

研究生教学用书

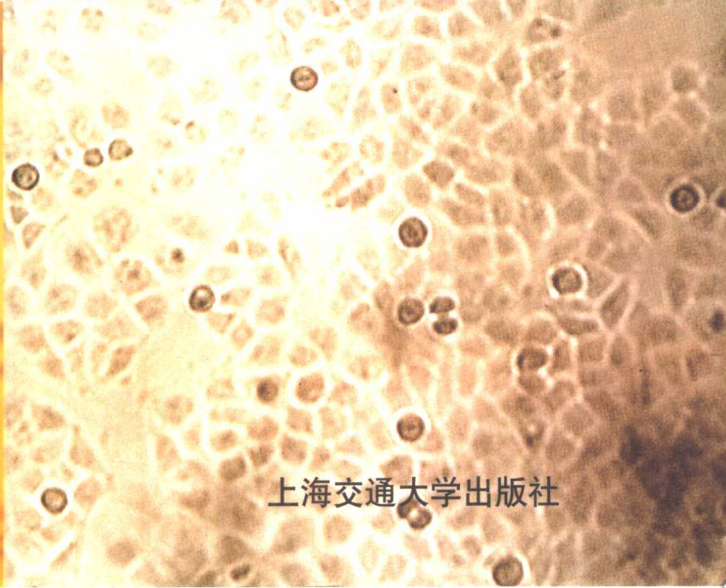
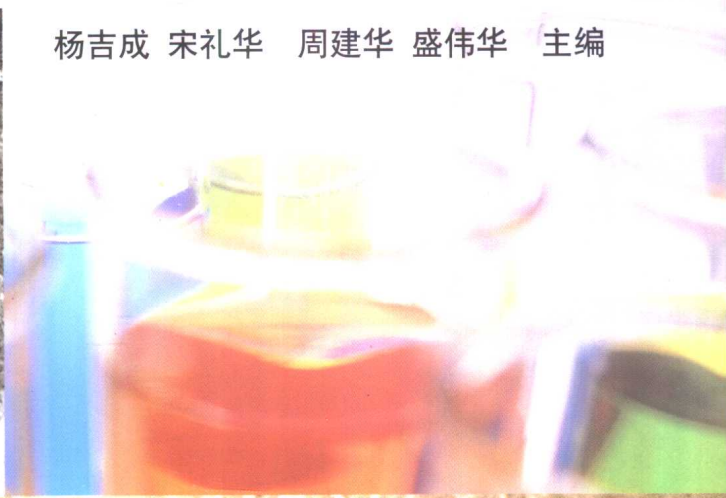
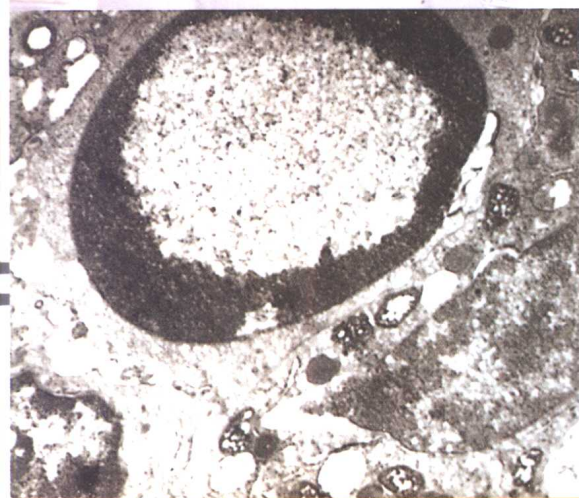
教育部研究生工作办公室推荐

MEDICAL CELL ENGINEERING

# 医用细胞工程

(第二版)

杨吉成 宋礼华 周建华 盛伟华 主编



上海交通大学出版社

**研究生教学用书**

教育部研究生工作办公室推荐

# 医用细胞工程

MEDICAL CELL ENGINEERING

(第二版)

主 编:杨吉成 宋礼华 周建华 盛伟华

副主编:缪竞诚 李平生

主 审:阮长耿

编 委:李丽娥 李晓诗 杨宗华 吕海涛

董宁征 王红卫 阳小卫 张 云

赵小瑜 龚爱华 郝思国 王 甦

汤建平 梁中琴 谢宇锋 陈 姝

陈雄艳 吴妹英 孙 凌 赵 军

上海交通大学出版社

## 内 容 简 介

本书是国家教育部研究生工作办公室推荐的第一批研究生教学用书之一。本书共分三篇,内容承上启下,循序渐进。第一篇为细胞工程的基本技术,分九章。第二篇为细胞工程的常用技术,分十三章。第三篇为细胞工程的应用技术,分六章。最后还介绍了细胞培养技术和细胞工程在医学和生物技术中的应用。

全书内容丰富、技术性强,充分体现了技术的实用性和可操作性。理论和技术、实验技术和生产工程技术密切结合的特点,不仅可作为医学硕士研究生专业基础课教材,而且可作为医学、药学、生物技术和生物制品专业本科生的专业教材,还可作为从事医疗卫生、教学科研的教师和医务工作者的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

医用细胞工程/杨吉成等主编. —2版. —上海:上海交通大学出版社,2003  
ISBN 7-313-02687-0

I. 医... II. 杨... III. 医学工程:细胞工程 IV. R318  
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 028111 号

### 医用细胞工程

#### 第二版

杨吉成 宋礼华 周建华 盛伟华 主编

上海交通大学出版社出版发行

(上海市番禺路 877 号 邮政编码 200030)

电话:64071208 出版人:张天蔚

上海锦佳装璜印刷发展公司 印刷 全国新华书店经销

开本:787mm×960mm 1/16 印张:30.5 彩插:16 字数:588 千字

2001 年 6 月第 1 版 2003 年 6 月第 2 版 2003 年 6 月第 2 次印刷

印数:3051—5100

ISBN 7-313-02687-0/R·011 定价:53.00 元

---

版权所有 侵权必究

# 序

医用细胞工程是根据细胞生物学和工程学原理,运用体外细胞培养技术定向改变细胞遗传特征,建立或创造新型细胞系(株),并通过专门的细胞培养方法研究细胞生命现象和活动规律,或采用工程化的大规模细胞培养方式,探索生产方法和工艺,制造医用生化 and 生物制品。这一专门的技术,不仅对医学基础及实验和应用性研究有参考价值,而且对生物技术产品的开发和生产也有较大的指导作用。

细胞工程是当代生物工程的重要组成部分,与基因工程、蛋白工程密切相关。目前细胞工程在医药、生物技术的研 究及工业生产中得到了越来越广泛的应用,并产生了巨大的社会和经济效益,但在国内医药及生物技术领域尚无此类图书。

杨吉成教授长期从事科研及教学工作,有着丰富的理论知识和实践经验,又了解医药及生物技术领域研究生及相关技术人员的需求,他和合作者共同编写的《医用细胞工程》,既详细地介绍了细胞工程中有关细胞培养的基本原理和方法,又全面地叙述了细胞工程中常用的技术,并介绍了细胞工程的生产技术。本书内容丰富,题材新颖,方法具体,实用性强。既可作为医药专业、生物技术专业的本科生及研究生的教材,又可作为相关技术专业人员的参考书,具有较大的参考价值。

苏州医学院院长  
中国工程院院士

院長耿

# 编 者 的 话

医用细胞工程是根据细胞生物学和工程学原理,运用细胞培养技术定向改变细胞遗传性,创造新型细胞系,并通过工程化的大规模细胞生产方法和工艺,制造生化产品和生物制品。本书系统介绍了细胞培养基本技术,常用技术和生产应用技术,重点突出了技术、方法、工程和应用。内容上具有题材新颖、技术先进、方法具体、步骤分明、操作方便、非常实用的特点。

医用细胞工程是生物工程的重要高新技术,与基因工程、蛋白工程关系密切。细胞工程既是基因工程的基础,又是基因工程的目的。基因工程的表达离不开细胞工程。细胞工程是蛋白工程产物的重要生产手段,可为蛋白工程提供大量的加工原料,若没有细胞工程,蛋白工程就难以实现产物的加工和纯化。由此可见,细胞工程在生物工程中占有重要地位。

《医用细胞工程》是国内医药和生物技术首版专业教材,可作为医药专业、生物技术和生物制品学专业的本科生和研究生的教材或参考书。这本书内容丰富,技术性强,要真正掌握,还得通过大量实验和工作实践,才能达到理论和实践的结合,才利于对其中的技术性内容完全消化吸收,光靠课堂讲授是不行的,还要安排好教学实验和实习。因此,要教好、学好,除了要制定相适应的教学大纲外,还得编写相匹配的实验和实习指导。

在编写本书的过程中,各编者根据自身的经验,参阅了国内外有关书籍和近期文献,但由于时间仓促,水平有限,遗漏、缺点和错误在所难免,恳望广大读者批评指正。

2003 年 5 月

# 前 言

根据细胞生物学及其工程原理,运用细胞培养技术定向改造人及动物细胞遗传性,创造新型细胞系,并通过工程化的大规模细胞生产方法和工艺,制造生化产品或生物制品,为生物制药和医药研究服务的技术,称之为医用细胞工程。鉴于目前的生物学、医学和生物技术专业的本科生和研究生虽然学习过细胞生物学、微生物学和生物化学等专业基础课,但从未接受过细胞培养技术的训练和学习,而细胞培养技术又是细胞工程的基础和基本功,是必不可缺的基本技术,因此,对于他们来说补上这一课是很有必要的。

细胞培养基本技术包括细胞培养的基本知识和概念,细胞培养的条件,各种组织来源的原代细胞制作和传代培养方法,细胞的营养、环境和影响细胞生长的因素,特别是正常细胞(包括二倍体细胞)、肿瘤细胞的培养和细胞系(株)的建立,细胞的纯化、克隆分离及单细胞培养技术,细胞的长期保存和运输,细胞的形态和生长特性的观测等。这些内容均属于细胞培养的基本技术。如果连这些技术都未能掌握,又怎能理解和掌握细胞工程中重要的和关键性的技术,又怎能使细胞工程中的操作技能得到提高。若不通过细胞培养技术的基本功训练,是难以真正学好和掌握细胞工程的。因此,首先从细胞培养基本技术着手,进行基础知识学习和基本技术的实际操作,是完全有必要的。

在学好细胞培养基本技术的基础上,才能更好地进一步学习和掌握细胞工程中重要而又常用的专门技术,如细胞染色质和染色体分离分带技术,细胞凋亡,细胞转化,细胞的诱导分化,细胞的药物敏感性试验,细胞毒试验,细胞的融合及单克隆抗体的制备,细胞因子的诱生和检测,细胞的病毒分离和培养,细胞器的提取,细胞 DNA(基因组 DNA)、RNA 分离鉴定,细胞的基因(或基因组 DNA 及细胞器)的导入等重要的专门技术。该专门技术在细胞工程中是极为常用的,但专业性强,没有扎实的基础和过硬的操作技能是难以掌握的。一旦掌握了此项技术,既可开展细胞工程的科学研究,又可在细胞工程的应用技术中大显身手。同时,该项技术也是分子细胞生物学的基础,学好了此项技术也可开展分子生物学和基因工程的科学研究打下扎实的基础,而且也利于熟练地开展细胞工程的生产应用,并能直接指导生产实践。总而言之,细胞培养基本技术是基础,细胞工程常用的专门技术是关键。

细胞工程的应用技术是细胞培养基本技术和细胞工程常用的专门技术具体应

用的体现,应用是我们学习这门课程的目的所在。因此,学好应用技术对今后的生产和研究工作有直接的参考和指导价值,是对所学的实验技术能否真正达到与生产实践相结合的具体检验,学好后,对今后走向社会更好地适应不同的工作岗位是非常有益的。

目前,医用细胞工程不仅在医药、生物技术的研究中广获应用,而且在工业生产中也具有重要的地位,并产生了巨大的社会效益和经济效益。自 19 世纪 70 年代以来,由于现代生物技术迅速发展成熟,人们发现人和动物细胞培养具有功能的全能性,可利用细胞制造许多生物活性物质,并形成了相当规模的细胞工程工业。其主要产品除病毒疫苗外,大多用于生产人体含量极低、多功能、高活性、特殊的生物活性蛋白,如 IL-2、IFN- $\alpha$  等细胞因子。由于医药事业和生物技术的发展,目前已实现商品化的产品有口蹄疫疫苗、狂犬病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒活疫苗、麻疹疫苗、流行性乙型脑炎疫苗,此外还有乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒 I 型和 II 型、巨细胞病毒和 HIV 病毒的抗原疫苗,疟疾和血吸虫抗原疫苗;生物活性蛋白类制品有  $\alpha$ -干扰素和  $\beta$ -干扰素,血纤维蛋白溶酶原激活剂,凝血因子 VIII 和 IX、蛋白 C,免疫球蛋白,促红细胞生成素、松弛素、激肽释放酶、尿激酶、生长激素及 200 多种单克隆抗体,以及真核细胞(CHO 等)表达的基因工程产品,如 G-CSF, GM-CSF, EPO 等。临床研究所应用的功能性效应细胞,如 LAK, TIL、造血干/祖细胞和基因导入的功能性细胞的细胞移植产品等。其中用无血清培养基培养动物细胞,生产 McAb,采用气升式培养罐达到 1 000 L 规模,生产周期为 260 h,抗体浓度达到 50~500 mg/L,为实验室浓度的 4~5 倍。产品批量达到 200 g;此外在 1 000 L 规模上采用微载体法培养人二倍体成纤维细胞和生产  $\beta$ -干扰素获得成功。英国 Wellcome 公司采用 8 000 L 培养罐培养 Namalva 细胞生产  $\alpha$ -干扰素,亦为工业化规模生产的典型实例,被称为“超大规模”人类淋巴细胞培养技术。近年来又采用 100 L 培养罐进行灌注式连续培养细胞的生产获得成功,缩小了反应体积,扩大了培养规模,提高了产品的产量,为大量细胞培养提供了新技术,推动了细胞工程的工业化进程。相信随着技术的不断进步,新的细胞培养设备不断出现,必然形成一个有广泛市场前景的细胞工程产业。

杨吉成

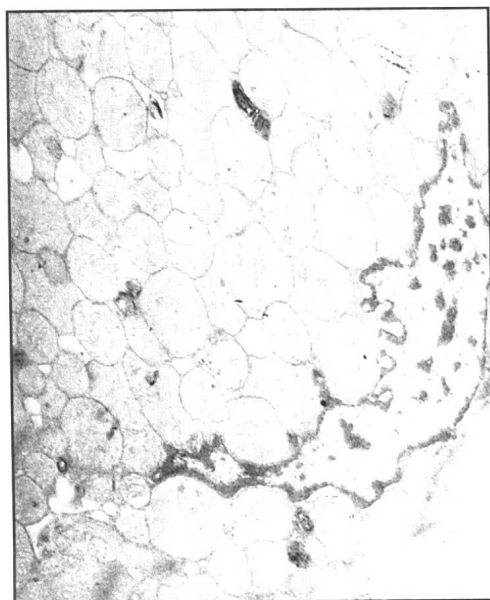
2003 年春于苏州医学院



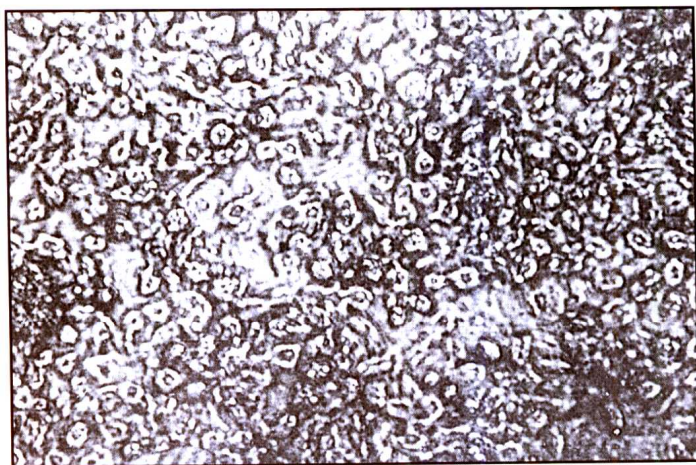
照片 1 细胞内的中心粒、高尔基体  
(苏州医学院毛棣华提供)  
 $\times 12000$



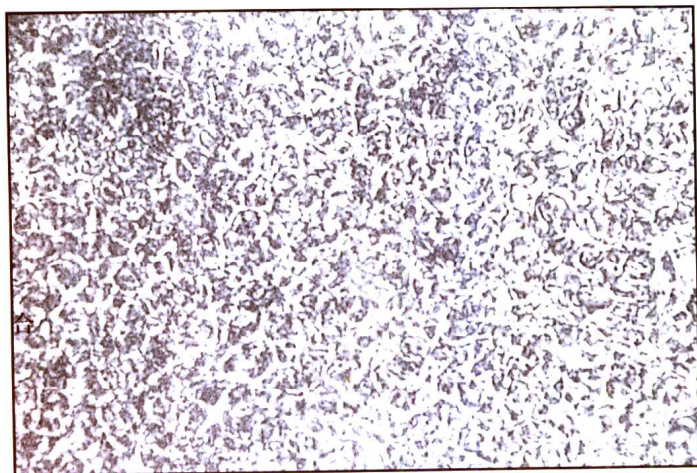
照片 2 细胞内的粗面内质网  
(苏州医学院毛棣华提供)  
 $\times 12000$



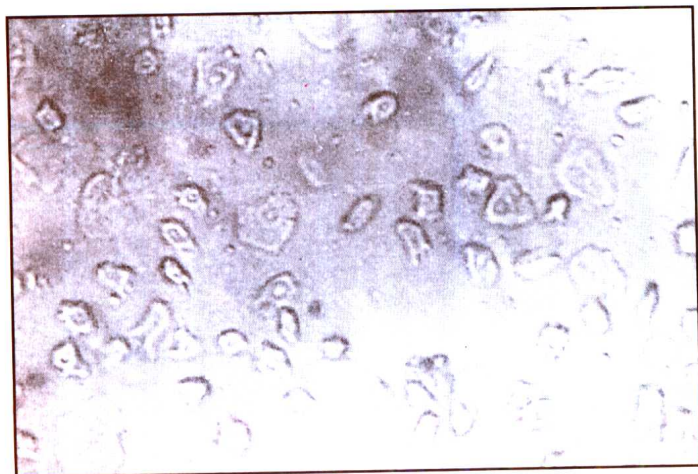
照片 3 心肌细胞内的线粒体  
(苏州医学院毛棣华提供)  
 $\times 12000$



照片4 种植在3T3 饲养细胞上的表皮细胞生长融合成片  
(自家标本) × 200

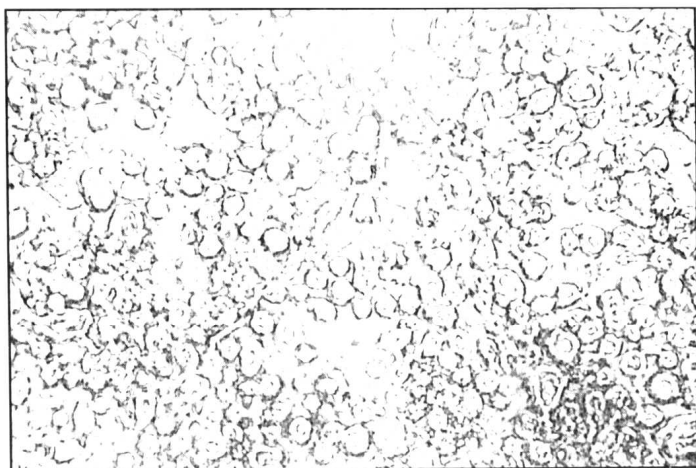


照片5 表皮细胞生长融合成片,并向复层发展  
(自家标本) × 200

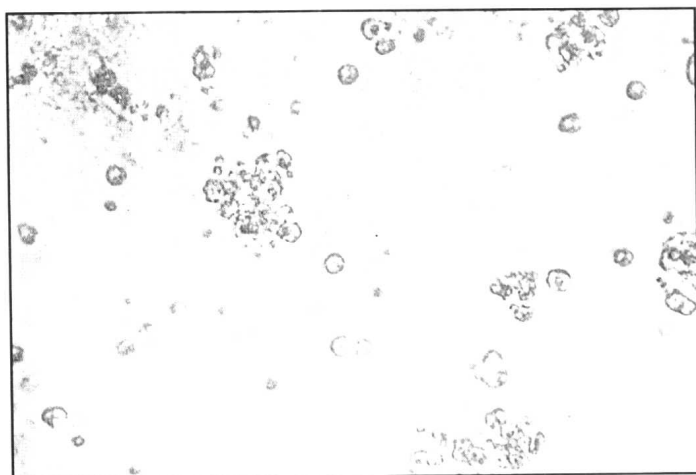


照片6 表皮细胞贴壁生长,呈多边形,不规则  
(自家标本) × 200

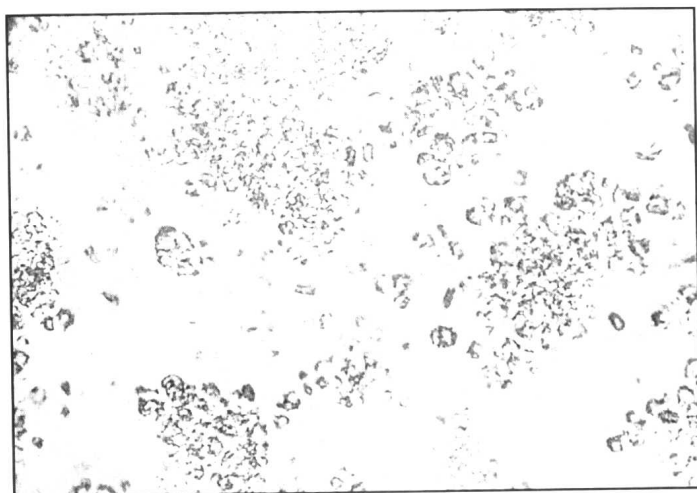
照片 7 种植在胶原蛋白膜  
上的表皮细胞生  
长融合成片  
(自家标本)  $\times 200$

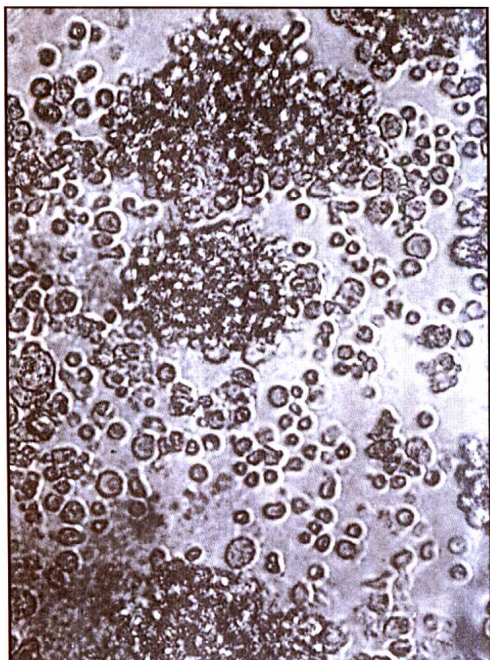


照片 8 体外培养的骨髓  
细胞中红系集落  
形成单位(CFU-E)  
(自家标本)  $\times 200$

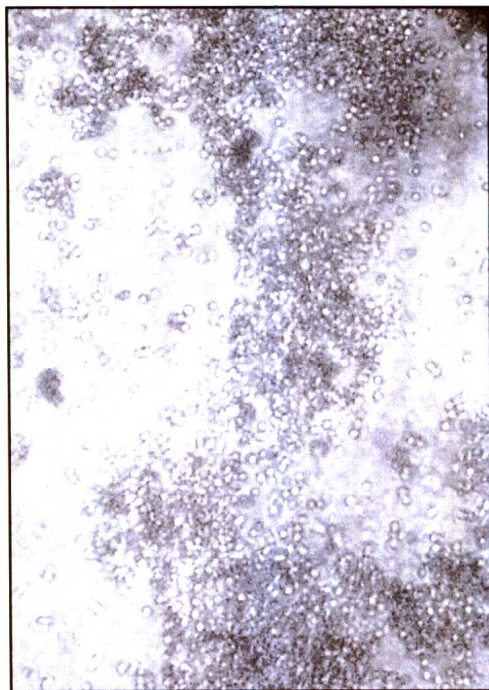


照片 9 体外培养的骨髓  
细胞中单核-巨  
噬细胞集落形成  
单位(CFU-GM)  
(自家标本)  $\times 200$

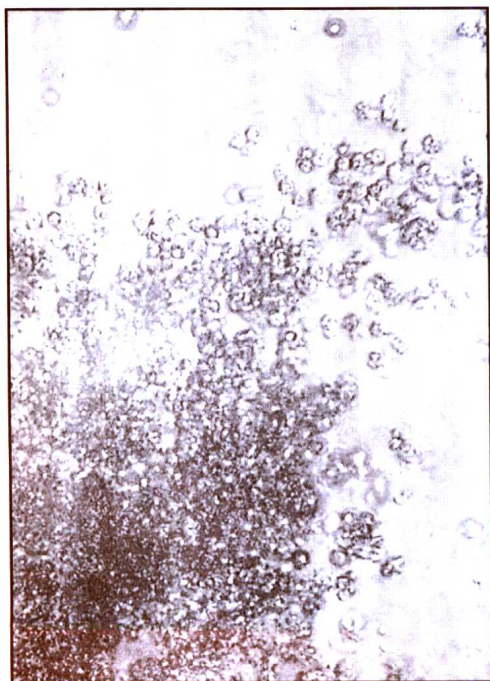




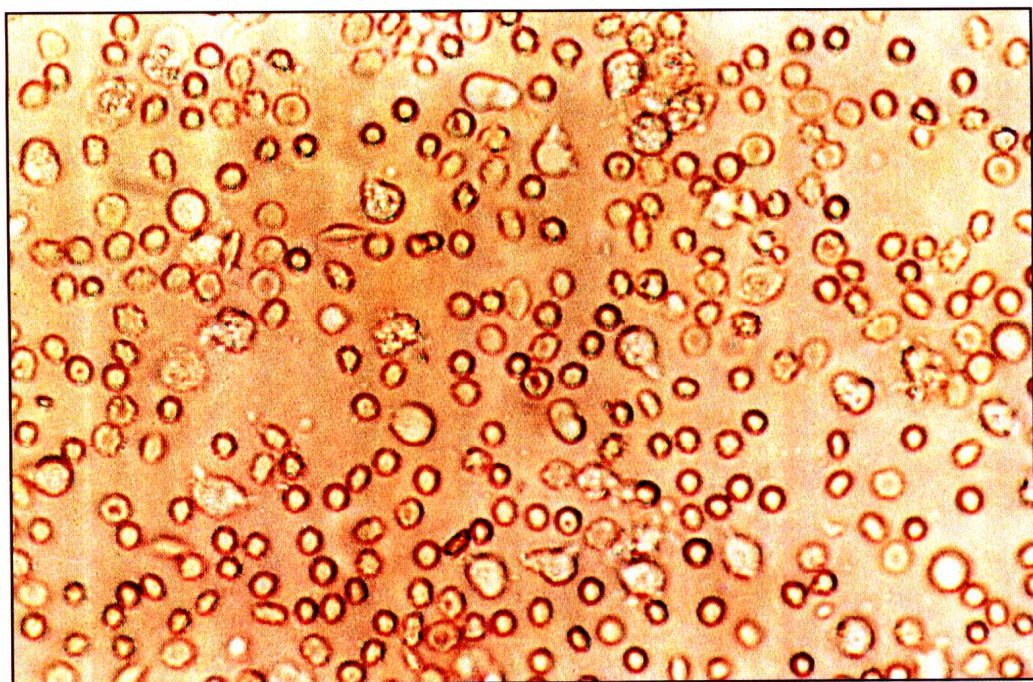
照片10 体外培养的骨髓细胞中巨型单核-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM) (白家标本)  $\times 200$



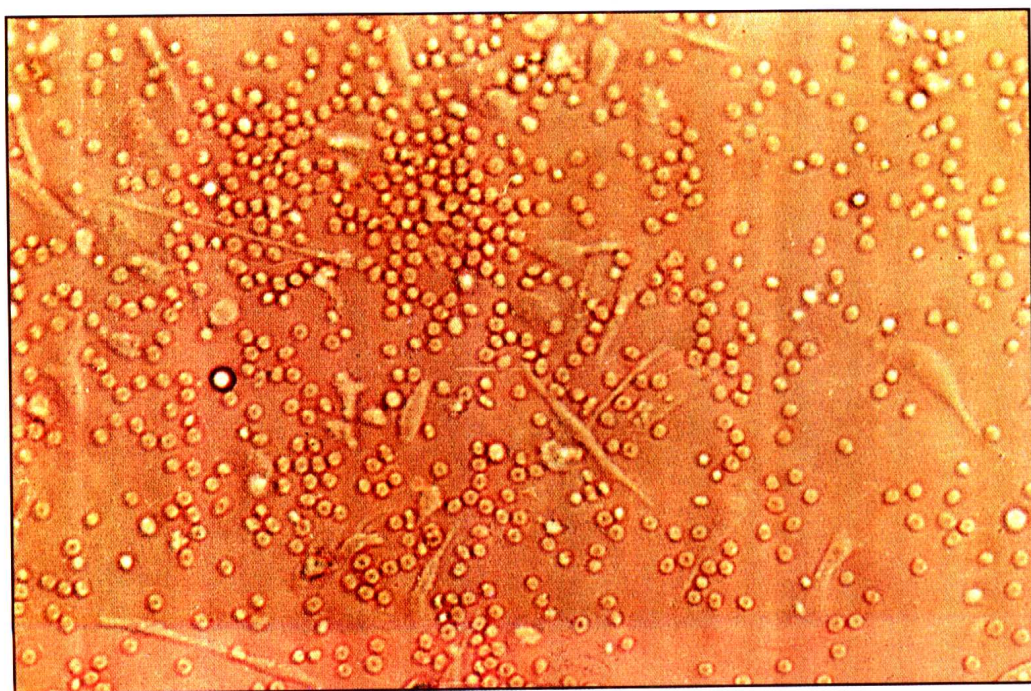
照片11 体外培养的骨髓细胞中红系爆式集落形成单位(BFU-E) (白家标本)  $\times 200$



照片12 体外培养的骨髓细胞中红系爆式集落形成单位(BFU-E) (白家标本)  $\times 400$



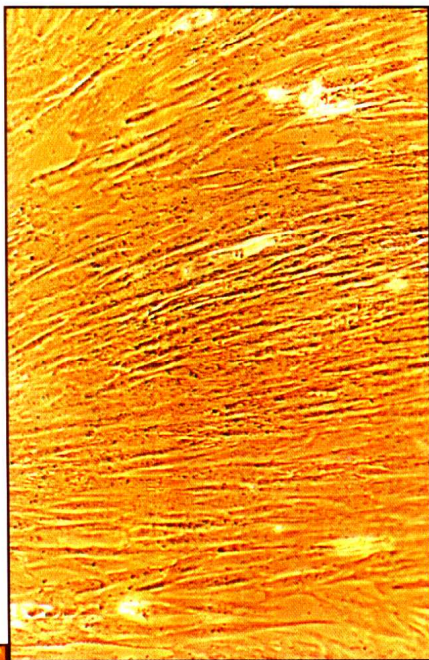
照片 13 培养 1 d 的骨髓细胞中的基质细胞开始贴壁变形  
(苏州医学院董启榕、姜红江提供)  $\times 200$



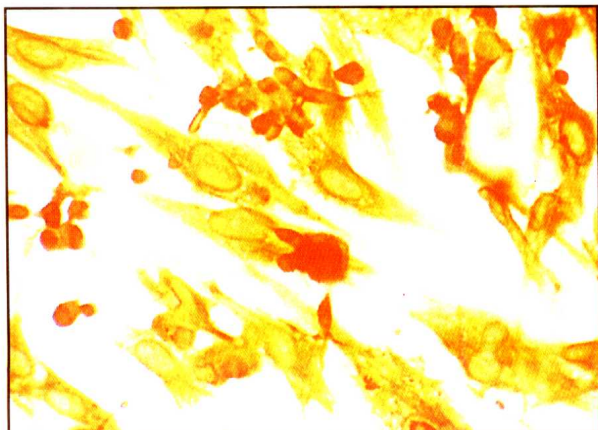
照片 14 培养 4 d 的骨髓基质细胞伸展生长、呈长棱形肌样外观  
(苏州医学院董启榕、姜红江提供)  $\times 200$



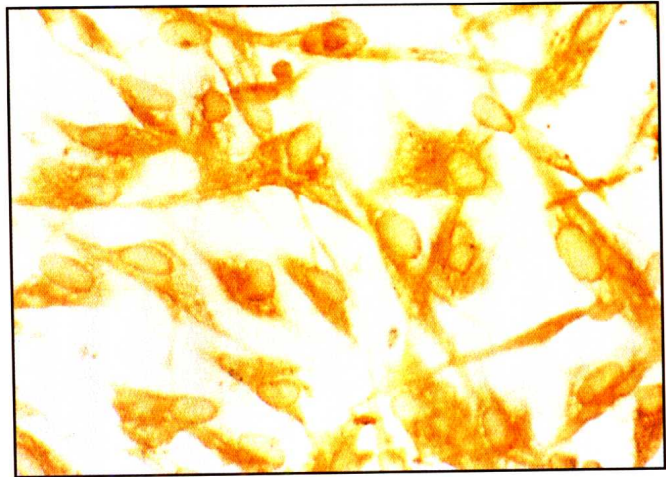
照片 15 培养1周的骨髓基质肌样细胞  
(网状)(自家标本)×200



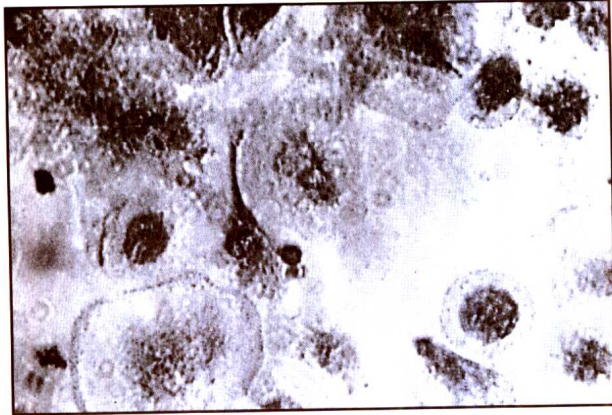
照片 16 培养2周的骨髓基质肌样细胞(单层)  
(苏州医学院董启榕、姜红江提供)×200



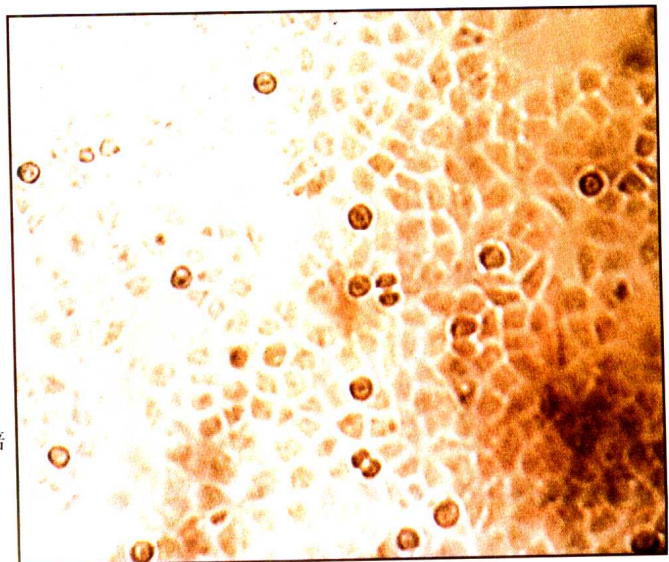
照片 17 3代儿童骨髓基质细胞所呈  
现 Vimentin 强阳性(100%)  
(自家标本)×400



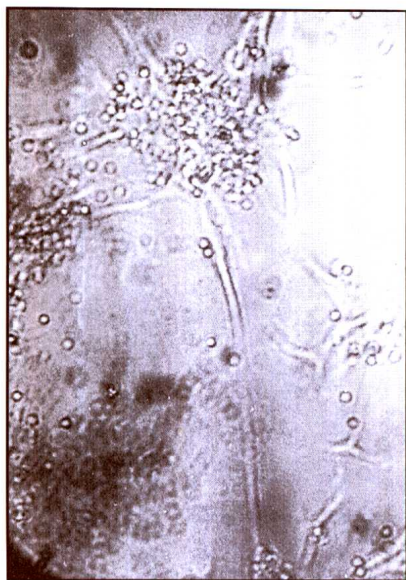
照片 18 5 代儿童骨髓基质细胞所呈现 Vimentin 强阳性 (95%)  
(自家标本)  $\times 400$



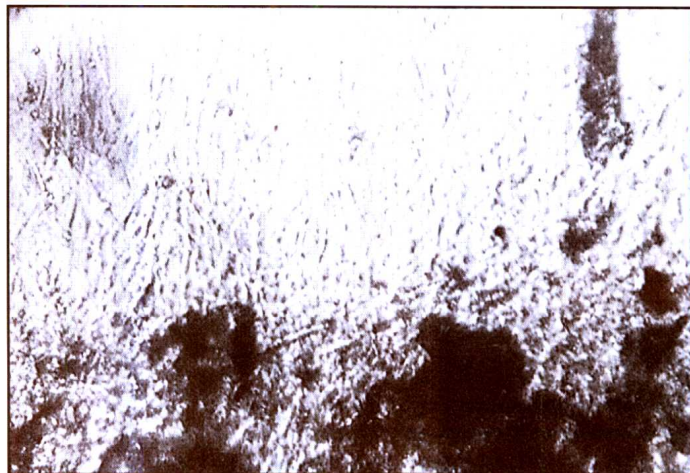
照片 19 骨髓基质细胞中体外培养出的单核-巨噬细胞  
(自家标本)  $\times 400$



照片 20 骨髓基质细胞中体外培养出的内皮细胞  
(自家标本)  $\times 200$



照片 21 骨髓基质细胞支持脐血造血干/祖细胞生长所形成的造血岛(自家标本)× 200

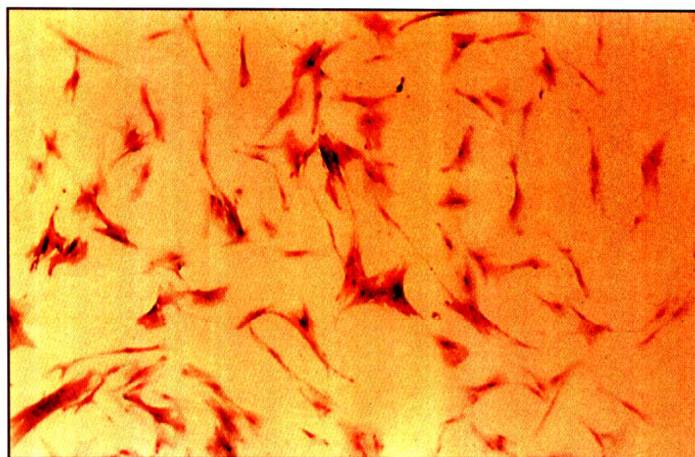


照片 22 5 代儿童骨髓基质细胞成骨诱导 3 周所形成的黑色矿化区(自家标本)× 100

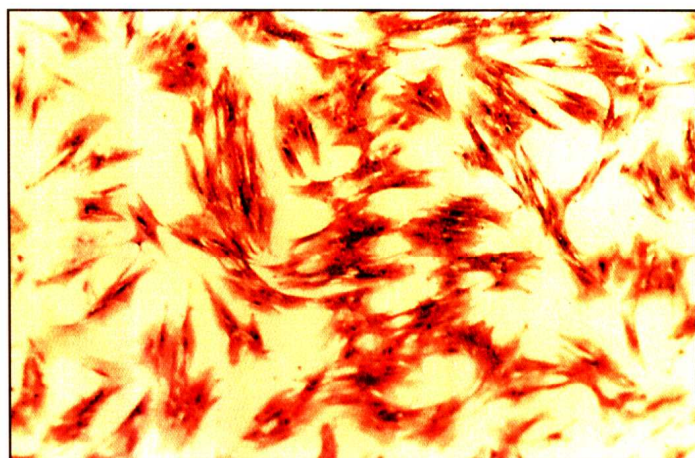


照片 23 5 代儿童骨髓基质细胞成骨诱导 3 周所形成的丛毛刺状钙化区(自家标本)× 30000

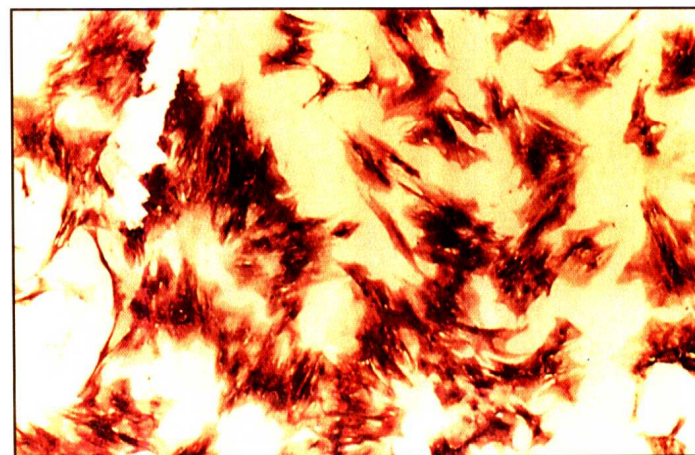
照片 24 AKP 细胞化学染色法、骨髓基质细胞呈弱阳性(黑色点)  
(苏州医学院董启榕、姜红江提供)×400



照片 25 AKP 细胞化学染色法、骨髓基质细胞呈阳性(黑色块)  
(苏州医学院董启榕、姜红江提供)×400



照片 26 AKP 细胞化学染色法、骨髓基质细胞呈强阳性(黑色片)  
(苏州医学院董启榕、姜红江提供)×400





照片 27 骨髓基质细胞在羟基磷灰石载体上贴壁生长良好（苏州医学院董启榕、姜红江提供） $\times 400$

照片 28 骨髓基质细胞在羟基磷灰石载体上沿微孔表面生长，并有突起（苏州医学院董启榕、姜红江提供） $\times 1200$

