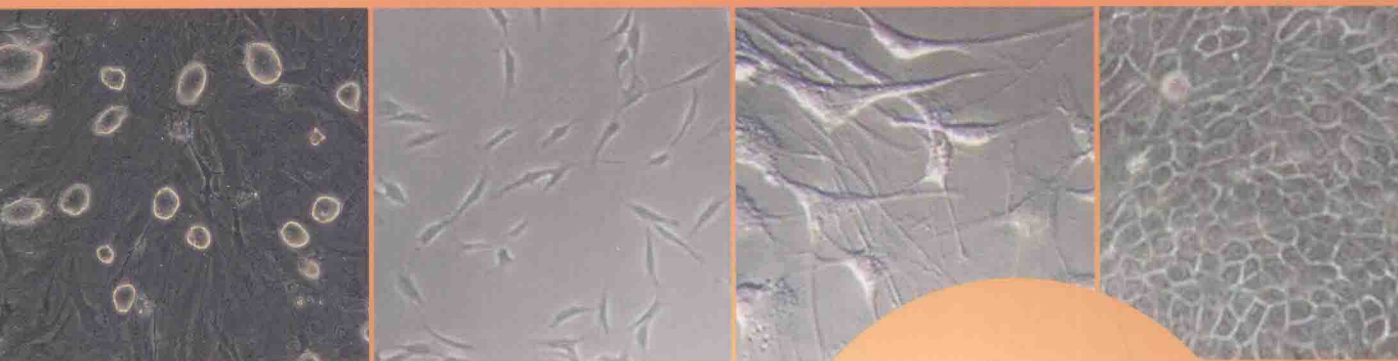


■ 刘小玲 孙 鹏 主编  
■ 吴宝金 副主编

# 动物细胞培养技术

TECHNIQUES FOR ANIMAL CELL CULTURE

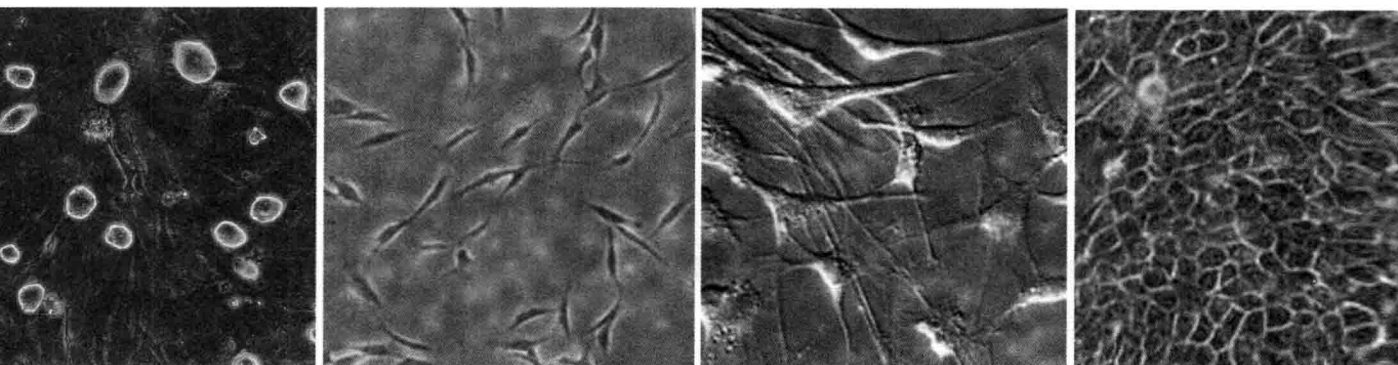


化学工业出版社

# 动物细胞培养技术

TECHNIQUES FOR ANIMAL CELL CULTURE

- 刘小玲 孙 鹂 主编
- 吴宝金 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书第一部分讲解了动物细胞培养的基本概念、基本知识、准备工作、基本技术和方法、应用研究,以及干细胞技术等,每个章节有单元小结、相关链接和复习思考题。第二部分是第一部分涉及的相关实验教程,包括经典实验和干细胞培养等技术实验。

本书是动物细胞培养技术的实用实训型教材,可供医学(临床,基础)、药学、生命科学等相关专业本科学学生使用,也可作为相关专业研究生以及实验技术操作人员的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

动物细胞培养技术/刘小玲,孙鹂主编. —北京:化学工业出版社,2013.8  
ISBN 978-7-122-12217-9

I. ①动… II. ①刘…②孙… III. ①动物-细胞培养-高等学校-教材 IV. ①Q954.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第179658号

---

责任编辑:刘亚军  
责任校对:边涛

装帧设计:韩飞

---

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)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张12¼ 字数300千字 2013年10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:39.00元

版权所有 违者必究

## 本书编写人员名单

主 编 刘小玲 孙 鹂

副主编 吴宝金

参 编 (按姓氏汉语拼音为序)

陈功星 陈建明 成 璐

曹亦菲 崔 春 狄春红

何 平 黄晓慧 李铭源

李振华 连福治 刘小玲

宋维芳 孙 鹂 谭晓华

吴宝金 吴 昭 袁 红

钟石根 朱 梁

# 前 言

在多年的本科教育教学中，我们感觉现有的教学条件和教学方法已经很难适应越来越快的发展需要。由于缺乏适合本科生实用的《细胞培养技术》相关教材和实验指导材料，遂产生编写《动物细胞培养技术》教材的想法，目的是编写实用实训型教材，包括实验指导部分，这既符合医学等相关专业培养需要，又紧跟前沿领域技术，使学生更有效地掌握实验操作技能，从而具有可持续发展的空间。

本教材第一部分内容包括动物细胞培养的基本概念，动物细胞培养的基本知识，动物细胞培养的准备工作和动物细胞培养的基本技术和方法，动物细胞培养在医学研究领域的应用和特殊细胞培养，以及干细胞技术，包括诱导多能干细胞（iPS 细胞）技术等。第二部分包括每一部分涉及的主要实验实训材料。本教材创新之处主要体现在内容的广度，它涉及干细胞领域和人类诱导的多能干细胞（iPS 细胞）技术，使学生较早接触这个新型领域和前沿技术。

本教材适用于医学、药学、生命科学等相关专业本科生，以及相关专业研究生教学训练，也可作为实验技术人员和自学入门者的参考书。

本书在编写过程中得到了杭州师范大学攀登工程基金（国家规划教材培育）、浙江省自然科学基金（编号 Y2080747）和杭州市科技发展计划项目基金（编号 20100333T15），杭州市重点实验室项目（实验动物科学实验室）的部分经费支持。杭州师范大学的同仁，上海复旦大学，澳门大学，山西医科大学和上海斯丹赛生物有限公司干细胞实验室的专家和教授参与了部分章节的编写和校对工作，在此一并致谢。

由于编写的时间和经验有限，疏漏之处在所难免，敬请读者批评指正。

刘小玲

2012 年 12 月

# 目 录

<b>第一部分 动物细胞培养技术</b> .....	1
<b>第一章 绪论</b> .....	1
第一节 动物细胞培养的基本概念 .....	1
第二节 动物细胞培养技术发展史 .....	2
第三节 动物细胞培养技术的应用 .....	4
<b>第二章 动物细胞培养的基本知识</b> .....	6
第一节 培养细胞的细胞生物学特征 .....	6
第二节 培养细胞的生长条件 .....	9
第三节 细胞培养实验室要求 .....	11
<b>第三章 动物细胞培养的准备工作的准备工作</b> .....	13
第一节 细胞培养用品的清洗、包装和灭菌 .....	13
第二节 细胞培养常用液体分类、配制和无菌处理 .....	16
<b>第四章 动物细胞培养的基本技术和方法</b> .....	21
第一节 培养细胞的取材与分离 .....	21
第二节 动物细胞的原代培养 .....	26
第三节 培养细胞的观察和检测 .....	30
第四节 动物细胞传代培养 .....	34
第五节 动物细胞的冻存、复苏和运输 .....	36
第六节 特殊细胞培养 .....	39
<b>第五章 动物细胞培养的应用研究</b> .....	56
第一节 细胞培养在功能与分化研究中的应用 .....	56
第二节 细胞培养在病毒学研究中的应用 .....	64
第三节 细胞培养在肿瘤学研究中的应用 .....	67
第四节 细胞培养在免疫学研究中的应用 .....	78
第五节 细胞培养在药理学研究中的应用 .....	85
第六节 细胞毒性检测 .....	102
第七节 功能性细胞的制备 .....	109
<b>第六章 干细胞技术</b> .....	116
第一节 概述 .....	116
第二节 成体干细胞的分离培养 .....	119
第三节 胚胎干细胞体外培养与定向诱导分化 .....	122
第四节 诱导多能干细胞 (iPS 细胞) 技术 .....	126

第五节	胚胎干细胞/iPS 细胞的应用及意义 .....	133
<b>第二部分</b>	<b>动物细胞培养实验教程 .....</b>	<b>138</b>
实验一	动物细胞培养的无菌操作 .....	138
实验二	动物细胞培养常用设备的使用 .....	138
实验三	动物细胞培养实验玻璃器皿的清洗、包装和高压蒸汽灭菌 .....	140
实验四	动物细胞培养常用液体配制和无菌处理 .....	142
实验五	细胞计数和密度换算 .....	146
实验六	乳鼠肾细胞原代培养 .....	147
实验七	乳鼠心肌细胞原代培养 .....	149
实验八	培养细胞的观察 .....	150
实验九	培养细胞的传代 .....	151
实验十	细胞冻存技术 .....	152
实验十一	细胞的复苏和活力检测 .....	153
实验十二	异体动物接种成瘤实验 .....	155
实验十三	肿瘤细胞的软琼脂集落实验 .....	156
实验十四	动物细胞融合 .....	157
实验十五	细胞克隆 .....	158
实验十六	电穿孔法转染细胞 .....	161
实验十七	阳离子脂质体介导真核细胞转染 .....	162
实验十八	饲养细胞的制备和饲养层细胞培养 .....	163
实验十九	小鼠胚胎干细胞培养 .....	166
实验二十	小鼠成纤维细胞培养 .....	168
实验二十一	磷酸钙法转染 HEK293T 细胞 .....	171
实验二十二	病毒包装及病毒滴度测定 .....	172
实验二十三	小鼠 iPS 细胞的诱导 .....	173
<b>附录</b>	<b>细胞培养技术常用术语中英文对照 .....</b>	<b>175</b>
<b>参考文献</b>	<b>.....</b>	<b>184</b>

# 第一部分

## 动物细胞培养技术

### 第一章 绪 论

#### 教学目的及要求

1. 掌握动物细胞培养的基本概念；
2. 熟悉动物细胞培养技术的应用；
3. 了解动物细胞培养技术的发展史。

#### 第一节 动物细胞培养的基本概念

##### 一、动物细胞培养的概念

从动物体内取出的组织或细胞，在体外模拟体内生理环境下建立无菌、适温和适宜营养的条件，使细胞生存和扩增，并维持其正常结构与功能的方法，称为动物细胞培养。

培养细胞常见的组织来源主要有猴、啮齿类、禽类的胚胎和脏器。根据需要选用不同的动物组织，经分散、酶消化、单层细胞培养等步骤，获得动物组织细胞系。在多数情况下，需利用原代细胞培养技术，即直接从动物活体内取出组织、细胞进行第一次的培养。与组织、器官培养不同的是，细胞培养采用的原始培养对象是单细胞悬液，而组织培养采用的是组织块或薄片，器官培养采用的是整个器官、器官的一部分或器官原基。

动物细胞培养技术目前已经发展到一个新的阶段，从不同组织得到的各类型细胞可在体外反复传代长期生长。源自动物和人的胚胎和成年组织、正常和肿瘤组织均可建立细胞系（cell line），类型包括上皮细胞和成纤维细胞等。有些在体内自身更新能力强的上皮细胞，通过改进培养技术可具备无限增殖能力，可成为永久性细胞系或株（continuous cell line or strain）；但大多数体外培养的正常组织细胞仅为有限期的传代，称有限细胞系或株（finite cell line or strain）。

啮齿类动物细胞在体外具有较高的转化率，经肿瘤细胞或 SV40 感染，以及化学物质处理后即可获得稳定的细胞系。美国 ATCC（American Type Culture Collection）保存有大量的细胞系，并能购买到。

干细胞（stem cells）技术是通过对于干细胞进行分离、体外培养、定向诱导、甚至基因修饰等过程，在体外繁育出全新的、正常的甚至更年轻的细胞、组织或器官，并最终通过细胞组织或器官的移植实现对临床疾病的治疗。胚胎干细胞（embryonic stem cell, ES cell）与其他普通细胞相比有许多独特之处，其培养也有相应的特殊性。2006 年，日本科学家 Yamanaka 建立的诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cells, iPS）技术，以病毒载



体、质粒等介导特定转录因子（如 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4）过表达，迫使体细胞重编程为类似于 ES cell 的多能干细胞状态，该技术的诞生为干细胞研究领域带来了重大的突破。

## 二、动物细胞培养的优点

### 1. 简化细胞生长环境

生物体内任何一个细胞不论是其生存环境还是其发挥功能的条件都非常复杂，不易研究。要想了解某一种细胞的生存条件和生物学功能，有效的方法就是将所研究的对象孤立出来单独分析。细胞培养技术使细胞在存活的基础上独立研究其生命活动、逐项研究细胞生存条件和细胞功能成为可能。

### 2. 方便控制实验因素

在培养条件下，细胞生存的理化环境如 pH 值、温度、CO<sub>2</sub> 压力等都可以人为控制，并且可以做到很精确，并保持其相对的恒定。在培养液中有针对性地加入或者删除某种成分，即可研究这种实验因素对细胞的生物学作用。

### 3. 易于观测实验结果

利用细胞培养技术研究细胞的生命活动规律，可以采用各种实验技术和方法来观察、检测和记录。如通过倒置相差显微镜等直接观察活的细胞；应用缩时电影技术摄像，或通过闭路电视长时间连续记录和观察被培养细胞的体外生长情况，可直观揭示培养细胞的生命活动规律，以及所施加因素引起的反应；利用同位素标记、放射免疫等方法可检测细胞内的物质合成和代谢变化等。

此外，培养技术的发展和成熟，使可供研究的细胞种类极其广泛。从低等动物细胞到高等动物细胞，以至人类细胞：胚胎细胞和成体细胞，正常组织细胞和肿瘤组织细胞皆可用于培养，为多种学科的实验研究提供广泛的实验材料。该技术可同时提供大量均一性较好的细胞群，并降低实验成本，动物细胞培养能够进行大规模生物制品的生产。目前，利用动物细胞大规模培养技术生产的生物产品包括酶、单克隆抗体以及多种疫苗等生物制品或者基因工程产品。

动物细胞培养虽然具有以上一系列优点，但也有不足之处，主要表现在失去体内细胞的制约和整体调节作用后，培养细胞的形态和功能会发生一定程度的改变；实验试剂对细胞形态和功能也有影响，如胰蛋白酶对细胞表面受体、抗原酶等均有破坏作用；培养过程中，长期传代、冻存等操作也可使培养细胞发生染色体非整倍体改变等。此外，体外培养的动物细胞对营养的要求较高，一般需加入 10% 的胎牛或新生牛血清，动物细胞生长缓慢，对环境条件要求严格。总之，动物细胞体外培养终究是一种人工条件，始终不如真正的体内生存条件完美。因此，在利用培养细胞作研究对象时，不可与体内细胞完全等同来对实验结果轻易做出判断。

动物细胞培养技术的进步也在于如何去探索和洞悉细胞的生物学特性，在体外造就一个接近体内细胞的生理环境，满足细胞对能量、物质和信息三者统一的要求，环境条件的设计成为至关重要的影响因素。只有在体外条件下，细胞仍然保持在体内的生物学特性，才能用培养的细胞去完成细胞生物学所研究的内容。

## 第二节 动物细胞培养技术发展史

1885 年，德国学者 Roux 用温生理盐水培养鸡胚神经板组织达数月，并首次采用“tis-

sue culture”这一概念。1898年 Liunggren 将人体皮肤保存在腹水中几天至几周后用于移植手术，获得成功。Jolly 于1903年将蝾螈的白细胞输入生理盐水或血清中培养，并观察到活细胞的游走及分裂。Beebe 等研究者于1906年用动物血清培养犬传染性淋巴瘤细胞达3天。这些尝试为以后的动物细胞培养方法奠定了基础。

动物细胞培养技术的真正创立是从美国生物学家 R. Harrison (1907) 和法国学者 A. Carrel (1912) 两人开始的。

Harrison 在无菌条件下，将蛙胚髓管部的小片组织接种于蛙的淋巴液中，共同保持在一单盖玻片上，然后翻转盖玻片，使组织小片和淋巴液悬挂在盖玻片表面，再将这块玻片密封在一个下凹的载玻板之上，一定时间后更换淋巴液。用这种方法，Harrison 将蛙胚髓管部的小片组织在体外培养了数周之久。Harrison 的实验开创了动物组织和细胞培养的先河，标志着盖玻片悬滴培养法的建立。他首次成功地在体外培养液（凝结的淋巴液）中培养了神经元，证实了原始的胚胎神经元或成神经细胞的胞质向外突起而形成轴突，并不断延伸的假说，从而结束了从19世纪以来关于神经轴突形成理论的争论。他在实验中设计并总结了一整套合理的无菌操作技术，故 Harrison 被公认为“组织培养之父”。

A. Carrel 把外科手术无菌技术的构思和操作带到了组织培养实验中，在无抗生素条件下，仅靠小心细致的操作，使鸡胚心脏植块连续培养长达34年，实验中可做到绝对无菌。Carrel 的另一个重要贡献是将组织包埋技术、营养供应以及传代培养等许多重要的培养条件和方法引入组织细胞培养过程中，从而使多种动物组织细胞培养获得成功。1923年，Carrel 和 Harrison 等设计了使用卡氏瓶（Carrel flask）培养的方法，以扩大组织细胞的生存空间，并发表了大量论文，为组织细胞培养的发展奠定了基础。在此之后，相继出现了各种类型的培养瓶、培养皿以及多孔培养板等培养器材。

1910年，美国医生 Burrows 和 Carrel 用血浆或组织匀浆液与血浆混合液代替淋巴，成功培养了犬、猫、小鼠、豚鼠甚至恶性细胞的外植物。他们创造性的研究成果揭示了离体动物组织在合适条件下具有近于无限生长繁殖的能力。此后，美国学者 W. H. Lewis 和 M. R. Lewis 等开始研究和运用已知成分的人工合成培养液。Eagle 等在细胞培养技术及培养液的开发研究上作出巨大贡献，以他命名的 Eagle 培养液作为主要培养液沿用至今，并由此衍生出许多种类，而应用于各种细胞培养。此后30年里，许多科学家相继研究出合成培养液，这些人工合成培养液可大幅降低天然培养液所占比重，甚至出现用纯合成已知成分培养细胞的方法，即无血清培养液（serum free medium, SFM）培养法。

20世纪50年代末，组织细胞培养技术进入繁盛阶段，在培养用器皿、培养液和培养方法等方面都有极大改进。培养细胞在基础研究与应用领域中得到愈来愈广泛的使用，尤其在医学基础学科和临床医学中的研究与应用发展迅速。

目前，动物细胞培养技术已成为实验室常用的研究方法和应用手段，在生物学、医药学、环境保护、农学等方面，动物细胞培养技术成为应用范围极广和利用价值极高的技术。有关细胞培养方面的杂志有《In Vitro》，此外，世界著名杂志如《Cell》、《Science》、《Nature》、《European Molecular Biology Organization Journal》、《Journal of Cell Biology》，每年都有大量有关细胞培养的文献报道。尤其于20世纪末，人们提出与实施的“人类基因组计划（human genome project, HGP）”，近年来再次兴起的干细胞研究，以及诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS）等，都离不开细胞培养技术。细胞培养技术日益成为生物工程研究与生产以及临床治疗的重要手段。

### 第三节 动物细胞培养技术的应用

动物细胞培养技术可从细胞水平帮助人类揭示生、老、病、死的规律，是探索优生、防治疾病、抗衰老的手段或途径。随着细胞生物学和分子生物学的相互渗透，分子克隆技术与细胞培养技术相结合，使细胞培养技术在阐明基因结构与功能、基因在细胞生长和分化中的作用、细胞癌变机制等方面发挥了重要作用。

#### 一、在生物学领域基础研究中的应用

培养的动物细胞具有培养条件可人为控制且便于观察检测等优势，因此可进行细胞生物学的基础理论研究，如正常或病理细胞形态、结构、细胞器及其功能、生长周期、遗传物质、核型变异、细胞转化等。离体培养细胞便于进行环境、药物等影响因素的研究，探索其作用机制，使研究方法简便、结果可靠、成本降低。当今细胞生物学研究的热点，如细胞通讯和信号转导、细胞增殖与周期调控、细胞生长和分化、细胞衰老和死亡等，以及干细胞应用和细胞工程研究等，都要以培养细胞学为基础，以细胞培养技术为手段和工具。

干细胞具有较强的再生能力，在一定条件下可分化、增殖出各类细胞。但干细胞在体内数量极少，需分离并在体外大量扩增，使之长成各种组织或器官。目前干细胞的分离培养技术在造血干细胞、胚胎干细胞和神经干细胞方面比较成熟，已成为干细胞研究的首要课题。虽然目前对干细胞的了解仍存在盲区，不论从深度与广度上，还是从临床应用上，干细胞的分离培养与诱导分化等都是细胞培养技术的研究重点。近年来的诱导性多能干细胞（iPS）技术的诞生，更为干细胞领域带来了重大突破。

#### 二、在生物制品生产上的应用

生物反应器的开发研究可将编码某生物活性物质的基因导入动物受精卵，随后从这种受精卵发育的动物组织、体液分泌物中可获得外源基因的表达产物。

利用这种细胞融合与杂交技术进行细胞工程研究与开发，目前可生产的生物制品包括各类疫苗、干扰素、激素、生长因子、酶、单克隆抗体等。各类生物制品销售额逐年增长，尤其全球抗体市场增长迅猛，1999年全球抗体的销售额为12亿美元，2004年上升到105亿美元，2008年超过400亿美元，2011年则超过1100亿美元。随着现代生物技术发展，利用生物反应器大规模培养动物细胞生产生物制品是生物制品行业发展的必然趋势，其中的核心技术即为细胞悬浮培养。该技术结合筛选驯化的高表达细胞株和个性化培养基控制细胞培养过程，实现提高生产效率及产品质量，降低生产成本的目的，这是当前国际上生物制品生产的主流模式。

#### 三、在临床医学上的应用

细胞是生命的基础，细胞健康是人体健康的根本已成为人们的共识。21世纪，世界卫生组织（WHO）对疾病康复的新定义是：治愈疾病最根本的途径是修复细胞，改善细胞代谢，激活细胞功能。

##### 1. 淋巴细胞培养技术的应用

淋巴细胞在培养环境中受某些生长因子的刺激，出现旺盛的分裂、增殖。淋巴细胞培养的成功对反映机体免疫功能状况起很大作用，如研究细胞标记，检测T、B细胞数量及功能，检测T细胞亚群（CD3、CD8、CD4等细胞）的变化，研究T、B细胞与细胞因子、体液因子的信息传递等，检测细胞因子产生能力，如白细胞介素（interleukins, IL）、肿瘤坏

死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、干扰素 (interferon, IFN) 等, 检测细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL)、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK 细胞) 等细胞毒作用, 制备淋巴因子激活的杀伤细胞 (lymphokine activated killer cell, LAK 细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL) 等用于临床肿瘤治疗、癌症的早期诊断和预防, 也可以通过培养淋巴细胞, 对其染色体进行对比分析检测出易患癌症的病人, 以便进行早期预防和治疗。

#### 2. 遗传性疾病的产前检查

用羊膜穿刺术获得羊水中的胎儿细胞进行培养, 便可在妊娠早期诊断胎儿是否患有遗传性疾病或先天畸形。少量胎儿脱落细胞经 2~4 周生长, 形成单层上皮样细胞, 进行染色体分析, 或检测甲胎蛋白等, 可于产前筛查出几十种代谢性疾病与遗传性疾病, 较准确地指导优生优育。

此外, 细胞培养技术尚用于药物效应检测、肾衰性贫血等临床诊疗。

### 四、在动物育种上的应用

利用细胞融合技术、细胞杂交技术以及转基因技术, 人们能够在细胞水平操作并改变动物基因, 进行遗传物质重组, 从而完成新品种的培育。目前, 卵母细胞体外培养、体外受精、胚胎分割和移植等技术已较成熟, 并应用于家畜繁殖生产中。这些研究成果和克隆羊多莉的问世, 为动物遗传育种开辟了一条新途径。

## 单元小结

本章主要介绍了动物细胞培养的基本概念, 动物细胞培养发展史, 以及动物细胞培养在各相关领域中的应用等内容。动物细胞培养是指从动物活体内取出的组织或细胞, 模拟体内生理环境, 在体外建立无菌、适温和适宜营养的条件, 使细胞生存和扩增, 并维持其正常结构与功能的方法。动物细胞培养技术从创立至今已有 100 多年历史, 到 20 世纪 50 年代, 在培养器材、培养液和培养方法等各方面都有很大改进, 使细胞培养技术进入迅速发展阶段。近年来干细胞研究的再兴起和诱导多能干细胞技术的建立, 使细胞培养技术成为人类疾病康复的重要手段, 它使上世纪的药物治疗转变为本世纪的细胞治疗, 使细胞培养技术更接近为人类服务的目的。动物细胞培养技术主要涉及生物学领域基础研究、生物制品生产、动物育种和临床医学等领域。

## 相关链接

1. <http://www.bioon.com/experiment/cellular11/309902.shtml>
2. <http://baike.baidu.com/view/626863.htm>
3. [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_culture](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture)

## 复习思考题

1. 什么是动物细胞培养?
2. 简述动物细胞培养技术的应用领域。

(刘小玲)

## 第二章 动物细胞培养的基本知识

### 教学目的及要求

1. 掌握动物细胞培养的基本知识；
2. 熟悉细胞培养实验室常规设备。

### 第一节 培养细胞的细胞生物学特征

细胞培养是指将体内某组织中分离的细胞置于体外模拟环境中，使其生长分裂，并维持其结构和功能的培养技术。每种培养细胞可视为特定的细胞群体，它们既保持着与体内细胞相似的基本结构和功能，也可能有一些不同于体内细胞的性状。

#### 一、培养细胞的生长类型和形态特征

培养细胞根据是否需要贴附支持物，可分为贴附型和悬浮型两大类。

##### (一) 贴附型细胞

贴附型细胞指贴附于支持物才能正常生长的细胞。大多数培养细胞属于这种，可分为以下四种类型（图 2-1）。

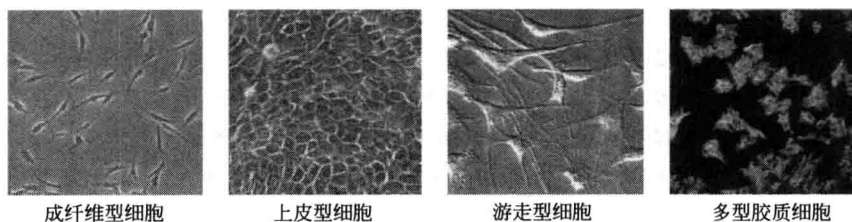


图 2-1 培养细胞的形态

#### 1. 成纤维型细胞

此类细胞在支持物表面生长时呈梭形或不规则三角形，中央有卵圆形核，胞质向外伸出长短不同的突起，生长时呈放射状、旋涡状或似栅栏状。凡中胚层间质起源的组织细胞（如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮细胞等）进行培养时，表现为成纤维型生长。

#### 2. 上皮型细胞

细胞呈扁平不规则多角形，有圆形细胞核位于细胞中央，细胞间紧密相连，有连接成片的能力，细胞密集稍高时集结成单层膜状。来源于内、外胚层细胞，如皮肤、消化管上皮、肝、胰、肺泡等组织细胞培养时，在培养时呈上皮型生长。

#### 3. 游走型细胞

这种细胞呈散在生长，一般不连接成片状。胞质常伸出伪足或突起。细胞能速度较快且方向不规则地游走或呈活跃的变形运动。此型细胞不很稳定，有时难以和其他类型细胞区别。常见于单核巨噬细胞系统的细胞和培养早期的羊水细胞。

#### 4. 多型细胞

多型细胞是形态上不规则的细胞，一般分为胞体和胞突，胞体略呈多角形，而胞突常为细长形。如神经细胞等难以确定其规律和特定形态的细胞，可统归于此类。

##### (二) 悬浮型细胞

少数细胞培养时不贴附在支持物上，呈悬浮状态生长。包括一些取自血、脾或骨髓的细胞，尤其是血液白细胞及癌细胞。此型细胞悬浮生长良好，细胞呈圆形，呈单个细胞或是细小的细胞团。悬浮细胞生存空间大，能够大量增殖，具有传代方便、易于收获细胞等优点，适于进行血液病的研究。

### 二、培养细胞分化状态的变化

细胞在离体之后，失去了神经体液的调节和不同种类细胞间的相互影响，生活在相对恒定的环境中，其分化可能会出现不适应和去分化等变化。不适应性表现为，分化能力减弱或不明显，逐渐失去形态和功能特性。去分化是指细胞在体外不可逆地失去原有特性，但是去分化并不代表分化能力完全丧失。细胞是否表现分化，关键在于是否存在使细胞分化的条件。从正常培养细胞接触抑制和密度抑制的特点，可看出培养细胞仍可被视为整体。这种相互作用与依存的关系调控着细胞的分化过程。体内外细胞分化的具体表现常常不同。如二倍体成纤维细胞于体外可传代 50 代左右，相当于 150~300 个细胞周期，呈现着发展分化的生命过程。

### 三、培养细胞的生长特点

细胞在体外培养时具有贴附、接触性抑制和密度依赖性抑制等生长特点。

#### (一) 贴附

贴附并伸展是多数贴壁细胞的生长特点。细胞的贴附与伸展分为几个阶段。以成纤维细胞为例，一般细胞接种后，5~10min 便可见细胞以伪足附着于底物形成一些接触点；接着，细胞逐渐呈放射状地伸展开，细胞体的中心部分随之变为扁平；最后，细胞变为成纤维细胞的形态。细胞附着于底物并非一种需要能量的过程，一般认为与电荷相关。一些特殊的促细胞附着物质、离子作用 ( $\text{Ca}^{2+}$ )、机械、物理、生物因素等都会影响细胞贴附。

#### (二) 接触性抑制

接触抑制是某些贴附型细胞生长特性。以成纤维细胞为例，正常细胞在不停地活动或移动中，细胞膜呈现特征性皱褶样活动。当细胞相互靠近时，将停止移动并向另一个方向离开；细胞被围绕接触时将不再移动，在接触区域的细胞膜皱褶样活动停止，此即接触抑制。正常细胞不会相互重叠生长，但转化细胞或癌细胞间的接触抑制下降，可重叠生长。

#### (三) 密度依赖性抑制

当细胞生长汇合成单层时，细胞间比较拥挤，扁平形状减小；与培养液接触的表面区域亦减小，同时，紧靠着细胞周围的一些营养物质将逐渐消耗。这种形成单层的细胞，在静止状态能维持一段时间，但不发生分裂增殖，这种生长特性即为密度依赖性抑制。转化细胞或恶性肿瘤细胞的密度依赖性调节通常降低，可以生长至终末细胞密度。

### 四、细胞的生长和增殖过程

细胞的生长和增殖过程可从三个不同的层面进行描述，即单个细胞、细胞系及每代细胞的生长过程，具体介绍如下。

#### (一) 单个细胞的生长过程

即细胞周期，是指从一次细胞分裂结束开始，经过物质积累过程，直到下一次分裂结束为止。细胞周期一般分为先后连续的 4 个时期：①G1 期 (gap1)，指从有丝分裂完成到 DNA 复



制之前的间隙时间；②S期 (synthesis-phase)，指 DNA 复制的时期，只有在这一时期 H<sup>3</sup>-TDR 才能掺入新合成的 DNA 中；③G<sub>2</sub>期 (gap<sub>2</sub>)，指 DNA 复制完成到有丝分裂开始之前的一段时间；④M期，又称 D期 (mitosis or division)，细胞分裂开始到结束。细胞周期的长短与物种的细胞类型有关，不同类型细胞的 G<sub>1</sub> 期长短不同，是造成细胞周期差异的主要原因。从增殖的角度来看，可将高等动物的细胞分为三类：①连续分裂细胞，在细胞周期中连续运转又称为周期细胞，如表皮生发层细胞、部分骨髓细胞；②休眠细胞，暂不分裂，但在适当的刺激下可重新进入细胞周期，称 G<sub>0</sub> 期细胞，如淋巴细胞、肝、肾细胞等；③不分裂细胞，指不可逆地脱离细胞周期，不再分裂，又称终末细胞，如神经、肌肉、多形核细胞等。

## (二) 细胞系的生长过程

从体内组织直接分离并置于体外培养的细胞，在其传代之前称为原代培养。培养细胞经持续生长繁殖，达到一定细胞密度后，应当进行分瓶传代。传代生长之后的细胞便成为细胞系。正常细胞系的寿命只能维持一定的寿命期限，称为有限细胞系。细胞系能够存活时间的长短，主要取决于来源的种族、组织及年龄。组织细胞的培养过程一般可分为三个阶段：原代培养期、传代期、衰退期 (图 2-2)。

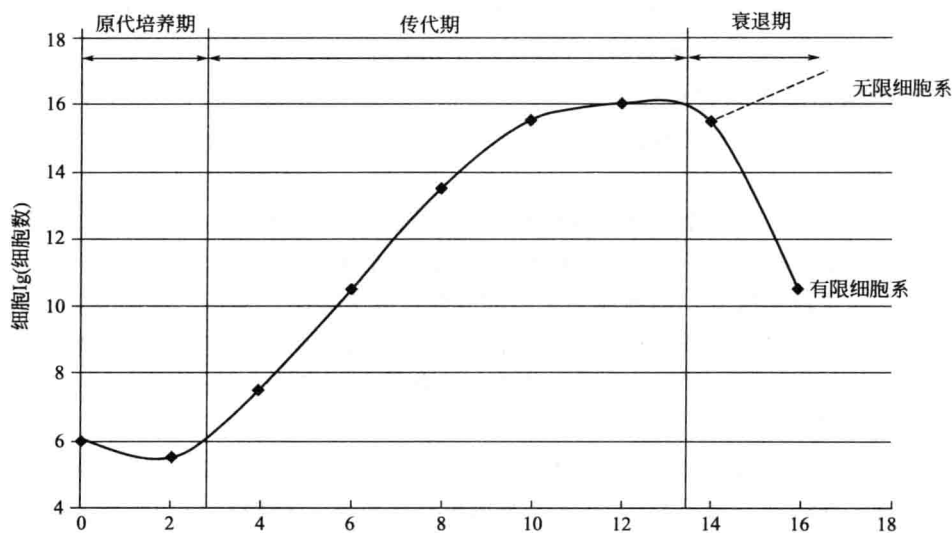


图 2-2 培养细胞的生长与增殖过程

### 1. 原代培养期

新鲜组织自体内取出并在体外培养，生长至第一次传代的时期。原代培养通常为异质性，含较少的生长组分，为二倍体核型。此期细胞的形状与体内相似，细胞移动较为活跃，有细胞分裂但并不旺盛，相对于部分传代细胞，原代细胞更能代表其来源组织的细胞类型及组织特异性。

### 2. 传代期

原代培养达一定细胞密度后，应接种培养，即传代。传代约数天至 1 周左右即可重复一次，持续数月。此期细胞增殖旺盛，仍为二倍体核型，并保留原组织细胞的特征。大多数细胞系是有限细胞系。当反复长期传代，细胞将逐渐失去二倍体性质，细胞增殖变慢而停止分裂，进入衰退期。

### 3. 衰退期

在体外培养细胞的生命期间有“危机期”，有限细胞系若不能通过，将进入衰退期而趋

于死亡；在传代过程中，少数细胞系通过“危机期”，获得不死性而具有持久或无限增殖的能力，称为无限细胞系或连续细胞系。

### (三) 每代培养细胞的生长过程

每代细胞的生长过程可分为三个阶段：首先进入生长缓慢的潜伏期，随后为增殖迅速的指数生长期，最后到达生长停止的平台期（图 2-3）。

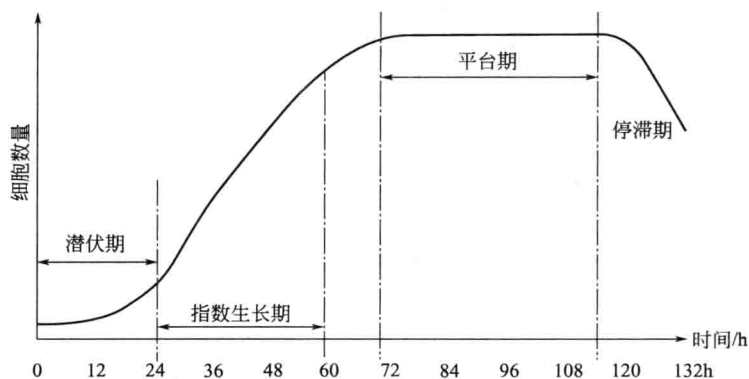


图 2-3 培养细胞的生长过程

#### 1. 潜伏期 (latent phase)

细胞在被分瓶接种后，首先经过悬浮期。此时，细胞在培养液中呈悬浮状，胞质回缩，胞体呈圆球形。接着，细胞贴附于载体表面，称贴壁。贴附是贴壁型细胞生长增殖的前提条件。细胞贴壁后还需经过一个潜伏阶段。此时，细胞有运动或活动，但基本无增殖，少见分裂相。潜伏期与细胞种类、培养基性质和细胞接种密度等密切相关。原代培养细胞的潜伏期较长，为 24~96 小时或更长，连续细胞系和肿瘤细胞系的潜伏期短，仅需 6~24 小时。当开始出现细胞分裂相并逐渐增多时，细胞进入指数增殖期。

#### 2. 指数生长期 (logarithmic growth phase)

指数生长期是细胞分裂增殖最旺盛的阶段，呈分裂相的细胞显著增多。此期细胞呈分裂相的比例可作为判定细胞生长是否旺盛的重要标志，通常以细胞分裂相指数 (mitotic index, MI) 作为衡量标志，即在特定细胞群体的每 1000 个细胞中的呈分裂相的细胞数。细胞的分裂相指数一般介于 0.1%~0.5% 之间，原代培养细胞的分裂相指数较低，连续细胞系和肿瘤细胞的细胞分裂相指数可高达 3%~5%。此时细胞的活力最好，是进行各种实验及细胞冻存的最佳时期。

#### 3. 平台期 (plateau)

又称停滞期 (stagnate phase)。经过指数生长期的快速增殖，当细胞数量达到饱和密度后，细胞的增殖活动停止，但仍有代谢活动。若不进行及时分瓶传代，因培养液中营养耗尽、pH 值下降、代谢产物积聚等原因，细胞形态就会发生改变，贴壁细胞开始脱落，严重的发生死亡。在光镜下，活细胞是均质而透明的，结构不明显，在生长期常有 1~2 个核仁。当细胞机能状态不良时，细胞的轮廓增强，反差增大。若在胞质中出现颗粒、脱滴和腔泡等现象时，表明细胞代谢不良。

## 第二节 培养细胞的生长条件

### 一、营养需要

离体细胞体外培养需要供其生存的营养和适宜的环境。在组织培养技术发展的早期，多



数细胞培养是在血浆或血纤维蛋白原凝块中，或在组织提取物中生长。经反复的研究已证实，体外培养细胞如体内一样需要一些基本营养物质及促生长因子等。

#### (一) 氨基酸

氨基酸是细胞合成蛋白质的基本原料。尽管不同种类的细胞对氨基酸的需求各异，但都离不开 12 种必需的氨基酸，这些必需氨基酸包括异亮氨酸、亮氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、缬氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸。此外，谷氨酰胺是细胞合成核酸和蛋白质必需的氨基酸，在细胞代谢过程中具有重要作用。

#### (二) 碳水化合物

碳水化合物是细胞生长的主要能量来源。主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖、丙酮酸钠和醋酸等。培养的动物细胞时几乎都以葡萄糖作为必需的能源物质。

#### (三) 无机离子与微量元素

细胞生长除需要钠、钾、钙、镁、氮和磷等常量元素外，还需要多种微量元素，如铁、锌、锰、钼、硒、铜、钒等。

#### (四) 维生素

维生素是维持细胞生长的一大类生物活性物质，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。脂溶性维生素包括维生素 A、维生素 D、维生素 E、维生素 K。水溶性维生素包括生物素、叶酸、吡哆醇、核黄素、烟酰胺、泛酸、硫胺素和维生素 B<sub>12</sub>。维生素 C 对能够合成胶原的细胞更为重要。

#### (五) 促生长因子及激素

各种生长因子及激素对维持特定类型细胞的功能、保持细胞的分化或未分化状态具有十分重要的作用。

## 二、生存环境

### (一) 温度

恒定而适宜的温度是维持细胞旺盛生长的必要条件之一。不同种类的细胞对培养温度要求不同。细胞代谢随温度降低而减慢，对低温的耐受力较高温强。但当温度降至冰点以下时，细胞可因胞质内冰晶损伤而死亡。培养液中加入一定量的冷冻保护剂（二甲亚砜或甘油），在深低温时如 -80℃ 或 -196℃（液氮），细胞可长期保存。

### (二) 气体环境

适宜的气体环境也是哺乳动物细胞培养生存的必需条件之一，所需气体环境主要有氧气和二氧化碳。通常把细胞置于 95% 空气加 5% 二氧化碳组成的混合气体环境中开放培养。氧气的主要功能是参与三羧酸循环，产生供给细胞生长分裂需要的能量和合成细胞生长所需要的多种成分。二氧化碳既是细胞代谢产物，也是细胞生长分裂所需成分，它在细胞培养中的另一作用在于维持培养基的 pH 值。

### (三) 渗透压

尽管大多数培养细胞对渗透压有一定耐受性，细胞最好生活在等渗环境之中（细胞内外的渗透压一致）。对于大多数哺乳动物细胞，渗透压在 260~320mOsm/kg 的范围都适宜。人血浆渗透压 290mOsm/kg，可视为培养人体细胞的理想渗透压。小鼠细胞渗透压在 320mOsm/kg 左右。

## 三、缓冲系统

大多数培养细胞所需 pH 值在 7.2~7.4 之间。细胞培养最适 pH 值随培养细胞的种类不同