

乙醇诱导杂交瘤细胞凋亡的检测

徐 静, 王贤辉, 米 力*, 陈志南

(第四军医大学细胞生物学教研室, 西安 710032)

摘要: 为建立杂交瘤细胞凋亡检测模型, 在乙醇诱导下, 采用荧光染色、MTT等方法检测H18杂交瘤细胞凋亡时的形态学及增殖活性变化, 并用流式细胞仪对其进行定量分析, 夹心ELISA检测IgG抗体分泌的变化情况。结果发现510mmol/L乙醇作用5~6 h的凋亡诱导效果最为明显, 在诱导条件下, 杂交瘤细胞的活细胞数显著下降, 凋亡细胞比例较高。抗体浓度明显下降, 与乙醇浓度呈负相关, 但与细胞增殖活性无明显的线性关系。故以此为凋亡检测模型, 可为后续抗凋亡细胞株的建立与筛选研究提供初步的实验基础, 并为乙醇对IgG型抗体分泌的影响研究提供了可能的实验模型。

关键词: 凋亡; 乙醇; 杂交瘤细胞

中图分类号: R329.2·8; R392.12 文献标识码: A 文章编号: 0253-9977(2004)02-185-04

哺乳动物细胞大规模培养已成为生物医药高技术产业的重要部分。但由于动物细胞体外培养的生物学特性及培养环境的变化等因素限制, 要满足重要生物制品的规模化生产需求, 这一技术中仍存在许多亟待解决的问题, 如细胞密度及目的蛋白产量的提高等。研究证明, 在大规模培养中, 营养缺乏、代谢产物累积等细胞生长环境条件的变化, 往往会诱发细胞凋亡^[1]。细胞凋亡是大规模培养中细胞死亡的主要方式^[2], 其一方面会缩短培养时间, 影响细胞达到高密度; 另一方面凋亡细胞释放的蛋白酶可降解目的产物, 凋亡过程中产生的自由基修饰目的蛋白因子, 使之失去正确空间构象^[3], 故细胞凋亡的发生被认为是动物细胞大规模培养过程中重要的制约环节。因此, 进行抗凋亡研究, 如采用基因转染的方法, 将抗凋亡基因(如**bcl-2**等)转入杂交瘤细胞, 建立抗凋亡细胞株, 提高杂交瘤细胞的培养密度及延长培养时间, 在杂交瘤细胞大规模培养中具有重要的应用价值。为此, 本文用乙醇诱导杂交瘤细胞凋亡, 建立H18杂交瘤细胞凋亡检测模型, 为下一步抗凋亡研究中细胞株的筛选打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株

采用本室建株的H18杂交瘤细胞, 可产生高特异性、高亲和力的抗人肝癌单克隆抗体HAb18(IgG1)^[4,5]。

1.2 细胞培养

培养基采用CCM-1(Hyclone公司), 加入1%灭活的胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司); 细胞培养于5%CO₂、37℃、饱和水汽培养箱内。

诱导凋亡的培养基为上述培养基内加至170mmol/L、510mmol/L等不同浓度的无水乙醇。

1.3 细胞凋亡的形态学分析

接种1×10⁵细胞/ml的H18杂交瘤细胞于24孔板内(Costar公司), 1ml/孔, 培养3天, 用含不同浓度乙醇的新鲜培养液(0, 170mmol/L, 510mmol/L)更换各孔培养液, 分别于不同时间点, 取各孔100μl细胞悬液, PBS离心洗涤, 200μl PBS重悬细胞, PI(Propidium Iodide, 碘化丙啶, Santa Cruz公司)、Hoechst 33342(Molecular Probes公司)双重染色10min, 于荧光显微镜下观察细胞形态变化。

1.4 细胞凋亡的定量分析

取培养36h的H18杂交瘤细胞, 于不同时间点更换各瓶细胞培养液, 分别加入不同乙醇浓度的新鲜培养液(0, 170mmol/L, 510mmol/L)5ml/瓶, 再培养5h后, 离心收集各瓶细胞, 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

收稿日期: 2003-03-17; 修回日期: 2003-09-30

国家高技术研究发展计划(863计划)重大专项(2002AA217011)

* 通讯作者, E-mail: milicec@fmmu.edu.cn

细胞离心后，取其上清分装、-20℃冻存，留待以ELISA检测其中抗体浓度。

1.5 细胞增殖活性的测定

以 5×10^4 细胞/ml的浓度接种H18杂交瘤细胞于96孔板(Costar公司)内，每孔200μl，培养3天后，以不同诱导条件更换各孔培养液，200μl/孔，每一条件设3个复孔，分别于不同时间点(自换液后1h起至7h止，每小时检测一次)，加入12mmol/L MTT(Sino-American Biotech公司)20μl/孔，继续孵育4h，小心吸弃孔中液体，加入DMSO(Pierce公司)150μl/孔，融解细胞内结晶，以酶联免疫检测仪于490nm处测定OD值。实验重复3次。绘制时间效应曲线。

1.6 抗体分泌量检测

取上述分装、-20℃冻存的上清液，复融后以夹心ELISA检测其中单克隆抗体HAb18的浓度。用山羊抗小鼠IgG抗体(Sino-American Biotech公司)包被96孔板，5%脱脂奶粉封闭，100μl/孔，室温30min；以本室纯化之单克隆抗体HAb18(1mg/ml)为标准品，标准品和样品均行倍比稀释后，100μl/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)100μl/孔，室温反应2h；洗板后加显色剂(R&D公司)100μl/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波长处检测各孔光吸收值。

2 结果

2.1 细胞凋亡的形态学检测

Hoechst 33342是一种与DNA特异性结合的活性染料，可选择性与DNA小沟、A=T富含序列结合，可被正常细胞摄取，使其细胞核呈现较为均质的蓝色荧光；细胞凋亡的早期，细胞膜的完整性尚无明显改变，但膜通透性已有增强，此时PI仍被细胞拒染，而Hoechst 33342进入量较正常细胞多，且细胞凋亡早期，染色体DNA结构发生改变，DNA降解，核质浓缩，利于该染料与DNA结合，故在较短的作用时间内，Hoechst 33342可使处于凋亡早期的细胞核呈现荧光强度高的亮蓝色团块状，形态上可明显区别于正常活细胞^[6]；处于凋亡晚期及坏死的细胞由于膜完整性的破坏，均可被PI染为红色^[7]，但两者细胞核形态不同，凋亡晚期的细胞核浓缩成几个大的团块，而坏死的细胞则无染色质的片段化现象，细胞核呈均质的红色。H18杂交瘤细胞经乙醇诱导凋亡后，以PI和Hoechst 33342双重

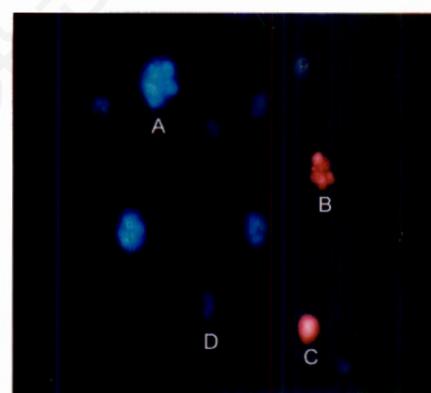


图1 PI和Hoechst 33342双重染色显示细胞两类死亡过程中的典型细胞形态
A, 凋亡早期细胞；B, 凋亡晚期细胞；C, 坏死细胞；D, 正常活细胞。

染色，于荧光显微镜下观察细胞形态变化如图1。

2.2 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，可成为巨噬细胞清除凋亡细胞识别的标志。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^[8]。对不同凋亡诱导条件下的杂交瘤细胞以Annexin V-FITC和PI双重染色，流式细胞仪进行双参数分析，可将凋亡细胞(Annexin V⁺细胞)与坏死的细胞(Annexin V⁺/PI⁺细胞)区分开。结果显示正常未经乙醇处理的杂交瘤细胞凋亡细胞数在3%以下；510mmol/L乙醇浓度作用5h，有接近半数的细胞发生凋亡；作用6~7h，凋亡细胞数达70%以上；而乙醇浓度为170mmol/L时，即使作用7h，凋亡细胞数仍在10%以下。故以510mmol/L乙醇作用6~7h，对杂交瘤细胞的凋亡诱导作用最为明显。各条件下诱导凋亡阳性细胞比如图2。

2.3 细胞增殖活性的测定

以MTT法检测不同诱导条件、不同时间点下杂交瘤细胞增殖活性的变化。正常细胞在7h内细胞增殖活性变化不明显，而经乙醇诱导的细胞，其增殖活性呈现下降趋势，与乙醇诱导的浓度及时间呈负相关(如图3)。

2.4 乙醇诱导凋亡后细胞抗体分泌量的变化

以夹心ELISA法检测不同诱导条件、不同时间点下杂交瘤细胞抗体分泌能力的变化。经不同浓度乙醇诱导凋亡后，杂交瘤细胞培养上清中HAb18单克隆抗体的浓度呈下降趋势，且510mmol/L乙醇浓度下抗体下降程度大于170mmol/L乙醇浓度，呈现

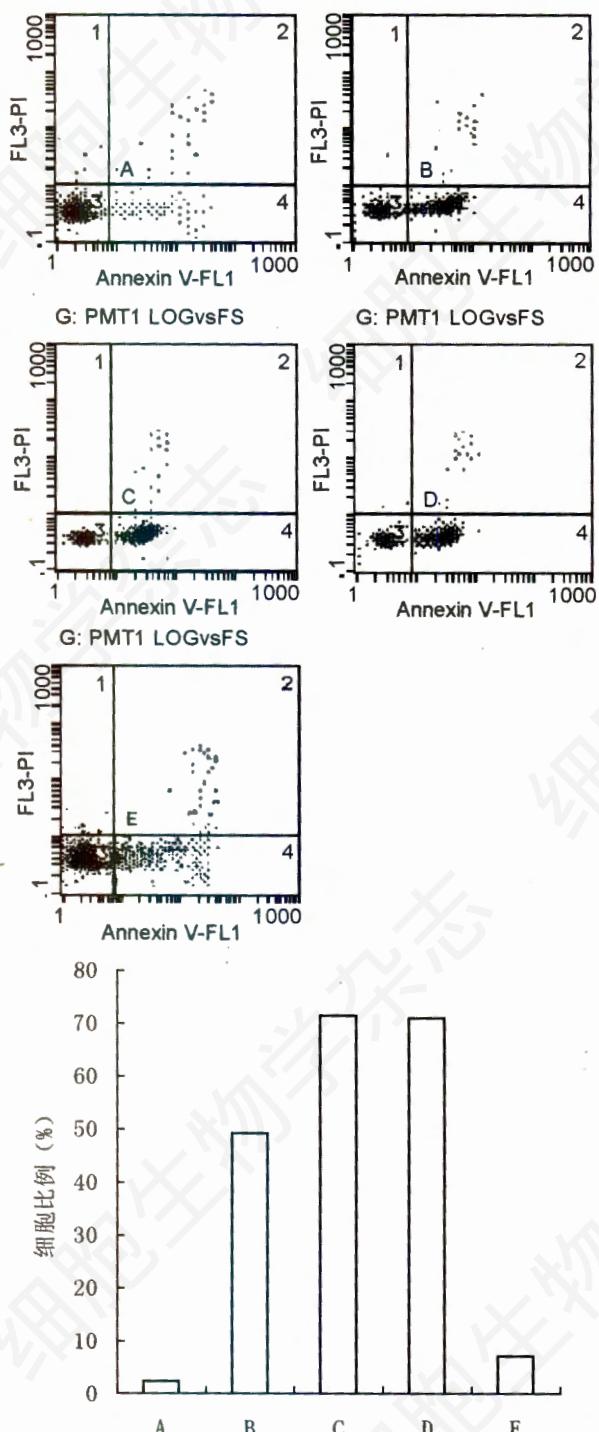


图2 流式细胞术检测不同诱导条件下杂交瘤细胞凋亡比例
A, 正常对照; B~D, 510mmol/L 乙醇诱导 5、6、7h; E, 170mmol/L 乙醇诱导 7h。

剂量依赖关系。510mmol/L 乙醇作用 5h、6h、7h，抗体分泌量无明显变化(如图4)。

3 讨论

乙醇对多种细胞均有凋亡诱导作用，如对神经细

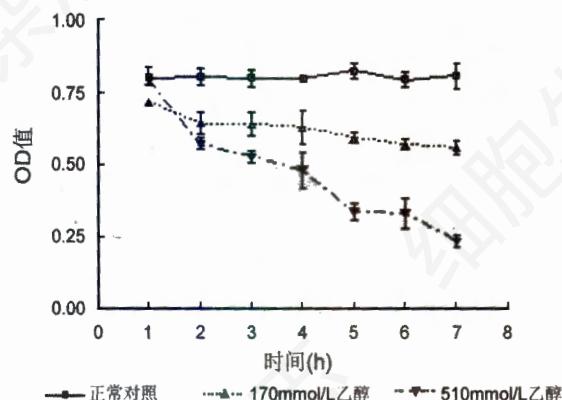


图3 乙醇对杂交瘤细胞的时效曲线

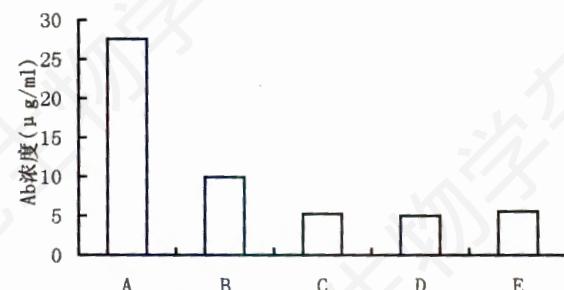


图4 乙醇诱导凋亡后杂交瘤细胞抗体分泌的变化
A, 正常对照; B, 170mmol/L 乙醇诱导 7h; C~E, 510mmol/L 乙醇
诱导 5、6、7 h。

胞瘤细胞株，在34mmol/L 和 68mmol/L 乙醇浓度时，就会特异性地增加DNA片段化现象，137mmol/L以内的各浓度均可增加PS的外化，而在103和137mmol/L浓度时开始出现坏死，其引发凋亡的机制可能与乙醇能够特异性地诱导一种与凋亡相关的丝裂原激活蛋白激酶JNK的磷酸化有关^[9]；在大脑皮质细胞，乙醇对凋亡的诱导也呈剂量依赖关系，在137mmol/L出现DNA片段化的峰值，在137和206mmol/L出现PS外化的峰值^[8]。乙醇诱导凋亡简便、快速，为给后续的抗凋亡细胞株的建立和筛选提供基础，本文以其建立了H18杂交瘤细胞的凋亡检测模型。经荧光染色的形态学检测方法，在170及510mmol/L乙醇浓度下，孵育5~7h，可观察到细胞凋亡的典型形态变化；MTT法对细胞增殖活性的检测显示乙醇浓度与杂交瘤细胞增殖活性呈负相关；用流式细胞术对PS外化进行检测，对不同条件下凋亡细胞数进行定量分析发现，510mmol/L乙醇诱导6h，H18杂交瘤细胞凋亡细胞比例最高，达71.4%；故我们认为，对H18杂交瘤细胞，以510mmol/L乙醇作用5~6h的凋亡诱导效果最为明显，可以此条件为凋亡检测模型。在研究中，经

对抗体浓度变化的检测发现，细胞培养上清中抗体量的下降与细胞活性间并无明确的线性关系，170mmol/L 乙醇诱导7h，细胞凋亡率10%，细胞增殖活性下降约25%，而抗体分泌量较正常下降64%；510mmol/L 乙醇诱导5h，细胞凋亡率达50%，细胞增殖活性下降约50%，而抗体分泌量则较正常下降82%；提示引起抗体分泌量下降的原因，一方面可能是由于凋亡细胞数增加，细胞活性下降，另一方面可能是由于乙醇可激活细胞内某些影响抗体合成、组装、分泌的蛋白等原因所致。如有研究发现，对分泌 IgM 型抗体的杂交瘤细胞，在乙醇浓度低于100mmol/L 时，尽管细胞数明显低于正常，培养上清中的抗体浓度却无明显下降，提示细胞内的抗体合成代偿；在200mmol/L 时，上清中 IgM 的浓度出现明显下降，并发现乙醇可通过影响细胞内的蛋白激活过程而造成 IgM 抗体蛋白的无效组装或错误折叠^[10]。本文所用为分泌 IgG1 型单克隆抗体的杂交瘤细胞株，初步的实验显示，在170mmol/L 乙醇作用7h 时，培养上清中的 IgG1 即已下降64%。因此，本文可为后续抗凋亡细胞株的建立与筛选研究提供凋亡细胞形态及数量的检测模型，并为乙醇对 IgG 型抗体分泌的影响研究提供了可能的实验模型。

参 考 文 献

- [1] 胡显文, 肖成祖, 李佐虎, 等. 多孔微载体无血清培养rCHO细胞生产u-PA [J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 387—391.
- [2] 林福玉, 陈昭烈, 刘红, 等. 大规模动物细胞培养的问题及对策 [J]. 生物技术通报, 1999, 15(1): 32—35.
- [3] MASTRANGEAO A J. Overcome apoptosis [J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16(2): 88.
- [4] CHEN Z N, LIU Y F. Monoclonal antibody HAb18 to human hepatoma [J]. Monoclonal Antibodies, 1991, 8: 11—12.
- [5] LOU C, CHEN Z N, BIAN H J, et al. Pharmacokinetics of radioimmunotherapeutic agent of direct labeling mAb ¹⁸⁸Re-HAb18 [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 69—73.
- [6] TAKAHASHI A, AOSHIBA K, NAGAI A. Apoptosis of wound fibroblasts induced by oxidative stress [J]. Exp Lung Res, 2002, 28(4): 275—284.
- [7] CHOI S H, CHOI D H, LEE J J, et al. Imidazoline drugs stabilize lysosomes and inhibit oxidative cytotoxicity in astrocytes [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(5): 394—405.
- [8] CHEEMA Z F, WEST J R, MIRANDA R C. Ethanol induces Fas/Apo [apoptosis]-1 mRNA and cell suicide in the developing cerebral cortex [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2000, 24(4): 535—543.
- [9] MCALHANY R E Jr, WEST J R, MIRANDA R C. Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol-induced apoptosis and JUN kinase phosphorylation [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 119(2): 209—216.
- [10] MüHLBAUER E, KARSTEN U, ROTTMANN M, et al. Impaired immunoglobulin M production by incubation of hybridoma cells with ethanol [J]. Alcohol, 2001, 24: 179—187.

Detection of Apoptosis Induced by Ethanol in Hybridoma Cells Culture

XU Jing, WANG Xian Hui, MI Li*, CHEN Zhi Nan

(Department of Cell Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: To construct an apoptosis model, after induced by ethanol, the morphological changes of H18 hybridoma were observed by fluorescence microscope after Hoechst 33342-PI double fluorescence staining; the viability was examined by MTT assay; the proportion of apoptosis was assayed by flow cytometry; and the IgG antibody concentration was measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that 510mmol/L ethanol led to the most evident effect of apoptosis after 5—6 hours induction and the viability of H18 hybridoma was notably decreased with peak apoptosis observed by flow cytometry. The antibody concentration was decreased with a negative correlation to the dose of ethanol, while with no linear relation to the viability of the detected cells. These results provided a detection model for the study on anti-apoptosis followed, while also provided a study model of the effect of ethanol on IgG secreted.

Key words: apoptosis; ethanol; hybridoma cells

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2002AA217011)

*Corresponding author, E-mail: milicec@fmmu.edu.cn