

# 人羊膜单层细胞培养方法几个问题的探讨\*

董熙昌 朱清干 萧顺华 李德邵

(贵阳医学院微生物学教研组, 贵阳)

人羊膜细胞培养成功, 虽然只有近十年的历史, 却已经成为病毒研究工作中常用的细胞之一。国内外文献<sup>[1-6]</sup>所介绍的这种单层细胞培养方法与技术都有出入。其中有許多地方需要作进一步研究。本文将探讨培养人羊膜单层细胞时的消化方法、细胞培养液以及人羊膜的选择等问题。

## 材料与方 法

(一) 人羊膜 多数取自本院附属医院分娩室。少数取自本市妇幼保健院。前者为整个胎盘携回, 在无菌室剥离。后者在该院剥离, 置于含 Hanks 溶液的玻璃器内, 携回实验室。所有羊膜均于分娩后 8 小时内携回实验室。用 Hanks 溶液洗涤 3—6 次, 直至大部分粘液与血球被除去为止。然后剪成直径为 2—3 厘米大小的碎块。

(二) 人羊膜质量的指标 为了选择适宜的人羊膜进行消化, 提高细胞培养成功机会, 在消化前, 从羊膜不同部位剪下两小块, 作低倍镜检查。其质量指标曾参考曾毅等<sup>[5]</sup>报告, 并辅以肉眼观察, 列于表 1。

表 1 人羊膜组织质量指标

人羊膜质量	“++++”	“+++”	“++”	“+”
肉眼观察	羊膜洁白, 薄而韧, 粘液少	羊膜灰白或略带黄色, 稍厚, 粘液中等	羊膜微黄, 厚薄不一, 粘液多	羊膜淡黄或黄绿色, 厚薄不一, 粘液多
低倍镜下观察	细胞圆而小, 立体感强, 胞浆透明, 无颗粒	细胞圆, 中等大小, 有立体感, 胞浆内有少许颗粒	细胞大而呈多角形, 扁平, 缺乏立体感, 有细胞融合现象, 胞浆内颗粒多	细胞间无明显界限, 可分辨的细胞很大, 胞浆内颗粒很多, 有成团的细胞脱落现象

(三) 人血清 取自本院附属医院血库, 多数为 2—4 个输血者混合血清。血清经 56°C, 30 分钟灭活。保存于 -20°C 条件下。用前再经 56°C, 10 分钟灭活。

(四) Hanks 10 倍浓缩溶液 系按傅杰青译文<sup>[7]</sup>配制。用时作 10 倍稀释。

(五) 0.5% 水解乳蛋白、0.5% 胰蛋白酶(Difco)及抗菌素(每毫升内含青霉素 1 万单位, 链霉素 1 万微克)等 系按病毒实验诊断手册<sup>[6]</sup>配制并保存。胰蛋白酶于使用时, 以 Hanks 溶液稀释成 0.25%。

(六) Eagle 氏综合培养液 系按 Eagle 氏原法配制保存<sup>[8]</sup>。临用前混合稀释, 经玻璃滤器或蔡氏滤器过滤除菌, 保存在 4°C 条件下备用。在最初使用时, 培养液 pH 过高, 故在以后配制时, 将 NaHCO<sub>3</sub> 的含量减少一半。

(七) 人羊膜细胞培养液 第一号培养液(以下简称 AM<sub>1</sub> 培养液): 其成分为含有人血清 20% 及

\* 本文承于本崇教授指正; 在获得人羊膜方面得到本院妇产科分娩室和妇幼保健院分娩室同志们的帮助, 特此致谢。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

抗菌素 1% 的 0.5% 水解乳蛋白溶液, pH 7.4。第二号培养液 (以下简称 AM<sub>2</sub> 培养液): 内含人血清 15%、Eagle 氏综合培养液、0.5% 水解乳蛋白溶液各 42% 及抗菌素 1%, pH 7.4。

(八) 消化方法 第一法 (短时多次消化法): 取剪碎的羊膜 5—20 克不等。按每克羊膜加入 2 毫升的 0.25% 胰蛋白酶, 用 2.8% NaHCO<sub>3</sub> 调节至 pH 7.6, 加入抗菌素 1%。在 37°C 水浴中静置 30 分钟, 在电磁搅拌器上搅动消化 3—5 分钟。弃去消化液, 另换等量 0.25% 胰蛋白酶, 在 37°C 水浴中静置 30 分钟, 然后搅拌 10 分钟, 用 4 层纱布过滤, 以等量未调节 pH 的 Hanks 溶液稀释滤液。用 1000 r.p.m. 速度沉淀 10 分钟, 再用 pH 7.4 Hanks 溶液洗滌沉淀一次。将沉淀用适量培养液稀释, 置 37°C 水浴中保存。将经过一次消化的羊膜重新置于含有同量 0.25% 胰蛋白酶中, 按上法重复进行消化与操作, 直至羊膜上细胞全部脱落为止。一般消化 4—5 次, 少数 7 次, 才能使细胞完全脱落。将每次消化所获细胞混合在一起。

第二法: 取剪碎的羊膜 5—20 克不等。每克羊膜加入 3 毫升的 0.25% 胰蛋白酶。正式消化前的处理办法同第一法, 另换同量胰蛋白酶, 在 37°C 水浴中一次消化 3 小时。消化过程中, 每隔 50 分钟搅拌 10 分钟, 如是共 3 次。以后的处理方法与第一法同。

第三法: 全部处理过程同第二法, 只是正式的消化时间为 1 次, 4—5 小时。

将所获细胞悬液计数, 用培养液稀释为每毫升含 40—50 万细胞, 接种于链霉素小瓶内, 每瓶 0.6—0.8 毫升。在 37°C 温箱中静置培养。于 24—48 小时中观察细胞粘管情况。粘管的细胞, 在 2—3 日内换以新配制的培养液。每天观察细胞生长情况。

## 结 果

(一) 不同消化方法与获得细胞数的关系 用第一法与第二法消化不同质量的人羊膜共 35 次, 发现第一法所获得的细胞数比第二法的多。实验结果见表 2。

表 2 用第一法及第二法消化人羊膜所获细胞数

消化方法	羊膜质量	实验次数	细胞总数 (万)	羊膜总重量 (克)	平均每克羊膜细胞数 (万)
第一法	“+++”	3	11,740	50	213
	“++”	15	48,265	210	230
	“+”	6	14,635	79	185
	合 计	24	74,640	339	220*
第二法	“+++”	7	9,020	120	70
	“++”	4	3,805	47	81
	合 计	11	12,825	167	76*

\* 合计项内的“平均每克羊膜细胞数(万)”, 是用合计项内的“细胞总数(万)”除以合计项内的“羊膜总重量(克)”。

由表 2 可见, 羊膜质量虽有不同, 用同一种方法进行消化, 所获得的细胞数 (按平均每克羊膜计算) 无明显差异; 但用不同的消化方法, 则有明显的差异。用第一法消化所获细胞数约为第二法的 3 倍。说明用第二法消化时, 大部分细胞并未完全脱落。

取质量均为“+++”的同一人羊膜, 同时用第一法及第三法进行消化。两种方法所获细胞均用 AM<sub>2</sub> 培养液培养。共进行过 5 次试验, 结果见表 3。

由表 3 可见, 用第一法及第三法消化同一质量的羊膜, 平均每克羊膜所获细胞数无明显差异, 且二者所获细胞形成单层所需时间也相同。

(二) 不同营养液与羊膜细胞生长繁殖的关系 用 AM<sub>1</sub> 及 AM<sub>2</sub> 培养液培养不同质量

表3 用第一法及第三法消化人羊膜所获细胞数

实验批次	第一法			第二法		
	细胞数(万)/羊膜重量(克)	平均每克羊膜细胞数(万)	细胞形成单层时间(天)	细胞数(万)/羊膜重量(克)	平均每克羊膜细胞数(万)	细胞形成单层时间(天)
49	6,000/12	500	4.5	3,200/7	460	5.0
50	450/8	56	4.5	675/8	84	4.5
51	1,280/6	213	4.0	960/6	160	4.5
52	4,010/13	308	4.5	3,325/7	475	4.5
53	1,900/7	271	3.5	1,200/5	240	3.5
合计	13,640/46	296*	4.2	9,360/33	283*	4.4

\* 合计项内的“平均每克羊膜细胞数(万)”为合计项内“细胞数(万)/羊膜重量(克)”的商数。

的人羊膜细胞, 细胞形成单层所需时间见表4。

表4 用 AM<sub>1</sub> 及 AM<sub>2</sub> 培养液培养不同质量人羊膜细胞形成单层所需时间

AM <sub>1</sub> 培养液				AM <sub>2</sub> 培养液					
羊膜质量				羊膜质量					
“+++”		“+++”		“+++”		“+++”		“++”	
实验批次	细胞形成单层天数	实验批次	细胞形成单层天数	实验批次	细胞形成单层天数	实验批次	细胞形成单层天数	实验批次	细胞形成单层天数
21	6	1	6	41	3.5	30	4	44	7
23	5	5	6	42	3.5	31	3.5	47	3
		10	4			34	4	48	4
		22	7			38	5		
		38	7			39	3.5		
		45	3			45	4.5		
						46	3.5		
						49	4.0		
平均天数	5.5		5.5		3.5		4.0		4.7

由表4可看出, 在使用 AM<sub>2</sub> 培养液培养人羊膜细胞时, 无论人羊膜质量如何, 均较用 AM<sub>1</sub> 培养液培养相同质量羊膜为佳。细胞出现单层平均可提前1—2天。同时观察到, 在用 AM<sub>2</sub> 液作培养液时, 羊膜质量越好, 细胞形成单层所需时间也越短。

(三) 羊膜质量与培养成功率的关系 我们曾取不同质量的人羊膜, 用 AM<sub>1</sub> 及 AM<sub>2</sub> 培养液进行培养。以多数管能形成单层作为培养成功的指标。共进行了80余次培养。除因污染、资料登记不全及仪器事故等未计算外, 培养成功率的统计列于表5。

表5 用 AM<sub>1</sub> 及 AM<sub>2</sub> 培养液培养不同质量人羊膜细胞的培养成功率

羊膜质量	“+++”	“+++”	“++”	合计
AM <sub>1</sub>	2/2*	9/13	1/6	12/21 (57.1%)
AM <sub>2</sub>	3/3	26/28	10/13	39/44 (88.6%)

\* 分母代表实验次数, 分子代表成功次数。

表 5 說明：羊膜細胞培养成功的机会，首先与其質量有明显的关系，羊膜質量越好，培养成功的机会越大；其次，在使用不同培养液培养羊膜細胞时，除質量为“+++”的羊膜无差异外，其他相同質量的人羊膜細胞，用 AM<sub>2</sub> 培养液較用 AM<sub>1</sub> 培养液更易成功。AM<sub>2</sub> 培养液的总成功率为 88.6% (39/44)，AM<sub>1</sub> 培养液則仅为 57.1% (12/21)。

(四) 人羊膜組織的觀察与統計 人羊膜組織質量的統計材料，曾見于曾毅等氏<sup>[5]</sup>的报告。現將我們对 40 份分娩后 8 小时以內的未加选择的人羊膜检查結果列于表 6。

表 6 40 份人羊膜組織質量統計

羊膜質量	“+++”	“++”	“+”	“+”
份 数	0	15	17	8
百分比(%)	0	37.5	42.5	20

由表 6 可見，實驗室检查 40 份分娩后 8 小时以內的人羊膜組織，其質量“+++”、“++”、“+”分別为 15(37.5%)、17(42.5%) 及 8(20%) 份。以質量为“++”的羊膜最多；質量为“++”及“+++”的羊膜占总数的 80%。根据表 5，用 AM<sub>2</sub> 培养液培养人羊膜細胞的結果，可以認為約 80% 的人羊膜可用于細胞培养。

## 討 論

在許多培养人羊膜細胞的报导中<sup>[1-6]</sup>，羊膜的消化方法与消化时间的关系頗不一致。为了寻找最适宜的技术措施，以获得大量有活力的細胞，作者等初步探討了 3 种消化人羊膜的方法。用多次短时消化法，即第一法，虽可获得大量的生活細胞，但操作过程过繁，并增加了污染的机会。考虑到多次短时消化的总时数約为 4 小时，而胰蛋白酶对細胞的生活力并无明显的影响，故又試驗了一次 4—5 小时的消化法，即第三法。初步实验結果表明，此法消化人羊膜細胞是合宜的。

在培养人羊膜細胞时，国内多用含 20% 血清的水解乳蛋白液<sup>[5,6]</sup>，即本文中的 AM<sub>1</sub> 液；国外所用种类較多<sup>[1-4]</sup>。作者等在使用 AM<sub>1</sub> 液的相当长时间里，发现細胞在两天半左右才开始分裂，形成单层需时 5—6 天。再者，培养两天后，营养液的 pH 就下降至 7.0 以下。后来，又曾改用含血清的 Eagle 氏綜合营养液，但 pH 又过高。故采用了 AM<sub>2</sub> 液。半年多来，在改用 AM<sub>2</sub> 液培养时，細胞粘管后短时期內就变大，呈多角形，一般在一天半左右就开始分裂。約 4 天就形成单层，pH 保持在 7.0 以上可达 4 日之久。用 AM<sub>2</sub> 营养液培养的单层細胞換維持液后（維持液为：在 1:2 的 Eagle 氏液与 0.5% 水解乳蛋白的混合液中，加入 1% 抗菌素及 2% 牛血清），維持液的 pH 保持在 7.0 以上的時間，也超过 4 日。至于这一营养液何以有較多的优点，則有待今后探討。

国外报导<sup>[2,4]</sup>，人羊膜培养成功率較高，一般在 70—80% 左右；国内报告<sup>[5]</sup> 認為，羊膜如不加选择地使用，往往不易成功；因而建議用質量好的羊膜。我們的初步实验結果表明，在使用 AM<sub>2</sub> 培养液时，人羊膜的培养成功率与国内資料相似，但若改用 AM<sub>2</sub> 培养液时，不但質量为“+++”的羊膜的培养成功率可达 93%，即使質量为“++”的羊膜，也有 77% 可以培养成功。自然，由于試驗次数还不够多，还不能完全排除抽样誤差，但現有資料的

試驗表明, AM<sub>1</sub> 与 AM<sub>2</sub> 培养液的培养成功率的差异是显著的,  $p < 0.01$ 。因而我們认为仍有一定的可靠性。至少应该想到, 人羊膜培养成功率除与羊膜本身质量有关外, 还可能与培养液的选择有一定的关系。我們初步认为, 在使用 AM<sub>2</sub> 培养液时, 质量为“++”的人羊膜也可采用。

## 結 論

用多次短时消化人羊膜細胞, 較一次 3 小时消化法可以获得多 2 倍的細胞数。若将一次消化的時間延长至 4—5 小时, 所获得的細胞数可大大增加, 而不影响細胞的生活能力, 与多次短时消化法所获得的細胞相似。这样就克服了多次短时消化法的操作过程繁杂与易于污染的缺点。

用 AM<sub>2</sub> 培养液培养人羊膜細胞較一般常用的 AM<sub>1</sub> 培养液为佳。可以在較短的時間內形成单层, 也可以提高人羊膜細胞培养的成功机会; 再者, 由于质量为“++”的羊膜就可采用, 因而增加了可供使用的人羊膜数。

## 参 考 文 献

- [1] Zitcer, F. M. et al.: *Science*, **122**: 30, 1955.
- [2] Dunebacke, T. H. and Zitcer, E. M.: *Cancer Res.*, **17**:1043, 1957.
- [3] Takemoto, K. K. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**: 179, 1957.
- [4] Weinstein, et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**: 535, 1956.
- [5] 曾毅, 毛江森: *微生物学报*, **9**(1): 48, 1963.
- [6] 北京协和医院检验科: *病毒实验诊断手册*, 人民卫生出版社, 1960.
- [7] 傅杰青译: 苏联医学科学院脊髓灰质炎研究所, 利用人的成纤维细胞培养物作脊髓灰质炎实验室诊断的暂行条例。中华人民共和国卫生部卫生防疫司, 1957.
- [8] Eagle, H.: *Science*, **122**: 501—504, 1955.

## AN INVESTIGATION ON THE CULTIVATION OF THE HUMAN AMNIOTIC MONOLAYER CELLS

TUNG HSI-CHANG, CHU CHIN-KAN, HSIAO SHUN-HWA AND LI TEH-SHAO

(*Department of Microbiology, Kueiyang Medical College, Kueiyang*)

Although there have been many different methods on the cultivation of human amniotic cells, it seems that certain technical points have still to be reassessed. In this paper, the authors endeavor to put forward their own criteria for selecting the human amniotic membranes and to investigate the procedures for membrane digestion and the selection of culture media.

1. Procedure for digestion: 1 hr. or short interval repeated digestion (method 1), 3-hrs. continuous digestion (method 2) and 4—5-hrs. prolonged digestion (method 3) have been compared. Digestion was carried out with 0.25% trypsin (Difco) solution in a water bath at 37°C.

2. Culture media: The authors used a medium consisting of 0.5% lactalbumin hydrolysate solution with 20% human serum (AM<sub>1</sub>) and another of 1:1 Eagle's medium and 0.5% lactalbumin solution with 15% human serum (AM<sub>2</sub>). They found that the nutritional value of these two media was different.

3. The criteria for the quality of the amniotic membranes: Besides the criteria put forth by Tseng-yi et al., the authors also used macroscopic descriptions of the membranes as an added criterion for the determination of the usefulness of the membranes.

When the membranes of different quality were subjected to digestion by method 1 and 2, the average number of cell yields per gram of membrane in repeated trials were 2.2 millions and 0.76 million respectively. But the average number of the cell yields per gram of the membranes of different quality was almost the same, no matter which one of the methods mentioned above was used. In another five trials, method 1 and 3 were used to digest five membranes of “+++” grade simultaneously. The average number of cell yields by either one of these two methods was quite similar, i.e. 2.96 millions and 2.83 millions per gram respectively. If the cells obtained by either method 1 or 3 were cultivated in AM<sub>2</sub> medium, the monolayer of cells would usually develop within 4 days. The authors, therefore concluded that method 3 was the most applicable one, because it would yield sufficient amount of useful cells. Besides, the procedure of digestion was comparatively simple and the chances of contamination were also relatively reduced.

When AM<sub>2</sub> was used as a culture medium, it was definitely superior to AM<sub>1</sub>, because the monolayer of cells would grow out in a confluent sheet within 4 days and the pH of the culture could be maintained at 7.0—7.4 for more than 4 days. Moreover, the ratios of successful cultivation of the amniotic cells from membranes of “+++” and “++” grades in AM<sub>2</sub> were 26/28 (93%) and 10/13 (77%) respectively.

40 specimens of amniotic membranes were picked at random within 8 hrs. after their expulsion and graded according to the authors' own criteria. It was found that more than 80% of the membranes examined belonged to “+++” or the better grades. This finding suggested that 80% of the amniotic membranes could be used for cell culture, in case that AM<sub>2</sub> was the medium employed.