

## 实验技术

## 一种用于正常和恶性造血祖细胞克隆培养的无血清培养基

戴育成 文 珠 吴 奇 牛寒瑛 方 征

卢晓光 陈国安 林 华 李亦民 李 洁

(南昌, 江西省医学科学研究所 330029)

传统的细胞培养需用动物血清, 然而血清的成份十分复杂, 其中含有大量抗原、抗体、激素、细胞生长和抑制物质, 以及许多其它未知成份, 这些物质的存在必然会干扰研究结果的准确性和重复性。而且, 血清的质量受动物个体状况的影响颇大, 不同批号的血清常产生不同的培养结果。近年来, 随着单克隆抗体和重组生长因子的出现, 越来越要求有一种更为精确和合理的细胞培养体系。无血清培养体系就是在这种形势下进一步得到了发展。虽然无血清培养的研究在国外已开展多年<sup>(1-4)</sup>, 国内也有少数报道<sup>(5-7)</sup>, 但多用于细胞的液体悬浮培养。最近我们报道了一种用于正常和慢性淋巴细胞白血病 B 淋巴细胞集落形成的无血清培养基<sup>(8)</sup>, 本文将此培养基进一步用于包括 T、B 淋巴祖细胞在内的人类几种正常和恶性造血祖细胞的半固体克隆培养, 效果与有血清培养无明显差异。现报道如下。

## 材 料 与 方 法

## 一、标本

包括 20 例急性淋巴细胞白血病(ALL)患者的外周血标本和 18 例急性非淋巴细胞白血病(ANLL)患者的骨髓标本。20 例 ALL 根据免疫学分型分为 T 细胞型 4 例, B 细胞型 3 例, 非 T 非 B 细胞型 13 例。18 例 ANLL 根据 FAB 分型为 M<sub>1</sub> 1 例, M<sub>2</sub> 7 例, M<sub>3</sub> 2 例, M<sub>4</sub> 3 例, M<sub>5</sub> 4 例, M<sub>6</sub> 1 例。另有 16 例健康献血员的外周血和 7 例健康人骨髓标本。

## 二、无血清培养基和血清替代物的配制

1. 基础培养基 以 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)为基础补充以国产氨基酸、维生素、无机盐及抗菌素等 11 种成份, 制成 IMDM(Iscove's

modified Dulbecco's medium), 为基础培养基(表 1)。

2. 血清替代物的筛选 我们曾测试过牛血清白蛋白(BSA, Fluka AG, 瑞士)、胰岛素(Ins, 国产)、胆固醇(Chol, 国产)、转铁蛋白(Tf, Sigma)和过氧化氢酶(Cata, Sigma)等对正常 B 淋巴祖细胞体外生长的剂量反应曲线和省略筛选试验, 结果发现, 血清替代物的最佳浓度和配方为: BSA 10 mg/ml、Tf 1 µg/ml、Ins 8 µg/ml、Chol 20 µg/ml 和 Cata 20 µg/ml<sup>(8)</sup>。

表 1 国产 11 种培养基成份

| 成 份                                    | 实际含量        |
|----------------------------------------|-------------|
| L-alanine                              | 25 mg/L     |
| L-asparagine                           | 50 mg/L     |
| L-aspartic acid                        | 30 mg/L     |
| L-cystine                              | 25 mg/L     |
| L-glutamic acid                        | 75 mg/L     |
| L-proline                              | 40 mg/L     |
| Na pyruvate                            | 110 mg/L    |
| Vitamin B 12                           | 0.013 mg/L  |
| Biotin                                 | 0.013 mg/L  |
| Na selenite                            | 0.0173 mg/L |
| Antibiotics                            |             |
| Penicillin & Streptomycin 各 100000 u/L |             |

3. 血清替代物的配制 ① 人转铁蛋白: 将人转铁蛋白溶于 IMDM(90 mg/ml), 每 mg 转铁蛋白加  $7.4 \times 10^{-9}$  mol/L  $\text{Fe}^{3+}$  (以溶于 0.1 mmol/L 盐酸中的  $\text{FeCl}_3$  形式)使 1/3  $\text{Fe}^{2+}$  饱和, 此为贮存液, 经过滤去除菌后  $-20^\circ\text{C}$  保存。② 牛血清白蛋白: 将 BSA 按下法去毒。称取 BSA 100 g 使之溶于 182 ml 三蒸馏水(或去离子水)中, 置  $4^\circ\text{C}$  过夜, 次日与 10 g 树脂珠混合, 置  $4^\circ\text{C}$  2 小时, 每 15 分钟搅拌一次, 去树脂珠, 再与 10 g 树脂珠混合, 先后置  $4^\circ\text{C}$  1 小时及室温 1 小时, 去树脂珠, 测 BSA 的容量, 每 15 ml BSA 加 1.1 ml Dulbecco's 磷酸缓冲盐水 ( $-\text{Mg}^{2+}$ ,  $-\text{Ca}^{2+}$ ) 10 倍浓缩液, 再用 Dulbecco's 磷酸缓冲盐水工作液稀释为 10% BSA(w/v)。过滤除菌,  $-20^\circ\text{C}$  保存。使用

前每 20 ml BSA 加 7% NaHCO<sub>3</sub> 0.5 ml 和 1.9% L 谷酰胺 1.2 ml。③ 脂类物质的配制: 胆固醇 50 mg 加在 50 ml 酸性培养基中, 用超声波粉碎机(2 cm 直径的探头)在 0℃ 以最大振幅振荡 1 小时, 使之完全分散, 然后将悬液先后通过 1.2 μm 和 0.45 μm 的滤膜过滤。酸性培养基为不加碳酸氢钠的 DMEM, pH 为 5.1。④ 胰岛素及过氧化氢酶的配制: 胰岛素先用少量 PBS 溶解, 缓慢滴加 0.01 mol/L HCl, 使之完全溶解, 再用 IMDM 将其稀释至所需浓度。过氧化氢酶用 IMDM 直接溶解, 配成 1 mg/ml 浓度。将上述血清替代物加入基础培养基即成无血清培养基。为了进一步比较血清替代物的浓度, 参考有关文献<sup>[9]</sup>, 制备了 3 种无血清培养基: ① SFM-1: 按上述之最佳浓度和配方, 即 BSA 10 mg/ml, Tf 1 μg/ml, Ins 8 μg/ml, Chol 20 μg/ml 和 Cata 20 μg/ml; ② SFM-2: BSA 10 mg/ml, Tf 1 μg/ml, Ins 80 μg/ml, Chol 80 μg/ml 和 Cata 80 μg/ml; ③ SFM-3: BSA 0.4 mg/ml, Tf 1 μg/ml 和 Chol 100 μg/ml。有血清培养基(SCM)则以 IMDM 和 10% 新生牛血清(NBCS)组成。

### 三、培养方法

半固体培养体系为: 0.8% 甲基纤维素、10% 无血清 PHA-LCM、无血清培养基(SFM-1、SFM-2 或 SFM-3)或有血清培养基(SCM)。细胞浓度为: 正常人和 ALL 外周血单个核细胞为  $5 \times 10^5/\text{ml}$  (TL-CFU 为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ); 正常人及 ANLL 骨髓单个核细胞为  $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。以上为一般培养条件, 对不同种类的细胞, 尚有不同的要求。我们将 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、ALL、ANLL 和粒单细胞集落形成单位的测定分别称为 TL-CFU、BL-CFU、CFU-ALL、CFU-ANLL 和 GM-CFU。对 TL-CFU, 需加 0.25% PHA-P; BL-CFU 需加葡萄球菌 A 蛋白 50 μg/ml<sup>[10]</sup>。对 CFU-ALL 和 BL-CFU, 培养细胞在培养前需和半乳糖化酶(GO)10 u/ $2 \times 10^7$  细胞/ml 一起孵育 30 分钟。共测定 TL-CFU 6 例、BL-CFU 10 例、CFU-ALL 20 例、CFU-ANLL 18 例和 GM-CFU 7 例。用 40 孔塑料微孔培养板, 每孔加培养混合物 0.1 ml 重复 3 孔, 置 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 7 至 13 天。含 50 个或以上细胞的细胞团为集落; 4—49 个细胞为集簇。

### 四、培养细胞的鉴定和染色体分析

对有血清和无血清培养条件下的集落细胞均进行了形态学及细胞表面标志的检查。前者包括姬姆萨瑞氏染色和组化染色(过氧化物酶、糖元、非特异性脂

酶等); 后者包括: T 细胞标志(绵羊红细胞受体、CD<sub>3</sub>)、B 细胞标志(CD<sub>20</sub>、SmIg 和 CIg)、普通型急性淋巴细胞白血病细胞标志(CD<sub>10</sub>)。检查 SmIg 和 CIg 用直接免疫荧光法, 检查 CD<sub>3</sub>、CD<sub>20</sub> 和 CD<sub>10</sub> 用间接免疫荧光法。另对 1 例 ALL 和 1 例 ANLL 患者进行了染色体分析, 并对其新鲜细胞和无血清培养后集落细胞的染色体进行了比较。

## 结 果

### 一、五种培养基的比较

我们用 TL-CFU 和 GM-CFU 测定法对下述 5 种培养基进行了比较: 1. SCM; 2. SFM-1; 3. SFM-2; 4. SFM-3; 5. IMDM。结果见表 2。SFM-1 对 TL-CFU 和 GM-CFU, 以及 SFM-3 对 TL-CFU 的生长支持作用与 SCM 比较无显著性差异( $p > 0.05$ ), 而 SFM-2 和 IMDM 对两者的作用均比 SCM 差( $p < 0.01$ )。

### 二、SFM-1 和 SCM 的比较

表 3 着重比较了 SFM-1 和 SCM 对人类几种正常和异常造血祖细胞的生长支持作用。由表 3 可见, SFM-1 和 SCM 比较, 并无显著性差异( $p > 0.05$ )。

### 三、无血清培养基对细胞形态和结构的影响

为了探讨无血清培养基对培养细胞形态、表型和结构的影响, 我们对每次实验均进行了培养前后细胞形态学和细胞表面标志的检查, 并对 1 例 ALL 和 1 例 ANLL 患者进行了培养实验细胞的染色体检查。结果表明, 在所有前后中, 培养前后的细胞形态学、表型均无特殊改变, 2 例急性白血病患者, 细胞培养前后具有相同的染色体异常。

20 例 ALL, 培养前均进行了表型检查, 分别为 T 细胞型 4 例, B 细胞型 3 例, 非 T 非 B 细胞型 13 例; 培养后有 17 例进行了集落细胞的检查, 全部符合培养前的表型。20 例 ALL 外周血单个核细胞培养前姬姆萨瑞氏染色(GW)可见不同数量的幼稚淋巴细胞, 过氧化物酶(POX)染色阳性率在 3—15% 以下; 培养后集落细胞仍为幼稚淋巴细胞, POX 染色

表 2 五种培养基对 TL-CFU 和 GM-CFU 支持作用的比较

| 培养基   | TL-CFU   |          |                             | P*<br>值 | GM-CFU   |          |                             | P*<br>值 |
|-------|----------|----------|-----------------------------|---------|----------|----------|-----------------------------|---------|
|       | 实验<br>例数 | 生长<br>例数 | 集落数<br>(1×10 <sup>5</sup> ) |         | 实验<br>例数 | 生长<br>例数 | 集落数<br>(2×10 <sup>4</sup> ) |         |
| SFM-1 | 6        | 6        | 222±164                     | >0.05   | 7        | 5        | 170±154                     | >0.05   |
| SFM-2 | 5        | 4        | 17±18                       | <0.01   | 5        | 3        | 13±21                       | <0.01   |
| SFM-3 | 5        | 5        | 131±124                     | >0.05   | 5        | 4        | 29±23                       | <0.01   |
| IMDM  | 5        | 4        | 16±18                       | <0.01   | 5        | 3        | 12±15                       | <0.01   |
| SCM   | 6        | 6        | 152±141                     |         | 7        | 5        | 158±179                     |         |

\* P 值为各组与 SCM 比较的结果。

表 3 半固体培养条件下 SFM-1 和 SCM 对几种造血祖细胞生长支持作用的比较

| 克隆测定     | 细胞数<br>(1×10 <sup>4</sup> ) | SFM-1    |          |         | SCM      |          |         | p<br>值 |
|----------|-----------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|--------|
|          |                             | 实验<br>例数 | 生长<br>例数 | 集落数     | 实验<br>例数 | 生长<br>例数 | 集落数     |        |
| TL-CFU   | 10                          | 6        | 6        | 222±164 | 6        | 6        | 152±141 | >0.05  |
| BL-CFU   | 5                           | 10       | 6        | 23±41   | 10       | 8        | 52±41   | >0.05  |
| CFU-ALL  | 5                           | 20       | 20       | 92±85   | 20       | 12       | 141±101 | >0.05  |
| CFU-ANLL | 2                           | 18       | 13       | 83±57   | 18       | 13       | 122±121 | >0.05  |
| GM-CFU   | 2                           | 7        | 5        | 170±154 | 7        | 5        | 158±179 | >0.05  |

全部阴性。18 例 ANLL，培养前骨髓单个核细胞 GW 染色可见较多数量的原幼粒细胞或单核细胞，POX 染色阳性率达 70—90%（急性粒细胞白血病）；培养后 13 例生长集落，其集落细胞仍为幼稚细胞，POX 染色阳性率为 77—90%。7 例正常骨髓，培养前后均经 GM 染色，培养前的单个核细胞中存在不同分化阶段的各种造血细胞，培养后则为正常幼稚粒单细胞及成熟粒细胞和巨噬细胞。10 例正常 B 淋巴细胞集落测定，培养前纯化的 B 淋巴细胞均为 SmIg 阳性，其中 6 例生长了集落，其集落细胞亦为 SmIg 阳性和/或 CIg 阳性，GW 染色发现浆细胞（培养后 7 天）。6 例正常 T 淋巴细胞集落测定，培养前后均为 E-玫瑰花结试验阳性。另有 1 例 ANLL（慢粒急变）及 1 例 ALL 进行了培养前后的染色体检查。慢粒急变病人培养前的骨髓细胞和培养后的集落细胞中均发现 Ph<sup>1</sup> 阳性染色体。ALL 病人的细胞培养前后均发现有相同数量的多倍体改变（69，×× 及 92，××）。

讨 论

在国外很早就已开始了无血清培养法的研究。1976 年 Hayashi 等<sup>[11]</sup>报道了大鼠垂体 GH<sub>3</sub> 细胞的无血清培养，他们用激素、生长因子和其他一些基本营养物质代替血清，此后又发展了各种无血清培养基用于培养许多不同来源的细胞<sup>[1-4]</sup>，但是均为液体悬浮培养。近年来，开始将无血清培养法用于培养条件要求较高的半固体培养，如 BFU-e 等<sup>[12]</sup>，但用无血清培养法培养包括人类正常和恶性淋巴系祖细胞在内的人类多种正常和恶性造血祖细胞的报道仍较少。

我们研制的 SFM-1 是采国外各种无血清培养基之长，在血清替代物的配方和浓度上进行了改良。SFM-1 和国外大多数无血清培养基不同之处在于加用了过氧化氢酶。过氧化氢是淋巴细胞生长和克隆的主要毒性物质，培养基中的酪氨酸、色氨酸、核黄素、抗坏血酸等均能导致过氧化氢的形成。过氧化氢可由细胞膜

M期的中/后期,  $P^{34}$  自身也参与一个由 cyclin 参加的反馈调节过程<sup>[8]</sup>。

#### 四、 $G_1$ 期周期蛋白—跨入 S 期

遗传学家们在芽生酵母中发现了 3 个基因: CLN 1、CLN 2 和 CLN 3。它们的产物称为  $G_1$  期周期蛋白( $G_1$  cyclins)。这些蛋白均是  $G_1$  期所固有的, 与上述的  $G_2/M$  期中的 cyclin A 和 cyclin B 不同。CLN 2 蛋白在细胞中的半衰期短, 一边合成, 同时又被降解。当合成量大于降解量, 蛋白积累到一定的阈值时, 与  $P^{34}$  结合, 激活  $P^{34}$ , 使细胞离开  $G_1$  期而进入 S 期; 反之, 当蛋白含量未达到阈值时,  $P^{34}$  不被活化, 细胞仍停留在  $G_1$  期<sup>[9]</sup>。

值得提出的是: 在过去的文献中, 曾将一种在  $G_1/S$  期开始在核中出现又在 S 期结束后消失的与细胞周期有关的蛋白质称为 cyclin。但它与本文所提到的 cyclins 和  $G_1$  cyclins 完全不同, 它是增殖细胞核抗原 (PCNA, proliferating cell nucleus antigen), 在哺乳类细胞中是 DNA 聚合酶  $\delta$  的附属蛋白, 能促进 DNA 聚合酶  $\delta$  延伸 DNA 链; 在酵母中具有促进 DNA 聚合酶 III 的活性的作用, 显然它与 S 期的 DNA 复制活动有关。目前为了避免混淆, 常称之为 PCNA 或 PCNA/cyclin。

(上接封三)

上不饱和脂肪酸的氧化、细胞蛋白质的氧化和/或 DNA 的损伤而引起细胞的死亡。过氧化氢酶可破坏过氧化氢而保护细胞的生长<sup>[13,14]</sup>。已证明, 在培养基贮藏过程中的主要有害物质是过氧化氢, 但其中 40% 可被过氧化氢酶除去。

各种细胞的生长、分化和机能发挥均需较特异的营养物质和生长因子, 所以要制备一种适合于所有种类细胞生长的培养基十分困难。从本实验结果看, SFM-1 不仅可以用于正常和恶性淋巴祖细胞, 而且可以用于其他种类的造血祖细胞, 培养结果和有血清培养无明显差

## 结 语

细胞周期的调控, 包括卵母细胞成熟的调控, 不是一个单纯的级链式的作用, 很有可能是一个多元调控。在离体实验中, 蛙卵母细胞经孕酮或胰岛素的刺激, 均能够成熟。但经两者处理后, 成熟的具体途径是不同的。具体地说, 两者早期的作用后事件有所不同, 但最后又一致地产生活性的 MPF。那么细胞本身是怎样协调这些多元调控的呢? 来自外源的信号和来自内源的调控因子又是怎样相互协调, 共同调控细胞周期的呢? 换句话说: 这个细胞周期的调控网是怎样运行的呢? 这将有赖于今后进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Marx J. L., 1989, *Science*, 245:252-255.
- [2] Lohka K. J. et al., 1988, *Proc. Natl. Aca. Sci., U. S. A.*, 85:3009-3013.
- [3] Lewin B., 1990, *Cell*, 61:743-752.
- [4] Birchmeier C. et al., 1985, *Cell*, 43:615-621.
- [5] Sagata N. et al., 1989, *Science*, 245: 643-646.
- [6] Barrett C. B. et al., 1990, *Mol. Cell Biol.*, 10:310-315.
- [7] Sagata N. et al., 1989, *Nature*, 342:512-518.
- [8] Felix M. A. et al., 1990, *Nature*, 346: 379-382.
- [9] Richardson H. E. et al., 1989, *Cell*, 59: 1127-1133.

异, 效果是比较理想的。

## 摘 要

最近, 我们研制了一种可用于正常和恶性造血祖细胞半固体克隆培养的无血清培养基, 不仅可用于正常和恶性淋巴祖细胞, 而且可用于其他种类的造血祖细胞。这种无血清培养基称之为 SFM-1, 由 IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)补充以牛血清白蛋白 10 mg/ml、转铁蛋白 1  $\mu$ g/ml、胰岛素 8  $\mu$ g/ml、胆固醇 20  $\mu$ g/ml 和过氧化氢酶 20  $\mu$ g/ml 组成。通过 CFU-ALL、CFU-ANLL、BL-CFU、TL-

(下转40页)