

# ·技术与方法·

## 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的培养技巧及经验总结 \*

方 瑶 毛旭虎<sup>△</sup>

(第三军医大学医学检验系临床微生物教研室 重庆 400038)

**摘要** RAW264.7 细胞具有很强的黏附和吞噬抗原的能力,是研究微生物学、免疫学的常用细胞株。很多研究者发现这种细胞形态极不稳定,细胞状态的评价也很困难。本文作者结合 RAW264.7 培养经历及文献资料探讨 RAW264.7 细胞培养的经验教训和评价细胞状态的方法,旨在为培养该细胞的科研工作者提供一定的借鉴。

**关键词** 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(TIB-71) 细胞培养 细胞形态

**中图分类号** Q95-3 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)22-4358-02

## Culture Skill and Experience of RAW264.7\*

FANG Yao, MAO Xu-hu<sup>△</sup>

(Department of Clinical Microbiology and Immunity, the Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**ABSTRACT:** RAW264.7 has doughty capability of adhesion and antigen phagocytosis, so it is commonly used in microbiology and immunology. However, many researchers find that the cell is very unstable because of its morphous variation, and it is difficult to value its state. In this paper we mainly discussed the skills and experience in culturing RAW264.7 and method of evaluating cell state. We hope to provide some references to researchers who would culture such cell line.

**Key words:** Mice macrophages; RAW264.7(TIB-71); Cell culture; Cell morpha

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, Q813 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)22-4358-02

RAW264.7 是由 Abelson 鼠白血病病毒诱导 BALB/c 小鼠产生肿瘤后收集小鼠腹水单核样巨噬细胞得到的细胞株(ATCC Number: TIB-71)。该细胞具有很强的黏附和吞噬抗原的能力,是微生物学、免疫学研究中的常用细胞株<sup>[1]</sup>。美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)网站上提供了培养该细胞的标准方案,但是在具体的科研工作中,很多研究者发现这种细胞较难培养,具体表现在:复苏不易成功、细胞形态变异明显(易形成多角的大细胞、长梭形细胞)、消化困难(0.25%胰酶消化 10 min 以上都达不到理想效果,还要借助细胞刮)等一系列的问题。研究人员在细胞状态的评价上观点不一。有的认为 RAW264.7 是巨噬细胞,摄取抗原的能力强,摄取少量抗原就会发生形态的变异明显,是正常现象;有的则认为细胞形态变异是细胞衰老的表现,这时的细胞用于实验的话数据就不可靠<sup>[2]</sup>。具体怎样通过细胞形态来评价细胞的状态,如何培养得到状态良好的细胞,正是本文关注的内容。

### 1 RAW264.7 培养的准备工作的

RAW264.7 细胞培养之前,一切与该细胞直接接触的玻璃器皿和器具都要进过去热源处理(200-250℃ 烘烤 4-6h),RAW264.7 细胞接触过多的热源会导致巨噬细胞形态发生明显变异,影响实验中的观察。培养细胞的相关试剂在分装时也尽量减少热源的污染。这样,RAW264.7 细胞的状态才可能达

到最好,确保实验的可靠性和真实性。

### 2 RAW264.7 的形态特点与培养

ATCC 官方网站上提供有 RAW264.7 细胞的参考图片(<http://www.atcc.org/Attachments/2005.jpg>),细胞形态多为有细长伪足的细胞和类圆形的细胞。作者认为,RAW264.7 细胞是类单核的细胞,最好的形态是小的圆形透亮的细胞。因为在作者培养 RAW264.7 细胞过程中,通过优化培养条件后能逐步改善细胞的形态,最终使这种具有较好形态细胞生长密度占 99% 以上。而参考图片中的细胞有可能是接触了少量变异源才导致了分化的状态。小的圆形透亮的细胞也许才能称为标准的 RAW264.7 形态。

RAW264.7 极易出现多伪足的细胞形态,这也是造成很多研究者困惑的原因<sup>[3]</sup>。同时这也是之后细胞的消化和传代困难的根源。RAW264.7 具有很强的吞噬能力,当吞噬抗原后,细胞会释放趋化因子,进一步促使细胞伸出伪足,增强黏附攀爬能力。细胞吞噬抗原过多、培养环境恶劣都会促使该细胞呈现梭形、长梭形,镜下会看到具有细长的伪足的小细胞被类似上皮的梭形大细胞取代。这种细胞形态表明细胞已经老化,细胞之间也很难像圆形小细胞那样聚集成簇。培养中我们发现,通过改善细胞的培养状况,变异的细胞形态可以在一定程度上得到改善的。将细胞复苏培养在未经去热源的玻璃培养瓶中,接触

\* 基金项目:国家重大科技专项(2008ZXJ09014-007)

作者简介:方瑶(1987-)男,硕士,主要研究方向:病原与宿主相互作用, E-mail: jolfang@sina.cn

<sup>△</sup>通讯作者:毛旭虎, E-mail: mxh95xy@tom.com

(收稿日期:2011-11-23 接受日期:2011-12-18)

细胞的器具是一般的高温高压的器具(未经去热源处理),培养的细胞形态就多呈梭形,传代中消化非常困难(胰酶消化20min后效果很差,用细胞刮刮取都很难刮取干净)。通过改善细胞的培养环境(换用250mL flask培养瓶,玻璃器皿经高温烘烤处理,采用一次性器具)后,细胞形态转为主要以细长伪足的细胞和类圆形的透亮细胞为主了,但是很难达到更为理想的细胞形态。

### 3 RAW264.7 的传代

胰酶的消化效果与细胞的形态有紧密的关系。细胞的伪足多而长,会使细胞很难消化,用细胞刮对细胞损伤较大,需要的贴壁的时间更长,增值速度也会很慢。因此往往RAW264.7的消化是传代中工作量最大的步骤<sup>[4]</sup>。本文作者的做法是:1)待培养瓶中RAW264.7细胞的密度达到80%,弃去培养基;2)用HBSS洗液洗涤两次,完全去除含胎牛血清的培养基(以免影响胰酶的消化效果);3)0.25%胰酶消化5-10min。形态好(指小、圆形)的细胞5min就可达到理想的消化效果;4)弯嘴吸管稍用力均匀吹打,重复一次,即可将RAW264.7细胞吹打下来。但是形态不好(多触角、长梭形)的细胞即使消化10min后,镜下观察,悬浮的RAW264.7细胞都很少,这时的细胞状态就不太好,对后续的实验有较大的影响。

### 4 RAW264.7 的冻存及复苏

RAW264.7的冻存过程应尽量减少热源对细胞的影响,这样对细胞种子的洁净度有更好的保障<sup>[5]</sup>。该细胞对空间状态很敏感,所以复苏的细胞密度应适中,如果密度太高复苏时细胞增殖太快,过密的生长会加剧细胞的营养缺乏,促使细胞老化。一般接种或复苏的细胞数量控制在 $10^4$ - $10^5$ 为宜,这种密度接种75cm<sup>2</sup>药瓶培养瓶2天细胞的密度即可达到70-80%,状态好的话就可以进行后续的试验或者冻存了。细胞培养的其它步骤同一般的贴壁细胞<sup>[6]</sup>。

### 5 结论

RAW264.7细胞具有很强的黏附和吞噬抗原的能力,是研究免疫中抗原递呈、微生物中宿主与病原体相互作用的常用菌

株。但是RAW264.7又是很“娇气”的细胞,对空间很敏感,喜聚集成片生长,易吞噬抗原、易老化、易发生形态的变异,研究中对于细胞的状态很难把握。本文作者觉得,多角的、梭形的细胞形态可能指示细胞的生长状态不好。因为这时的RAW264.7因为接触了太多的抗原成分,致使细胞的各种生理状态发生变化,后续的实验会受到很大的影响,尤其是做一些抗原递呈相关的实验。类单核状态的巨噬细胞会比老化的巨噬细胞对抗原的反应更强烈<sup>[7]</sup>。通过实验我们知道,在去除热源的情况下,细胞是可以达到很理想的细胞形态的,而且这种小、圆形的细胞才是RAW264.7细胞形态的本来面目。本文结合文献资料和自身的培养经验教训,旨在能为同仁们提供一定的借鉴,节约宝贵的研究时间。

#### 参考文献(References)

- [1] Lee SJ, Lim KT. Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1beta and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells Naunyn Schmiedebergs[J]. Arch Pharmacol, 2008, 377(1): 45-54
- [2] <http://cell.dxy.cn/bbs/thread/8399629?keywords=小鼠巨噬细胞#8399629>
- [3] <http://wenku.baidu.com/view/88795d1efad6195f312ba694.html>
- [4] Zhou HY, Shin EM, Guo LY, et al. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 586(1-3):340-349
- [5] Norris, M.H., et al. The Burkholderia pseudomallei {Delta}asd mutant exhibits attenuated intracellular infectivity and imparts protection against acute inhalation melioidosis in mice[J]. Infect Immun, 2011, 79(10):4010-4018
- [6] Cheng YW, Cheah KP, Lin CW, et al. Myrrh mediates haem oxygenase-1 expression to suppress the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(9): 1211-1218
- [7] Na YS, et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from Capsosiphon fulvescens[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(3): 364-370

(上接第4348页)

- [12] Tofteng F, Larsen FS. Management of patients with fulminant hepatic failure and brain edema[J]. Metab Brain Dis, 2004,19(3-4):207-214
- [13] Rinella ME, Sanyal A. Intensive management of hepatic failure[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2006,27(3):241-261
- [14] Wendon J, Lee W. Encephalopathy and cerebral edema in the setting

of acute liver failure: pathogenesis and management [J]. Neurocrit Care, 2008,9(1):97-102

- [15] Acute Liver Failure Study Group. Intensive care of patients with acute liver failure: recommendations of the U.S.[J]. Crit Care Med, 2007,35(11):2498-2508