

# 小鼠杂交瘤细胞在双口滚动培养瓶中的生长及抗体分泌\*

王彦 焦鸿丽 张锦珠 赫荣乔\*\*

(中国科学院生物物理研究所, 视觉信息加工开放实验室, 北京 100101)

**摘要** 研制了一种新的滚动式细胞培养装置 (rolling culture system) 和双口滚动瓶 (double mouthed roller). 利用分泌抗人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞作为检验材料, 对培养在双口滚动培养装置及常规 T 形瓶中的细胞生长和单抗分泌进行了比较. 在滚动培养装置中 (转速 2~10 r/min) 培养的细胞生长和抗体分泌皆增加 30% 以上. 不同浓度的血清对细胞生长和抗体产量有一定影响, 含 5% 血清的培养液中生长的杂交瘤细胞单抗产量最高; 添加少量明胶可增加细胞生长和抗体产量.

**关键词** 杂交瘤, 单抗分泌, 细胞培养, 双口滚动瓶

**学科分类号** Q8131+1

自 1975 年利用杂交瘤细胞制备单克隆抗体的技术建立以来<sup>[1]</sup>, 大量的单克隆抗体已广泛应用于科研、诊断和治疗. 将杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔, 从腹水中获得单抗的方法虽然抗体产量较高, 但由于抗体不纯且用于人类治疗受到限制而逐渐被体外培养所取代<sup>[2]</sup>. 除传统 T 形瓶静止培养外, 培养方法不断更新, 如: 旋转或振动培养, 中空纤维反应器培养, 透析管培养, 多孔微载体培养法等<sup>[3~5]</sup>. 评价这些方法的指标主要是细胞生长、抗体产量及合理的费用等.

市售滚动培养装置实际是一种滚动架, 其滚动培养瓶虽有不同种类, 但仅为单口, 并存在一定缺点: 第一, 通气相对不好, 导致细胞生长不如双口培养瓶; 第二, 单口培养瓶在绕轴滚动过程中不平衡而产生移动和振动, 进而影响细胞生长和产物的分泌. 近年来发明的回转式细胞培养装置 (rotary cell culture system, RCCS) 利用模拟微重力, 使培养液充满容器, 细胞悬浮或生长在微载体上, 当培养容器的半径和转速在一定范围内, 细胞受到的离心力与重力可以达到近似均衡, 在这种状态下, 细胞呈三维生长. 国际同行利用 RCCS 做了很好的工作. Freed<sup>[6]</sup>和 Falsafi 等<sup>[7]</sup>成功地实现了人工牛软骨及人鼻软骨的建造; 构建出了人工甲状腺组织<sup>[8]</sup>和肝组织<sup>[9]</sup>. 一些肿瘤细胞系在 RCCS 中能形成三维结构<sup>[10]</sup>. Lelkes 等<sup>[11]</sup>利用 RCCS 研究了神经细胞分化和基因表达. 到目前为止, 还未见利用

RCCS 对杂交瘤细胞培养的报道. 曾有人在空间微重力条件下对杂交瘤细胞进行过培养实验<sup>[12, 13]</sup>, 发现微重力能促进杂交瘤的生长速度, 在太空中培养的杂交瘤细胞生长速度与地面相比增加 30%~40%, 但单克隆抗体的分泌与地面培养的对照相比却减少了. 本文作者研制的滚动培养装置和双口滚动培养瓶克服了单口滚动培养瓶的缺点并兼有回转细胞培养装置的某些优点<sup>[14, 15]</sup>.

## 1 材料和方法

### 1.1 培养装置

新型滚动培养装置<sup>[15]</sup>包括: 保温培养箱体、控制电源、滚动床、培养瓶. 滚动培养瓶在可控转速的机械滚动床上以稳定的转速原位滚动, 多个滚动培养瓶可同时在滚动床上绕圆柱长轴滚动<sup>[16]</sup>. 滚动培养瓶为两端开口的圆柱形瓶<sup>[14]</sup>.

### 1.2 细胞系和培养液

杂交瘤细胞系 3E8 由小鼠 P3-X63Ag8.653 骨髓细胞和 Balb/C 免疫 hCG 的 B 淋巴细胞融合得到. 采用低糖 MEM 培养液, 含 1 万单位青链霉素, 用 7.4% NaHCO<sub>3</sub> 将 pH 调为 7.4, 依实验要求添加 1%, 5% 和 10% 的胎牛血清, 根据实验要

\* 国家 863-2 高技术航天领域项目 (863-2-7-2-16).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: Herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-12-19, 接受日期: 2001-04-05

求, 有些培养液中添加 1%~2% 明胶。

### 1.3 细胞培养

为了使细胞不致贴到培养瓶内壁, 用 5% 正硅烷氯仿水溶液对玻璃器皿进行硅化处理。  $1.5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  /ml 活细胞接种于滚动瓶中, 进行旋转培养 (转速 2~10 r/min)。每次实验至少取 3 个滚动瓶, 并取 3 个 T 形瓶静止培养进行对照。培养液分别含 1%, 5% 及 10% 胎牛血清和 1%~2% 明胶。

### 1.4 细胞生长曲线的测定

从滚动瓶和 T 形瓶中每 24 小时取样, 0.2% 台盼蓝染色, 用血球计数器确定活细胞数, 死细胞和总细胞数。

### 1.5 抗体浓度分析

单克隆抗体浓度用标准 ELISA 方法确定<sup>[17]</sup>。用 hCG 抗原 (20 mg/L) 包被酶标板, 每孔 100  $\mu$ l, 4  $^{\circ}$ C 过夜; 用 1% BSA 封闭 (每孔 200  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C, 2 h); 用 PBS (含 0.5% TritonX-100) 洗 3

次, 每次 200  $\mu$ l/孔, 甩干; 加入待测样品, 阳性、阴性及空白对照, 50  $\mu$ l/孔 (37  $^{\circ}$ C, 1 h); 用 PBS (含 0.5% TritonX-100, 1% BSA) 洗 3 次, 每孔 100  $\mu$ l; 加入二抗 (羊抗鼠 hCG, 每孔 50  $\mu$ l; 37  $^{\circ}$ C, 1 h); 用 PBS (含 0.5% TritonX-100) 洗 3 次, 双蒸水洗 2 次, 每孔 200  $\mu$ l; 加入 TMB 显色液 (100  $\mu$ l/孔; 37  $^{\circ}$ C 暗处显色 15~30 min); 加 12.5%  $H_2SO_4$  终止反应; 酶标仪 (Bio-Rad Model 3550 Microplate Reader JP41) 492 nm 读数, 根据标准曲线计算抗体产量。

## 2 结果

### 2.1 双口滚动瓶中杂交瘤细胞的生长

图 1 表示在双口滚动瓶中旋转培养的杂交瘤细胞生长曲线与 T 形瓶的比较, 可以看出, 三种血清浓度下在滚动瓶中旋转培养的细胞生长都明显高于 T 形瓶。

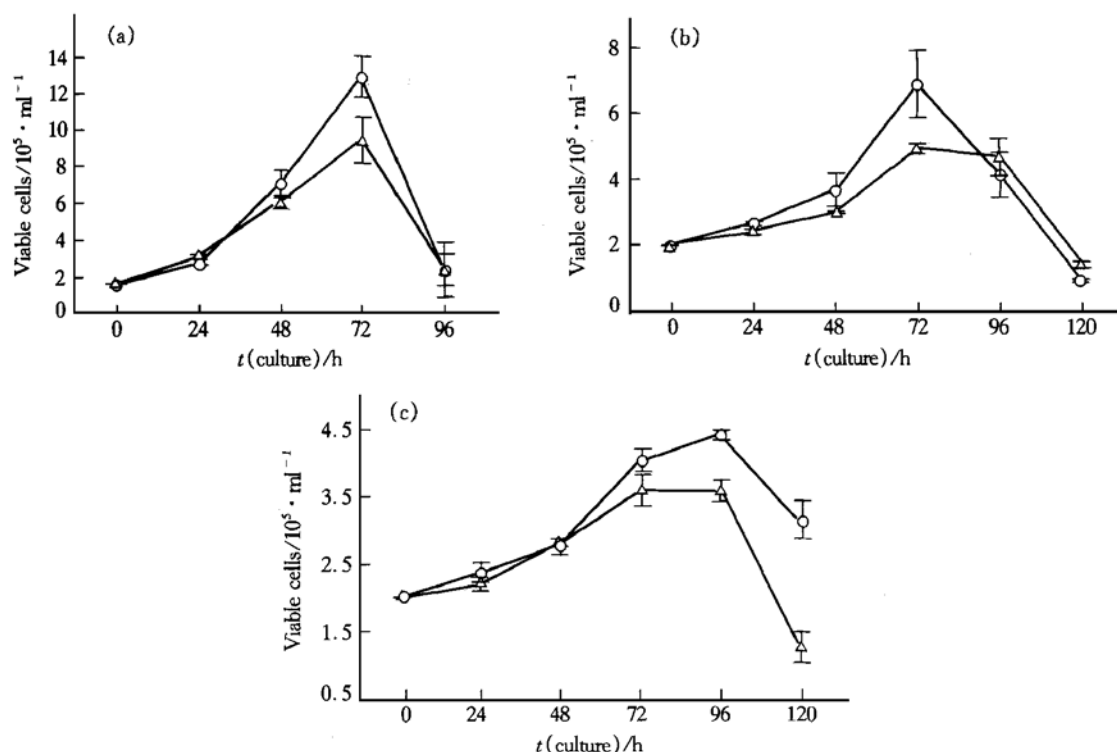


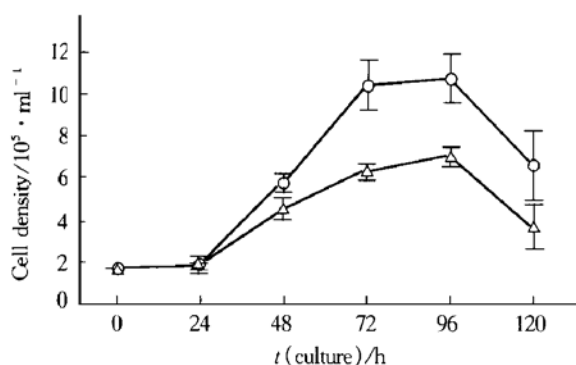
Fig. 1 Comparison of cell growth in double-mouthed rolling bottles and in T flasks

(a) The hybridoma cells were cultured in DMEM medium with 10% FCS; (b) The cells were cultured in DMEM medium with 5% FCS; (c) The cells were cultured in DMEM medium with 1% FCS. Each group contains three parallel cultures.  $\bar{x} \pm s$ .  $\circ - \circ$ : in double-mouthed rolling bottles;  $\triangle - \triangle$ : in T flasks.

### 2.2 明胶的作用

图 2 为培养液中含明胶与不含明胶情况下旋转培养细胞生长的比较, 加入 1% 明胶后, 生长在含

5% 血清培养液中的杂交瘤细胞可达  $10^6$  /ml; 在 1% 血清培养液中旋转培养的细胞密度显著升高, 抗体产量也随之升高 (表 1)。



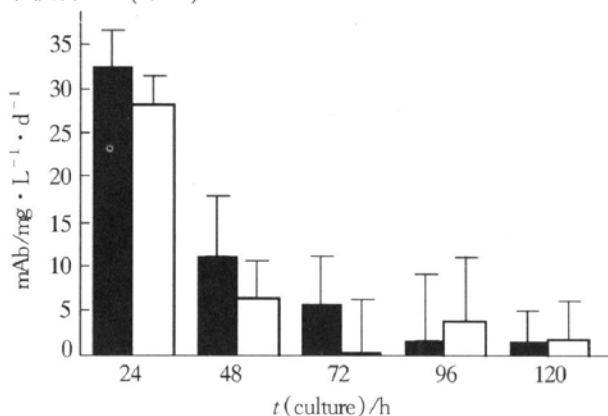
**Fig. 2 Growth of hybridoma cells cultured in the medium with and without 1% gelatin**

The hybridoma cells were cultured in the medium with 5% FCS. Each group contains three parallel cultures. ○—○: with 1% gelatin; △—△: without 1% gelatin.

### 2.3 杂交瘤细胞抗体产量的比较

图3显示了双口滚动瓶培养的细胞和T形瓶的细胞单克隆抗体日产量的比较。可以看出抗体日产量最高在24 h, 以后逐渐减少; 但到72 h, 旋转组和T形瓶组每天的抗体产量均有区别, 前3天产量占总产量的95%以上。因此, 我们只比较了培养72 h含明胶滚动瓶旋转组和不含明胶旋转组与不含明胶的T形瓶静止组单抗产量(表1)。可以看出, 三种血清浓度下单抗产量含明胶旋转组高于不含明胶旋转组, 均比T瓶组高, 其中5%血清

浓度为抗体分泌和细胞生长两者的最好条件。培养液中添加1%~2%明胶增加了细胞的生长, 从而增加了抗体分泌, 同时, 适中的血清浓度也可促进单抗分泌(表1)。



**Fig. 3 Comparison of mAb production rate of everyday in double-mouthed roller and in T flasks**

The hybridoma cells were cultured in DMEM medium with 5% FCS. Each group contains three parallel cultures.  $\bar{x} \pm s$ . ■—■: in double-mouthed roller; □—□: in T flasks.

将在双口滚动瓶中旋转培养和在T形瓶培养72 h的总细胞数和抗体累积产量进行比较(表1)发现双口滚动瓶中培养的细胞生长比T形瓶增加11%至85%; 单克隆抗体分泌增加18%至53%, 此外有国产化、价格低、易普及的优势。

**Table 1 Growth and mAb production of the resultant cells cultured for 72 h**

| Group              | Total cells/ $10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ | Increase rate/ % | $\rho$ (mAb) / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | Increase rate/ % |
|--------------------|------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------|------------------|
| T-flask (10% FCS)  | $10.1 \pm 1.0$                           | 100              | $37.2 \pm 3.7$                                 | 100              |
| Roller             | $13.5 \pm 0.9^{1)}$                      | 134              | $43.8 \pm 5.0^{1)}$                            | 118              |
| Roller (+ gelatin) | $11.2 \pm 0.1^{2)}$                      | 111              | $49.5 \pm 5.6^{1)}$                            | 128              |
| T-flask (5% FCS)   | $5.9 \pm 0.6$                            | 100              | $34.8 \pm 4.1$                                 | 100              |
| Roller             | $7.2 \pm 0.7^{1)}$                       | 122              | $49.5 \pm 5.6^{2)}$                            | 142              |
| Roller (+ gelatin) | $11.5 \pm 1.1^{2)}$                      | 185              | $53.2 \pm 7.0^{2)}$                            | 153              |
| T-flask (1% FCS)   | $5.0 \pm 0.2$                            | 100              | $34.7 \pm 9.3$                                 | 100              |
| Roller             | $5.9 \pm 0.2^{1)}$                       | 118              | $45.1 \pm 5.8$                                 | 130              |
| Roller (+ gelatin) | $5.5 \pm 1.0$                            | 117              | $45.9 \pm 3.8$                                 | 132              |

Compared with T-flask group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.1$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

### 3 讨 论

细胞在双口瓶的旋转培养与T形瓶静止培养相比其生长和抗体分泌都明显增高。影响细胞生长有以下几个重要因素, 如培养液面上空间和培养液与空气接触的表面积等。我们用的双口瓶有50 ml和100 ml两种, T形瓶为50 ml ( $d = 25 \text{ cm}^2$ )。虽100 ml双口瓶的上空间比对照T形瓶大, 但50 ml双口瓶的上空间与T形瓶基本相同; 另一个主要

因素是培养液与空气接触的表面积, 50 ml (含4 ml培养液) 和100 ml (含8 ml培养液) 双口瓶培养液与空气接触的表面积分别为  $11 \text{ cm}^2$  和  $17 \text{ cm}^2$ 。两端开口的滚动瓶通过旋转使细胞保持悬浮状态, 细胞代谢产生的废物通过旋转被不断清除, 新的营养成分不断移动到细胞周围, 虽然液面与空气的接触面积小于T形瓶, 但由于旋转加速了氧气吸收,  $\text{CO}_2$  排除效率。另外旋转培养的细胞密度和抗体产量不仅高于T形瓶, 而且也高于滚

动瓶的静止对照,说明旋转起重要作用,该作用不仅是机械搅拌,也利用了模拟微重力.因此双口滚动培养装置除了具有通气好,均匀搅拌等作用外,还具 RCCS 的优点.由于剪切力的对细胞生长具有不利的影响,如何根据培养液的体积、性质;细胞大小、质量密度及培养液与细胞间的作用等各种参数,选择合适旋转速度达到最佳的培养是极其重要的,也是可能的.该系统也可用于其他分泌细胞(包括悬浮和贴壁细胞)的高密培养<sup>[18]</sup>.该系统还可用于组织工程<sup>[19]</sup>,具有良好的应用前景.

**致谢** 衷心感谢江丕栋、付世密教授等提供的各种回转培养装置.

### 参 考 文 献

- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, **256** (5517): 495~ 497
- Falkenberg F W. Monoclonal antibody production: problems and solutions. *Res Immunol*, 1998, **149** (6): 542~ 547
- Voigt A, Zintl F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *J Biotechnology*, 1999, **68** (2~ 3): 213~ 226
- Falkenberg F W, Weichert H, Krane M, *et al.* *In vitro* production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular mini fermenter. *J Immunol Methods*, 1995, **179** (1): 13~ 29
- Lipan N S, Jackson L R. Hollow fibre bioreactors: an alternative to murine ascites for small scales (< 1 gram) monoclonal antibody production. *Res Immunol*, 1998, **149** (6): 571~ 576
- Freed L E, Langer R, Martin I, *et al.* Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (25): 13885~ 13890
- Falsafi S, Koch R J. Growth of tissue-engineered human nasoseptal cartilage in simulated microgravity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, **126** (6): 759~ 765
- Martin A, Zhou A, Gordon R E, *et al.* Thyroid organoid formation in simulated microgravity: influence of keratinocyte growth factor. *Thyroid*, 2000, **10** (6): 481~ 487
- Khaoustov V I, Darlington G J, Soriano H E, *et al.* Induction of three dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, **35** (9): 501~ 509
- Ingram M, Tschy G B, Saroufeem R, *et al.* Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, **33** (6): 459~ 466
- Lelkes P I, Galvan D L, Hayman G T, *et al.* Simulated microgravity conditions enhance differentiation of cultured PC12 cells towards the neuroendocrine phenotype. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, **34** (4): 316~ 325
- Smiley S A, Gillock E T, Black M C, *et al.* The effect of space flight on monoclonal antibody synthesis in a hybridoma mouse cell line. *Exp Cell Res*, 1997, **230** (2): 411~ 414
- Bechler B, Hunzinger E, Muller O, *et al.* Culture of hybridoma and Friend leukemia virus transformed cells in microgravity. Space lab IML-1 mission. *J Biol Cell*, 1993, **79** (1): 45~ 50
- 赫荣乔, 张锦珠, 王彦, 等. 细胞培养和组织培养双口滚动培养瓶. 中国实用新型专利, ZL00245773, 3. 2000-08-09
- 赫荣乔, 张锦珠, 王彦, 等. 一种用于细胞工程和组织工程滚动培养装置. 中国实用新型专利, ZL00252933, 5. 2000-09-06
- 付世密, 扈建琦, 江丕栋. 外缘滚动床. 中国实用新型专利, ZL00250142, 2. 2000-09-13
- Caponi L, Migorini P. Antibody Usage in the Lab (Springer lab manual). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. 19~ 23
- 张文利, 燕秋, 朱正美, 等. 免疫球蛋白糖链结构异常和自身免疫性疾病. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 348~ 352
- Zhang W L, Yan Q, Zhu Z M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (3): 348~ 352
- 王梁华, 冯煜, 钟山, 等. Toll样受体抗体抑制脂多糖激活巨噬细胞的吞噬活性. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 367~ 371
- Wang L H, Feng Y, Zhong S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (3): 367~ 371

## Growth and Antibody Production of Resultant Hybridoma Cells in a Double-mouthed Roller\*

WANG Yan, JIAO Hong-Li, ZHANG Jir-Zhu, HE Rong-Qiao\*\*

(Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** A new rolling culture system with double-mouthed roller was manufactured. Hybridoma, which produces anti-hCG monoclonal antibody (mAb), was employed in the double-mouthed roller, in which growth and antibody yield of the cells were compared with those cultivated in T flask. The results showed that with an increase in growth of the cells cultured in the roller by 1.4~ 1.8 folds, the yield of the antibody increased by 1.3 folds of those statically cultured in T flask. Addition of gelatin in culture media could further improve both yield of the antibody and growth of the hybridoma cells.

**Key words** hybridoma, monoclonal antibody secrete, cell culture, double-mouthed roller

\* This work was supported by space project (863-2-7-2-16).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-64889876, E-mail: Herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: December 19, 2000 Accepted: April 5, 2001