

无血清培养 HAb18 细胞的生长代谢与 抗体分泌特征

李玲 米力* 谢丽 刘蓉 冯强 徐力青 陈志南*

(第四军医大学细胞生物学教研室, 西安 710032)

摘要 通过逐步降低血清浓度, HPLC 氨基酸分析及正交实验筛选研制了 HAb18 杂交瘤细胞的无血清培养基。对在该无血清培养条件下的细胞进行了计数, 对培养上清液进行了葡萄糖、谷氨酰胺、乳酸和氨浓度以及抗体分泌量和抗原结合活性测定, 并对动力学参数进行了分析, 结果表明 HAb18 细胞在无血清培养条件下达到的最大细胞密度和抗体分泌量分别为 0.91×10^6 个/ml 和 43.8 mg/L; 细胞比生长速率较在有血清条件下稍有下降, 而抗体合成速率提高(0.0207/h 比 0.0218/h, 0.387 pg/cell/h 比 0.218 pg/cell/h, $P < 0.01$)。无血清培养时葡萄糖和谷氨酰胺消耗无明显变化, 但乳酸浓度降低, 氨浓度升高; 此外, 分泌抗体的抗原结合活性增加。研究无血清培养条件下的 HAb18 细胞生长代谢和抗体分泌特征可为建立 HAb18 无血清悬浮流加培养工艺打下基础。

关键词 杂交瘤细胞; 无血清培养; 细胞生长; 细胞代谢; 抗体分泌

无血清培养是当今细胞培养领域和工业化生物技术药物研究的热点与趋势。无血清培养基(serum free medium, SFM)采用已知分子结构和构型的组分, 成分明确、质量一致, 有利于提高动物细胞产品生产的稳定性并使细胞产品易于纯化, 降低生产成本, 尤其是可进行培养基成分的选择性添加, 以及培养过程的代谢优化^[1,2]。然而商业化无血清培养基缺乏广泛的通用性, 无法进行培养成分的优化, 且具有与血清类似的不足, 如替代成分来源不明或为动物来源等问题^[3]。因此, 针对各个不同的细胞而言, 仍需发展适合细胞自身特点的无血清培养基。我室建立的抗人肝癌单克隆抗体 HAb18 目前已获得 SFDA 批准的新药证书(@S20050039), 即将投入市场用于原发性肝癌的治疗。以肝癌单抗 HAb18 为目标产品, 进行杂交瘤细胞 HAb18 的规模化生产放大, 迫切需要研制适于 HAb18 细胞生长增殖的无血清培养基。

本文采用逐步降低血清浓度, 在分析杂交瘤细胞 HAb18 对培养基中氨基酸利用的基础上, 对 DMEM/F12 培养基进行初步优化; 再采用正交实验筛选无血清替代成分, 研制出适宜杂交瘤细胞 HAb18 长期生长传代的无血清培养基, 实现了无血清低蛋白培养。同时, 对杂交瘤细胞 HAb18 在含血清与无血清两种不同培养条件的细胞生长, 细胞

代谢及抗体分泌进行了比较。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞株

杂交瘤细胞 HAb18 由本教研室建立(中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物保藏中心保藏, 保藏号: CGMCC No 0426), 分泌高特异性、高亲和力的抗人肝癌单克隆抗体 HAb18 (IgG₁)。

1.2 培养基及添加物

DMEM、Ham's F12、胎牛血清为 Hyclone 公司产品, 胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、乙醇胺、2-巯基乙醇、ATA 和 PF-68 等均购自 Sigma 公司, 谷氨酰胺、碳酸氢钠、氨基酸等为国产。

1.3 无血清培养适应过程

常规培养基为 DMEM/F12 添加 10% FBS。采用分阶段降低血清法: 将处于对数生长期、细胞活性大于 95%、在 10% FBS 稳定生长的细胞, 以 0.3×10^6 个/ml 传代于常规培养基(75%)与 SFM(25%)混合的培养基中。当细胞密度大于 0.6×10^6 个/ml 时, 再以 0.3×10^6 个/ml 的细胞密度传代, 如此重复 3

收稿日期: 2005-06-23 接受日期: 2005-09-13

国家高新技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No.2002AA217011)

* 通讯作者。Tel: 029-84774547, Fax: 029-83293906, E-mail:

chcerc2@fmmu.edu.cn; milicec@vipsina.com.cn

代,直至细胞比生长速率趋于稳定,活性维持在90%以上。用同样的方法使细胞适应在5%、2.5%、1% FBS及SFM培养基中生长。一旦细胞能在100%SFM中成功地连续传代3次以上,即认为细胞适应了SFM。

1.4 基本培养基优化

将已适应低/无血清培养条件的HAb18细胞转入DMEM/F12无血清基本培养基培养24 h,用HPLC分析测定HAb18细胞在无血清培养条件下氨基酸的利用情况,据此调整优化基本培养基氨基酸浓度。

1.5 无血清添加成分及浓度的正交实验筛选

以DMEM/F12为基本培养基,采用 $L_8(2^7)$ 正交模式,分析胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、乙醇胺、2-巯基乙醇、ATA和PF-68等7种成分对HAb18细胞生长的影响,以细胞比生长速率为评价指标,确定无血清替代成分组合及浓度水平。每种组合对细胞生长影响的实验均重复3次。添加成分及浓度水平见表1。

1.6 培养效能验证

分别用SFM、含10%FBS的DMEM/F12培养基以及商品化无血清培养基CCM1,在方瓶及摇瓶(B.Braun公司)中进行平行对照实验,进行细胞生长、细胞代谢、抗体分泌及抗原结合活性的比较。不同培养条件的平行对照实验均重复3次。细胞计数采用血球计数仪及台盼蓝染色法;葡萄糖和谷氨酰胺浓度测定采用YSI生化分析仪进行;乳酸和氨离子浓度检测分别采用乳酸脱氢酶法和靛酚蓝比色

法;抗体定量采用竞争ELISA法;抗原结合活性检测采用FCM和间接ELISA法。细胞生长与抗体生成的动力学参数计算公式为:比生长速率

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \text{ (1/h)}; \text{ 抗体比生成速率}$$

$$q_{Mab} = \frac{Ab_2 - Ab_1}{\frac{X_2 + X_1}{2}(t_2 - t_1)} \text{ (pg/cell/h)}.$$

式中: Ab 为抗体浓度; X 为细胞密度; t 为培养时间。

2 结果

2.1 基本培养基氨基酸浓度优化

从图1可看出, HPLC分析静止培养24 h后HAb18细胞对非必需氨基酸如组氨酸和脯氨酸的消耗达70%;对5种必需氨基酸如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和蛋氨酸消耗接近50%。依据公式: $C_{o,i}^{new} = C_{o,i}^{SFM} + (\beta C_{o,i}^{SFM} - C_{f,i}^{SFM})$ 分别给予相应的补充^[4]。 $C_{o,i}^{new}$ 、 $C_{o,i}^{SFM}$ 和 $C_{f,i}^{SFM}$ 分别为培养基中第 i 种氨基酸在新培养基添加后,未添加起始条件和未添加培养后期的浓度。 β 为比例系数,通常设置为0.7。

2.2 无血清添加成分及浓度确定

从正交实验结果直观分析来看:5#方案达到的细胞密度最高(55.8×10^4 个/ml),接近于10%FBS组(62.3×10^4 个/ml)和CCM1组(64.3×10^4 个/ml)(表2)。各因素不同水平对细胞生长有不同的影响。极

表1 无血清替代成分浓度及水平表

| 因素 水平 | 胰岛素 (mg/L) | 转铁蛋白 (mg/L) | 亚硒酸钠 (nmol/L) | 乙醇胺 (μ mol/L) | 2-巯基乙醇 (μ mol/L) | ATA (μ mol/L) | PF-68 (%) |
|----------|---------------|----------------|------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------|
| 1 | 5 | 5 | 10 | 10 | 25 | 5 | 0 |
| 2 | 15 | 10 | 30 | 25 | 55 | 50 | 0.1 |

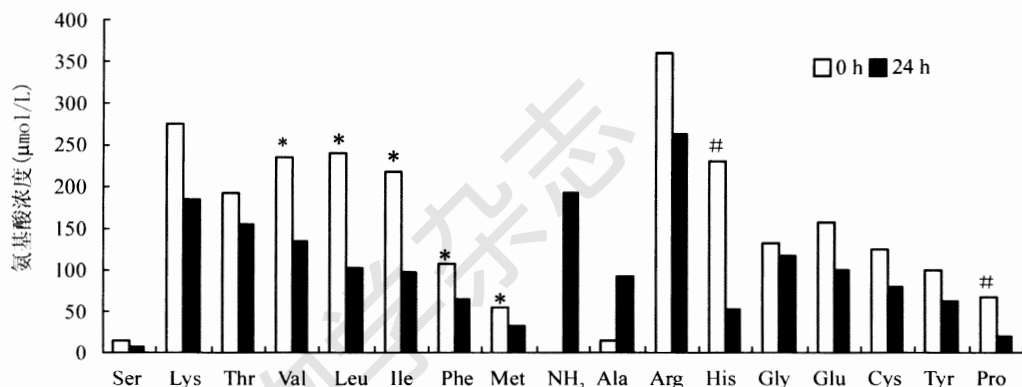


图1 HAb18杂交瘤细胞静止培养时HPLC氨基酸消耗分析

*: 必需氨基酸; #: 非必需氨基酸。

差R值显示: PF68两水平间极差最大, 其次为ATA和胰岛素, 因而选择K值较大的水平, 如胰岛素和PF-68选取高浓度水平(分别为15 $\mu\text{g/ml}$ 和0.1%), ATA选择低浓度水平, 即5 $\mu\text{mol/L}$ 。后四者极差R值均小于5, 其不同水平对于细胞生长影响的差异较小, 可任选其一; 为降低成本, 我们选择了较低浓度水平。

2.3 HAb18细胞的无血清适应培养

分阶段缓慢降低血清过程中, 在血清浓度依次降低至2.5%时, 前1~2代细胞生长不受影响, 随后细胞生长减慢, μ 由0.04/h降低至0.03/h, 8代后已适应在较低血清浓度生长, 活性维持在80%以上。细胞由1%FBS+SFM18转入无血清培养基后, 在培养的前2代细胞也没有表现出不适应现象, μ 维持在0.03/h左右, 但出现细胞结团现象。培养至第3代以后, 细胞生长缓慢, μ 迅速降至0.02/h以下, 细胞结团严重; 第6代时, 细胞活性下降至60%(图2中显示为0.6); 随后细胞活性和生长速率缓慢增加, 到20天(连续传代10次)生长开始加快, 比生长速率恢复到1%FBS+SFM18的水平, 细胞密度恢复至10%FBS的水平(1×10^6 个/ml), 细胞活性开始回升, 此时细胞结团仍然较为严重。再经过连续传代22天后, 细胞开始正常生长, μ 维持在0.03/h左右, 细胞结团缓解。

2.4 培养效能比较

将HAb18杂交瘤细胞以 0.3×10^6 个/ml的细胞密度分别接种到SFM18和10%FBS培养基进行培养

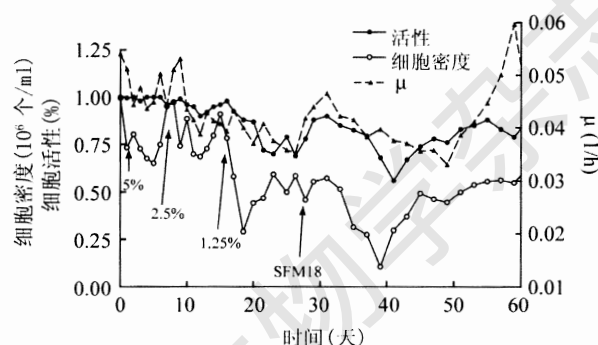


图2 HAb18细胞无血清适应过程中细胞密度和比生长速率的变化

效能比较(图3)。从细胞生长来看, SFM18和10%FBS获得的最大活细胞密度分别为 0.91×10^6 个/ml和 1.093×10^6 个/ml, 对数生长期 μ 分别为0.0207/h和0.0218/h。虽然SFM18支持的细胞最大活细胞密度和 μ 略低于10%FBS培养条件, 但培养周期延长。就抗体合成而言, SFM18的抗体产量高于10%FBS(43.8比30 mg/L), q_{Mab} 亦升高(0.387比0.218 pg/cell/h, $P < 0.01$)。此外, 与10%FBS相比, SFM18培养条件下葡萄糖和谷氨酰胺消耗无明显变化, 但乳酸浓度降低, 氨浓度升高, 提示无血清培养条件下其他氨基酸消耗需求增加。

在抗原结合活性方面, SFM18培养制备的IgG与靶细胞FHCC98(本研究中心鉴定保存)^[5]结合的平均荧光强度和阳性率与CCM1接近, 而略高于10%FBS(252 ± 4.0 比 233 ± 2.5 , $P > 0.01$; $99.97\% \pm 0.02$)

表2 HAb18杂交瘤细胞正交实验结果及直观分析表

| 序号 | A | B | C | D | E | F | G | 细胞密度 (10^4 个/ml) | | | 均值 |
|-------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|------|------|-----------------|
| | | | | | | | | 1 | 2 | 3 | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 22.5 | 27 | 21.5 | 23.7 ± 2.93 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 33.5 | 37 | 36 | 35.5 ± 1.80 |
| 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 30 | 34 | 38 | 34.0 ± 4.00 |
| 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 25.5 | 23 | 32 | 26.8 ± 4.65 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 50 | 60.5 | 57 | 55.8 ± 5.35 |
| 6 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 24 | 28 | 34 | 28.7 ± 5.03 |
| 7 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 26 | 14.5 | 24.5 | 21.7 ± 6.25 |
| 8 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 53 | 48.5 | 40 | 47.2 ± 6.60 |
| 9 | DMEM/F12 | | | | | | | 12 | 9.5 | 19 | 13.5 ± 4.92 |
| 10 | DMEM/F12+10%FBS | | | | | | | 59.5 | 67.5 | 60 | 62.3 ± 4.48 |
| 11 | CCM1 | | | | | | | 66 | 70.5 | 56.5 | 64.3 ± 7.15 |
| \bar{K}_1 | 30 | 35.93 | 32.03 | 33.8 | 33.4 | 38.38 | 25.23 | | | | |
| \bar{K}_2 | 38.35 | 32.43 | 36.33 | 34.55 | 34.95 | 29.98 | 43.13 | | | | |
| R | -8.35 | 3.5 | -4.3 | -0.75 | -1.55 | 8.4 | -17.9 | | | | |

表中A为胰岛素, B为转铁蛋白, C为亚硒酸钠, D为乙醇胺, E为2-巯基乙醇, F为ATA, G为PF-68; 表中 \bar{K}_1 和 \bar{K}_2 分别为各因素取第1水平或取第2水平的4次实验之细胞密度值总和的算术平均值; R为 \bar{K}_1 和 \bar{K}_2 值的极差, 采用直接计算的方法获得, 当R的绝对值大于5时, 表明该因素对细胞密度有较大的影响。另外, 讨论其中一个因素时, 其他的因素按照正交设计表设计取相应的水平。采用SPSS12.0对各组的细胞密度值进行方差分析, 结果表明胰岛素、ATA和PF-68对HAb18细胞生长及增殖有明显的促进作用, 且差异有显著意义($P < 0.01$)。

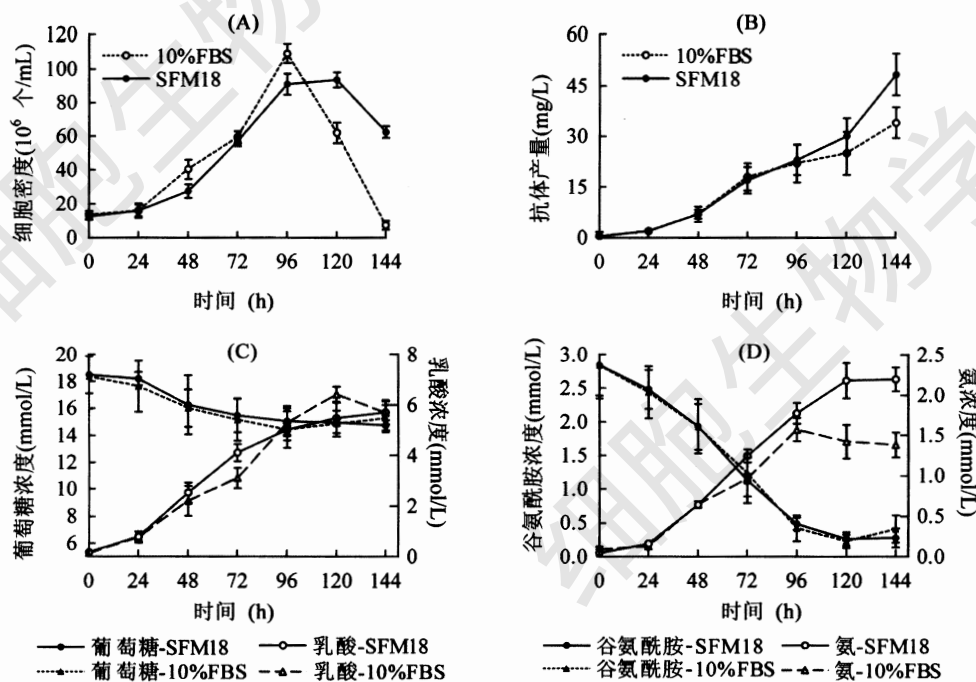


图3 无血清培养 HAb18 细胞的细胞生长代谢与抗体合成特征

A: 不同条件下的 HAb18 细胞生长情况; B: 不同条件下的抗体分泌情况; C: 不同条件下 HAb18 细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成情况; D: 不同条件下 HAb18 细胞的谷氨酰胺消耗和氨生成情况。

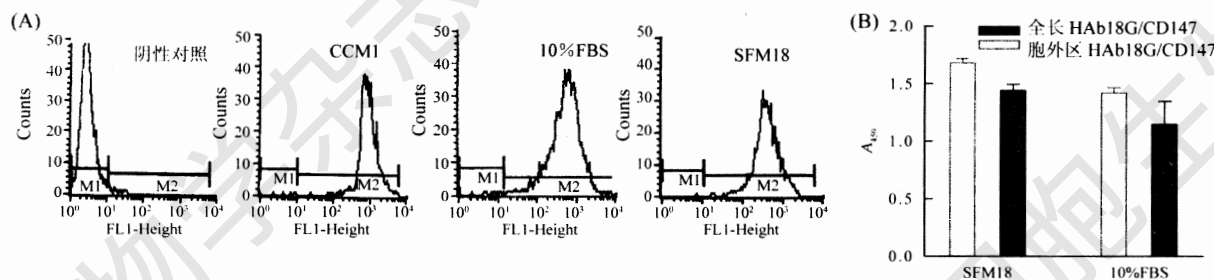


图4 无血清培养 HAb18 细胞的抗原结合活性

A: 不同条件制备的 IgG 与靶细胞 FHCC98 的免疫结合活性; B: 不同条件制备的 IgG 与靶抗原 HAb18G/CD147 的免疫结合活性。

比 $97.22\% \pm 1.4$, $P > 0.01$) (图 4A)。与靶抗原 HAb18G/CD147(本研究中心鉴定制备)^[6]全长和胞外区结合的 A_{450} 值亦高于 10%FBS (1.44 ± 0.09 比 1.149 ± 0.35 , $P < 0.01$; 1.68 ± 0.06 比 1.42 ± 0.08 , $P < 0.01$) (图 4B)。

3 讨论

本实验采用 Sato 和 Barnes 创立的合成路线, 通过正交实验筛选, 在优化的 DMEM/F12 基本培养基中添加不同组合的生长基质成分以替代血清, 在 1 个月内筛选出 HAb18 杂交瘤细胞的无血清培养基 SFM18 添加成分的组合配方, 成本较有血清和商业无血清培养基降低 40%, 快速高效且省钱、省力。进行无血清培养的关键步骤是无血清或无蛋白

质“适应”, 即缓慢减少培养基中血清或蛋白质含量, 给细胞以充足的时间“适应”无血清或无蛋白质培养基条件, 并进行细胞增殖和产物分泌^[3]。但在无蛋白质培养条件下, 部分细胞若缺乏生长增殖或产物分泌所必需的生长因子如胰岛素或转铁蛋白, 即使经过“适应”驯化也常常会出现细胞生长或产物分泌速率下降^[3, 7]。因而, 研制成分明确, 不含动物或人源蛋白的低蛋白质化学限定培养基是进行动物细胞规模化培养的理想选择。本研究研制的 SFM18 组分明确, 其蛋白质成分胰岛素和转铁蛋白均来源重组表达产物, 培养基中总蛋白含量为 20 mg/L, 属于低蛋白质化学限定培养基。

商品化的动物细胞培养基大多是根据细胞在低密度培养或克隆生长的营养需要而设计的, 不完

全适用于以动物细胞产品生产为目的的细胞培养的需要。由于不同细胞对营养成分的需求有所不同, 培养基中某些成分的不足, 可能成为细胞生长限制性因素^[8]。如, 不同的细胞系及表达产品, 其氨基酸消耗利用方式及比例是不同的^[9]; 某些氨基酸成分的不足可诱导细胞凋亡发生^[10], 相反部分氨基酸浓度过高时则产生毒性作用。因此, 在设计无血清培养基时, 需平衡添加氨基酸, 通过分析细胞对营养的需求进行优化。本实验中采用 HPLC 氨基酸分析, 依据公式 $C_{o,i}^{new} = C_{o,i}^{SFM} + (\beta C_{o,i}^{SFM} - C_{f,i}^{SFM})$ 对氨基酸消耗在 50%~70% 的 10 种氨基酸进行添加, 实现了 DMEM/F12 基本培养基氨基酸浓度的优化。

本实验中发现, 无血清培养条件下达到的最大细胞密度比有血清培养时低(10%FBS 的 83%), μ 下降, 这与文献报道一致。如在无血清培养时, 杂交瘤细胞的密度仅为有血清培养时的 24%~75%^[11]。尽管无血清培养时, 细胞密度有所降低, 但 q_{Mab} 却比有血清培养增高。原因可能是: ①有血清培养时, 细胞往往不能较长时间地维持在较高密度(大于 10^6 个/ml), 同时衰老死亡的细胞释放细胞内的蛋白酶至培养基中, 引起目的产物降解; ②无血清培养时, 细胞处于 G_0 期或 G_1 期延长, 培养周期延长,

因而目的产物产量增加^[12]; ③血清中含某些抑制因子; ④细胞生长也可能影响抗体分泌。当细胞处于相对低 μ 的情况下, 用于细胞增殖的能量减少而用于产物合成的能量增加, 有利于抗体的合成。因此, 无血清培养时细胞密度降低, 但 q_{Mab} 增加。

除了采用 μ 和 q_{Mab} 作为无血清培养基优化的评价指标之外, 本实验引入了抗体的抗原结合活性这一反映细胞培养产物生物学活性的指标。我们的结果表明采用无血清培养之后, 培养产物的抗原结合活性均反而较有血清时提高, 其原因可能在于血清中的抑制因子被去除的缘故。

参考文献 (References)

- [1] Wurm FM. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 1393
- [2] Li L *et al.* *Biotechnol Appl Biochem*, 2005, **42**: 73
- [3] Hesse F *et al.* *TIBTECH APRIL*, 2000, **18**: 173
- [4] Stoll TS *et al.* *J Biotechnol*, 1996, **45**: 111
- [5] Lou CY *et al.* *World J Gastroenterol*, 2004, **10**: 1462
- [6] 张思河等. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, **21**: 65
- [7] Sung YH *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**: 527
- [8] 米力等. *生物工程学报*, 2002, **18**: 360
- [9] Chen Z *et al.* *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 837
- [10] Simpson NH *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**: 90
- [11] Quesney S *et al.* *Cytotechnology*, 2001, **35**: 115
- [12] Lloyd DR *et al.* *Cytotechnology*, 2000, **34**: 59

Characteristics of HAb18 Cell Growth, Cell Metabolism and Antibody Synthesis under Serum Free Culture Condition

Ling Li, Li Mi*, Li Xie, Rong Liu, Qiang Feng, Li-Qing Xu, Zhi-Nan Chen*
(Department of Cell Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract A serum free medium for hybridoma HAb18 was obtained through decreasing the serum concentration gradually, analyzing amino acids exhaustion with HPLC and screening serum supplement through orthogonal experiment. Cell grown in serum free medium was subjected to cell counting. Supernatant from the spent medium were pooled to determine the concentration of glucose, glutamine, lactate and ammonia. Moreover, not only antibody yield and antigen binding activity were detected, but dynamic parameters were analyzed. Our results showed that the maximum cell density and antibody production in serum free medium were 0.91×10^6 cells/ml and 43.8 mg/L, respectively. Although the specific cell growth rate reduced slightly, antibody productivity increased (0.0207/h vs. 0.0218/h, 0.387 vs. 0.218 pg/cell/h, $P < 0.01$). Glucose and glutamine exhaustions in serum free medium were similar to that in serum containing medium; while lactate production cut down and ammonia production enhanced. Likewise, antigen-binding activity increased. Taken together, studies on characteristics of HAb18 cell growth, metabolism and antibody synthesis in serum free medium would lay a foundation for HAb18 serum free suspension fed-batch technology.

Key words hybridoma cell; serum free culture; cell growth; cell metabolism; antibody production

Received: June 23, 2005 Accepted: September 13, 2005

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA217011)

*Corresponding author. Tel: 86-29-84774547, Fax: 86-29-83293906, E-mail: cherc2@fmmu.edu.cn; milicec@vipsina.com.cn