

2.2.15 细胞最佳培养条件探讨

陈 婷^{1,2*} 彭少华¹

(¹ 咸宁学院医学院内科, 咸宁 437100; ² 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病所, 武汉 430030)

摘要 2.2.15 细胞培养难度较大, 通过对 2.2.15 细胞(HepG2 细胞经 HBV 基因组转染后所得) 在不同复苏和培养条件下生长状态的对比, 探讨了 2.2.15 细胞复苏和培养增殖的最佳条件。结果表明 2.2.15 细胞在高糖 DMEM 培养基、20% Gibco 胎牛血清、接种密度为 1×10^5 个/cm²、湿度饱和和含 5% CO₂ 环境下复苏时获得最佳效果; 在高糖 DMEM 培养基、10% Gibco 胎牛血清、湿度饱和和含 5% CO₂ 环境下培养生长最佳。

关键词 2.2.15 细胞; 培养条件

人肝肿瘤细胞株 HepG2 广泛应用于遗传毒理学试验^[1]、外源性生物性异物的细胞毒性^[2,3]和病毒(如乙型肝炎病毒)感染机制等方面的研究。2.2.15 细胞的祖先就是 HepG2 细胞, 里面转染了两段完整的乙肝全基因, 通常作为乙肝病毒感染的细胞模型, 在抗病毒治疗时, 进行药物的药效和药物的毒理试验的研究。由于 2.2.15 细胞复苏和培养难度较大, 通常不易复苏、培养成功, 因而我们根据本实验室的条件, 对 2.2.15 细胞复苏及培养增殖的最佳条件进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源

2.2.15 细胞为美国耶鲁大学医学院 Cheng 博士惠赠。

1.2 试剂

DMEM 培养基(高糖型)、胎牛血清(美国 Gibco 公司产品)、L-谷氨酰胺(美国 Gibco 公司产品)、胰蛋白酶(德国 Biochrom KG Seromed 公司产品)、HEPES(德国默克公司产品)、碳酸氢钠(上海虹光化学厂)以及青霉素与链霉素(华北制药股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 复苏时接种密度与血清含量 将冻存 2.2.15 细胞复苏清洗、离心后接种于 10 ml 培养液中, 接种密度分别为 1×10^6 个/cm²、 1×10^5 个/cm²、 1×10^4 个/cm²、 1×10^3 个/cm², 血清含量分别为 10%、15%、20%、25%。

1.3.2 消化时间与温度 吸取 2 ml 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 消化温度分别为 27 °C、29 °C、31 °C、33 °C、35 °C、37 °C, 观察时间分别为 1 min、1.5 min、2 min、2.5 min、3 min、3.5 min、4 min。

1.3.3 37 °C 无 CO₂ 条件下 2.2.15 细胞的培养 将密度为 1×10^5 个/cm² 复苏细胞与经 5% CO₂ 培养的传代细胞(复苏后传至第 4 代)分别接种于 10 ml 培养液中(其中复苏细胞培养液血清含量为 20%, 传代细胞培养液血清含量为 10%), 放入 37 °C 无 CO₂ 培养箱中培养观察 48 h。

2 结果

2.1 复苏时接种密度与血清含量对 2.2.15 细胞的影响

结果发现, 当接种密度为 1×10^6 个/cm², 血清含量为 20% 时, 24 h 后细胞绝大部分贴壁且有成团生长, 增殖速度最快, 2 天后可按 1:4 比例传代, 但细胞状态明显下降; 当接种密度为 1×10^5 个/cm², 血清含量为 20% 时, 细胞 24 h 后大部分贴壁, 增殖速度快, 4 天后可按 1:2 比例传代, 细胞状态较好; 当接种密度为 1×10^4 个/cm², 血清含量为 20% 时, 细胞 24 h 后大部分贴壁, 增殖速度及传代速度减慢; 当接种密度小于 1×10^4 个/cm², 血清含量为 20% 时, 细胞 24 h 后大部分贴壁, 但增殖速度明显减慢, 约 30 天后才可按 1:2 比例传代; 当接种密度小于 1×10^3 个/cm² 和(或)血清含量少于 20% 时, 细胞表现为贴壁困难, 出现进行性退化。

2.2 消化时间与温度的影响

结果发现, 在 27~29 °C, 细胞消化不足 4 min 时, 细胞不能被充分消化分散, 而是成团生长; 消化长于 4 min 时会出现较多死细胞; 当消化时间刚好 4 min 时,

细胞分散程度最好,均呈单个分散贴壁且死细胞最少。在31~35℃,细胞消化不足3 min时,细胞成团生长,不能被充分消化分散;消化时间过长,长于3 min时则出现较多死细胞;当消化时间刚好3 min时,细胞分散程度最好且死细胞最少;在37℃,细胞消化时间过短,不足2 min时,细胞不能被充分消化分散而成团生长;消化时间长于2 min时会出现较多死细胞;当消化时间刚好2 min时,细胞分散程度最好,均呈单个分散贴壁且死细胞最少。

2.3 37℃无CO₂条件下对2.2.15细胞培养的影响

第1天,镜下观察复苏细胞与传代细胞大多悬浮于培养液中,折光性强,胞体呈圆形。第2天,复苏细胞培养液较第1天略偏碱,镜下观察细胞仍大多呈悬浮状态,细胞有缩小趋势,折光性较好;传代细胞培养液较第1天略偏酸,镜下观察细胞已贴壁,折光性好,少数细胞出现伪足。第3天,复苏细胞培养液明显呈碱性,镜下观察细胞多数仍悬浮于培养液中,仅部分细胞缩小且折光性差;传代细胞培养液明显偏酸性,镜下观察大部分细胞已伸出伪足,细胞轮廓清楚,折光性强,细胞数量明显增多。

3 讨论

据文献报道,HepG2细胞营养要求高,复苏后存活率较低,体外培养难度较大^[4,5]。2.2.15细胞培养难度较HepG2细胞难度更大,一方面表现为营养及接种密度要求高;另一方面表现为2.2.15细胞复苏后存活率极低。本室根据国内外文献报道,采用10%的胎牛血清进行传代培养,取得了较好的培养效果;本实验研究中发现接种密度为 1×10^5 个/cm²,血清含量为20%时,2.2.15细胞贴壁后增殖培养效果最好;结果还显示,接种密度在 1×10^3 个/cm²~ 1×10^6 个/cm²的范围内,细胞复苏时接种的密度越大,细胞贴壁的越

多,细胞贴壁后增殖速度也越快。当2.2.15细胞贴壁生长稳定后,将血清含量逐渐降至10%,再放入37℃含5%CO₂的培养箱中培养,即可获得最佳培养效果。

2.2.15细胞具有肿瘤细胞可重叠成团生长的特点,而许多实验要求细胞呈单层贴壁生长,以便于实验的观察。因此我们探讨了使2.2.15细胞充分分散的适宜消化时间,结果显示在不同温度下2.2.15细胞需要消化的时间不同。总的说来,随着温度下降,2.2.15细胞需要消化的时间逐渐延长。本研究采用0.25%胰蛋白酶在37℃,消化2 min的条件。这是因为在37℃下胰蛋白酶活性最大,所需消化时间最短,可避免因胰蛋白酶长时间作用于细胞而造成细胞的损失。

本室还探讨了在37℃无CO₂条件下培养2.2.15细胞的适宜环境。结果显示复苏细胞不适于在37℃无CO₂条件下培养,这可能是由于刚复苏细胞增殖缓慢,自身调节pH的能力较差的缘故。

本室通过对2.2.15细胞适宜培养条件的探讨,已使2.2.15细胞在本室顺利传代并保持较好的生长状态。

参考文献(References)

- [1] Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, *et al.* Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens, *Mutat Res*, 1998, 402(1-2): 185-202
- [2] Neuman MG, Koren G, Tiribelli C. *In vitro* assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line, *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(2): 932-941
- [3] Shear NH, Malkiewicz IM, Klein D, *et al.* Acetaminophen-induced toxicity to human epidermoid cell line A431 and hepatoblastoma cell line Hep G2, *in vitro*, is diminished by silymarin, *Skin Pharmacol*, 1995, 8(6): 279-291
- [4] 甘起霓, 鲁文清, 张悦. 人肝肿瘤细胞HepG2最佳培养条件探讨, *同济医科大学学报*, 2001, 30(4): 319-320
- [5] 艾立民, 任中原. 培养HepG2细胞的几点体会, *天津医学院学报*, 1994, 18(3): 27-28

Investigation on the Optimal Culture Conditions of 2.2.15 Cells

Ting Chen^{1,2*}, Shao-Hua Peng¹

¹Medical Department of Xianning Medical Collage, Xianning University Xianning 437100, China; ²Institution of Liver Research Center of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract The 2.2.15 cell can be used in a variety of studies, but it is difficult to culture. The optimal culture conditions of 2.2.15 cells were studied by the contrast of their resuscitation and growth state under different culture conditions. The results indicated the cells could be subcultured smoothly under the following situation: (1) for resuscitation, high sugar DMEM medium and 20% fetal bovine serum were needed and the seeding density was 1×10^5 cells/cm² under humidified atmosphere of 5% CO₂; (2) for culturing, high sugar DMEM medium and 10% fetal bovine serum were needed and humidified atmosphere in 5% CO₂ was optimal.

Key words 2.2.15 cell; culture conditions

Received: April 3, 2009

Accepted: August 24, 2009

*Corresponding author. Tel: 86-715-8342004, E-mail: ctpb88@163.com

本刊将于 2010 年 2 月更名为《中国细胞生物学学报》

经新闻出版总署批准,《细胞生物学杂志》将于 2010 年第一期(2010 年 2 月)起更名为《中国细胞生物学学报》。更名后的《中国细胞生物学学报》作为中国细胞生物学学会会刊、旗下唯一的中文期刊,将继续坚持“提高与普及兼顾”的办刊方针,邀请著名专家撰文介绍国内外细胞生物学研究热点,扩大研究论文的刊登比例,提高综述文章的质量,增加介绍细胞生物学领域的新技术、新方法以及细胞生物学教学方面的文章;宣传和报道我国细胞生物学领域的最新进展,中国细胞生物学学会(包括会员)及各省市细胞生物学学会(包括会员)的各种活动和信息,竭诚为广大会员及从事细胞生物学的科研人员服务,使《中国细胞生物学学报》成为国内生命科学领域领先的中文期刊。