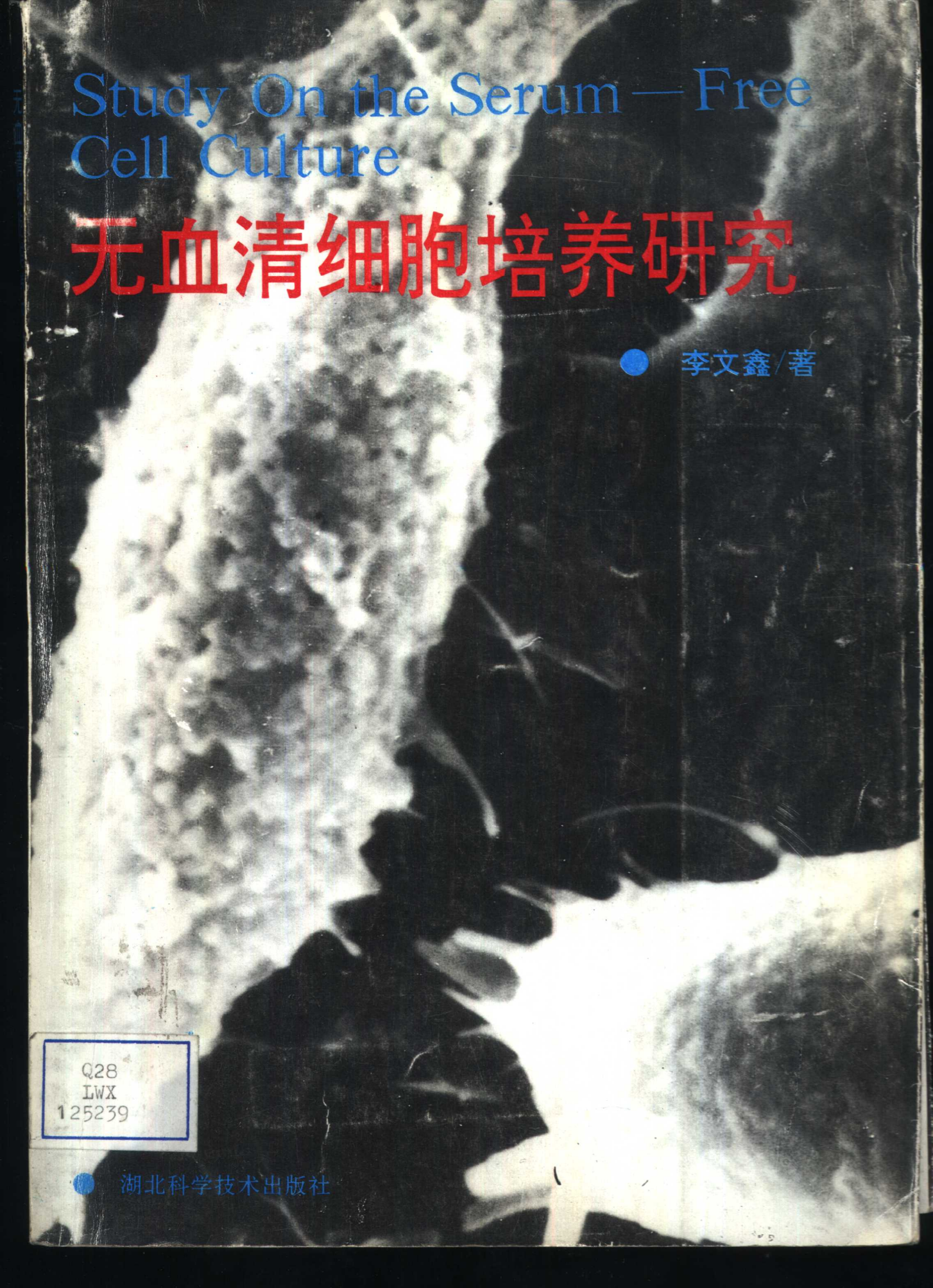


A high-contrast, black and white microscopic image of cells, likely showing a dense cluster of cells with prominent nuclei and some surrounding structures. The image is grainy and has a high-contrast, almost artistic quality.

Study On the Serum — Free
Cell Culture

无血清细胞培养研究

● 李文鑫/著

Q28
LWX
125239

● 湖北科学技术出版社

● 李文鑫 著

无血清细胞 培养研究

湖北科学技术出版社

鄂新登字 03 号

无血清细胞培养研究

© 李文鑫 著

*

湖北科学技术出版社出版发行 新华书店湖北发行所经销

湖北省鄂南新华印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 12.25 印张 300 千字

1993 年 4 月第 1 版 1993 年 4 月第 1 次印刷

ISBN 7-5352-0993-9/R·201

印数:1-2 500 定价:9.30 元

前 言

无血清细胞培养作为一门现代生物学技术,是在现代科学研究的推动下发展起来的,它在细胞培养研究中是一个里程碑。

我国著名细胞生物学家、学部委员汪堃仁教授曾指出:“科学就是生产力,生产力的提高,决定于生产工具的改进,因而,在这一意义上讲,技术手段的发展,也是决定科学发展速度的一个重要因素。”无血清细胞培养研究,正是作为一门现代生物技术,为蛋白质工程、基因工程、细胞工程、生长因子、单克隆抗体及细胞大量繁殖等应用研究奠定了基础;同时也为细胞生物学、肿瘤生物学、病毒学和分子生物学等基础理论研究开辟了新道路;在排除血清复杂因子干扰的情况下阐明细胞生长、增殖分化机制,病毒与细胞的关系,以及基因表达调控等生命科学中的基本生命现象,更真实地反应了生命的本质规律。

我们是1983年开始进行无血清细胞培养研究的,1986年申请了国家教委下达的《无血清细胞培养研究》课题。该研究课题在申请中得到了已故室主任胡解郁教授的鼓励和支持;经费上得到了国家教委和湖北省科委的共同资助。该研究工作能得以进行下去并取得好成绩,达到国际先进水平,多亏了武汉大学科研处和病毒学及分子生物学系的关心。另外,也得到了北京师范大学汪堃仁教授、王永潮教授的鼓励和支持。该研究是在困难的条件下进行的,参加该研究工作的全体同志都付出了辛勤的劳动,尤其是曾灵芳同学(现为北京师范大学博士生)从硕士论文开始就踏踏实实地工作,并草写了部分论文。另外,付烈振同志为部分论文的抄写、作图和校对付出了辛勤劳动。本研究工作也曾得到中科院武汉水生生物研究所电镜室、武汉大学生物系电镜室、湖北省肿瘤医院、广州军区武汉总医院和北京师范大学等单位的大力支持。在此我们对参加该研究工作的同学和资助支持该研究工作的单位和同志表示衷心感谢。

我们的研究成果能以专著的形式与广大读者见面,首先感谢湖北科学技术出版社对科学研究者的厚爱。在该书的出版过程中武汉大学学报杨于高同志给予了积极的支持,在此也一并致谢。

本书是我们多年来在无血清细胞培养研究方面的成果汇集,共分五个部分:第一部分为有关生长因子研究;第二部分为无血清培养基在细胞培养中的应用研究;第三部分为无血清培养细胞系的应用研究;第四部分为无血清培养细胞系的建立及生物学特性研究;第五部分为肿瘤细胞系的建立及生物学特性研究。本书的主要内容系首次发表的研究成果,所以,以原始论文的面貌出现,附有大量的图表和照片,供读者和专家们参考。另外,在本研究中提出了某些新观点与同行专家商讨,敬请专家和读者指正。

李文鑫

1992年9月于珞珈山

目 次

无血清细胞培养研究(概论)	李文鑫(1)
第一部分 生长因子研究	
应用牛初乳进行无血清细胞培养研究	李文鑫 王经建 胡解郁(9)
牛初乳替代血清对培养细胞的 DNA 合成和增殖的影响	李文鑫(12)
乳清促生长因子的分离纯化及部分特性	李文鑫 张大丙(17)
转铁蛋白的分离及部分性质研究	李文鑫 袁雪(23)
人肺腺癌胸水中生长因子研究初探	李文鑫 曾灵芳 汪堃仁(30)
人肺腺癌胸水对细胞骨架和细胞表面的影响	曾灵芳 李文鑫 陈国勋 沈瑞忠 王永潮(39)
第二部分 无血清培养基在细胞培养中的应用研究	
无血清培养基 RDL 在细胞培养中的应用 A. 传代细胞系的培养	李文鑫 张大丙(50)
无血清培养基 RDL 在细胞培养中的应用 B. 肿瘤细胞系的培养	李文鑫 曾灵芳 张大丙(58)
无血清 RDL-2 培养基在细胞悬浮培养中的应用	李文鑫 曾灵芳 王经建(67)
第三部分 无血清培养细胞的应用研究	
无血清培养细胞对体外单纯疱疹病毒的增殖研究	李文鑫 王经建(71)
无血清培养细胞系 HLAMP/S ⁻ 和 HICMA/S ⁻ 对抗肿瘤药物的敏感性观察	李文鑫 王经建 李杰(78)
第四部分 无血清培养细胞系的生物学特性研究	
人鼻咽癌细胞的无血清培养及生物学特征观察	李文鑫 沈瑞忠 曾灵芳(84)
人肺腺癌转移胸水细胞 HLAMP/S ⁻ 的无血清建系培养过程及其生物学特性	李文鑫 曾灵芳 李杰(96)
人小肠癌转移腹水无血清细胞系(HICMA/S ⁻)的建立及其生物学特性观察	李文鑫 曾灵芳 沈瑞忠(104)
无血清培养细胞的粘附作用观察	李文鑫 曾灵芳 沈瑞忠(112)
无血清培养人鼻咽癌细胞亚系中 C-myc 和 C-ras 基因表达及人肺腺癌胸水 对基因表达的影响	李文鑫 李华钢 曾灵芳 张锡元 王永潮(124)

无血清培养细胞的表面特性研究——植物凝集素对细胞的凝集力观察	李文鑫 曾灵芳 李杰(133)
无血清培养细胞系的染色体及微核观察	曾灵芳 李文鑫 江虹 沈瑞忠 杨洁(140)
无血清生长的化学转化细胞产生并应答转化生长因子	李文鑫 VIGIER. P(146)
C—myc 和 C—ras 基因在正常、化学转化和肿瘤细胞中的表达	李文鑫(154)
第五部分 肿瘤细胞系的生物学特性研究	
人肺腺癌转移胸水细胞系 HLAMP 的建立及其生物学特征	曾灵芳 李文鑫 李杰 王经建 汪堃仁(160)
人小肠癌转移腹水细胞 HICMA 的建系培养及其生物学特征	曾灵芳 沈瑞忠 李文鑫 王永潮(168)
DXM 对小鼠乳腺癌培养细胞的影响及诱发 MMTV 的释放	郑菁 李文鑫 胡解郁(177)
抗坏血酸和电子顺磁共振对鼻咽癌细胞的生长影响	李文鑫 王泽群(186)

CONTENTS

A REVIEW OF STUEIES ON THE SERUM—FREE CELL CULTURE	Li Wenxin(1)
--	--------------

Part I :Study on the growth factors

A PRELIMINARY REPORT ON THE SERUM—FREE GROWTH OF CULTURED CELLS IN BOVINE COLOSTRUM	Li Wenxin, Wang Jingjian, Hu Jieyu(11)
THE SURBSTITUTION OF SERUM FOR BOVINE COLOSTRUM STIMULATES DNA SYNTHESIS AND CELLULAR PROLIFERATI ON IN CULTURED CELLS	Li Wenxin (16)
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GROWTH FACTOR IN BOVINE COLOSTRUM	Li Wenxin,zhang dabing (22)
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TRANSFERRIN FROM PIG SERUM	Li Wenxin, Yuan Xue (29)
STUDIES ON THE GROWTH FACTORS IN HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA PLEURAL EFFUSIONS	Li Wenxin, Zeng Lingfang, Wang Kunren (38)
EFFECT OF HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA PLEURAL EFFUSIONS ON CYTOSKELETON AND CELLULAR SURFACE	Zeng Lingfang, Li Wenxin, Chen Gouxun, Shen Ruizhong, Wang Yongchao(49)

Part I :APPLICATION OF SERUM—FREE MEDIUM IN CELL CULTURE

APPLICATION OF SERUM—FREE MEDIUM RDL IN CELL CULTURES I . CULTURES OF NORMAL CELL LINES	Li Wenxin, Zhang Dabing (57)
APPLICATION OF SERUM—FREE MEDIUM RDL IN CELL CULTURES I . CULTURES OF TUMOR CELL LINES	Li Wenxin, Zeng Lingfang, Zhang Dabing (65)
APPLICATION OF SERUM—FREE MEDIUM RDL—2 IN THE SUSPENSION CULTURE OF ANIMAL CELLS	Li Wenxin, Zeng Lingfang, Wang Jingjian (70)

Part II STUDIES OF APPLICATION ON THE SERUM—FREE CULTURED CELLS

A STUDY OF HERPES SIMPLEX VIRUS MULTIPLICATION IN THE SERUM—FREE CULTURED CELLS	Li Wenxin, Wang Jingjian (77)
STUDIES ON THE SENSITITIVITY OF SERUM—FREE CULTURED CELL LINES TO ANTITUMOR PHARMACEUTICAL	Li wenxin, Wang jingjian, LiJie (83)

Part IV :ESTABLISHMENT AND BIOLOGICAL CHARAC TER- ISTICS OF CELL LINES OF SERUM—FREE CULTURE STUDIES ON SERUM—FREE GROWTH AND BIOLOGICAL CHARACTERISTIES OF HU- MAN NASOPHARYNGEX CARCINOMA CELLS	Li Wenxin, Shen Ruizhong, Zeng Lingfang (94)
--	--

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA
METASTATIC PLEURAL EFFUSIONS CELL LINE OF SERUM—FREE CULTURE (HLAMP/
S⁻) Li Wenxin, Zeng Lingfang, Li Jie (103)

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF HUMAN SMALL INTESTINE CANCER
METASTATIC ASCITES CELL LINE OF SERUM—FREE CULTURE (HICMA/S⁻)

..... Li Wenxin, Zeng Lingfang, Shen Ruizhong (110)

STUDIES ON THE ADHESIVENESS OF SERUM—FREE CULTURED CELL LINES

..... Li Wenxin, Zeng Lingfang, Shen Ruizhong (116)

STUDIES OF SURFACE CHARACTERISTICS OF SERUM — FREE CULTURE CELL
LINES—AGGLUTINABILITY INDUCED BY THE LECTIN PHA AND CONA

..... Li Wenxin, Zeng Lingfang, Li Jie (139)

CHROMOSOMES AND MICRONUCLEUS OF SERUM—FREE CULTURED CELL LINES

..... Zeng Lingfang, Li Wenxin, Jiang Hong, Shen Ruizhong (144)

CHEMICALLY TRANSFORMED CELLS GROWING IN SERUM — FREE/MITOGEN — FREE
MEDIUM PRODUCE AND RESPONSE TO TRANSFORMING GROWTH FACTOR

..... Li Wenxin, Vigier P. (153)

EXPRESSION OF C — MYC AND C — RAS ONCOGENES IN NORMAL, CHEMICALLY
TRANSFORMED AND TUMOR CELLS Li Wenxin (159)

Part V : BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUMOR CELL LINES

ESTABLISHMENT AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN LUNG ADENOCAR-
CINOMA METASTATIC PLEURAL EFFUSION CELL LINES (HLAMP)

..... Zeng Lingfang, Li Wenxin, Li Jie, Wang Jingjian, Wang Kunren (167)

ESTABLISHMENT AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN SMALL INTESTINE
CANCER METASTATIC ASCITES CELL LINE (HICMA)

..... Zeng Lingfang, Li Wenxin, Shen Ruizhong, Wang Yongchao (176)

EFFECTS OF DEXMETHASONE ON CULTURED MOUSE MAMMARY TUMOR CELLS AND
INCREASING RELEASE OF MMTV Zheng Jing, Li Wenxin, Hu Jieyu (185)

EFFECT OF VITAMIN C AND ELECTRONIC PARAMAGNETIC RESONANCE (EPR) ON
THE GROWTH OF HUMAN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELLS

..... Li Wenxin, Wang Zequn (187)

无血清细胞培养研究(概论)

李文鑫

(武汉大学病毒学及分子生物学系)

无血清细胞培养研究是在现代科学研究的推动下发展起来的,尤其是细胞工程、基因工程、蛋白质工程、医学生物学、癌分子生物学和生物制品等研究,亟待需要无血清细胞培养技术。因此,近年来在现代生物技术领域里广泛进行了无血清细胞培养研究。无血清培养基由于其组成成份清楚,不仅为现代生物技术科学的应用开辟了新途径,而且是研究和阐明细胞生长、增殖、分化和基因表达调控这一生命科学中的根本问题的有力工具,将进一步阐明生命现象、补充和完善细胞生物学理论作出突出贡献。正如科学家们所预测的,无血清细胞培养技术是细胞培养研究中的一个里程碑。

对无血清细胞培养研究可追溯到本世纪初,当时 Lewis 等提出以人工配制的介质代替原生质将会成为现实^{[1]*}。这一设想为细胞培养研究指明了道路,从而导致了各种混合营养成分的培养基问世。培养基的出现和使用使细胞培养技术广为发展,并应用于相关研究领域。随着研究的发展和需要,逐步对细胞体外培养所需成份进行了严格的分析,合成了适合相应细胞生长的基础合成培养基^[2]。在使用基础培养基培养细胞时仍需加入一些天然成分,如小牛血清和胎汁等,否则细胞仍然不能很好生长。一般说来,含 5% 小牛血清的培养基对大多数细胞来说可以维持细胞不死,但支持细胞生长一般需加 10—20% 血清。对于血清支持细胞生长的生物学效应已得到证明,但对血清中的复杂成份至今尚未完全清楚。血清中不仅存在促细胞生长因子,同时也存在着细胞生长抑制因子或毒性因子,因此在含血清培养基中培养的细胞所反映的生物学特性是细胞和复杂血清因子的综合反应。于是在生长因子、蛋白质工程、单克隆抗体、基因表达及调控等研究领域,迫切希望用无血清培养基培养细胞。

Sato 等^[3]在细胞培养研究中提出,血清的主要作用是提供各种激素,认为有可能用激素来代替血清,这个假设首先在 GH3 细胞的培养中得到了证实,使 GH3 细胞在无血清介质中生长获得了成功^[4]。此后,无血清培养技术日益受到人们的重视,并在不断发展。

对无血清细胞培养研究,总体上讲从三个方面开展工作:第一,寻找血清代用品;第二,在培养基中补加必需成分,如生长因子 EGF、PDGF、FGF^[5,6,7,8]等,以减少或消除血清用量;第三,无血清细胞培养用于相关学科研究。近十年来,无血清细胞培养技术迅速发展,已报道有几十种细胞株系在相应的无血清培养基中生长和增殖获得成功,但是各自的培养基对细胞的无血清培养都受到了细胞种类和传代时间的限制,从细胞种类上讲,相应的培养基只适应于特定细胞生长;从生长时间上讲,在无血清培养基中生长的细胞从几代到十几代不等,细胞逐渐衰退、老化或死亡,难以无限繁殖。我们总结了前人及自己的工作,设计了一种 RDL 无血清培养基用于细胞的无血清培养,并建立了 3 株无血清培养细胞系。

* [] 中的序号为参考资料序号。下同。

生长因子是维持细胞生长和增殖所必需的物质,血清中尽管存在着系列生长因子,但这些生长因子是一个非常复杂的蛋白质和生物大分子及小分子的混合物,这些杂蛋白给培养产物的分离、检测带来很多麻烦,并影响基础理论的研究结果。为了消除培养基中的血清,人们对主要促细胞生长物质进行了分析,以寻找相应的补充因子来替代血清,对细胞进行无血清培养^[9]。目前已经鉴定的生长因子已逾 20 余种,其中近半数以上是近几年来完成和鉴定的。近几年来,新的生长因子陆续发现,据估计在机体中有 100 种左右生长因子存在。因此,还有很多生长因子尚有待发现^[10]。

一、生长因子的分离

1. 牛初乳促细胞生长活性测定及乳促生长因子的分离:

血清替代物和生长因子的来源无非是动物体液,动物组织浸提物和水解产物等,从这方面考虑,我们首先得到了初生婴儿出生后其母乳促生长作用的启示。在母乳中除了含蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素及矿物质等丰富的营养成分外,还含有丰富的生长因子,如 EGF、NGF、牛磺酸、乙醇胺、磷酸乙醇及微量元素等^[11,12]。于是我们就考虑到从牛初乳中寻找血清代用品,分离生长因子用于无血清细胞培养研究。研究的结果指出,2.5%的牛初乳明显地促进 NRK、CHO 和 MA782/5S-8101 细胞生长,对细胞的生长刺激作用相当于 10%小牛血清的 40%左右^[13]。进一步对牛初乳促细胞生长因子进行了分离,发现分离 1°样品对细胞 DNA 合成的刺激作用加强;2%浓度的 1°分离样品对 NRK、CNE、MA782/5S-8101 细胞 DNA 合成刺激作用大约是 10%血清的 9 倍,并且显示出随着浓度增高,对细胞 DNA 合成刺激作用加强的剂量效应。从 pH 梯度分离情况来看,pH4 和 pH5 沉淀后的乳清对细胞的刺激活性最高^[14]。对 pH 梯度分离的 1°样品我们以标准分子量柱进行了层析分离及活性测定,结果指出,牛初乳 1°样品中对细胞生长具有促进作用的物质分子量在 30—45kd 之间。一般认为 3 天内的乳汁为初乳,我们在取样中发现不同时间的样品对细胞的促生长作用波动很大,于是我们对不同分泌期的初乳对细胞的作用进行了测定^[14],结果显示,小牛分娩后 12h 的牛初乳对细胞的生长刺激活性最高,分娩后 24h 的初乳对细胞的生长刺激活性仅相当于 12h 的 40%左右,而分娩后 72h 的初乳对细胞的生长刺激作用不明显,分娩后 12h 的 0.25%的牛初乳对 CNE 细胞的刺激活性相当于 5%血清的作用。另外,不同处理对乳清的活性显示,100℃处理 5min、0.065M/DTT/25℃处理 1h,乳促生长因子促细胞生长活性基本上丧失。4℃30 天、-20℃90 天和 56℃1h,保持 95%以上的促细胞生长活性。

2. 猪血清转铁蛋白的分离及纯化:

转铁蛋白主要作为铁的运输载体或结合某些痕量毒性金属离子广泛应用于无血清细胞培养研究^[15,16,17]。我们从猪血清中分离转铁蛋白以代替人转铁蛋白用于无血清细胞培养,证明猪血清转铁蛋白可以代替人转铁蛋白用于无血清细胞培养研究^[18]。猪血清经硫酸铵沉淀后过 DE52 柱,共获得 5 个蛋白峰,峰 1 为促细胞生长活性的转铁蛋白,465nm 波长处有特异性吸收峰。DE52 柱层析后的峰 1 出现两条电泳带,带 1 为转铁蛋白,带 2 为未知蛋白。将峰 1 过第二次 DE52 柱,两条电泳带完全分开,所得的转铁蛋白具有结合和释放 Fe^{3+} 性质。当将 pH 从 8.7 调至 4 时,铁离子(Fe^{3+})逐渐被释放,蛋白质橙红色完全消失;又将 pH 逐渐调回 8.7 时,橙红色又逐步再现,转铁蛋白又与 Fe^{3+} 结合。另外,以标准分子量为对照,SDS-PAEG 测定猪转铁蛋白分子量为 77kd。

3. 人肺腺癌胸水中促细胞生长因子及粘附因子的分离:

我们对人肺腺癌胸水的促细胞生长活性进行了测定^[19],结果显示,2%的胸水对 CNE 细胞

和 NRK 细胞都表现出明显的促生长活性,并且以 1%胸水代替 10%血清对 NRK 细胞进行了长期传代培养,发现 1%胸水足以支持 NRK 细胞在体外长期生长,细胞生长旺盛。我们又以不同浓度的胸水对 CNE 和 NRK 细胞进行作用,两种细胞对不同浓度的胸水反应不尽一致:当胸水浓度超过 2%时,随着浓度的升高对 NRK 细胞的刺激活性加强;反之,随着浓度的升高对 CNE 细胞表现为抑制作用。于是我们对胸水 40%—70%硫酸铵沉淀组分进行了 Sephadex—G100 柱层析,分离出 80、55、45 和 30kd 左右的促细胞生长因子和分子量 50kd 左右的细胞粘附因子,以及 65kd 左右的肿瘤细胞生长抑制因子。也就是说在人肺腺癌胸水中促细胞生长因子和细胞生长抑制因子并存。另外,对这些因子的部分理化性质进行了测定,表现出不同性质的生长因子对不同理化因素处理反应不尽一致。对胸水中粘附生长因子进行了分析测定,结果显示以抗 Fibronectin、Laminin 和 IV 型胶原抗体进行免疫沉淀反应时,只有抗 Fibronectin 抗体才能形成沉淀线[见图版 1],但是胸水粘附因子的分子量与 Fibronectin 差别很大,Fibronectin 分子量为 220—250kd,而胸水中的粘附蛋白分子量为 50kd 左右,这说明在胸水中的粘附因子与 Fibronectin 有明显区别。胸水中的粘附因子是具有 Fibronectin 的同样抗原决定簇的另一蛋白,还是 Fibronectin 的降解产物,有待于进一步研究。

二、无血清培养基 RDL 在细胞培养中的应用

1. RDL 培养基对正常传代细胞系的作用:

我们以 RDL 培养基对 BHK、NRK、CHO 和 NIH3T3 细胞的支持生长作用进行了测定^[20],结果指出 RDL 培养基可以支持 BHK、NIH3T3、NRK 和 CHO 细胞无血清生长,与 5%血清相比细胞生长启动较慢,但最终的饱和密度接近。³H—TdR 掺入 DNA 量的结果指出,RDL 培养基在支持 NRK 细胞生长的同时,DNA 合成量增加^[20]。

2. RDL 培养基对肿瘤细胞系的培养:

在对正常传代细胞系的生长测定之后,对肿瘤细胞系进行了培养^[21]。结果指出,RDL 培养基可支持 SP2/0、MGc80—3、CNE 和 MA782/5S—8101 细胞生长。我们还观察到在 10%血清培养基中这些细胞生长到一定密度后,出现平缓期,再继续培养细胞则悬浮死亡,密度下降;而在 RDL 培养基中则不同,细胞呈渐进性稳步生长,达到一定密度后,部分细胞悬浮,但是悬浮细胞为活细胞,可以继续生长。

另外,以³H—TdR 掺入法测定了 Hela 细胞、LTEP—a—2 和 MA782/5S—8102 细胞在 RDL 培养基中 DNA 的合成情况,结果说明,在 RDL 培养基中 Hela、LTEP—a—2 和 MA782/5S—8102 细胞随着培养时间延长 DNA 合成量增加,并且 LTEP—a—2 细胞在培养到第七天时测出的 DNA 总放射性强度高出 10%血清组^[11],说明 RDL 培养基促进细胞增殖的同时,DNA 合成增加。

3. RDL 培养基用于无血清细胞系的建立:

(1)人鼻咽癌细胞 CNE 的无血清亚系 LCE 的建立:

在对以上细胞培养的基础上,对 CNE 细胞进行了无血清传代培养,可见细胞生长旺盛,光滑透亮。在建系的培养过程中,将 CNE 细胞直接转入 RDL 培养基后,细胞有一附壁能力逐渐减弱过程,至 4—7 代细胞基本悬浮生长,此后细胞又逐渐出现附壁生长,12 代以后生长性状基本稳定,为弱附壁性生长。粘附生长的 LCE 细胞有特殊的粘着结构,这种“树枝”状粘着结构末端有“鸭蹼”状粘着斑。无血清生长细胞的这种粘着结构至今尚未见报道。扫描电镜也可见这种粘着结构,但由于末端“鸭蹼”状粘着结构是很薄一层蛋白质,扫描电镜制片干燥时易翘起,难以保持原形。另外,在 LCE 细胞表面与其亲本 CNE 细胞有明显不同,LCE 细胞表面有少

量微绒毛、泡状结构和“树枝”状粘着结构,而 CNE 细胞有较丰富的皱褶,少见微绒毛,无“树枝”状结构。透射电镜也可明显看出,LCE 细胞内线粒体丰富,明显可见线粒体嵴的结构,也常见到粗面内质网。CNE 细胞则不同,线粒体畸变,结构不完整,细胞质内出现无结构空泡较多。LCE 细胞从 1988 年 4 月 6 日无血清传代至今,历时三年多,已传代 300 余次,细胞生长性状稳定,增殖迅速。我们对 100 代和 200 代的 LCE 细胞进行了生长曲线测定,不同代数的 LCE 细胞其倍增时间都在 16h 左右,200 代 LCE 细胞的分裂指数为 37%,并且对染色体也进行了分析,发现 LCE 细胞染色体众数为 53 条,众数区比较集中。而 CNE 细胞染色体众数为 69 条,众数区不明显。这两种细胞对 PHA 和 ConA 结合反应为阳性,但 LCE 细胞对凝集素的作用比 CNE 细胞更敏感。微核出现率二者较接近,CNE 为 30%,LCE 为 27.75%。

(2)人肺腺癌转移胸水无血清细胞系 HLAMP/S⁻的建立^[23]:

直接从人肺腺癌胸水中分离细胞,在 RDL 无血清培养基中长期培养,建立了一株 HLAMP/S⁻无血清细胞系,至今已传 80 余代,细胞生长稳定迅速。HLAMP/S⁻细胞倍增时间为 14—15h,分裂指数 42.2%,细胞最高倍增量为 20 倍,饱和密度 $1.85 \times 10^5/\text{cm}^2$,染色体众数为 54 条,众数区集中突出。HLAMP/S⁻细胞生长特征和粘着结构与 LCE 细胞相似。扫描电镜和透射电镜也都反映出与 LCE 细胞类似情况,有少量微绒毛,“树枝”状粘着结构和“鸭蹼”状粘着斑,透射电镜表明有丰富的线粒体和内质网。

(3)人小肠癌转移腹水无血清细胞系 HICMA/S⁻细胞系的建立^[24]:

从小肠癌转移腹水中分离细胞直接进行无血清建系培养,已传 80 余代,细胞生长稳定、迅速,生长特性与 LCE 和 HLAMP/S⁻细胞相似。扫描电镜观察,细胞的微绒毛和粘着结构与 LCE 和 HLAMP/S⁻也类同。透射电镜可见丰富的线粒体和内质网。HICMA/S⁻细胞的倍增时间为 16h,分裂指数 33.3%,饱和密度为 $1.44 \times 10^5/\text{cm}^2$,染色体众数为 53 条,众数区集中突出。PHA 和 ConA 凝集反应阳性,平板集落形成率 42%,微核率 35.3%。

以上三个无血清细胞系都进行了定期保存,复苏情况良好,活细胞数 90%以上。

对十几种不同细胞进行 RDL 无血清培养后,我们建立了三株无血清细胞系,这三个无血清细胞系共同特点是细胞粘附生长方式相似,有同样的无血清培养粘着结构,细胞质内有丰富的线粒体和粗面内质网;细胞生长旺盛,迅速,倍增时间和分裂指数与相应的含 10%血清培养基培养的同源细胞接近,细胞悬浮后仍为活细胞可继续生长。另外,无血清培养细胞系对外源因素及温度敏感,25℃十几分钟后,粘附细胞易脱壁形成圆形,但恢复 37℃细胞很快粘附生长。

(4)无血清培养细胞摇床悬浮生长^[25]:

我们将 RDL 培养基进行修改后,发展了一种 RDL-2 培养基,对 CHO 和 LCE 细胞进行了类似细菌培养方式的摇床悬浮培养,摇床培养细胞的增殖速度较静止培养的慢,但最终饱和密度大于静止培养细胞。摇床培养的细胞呈圆形,光滑透亮,细胞单个体积比静止培养的大。我们对摇床培养细胞也进行了传代①培养约 2 个多月,细胞生长良好,可以继续传代。LCE 细胞悬浮培养的饱和密度是静止培养的 1.4 倍,另外,摇床培养细胞的振荡频率在 80—100rpm 为宜,低于 60rpm,细胞容易沉积;大于 120rpm,对细胞生长不利。

(5)原代细胞的无血清培养:

以 RDL 培养基为基础,我们发展了一种 RDL-1 无血清培养基,用于正常原代细胞培养,我们培养了兔胚肾和婴地鼠肾细胞,RDL-1 培养基可以支持这两种细胞生长,在体外传代培养 3 次以上,历时两个多月。

以上我们利用 RDL 培养基对 4 种正常传代细胞系、7 种肿瘤传代细胞系、2 种原代细胞进行了无血清培养, RDL 培养基可以支持这些细胞生长;在此基础上我们又建立了三株无血清生长细胞系, 细胞系生长稳定迅速。另外, 首次利用细菌摇床培养方式对动物细胞进行了无血清培养, 细胞可以稳定增殖。

三、无血清培养细胞对抗癌药物的敏感性及对病毒的增殖影响

1. 无血清培养细胞系对抗癌药物的敏感性^[26]。

以同源有血清培养细胞为对照, 测定了无血清细胞系对已知抗癌药物的敏感性。无血清培养 HLAMP/S⁻ 细胞对阿霉素的作用敏感, 10 μ g/ml 阿霉素对 HLAMP/S⁻ 细胞有明显杀细胞作用, 但对 HLAMP 细胞抑制作用不明显。对顺铂的作用一样, HLAMP/S⁻ 细胞比 HLAMP 细胞敏感。阿霉素对 HICMA/S⁻ 细胞和 HICMA 细胞都有杀细胞作用, HICMA/S⁻ 更敏感。顺铂对 HICMA/S⁻ 细胞比 HICMA 细胞的作用敏感。从以上结果可以看出, 无血清培养细胞系对抗癌药物比相应的有血清培养细胞系更为敏感。这主要是因为培养基中消除了血清因子的影响, 直接反映了细胞对外源因素的反应。

2. 无血清培养细胞对体外病毒增殖的影响^[27]。

以 HLAMP 细胞为指示细胞, 测定了无血清 LCE 细胞和相应的有血清培养的 CNE 细胞对 HSV-1 病毒的感染敏感性。将 LCE 细胞 (4.87×10^5) 和 CNE (5.1×10^5) 计数后以同样浓度病毒感染, 分别在不同时间收集病毒悬液后, 测定指示细胞出现病变情况, 感染后 20h 收集的病毒悬液感染指示细胞后 68h 观察病变情况, CNE 细胞病毒悬液出现病变稀释度为 10^{-4} , 而 LCE 细胞的病毒悬液则为 10^{-6} 。再将不同时间收集的病毒悬液作系列稀释后感染指示细胞, 结果也表明, 在无血清培养细胞中繁殖的病毒, 感染指示细胞后, 出现病变的稀释度比有血清培养细胞高 2—3 个对数。以 RDL 培养基作维持液与 10% 血清培养基比较, RDL 培养基有利于病毒的繁殖, 病变稀释度高 3 个对数以上。显然血清是影响病毒繁殖的直接因素。另外, 测定了不同浓度血清对病毒繁殖的影响, 显然随着血清浓度的增加, 对病毒繁殖的抑制作用加强。分别以血清处理细胞或病毒, 观察细胞的病变情况表明, 血清处理病毒或血清处理细胞都影响病毒的感染效率, 血清处理病毒对病毒感染抑制作用更强。从以上结果可见, 无血清 RDL 培养基和无血清培养细胞有利于病毒的感染繁殖, 而血清对病毒的感染繁殖有明显的抑制作用。抑制机制可能是特异性抗体或非特异性抑制物封闭了细胞表面病毒受体或病毒外部的吸附蛋白。

四、无血清培养细胞系的生物特性研究

1. 无血清培养细胞系的粘附生长与骨架:

在常规细胞培养中, 细胞粘附作用常常是外源粘附因子介导细胞与基质粘着^[28,29,30]。所报道的无血清短期培养细胞, 为解决细胞粘着生长, 都预先在培养瓶上涂上鼠尾胶原或 Fibronectin 等, 而在 RDL 无血清培养基中细胞粘着生长, 无需作特殊处理。以 CNE 细胞为对照, 我们观察了 LCE 细胞的粘附生长全过程^[31]。CNE 细胞的粘附与常规培养细胞的粘附过程相同: 机械粘着——→极性铺展——→生长。LCE 细胞传代后在新的细胞瓶上粘附率很高, 30min 内绝大部分细胞已附壁, 并从胞质中伸出小突起, 这一过程随着培养时间的延长是渐进性的, 4h 突起增多形成“树枝”状, 每一“树枝”状突起末端有一“鸭蹼”状粘着斑。LCE 细胞补加血清后细胞的这种粘着结构减少或不明显, 并且随着培养时间的延长, 这种结构的减少也是渐进性的。将细胞重新恢复到 RDL 培养基中, 一定时间后这种粘着结构又复出现。根据细胞的生长状况, 增殖速度和无限传代, 完全可以排除细胞的这种特异粘着现象是由于营养不良造成的假象; 同时这也说明细胞的粘附生长并非血清依赖性, 可能存在着自我粘附生长调节系统。常规

的有血清细胞培养,由于血清中丰富的外源粘着因子,使细胞自我粘附调节系统被钝化。我们在无血清培养细胞系(LCE、HLAMP/S⁻和 HICMA/S⁻)中观察到的细胞粘附现象与经典描述的外源粘附因子介导粘附现象不同,并提出了受细胞基因控制的细胞自我粘附生长调节系统的观点。这对于在完全无血清因子干扰下描述细胞的生命现象无疑是非常有意义的,有利于我们对细胞生命现象本质的进一步认识。

LCE 细胞有丰富的微丝结构,与 CNE 细胞不同,其微丝结构以束状存在,与其存在着粘附作用相一致^[22]。另外,抗微管蛋白的间接免疫荧光显示,有血清培养 CNE 细胞的微管系统比 LCE 细胞较丰富,荧光亮度更强。

2. 在无血清培养 LCE 细胞中 C-myc 和 C-ras 基因的表达:

以 C-myc 的 C-ras 基因为探针,用细胞原位杂交的方法观察了 C-myc 和 C-ras 基因在 LCE 细胞和 CNE 细胞中的表达^[32],C-myc 基因在 LCE 细胞中的表达水平低于在 CNE 细胞中。当 LCE 细胞经 10%血清处理 48 小时后,C-myc 基因的表达量明显增加,与 CNE 细胞接近。C-ras 基因在 LCE 与 CNE 细胞中的表达与 C-myc 基因相似,10%血清处理 LCE 细胞 48 小时后,C-ras 基因的表达量也增加。这一结果与 Dot-blot 结果一致,银颗粒计数也说明了这一结果。显然,血清对细胞 C-myc 和 C-ras 基因表达有激活作用。

3. 无血清培养细胞的表面特性—PHA 和 ConA 对细胞的凝集作用:

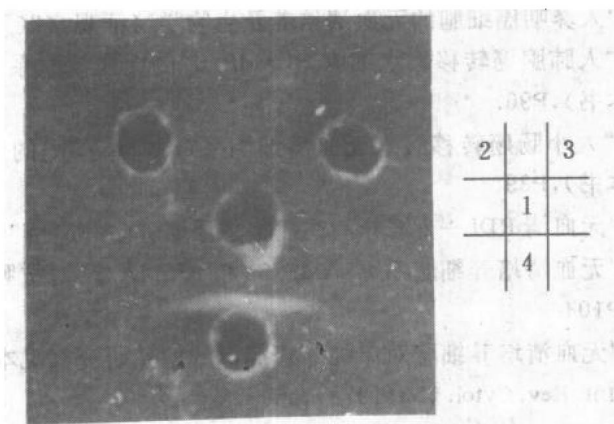
以同源有血清培养细胞为对照,观察了不同浓度 PHA 和 ConA 对三个无血清培养细胞系的凝集力^[33]。PHA 对 LCE 细胞的作用明显高于 CNE 细胞,对 HLAMP/S⁻、HICMA/S⁻细胞的凝集作用也都高于相应的有血清培养细胞,显然无血清培养细胞系对 PHA 的反应均比相应的有血清细胞系敏感。对 ConA 的反应则不尽一致,LCE 细胞对 ConA 的反应比 CNE 细胞敏感;而 HLAMP/S⁻和 HICMA/S⁻细胞则不同,对 ConA 的反应与相应的有血清培养细胞相比差异不明显。这说明不同的无血清培养细胞系其表面膜蛋白成份或结构及分布有一定差异。

4. 无血清培养细胞系的微核及染色体^[34]:

三个无血清细胞系与相应的有血清细胞系比较,同来源的细胞微核出现率差别不明显,并且都是以单微核为主。从对六个细胞系染色体分析来看,无血清细胞系的染色体众数区集中,众数突出,染色体多为 53—54 条。

以上是我们在无血清细胞培养研究方面所做的工作,我们在建立 HLAMP/S⁻和 HICMA/S⁻无血清细胞系的同时也建立了相应血清细胞系 HLAMP 和 HICMA,并作了比较研究^[35,36,37]。结果说明,无血清培养细胞系有与血清培养细胞系不同的生长方式和特性,无血清培养细胞系可能更真实地反映了细胞的生命本质。

在无血清细胞培养研究中,我们从牛初乳中分离乳促生长因子,从猪血清中分离了转铁蛋白,从人胸水中分离了促细胞生长因子及粘附因子,另外设计合成了 RDL 无血清培养基,在此基础上发展了适合原代细胞生长的 RDL-1 和适合于悬浮细胞摇床生长的 RDL-2 培养基;对十几种细胞进行了无血清培养,并建立了三株无血清培养细胞系和相应的有血清培养细胞系,对其生物学特征进行了比较研究。我们认为无血清培养基和无血清培养细胞系在应用和基础理论研究方面都有着广阔的前景和重要意义;它不仅为细胞分泌、代谢调控及基因表达等研究排除了血清干扰,而且为在无血清复杂因子干扰情况下描述细胞生命现象和研究细胞生命本质提供了有力证据。无血清细胞培养代替有血清细胞培养已成为现实。在完全无血清复杂因子干扰的情况下,利用无血清培养细胞系来研究生命现象的本质规律,将会为细胞生物学理论作出新贡献。



图版 1 双向免疫扩散图谱

1. 人肺腺癌胸水 2. 抗 Laminin 血清(兔抗鼠)
3. 抗 IV 型胶原血清(兔抗鼠) 4. 抗 Fibronectin 血清(兔抗人)

参 考 文 献

- [1] Lewis, et al, Anat. Rec, 5(1911), P277
- [2] Eagle, H. , Science, 130(1959), P432
- [3] Sato, G. , Biochemical Action of Hormones, 3(1975), P391
- [4] Sato, G. , Nature, 259(1976), P132
- [5] Lembach J. , J. Cell. Physiol. 89(1976), P277
- [6] Chen, et al, Science, 197(1977), P776
- [7] Castor, et al, J. lab. chin. Med. , 91(1978), P81
- [8] Gospodarowieg, D. et al, in Vitro, 14(1978), P85
- [9] Ramireg, G. K. et al, Biotechn. Bioeng. 35(1990), P82
- [10] Weinstein, I. B. , J. cell. Biochem. 33(1987), P213
- [11] Gered, E. et al, Pediatrics, 75(1985), P142
- [12] Wright, G. E. and Gaull, G. E. , Pediatrics Re. , 17(1984), 144A
- [13] 李文鑫, “牛初乳替代血清对培养细胞的 DNA 合成和增殖影响”, 武汉大学学报(自然科学版), 2(1991), p4
- [14] 李文鑫等, “乳清促生长因子的分离及部分特性”(见本书), P17
- [15] Sato, G. , Nature, 259(1976), P132
- [16] Sato, J. D. et al, J. Exp. Med. , 165(1987), P1761
- [17] Takayawa, Y. , et al, Biotech. Bioeng. 31(1988), P168
- [18] 李文鑫等, “转铁蛋白的分离纯化及部分性质研究”(见本书), P23
- [19] 李文鑫等, “人肺腺癌胸水中生长因子研究初探”(见本书), P30
- [20] 李文鑫等, “无血清培养基 RDL 在细胞培养中的应用 A. 传代细胞系的培养”(见本书), p50
- [21] 李文鑫等, “无血清培养基 RDL 在细胞培养中的应用 B. 肿瘤细胞系的培养”(见本书), P58

- [22] 李文鑫等,“人鼻咽癌细胞的无血清培养及生物学特征观察”(见本书),P84
- [23] 李文鑫等,“人肺腺癌转移胸水细胞 HLAMP/S⁻的无血清建系培养过程及其生物学特征”(见本书),P96
- [24] 李文鑫等,“人小肠癌转移腹水无血清细胞系(HICMA/S⁻)的建立及其生物学特性观察”(见本书),P89
- [25] 李文鑫等,“无血清 RDL-2 培养基在细胞悬浮培养中的应用”(见本书),P60
- [26] 李文鑫等,“无血清培养细胞系 HLAMP/S⁻和 HICMA/S⁻对抗肿瘤药物敏感性观察”(见本书),P104
- [27] 李文鑫等,“无血清培养细胞对单纯疱疹病毒的增殖研究”(见本书),P71
- [28] Grinell, F. , *Int. Rev. Cytol.* , 53(1978), p69
- [29] N. A. Kefalides, *Renal. Physiol.* , 4(1981), p57
- [30] F. G. Grinnel et al, *Cell*, 19(1980), p517
- [31] 李文鑫等,“无血清培养细胞的粘附作用观察”(见本书),P112
- [32] 李文鑫等,“无血清培养人鼻咽癌细胞亚系中 C-myc 和 C-ras 基因表达及人肺腺癌胸水对基因表达的影响”(见本书),P124
- [33] 李文鑫等,“无血清培养细胞的表面特性的研究——植物凝集素对细胞的凝集力观察”(见本书),P133
- [34] 曾灵芳等,“无血清培养细胞系的染色体及微核观察”(见本书),P140
- [35] 曾灵芳等,“人肺腺癌转移胸水细胞系 HLAMP 的建立及其生物学特征”(见本书),P160
- [36] 曾灵芳等,“人小肠癌转移腹水细胞系 HICMA 的建系培养及其生物学特征”(见本书),P168
- [37] 曾灵芳等,“人肺腺癌转移胸水对细胞骨架和细胞表面的影响”(见本书),P39

应用牛初乳进行无血清细胞培养研究

李文鑫 王经建 胡解郁
(武汉大学病毒学及分子生物学系)

体外培养细胞,通常是在培养基中补充 10—20%血清,血清为细胞体外生长提供了促细胞分裂、细胞粘附和铺展因子。细胞的无血清培养发展较快,其中乳汁因子代替血清因子进行细胞的无血清培养也正在研究之中。乳汁是哺乳动物初生期的主要营养物,它含有丰富的生长因子,能刺激 DNA 合成,促进细胞分裂。尤其是近年来在单克隆抗体,细胞大量繁殖和真核细胞基因表达研究中,细胞的无血清培养越来越显得重要。我们应用牛初乳进行无血清细胞培养,获得了初步结果。

一、细胞和细胞培养

正常大鼠肾细胞(NRK)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、小鼠乳腺癌细胞(MA782/5S-8101)培养在含 10%小牛血清,50 单位/ml 青霉素,50 μ g/ml 链霉素和 50 单位/ml 卡那霉素的 RPMI-1640(中国科学院生物物理所生化厂)或 DMEM(GIBCO)培养基中,37℃、5%CO₂ 和 95%空气的 CO₂ 培养箱培养。细胞传代培养用 0.25%胰酶(Difco)和 0.02%EDTA 分散细胞,每星期传代一次。

二、细胞的无血清培养

上述传代细胞系从 10%血清培养基中降低血清到 5%,培养 48h 后,经无血清培养基洗涤两次,经 0.125%胰酶/EDTA 分散后,用 2.5%牛初乳 RPMI-1640 或 DMEM 培养基稀释至所需浓度、接种培养,每 3—4 天换新鲜培养基,37℃,CO₂ 培养箱培养。

三、细胞增殖

实验测定了大鼠肾细胞(NRK)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和小鼠乳腺癌细胞(MA782/5S-8101)在无血清牛初乳培养基中的生长情况。在 2.5%的牛初乳培养基中,NRK 细胞 9 天增殖 19 倍(表 1),CHO 细胞 9 天增殖 25 倍(表 2),MA782/5S-8101 细胞 7 天约增殖 24 倍(表 3)。细胞增殖率分别是 10%小牛血清培养基的 32%、42%和 37%。这三种细胞在无血清无牛初乳培养基中均未表现出明显地生长。

四、细胞在无血清牛初乳培养基中的生长特征

将在 10%小牛血清培养基中生长的 NRK,CHO 和 MA782/5S-8101 细胞转为无血清牛初乳培养基中后,细胞呈悬浮状态生长,细胞多增殖为细胞球,最大直径可达 1mm。另外,我们对 CHO 细胞进行了传代观察,发现 CHO 细胞开始在牛初乳培养基中呈悬浮生长,但传代到 8 代(约 70 天)左右,有少数细胞开始附壁生长,形成可附壁的细胞集落。