

无血清细胞培养基及其主要补充因子

顾涵英 冯佑民

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

无血清细胞培养作为一门现代生物技术,近十年来发展很快。它不仅为细胞的生长、增殖和分化的调节和机制的研究提供了有力的工具,而且为现代生物技术科学如蛋白质工程、细胞工程和单克隆抗体等的应用奠定了基础。本文概括叙述了无血清细胞培养的历史、培养基的组成和主要补充因子,并举了若干近期报道的无血清细胞培养的例子。

关键词 细胞培养,无血清培养基,生长因子,贴壁因子

用无血清培养基进行细胞培养的设想可以追溯到1911年,当时 Lewis 曾提出将来会用人工配制的介质代替原生质^[1]。这种设想导致了营养的研究,实际上很多培养基是复杂营养物质的混合物。培养基的出现和使用使细胞培养的技术广为发展和应用。但绝大多数细胞,在培养时除培养基外还需要有血清存在。血清是一个组分很不明确的混合物,对深入研究某一物质对细胞生长、分化的作用及作用机制等带来很多困难。血清中的哪些成分是细胞生长所必需的呢?几十年没有答案。

1975年 Sato 等人在实验的基础上指出,在细胞培养中,血清的主要作用是提供各种激素,(现在看来还应包括多种生长因子和贴壁因子等),认为有可能用激素来代替血清。这个假设首先在垂体细胞株 GH₁ 的培养中得到证实^[2]。Sato 等在培养基中用生理浓度的三碘甲状腺素(T₃),促甲状腺激素释放激素(TRH),甲状旁腺激素(PTH),生长调节素(Somatomedin)和转铁蛋白(Tf)代替血清,使GH₁在无血清介质中生长获得了成功^[3]。此后,无血清细胞培养技术迅速发展,十多年来已报道有几十种细胞株系在无血清细胞培养基中

生长和增殖获得成功,这些细胞的种类包括内分泌细胞、表皮细胞、成纤维细胞、神经系统的细胞和淋巴系统的细胞等。

无血清细胞培养基一般是由基础培养基和替代血清的补充因子组成的。

一、基础培养基

基础培养基是各种营养物质的混合物,是维持组织或细胞生长、发育、遗传、繁殖等一系列生命活动必不可少的物质。最原始的天然培养基有牛肉浸汁、大豆蛋白胨和鸡胚浸液等。五十年代发展起来的合成培养基则是按细胞生长需要将一定比例的氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖等组合成的基础培养基。1955年 Eagle 证明在有血清存在时 L 细胞和 HeLa 细胞需要 13 种氨基酸和 7 种维生素,这些发现形成了现在著名的 Eagle's 基础培养基(MEM)^[4]以后 Ham 等人确定了某些细胞对脂肪酸(亚油酸)、多胺(丁二胺)和微量元素(硒)的需求又发展了更为完善的基础培养基 F₁₂ 等。现有的合成培养基商品就有上百种。

基础培养基的成分是完全已知的,而且可以按照细胞的不同营养要求增加或减少某些组

表1 Eagle's 基础培养基的成分 (mg/L)

氨基酸		维生素		无机盐和其他	
L-精氨酸盐酸盐	21	生物素	1	无水 CaCl ₂	200
L-胱氨酸	12	氯化胆碱	1	KCl	400
L-谷氨酰胺	292	叶酸	1	MgSO ₄ · 7H ₂ O	200
L-组氨酸盐酸盐	10	肌醇	1.8	NaCl	6800
L-异白氨酸	26	菸酰胺	1	NaHCO ₃	2200
L-白氨酸	26	泛酸钙	1	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140
L-赖氨酸盐酸盐	36.5	维生素 B ₆	1	葡萄糖	1000
L-甲硫氨酸	7.5	维生素 B ₂	0.1	酚红	10
L-苯丙氨酸	16.5	维生素 B ₁	1		
L-苏氨酸	24				
L-色氨酸	4				
L-酪氨酸	18				
L-缬氨酸	23.5				

表2 在无血清培养基中能刺激细胞株的因子^[3]

激 素	浓 度	敏感的细胞株
胰岛素	0.1—10 μg/ml	所有的细胞株
胰高血糖素	0.05—5 μg/ml	HC84S, HLE222, (MDCK)
促卵泡激素	0.05—0.5 μg/ml	M2R, TM4
生长激素	0.05—0.5 μg/ml	TM4
生长调节素 c (或 MSA)	1—100 ng/ml	GH ₃ , TM4, (SV-3T3)
表皮生长因子	1—100 ng/ml	HeLa, MCF-7, TM4, HC84S, BHK 等
成纤维生长因子	1—10 ng/ml	GH ₃ , HeLa, C6, ZR-75-1, BHK 等
神经生长因子	1—10 ng/ml	M2R
甲状旁腺激素	1—10 ng/ml	GH ₃
促甲状腺激素释放激素	1—10 ng/ml	GH ₃
促黄体生长激素释放激素	1—10 ng/ml	M2R
前列腺素 F _{2a}	1—100 ng/ml	MCF-7
前列腺素 E ₁	1—100 ng/ml	MDCK
三碘甲状腺原氨酸	1—100 Pmol/L	GH ₃ , MDCK, ZR-75-1, HC84S, HLE222
氢化可的松	10—100 nmol/L	HeLa, MDCK, ZR-75-1, RF-1, HC84S
孕(甾)酮	1—100 nmol/L	B104, (M2R)
辜(甾)酮	1—10 nmol/L	M2R
雌(甾)二醇	1—10 nmol/L	ZR-75-1, (MCF-7)
结合蛋白		
转铁蛋白	0.5—100 μg/ml	除 L6 外的所有细胞株
无脂肪酸的白蛋白	0.5—2 mg/ml	SV-3T3, C6
贴壁因子		
冷不溶的球蛋白	0.5—5 μg/ml	B ₁₀₄ , MCF-7, RF-1, F9, HLE222 等
血清扩散因子	0.5—5 μg/ml	MCF-7, C6, (SV-3T3)(RF-1) 等
胎球蛋白	1 mg/ml	L6

分, 但是用这些培养基培养细胞时必须加一定量的牛血清, 细胞才能生长繁殖, 这是由于血清中含有一些细胞生长所必需的生长因子、激素、脂质、结合蛋白和多种微量元素等。血清是一个非常复杂的蛋白质和生物大分子及小分子

的混合物, 这些杂蛋白将给培养产物的分离、检测带来很多麻烦, 如果知道血清中哪些因子是在细胞生长繁殖中起主要作用的, 将这些因子补充到基础培养基中就可以替代血清。

二、补充因子

补充因子就是用来替代血清的各种因子的总称。补充因子的种类很多,包括大分子、小分子和微量元素等,下面主要讨论大分子补充因子,这些补充因子又可分为必需补充因子和特殊补充因子。

1. 必需补充因子

几乎所有的细胞株在无血清培养基中生长时都需要胰岛素和转铁蛋白存在,因此我们称胰岛素和转铁蛋白为必需补充因子。胰岛素和转铁蛋白的经典功能都不是促进生长,而它们又都具有促生长的功能,近年来人们认为胰岛素和转铁蛋白也是生长因子。

2. 特殊补充因子

表3 已经鉴定的多肽生长因子

生长因子	链长 (氨基酸数)
*表皮生长因子 (EGF)	53aa
*神经生长因子 (NGF)	2 × 118aa
*血小板衍生的生长因子 (PDGF)	B 链 70aa
成纤维细胞生长因子 (FGF)	
Multiplication-stimulating activity(MSA)	
*类胰岛素生长因子 I(IGF-I)	70aa
*类胰岛素生长因子 II(IGF-II)	67aa
促红细胞生长素	
巨噬细胞生长因子 (MGF)	
*调节生长血清三肽 (GHL)	3aa
卵巢生长因子 (OGF)	
*白细胞介素-2 (IL-2)	133aa
*转化生长因子 α (TGF- α)	50aa
*转化生长因子 β (TGF- β)	2 × 112aa
转化生长因子 γ (TGF- γ)	
*多-菌落刺激因子 (IL-3)	134aa
白细胞介素-4 (IL-4)	
白细胞介素-5 (IL-5) (T 细胞释放因子)	
成纤维细胞衍生长因子 (FDGF)	
骨肉瘤衍生长因子 (ODGF)	
神经胶质瘤衍生长因子 (GDGF)	
胸腺素	
纤毛的神经营养因子 (CNTF)	
脑衍生的神经营养因子 (BDNF)	
*菌落刺激因子-1 (CSF-1)	
*菌落刺激因子-2 (CSF-2)	
(粒性白细胞巨噬细胞 CSF)	127aa

* 已知一级结构

(1) 生长因子

生长因子是维持细胞生存和增殖所必需的物质。依照化学性质可分为肽类生长因子和甾体生长因子等,下面只讨论肽类生长因子。肽类生长因子是由分子量几百到几万的多肽和蛋白质组成,多数分子量在 10000 左右,习惯上称多肽生长因子。目前已经鉴定的大约有 20 余种,其中半数以上是近几年完成鉴定的。在近几年,几乎每年都有新的生长因子被发现。

实际上,还有很多生长因子尚待发现。因为脊椎动物至少有 30 种细胞类型,如神经、肝、肾和支气管细胞等,每一类型细胞估计有 2—3 种生长因子对其正常生存和增殖起着调节作用,因此,估计在机体中有约 100 种生长因子存在^[6]。

从结构和功能考虑,可把已鉴定的生长因子归纳为若干“家族”,如表皮生长因子 (EGF) 家族包括转化生长因子 α (TGF α) 等。有的生

表4 “老兵新传”生长因子

胰岛素	胎盘催乳激素
转铁蛋白 (Tf)	血纤维蛋白溶酶原激活剂
促胃酸激素释放肽 (GRP)	后叶加压素
生长激素 (GH)	耻骨松弛激素
凝血酶	催乳激素

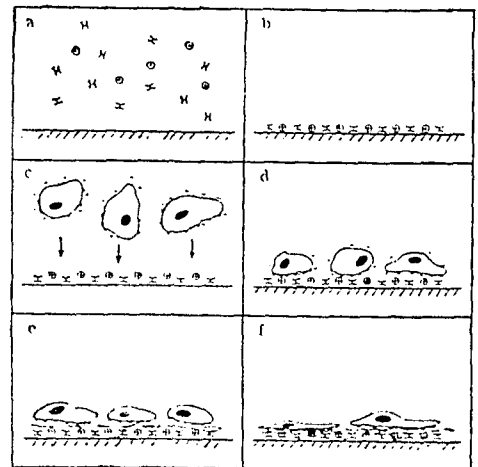


图1 细胞在固体表面贴壁机制的图解

首先 (a) 中的填充物和贴壁因子吸附到固体表面 (b), 然后细胞静电吸引 (c、d), 细胞表面的受体与限定的已贴壁的物质发生生物化学的相互作用 (e), 最后细胞以介质为媒介而延伸 (f)

表 5 常见的贴壁因子

促进贴壁的因子	来源	分子量	专一性	参考文献
纤粘连蛋白	细胞表面 结缔基质 血清	200000—250000	成纤维细胞	9
Laminin (GP ₂)	基底膜	1000000	上皮细胞 内皮细胞 肝细胞	10
软骨粘连蛋白	软骨 血清	180000	软骨细胞	11
Entactin (GP ₃)	基底膜	158000	内皮细胞	12
Epibolin	血清和血浆	65000	表皮细胞(上皮细胞)	13
肝细胞贴壁分子 (L-CAM)	鸡肝	81000	肝细胞	14
血清扩散因子	哺乳动物血清和血浆	60000—90000	成纤维细胞	15
胶原 IV	基底膜	170000—190000 (二条链)	上皮细胞 表皮细胞 内皮细胞	16
氨基多糖 硫酸乙酰肝素 硫酸皮肤素 硫酸软骨素	基底膜 皮肤软骨	200000—8000000	上皮细胞 成纤维细胞 软骨细胞	17

长因子还有自己的家族,如 TGF β 家族就有 9 个成员^[7]。

在生长因子中,另一个有趣的现象是发现不少激素和生物物质如胰岛素、转铁蛋白和促胃酸分泌释放多肽等,除经典功能外,也具有生长因子的功能,可称这些生长因子为“老兵新传”生长因子。如前所述,胰岛素和转铁蛋白是无血清细胞培养的两个必需补充因子。

(2) 贴壁因子 (adhesion factors)

绝大多数真核细胞在体外生长时需要固着于适当的基底^[8]。细胞固着作用是一个复杂的过程(图 1),包括贴壁因子吸附于器皿表面,细胞与贴壁因子的结合等。

目前在无血清细胞培养中常使用的贴壁因子有细胞间质和血清中的组分,如纤粘连蛋白(Fibronectin)、Laminin、胶原(Collage)和多聚赖氨酸(poly-D-lysine)等。

(3) 激素

很多细胞在无血清培养时需要加入激素,如胰岛素、生长激素、胰高血糖素等,但关于激素在促进细胞生长中的作用机制仍不清楚。前面已谈到胰岛素几乎是所有细胞在无血清培养中必需的,此外,甾体激素如孕酮、氢化可的松、雌二醇等也是无血清细胞培养常用的补充因子。

无血清细胞培养技术是细胞培养研究中的一个里程碑。由于无血清培养基全部是由已知成分组成的,这不仅为研究和阐明细胞生长、增殖和分化的机制——这一生命科学中的根本问题提供了有力的工具,而且为现代生物技术科学如基因工程、蛋白质工程、细胞工程和单克隆抗体等的应用奠定了基础。因此,近几年来关于无血清培养基的应用和发展很快,下面列举了一些无血清细胞培养的实例。

表 6 几个无血清细胞培养的实例

细胞类型	基础培养基	胰岛素 ($\mu\text{g/ml}$)	转铁蛋白 ($\mu\text{g/ml}$)	亚硒酸钠 (mol/L)	另加的补充剂	参考文献
骨髓瘤细胞 (小鼠 SP2/0, NS-1, \times 63Ag 8.653)	RPMI 1640/DME (1:1)	5	5	1.0×10^{-9}	巯基乙醇 ($1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$) 乙醇胺 ($1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$) LDL (人) ($2.0-6.0 \mu\text{g/ml}$)	18
杂交瘤细胞 (小鼠-人, P3U1)	RPMI 1640/DME/F ₁₂ (2:1:1)	10	10	2.0×10^{-8}	乙醇胺 ($1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$) VLDL (卵黄) ($2.5 \mu\text{g/ml}$) BSA (5mg/ml)	19
小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0)	RPMI 1640/F ₁₁ (1:1)	5	25	1.0×10^{-9}	巯基乙醇 ($5.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$) 孕酮 ($1.0 \times 10^{-6} \text{mg/ml}$) 乙醇胺 ($2.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$)	20
克隆瘤细胞 (人, HT29) 黑素瘤细胞 (人, TW1)	DME/F ₁₂ (1:1)	5	5	5 (ng/ml)	表皮生长因子 (20ng/ml) 三碘甲状腺原氨酸 ($2.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$)	21
肺癌细胞 (人, NCI-H23, A549, NCI-H126)	RPMI DME/F ₁₂ (1:1)	10	10	2.5×10^{-8}	氢化可的松 ($5.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$) 表皮生长因子 (1ng/ml) 牛血清白蛋白 (1mg/ml)	22
肾细胞 (大鼠, MDCK)	DME/F ₁₂ (1:1)	5	5	5.0×10^{-8}	氢化可的松 ($5.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$) 三碘甲状腺原氨酸 ($5.0 \times 10^{-11} \text{mol/L}$) 前列腺素 E ₁ (25ng/ml)	23
Hepatoma (人, HEP G2, HEP3B2)	M/M	10	10	3.0×10^{-8}	胰高血糖素 ($1.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$) 亚油酸 ($1 \mu\text{g/ml}$) 生长激素 ($50 \mu\text{g/ml}$) 三碘甲状腺原氨酸 ($1.0 \times 10^{-8} \text{mol/L}$) 地塞米松 ($1.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$)	24

参 考 文 献

1 Lewis M R *et al.* *Anat Rec*, 1911; 5: 277
 2 Sato G. *Biochemical Action of Hormones*, 1975; 3: 391
 3 Sato G. *Nature*, 1976; 259: 132
 4 Eagle H. *Science*, 1959; 130: 432
 5 Barnes D *et al.* *Cell*, 1980; 22: 649
 6 Weinstein I B. *J Cell Biochem*, 1987; 33: 213
 7 Massague J. *Cell*, 1987; 49: 437
 8 Grinell F. *Int Rev Cytol*, 1978; 53: 65
 9 Hynes R O *et al.* *J Cell Biol*, 1982; 95: 369
 10 Carlsson R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 2403
 11 Hewitt A T *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257: 2330
 12 Carlin B *et al.* *J Biol Chem*, 1981; 256: 5209
 13 Stenn K S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78:

6907
 14 Gallin W J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 1038
 15 Barnes D *et al.* *J Supramol Struct*, 1980; 14: 47
 16 Kleinman H K *et al.* *J Cell Biol*, 1981; 88: 473
 17 Roden L. In: Lennard W J ed. *The biochem glycoproteins & Proteoglycans*, New York: Plenum Press, 1980: 267
 18 Sato J D *et al.* *J Exp Med*, 1987; 165: 1761
 19 Takazawa Y *et al.* *Biotech Bioeng*, 1988; 31: 168
 20 冯佑民等. *生物化学与生物物理学报*, 1987; 19: 322
 21 Fantini J *et al.* *In Vitro*, 1987; 23: 641
 22 Brower M *et al.* *Canc Res*, 1986; 46: 798
 23 Taub M. In: Barnes D W *et al.* eds. *Methods for molecular and cell biology*, New York: Alan R Liss Inc, 1984; Vol. 3: 3-24
 24 Darlington G J *et al.* *In Vitro*, 1987; 23: 349

[本文于 1989 年 5 月 22 日收到]