

## 简报

# 小鼠腹水培养液体外培养杂交瘤细胞的研究

于善谦 涂正金

(复旦大学微生物系, 上海)

培养动物细胞,除要提供各种氨基酸、维生素、无机盐等基本营养要素外,尚需加入一定浓度的小牛血清。血清具有提供营养、中和毒素及刺激细胞生长繁殖等作用。但血清组成复杂,还可能含有抑制细胞生长和功能的物质,同时也由于生物工程技术的发展,人们期望能设计或找到更好的培养液,以解决动物细胞培养特别是杂交瘤细胞高密度培养生产单克隆抗体的问题。目前关于无血清培养液的研究已获得了较大的进展<sup>[1]</sup>,而用其他动物血清<sup>[2]</sup>、乳蛋白液<sup>[3]</sup>等代替小牛血清的研究进展较缓。本文报道用小鼠骨髓瘤SP2/0细胞诱导BALB/c小鼠产生的腹水取代小牛血清培养小鼠骨髓瘤及其B淋巴细胞杂交瘤的研究结果。

## 材料与 方法

### (一) 细胞株

小鼠骨髓瘤细胞株为SP2/0-Ag14(简称SP2/0)杂交瘤29H1、17Hc1是SP2/0细胞与BALB/c小鼠脾脏B淋巴细胞融合建株的产生抗长叶车前花叶病毒上海分离株(RMVsh)单克隆抗体的杂交瘤细胞(待发表)。

### (二) 腹水诱导

按常规方法制备SP2/0细胞腹水(未用降植烷或石蜡油致敏),所得腹水过滤除菌, -20℃保存待用。

### (三) 细胞培养

基本培养液为RPMI1640(GIBCO)加入一定浓度的腹水或小牛血清(天津市生化制品厂,批号8408021)配制成完全培养液。细胞培养于35ml玻璃培养瓶中,每瓶4ml培养液。SP2/0细

胞、29H1、17Hc1细胞先在含15%小牛血清的培养液中生长繁殖,以无血清RPMI1640培养液洗涤3次,分别以相同数量接种于含腹水和小牛血清的培养液中,37℃含5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞数量采用血球计数板测定,每个样品重复3瓶,每瓶计数4次,取平均值。分别比较不同浓度的腹水和小牛血清培养液中SP2/0细胞生长情况,测定各细胞株在一定浓度的腹水和小牛血清培养液中的生长曲线。

### (四) 单克隆抗体量的测定

以间接ELISA方法测定单克隆抗体含量<sup>[4]</sup>。包被抗原浓度为20μg/ml。以经4次硫酸铵沉淀及DEAE-纤维素柱层析纯化的单克隆抗体免疫球蛋白作标准,蛋白浓度以公式 $A_{280nm}^{0.1\%} = 1.7$ 计算。

## 结 果

### (一) 腹水培养液中细胞的长期培养

小鼠骨髓瘤SP2/0细胞、杂交瘤29H1、17Hc1细胞先在小牛血清培养液中繁殖,经无血清RPMI1640培养液充分洗涤后转入含5%腹水的培养液中培养。3种细胞均能生长繁殖,未出现生长适应期或部分细胞死亡现象。而且细胞形态良好,生长旺盛。细胞贴满瓶壁后可向上悬浮,呈现团块状悬浮生长。按常规方法传代,每3天一次。其中SP2/0细胞连续培养了150天、50代,29H1细胞为120天、40代,17Hc1细胞为90天、30代。29H1和17Hc1细胞经长期传代培养,其分泌单克隆抗体量仍能稳定地达到开始时

本文于1988年2月8日收到。

的水平。用腹水培养液同样能保存与复苏细胞,所培养的细胞也能顺利地改用小牛血清培养液培养,同时其诱发BALB/c小鼠产生腹水的能力也未改变。

## (二) 不同浓度的腹水和小牛血清对细胞生长的影响

于含0.5、1、2、5、10、15%浓度的腹水和小牛血清培养液中分别接种SP2/0细胞,每瓶 $1.2 \times 10^5$ 个。培养4天后计数细胞,结果如图1所示。SP2/0细胞在腹水培养液中的生长远较小牛血清培养液旺盛。在腹水浓度为0.5%时基本上能维持细胞的存活,浓度达1%时细胞生长速度迅速增大,与含15%小牛血清的培养液相比,培养4天细胞密度为后者的2倍。腹水浓度达2%以上时细胞生长速度基本上达到最大值。而在小牛血清培养液中,血清浓度达2%时才能维持细胞的存活,随血清浓度的增加,细胞数量也呈较缓慢的线性增长。

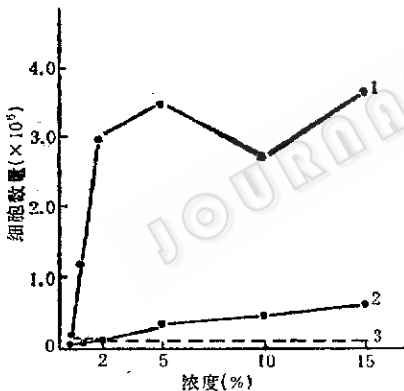


图1 不同浓度的腹水和小牛血清培养液中SP2/0细胞的生长

1. 腹水培养液 2. 小牛血清培养液  
3. 细胞接种数量, 细胞培养4天计数

## (三) 不同培养液中的细胞生长曲线

SP2/0细胞同样分别接种于含5%腹水和15%小牛血清培养液中,每瓶 $6.4 \times 10^4$ 个细胞。培养2天后每天计数,共5次,测得SP2/0细胞生长曲线如图2所示。SP2/0细胞在腹水培养液中的生长优于在小牛血清培养液中。细胞提前进入对数生长期,细胞倍增时间为21.5h,短于小牛血清培养液中的26.3h,培养6天后腹水培养液中的细胞数量为小牛血清中的2.4倍。于上述

两种培养液中接种29H1细胞,每瓶 $2.7 \times 10^5$ 个,测得细胞生长曲线如图3中实线所示。同样杂交瘤29H1细胞在腹水培养液中的生长优于小牛血清培养液,提前进入对数生长期,细胞倍增时间为40.4h,短于小牛血清培养液中的63.1h,培养6天后腹水培养液中细胞数量为小牛血清中的2.3倍。杂交瘤29H1细胞在培养过程中以间接ELISA方法测定培养上清液的反应值,同时以纯化的单克隆抗体29H1免疫球蛋白作标准曲线,计算出单克隆抗体的含量如图3中虚线所示。培养上清液中单克隆抗体随培养时间和细胞数量的增加而增加,在小牛血清培养液中基本上呈直线式增加,而在腹水培养液中单克隆抗体量随细胞数量的迅速增加似呈对数式增加,6天后可达到 $59.2 \mu\text{g}/4\text{ml}$ 为小牛血清培养液中的3.2倍。

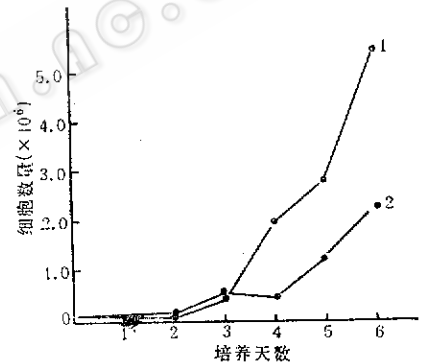


图2 SP2/0细胞生长曲线

1. 5%腹水培养液 2. 15%小牛血清培养液

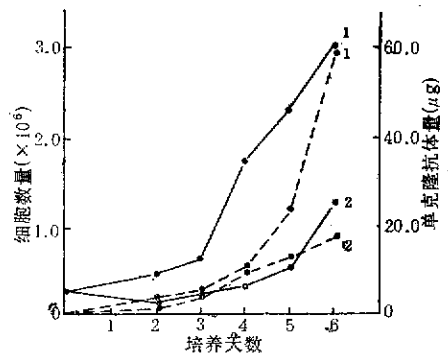


图3 杂交瘤29H1细胞生长曲线及单克隆抗体分泌量

1. 5%腹水培养液 2. 15%小牛血清培养液  
—— 细胞生长曲线 —— 单克隆抗体量

## 讨 论

细胞长期传代实验,不同浓度的腹水和小牛血清培养液对细胞生长情况影响的比较,细胞生长曲线测定及杂交瘤分泌单克隆抗体量的分析,表明小鼠骨髓瘤SP2/0细胞诱导BALB/c小鼠产生的腹水是较小牛血清更好的适合骨髓瘤、杂交瘤细胞生长繁殖的一种培养添加物。用该培养液培养时细胞生长速度、所达到的密度及杂交瘤细胞分泌单克隆抗体量均大大高于使用小牛血清培养液,而且使用的浓度较低。因此腹水作为一种新的小牛血清替代物可望进一步应用于杂交瘤技术之中,特别是在融合细胞生长、体外免疫反应及杂交瘤细胞高密度培养等方面有较大的潜在应用

价值。

腹水是肿瘤细胞体内病理反应产物,基本组成类似血清,因此用腹水培养细胞仍属于有血清培养范畴。腹水对小鼠骨髓瘤和杂交瘤细胞生长刺激作用大大高于小牛血清的原因可能是由于腹水含鼠源性的生长因子,而同源性因子对细胞生长有较好的刺激作用<sup>[5]</sup>。另一方面腹水中也含有大量肿瘤细胞自身分泌代谢产物,这些产物对于肿瘤细胞本身的生长有很强的刺激作用<sup>[6]</sup>。因此腹水成分的分析、生长因子的分离及腹水适应培养细胞的范围的研究,对于进一步扩大腹水在杂交瘤技术中的应用和阐明其刺激细胞快速生长繁殖的机制都有较大的意义。

## 参 考 文 献

- [1] Griffiths, B.: *Trends in Biotech.*, 4: 268—272, 1986.
- [2] Borrebaeck, C. A. B. et al., *J. Biol. Chem.*, 256: 4723, 1980.
- [3] Sereni, A. and Baserga, R.: *Cell Biol. Intern. Rep.*, 5: 339—345, 1981.
- [4] 于善谦等: 中国科学 (B辑), (12): 1266—1270, 1986.
- [5] Emerman, J. T. et al.: *In Vitro*, 23: 134—139, 1987.
- [6] Massague, J.: *Trends Biochem. Sci.*, 10: 237—240, 1985.

## CULTURE OF HYBRIDOMA CELLS IN VITRO USING MEDIUM CONTAINED MOUSE ASCITIC FLUID

Yu Shanqian

Tu Zhengjin

(Department of Microbiology, Fudan University, Shanghai)

A completed medium was made by adding 5% BALB/c mouse ascitic fluid(MAF) induced by myeloma cell line SP2/0 to the basal medium RPMI 1640. Mouse myeloma cell line SP2/0 and its hybridoma cell lines 29H1, 17Hc1 could be cultured with it for a long period, SP2/0 cells for 150 days 50 generations, 29H1 cells for 120 days 40 generations, 17Hc1 cells for 90 days 30 generations. Cell grew well and hybridoma cells maintained their ability of secreting monoclonal antibodies. So the BALB/c mouse ascitic fluid may be a good replacement of newborn calf serum in the medium for the culture of hybridoma cells or other uses in the hybridoma technology.

## Key words

Mouse ascitic fluid; cell culture; hybridoma cells