

TISSUE ENGINEERING:
A LABORATORY MANUAL

组织工程学 实验技术

主编 裴国献 魏宽海 金丹

组织工程学实验技术

TISSUE ENGINEERING: A LABORATORY MANUAL

主 编 裴国献 魏宽海 金 丹

编 者 (以姓氏笔画为序)

王智崇	艾玉峰	白晓春	朱家恺
任高宏	全大萍	刘 伟	刘炳乾
刘敬波	许杨滨	孙安科	杨光辉
李立华	陈 滨	陈系古	罗丙红
金 丹	周广东	周长忍	姜晓丹
秦 煜	徐如祥	黄 冰	崔 磊
葛 坚	谢慧琪	路艳蒙	熊 猛
裴国献	潘兴华	魏宽海	



人民军医出版社

People's Military Medical Press

北 京

图书在版编目(CIP)数据

组织工程学实验技术/裴国献,魏宽海,金丹主编. —北京:人民军医出版社,2006.5
ISBN 7-80194-869-6

I. 组… II. ①裴…②魏…③金… III. 人体组织学—经验 IV. R329—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 072232 号

策划编辑:郭伟疆 **文字编辑:**纳 琨 **责任审读:**黄栩兵

出 版 人:齐学进

出版发行:人民军医出版社 **经销:**新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 **邮编:**100036

电话:(010)66882586(发行部)、51927290(总编室)

传真:(010)68222916(发行部)、66882583(办公室)

网址:www.pmmp.com.cn

印刷:三河市春园印刷有限公司 **装订:**春园装订厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:25·彩页 19 面 **字数:**608 千字

版、印次:2006 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001~3000

定价:120.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

电话:(010)66882585、51927252

内 容 提 要

本书是由组织工程学著名专家组织国内知名学者编写的实验技术方面的专著,反映了该领域的新进展和新动向。全书共 3 篇 18 章,上篇为细胞培养,主要介绍其基本原理、技术、种子细胞的获取与鉴定及分子细胞学技术;中篇为生物材料,重点介绍了组织工程学中常用的生物材料及其合成与制备技术,并阐述了组织工程支架材料的理化特性和生物相容性;下篇为组织构建,详细论述骨、软骨、肌肉、肌腱、神经、角膜、皮肤、血管和喉软骨等组织的构建技术,并对组织工程学在临床的初步应用进行了介绍。该书内容翔实,论述全面、系统,对生物组织工程学实验操作系统化和规范化建设具有重要意义。适合生物医学、医用生物材料学、临床医学等学科的科研人员和医学研究生阅读参考。

责任编辑 郭伟疆 纳 琨

前言

组织工程学是一门新兴学科,它利用生命科学和工程学的原理和方法,以生物材料为载体整合被分离的细胞,在宿主体内降解释放细胞,并形成新的具有生物活性的功能组织。利用生物组织工程学原理和手段再生组织、修复组织缺损,突破了以往的治疗模式,为生物组织的再生及修复提供了新的思路和方法,已成为 21 世纪生物医学研究领域的国际性前沿学科。

生物组织工程研究目前已引起我国政府及高等院校、研究机构等部门、单位与研究人员的高度重视。各级政府部门已设立专项研究基金予以重点资助研究;已建立国家、地区、部门与单位等不同级别的生物组织工程研究与开发中心,从而促进了我国生物组织工程研究的较快发展,生物组织工程学涉及到多个学科、多个领域、多个部门,研究工作正在深入开展。目前我国生物组织工程研究工作正处于一个关键发展时期。但尚缺乏生物组织工程学实验技术的相关专著,急需一部贯穿该学科领域,全面、系统介绍生物组织工程学常用技术方法的专业书籍,以促使生物组织工程实验技术的系统化、规范化及增强其可操作性,保证生物组织工程研究的进一步深入开展。

本书从细胞培养、生物材料、组织构建及临床应用几个方面介绍了生物组织工程学常用实验技术。在细胞培养部分主要介绍了其基本原理和技术、种子细胞的获取方法及分子细胞学技术;在生物材料部分重点介绍了常用生物材料的制备和检测技术;在生物组织构建及临床应用部分着重论述了骨、软骨、肌肉、肌腱、神经、角膜、皮肤、血管和喉软骨等组织的构建技术、组织工程化生物组织及其血管、神经的同步构建,并对生物组织工程学在临床的初步应用进行了介绍。书末附有生物组织工程学常用词汇。

本书详细介绍了生物组织工程学实验技术的主要方面,反映了该领域的最新进展,实用性强,可作为从事生物医学、医用生物材料学及临床医学的科研人员和研究生的参考书。生物组织工程学是一项全新的研究领域,许多实验技术尚不成熟,尤其在组织器官构建、检测与临床应用实验技术等方面有许多问题需在今后的试验研究过程中不断探索、总结、完善与提高。鉴于编者的经验所限,不妥之处望同道不吝雅正。

裴国献

2006 年 1 月 于广州

目 录

上篇 细胞培养

第 1 章 细胞培养基本原理	(3)
第 2 章 细胞培养的常用技术	(8)
第一节 细胞培养的基本环境和条件	(8)
第二节 细胞培养用液的制备	(11)
第三节 细胞培养的方法	(13)
第四节 基因转导技术	(16)
第五节 细胞培养干预技术	(17)
第 3 章 细胞培养的常用检测技术	(20)
第一节 培养细胞的形态学观察	(20)
第二节 培养细胞增殖特性的检测	(25)
第三节 培养细胞的蛋白质检测	(27)
第四节 培养细胞的 DNA 检测	(33)
第五节 培养细胞的 RNA 检测	(39)
第 4 章 常用种子细胞的获取与鉴定	(45)
第一节 胚胎干细胞	(45)
第二节 成骨细胞	(55)
第三节 软骨细胞	(67)
第四节 肌肉细胞	(75)
第五节 腱细胞	(84)
第六节 施万细胞	(90)
第七节 神经元细胞	(96)
第八节 真皮成纤维细胞	(122)
第九节 表皮角质形成细胞	(124)
第十节 血管内皮细胞	(129)

中篇 生物材料

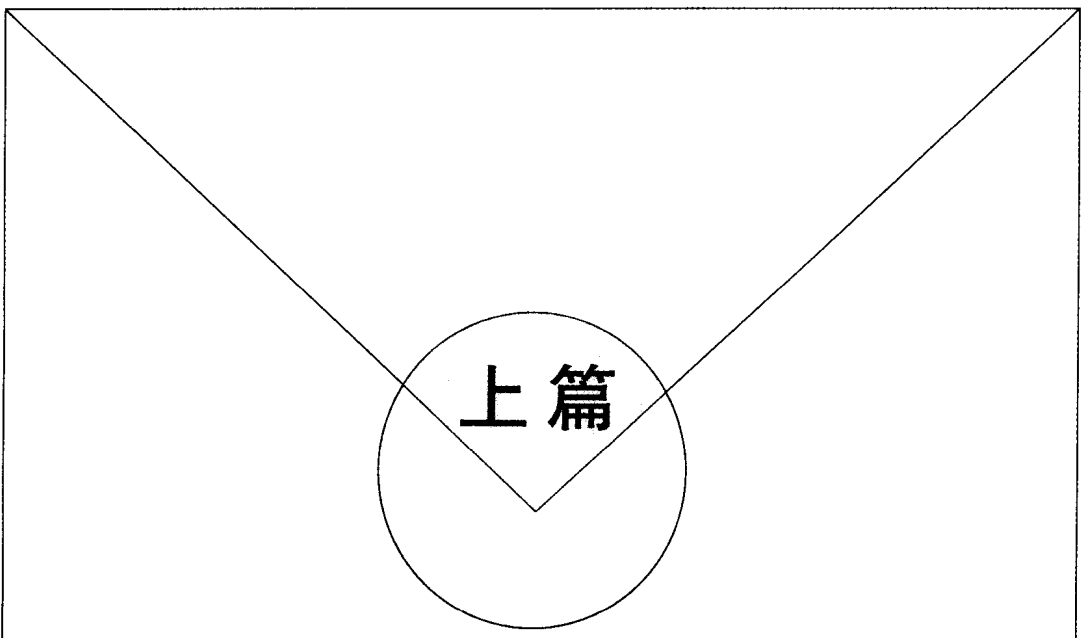
第 5 章 组织工程学常用的生物材料	(139)
第一节 绪论	(139)
第二节 常用生物材料	(142)

第三节 生物降解材料简介	(143)
第四节 组织工程中常用的几种生物材料	(146)
第6章 组织工程中生物材料的合成与制备技术	(154)
第一节 生物陶瓷类材料	(154)
第二节 合成高分子材料	(156)
第7章 组织工程支架材料的理化性能与生物相容性评价	(165)
第一节 材料的本体性能检测	(165)
第二节 材料的表面性能检测	(171)
第三节 生物降解性能研究	(172)
第四节 材料的生物相容性体外评价	(173)
第五节 生物相容性体内评价	(178)

下篇 组织构建

第8章 细胞与生物材料的复合	(189)
第一节 概述	(189)
第二节 常规种子细胞与支架材料的接种复合技术	(190)
第三节 微重力细胞培养与旋转培养系统	(192)
第四节 可变应力场细胞培养	(196)
第五节 影响细胞与支架材料复合的因素	(199)
第六节 多种细胞与生物材料的复合	(202)
第七节 细胞与生物材料复合的检测	(205)
第9章 组织工程骨的构建	(210)
第一节 动物模型的制备	(210)
第二节 组织工程骨组织的体内构建	(215)
第三节 组织工程骨及其血管神经的同步构建	(219)
第四节 组织工程骨的检测技术	(227)
第10章 组织工程软骨的构建	(233)
第一节 软骨缺损动物模型建立	(233)
第二节 各类软骨组织构建	(234)
第三节 组织工程软骨检测技术	(240)
第11章 组织工程肌肉的构建	(244)
第一节 骨骼肌组织工程研究	(244)
第二节 心肌组织工程研究	(249)
第三节 平滑肌组织工程	(252)
第12章 组织工程肌腱的构建	(258)
第一节 动物模型的制备	(258)
第二节 组织工程肌腱的构建	(259)
第三节 组织工程肌腱的检测技术	(262)

第 13 章	组织工程周围神经的构建	(267)
第一节	动物模型的制备	(267)
第二节	组织工程周围神经的构建	(269)
第三节	组织工程化周围神经的检测技术	(281)
第 14 章	组织工程角膜的构建	(284)
第一节	角膜的结构与功能	(284)
第二节	种子细胞的准备	(290)
第三节	组织工程化角膜的体外构建	(297)
第四节	应用前景和未来的挑战	(301)
第 15 章	组织工程皮肤的构建	(304)
第一节	组织工程皮肤概述	(304)
第二节	组织工程皮肤的体外构建	(309)
第 16 章	组织工程血管的构建	(314)
第一节	血管的概述	(314)
第二节	组织工程血管的构建	(316)
第三节	组织工程血管的检测技术	(325)
第 17 章	组织工程喉软骨的构建	(328)
第一节	喉软骨缺损模型制备与组织工程修复	(329)
第二节	组织工程化喉软骨的构建	(336)
第三节	组织工程喉软骨的检测技术	(344)
第 18 章	组织工程学的临床应用	(352)
附录 A	组织工程学常用词汇中-英文对照	(368)
附录 B	组织工程学常用词汇英-中文对照	(378)



上篇

细胞培养

第1章 细胞培养基本原理

一、组织工程学对种子细胞的要求

组织或器官的功能障碍或丧失,是人类健康面临的重要危害之一,也是人类疾病和死亡的最主要原因。目前临床上常采用自体组织移植、异体组织移植或应用人工代用品进行修复。但由于自体组织移植来源有限、必须以牺牲人体部分正常组织为代价;异体组织存在免疫排异反应及供体严重不足;人工组织代用品存在异物反应和感染等风险,均限制了其广泛临床应用。20世纪以来,随着现代医学科学技术的飞速发展,尤其是生物学工程学、细胞生物学、分子生物学、临床医学和生物材料科学的发展,促进由多学科交叉的新兴边缘学科——组织工程学的诞生。

组织工程学(tissue engineering)是20世纪80年代才提出的新概念,目前被正式定义为:应用生命科学与工程学原理和技术,在正确认识哺乳动物的正常及病理两种状态下的组织结构与功能关系的基础上,研究并开发应用于修复、维护、促进人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的生物学替代的一门新兴科学。组织工程理论上是将体外分离的高浓度组织细胞,经体外培养扩增后种植于一种天然或人工合成、具有良好生物相容性并可被人体逐步降解、吸收的细胞支架或称细胞外基质上。然后将这种细胞生物材料复合物植入机体病损部位,生物材料在降解、吸收过程中,种植细胞不断增生、繁殖,形成新的具有其原来特殊功能和形态的相应组织和器官,达到修复创伤和重建功能的目的,从

而解决组织和器官缺损所致的功能障碍或丧失的治疗问题。组织工程的兴起,为解决目前费用昂贵的器官、组织移植和再造问题提供了崭新的方法,被认为是继细胞生物学和分子生物学之后,生命科学史上又一新的里程碑,也是一场意义深远的革命。

组织工程的研究内容主要集中于以下三个方面:①种子细胞的培养;②细胞外基质替代物的研究;③组织工程化组织对各种病损组织替代的研究等三方面的内容,其中获得足够数量、不引起免疫排斥反应且具有再生活力的种子细胞是开展组织工程研究的前提和基础。由于组织工程发展的最终目的是应用于临床,因此基于临床应用的实际需要,种子细胞应具有以下特点。

1. 取材方便,创伤小 ①取材的部位要恒定,便于规范操作;②取材方法要简单,尽量采用微创技术(如穿刺),不宜首选有一定创伤的切开取材方法,以免给患者带来更大的痛苦;③取材部位要能相对稳定地提供足够数量的目的细胞,且取材过程易于避免其他细胞造成“污染”;④取材的目标尽量小,并且对人体没有太大的生理干扰;⑤取材的组织应尽量处于稳定的体内环境,不受疾病的影响而发生质或量的改变。

2. 来源丰富,使用安全 组织工程研究需要的种子细胞不仅要求取材方便,而且要求来源丰富,对机体无明显免疫排斥及潜在的疾病传播危险。组织工程有多种细胞来源,如自体细胞、同种异体及异种细胞等,自体细胞可由活检或穿刺获得的组织进行分离培养,获得所需要的功能细胞;同种异体细胞

主要来自胚胎、新生儿和成体组织;异种细胞主要来自于猪、牛等动物,但每一种细胞来源都有其优缺点。由于收获来源于患者的自体细胞在体外培养扩增后再进行体内移植,不会引起免疫排斥反应和传播疾病的潜在危险,因此是最佳的细胞来源,也是目前组织工程研究中应用最为广泛的一种细胞来源。尽管如此,自体细胞作为种子细胞来源也存在明显局限性,如自体细胞来源有限,在体外传代有限,难以大量扩增,并且存在易于老化现象等,限制了其广泛应用。另一类种子细胞来源于人类或动物的异体细胞。由于人体许多组织缺乏自身细胞供应,因此,人类或动物的异体细胞作为种子细胞的另一重要来源。但利用异体细胞进行体内移植也存在明显缺陷,如容易引起病原体体内传播、免疫排斥等,因此大大降低了临床应用的安全性。细胞微囊技术为解决这些问题迈出了可喜的一步,其原理是将异体或异种细胞包裹在有免疫隔离作用的细胞微囊中,再将其植入体内,囊膜起到半透膜的作用,可以阻止细菌抗体、淋巴细胞等大分子物质通过,而氧分子、葡萄糖等细胞生存所需的营养物质及细胞分泌的激素可自由通过,让移植的细胞在免疫隔离的状态下释放具有治疗效应的物质。这一技术已成功用于治疗帕金森病和糖尿病。此外,美国 Diacrin 公司的科学家们通过去除或掩盖细胞表面识别“异体”细胞的蛋白质,希望获得一种“万能供体”细胞系,以克服免疫排斥反应问题,目前取得了初步成效。由于自体细胞和异体细胞作为组织工程细胞来源存在众多有待突破的限制性因素,因此,近年来,科研人员开始将注意力集中到来源丰富、使用相对安全的干细胞研究领域。干细胞是一类具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的特殊细胞,根据其存在部位的不同,可分为胚胎干细胞和组织或成体干细胞两种类型。胚胎干细胞在一定的条件下可以纵向分化成为人体几乎所有的细胞类型,同时可自

我复制,具有很强的繁殖能力,成体干细胞也可在特定微环境下表现出很强的跨系或跨胚层分化潜能和“可塑性”,横向分化为其他组织细胞。但存在分化潜能差、细胞来源少和存活率低等不足;胚胎干细胞数量极少,对周围环境的依赖性较强,在体外易发生分化而失去原来的特性,容易发生恶性转化而具有成瘤性。随着干细胞体外分离、培养和扩增技术取得成功、治疗性克隆干细胞技术的成熟及相关研究的进一步深入,干细胞即将成为组织工程研究的主要细胞来源。

3. 种子细胞在体外具有较强的增殖能力并能定向分化 最近有报道取自体 1cm^2 正常皮肤细胞通过组织工程学的方法经过 1 个月的特殊培养,可以制成相当于整个个体大小的人工皮,这显然对患者来说是一个不太能接受的等待时期。因为在此阶段中也许现有的外科技术早已能解决因组织缺损给患者带来的痛苦。如何通过改进培养装置等方法,如转壁式生物反应器来加速种子细胞在体外的扩增是一个关键问题。对于那些培养条件要求高、增殖能力低的自体细胞更需找出新方法以加速其增殖。在与材料复合时,培养液中的细胞需要适宜浓度,如 2.0×10^7 cell/ml 是软骨组织工程的最低细胞浓度,只有在细胞浓度适宜时,分布在支架中的细胞纤维构架与材料支架才能互相连接,构成完整的系统结构,保持合理的机械应力作用。同时在对组织分离、消化为细胞悬浮液过程中,只能保持原细胞数量的 85%,因此,细胞提取和培养技术尚待进一步提高。另外,种子细胞植入体内后能否定向分化为预构的新生组织及进行有效的调控,也是临床所迫切需要研究解决的。

4. 种子细胞植入受区后能保持修复组织的表型 人类在长期生物进化过程中不断得到优化组合,并且形成了相对稳定的体内外环境,如破坏了这种环境并且超过了一定的限度,则组织和器官就会丧失其结构和功

能,例如器官结构支架,细胞及基质三者之间存在着密切的关系,破坏了这种关系,器官的功能则不能得到正常的发挥。而组织工程在体外进行细胞培养,构建组织和器官,细胞是在失神经、体液和细胞外基质条件下生长,种子细胞和材料复合后要能保持其原来的生理性状,继续分裂、增殖;而通过组织工程技术所构建的组织与宿主必然也会存在差异,当其被植入受区时,要完成对自然组织和器官的真实模拟,而且受区由于病损的原因可能失去原有的正常的环境甚至伴有炎症反应,在这样的环境下,种子细胞如何能够健康地繁殖、生长并保持其原来的生理性状也是一个亟待解决的问题。

5. 种子细胞应能方便地进行基因修饰
通过分子生物学技术对种子细胞进行基因修饰,表达出期望的目的基因,改变或补充异常基因的功能,并加以指导和修复;或通过提供目的基因增加一些新的功能或是调节其他基因的活动;从而具有更丰富的基因表型促进组织的修复,调节端粒酶的活性延缓细胞的衰老,更好地满足临床应用的要求。

二、细胞培养在组织工程学中的地位和价值

细胞培养技术经过一个世纪的发展,目前已日趋成熟。体外培养的细胞具有体内细胞的大部分功能; CO_2 细胞孵箱、超净工作台及各种细胞培养液的存在,使人类几乎所有的细胞均可以进行体外培养,再辅以细胞的冻存与复苏技术、细胞克隆技术等,使细胞培养成为生命科学领域最重要的基础学科,同时也是组织工程学研究中最常用的研究手段。因为种子细胞是组织工程中用于修复或重建新生组织的最基本原材料,也是组织工程化组织成功构建的始动因素。利用细胞培养技术一方面可为组织工程研究提供大量的种子细胞,另一方面,利用培养的细胞可以方便地进行基因修饰,表达出期望的目的基因,

促进病损组织的修复或增加组织工程化组织一些新的功能,调节端粒酶的活性延缓细胞的衰老,更好地满足临床应用的要求。此外,培养的细胞能排除神经体液因素的影响、肝肾解毒功能及其他细胞的干扰,观察某些因素或生物材料对培养细胞的直接作用,为生物材料的生物相容性检测提供便捷的方法。在细胞培养实验中能直接观察到培养细胞生命活动的动态过程;用定时显微摄影记录可发现一些肉眼观察不到的生命现象;还可利用电镜、放射性核素标记、放免法和免疫组化等手段来研究细胞形态结构及细胞内化学物质的分布。另外,采用细胞培养技术还可节约组织工程研究费用。由于细胞培养有可能大量提供在同一时期、条件相同、性状相似的实验样本,因此有时比体内试验经济得多。

当然,细胞培养方法也存在不足之处:培养细胞失去体内细胞的制约和整体的调节作用,细胞形态和功能会发生一定程度的改变;培养方法、实验试剂对细胞形态和功能有一定的影响;长期体外培养的细胞,经反复传代、冻存和操作等因素的影响,可能发生染色体非整倍体改变,呈永生化或癌变的特征;另外,细胞培养对人员、设备等条件都要求较高。但通过改良培养技术,改进培养装置,努力创造条件以模拟体内的微环境,无疑将有利于促进细胞培养技术在组织工程学研究发挥更加重要的作用。

总之,细胞培养技术已成为当今生命科学各研究领域的基础技术和基本技能,它又是组织工程学的重要研究手段。因此,学习细胞培养技术方法及操作要领,是从事组织工程研究的工作者必备的基本知识和技能。

三、细胞培养的基本概念

(一)细胞培养概述

细胞培养工作始于20世纪之初(Harrison 1907, Carrel 1912),现已广泛应用于生

物学、医学各个领域,成为重要的基础科学之一。细胞培养是一种笼统的提法,严格地说,细胞培养应包括动物和植物的细胞培养。在组织工程学研究领域仅讨论动物的细胞培养,简称为细胞培养。其含义是指从动物活体内取出组织,用机械或酶消化法将组织碎块分离成单个细胞,用培养基制成细胞悬液,在体外适宜条件下,使细胞生长繁殖,并保留其一定的结构和功能特性。若以产生形成培养物的方法而言,可分为组织培养、细胞培养和器官培养。细胞培养使用的是单个细胞悬液,组织培养使用的是组织块($0.5 \sim 1\text{mm}^3$)或薄片(厚 0.2mm),而器官培养使用的是器官原基或器官的一部分或整个器官。在组织培养中,细胞自组织块周围移出并生长,细胞在生长过程中总有移动(运动)或其他变动,这样就使被培养的组织难以长期维持其原有的结构和功能。培养时间越长,发生变化的可能性越大,结果常使单一类型的细胞保存下来,最终成了细胞培养。由于这些细胞与组织的培养物主要成分均属细胞,而这些细胞在体外生长时,仍然是相互依存、互相影响的,所以组织培养和细胞培养实际上并无本质区别。

(二)细胞培养中常用的术语

1. 细胞培养(cell cultivate) 单个细胞在体外条件下的生长,称为细胞培养。在细胞培养中,细胞不再形成组织。

2. 原代培养(primary cultivate) 从直接取自生物体细胞、组织或器官开始的培养。首次成功的传代培养之前的培养可以认为是原代培养或初代培养。

3. 传代培养或传代(passage) 将细胞从一个培养容器移植到另一培养容器中培养。

4. 细胞系(cell line) 原代培养物经首次传代成功后即成细胞系。由原先存在于原代培养物中的细胞世系所组成。如果细胞系不能继续传代或传代数有限,称为有限细胞

系(finite cell line)。如果可以连续传代,则称为连续细胞系(continuous cell line)。

5. 细胞株(cell strain) 通过筛选法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或特异性标记的细胞称为细胞株。细胞株的特性或特异性标志必须在整个培养期间始终存在,这些特性包括具有一定的标记染色体,对某种病毒的敏感性、抗性及具有的特殊抗原性等,描述一个细胞株时必须说明它的特性或标志。如果细胞株不能继续传代或传代数有限,可称为有限细胞株(finite cell strain)。如果可以继续传代,则可称为连续细胞株(continuous cell strain)。

6. 亚株(substrain) 一个亚株是由某细胞株中分离出的单个细胞或群体细胞所衍生而成的。这种单个细胞或群体细胞具有的特征或标记不是亲本细胞株中所有细胞都具有的。

7. 贴壁率(attachment efficiency, seeding efficiency) 又称接种存活率,指在一定时间内,接种细胞贴附于培养器皿表面的百分率,应当说明在测定贴壁率时的培养条件。

8. 汇合(confluent) 贴壁生长的细胞在培养器皿中生长达到一定数量时细胞彼此连结成层长满器皿底壁。

9. 克隆(clone) 由单个细胞通过有丝分裂形成的细胞群体,一个克隆不一定是均质的。

10. 克隆形成率(cloning efficiency) 细胞接种到培养器皿内形成的克隆数与接种的细胞数所构成的百分率。

11. 集落形成率(接种率)(plating efficiency) 细胞接种到培养器皿内所形成的集落的百分率。接种细胞的总数、培养瓶的种类以及环境条件(培养基、温度、密闭系统还是开放系统等)均须说明。该术语用以说明细胞形成纯系的百分率。

12. 生长曲线(growth curve) 以正在

生长繁殖的培养物中的细胞的数目或生物量为时间的函数所绘制的曲线。

13. 细胞一代时间 (cell generation time) 单个细胞连续两次分裂的间隔时间, 这一时间可借助于显微电影照相术来精确测定。

14. 群体密度 (population density) 培养器皿内每单位面积或体积中的细胞数。

15. 群体倍增时间 (population doubling time) 在对数生长期 (logarithmic phase of growth) 计算细胞数增加一倍所需要的时间。平均群体倍增时间可以通过计算培养结束时或收集培养物时的细胞数与接种时的细胞数的比值推算而得。

16. 饱和密度 (saturation density) 在特定条件下, 培养器皿内能达到的最高细胞数, 当细胞达到饱和密度后细胞群体停止繁殖。在贴壁培养中以细胞数/cm²表示, 在悬

浮培养中则以细胞数/cm³表示。

17. 体外转化 (*in vitro* transformation) 培养细胞自发的或经化学致癌物、病毒、辐射等处理细胞而引起的可遗传的变化, 包括形态学、抗原、肿瘤、增殖或其他特性的变化。体外恶性或肿瘤性转化只是体外转化的一种情况。在描述体外转化时应指明其转化的类型。

18. 无限增殖 (永生性, 不死性) (immortalization) 一般用于从有限增殖的细胞转化为能无限增殖的细胞系 (株)。

19. 活力 (viability) 在细胞培养中指细胞具有生长和代谢能力, 经常以活细胞数占总细胞数的百分比来表示。

20. 衰老 (senescence) 在细胞培养中指细胞群体倍增到一定次数后即失去了再增殖的能力。

(南方医科大学南方医院 裴国献 任高宏)

第2章 细胞培养的常用技术

第一节 细胞培养的基本环境和条件

体外细胞培养所需的基本环境、生存条件及物质代谢过程与体内细胞基本相同,但随着生存环境的改变也会有一定的差异。

一、细胞培养的基本环境

无论从事何种细胞培养,培养环境中无毒、无菌都是保证培养细胞生存的首要条件。无菌技术主要包括以下几个部分。

(一)工作环境的无菌及表面处理

可采用紫外线对细胞培养室空气、超净工作台操作表面消毒,一般距紫外灯 2.5 m 范围内直接照射 20min 即可。也可用消毒剂对细胞培养室的工作面、墙壁、地面和空气等进行灭菌处理,如 70% 乙醇用于消毒皮肤或瓶皿开口部位;10% 苯扎溴铵(新洁尔灭)用于擦洗工作台;0.1% 苯扎溴铵可以对器械、皮肤、操作表面进行浸泡消毒;乳酸可用于空气消毒。

(二)培养用品的清洗和无菌处理

1. 培养用品的清洗

(1)玻璃瓶皿的清洗:培养用玻璃器皿主要有:玻璃瓶,用于配制储存种种培养液、血清等液体,常以 500ml、200ml、100ml 的生理盐水瓶代替;培养瓶,用于培养细胞,有 200ml、100ml、30ml、25ml、15 ml 等规格;培养皿,用于培养细胞和分离组织细胞及软琼脂培养等,分 120mm、60mm 等几种;吸管,包括刻度吸管及短尖吸管,用于吸取各种液体;离心管,用于离心、漂洗和分离细胞,常用离心管分为 50 ml、15ml、10ml、5ml 等规格。

其他还有三角烧瓶、烧杯、量筒、漏斗、试管、注射器等。

玻璃器皿清洗的一般步骤:煮沸 10min → 刷洗 → 流水振荡冲洗 → 烤干 → 清洁液浸泡 24h 流水振荡冲洗 → 沥水 → 蒸馏水浸泡 2 次,每次 12h → 烤干备用。

玻璃器皿清洗要领,①浸泡:初次使用的玻璃器皿使用前浸泡在 5% 稀盐酸中过夜,以中和玻璃表面的碱性物质并去除可能的霉斑,然后经简单刷洗,流水冲洗,蒸馏水浸泡,干燥备用。新玻片处理后,短时间不用时,须将它投入 95% 乙醇中保存,以防长霉。培养后的玻璃器皿应立即投入浅水中浸泡。②刷洗:用过的玻璃器材经自来水冲洗后,浸入水中煮沸,然后将适量洗涤剂(洗洁精或洗衣粉)投入沸水中继续煮沸 10min,趁热刷洗器皿内外,刷洗后浸入浅水中进行冲洗。③酸泡:刷洗好的玻璃器皿干燥后置清洁液中浸泡 24h,浸泡、煮沸、酸泡的器皿内要充满液体,不得有气泡。

清洗液的配制:表 2-1 所示为常用的三种强度的清洁液。新配制的清洁液为棕红色,遇有机溶剂或水分增多时变成绿色,表明已失效。

配制时先在盆中加入蒸馏水,加热至重铬酸钾溶解,再将盆置流动自来水中。待重铬酸钾溶解后,缓慢加入浓硫酸,边加边用玻璃棒搅动,以混合液温度不过快上升和不出现重铬酸钾结晶为度。

表 2-1 清洁液的配制

清洗强度	成分及用量		
	重铬酸钾 (g)	浓硫酸 (ml)	蒸馏水 (ml)
弱液	100	100	1 000
次强液	120	200	1 000
强液	63	1 000	200

(2)橡胶用品的清洗:胶塞类橡胶用品,每次用后先用蒸馏水浸泡,然后用2% NaOH溶液煮沸15~20min,用自来水冲洗干净,再用1%稀盐酸溶液浸泡30min,再用自来水冲洗、蒸馏水漂洗2~3次,最后双蒸水漂洗1次,烤干备用。

(3)金属器械的清洗:金属器械主要用于解剖动物、取材和原代培养组织等,新的解剖器械应先用纱布擦去防锈油后,再用洗涤剂煮沸刷洗,然后用自来水、蒸馏水、双蒸水冲洗,烤干备用;用过的器械须擦净、晾干,以防生锈。

(4)塑料器皿的清洗:细胞培养用的塑料器皿主要有培养板(有4、6、12、24、96孔等规格)、培养皿(有30、60、100mm等规格)、培养瓶等。这些产品主要是进口的一次性商品,已经消毒灭菌,打开就可使用。如果要反复使用,可按如下方法清洗:用后立即用流水清洗或浸泡在水中,用脱脂棉轻轻擦拭掉残留附着物或用超声清洗机清洗后,流水冲净,浸泡在清洗液中过夜,再用自来水冲净,蒸馏水漂洗2~3次,晾干备用。

注意事项:通常单层细胞培养物在塑料瓶中比玻璃瓶中更易附着、生长更快。塑料瓶本身无活性,更适宜在4℃储存溶液,但其价格昂贵,不能重复使用。

2. 消毒灭菌 所有培养用品在消毒灭菌前必须进行适当的包装,以保证灭菌后不受到外界污染。吸管在清洗晾干后待消毒前,在管的根端口中须用尖镊取少许脱脂棉堵塞,松紧要适宜;堵塞过多妨碍透气,过少

易脱落和不起防异物作用。

消毒灭菌的方法有多种,随物品不同,采用的方法也不同。总的来说有物理方法和化学方法两大类。物理方法有湿热(高压蒸汽)、干热、过滤和紫外线等;化学方法是使用化学消毒剂、抗生素等杀灭微生物。

(1)湿热灭菌:即高压蒸汽灭菌,是最常用和最有效的一种方法。布类、胶塞、金属器械、玻璃器皿及某些培养用液都可用此法消毒灭菌。

湿热消毒一般过程:打开排气阀→加热→排出冷空气后关闭排气阀→升到所需压力时调节火焰大小使压力稳定在所需数值并开始计时→到达所需时间后停止加热→压力指针降至零位后取出物品。各种物品有效消毒压力和时间不同,一般物品(如布类、金属器械、玻璃器皿等)消毒的要求是0.15 MPa (126℃) 20min;橡胶制品为0.1 MPa (121℃) 10min;常规液体消毒0.15 MPa (126℃) 15min。

注意事项:湿热消毒时,消毒物品不能装得过满,以保证消毒器内气体的流通。消毒过程中,消毒者不能离开岗位,要经常检查压力是否恒定,如有偏离,应及时调整。不可用安全阀摘子排气。

(2)干热灭菌:主要适用于一般器皿。用电热鼓风干燥箱加温到160℃,保持1h,可达到消毒目的。

(3)滤过除菌:大多数培养用液,如人工合成培养液、血清、酶溶液等,在高温下会变性,失去功能,因此必须采用滤过法除菌。目前常用微孔滤膜滤器进行滤过除菌时,有一次性和反复使用的两种。一次性滤器打开后就可使用。其他各种滤器如不锈钢正压滤器等必须清洗后经高压蒸汽消毒、烤干后方可使用。滤膜常使用0.22μm孔径,为一种特制的混合纤维素酯,其滤过速度快,效果较好。

(4)抗生素:主要适用于培养用液消毒灭