

技术与方法

一种改良胰蛋白酶消化液及其应用

夏晴[#] 张雨晴[#] 喻峰 童莹 吴军*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心细胞库, 上海 200031)

摘要 该研究旨在提供一种改良胰蛋白酶消化液, 并通过将其与0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、柠檬酸胰酶进行比较, 探究其在细胞消化中的作用优势及更多应用。通过pH值测定、显微镜下整体观察细胞消化程度以评估改良胰蛋白酶消化液在不同保存条件时的稳定性、时效性及消化能力变化情况; 通过计算细胞间分散率、台盼蓝染色、CCK-8细胞增殖检测实验以验证改良胰蛋白酶消化液对细胞间的分散效果及过度消化细胞后对细胞存活率、增殖率、贴壁性的影响。结果显示: 在不同保存条件时, 改良胰蛋白酶消化液的pH值变化区间最小、消化能力最稳定; 与0.25%胰蛋白酶相比, 改良胰蛋白酶消化液可显著提高细胞间分散率; 与胰蛋白酶-EDTA(0.25%)相比, 改良胰蛋白酶消化液在过度消化细胞时可明显降低细胞死亡率, 显著提高细胞增殖率及贴壁能力。这些结果表明, 改良胰蛋白酶消化液无论在保存时效性、稳定性、消化能力等方面均有显著提高, 且对细胞间分散效果更好, 对细胞损伤更小, 具有营养稳定实验细胞系及促进细胞系传代后快速贴壁、增殖生长的显著优势。这也为需要连续传代培养的实验细胞系、细胞临床转化治疗、计数实验细胞系、单个细胞研究等方向提供一种更适合的细胞消化液及技术保障。

关键词 胰蛋白酶消化液; 细胞消化; 柠檬酸钠; 聚乙烯吡咯烷酮

An Improved Trypsin Digestion Solution and Its Application

XIA Qing[#], ZHANG Yuqing[#], YU Feng, TONG Ying, WU Jun*

(Cell Bank, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract This study aims to provide an improved trypsin digestion solution and explore its advantages and more applications in cell digestion by comparing it with 0.25% trypsin, trypsin-EDTA (0.25%), and citric acid trypsin. The stability, timeliness, and digestion ability changes of the improved trypsin digestion solution under different storage conditions were evaluated by measuring pH values and observing the degree of cell digestion under a microscope. The dispersion effect between cells and the effects on cell survival rate, proliferation rate, and adhesion after overdigesting cells were verified by calculating the intercellular dispersion rate, trypan blue staining, and CCK-8 cell proliferation detection experiments. The results showed that under different storage conditions, the pH value change range of the optimized trypsin digestion solution was the smallest and its digestion ability was the most stable. Compared with 0.25% trypsin, the optimized trypsin digestion solution could significantly increase the

收稿日期: 2024-08-30

接受日期: 2024-11-28

科技部国家科技资源共享服务平台(批准号: E019370102)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 021-54920405, E-mail: wjun@sibcb.ac.cn

Received: August 30, 2024

Accepted: November 28, 2024

This work was supported by the National Science and Technology Infrastructure (Grant No.E019370102)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-21-54920405, E-mail: wjun@sibcb.ac.cn

intercellular dispersion rate. Compared with trypsin-EDTA (0.25%), when overdigesting cells, the improved trypsin digestion solution could significantly reduce the cell mortality rate and significantly increase proliferation rate, and adhesion ability. These results indicate that the improved trypsin digestion solution has significant improvements in terms of storage timeliness, stability, and digestion ability. Moreover, it has a better dispersion effect between cells and causes less damage to cells, and has significant advantages in nourishing and stabilizing experimental cell lines and promoting rapid adhesion and proliferation growth of cell lines after passage. This also provides a more suitable cell digestion solution and technical support for experimental cell lines requiring continuous passage culture, cell clinical transformation therapy, counting experimental cell lines, and single-cell research.

Keywords trypsin digestion solution; cell digestion; sodium citrate; polyvinylpyrrolidone

细胞培养技术是研究实验细胞系在细胞生物学、药物研发、疾病机制研究以及生物医学应用中的基础, 通过将细胞系在体外进行体内模拟培养, 研究人员能够探索细胞的生理功能、信号通路、代谢过程以及相互作用^[1-2]。而细胞消化是细胞传代培养技术中的关键步骤之一, 对于维持细胞系的生长活性、传代培养、冻存保种及进行实验研究都至关重要。目前在细胞消化领域进行细胞消化主要通过机械消化法^[3]、离子螯合法^[4]、酶消化法等方法^[5], 其中离子螯合法、酶消化法最为常用。通过使用酶消化法或消化酶与离子螯合剂共同消化的方式, 如比较常见的0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)等进行细胞消化是目前应用较广且最常见的细胞消化方法^[5]。但是传统的0.25%胰蛋白酶虽然消化细胞速度快但是细胞容易聚团生长, 无法满足实验细胞系大规模连续传代所需的高效、稳定及生长均匀性^[6]。胰蛋白酶-EDTA(0.25%)中某些成分(如EDTA等螯合剂)可能会对细胞造成损伤, 如细胞毒性较大、细胞凋亡等, 限制了其在规模化生产实验细胞系方面的应用范围^[7]。此外, 胰蛋白酶消化液的稳定性及酶活性也容易受到多种因素的影响, 如自身浓度、pH值、温度和消化时间等。因此, 迫切需要优化出一种更稳定高效、细胞损伤小且可规模化传代实验细胞系的胰蛋白酶消化液, 以克服传统胰蛋白酶的局限性并提高实验细胞系在连续传代培养时的细胞活性和可持续应用性。

柠檬酸胰酶[其中含有柠檬酸钠(sodium citrate)与传统的胰蛋白酶组分]不仅消化细胞快又有分散细胞好的优点^[7-8]。柠檬酸钠作为胰蛋白酶消化液中可添加成分之一, 不仅对钙离子、镁离子等金属离子具有良好的络合能力, 在胰蛋白酶消化液中还可以用作细胞解聚剂。当需要将组织分解为单个细胞时,

柠檬酸钠可与胰蛋白酶联合使用, 促进组织间的解聚和细胞间的分离, 使细胞间更分散, 可显著提高胰蛋白酶的消化效率。此外, 相较于同为螯合剂的EDTA来说, 柠檬酸钠具有安全无毒性, 即使长时间消化实验细胞系也不会对其造成更多损伤, 比较适合实验细胞系连续传代培养及临床转化应用。尽管如此, 作为一种弱酸强碱盐, 柠檬酸钠在发生缓慢水解的同时在胰蛋白酶的酸性体系条件下不够稳定。因此, 柠檬酸胰酶无法在4℃条件或常温下长期保存, 必须长期保存在-20℃条件下, 使用前要先解冻且需避免反复冻融。

本研究在柠檬酸胰酶的基础上进行胰蛋白酶消化液的高效改良, 采用柠檬酸钠替代EDTA的同时, 添加了磷酸缓冲体系以保障消化液自身的稳定性。除此之外, 也考虑添加了特定比例的稳定剂——聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)以增加改良后胰蛋白酶消化液的高效性及细胞保护性。PVP不仅可以帮助维持改良的胰蛋白酶消化液及细胞培养液中的胶体稳定性, 还能够防止胶体颗粒的聚集和沉淀^[9]。比如很多细胞类型在消化过程中容易自发聚集形成细胞团块, 而PVP的加入不仅可以防止细胞间凝聚, 帮助维持分散细胞的单个状态, 其自身还具有良好的水溶性和黏附性^[10-13]。因此, 在改良的胰蛋白酶消化液中添加PVP既可以降低细胞被胰蛋白酶过度消化的风险, 减少细胞的损伤, 还可以帮助消化后需贴壁生长的细胞附着在培养表面或载体上, 为细胞传代增殖提供良好的生长环境^[14]。除此之外, PVP还是改良胰蛋白酶消化液及细胞培养媒介中的抗氧化剂^[15], 不仅可以帮助减少改良胰蛋白酶消化液及细胞培养液中氧化反应的发生, 还可以保护细胞在分离过程及后续增殖生长时免受氧化应激的损伤, 尤其在细胞过度消化时发挥一定的

保护作用, 更有利于实验细胞系的连续传代培养。

本研究所阐述的改良胰蛋白酶消化液是一种更稳定高效且可规模化传代实验细胞系的胰蛋白酶消化液。相比较常见的细胞消化液而言不仅具有消化能力更强、细胞间分散率更高的优势, 还可以减少EDTA及氧化应激对实验细胞系连续传代培养或胰蛋白酶过度消化所带来的损伤, 增加胰蛋白酶消化液自身的稳定性和长时间的高活性, 也为细胞系消化传代后的贴壁性及增殖提供了良好的生长环境, 更适用于多种类型实验细胞系的大规模连续传代培养及应用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞系

本文中所涉及的大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人宫颈癌细胞HeLa、人整合SV40基因的乳腺上皮细胞HBL-100、人皮肤成纤维细胞BJ、人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)等均来自于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂

0.25%胰蛋白酶(trypsin, 产品货号: 15050057)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(产品货号: 25200072)、DMEM基础培养基(产品货号: 10566016)、RPMI 1640基础培养基(产品货号: 11875093)、胎牛血清FBS(产品货号: 10091148)均购自ThermoFisher Scientific公司; 柠檬酸钠(sodium citrate, 产品货

号: 39476468)、氯化钠(sodium chloride, 产品货号: A610476)、氯化钾(potassium chloride, 产品货号: A610440)、磷酸氢二钠(disodium hydrogen phosphate, 产品货号: A610404)、磷酸二氢钾(potassium dihydrogen phosphate, 产品货号: A600445)、酚红(phenol red, 产品货号: A600420)、无水葡萄糖(glucose, 产品货号: 63005518)、碳酸氢钠(sodium bicarbonate, 产品货号: A610482)均购自国药控股股份有限公司; PVP(产品货号: P2307-100G)、胰酶(产品货号: T4799-100G)购自Sigma公司; 0.4%台盼蓝溶液(产品货号: E607338)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 细胞增殖毒性检测试剂盒(CCK-8, 产品货号为CK04-500tests)购自东仁化学科技(上海)有限公司。

1.3 改良胰蛋白酶消化液的配制

根据试剂产品货号分别从市场中购入胰蛋白酶、柠檬酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、酚红、葡萄糖、蒸馏水(distilled water)、碳酸氢钠等配方成分, 之后按照表1中的编号分别为1~6号胰蛋白酶消化液的具体用量称(量)取各成分后加100 mL蒸馏水进行溶解。用碳酸氢钠干粉将溶解后的消化液pH值调至7.6, 过滤除菌, 置于低温或常温保存。

1.4 细胞适度/过度消化及显微镜下整体观察培养

将等比例传代至两个细胞培养6孔板且融合率达到80%~90%的细胞[包括大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人宫颈癌细胞HeLa、人整合SV40基因的乳腺上

表1 配制编号为1~6号不同配方胰蛋白酶消化液100 mL的成分含量表
Table 1 Composition of 100 mL trypsin digestive liquid 1-6

配方成分 Component	编号1 Number 1	编号2 Number 2	编号3 Number 3	编号4 Number 4	编号5 Number 5	编号6 Number 6
Trypsin /g	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
Sodium citrate /%	0.100	0.200	0.300	0.400	0.500	0.600
Polyvinylpyrrolidone /%	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Sodium chloride /g	0.800	0.800	0.800	0.800	0.800	0.800
Potassium chloride /g	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
Disodium hydrogen phosphate /g	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142
Potassium dihydrogen phosphate /g	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027
1% phenol red /mL	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150
Glucose /g	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Distilled water /mL	Supplement to 100 mL	Supplement to 100 mL	Supplement to 100 mL	Supplement to 100 mL	Supplement to 100 mL	Supplement to 100 mL
pH	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6

皮细胞HBL-100、人皮肤成纤维细胞BJ、人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)等]从二氧化碳培养箱内取出,缓慢吸出旧培养基,每孔加入1 mL D-PBS清洗两遍以去除残余培养基,分别加入500 μ L改良的胰蛋白酶消化液、柠檬酸胰酶、0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)于每孔中,之后将两个细胞培养6孔板置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中分别进行适度消化(每种细胞对胰蛋白酶消化液的作用反应不同,置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中进行适度消化2~30 min不等)与过度消化(每种细胞对胰蛋白酶消化液的作用反应不同,细胞过度消化时间1~2 h不等)。适度消化时若细胞大部分变圆并脱落,迅速拿回操作台,轻敲几下6孔板后每孔加500 μ L完全培养基终止消化。过度消化时可于1~2 h不等的时间内将细胞从37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中取出至操作台,轻敲几下6孔板后每孔加500 μ L完全培养基终止消化。终止消化后轻轻吹打细胞,细胞完全脱落后吸出至离心管,室温下离心(1 000 r/min, 5 min)。弃去上清液,加500 μ L完全培养基重悬。轻轻吹打重悬细胞,吸取200 μ L细胞悬液至新的培养板,补充完全培养基至2 mL/孔,将细胞移至37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中静置培养。当细胞培养至第24、48、72 h时可通过显微镜下整体观察细胞生长状态并显微拍照。

1.5 台盼蓝染色检测细胞存活率

使用改良的胰蛋白酶消化液及胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人宫颈癌细胞HeLa、人整合SV40基因的乳腺上皮细胞HBL-100、人皮肤成纤维细胞BJ、人正常肺上皮细胞BEAS-2B等五种细胞置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中进行过度消化(1~2 h不等),之后加入500 μ L完全培养基终止消化,并轻轻吹打重悬细胞。取180 μ L细胞悬液[细胞适用浓度为 $(1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6)$ / mL]与20 μ L 0.4%台盼蓝溶液混合后于室温下染色3 min。取少量细胞用血细胞计数板于电子显微镜下计数活细胞总数与死细胞总数,计算细胞的存活率。死细胞胞体呈蓝色膨大状,每个细胞样本计数至少500个细胞。细胞存活率(%)=[活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数)] $\times$ 100%。

1.6 通过细胞计数检测细胞分散率

使用改良的胰蛋白酶消化液及0.25%胰蛋白酶消化液对人回盲肠癌细胞HCT-8细胞、人肝癌细胞

Hep G2、人结直肠腺癌上皮细胞DLD-1、狗肾细胞MDCK(NBL-2)等四种细胞进行适度消化(2~30 min不等),之后加入500 μ L完全培养基终止消化,并轻轻吹打重悬细胞。取少量细胞用血细胞计数板于电子显微镜下计数每种细胞悬液中已分散的单个细胞数及未分散的细胞团中的数量,计算细胞的分散率,以细胞分散率表示改良的胰蛋白酶消化液及0.25%胰蛋白酶消化液消化细胞的能力。细胞分散率(%)=[已分散细胞总数/(已分散细胞总数+细胞团数)] $\times$ 100%。

1.7 CCK-8细胞增殖实验检测细胞增殖率

使用改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对人皮肤成纤维细胞BJ、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)、大鼠心肌细胞H9c2(2-1)等四种细胞置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中进行过度消化(1~2 h不等)后接种至96孔板中分别培养至24 h、48 h、72 h、96 h,在每孔中加入10 μ L的CCK-8溶液后置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中孵育1 h。之后使用酶标仪在450 nm处测定每孔的吸光度(D)值,以评估细胞活性。

1.8 pH值检测

将改良的胰蛋白酶消化液、0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、柠檬酸胰酶等四种不同配方的胰蛋白酶消化液分别保存在4 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C条件下存放1~3周后,用洁净的玻璃棒直接沾取少许不同配方的胰蛋白酶消化液,滴在pH试纸上,将试纸显示的颜色(半分钟内)随即与标准比色卡对照,确定溶液的pH值,以此检测以上四种胰蛋白酶消化液的pH值变化。

1.9 统计分析

所有实验数据经汇总统计后,使用GraphPad Prism 7.0软件对汇总数据进行分析。组间比较均采用 t 检验进行差异性分析。ns: 无显著性差异;显著性差异: * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

2 结果

2.1 改良胰蛋白酶消化液最佳配方及细胞消化能力验证

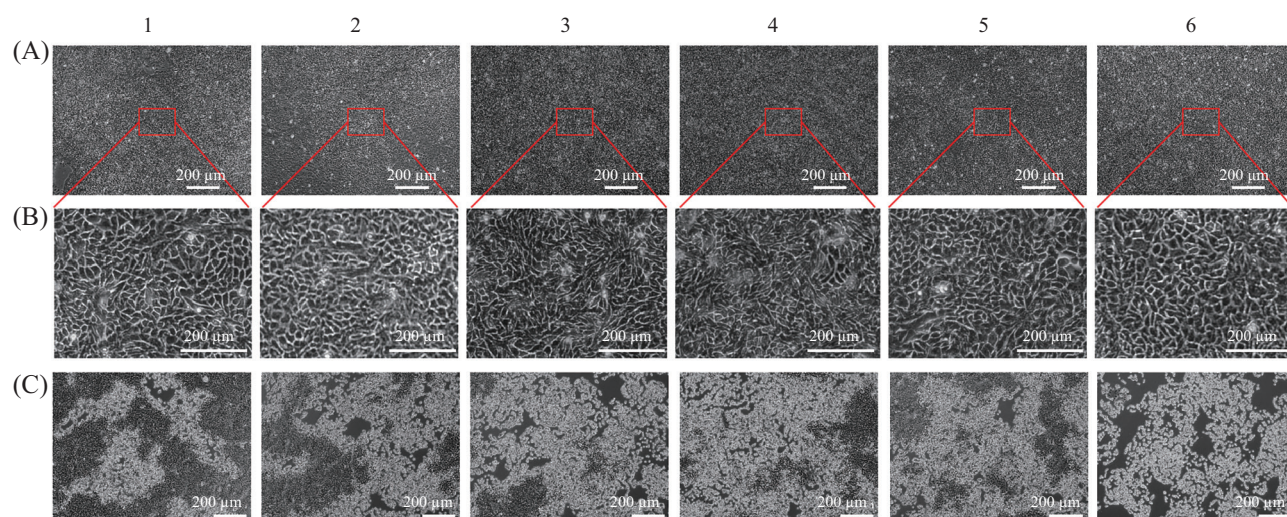
本研究中阐述的改良胰蛋白酶消化液的配制试剂都是市场在售且描述可用于细胞培养的产品。按照材料与方法1.3中提到的表1内容,配制编号分别为1~6号改良的胰蛋白酶消化液各100 mL,之后使

用1~6号胰蛋白酶消化液对人回盲肠癌细胞HCT-8细胞进行适当消化并在相同的消化时间内通过显微镜下整体评估各组细胞的消化程度, 比较编号1~6号胰蛋白酶消化液的消化效果(每组实验重复值为5, 图1)。图1结果显示: 将PVP的含量控制在0.5%, 同时调整柠檬酸钠的含量在0.1%~0.6%之间时, 改良胰蛋白酶消化液均具备一定的细胞消化能力。其中柠檬酸钠的含量保持在0.3%~0.5%之间时更有利于细胞的适度消化, 且随着柠檬酸钠含量的提高, 改良胰蛋白酶消化液的消化能力也有所提高。科研用户可根据自身实验细胞系的贴壁性差异及细胞间解离难易度为依据选择柠檬酸钠最合适的配制比例。本文综合权衡多种实验细胞系的平均消化时间, 选择将柠檬酸钠的含量控制在0.3%(即表1中编号3)作为本文阐述的一种改良胰蛋白酶消化液的具体配方进行后续不同种胰蛋白酶消化液的性能测试。

2.2 不同保存条件时改良胰蛋白酶消化液的稳定性及消化能力变化

传统胰蛋白酶消化液的稳定性及酶活性容易受到多种因素的影响, 如温度、pH值等, 从而导致其存储的有效期也会受到明显影响^[16]。温度较高时胰蛋白酶溶液会因自身消化而导致酶活性降低^[17], 因此传统的胰蛋白酶消化液必须保存在-20 °C条件下, 使用前需要先解冻且需避免反复冻融。细胞消

化也需要在适当的pH条件下进行, 通常在碱性范围(pH7.2~8.0)内胰蛋白酶消化液才会表现出其细胞消化最大的活性, 大于或小于最适pH值, 都会降低酶活性从而影响细胞间的分离效果。为了有效测定改良的胰蛋白酶消化液及市场常见胰蛋白酶消化液的稳定性及存储时效性, 本文分别将改良的胰蛋白酶消化液、柠檬酸胰酶、0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)等四种不同配方的胰蛋白酶消化液分别保存在4 °C、37 °C环境中存放1~3周(参考模拟加速稳定性实验^[18-19], 初步考虑37 °C保存1~3周约等于4 °C保存半年至一年的效果), 检测以上胰蛋白酶消化液的pH值变化(表2)。之后使用保存在4 °C及37 °C环境中存放1~3周后的四种胰蛋白酶消化液对人回盲肠癌细胞HCT-8进行相同时间的消化, 通过显微镜下整体观察细胞的消化程度从而进行消化能力的比较(每组实验重复值为5, 图2~图5)。从表2数据可以发现: 改良的胰蛋白酶消化液保存在37 °C环境中存放1~3周时, pH值仍保持在正常范围内且变化区间最小, 其稳定性显著优于柠檬酸胰酶及市场传统的0.25%胰蛋白酶消化液。同时图2至图5的结果显示: 无论是4 °C亦或37 °C保存条件, 改良的胰蛋白酶消化液、柠檬酸胰酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)的消化能力均显著高于0.25%胰蛋白酶。当四种胰蛋白酶消化液长期保存在37 °C条件时, 改良胰蛋白



A: 人回盲肠癌细胞HCT-8细胞正常显微形态图; B: 人回盲肠癌细胞HCT-8细胞正常显微形态局部放大图; C: 人回盲肠癌细胞HCT-8细胞经表1所述编号分别为1~6号胰蛋白酶消化液消化10 min时的显微形态图。

A: normal microscopic morphology of HCT-8; B: locally magnified microscopic morphology of HCT-8; C: microscopic morphology of HCT-8 digested with trypsin solutions numbered 1-6 as described in table 1 for 10 minutes.

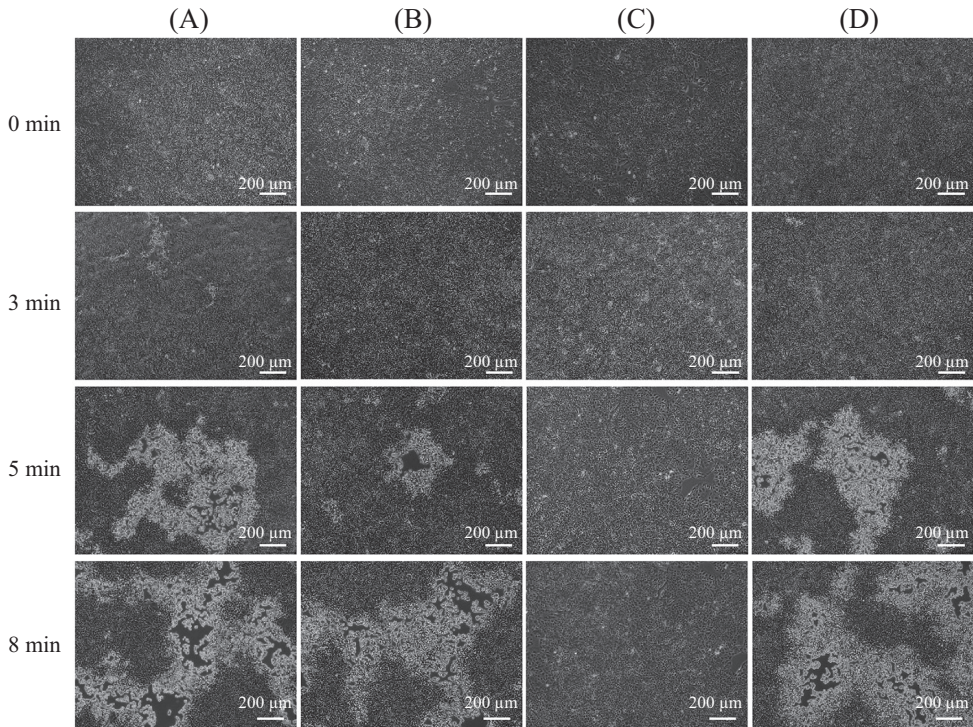
图1 人回盲肠癌细胞HCT-8细胞经表1所述编号为1~6号胰蛋白酶消化液消化10 min前后显微形态图

Fig.1 Microscopic morphology of HCT-8 cells digested with trypsin digestion solution 1-6 for 10 minutes

表2 不同配方的胰蛋白酶消化液保存在室温、37 °C下1~3周后的pH值

Table 2 pH values of trypsin digestion solutions with different formulations stored at room temperature and 37 °C for 1-3 weeks

条件 Condition	改良胰蛋白酶消化液pH值 The pH value of the op- timized trypsin digestion solution	柠檬酸胰酶pH值 The pH value of the citrate trypsin	0.25%胰蛋白酶pH值 The pH value of the 0.25% trypsin	胰蛋白酶-EDTA(0.25%) pH值 The pH value of the trypsin- EDTA (0.25%)
Room temperature	7.6	7.6	7.6	7.6
Store at 37 °C for 1 week	7.5	6.8	7.4	7.4
Store at 37 °C for 2 week	7.4	6.4	7.2	7.1
Store at 37 °C for 3 week	7.4	6.0	7.0	7.1



A: 保存在4 °C时改良的胰蛋白酶消化液分别消化HCT-8细胞0 min、3 min、5 min、8 min后的显微形态图; B: 保存在4 °C时柠檬酸胰酶分别消化HCT-8细胞0 min、3 min、5 min、8 min后的显微形态图; C: 保存在4 °C时0.25%胰蛋白酶分别消化HCT-8细胞0 min、3 min、5 min、8 min后的显微形态图; D: 保存在4 °C时胰蛋白酶-EDTA(0.25%)分别消化HCT-8细胞0 min、3 min、5 min、8 min后的显微形态图。

A: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with the improved trypsin digestion solution at 4 °C for 0 min, 3 min, 5 min, and 8 min; B: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with citrate trypsin at 4 °C for 0 min, 3 min, 5 min, and 8 min; C: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with 0.25% trypsin at 4 °C for 0 min, 3 min, 5 min, and 8 min; D: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with trypsin-EDTA (0.25%) at 4 °C for 0 min, 3 min, 5 min, and 8 min.

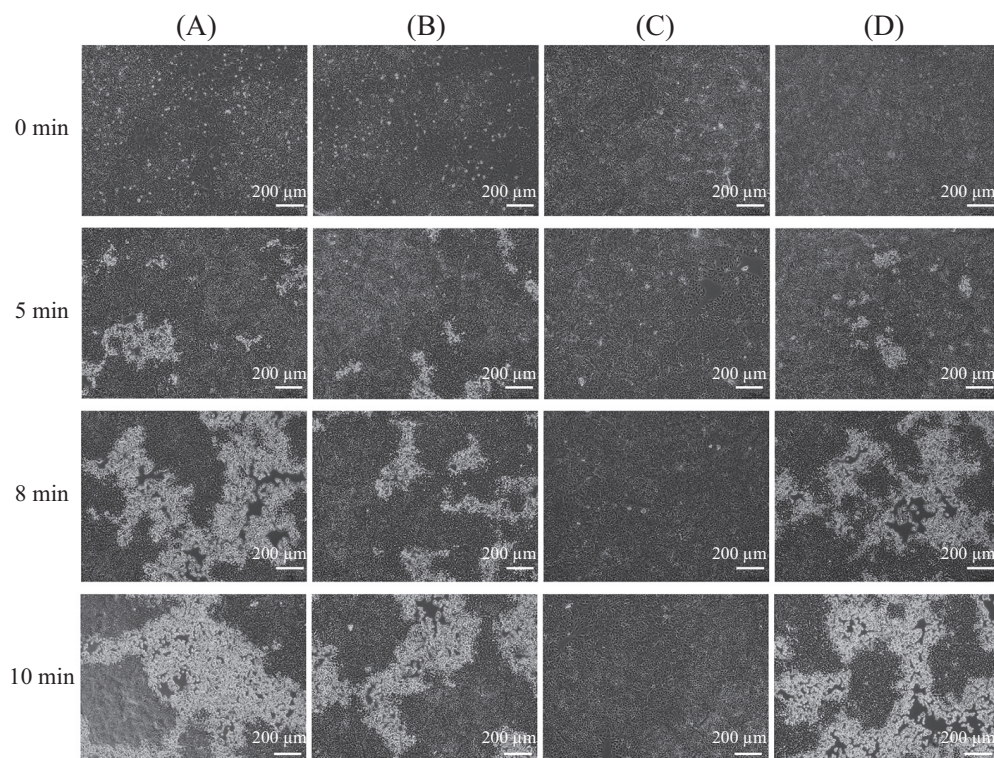
图2 不同配方的胰蛋白酶消化液保存在4 °C时对人回盲肠癌细胞HCT-8细胞分别在消化0 min、3 min、5 min、8 min后的显微镜下细胞整体形态图

Fig.2 Microscopic morphology of HCT-8 cells digested with different formulations of trypsin digestion solution stored at 4 °C for 0, 3, 5, and 8 minutes

酶消化液的消化能力则明显高于柠檬酸胰酶，但与胰蛋白酶-EDTA(0.25%)相比差异不大。即使在37 °C环境中存放3周，改良的胰蛋白酶消化液仍对人回盲肠癌细胞HCT-8具有一定的细胞消化能力。

2.3 改良胰蛋白酶消化液对细胞间分散率的影响
通过使用改良的胰蛋白酶消化液及0.25%胰蛋

白酶消化液对人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人结肠直肠癌上皮细胞DLD-1、狗肾细胞MDCK(NBL-2)等四种细胞进行适度消化(2~30 min不等，图6)，比较改良的胰蛋白酶消化液相较于0.25%胰蛋白酶消化液对以上四种细胞的分散效果。图6结果显示：改良的胰蛋白酶消化液对细胞的分散



A: 保存在37 °C 1周后改良的胰蛋白酶消化液分别消化HCT-8细胞0 min、5 min、8 min、10 min后的显微形态图; B: 保存在37 °C 1周后柠檬酸胰酶分别消化HCT-8细胞0 min、5 min、8 min、10 min后的显微形态图; C: 保存在37 °C 1周后0.25%胰蛋白酶分别消化HCT-8细胞0 min、5 min、8 min、10 min后的显微形态图; D: 保存在37 °C 1周后胰蛋白酶-EDTA(0.25%)分别消化HCT-8细胞0 min、5 min、8 min、10 min后的显微形态图。A: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with the improved trypsin digestion solution after being stored at 37 °C for one week for 0 min, 5 min, 8 min, and 10 min; B: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with citrate trypsin after being stored at 37 °C for one week for 0 min, 5 min, 8 min, and 10 min; C: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with 0.25% trypsin after being stored at 37 °C for one week for 0 min, 5 min, 8 min, and 10 min; D: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with trypsin-EDTA (0.25%) after being stored at 37 °C for one week for 0 min, 5 min, 8 min, and 10 min.

图3 不同配方的胰蛋白酶消化液保存在37 °C 1周后对人回盲肠癌细胞HCT-8细胞分别在消化0 min、5 min、8 min、10 min后的显微镜下细胞整体形态图

Fig.3 Microscopic morphology of HCT-8 cells digested with different formulations of trypsin digestion solution stored at 37 °C for one week at 0, 5, 8, and 10 minutes

率可高达98.5%, 远超于0.25%胰蛋白酶消化液对细胞的分散率(44.7%), 显著提高了各组细胞间的分散率。

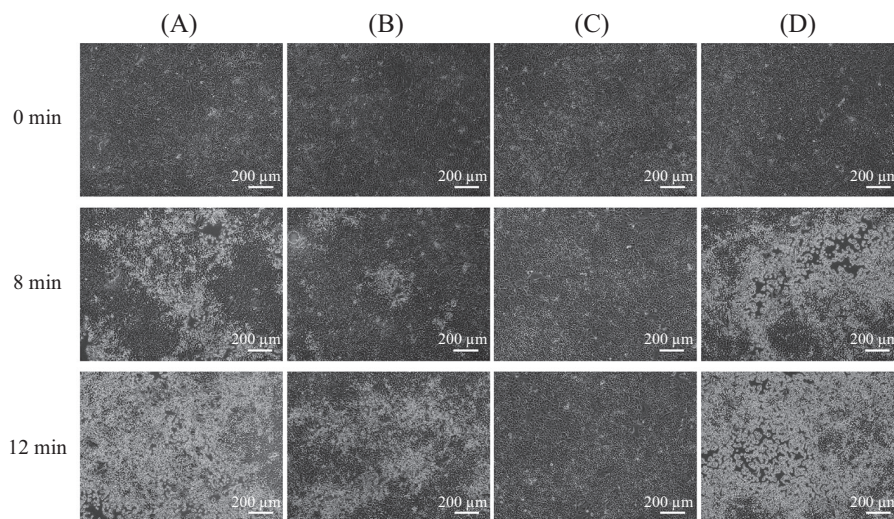
2.4 改良胰蛋白酶消化液过度消化细胞后对细胞存活率的影响

EDTA作为胰蛋白酶消化液中最常用的化学螯合剂之一, 不仅无法通过血清/完全培养液终止其细胞消化反应, 长时间消化还会对细胞造成一定的损伤, 进而影响细胞后续的贴壁及生长活性。本研究中使用改良的胰蛋白酶消化液及胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、人皮肤成纤维细胞BJ、人整合SV40基因的乳腺上皮细胞HBL-100、人宫颈癌细胞HeLa等五种细胞进行过度消化(1~2 h不等, 图7), 通过台盼蓝溶液染色检测两组实验细胞的

存活率。图7结果表明: 改良的胰蛋白酶消化液在过度消化细胞后细胞存活率可达98.5%, 而胰蛋白酶-EDTA(0.25%)组的细胞存活率只有75.7%~84.6%, 可见改良的胰蛋白酶消化液对细胞损伤较小, 可显著提高细胞消化后的存活率。

2.5 改良胰蛋白酶消化液过度消化细胞后对细胞增殖率的影响

使用改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对人皮肤成纤维细胞BJ、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)、大鼠心肌细胞H9c2(2-1)等四种细胞进行过度消化(1~2 h不等)后分别传代培养至24 h、48 h、72 h、96 h, 通过CCK-8细胞增殖实验比较改良的胰蛋白酶消化液及胰蛋白酶-EDTA(0.25%)在过度消化细胞后对细胞增殖能力的影响(图8)。图8实验结果表明: 改

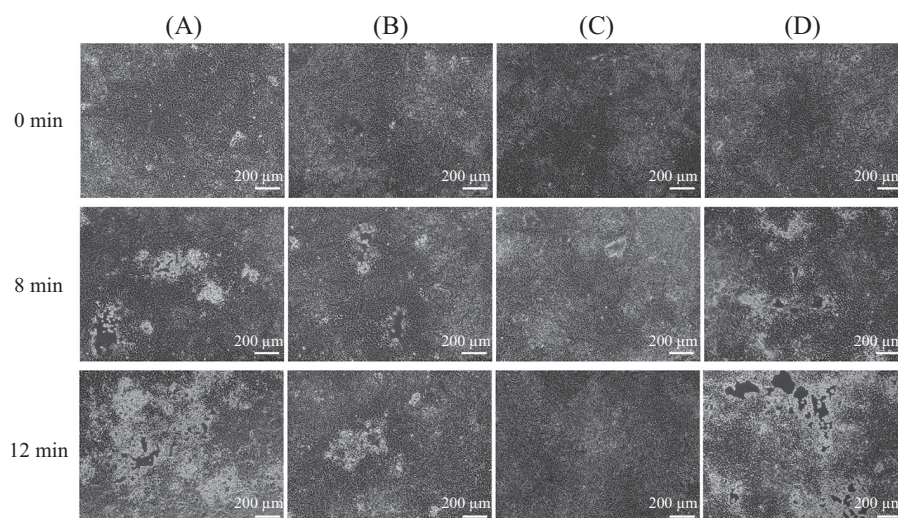


A: 保存在37 °C 2周后改良的胰蛋白酶消化液分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图; B: 保存在37 °C 2周后柠檬酸胰酶分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图; C: 保存在37 °C 2周后0.25%胰蛋白酶分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图; D: 保存在37 °C 2周后胰蛋白酶-EDTA(0.25%)分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图。

A: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with the improved trypsin digestion solution after being stored at 37 °C for two weeks for 0 min, 8 min, and 12 min; B: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with citrate trypsin after being stored at 37 °C for two weeks for 0 min, 8 min, and 12 min; C: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with 0.25% trypsin after being stored at 37 °C for two weeks for 0 min, 8 min, and 12 min; D: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with trypsin-EDTA (0.25%) after being stored at 37 °C for two weeks for 0 min, 8 min, and 12 min.

图4 不同配方的胰蛋白酶消化液保存在37 °C 2周后对人回盲肠癌细胞HCT-8细胞分别在消化0 min、8 min、12 min后的显微镜下细胞整体形态图

Fig.4 Microscopic morphology of HCT-8 cells after digestion with different formulations of trypsin digestion solution stored at 37 °C for two weeks at 0, 8, and 12 minutes

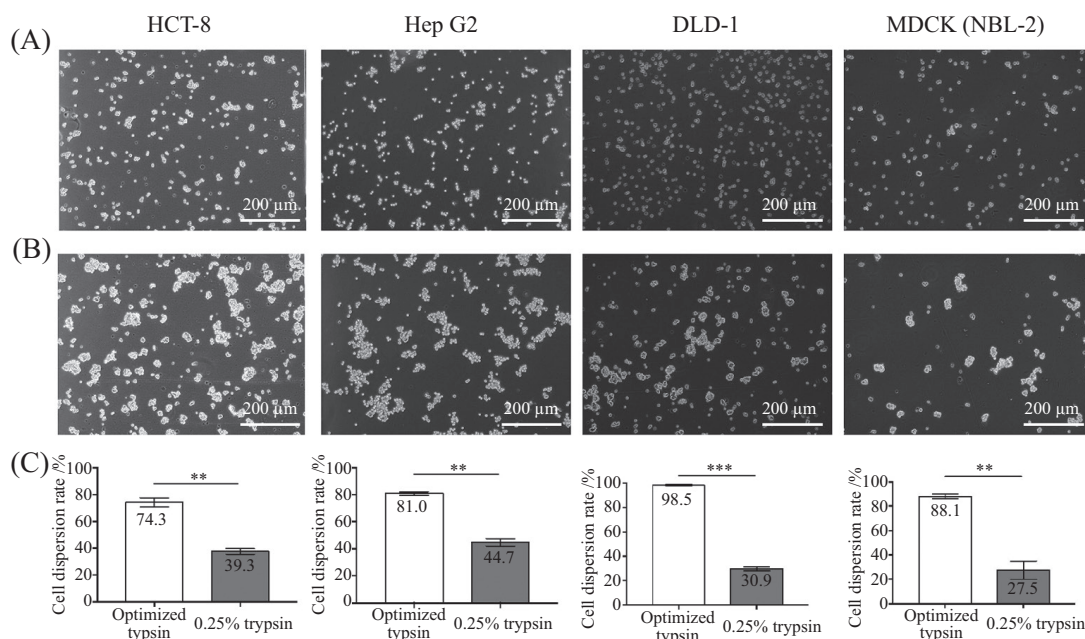


A: 保存在37 °C 3周后改良的胰蛋白酶消化液分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图; B: 保存在37 °C 3周后柠檬酸胰酶分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图; C: 保存在37 °C 3周后0.25%胰蛋白酶分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图; D: 保存在37 °C 3周后胰蛋白酶-EDTA(0.25%)分别消化HCT-8细胞0 min、8 min、12 min后的显微形态图。

A: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with the improved trypsin digestion solution after being stored at 37 °C for three weeks for 0 min, 8 min, and 12 min; B: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with citrate trypsin after being stored at 37 °C for three weeks for 0 min, 8 min, and 12 min; C: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with 0.25% trypsin after being stored at 37 °C for three weeks for 0 min, 8 min, and 12 min; D: microscopic morphology of HCT-8 cells digested with trypsin-EDTA (0.25%) after being stored at 37 °C for three weeks for 0 min, 8 min, and 12 min.

图5 不同配方的胰蛋白酶消化液保存在37 °C 3周后对人回盲肠癌细胞HCT-8细胞分别在消化0 min、8 min、12 min后的显微镜下细胞整体形态图

Fig.5 Microscopic morphology of HCT-8 cells digested with different formulations of trypsin digestion solution stored at 37 °C for three weeks at 0, 8, and 12 minutes



A: 使用改良的胰蛋白酶消化液正常消化人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人结直肠腺癌上皮细胞DLD-1、狗肾细胞MDCK(NBL-2)时的细胞悬液显微形态图; B: 使用0.25%胰蛋白酶消化液正常消化人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人结直肠腺癌上皮细胞DLD-1、狗肾细胞MDCK(NBL-2)时的细胞悬液显微形态图; C: 使用改良的胰蛋白酶消化液与0.25%胰蛋白酶消化液正常消化人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人结直肠腺癌上皮细胞DLD-1、狗肾细胞MDCK(NBL-2)后的细胞间分散率比较(ns: 无显著性差异; 显著性差异: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

A: microscopic morphology of cell suspensions from normal digestion of HCT-8, Hep G2, DLD-1 and MDCK (NBL-2) cells using the improved trypsin digestion solution; B: microscopic morphology of cell suspensions from normal digestion of HCT-8, Hep G2, DLD-1 and MDCK (NBL-2) cells using 0.25% trypsin solution; C: comparison of intercellular dispersion rates after normal digestion of HCT-8, Hep G2, DLD-1 and MDCK (NBL-2) cells using the improved trypsin digestion solution and 0.25% trypsin solution (ns: no significant difference; significant differences: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

图6 改良的胰蛋白酶消化液与0.25%胰蛋白酶消化液适度消化人回盲肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Hep G2、人结直肠腺癌上皮细胞DLD-1、狗肾细胞MDCK(NBL-2)时的细胞悬液显微形态图及细胞间分散率

Fig.6 Microscopic morphology and comparison of cell dispersion rates after normal digestion of HCT8, Hep G2, DLD-1, and MDCK (NBL-2) cells using optimized trypsin and traditional 0.25% trypsin

良的胰蛋白酶消化液在过度消化实验细胞后细胞的增殖能力均显著高于胰蛋白酶-EDTA(0.25%)组, 改良的胰蛋白酶消化液更有利于细胞消化传代后的可持续生长。

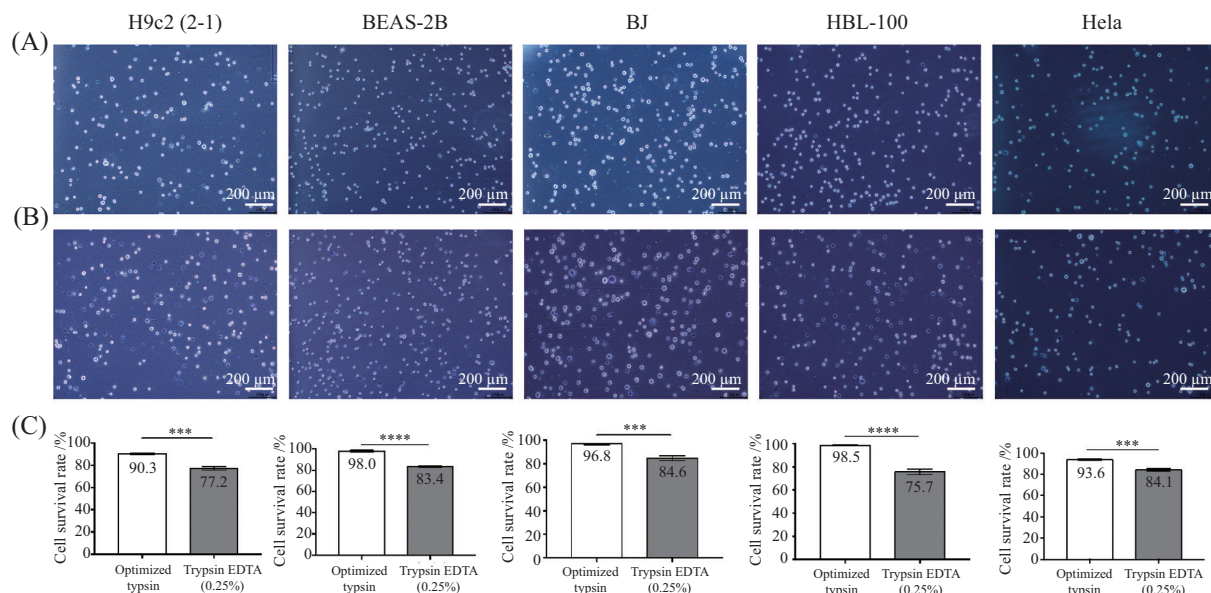
2.6 改良胰蛋白酶消化液过度消化细胞后对细胞贴壁及生长状态的影响

通过使用改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对人皮肤成纤维细胞BJ、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)、大鼠心肌细胞H9c2(2-1)等四种细胞进行过度消化(1~2 h不等)后传代培养至24 h、48 h、72 h(图9~图12), 通过显微镜下整体观察细胞形态比较改良的胰蛋白酶消化液相较于胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对细胞贴壁及生长状态的影响。从图9至图12的结果表明: 胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化细胞后细胞的

贴壁速度及增殖能力明显缓慢, 改良的胰蛋白酶消化液可明显改善过度消化对细胞不易贴壁及生长状态的影响, 更有利于实验细胞系的传代扩增培养。

3 讨论

细胞消化技术在细胞传代保种过程中发挥着不可或缺的作用, 通过选择合适的胰蛋白酶消化液可以有效促进细胞间的分离和传代, 保证细胞的活力及增殖状态, 为后续的实验和研究提供更稳定的细胞来源。目前市场上比较常见的胰酶消化液主要有0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、柠檬酸胰酶等, 其中0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)最为常用。然而胰蛋白酶的稳定性及消化活性容易受到其自身浓度、环境温度、pH值、作用时间等因素影响, 同时细胞再复苏时容易



A: 使用改良的胰蛋白酶消化液过度消化大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、人皮肤成纤维细胞BJ、人整合SV40基因的乳腺上皮细胞HBL-100、人宫颈癌细胞HeLa后的台盼蓝溶液染色图; B: 使用胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、人皮肤成纤维细胞BJ、人整合SV40基因的乳腺上皮细胞HBL-100、人宫颈癌细胞HeLa后的台盼蓝溶液染色图; C: 使用以上两组胰蛋白酶消化液过度消化以上细胞后的细胞存活率比较(ns: 无显著性差异; 显著性差异: $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)。

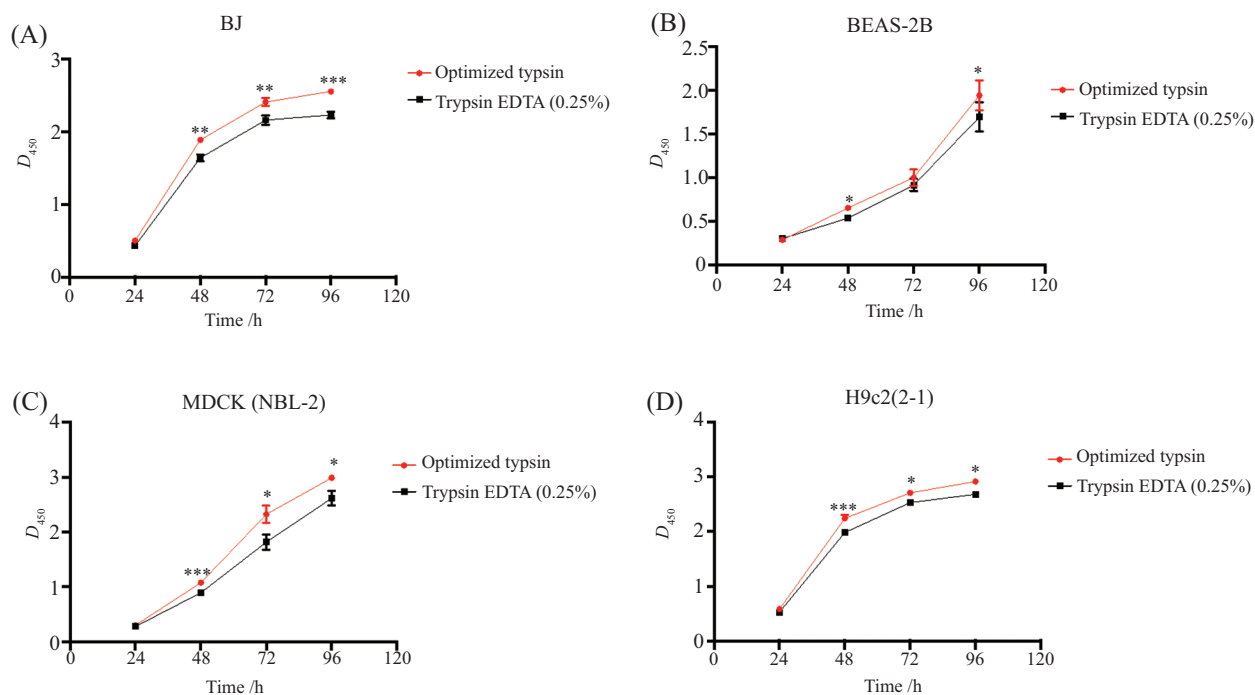
A: trypan blue staining results of H9c2 (2-1), BEAS-2B, BJ, HBL-100, HeLa cells overexposed with optimized trypsin; B: trypan blue staining results of H9c2 (2-1), BEAS-2B, BJ, HBL-100, HeLa cells overexposed with trypsin EDTA (0.25%); C: comparison of cell survival rates of H9c2 (2-1), BEAS-2B, BJ, HBL-100, HeLa cells overexposed with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%) (ns: no significant difference; significant differences: $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$).

图7 使用改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化大鼠心肌细胞H9c2(2-1)、人正常肺上皮细胞BEAS-2B、人皮肤成纤维细胞BJ、人整合SV40基因的乳腺上皮细胞HBL-100、人宫颈癌细胞HeLa后台盼蓝溶液染色图及细胞存活率
Fig.7 Trypan blue staining results and cell survival rates of H9c2 (2-1), BEAS-2B, BJ, HBL-100, HeLa cells overexposed with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%)

聚团生长, 无法满足实验细胞系大规模连续传代所需的高效、稳定及生长均匀性。因此在本文中, 我们通过优化改良胰蛋白酶消化液的最佳配方, 比较改良胰蛋白酶消化液、柠檬酸胰酶、0.25%胰蛋白酶、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)等四种不同配方胰蛋白酶消化液在不同保存条件时的pH值变化及细胞消化活性, 发现改良胰蛋白酶消化液的稳定性及消化能力均显著优于柠檬酸胰酶及市场传统0.25%胰蛋白酶消化液。同时通过计算细胞间分散率, 我们还发现改良胰蛋白酶消化液对细胞的分散率远超于0.25%胰蛋白酶消化液, 这主要考虑改良后的胰蛋白酶消化液中不仅添加并测试了柠檬酸钠的含量(0.3%), 同时也构建了磷酸缓冲体系协同作用, 在其进行细胞消化时可进一步抑制细胞凝聚过程, 从而帮助维持细胞间更分散的解离状态, 防止细胞传代后出现聚团生长现象。

不同的贴壁细胞对胰蛋白酶的作用反应不同, 钙离子螯合剂-EDTA也可以显著增强0.25%胰蛋白酶的

细胞消化效果, 使贴壁细胞更容易脱离培养底物并促进细胞间分散, 因此胰蛋白酶-EDTA(0.25%)在目前市场中也较为常用。不过考虑消化液中的EDTA无法通过血清/完全培养液终止其对细胞的消化反应, 所以在消化细胞后必须使用缓冲盐溶液清洗细胞后再离心去除, 才能避免其影响细胞系传代后的贴壁效果^[20], 且EDTA本身具有一定的细胞毒性^[21-22], 消化细胞较长时间时容易对细胞造成损伤且可能会直接影响细胞消化后的生长状态。因此, 我们在采纳以柠檬酸钠替代EDTA的同时还考虑添加了0.5%的PVP, 并对细胞消化后的存活率、增殖率及生长状态进行检测, 结果也证实改良胰蛋白酶消化液无论在细胞的存活率、增殖率, 还是贴壁性方面均显著优于胰蛋白酶-EDTA(0.25%)。基于柠檬酸钠的安全无毒性, 以及PVP被证实具有细胞无毒、稳定剂、保护剂、抗氧化剂、可生物降解等优点^[23-24], 我们推测改良的胰蛋白酶消化液中PVP的添加不仅可以保护细胞在消化分离过程及后续增殖生长时免受氧化应激的

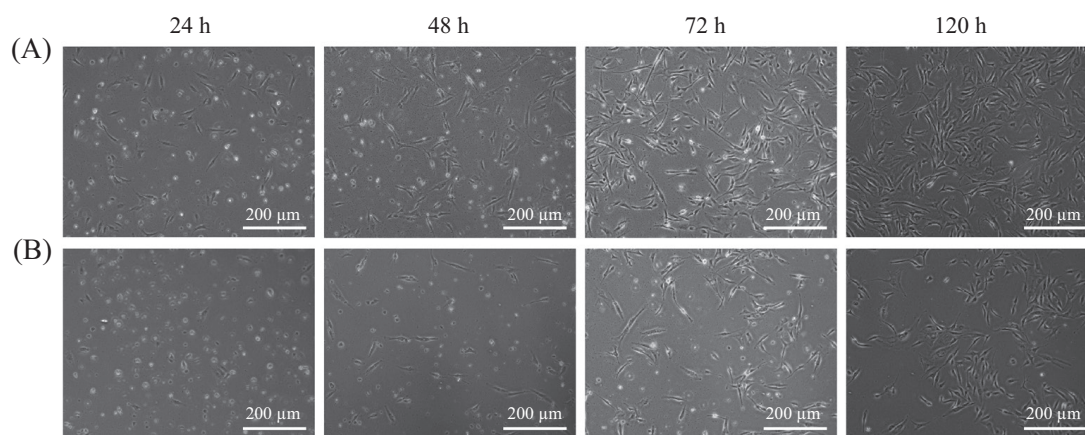


A~D: 通过CCK-8细胞增殖实验对改良胰蛋白酶消化液及胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化后传代培养至24 h、48 h、72 h、96 h的人皮肤成纤维细胞BJ、正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)、大鼠心肌细胞H9c2(2-1)的增殖率(ns: 无显著性差异; 显著性差异: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

A~D: cell proliferation rates of BJ, BEAS-2B, MDCK (NBL-2), H9c2 (2-1) cells passaged and cultured for 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h after over-digestion with the improved trypsin digestion solution and trypsin-EDTA (0.25%), as determined by the CCK-8 cell proliferation assay. (ns: no significant difference; significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

图8 使用改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化人皮肤成纤维细胞BJ、正常肺上皮细胞BEAS-2B、狗肾细胞MDCK(NBL-2)、大鼠心肌细胞H9c2(2-1)后的细胞增殖率

Fig.8 Cell proliferation rates of BJ, BEAS-2B, MDCK (NBL-2), H9c2 (2-1) cells overexposed with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%)

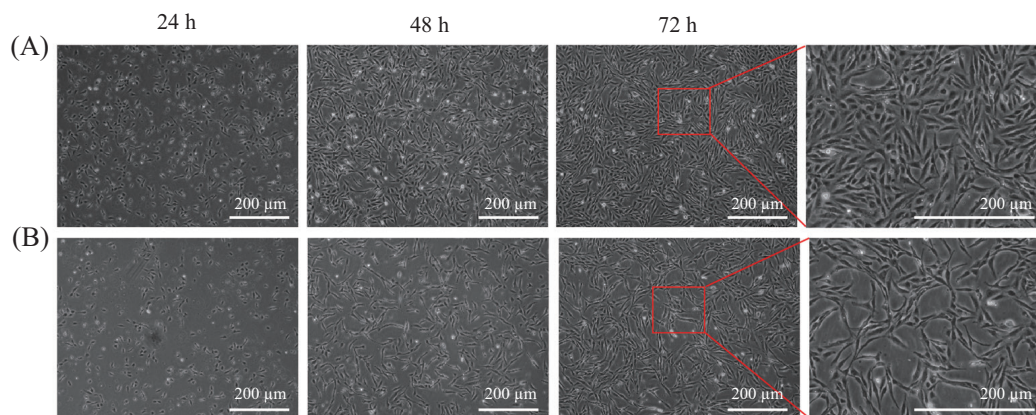


A: 使用改良的胰蛋白酶消化液过度消化人皮肤成纤维细胞BJ后培养至第24 h、48 h、72 h、120 h时的显微形态图; B: 使用胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化人皮肤成纤维细胞BJ后培养至第24 h、48 h、72 h、120 h时的显微形态图。

A: microscopic morphology of BJ cells after excessive digestion with optimized trypsin at 24 h, 48 h, 72 h and 120 h of culture; B: microscopic morphology of BJ cells after excessive digestion with trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h, 72 h and 120 h of culture.

图9 改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化人皮肤成纤维细胞BJ后培养第24 h、48 h、72 h、120 h时的显微形态图

Fig.9 Microscopic morphology of BJ cells after excessive digestion with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h, 72 h and 120 h of culture

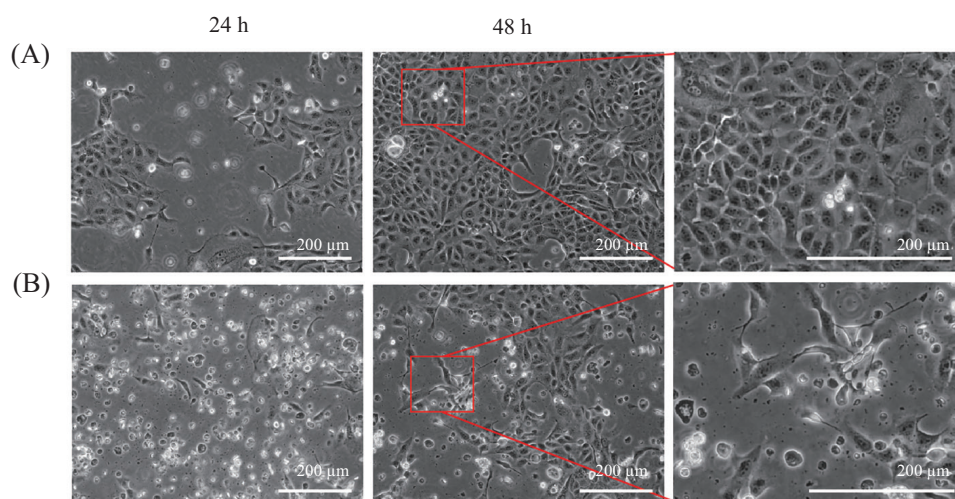


A: 使用改良的胰蛋白酶消化液过度消化人正常肺上皮细胞BEAS-2B后培养至第24 h、48 h、72 h时的显微形态及局部放大图; B: 使用胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化人正常肺上皮细胞BEAS-2B后培养至第24 h、48 h、72 h时的显微形态及局部放大图。

A: microscopic morphology and locally magnified images of BEAS-2B cells after excessive digestion with optimized trypsin at 24 h, 48 h, and 72 h of culture; B: microscopic morphology and locally magnified images of BEAS-2B cells after excessive digestion with trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h, and 72 h of culture.

图10 改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化人正常肺上皮细胞BEAS-2B后培养第24 h、48 h、72 h时的显微形态及局部放大图

Fig.10 Microscopic morphology of BEAS-2B cells after excessive digestion with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h, and 72 h of culture



A: 使用改良的胰蛋白酶消化液过度消化狗肾细胞MDCK(NBL-2)后培养至第24 h、48 h时的显微形态及局部放大图; B: 使用胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化狗肾细胞MDCK(NBL-2)后培养第24 h、48 h时的显微形态及局部放大图。

A: microscopic morphology and locally magnified images of MDCK (NBL-2) cells after excessive digestion with optimized trypsin at 24 h, 48 h of culture; B: microscopic morphology and locally magnified images of MDCK (NBL-2) cells after excessive digestion with trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h of culture.

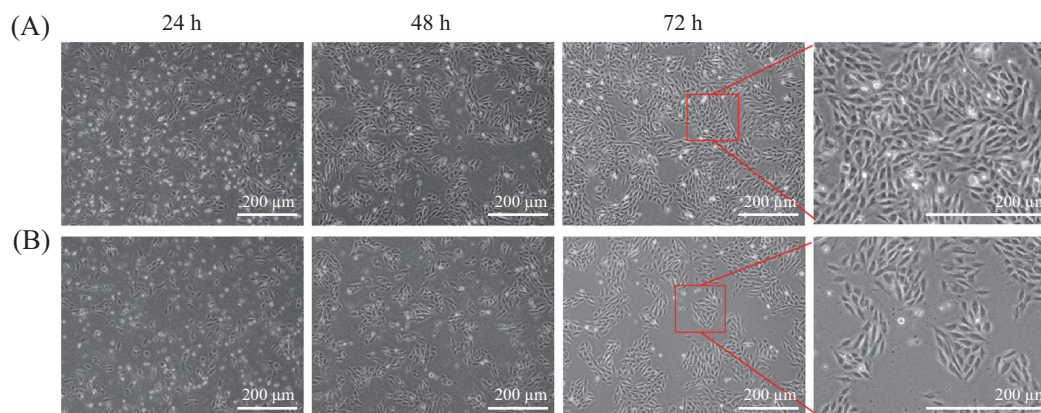
图11 改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化狗肾细胞MDCK(NBL-2)后培养第24 h、48 h时的显微形态及局部放大图

Fig.11 Microscopic morphology of MDCK (NBL-2) cells after excessive digestion with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%) at 24 h and 48 h of culture

损伤, PVP自身良好的水溶性及黏附性还可以帮助细胞在消化后能够更好地附着在细胞培养器的表面或载体上, 为细胞后续的贴壁过程、传代增殖提供了良好的生长环境, 更适合实验细胞系的连续传代培养及大规模生产。目前也有文献报道将PVP作

为低温保护剂添加至细胞培养液、干细胞无血清冻存液中, 可以显著提高细胞的复苏活力^[25]。

此外, 从市场应用性及开发角度考虑, 经济成本及量产后的工艺流程也成为制约本研究中改良胰蛋白酶消化液能否服务科研大众的关键。我们通过



A: 使用改良的胰蛋白酶消化液过度消化大鼠心肌细胞H9c2(2-1)后培养至第24 h、48 h、72 h时的显微形态及局部放大图; B: 使用胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化大鼠心肌细胞H9c2(2-1)后培养至第24 h、48 h、72 h时的显微形态及局部放大图。

A: microscopic morphology and locally magnified images of H9c2 (2-1) cells after excessive digestion with optimized trypsin at 24 h, 48 h, and 72 h of culture; B: microscopic morphology and locally magnified images of H9c2 (2-1) cells after excessive digestion with trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h, and 72 h of culture.

图12 改良的胰蛋白酶消化液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)过度消化大鼠心肌细胞H9c2(2-1)后培养第24 h、48 h、72 h时的显微形态及局部放大图

Fig.12 Microscopic morphology of H9c2 (2-1) cells after excessive digestion with optimized trypsin and trypsin EDTA (0.25%) at 24 h, 48 h, and 72 h of culture

与0.25%胰蛋白酶及胰蛋白酶-EDTA(0.25%)消化液的市场价格、配制流程、保存时效性及使用耗损等方面进行优化比较,发现改良胰蛋白酶消化液更具有市场应用及开发优势,但是同时也需要通过更多类型的实验细胞系尤其在干细胞的消化、保种方面进行数据验证,以提高改良胰蛋白酶消化液在生物医学领域的通用性范围及安全可靠性。

综上所述,改良胰蛋白酶消化液在不同的保存条件时其稳定性及消化能力均显著优于0.25%胰蛋白酶、柠檬酸胰酶等市场较为常见的胰蛋白酶消化液。不仅如此,改良胰蛋白酶消化液还可以显著提高细胞间的分散率,明显降低消化时间过长以及胰蛋白酶-EDTA(0.25%)对实验细胞系存活率、增殖率及贴壁性的影响,对细胞的损伤更小,更适合多种类型实验细胞系的大规模连续传代培养及临床转化应用等方向。

参考文献 (References)

- [1] CHEN R M. History and current status of cell culture [J]. Biol Teach, 1980, 1(1): 1-2.
- [2] FOLEY G E, EPSTEIN S S. Cell culture and cancer chemotherapy [J]. Adv Chemother, 1964, 13(1):175-83.
- [3] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-10.
- [4] ZHANG E. Tissue culture and molecular cytology techniques [M]. Beijing Publ, 1995, 40(3): 76-9.
- [5] LIU C, MA T, ZHANG L. Mechanical and enzymatic digestion of autologous fat grafting (A-FG): Fat volume maintenance and AD-SVFs amount in comparison [J]. Aesthet Plast Surg, 2024, 48(1): 27-8.
- [6] SENOO T, OBARA Y, JOYCE N. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium [J]. IOVS, 2000, 41(10): 2930-5.
- [7] XIONG S Y, XIAO C. Digestion of dispersed cells with citric acid trypsin [J]. J Cell Biol, 1987, 4(4): 190-1.
- [8] SHEN M, XU S, ZHANG K. Digestion and dispersion of BHK21 cells using sodium citrate trypsin [J]. Chin J Vet Med, 1990, 1(1): 36-7.
- [9] WALTER L, GYNHEUNG A, JAMES M. The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures [J]. Biotechnol Lett, 1997, 19(1): 93-6.
- [10] KURAKULA M, RAO G. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): as excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2020, 60(1): 102-16.
- [11] FADEEVA I, TROFIMCHUK E, FORYSENKONA A, et al. Composite polyvinylpyrrolidone-sodium alginate-hydroxyapatite hydrogel films for bone repair and wound dressings applications [J]. Polymers, 2021, 13(22): 39-49.
- [12] LI W, LU X, JIANG L, et al. Radioprotective effect of polyvinylpyrrolidone modified selenium nanoparticles and its antioxidant mechanism *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12(1): 1332-9.
- [13] CROW B, STOKES W, KAPUR N, et al. Polyvinylpyrrolidone (PVP) adsorbs on and interacts with biomembrane-like layers [J]. J Solid State Electrochem, 2024, 90(9): 411-8.
- [14] HONG Y, CHIRILA T, FITTON J H, et al. Effect of crosslinked

- poly (1-vinyl-2-pyrrolidinone) gels on cell growth in static cell cultures [J]. *Biomed Mater Eng*, 1997, 7(1): 35-47.
- [15] JAVED R, AHMED M, HAQ I, et al. PVP and PEG doped CuO nanoparticles are more biologically active: antibacterial, antioxidant, antidiabetic and cytotoxic perspective [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 7(9): 108-15.
- [16] MANSURI M, BATHLA S, LAM T, et al. Optimal conditions for carrying out trypsin digestions on complex proteomes: from bulk samples to single cells [J]. *J Proteomics*, 2024, 29(7): 105-9.
- [17] LIU L. Research on the application of rational design in the thermal stability of trypsin [D]. 天津: 天津大学, 2019, 50(4): 12.
- [18] MAGGI L, CONTE U, NHAMIAS A, et al. Evaluation of accelerated stability test conditions for medicated chewing gums [J]. *DDIP*, 2013, 39(10): 1500-7.
- [19] SOBRAL D, GOUVEIA T, CONDELES A L, et al. Effect of accelerated stability on the physical, chemical, and mechanical properties of experimental bleaching gels containing different bio-adhesive polymers [J]. *Clin Oral Investig*, 2022, 26(3): 3261-71.
- [20] KOVACS K, SZITTNER Z, MAGYARODI B, et al. Optical sensor reveals the hidden influence of cell dissociation on adhesion measurements [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 117-9.
- [21] LANIGAN R, YAMARIK T. Final report on the safety assessment of EDTA, calcium disodium EDTA, diammonium EDTA, dipotassium EDTA, disodium EDTA, TEA-EDTA, tetrasodium EDTA, tripotassium EDTA, trisodium EDTA, HEDTA, and trisodium HEDTA [J]. *Int J Toxicol*, 2002, 21(2): 95-142.
- [22] AMARAL K, ROGERO M, FOCK R, et al. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture [J]. *Int Endod J*, 2007, 40(5): 338-43.
- [23] WANG A, MADDEN L, PAUNOV V N. Advanced biomedical applications based on emerging 3D cell culturing platforms [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(46): 10487-501.
- [24] LUTOLF M, HUBBELL J. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 47-55.
- [25] RAY S, PRAMANIK K, SARANGI S, et al. Serum-free non-toxic freezing solution for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(8): 1397-404.