

细胞悬液“十”字轨迹运动促进细胞均匀分布的研究

唐月连^{1,2}, 陈权^{1,3}, 李晓毅^{1,2}, 王颖⁴, 陈鸿鹏^{1,3}, 刘肖雨^{1,4}, 赵威^{1,5}, 刘玉婷^{1,6}, 陈艺琳^{1,4}, 刘新光^{1,7,8}, 孙雪荣^{1,7*} (广东医科大学 1. 东莞科研中心衰老研究所, 2. 医学检验学院, 3. 信息工程学院, 4. 第二临床医学院, 5. 药学院, 6. 基础医学院, 7. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 8. 生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘要: 目的 观察细胞悬液“十”字轨迹运动对细胞均匀分布的影响。方法 采用不规则摇动法、椭圆形摇动法及“十”字轨迹摇动法等3种不同方法, 对种板后黑色素瘤A375细胞进行处理, 分别观察不同摇动方式对细胞分布的影响。结果 相比不规则运动和椭圆形运动, “十”字轨迹的摇动方式能使细胞分布更加均匀。结论 “十”字轨迹运动方式有助于细胞均匀分布, 为细胞种板提供了便利。

关键词: 细胞培养; 细胞传代; 细胞分布; 运动轨迹; 生物摇床

中图分类号: Q 81

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2019)06-0623-04

Study on uniform cell distribution promoted by crisscross movement of cell suspension

TANG Yue-lian^{1,2}, CHEN Quan^{1,3}, LI Xiao-yi^{1,2}, WANG Ying⁴, CHEN Hong-peng^{1,3}, LIU Xiao-yu^{1,4}, ZHAO Wei^{1,5}, LIU Yu-ting^{1,6}, CHEN Yi-lin^{1,5}, LIU Xin-guang^{1,7,8}, SUN Xue-rong^{1,7,*} (1.Institute of Aging Research, Dongguan Scientific Research Center; 2.School of Laboratory Medicine; 3.School of Information Engineering; 4.The Second Clinical School; 5.School of Pharmacy; 6.School of Basic Medicine; 7.Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Guangdong Medical University, Guangdong 523808, China; 8.Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To observe the effect of the crisscross movement of cell suspension on the uniform cell distribution. Methods Three different methods including irregular shaking method, elliptic shaking method and crisscross shaking method were used to treat melanoma A375 cells. The effect of different shaking methods on the cell distribution was observed respectively. Results The results showed that the crisscross movement of cell suspension can make the cells more uniformly distributed compared with irregular or elliptical movement. Conclusion The crisscross movement provided in this study is a better choice to promote uniform cell distribution and thus facilitate cell passage.

Key words: cell culture; cell passage; cell distribution; movement trail; biological shaker

在贴壁细胞体外培养的过程中, 经常需要进行传代^[1-2]。在传代过程中, 细胞悬液种板后, 细胞贴壁和分布是否均匀, 是影响细胞功能及后续实验的重要因素^[3-5], 如何使细胞分布均匀是至关重要的问题。由于目前缺乏统一且标准化的细胞均匀分布的方法或仪器, 科研人员大多通过手工或生物摇床对

培养板等进行摇动, 以达到细胞均匀分布, 但是每个人的操作手法不一样, 摆床的参数也各不相同, 效果也参差不齐。哪种摇动方式更容易使细胞均匀分布? 目前尚未见研究报道。我们在实验中发现, 使液体在垂直方向做相对运动, 即“十”字轨迹运动, 能使细胞分布较好。因此, 为了比较不同摇动

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(No.2017A030307034), 广东省扬帆计划“引进紧缺拔尖人才”项目(No.4YF16001G), 广东医科大学成果转化项目培育(No.4SG19053G), 大学生创新创业训练计划项目(No.201810571033, No.201810571013), 广东大学生科技创新培育专项资金(No.pdjhb0227), 广东医科大学创新实验项目(No.ZZDS003, ZYDC001)

收稿日期: 2019-09-14; **修订日期:** 2019-10-07

作者简介: 唐月连(1997-), 女, 在读本科

通信作者: 孙雪荣(1974-), 男, 博士, 副教授, E-mail:xuerongsun@126.com

方式对细胞分布的影响，本文通过手工或摇床对种板后的细胞悬液进行摇动，比较并筛选出能使细胞均匀分布的摇动方式，为科研工作者做细胞传代提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

胎牛血清；DMEM生长液；黑色素瘤A375细胞购自中国科学院上海细胞库；胰酶；12孔板；100 mm培养皿；普通生物摇床(WD-9405D)购自北京六一生物科技有限公司；倒置相差显微镜(TS100, Nikon)。

1.2 方法

1.2.1 细胞传代和种板 用含10%胎牛血清的DMEM生长液培养黑色素瘤A375细胞(中国科学院上海细胞库)，待细胞生长至约80%融合后，经胰酶消化和生长液中和后，离心去上清，再用生长液重悬。分别取含 5×10^4 和 5×10^5 细胞重悬液，种板于12孔板或100 mm培养皿中，用不同的摇动方式混匀细胞后，置于37 °C，饱和湿度的培养箱中进行培养，24 h后在倒置相差显微镜(TS100, Nikon)下观察和拍照。

1.2.2 细胞悬液的摇动方式 细胞悬液种板后，采用不同的摇动方式混匀细胞，然后置于培养箱中培养，每个实验至少重复3次。本研究采用了3种不同的摇动方式：(1)不规则摇动，细胞种板后，不做特殊处理，简单摇晃后置入培养箱中；(2)生物摇床摇动，将培养板置于普通生物摇床上(WD-9405D, 北京六一生物科技有限公司)，在水平面做椭圆形运动，30~40 r/min，摇动约1 min后，置于培养箱中培养；(3)“十”字交叉摇动方式，根据培养板或培养皿大小不同，采用两种不同的摇动手法，使细胞悬液呈“十”字轨迹运动。针对面积小的12孔板，在水平面做前后、左右方向“十”字运动，先左右运动10个来回，再在垂直方向10个来回，依此交替，时间约1 min，针对面积较大的100 mm培养板，分别以水平面X轴和Y轴为枢纽，进行前后、左右的“跷跷板”式摇动，使液体呈垂直交叉运动，每个方向来回摇动10次左右，并交替进行，时间约1 min。

2 结果

不规则、椭圆形及“十”字轨迹摇动方式对细胞分布的影响如下：

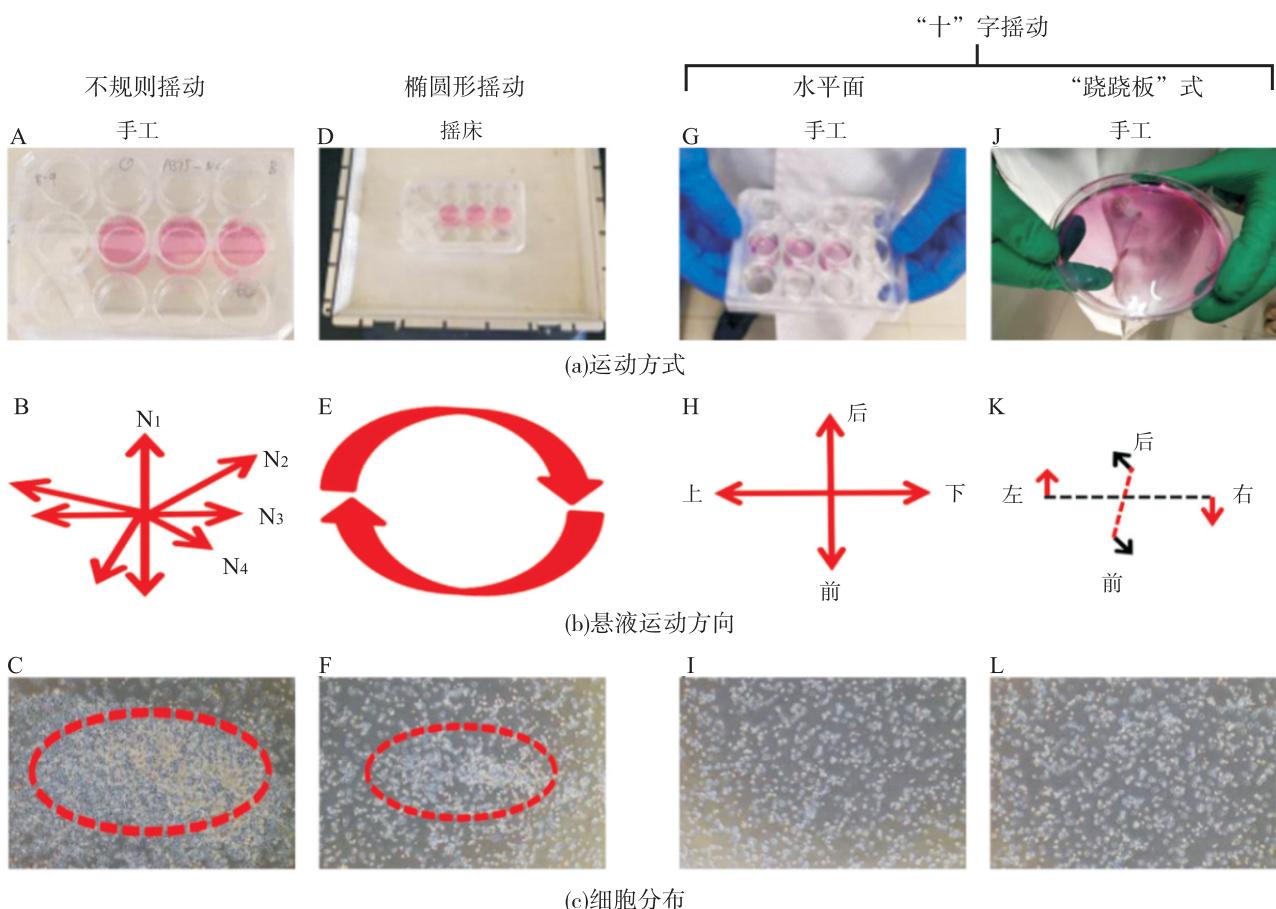
(1)不规则摇动：研究发现，将A375细胞悬液种于12孔板后，进行简单的不规则摇动，然后置于培养箱中，可见细胞分布明显不均匀，中间区域细胞密集，甚至重叠，出现细胞因营养不足脱落死亡；而周边区域细胞分布较稀疏，虽营养充足但细胞相互交联少出现轮廓不清，生长速度缓慢等不良状态(图1A~1C)。

(2)椭圆形摇动：将含细胞悬液的12孔板用生物摇床在水平面上进行椭圆形摇动后，再进行培养，结果发现，其细胞分布相对于不规则摇动更加均匀，但培养孔中央区域仍有一定的细胞聚集区，亦使聚集区细胞脱落死亡(图1D~1F)。

(3)“十”字轨迹摇动：根据培养板、皿的大小不同，我们采用了不同的摇动方式，使培养悬液呈“十”字交叉运动。对于直径小于或等于60 mm的培养皿，或普通细胞培养板(6孔板、12孔板)等，可采用水平面的“十”字轨迹运动方式，即细胞种板后，用手工操作对培养皿/板进行水平面的“十”字轨迹运动，交替在前后和左右方向进行来回运动(图1G, H)，然后放入培养箱培养。本研究以12孔板为例进行测试，结果发现，与不规则摇动和椭圆形摇动方式相比，“十”字轨迹运动可使细胞分布更加均匀(见图I)。而对于直径大于100 mm的培养皿，水平面的“十”字轨迹运动容易使液体溢出，为此，我们用了“跷跷板”式的“十”字摇动方式，即以手工方式将培养皿分别以X轴和Y轴为支点，进行前后、左右摇动(图J, K)，这种运动方式相对温和，液体不容易溢出。我们用100 mm培养皿进行了测试，发现种板后细胞分布均匀，细胞轮廓清晰，效果与水平面的“十”字轨迹运动类似(图L)。

3 讨论

在贴壁细胞传代培养过程中，不仅需要将细胞重悬并转移至新的培养板、皿或瓶中(简称为种板)，还需摇动生长液使细胞均匀分布。细胞贴壁后如分布不均匀，会对后续实验造成困扰。如果细胞分布不均匀，会造成细胞在培养基中获得营养成分多寡不同，且繁殖速度也不一样。种板太密的地方，细胞获取营养成分困难，并出现接触抑制，从而限制了生长；细胞太稀的地方，因细胞之间“交流”减少，生长速度也可能减慢；而密度适中的地方，细胞状态和生长速度均较佳，且均一性好。参差不齐的细胞密度和生长方式，对后续实验影响较大，因此，如何使细胞分布均匀，是不少实验工作者经常



A-C: 不规则摇动；D-F: 椭圆形摇动；G-I: “十”字运动；J-L: 对于大培养皿(直径100 mm), “跷跷板”联合“十”字运动, 红色和黑色虚线为固定的运动枢纽(K)。图中箭头代表培养器皿或液体的运动方向, 红色虚线圈为细胞密集区域, 图中标尺为100 μm(C)。

图1 不同摇动方式对细胞分布的影响细胞分布的影响

遇到的难题。

为了使细胞均匀分布,许多科研工作者用手工摇动的方式混匀细胞悬液,但操作方式因人而异,效果良莠不齐,究竟哪种摇动方式比较好,尚未见报道。有些实验室则使用生物摇床对种板的细胞进行混匀,摇床的运动方式大多为水平椭圆形、圆周式摆动、左右摆动或不规则震动等,形状大小功率等参数各不相同,某些摇床虽然可用于混匀细胞悬液,但参数不容易掌握,且效果不大稳定。目前专业用于细胞种板的摇床很少见,更多的摇床是用于悬浮细胞的培养和震荡^[6]。

本实验表明,不规则摇动容易使细胞出现分布不均,密集区域细胞因营养不足,生长空间受限,出现细胞死亡脱落,而稀疏区域细胞虽营养空间充足,但因缺乏细胞间相互作用而出现生长缓慢等表现;而椭圆形摇动种板细胞生长情况较不摇动方式好,其产生的分布密度差异相对较小,但仍有部分细胞分布不均匀。相较于前面两种方式,“十”字

轨迹运动可发挥有效混匀细胞的作用,培养后细胞分布均匀,形态轮廓清晰,生长状态良好。

针对不同大小的培养皿/板,采用了不同的“十”字摇动方式。其中水平面“十”字轨迹摇动方式使用较多,这种运动方式的作用力较大,液体移动速度也较快,适合于直径较小的培养板/皿,如6孔板、12孔板及35 mm、60 mm培养皿等,因这些规格的培养板/皿,培养面积小,液体移动距离短,故需要较大的摇动力度。但对于直径较大的培养皿,如100 mm及以上培养皿,其液体可运动的距离远,作用力也相对增大,此时再用水平面“十”字运动方式可造成液体飞溅逸出。因此,选用了较温和的“跷跷板”式“十”字运动,这种方式是以X轴和Y轴为支点,前后、左右交替摇动培养皿,其混匀效果好,同时又不至使液体溅出。

生物摇床经常用于混匀溶液或细胞等,摇床的机械运动可通过横纵向摇杆、悬臂、万向定位滑轮和电生磁场发生振荡等多种方式实现各种运动,但

目前市面鲜见专用于细胞培养，使生长液呈“十”字轨迹运动的摇床。本文为进一步开发相关的细胞培养专用摇床提供了依据。当然，要让“十”字轨迹运动摇床适用不同的培养皿、板或瓶，还需要进行大量的实验研究，才能得出频率、振幅和时间等科学有效的数字化参数。

参考文献：

- [1] SATO Y, YAMADA T, HIROYAMA T, et al. A robust culture method for maintaining tumorigenic cancer stem cells in the hepatocellular carcinoma cell line Li-7[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1644-1652.
- [2] KINO J, ICHINOHE N, ISHII M, et al. Isolation and expansion of rat hepatocytic progenitor cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1905: 29-41.
- [3] TONE H, YOSHIOKA S, AKIYAMA H, et al. Embryoid body-explant outgrowth cultivation from induced pluripotent stem cells in an automated closed platform[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 7098987.
- [4] TEIXEIRA G Q, BARRIAS C C, LOURENCO A H, et al. A multi-compartment holder for spinner flasks improves expansion and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014; 20 (12): 984-993.
- [5] KIM J, MA T. Bioreactor strategy in bone tissue engineering: pre-culture and osteogenic differentiation under two flow configurations[J]. *Tissue Eng*, 2012, 18(21-22): 2354-2364.
- [6] 严广号. 上海智城发布全新一代精密细胞培养智能摇床[J]. 机电信息, 2016, 29(10): 60.

(上接第622页)

- [12] 杨雪峰. 枳实芍药散在急性胰腹痛中的应用[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(9): 891-892.
- [13] 宋永刚. 枳实芍药对的源流及功用初探[J]. 时珍国医药, 2009, 20(7): 1713-1715.
- [14] 石君杰, 戴玉英, 王海云, 等. 慢性束缚及夹尾刺激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其内脏敏感性评价[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 16(2): 85-89.
- [15] 吕恩基, 高志雄, 王威. 成年大鼠肠易激综合征模型建立的新方法[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(9): 184-185.
- [16] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 394-400.
- [17] AL-CHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [18] 诸琦, 王静, 赖华梅, 等. 中药肠吉安对肠易激综合征内脏高敏感模型大鼠的作用及其机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(9): 813-817.
- [19] 任培培, 汪龙德, 刘俊宏, 等. 腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的研究方法[J]. 中医研究, 2019, 32(6): 49-52.
- [20] 周云, 梁万年, 唐春萍, 等. 肠乐胶囊对肝郁脾虚型肠易激综合征模型大鼠的影响[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(1): 70-74.
- [21] 刘媛, 唐洪梅, 钟如帆, 等. 健脾通腑颗粒对肝郁脾虚型便秘型肠易激综合征大鼠模型的作用及机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(12): 2870-2874.
- [22] 李燕舞, 巫燕莉, 王汝俊, 等. 肠易激综合征内脏高敏大鼠模型的建立及动态评估[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 229-231.
- [23] 王博龙, 刘志强. 枳实芍药散“成分-靶点-通路”的网络药理学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 586-594.