



● 吕 刚 梅晰凡 刘 畅 主编

医学干细胞 实验技术

**The Medicine Experimental
Technology of Stem Cell**



 **辽宁科学技术出版社**
LIAONING SCIENCE AND TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE

辽宁省优秀自然科学著作

医学干细胞实验技术

吕 刚 梅晰凡 刘 畅 主编

辽宁科学技术出版社

沈 阳

主编：吕 刚 梅晰凡 刘 畅

编者：(以姓氏笔画为序)

王岩松	王滢丽	王 筠	王欣燕	白雪山
李全双	李 新	刘世琼	闫 鹏	张学普
张世民	张 赫	姜丁文	胡 萌	胡英明
郭占鹏	袁亚江	曹 阳		

© 2010 吕刚 梅晰凡 刘畅

图书在版编目(CIP)数据

医学干细胞实验技术 / 吕刚, 梅晰凡, 刘畅主编. — 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010.12

(辽宁省优秀自然科学著作)

ISBN 978-7-5381-6722-1

I. ①医… II. ①吕… ②梅… ③刘… III. ①干细胞—实验 IV. ①Q24-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第204928号

出版发行：辽宁科学技术出版社

(地址：沈阳市和平区十一纬路29号 邮编：110003)

印刷者：沈阳新华印刷厂

经销者：各地新华书店

幅面尺寸：185mm×260mm

印 张：12

字 数：260千字

印 数：1~2000

出版时间：2010年12月第1版

印刷时间：2010年12月第1次印刷

责任编辑：李伟民 陈 刚

封面设计：嵘 嵘

责任校对：王春茹

书 号：ISBN 978-7-5381-6722-1

定 价：30.00元

联系电话：024-23284360

邮购热线：024-23284502

<http://www.lnkj.com.cn>

《辽宁省优秀自然科学著作》评审委员会

主 任:

康 捷 辽宁省科学技术协会党组书记、副主席

执行副主任:

黄其励 东北电网有限公司名誉总工程师

中国工程院院士

辽宁省科学技术协会副主席

副主任:

金太元 辽宁省科学技术协会副主席

宋纯智 辽宁科学技术出版社社长兼总编辑 编审

委 员:

郭永新 辽宁大学副校长

陈宝智 东北大学安全工程研究所所长

刘文民 大连船舶重工集团有限公司副总工程师

李天来 沈阳农业大学副校长

刘明国 沈阳农业大学林学院院长

邢兆凯 辽宁省林业科学研究院院长

辽宁省科学技术协会委员

吴春福 沈阳药科大学校长

辽宁省科学技术协会常委

张 兰 辽宁中医药大学附属医院副院长

王恩华 中国医科大学基础医学院副院长

李伟民 辽宁科学技术出版社总编室主任 编审

目 录

第一章 总 论	001
第一节 概 述	001
第二节 干细胞在医学中的应用	003
第三节 干细胞培养的无菌技术	004
第四节 污染——细胞培养中的“难关”	006
第五节 污染的清除	007
第六节 干细胞应用中的伦理学问题	009
参考文献	012
第二章 胚胎干细胞	014
第一节 胚胎干细胞概述	014
第二节 胚胎干细胞的生物学特性	014
第三节 胚胎干细胞的实验技术	015
第四节 小结	037
参考文献	040
第三章 骨髓基质干细胞	042
第一节 骨髓基质干细胞概述	042
第二节 骨髓基质干细胞的分离、纯化和体外培养	043
第三节 骨髓基质干细胞的生物学特性及鉴定	046
第四节 骨髓基质干细胞的诱导分化	048
第五节 骨髓基质干细胞的研究现状及应用	061
第六节 骨髓基质干细胞临床应用的前景	065
参考文献	068

第四章 肌源性干细胞	073
第一节 肌肉干细胞概述及特性	073
第二节 肌源性干细胞的实验技术	076
第三节 小结与思考	080
参考文献	081
第五章 神经干细胞	083
第一节 神经干细胞概述	083
第二节 神经干细胞的分类	084
第三节 神经干细胞的分化与调控	085
第四节 神经干细胞的鉴定和标记	088
第五节 神经干细胞移植治疗神经系统疾病的研究进展	088
第六节 神经干细胞相关实验技术	090
参考文献	093
第六章 造血干细胞	095
造血干细胞概述	095
参考文献	114
第七章 肿瘤干细胞	116
第一节 肿瘤干细胞概述	116
第二节 肿瘤干细胞的生物学特性	118
第三节 肿瘤干细胞的分化调控机制	119
第四节 肿瘤干细胞表面标志与鉴定	120
第五节 肿瘤干细胞在实体瘤中的研究进展与应用	122
第六节 肿瘤干细胞与肿瘤耐药性的研究	125
第七节 肿瘤干细胞的相关实验技术	126
参考文献	129
第八章 脂肪干细胞	131
第一节 脂肪干细胞的生物学特性	131
第二节 脂肪干细胞实验技术	133
第三节 脂肪组织工程中脂肪干细胞的应用	134
第四节 脂肪干细胞研究存在的问题及展望	135
第五节 脂肪干细胞的研究方向和挑战	135
参考文献	136

第九章 肝脏干细胞	137
肝脏干细胞概述	137
参考文献	148
第十章 表皮干细胞	151
第一节 表皮干细胞的概述	151
第二节 表皮干细胞的生态学特性	151
第三节 表皮干细胞实验技术	154
第四节 表皮干细胞的应用前景	155
参考文献	156
第十一章 小肠黏膜干细胞	157
小肠干细胞概述	157
参考文献	162
第十二章 角膜缘干细胞	164
第一节 角膜缘干细胞的特点及作用	164
第二节 角膜缘干细胞的特性与鉴定	164
第三节 角膜缘干细胞的分离纯化	165
第四节 角膜缘干细胞材料和方法	165
参考文献	166
第十三章 胰腺干细胞	167
第一节 胰腺干细胞概述及胰腺干细胞的种类	167
第二节 胰腺干细胞实验技术	175
第三节 小结与展望	179
参考文献	180

第一章 总论

第一节 概述

干细胞 (Stem Cell) 是人体及其各种组织细胞的最初来源, 是一种未充分分化, 尚不成熟的细胞, 具有高度自我复制能力、高度增殖和多向分化潜能, 在医学界曾被称为“万用细胞”。

早在 19 世纪, 发育生物学家就知道, 卵细胞受精后很快就分裂呈桑葚胚。这时如果将组成桑葚胚的细胞一一分开, 并分别植入到母体的子宫内, 则每个细胞都可以发育成一个完整的胚胎, 这种细胞就是胚胎干细胞。骨髓、脐带、胎盘和脂肪中则可以获取组织干细胞。每个人的体内都有一些终生与自己相伴的干细胞。

1958 年, Stevens 发现畸胎瘤, 将小鼠早期胚胎移植到 129 只小鼠的卵巢或肾脏的被膜下, 得到胚胎干细胞, 但没有定义胚胎干细胞。一般认为干细胞的研究始于 1960 年加拿大科学家恩尼斯特·莫科洛克和詹姆士·堤尔的研究之后。20 世纪 60 年代时, 几个近亲种系的小鼠睾丸畸胎瘤的研究表明其来源于胚胎生殖细胞 (embryonic germ cells, EG 细胞), 此工作确立了胚胎癌细胞 (embryonic carcinoma cells, EC 细胞) 是一种干细胞。1967 年, 美国华盛顿大学的多纳尔·托马斯发表报告说, 如果正常人的骨髓移植到病人体内, 可以治疗造血功能障碍。

1969 年, 多纳尔·托马斯完成了第一例骨髓移植, 并因此获得了 1990 年诺贝尔医学和生理学奖。1970 年 3 月, 第一次尝试用 8 份脐血治疗一位 16 岁的白血病患者, 虽然没有发生 GVHD 反应, 但移植失败, 后经化疗成功治愈。1981 年, 英国剑桥大学的 Martin Evans 和 Matt Kaufmann 以及加州大学旧金山分校的 Gail Martin 博士的实验室, 分别自小鼠胚囊中分离出胚胎干细胞。研究发现若利用微量注射方式将胚胎干细胞注入囊胚中, 并使其发育成鼠, 则胚胎干细胞便有能力发育成嵌合体小鼠身上的任何一个组织, 随后并可造成基因剔除小鼠。这些在基因表达、癌症发生、生物发生学及实验病理学上均有极大的贡献。这也是首次真正让干细胞走到了人们的眼皮底下, 并为以后干细胞克隆研究奠定了基础。1987 年 8 月, 英国爱丁堡动物生理及基因研究所的 Dr. J. Paul Simons 等人, 将羊类制造

β -乳球蛋白的基因导入老鼠,使老鼠分泌含 β -LG的羊乳,这是人类首次成功利用导入基因的方法让老鼠生产羊乳。1988年哈佛大学申请到第一只基因转殖鼠的专利。1998年的11月,美国威斯康辛大学的詹姆斯·汤森从不孕症诊所剩下的胚胎中取出细胞,建立了世界第一个人类胚胎干细胞系。

2004年3月12日,权威杂志Science上,韩国的Woo Suk Hwang和他的同事报道了采用体细胞核移植的方法产生了人囊胚,随后又得到了人胚胎干细胞。这个报道披露了干细胞及其衍生物研究方面的一个崭新的手段。以美国和哥斯达黎加为首的一派,支持采取广泛全球禁令,禁止各种形式的克隆研究,认为治疗性克隆就是夺走人们的生命。

诱导多能干细胞技术无疑是最近两年干细胞研究所取得的最为突出的成果,因此入选《科学》杂志年度十大科技突破,并列榜首。与经典的胚胎干细胞技术和体细胞核移植技术不同,诱导多能干细胞技术不使用胚胎细胞或卵细胞,因此没有伦理学的问题。

2006年日本京都大学山中伸弥领导的实验室在世界著名学术杂志《细胞》上率先报道了诱导多能干细胞的研究。他们把Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4这4种转录因子引入小鼠胚胎或皮肤纤维母细胞,发现可诱导其发生转化,产生的iPS细胞在形态、基因和蛋白表达、表观遗传修饰状态、细胞倍增能力、类胚体和畸形瘤生成能力、分化能力等都与胚胎干细胞极为相似。随后,他们进一步通过改进筛选技术得到了更接近于胚胎干细胞的多能干细胞,把这些细胞注入小鼠囊胚中再植入体内后可孕育出遗传混杂型(Chimera)仔鼠,甚至产出完全由iPS细胞发育而成的仔鼠。

很快,美国的几家实验室也陆续发表了相似的研究结果。2007年末,Thompson实验室和山中伸弥实验室几乎同时报道,利用iPS技术同样可以诱导人皮肤纤维母细胞成为几乎与胚胎干细胞完全一样的多能干细胞,所不同的是日本实验室依然采用了用逆转录病毒引入以上4种因子组合,而Thompson实验室则采用了以慢病毒载体引入Oct4、Sox2加NANOG和LIN28这种因子组合。这些研究成果在科学界和大众媒体中都引起了很大轰动,也因此被美国《科学》杂志列为2007年十大科技突破中的第2位。

2008年,iPS的研究热潮持续高涨,并取得了多项令人瞩目的进展。哈佛大学George Daley实验室利用诱导细胞重新编程技术把采自10种不同遗传病患者病人的皮肤细胞转变为iPS,这些细胞将会在建立疾病模型、药物筛选等方面发挥重要作用。

利用iPS技术可以用病人自己的体细胞制备专用的干细胞,所以不会有免疫排斥的问题。然而,iPS的研究还只是刚刚起步,有许多技术难题还有待解决。例如,现在的iPS技术主要采用病毒载体引入细胞因子,这些病毒随机插进基因组后存在着激活致癌基因或抑制抑癌基因的可能性,许多方法中还使用了c-Myc原癌基因,因此存在较大的致癌风险,显然不可能应用于临床。当前和今后一段时间的研究将继续优化方法,如使用质粒载体、融合蛋白、小分子等替代病毒载体。

干细胞按分化能力可以分为以下4类:

(1) 全能干细胞 由卵和精细胞的融合产生受精卵。而受精卵在形成胚胎过程中四细胞期之前任一细胞皆是全能干细胞。具有发展成独立个体的能力。也就是说能发展成一个个体的细胞就称为全能干细胞。

(2) 万能干细胞 是全能干细胞的后裔,无法发育成一个个体,但具有可以发育成多

种组织的能力的细胞。

(3) 多能干细胞 只能分化成特定组织或器官等特定族群的细胞（例如血细胞，包括红血细胞、白血细胞和血小板）。

(4) 专一性干细胞 只能产生一种细胞类型；但是，具有自更新属性，将其与非干细胞区分开。

第二节 干细胞在医学中的应用

干细胞的用途非常广泛，涉及医学的多个领域。目前，科学家已经能够在体外鉴别、分离、纯化、扩增和培养人体胚胎干细胞，并以这样的干细胞为“种子”，培育出一些人的组织器官。干细胞及其衍生组织器官的广泛临床应用，将产生一种全新的医疗技术，也就是再造人体正常的甚至年轻的组织器官，从而使人能够用上自己的或他人的干细胞或由干细胞所衍生出的新的组织器官，来替换自身病变的或衰老的组织器官。假如某位老年人能够使用上自己或他人婴幼儿时期或者青年时期保存起来的干细胞及其衍生组织器官，那么，这位老年人的寿命就可以得到明显的延长。干细胞的应用研究在国内外十分活跃，并取得一系列成果。

近年来，生物医学技术迅猛发展，由于干细胞具有自我更新和分化的潜能，在特定的微环境中可以横向分化，因此干细胞的应用研究具有划时代的意义。干细胞应用和人类其他治疗疾病手段一样，应符合安全和有效两大原则，安全包括：致畸、致突、致癌3大安全评价试验。即使安全评估合格，干细胞有效治疗还有许多未解决的问题，但由于其广阔的应用前景，仍成为世界科学界研究的热点之一。应用干细胞治疗疾病较传统方法有很多优点，如低毒性或无毒性，长期有效；应用自身干细胞移植，避免产生免疫排斥反应等。

源于脂肪的干细胞用于培育骨骼。美国杜克大学研究人员从成年人脂肪干细胞中培育出骨骼（如软骨细胞）取得成功，这项成果表明成年人体内组织（非胚胎组织）存在的干细胞有其多样性和多能性，脂肪干细胞具有转化成骨骼细胞及其他类型细胞的潜能。

在人的胚胎里，造血干细胞首先出现在卵黄里，随着胎儿的发育而迁移到肝。血细胞是在胎儿的肝里产生的，但在婴儿出生后不久就在骨髓里产生血细胞了。根据血细胞的发生、发展过程及其相互关系可以看出，干细胞形成了血流里的各种各样的细胞，包括把氧运送到全身的红细胞、防止伤口流血不止的血小板，以及免疫系统里能抵御外来组织、病毒和其他微生物侵袭的各种白细胞。

干细胞因故（例如化学治疗、辐射或疾病）受到损伤，就会危及免疫系统和造血系统。可以采用移植骨髓来治疗干细胞受到上述损伤的病人。不难想象，对干细胞的彻底了解对改进骨髓移植法、开发治疗癌症、艾滋病、再生障碍性贫血以及自体免疫性疾病提供了良好的方法。

1961年，J. E. Till和E. A. McCulloch对干细胞存在处所及其功能做了研究，并取得了一定进展。他们用致死剂量的辐射照射小鼠以破坏其造血系统和免疫系统，然后给注射

遗传上相容的健康的小鼠骨髓。12天后,取出受辐射小鼠的脾,并计数脾里生长的造血细胞的集落数。结果发现,小鼠脾里的集落数和原先注入的干细胞数是相对应的。

采用骨髓移植法移植干细胞存在的主要问题是组织不相容问题。目前解决的办法是采用自体移植或移植组织类型相容的同胞兄妹的骨髓。近20年来,人们已经清楚,脐带血里含有血细胞的前体——多能性干细胞。目前,脐带血在婴儿出生后即被丢弃,而这些血都可能成为有用的干细胞的来源。从理论上讲,这个干细胞可供人终生受用。

如能贮存许多人甚至所有人的干细胞,尤其是贮存在人出生时收集的造血性干细胞,则在急需进行自体移植时立即可以得到贮存的干细胞。

从骨髓里分离干细胞也并非容易。Gerald J. Spangrude等利用一系列单克隆抗体对小鼠骨髓里细胞进行了分类。鉴定出了骨髓细胞中总数不少于0.1%的亚细胞群,它们能维持和重建受致死性辐射小鼠的免疫系统和造血系统。Ihor R. Lesmischka等也在小鼠胎儿的肝细胞里发现一个亚细胞群,这个亚群里含有全能干细胞。此外,Curt Civin和Charles Baum等研究小组在研究分离人的干细胞方面都建立了很好的方法。

在干细胞的行为研究方面,曼彻斯特pasterson癌症研究所的工作具有重要意义。他们开发了一个系统,可使干细胞在实验室里存活,从而可以观察干细胞在和人骨髓相似条件下的生长和发育。

最近的研究揭示了有关激素因子如何调节造血和骨髓环境以影响干细胞活性的新细节。其中干细胞因子特别引人注目,它能和由细胞癌基因c-kit产生的受体相互作用。

干细胞能够重建免疫系统。目前,采用移植干细胞法对许多种疾病进行了治疗,如严重的结合性免疫缺损综合征、巨噬细胞障碍的代谢疾病、地中海贫血症、镰刀状红细胞病、范可尼贫血症以及白细胞的严重缺酶症等。

研究干细胞的最终目的是为了造血和免疫系统疾病的治疗。因此,人们应该能够控制干细胞的分化和诱使多能性干细胞的复制。关于干细胞的分化存在两种观点:“决定论”和“随机论”。前者认为,包括激素在内的外来因素影响诱导干细胞的分化;后者认为,自我更新或分化以及遵循哪个谱系的决定都是随机的。David W. Golde最近的研究表明,干细胞发育的随机论和决定论并不相互排斥,两种机制可能都存在。

总之,通过对干细胞各种行为的研究,已经为在医学上令人头疼的多种疑难病症的治疗提供了在理论上和实践上都可行的方法。这在医学上具有深远的意义。

第三节 干细胞培养的无菌技术

干细胞的培养条件是相当严格的,每个成功的研究员对细胞的照顾甚于自己的孩子。而众多的成功经验中,无菌技术无疑是最最重要的一条:

①做好准备工作。不要急于进行细胞培养,要先设定计划,即步骤、工具、试剂。特别是将细胞用于大规模生产时,尤其如此。经过干热灭菌的容器一般认为可以在一周内保持无菌状态,如果准备多了,用不完的就得重新灭菌,耗费能源、占用灭菌空间;干热灭

菌需要一天的时间，当器皿准备不足时，可能错过了最佳操作时间，也许需要很久才能将细胞状态再调整好。

②刷玻璃器皿的过程：初洗、泡酸（一天）、自来水冲洗（10遍）、纯化水冲洗（3遍）、注射用水冲洗（3遍）。残留的酸可能会抑制细胞生长，甚至导致细胞死亡，痛失辛苦得来的细胞，一定不能大意。

③实验进行前，无菌室及无菌操作台（laminar flow）以紫外灯照射30~60min灭菌，以75%医用酒精擦拭无菌操作台面，并开启无菌操作台风扇运转10min后，才开始实验操作。每次操作只处理一株细胞株，且即使培养基相同亦不共享培养基，以避免失误混淆或细胞间污染。实验完毕后，将实验物品带出工作台，以75%医用酒精擦拭无菌操作台面。操作间隔应让无菌操作台运转10min以上后，再进行下一个细胞株的操作。

④无菌操作工作区域应保持清洁及宽敞。必要物品，例如试管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暂时放置，其他实验用品用完即应移出，以利于气流流通。实验用品以75%医用酒精擦拭后方可带入无菌操作台内。实验操作应在台面之中央无菌区域，勿在边缘非无菌区域操作。

⑤小心取用无菌的实验物品，避免造成污染。勿碰触吸管尖头部或是容器瓶口，亦不要在打开之容器正上方操作实验。容器打开后，以手夹住瓶盖并握住瓶身，倾斜约45°取用，尽量勿将瓶盖盖口朝上放置桌面。

⑥无菌操作台内定期更换紫外线灯管及HEPA过滤膜，预滤网（300h/预滤网，3000h/HEPA）。

⑦水槽可添加消毒剂，定期更换水槽内的水。

⑧认真按照操作规程进行实验，一般不会导致污染，很多情况下是由于所用的试剂或培养基有污染而使实验失败。

⑨粉末培养基配制好后（加了血清），一般在4℃下存放尽量不要超过1个月，如在-20℃存放时间可长一些，但最好也不要超过3~4个月，可能对于永生化细胞株来说要求不是太高，我们在过去的几年里一直是作原代细胞培养的，细胞娇弱，经验表明放置时间不宜过长。

⑩关于实验用品的清洗与消毒：用过的玻璃器皿先在清水中浸泡30min以上，然后加少许清洗剂，以超声波洗涤30min左右（如无超声波洗涤器可用软毛刷轻轻刷洗干净），捞出晾干，再在铬酸洗液中浸泡6~18h（或过夜）后，自来水清洗10~15遍，双蒸水清洗3~4遍，晾干，高压消毒后即可使用。

⑪试剂一定要用自己的。因为并不是每个人的操作都规范，因此相互之间串着用，容易造成交叉污染。倒液体前后都要在酒精灯上过一下。个人认为比起用吸管吸更能很好地防止污染。步骤越简单，越能防止污染。而且还能节省很多吸管。

⑫一次将所有的所需要试剂、工具放入工作台。不要在实验中途，又出工作间去拿东西，这样增加了污染的机会。

⑬整个操作要快、动作要轻、而且不要处理其他的事情。比如手机响了，最好不要接。最好操作的时候将手机关机。

⑭一般开紫外线照射台的时候，就将培养基、酶、DHANKS液置于室外让其自然升

温。这样40min后,温度也升上来了。有很多人将其放到37℃水浴锅里加热。一定要注意水浴锅的卫生,有的常年不清洗,里面很脏,容易在外面瓶身上吸附大量细菌。因此使用时一定要勤换水。从水浴锅取出后,最好用毛巾擦干上面的水。

⑮操作前要洗手,用75%酒精擦手。用完操作台,要打扫卫生。

⑯对于培养条件需求较高的细胞,一般都是第一天处理完后,加少量培养基(能够盖住瓶底部),第二天换液,以免死细胞和碎片对活的细胞产生不良影响。

⑰按照试剂的保存标准保存,例如血清、胰酶等没开封的-20℃保存,开封后-4℃保存一般不超过7天。

第四节 污染——细胞培养中的“难关”

有过细胞培养经验的科研人员都清楚,在细胞培养过程中,污染无疑是研究人员最不愿意面对的问题。污染的出现往往意味着这段实验的失败,需要重新起步。由于每一种细胞有其独特的培养体系,因此污染造成后果也不尽相同。某些污染的发生往往难以察觉检测,而且污染源能长期共存于培养体系中,这类污染事实上大部分被人们忽视了。如果能够迅速找到污染源,无疑能给今后的实验带来宝贵的经验,不幸的是,在实际操作过程中,我们很难在短时间内找到污染的源头。这就像一场噩梦,即使重新实验,我们依然是在忐忑不安中度过分分秒秒。运气好的话可以避免再次污染,运气不好可能就此停滞不前,反复污染。

污染的发生存在很大的不确定性。实验仪器设备、实验室周围环境等因素都可以引起细胞培养中的污染现象。经过实际操作和对周围研究人员的观察,我们不得不将引起污染主要的责任归到操作人员身上。前面提到的外部因素固然客观存在,但这些都是可以在研究人员严格的操作下避免的。设备的及时、彻底的清洗和消毒;实验室定期按时、按量的进行消毒处理,这些外部的物理、化学及生物因素都可以预防。这样操作人员清洗消毒培养用物品、材料洗刷不净,培养用液和器材灭菌不彻底也会引入微生物和有毒物质就成了细胞污染的主要来源:例如研究人员操作过程中未戴口罩、帽子,呼出气中排出污染物;操作者将吸管或无菌器具碰到了污染的物品,如手上皮肤和瓶子外壁;血清灭菌不彻底,潜在污染源头等。因此,认识细胞培养污染的途径及其危害性,建立细胞培养规范的操作方法及规章制度,可以有效地防止污染保证实验体系的稳定性和可靠性。

根据污染物的不同,我们可以将细胞培养中的污染分为以下几个不同的类型:

1. 生物污染

生物污染是实验室细胞培养中最常见的污染。其中又以细菌污染最为常见。即使在细胞培养液中加入了一定剂量的抗生素(有人认为这可能是导致污染的诸多因素之一,也可能因为其他原因而引起污染。细胞受细菌污染后,会出现培养液变混浊,pH改变等不同现象。这些都是显性污染,虽然可以导致细胞的迅速死亡(往往不能挽救),但是可以提示实验人员在最短的时间内中止此次实验;还有一种污染时“隐性污染”,培养液肉眼观

察无多少改变，只能在镜下发现菌体才知污染。“隐性污染”的危害要大于“显性污染”，原因在于这种污染往往不能及时发现，在后续的试验中会浪费大量的人力物力。由于污染持续的时间长，且比较隐秘，污染源很难找到。所以，每天应在导致相差显微镜下仔细观察，及时发现潜在的污染。

有一种污染物介于细菌与病毒之间能独立生活的最小微生物——支原体，支原体的大小为 $0.2 \sim 0.3\mu\text{m}$ ，显微镜看不到，不能通过过滤清除，常给细胞培养工作带来污染的麻烦。它的结构比较简单，多数成球形，没有细胞壁，只有三层结构的细胞膜，故具有较大的可变性。支原体污染后不引起培养液混浊和pH改变，部分敏感细胞可见细胞生长增殖变慢，部分细胞变圆，从瓶壁脱落。但多数细胞污染后无明显变化，或略有变化，营养要求高，不容易用传统的微生物培养法检测到，大多数抗生素对其无效。

病毒是仅由核酸和蛋白质外壳构成的专营细胞内生存的寄生物。无细胞结构，为纤细的病原体。病毒有高度的寄生性，完全依赖宿主细胞的能量和代谢系统，获取生命活动所需的物质和能量，采用组织细胞培养法生产疫苗，如果没有除去潜在病毒的组织培养物，会产生病毒污染。因此，潜在病毒是细胞大量生产和疫苗、干扰素等生物制品制作中的难题。在实验过程中，我们发现有些病毒污染后，在养分充足的情况下，可长时间与细胞共生，不过细胞生长会变慢，但多于最后由于营养耗尽及毒性作用而使细胞脱落死亡。

真菌污染是细胞培养过程中最难发现和最难清除的一种，尤其在南方的梅雨季节进行细胞培养更易发生此类污染。培养细胞受真菌污染后，培养液一般不发生混浊，有些种类的病毒污染偶尔在倒置显微镜下可见丝状、管状或树枝状的菌丝纵横交错在细胞之间。

2. 物理污染

细胞培养中的物理污染主要包括：孵箱的温度、 CO_2 含量不当；不明来源的放射线和辐射等。物理污染对细胞的损害程度与物理因素接触的时间和浓度有很大的关系，如果接触时间不长，浓度不大，及时纠正后还是可以保住细胞的。

3. 化学污染

细胞培养中的化学污染来源于血清、三蒸水、培养液等试剂和刷洗后的培养皿残留的洗涤剂。这就显示了预实验的重要性。在试验正式进行之前和实验过程中不得已更换试剂之前，一定要进行预实验。在试剂购买时，在经济能力可以承受的范围内，尽量选择口碑比较好的品牌试剂，必定有事半功倍的效果。

污染可以导致细胞的死亡和活性减低，但是细胞培养过程中出现裂变和活性减低、老化等现象并不能一概归咎到污染的问题之下，因为试剂的不合理应用、环境的不适合等等因素都可以导致以上现象的发生。总之，遇到问题还是从实际出发，得出污染的结果除了靠经验，检测结果的支持还是最重要的。

第五节 污染的清除

培养细胞一经污染，多数较难处理。如果污染细胞价值不大，宜弃之；有细胞株留存

的或可购置的,可在寻找原因后彻底消毒操作室,复苏或重新购置细胞,再培养。若污染细胞价值较大,又难于重新得到,可采取以下办法清除。

1. 使用抗生素

抗生素对杀灭细菌较有效。联合用药比单独用药效果好。预防用药比污染后再用药效果好。预防用药一般用双抗生素(青霉素 100u/mL 加链霉素 100 μ g/mL),污染后清除用药需采用大于常用量 5~10 倍的冲洗法,于加药后作用 24~48h,再换常规培养液。此法在污染早期可能有效。所用抗生素品种除青霉素、链霉素外,还可用庆大霉素、卡那霉素、多粘菌素、四环素、制霉菌素等。常用 400~800 μ g/mL 卡那霉素或 200 μ g/mL 四环素处理,每隔 2~3 日换液 1 次,传 1~2 代进行治疗。近年来有报道,4-氟,2-羟基喹啉(Ciprofloxacin, Cip)、截耳素衍生物(Pleu-romutilin derivative, BM-Cyclin2: BM-1)和四环素衍生物(BM-2)等 3 种抗生素单用或合用对杀灭支原体有效。这三种抗生素均用 PBS 配成 250X 浓缩液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用,使用浓度 Cip 为 10 μ g/mL, BM-1 为 10 μ g/mL, BM-2 为 5 μ g/mL。使用时先吸出污染的培养液,加入含 BM-1 的 RPMI1640 培养液,3 天后再吸出培养液,加入含 BM-2 的 RPMI1640 培养液,培养 4 天,如此连续 3 个轮次,直至用 33258 荧光染色镜检验证明已清除支原体后,再加正常培养液培养传代 3~4 次。

2. 加温处理

将污染的组织培养物放在 41 $^{\circ}$ C 培养 18h,可杀死支原体,但对细胞有不良影响。所以在处理前要进行预试验,摸索能最大限度地杀死支原体又对细胞影响最小的加热时间。此法有时不可靠。若先用药物处理后,再以 41 $^{\circ}$ C 加温处理效果更佳。

3. 使用支原体特异性血清

用 5% 的兔支原体免疫血清(血凝效价 1:320 以上)可去除支原体污染,因特异抗体可抑制支原体生长,故经抗血清处理后 11 天即转为阴性,并且 5 个月后仍为阴性。但此法比较麻烦,不如用抗生素方便、经济。

4. 其他方法

除了上述去除污染的方法外,还有动物体内接种除菌法、巨噬细胞吞噬法、污染培养瓶中加入溴尿嘧啶再用光照射的方法及过滤法等,但均较麻烦,且效果不确定。所以一旦支原体污染,除非有特别重要价值,一般均弃之重新培养。

5. 预防

预防是防止细胞培养过程中发生污染的最好办法。只有预防工作做在前,才能将发生污染的可能性降到最低程度。一般预防可从以下几方面着手:

(1) 从物品、用品消毒灭菌着手 细胞培养所用物品清洗、消毒要彻底,各种溶液灭菌除菌要仔细,并在无菌试验阴性后才能使用。操作室及剩余的无菌器材要定期清洁消毒灭菌。

(2) 从操作者做起

①操作者责任心要强,要细心稳重,操作技术要熟练。进无菌室前要用肥皂洗手或用 5% 新洁尔灭浸泡 5min,按规定穿隔离衣。进入后关好门,坐下来尽量少走动。工作开始要先用 75% 酒精棉球擦手、擦瓶口和烧灼瓶口。事先要严格检查器材、溶液和培养物,不要把污染品或未经消毒的物品带入无菌室内,更不能随便使用,以免造成大批污染。

②操作者动作要轻,必须在火焰周围无菌区内打开瓶口,并将瓶口转动烧灼。操作时尽量不要谈话,若打喷嚏或咳嗽应转向背面。

③操作时要常更换吸管,切勿一根吸管做到底。一旦发现吸管口接触了手和其他污染物品应弃去。实验完毕及时收拾,保持实验室清洁整齐,最后用经过消毒水浸泡的纱布擦台面。

(3) 防止细胞交叉污染

①在进行多种细胞培养操作时,所用器具要严格区分,最好做上标记便于辨别。并按顺序进行操作,避免一起进行时易发生混乱。

②在进行换液或传代操作时,注射器和滴管不要触及细胞培养瓶瓶口,以免把细胞带到培养液中污染其他细胞。

③所有细胞一旦购置,或从别处引入,或自己建立,均应及早留种冻存,一旦发生污染可弃之复苏,重新培养。

第六节 干细胞应用中的伦理学问题

众所周知,干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源,具有高度自我复制能力、高度增殖和多向分化潜能、具有可植入性和重建能力等特征。近年来干细胞领域的研究成果主要体现在人胚胎干细胞的克隆成功,核移植技术的成熟以及成体干细胞的可塑性研究等领域。在当今的生命科学研究领域,人胚胎干细胞及克隆技术等研究的进展和突破给医疗、卫生健康等方面带来了革命性的影响,同时相关研究成果所引发的生命伦理问题备受关注。如何更好地协调与解决干细胞研究过程中面临的伦理学争论,成为摆在人们面前一个很现实和迫切需要解决的问题。

干细胞应用中的伦理学问题集中体现在胚胎干细胞,一场伦理道德之争正在展开。那么在理论上,用体细胞核转移的方法生成自体同源干细胞引起的争议会少一些。这种方法是把成熟细胞的细胞核转入一个去核的未受精卵细胞中,在实验室里,这个卵细胞发育成胚泡,研究人员可从中分离培养多能干细胞系。如果这种“治疗性克隆”能够在效率上更提高一些,那么这对人类干细胞的研究同样有意义。

人类胚胎实验研究的目的是,为了从基因调控的层面去探索胚胎发育的奥秘。这不仅是为了治疗不育症,而且可从基因诊断和基因治疗的角度去不断探索医疗卫生的新方法,从而为人类健康服务。现在人类胚胎研究在治疗不育症方面有了体外授精、单一精子注入卵质内手术等先进技术,人们从原来排斥的态度转变到现今的普遍接受。而从胚胎分离和培养干细胞的实验还未被广泛接受,其根本问题在于胚胎是不是人、胚胎是否具备“道德人格”和道德地位。在这个核心问题上存在着一些对立的看法和伦理道德的争论。

这场争论的广度与深度前所未见,备受各国政府和全社会的关注,政府首脑、科学家、哲学家、医学家和伦理学家都纷纷发表各自的意见。各国政府和科学家都同声谴责克隆人。美国前总统克林顿曾要求国会立法禁止克隆人,欧洲议会则通过了反对克隆人的投

票，英、法、德、澳、日和中国政府都正式表态反对克隆人。各国科学家对克隆人采取了坚决抵制的态度。多利羊之父维尔穆特（I. Wilmut）谴责克隆人的做法，认为这“完全是一种犯罪行为”；还有人表示，在动物克隆实验屡屡失败的今天，抢先进行克隆人实验是“不道德的”。

1999年，人类基因组组织（HUGO）伦理委员会发表了关于克隆的声明。声明中明确指出：“研究利用克隆技术产生特定细胞和组织（皮肤、神经或肌肉等）用于治疗性移植应该得到支持”，“在人和动物身上用体细胞核移植进行基础研究，以探讨种种科学问题，如研究基因表达、研究衰老以及细胞凋亡应该得到支持”。

为满足不断发展的干细胞研究领域的需求，美国首个专门致力于干细胞研究的独立伦理审查委员会StemCore在2007年2月成立。该机构专门从事干细胞研究审查、确认胚胎干细胞来源以及审查试验细胞疗法方案。该机构联席主席Kathi Hanna表示：“重要的是，这一新兴科学领域的研究要想尽快地发展，还取决于实行独立的监督机制来确保其符合伦理和监管部门的要求。”

干细胞研究已经成为各个国家争先抢夺的生物医学研究的制高点。正当干细胞研究不断取得突破性进展的时候，伦理学家、政治家以及一些政府机构发出了不少反对的声音，他们的主要依据是干细胞研究涉及人类胚胎、生命的权利、器官再造等一系列伦理学、宗教等敏感问题；人类胚胎作为生命体应该受到保护；非自然的器官乃至生命再造等应慎重进行等。事实上，由于伦理学家的批评意见以及政治家在立法过程中的相反观点，干细胞研究已经受到相当程度的羁绊。回顾科学发展的历史，许多重大的科学发现和进展往往对传统的道德观念，包括伦理学发生剧烈的冲突，从而引起科学家、伦理学家以及公众认识上的差异甚至争论，目前干细胞的研究也面临着同样的问题。

这些争议对一些更极端的反对者来说还不是关键，他们认为只有对于一个已经去世的人，体细胞核转移技术才可以接受。往往在联邦经费资助人类干细胞的科学研究之前，一个基于相互尊重的信仰的公众讨论就已经开始，无论这种研究是以治疗人类疾病为目的还是以基础研究为目的。

在科学技术成为强势文化的今天，生命伦理学的发展要和科学技术的进步相协调，我们应当坚持科学研究的宗旨，为人类的生存、幸福和发展，坚持趋利避害，坚持公正的恒久道义，促使科学与道德协调发展。值得高兴的是，目前科学工作者和伦理学家以及社会公众在以下问题上已经达成共识。①人类干细胞研究的地位应受到应有的尊重，充分尊重胚胎、尊重人的权利和尊严。人类胚胎用作研究必须是体外的，不能超过14天（一般认为，14天前的胚胎还是既无感觉又无知觉的细胞团，人类胚胎不是商品，不能进行买卖，科学家应采取专门的措施处理研究用胚胎。②干细胞的来源问题，如果多能干细胞来源于胎儿组织，则必须遵守所有涉及人类胎儿组织研究和胎儿组织移植研究的法律和规则。剩余胚胎和胎儿组织的获得，必须经捐赠者的知情同意，包括：捐赠者不会得到捐赠之后任何有关胎儿组织或细胞试验的信息，捐赠者不会从该细胞研究中得到任何经济上的回报等。如果来源于成人细胞或组织，也必须严格遵循知情同意原则。③女性供卵要非常慎重，必须获得当事人的知情同意，并遵守有关的伦理学原则和法律法规，并严禁将其作为商品和有价物品进行买卖和交易。④坚决反对“克隆”人，并对生殖技术进行监督和控