ml/25cm<sup>2</sup> 的量，加选择的分离液(见表)到培养瓶对着细胞的一面。确保分离液覆盖细胞层。在 37℃ 孵育培养瓶，轻轻摇动培养瓶。通常，在 5 到 15 分钟内，细胞就会脱落。细胞分离需要的时间因细胞系不同而有所变化。仔细监测细胞分离过程，避免细胞受损伤。对难于从培养瓶基层分离的细胞系，可以轻轻敲打，以加速分离过程。

4. 当细胞完全分离时，垂直放置培养瓶，让细胞流到培养瓶的底部。在培养瓶中加入完全培养基，通过移液管在单层细胞表面反复吹打来分散细胞。计数并再次培养细胞。

5. 对于无血清培养基，加入大豆胰蛋白酶抑制剂。通常使用 1:1 (v:v) 0.25mg/ml 胰蛋白酶抑制剂到胰蛋白酶中将抑制胰蛋白酶活性。

### 第三节 细胞的冻存与复苏

为了防止因污染或技术原因使长期培养功亏一篑，考虑到培养细胞因传代而迟早会出现变异，有时因寄赠、交换和购买，培养细胞从一个实验室转运到另一个实验室，最佳的策略是进行低温保存。这对于维持一些特殊细胞株的遗传特性极为重要。现简要介绍深低温保存法(-70℃~-196℃)的特点。细胞深低温保存的基本原理是：在-70℃以下时，细胞内的酶活性均已停止，即代谢处于完全停止状态，故可以长期保存。细胞低温保存的关键，在于通过 0~20℃ 阶段的处理过程。在此温度范围内，水晶呈针状，极易招致细胞的严重损伤。

一、细胞的冻存 为避免污染造成的损失，最小化连续细胞系的遗传改变和避免有限细胞系的老化和转化，需要冻存哺乳细胞。冻存细胞前，细胞应该特性化并检查是否污染。

有几种普通培养基用来冻存细胞。对于包含有血清的培养基，成分可能如下：

◆包含 10% 甘油的完全培养基，

◆包含 10% 二甲基亚砷 (DMSO) 的完全培养基，

◆50% 细胞条件培养基和 50% 含有 10% 甘油的新鲜培养基，或

◆50% 细胞条件培养基和 50% 含有 10% 二甲基亚砷的新鲜培养基。

对于无血清培养基，一些普通的培养基成分可能是：

◆50% 细胞条件无血清培养基和 50% 包含有 7.5% 二甲基亚砷的新鲜的无血清培养基，或

◆包含有 7.5% 二甲基亚砷和 10% 细胞培养级 BSA 的新鲜无血清培养基。



### 1. 悬浮细胞

- 计数将要冻存的活细胞。细胞应该处于对数生长期。以大约 200~400g 离心 5 分钟沉淀细胞, 使用移液管移去上清到最小体积, 不要搅乱细胞。
- 以  $1 \times 10^7$  到  $5 \times 10^7$  细胞/ml 密度, 在包含血清的冷冻培养基中再次悬浮细胞, 或者以  $0.5 \times 10^7$  到  $1 \times 10^7$  在无血清培养基中, 再次悬浮细胞。
- 分装进冻存管, 将冻存管置于湿冰上或放入 4℃ 冰箱中, 5 分钟内开始冷冻步骤。
- 细胞以 1℃/分钟进行冷冻, 可以通过可编程序的冷冻器进行或者把隔离盒中的冻存管放到 -70℃ 到 -90℃ 的冰箱中, 然后转移到液氮中贮存。

### 2. 贴壁细胞

- 使用分离试剂从基层分离细胞, 分离时尽可能温和, 使对细胞的损伤减少到最小。
- 在完全生长培养基中, 再次悬浮分离细胞, 确定有活力细胞数。
- 以大约 200g 离心 5 分钟沉淀细胞。使用移液管移去上清到最小体积, 不要搅乱细胞。
- 以  $5 \times 10^6$  到  $1 \times 10^6$  细胞/ml 密度, 在冻存液中悬浮细胞。
- 分装进冻存管, 将冻存管置于湿的冰上或放入 4℃ 冰箱中, 5 分钟内开始冷冻步骤。
- 细胞以 1℃/分钟进行冷冻, 可以通过可编程序的冷冻器进行或者把隔离盒中的冻存管放到 -70℃ 到 -90℃ 的冰箱中, 然后转移到液氮中贮存。

二、冻存细胞的复苏 冻存细胞较脆弱, 要轻柔操作。冻存细胞要快速融化, 并直接加入完全生长培养基中。若细胞对冻存剂 (DMSO 或甘油) 敏感, 离心去除冻存培养基, 然后加入完全生长培养基中。

#### 1. 直接铺板方法

- 取出贮存细胞, 37℃ 水浴中快速融化。
- 直接用完全生长培养基铺板细胞。1ml 冻存细胞使用 10~20ml 完全生长培养基。进行活细胞计数, 细胞接种应该至少在  $3 \times 10^5$  活细胞/ml。
- 培养细胞 12 到 24 小时, 更换新鲜的完全生长培养基, 去除冻存剂。

#### 2. 离心方法

- 取出贮存细胞, 37℃ 水浴中快速融化。
- 把 1 到 2ml 冻存细胞加入到大约 25ml 完全生长培养基, 轻轻混匀。
- 以大约 80x g 离心 2 到 3 分钟。
- 弃去上清。
- 在完全生长培养基轻轻再次悬浮细胞, 并且进行活细胞计数。
- 细胞铺板, 细胞接种应该至少为  $3 \times 10^5$  活细胞/ml。

## 三、细胞的分化、衰老与死亡

1. 细胞的分化 一个成年人全身细胞总数约 1012 个, 可以区分为 200 多种不同类型的细胞: 形态结构, 代谢, 行为, 功能等各不相同。追根溯源, 这么多种细胞均来自一个受精卵细胞。所以, 通常把发育过程中, 细胞后代在形态、结构和功能上发生差异的过程称为细胞分化。细胞分化发生在胚胎阶段, 也发生在胎儿出生以后, 乃至成人阶段。例如, 人体血细胞的产生和分化, 这个过程在人的一生中一直持续着。

由旺盛生长不断分裂的细胞, 转入分化, 通常从细胞周期中 G1 期开始时一个确定的点 G0 点“逃逸”出细胞周期。旺盛生长分裂的细胞和各种分化了的细胞, 它们的基因表达和代谢活动各不相同。

## 2. 细胞的衰老 体外细胞培养实验证明:

成纤维细胞: 来自胎儿传代 50 次后衰老死亡, 来自成人传代 20 次后衰老死亡(与具体年龄有关); 来自小鼠传代 14--28 次后衰老死亡, 来自乌龟传代 90--125 次后衰老死亡。

细胞衰老过程中会发生一系列的变化, 包括: 蛋白质合成速度降低, 已有蛋白质结构变化, 特异蛋白质成份出现; 同时, 细胞核, 线粒体, 膜系统、骨架系统等都有结构、功能的改变。

细胞衰老原因, 尚无定论, 出现过好几种理论与假说, 其中得到较广泛认可的是“自由基损伤假说”。

3. 细胞凋亡 细胞的死亡是个体存活正常现象, 常见的细胞死亡形式有 3 种: 坏死、凋亡和细胞毒性。多细胞生物的生命活动中, 因为环境因素的突然变化或病原物的入侵, 导致一部分细胞死去, 称为细胞的病理死亡, 或细胞坏死。坏死是细胞暴露于严重的物理或化学刺激时导致的细胞死亡; 细胞毒性是由细胞或者化学物质引起的单纯的细胞杀伤事件, 不依赖于其它两种细胞死亡机理, 如杀伤 T 细胞的细胞毒性作用。

还有一种情况, 一部分细胞的死亡是生物个体正常生命活动(代谢、生长、发育、分化)的一个必要部分; 似乎带有“牺牲局部, 保全整体”的意味。这种情况下的细胞死亡, 明显地受遗传控制, 称为细胞凋亡。凋亡(Apoptosis)则是程序性的、正常的细胞死亡, 是机体清除无用的或者不想要的细胞的手段。它与细胞坏死是两个截然不同的过程, 无论从形态学、生物学还是生化的特征来说, 都有明显的区别。细胞凋亡现象普遍存在于生物界。细胞凋亡与细胞增殖、分化和衰老起着互补与平衡的作用, 在多细胞动物的发育、形态建成与维持中扮演至关重要的角色。作为细胞的一种基本生命现象, 凋亡失控的结果将是可怕的: 凋亡不足时, 易发生癌变、病毒性疾病和自身免疫疾病; 而凋亡过量则可能产生获得性免疫缺陷综合征(HIV)、重症肝炎与退行性神经疾病, 如老年性痴呆症(Alzheimer's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)。因此研究细胞凋亡及其机理具有重要的理论和实践意义。

### 细胞凋亡与坏死的区别

#### 坏死

形态学特征--膜完整性丧失, 胞浆和线粒体膨胀, 全细胞裂解

生化特征--离子内环境失调, 非能量依赖性的(被动过程, 在 4° C 也可以发生), 随机消化 DNA (电泳显示为 DNA 弥散状态), Postlytic DNA 断裂

生理学特征--影响群组细胞 由非生理学因素引起(如补体攻击、代谢中毒、缺氧等), 被巨噬细胞吞噬, 周围有明显的炎症反应

#### 凋亡

形态学特征--胞膜出芽, 但保持完整, 染色体聚集在核膜周边, 胞浆收缩、细胞核凝集, 最后细胞分裂为凋亡小体, Bcl-2 家族蛋白导致线粒体膜通透性增加

生化特征--ATP 依赖性的(主动过程, 在 4° C 不能发生), 以核小体为单位剪切 DNA (电泳显示为 DNA ladder), Prelytic DNA 断裂, 线粒体释放多种因子至胞浆中(细胞色素 c、AIF), Caspases 级联活化, 膜对称性改变(PS 外翻)

生理学特征--只影响单个细胞 ,由生理学刺激诱导（如生长因子缺乏、激素环境改变等）,被临近细胞和巨噬细胞吞噬 无炎症反应

#### 第四节 细胞计数及活力测定

一、原理 培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好，所以要进行细胞计数。计数结果以每毫升细胞数表示。细胞计数的原理和方法与血细胞计数相同。

在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞，总细胞中活细胞所占的百分比叫做细胞活力，由组织中分离细胞一般也要检查活力，以了解分离的过程对细胞是否有损伤作用。复苏后的细胞也要检查活力，了解冻存和复苏的效果。

用台盼兰染细胞，死细胞着色，活细胞不着色，从而可以区分死细胞与活细胞。利用细胞内某些酶与特定的试剂发生显色反应，也可测定细胞相对数和相对活力。

#### 二、仪器、用品与试剂

- 1、仪器与用品：普通显微镜、血球计数板、试管、吸管、酶标仪（或分光光度计）
- 2、试剂：0.4%台盼兰，0.5%四甲基偶氮唑盐（MTT）、酸化异丙醇
- 3、材料：细胞悬液

#### 三、操作步骤

##### （一）细胞计数

- 1、将血球计数板及盖片用擦试干净，并将盖片盖在计数板上。
- 2、将细胞悬液吸出少许，滴加在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间。
- 3、静置 3 分钟。
- 4、镜下观察，计算计数板四大格细胞总数，压线细胞只计左侧和上方的。然后按下式计算：

细胞数/ml=4 大格细胞总数/ 4×10000

注意：镜下偶见由两个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算，若细胞团占 10%以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液。

##### （二）细胞活力

- 1、将细胞悬液以 0.5ml 加入试管中。
  - 2、加入 0.5ml 0.4%台盼兰染液，染色 2—3 分钟。
  - 3、吸取少许悬液涂于载玻片上，加上盖片。
  - 4、镜下取几个任意视野分别计死细胞和活细胞数，计细胞活力。
- 死细胞能被台盼兰染上色，镜下可见深兰色的细胞，活细胞不被染色，镜下呈无色透明状。
- 活力测定可以和细胞计数合起来进行，但要考虑到染液对原细胞悬液的加倍稀释作用。

##### （三）MTT 法测细胞相对数和相对活力

活细胞中的琥珀酸脱氢酶可使 MTT 分解产生兰色结晶状甲赞颗粒积于细胞内和细胞周围。其量与细胞数呈正比，也与细胞活力呈正比。

- 1、细胞悬液以 1000rpm 离心 10 分钟，弃上清液。

- 2、沉淀加入 0.5—1ml MTT, 吹打成悬液。
- 3、37℃下保温 2 小时。
- 4、加入 4—5 ml 酸化异丙醇(定容)。打匀。
- 5、1000 rpm 离心, 取上清液酶标仪或分光光度计 570nm 比色, 酸化异丙醇调零点。

注意: MTT 法只能测定细胞相对数和相对活力, 不能测定细胞绝对数。

## 第五节 细胞的分裂指数

一、原理 体外培养细胞生长、分裂繁殖的能力, 可用分裂指数来表示。它与生长曲线有一定的联系, 如随着分裂指数的不断提高, 细胞也就进入了指数生长期。分裂指数指细胞群体中分裂细胞所占的百分比, 它是测定细胞周期的一个重要指标, 也是不同实验研究选择细胞的重要依据。

### 二、仪器、用品与试剂

- 1、仪器与用品: CO<sub>2</sub> 培养箱、普通显微镜、细胞培养皿、盖玻片、吸管
- 2、试剂: 培养液、胰酶、甲醇、冰醋酸、Giemsa 染液

### 三、操作步骤

- 1、消化细胞, 将细胞悬液接至内含盖玻片的培养皿中。
- 2、CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 小时, 使细胞长在盖片上。
- 3、取出盖片, 按下列顺序操作:  
PBS 漂洗 3 分钟→甲醇: 冰醋酸=3: 1 固定液中固定 30 分钟→Giemsa 液染色 10 分钟→自来水冲洗。
- 4、盖片晾干后反扣在载玻片上, 镜检。
- 5、计算:  
$$\text{分裂指数} = \frac{\text{分裂细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

四、注意事项 操作时动作要轻, 以免使盖片上的细胞脱落。

## 第六节 细胞周期的测定

一、原理 细胞周期指细胞一个世代所经历的时间。从一次细胞分裂结束到下一次分裂结束为一个周期。细胞周期反应了细胞增殖速度。

单个细胞的周期测定可采用缩时摄影的方法, 但它不能代表细胞群体的周期, 故现多采用其他方法测群体周期。测定细胞周期的方法很多, 有同位素标记法、细胞计数法等, 这里介绍一种利用 BrdU 渗入测定细胞周期的方法。

BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 加入培养基后, 可做为细胞 DNA 复制的原料, 经过两个细胞周期后, 细胞中两条单链均含 BrdU 的 DNA 将占 1/2, 反映在染色体上应表现为一条单体浅染。如经历了三个周期, 则染色体中约一半为两条单体均浅染, 另一半为一深一浅。细胞如果仅经历了一个周期, 则两条单体均深染。计分裂相中各期比例, 就可算出细胞周期的值。

### 二、仪器、用品与试剂



- 1、仪器、用品：同常规细胞培养
- 2、试剂：BrdU (1.0mg/ml), 甲醇、冰醋酸, Giemsa 染液, 秋水仙素, 2×SSC 液

### 三、操作步骤

- 1、细胞生长至指数期时, 向培养液中加入 BrdU, 使最终浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ 。
- 2、44 小时加秋水仙素, 使每 ml 中含  $0.1 \mu\text{g}$ 。
- 3、48 小时后常规消化细胞至离心管中, 注意培养上清的漂浮细胞也要收集到离心管中。
- 4、常规染色体制片 (见第三部分: 染色体技术)。
- 5、染色体玻片置  $56^\circ\text{C}$  水浴锅盖上, 铺上 2×SSC 液, 距紫外灯管 6cm 处紫外照射 30 分钟。
- 6、弃去 2×SSC 液, 流水冲洗。
- 7、Giemsa 液染色 10 分钟, 流水冲洗, 晾干。
- 8、镜检 100 个分裂相, 计第一、二、三、四细胞期分裂指数。
- 9、计算:  
细胞周期 ( $T_c$ ) =  $48 / \{ (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / 100 \}$  (小时)

### 第七节 培养物的污染及防止

按现代的观念, 凡是混入培养环境中对细胞生存产生有害的成分和造成细胞不纯的异物都应该视为污染。根据这一概念, 组织培养污染物应包括生物 (真菌、细菌、病毒和支原体)、化学物质 (影响细胞生存、非细胞所需的化学成分)、细胞 (非同种的其他细胞)。其中一微生物最为多见。另外, 随着使用细胞种类增多, 不同细胞交叉污染, 尤其是 **Hela** 细胞的污染也时有发生, 从而造成细胞不纯。

#### 一、污染途径 污染物, 特别是微生物常通过下列途径进入培养体系, 造成污染

- 1 空气: 空气是微生物及尘埃颗粒传播的主要途径。空气流动性大, 如果培养操作场地于外界隔离不严格或消毒不充分, 外界不洁空气很容易进入造成污染。因此, 培养设施不能设在通风场所。无菌操作应在净化台内进行, 工作时要戴口罩, 以免因讲话、咳嗽等使外界污染进入操作面, 造成污染。
- 2 器材: 各种培养器皿、器械消毒不彻底和洗刷不干净导致污染, 另外需要对培养箱进行定期消毒, 防止形成污染
- 3 操作: 实验操作无菌观念不强, 技术不熟练, 使用污染的器皿或封瓶不严等, 都可以造成污染。培养两种细胞以上时, 操作不规范, 交叉使用吸管或培养液、瓶等有可能导致细胞交叉污染。
- 4 血清: 有些血清在生产时就已经被支原体或病毒等污染, 变成了污染。
- 5 组织样本: 原代培养的污染多数来源于组织样本; 取材时碘酒消毒后脱碘不彻底, 可造成碘混入组织, 细胞或培养液中, 影响细胞生长。

#### 二、污染对培养细胞的影响及污染的检测

由于体外培养细胞自身没有抵抗污染的能力, 而且培养基中的抗生素抗污染能力有限, 因而培养细胞一旦发生污染多数将无法挽回。细胞污染早期或污染程度较轻时, 如果能及时去除污染物, 部分细胞有可能恢复、但是当污染物持续存在培养环境中, 轻者细胞生长缓慢, 分类象减少, 细胞变得粗糙, 轮廓增强细胞浆出现颗粒、污染较严重,

细胞增值停止, 分裂象消失, 细胞质中出现大量堆积物, 细胞变圆、脱壁。

### (一) 细菌污染对培养细胞的影响及污染物的检测

常见的污染细菌有大肠杆菌、假单孢菌、葡萄球菌等。细菌污染初期由于培养体系的抗生素作用, 其繁殖处于抑制状态, 细胞生长不受明显影响, 污染情况用倒置显微镜观察不易判断。怀疑培养细胞有细菌污染时, 取 10ml 细胞悬液离心 1000 转 5 分钟, 沉淀中加入无抗生素培养液 2ml, 将细胞放培养箱培养。

如果培养无真的细菌污染, 24 小时内可以获得阳性结果。当污染的细菌量比较大或者细菌增殖到一定基数时, 大约每 20 分钟一代, 会使培养系统中很快产生大量细菌, 后者不仅可以消耗培养系统中的养分, 还能释放大量的代谢产物。几个小时后, 增殖的细菌就可以导致培养液外观浑浊, 肉眼就可以判断。细菌污染大多数可以改变培养液 pH, 使培养液变浑浊、变色。用相差显微镜观察, 可见满视野都是点状的细菌颗粒, 原来的清晰培养背景变得模糊, 大量的细菌甚至可以覆盖细胞, 对细胞的生存构成威胁。用青霉素、链霉素可以预防细菌污染有效。

### (二) 真菌污染对细胞的影响及污染物的检测

微生物污染中以真菌最多, 真菌种类繁多, 形态各异, 但是污染后易于发现, 大多呈白色或浅黄色小点漂浮于培养液表面, 肉眼可见; 有的散在生长, 镜下可见呈丝状、管状、树枝状, 纵横交错穿行于细胞之间。念珠菌和酵母菌卵圆形, 散在细胞周边和细胞之间生长。真菌生长迅速, 能在短时间内抑制细胞生长、产生有毒物质杀死细胞。抗真菌制剂对预防和排除真菌污染有效。

### (三) 支原体污染对细胞影响及污染物的检测

细胞培养(特别是传代细胞)被支原体污染是个世界性问题, 是细胞培养最常见的、干扰试验结果的一种污染。但由于不易被察觉, 有些污染的细胞仍在被应用。研究表明, 95% 以上是以下四种: 口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*) 和莱氏无胆甾原体 (*A. laidlawii*), 为牛源性。以上是最常见的污染细胞培养的支原体菌群, 但能够污染细胞的支原体种类是很多的, 国外调查证明, 大约有二十多种支原体能污染细胞, 有的细胞株可以同时污染两种以上的支原体。据查, 目前各实验室使用的二倍体细胞和传代细胞中约有 11% 的细胞受到支原体污染。

污染来源包括工作环境污染、操作者本身污染(一些支原体在人体是正常菌群)、培养基污染、污染支原体的细胞造成的交叉污染、实验器材带来的污染和用来制备细胞的原始组织或器官的污染。支原体污染后, 因为它们不会使细胞死亡可以与细胞长期共存, 培养基一般不发生浑浊, 细胞无明显变化, 外观上给人以正常感觉, 实则细胞受到多方面潜在影响, 如引起细胞变形, 影响 DNA 合成, 抑制细胞生长等。

细胞培养中, 主要从以下几个方面来预防支原体的污染:

控制环境污染;

严格实验操作;

细胞培养基和器材要保证无菌;

在细胞培养基中加入适量的抗生素。

支原体污染细胞后, 特别是重要的细胞株, 有必要清除支原体, 常用方法有抗生素处理、抗血清处理、抗生素加抗血清和补体联合处理。支原体最突出的结构特征是没有细胞壁, 一般来讲, 对作用于细胞壁生物合成的抗生素, 如  $\beta$ -内酰胺类、万古霉素等完全不敏感; 对多粘菌素 (polymycin)、利福平、磺胺类药物普遍耐药。对支原体最有抑制活性及常用于支原体感染治疗的抗生素是四环素类、大环内酯类及一些氟喹诺酮; 其他类抗生素如氨基糖苷类、氯

霉素对支原体有较小抑制作用, 所以常不用来作为支原体感染的化学治疗剂。

#### (四) 细胞交叉污染对细胞的影响及污染物的检测

细胞培养中, 细胞间交叉污染并不罕见, 多是由于在培养中操作时各种细胞同时进行, 混杂使用器皿和液体所致, 这种污染能使细胞的生长特性、形态特征等发生变化, 有些变化较轻、不易察觉, 有些可能由于污染的细胞具有生长优势最终压过原来细胞而导致细胞的生长抑制, 最终死亡。常用观察细胞形态学、分析生长特性和核型、检测细胞的标记物等方法检测交叉污染的细胞。

三、污染的预防 防止污染, 预防是关键, 预防措施应该贯穿整个细胞培养的始终。

1 器皿准备中的预防: 用于细胞培养的器皿应该严格消毒, 做到真正洁净; 应该无菌的物品, 要做到消毒严格、真正无菌; 器皿的运输、贮存过程中, 要严格操作, 谨防污染。

2 开始操作前的预防: 应当按厂家规定, 定期清洗或更换超净台的空气滤网, 请专职人员定期检查超净台的空气净化标准; 检查培养皿是否有消毒标志, 有条件得实验室可以使用一次性用品; 检查新配置的培养液, 确认无菌方可使用; 操作前提前半小时启动超净台的紫外灯消毒; 操作应戴口罩, 消毒双手。

3 操作过程中的预防; 主要包括: 超净台内放置的所有培养瓶瓶口不能与风向相逆, 不允许用手触及器皿的无菌部分, 如瓶口和瓶塞内侧; 在安装吸管冒、开启或封闭瓶口操作时要经过酒精灯烧灼, 并在火焰附件工作; 吸取培养液、细胞悬液等液体时, 应专管专用, 防止污染扩大或造成培养物的交叉污染; 使用培养液前, 不易较早开启瓶口; 开瓶后的培养瓶应保持斜位, 避免直立; 不再使用的培养液应立即封口; 培养的细胞在处理之前不要过早的暴露空气中; 操作时不要交谈、咳嗽, 以防唾沫和呼出气流引发污染; 操作完毕后应将工作台面整理好, 并消毒擦拭工作台面, 关闭超净台。

4 其他预防: 及早冻存培养物; 重要的细胞株传代工作应有两个人独立进行; 购入的未灭活血清应采取 56 度水浴灭活 30 分钟使血清的补体和支原体灭活; 为了避免诱导抗药细菌, 应定期更换培养系统的抗生素, 或尽可能不用抗生素; 对新购入的细胞株应加强观察, 防止外来的污染源; 定期消毒培养箱。

四、污染的排除 培养的细胞一旦污染应及时处理, 防止污染其他细胞。通常选高压灭菌被污染的细胞, 然后弃掉。如果有价值的细胞被污染, 并且污染程度较轻, 可以通过及时排除污染物, 挽救细胞恢复正常。常用的排除微生物污染的方法有以下几种:

1 抗生素排除法: 抗生素是细胞培养中杀灭细菌的主要手段。各种抗生素性质不同, 对微生物作用也不同, 联合应用比单用效果好, 预防性应用比污染后应用好; 如果发生微生物污染后再使用抗生素, 常难以根除。有的抗生素对细菌仅有抑制作用, 无杀灭效应。反复使用抗生素还能使微生物产生耐药性, 而且对细胞本身也有一定影响, 因此有人主张尽量不用抗生素处理, 当然, 一些有价值的细胞被污染后, 仍需要用抗生素挽救, 在这种情况下, 可采用 5—10 倍于常用量的冲击法, 加入高浓度抗生素后作用 24—48 小时, 再换入常规的培养液, 有时可以奏效。

2 加温除菌: 根据支原体耐热性能差的特点。有人将受支原体污染的细胞置于 41 度中作用 5—10 小时 (最长可以达 18 小时) 杀灭支原体。但是 41 度对细胞本身应有较大影响, 故在处理前, 应进行预试验, 确定最大限度杀伤支原体而对细胞影响较小的处理时间。

3 动物体内接种: 受微生物污染的肿瘤细胞可以接种到同种动物皮下或腹腔, 借动物体内免疫系统消灭掉微生物,

肿瘤细胞却能在体内生长,待一定时间,从体内取出再进行培养繁殖。

4 与巨噬细胞共培养: 在良好的体外培养条件下巨噬细胞可以存活 7—10 天,并可以分泌一些细胞因子支持其他细胞的克隆生长。与体内情况相似,巨噬细胞在体外条件下仍然可以吞噬微生物并将其消化。利用 96 孔板将极少培养细胞与巨噬细胞共培养,可以在高度稀释培养细胞、极大地降低微生物污染程度地同时,更有效地发挥巨噬细胞清除污染地效能。本方法与抗生素联合应用效果更佳。

#### 第四章 动物细胞大规模培养技术

##### 第一节 大规模培养技术应用简介

通过大规模体外培养技术培养哺乳类动物细胞是生产生物制品的有效方法。20 世界 60-70 年代,就已创立了可用于大规模培养动物细胞的微载体培养系统和中空纤维细胞培养技术。近十数年来,由于人类对生长激素、干扰素、单克隆抗体、疫苗及白细胞介素等生物制品的需求猛增,以传统的生物化学技术从动物组织获取生物制品已远远不能满足这一需求。随着细胞培养的原理与方法日臻完善,动物细胞大规模培养技术趋于成熟。

所谓动物细胞大规模培养技术(large-scale culture technology)是指在人工条件下(设定 pH、温度、溶氧等),在细胞生物反应器(bioreactor)中高密度大量培养动物细胞用于生产生物制品的技术。目前可大规模培养的动物细胞有鸡胚、猪肾、猴肾、地鼠肾等多种原代细胞及人二倍体细胞、CHO(中华仓鼠卵巢)细胞、BHK-21(仓鼠肾细胞)、Vero 细胞(非洲绿猴肾传代细胞,是贴壁依赖的成纤维细胞)等,并已成功生产了包括狂犬病疫苗、口蹄疫疫苗、甲型肝炎疫苗、乙型肝炎疫苗、红细胞生成素、单克隆抗体等产品。

在过去几十年来,该技术经有了很大发展,即从使用转瓶(roller bottle)、CellCube 等贴壁细胞培养,发展为生物反应器(Bioreactor)进行大规模细胞培养。第一代细胞培养技术的核心问题是难以产业化或者说是规模化生产:一是在工艺生产时不能大规模制备产品;二是非批量生产容易导致产品质量的不均一性;三是难以对同批生产进行生产和质量控制。

随着生物技术的发展,迫切需要大规模的细胞培养,特别是培养表达特异性蛋白的哺乳动物细胞,以便获得大量有用的细胞表达产物。采用玻璃瓶静置或旋转瓶的培养方法,已不能满足所需细胞数量及其分泌产物。因而必须为工业化生产开创一种新的技术方法。自 70 年代以来,细胞培养用生物反应器有很大的发展,种类越来越多,规模越来越大,较常见的细胞培养生物反应器有空气提升反应器,中空纤维管反应器,无泡搅拌反应器及篮式生物反应器等。八十年代以来,人们逐渐开始以生物反应器培养代替鼠腹水的方法获得单克隆抗体。

动物细胞是一种无细胞壁的真核细胞,生长缓慢,对培养环境十分敏感。采用传统的生物化工技术进行动物细胞大量培养,除了要满足培养过程必需的营养要求外,有必要建立合理的控制模型,进行 pH 和溶氧(DO)的最佳控制。细胞生物反应器可通过微机有序地定量地控制加入动物细胞培养罐内的空气、氧气、氮气和二氧化碳四种气体的流量,使其保持最佳的比例来控制细胞培养液中的 pH 值和溶氧水平,使系统始终处于最佳状态,以满足动物细胞的生长对 pH 值和溶解氧的需要。如为提高或达到一定的溶氧水平可改变通入培养罐内气体中氧气和氮气的比例来实现控制 DO 值的目。采用二氧化碳/碳酸氢钠(CO<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub>)缓冲液系统来控制培养液的 pH 值是一种较好的方法。

现在,由于动物细胞培养技术在规模和可靠性方面都不断发展,且从中得到的蛋白质也被证明是安全有效的,因此人们对动物细胞培养的态度已经发生了改变。许多人用和兽用的重要蛋白质药物和疫苗,尤其是那些相对较大、较复杂或糖基化(glycosylated)的蛋白质来说,动物细胞培养是首选的生产方式。60 年代初,英国 AVRI 研究所在贴壁细胞系 BHK21 中将口蹄疫病毒培养成功后,从最初的 200ml 和 800ml 玻璃容器开始,很快就放大到 30L 和



100L 不锈钢罐的培养规模。使用的是基于 Eagle's 配方的培养基, 补充 5% 成年牛血清和蛋白胨。1967 年以后, Wellcome (现为 Cooper 动物保健) 集团分布于欧洲、非洲和南美洲 8 个国家的生产厂商, 应用此项技术工业化生产口蹄疫疫苗和兽用狂犬疫苗, 已掌握了 5000L 的细胞罐大规模培养技术。

目前已实现商业化的产品有: 口蹄疫疫苗、狂犬病疫苗、牛白血病病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒疫苗、乙型肝炎疫苗、疱疹病毒疫苗、巨细胞病毒疫苗、 $\alpha$  及  $\beta$  干扰素、血纤维蛋白溶酶原激活剂、凝血因子 VIII 和 IX、促红细胞素、松弛素、生长激素、蛋白 C、免疫球蛋白、尿激酶、激肽释放酶及 200 种单克隆抗体等。其中, 口蹄疫疫苗是动物细胞大规模培养方法生产的主要产品之一。1983 年, 英国 Wellcome 公司已能够利用动物细胞进行大规模培养生产口蹄疫疫苗。美国 Genentech 公司应用 SV40 为载体, 将乙型肝炎病毒表面抗原基因插入哺乳动物细胞内进行高效表达, 已生产出乙型肝炎疫苗。英国 Wellcome 公司采用 8000L Namalwa 细胞生产  $\alpha$  干扰素。英国 Celltech 公司用气升式生物反应器生  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  干扰素; 用无血清培养液在 10000L 气升式生物反应器中培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体。美国 Endotronic 公司用中空纤维生物反应器大规模培养动物细胞生产出免疫球蛋白 G、A、M 和尿激酶、人生长激素等。

## 第二节 大规模培养常用方法

根据动物细胞的类型, 可采用贴壁培养、悬浮培养和固定化培养等三种培养方法进行大规模培养。

### 一、动物细胞生长特性及培养温度

- 1 细胞生长缓慢, 易污染, 培养需用抗生素
- 2 细胞大, 无细胞壁, 机械强度低, 环境适应性差
- 3 需氧少, 不耐受强力通风与搅拌
- 4 群体生长效应, 贴壁生长 (锚地依赖性)
- 5 培养过程产品分布细胞内外, 成本高
- 6 原代培养细胞一般繁殖 50 代即退化死亡

依据在体外培养时对生长基质依赖性差异, 动物细胞可分为两类:

●贴壁依赖型细胞: 需要附着于带适量电荷的固体或半固体表面才能生长, 大多数动物细胞, 包括非淋巴组织细胞和许多异倍体细胞均属于这一类。

●非贴壁依赖型细胞: 无需附着于固相表面即可生长, 包括血液、淋巴组织细胞、许多肿瘤细胞及某些转化细胞。培养细胞的最适温度相当于各种细胞或组织取材机体的正常温度。人和哺乳动物细胞培养的最适温度为 35~37℃。偏离这一温度, 细胞正常的代谢和生长将会受到影响, 甚至死亡。总的来说, 培养细胞对低温的耐力比高温高。温度不超过 39℃时, 细胞代谢强度与温度成正比; 细胞培养置于 39~40℃环境中 1h, 即受到一定损伤, 但仍能恢复; 当温度达 43℃以上时, 许多细胞将死亡。当温度下降到 30~20℃时, 细胞代谢降低, 因而与培养基之间物质交换减少。首先看到的是细胞形态学的改变以及细胞从基质上脱落下来。当培养物恢复到初始的培养温度时, 它们原有的形态和代谢也随之恢复到原有水平。

### 二、贴壁培养 (attachment culture) 是指细胞贴附在一定的固相表面进行的培养。

1. 生长特性: 贴壁依赖型细胞在培养时要贴附于培养 (瓶) 器皿壁上, 细胞一经贴壁就迅速铺展, 然后开始有丝分裂, 并很快进入对数生长期。一般数天后就铺满培养表面, 并形成致密的细胞单层。

## 2.贴壁培养的优点:

- 容易更换培养液;细胞紧密黏附于固相表面,可直接倾去旧培养液,清洗后直接加入新培养液。
- 容易采用灌注培养,从而达到提高细胞密度的目的;因细胞固定表面,不需过滤系统。
- 当细胞贴壁于生长基质时,很多细胞将更有效的表达一种产品。
- 同一设备可采用不同的培养液/细胞的比例。
- 适用于所有类型细胞。

## 3.贴壁培养的缺点:与悬浮培养法相比

- 扩大培养比较困难,投资大;
- 占地面积大;
- 不能有效监测细胞的生长;

4.细胞贴壁的表面:要求具有净阳电荷和高度表面活性。对微载体而言还要求具一定电荷密度;若为有机物表面,必须具有亲水性,并带阳电荷。

5.贴壁培养系统:主要有转瓶、中空纤维(后面专题介绍)、玻璃珠、微载体系统(后面介绍)等。

●转瓶培养系统:培养贴壁依赖型细胞最初采用转瓶系统培养。转瓶培养一般用于小量培养到大规模培养的过渡阶段,或作为生物反应器接种细胞准备的一条途径。细胞接种在旋转的圆筒形培养器-转瓶中,培养过程中转瓶不断旋转,使细胞交替接触培养液和空气,从而提供较好的传质和传热条件。

转瓶培养具有结构简单,投资少,技术成熟,重复性好,放大只需简单的增加转瓶数量等优点。

但也有其缺点:劳动强度大,占地空间大,单位体积提供细胞生长的表面积小,细胞生长密度低,培养时监测和控制环境条件受到限制等。

现在使用的转瓶培养系统包括二氧化碳培养箱和转瓶机两类。

●反应器贴壁培养 此种培养方式中,细胞贴附于固定的表面生长,不因为搅拌而跟随培养液一起流动,因此比较容易更换培养液,不需要特殊的分离细胞和培养液的设备,可以采用灌注培养获得高细胞密度,能有效地获得一种产品;但扩大规模较难,不能直接监控细胞的生长情况,故多用于制备用量较小、价值高的生物药品。

CelliGen、CelliGen Plus<sup>TM</sup> 和 Bioflo3000 反应器是常用的贴壁培养式生物反应器,用于细胞贴壁培养时可用篮式搅拌系统和圆盘状载体。此载体是直径 6 毫米无纺聚酯纤维圆片,具很高表面积与体积比(1200cm<sup>2</sup>/g),利于获得高细胞密度。篮式搅拌系统和载体培养是目前贴壁细胞培养使用最多方式,用于杂交瘤细胞、Hela 细胞、293 细胞、CHO 细胞及其它细胞培养。此种方式培养细胞,细胞接种后贴壁快。

三、悬浮培养(suspension culture):是指细胞在反应器中自由悬浮生长的过程。主要用于非贴壁依赖型细胞培养,如杂交瘤细胞等;是在微生物发酵的基础上发通起来的。

无血清悬浮培养是用已知人源或动物来源的蛋白或激素代替动物血清的一种细胞培养方式,它能减少后期纯化工作,提高产品质量,正逐渐成为动物细胞大规模培养的研究新方向。

四、固定化培养 (immobilization culture): 是将动物细胞与水不溶性载体结合起来, 再进行培养。上述两大类细胞都适用, 具有细胞生长密度高, 抗剪切力和抗污染能力强等优点, 细胞易于产物分开, 有利于产物分离纯化。制备方法很多, 包括吸附法、共价贴附法、离子/共价交联法、包埋法、微囊法等。

1. 吸附法 用固体吸附剂将细胞吸附在其表面而使细胞固定化的方法称为吸附法 (adhesion)。操作简便、条件温和、是动物细胞固定化中最早研究使用的方法。缺点是: 载体的负荷能力低, 细胞易脱落。微载体培养和中空纤维培养是该方法的代表, 稍后专门介绍。

2. 共价贴附法 利用共价键将动物细胞与固相载体结合的固定化方法称为共价贴附法 (attachment by covalent bonding)。此法可减少细胞的泄漏, 但须引入化学试剂, 对细胞活性有影响, 且因贴附而导致扩散限制小, 细胞得不到保护。

3. 离子/共价交联法 双功能试剂处理细胞悬浮液, 会在细胞间形成桥而絮结产生交联作用, 此固定化细胞方法称为离子/共价交联法 (cross-linking by covalent bonding)。交联试剂会使一些细胞死亡, 也会产生扩散限制。

4. 包埋法 将细胞包埋多孔载体内部制成固定化细胞的方法称为包埋法 (entrapment)。优点是: 步骤简便、条件温和、负荷量大、细胞泄漏少, 抗机械剪切。缺点是: 扩散限制, 并非所有细胞都处于最佳基质浓度, 且大分子基质不能渗透到高聚物网络内部。一般适用于非贴壁依赖型细胞的固定化, 常用载体为多孔凝胶, 如琼脂糖凝胶、海藻酸钙凝胶和血纤维蛋白。

5. 微囊法 (microencapsulation) 是用一层亲水的半透膜将细胞包围在珠状的微囊里, 细胞不能逸出, 但小分子物质及营养物质可自由出入半透膜; 囊内是种微小培养环境, 与液体培养相似, 能保护细胞少受损伤, 故细胞生长好、密度高。微囊直径控制在 200-400  $\mu\text{m}$  为宜。制备中应注意:

- 温和、快速、不损伤细胞, 尽量在液体和生理条件下操作;
- 所用试剂和膜材料对细胞无毒害;
- 膜的孔径可控制, 必须使营养物和代谢物自由通过;
- 膜应有足够机械强度抵抗培养中搅拌。

## 五、抗凋亡策略在细胞大规模培养中的应用

生物反应器动物细胞大规模生产过程中, 细胞凋亡在细胞死亡中占主要部分。最近研究显示在大规模培养生物反应器中细胞的死亡中 80% 是凋亡所导致, 而不是以前所认为的坏死。而在大规模细胞培养中, 细胞死亡是维持细胞高活性和高密度的最大障碍。理论上讲, 防止或延长细胞死亡, 可以极大提高生物反应器生产重组蛋白的产量。

细胞凋亡由一系列基因精确地调控, 是多细胞生物发育和维持稳态所必需的生理现象。已知凋亡的最终执行者是 Caspase 家族, 它们均为半胱氨酸蛋白酶, 各识别一个 4 氨基酸序列, 并在识别序列 C 端天冬氨酸残基处将底物切断。Caspase 含有可被自身识别的序列, 可以切割活化自身而导致信号放大, 并作用于下游 Caspase 成员, 从而形成 Caspase 家族的级联放大, 最终作用于效应蛋白, 引起细胞凋亡。

所以在大规模培养时干扰细胞在培养中凋亡的发生, 提高细胞特异性抵制遇到压力而引起凋亡的能力, 有利于提高细胞的培养密度、延长细胞的培养周期, 从而提高目标产品的产量 2-3 倍。

### 1. 营养物质抗凋亡

在常规生物反应器构造中,营养耗竭或缺乏培养基中特殊的生长因子则引起凋亡,例如血清,糖或特殊氨基酸的耗尽。培养基中添加氨基酸或其它关键营养可抑制凋亡、延长培养时间从而提高产品的生产。大规模培养中细胞凋亡主要由于营养物质的耗竭或代谢产物的堆积引起,如谷氨酰胺的耗竭是最常见的凋亡原因,而且凋亡一旦发生,补充谷氨酰胺已不能逆转凋亡。另外,动物细胞在无血清、无蛋白培养基中进行培养时,细胞变得更为脆弱,更容易发生凋亡。

## 2.基因抗凋亡

与凋亡相关的一系列基因产物可对其进行正、负向的调控,因此可通过导入相应基因来调节细胞凋亡的机制。Bcl-2 基因是目前最为有效的抗凋亡基因,在多种细胞系中均表现出很强的抗凋亡活性。

## 3.化学方法抗凋亡

凋亡发生时细胞许多部位发生生物物质的改变,有些变化如改变细胞氧化还原条件产生活性氧在凋亡信号阶段发生,其它的如破坏线粒体膜电位、激活 caspase 则发生在凋亡效应阶段,这在绝大多数细胞死亡中是相同的。因此阻止这些生物物质的改变可能阻止或至少延迟细胞凋亡的发生,所以运用化学物质可抑制信号效应阶段的发生,被认为是抗凋亡策略之一。

### 第三节 大规模培养技术的操作方式

深层培养可分为:分批式、流加式、半连续式、连续式、连续式和灌注式五种。

一、分批式培养(batch culture) 是细胞规模培养发展进程中较早期采用的方式,也是其它操作方式的基础。该方式采用机械搅拌式生物反应器,将细胞扩大培养后,一次性转入生物反应器内进行培养,在培养过程中其体积不变,不添加其它成分,待细胞增长和产物形成积累到适当的时间,一次性收获细胞、产物、培养基的操作方式。

该方式的特点:

- 操作简单。培养周期短,染菌和细胞突变的风险小。反应器系统属于封闭式,培养过程中与外部环境没有物料交换,除了控制温度、pH 值和通气外,不进行其他任何控制,因此操作简单,容易掌握;
- 直观反映细胞生长代谢的过程。因培养期间细胞生长代谢是在一个相对固定的营养环境,不添加任何营养成分,因此可直观的反映细胞生长代谢的过程,是动物细胞工艺基础条件或"小试"研究常用的手段;
- 可直接放大。由于培养过程工艺简单,对设备和控制的要求较低,设备的通用性强,反应器参数的放大原理和过程控制,比较其它培养系统较易理解和掌握,在工业化生产中分批式培养操作是传统的、常用的方法,其工业反应器(Genetech)规模可达 12000L。

分批培养过程中,细胞的生长分为五个阶段:延滞期、对数生长期、减速期、平稳期和衰退期,见图 1。分批培养的周期时间多在 3-5 天,细胞生长动力学表现为细胞先经历对数生长期(48-72h)细胞密度达到最高值后,由于营养物质耗竭或代谢毒副产物的累积细胞生长进入衰退期进而死亡,表现出典型的生长周期。收获产物通常是在细胞快要死亡前或已经死亡后进行。

## 二、流加式培养(feeding culture)

1.流加式培养是在批式培养的基础上,采用机械搅拌式生物反应器系统,悬浮培养细胞或以悬浮微载体培养贴壁细胞,细胞初始接种的培养基体积一般为终体积的 1/2~1/3,在培养过程中根据细胞对营养物质的不断消耗和需求,流加浓缩的营养物或培养基,从而使细胞持续生长至较高的密度,目标产品达到较高的水平,整个培养过程没有流出或回收,通常在细胞进入衰亡期或衰亡期后进行终止回收整个反应体系,分离细胞和细胞碎片,浓缩、纯化目标蛋白。



## 2.流加培养特点:

- 流加培养根据细胞生长速率、营养物消耗和代谢产物抑制情况,流加浓缩的营养培养基。流加的速率与消耗的速率相同,按底物浓度控制相应的流加过程,保证合理的培养环境与较低的代谢产物抑制水平。
- 培养过程以低稀释率流加,细胞在培养系统中停留时间较长,总细胞密度较高,产物浓度较高。
- 流加培养过程须掌握细胞生长动力学,能量代谢动力学,研究细胞环境变化时的瞬间行为。流加培养细胞培养基的设计和培养条件与环境优化,是整个培养工艺中的主要内容。
- 在工业化生产,悬浮流加培养工艺参数的放大原理和过程控制,比较其它培养系统较易理解和掌握,可采用工艺参数的直接放大。

流加培养是当前动物细胞培养中占有主流优势的培养工艺,也是近年来动物细胞大规模培养研究的热点。流加培养中的关键技术是基础培养基和流加浓缩的营养培养基。通常进行流加的时间多在指数生长后期,细胞在进入衰退期之前,添加高浓度的营养物质。可以添加一次,也可添加多次,为了追求更高的细胞密度往往需要添加一次以上,直至细胞密度不再提高;可进行脉冲式添加,也可以降低的速率缓慢进行添加,但为了尽可能的维持相对稳定的营养物质环境,后者采用较多;添加的成分比较多,凡是促细胞生长的物质均可以进行添加。流加的总体原则是维持细胞生长相对稳定的培养环境,营养成分即不过剩而产生大量的代谢副产物造成营养利用效率下降而成为无效的利用;也不缺乏导致细胞生长抑制或死亡。

## 3.流加工艺中的营养成分主要分为三大类:

- 葡萄糖:葡萄糖是细胞的供能物质和主要的碳源物质,然而当其浓度较高是会产生大量的代谢产物乳酸,因而需要进行其浓度控制,以足够维持细胞生长而不至于产生大量的副产物的浓度为佳。
- 谷氨酰胺:谷氨酰胺是细胞的供能物质和主要的氮源物质,然而当其浓度较高是会产生大量的代谢产物氨,因而也需要进行其浓度控制,以足够维持细胞生长而不至于产生大量的副产物的浓度为佳;  
大规模培养中细胞凋亡主要由于营养物质的耗竭或代谢产物的堆积引起,如谷氨酰胺的耗竭是最常见的凋亡原因,而且凋亡一旦发生,补加谷氨酰胺已不能逆转凋亡。另外,动物细胞在无血清、无蛋白培养基中进行培养时,细胞变得更为脆弱,更容易发生凋亡。
- 氨基酸、维生素及其他:主要包括营养必需氨基酸、营养非必需氨基酸、一些特殊的氨基酸如羟脯氨酸、羧基谷氨酸和磷酸丝氨酸;此外还包括其他营养成分如胆碱、生长刺激因子。添加的氨基酸形式多为左旋氨基酸,因而多以盐或前体的形式替代单分子氨基酸,或者添加四肽或短肽的形式。在进行添加时,不溶性氨基酸如胱氨酸、酪氨酸和色氨酸只在中性 pH 值部分溶解,可采用泥浆的形式进行脉冲式添加;其他的可溶性氨基酸以溶液的形式用蠕动泵进行缓慢连续流加。

## 4.流加式培养分为两种类型:单一补料分批式培养和反复补料分批式培养。

- 单一补料分批式培养是在培养开始时投入一定量的基础培养液,培养到一定时期,开始连续补加浓缩营养物质,直到培养液体积达到生物反应器的最大操作容积,停止补加,最后将细胞培养液一次全部放出。该操作方式受到反应器操作容积的限制,培养周期只能控制在较短的时间内。
- 反复补料分批式培养是在单一补料分批式操作的基础上,每个一定时间按一定比例放出一部分培养液,是培养液体积始终不超过反应器的最大操作容积,从而在理论上可以延长培养周期,直至培养效率下降,才将培养液全部放出。

## 三、半连续式培养 (semi-continuous culture)

1.半连续式培养又称为重复分批式培养或换液培养。采用机械搅拌式生物反应器系统,悬浮培养形式。在细胞增长和产物形成过程中,每间隔一段时间,从中取出部分培养物,再用新的培养液补足到原有体积,使反应器内的总体

积不变。

这种类型的操作是将细胞接种一定体积的培养基, 让其生长至一定的密度, 在细胞生长至最大密度之前, 用新鲜的培养基稀释培养物, 每次稀释反应器培养体积的  $1/2 \sim 3/4$ , 以维持细胞的指数生长状态, 随着稀释率的增加培养体积逐步增加。或者在细胞增长和产物形成过程中, 每隔一定时间, 定期取出部分培养物, 或是条件培养基, 或是连同细胞、载体一起取出, 然后补加细胞或载体, 或是新鲜的培养基继续进行培养的一种操作模式。剩余的培养物可作为种子, 继续培养, 从而可维持反复培养, 而无需反应器的清洗、消毒等一系列复杂的操作。在半连续式操作中由于细胞适应了生物反应器的培养环境和相当高的接种量, 经过几次的稀释、换液培养过程, 细胞密度常常会提高。

## 2. 半连续式特点:

- 培养物的体积逐步增加;
- 可进行多次收获;
- 细胞可持续指数生长, 并可保持产物和细胞在一较高的浓度水平, 培养过程可延续到很长时间。

该操作方式的优点是操作简便, 生产效率高, 可长时期进行生产, 反复收获产品, 可使细胞密度和产品产量一直保持在较高的水平。在动物细胞培养和药品生产中被广泛应用。

## 四、连续式培养 (continuous culture)

1. 连续式培养是一种常见的悬浮培养模式, 采用机械搅拌式生物反应器系统。该模式是将细胞接种与一定体积的培养基后, 为了防止衰退期的出现, 在细胞达最大密度之前, 以一定速度向生物反应器连续添加新鲜培养基; 同时, 含有细胞的培养物以相同的速度连续从反应器流出, 以保持培养体积的恒定。理论上讲, 该过程可无限延续下去。

2. 连续培养的优点是反应器的培养状态可以达到恒定, 细胞在稳定状态下生长。稳定状态可有效的延长分批培养中的对数生长期。在稳定状态下细胞所处的环境条件如营养物质浓度、产物浓度、pH 值可保持恒定, 细胞浓度以及细胞比生长速率可维持不变。细胞很少受到培养环境变化带来的生理影响, 特别是生物反应器的主要营养物质葡萄糖和谷氨酰胺, 维持在一个较低的水平, 从而使他们的利用效率提高, 有害产物积累有所减少。然而在高的稀释率下, 虽然死细胞和细胞碎片及时清除, 细胞活性高最终细胞密度得到提高; 可是产物却不断在稀释, 因而产物浓度并为提高; 尤其是细胞和产物不断的稀释, 营养物质利用率、细胞增长速率和产物生产速率低下。

## 3. 连续式培养不足:

- 由于是开放式操作, 加上培养周期较长, 容易造成污染;
- 在长周期的连续培养中, 细胞的生长特性以及分泌产物容易变异;
- 对设备、仪器的控制技术要求较高。

连续式培养操作使用的反应器多数是搅拌式生物反应器, 也可以是管式反应器。

## 4. 连续式培养的特点:

- 细胞维持持续指数增长;
- 产物体积不断增长;
- 可控制衰退期与下降期。

## 五、灌流式培养 (perfusion culture)

1. 灌流式培养是把细胞和培养基一起加入反应器后, 在细胞增长和产物形成过程中, 不断地将部分条件培养基取出, 同时又连续不断地灌注新的培养基。它与半连续式操作的不同之处在于取出部分条件培养基时, 绝大部分细胞均保

留在反应器内, 而半连续培养在取培养物时同时也取出了部分细胞。

灌流式培养常使用的生物反应器主要有两种形式。一种是用搅拌式生物反应器悬浮培养细胞, 这种反应器必须具有细胞截流装置, 细胞截留系统开始多采用微孔膜过滤或旋转膜系统, 最近开发的有各种形式的沉降系统或透析系统。

中空纤维生物反应器是连续灌流操作常用的一种。它采用的中空纤维半透膜, 透过小分子量的产物和底物, 截流细胞和分子量较大的产物, 在连续灌流过程中将绝大部分细胞截留在反应器内; 近年来中空纤维生物反应器被广泛应用于产物分泌性动物细胞的生产, 主要用于培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体。

另外一种形式是固定床或流化床生物反应器, 固定床是在反应器中装配固定的篮筐, 中间装填聚脂纤维载体, 细胞可附着在载体上生长, 也可固定在载体纤维之间, 靠上搅拌中产生的负压, 迫使培养基不断流经填料, 有利于营养成分和氧的传递, 这种形式的灌流速度较大, 细胞在载体中高密度生长。流化床生物反应器是通过流体的上升运动使固体颗粒维持在悬浮状态进行反应, 适合于固定化细胞的培养。

## 2. 灌流式培养的优点:

- 细胞截流系统可使细胞或酶保留在反应器内, 维持较高的细胞密度, 一般可达 107-109/ml, 从而较大的提高了产品的产量;
- 连续灌流系统, 使细胞稳定的处在较好的的营养环境中, 有害代谢废物浓度积累较低;
- 反应速率容易控制, 培养周期较长, 可提高生产率, 目标产品回收率高;
- 产品在罐内停留时间短, 可及时回收到低温下保存, 有利于保持产品的活性。

连续灌注培养是近年用于动物细胞培养生产分泌型重组治疗性药物和嵌合抗体及人源化抗体等基因工程抗体较为推崇的一种方式。应用连续灌流工艺的公司有 Genzyme, Genetic Institute, Bayer 公司等。这种方法最大困难是污染机率较高, 长期培养中细胞分泌产品的稳定性, 规模放大过程中工程问题。

六、细胞工厂培养 细胞工厂(cell factory)是一种设计精巧的细胞培养装置。它在有限的空间内利用了最大限度的培养表面, 从而节省了大量的厂房空间,并可节省贵重的培养液。更重要的是, 它可有效地保证操作的无菌性, 从而避免因污染而带来的原料、劳务和时间损失。它是对传统转瓶培养的革命。

丹麦 NUNC 公司生产的 NUNC 细胞工厂是目前应用较多的细胞工厂系统。可用于如疫苗、单克隆抗体或生物制药等工业规模生产, 特别适合于贴壁细胞, 也可用于悬浮培养, 在从实验室规模进行放大时不会改变细胞生长的动力学条件, 可提供 1, 2, 10 和 40 盘的规格使放大变得简单易行, 低污染风险, 节省空间, 培养表面经测试保证最有利于细胞贴附和生长。同时, 与 NUNC 的细胞工厂操作仪结合使用, 可全面实现细胞培养的自动化, 从而大大地减低劳动强度和密集度。

这套系统使用很方便, 可产生类似塑料培养瓶的效果。由组织培养级聚苯乙烯制成, 使用后可随意处理。其最大缺点是: 经胰酶消化后, 很难将细胞完全洗出。

## 第四节 动物细胞大规模培养用生物反应器简介

动物细胞培养技术能否大规模工业化、商业化, 关键在于能否设计出合适的生物反应器 (bioreactor)。由于动物细胞与微生物细胞有很大差异, 传统的微生物反应器显然不适用于动物细胞的大规模培养。首先必须满足在低剪切力及良好的混合状态下, 能够提供充足的氧以供细胞生长及细胞进行产物的合成。

## 一、生物反应器分类

目前, 动物细胞培养用生物反应器主要包括: 转瓶培养器、塑料袋增殖器、填充床反应器、多层板反应器、螺旋膜反应器、管式螺旋反应器、陶质矩形通道蜂窝状反应器、流化床反应器、中空纤维及其它膜式反应器、搅拌反应器、气升式反应器等。

按其培养细胞的方式不同, 这些反应可分为以下三类:

1. 悬浮培养用反应器: 如搅拌反应器、中空纤维反应器、陶质矩形通道蜂窝状反应器、气升式反应器;
2. 贴壁培养用反应器: 如搅拌反应器 (微载体培养)、玻璃珠床反应器、中空纤维反应器、陶质矩形通道蜂窝状反应器;
3. 包埋培养用反应器: 如流化床反应器、固化床反应器。

二、搅拌罐生长反应器 这是最经典、最早被采用的一种生物反应器。此类反应器与传统的微生物生物反应器类似, 真对动物细胞培养的特点, 采用了不同的搅拌器及通气方式。通过搅拌器的作用使细胞和养分在培养液中均匀分布, 使养分充分被细胞利用, 并增大气液接触面, 有利于氧的传递。现已开发的有: 笼式通气搅拌器、双层笼式通气搅拌器、桨式搅拌器、海般式搅拌器等。

## 三、气升式生物反应器

1979 年首次应用气升式生物反应器成功的进行了动物细胞的悬浮培养。气升式生物反应器的话优点:

- 罐内液体流动温和均匀, 产生剪切力小, 对细胞损伤较小;
- 可直接喷射空气供氧, 因而氧传递率较高;
- 液体循环量大, 细胞和养分都能均匀分布于培养液中;
- 结构简单, 利于密封并降低了造价。

常用的气升式反应器有三种: 内循环式气升式、外循环式气升式、内外循环式气升式生物反应器。

## 四、鼓泡式生物反应器

与气升式反应器相类似, 是利用气体鼓泡来进行供氧及混合, 其设计原理与气升式生物反应器也相同。

五、中空纤维生物反应器 用途较广, 既可用于悬浮细胞的培养, 又可用于贴壁细胞的培养。其原理是: 模拟细胞在体内生长的三维状态, 利用反应器内数千根中空纤维的纵向布置, 提供细胞近似生理条件的体外生长微环境, 使细胞不断生长。中空纤维是一种细微的管状结构, 管壁为极薄的半透膜, 富含毛细管, 培养时纤维管内灌流充以氧气的无血清培养液, 管外壁则供细胞黏附生长, 营养物质通过半透膜从管内渗透出来供细胞生长; 对于血清等大分子营养物, 划必须从管外灌入, 否则会被半透膜阻隔不能被细胞利用; 细胞的代谢废物也可通过半透膜渗入管内, 避免了过量代谢物对细胞的毒害作用。

优点是:

- 占地空间少;
- 细胞产量高, 细胞密度可达  $10^9$  数量级;



●生产成本低, 且细胞培养维持时间长, 适用于长期分泌的细胞。

六、生物反应器的设计和放大 设计的总体考虑是:

- ①结构严密, 能耐受蒸汽灭菌, 采用对生物催化剂无害和耐蚀材料制作, 内壁光滑无死角, 内部附件尽量减少, 以维持纯种培养需要;
- ②有良好的气-液接触和液-固混和性能和热量交换性能, 使质量与热量传递有效地进行;
- ③保证产物质量和产量前提下, 尽量节省能源消耗;
- ④减少泡沫产生, 或附有消沫装置以提高装料系数, 并有必要可靠的参数检测和控制仪表并能与计算机联机。

生物反应器的放大一种新的生物技术产品从实验室到工业生产的开发过程中, 会遇到生物反应器的逐级放大问题, 每一级约放大 10~100 倍。生物反应器的放大, 表面看来仅是一个体积或尺度放大问题, 实际上并不是那么简单。

反应器放大研究虽已提出了不少方法, 但还没有一种是普遍都能适用的。目前还只能是半理论半经验的, 即抓住反应过程中的少量关键性参数或现象进行放大。

有关氧传递问题在生物反应器中, 氧的传递速率要满足细胞对氧的摄取速率, 并使反应器中溶解氧的浓度  $CL$  要维持在一定水平上。这就是说, 在稳态情况下, 供氧与需氧间存在下列关系:  $KLa(C^*-CL)=r$

此处,  $KLa$  为氧的传递系数;  $C^*$  为相当气相氧分压的溶氧浓度,  $CL$  为培养液中溶氧浓度,  $r$  为摄氧率。

影响供氧的因素从上式可知  $r=KLa(C^*-CL)$ ; 因此影响供氧的因素总体上讲是  $KLa$  和  $C^*-CL$  值。

要增大  $C^*-CL$ , 无非是增大  $C^*$  值或降低  $CL$  值。增大  $C^*$  的措施, 有适当增加反应器中操作压力和增大气相中的氧分压两个方法。在实际操作中, 反应器保持一定正压, 以防止大气中的杂菌从轴封、阀门等处侵入, 但在增加罐压的同时, 发酵代谢所产生的  $CO_2$  也会更多地溶解于培养液而对发酵不利。至于  $CL$  值, 一般不允许过分减小, 因为细胞在生长中有一个临界氧浓度, 低于此临界值, 细胞的呼吸将受到抑制。

影响  $KLa$  的因素大致可分为三个方面: 一是反应器的结构, 包括相对几何尺寸的比例; 二是操作条件, 如搅拌功率或循环泵功率的输入量, 通气量等; 三是培养或发酵液的物理化学性质, 如流变特性, 特别是其粘度或显示粘度、表面张力、扩散系数、细胞形态、泡沫程度等。

生物反应器中的传热在细胞培养和发酵过程中, 热量的释放是普遍存在的。这是因为在培养或发酵过程中细胞与周围环境的物质产生新陈代谢, 即发生异化(分解)作用和同化(合成)作用, 而异化作用一般释放能量, 同化作用则是吸收能量。同化作用包括细胞生长、繁殖、产物形成所需能量来自细胞对培养基中的基质及营养成分的异化。从热力学角度讲, 异化所产生能量必然应多于同化所需要能量, 而多余的能量则转化为热能释放到周围环境中去。无论是涉及细胞或酶的反应中, 释放出的热量都应及时移去, 以免影响过程的正常进行, 为此在生物反应器中一般都附有冷却装置。

## 第五节 微载体培养技术 (microcarrier culture technique)

一、微载体培养应用 此技术于 1967 年被用于动物细胞大规模培养。经过三十余年的发展, 该技术目前已渐日趋完善和成熟, 并广泛应用于生产疫苗、基因工程产品等。微载体培养是目前公认的最有发展前途的一种动物细胞大规模培养技术, 其兼具悬浮培养和贴壁培养的优点, 放大容易。目前微载体培养广泛用于培养各种类型细胞, 生产疫苗、蛋白质产品, 如 293 细胞、成肌细胞、Vero 细胞、CHO 细胞。

使用较多的反应器有两种: 贝朗公司的 BIOSTAT?B 反应器, 使用双桨叶无气泡通气搅拌系统; NBS 公司的 CelliGen、CelliGen Plus<sup>TM</sup> 和 Bioflo3000 反应器, 使用 Cell-lift 双筛网搅拌系统。两种系统都能实现培养细胞和收获产物的有效分离。

二、微载体 是指直径在 60-250  $\mu\text{m}$ , 能适用于贴壁细胞生长的微珠。一般是由天然葡聚糖或者各种合成的聚合物组成。自 Van Wezel 用 DEAE-Sephadex A 50 研制的第一种微载体问世以来, 国际市场上出售的微载体商品的类型已经达十几种以上, 包括液体微载体、大孔明胶微载体、聚苯乙烯微载体、PHEMA 微载体、甲壳质微载体、聚氨酯泡沫微载体、藻酸盐凝胶微载体以及磁性微载体等。常用商品化微载体有三种: Cytodex1、2、3, Cytopore 和 Cytoline。

●微载体的大小: 增大单位体积内表面积(S/F)对细胞的生长非常有利。使微载体直径尽可能小, 最好控制在 100-200  $\mu\text{m}$  之间。

●微载体的密度: 一般为 1.03-1.05g/cm<sup>2</sup>, 随着细胞的贴附及生长, 密度可逐渐增大。

●微载体的表面电荷: 据研究, 控制细胞贴壁的基本因素是电荷密度而不是电荷性质。若电荷密度太低, 细胞贴附不充分, 但电荷密度过大, 反而会产生“毒性”效应。

### 三、微载体培养原理与操作

1.原理: 其原理是将对细胞无害的颗粒-微载体加入到培养容器的培养液中, 作为载体, 使细胞在微载体表面附着生长, 同时通过持续搅动使微载体始终保持悬浮状态。

贴壁依赖性细胞在微载体表面上的增殖, 要经历黏附贴壁、生长和扩展成单层三个阶段。细胞只有贴附在固体基质表面才能增殖, 故细胞在微载体表面的贴附是进一步铺展和生长的关键。黏附主要是靠静电引力和范德华力。细胞能否在微载体表面黏附, 主要取决于细胞与微载体的接触概率和相融性。

2. 搅拌转速: 由于动物细胞无细胞壁, 对剪切力敏感, 因而无法靠提高搅拌转速来增加接触概率。通常的操作方式是: 在贴壁期采用低搅拌转速, 时搅时停; 数小时后, 待细胞附着于微载体表面时, 维持设定的低转速, 进入培养阶段。微载体培养的搅拌非常慢, 最大速度 75r/min。

3.细胞与微载体的相融性, 是与微载体表面理化性质有关。一般细胞在进入生理 PH 值时, 表面带负电荷。若微载体带正电荷, 则利用静电引力可加快细胞贴壁速度。若微载体带负电荷, 因静电斥力使细胞难于黏附贴壁, 但培养液中溶有或微载体表面吸附着二价阳离子作为媒介时, 则带负电荷的细胞也能贴附。

4. 细胞在微载体表面的生长 影响细胞在微载体表面生长的因素很多, 主要有三个方面。

●在细胞方面, 如细胞群体、状态和类型。

●在微载体方面, 如微载体表面状态、吸附的大分子和离子; 微载体表面光滑时细胞扩展快, 表面多孔则扩展慢。

●在培养环境中, 如培养基组成、温度、pH、DC 以及代谢废物等均明显影响细胞在微载体上的生长。如果所处条件最优, 则细胞生长快; 反之生长速度慢。

### 5. 微载体培养操作要点

●培养初期: 保证培养基与微球体处于稳定的 PH 与温度水平, 接种细胞(对数生长期, 而非稳定期)至终体积

1/3 的培养液中,以增加细胞与微载体接触的机会。不同的微载体所用浓度及接种细胞密度是不同的。常使用 2-3g/L 的微载体含量,更高的微载体浓度需要控制环境或经常换液。

●贴壁阶段(3-8d)后,缓慢加入培养液至工作体积,并且增加搅拌速度保证完全均质混合。

●培养维持期:进行细胞计数(胞核计数)、葡萄糖测定及细胞形态镜检。随意细胞增殖,微球变得越来越重,需增加搅拌速率。经过 3d 左右,培养液开始呈酸性,需换液:停止搅拌,让微珠沉淀 5min,弃掉适宜体积的培养液,缓慢加入新鲜培养液(37℃),重新开始搅拌。

●收获细胞:首先排干培养液,至少用缓冲液漂洗 1 遍,然后加入相应的酶,快速搅拌(75-125r/min)20-30min。然后解离收集细胞及其产品。

●微载体培养的放大:可以通过增加微载体的含量或培养体积进行放大。使用异倍体或原代细胞培养生产疫苗、干扰素,已被放大至 4000L 以上。

四、微载体大规模细胞培养的生物反应器系统 此技术大规模培养,细胞扩增的效率受到诸多因素的影响和限制,其中主要的限制性因素包括:细胞对剪切力的敏感性、氧的传递以及传代和扩大培养等。而研制的各种类型生物反应器系统则可针对上述限制性因素,为微载体细胞培养与扩增提供低剪切力、高氧传递效率、易于细胞传代等适宜的外部环境。已较多使用的微载体培养系统生物反应器,可以实行计算机控制操作,培养搅拌速度及悬浮均匀程度、温度变化、PH 稳定及溶氧供应( $O_2$ 、 $N_2$ 、 $CO_2$ 、空气四种纯化气体按比例调节)、罐压、培养体积和通气量等参数全部由电脑自动控制。因此,应用生物反应器系统进行微载体细胞大规模扩增具有明显优势,目前国外相继研制了数种适合进行微载体大规模细胞培养的生物反应器系统,如搅拌式生物反应器系统、旋转式生物反应器系统以及灌注式生物反应器系统等。

1、搅拌式生物反应器系统 搅拌式生物反应器系统在微载体细胞大规模扩增研究领域已有较长的研究历史,但因该细胞培养系统容易产生过大的剪切力,从而限制了其应用范围。尽管如此,由于该系统具有简单、实用及价格低廉等特点,国内外仍有不少应用该系统成功进行细胞大规模扩增的研究报道。例如, Werner A (2000 年)成功地在该系统内进行了肝细胞大规模扩增的研究。

2、灌注式生物反应器系统 灌注培养是目前研究热点之一。它的特点是不断地加入新鲜培养基以及不断地抽走含细胞代谢废物的消耗培养基,使细胞得以在一个相对稳定的生长环境内增殖,即省时省力,又减少了细胞发生污染的机会,且可以提高细胞密度 10 倍以上。

3、旋转生物反应器 近年来,旋转生物反应器系统(RCCS)已经成为应用微载体技术进行细胞大规模扩增的一种较常用细胞培养系统。该系统是基于美国航空航天局为模拟空间微重力效应而设计的一种生物反应器。RCCS 既可以用于微载体大规模细胞培养,又能在其内培育细胞与支架形成的三维空间复合体。至今,近百种组织细胞均在该系统内成功进行了大规模扩增。

## 五、微载体培养优点

●表面积/体积(S/V)大,因此单位体积培养液的细胞产率高;

●把悬浮培养和贴壁培养融合在一起,兼有两者的优点;

●可用简单的显微镜观察细胞在微珠表面的生长情况;

●简化了细胞生长各种环境因素的检测和控制,重现性好;

●培养基利用率较高;

●放大容易;

●细胞收获过程不复杂;

●劳动强度小;

●培养系统占地面积和空间小。

## 第五章 常见组织细胞的培养方法

体内组织细胞在体外培养时,所需培养环境基本相似,但由于物种、个体遗传背景及所处发育阶段等的不同,各自要求条件有一定差别,所采取的培养技术措施亦不尽相同,现介绍个别组织细胞培养的要点如下:

### 第一节 上皮细胞培养

上皮细胞包括腺上皮是很多器官如肝、胰、乳腺等的功能成分,又由于癌起源于上皮组织,故上皮细胞培养特别受到重视。但上皮细胞培养中常混杂有成纤维细胞,培养时生长速度往往超过上皮细胞,并难以纯化,同时上皮细胞难以在体外长期生存,因此纯化和延长生存时间是培养关键。

体内上皮细胞生长在胶原构成的基膜,因此培养在有胶原的底物上可能利于生长,另外人或小鼠表皮细胞培养在以3T3细胞为饲养层(用射线照射后)时,细胞易生长并可发生一定程度的分化现象。降低PH、Ca<sup>2+</sup>含量和温度,向培养基中加入表皮生长因子,均有利于表皮细胞生长。

以表皮细胞为例,用皮肤表皮和真皮分离培养法可获得纯上皮细胞,其法如下(黑木凳志夫 1981)

- 1、取材: 外科植皮或手术残余皮肤小块, 早产流产儿皮肤更好, 取角化层薄者, 切成0.5—1平方厘米小块。
- 2、置0.02%EDTA中, 室温, 5分钟。
- 3、换入0.25%胰蛋白酶中, 4℃过夜。
- 4、分离: 取出皮块, 用血管钳或镊子将表皮与真皮层分开。
- 5、取出表皮, 剪成更小的块后, 置0.25%胰酶中, 37℃, 30—60分钟。
- 6、反复吹打, 制成悬液。
- 7、培养: 用80目不锈钢纱网滤过后, 低速离心, 吸去上清。
- 8、直接加入培养基(Eagle加20%小牛血清)制成细胞悬液, 接种入培养瓶, CO<sub>2</sub>温箱培养。

### 第二节 内皮细胞培养

内皮细胞易于从大血管分离培养成单层细胞, 对于研究内皮细胞再生、肿瘤促血管生长因子(TAF)等有很大价值。

研究人内皮细胞培养以人脐带静脉灌流消化法最为简便, 其法如下:



- 1、产后新鲜脐带，无菌剪取 10—15 厘米长一段，如不能立即培养，可于 12 小时内保存于 4℃。
- 2、用三通注射器吸取温 PBS 液注入脐静脉中洗去残血，在入口处用线绳扎紧，以防液体返流。
- 3、用血管钳夹紧脐带一端，从另一端向脐静脉中徐徐注入终浓度为 0.1%的粗制胶原酶，充满血管，消化 3—10 分钟；注入口用线绳扎，以防液体返流。
- 4、吸出含有内皮细胞的消化液，于离心管中，注入温 PBS 轻轻反复冲洗后，一并注入离心管中（此步骤可重复）。
- 5、离心去上清，加入 RPMI1640 培养液制成细胞悬液，接种入培养器皿中，置温箱培养。两至三天可见细胞长成单层。

### 第三节 神经细胞培养

神经细胞（神经元）不易培养，只有在适宜情况下，如接种在胶原底层上，或加入神经生长因子和胶质细胞因子时，可出现一定程度的分化，长出突起等现象，但很难使之增值。而神经胶质细胞是神经组织中比较容易培养的成分。

人、鼠等脑组织即可用于神经胶质细胞培养，不仅能获得生长的胶质细胞，也可形成能传代的二倍体细胞系。一般说来，胶质细胞在培养中生长不稳定，不易自发转化，但对外界因素仍保持很好的敏感性，可用 ROUS 病毒和 SV4 等诱发转化。

一. 设备： 无菌操作设备。

二. 大型设备 CO<sub>2</sub> 培养箱：恒温 5%、10%CO<sub>2</sub> 维持培养液中 pH 值。

倒置显微镜：用于每天观察贴壁细胞生长情况。

解剖显微镜，用于准确地取材。

常温冰箱：-4℃，用于保存各种培养液，解剖液和鼠尾胶。

低温冰箱：-20℃--80℃，用于储存血清酶，贵重物品和试剂。

电热干烤箱：用于消毒玻璃器皿。

高压消毒锅：用于消毒培养皿，手术器械。

过滤器：配制解剖液、培养液，必须过滤后才可使用，以去除细菌。

渗透压仪，pH 剂，天平等。

三. 培养器皿及手术器械

1 培养皿：常用 35mm 塑料及玻璃皿，解剖取材用 15mm-90mm 直径。

2 培养板, 24-40 孔, 可用于开放培养。

3 培养瓶:

4 吸管, 常用 1, 5, 10ml, 均需泡酸、洗涤、灭菌后方可使用。

5 各类培养液贮存器。

6 小型手术器械。

准备:

#### 一 配制培养液

(1) 解剖液: 以无机盐 (去除  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) 加葡萄糖配制成 PBS 缓冲液, 保持一定的渗透压和 pH 值。

(2) 基础培养基 (MEM): 主要为多种氨基酸, 加入葡萄糖, 双蒸馏水溶解。

(3) 接种培养液: 用于胰酶消化后的细胞分散, 做成细胞悬液, 其成分为 MEM 含 1% 谷氨酰胺, 另加入 10% 马血清, 当天配制。

(4) 维持培养液: 接种后 24h, 全部换成此液, 后每 2 周换一次, 每次换 1/2。其成分为 MEM 中含 5% 马血清, 1% 谷氨酰胺, 及适量的支持性营养物质。

#### 二 培养基质 常用鼠尾胶、小牛皮胶, 多聚赖氨酸, 再涂胶

三消毒培养皿的备用。所有培养器皿均需清水冲洗 2-3d, 达两次 ddH<sub>2</sub>O, 每遍洗刷 3-4 次, 加塞包装, 置于烤箱中干燥消毒, 于培养前 1 天进行。

#### 神经细胞分散培养

(一) 选材 常用胚胎动物或新生鼠神经组织。鸡胚常用胚龄 6-8d, 新生鼠或胎鼠 (12-14d) 或人胚胎。不过也有认为与组织相关。如大白鼠胚胎以 19d 为宜, 小鼠以 18d 为宜, 大鼠纹状体以 10d 为宜; 若纹状体与黑质联合培养的大鼠胚, 则黑质以 13d, 纹状体 18-21d 为宜; 小脑以 20-21d 小鼠胚胎, 所获蒲氏细胞成活率高, 颗粒细胞正在分化; 脊髓与 DRG 联合培养, 常用 4-7d 鸡胚或 12-14d 小鼠胚胎, 取材易, 神经成活率高。

(二) 取材。脑则取出相应组织, 在解剖液中先剪碎, 以使胰酶消化。脊髓则固定于琼脂板上, 用小刀将其要成背腹两侧, 分别培养。

(三) 细胞分离与接种。神经组织用 0.125-0.25% 胰蛋白酶在 37℃ 孵育 30min, 移入接种液, 停止消化, 并洗去胰蛋白酶液, 用细口吸管吹打细胞悬液, 使其充分分散, 如此多次, 待沉淀后吸出上层细胞悬液, 计数, 预置细胞密度, 接种于培养皿 ( $1 \times 10^6$ ), 做电生理应为  $5 \times 10^5$  或更低。

(四) 抑制胶质细胞生长。培养 3-5d 后, 也有人认为培养 7d 后, 用阿糖胞苷, 或 5-FU 抑制神经胶质细胞的生长。

(五) 观察。接种 6-12h, 开始贴壁, 并有集合现象, 细胞生长突起明显, 5-7d 胶质细胞增生明显, 7-10d 胶质细胞成片于神经细胞下面, 形成地毯, 2 周时神经细胞生长最丰满, 四周晕光明显, 一个月后, 有些神经细胞开始退化, 变形, 甚至出现空泡, 一般培养 2-4 周最宜。

但神经细胞只能增大, 而不能增殖, 只能原代, 不能传代, 不会有细胞周期, 而且随培养时间的延长, 细胞数量在下降, 但胶质细胞可以, 神经胶质细胞也可以。在培养过程中, 早期 9-12d 时, 有较多的神经细胞死亡, 这是第一次死亡阶段, 应注意保持条件的恒定。在此之后存活下去的细胞一般突起长而多, 且相互形成突触。

(六) 常用培养细胞实验有: FCM 的蛋白总量分析; 膜片钳与离子通道的分析; 免疫组化分析;

但免疫组化分析应注意, 由于抗体直接作用于活细胞, 不易穿透活细胞, 故对核内抗原定位时, 首先考虑膜对抗体的通透性问题。常用化学试剂以增加其通透性或采用冰冻方法解决。

在免疫组化中, 或其它组织学染色中, 常用不同的染色方法以区分不同细胞, 如半乳糖脑苷脂对小树突胶质细胞标记明显; GFAP 对星形胶质细胞具有特异性染色等。这对研究神经系统中胶质细胞功能具有极大的应用价值。神经胶质细胞以往多被忽视, 其在脑血管疾病(如缺血性损伤)、退行性疾病(如 AD、PD)、损伤后胶质细胞的填充等具有不可忽视的作用。它也是神经细胞功能和营养支持的物质基础。

#### 第四节 肌组织细胞培养

各种肌组织均可用于培养, 以心肌和骨骼肌较实用。

##### (一) 骨骼肌细胞培养

- 1、出生 1—2 天的乳鼠, 引颈处死。
- 2、无菌取大腿肌组织, 切成 0.3—0.5cm<sup>2</sup> 小块后, 用不含钙镁离子的 Hanks 液配的 0.25% 胰蛋白酶消化, 无菌纱布或纱布滤过。
- 3、计数调整细胞密度。
- 4、快接种量  $2 \times 10^6$ /皿入培养基培养。
- 5、培养基内含 10% 小牛血清, 可加 1% 的胎汁以促进分化。

接种在胶原或胶原的底物上能促进细胞分化, 明胶配置: 用 Hanks 液配成 0.01% 明胶。

该细胞接种率约 50%, 细胞生长开始呈纺锤形, 培养 50—52 小时后出现融合形成肌细胞状多核纤维。数日后融合停止, 此时可观察到横纹, 一般在融合后二、三天内能见到收缩现象。

##### (二) 心肌细胞培养

心肌细胞是最早的培养材料, Carrel 曾长期培养过心肌组织, 至今心肌仍不失为好的培养物, 最常用的是鸡胚心肌。

心肌比较容易培养和生长, 可用悬滴培养、组织块培养和消化培养法, 均可获良好的效果。取心室肌培养较好, 原代培养的鸡胚心肌呈纺锤形, 培养成功时, 一周后可见节律性收缩现象。

## 第五节 巨噬细胞培养

巨噬细胞属免疫细胞, 有多种功能, 是研究细胞吞噬、细胞免疫和分子免疫学的重要对象。巨噬细胞容易获得, 便于培养, 并可进行纯化。巨噬细胞属不繁殖细胞群, 在条件适宜下可生活 2—3 周, 多用做原代培养, 难以长期生存。

巨噬细胞也建有无限细胞系, 大多来自小鼠, 如 P331、S774A.1、RAW309Cr.1 等, 均获恶性, 培养中呈巨噬细胞形态和吞噬功能, 易于传代和瓶壁分离, 但难以建株。

培养巨噬细胞可用各样方法和各种来源来获取细胞, 以小鼠腹腔取材法最为实用, 其法如下:

- 1、实验前三天, 向小鼠腹腔内注入无菌硫羟乙酸肉汤 1ml (勿注入肠内!), 以刺激产生大量的巨噬细胞。
- 2、引颈处死小鼠。
- 3、手提鼠尾将其全浸入 70% 乙醇中 3—5 秒。
- 4、置动物于解剖台, 用针头固定四肢, 持镊撕开腹部皮肤, 但勿伤及腹膜壁, 把皮肤拉向上下两侧, 暴露出腹膜壁。
- 5、用 70% 酒精擦洗腹膜壁, 注射器吸 10ml Eagle 液注入腹腔中, 同时用手指从两侧压揉腹膜壁, 使液体在腹腔内流动。
- 6、用针头轻挑起腹壁并微倾向一侧, 使腹腔中液体集中于针头下吸取入针管内。
- 7、小心拔出针头, 把液体注入离心管。
- 8、4℃ 下 250g 离心 10 分钟后, 去上清, 加 10ml Eagle 培养基。
- 9、计数细胞。每只鼠可产生 20—30×10<sup>6</sup> 细胞, 其中 90% 为巨噬细胞。
- 10、以 3×10<sup>5</sup> 个贴附细胞/平方厘米接种。
- 11、接种数小时后, 除去培养液, 可去除其它白细胞, 纯化培养细胞, 用 Eagle 液冲洗 1—2 次, 再加新 Eagle 培养液置 CO<sub>2</sub> 温箱中。

## 第六节 肾小球分离、移植培养



SD 大鼠颈椎脱臼法处死, 75%乙醇浸泡 1~2 分钟, 2 次, 置超净台内, 打开腹腔取出肾脏剪碎, 置含 Hank's 液的无菌培养皿洗涤, 置 80 目不锈钢筛网上。用扁平自制小铲轻轻碾磨产物微小组织透过筛网, 滤过组织 Hank's 液混合物用吸管吸至 120 目不锈钢筛网, 滤过, 去小组织块, 滤过物吸至 200 目不锈钢筛网, 轻轻滤过, Hank's 液洗涤 1 次, 收集网上肾小球, 镜下观察为分离良好的肾小球。

肾小球用 0.2%胰酶、0.1%胶原酶, 37℃消化 20 分钟, 加血清终止胰酶反应, 离心除去胶原酶。处理过的肾小球计数后接种至 24 孔培养板或 25ml 培养瓶, 使肾小球大于 60 个/cm<sup>2</sup>, 加培养基 5~10ml (培养基组成: F12—3T3 血清 1: 1; 5%马血清; 2.5%胎牛血清; 胰岛素 5 μg/ml; 25ng/ml 氢化可的松; 5 μg/ml 转铁蛋白; 25ng/ml 前列腺素 E1; 甲状腺素 0.02ng/ml; D-缬氨酸 150ng/ml) 肾小球培养 8~10 天, 去除肾小球未生长组分, 细胞继续培养 24 小时, 形态学观察: 细胞生长成单层多角型细胞, 直径约 100 μm。

## 第七节 裸小鼠移植瘤单细胞分离培养

无菌条件下取出小鼠移植瘤组织, 剪成 1mm<sup>3</sup> 小块, 用 0.5%胶原酶室温消化 30 分钟到 1 小时, 再加等体积 0.2%胰酶消化 5~8 分钟, 在消化过程中用吸管吹打组织块或用自制装置 (分别作为加样和收集器的两个注射器中间加一小滤器连接而成, 滤器中间垫两层丝质材料以隔断组织块与单细胞) 来回推动注射器吹打组织以分离单细胞, 终止酶消化方法同上。

常规方法接种培养收获细胞。

## 第六章 肿瘤细胞的培养

肿瘤细胞在组织培养中占有核心的位置, 首先癌细胞是更容易培养的细胞。当前建立的细胞系中癌细胞系是最多的。另外肿瘤对人类是威胁最大的疾病。肿瘤细胞培养是研究癌变机理、抗癌药检测、癌分子生物学极其重要的手段。肿瘤细胞培养对阐明和解决癌症将起着不可估量的作用。

### 一、组织培养肿瘤细胞生物学特性

肿瘤细胞与体内正常细胞相比, 不论在体内或在体外, 在形态、生长增值、遗传性状等方面都有显著的不同。生长在体内的肿瘤细胞和在体外培养的肿瘤细胞, 其差异较小, 但也并非完全相同。培养中的肿瘤细胞具以下突出特点:

#### (一) 形态和性状

培养中癌细胞无光学显微镜下特异形态, 大多数肿瘤细胞镜下观察比二倍体细胞清晰, 核膜、核仁轮廓明显, 核糖体颗粒丰富。电镜观察癌细胞表面的微绒毛多而细密, 微丝走行不如正常细胞规则, 可能与肿瘤细胞具有不定向运动和锚着不依赖性有关。

#### (二) 生长增殖

肿瘤细胞在体内具有不受控增殖性, 在体外培养中仍如此。正常二倍体细胞在体外培养中不加血清不能增殖, 是因

血清中含有很细胞增殖生长的因子,而癌细胞在低血清中(2%~5%)仍能生长。已证明肿瘤细胞有自泌或内分泌性产生促增殖因子能力。正常细胞发生转化后,出现能在低血清培养基中生长的现象,已成为检测细胞恶变的一个指标。癌细胞或培养中发生恶性转化后的单个细胞培养时,形成集落(克隆)的能力比正常细胞强。另外癌细胞增殖数量增多扩展时,接触抑制消除,细胞能相互重叠向三维空间发展,形成堆积物。

### (三) 永生性

永生性也称不死性。在体外培养中表现为细胞可无限传代而不凋亡(Apoptosis)。体外培养中的肿瘤细胞系或细胞株都表现有这种性状,体内肿瘤细胞是否如此尚无直接证明。因恶性肿瘤终将杀死宿主并同归于尽,从而难以证明这一性状的存在。体外肿瘤细胞的永生性是否能反证它在体内时同样如此?也尚难肯定。从近年建立细胞系或株的过程说明,如果永生性是体内肿瘤细胞所固有的,肿瘤细胞应易于培养。事实上,多数肿瘤细胞初代培养时并不容易。生长增殖并不旺盛;经过纯化成单一化瘤细胞后,也大多增殖若干代后,便出现类似二倍体细胞培养中的停滞期。过此阶段后才获得永生性,顺利传代生长下去。从而说明体外肿瘤细胞的永生性有可能是体外培养后获得的。从一些具有永生性而无恶性性的细胞系,如NIH3T3、Rat-1、10T1/2等细胞证明,永生性和恶性(包括浸润性)是两种性状,受不同基因调控,但却有相关性。可能永生性是细胞恶变的阶段。至少在体外是如此。

### (四) 浸润性

浸润性是肿瘤细胞扩张性增殖行为,培养癌细胞仍持有这种性状。在与正常组织混合培养时,能浸润入其它组织细胞中,并有穿透人工隔膜生长的能力。

### (五) 异质性

所有肿瘤都是由有增殖能力、遗传性、起源、周期状态等性状不同的细胞组成。异质性构成同一肿瘤内细胞的活力有差别的瘤组织;处于瘤体周边区的细胞获得血液供应多,增殖旺盛,中心区有的细胞衰老退化,有的处于周期阻滞状态,那些呈活跃增殖状态的细胞称干细胞(Stem Cells)、只有这些干细胞才是支持肿瘤生长的成分。肿瘤干细胞培养时易于生长增殖;把干细胞分离出来的培养方法称干细胞培养。

### (六) 细胞遗传

大多数肿瘤细胞有遗传学改变,如失去二倍体核型、呈异倍体或多倍体等。肿瘤细胞群常由多个细胞群组成,有干细胞系和数个亚系,并不断进行着适应性演变。

### (七) 其它

肿瘤细胞在体外不易生长的原因可能由于:

①依赖性:肿瘤细胞虽有较强克隆生长力,但仍有一定的群体性或与其它细胞相依存关系。一是肿瘤细胞与肿瘤细胞的相互依存,二是肿瘤细胞与基质成纤维细胞的依赖。体外分散培养和排除成纤维细胞后也会同时消除或减弱这些依存关系,可能影响癌细胞增殖生长的活性;

②肿瘤细胞的自泌也会因分散培养而被稀释,达不到肿瘤生长的需求,降低肿瘤细胞的生长增殖力;

③并非所有肿瘤细胞都有强的生长活力和长的 Life Span,只有干细胞才有强的增殖生长能力,但这些细胞数量很

少；

④离体培养肿瘤细胞可能需求与体内相似的特殊生存条件。

二、培养方法

肿瘤细胞培养成功关键在于：取材、成纤维细胞的排除、选用适宜的培养液和培养底物等几个方面。在具体培养方法方面，肿瘤细胞培养与正常组织细胞培养并无原则差别，初代培养应用组织块和消化培养法均可。

1. 取材：

人肿瘤细胞来自外科手术或活检瘤组织。取材部位非常重要，体积较大的肿瘤组织中有退变或坏死区，取材时尽量避免用退变组织，要挑选活力较好的部位。癌性转移淋巴结或胸腹水是好的培养材料。取材后宜尽快进行培养，如因故不能立即培养，可贮存于 4℃ 中，但不宜栽过 24 小时。

2. 培养基：

肿瘤细胞对培养基的要求不如正常细胞严格，一般常用的 RPMI1640、DMEM、Mc-Coy5A 等培养基等皆可用于肿瘤细胞培养。肿瘤细胞对血清的需求比正常细胞低，正常细胞培养不加血清不能生长，肿瘤细胞在低血清培养基中也能生长。肿瘤细胞对培养环境适应性较大，是因肿瘤细胞有自泌（Autocrine）性产生促生长物质之故。但这并不说明肿瘤细胞完全不需要这些成分。按不同细胞需要不同的生长因子；肿瘤细胞与正常细胞之间、肿瘤细胞与肿瘤细胞之间对生长因子的需求都存在着差异。但大多数肿瘤细胞培养中仍需要生长因子。有的还需特异性生长因子（如乳腺癌细胞等）。总之培养肿瘤细胞仍需加血清和相关生长因子培养更易成功。

3. 成纤维细胞的排除：

成纤维细胞常与肿瘤细胞同时混杂生长，致难以纯化肿瘤细胞。而且成纤维细胞常比肿瘤细胞生长得快，最终能压制肿瘤细胞的生长。因此排除成纤维细胞成为肿瘤细胞培养中的关键。排除成纤维细胞有多种方法（表 2—1）。

表 2—1 抑制成纤维细胞生长因素

方法	因素	组织细胞
选择性附着	胰蛋白酶	胚胎小肠、心肌、表皮
选择性附着底物	胶原酶	乳癌
	聚丙烯酰胺	各种肿瘤
	聚四氟乙烯（Teflon）	转化细胞
	胶原（猪皮）	表皮细胞
汇合饲细胞层	小鼠 3T3	表皮
	人胎小肠	正常和恶性乳腺上皮
选择性培养基	D-缬氨酸（Valine）	结肠癌
	MCDB-710	肾组织
	MCDB-153	乳腺
	Phenobarbitone	表皮
		肝细胞

注：上表结果为个别实验室经验，仅供参考

### 三、成纤维细胞排除法

#### 1 机械刮除法:

是用不锈钢丝末端插有橡胶刮头（用胶塞剪成三角形插以不锈钢丝）、或裹少许脱脂棉制成，装入试管中高压灭菌后备用（也可用特制电热烧灼器刮除）。刮除程序为：

- （1）标记：镜下观察，用不脱色笔在培养瓶皿的背面圈下生长肿瘤细胞的部位；
- （2）刮除：弃掉培养液，把无菌胶刮伸入瓶皿中，肉眼或显微镜窥视下，刮除无标记空间；
- （3）用 Hanks 液冲洗一两次，洗除被刮掉的细胞；
- （4）注入培养液继续培养，如发现仍有成纤维细胞残留，可重复刮除至完全除掉为止

#### 2. 反复贴壁法:

根据肿瘤细胞比成纤维细胞贴壁速度慢的特点，并结合使用不加血清的营养液，把含有两类细胞的细胞悬液反复贴壁，使两类细胞相互分离，操作方法与传代相同。

（1）待细胞生长达一定数量后，倒出旧培养液，用胰酶消化后，Hanks 冲洗 2 次，加入不含血清的培养液，吹打制成细胞悬液；

（2）取编号为此 A、B、C 三个培养瓶；首先把悬液接种入 A 培养瓶中。置温箱中静止培养 5~20 分钟后，轻轻倾斜培养瓶，让液体集中瓶角后慢慢吸出全部培养液，再接种入 B 培养瓶中后；向 A 瓶中补充少许完全培养液置温箱中继续培养；

（3）培养 B 瓶中细胞 5~20 分钟后，按处理 A 的方法，把培养液注入 C 培养瓶中；再向 B 瓶中补加完全培养基。当三个瓶内都含有培养液后，均在温箱中继续培养。如操作成功，次日观察可见 A 瓶主要为成纤维细胞，B 瓶两类细胞相杂，C 瓶可能主要为癌细胞。必要时可反复处理多次，直至癌细胞纯化为止。

#### 3. 消化排除法:

此法曾用于乳癌细胞的培养，具体程序是：

（1）先是用 0.5%胰蛋白酶和 0.02%EDTA（1：1）混合液漂洗培养细胞一次，然后再换成新的混合液继续消化，并在倒置显微镜下窥视和不时摇动培养瓶，到半数细胞脱落下来后，便立即停止消化；

（2）把消化液吸入离心管中，离心去上清，吸入另瓶中，加培养液置温箱中培养；向原瓶内也补加新的培养液继续培养。用此法处理后，成纤维细胞比肿瘤细胞易先脱落。经过几次反复处理，可能把成纤维细胞除净。

#### 4. 胶原酶消化法:



本法是利用成纤维细胞对胶原酶较为敏感的特点, 通过消化进行选择。

(1) 可用 0.5mg/ml 的胶原酶消化处理, 边消化边在倒置显微镜下窥视, 当发现成纤维细胞被除掉后, 即终止消化;

(2) 用 Hanks 洗涤处理一次后, 更换新培养液, 继续培养, 可获纯净肿瘤细胞。如成纤维细胞未被除净, 可再次重复。

#### 5. 其它方法:

有人发现聚丙烯酰胺有抑制成纤维细胞生长的作用; 也有人用聚蔗糖制备成比重 1.025~1.085 的密度梯度离心液, 加入细胞悬液后, 在 23℃ 中 800g 离心 10 分钟。在比重 1.025~1.050 层为成纤维细胞, 在比重 1.050~1.085 层为上皮细胞, 再经过分离进行培养。最近也有人应用特殊化学物如 SOD 抑制成纤维细胞生长的方法。

选用上述任何一种方法, 都需进行试验, 取得必要经验, 找出适合的条件, 才能获得好的效果。

### 四、提高肿瘤细胞培养存活率和生长率措施

根据人们的经验, 肿瘤细胞在体外不易培养, 建立能传代的肿瘤细胞系更为困难。当肿瘤组织或细胞初代接种培养后, 常出现以下几种情况:

完全无细胞游出或移动;

有细胞移动和游出, 但无细胞增殖, 细胞长时间处于停滞状态以致难以传代;

有细胞增殖, 传若干代后停止生长或衰退死亡;

传数代后细胞增殖缓慢, 经过一段停滞期后, 才又呈旺盛生长状态, 形成稳定生长的肿瘤传代细胞系。

以上现象说明肿瘤细胞对体外生存条件有较高的要求, 并需经过对新环境的适应才能生长, 因此欲获得好的培养效果, 不能局限于一般培养法, 必须采用一些特殊的措施。

1. 适宜底物: 把经过纯化的细胞接种在不同的底物上, 如鼠尾胶原底层、饲细胞层等。

2. 生长因子: 应用促细胞生长因子, 向培养液中增加一种或几种促细胞生长因子。根据细胞种类不同选用不同的促生长物, 常用有胰岛素、氢化可的松、雌激素以及其它生长因子。

为提高肿瘤细胞对体外培养环境的适应力和增加有活力癌细胞(干细胞)的数量, 可采用动物体转嫁接种成瘤后, 再从动物体内取出进行培养, 能提高体外培养的成功率。受体动物以裸鼠最好。

#### 3. 动物体媒介培养方法:

(1) 瘤块接种: 取新鲜瘤组织, 用 Hanks 液洗净血污, 切成 1~3 毫米小块, 用穿刺针头吸一小瘤块, 用酒精棉球擦拭动物腹部后, 直接刺入皮下, 注入瘤块;

(2) 饲养观察, 待肿瘤生长达较大体积后, 剥取出瘤组织;

(3) 进行体外培养。

(4) 为防止失败, 仍取部分瘤组织继续在裸鼠体内传代。通过裸鼠媒介接种, 有活力的肿瘤细胞数量增多, 细胞培养易于成功。

肿瘤细胞培养方法与培养正常细胞完全相同, 但成功率比正常细胞高。

## 五、体外培养肿瘤细胞生物学检测

一旦培养的肿瘤细胞生长成形态上单一的细胞群体或细胞系(或株)后, 不论用于实验研究还是建立细胞系, 都需要做一系列的细胞生物学测定, 主要的目的在于求得证明:

所培养的细胞系的确来源于原体内具有恶性的细胞, 而非正常细胞或其它细胞。均具有瘤种特异性。阐明一般生物学性状。测定项目数量无明确规定, 根据需要而定, 以下为常做的项目和要点。

**【形态观察】**主要观察细胞的一般形态, 如大体形态、核浆比例、染色质和核仁大小、多少等以及细胞骨架微丝微管的排列状态等。

**【细胞生长增殖】**检测细胞生长曲线、细胞分裂指数、倍增时间、细胞周期时间。

**【细胞核型分析】**检测核型特点, 染色体数量、标记染色体的有无、带型等。

**【凝集试验】**检测凝集力。

**【软琼脂培养】**检测集落形成能力。

**【异体动物接种】**向异体动物体内(皮下)接种细胞悬液, 观察成瘤能力。

**【其它】**除上述项目外, 根据需要还可做同位素标记、组织化学成分分析, 荧光显微镜观察等。

在上述肿瘤细胞生物学检测中, 最主要的为: 异体动物(以用裸鼠为上)接种成瘤、软琼脂培养、核型分析、细胞骨架和电镜观察等几项。当然从分子细胞学角度考虑尚应做癌基因和抗癌基因等的检测, 这些项目将在本书第二篇中介绍。

## 六、对肿瘤细胞系或细胞株的评价

已建成的各种肿瘤细胞系或细胞株, 无疑都是可用的实验对象。近年我国已建成的肿瘤细胞系已非常多, 并获得越来越广泛的应用。但根据研究者的经验, 在使用这些细胞系时, 应持特别审慎态度, 主要是应考虑到这些细胞在长期传代中有否发生遗传性改变的可能。众所周知, 长期传代细胞系染色体核型常是不稳定的。另外也可能发生如基因突变、基因易位或缺失等变化。其结果可能导致细胞产生生物学性状上的变动。以近年建成的各种肿瘤细胞系为例, 都已传代少则几十, 多则百代以上后, 才确认建成了细胞系。这种情况下很难保证细胞从初代到建成时的性状

仍是一致的。

已如前述，癌细胞在培养中并非能很顺利地传下去，凡已长期传代的细胞系，都已获得不死性。当前尚未完全确证所有癌细胞都具有不死性；因此尚难肯定在长期培养中的癌细胞的生物学性状与体内时仍完全相同（包括不死性）。据上述对用癌细胞系所获实验结果应尽量做分析性的结论，避免做概括性的与体内等同的结论，外推与体内等同更是不妥的。广泛来说，应用各种较长时间培养细胞做实验时，都应如此。