

DMSO 抑制杂交瘤增殖促进抗体的分泌

王贤辉 贺书云 张 阳 徐 静 冯 强 李 铃 米 力* 陈志南*

(第四军医大学细胞工程中心, 西安 710033)

摘 要 利用 DMSO 促进杂交瘤细胞分泌单克隆抗体, 并对其作用机制进行了研究。结果表明在杂交瘤细胞对数生长后期添加 0.6% 浓度的 DMSO 与对照相比可提高抗体的产量 2 倍; 流式细胞仪检测细胞周期表明此时 83.7% 的细胞处于 G1 期; 免疫印记结果显示在有 DMSO 作用下杂交瘤细胞 P27 蛋白表达显著升高。因此, DMSO 可通过促进 P27 蛋白的表达, 抑制杂交瘤细胞的增殖, 从而提高杂交瘤细胞分泌抗体的能力。对 DMSO 进一步在高密度大规模培养杂交瘤细胞中的应用具有重要意义。

关键词 DMSO, 杂交瘤细胞, P27

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0568-04

用生物反应器进行动物细胞大规模生产过程中, 细胞的快速生长对营养物质的需求较高, 大多数用于合成细胞自身组成蛋白, 而对外源蛋白的合成来说相对减少。因此, 细胞快速生长的一个负面影响是外源目的蛋白的生成量减少。随着阐明细胞周期调控的分子机制, 现在可运用多种方法调控细胞周期, 实现动物细胞的大规模高产量培养。同时, 抑制细胞的增殖, 减少细胞的分裂可潜在性的减少细胞群体的基因型的改变。在药物的生产过程中, 长时间保持其生产的一致性最为重要。

在杂交瘤细胞培养中, 有以下几种方法可提高单抗的产量 (a) 确定高分泌量、基因型稳定的克隆株 (b) 延长细胞的存活减少细胞凋亡 (c) 运用添加剂提高蛋白质的产生和分泌。虽然, 这些方法均可提高单抗的产量, 但前两种方法耗时, 而添加刺激试剂可快速影响抗体的产生, 简单的操作适于获得大量抗体。在确定这些试剂时, 需考虑添加剂的一些特征: ① 容易使用和操作; ② 对过程和操作安全; ③ 花费少; ④ 最主要是可大量供应; ⑤ 不改变终产品质量。在本文, 我们描述了 DMSO 这种培养基添加剂具有这些特点, 可促进杂交瘤细胞产生抗体。

DMSO 已广泛用于细胞培养。最为常见的是冻存细胞。发育生物学家运用 DMSO 诱导骨髓瘤和神

经胶质细胞分化^[1]。Saito 等研究表明, DMSO 可抑制人肝癌细胞增殖, 促进细胞分化^[2]。虽然 DMSO 对细胞作用的机制已被研究^[3], 但 DMSO 和蛋白的产生之间的联系目前还不清楚。细胞分化试剂如正丁酸钠已用于刺激人肝癌细胞内源性蛋白的表达和各种重组蛋白在 CHO 细胞及杂交瘤细胞中的表达^[4]。此外, Oh 等研究显示适应高渗透压的杂交瘤可提高 60% 的单抗产量, 添加 NaB 可再增加 40% 的产量^[5]。本研究显示, 在适宜的细胞培养时机, 添加适宜浓度的 DMSO 可提高 H18 杂交瘤细胞^[6]分泌抗体 2 倍的产量, 并对其抑制杂交瘤细胞增殖, 促进抗体分泌的机理进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和 DMSO 的添加

杂交瘤细胞 H18 培养于 CCM-1 无血清培养基中, 谷氨酰胺 2.5mmol/L, 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 75mL 培养瓶中, 37℃ 孵箱培养; 在合适细胞密度时, 按 0.3%、0.6%、0.9% 浓度将 DMSO (Sigma) 直接加入培养的细胞中; 不同时间点取细胞进行台盼蓝染色, 血球计数板计数; 各瓶细胞离心后, 取其上清分装、-20℃ 冻存, 留待以 ELISA 检测其中鼠源性抗体浓度。

收稿日期 2003-12-18, 修回日期 2004-03-15。

基金项目 国家 863 计划生物工程主题项目 (No. 2002AA217011) 和国家重大科技专项 (No. 2002AA2Z3441)。

* 通讯作者。Tel: 86-29-3374547; Fax: 86-29-3293906; E-mail: chcerc2@fmmu.edu.cn, milicec@vip.sina.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2 ELISA 测定抗体的浓度

夹心 ELISA 检测抗体的浓度 ,山羊抗小鼠 IgG 抗体(Sino-American Biotech 公司)包被 96 孔板 ,5% 脱脂奶粉封闭 ,100 μ L/孔 ,室温 30min ,标准品和样品均进行倍比稀释后 ,100 μ L/孔 ,每条件设 3 个复孔 ,室温反应 2h ,洗板后 ,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(Pierce 公司)100 μ L/孔 ,室温反应 2h ;洗板后加 TMB(R& D 公司)100 μ L/孔 ,避光室温 30min ,加 2mol/L 硫酸终止反应 ,于酶联免疫检测仪上 450nm 处检测各孔光吸收值 ,以本室纯化之单克隆抗体 HAb18(1mg/mL)为标准品。

1.3 Western blot 检测杂交瘤细胞 P27 的表达

用细胞裂解液裂解 H18 细胞 2×10^6 个 ,提取蛋白质 ,Bradford 法蛋白质定量 ,用相同量的细胞蛋白质进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 ,电转 PVDF 膜(按说明书操作) ,一抗为兔抗鼠 P27 多克隆抗体(1 : 400) ,二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1 :5000) ,ECL Plus 发光显色。

1.4 细胞周期的测定

加入不同浓度 DMSO 的杂交瘤细胞 ,培养 36h 后 ,收集细胞加入预冷至 4 $^{\circ}$ C、pH 7.4 的 PBS 液洗涤 2~3 次 ,70% 乙醇固定 ,制成单细胞悬液 ,加入 PI 染色剂 ,染色 30min ,4 $^{\circ}$ C ,流式细胞仪进行细胞周期测定。

2 结果

2.1 DMSO 对杂交瘤细胞增殖的影响

用台盼蓝染色计数法检测不同浓度 DMSO 对 H18 杂交瘤细胞活性影响的变化。当细胞生长到对数生长期后期 ,加入不同浓度的 DMSO。未加 DMSO 的 H18 杂交瘤细胞 ,密度可达 1.16×10^6 个/mL ; 0.9% 的 DMSO 对杂交瘤细胞的活性影响明显 ,细胞密度下降迅速 ,小于 3×10^5 个/mL ,0.3% 和 0.6% 的 DMSO 可抑制杂交瘤细胞的生长 ,细胞密度为 1.0×10^6 个/mL ,而且在细胞培养后期细胞活性下降缓慢 (图 1)。

2.2 DMSO 促进杂交瘤细胞抗体的分泌

夹心 ELISA 法检测不同浓度 DMSO 对 H18 杂交瘤细胞分泌能力的影响。经 0.3% 和 0.6% DMSO 作用的 H18 杂交瘤细胞 ,培养上清中抗体的浓度与未经 DMSO 作用的 H18 杂交瘤细胞[(36 ± 1.3) μ g/mL]相比 ,抗体浓度显著增加 ,分别为(52.2 ± 2.2) μ g/mL 和(75.3 ± 1.7) μ g/mL ,而 0.9% DMSO 作用的 H18 杂交瘤细胞培养上清中抗体浓度为($28.1 \pm$

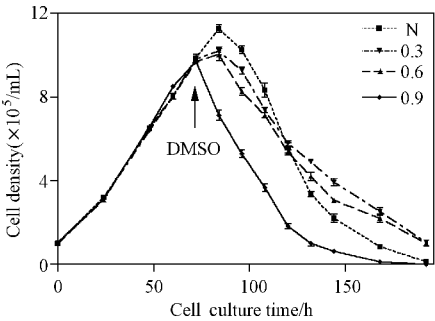


图 1 不同浓度 DMSO 对 H18 杂交瘤细胞增殖的影响
Fig.1 Effects of different DMSO concentrations on the proliferation of H18 hybridoma

1.1) μ g/mL (图 2) ,由于 0.9% DMSO 对 H18 杂交瘤细胞的活性和抗体分泌的负性作用 ,在检测细胞周期和 P27 表达时仅选用 0.3% 和 0.6% DMSO 的药物作用浓度。

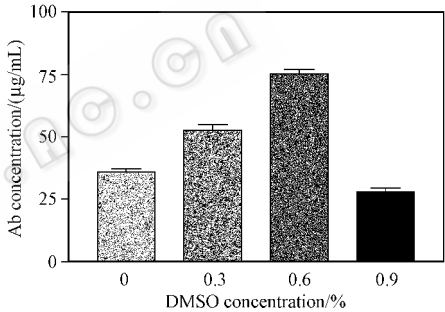


图 2 不同浓度 DMSO 对 H18 杂交瘤分泌抗体的影响
Fig.2 Effects of different DMSO concentrations on antibody secretion of H18 hybridoma cells

2.3 DMSO 对杂交瘤细胞 P27 表达的影响

取正常 H18 杂交瘤和加入 0.3% 或 0.6% DMSO 的 H18 杂交瘤细胞 2×10^6 个 ,细胞经裂解后 ,取相同含量的细胞裂解蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳 ,结果显示各种杂交瘤细胞均表达 P27 蛋白 ,其中加入 0.6% DMSO 的杂交瘤细胞表达量最高 ,而正常 H18 细胞表达 P27 弱 ,P27 的分子量为 27kD (图 3)。

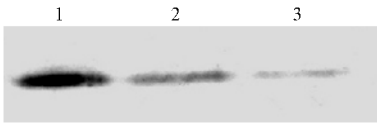


图 3 Western blotting 鉴定 P27 表达
Fig.3 Western blotting of P27 expression
1 : with 0.6% DMSO ; 2 : with 0.3% DMSO ; 3 : without DMSO

2.4 DMSO 对杂交瘤细胞周期的影响

用流式细胞仪检测杂交瘤细胞在培养过程中的细胞周期的分布 ,结果显示 H18 杂交瘤细胞在含 0.6% DMSO 培养液中培养 36h 后 ,G1 细胞比例为

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

83.7% ,在含 0.3% DMSO 培养液中培养 36h 后 ,G1 细胞比例为 62.9% ;而正常 H18 杂交瘤细胞中 G1

细胞比例为 47.5%(图 4)。

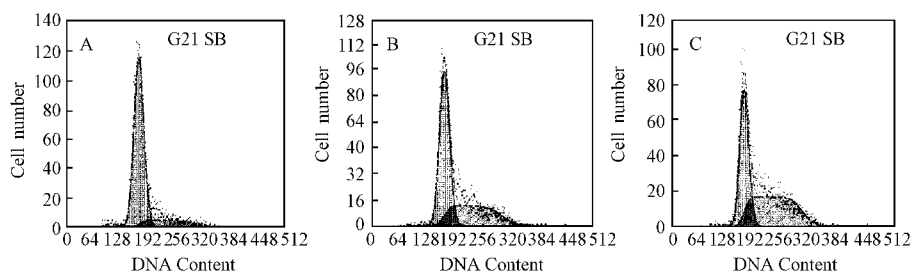


图 4 流式细胞仪分析细胞周期比例

Fig.4 FCM analysis of cell cycle

A :H18 cell with 0.6% DMSO ; B :H18 cell with 0.3% DMSO ; C :H18 cell without DMSO

3 讨论

细胞高密度通常认为与高产量相关。但是 ,高细胞密度的生产环境有可能导致增加毒性产物的聚集、营养物质和氧气的耗竭、产物的损坏。控制增殖技术是近年出现的一项促进生产的策略 ,主要由两个时相组成 :① 增殖时相细胞增殖生长达到理想的细胞密度 ;② G1 期抑制使细胞处于生长抑制 ,细胞的代谢能量大部分用于合成产物。目前 ,常用的控制细胞增殖技术是诱导 G1 期特异性生长抑制 ,基于外源基因调控系统控制肿瘤抑制基因、细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子、分化调节因子等表达而实现^[7,8]。但是 ,运用控制增殖技术改造细胞系的方法比较复杂而且耗时 ,而利用添加可控制细胞周期的试剂是一种简单、快速有效的提高抗体产量的方法。

我们研究显示 DMSO 作为刺激试剂与对照细胞相比 ,可提高杂交瘤细胞分泌抗体 2 倍。最近 ,Liu 等研究发现 ,无论是有血清还是无血清培养 ,DMSO 可促进许多重组蛋白在 CHO 细胞中的表达 ,但是不增加杂交瘤细胞在有血清培养中抗体的产量^[9,10]。我们的结果显示在无血清培养杂交瘤中加入 DMSO 的确促进抗体的表达。此外 ,DMSO 影响抗体的分泌依赖药物浓度。对 H18 杂交瘤来说 ,在细胞对数生长后期时添加 0.6% 的 DMSO 可增加抗体的产量 ;同时通过 Western blotting 检测杂交瘤细胞内 P27 的表达 ,显示细胞内 P27 表达上调 ,而且大多数细胞处于 G1 期 ,说明 DMSO 作用杂交瘤细胞促进细胞周期调节蛋白 P27 的表达 ,从而使细胞处于 G1 期抑制 ,进而有利于抗体的分泌提高抗体的产量。但如果添加 0.9% 的 DMSO 时 ,抗体的分泌量并没有增加 ,通过细胞活性的检测发现在此药物浓度下引起了细胞

的死亡。

总之 ,我们在杂交瘤细胞生长到高密度时 ,添加 0.6% 的 DMSO 使杂交瘤细胞大部分处于生长抑制的状态 ,从而提高了杂交瘤分泌抗体量 2 倍。因此 ,本实验 DMSO 的添加时机和浓度 ,为将来在生物反应器细胞高密度、大规模培养 ,提高抗体产量奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Rubbini S, Cocco L, Manzoli L *et al*. DMSO induced differentiation reduces the association of phosphatidylinositol transfer protein with the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **230** :302 – 305
- [2] Saito H, Kagawa T, Tada S *et al*. Effect of dexamethasone dimethylsulfoxide and sodium butyrate on a human hepatoma cell line PLC/PRF/5. *Cancer Biochem Biophys*, 1992, **13** :75 – 84
- [3] Ponzio G, Lobat A, Rochet N *et al*. Early G1 growth arrest of hybridoma B cells by DMSO involves cyclin D2 inhibition and p21^{cipl} induction. *Oncogene*, 1998, **17** :1159 – 1166
- [4] Wang XH, Xu J, Chen ZN *et al*. Inducible expression of Bcl-XL inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in hybridoma, resulting in enhanced antibody production. *Cell Biology Int*, 2004, **28** :185 – 191
- [5] Oh SDW, Vig P, Chua F *et al*. Substantial overproduction of antibody by applying osmotic pressure and sodium butyrate. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42** :601 – 610
- [6] Wang XH (王贤辉), Xu J (徐静), Chen ZN (陈志南) *et al*. Modification of the antiapoptotic ability of H18 hybridoma cells. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19** (6) :705 – 708
- [7] Meents H, Enenkel B, Werner RG *et al*. P27^{kpl}-mediated controlled proliferation technology increases constitutive sICAM production in CHO-DUKX adapted for growth in suspension and serum-free media. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **79** (6) :619 – 627
- [8] Watanabe S, John S, Mohamed Al-Rubeai. Regulation of cell cycle and productivity in NSO cells by the over-expression of p21^{cipl}. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **77** (1) :1 – 7

nous genes in recombinant CHO cells in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biotechnol Lett* , 2001 , **23** :1641 – 1645

body production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biotechnol Prog* , 2003 , **19** :158 – 162

[10] Ling WL , Deng L , Lepore J *et al* . Improvement of monoclonal anti-

DMSO Arrested Hybridoma Cells for Enhanced Antibody Production

WANG Xian-Hui HE Shu-Yun ZHANG Yang XU Jing FENG Qiang LI Ling MI Li* CHEN Zhi-Nan*

(Cell Engineering Research Centre , The Fourth Military Medical University , Xi 'an 710033 , China)

Abstract Dimethyl sulfoxide (DMSO) , a well-known differentiation inducer in several myeloid cells , induces G1 phase arrest in many cell lines . In this study , we investigated the possibility of using DMSO to arrest H18 hybridoma cells to the G1 phase and monitor whether the arrest improves antibody production . We showed that DMSO in concentration ranging between 0.3% and 0.6% efficiently arrested H18 hybridoma cells in G1 phase . In our experiment , > 80% of cells grown for 36h in presence of the 0.6% DMSO were arrested in G1 . Furthermore , expression levels of P27 were up-regulated tow fold during the G1 phase . Higher concentration of DMSO at 0.9% leads to cytotoxicity . Herein we show a simple way , a two-stage process for antibody production , which consists of a proliferation phase leading to the desired cell density , followed by an extended production phase during which the cells remain at G1 phase . Our observation that the addition of DMSO results in increase antibody production is of significance in further use of hybridoma cells in high density large scale cell culture .

Key words DMSO , hybridoma cells , P27

Received : 12-18-2003

This work was supported by the National Hi-Tech Research and Development Programme of China (863) (No. 2002AA217011 and 2002AA2Z3441) .

* Corresponding author . Tel 86-29-3374547 ; Fax : 86-29-3293906 ; E-mail : chcerc2@fmmu.edu.cn , milicec@vip.sina.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>