

• 实验研究 •

西司他丁钠+亚胺培南消除细胞培养中细菌污染的研究

江千里¹, 王健民^{1*}, 江 汕², 许 育³, 温丽敏¹, 周 虹¹, 闵碧荷¹

(1. 第二军医大学长海医院血液科, 上海 200433; 2. 南京医科大学病理学教研室, 南京 210029; 3. 第二军医大学长海医院实验诊断科)

[摘要] **目的:** 研究西司他丁钠+亚胺培南(泰能)清除细胞培养中细菌污染的可行性。**方法:** 将 15 批细胞培养中已发生细菌污染的细胞, 用含泰能 10~100 μg/ml 的 PBS 洗涤 3 次(PBS 用量逐次递增), 第 3 次洗涤之前将细胞悬浮于含 100 μg/ml 泰能的完全培养液 1.5 ml 中 37℃ 孵育 30 min; 然后细胞移入含 100 μg/ml 泰能的完全培养液中培养, 更换含 100 μg/ml 泰能的完全培养液 1 次/d, 共 3 d。**结果:** 成功消除 14 批细菌感染, 另 1 批加用万古霉素后亦获成功。**结论:** 泰能可以有效消除细胞培养中的细菌污染, 其剂型和包装等尚可改进。

[关键词] 细胞培养; 细菌污染; 西司他丁钠; 亚胺培南

[中图分类号] Q 813.11; R 978 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0114-02

Elimination of bacterial contamination in cell culture with imipenem plus cilastatin

JIANG Qian-Li¹, WANG Jian-Min^{1*}, JIANG Shan², XU Yu³, WEN Li-Min¹, ZHOU Hong¹, MIN Bi-He¹ (1. Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029; 3. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a method using imipenem plus cilastatin to eliminate bacterial contamination in cell culture. **Methods:** Washing cells twice with PBS containing 10-100 μg/ml imipenem plus cilastatin, suspending cells in 1.5 ml culture medium with 100 μg/ml imipenem plus cilastatin, then incubating cells at 37℃ for 30 min. Washing again with PBS containing 100 μg/ml imipenem plus cilastatin, then transferring the cells into imipenem plus cilastatin-culture-medium (with 10% FCS and 100 μg/ml imipenem plus cilastatin), changing imipenem/cilastatin-culture-medium once a day for 3 d. **Results:** Fourteen of 15 cases of bacterial contamination (9 were Bacillus and 6 were coccus) were eliminated. The only failed case was contaminated by G⁺ Corynebacterium, which was also successfully eliminated when vancomycin was added. **Conclusion:** Imipenem plus cilastatin can eliminate most of bacterial contaminations in cell culture.

[KEY WORDS] cell culture; bacterial contamination; cilastatin; imipenem

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 114-115]

在临床诊治、科研及医药生产中均需要细胞培养, 细菌污染是最常见的问题, 但处理方法有限。本研究拟建立西司他丁钠+亚胺培南(泰能)清除细胞培养中细菌污染的方案, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640 培养液购自 Gibco BRL 公司。胎牛血清(FCS)购自 Hyclone 公司。K562 细胞等由本室保存。

1.2 细胞培养 除非特殊说明, 细胞均在 37℃、5%CO₂ 和饱和湿度条件下, 培养于含 10%NBS 的 RPMI 1640 培养液(完全培养液)。

1.3 泰能的配制和保存 临床用 500 mg 包装的泰能粉针剂(默沙东公司), 使用前以生理盐水新鲜配制成 5 mg/ml, 分装后-20℃冻存。

1.4 泰能对细胞生长的影响 96 孔培养板中接种 K562 细胞(5 000/孔), 于完全培养液中分别加入泰能 0~500 μg/ml (n=4), 培养 48h 后观察细胞形态, MTT 法测定药物抑制曲

线^[1,2]。

1.5 泰能消除细胞污染的步骤 (1)收集细胞: 贴壁细胞以胰酶消化后, 悬浮细胞则直接以 1 300 r/min×5 min(下同)离心, 吸取部分上清液用于检菌, 其余弃去, 回收细胞; (2)洗涤: 含 10~100 μg/ml 泰能的 PBS 离心洗涤细胞 2 次, PBS 用量逐次递增(如 6 ml 和 8ml), 吸弃上清; (3)抗生素孵育: 用含 100 μg/ml 泰能的完全培养液 1.5 ml 重悬细胞, 更换试管, 37℃孵育 30 min; (4)再洗涤: 细胞悬液以 10 ml 含 100 μg/ml 泰能的 PBS 再次离心洗涤, 吸弃上清; (5)抗生素维持培养: 更换吸管, 将细胞重悬于含泰能 100 μg/ml 的完全培养液 5 ml, 移入新培养瓶中培养。第 2 日光镜观察如无污染, 则更换含泰能 100 μg/ml 的完全培养液 1 次/d, 共 3 d。步骤

[基金项目] 国家自然科学基金(30172347); 上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养基金(98BR029)。

[作者简介] 江千里(1974-), 男(汉族), 博士, 住院医师。现在第一军医大学南方医院血液科, 广州 510515。E-mail: jiangql@yahoo.com

*Corresponding author. E-mail: jmwang@medmail.com.cn

(1)中收集的含菌上清液经 $4\ 000\ g \times 5\ min$ 离心后,取沉渣涂片,革兰染色,必要时细菌划线接种于羊血哥伦比亚琼脂平板^[3]分离鉴定细菌。

1.6 潜伏期污染的治疗 适用于培养用具被打翻、使用了污染的培养液或要培养污染的组织等情况。细胞即刻处理,步骤同 1.5,含菌培养液培养 1~3 d 后进行细菌鉴定。

1.7 治疗污染的冻存细胞 细胞复苏后,取 50 μ l 细胞悬液于 3 ml RPMI 1640 培养基中培养 1~3 d 后进行细菌鉴定。其余细胞即刻处理,步骤同 1.5 项,可省略抗生素孵育和再洗涤。

1.8 疗效的评判 细胞或培养上清在无抗生素的条件下,37℃连续培养 2 周,光镜下未发现污染者,可认为治疗成功。细胞进行一般生物特性的检测。

2 结果

2.1 泰能对细胞生长的影响 当浓度高于 150 μ g/ml 时,细胞表面可出现毛刺状突起,细胞生长受抑 80%,低于此浓度对细胞生长无显著影响。

2.2 治疗效果 共处理污染的细胞 15 批,包括 10 批普通培养时发生的污染,3 批污染的冻存细胞和 2 批污染的原代组织标本;其中杆菌 9 批,球菌 6 批。污染的细胞包括人及小鼠的悬浮细胞和贴壁细胞,如 K562、293、C26、p388、NIH3T3 等。14 批获得成功,失败的 1 批为普通培养中发生的污染,泰能虽能抑制细菌生长,但无法清除,细菌学鉴定为 G⁺ 杰克棒状杆菌,药敏试验显示该菌对万古霉素、红霉素等敏感,遂在处理中将抗生素换为 1 mg/ml 的去甲万古霉素(华北制药),成功清除了细菌。

2.3 泰能对细胞特性的影响 细胞形态、倍增时间和裸鼠体内成瘤性等特性均无明显变化。

3 讨论

实验室的细菌污染来势凶猛,而种类和药敏情况复杂^[4,5],甚至可能本身就带有氨基青霉素(AMP)等抗药基因,处理必须采用高效广谱抗生素,尽快清除污染,无法等待药敏结果再做处理。

同一般抗生素相比,泰能用于清除细胞培养中的细菌污染具有以下优势^[6,7]:(1)抗菌谱广:泰能对多数 G⁺、G⁻ 细菌和厌氧菌有效;(2)杀菌迅速:亚安培南属于碳青霉烯类抗生素,对细菌的 β -内酰胺酶高度稳定,相对分子质量低,能迅速杀灭细菌;(3)具有抗生素后效应;(4)抑菌浓度低:亚安培南最低抑菌浓度为 8 μ g/ml;(5)生物安全性高:相对其他抗生素而言,杀菌过程中产生的内毒素和 TNF、IL-6 等致热原较低,对细胞的影响小,这点具有特殊的意义。

本方案使用的体会是:(1)泰能短期孵育和再洗涤对于严重的污染很重要,而对于冻存细胞的污染可以省去,可能是由于冻存细胞的污染一般较轻,或冻融过程提高了细菌对

药物的敏感性。(2)注意细节:如洗涤细胞时,应吸弃上清而非倾倒,洗涤细胞的含抗生素 PBS 用量应逐次递增,以清除清洗的死角;PBS、培养基和培养用具等应专用,避免造成二次污染。(3)涂片检菌可使治疗更具针对性,简便实用。(4)泰能应尽量新鲜配制,配置后 4℃可维持药效 24 h, -20℃可保存 2~3 周,使用时握于手心解冻,吸出所需剂量后立即返回 -20℃冻存或丢弃^[7]。

本方案应用中还有一些问题:(1)泰能临床剂型包装过大,而配置后不便保存,即使存于 -20℃经一段时间也会变色,影响疗效;(2)西司他丁钠盐是用于抑制亚胺培南体内代谢的酶类,没有抗菌活性,可以考虑去除;(3)本法不能代替无菌操作,也不宜用于预防感染,以免诱导耐药;(4)为了避免污染环境,需要对含菌的废液统一收集,丢弃前以消毒剂进行无害化处理。

致谢:感谢长海医院许育和方超平老师的巨大支持以及顾俊彦、戴观荣、宋献民、楼敬伟、高磊、费新红等对本方案优化等做出的贡献。感谢陈华红小姐给予的帮助。

[参考文献]

- [1] 司徒镇强,吴军正 主编. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社,1996. 169-189.
- [2] 江千里,王健民,温丽敏,等. YCD 基因修饰对小鼠 P388 白血病的体内治疗作用研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2003,10(2):121-124.
Jiang QL, Wang JM, Wen LM, et al. Therapeutic effect of YCD suicide gene modified murine P388 leukemia *in vivo*[J]. *Zhongguo Zhongliu Shengwu Zhiliao Zazhi (Chin J Cancer Biother)*, 2003, 10(2):121-124.
- [3] 刘峰,许育,周水森,等. 急慢性鼻窦炎中肺炎链球菌检验方法的改进[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志,2002,16(2):84-85.
- [4] 李映波,姜述德,李平忠,等. 脊灰疫苗生产中零星细菌污染的菌谱情况及其药敏分析[J]. 云南大学学报·自然科学版,1999,21(3):189-191.
- [5] 鞠洪涛,李爱玲,徐龙涛,等. 一例细菌对 MDCK 细胞污染的检测[J]. 中国兽药杂志,2003,37(1):41-42.
Ju HT, Li AL, Xu LT, et al. Detection of a bacterial from contaminated MDCK cell[J]. *Zhongguo Shouyao Zazhi (Chin J Vet Drug)*, 2003, 37(1):41-42.
- [6] Pfaller MA, Jones RN, Marshall SA, et al. Inducible Amp C β -lactamase producing gram-negative bacilli from blood stream infections: Frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE) [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1997, 28(4):211-219.
- [7] 史亚柱,隋广志,高忠民,等. 泰能与 6 种输液配伍的稳定性研究[J]. 药学实践杂志,1998,16(1):48-51.

[收稿日期] 2003-05-20

[修回日期] 2003-11-27

[本文编辑] 曹静