

美罗培南挽救细胞培养中受细菌污染的人包皮成纤维细胞的研究

梁 锐¹⁾, 王志强²⁾, 李文亮²⁾, 黄 鉴²⁾, 黄 芩³⁾, 韦 焘³⁾

(1) 云南省第一人民医院病理科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学第一附属医院肿瘤科, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 研究美罗培南挽救细菌污染的人包皮成纤维细胞 (hFFs) 的效果, 并对成功挽救的 hFFs 的形状及增殖能力进行研究. **方法** 将 14 批在培养中已发生细菌污染的 hFFs 随机分为美罗培南组和双抗组, 分别用美罗培南法和双抗法对发生细菌污染的 hFFs 进行挽救. 倒置显微镜下观察获得挽救的 hFFs 的细胞形态, 测定细胞生长曲线. **结果** 美罗培南组成功挽救了 6 批受细菌污染的 hFFs, 双抗组仅成功挽救了 1 批细胞. 挽救成功的 hFFs 的细胞形态和增殖能力无明显改变. **结论** 美罗培南可以有效消除 hFFs 的细菌污染, 对 hFFs 细胞形态和增殖特性没有影响, 为珍贵细胞污染提供了参考.

[关键词] 人包皮成纤维细胞; 细胞培养; 细菌污染; 美罗培南

[中图分类号] Q813.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 04 - 0020 - 03

Rescuing Human Foreskin Fibroblasts Contaminated by Bacteria in Cell Culture with Meropenem

LIANG Rui¹⁾, WANG Zhi - qiang²⁾, LI Wen - liang²⁾, HUANG Jian²⁾, HUANG Qin³⁾, WEI Tao³⁾

(1) Dept. of Pathology, the First people's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Oncology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of meropenem in rescuing human foreskin fibroblasts (hFFs) contaminated by bacteria and observe the morphous and proliferative ability of hFFs after rescued successfully. **Methods** 14 batches of hFFs contaminated by bacteria were randomly divided into meropenem group and double antibiotics group. hFFs contaminated by bacteria were rescued with meropenem and double antibiotics method respectively. Morphology of hFFs after rescued successfully were observed with inverted microscope and proliferative ability was detected by growth curve. **Results** 6 batches of bacterial contamination in meropenem group were eliminated. 1 batch of bacterial contamination in double antibiotics group was eliminated. Morphology and proliferative ability of hFFs after rescued successfully had no obviously change. **Conclusion** Meropenem can eliminate bacterial contaminations of hFFs. There is no influence on morphology and proliferative ability of hFFs and it will provide the reference for saving the precious cell contaminated by bacteria.

[Key words] Human foreskin fibroblasts; Cell culture; Bacterial contaminations; Meropenem

细菌污染在细胞培养过程中是不可避免的, 一旦细菌污染未能及时发现并进行有效处理, 受到污染的细胞最终会发生死亡. 普通细胞的细菌污染对实验进程影响较小, 而对于异常珍稀的细

胞来讲, 细胞死亡意味着实验的暂停或终止, 因此, 研究者常常需要想尽各种方法来挽救细胞, 其中抗生素法是最有效的方法^[1].

本研究以传统的实验室常用的双抗方法作为

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2009CD085)

[作者简介] 梁锐 (1978~), 女, 河南平顶山市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理和干细胞的研究工作.

[通讯作者] 黄芩. E-mail: huangqin_ph@126.com

对照, 采用美罗培南对本实验室原代培养的第10代受污染的人包皮成纤维细胞 (human foreskin fibroblasts, hFFs) 进行处理^[2], 比较两方法挽救受细菌污染细胞的能力, 并对挽救成功的细胞的生物学特性进行初步探索, 以寻找一种有效的能够挽救细菌污染细胞的抗生素处理方法。

1 材料与方法

1.1 材料

hFFs 由本实验室原代培养, DMEM 高糖培养基和 D-PBS 缓冲液购于美国 Hyclone 公司; 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液、特级胎牛血清和青链霉素溶液购于美国 Bioind 公司; 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 溶液和 MEM 非必需氨基酸购于美国 Gibco 公司; 美罗培南购于浙江海正药业公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 收集受细菌污染的 hFFs 共 14 批, 随机分为双抗组和美罗培南组, 每组 7 批细胞, 两组细胞处理方法如下, 吸除受污染的细胞培养基, 分别加入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南或双抗的 D-PBS 5 mL 洗涤 hFFs 细胞 2 次; 加入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南或双抗的完全培养基 5 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 弃取培养基, 再加入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南或双抗的完全培养基 5 mL, 置培养箱培养过夜。每天倒置显微镜下观察 hFF 生长状态, 每日更换含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南或双抗的完全培养液, 共 3 d。

1.2.2 hFFs 细胞培养条件 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 含有 5% CO_2 的培养箱中、饱和湿度条件下, 完全培养基中培养 (15% 胎牛血清, 1% MEM 非必需氨基酸, 1% 青链霉素溶液, 83% 高糖 DMEM 培养基)。

1.2.3 细胞形态的观察 以未受细菌污染的 hFFs 作为对照, 倒置显微镜下观察经过挽救的 hFFs 形态。

1.2.4 细胞生长曲线的测定 以未受细菌污染的 hFFs 作为对照, 测定经过挽救的 hFFs 生长曲线。将处于对数生长期的 hFFs 消化稀释, 调节细胞浓度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 24 孔培养板, 每孔接种 1 mL, 细胞培养箱内培养, 每隔 24 h 收集 3 孔细胞并计数, 取平均值, 连续计数 7 d 后绘制生长曲线。

1.2.5 细菌污染的检测 将受细菌污染的培养基进一步鉴定, 以明确细菌的种类。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 软件进行数据处理, 计数资料进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 挽救结果

美罗培南组成功挽救了 6 批受细菌污染的 hFFs, 其中杆菌 4 批, 球菌 2 批, 挽救失败的 1 批细胞为真菌。双抗组仅成功挽救了 1 批细胞, 为杆菌, 挽救失败的细胞中杆菌 3 批, 球菌 2 批, 真菌 1 批。美罗培南组挽救细菌污染细胞的成功率显著高于双抗组 ($\chi^2 = 7.14$, $P = 0.008$)。

2.2 细胞形态

挽救成功的 hFFs 细胞形态呈长梭形, 无明显改变 (图 1)。

2.3 细胞生长曲线测定

对照 hFFs 和经过挽救的 hFFs 的增殖能力均强, 倍增时间短, 生长曲线中 (图 2) 见一段时间内细胞数量与时间呈正相关。对照 hFFs 和经过挽救的 hFFs 的增殖能力均未见显著差异 ($P > 0.05$)。



图 1 挽救成功的 hFFs

Fig. 1 hFFs after rescued successfully

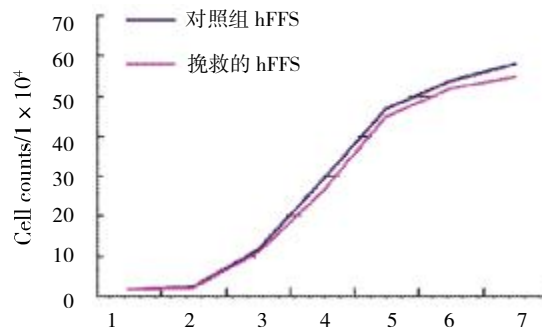


图 2 hFFs 生长曲线

Fig. 2 Growth curve of hFFs

3 讨论

一些研究表明^[9]应该根据细菌培养及药敏结果选择抗生素进行挽救,但细胞从发生细菌污染到细胞出现无法挽救的死亡的时间短暂,留给研究者对细胞进行挽救的时间窗口较短,多为 1~2 d,而药敏鉴定常需要 2~3 d 的时间,当得到鉴定结果时细胞往往已经死亡。因此,应该在发现细菌污染时早期应用广谱抗生素处理,通过对细胞可能感染的细菌的广覆盖以达到挽救的最佳效果。但是采用联合用药还是单独用药目前尚存在争议,相关研究表明抗生素会对被挽救的细胞的生物学特性产生影响^[9],因此联合应用 2 种或多种抗生素有增加被挽救细胞生物学特性改变的风险。

为了实现对 hFFs 可能感染的细菌的广覆盖,本研究选择了广谱抗生素美罗培南单药对 hFFs 进行挽救,美罗培南为人工合成的碳青霉烯类抗生素,通过抑制细菌细胞壁的合成而产生抗菌作用,对大多数革兰阳性、阴性需氧菌、厌氧菌及多重耐药菌均有较强的抗菌活性,在临床中已经成为治疗严重细菌感染最主要的抗菌药物之一。研究结果表明,美罗培南组除一批真菌污染的细胞未能挽救外,其余均挽救成功,而对照组仅成功挽救 1 批细胞,美罗培南的挽救成功率显著高于对照组。江千里^[9]等使用亚胺培南对受细菌污染的细胞进行了挽救,同样取得了较好的疗效。本研究为细胞培养过程中受细菌污染细胞的处理提供了可靠的方案和依据。

虽然美罗培南在挽救受细菌污染的细胞过程中表现出了极大的优势,但经过挽救的细胞的生物学特性如细胞增殖能力、细胞形状等,是否会发生改

变是挽救成功后研究者所关注的关键点,本研究尝试对成功挽救的 hFFs 的形状及增殖能力进行了检测,测定了 hFFs 细胞的生长曲线,结果发现经过挽救的 hFFs 形态未发生明显改变,仍能保持较强的增殖能力,与对照组 hFFs 无统计学差异,表明美罗培南在细胞的挽救过程中对受污染细胞的形态和增殖能力没有影响。

从两组对 hFFs 挽救的结果中也可以看出,由于美罗培南抗菌谱未能覆盖真菌,因此当细胞发生真菌感染时,美罗培南无法挽救,需要寻找更加行之有效的方法对抗真菌的感染^[9],但抗真菌药物对挽救细胞的生物学特性是否存在影响,仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 鄂征. 组织培养技术及其在医学研究中的应用[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004:123-124.
- [2] 王志强,梁锐,陈明清,等. 胰蛋白酶消化法和组织块法原代培养人包皮成纤维细胞的比较[J]. 生命科学,2012,16(3):242-247.
- [3] 王鸿,张伟,孟娜. 细胞培养中珍贵贴壁细胞污染挽救方法的评价[J]. 首都医科大学学报,2011,32(1):129-134.
- [4] LANGDON S P. Cell culture contamination:an overview [J]. Methods Mol Med,2004,88:309-317.
- [5] 江千里,王健民,江汕,等. 西司他丁钠+亚胺培南消除细胞培养中细菌污染的研究[J]. 第二军医大学学报,2004,25(1):114-115.
- [6] 邵荣标,钱勤虎,吴巨飞,等. 细胞培养法真菌污染控制初探[J]. 南通医学院学报,2002,22(3):278-280.
(2013-02-19 收稿)