

牛视网膜提取物对人—鼠杂合细胞抗体产生的影响^①

张昌卿¹ 刘乐和² 肖锡宾¹ 何凤仪³ 高世梅³ 方丹云² 欧深明¹

(1 中山医科大学肿瘤医院; 广州, 510060 2 中山医科大学微生物学教研室 3 广州畜牧场兽医站)

摘要 目的: 探讨牛视网膜提取物对人—鼠杂合细胞抗体产生的影响。方法: 在 RPMI 1640 完全培养基(CM)中加入 20 mg/L 牛视网膜提取蛋白, 配成牛视网膜培养基(BREM)。用 MTT 测定、细胞克隆技术、夹心 ELISA 方法和染色体分析, 比较人—鼠杂合细胞 G12 在两种培养条件下的细胞活力、克隆效率、人 IgM 分泌和人染色体阳性细胞比率之间的差异。结果: 用 BREM 培养的 G12 细胞活力高于用 CM 培养($P < 0.05$)。用 BREM 培养的 G12 细胞克隆中分泌人 IgM 者占 12/24, 用 CM 培养的克隆只占 2/47。G12 细胞传代培养 3 个月后, 用 BREM 培养的上清人 IgM 水平 A_{490} 为 0.335 ± 0.050 用 CM 培养的上清为 0.070 ± 0.027 ($P < 0.05$)。前者含人染色体阳性的细胞为 20%, 后者 25%, 两者间没有差异($P > 0.05$)。结论: 添加牛视网膜提取物的培养基可以提高人—鼠杂合细胞的活力和人 IgM 抗体的分泌能力。维持人源性 IgM 持续分泌的条件不仅取决于杂合细胞中人染色体的存在和稳定, 还有其它未知因素在起作用, 牛视网膜提取蛋白可以提供这方面的需要。

主题词 杂交细胞; 抗体; 肿瘤; 视网膜提取物; 牛

中图分类号 R 73

Effects of Bovine Retinal Extract on Production of Human IgM in the Culture of Human—Mouse Hybridoma Cells

Zhang Changqing¹ Liu Lehe² Xiao Xibin¹ He Fengyi³
Gao Shimei³ Fang Danyun² Ou Shenming¹

(1 Tumor Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060 2 Department of Medical Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences 3 Veterinary Station in Guangzhou Livestock Farm)

Abstract Objective: To study the effects of bovine retinal extract (BRE) on production of human IgM (hIgM) in the culture of human-mouse hybridoma cells named G12. **Methods:** BRE-medium (BREM) was prepared by supplementing 20 mg/L protein from BRE to the complete RPMI 1640 medium (CM). The cell viability plating efficiency, the levels of hIgM in supernatant and the rate of human chromosome positive cells in both culture were detected with MTT assay, clone technique, double antibody sandwich ELISA and chromosome analysis method respectively. **Results:** The viability of G12 cell; in BREM was higher than that in CM ($P < 0.05$). In the growth at single cell level, 12/24 of clone secreting hIgM on BREM was obtained, by contrast 2/47 in CM. After generating the cells for 3 months, hIgM levels (A_{490}) of both supernatant (BREM-G12 and CM-G12) were 0.335 ± 0.050 and 0.070 ± 0.027 ($P < 0.05$). 20% of G12 cells in BREM and 25% of G12 cells in CM presented human chromosomes ($P > 0.05$). **Conclusion:** The G12 cells cultured in BREM showed higher cell viability and the ability of secreting hIgM than those in CM. Besides the stability of human chromosome presented in G12 cells, there are some factors in BREM, which could be responsible to the production of hIgM in culture of G12 human-mouse hybridoma cells.

Subject headings hybrid cells; antibodies; neoplasm; retina extracts; cattle

牛视网膜提取物(bovine retinal extract, BRE)具有促进脐带血管内皮细胞,角膜纤维母细胞生长的作用^[1,2]。它的主要成份及促进生长作用的研究,目前仍在进行。本研究将BRE作为人-鼠杂交瘤细胞培养的添加剂,发现它对杂交瘤细胞的增殖及抗体的产生有一定作用,报道如下。

1 材料和方法

1.1 BRE培养基的配制

由本校微生物学教研室刘乐和教授提供BRE。将蛋白为1g/L的BRE加入含 $\phi=10\%$ 小牛血清(广州市畜牧场提供), 200×10^3 U/L青霉素、链霉素,0.02 mol/L谷氨酸钠的RPMI 1640(Sigma)完全培养基(CM)中,使培养基中所含提取物蛋白的最终浓度为20 mg/L即为牛视网膜培养基(BREM)。

1.2 人-鼠杂交瘤细胞的来源

从手术切除的人甲状腺癌转移淋巴结分离出 1×10^8 的淋巴细胞,与 1×10^7 的小鼠X63-Ag 8°653骨髓瘤细胞混合后,按杂交瘤技术常规在500 g/L聚乙醇(PEG)作用下融合^[3],用含 $\phi=20\%$ 小牛血清的HAT培养基(Sigma公司)对融合细胞进行选择培养。14 d后,筛选,保留人IgM或IgG阳性的杂交细胞生长孔进行扩大培养,建立人-鼠杂交瘤细胞株。

1.3 BREM对人-鼠杂交瘤细胞生长的影响

由于融合未获人IgG抗体阳性孔。因此选取生长旺盛的人IgM阳性孔G12扩大培养后进行下述试验。

1.3.1 克隆生长效率 将G12细胞分别混悬在BREM及CM培养基中(BREM-G12, GM-G12)。按有限稀释法在96孔内以每孔1个细胞的密度置37℃, $\phi=5\%$ CO₂饱和湿度下培养20 d,计数各板内的集落生长率,测定其中的人IgM阳性孔。

1.3.2 BREM对人-鼠杂交瘤细胞增殖活力的影响 按每孔2 500个,1 250个,625个细胞数种6个复孔置CO₂培养箱37℃培养72 h后,用MTT[3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide]测定^[4]2种培养基培养G12细胞的增殖差异。

1.3.3 G12细胞抗体分泌的稳定性 调节BREM-G12和CM-G12细胞密度到 2×10^9 /L收集培养第7天的上清于-20℃保存,待测人IgM。各用1块24孔板,以每孔1 mL的细胞悬液分别培养,隔天弃去1/2细胞混液加入等量BREM或

CM培养基。持续培养3个月后,用夹心ELISA方法^[5],测定细胞密度为 2×10^9 /L的上清中人IgM吸光度[A₄₉₀]值。与起始培养上清的人IgM A₄₉₀值作对比。

1.3.4 杂合细胞的染色体检查 将培养3个月后的BREM-G12, CM-G12细胞和小鼠X63-Ag 8°653骨髓瘤细胞,进行常规染色体检查,计数100个细胞中含有完整的人染色体细胞的比率。

2 结果

2.1 G12细胞的克隆生长效率

用BREM培养的G12细胞集落生长率为25%(24/96),低于普通(CM)培养基的集落生长率49%(47/96)。人IgM阳性孔率前者为50%(12/24),高于后者4.3%(2/47),见表1。

表1 BREM培养基对人-鼠杂交瘤G12细胞克隆效率的影响

Table 1 The effects of BREM on the plating efficiency of G12 human-mouse hybridoma cells n (%)

Medium	N ³⁾	Plating efficiency	Clones secreting human IgM
CM ¹⁾	96	49(47/96)	4.3(2/47)
BREM ²⁾	96	25(24/96)	50(12/24)

1)CM: RPMI 1640 medium supplemented with $\phi=10\%$ calf serum, 200×10^3 U/L of penicilline and streptomycins 0.02 mol/L L-glutamine. 2) BREM: CM supplemented with 20 mg/L of BRE. 3) N: the number of plating G12 cells in 96 well plate

2.2 G12细胞增殖测定

用BREM培养的G12细胞增殖率高于用CM培养基培养的G12细胞($P<0.05$)见表2。

表2 BREM培养基对人-鼠杂交瘤G12细胞生长的影响

Table 2 The effects of BREM on the growth of G12 human-

Cells ¹⁾	Cell viability (A ₄₅₀) ²⁾		
	2 500 (cells/well)	1 250 (cells/well)	625 (cells/well)
CM-G12	0.353±0.021	0.256±0.038	0.178±0.030
BREM-G12	0.482±0.041	0.338±0.078	0.235±0.019
t test	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

1)CM-G12/BREM-G12: G12 Cells cultured in CM. BREM with 6 wells plate after 5 d. 2) The growth of G12 cells detected by MTT method

2.3 G12 细胞抗体分泌的稳定性

G12 细胞持续传代培养 3 个月后, BREM-G12 上清人 IgM 阳性值 A_{490} 是初始培养的一半左右, 而 CM-G12 上清中人 IgM 为阴性。见表 3。

2.4 G12 细胞的人染色体分析

G12 细胞在 BREM/CM 中持续传代 3 个月后, 染色体众数(mode of chromosome)仍高于小鼠母本骨髓瘤 X63-Ag 8⁶⁵³ 细胞, 表明它们仍为杂合细胞。具有人染色体细胞的比例在 BREM-G12 为 20%, CM-G12 为 25%, 两者间无统计差异, 见表 4。

表 4 人-鼠杂交瘤 G12 细胞的染色体分析

Table 4 Analysis of the chromosome from G12 human-mouse hybridoma cells

cells ¹⁾	number of chromosome n / cell	mode of chromosome n / cell	the cells with human chromosome (%)
CM-G12	48~110	84~94	25
BREM-G12	39~96	68~78	20
G12 CM-653	50~54	50~54	0

1) CM-G12/BREM-G12; G12 cells cultured in CM/BREM *t* test; $P > 0.05$; CM-653; mouse myeloma cells X 63-Ag 8⁶⁵³ cultured in CM

3 讨论

人-鼠融合技术中, 因人源性染色体的丢失, 人抗体的分泌也将随之减少直至丧失。本研究在人-鼠杂合细胞 G12 的培养过程中, 采用在培养基中添加牛视网膜提取物(BRE)的方法, 与完全培养基(CM)相比, 它能使人-鼠杂合细胞人 IgM 阳性孔的克隆效率达到 50%, 高于 CM 培养 (4.3%)。在 600~2 500 个/孔细胞范围内, 用 MTT 测定, 添加 BRE 培养的 G12 细胞增殖高于完全培养基 ($P < 0.05$)。用 BREM 和 CM 对 G12 细胞持续培养 3 个月后, 在 BREM 上清中, 人 IgM 水平 (A_{490}) 虽较培养初期降低了一半 ($A_{490} = 0.335 \pm 0.052$), 但仍显著高于用完全培养基(CM)培养的 G12 细胞上清 ($A_{490} = 0.070 \pm 0.027$)。上述结果表明, 在培养基中添加 BRE 不仅提高了 G12 细胞克隆后人 IgM 的阳性率和细胞的增殖能力, 而且在持续培养状态下还可以延长杂合细胞分泌人源性 IgM 的时间, 减少了反复进行细胞克隆的工作量。

染色体分析显示, 用 BREM 和 CM 持续培养 3

表 3 BREM 培养基对人-鼠杂交瘤 G12 细胞分泌人 IgM 的影响

Table 3 The effects of BREM on human IgM secreting by G12 human-mouse hybridoma cells

Cells ¹⁾	The levels of human IgM (A_{490}) ²⁾	
	1 week	3 months
CM-G12	0.687±0.051	0.070±0.027
BREM-G12	0.778±0.042	0.334±0.050
<i>t</i> test	$P > 0.05$	$P < 0.5$

1) CM-G12/BREM-G12; G12 cells (2×10^6 /mL) continually cultured in CM/BREM with 24-well plate from 1 week to 3 months; 2) The levels of human IgM in cell cultured supernatant tested by double antibody sandwich ELISA

个月后的 G12 细胞, BREM-G12 的染色体众数 (68~78) 少于 CM-G12 (84~94), 有趋于减少的倾向。膜中具有人染色体细胞的比例分别为 20% 和 25%, 无统计学差异。提示 G12 细胞能持续分泌抗体的原因比较复杂, 除了保持细胞内人染色体的稳定外, 还受其它因素的影响, 牛视网膜蛋白内含有能保证 G12 细胞持续分泌抗体的必要成份。

(细胞染色体分析得到中山医科大学肿瘤研究所方熾教授的帮助, 特此表示感谢)

参 考 文 献

- 1 江丽芳, 刘乐和, 郭辉玉. 人脐静脉内皮细胞的培养和连续传代. 中山医科大学学报, 1993, 14(4): 288
- 2 Glaser B M. Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. J Cell Biol, 1980, 84(4): 298
- 3 刘乐和, 李少冰, 麦小萍. 产生登革型病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株的建立. 病毒学杂志, 1987, 12(1): 20
- 4 Mossman T. Rapid colorimetric for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983, 65(3): 55
- 5 郑怀竟, 韩松. 临床检验 ELISA 指南. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994, 12~17

(1997-12-19 收稿 1998-06-22 修回)