

BHK₂₁C₁₃ 细胞的悬浮培养

张茂金 阎小美 方继明 周喜祥 丁振英

(中国人民解放军五九一七七部队)

动物细胞悬浮培养(以下简称“悬培”),自 Owens^[1]开展以来,发展迅速。目前国内关于细胞悬培工作尚未见报告。近几年来,应用微载体悬培技术,培养那些不能直接进行悬培的原代细胞和二倍体细胞株已获成功并有所发展^[2]。这为人用疫苗、激素、干扰素等的大量生产又提供了新途径。

自从 Macpherson 和 Stoker^[3]建立了幼龄地鼠肾(BHK)细胞株以来,由于其生长速度较快^[4],病毒敏感谱广^[5],已将它适应于悬培生长^[6]。此后,对这株细胞在不同培养基^[7,8],不同培养量^[9,10],以及不同培养条件下^[11]的悬培生长都作过研究。用 2000 升发酵罐培养此细胞制备口蹄疫病毒疫苗已在一些国家获得成功^[10]。本文报道利用这株细胞进行悬培的初步研究。

材 料 和 方 法

一、细胞及细胞培养

BHK₂₁C₁₃ 细胞株由北京生物制品检定所提供,经 16 次单层传代后进行悬培。将罗氏瓶内长成单层的正常细胞,用 0.1%胰酶—Hanks 液消化,用培养基稀释成 5×10^5 细胞/毫升, $35-35.5^\circ\text{C}$, $180-220\text{RPM}$, $\text{pH}7.0-7.4$, 培养量为 600—700 毫升,每隔一定时间,取出部份悬液,加入相应量新培养基,补足细胞数以单层培养细胞(尽量用取出细胞悬液转种)制备的细胞悬液进行补充。细胞适应悬培生长后,取出部份细胞悬液,加入相应量新鲜培养基培养。

培养基包括, 199 培养基:按中国医学科学院病毒所配方配制,但省去 CaCl_2 ; 199 和 HL (0.5%乳白蛋白水解物—Hanks 液)各半量培养基; HTYs 培养基:按表 1 成分配制; HTY 培养基:仅含表 1 的 HTY 成分。以上四种培养基均加 10% 小牛血清(未灭活)。

HTYsh 培养基只含表 1 培养基成分的一半及 5%小牛血清。HTYfs 培养基:除小牛血清量降至 2%外,其余含 HTY 及 S 组分。

表 1 培养基的成分

成分	浓度(%)	成分	浓度(毫克/升)
HTY		S 组分	
HL(H)	0.5	核黄素	0.32
TPB(T)	10.0	氯化胆碱	3.2
酵母膏(Y)	0.1	叶酸	3.2
8 磅 20 分钟高压灭菌		菸酰胺	3.2
		盐酸吡哆醛	3.2
		硫 胺	3.2
		泛酸钙	3.2
		肌 醇	0.7
		谷氨酰胺	233.0
		葡萄糖	5200.0
		G6 玻璃滤器过滤除菌	

单层培养时,培养基中分别加青、链霉素各 100 单位/毫升和 100 毫克/毫升,并用 10% NaHCO_3 调至 $\text{pH}7.0-7.4$ 。悬培时,培养基中加入最终浓度为 0.2%羧甲基纤维素, 10^{-6} 聚醚油,及卡那、链霉素各 200 毫克/毫升,青霉素 200 单位/毫升,制霉素 30—50 单位/毫升。

培养装备:用美国 New Brunswick 公司制造的台式发酵罐。实验用 2 升罐。

二、细胞生长测定

用 0.2%台酚蓝液染细胞,在血球计数板上分别计数死细胞和活细胞。

细胞大小测定:细胞悬液以 1000RPM 离心约 10 分钟后,沉淀物加入等量 0.2%台酚蓝液,显微镜下用测微尺测定 200 个活细胞直径,统计学处理得出平均细胞直径。

染色体计数:用秋水仙素处理中期生长细胞,空气干燥 Giemsa 染色法。观察 300 个中期细胞的染色体数。

计算公式:

$$\text{细胞增长倍数}(N) = \frac{\text{高峰细胞浓度或生长48小时细胞浓度}}{\text{接种细胞浓度}}$$

$$\text{平均世代时间}(G) = -\frac{\text{培养时间} \times \log 2}{\log [\text{收获时总细胞数/毫升}] - \log [\text{接种时活细胞数/毫升}]}$$

结 果

一、BHK₂₁C₁₃ 细胞的悬培适应与生长

BHK₂₁C₁₃ 细胞, 在我们的实验条件下, 利用 199 培养基进行悬培。在培养前 12 天中, 尽管每 2—3 天换部分新鲜培养基, 并加入单层细胞制备的细胞悬液, 但细胞无明显生长。悬培至第 8 天的悬培细胞经二次单层传代后再制成悬液进行悬培, 在第 9—24 天的 16 天悬培期中, 同前 12 天的培养情况相似。于是又将悬培第 19 天的细胞悬液再作单层培养, 然后又改为悬培, 在第 20—30 天的悬培中, 细胞仍无明显增长。即悬培→单层→悬培→单层→悬培→30 天前悬培细胞无生长但 30 天后悬培细胞开始稳定生长。图 1 表明, 悬培适应后的细胞 (称 BHK₂₁C₁₃S) 在前 11 天的悬培中生长较慢, 平均每 48 小时增长倍数为 1.41, G 为 79.39 ± 6.49 小时。其后生长加快, 平均每 48 小时增长倍数为 2.74, $G = 32.52 \pm 4.88$ 小时。细胞存活率在 90% 以上。

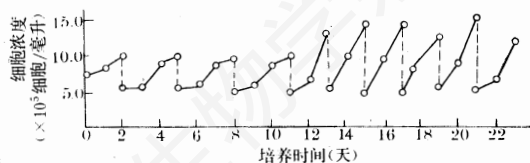


图 1 BHK₂₁C₁₃ 细胞经 30 天悬培适应后的悬培生长情况

○——○ 细胞生长。○……○ 取出细胞悬液。

二、BHK₂₁C₁₃S 细胞在各种培养基中悬培生长的比较

由于 199 培养基成本高, 配制麻烦, 悬培用量较大, 因此又试验了几种较简单的培养基。图 2 表明 BHK₂₁C₁₃S 细胞在 199 和 HL 各半量培养基中能连续悬培生长。在 HTY 培养基中细胞开始生长很好, 产量也高, 但第 10 天时生长

下降, 到悬培第 12 天几乎不生长。此时培养基中加入谷氨酰胺 (116 毫克/升), 细胞生长仍无明显好转。到第 16 天时, 改用 HTYs 培养基, 细胞又开始生长, 经一次传代细胞生长达到原来水平。这表明 HTY 培养基不宜用于连续培养这株细胞。细胞在 HTYs, HTYsh 和 HTYfs 培养基中均能有规律地悬培生长。即使在只含 2% 小牛血清的 HTYfs 培养基中也生长很好, 这为细胞悬培的大规模应用提供了有利条件, 因为培养基成本大大降低了。

图 3 表明, BHK₂₁C₁₃S 细胞在所试的 6 种培养基中都能生长。但在不同培养基中增长倍数及达到高峰时间不同 (表 2)。

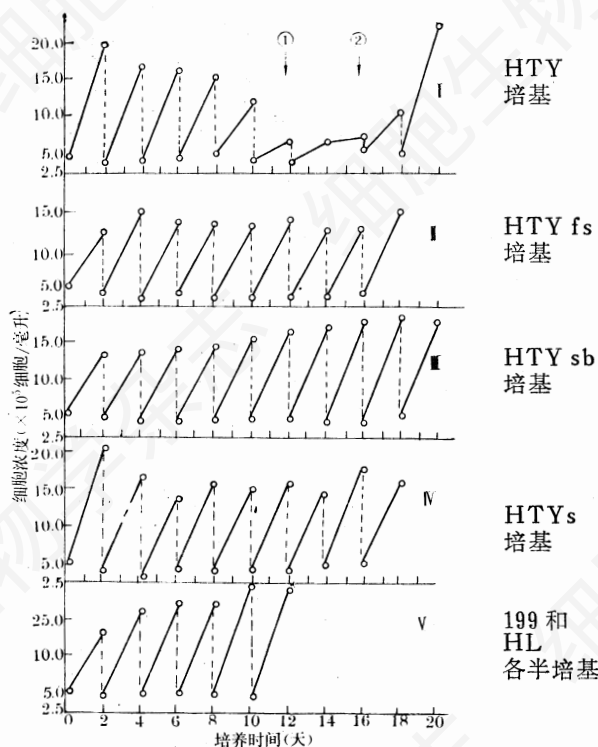


图 2 BHK₂₁C₁₃S 细胞在各种培养基中的连续悬培生长情况的比较 (细胞存活率在 90% 以上)

① 加入谷氨酰胺 (116 毫克/升)。

② 改用 HTYs 培养基培养。

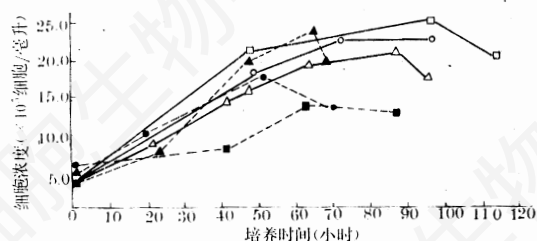


图3 BHK₂₁C₁₃S细胞在各种培养基中的悬培生长曲线(细胞存活率90%以上)

■.....■ 199 培养基; ●.....● 199 和 HL 各半量培养基; ▲.....▲ HTY 培养基;
□——□ HTYs 培养基; ○——○ HTYsh 培养基; △——△ HTYfs 培养基

表2 BHK₂₁C₁₃S细胞在各种培养基中的最大生长

培养基	达到生长高峰的时间(小时)	最大生长倍数(N)
199	65	3.00
199和HL各半量	50	3.61
HTY	65	7.44
HTYs	96	7.50
HTYsh	72	5.79
HTYfs	87	6.23

三、培养体积对 BHK₂₁C₁₃S 细胞生长的影响

在2升培养罐中,培养体积为1100—1400毫升(占全罐体积1/2—2/3),以HTYfs培养基悬培时,BHK₂₁C₁₃S细胞仍能正常生长,而且细胞产量基本稳定,平均每两天生长倍数为2.69。

表3 在2升发酵罐中培养体积占总体积的1/2—2/3时 BHK₂₁C₁₃S细胞的生长

实验批次	培养体积(毫升)	接种活细胞数($\times 10^6$ 细胞/毫升)	生长2天的活细胞数($\times 10^6$ 细胞/毫升)	生长倍数(N)
1 ...	1400	0.31	1.04	3.35
2 ...	1100	0.37	0.98	2.64
3 ...	1200	0.40	0.80	2.00
4 ...	1200	0.48	1.34	2.79
5 ...	1100	0.41	1.10	2.68
平均				2.69

四、BHK₂₁C₁₃细胞悬培适应后的生长特性

1. 在不同培养阶段的生长情况 细胞适应悬培的初期,尽管我们使用的是无Ca⁺⁺199培养基,仍有5—10个细胞结团和细胞附着培养罐壁生长的现象。随着悬培时间的延长,这种现象逐渐减少,到悬培70天后完全消失。适应的细胞,经110天33次单层传代后再悬培时,其生长特性未改变。

2. 细胞在不同培养基中的增长倍数及世代时间 除在199培养基中悬培适应初期细胞生长较慢,世代时间较长外,在其余培养基中差别不大(表4)。N在3—4之间,G在24—27小时之间。这说明,此细胞经悬培适应后,生长基本稳定。

表4 BHK₂₁C₁₃S细胞在各种培养基中的增长倍数及平均世代时间

培养基	生长*峰数	平均每48小时中增加的倍数(N)	平均世代时间(G)(小时)
199	6	2.74	32.52 $\pm$ 4.88
199和HL各半量	6	3.23	26.35 $\pm$ 4.25
HTYs	9	3.77	24.66 $\pm$ 3.27
HTYsh	10	3.69	24.83 $\pm$ 3.03
HTYfs	9	3.39	26.09 $\pm$ 2.09

* 细胞每生长48小时的连续个数。

3. 在不同培养阶段的细胞大小 BHK₂₁C₁₃细胞在悬培适应后的不同阶段,和未经悬培的细胞相比,细胞大小无显著变化(表5)。

表5 BHK₂₁C₁₃细胞在不同悬培阶段的细胞大小

悬培时间(累计天数)	细胞平均直径(μ)	标准差	细胞大小范围(μ)
未悬培 ...	13.10	2.419	8~25
57	12.76	2.331	5~24
90	12.84	2.427	8~26
102	12.81	2.020	8~18

4. 悬培细胞单层培养时的生长 悬培细胞转为单层培养时,可以正常贴附容器生长,细胞形态与悬培适应前的没有明显不同。从单

层培养生长来看, 悬培适应前后生长速度不同(图4)。在同一规格[$2.5 \times 4.5 \times 11.5$ (厘米), 培养液 10 毫升]的每一培养瓶中, 接种同量细胞, 在一定时间内, 悬培适应细胞的生长($N = 16.7$)比未悬培细胞($N = 4.8$)快得多。

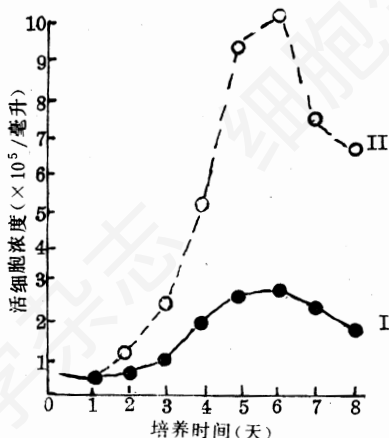


图4 悬培适应前后的 BHK₂₁C₁₃ 细胞单层培养时的生长

I 悬培适应前(199 培养基)。

II 悬培适应后 76 天(HTYs 培养基)。

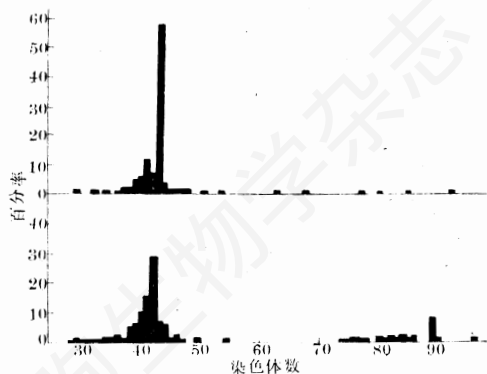


图5 BHK₂₁C₁₃ 细胞悬培适应前后染色体数目变化

上: 悬培适应前(199 培养基加 10% 小牛血清)。

下: 悬培适应后(199 和 HL 各半量培养基, 10% 小牛血清)。

5. 悬培适应前后细胞染色体数目的变化
图5表明, BHK₂₁C₁₃ 细胞未经悬培时, 染色体数目占优势的是二倍体, 44 条染色体的细胞占 56.33%, 四倍体以上只占 1.67%。而悬培适

应后细胞, 染色体数目较为分散, 染色体 44 条的只占 6%, 42 条的占 14.67%, 43 条的占 28.33%, 四倍体以上的细胞已占 5.67%。

讨 论

一、BHK₂₁C₁₃ 细胞是二倍体细胞^[12]。二倍体细胞和原代细胞不适应于悬培生长, 只有肿瘤细胞或异倍体细胞才有这种特性^[11]。而且由单层培养转成悬培时, 由于生长方式不同, 需要一定的适应期。BHK₂₁C₁₃ 细胞之所以能悬培适应, 可能与接种地鼠后产生肿瘤^[13]并且认为是拟二倍体的细胞^[12]等性状有关。Capstick 等^[6]悬培 BHK₂₁C₁₃ 细胞时, 经过 21 天才能适应, 而 Davis 等^[14]报道则需要 30 天。从本实验结果看, 我们使用的细胞与 Davis 等使用者比较相似。

细胞适应悬培所需的时间与细胞原来染色体组型可能有关。Capstick 等^[13]报告, 他们将不同染色体组型的 BHK₁₂C₁₃ 细胞进行悬培时, 非整倍体占优势的 2P 亚株 22 天适应悬培生长, 而二倍体占优势的 3P 亚株经 44 天才建成悬培生长。细胞适应悬培生长后, 染色体数目一般也发生变化。Capstick^[15]发现, 悬培维持 170 天的 BHK₂₁C₁₃ 细胞染色体变为混倍体。Fishcher 等^[16]报告, BHK₂₁C₁₃ 细胞, 悬培前 44 条染色体的占 65%, 近四倍体的占 4.8%。悬培适应后, 染色体 44 条的为 9.8%, 42 条的为 23.3%, 43 条的为 24.2%。我们的结果与 Fishcher 等的结果较相似。

细胞悬培适应过程中, 开始细胞数逐渐减少。一般采用多罐合并离心沉淀法。我们采用取出部份悬液, 加进新鲜培养基, 不足细胞数使用前代单层培养物制备的细胞悬液补足。这种方法操作较简单, 有利于避免离心换液时带来的污染。

在本实验中悬培适应前后的细胞大小无明显变化。这与 Capstick 等^[13]的结果一致。适应细胞单层培养时, 形态学上无重要变化, 均以棱形细胞为主。这与 Кудрявцева 等^[17]

报告的适应悬培的细胞形态学上不同于单层培养细胞似乎不一致。

二、BHK₂₁C₁₃细胞是用Eagle氏培养基加10%牛血清建立的^[3]。以后悬培适应及培养条件的研究,多数采用作一定程度修改的Eagle氏培养基进行。细胞在这些培养基中,以 $3-5 \times 10^5$ 细胞/毫升接种,经40—50小时可增加近5倍。后来Radlett等^[7]使用7M培养基(葡萄糖量增加到6200毫克/升,谷氨酰胺量增至932毫克/升)时,细胞产量可增加近14倍。Mizahi和Avihoo^[8]在分析6M培养基的氨基酸组成时发现,HL和TPB含氨基酸相当丰富。去掉培养基中氨基酸时,与含氨基酸的相比细胞生长无任何差别。但当培养基中缺少谷氨酰胺、维生素、血清、HL和TPB中的任一种时,细胞生长大受影响。培养基6M与7M的主要区别是,谷氨酰胺浓度较低(466毫克/升),血清较少(5%)。这表明,培养基中减去氨基酸,减少血清量仍能使细胞正常生长。但Mizahi和Avihoo的试验培养量太少(10毫升),而且只做生长曲线,未做连续培养。

我们为了使细胞迅速适应悬培生长,先使用营养较丰富的199培养基。但作大量培养时因价格昂贵不宜使用。在使用去掉了氨基酸的HTY培养基时细胞不能连续悬培生长(图2)。看来这种培养基可能缺乏细胞长期生长所需要的营养因子。细胞在199和HL各半量、HTYs、HTYsh和HTYfs培养基中,都能连续悬培生长。平均每48小时增长2.5—3.7倍(表4)。但是,在我们的实验条件下,不管采用何种培养基,细胞生长从未超过8倍(表2)。即使采用接近于6M的培养基时,细胞最大生长仍在 3.0×10^6 细胞/毫升以下。其原因可能是:(1)培养条件有差异(如培养量较大等);(2)细胞传代历史不同。有的学者^[11]认为,随着细胞传代数的增加,其繁殖速度也加快。Davis等^[14]适应悬培的BHK₂₁C₁₃细胞,在2天的生长期中细胞数也在1.5—2.2细胞/毫升。看来细胞传代历史可能是生长倍数不同的

主要原因。

值得重视的是,培养基中血清量由10%降到2%时细胞仍能连续悬培生长。这对细胞大量悬培很重要,不仅因为牛血清用量减少,成本降低,且利于生化分析。

三、BHK₂₁C₁₃细胞在不同培养量时的悬培条件有过很多研究^[11]。目前除生产口蹄疫病毒疫苗外,多数用30升以下的从事研究。一般认为,33—37℃,335或480RPM, pH 7.0—7.6, pO₂80mmHg时,细胞生长得较好。我们以pH7.0—7.4,不通气培养时,细胞能很好生长。这与早期的报告^[6]一致。但是,我们以300RPM搅拌培养时,细胞很快死亡。这可能是所用的发酵罐挡板较多,而培养量较少(1/3)所致。

摘 要

本文报告BHK₂₁C₁₃细胞的悬浮培养研究。细胞经30天悬浮培养适应后能稳定生长。适应后细胞在所试的199和HL各半量、HTYs、HTYsh和HTYfs培养基中都能连续稳定悬浮培养生长。适应后,细胞大小无明显变化;单层培养时生长速度加快;细胞染色体数目发生变化,文内对此作了讨论。

参 考 文 献

- [1] Owens, O. Von H., et al. 1954. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1039—1055.
- [2] Levine, D. W., et al. 1979. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 821—845.
- [3] Macpherson, I., and Stoker, M., 1962. *Virology.* 16: 147—151.
- [4] Böbme, U., and Kuwert, E., 1971. *Med. Microbiol. Immunol.* 157: 32—45.
- [5] Karabstos, N., and Buckley, S. M., 1967. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 99—105.
- [6] Capstick, P. B., et al. 1962. *Nature*, 195: 1163—1164.
- [7] Radlett, P. J., et al. 1971. *Appl. Microbiol.* 22: 534—537.
- [8] Mizrahi, A., and Avihoo, A., 1976. *J. Biol. Stand.* 4: 51—56.

- [9] Telling, R. C., and Elsworth, R., 1965. *Biotechnol. Bioeng.* 7: 417—434.
- [10] Сергеев, В. А., 1976. Репродукция и Выращивание Вирусов Животных. С 249. Москва «Колос».
- [11] Telling, R. C., and Radlett, P. J., 1970. *Adv. Appl. Microbiol.* 13: 91—119.
- [12] Stoker, M., and Macpherson, I., 1964. *Nature* 203: 1155—1157.
- [13] Capstick, P. B., et al. 1966. *Exp. Cell. Res.* 44: 119—128.
- [14] Davis, J. L., et al. 1971. *Appl. Microbiol.* 21: 338—341.
- [15] Capstick, P. B., 1963. *Proc. Roy. Soc. Med.* 56: 1062—1064.
- [16] Fischer, A. B., et al. 1971. *Archiv. ges. Virusforsch.* 33: 375—384.
- [17] Кудрявцева, Г. А., и др., 1976. *инфекционная*. 18: 336—341.

离体条件下胎肝细胞代谢功能的研究

汪涛、马祥瑞、王洪云、苏燎原

(苏州医学院放射医学系)

胎肝细胞具有旺盛的造血功能,已被体内和体外集落形成细胞的许多实验所证实^[1,2]。Moore 等人^[3]的观察表明,早期造血器官的发生来源于胎肝的循环干细胞,这说明胎肝在造血过程中具有重要的意义。我们拟用³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)和¹⁴C-尿嘧啶核苷(¹⁴C-UR)两者的参入实验来探讨胎肝细胞代谢功能的某些特性及其辐射敏感性。

材 料 和 方 法

一、胎肝细胞悬液的制备

实验中选用昆明种怀孕小鼠,孕鼠颈部脱臼活杀,经酒精消毒后剖腹取出胎鼠,再将胎鼠剖腹取胎肝放进盛预冷的 Eagle 培养基的培皿中,通过 6½ 号、4 号针头冲打,使细胞均匀扩散,制成 10 毫升细胞悬液,用血细胞计数器进行计数。

二、小鼠胚胎条件培养基的制备

将胎鼠断头并去四肢及内脏,所剩躯干部分用弯形小剪刀剪碎,用 1 毫升注射器冲打成匀浆,用 0.5%胰蛋白酶消化,制备成单细胞悬液,细胞计数。用 Eagle 培养基按 2×10^6 个细胞/毫升稀释,5 毫升/瓶,共 6 瓶,37℃ 培养 7 天,离心收集上清液。下面的细胞层加入 Eagle 培养基继续培养,准备连续收获。

三、胎肝细胞的培养及标记

所制备的胎肝细胞混悬液的各实验组,分装成 4—8 个平行样品,每瓶样品 2 毫升,用微量注射器每瓶样品加入³H-TdR (比放射性 14 居里/毫克分子,

放射性强度 30 微居里/毫升) 0.6 微居里和¹⁴C-UR (比放射性 50 毫居里/毫克分子,放射性强度 7.5 微居里/毫升) 0.15 微居里混合液 20 微升,在 37℃ 温箱培养 4 小时后,制备成纸片样品^[4]。

四、测量条件与计算

应用国产 FJ—353 型双道液体闪烁计数器进行测量,其条件:高压 1400V,甄别阈上道 10.0V,中道 5.6V,下道 0.5V,分析选择用“2”,放大倍数 $A1/2 \times 1/4$, $B1/2 \times 1/16$ 。测量样品减去本底后,根据³H 和¹⁴C 在 A、B 道的效率乘以校正值计算其参入量^[4]。

结 果

一、胎肝细胞植入数与放射性参入量之间的关系

胎肝细胞在 Eagle 培养基中短期培养后(4 小时),细胞浓度以 2×10^4 — 2×10^6 个细胞/毫升之间培养时生长良好,³H-TdR 的参入量与¹⁴C-UR 的参入量均呈线性增长,而在 2×10^7 个细胞/毫升时³H、¹⁴C 的参入降低,细胞生长受到抑制,同时发现³H-TdR 参入和¹⁴C-UR 参入相平行[图 1]。在³H-TdR 参入 DNA 受抑制的细胞浓度(2×10^7 个细胞/毫升),¹⁴C-UR 参入 RNA 也受抑制,表明 DNA 与 RNA 的合成与种植的细胞数有一定依赖关系。