

# 一种可实现原位监测的细胞培养信息化装置

谭逸斌, 张宇翔, 李中源, 张启英, 顾宁\*

东南大学生物科学与医学工程学院, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京 210096

\* 联系人, E-mail: guning@seu.edu.cn

2013-11-19 收稿, 2013-12-16 接受, 2014-02-17 网络版发表

国家重大科学仪器研发专项(2011YQ03013403)、国家重大科学研究计划(2011CB933503)、国家自然科学基金(61127002)和江苏省基础研究计划(BK2011036)资助

**摘要** 对细胞进行连续的原位检测可以获得其生理过程更准确、具体的信息, 帮助人们更全面深入地认识细胞个体差异以及细胞间相互作用等问题. 为了实现对细胞进行连续原位检测, 本文设计了一种小型化的可以与倒置显微镜等检测设备相结合的细胞培养装置. 该信息化的装置通过单片机系统实现对装置培养环境的实时监测和反馈控制, 并且将培养环境数据等重要信息在上位机实时显示并储存, 同时还利用 GSM 模块实现了用户和培养装置的远程交互功能. 文中通过对 HO8910 卵巢癌细胞的培养及原位观察实验验证了装置的培养效果.

## 关键词

细胞培养装置

信息化

原位检测

实时监测

远程交互

HO8910 卵巢癌细胞

自 19 世纪中期德国科学家 Schleiden 和 Schwann 提出细胞学说之后, 生命科学的研究开始进入细胞这一微观层次. 随着新理论、新技术的不断涌现, 人们对细胞的研究正不断深入, 细胞生物学、分子生物学已经成为 21 世纪最活跃的生命科学学科. 作为生命科学中最基础的环节, 细胞培养技术经过一个多世纪的发展, 已经形成了较为成熟的体系, 逐渐成为当今分子生物学和细胞生物学实验室的常规技术.

细胞培养装置是细胞培养过程的核心设备之一, 融合了生物、化学、机电、控制、信息等多个工程学科, 是细胞生物学研究的基础, 在整个生命科学研究中有着极为广泛的应用.

20 世纪初的生物学家在培养组织时已经发现, 动物细胞必须在温暖、潮湿的环境下才能较好地生长, 同时培养环境还应尽量避免细菌的干扰<sup>[1,2]</sup>. 此时, 已经使用一些用于提供合适的细胞生长环境的培养装置, 但结构都比较简单. 直到 20 世纪中期, 一些结构相对复杂的培养装置才陆续进入实验室<sup>[3]</sup>, 这些装置通常采用水套式或电热式的结构来控制温

度, 有相对密闭的可以提供无毒无菌环境的培养箱体. 近年来, 随着精密加工、自动控制、电子信息等技术的进步, 细胞培养装置也得到了充分的发展. 目前, 按照使用目的进行划分, 市场上成熟的商业化产品主要有以下几个类别: (1) 以生产大量细胞为目的, 如大型生物反应器、发酵罐等; (2) 以提供高度稳定可靠的细胞生长环境为目的, 如 CO<sub>2</sub> 培养箱等; (3) 以模拟细胞实际生长环境为目的, 如旋转式细胞培养系统<sup>[4]</sup>等; (4) 以提供连续观察条件为目的, 如细胞工作站小型培养系统等. 尽管细胞培养装置已经发展的较为成熟, 但是随着对细胞认识的不断深入, 生物学家尝试使用更多的新技术和新方法来研究细胞, 如力学<sup>[5,6]</sup>、电磁学<sup>[7-9]</sup>、光学<sup>[10-15]</sup>、温度<sup>[16-18]</sup>等, 同时他们对细胞的长时间连续观察和检测也提出了更高的要求. 这些对揭示生物体细胞的内部活动、信号传导、细胞间相互作用等具有极为重要的意义. 而这些研究将依赖于更有针对性的细胞培养装置来实现.

结合这一现状, 本文研制了一种小型的细胞培

**引用格式:** 谭逸斌, 张宇翔, 李中源, 等. 一种可实现原位监测的细胞培养信息化装置. 科学通报, 2014, 59: 1026-1032

Tan Y B, Zhang Y X, Li Z Y, et al. Informationalized cell culture device for real-time monitoring *in situ* (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 1026-1032, doi: 10.1360/972013-820

养信息化装置 (small informationalized cell culture device, SICCD). SICCD 综合了目前各类培养装置的特点, 以满足科研用户的实际需求为目标, 实现了装置的小型化、信息化、智能化. 该装置加强了与细胞检测设备的可联用性, 为细胞原位连续检测提供了保障. 同时该装置还实现了培养环境参数的实时监测及存储, 可以为用户的后续研究分析提供更全面的信息. 此外, 其远程交互功能的设计可以使用户通过移动终端及时掌握和调整培养环境参数, 极大地方便了用户的使用.

## 1 装置设计与实现

### 1.1 培养装置的系统设计

SICCD 以细胞培养微室和单片机为核心, 采用了模块化设计的思路. 图 1 为系统设计框图. 整套装置核心包括 3 个单元.

(i) 培养微室单元. 该单元包括培养腔模块和环境参数采集模块. 培养腔模块的主要作用是提供放置细胞培养器皿的空间, 设置水槽、通气孔、气体流量计及加热元件以便于稳定的控制系统环境, 同时预留传感器接口, 并在此基础上提供一定的与其他细胞连续检测设备联用的结构设计. 环境参数采集模块是利用传感器采集细胞培养微室内部的温度、湿度、CO<sub>2</sub> 气体浓度的数值, 并向后续数据处理单元提供前端数据.

(ii) 核心控制单元. 该单元包括信号处理模块和反馈控制模块. 信号处理模块是整套装置的大脑,

其主要作用是对前端采集的环境参数信号进行相应的处理, 使其数字化并进行编码. 结合串口控制程序将其传输、存储到桌面计算机终端. 在此基础上, 通过自行编制的软件, 将环境参数的实时数据进行图表化显示. 反馈控制模块的功能是衔接信号处理模块和培养腔模块, 根据用户设定的控制参数, 进行相应的指令调用和发送, 结合监测数据采用一定的算法对培养腔内部环境进行反馈调节, 使其能够维持稳定的状态.

(iii) 远程交互单元. 相对大型培养装置来说, 小型装置的抗干扰性相对差一些, 有一定的发生异常状况的概率. 当培养环境发生异常时, 在一定时间内装置如果无法通过自身反馈调节回复到正常培养状态, 该单元可以利用 GPRS 网络进行远程报警, 及时提醒用户人为介入干预. 此外, 该单元还可以向用户提供远程查询、远程参数设定等功能.

SICCD 系统的核心数据为培养环境参数, 图 2 为系统数据处理流程图.

### 1.2 培养装置的实现

根据系统总体设计, 采用表 1 中的器件实现了各模块的功能, 完成了整套微型培养装置的搭建工作, 图 3 为结合微操纵平台和倒置显微镜设计的小型培养腔实物照片.

完成了 SICCD 的系统搭建后, 进行了装置的稳定性测试. 结果表明, 装置在常规室温环境连续工作 48 h 的情况下, 对培养腔内的微环境控制较为理想, 温度基本维持在  $37 \pm 0.3$  °C, 湿度始终维持在 80% 以

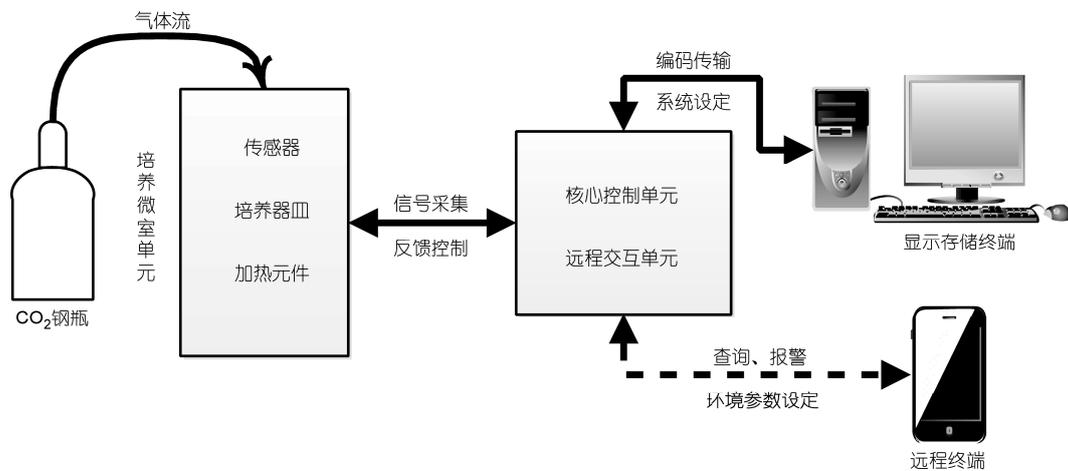


图 1 系统设计框图

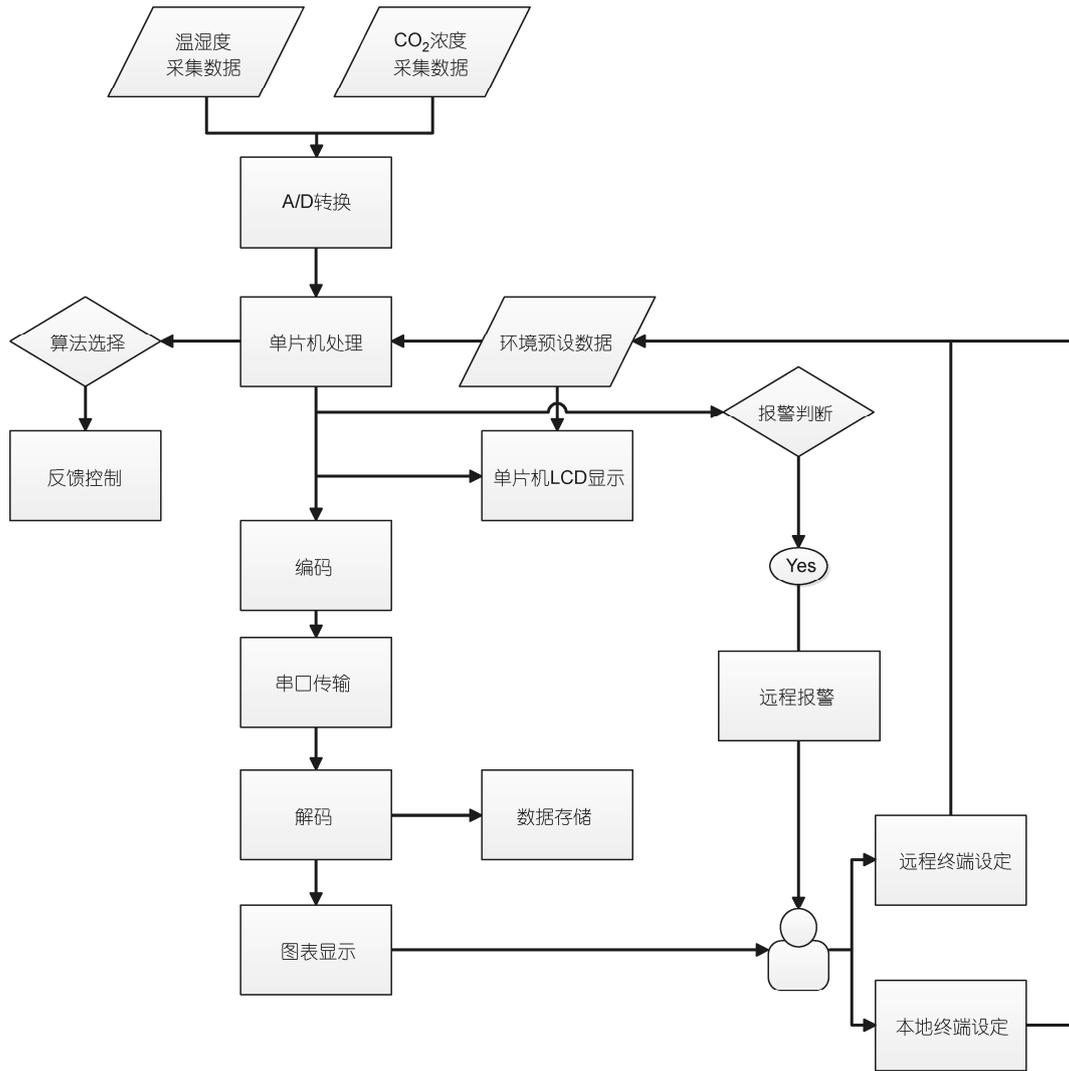


图2 数据处理流程图

表1 装置器件列表

模块	器件	来源
环境参数采集模块	DHT22 温湿度传感器	广州奥松电子有限公司
	SRH-5 红外非分光 CO <sub>2</sub> 传感器	武汉四方光电科技有限公司
信号处理模块	MSP430f449 单片机	Ti 公司
远程交互模块	TC35 系列双频 900/1800MHZ GSM 模块	西门子公司
培养腔模块	高透光度亚克力	自行设计定制
	氧化铟锡(ITO)导电玻璃	自行设计定制
	硅胶加热板	自行设计定制
	玻璃转子流量计	常州双环热工仪表有限公司

上, CO<sub>2</sub> 浓度也保持在 5% 左右, 符合细胞培养的环境需求. 为了进一步验证其实际工作效果, 本文进行了

细胞培养对照实验, 同时也对 SICCD 中培养的细胞进行了 24 h 连续原位观察.

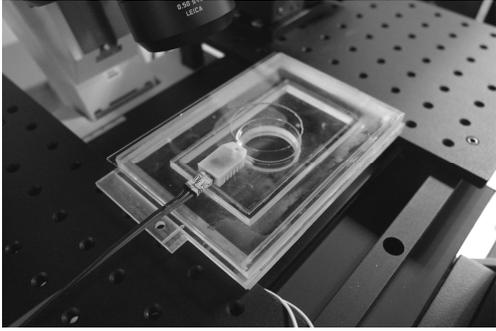


图3 基于倒置显微镜及微操纵平台设计的小型培养腔实物图

## 2 细胞培养实验及结果讨论

### 2.1 实验过程及器材

将复苏的人卵巢癌细胞 HO8910 细胞(南京先声药业提供)培养 3 d 后,用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液消化,进行细胞计数后置入 35 mm 的培养皿内,加入培养液后分别在 SICCD 和大型 CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养,采用倒置显微镜观察 24 h 内的细胞生长情况.胰蛋白酶-EDTA 消化液及高糖型改良杜氏伊格尔(DMEM)培养液由南京凯基生物科技发展有限公司提供,胎牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司提供,CO<sub>2</sub> 培养箱为 Thermo HERA Cell 150 培养箱. SICCD 中培养的细胞采用连续观察模式,显微镜为 Leica DMI3000B 倒置生物显微镜;CO<sub>2</sub> 培养箱中培养的细胞采用定时取出观察模式,显微镜为 Zeiss Axiovert 200 倒置生物显微镜.

### 2.2 细胞培养对照实验结果

两组细胞培养 24 h 后分别用显微镜进行观察,10 倍物镜下结果如图 4 所示.对照结果的光镜照片显示,大部分细胞均已贴壁且伪足伸展,细胞形态呈梭形,表明生长状况良好.从细胞聚集形态和增殖数量上来看,大型培养箱的培养效果要略优于 SICCD.为了进一步验证这一观察结果,分别对两组细胞进行了 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)染色<sup>[19]</sup>,通过测量吸光度来比较两组细胞活性,结果如图 5 所示,与显微镜观察结果吻合.

由于专业的大型细胞培养箱对湿度和 CO<sub>2</sub> 浓度的控制更为精确,其良好的密闭性和整体设计使得外界环境扰动对装置的影响很小,出现上述的对

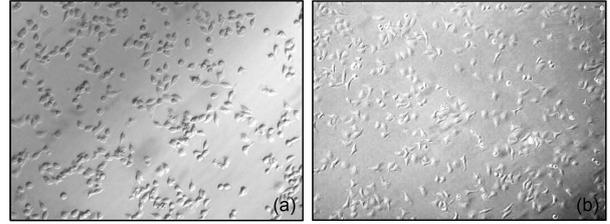


图4 SICCD(a)和 CO<sub>2</sub>(b)培养箱 24 h 培养结果

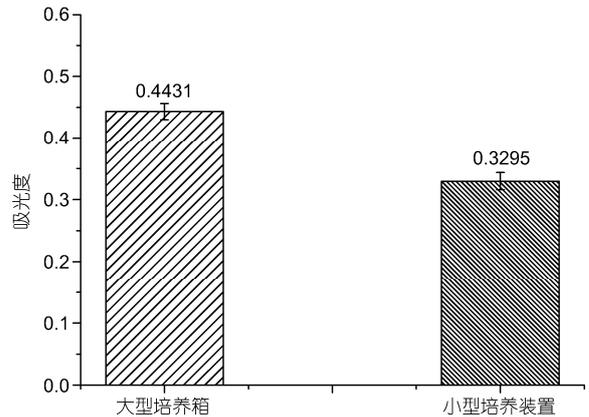


图5 细胞 MTT 染色吸光度测量结果

照实验结果是可以预期的.不可否认的是,尽管 SICCD 在细胞实际培养效果上仍无法与这些大型细胞培养箱相媲美,但是该装置已经可以较好地维持细胞体外生长的环境,能够满足细胞培养的基本要求.

### 2.3 细胞原位实时观察结果

虽然 SICCD 在培养效果上略逊一筹,但其培养微室的小型化设计可以使研究人员在培养过程中对感兴趣的细胞进行原位的连续实时观察,这是传统的培养箱无法实现的.在 SICCD 培养实验中,在光学显微镜的视野下选取了部分细胞进行了 24 h 原位观察,间隔一定的时间进行拍摄,观察结果如图 6 所示.

从图中发现,刚消化的细胞呈球形,处于未贴壁状态,在培养基中会产生小范围的移动.经过一段时间,细胞逐步开始贴壁生长,贴壁后的细胞位置基本保持不变.其中,A 箭头所指的单个细胞 0.5 h 后即开始贴壁,2 h 后基本完成了贴壁过程,细胞体平铺且伪足已伸展开.该细胞在 8 h 左右进入细胞分裂期,16 h 后分裂基本完成.而 B 箭头所指的相互靠近的几个细胞则经过了 4 h 才开始贴壁生长,整个贴壁过程持续了 12 h,伪足在消化 16 h 后才基本伸开,并且在 24 h 内也未见明显的细胞分裂增殖过程.原位实时

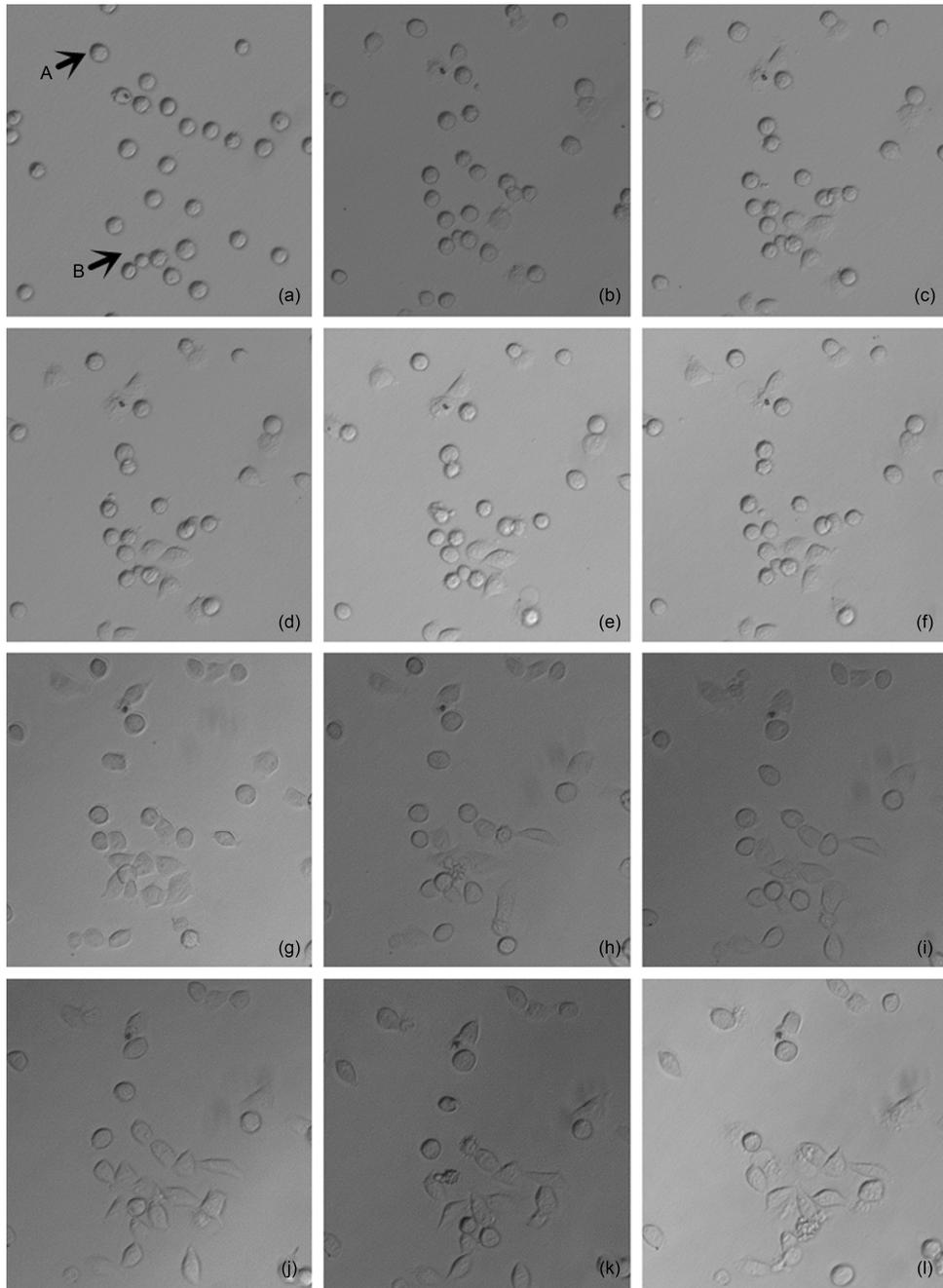


图6 光学显微镜下细胞原位实时观察结果

(a) 0 h; (b) 0.5 h; (c) 1 h; (d) 1.5 h; (e) 2 h; (f) 2.5 h; (g) 4 h; (h) 8 h; (i) 12 h; (j) 16 h; (k) 20 h; (l) 24 h

观察结果表明,在体外培养过程中,即使是处于同一培养环境中的同一类细胞,也可能会在贴壁生长和分裂增殖中表现出明显的差异.这些差异的产生一方面可能源于细胞处在不同的细胞生长周期,另一方面也可能是细胞间相互作用所导致.这一结果进一步凸显了原位实时观察的重要性,而 SICCD 正是

实现这一目标的有力保障.

## 2.4 环境数据监测结果

如同在描述系统设计时所提到的, SICCD 是一个信息化装置,它的另一个突出优势是在细胞培养的过程中可以对微环境数据进行了实时观察和监测.

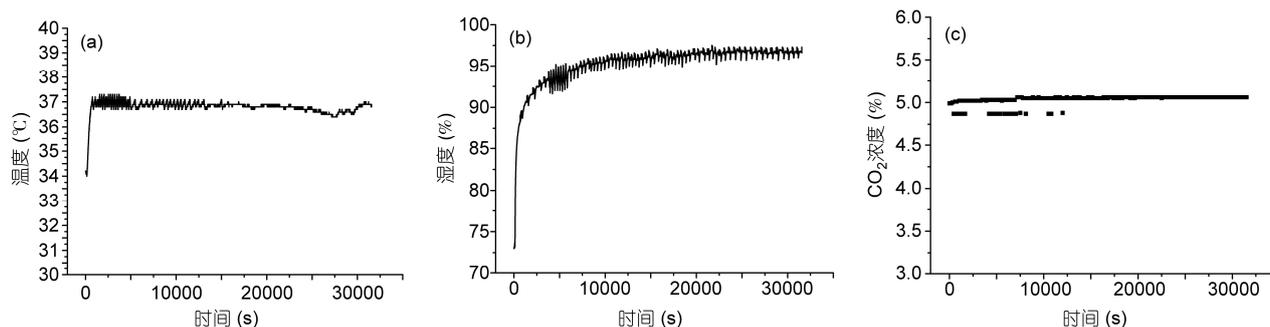


图7 环境参数调阅分析数据图

(a) 温度; (b) 湿度; (c) CO<sub>2</sub> 浓度

同时, 监测数据将以文本的形式实时地保存在本地计算机终端中, 并且可以通过远程终端进行查询. 通过对实时数据的回溯, 研究人员可以掌握细胞培养过程中各时间节点的环境参数. 图7是对一定时间段内的环境参数进行调阅分析的数据图, 包括了温度、湿度和 CO<sub>2</sub> 浓度的信息. 这些数据图中出现的环境参数的大幅度变化往往出现在最初的系统稳定过程, 或者与加样、换液等人为操作相关. 这将帮助我们更为准确地分析细胞培养过程中各种因素造成的影响, 对细胞生物学研究具有非常重要的意义. 同时, 对于小型装置来说, 这一功能也是加强其在细胞实验中可靠性的保障, 在实际应用中是不可或缺的.

### 3 结论与展望

经过细胞培养实验的验证, 可以得出以下结论. SICCD 可以满足细胞培养的基本要求, 在进行长时间培养时, 细胞能保持一定的增殖速率和较好的形态. 同时, 与显微镜等平台的结合设计也使 SICCD 具备了实现细胞原位实时观察的能力. 对环境数据的监测、回溯和远程交互等信息化设计确保了装置的可靠性, 同时也为细胞实时检测分析工作奠定了基础. 可以预期的是, 将 SICCD 与荧光光谱、拉曼光谱、膜片钳、细胞测温等检测平台结合, 将为细胞的各类信息的长时间连续检测提供稳定可靠的系统保障.

### 参考文献

- Harrison R G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1907, 4: 140–143
- Carrel A. Technique for cultivating a large quantity of tissue. *J Exp Med*, 1912, 15: 393–396
- Capstick P B, Telling R C, Chapman W G, et al. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*, 195: 1163–1164
- Mitteregger R, Vogt G, Rossmann E, et al. Rotary cell culture system (RCCS): A new method for cultivating hepatocytes on microcarriers. *Int J Artif Organs*, 1999, 22: 816–822
- Sugiura S, Nishimura S, Yasuda S, et al. Carbon fiber technique for the investigation of single-cell mechanics in intact cardiac myocytes. *Nat Protoc*, 2006, 1: 1453–1457
- Chen J, Zheng Y, Tan Q, et al. A microfluidic device for simultaneous electrical and mechanical measurements on single cells. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 014113
- Schulte A, Schuhmann W. Single-cell microelectrochemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 8760–8777
- Huang Y, Cai D, Chen P. Micro- and nanotechnologies for study of cell secretion. *Anal Chem*, 2011, 83: 4393–4406
- Wang X, Veruki M L, Bukoreshtliev N V, et al. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 17194–17199
- Sample V, Newman R H, Zhang J. The structure and function of fluorescent proteins. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 2852–2864
- Tsien R Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509–544
- Xie C, Li Y. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques. *J Appl Phys*, 2003, 93: 2982–2986

- 13 Xie C, Dinno M A, Li Y. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells. *Opt Lett*, 2002, 27: 249–251
  - 14 Kneipp K, Haka A S, Kneipp H, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles. *Appl Spectrosc*, 2002, 56: 150–154
  - 15 Baraga J J, Feld M S, Rava R P. Rapid near-infrared Raman spectroscopy of human tissue with a spectrograph and CCD detector. *Appl Spectrosc*, 1992, 46: 187–190
  - 16 Maestro L M, Rodríguez E M, Rodríguez F S, et al. CdSe quantum dots for two-photon fluorescence thermal imaging. *Nano Lett*, 2010, 10: 5109–5115
  - 17 Gota C, Okabe K, Funatsu T, et al. Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2766–2767
  - 18 Wang C, Xu R, Tian W, et al. Determining intracellular temperature at single-cell level by a novel thermocouple method. *Cell Res*, 2011, 21: 1517–1519
  - 19 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55–63
- 

## Informationalized cell culture device for real-time monitoring *in situ*

TAN YiBin, ZHANG YuXiang, LI ZhongYuan, ZHANG QiYing & GU Ning

*Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China*

It is important to acquire the precise and specific information about cellular physiological processes for the research of life science. The single-cell detection technique in real-time can help us to know more about the dynamic cellular individual difference and interaction. To realize the real-time detection of a single cell *in situ*, herein we developed a small informationalized device used on inverted biological microscope for cell culturing *in vitro*. This equipment can realize monitoring and feedback control of the internal environment by using SCM system. It can also display and store the environmental data in computer. Meanwhile, our machine can accomplish the remote interaction with users by GSM module. Finally, the performance of the device is verified through controlled experiments of HO8910 cell culturing, which demonstrates the cells are in the good shape after 24 h culture.

**cell culture device, informationalized, detection *in situ*, real-time monitoring, remote interaction, HO8910 ovarian carcinomacells**

doi: 10.1360/972013-820