

Pluronic 和纤维素类对杂交瘤细胞保护特性的研究

徐殿胜 吴铁平 吴小蔚 张元兴 陈因良

(华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

摘 要 利用鼠鼠杂交瘤 2F7 细胞(分泌 IgG2a 单抗)研究了 Pluronic F-68、甲基纤维素、羧甲基纤维素及聚醚多元醇与杂交瘤细胞生物相容性及添加限制浓度;研究了添加浓度对葡萄糖的利用及氨的生成影响;在高速搅拌、高剪切力下考查添加剂的保护效果。结果表明,0.05—0.10%(W/V) Pluronic F-68、0.10—0.20%(W/V)甲基纤维素能较好地保护杂交瘤细胞;高浓度 Pluronic F-68 增加了葡萄糖的比消耗速率及氨的比生成速率;高浓度甲基纤维素增加了氨比生成速率;羧甲基纤维素添加浓度低于 0.1%不影响细胞生长,也无保护作用,羧甲基纤维素不影响细胞对葡萄糖的比消耗速率,但增加了氨比生成速率;聚醚多元醇分解细胞。在 1.5 升 GelliGen 生物反应器中,培养基添加 0.10% Pluronic F-68、搅拌转速 70r/min 下细胞正常生长。

关键词 杂交瘤细胞,Pluronic F-68,甲基纤维素,保护剂

为了更好地满足疾病治疗及器官移植的需求,各种生物反应器如:搅拌式、气升式^[1,2]及中空纤维等已被广泛应用于生产治疗性蛋白、单克隆抗体及大量的造血细胞^[3,4]。但是,由于培养中供氧通气、搅拌等引起的流体流动、气泡破碎而产生了各种难以测量并解释的剪切应力,实际上即使相当小的流体应力,也引起了细胞的损伤,从而导致细胞内部作出反差巨大的不同反应或减少了细胞活性,甚至引起细胞死亡^[2]。许多研究者已成功地应用添加剂作为“剪切保护剂”^[5],如:Pluronic 系列、牛血清白蛋白、蛋白类混合物等,但是,蛋白类物质通常给产物的纯化带来困难。Pluronic 系列是一类非离子表面活性剂,由聚环氧乙烯、聚环氧丙烯嵌断聚合而成,作为动物细胞保护剂与其分子量、亲水/疏水(HLB)性比值关系较大,通常其 HLB 应大于 18^[6]。Pluronic F-68 平均分子量为 8 400,含有一个聚环氧丙烯骨架(20%)及两端为聚环氧乙烯骨架。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

1.1.1 细胞株:2F7 杂交瘤细胞是分泌抗人小细胞肺癌单抗(IgG2a 型)的鼠鼠杂交瘤细胞,由上海市肿瘤研究所建株并提供使用。

1.1.2 培养基:以 DME:F12(1:1)(Sigma)为基础培养基,添加补充因子配制成 2F7 细胞无血清培养基,使用前补加青霉素 50μg/ml,链霉素 50μg/ml。

1.1.3 试剂:Pluronic F-68,分子量 8 400(BASF. Co.);甲基纤维素(MC),分子量 300—500kDa.(DOW Co.);羧甲基纤维素(CMC-52),分子量 500kDa,(Whatman Co.);聚醚

国家“八五”攻关资助课题。

本文于 1993 年 12 月 10 日收到。

多元醇(GP-TR210),分子量 3 500-6 000(沈阳石油化工总厂)。

1.2 实验装置及设备

1.2.1 磁力搅拌器及 100ml 磁力细胞培养瓶是 Techne. Co. 产品。

1.2.2 1.5 升 Celli Gen 细胞培养生物反应器由美国 New Brunswick Sci. Co. 生产。

1.3 实验方法

1.3.1 生物相容性:方瓶静止培养,培养基中加入添加剂,使其达到一定浓度,5%CO₂ 培养箱中 37℃ 培养。

1.3.2 剪切力保护实验:在 100ml 磁力搅拌瓶中(400—600r/min),检验抗剪切保护能力。

1.3.3 在 1.5 升 Celli Gen 生物反应器中培养 2F7 细胞,控制条件为 pH7.2,溶解氧 50%空气饱和度,搅拌转速为 40r/min 和 70r/min,温度 37±0.1℃。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞计数:苔盼蓝染色法^[7],用血球计数板活细胞计数。

1.4.2 添加剂保护效果分析:以搅拌下存活细胞占总起始细胞百分数表示:

$$Pn.v = \frac{\text{剪切后活细胞数}}{\text{起始总细胞数}} \times 100\%$$

1.4.3 葡萄糖分析:辣根过氧化物酶法^[8],上海生物制品研究所生产试剂盒。

1.4.4 氮分析:采用脲酶 Berthelot 法^[9],上海生物制品研究所生产试剂盒。

2 结果与讨论

2.1 生物相容性及限制浓度

2.1.1 Pluronic F-68: 实验分别使用 (W/V) 0.05%、0.10%、0.20%、0.40%、0.50% 浓度的 Pluronic F-68, 细胞生长结果如图 1 所示。由图 1 看出, Pluronic F-68 作为动物细胞培养添加剂使用时其浓度应超过 0.20%, 高于这浓度细胞生长受到明显抑制, 这一结论与国外部分报道无限制浓度^[10]有所不同, 可能是细胞株间差异所致。

2.1.2 甲基纤维素: 实验中分别添加 (W/V) 0.10%、0.20%、0.60% 及 0.80% 浓度的甲基纤维素, 细胞生长结果如图 2 所示。随着添加浓度的增加, 限制细胞生长的影响愈明显, 添加 0.10% 与不添加对照无明显区别, 培养 96 小时后, 细胞密度可达到 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。因此, 作为细胞培养添加保护剂, 甲基纤维素浓度应控制在 0.20% 以下, 否则限制细胞生长。

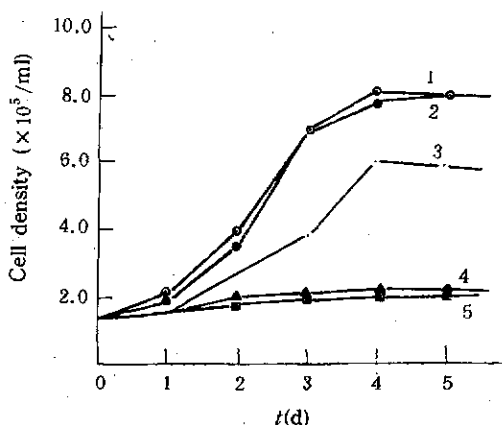


图 1 Pluronic F-68 浓度对细胞生长的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of Pluronic F-68 on 2F7 cell culture

1. 0.05%, 2. 0.10%, 3. 0.20%,
4. 0.40%, 5. 0.50%

2.1.3 羧甲基纤维素:实验中分别添加(W/V)0.10%、0.30%、0.60%、及0.80%浓度的羧甲基纤维素。细胞生长结果表明,当添加浓度为0.10%时对细胞生长无影响,其接种量为 $0.7 \times 10^5/\text{ml}$ 下培养96小时细胞密度可达到 $6.0 \times 10^5/\text{ml}$;而添加浓度为0.30%时,最高细胞密度为 $4.7 \times 10^5/\text{ml}$;添加浓度为0.60%及0.80%时细胞密度为 $3.6 \times 10^5/\text{ml}$ 。所以,羧甲基纤维素作为保护剂时其浓度不应超过0.10%。

2.1.4 聚醚多元醇:添加不同量的聚醚多元醇于细胞培养基中,结果出现细胞大量破碎,细胞浓度不断降低,因此它不能作为动物细胞保护剂及消泡剂。

2.2 添加剂对葡萄糖消耗及氨生成的影响

2.2.1 Pluronic F-68: 实验中研究了

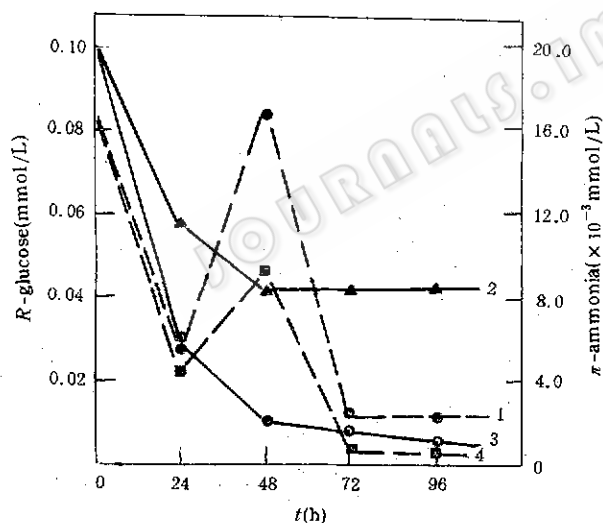


图3 pluronic F-68对葡萄糖消耗及氨生成影响

Fig. 3 Effects of Pluronic F-68 on glucose utilization and ammonia production

1. 0.5% π -a, 2. 0.5% R-g, 3. 0.05% R-g, 4. 0.05% π -a

高 Pluronic F-68 浓度时细胞生长受到限制的原因。

2.2.2 甲基纤维素:实验中研究了0.10%及0.60%浓度的甲基纤维素作为保护剂时细胞代谢的变化,结果如图4所示。48小时前低浓度甲基纤维素时葡萄糖比消耗速率高于高浓度时的值,48小时后几乎没有区别。但自始至终,高浓度甲基纤维素下氨的比生成速率值高于低浓度下值。因此,添加甲基纤维素限制了葡萄糖利用,增加了氨基酸消耗,这可

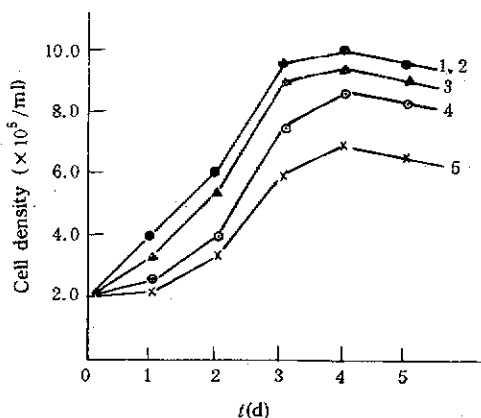


图2 甲基纤维浓度对细胞生长影响

Fig. 2 Effects of different MC concentrations on 2F7 cell culture

1. 0.0%, 2. 0.10%, 3. 0.30%, 4. 0.60%, 5. 0.80%

0.05%及0.50% Pluronic F-68下细胞对葡萄糖比消耗速率及氨的比生成速率变化。结果如图3所示,不论是葡萄糖比消耗速度还是氨比生成速度,0.05% Pluronic F-68浓度下的值大大小于0.5%浓度下的值。从单位细胞所消耗葡萄糖量说明,高浓度 Pluronic F-68下使得部分葡萄糖进入糖酵解或其它途径,减少进入三羧酸循环比例,但旁路途径生成产物乳酸会抑制细胞生长;高浓度 Pluronic F-68下促进氨比生成速率,导致谷氨酰胺等氨基酸转化量增加,但细胞却受到了代谢产物氨的抑制,降低了氨基酸的利用效率。这可能正是

能正是限制细胞生长的原因。

2.2.3 羧甲基纤维素:实验中研究在 0.10% 及 0.80% 羧甲基纤维素下细胞代谢变化,结果如图 5 所示。不论添加剂浓度如何变化,葡萄糖比消耗速率几乎没有区别,而高浓度羧甲基纤维素时氨的比生成速度始终较高,即谷氨酰胺等氨基酸消耗转化量较大,利用率较低,限制细胞生长。

2.3 高剪切力下保护效果研究

2.3.1 Pluronic F-68:起始转速为 370r/min 时,结果如图 6 所示。96 分钟之内细胞活性率为 100,但不添加 Pluronic F-68 对照已出现死亡趋势,至 120 分钟时 $Pn.v$ 已下降为 40。而添加浓度为 0.05% 及 0.10% 时 $Pn.v$ 均高于 98%,此

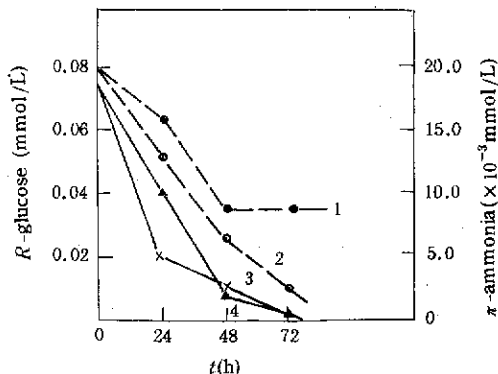


图 4 甲基纤维素对葡萄糖消耗及氨生成影响
Fig. 4 Effects of MC on glucose utilization and ammonia production

1. 0.60% π -a, 2. 0.10% π -a, 3. 0.10% R-g, 4. 0.60% R-g

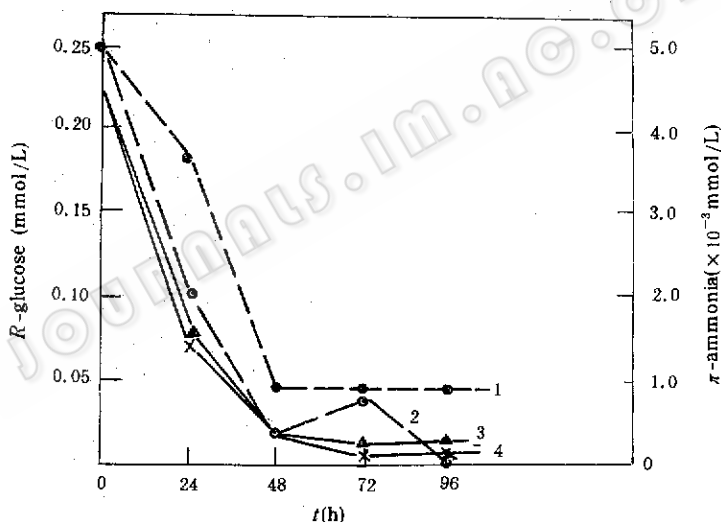


图 5 羧甲基纤维素对葡萄糖消耗及氨生成影响
Fig. 5 Effects of CMC-52 on glucose utilization and ammonia production

1. 0.80% π -a, 2. 0.10% π -a, 3. 0.80% R-g, 4. 0.10% R-g

时调整搅拌转速到 430r/min,发现沿搅拌轴方向出现旋涡,且有气泡夹带。到 144 分钟时,无 Pluronic F-68 对照瓶 $Pn.v$ 仅为 20% 左右,而添加组仍高于 80% 以上,到 180 分钟时仍高于 60%。这一结论与 Kunas, K. T. 完全一致^[11]。

2.3.2 甲基纤维素:在起始转速为 430r/min,90 分钟及 180 分钟时分别调整转速为 500 r/min 及 600r/min,结果如图 7 所示。表明 0.10% 及 0.20% 浓度的甲基纤维素具有较好保护效果,两者无明显区别。

2.3.3 羧甲基纤维素:在起始搅拌转速为 530r/min 时,0.10% 浓度的羧甲基纤维素同空白对照无明显区别,而添加 0.30% 浓度时也仅略好,其对细胞保护性能较差,搅拌 30 分钟后,

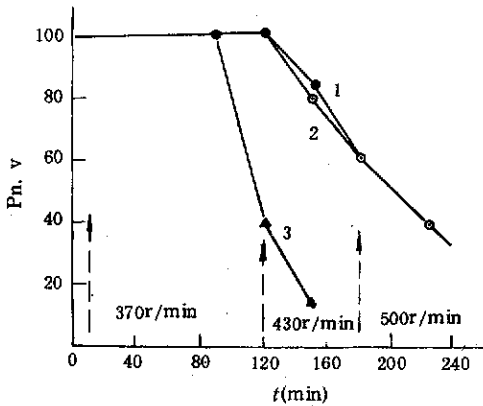


图 6 Pluronic F-68 保护效果

Fig. 6 Protecting effect of Pluronic F-68

1. 0.05%, 2. 0.10%, 3. 0.30%

$Pn.v$ 仅为 30%, 搅拌 60 分钟后, 0.10% 及 0.30% 浓度的羧甲基纤维素下的 $Pn.v$ 分别为 0% 和 10%, 但 0.30% 时已限制细胞生长, 所以羧甲基纤维素不宜作为细胞保护剂。

2.4 1.5 升 CelliGen 生物反应器培养

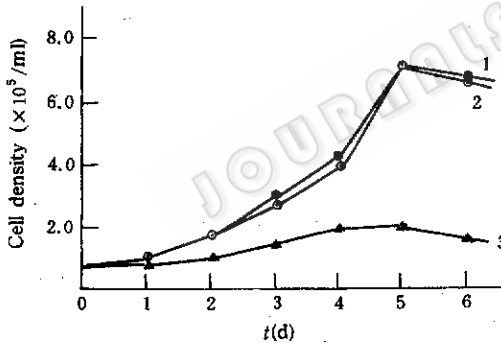


图 8 2F7 细胞生长曲线

Fig. 8 2F7 Cell growth curve

1. 40r/min, 2. 70r/min + 0.10% Pluronic F-68, 3. 70r/min

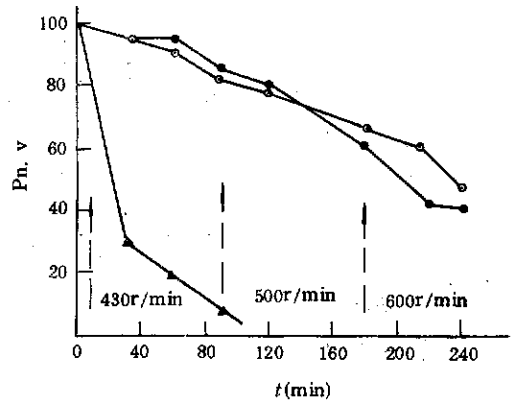


图 7 甲基纤维素保护效果

Fig. 7 Protecting effect of MC

1. 0.20%, 2. 0.10%, 3. 0.0%

分别调节搅拌转速为 40r/min、70r/min 及 70r/min 下培养基中加入 Pluronic F-68 浓度为 0.10%, 控制温度为 37℃, pH7.25, 溶解氧为 50%, 结果如图 8 所示。在起始浓度为 0.8×10^5 /ml 下, 培养 5 天, 添加 Pluronic F-68 后活细胞密度达到 7.2×10^5 /ml (总密度为 8.0×10^5 /ml) 与对照 40r/min 下没有区别。

参 考 文 献

- (1) Prokop A *et al.* Eng/Biotechnol, 1989, 39, 30-67.
- (2) Martin R S *et al.* In: Huang N C ed. Quantitative Cardiovascular Studies, University Park Press, Baltimore MD Chap 1979, 9, 419-454.
- (3) Hansen J J *et al.* Science, 1989, 246, 775.
- (4) Culliton B J *et al.* Science, 1989, 246-746.
- (5) Cherry R S, Papoutaskis E T, In: Spier R E, Griffiths J B eds, Animal Cell Biotechnology New York, Academic, 1990, Vol. 4, 71-121.
- (6) David W *et al.* Biotechnol Prog, 1990, 6, 142-148.
- (7) 郭征等.《细胞培养技术》, 北京: 人民卫生出版社, 1981, p. 103
- (8) 缪辉南, 陈石根译, George G Guilbault 著,《酶分析手册》, 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 93-95.
- (9) 董树沛, 陈因良等. 生物工程学报, 1992, 8(4), 389-393.
- (10) Murhammer D W, Goochee C F. Bio/Technol, 1989, 6, 1411.
- (11) Kanas K T, Papoutaskis E T. J Biotechnol, 1990, 15, 57.

Studies of Protective Properties of Pluronic and Cellulose on Hybridoma Cell Culture

Xu Diansheng Wu Tieping Wu Xiaowei Zhang Yuanxing Chen Yinliang

(Research Institute of Biochemical Engineering, East China

University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract The potential toxicity and optimal concentrations of different protective agents such as pluronic F-68, methylcellulose (MC), CMC, and GPE on the growth *in vitro* of murine hybridoma 2F7 cell which secretes monoclonal antibody against small cell lung cancer were studied. The effects of adding protective agents on glucose utilization rate and ammonia production rate were investigated. The protective effects of different protective agent concentrations at high agitation speed were also observed. It is shown that 0.05—0.10% (W/V) pluronic F-68, 0.10—0.20% (W/V) MC can protect hybridoma cell from shear stress at high agitation speed. Adding pluronic F-68 can increase glucose utilization rate and ammonia production rate, while adding MC does not effect glucose utilization rate, but increase ammonia production rate. Although CMC does not effects 2F7 cell growth at the concentration less 0.10% (W/V), but it exhibits no protective property. GPE can lyse hybridoma cell. In 1.5 L Celligen bioreactor, when pluronic F-68 concentration is 0.10% (W/V) in medium and agitation speed is 70r/min the hybridoma cell can grow normally.

Key words Protective agents, pluronic F-68, methylcellulose, hybridoma cell culture