

产生有用物质的动物细胞培养法

——无血清培养基开发的动向

一、前言

动物细胞组织培养法在医学领域里的研究,经过十余年的努力,有了很大的发展。尤其对人体恶性肿瘤组织的培养,早在六十年代,人们就利用 HeLa 细胞株在浮游状态下能够增殖的变异亚种(Subclone),开始进行了搅拌培养。

但细胞培养也还存在着许多未能解决的问题,例如除 L 细胞等之外,在大多数动物细胞培养方面,都应用 10% 左右的牛血清,特别是牛胎儿血清。由于其批号不同,细胞增殖率差别亦大。此外,在有用物质的产生等方面,其重演性也存在着很多问题。同时,这种血清价钱较贵,有时接近培养成本的 90%。又由于在培养基中含有大量的血清而带来自培养基中将生理活性物质进行精制的问题。所以,开发适合于各种目标的组织培养细胞株的无血清培养基便成为当务之急。

二、动物细胞培养的现状和无血清培养基开发的动向

真正的动物细胞大量培养法是在进入六十年代之后,当 L 细胞、HeLa 细胞、BHL21 株细胞等等在悬浮状态下进行搅拌培养时开始的。如大鼠腹水肿瘤细胞和淋巴系细胞,原来就是在悬浮状态下增殖的细胞株,进行搅拌培养也有很多报道。

另外,只在单层状态下增殖的细胞,先接种在圆筒状的培养瓶中,然后使培养瓶旋转,成为转瓶法(roller bottle)培养。目前,进一步改良的结果,使直径为 200 μ 左右的塑料微粒带正电荷,再使单层增殖性的细胞附

着在上面,和悬浮培养时一样进行搅拌培养。这样就开发了使每一培养基量的细胞飞跃增加的微载体培养法(microcarrier culture)。

下面介绍株化了的动物细胞在无血清培养基中培养的最近进展。

以 Eagle 的 MEM 为代表的合成培养基,其主要成分是维生素、氨基酸和糖类。通常,细胞的增殖在 MEF 培养基中需要添加

表 1 Sato C H 等总结的生长因子的种类*

激 素	浓 度
胰岛素	0.1~10 μ g/ml
高血糖素	0.05~5 μ g/ml
卵泡刺激素	0.05~0.5 μ g/ml
生长激素	0.05~0.5 μ g/ml
Somatomedin C 或 MSA	1~100 ng/ml
表皮生长因子	1~100 ng/ml
成纤维细胞生长因子	1~10ng/ml
神经生长因子	1~10ng/ml
甲状旁腺激素	1~10ng/ml
促甲状腺激素释放激素	1~10ng/ml
黄体激素释放激素	1~10ng/ml
前列腺素 F _{2a}	1~100 ng/ml
前列腺素 E ₁	1~100 ng/ml
三碘甲状腺氨酸	1~100pM
氢化可的松	10~100nM
黄体酮	1~100nM
睾酮	1~10nM
雌二醇	1~10nM
粘蛋白	
运铁蛋白	0.5~100 μ g/ml
去脂脂肪酸白蛋白	0.5~2mg/ml
附着因子	
冷不溶性球蛋白	0.5~5 μ g/ml
血清分散因子	0.5~5 μ g/ml
胎球蛋白	1mg/ml

* 引自 Barnes D et al: Cell, 22: 649, 1980

血清,特别是培养人体细胞必须加有血清。然后, Sato 等人最近在多数人体细胞的培养中,由于添加了几种激素和生长因子而成功地开发了无血清培养基。他们极其细心地就多数细胞株需要激素的程度,进行了探索,结果大多数的细胞株在增殖上都需要生长因子有胰岛素、运铁蛋白表皮生长因子(Transferrin Epidermal Growth Factor)、成纤维细胞生长因子和氢化可的松等等(见表1)。

Sato 和村上等还报道了利用无血清培养法来大量生产免疫球蛋白。其中,小鼠骨髓瘤(myeloma) MPC-11 细胞在加有运铁蛋白、乙醇胺、亚硒酸盐(selenite)的完全合成培养基(TES 培养基)中静置培养,获得了和有血清培养基时一样的增殖。在含有大豆磷脂成分磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine)和磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol)的 P-TES 培养基中,即使进行搅拌培养,也会看到很好的增殖效果。进而,他们在利用加有生长因子的无血清培养基来培养 MPC11-BL 杂交细胞株、以检定生长因子的时候,判明乙醇胺在胰岛素、运铁蛋白和硒共存下是有效果的,将这四种因子配合在一起(称为 ITES),据认为有可能使大多数杂交细胞株连续不断地增殖。在这种培养基中,将细胞培养后的上清液用 50% 硫酸铵处理,便得到抗体蛋白。据认为,这种培养基也适用于其它各种小鼠杂交系细胞的培养。

此外,还报道了关于 MPC-11 细胞在增殖上对维生素的需求性。MPC-11 细胞对胆碱和维生素 B₂ 有强的需求性。其最佳浓度,胆碱为 10 μg/ml、维生素 B₂ 为 200ng/ml。

据认为,维生素 H、叶酸、烟酰胺以及泛酸在细胞以一般的速度增殖时是必要的。进而,认为豚豚(proteose peptone)对 MPC-11 细胞的增殖也有效果。

村上等在人结肠癌细胞 HC 84 S 株的培养方面取得了成功。在无血清培养基中,有胰岛素、高血糖素、表皮生长因子、运铁蛋白、

氢化可的松、三碘甲状腺氨酸、硒以及维生素 C。HC 84 S 株在这种培养基中进行培养,达到了有血清培养基培养时 3 倍的生长增殖能力。村上等还利用 MPC-11 株,对各种激素进行了研究,确定了 MPC-11 株的生长因子。

表 2 影响 MPC 11-BL 细胞株增殖的生长因子的协同效果

加入的生长因子	细胞数量 数值×10 ⁻⁴ /培养皿
血清(7.5%)	145
胰岛素+运铁蛋白	6
胰岛素+运铁蛋白+亚硒酸盐	6
胰岛素+运铁蛋白+乙醇胺	70
全部生长因子	114
无胰岛素	8
无运铁蛋白	4
无乙醇胺	8
无亚硒酸盐	69
加松驰素	102
加 ACTH	107
加催乳激素	105
加生长激素	94
胰岛素+运铁蛋白+乙醇胺+亚硒酸盐	97

在 SFFD 培养基中加入的各生长因子最终浓度分别为:胰岛素 5 μg/ml,运铁蛋白 35 μg/ml,亚硒酸盐 25 nM,乙醇胺 20 μM,松驰素 100 ng/ml,ACTH 2.5 milliunit,催乳激素 0.1 μg/ml,生长激素 1 μg/ml

此外,山根绩等利用他们获得的自发产生干扰素(IFN)的细胞 UMCL,研究出培养该细胞株用的无血清培养基。还报道了在产生人干扰素的淋巴母细胞方面,如用 RITC-55.9 无血清培养基培养 Namalwa 株细胞时,与用有血清培养基培养时产生同样的增殖效果(见表3)。

悬浮细胞培养用的无血清培养基 RITC 55.9 是为了大量培养而以 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DEM)为基础,加有氨基酸、维生素、核酸衍生物激素以及重金属等的培养基。图 1 是表示在这种无血清培养基和通常应用的有血清培养基中进行培养时,持

表 3 无血清培养基(RITC-55.9)的组成

		mg/l			
DEM*		9,800	有机化合物	腐胺·2HCl	0.1
氨基酸	L-丙氨酸	20		次黄嘌呤	4
	L-天门冬酰胺·H ₂ O	56		胸腺嘧啶核甙	0.7
	L-天门冬氨酸	20		脱氧胞苷	0.03
	L-半胱氨酸·HCl·H ₂ O	40		脱氧腺苷	1.0
	L-谷氨酸	20		6,8-二羟基嘌呤	0.3
	L-脯氨酸	20		无机化合物	FeSO ₄ ·7H ₂ O
维生素	维生素 C	10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0.02
	维生素 H	0.2	Na ₂ SeO ₃		0.004
	叶酸	0.01	CaCl ₂		100
	维生素 B ₁₂	0.1	缓冲液	β-甘油酸二钠	1500
	葡萄糖	1,000		NaHCO ₃	1300
	谷胱甘肽	1.0	激素	胰岛素	10
		运铁蛋白		5	

* Dulbecco 改良的 Eagle 培养基

在上面组成的培养基中,加 0.5%浓度的牛血清白蛋白或人血清白蛋白,用 1N NaOH 及 NaHCO₃ 调节至 pH 7.2,此时渗透压为 285±5mOsm/kg

续产生干扰素的细胞的增殖和干扰素产量的关系。无论在哪一种培养基中,从细胞增殖和产生干扰素同等程度来看,表 3 中的

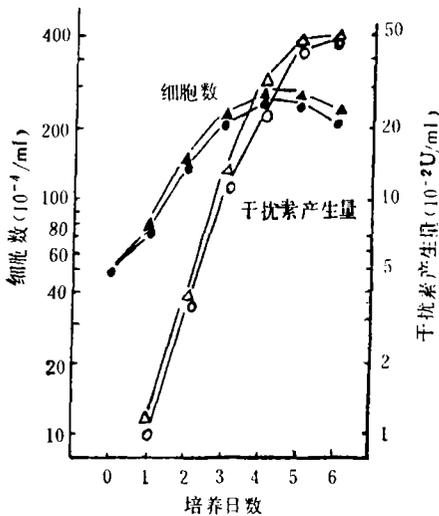


图 1 持续产生干扰素的细胞在有血清培养基及无血清培养基中细胞增殖和产生干扰素的关系

将持续产生干扰素的细胞(CB-3512)以 5×10^5 /ml 的细胞数接种在加有 10% 牛胎儿血清的 RPMI-1640 培养基中和无血清培养基(RITC-55.9)中,比较细胞增殖量和干扰素产量的关系

- ▲: RPMI-1640 培养基中的细胞增殖
- : RITC-55.9 培养基中的细胞增殖
- △: RPMI-1640 培养基中自发产生的干扰素
- : RITC-55.9 培养基中自发产生的干扰素

RITC-55.9 无血清培养基可以代替通常应用的有血清培养基。

但在产生有用物质时的大量培养方面,除无血清培养基之外,另一要点是高密度培养。存在的问题是:在培养细胞的培养基中,所含维生素类等必要营养素的量;以及培养细胞所排出的抑制性物质的蓄积问题。

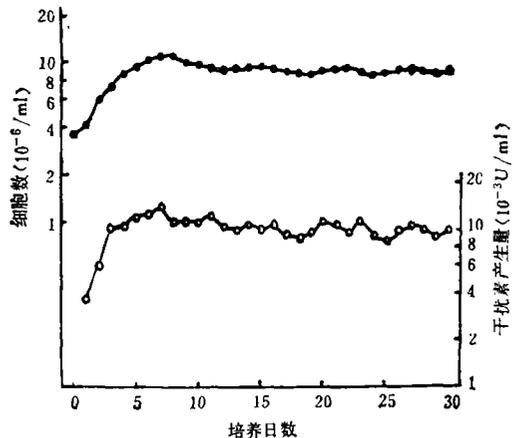


图 2 利用无血清培养基(RITC-55.9)进行高细胞密度培养持续产生干扰素的细胞(CB-3512)时所产生的干扰素

将CB-3512 细胞接种在RITC-55.9 培养基(10ml)中,每日进行培养液的交换

- : 细胞数。○: 干扰素产生量/24 小时培养

图 2 表示山根等用无血清培养基 RITC-55.9, 在高密度下的细胞培养和产生干扰素量的关系。他们的大量生产设备单纯明确地为解决上述问题, 而只进行培养液的交换操作, 这是一种极其简便而效率又高的方法。结果, 细胞数约为 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 其细胞增殖进入稳定状态, 每天得到的交换液中的干扰素效价达到 $1 \times 10^4 \text{u}/\text{ml}$ 。这和过去所应用的培养方法产生的干扰素比较, 效率大约提高 10 倍。

Ham R G 等也进行了关于无血清培养基的研究, 他们制作了很多种类的成纤维细胞用培养基。结果发现细胞不同则培养基中各种氨基酸的最佳浓度和它们之间的比例亦异。为了使氨基酸和无机盐类的浓度最佳化, 主张在各培养基中添加的生长因子限制在最小限度。例如 Sato 等在用于 3T3 株细胞的无血清培养基中, 除了 ITS (胰岛素、运铁蛋白和硒) 之外, 必须加有 EGF、FGF 等物。相反, Ham 等在用于 3T3 的培养基和 MCDB 402 培养基中加有胰岛素、FGF 及氢化可的松能达到和有血清培养基同等程度的增殖。他们认为, 生长因子是作为使培养细胞原来的代谢受到调整的物质而加以利用的, 但若将生长因子不断地大量加入, 则培养基的选择性就会丧失。

Ham 等还研究了抑制成纤维细胞增殖, 而有选择地仅使人体表皮细胞增殖的方法, 从而开发出 MCDB 151 培养基 (含少量的血清), 再进一步开发出无血清的 MCDB152 培养基, 使人体表皮细胞得到增殖。MCDB 152 培养基有广泛的应用性, 除人体表皮细胞之外, 人体乳腺细胞和前列腺细胞亦同样能够增殖。

血清和大多数的生长因子是蛋白性物质 (包括肽类), 大多数有用物质, 例如干扰素也是蛋白性质的物质。要从培养液中分离精制有用物质, 一般认为在培养基中不加作为生长因子的蛋白性物质较为有利 (如使用抗体

柱则能达到相当的效果)。从这样的观点出发, 冈部、大澤在无血清、无蛋白培养基中, 成功地培养了分化型扁平上皮癌细胞。该细胞的分裂时间大约是 30 小时, 不必添加表皮生长因子 (EGF) 和胰岛素。又慢性骨髓性白血病细胞亦有可能在无蛋白培养基中进行培养。这些研究结果, 提出了一个重要课题, 就细胞增殖来说, 在血清成分之中必不可少的究竟是哪一个成分? 经研究认为, 脂质亦是不可忽视的成分之一。对于脂质, Ham 和山根等也取得了令人满意的结果。

Ham 等当培养人二倍体成纤维细胞的时候, 他们在开发出来的 MCDB 105 培养基方面, 除了 EGF 等生长因子之外, 在培养基中加了不饱和脂肪酸、卵磷脂、神经鞘磷脂、胆固醇以及含有维生素的核糖体等, 直到第三代才在传代培养中获得成功。他们认为脂质对细胞的增殖来说, 是必要的。

山根等也认为脂质是重要物质, 但一般说来, 脂质是一类在水中不溶解或难溶解的物质, 所以有必要使之作为水溶性或以微泡状态加到培养基中去, 例如, 使亚油酸等脂肪酸在酒精中溶解, 以钠盐等形式加到培养基中时, 变成微细的微泡状态。但也有报道指出, 将这样的脂肪酸以游离的形式加入时, 当其浓度达到 $1 \text{mg}/\text{l}$ 左右时, 它有较强的细胞毒性。他们认为, 血清白蛋白的细胞增殖能力, 其主要成分白蛋白仅是一种载体, 细胞的增殖是由于油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸的存在而产生的。

他们对哪些物质可以成为脂肪酸载体白蛋白代替物进行了种种研究。用环糊精 (Cyclodextrin) 包埋疏水性脂肪使之成为亲水性这点引起人们的注意。环糊精有 α 、 β 和 γ 三种, β -环糊精在 $200 \text{mg}/\text{l}$ 的浓度时, 对人的淋巴细胞 UMCL 株有细胞毒性, 而 α 及 γ 型即使是 $2000 \text{mg}/\text{l}$ 亦不显示细胞毒性。更由于 α 型比 γ 型便宜, 作为脂肪酸包埋体, 他们选中了 α 型, 改良了 Szejtli 的方

法进行包埋。先将 α -环糊精溶于蒸馏水,在氮气流下滴加亚油酸等脂肪酸的乙醇溶液,加温到75°C,放置2小时,再于4°C放置20小时,离心分离,得到沉淀部分,用乙醇、石油醚等洗涤,冷冻干燥后即可应用。

在上述的无血清培养基 RITC-55.9 中,用此 α -环糊精包埋的脂肪酸代替血清白蛋白,加到100 mg/l 的浓度,来培养人淋巴细胞UMCL 株细胞,结果,即使在加有包埋脂肪酸的 α -环糊精的无血清培养基中,亦显示和在有血清培养基中培养时同等程度的增殖能力。干扰素产生能力也和在有血清培养基中培养时一样,达到5000单位,在长期传代培养中也有成功的报道。

当进行动物细胞的大量培养时,与无血清培养基的开发同等重要的还有培养基的高压灭菌问题。在培养基的灭菌中曾考虑了过滤灭菌法,但用这种方法除去微生物等完全可以做到,而除去病毒等就不那么简单了。

在利用病毒等诱发所培养的动物细胞来生产有用物质(如干扰素)的例子中,在诱发之前若是支原体和病毒就已存在于培养液中,那便成问题了。因此,在细胞大量培养的场所,采取高压灭菌法来灭菌是重要的问题。故经受得了高压灭菌的培养基的开发,一直受到人们的重视。根据山根等试验了在培养基成分中主要成分可以高压灭菌的改良培养基。要点是在MEM的成分中除去谷酰胺和碳酸氢钠,加入琥珀酸钠,再进行高压灭菌,其余的进行过滤灭菌,然后调制成培养基。

三、应用动物细胞培养法生产有用的生理活性物质的例子

上面就无血清培养基的开发动向等作了叙述。那么,若是利用这样的培养基来生产有用物质作为最终目标的话,考虑什么样的细胞好呢?对这个问题的回答有很多,有必要进行正确的解释,例如,就淋巴母细胞样细胞株来说为数极多,把名单全部列出来是困难的。表4中表示各种持续产生干扰素的

淋巴细胞样细胞株。文中将来自成人末梢血及脐带血的淋巴母细胞样细胞株产生干扰素的能力列表(略)。

表 4 各种持续产生干扰素的淋巴母细胞样细胞株

细胞来源	细胞株名	文献
正常成人淋巴细胞	RPMI-7666, RPMI-7466	*1
	RPMI-82880, RPMI-84069, RPMI-2177	*2
	RPMI-1788, EP-2, FS-2, RMcC	*3
Burkitt's 淋巴瘤	Namalwa	*4, *5
	EB-1, EB-2, Ogun, SL ₁	*1
	AL ₁	*2
白血病	RPMI-8866, RPMI-4265	*2
	SK-L ₁ , SK-L ₂ , LK-1D, LK-57, LK-60	*1
白血病增多症(原因不明) 传染性单核细胞症	GCS-1, GCS-2, GCS-5, GCS-6	*2
	PGLC-334, PGLC-33J, PGLC-42D, PGLC-42F, PGLC-44B	*2

- *1. Zajac B A et al: Cancer Res. **29**: 1467, 1969
 *2. Haase A T et al: Proc Soc Exp Biol Med. **133**: 1076, 1970
 *3. Pikerling L A et al: Proc Natl Acad Sci USA, **77**: 5938, 1980
 *4. Adams A et al: J Gen Virol. **28**: 219, 1976
 *5. Tovey M G et al: Nature, **267**: 455, 1977

表 5 细胞株名略号

细胞株略号	细胞株
FM3A	小鼠(C3H/He)自发性乳癌上皮细胞
3T3	小鼠(Swiss)胎儿成纤维细胞
L	小鼠(C3H)成纤维细胞(致癌剂甲基胆蒽处理)
BALB/c3T3	小鼠(Balb/c)胎儿成纤维细胞
L5178Y	小鼠(DBA/2)淋巴性白血病细胞
L1210	小鼠(DBA/2)淋巴性白血病细胞
S49	小鼠T淋巴肉瘤细胞
BHK21	田鼠(Syrian)生后--天肾成纤维细胞
CHO	田鼠(中国)卵巢成纤维细胞
V79	田鼠(中国)肺成纤维细胞
CHF	田鼠(中国)成纤维细胞
CHL	田鼠(中国)肺成纤维细胞

近年来,日本在对动物细胞的大量培养的同时,被保存的人癌细胞培养株也日益增加起

来。大星、关口等报道,利用日本的设备被保存着的人癌细胞株,据推测大约有150种之多。今将细胞株的株名略号列于表5中。

另外,哺乳类细胞的培养株和已建立的遗传性变异株也是饶有兴趣的研究对象。瀚

野根据不同的表现型将其归为5组:(1)有营养要求的;(2)有细胞周期;(3)对放射线敏感的;(4)耐药的;(5)其他,等等。

张久连节译 郑绳一校

[仓根隆一郎 ファインケミカル(11):3,1982]

荧光法在有机化合物定量分析上的应用

1852年 Stokes 虽已发表了有机化合物(如奎宁、叶绿素等植物成分)荧光现象的论文,但由于仪器技术的低劣状态,妨碍着这项技术的广泛使用。直到最近40年左右,才有了高度发展的荧光分光计和荧光显微镜,从而在理论上和分析上均取得了重大的进展。进而对分子生物化学、分子药理学以及临床化学产生了很大的影响(如自动分析、急诊病例分析、药物分析)。

在一些迅速发展的领域中,荧光分析方法的应用正在大幅度地增长。原因在于能不断增加供应低中价格、适于实验室应用的荧光和磷光的测定仪器,其分析灵敏度与仪器分析的要求相接近。

虽具有上述优点,但荧光法研究工作者和一些专业学科工作者(如医师、刑法学者等)之间合作与交流还跟不上形势的发展。

本文列表介绍了250多种药物和有机化合物荧光分析法的应用,包括分析介质、附加物质、纯化及预处理方法、消光波长、发射波长、灵敏度以及特殊荧光技术和有关文献。本文所提供的文献仅限于生物介质中有机化合物的定量分析法。

1. 基础理论

(1) 激发发光:

物质吸收光后,辐射能可转为热能(发热)、化学能(反应)或其他的辐射能(发光)。物质吸收一定频率的光后,发射另外一个频

率的光,即为发光现象。它又可分为荧光和磷光。这二者区别在于熄灭时限和对温度的依赖性(即磷光大多数在低温时才能观察到),以及产生发射时电子状态的不同(即单重态 Singulett 或三重态 Triplet)。

目前,除了光致发光外,生物发光和化学发光,也用于生化分析。

为了解荧光过程,有必要了解荧光分子的能量状态。能级图描述了分子中所有电子可能的(容许的)能级,并用它来表征其光谱性质。因为每个能级之间的转变相当于能

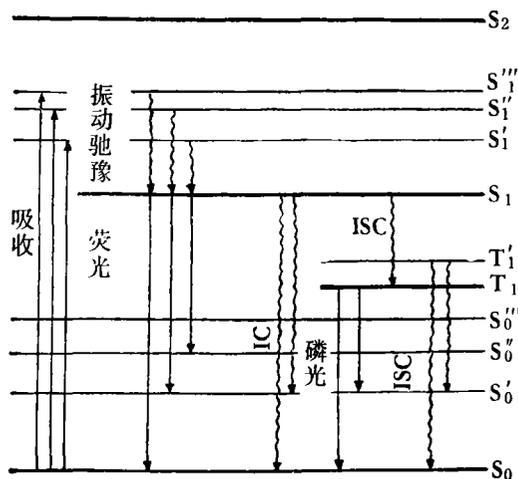


图1 简化的荧光能级图及其竞争过程

S: 单重态
T: 三重态
0: 基态
IC: 内转换
ISC: 系间跨越