

YIYONG XIBAO GONGCHENG
SHIYAN ZHIDAO

医用细胞工程 实验指导

■ 盛伟华 谢宇锋 龚爱华 编著

杨吉成 主审



化学工业出版社

YIYONG XIBAO GONGCHENG
SHIYAN ZHIDAO

医用细胞工程 实验指导

■ 盛伟华 谢宇锋 龚爱华 编著

杨吉成 主审



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是根据“细胞工程”专业课程的要求而编写的实验指导,全书包括细胞培养的基本知识、细胞培养的准备工作和正常细胞的培养技术和细胞培养的相关实验技术等 33 个实验,重点讲解实验过程中的基本原理、实验方法与步骤。

本实验指导与课程结合紧密,讲解清楚明了,可用作医学、生物学等专业的实验教材,也可供相关实验人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

医用细胞工程实验指导/盛伟华,谢宇锋,龚爱华编
著. —北京:化学工业出版社,2007.11

ISBN 978-7-122-01377-4

I. 医… II. ①盛…②谢…③龚… III. 医学工程:
细胞工程-实验-基本知识 IV. R318-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 164156 号

责任编辑:丁尚林

文字编辑:俞方远

责任校对:宋 夏

装帧设计:史利平

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装:北京市彩桥印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 7 $\frac{3}{4}$ 字数 144 千字 2008 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686)

售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:19.00 元

版权所有 违者必究

前 言

医学研究中泛指体外培养包括细胞培养、组织培养和器官培养。细胞培养是指用机械或化学的方法将组织分散成单个细胞而进行的培养。细胞培养方式分两种：①群体培养 (mass culture)，即将大量细胞置于培养瓶中，使其贴壁或悬浮生长，形成均匀的单层细胞或单细胞悬液；②克隆培养 (clone culture)，即将少数的细胞加入培养瓶中，贴壁后彼此间隔距离较远，经过繁殖每一个细胞形成一个集落，称为克隆。细胞培养可建细胞系和细胞株。在培养瓶中，组织失散，只有细胞和派生细胞的关系，最后获得单层或悬浮细胞培养物。组织块培养 (tissue culture) 是指把活体的组织取出分成小块，直接置于培养瓶底或通过胶原纤维血浆支持物的培养瓶底进行培养。其特点是：组织不失散，细胞保持原有的组织关系。培养的结果是细胞从组织块周围长出，形成生长晕 (cut growth) 或形成由扁薄细胞构成的单层细胞培养物。当细胞由组织向外迁移时，组织功能逐渐消失。由于这些培养物的主要成分均属细胞，而这些细胞在体外生长时，仍然是相互依存、互相影响的。因此，细胞培养与组织培养实际上区别不大。器官培养 (organ culture) 是将活体中器官或器官的一部分取出，在体外生长、生存，并使其保持器官原有的结构和功能特征的培养。其特点是：培养的器官在合适的条件下能生长和分化，存活数周或 1 年。器官培养的培养物用肉眼及显微镜观察均受限，只能用制作组织切片的方法观察或用透射电镜、扫描电镜观察。此种培养方法与细胞或组织培养有区别。

细胞或组织培养既是一种技术，也是一门科学。细胞或组织培养研究的对象是活的细胞，研究的条件可以人为地控制，研究的样本可以达到较好的均一性，研究的内容便于观察、检测和记录，研究的范围比较广泛，研究的费用相对较经济。因此被培养的组织或细胞是非常好的实验对象，被广泛应用于医学研究、生

物技术、基因工程研究等。随着细胞培养技术和其他技术的发展,医学和生物学研究将取得更大的成就。

本书是根据“细胞工程”专业课程的要求而编写的实验指导,全书包括细胞培养的基本知识、细胞培养的准备工作、正常细胞的培养技术和细胞培养的相关实验技术等 33 个实验,重点讲解实验过程中的基本原理、实验方法与步骤。

本实验指导与课程结合紧密,讲解清楚明了,可用作医学、生物学等专业的实验教材,也可供相关实验人员参考使用。

本书由盛伟华、谢宇锋、龚爱华编著,杨吉成主审。

编著者
2008 年 1 月

目 录

第一章 细胞培养的基本知识	1
一、培养细胞的形态与结构	3
二、培养细胞的生长方式和类型	4
三、培养细胞的生长特点	5
四、细胞的营养	6
五、影响细胞生长的外在因素	10
第二章 细胞培养的准备工作的	15
实验一 细胞培养的设施及器材准备	17
实验二 常用溶液、培养液及其配制	24
实验三 细胞的复苏	27
实验四 细胞的换液和传代	29
实验五 细胞的冻存	32
实验六 细胞计数和细胞生长曲线测定	35
实验七 四氮唑盐 (MTT) 比色法	39
第三章 正常细胞的培养技术	43
实验一 结缔组织细胞的分离培养	45
实验二 外周血细胞的分离培养	54
实验三 大鼠胚胎神经细胞 (组织) 的分离培养	57
实验四 间充质干细胞分离培养	61
第四章 细胞培养的相关实验技术	65
实验一 细胞毒性实验	67

实验二	微核实验 (Micronucleus Assay)	70
实验三	单细胞凝胶电泳 (SCGE)	73
实验四	脂质体介导的真核细胞转染	76
实验五	免疫细胞化学染色技术 (免疫组化)	80
实验六	VSV 病毒繁殖及其效价和干扰素效价测定	84
实验七	细胞凋亡技术	88
实验八	细胞因子 IL-2 的效价检测	99
实验九	细胞因子 IL-6 的效价检测	102
实验十	细胞基因组 DNA 分离和鉴定	106
实验十一	细胞总 RNA 的分离和鉴定	109
实验十二	PCR 技术	112

参考文献	117
------	-----

第一章

细胞培养的基本知识

一、培养细胞的形态与结构

不同组织的细胞,由于内部构造不同、生理功能不同、所处环境和条件不同,因而形态上表现为多种多样,如呈圆形、椭圆形、正方形、柱形、扁平形、梭形、星形和多边形等。另外,也有些细胞(如吞噬细胞)没有固定的形态。组织培养细胞的形态结构与体内细胞的形态结构基本相同。然而,由于细胞的生长方式不同导致其在大体形态及某些细微结构方面各有一定差异。如悬浮生长的细胞,不论细胞来源于体内何种类型细胞,因生长在液体环境中,胞内渗透压高于周围液体环境,因此,胞体基本呈圆形。呈贴附于支持物上生长的细胞,开始为圆形,很快过渡成扁平形,并逐渐恢复至原先的细胞形态。如来源于皮肤及其衍生物、乳腺、肝、消化道上皮等组织的细胞,由上皮性肿瘤(鳞状细胞癌)等培养的细胞均呈上皮样,上皮细胞形态为扁平的多角形,胞质近中央处有圆形的细胞核。上皮细胞紧密相靠、互相衔接成片,极性不明显。起源于中胚层的细胞,体外培养似成纤维细胞型^①,如纤维结缔组织、平滑肌、心肌、血管内皮、人胚肺等的细胞体外培养形态类似在体内生长的成纤维细胞,具有长短不等的数个细胞突起,因而多呈纤维状、梭形,少数呈不规则的三角形或扇形,核为卵圆形,位于靠近胞质的中央。细胞排列为漩涡状、放射状或似栅栏状。体外培养细胞类型见图 1-1。

在一般显微镜下直接观察体外培养的细胞,细胞功能健康活跃时,细胞呈现均质而透明,结构极不明显。用相差显微镜可看清细胞的轮廓和内部结构。细胞有 1~2 个核仁,用固定染色法和特殊技术可显示细胞器等结构。细胞功能状态不良时,细胞轮廓会增强,反差增大。在胞质中出现颗粒、脂滴和空泡等,反差很大的暗色小颗粒是变形的线粒体,这些是细胞代谢不良的表现。培养细胞的形态与细胞在体外生存时间的长短、细胞种类有一定关系。初代培养的正常二倍体细胞,除大体形态外,其构造和生物学性状与原体内细胞极相近,细胞均质性和透明度都很强。随着体外培养时间延长及反复传代,细胞会出现轮廓增强、核仁增多,甚至出现双核或多核等变化。如细胞发生转化,则形态变化更大。

培养细胞的超微结构需用电子显微镜才能观察到。细胞膜分三层结构,由双层磷脂分子组成,双层分子间嵌有蛋白质分子。细胞膜向外凸出形成泡状、叶状、丝状和指状突起。细胞膜含有丰富的酶类,膜表面分布着具有特殊功能的受体。细胞膜具有通透性和交换扩散、主动运转代谢物的功能。细胞膜下胞质区中有微丝、微管构成的骨架系统(cytoskeleton system, CSS),正常培养细胞中的微丝和微管走行有一定方向性,细胞转化后走行紊乱,被视为一项检测的标志。胞质中还有线粒体、溶酶体、高尔基复合体、中心体和内质网等。线粒体的形态

① 成纤维细胞型因形态与体内成纤维细胞的形态相似而得名。

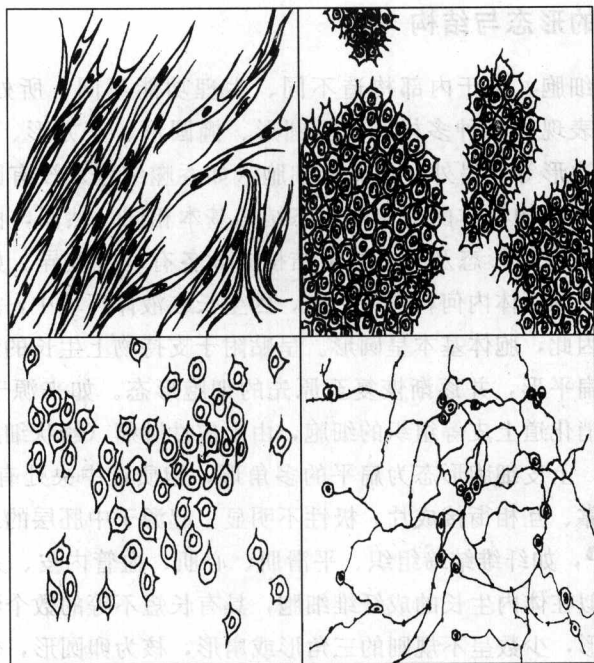


图 1-1 体外培养细胞类型

结构在培养细胞正常状态和异常状态下有所不同。功能状态良好的细胞中的线粒体,呈杆状或卵圆形,数量较多。当代谢不良或细胞功能低下时,细胞内有颗粒形成,并集聚成大的团粒,在显微镜下也明显可见。培养细胞的细胞核与体内细胞的细胞核无明显区别,有双层结构的核膜,核内有一个或数个核仁,也能看到核孔。永生性细胞系和肿瘤细胞的细胞核一般比较大,染色质丰富,核仁大而多。

二、培养细胞的生长方式和类型

体外培养细胞大多在培养瓶、培养皿等容器中生长。按其生长方式可分为贴壁型生长细胞和悬浮型生长细胞两大类。

1. 贴壁型生长细胞

贴壁型生长细胞能附着于底物(支持物)表面生长。靠贴附才能生长的细胞称贴附性细胞或锚着依存性细胞(anchorage-dependent cells)。目前,已有很多种细胞能在体外以这种方式生长,如成纤维细胞、骨骼组织(骨及软骨)、心肌与平滑肌、肝、肺、肾、乳腺、皮肤、神经胶质细胞、内分泌细胞、黑色素细胞及很多种肿瘤细胞等。这些细胞在活体内时,各自具有特殊的形态,但是处于体外培养状态下的细胞在形态上表现单一而失去了在体内原有的某些特征,形态各

异反映其胚层起源。如起源于内外胚层的细胞多呈上皮型细胞；来自中胚层的细胞则易呈成纤维细胞型。由于上述原因，在判定体外培养细胞形态时，不能再按体内细胞标准确定，仅能大致分为成纤维细胞型、上皮细胞型、游走细胞型和多形细胞型。成纤维细胞型的胞体呈梭形或不规则三角形，中央有卵圆形核，胞质向外伸出2~3个长短不同的突起，细胞呈放射状、火焰状或漩涡状生长。上皮细胞型的胞体呈扁平不规则多角形，细胞中有圆形核，细胞紧密相连成单层膜。游走细胞型在支持物上散在生长，胞质经常伸出伪足或突起，呈活跃游走或变形运动，运动速度快而不规则，细胞形态不稳定，有时难以与其他型细胞相区别。多形细胞型由于难以确定其形态而得名，吞噬细胞常属此类。需要注意的是：这些分类仅是笼统的提法，体外培养细胞的形态并不完全是恒定的，可因各种因素而发生改变，如pH、细胞密度、污染等因素。例如，HeLa细胞本身是上皮型细胞，若培养的条件过酸或过碱，则可呈现为梭形而似成纤维细胞型。

2. 悬浮型生长细胞

有些细胞在体外培养时，不能贴附在支持物表面生长，而是呈悬浮状态生长，如取自血、脾及骨髓培养的细胞及某些癌细胞。这些细胞在悬浮状态时生长良好，可以是单个细胞或细小的细胞团，胞体呈圆形，进行观察时不如贴壁型生长细胞方便。悬浮型生长细胞的优点有以下几个方面：由于悬浮在培养液中生长，生存空间大，可维持对数生长期，也允许长时间生长，传代繁殖方便，能繁殖更多细胞，饱和度大，可达高密度，适合大量生产，有工业应用价值；传代时只需稀释，不需要消化处理，易于收获，便于进行细胞代谢等研究；有些贴壁生长的细胞如HeLa细胞等，经悬浮和贴壁反复培养后，可逐渐适应，也能进行长期悬浮培养。

三、培养细胞的生长特点

体内细胞是生长在动态平衡的环境中，而体外细胞生长在培养瓶、培养皿的培养液中，生存空间和营养物质都是有限的。所以其生长特点和生长增殖过程有别于体内细胞，其生长增殖达到一定密度后，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）。每次传代后，细胞的生长增殖过程都会受到一定的影响。培养细胞的生长特点表现在以下两个方面。

1. 贴附并伸展

贴附并伸展是大多数体外培养细胞的基本生长特点。除悬浮型生长细胞外，大多数细胞都可贴附在某些支持物上，并逐渐伸展而形成一定的形态。细胞在接种后很快便可伸出伪足附着于支持物，形成一些接触点，接着细胞逐渐呈扁平或放射状伸展开来，逐渐形成上皮型或成纤维型或其他形态生长。细胞的贴附并伸

展受一些因素的影响,如缺少附着因子、生长因子、离子等成分,以及培养温度、培养液的流动速度等培养条件,特别是小牛血清和钙离子、镁离子对细胞贴壁影响更为明显。

2. 密度依赖性

培养瓶、培养皿中细胞过少或过密都会影响细胞的生长、增殖。当细胞贴附生长、汇合成单层时,细胞变得较为拥挤,而扁平形状的程度减少,造成与培养液的接触面减少,与此同时,培养液中的一些营养物逐渐耗尽,此时形成单层的细胞,分裂活动停止,必须尽快换液传代,否则将影响细胞的生长增殖。这种生长特性称为密度依赖性调节。另外,细胞过少,培养液与细胞的容积太大,均会影响细胞增殖。若培养液中的pH变为碱性,则细胞生长受到抑制,甚至会脱落死亡。

四、细胞的营养

离体细胞与体内细胞在营养代谢上是有区别的。机体内的细胞营养可受神经和激素等影响并进行一系列的统一调节,而离体的细胞则不受其调节。

离体培养细胞与体内细胞在营养要求上的主要差别如下。

① 体外长期培养的细胞大多需要血浆、血清或胚胎浸出液,而这类培养液都可能含有微量的激素、维生素及必需氨基酸,足以供给细胞营养的需要。

② 在体内血液中许多活性很强的物质只需微量即可维持营养的需要,而在体外培养时无法观测,量多了可能与微量的作用不同,量少了又可能很快就会消耗掉。

③ 组织培养是一群离体细胞,而这些细胞有不同的营养要求。这种不同的营养要求在体内因有另外的器官和组织细胞的活动而间接供给,但在培养基中则没有这种供给,也不受其他组织代谢的影响。

④ 各种组织的细胞都有其特殊的营养要求,能适合某一种组织的细胞的培养液,不一定就能适合另一种组织的细胞,其差异有时较大。

⑤ 在体内的细胞,其新生与衰亡维持一种平衡,而在体外培养时,细胞增生,体积加大,增殖速度往往高于分化速度,新生细胞比衰亡细胞要快,所以营养要求自然也不同。

由此可见,各种不同的细胞具有不同的营养要求。因此,细胞营养的研究在组织细胞培养中非常重要。凡能进入细胞中被细胞所利用,参与细胞代谢活动和维持细胞生存的物质均属营养物质。体外培养细胞的生长所需的基本营养物质除糖类、氨基酸和脂类三大类营养物质外,也需要一定量的无机盐、维生素和微量元素等。

1. 水

水是一种良好的溶剂。人体细胞中大部分是水。一切营养物质只有溶于水,才易被细胞吸收。代谢产物也需溶于水才能排泄。生化反应也必须在溶液状态下才能很好地进行。水的比热高、潜热大,对调节温度起着很大的作用。水有一定的表面张力,对生物形态的保存也有一定作用,且原生质的活动需要水的表面张力。没有水,水解反应和氧化反应无法进行。水也影响呼吸。水还便于溶质物质的转移。水作为一种导热体,对生物体内环境温度的调节起重要作用。水中有溶解氧的存在,可供细胞呼吸,可维持水中有机体的生存。细胞培养用水必须经过2~3次玻璃器皿蒸馏或用离子交换树脂处理。这样的水含杂质少、纯度高,应用起来安全可靠。一般在电导仪上表示 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6 \Omega$ 以上方可使用,生长液要在 $5 \times 10^6 \Omega$ 以上方可使用。

2. 糖

细胞靠糖的氧化来获得能量。葡萄糖是机体活动能量的主要来源,故在培养液中应加入一定浓度的葡萄糖(0.56mmol/L),以便在生物氧化后供给细胞大量的能量。葡萄糖的作用与平均细胞容积有直接的关系,而与细胞数的变化关系较小。很多健康胚细胞和成体细胞,皆依赖无氧酵解来获得能量,有些细胞也可以经脱氧获得基本能量。

3. 氨基酸

氨基酸是组成蛋白质的基本单位。所有培养细胞需要以下12种基本氨基酸:精氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、苏氨酸、缬氨酸、胱氨酸及酪氨酸,另外尚需谷氨酰胺。谷氨酰胺对细胞具有特殊作用,能促进各种氨基酸进入细胞膜。它所含的氮又是核酸中嘌呤和嘧啶的重要来源,同样也是合成腺苷三磷酸所必须的物质,也是能源和碳的来源。因此,谷氨酰胺对培养细胞非常重要,如肿瘤细胞培养时比正常细胞需求量高1倍。很多细胞在含氨基酸的培养液中生长良好,尤其是在单细胞培养或培养细胞较少时,需要氨基酸的种类和量要比上文中叙述的12种基本氨基酸多。有时细胞培养还加以下7种氨基酸,即天冬氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、羟脯氨酸(非必需氨基酸)。尤其是丝氨酸对很多癌细胞、成纤维细胞生长很重要。细胞只能利用左旋的异构体,而右旋的异构体即使超量也无用。半胱氨酸的主要作用是保护酶的活力,可消除培养液中的微量金属与细胞内酶结合后形成的抑制硫苷酸;可增加细胞的增生数和改善细胞的外形,延长细胞的生存时间。目前采用的浓度增加到0.21mmol/L,需新鲜配制于母液中,否则因氧化作用而失去效应。甘氨酸是一种最简单的氨基酸,它对细胞的大量生长有一定的促进作用,可通过转氨基作用形成丙氨酸、谷氨酸与苯丙氨酸,反过来丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺也可通过转氨基作用形成甘氨酸。甘氨酸的使用浓度一般为

50mg/L。丝氨酸并不是必需氨基酸,可部分地被甘氨酸、丙氨酸或几种不重要的氨基酸结合物所代替,但它对肿瘤和成纤维细胞有促进生长的作用,如果与丙氨酸、 α -氨基酪氨酸、天冬酰胺结合,能进一步增加丝氨酸的促进作用。适宜用量为 0.5~1.0mmol/L。色氨酸的作用是通过转氨基作用产生丙氨酸、甘氨酸和酪氨酸,适宜用量为 0.005~0.02mmol/L。精氨酸对细胞的增殖是重要的。如果缺少它,细胞生长受到抑制。如果有血清蛋白存在,精氨酸酶的活力受到抑制,精氨酸分解受阻,细胞生长受影响。支原体污染细胞后使精氨酸大量消耗,细胞增殖受抑制,甚至死亡。天冬氨酸主要来自植物性蛋白水解后产生。另外谷氨酰胺、组氨酸、异亮氨酸可经转氨基作用而形成天冬氨酸。高度分化的细胞可通过生物合成的途径取得天冬氨酸。

4. 维生素

维生素是人类及动物细胞维持生命和生长所需的一种活性物质。许多维生素是酶的辅酶和辅基的组成部分,对细胞的代谢有重大的影响,某些维生素缺乏,短期可引起细胞死亡。维生素的需求量因细胞而异,如生物素、叶酸、泛酸、吡哆醇、核黄素、硫胺素及维生素 B₁₂ 等在很多常用限定培养基中已成为固定组成成分。维生素 C 也是不可缺少的,它对具有合成胶原能力的细胞尤为重要,但维生素 C 易氧化,不稳定。脂溶性维生素对细胞生长也有作用,它们常从血清中得到补充。

5. 无机离子和微量元素

钠、钾、镁、钙、磷、氮等无机离子是细胞生长所必需的,它们参与细胞的代谢,是细胞组成所需要的。此外,微量元素铁、锌、硒等也是细胞生长所需要的。细胞培养时用的平衡盐溶液主要含钠离子、钾离子、钙离子、镁离子等阳离子,其比例与海水或高等动物血液内的比例相似。

① 钠:钠在体内主要维持水、渗透压及 pH 的平衡。钠离子是细胞外主要的阳离子,它可降低外质的黏度,促进外质的溶胶化,而在细胞内则可增加内质的黏度,能使球蛋白保持溶液状态,能增加组织细胞的应激性与增高细胞膜的渗透性,对维持渗透压的恒定及细胞内外物质的转运有决定性作用。在 L 和 HeLa 细胞培养时,Na⁺ 最适浓度为 100~200mmol/L,Cl⁻ 的适宜浓度为 50mmol/L (淋巴细胞除外)。

② 钾:钾是激活细胞内某些酶所必需的。L 细胞与 HeLa 细胞对钾的最适浓度是 1~10mmol/L。HeLa 细胞缺钾 18h 以上,细胞变圆,胞质内颗粒增加,细胞界限不清楚,并产生一种特殊树枝形细胞,24h 后细胞脱落死亡。

③ 钙:钙对维持细胞膜的坚固和渗透性,对保持神经和肌肉组织的正常兴奋性有很大作用。许多酶如胆碱酯酶、琥珀酸脱氢酶、腺苷三磷酸酶等都必须有钙的存在才有活性。钙对细胞黏着性也很重要,在无血清存在时,高浓度的钙离

子可帮助细胞贴壁,如 pH 7.6~7.8 时钙离子保护带电荷群,使细胞稳固贴壁。各种细胞所需钙的浓度不同,L 细胞的最适浓度是 1~2mmol/L,HeLa 细胞的最适浓度是 0.1~0.2mmol/L。

④ 镁:在细胞内,镁是糖代谢某些酶系统的参加者。镁对细胞的贴壁也有重要作用,较高的镁离子可促进培养物的生长。鼠成纤维细胞最适浓度是 0.1~0.2mmol/L。

⑤ 磷:磷酸盐是细胞和细胞间液的组成成分。它参与一切基本物质如蛋白质、糖类、脂肪、维生素的代谢,是 ATP(腺苷三磷酸)必不可缺的成分,可形成高能磷酸键以供细胞生命活动所需的能量。另外,它对维持组织内的酸碱平衡起着重要作用。L 细胞的适宜浓度是 0.2~0.6mmol/L,HeLa 细胞适宜浓度是 0.06~0.2mmol/L。

⑥ 碳:重碳酸盐与 CO_2 对细胞的生长和增殖很重要。它能使培养物产生最大糖分解以利于细胞生长,可维持和调节培养基的 pH,因此细胞通常在 CO_2 细胞培养箱中培养。

⑦ 微量元素:铁、锌、硒等微量元素对维持细胞的正常生理功能也同样起着重要作用。如铁是组成细胞色素与细胞色素氧化酶等物质的成分;锌与细胞增殖有一定的关系。在体内,它们大多数与有机化合物相结合。在组织细胞培养时,把上述微量元素加到人工培养基中,低浓度或适量浓度对细胞的生存与增殖有一定作用,浓度过高对细胞有毒性,要特别注意。

各种细胞对无机盐的需要是不同的。一般来说,氯、钠、钾、钙、镁、磷是重要的无机盐成分,它们也有相互拮抗作用。如钙和镁能使细胞膜渗透性降低,而钾和钠能使细胞膜渗透性增高。钾和钠能使肌肉收缩性丧失,而钙和镁能恢复肌肉的收缩性。镁的毒性作用可用钙来解除。因此,这些离子在溶液中只有保持一定的比例,才可以使细胞维持正常的生理平衡状态。

6. 促细胞生长因子

体外培养细胞除需要上述营养成分外,同样需要促进细胞生长的激素类物质,尤其是促细胞生长因子。如胰岛素能促使细胞利用葡萄糖和氨基酸,有促进有丝分裂的作用,对很多细胞的增殖生长均有促进作用。氢化可的松对皮肤上皮细胞及乳腺上皮细胞增殖生长有很好的促进作用,还能提高神经胶质细胞和成纤维细胞的克隆形成率。血清中含有多种促细胞生长因子,是体外培养细胞所需生长因子的重要来源。

血清中含有 A、B、C、D 四种因子。A 因子能促进细胞早期生长,缩短潜伏期,清除细胞内脂肪滴。A 因子比较小,呈酸性,可很快地通过火棉胶膜。B 因子是一种脂肪形成剂,易使细胞产生脂肪滴,其本身是可溶性脂类,但不能通过火棉胶膜。B 因子在老年血清中含量较多,过滤可除去该因子。C 因子可使细

胞发生退化。D因子是一种黏着因子。若除去B、C因子,则可促进细胞生长。血清中的球蛋白及肽对细胞有刺激性生长的作用,白蛋白不仅具有解除某些毒性物质(如油酸和重金属离子)对细胞的毒性作用,而且能支持细胞的生长和增殖。

血清对体外培养细胞固然重要,但有不少因素可影响血清的作用,如供血者的年龄、血型、血色素、胆红质、脂肪酸等。

① 年龄:较老动物的血清对细胞生长有抑制作用。其抑制成分存在于血清的类脂质与蛋白质部分,并能耐热至 65°C 。随着年龄的增加,血清卵磷脂含量下降,而类脂质、蛋白质与抑制剂的浓度增加(B因子也随之增加),对细胞生长不利。

② 血型:一般认为人AB型血清比A型和O型血清对细胞生长有利,原因不清。

③ 血色素:BaRa发现低浓度的血色素可引起正常的鼠成纤维细胞与恶性的鼠成纤维细胞的增殖,而高浓度的血色素可产生抑制作用。因此在制备血清时,必须尽量避免溶血。

④ 胆红质:低浓度胆红质一般对细胞生长影响不大,对有的细胞有抑制作用。因此在选血清时,也应注意这个问题。

⑤ 脂肪酸:血清中的脂肪酸的含量对细胞生长有很大的影响。老年动物血清中脂肪酸的含量较高;雌性动物血清中脂肪酸的含量较雄性高。因此制备血清时应选择雄性幼年动物。

⑥ 血清在培养液中的浓度并非越高越好。原则是能达到维持细胞良好的生长和繁殖,又不浪费。一般常用的浓度是10%、20%和40%,根据各类细胞的需求而定。有时为了某种研究目的的需要,用无血清或低浓度(5%)血清培养。

五、影响细胞生长的外在因素

细胞在体外进行培养,失去了机体的调节和控制。因此,除满足营养的要求外,还必须使细胞生存环境尽量接近活体的环境。体外环境的培养条件如温度、渗透压、酸碱度等均能影响细胞的生长。

1. 温度

一般哺乳类及禽类细胞体外培养的适宜温度是 $37\sim 38^{\circ}\text{C}$ 。温度过高或过低都会影响细胞的生长。细胞耐受低温的能力比耐受高温的能力强,在低温下,细胞的代谢活力及核分裂降低。温度不低于 0°C 时,虽影响细胞代谢,但并无伤害作用;把细胞置于 $25\sim 35^{\circ}\text{C}$ 时,细胞仍能生存和生长,但速度减缓;放在 40°C 数小时后,再置回 37°C 培养细胞仍能继续生长。但如果 40°C 下暴露时间太长,