

成牛血清低分子量成分在杂交瘤细胞体外 “无血清”培养中的利用

杜世或

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨)

利用适量的(3.5—14%)成牛血清低分子量成分超滤液(LMW-CS, 排阻 \bar{M} = 300 00)、10 mg/L转铁蛋白(T)、10 mg/L胰岛素(I)、20 μ mol/L乙醇胺(E)、40 n mol/L硒酸钠(S, 当以RPMI1640为基础液时用)等诸补充成分替代胎牛血清加到基础液RPMI1640或1:1(v/v)的IMDM与Ham's F₁₂混合液中构成本实验性“无血清”培养基。培养在此种培养基中的杂交瘤细胞其最高细胞密度可以达到甚至超过培养在含胎牛血清的生长培养基中的最高细胞密度。对于杂交瘤细胞生长, 4%的LMW-CS基本满足要求; T、I、E、S四种补充成分中乙醇胺(E)是首位影响因子, LMW-CS与TIES两部分之间的协同作用极为显著, 两者缺一不可。

关键词 无血清培养基; 杂交瘤细胞培养; 成牛血清

单克隆抗体(McAb)的广泛应用使其大规模生产成为必要。同杂交瘤的体内培养法相比较, 体外培养法生产McAb也将兴起。由于胎牛血清昂贵难得, 也为利于实验分析, 某些实验室近年发展了哺乳动物细胞的无血清培养, 寻找胎牛血清的替代物。Iscove的无血清培养基首先被用于杂交瘤的培养^[1]。其他几个实验室也相继报告了某些杂交瘤可在无血清的化学限定性培养基中生长^[2]。

为了发展体外大规模培养杂交瘤细胞, 同时易于McAb纯化, 降低成本和充分利用成年哺乳动物血清这一自然资源, 本工作试图探讨在体外“无血清”培养中利用成年哺乳动物血清低分子量成分作为添加成分的可能性和根据。实验的结果得出肯定的结论而且是有实用价值的。

材料和方法

(一) 细胞株

用于本研究的主要细胞株BE₂(ATC

C TIB182)是骨髓瘤NS-1源的鼠-鼠杂交瘤细胞株, 分泌IgM, 特异地针对神经鞘类脂。

(二) 试剂

细胞培养用的所有试剂除了特别标明购自GIBCO外, 均属Sigma产品。原液经微孔滤器除菌。

(三) 低分子血清超滤液的制备

成牛血清(CS, 购自GIBCO)及胎牛血清(FCS, 购自GIBCO)的低分子成分超滤液是通过“Amicon”超滤器经超滤膜PM30(排阻 \bar{M} = 30000)制得的。最终所得超滤液与浓缩液体积比约成3:1。

(四) 培养基

1. 基础培养基: 补足到有2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L丙酮酸钠、1.2 g/L NaHCO₃、25 mmol/L HEPES、

本文于1989年8月25日收到。

本文系在加拿大Alberta Research Council做的部分工作, 得到Drs. Gerson, Keshavartz, Kole, Jones以及Biomira Inc.的Dr. Suresh的关心和帮助, 谨致谢意。

100IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、和50 μ g/ml 庆大霉素的 RPMI 1640 液或者IMDM与 Ham's F₁₂(皆购自GIBCO)的1:1(v/v)的混合液作为基础培养基。

2. 血清培养基: 用前, 基础培养基添加10%胎牛血清。

3. 实验性“无血清”培养基: 以10 mg/L转铁蛋白(T)、10mg/L胰岛素(I)、20 μ mol/L乙醇胺(E)、40 n mol/L硒酸钠(S, RPMI1640 为基础液时用)及不同含量的成牛血清低分子量成分超滤液(LMW-CS, 见结果)等诸补充成分替代血清培养基中的胎牛血清。

(五) 细胞生长实验和细胞计数

离心收集培养在含10%FCS培养基中的受试细胞, 再用基础液洗, 洗后重悬在基础液中并调整到所需浓度, 接种入装有不同的实验性培养基的25cm²或75cm²培养瓶中(复样), 含培养细胞的初始浓度在5 \times 10⁴个/ml, 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中

培养8—10天, 每日计数, 以观察和比较其生长曲线。细胞计数是通过血球计数板在用0.5%台盼蓝染色(排斥试验)后进行的, 分别统计活细胞数、细胞总数及细胞活度。

结 果

(一) 一种有效的实验性“无血清”培养基

本研究成功地利用3.5—14%的LMW-CS、10mg/L 转铁蛋白(T)、10 mg/L 胰岛素(I)、20 μ mol/L 乙醇胺(E)、40 n mol/L 硒酸钠(当以 RPMI 1640 为基础液时用) 等诸补充成分替代血清培养基中的胎牛血清构成本实验性“无血清”培养基。正如表1和2所示, 培养在此种培养基中的杂交瘤细胞其最高细胞密度可以达到甚至超过培养在含胎牛血清的标准生长培养基中的最高细胞密度。所有的实验结果证明, 本报告中的实验性“无血清”培养

表 1 杂交瘤细胞BE₂在本实验性“无血清”培养基中的生长
Table 1 Growth of hybridoma cell line BE₂ in the experimental “Serum-free” medium

培养基 Medium	活细胞密度峰值 Maximum of viable cell density ($\times 10^5$ /ml)
RPMI1640 + 10%FCS	8.52
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+10%FCS	9.72
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+10%FCS + TIE	12.88
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+TIE	0.88
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS	1.76
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+TIE	10.68
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+T	2.84
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+I	4.40
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+E	6.12
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+TI	4.80
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+IE	3.44
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+4%LMW-CS+TE	8.48
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+20%CS	2.40
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+20%CS+TIE	2.00

FCS:Fetal calf serum; CS:Adult cattle serum

LMW-CS:Low molecular weight ultrafiltrate from adult cattle serum

T:Transferrin; I:Insulin; E:Ethanolamine; S:Sodium selenite

表 2 不同添加量的成牛血清低分子超滤液对BE₂细胞生长的影响
Table 2 Effect of various concentrations of LMW-CS on growth of BE₂

培养基 Medium	活细胞密度峰值 Maximum of viable cell density ($\times 10^5/\text{ml}$)
RPMI1640 + 10%FCS	8.24
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+10%FCS	7.94
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+10%FCS+TIE	13.02
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+TIE	0.02
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+3.5%LMW-CS	0.12
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+7%LMW-CS	0.24
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+14%LMW-CS	1.68
UMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+20%LMW-CS	1.26
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+3.5%LMW-CS+TIE	9.34
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+7%LMW-CS+TIE	9.74
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+14%LMW-CS+TIE	10.22
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+20%LMW-CS+TIE	4.16
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+20%CS	1.76
IMDM:Ham'sF ₁₂ (1:1)+20%CS+TIE	1.40

基是可行的,成年哺乳动物血清低分子成分可有效地用作生长培养基的添加成分。从生产角度看,此培养基为体外大规模培养杂交瘤细胞生产McAb提供一条切实可行的途径。

(二) 成牛血清低分子成分(LMW-CS)对细胞生长的影响

比较在本实验性培养基中不同含量的LMW-CS对细胞生长影响时观察到(表2),其含量范围在3.5—14%时细胞都能显现良好生长,3.5%的LMW-CS就能基本满足杂交瘤细胞生长的需要,其支持效应与7%、14%的LMW-CS时显现的相近,高到20%时细胞生长反而显现阻抑。结果表明,选择4%的LMW-CS是适宜的。

(三) 添加成分T、I、E及S对细胞生长的影响

从表1和表3可见,此四种补充成分在适宜的浓度下都有支持细胞生长效应,其中乙醇胺(E)是首位影响因子;其余三种成分的影响无显著差别,处于相近的水平。

(四) LMW-CS与TIES的协同作用

本实验中观察到LMW-CS与TIES之间有极其明显的协同作用。在本实验性培养基所有实例(如表1和2),基础液添加LMW-CS在有转铁蛋白、胰岛素、乙醇胺及硒酸钠(IMDM本身含硒酸钠)存在下确实地支持杂交瘤细胞的生长;在基础液中单独补充LMW-CS或单独补充TIES,杂交瘤细胞几乎不生长且存活期短,只有在这两部分补充成分共同存在下才保证细胞的正常生长,两者缺一不可。这暗示,几种大分子物质与一些小分子物质之间在支持杂交瘤细胞生长上表现有密不可分的关联。

讨 论

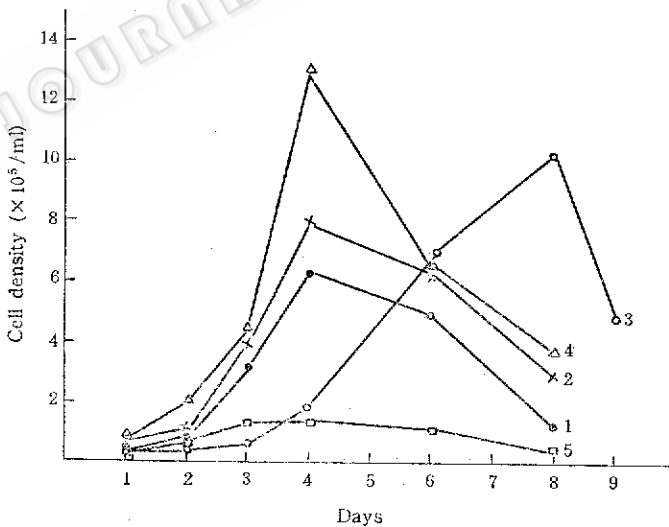
已有工作指出,对血清培养基补充胎牛血清可透析的成分能维持杂交瘤细胞的生长和McAb的分泌^[3],这与我们在胎牛血清低分子超滤液(LMW-FCS)方面的结果是相符的。本研究进一步提供了有实用价值的资料,成年哺乳动物(如成牛)血

表 3 四种生长因子(T、I、E、S)对BE₂细胞生长的影响Table 3 Effect of growth-stimulating factors (T, I, E, S) on BE₂ cells

培养基 Medium	活细胞密度峰值 Maximum of viable cell density (Per ml)	细胞活度 Viability (%)
RPMI1640	0.20×10^5	37.5
RPMI1640 + 10%FCS	8.55×10^5	89.3
RPMI1640 + 14%LMW-CS + T	1.24×10^5	61.3
RPMI1640 + 14%LMW-CS + I	1.28×10^5	69.0
RPMI1640 + 14%LMW-CS + E	3.48×10^5	77.7
RPMI1640 + 14%LMW-CS + S	1.56×10^5	65.9

清低分子量成分超滤液配合 TIES 以替代血清培养基中的胎牛血清构成的“无血清”培养基可以确实地支持杂交瘤细胞的生长。这些结果表明, 血清中的绝大多数大分子成分(蛋白质)是不为杂交瘤细胞生长所必需的。本实验的结果暗示, 成牛血清中含有抑制杂交瘤细胞生长的物质成分, 以致成牛血清补充以 TIES 时细胞照样生长不良, 增殖受限且速率慢, 有时成牛血清还不如其低分子成分超滤液支持杂交瘤

的生长(表 1、2 和图 1)。实验说明, 就杂交瘤细胞所需要的血清中低分子成分而论, LMW-CS 接近 LMW-FCS, 基本满足参与维持细胞生长的需要。据报道, 源于骨髓瘤 NS₁ 的杂交瘤细胞在只含 TIES 的无血清培养基中生长不好, 当满足其对 LDL(低密度脂蛋白)、油酸或亚油酸需求时才生长良好^[4]。本实验中 BE₂ 株(NS₁ 来源的)在添加了 LMW-CS 的本实验性培养基中生长相当好, 说明本实验性培养基

图 1 在不同的培养基中 BE₂ 细胞的生长曲线Fig. 1 Growth curves for BE₂ cells in various media

1. RPMI 1640 + 10% FCS
2. IMDM:Ham's F₁₂ + 10% FCS
3. IMDM:Ham's F₁₂ + 14% LMW-CS + TIE
4. IMDM:Ham's F₁₂ + 10% FCS + TIE
5. IMDM:Ham's F₁₂ + 20% CS + TIE

中LMW-CS代替了大多数无血清培养基中除了T、I、E及S之外的补充成分(如, 亚油酸和油酸、氢化可的松或睾甾酮、微量元素混合物、抗坏血酸等)^[5]的功能。成牛血清低分子成分的利用为杂交瘤的体外无血清培养提供一条新途径。成年哺乳动物血清来源广泛易得, 可望降低培养基成本; 此种培养易于McAb纯化; 对培养基的配制也比较简便。此培养基是有实用前景的。

本工作中观察到(图1), 杂交瘤对本实验性“无血清”培养基有一个适应期, 同在血清培养基中相比其生长曲线初始有1至2天的迟缓期, 细胞密度峰值出现的时间也随之延迟1至2天, 对数期细胞倍增时间也稍有延长, 在血清培养基中为16h, 而在此培养基中为20h, 但细胞活度皆在90%左右。Murakami在其无血清培养实验中也观察到类似的适应期^[6]。

可见, 血清培养基并不是唯一最适宜的生长培养基, 可以找到适宜的化学限定性无血清培养基, 只是目前有的生长因子还未被发现而已。

T、I、E、S是杂交瘤细胞生长所必需的主要生长因子, 甚至FCS培养基添加T、I、E、S时也进一步提高其细胞生长速率(表1和2)。在本实验, 事先选定了它们各自的适宜浓度^[2], 此四种补充成分之中E是最基本的生长因子, 这与Murakami的结果是一致的^[6]。

在刺激杂交瘤细胞生长效应上血清低分子成分与TIES之间有着明显的协同作用, 它们之间如何协同, 有待探讨。T、I这样的大分子除了具本身特有的功能外, 也可以是小分子物质的功能载体^[2]。某些研究者采用白蛋白作为无血清培养基的主要添加成分之一。本实验性培养基没添加白蛋白, 推测有某种机制替代了白蛋白的某种功能, 如, 转铁蛋白代替其载体功能。

采用本实验性无血清培养基在反应器中体外长期培养杂交瘤细胞的实验有待进行。本实验性培养基系列也可维持人瘤细胞等其他哺乳动物细胞的生长和保存, 详细报道待见另文。

参 考 文 献

- [1] Andersson, J. and Melchers, F.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 81:130—139, 1978.
- [2] 杜世或: 生物工程学报, 5:87—91, 1989.
- [3] Adamson, S. R. et al.: *Biotech. letters*, 5:573—578, 1983.
- [4] Kawamoto, T. et al.: *Anal. Biochem.*, 130:445—453, 1983.
- [5] Kovar, J. and Franek, F.: *Immunol. Letters*, 7:339—345, 1984.
- [6] Murakami, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79:1158—1162, 1982.

THE USE OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT COMPONENTS FROM ADULT CATTLE SERUM IN *IN VITRO* CULTURE OF HYBRIDOMA CELLS

Du Shiyu

(Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin)

This paper reported a “serum-free” medium supporting the growth of hybridoma cells *in vitro*.

Low molecular weight fraction from adult cattle serum (LMW-CS) passed through an Amicon PM30 filter (M.W. exclusion = 30000), 10mg/L transferrin (T), 10mg/L insulin (I), 20 μ mol/L ethanolamine (E), and 40 nmol/L sodium selenite (S) as the replacement of fetal calf serum (FCS) in culture medium were added to basal medium, RPMI1640 or 1:1 mixture (by volum) of IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) and Ham's F12, to compose the experimental “serum-free” medium. Maximum density of hybridoma cells cultured in such medium can reach and sometimes exceed that in FCS-containing medium. For the growth of hybridoma cells, 4% LMW-CS in the medium was found to be able to meet the basic requirement, ethanolamine (E) may be the primary growth-supporting factor among the 4 essential supplements of T, I, E, and S; and a significant synergistic action between LMW-CS and TIES on the cell growth was found.

Key words

Serum-free medium; culture of hybridoma; adult cattle serum