

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02133213.4

[45] 授权公告日 2006年3月8日

[11] 授权公告号 CN 1244689C

[22] 申请日 2002.10.18 [21] 申请号 02133213.4

[71] 专利权人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

[72] 发明人 张卫 张骁英 赵权宇 方丽驹

审查员 卢阳

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司

代理人 许宗富 周秀梅

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

## [54] 发明名称

海绵组织离散细胞形成细胞团的方法

## [57] 摘要

本发明涉及海洋无脊椎动物海绵的细胞离体培养技术，具体提供一种海绵组织离散细胞形成细胞团的方法。它是将新鲜海绵组织块在含有EDTA的无钙镁海水(CMFSW-E)中被切割成 $1 \sim 3\text{cm}^3$ 的小块，经研磨过滤获得离散的海绵细胞悬浮液，通过梯度离心得到了增殖能力高且无微生物污染的离散细胞，细胞在无菌海水中成团、培养，可采用MTT法或流式细胞仪确认细胞的增殖能力。与现有海绵细胞成团方法相比，本发明可获得生命活力更强的细胞团并有效的解决了海绵细胞培养中一直存在的霉菌污染难题。

1. 一种海绵组织块离散细胞形成细胞团的方法，其特征在于：将从海绵组织块离散得到的海绵细胞悬浮液通过梯度离心分级，获得增殖能力更高的且能除去海绵中所吸附的微生物的离散细胞，细胞在海水中成团；按如下步骤操作：

1) 预处理：取新鲜的海绵块，清洗海绵组织；

2) 细胞离散：采用研磨与化学离散剂相结合的方法获得离散的海绵细胞；将清洗过的新鲜海绵在含有化学离散剂 EDTA 的无钙镁海水中切割为  $1\sim 3\text{mm}^3$  的小块，在研磨器械中研挤出细胞，然后将细胞悬液过滤，获得大量的离散细胞；所余残渣在含有化学离散剂 EDTA 的无钙镁海水中可再次振荡离散；

3) 梯度离心：再将所得细胞悬液采用梯度密度离心技术对原细胞进行富集，利用不同细胞间的大小差异，采用 3%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 不同密度的 Ficoll 溶液梯度离心操作，使原细胞集中于高密度梯度处，取此处的细胞群作为相对单一的细胞悬浮液用于形成细胞团，梯度离心的最上层则富集了微生物；

4) 过滤淘洗：取出经过梯度离心后细胞，用含有化学离散剂 EDTA 的无钙镁海水稀释，经过流水过滤淘洗除去高密度的梯度介质，得到细胞沉淀；

5) 海水培养：将细胞悬液平行接种在多孔板上培养，以含有抗生素的海水作为培养基，培养过程中每天换液 30~60%，培养温度控制在  $10\sim 25^\circ\text{C}$  范围内，完成其不同生长阶段。

2. 按照权利要求 1 所述海绵组织离散细胞形成细胞团的方法，其特征在于：所述步骤 5) 过程中另补加新鲜的抗生素。

3. 按照权利要求 1 或 2 所述海绵组织离散细胞形成细胞团的方法，其特征在于：所述研磨法所采用的器械为平底、有塑性的圆形研磨器械。

4. 按照权利要求 1 或 2 所述海绵组织离散细胞形成细胞团的方法，其

特征在于：所述细胞离散参数是：含有化学离散剂 EDTA 的无钙镁海水中，EDTA 的浓度为 5~20mmol，研挤时间为 5~15 分钟，用 300~500 目的滤器过滤。

5. 按照权利要求 1 所述海绵组织离散细胞形成细胞团的方法，其特征在于：所述抗生素为：青霉素，链霉素或两性霉素的一种或多种。

## 海绵组织离散细胞形成细胞团的方法

### 技术领域

本发明涉及海洋无脊椎动物海绵的细胞离体培养技术，具体地说是海绵组织离散细胞形成细胞团的方法，它可从海洋无脊椎动物海绵中获得可进行有效培养的海绵细胞团。

### 背景技术

海绵是海洋中最原始的无脊椎动物，属后生动物门。目前从海洋生物体中发现的天然产物，来自海绵的占40% [文献1: Bergmann, W. *et al.*, The isolation of a new thymine pentoside from sponges, *J Am Chem Soc.* 1950, 72: 2809-2810]。这些产物不宜采取捕捞提取的方法获得，也较难通过养殖或合成方法生成。

以 Halichondrin B. 为例，每捕捞1吨海绵 (*Halichondria okadai*) 仅可获得310mg的纯品。同时，捕捞海绵资源有限，还要破坏海洋生态环境。即使如此也不能满足临床前药理研究所需药品量。在海绵药物的开发过程中，由于无法获得足够药物开发实验所需的药品量，使开发不能继续，开发中止，形成海绵药物筛选开发中的“程序性药物死亡”现象。解决问题的可行商业生产技术方案除了采集野生海绵外，还包括水产养殖、化学合成、细胞和组织培养以及培养异源受体的转基因菌。尽管水产养殖是最容易和低成本大量生产海绵生物量的方法，但其成功培养取决于不可预知和常常变化的自然环境，其代谢产物的调控高水平合成也难以实现。而且，不同的海绵生长速率不同，一些生长特别缓慢的海绵显然是不适合通过水产养殖来生产生物量的。另一方面，由于大多数海绵生物活性化合物是结构复杂的手性化合物，环状且不饱和度高，杂原子含量多，化学合成过程往往非常复杂，实验室虽然可行，但不能实现商业上的经济生产。此外，由于对海绵的许多基本的生物学和分子生物学规律还缺乏研究，将海绵代谢产

物的生物合成基因转移至异源受体如大肠杆菌或酵母中尚有相当漫长的过程。因此，对许多海绵活性药物开发来说，海绵细胞和组织的生物反应器培养如果不能说是唯一的，也是目前最为可行的选择。

与绝大多数细胞不同，海绵细胞具有较高端粒酶活性，也就是说海绵细胞可能像肿瘤细胞一样具有无限繁殖的特性。但人们发现，处于离散状态的海绵细胞，端粒酶呈阴性，因此离散的单细胞悬浮液中的海绵细胞极易凋亡[文献 2: **Bergmann, W. et al.**, Nucleosides of sponges: discovery of the arabinose-based nucleosides-Tethya crypta, *J Org Chem* 1951, 16: 981-987]。

像其它后生门动物一样，海绵具有自发成团的倾向。有大量海绵细胞形成的细胞聚集体活细胞团 (primmorphs)，其端粒酶呈阳性，在一定条件下能培养增殖[文献 3: **Faulkner, D.J.**, Marine Natural Products, *Nat. Prod. Rep.* 1998, 15: 113-158]。这样，海绵细胞培养技术的实质内容就成为海绵细胞团的形成技术以及海绵细胞团的培养、应用技术。海绵细胞因离体培养其显著的优点在于培养系统完全可控并能够容易的实现目的代谢物的调控和最优化生产。一方面适于工业放大，另一方面活性物质高水平生产的潜力使其经济可行，具有显著的应用开发价值。

海绵细胞团不仅可用于细胞增殖和细胞代谢物的生产，同时其对环境毒素的敏感性也可用做细胞生物传感器；细胞团还可应用于海绵物种的保存和培育[文献 3: **Faulkner, D.J.**, Marine Natural Products, *Nat. Prod. Rep.* 1998, 15: 113-158]。同时，由于海绵细胞非常适于进行动物细胞信号传导研究，因此对海绵细胞的离体培养的研究也具有很高的基础生物学科价值。这个领域迄今为止已经吸引了包括德国，以色列，美国，西班牙，新西兰，澳大利亚，日本等许多国家的科研力量。

现有技术中较成功的海绵细胞培养是 Custodio 等人首次对深海海绵 *Suberites domuncula* 的组织建立的以海绵细胞团为培养对象的体系[文献 4: **Custodio, M. R. et al.**, Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death, *Mech. Ageing Dev.*, 1998, 105 (1, 2), 45-59 (English)]。所谓细胞团是由 2000 个左右的细胞聚集成 1-3mm 左右的小团，称为

primmorph. 离散的海绵细胞在形成了 primmorphs 后很快由端粒酶阴性转为阳性，并且具有了 DNA 合成和细胞生长的能力。

该技术的主要流程是，海绵组织 → 切碎 → 含 EDTA 无钙镁海水振荡化学离散 → 海水培养 → 细胞成团 → 维持培养。

具体操作是：将 0.5~1mm<sup>3</sup> 大小的海绵组织块在含 EDTA 的无钙镁海水 (CMFSW-E) 中振荡依靠 EDTA 的化学离散作用将细胞从组织中分离，多次重复上一步骤直至获得一定量的离散细胞，收集细胞悬液，经过过滤，离心后将细胞接种于含抗生素的海水中经过 3 至 5 天的培养可以形成细胞团。其中加入抗生素是为了抑制培养体系内的微生物生长。细胞团中细胞的生长和增殖能力通过 5-BrdU 掺入正在进行 DNA 复制的细胞而获得证实。

但是，该技术作为一种原代培养技术一直未能对培养中总的生物量变化有所说明。同时应用到其它种属的海绵细胞培养中时，往往出现难以用抗生素控制的霉菌污染和原生动物污染。

海绵细胞培养的生物量增长问题和污染控制是海绵细胞培养的瓶颈问题。

海绵是最原始的多细胞动物，无组织分化，只有不同功能类型的细胞。其中普遍认为原细胞具有在特定条件下转化为其他细胞类型并增殖生长的能力。现有的海绵细胞团培养技术采用的是各种海绵细胞的混合成团培养，其中不仅包含各种不同分化程度的细胞，也包括了不同生长状态的细胞。而主要具有增殖能力的原细胞则不占优势，这使得细胞团的整体生长能力受到限制。部分高分化的细胞在团生长的开始就出现调亡，难以进行增殖和传代研究。

### 发明内容

为了提高海绵细胞团的增殖能力和传代潜力，本发明的目的是提供一种新的海绵组织离散细胞形成细胞团的方法，由这种技术形成的细胞团将具有更高的增殖能力。

为了实现上述目的，本发明技术方案是：将从海绵组织块离散得到的海绵细胞悬浮液通过梯度离心分级，获得增殖能力更高的且能大量除去海绵中所吸附微生物的离散细胞，细胞在海水中成团；具体操作步骤可以为：

1) 预处理: 取新鲜的海绵, 清洗海绵组织, 除去海绵组织块中的砂石;

2) 细胞离散: 采用研磨法与化学离散剂相结合的方法获得离散的海绵细胞: 将清洗过的新鲜海绵在含有化学离散剂 EDTA 的无钙镁海水 (CMFSW-E) 中切割为  $1\sim 3\text{mm}^3$  的小块, 在研磨器械中研挤细胞组织块, 研挤出细胞, 研挤时间为  $5\sim 15$  分钟, EDTA 的浓度  $5\sim 20$  mmol, 然后将细胞悬液用 300~500 目的滤器过滤, 在过滤后的所述细胞悬液中获得大量的离散细胞; 所余残渣在 CMFSW-E 中再次振荡离散;

所述研磨器械可采用平底、有塑性的圆形研磨器械如研钵;

3) 梯度离心: 再将所得细胞悬液采用梯度密度离心技术对原细胞进行富集, 利用不同细胞间的大小差异, 采用不同密度的 Ficoll 溶液梯度离心操作, 使大部分原细胞集中于高密度梯度处, 取此处的细胞群相对单一的细胞悬浮液用于形成细胞团, 梯度的最上层则富集了大部分的微生物;

采用梯度离心后所得悬浮液形成的细胞团具有更高的增殖能力, 且能完全避免霉菌污染。所述 Ficoll 的梯度要根据不同的海绵和细胞密度调整, 一般采用 3% 至 50% 之间不等的梯度。

4) 过滤淘洗: 取出经过梯度离心后高密度处的细胞, 用 CMFSW-E 稀释, 经过反复过滤淘洗, 除去高密度的梯度介质及残余微生物, 得到细胞沉淀;

5) 海水培养: 为检查所得到的细胞团中细胞的增殖能力, 将细胞悬液平行接种在多孔板上培养, 以添加抗生素的海水作为培养基, 培养过程中每天换液约 30~60%, 培养温度控制在  $10\sim 25^\circ\text{C}$  范围内, 完成其不同生长阶段; 并补加新鲜的抗生素。

所述的抗生素为: 青霉素, 链霉或两性霉素, 其添加量分别为:  $1\text{ U/ml} \leq \text{青霉素} \leq 100\text{ U/ml}$ ,  $1\ \mu\text{g/ml} \leq \text{链霉素} \leq 100\ \mu\text{g/ml}$  或  $0.1\ \mu\text{g/ml} \leq \text{两性霉素} \leq 3\ \mu\text{g/ml}$ 。

本发明利用新的细胞离散技术结合细胞筛选技术, 获得海绵组织中高增殖能力的原细胞进行富集培养, 获得了显著的细胞生物量扩增, 同时解决了培养中污染控制的问题, 并能有效的降低海绵组织内微生物对培养威胁, 有利于海绵细胞团的长期培养和增殖。与现有技术相比, 还具有如下有益效果:

1. 本发明在细胞离散过程中采用研磨法结合轻微的化学离散，研磨柔和快速，提高了细胞的收率和活性。

2. 本发明采用上述离散细胞的方法，细胞总收率为现有技术中直接的 CMFSW-E 振荡离散约 2 倍以上，细胞在 CMFSW-E 中停留时间短，细胞损伤小，同时有利于采用机械装置进行自动化操作，提高了细胞团的增殖能力。

3. 由于本发明采用梯度离心技术可获得更多原细胞，且能将大量的微生物在培养前除去。

#### 附图说明

图 1 为本发明一个实施例梯度密度离心后富集的细胞图，其放大倍数为 250 倍。

图 2 为本发明一个实施例 Ficoll 分离富集的细胞团培养生长曲线。

图 3 为现有技术中不经 Ficoll 分离的细胞团培养的非正常生物量变化曲线。

#### 具体实施方式

下面结合实施例及其附图详述本发明。

##### 实施例 1:

材料：繁茂膜海绵，在大连周边海域采集。

方法：称取两份海绵各 2.2~2.3 g (湿重)，用研磨法获得细胞悬液 35ml，采用血球计数板测得细胞密度为  $8.6 \times 10^7$  cells/ml。

具体操作如下：

1) 预处理：取新鲜的海绵，清洗海绵组织，除去海绵组织块中的砂石；

2) 细胞离散：将清洗过的新鲜海绵块在 EDTA 浓度为 10mmol 的无钙镁海水 (CMFSW-E) 中切割为  $1 \sim 3 \text{mm}^3$  的小块，在研磨器械中研挤细胞组织块，研挤出细胞，研挤时间为 10 分钟，然后将细胞悬液用 300~500 目的滤器过滤，在过滤后的所述细胞悬液中获得大量的离散细胞；所余残渣在 CMFSW-E 中再次振荡离散；

本实施例所述研磨法采用平底、有塑性的圆形研磨器械-研钵；本发明在细胞离散过程中采用研磨法结合轻微的化学离散，研磨柔和快速，提高了细胞的收率和活性。



本发明在研钵中研挤出细胞的方法与现有技术中直接的 CMFSW-E 振荡离散相比，其细胞总收率高为直接 CMFSW-E 振荡离散法 2 倍以上，细胞在 CMFSW-E 中停留时间短，细胞损伤小，同时有利于采用机械装置进行自动化操作。

3) 梯度离心：再将研磨所得无钙镁海水细胞悬液 5ml，采用梯度密度离心技术对原细胞进行富集，利用不同细胞间的大小差异，分别取 3%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 不同密度的 Ficoll 溶液梯度离心操作，使大部分原细胞集中高密度梯度处，取此处的细胞群作为相对单一的细胞悬浮液，用于形成细胞团，梯度的最上层则富集了大部分的微生物；

采用梯度离心后所得悬浮液形成的细胞团具有更高的增殖能力，且能完全避免霉菌污染。重新悬浮于 CMFSW-E 中经倒置显微镜观察，其中原细胞比例高于未经梯度富集的细胞悬液 2 倍以上。另外，采用梯度离心技术可获得更多原细胞，且能将大量的微生物在培养前除去。

4) 过滤淘洗：取出经过梯度离心后高密度处细胞，用 CMFSW-E 稀释，经过反复流水过滤淘洗，除去高密度的梯度介质及残余微生物，得到细胞沉淀，悬浮至 5ml；

显微镜观察如图 1 所示，可初步确定大量的细胞为原细胞。

5) 海水培养：为检查所得到的细胞团中细胞的增殖能力，将细胞悬液平行接种在多孔板上培养，以无菌海水即含有抗生素的海水作为培养基，将筛选所得细胞用所述海水—抗生素溶液（采用抗生素为青霉素 100U/ml，链霉素 100 $\mu$ g/ml，两性霉素 3 $\mu$ g/ml）稀释至细胞浓度  $10^8$  cells/ml，分置于 2 个 24 孔板中培养；培养过程中每天换液 50%，培养温度控制在 20 $^{\circ}$ C，完成其不同生长阶段。

用 MTT 法检查细胞增殖结果如图 2 所示，由上图可以看出，在新的细胞团培养中，细胞在 5 天内即可增殖 3.2 倍。

采用 MTT 法测定活细胞的标准曲线获得细胞的准确浓度，可直接获得细胞增殖的定量结果。具体作法如下：

已知细胞密度的不同浓度的海绵细胞悬液，与待测样品同时平行接种于 96 孔板中，添加 MTT 10~20 $\mu$ l，28~45 $^{\circ}$ C 孵育 2.5~5 小时，离心 5 分钟

去上清，沉淀用 IDMSO 溶解，酶标仪双波长检测吸光值，检测波长 570nm，测定 630nm 吸光值为参比， $A(\text{formazon}) = A(570) - A(630)$ 。以标准系列的细胞密度与吸光值对应，制作标准曲线，通过样品的吸光值计算样品的细胞密度。

比照例：称取海绵各 2.2~2.3 g(湿重)，用 CMFSW-E 法制备细胞悬液，测得细胞量为  $3.9 \times 10^7$  cells/ml。

结论：研磨所得细胞量是常规方法的 2.2 倍。研磨法离散细胞优于直接化学离散法。

比照例

细胞常规技术培养的生物量变化

采用化学离散法获得的细胞直接在 CMSFW - E 中成团，同样在海水抗生素溶液中采用抗生素为青霉素 100U/ml，链霉素 100 $\mu$ g/ml，两性霉素 3 $\mu$ g/ml 进行孔板培养，MTT 分析结果参见图 3 所示，细胞培养体系在第二天时出现霉菌污染，通过 MTT 法测得生物量增长 8 倍以上，经镜下检查，发现了大量的霉菌生长，可以断定所测得的生物量的异常增长为霉菌的生长。第四天的极大生物量经镜下检查为大量的原生动物生长。因此可以说明，采用常规海绵细胞离散成团技术培养的细胞团中的污染问题严重干扰海绵细胞的培养和生长，使海绵细胞团难以正常生长和增殖。

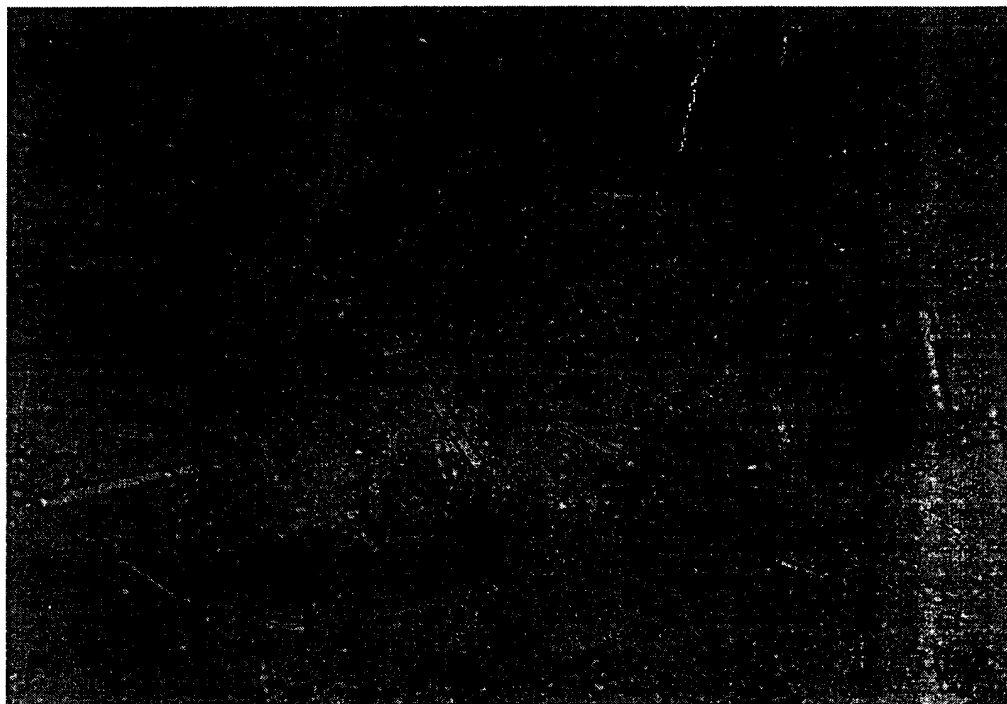


图1

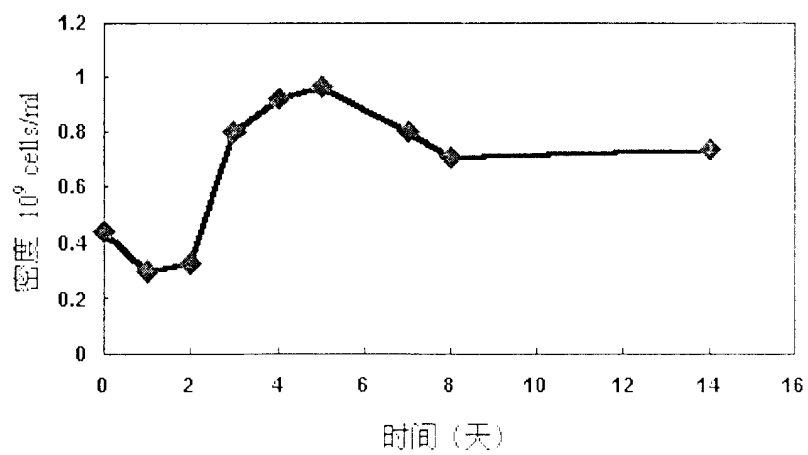


图2

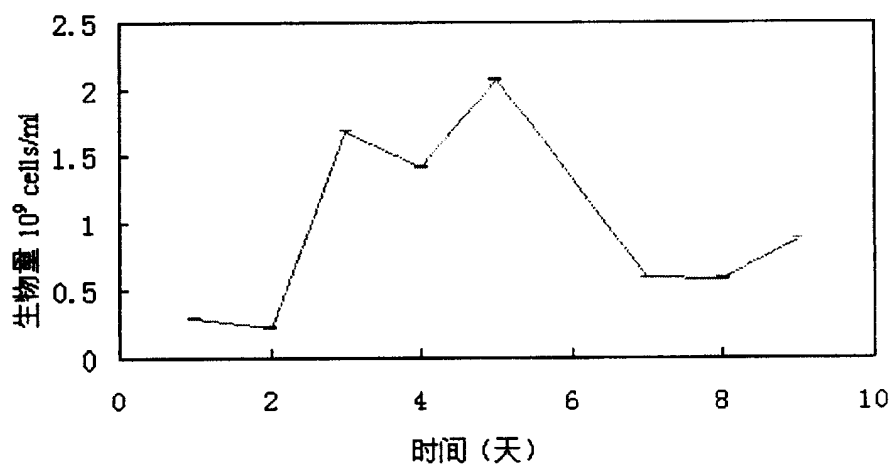


图 3