

H18 杂交瘤抗凋亡能力的改造

王贤辉 徐 静 张 阳 米 力* 陈志南*

(第四军医大学细胞工程中心,西安 710033)

摘 要 利用 PCR 从 pGEM-T-bcl-X_L 质粒中获得 bcl-X_L 基因,构建真核表达载体 pEF-bcl-X_L,脂质体法转染杂交瘤细胞, G418 筛选稳定表达株, Western blotting 检测目的蛋白表达,流式细胞仪检测 Bcl-X_L 提高杂交瘤抗正丁酸钠诱导凋亡的功能。将构建的编码鼠 bcl-X_L 基因的真核表达载体 pEF-bcl-X_L 转染 H18 细胞后,获得稳定的表达株细胞,稳定表达 Bcl-X_L 的细胞具有抗正丁酸钠诱导凋亡的功能。鼠 bcl-X_L 基因在杂交瘤细胞中稳定表达,提高了杂交瘤抗凋亡的能力,对高密度大规模培养杂交瘤细胞具有重要意义。

关键词 bcl-X_L 基因,杂交瘤细胞,表达

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0705-04

哺乳动物细胞的大规模高密度培养已成为现代生物制药产业的重要组成部分。在大规模培养过程中获得高细胞密度和高产物浓度是细胞工程的研究热点。但在生物反应器中诸如缺氧、营养缺乏、代谢产物聚集、流体力学等因素可影响细胞并激活其凋亡程序,发生死亡,影响细胞大规模高密度培养。因此,提高宿主细胞的抗凋亡能力,抑制凋亡的发生将提高细胞生产目的产品的能力^[1,2]。

与凋亡相关的一系列基因产物可对细胞凋亡进行正、负向的调控,因此通过导入相应基因可以调节细胞凋亡。Bcl-2 家族具有抗凋亡能力,其成员 Bcl-X_L 主要位于线粒体外膜并可和 Casapase 结合,通过阻止细胞色素 c 的释放和抑制 Casapase 的激活而阻止凋亡的共同通路,抑制凋亡的发生^[3,4]。因此我们通过克隆鼠 bcl-X_L 全长 cDNA 构建 pEF-bcl-X_L 真核表达载体并转染 H18 杂交瘤细胞,以期提高 H18 杂交瘤细胞抗凋亡的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

pGEM-T-bcl-X_L 质粒、pEF 质粒、*E. coli* DH5 α 宿主菌和 H18 杂交瘤细胞系(源于 SP2/0 细胞,分泌抗人肝癌单抗 HAb18)均为本室保存,限制酶、Taq 酶、

RPMI1640、DMEM、新生牛血清及脂质体 lipofectamine 2000TM均购自 Gibco 公司;T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 产品;DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司;plasmid purification kit 购自上海华舜公司。正丁酸钠购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 pEF-bcl-X_L 真核表达载体构建 以 pGEM-T-bcl-X_L 重组质粒为模板,设计引物 bcl-X_LF: 5'GATC CTG-CAGATGTCTCAGAGCAACCGGGAGC 3', bcl-X_LR: 5'GATC CTCGAGTCACTTCCGACTGAAGAGTGAGC 3'。用 *Pst*I 和 *Xho*I 双酶切 PCR 产物和表达载体 pEF,凝胶回收、纯化酶切后的 bcl-X_L 和 pEF,用 T4 DNA 连接酶连接酶切回收产物,连接产物转化 DH5 α ,用含氨苄青霉素的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,从转化的平板上挑取克隆,培养提取质粒,*Pst*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定,选出含有插入目的片段基因的克隆,即为构建的重组真核表达载体 pEF-bcl-X_L。

1.2.2 pEF-bcl-X_L 质粒的转染及筛选 转染前将对数生长的 H18 杂交瘤细胞重铺于 6 孔板中,待细胞长至 80% 覆盖率时进行转染。取 3 μ g DNA, 6 μ L lipofectamine 2000TM 各加入 100 μ L 无血清 DMEM 中,轻轻混合,室温孵育 20min。细胞用无血清 DMEM 洗 2 次,加 800 μ L 无血清 DMEM,滴加转染液,37 $^{\circ}$ C, 5%

CO₂ 培养 8h 后弃转染液,换含 10% 小牛血清的 DMEM 继续培养。转染后 36h 加入 500mg/L G418 进行筛选,药物浓度至 800 mg/L 时,将细胞有限稀释于 96 孔板,筛选克隆细胞株,进行鉴定。

1.2.3 Western blotting 鉴定稳定表达株:用细胞裂解液裂解转染质粒的 H18 细胞 2×10^6 个,提取蛋白,Bradford 法蛋白定量,用相同量的细胞蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电转 PVDF 膜(按说明书操作),一抗为兔抗鼠 Bcl-X_L 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。

1.2.4 细胞凋亡的定量分析:取经 Western blotting 鉴定的杂交瘤细胞培养 36 h,更换细胞培养液,加入 0.4 mmol/L 正丁酸钠的新鲜培养液,再培养 48 h 后,离心收集细胞,用 Annexin V (Santa Cruz 公司)和 PI 进行双重染色后,以流式细胞仪检测各条件下荧光强度,反映凋亡细胞的比例。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。

1.2.5 细胞活性的测定:以 5×10^4 细胞/mL 的浓度接种杂交瘤细胞于 96 孔板(Costar 公司)内,200 μ L 细胞悬液/孔,培养 3 d 后,以含不同浓度正丁酸钠(NaBu)培养液更换各孔培养液,每一条件设 3 个复孔,分别于不同时间点加入 5 mg/mL MTI(Sino-American Biotech 公司)20 μ L/孔,孵育 4 h 后,加入 DMSO (Pierce 公司)150 μ L/孔,融解细胞内结晶,以酶联免疫检测仪测定 A_{490nm} 值(OD 值)。实验重复 3 次。绘制时间效应曲线。

1.2.6 抗体分泌量检测: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。

2 结 果

2.1 pEF-bcl-X_L 真核表达载体构建

以 pGME-bcl-X_L 为模板,用 EBF 和 EBR 引物扩增获得约 710bp 的 bcl-X_L 基因,克隆入 pEF 后用 *Pst*

I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,载体片段为 5.5 kb,酶切后目的片段为 710bp(Fig. 1)。

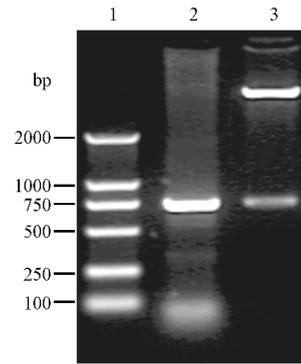


图 1 pEF-bcl-X_L 真核表达载体酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant pEF-bcl-X_L

1. DL2000 marker
2. PCR product of bcl-X_L ;
3. pEF-bcl-X_L cut with *Pst* I and *Xho* I

2.2 Western blotting 鉴定稳定表达株

挑取三孔克隆细胞,G418 药物筛选浓度 800 μ g/mL,细胞经裂解后,取相同含量的细胞裂解蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示 D4、D2、C3 三孔克隆均表达 Bcl-X_L 蛋白,其中 D4 表达量最高,而正常 H18 细胞不表达 Bcl-X_L,Bcl-X_L 的分子量为 26kD(图 2)。

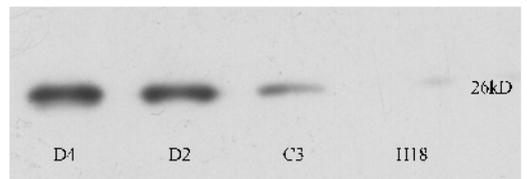


图 2 Western blotting 鉴定 Bcl-X_L 表达

Fig. 2 Western blotting analysis of Bcl-X_L expression

D4, D2, C3, different clonal cells originate from H18 hybridoma cell transfected by pEF-bcl-X_L

2.3 细胞凋亡的定量分析

正常活细胞带负电的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)定位于细胞膜内侧,细胞发生早期凋亡时,PS 由细胞膜的内侧暴露于胞膜外,即 PS 外化的现象。Annexin V-FITC 是一种标记有荧光素的钙依赖磷脂结合蛋白,与 PS 有很强的亲和力,可特异地与 PS 结合^[7]。以 Annexin V-FITC 和 PI 双重染色,可将 NaBu 引起杂交瘤的凋亡(Annexin V⁺ 细胞)与坏死的细胞(Annexin V⁺/PI⁺ 细胞)区分开。结果显示正常杂交瘤细胞在含 0.4 mmol/L NaBu 培养液中培养 36 h 后,凋亡细胞比例为 46%,而 H18、D4 杂交瘤细胞中凋亡细胞比例仅为 10%(图 3);引起坏死细胞的比例二者相同为 8%。

2.4 细胞活性的检测

用 MTT 法检测 NaBu 对正常 H18 和 H18、D4 杂

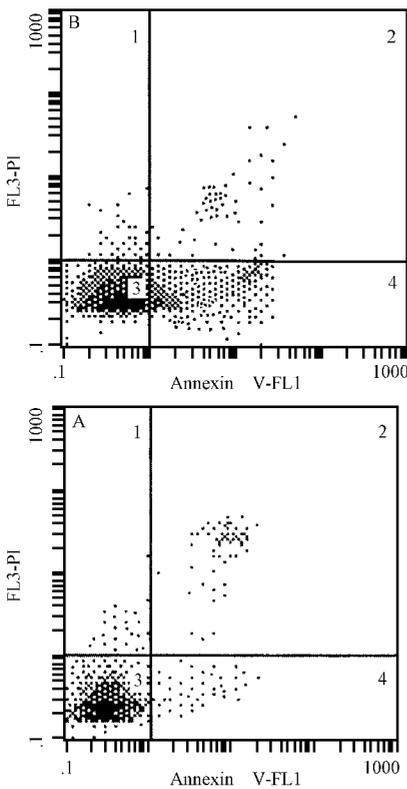


图3 流式细胞仪分析凋亡细胞比例

Fig.3 FCM analysis of percentage of apoptosis cell

Apoptosis cells induced by 0.4mmol/L NaBu. A. H18.D4 hybridoma cell; B. Normal H18 hybridoma cell (1. Quadrant, cell fragment; 2. Quadrant, necrotic cells; 3. Quadrant, normal cell; 4. Quadrant, apoptotic cells)

交瘤细胞活性影响的变化。正常 H18 杂交瘤细胞在 48h 内细胞活性变化明显,呈现下降趋势;而经改造的 H18.D4 杂交瘤可抵抗 NaBu 对细胞的负性作用,其活性变化缓慢(图 4)。

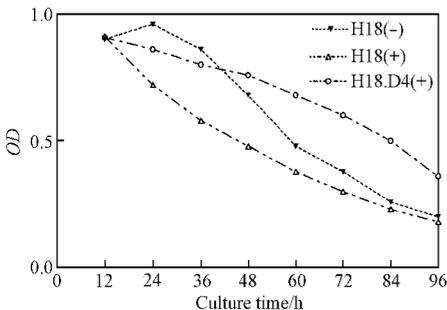


图4 NaBu 对不同杂交瘤细胞活性的影响

Fig.4 Effect of NaBu on different hybridoma viability

(-)without NaBu, (+)with NaBu

2.5 NaBu 对不同细胞抗体分泌量的影响

夹心 ELISA 法检测 0.4mmol/L NaBu 对正常 H18 和 H18.D4 杂交瘤细胞抗体分泌能力的影响。经 0.4 mmol/L NaBu 作用的 H18 杂交瘤细胞,培养上清中抗体的浓度与未经 NaBu 作用的 H18 杂交瘤细胞

相比,抗体浓度没有显著变化,为 $36\mu\text{g}/\text{mL}$;而经改造的 H18.D4 杂交瘤细胞培养上清中抗体浓度呈上升趋势,浓度为 $96\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 5)。

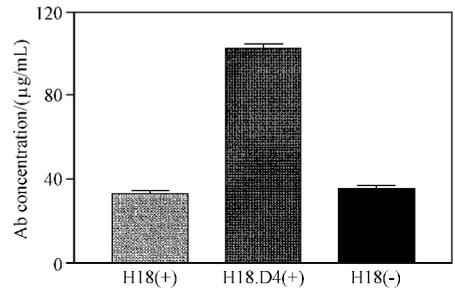


图5 NaBu 对不同杂交瘤细胞分泌抗体的影响

Fig.5 Effect of NaBu on different hybridoma secretion antibody

(-)without NaBu, (+)with NaBu

3 讨论

动物细胞在生物反应器中进行大规模高密度培养时,细胞的生长易受各种条件的影响而变化,如营养缺乏、代谢产物累积、pH 和溶氧、机械搅拌剪切力等因素,都会诱发细胞凋亡^[5]。Singh RP 等人报道在批式规模化培养中,细胞凋亡占细胞死亡的 80%^[6]。而细胞凋亡的发生会大大缩短细胞培养时间,影响细胞达到高的培养密度,使目标产量下降。因此,抗细胞凋亡的研究,对提高动物细胞表达产品的产量具有重要意义。

近年来,利用抗凋亡基因改造动物细胞,使其具有较强的抗凋亡能力,在动物细胞规模化培养的生产工艺中已被应用。杂交瘤细胞过表达 Bcl-2 可延长细胞在生长静止时期的时间以提高产量。Simpson 等报道转染 Bcl-2 的 TB/C3 细胞可促细胞活力和增加抗体的滴度。ITOH 等报道表达 Bcl-2 的 2E3 细胞比对照细胞可提高 4 倍的单抗产量^[7]。最近研究表明 Bcl-2 家族抗凋亡成员 Bcl-X_L 可通过阻止细胞色素 c 的释放和抑制 Casapase 的激活而阻止凋亡的共同通路,具有较强的抗凋亡作用。

本研究通过构建抗凋亡真核表达载体,转染筛选出稳定高表达 Bcl-X_L 的克隆株,利用促抗体分泌添加剂 NaBu 诱导杂交瘤细胞凋亡的发生,从而鉴定改造细胞株的抗凋亡能力^[8]。结果显示改造的杂交瘤具有较强的抵抗 0.4 mmol/L NaBu 所诱导的凋亡,在相同条件下改造的杂交瘤细胞仅有 10% 的细胞发生凋亡;相反,正常的 H18 细胞则有 46% 的细胞发生凋亡;同时 Bcl-X_L 可增强细胞的活性,延长培养时间,如果以 50% 细胞以上的活性作为有效培养,与未改造的杂交瘤细胞相比改造后的细胞株在批式培养中可延长培养时间 2~3d。由于 Bcl-X_L 的抗凋亡作用,增加有效培养时间,在 NaBu 的作用

下经 *bcl-X_L* 基因改造后的杂交瘤 H18.D4 抗体分泌量是改造前杂交瘤细胞抗体分泌量的 3 倍。而正常 H18 杂交瘤细胞在 0.4 mmol/L NaBu 的作用下抗体分泌量没有增加是因为 NaBu 可引起细胞凋亡, 抵消了其增加单个杂交瘤细胞分泌抗体的作用。

我们利用 *bcl-X_L* 基因改造杂交瘤细胞, 获得了稳定表达 Bcl-X_L 的杂交瘤, 提高了杂交瘤细胞抗凋亡能力, 并在 NaBu 存在的条件下增加了杂交瘤分泌抗体量 2~3 倍。因此, 本实验经 *bcl-X_L* 基因转染筛选出的杂交瘤细胞改造株, 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] Jung D, Cote S, Drouin M. Inducible expression of *bcl-X_L* restricts apoptosis resistance to the antibody secretion phase in hybridoma cultures[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **79**(2):180 - 187

[2] Tey B T, Singh R P. Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NSO cultures[J]. *J Biotechnol*, 2000, **79**(2):147 - 159

[3] Greene B T, Thornburn A, Torti F M *et al.* Activation of caspase pathways during iron chelator-mediated apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(28):25568 - 25575

[4] Ayllon V, Cayla X, Garcia A *et al.* The anti-apoptotic molecules Bcl-X_L and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bax[J]. *Eur J Immunol*, 2002, **32**(7):1847 - 1855

[5] Mercille S, Massie B. Induction of apoptosis in nutrient deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**: 1140 - 1154

[6] Singh R P, Al-Rubeai M, Gregory C D *et al.* Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**:720 - 726

[7] Simpson N H, Milner A N, Al-Rubeai M. Prevention of hybridoma cell death by *bcl-2* during suboptimal culture conditions. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **54**:1 - 16

[8] Oh S K W, Vig P, Chua F *et al.* Substantial overproduction of antibody by applying osmotic pressure and sodium butyrate. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42**:601 - 609

Modification of the Antiapoptotic Ability of H18 Hybridoma Cells

WANG Xian-Hui XU Jing ZHANG Yang MI Li* CHEN Zhi-Nan*

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

Abstract To construct eukaryotic expression vector containing murine *bcl-X_L* and stably express it in H18 hybridoma cells in order to enhance hybridoma cells antiapoptotic ability. PCR was used to obtain 710bp murine *bcl-X_L* cDNA from pGEM-T-*bcl-X_L*. Then the recombinant expression vector pEF-*bcl-X_L* was constructed by cloning *bcl-X_L* cDNA into eukaryotic expression vector pEF by *Pst* I and *Xho* I double digestion. After transfection into H18 hybridoma cells through lipofectamine 2000™, the stable expression cell line was screened by 800mg/L G418. The expression of *bcl-X_L* gene was detected by Western blotting. Flow cytometer was used to test the modified hybridoma cells ability to resist apoptosis induced by 0.4mmol/L Sodium Butyrate. The eukaryotic expression vector pEF-*bcl-X_L* was successfully constructed and stably expressed in H18 hybridoma cells. Our data showed that stably transfected H18 cells expressed high levels of Bcl-X_L. Under the condition of 0.4mmol/L NaBu, the production of antibody was to be significantly increased by more than 3-fold in stably transfected H18, which resulted from suppressing the NaBu-induced apoptosis and allowing stably transfected H18 cells to grow at higher viability and extend culture longevity by >3 days. The increased culture longevity by inhibition of NaBu-induced apoptosis by inducible expression of Bcl-X_L combined with the enhanced secretion of antibody by NaBu contributed to the enhancement of final antibody concentration in the stably transfected H18 cells culture. The final antibody concentration of stably transfected H18 cells in the presence of NaBu was three-fold higher than that of H18 cells culture in the absence of NaBu. Together, our results showed that butyrate is of practical interest for production of antibody. NaBu-induced apoptosis of hybridoma cells could be inhibited by inducible expression of Bcl-X_L. The expression of murine *bcl-X_L* gene in hybridoma cells and the increasing antiapoptosis ability of hybridoma cells are of significance in further use of hybridoma cells in high density large scale cell culture.

Key words *bcl-X_L*, hybridoma cells, expression

Received: 05-27-2003

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

* Corresponding author. Tel: 86-29-3374547; E-mail: chccrc2@fmmu.edu.cn, milicec@vip.sina.com