

用胸腺嘧啶核苷双阻断法实现 Vero 细胞的同步化生长

高红亮¹, 丛威¹, 鄧文波¹, 欧阳藩¹, 邵曼君²

(1. 中国科学院化工冶金研究所生物工程国家重点实验室;

2. 中国科学院化工冶金研究所多相反应开放实验室, 北京 100080)

摘要: 研究了胸腺嘧啶核苷(TdR)双阻断法同步化 Vero 细胞的最适条件, 包括 TdR 处理浓度、TdR 处理时间和两次阻断间的恢复生长时间. 结果表明, 在指数生长前期的细胞, 用 2 mmol/L 的 TdR 阻断细胞生长 11 h, 恢复生长 14 h, 再用 2 mmol/L 的 TdR 阻断 11 h, 所得 Vero 细胞的同步化程度最高. 用该方法分别处理在方瓶中贴壁生长的 Vero 细胞和旋转培养瓶中用 Cytodex-3 培养的 Vero 细胞, 其同步化指数分别为 65.0% 和 60.0%.

关键词: Vero 细胞; 同步化; 胸腺嘧啶核苷双阻断法

中图分类号: Q28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2001)01-0066-05

1 前言

动物细胞的大规模培养已广泛应用于生物医药制品的生产^[1,2]. 代谢工程和代谢分析近年来发展很快, 然而目前所进行的代谢分析基本上是基于细胞群体培养的数据, 由于细胞生长和代谢不同步, 部分掩盖了细胞的一些代谢行为. 用单个细胞进行研究不仅在技术上存在困难, 而且由于数量太少难以进行定量分析. 可行的方法是使细胞群体同步生长, 用同步生长的群体细胞的动力学来反映细胞真实的代谢行为. Vero 细胞是动物细胞大规模培养中广泛使用的细胞系之一, 是由世界卫生组织推荐的生产人体用免疫生物制品的连续细胞系, 并已用于生产脊髓灰质炎和狂犬病疫苗^[3,4].

动物细胞同步化主要有物理、化学方法等^[5,6]. 用化学方法阻断细胞使之同步化有许多优点, 因为化学试剂对许多类型的细胞有效, 不需要特殊的仪器, 而且可以获得较高的同步化率和收获率, 其缺点是干扰了细胞的正常调节过程. 研究表明使用过量的胸腺嘧啶核苷(Thymine Deoxyribonucleoside, TdR)只是暂时性地减慢 DNA 的合成^[7], 如果恰当选择 TdR 的浓度, 当去除 TdR 后, 细胞能够正常地生长、增殖和传代, 说明 TdR 对细胞的生理代谢的干扰是可逆的^[6]. 本文研究了过量的胸腺嘧啶核苷(TdR)双阻断法同步化 Vero 细胞的最优条件, 并用该法使在方瓶中贴壁生长的 Vero 细胞和用微载体在旋转培养瓶中培养的 Vero 细胞获得了同步培养.

2 材料与方法

2.1 材料

细胞: Vero 细胞, 由卫生部北京生物制品研究所提供.

培养基: 199 培养基(GIBCO 产品), 配制时加 2 g/L 葡萄糖和 2 g/L NaHCO₃, 用时再加 10% 小牛血清(天津市川页生化制品有限公司产品).

收稿日期: 1999-11-26, 修回日期: 2000-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 29606011); 中国科学院多相反应研究开放实验室基金资助项目

作者简介: 高红亮(1973-), 男, 河南林州人, 博士, 生物化工专业; 丛威, 通讯联系人.

2.2 方法

细胞方瓶培养：细胞在 25 ml 方瓶中于 37°C 恒温培养，接种密度为 0.7×10^5 个/ml。

细胞旋转培养瓶培养：细胞在 100 ml(工作体积)旋转培养瓶中于 37°C 恒温培养，接种密度为 1×10^5 个/ml，转速为 60 r/min。

细胞计数：细胞加入 0.2%胰酶，经 5~10 min 消化后，用血球计数板计数^[1]。

Giemsa 染色：倒掉方瓶中的培养液，加入适量固定液，固定 30 min，蒸馏水冲洗后，加入 Giemsa 染液，染色 30~40 min^[2]。

分裂指数(Mitotic Index, MI)测定：将染色后的样品置于显微镜下，选择细胞密度适中的区域，用 400 倍镜头观察分裂细胞，记录每 1 000 个细胞中处于分裂相的细胞的平均数，并计算出所占百分比，即为 MI。

同步化指数(Synchronous Index, SI)的计算：采用 Scherbaum 方法^[8]，由生长曲线系求出 SI， $SI=(n/n_0-1)(1-t_d/t_g)$ ，其中 n_0 为初始细胞密度， n 为增殖一代后的细胞密度， t_d 为细胞分裂开始至分裂结束的时间间隔(实验测得)， t_g 为实验测得的代时。

流式细胞仪(FACS)分析：细胞经 0.2%胰酶消化后，用 PBS 洗两遍，经 80%冷乙醇固定，再用 PBS 洗两遍，留 400 μ l，加 RNA 酶于 37°C 时消化 30 min，置冰浴，加 0.2 mmol/L EDTA-PBS 液 0.4 ml，加 200 μ g/ml 的碘化丙锭(PI)10 μ l，避光 5 min 后，在 Becton Dickinson 公司的流式细胞仪上分析 DNA 含量。

3 结果与分析

3.1 Vero 细胞的生长曲线

25 ml 的方瓶中 Vero 细胞的生长曲线如图 1 所示，细胞接种密度为 0.7×10^5 个/ml，对数期 Vero 细胞的倍增时间为 18.5 h。一般认为 TdR 双阻断同步化法换入 TdR 溶液的最适时间是细胞群体的指数生长初期^[2, 9]，本实验换入 TdR 溶液的时间为第 48 h。

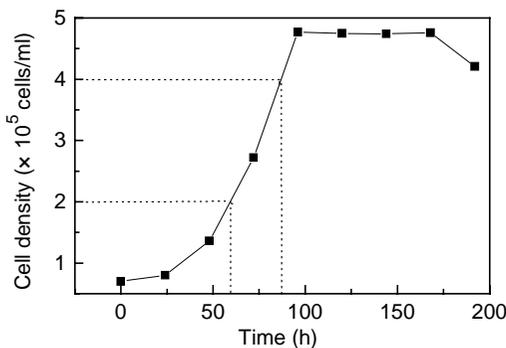


图 1 25 ml 方瓶中 Vero 细胞生长曲线

Fig.1 Growth of Vero cells in a 25 ml culture bottle

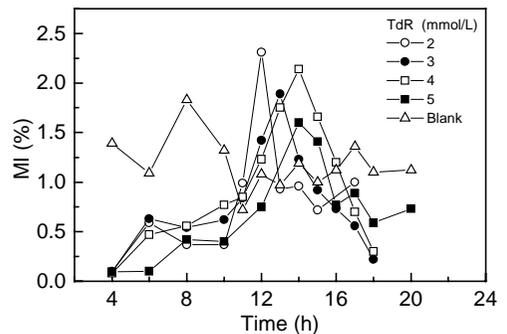


图 2 不同 TdR 浓度处理 Vero 细胞的 MI 值

Fig.2 Mitotic index of Vero cells treated with different concentrations of TdR

3.2 最适 TdR 浓度

文献中用 TdR 双阻断法同步化动物细胞时一般多采用 2 和 5 mmol/L 的 TdR。本实验以无血清 199 培养基作为对照，对比了不同浓度 TdR 对有丝分裂指数的影响，结果如图 2。经 2

mmol/L TdR 处理的 Vero 细胞在 10 h 以前 MI 很低, 在 12 h 出现 MI 的最高峰值, 其后 MI 又迅速降低. 经 3, 4 和 5 mmol/L TdR 处理的 Vero 细胞也有相同趋势, 但在 13 或 14 h 后才出现 MI 的最高峰值, 且比 2 mmol/L TdR 时低, 故本实验以 2 mmol/L TdR 作为最适处理浓度.

3.3 最适 TdR 处理时间

TdR 处理细胞的时间对同步化影响很大. 图 3 是经 2 mmol/L TdR 处理不同时间后 Vero 细胞恢复生长的 MI 值. 处理 10 h 的 Vero 细胞在恢复生长 10 h 后 MI 达到 3.75%, 处理 12 h 在恢复生长 12 h 后 MI 达到 3.20%, 远高于其它组. 本文确定 TdR 处理时间为 11 h.

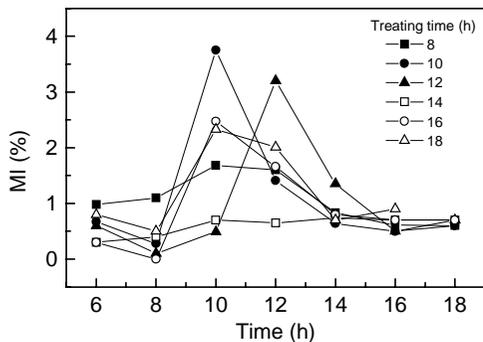


图 3 Vero 细胞不同处理时间的 MI 值

Fig.3 Mitotic index of Vero cells treated for different time

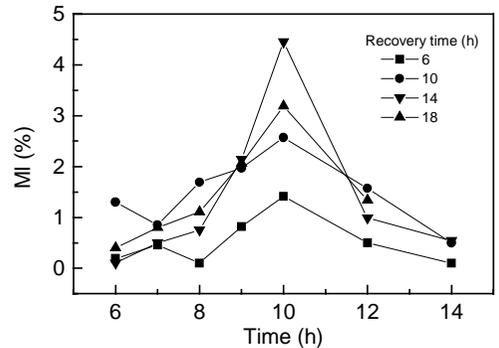


图 4 不同恢复时间 Vero 细胞的 MI 值

Fig.4 Mitotic index of Vero cells with different recovery time

3.4 最适恢复时间

在 TdR 双阻断法同步化 Vero 细胞时, 第一次加入 TdR 阻断后, 换入正常培养基的恢复生长时间很重要. 本文在第一次 TdR 阻断后, 分别恢复生长 6, 10, 14, 18 h, 再第二次阻断 11 h, 然后换入正常培养基, 从换入正常培养基的第 6 h 起, 间隔取样测定 MI, 结果如图 4 所示. 恢复生长 14 h 的细胞 MI 值曲线峰值明显, 在 10 h 达 4.45%, 而其它组 MI 曲线平缓. 这说明恢复生长 14 h 的细胞分裂时间集中, 同步化效果好.

3.5 TdR 双阻断法同步化方瓶培养细胞

根据以上实验得出的 Vero 细胞 TdR 双阻断法最优条件同步化 Vero 细胞. 用 2 mmol/L TdR 阻断 11 h, 恢复生长 14 h, 再阻断 11 h, 恢复生长 6 h 后分别测定其 MI 和细胞数的变化, 结果如图 5 所示. MI 曲线峰值十分明显, 最高值达到 5.5%, 整个分裂高峰集中在 8~11 h 之间. 这说明细胞基本上同步生长, 此时细胞主要处于 M 期. 而在细胞刚恢复生长时主要处于 S 期, 此时细胞同步化程度最高. 细胞生长曲线明显呈阶梯状, 在 9~12 h 的时间内细胞密度由 1.52×10^5 个/ml 增加到 2.70×10^5 个/ml, 增加了 77.6%. 用公式计算同步化指数 SI, 其中 $n=2.70$ 个/ml, $n_0=1.52$ 个/ml, $t_d=3$ h, $t_g=18.5$ h, 可得 $SI=65.0\%$.

3.6 TdR 双阻断法同步化旋转培养瓶微载体培养的细胞

应用同样的方法同步化旋转培养瓶培养的生长于 Cytodex-3 上的 Vero 细胞, 从第二次恢复生长时开始计数, 生长曲线如图 6. 细胞生长呈明显的阶梯状, 开始恢复生长时细胞密度为 3.5×10^5 个/ml, 第一次分裂高峰结束后细胞最高密度为 6.14×10^5 个/ml, 计算得 $SI=60.0\%$. 到第二次分裂高峰结束后同步化程度已降低, SI 为 25.1%, 60 h 后细胞已非同步生长.

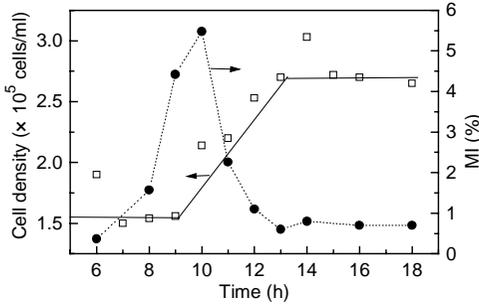


图 5 RdR 双阻断方瓶中 Vero 细胞密度和 MI 值
Fig.5 Cell density and Mitotic index of Vero cells treated with double TdR block in bottles

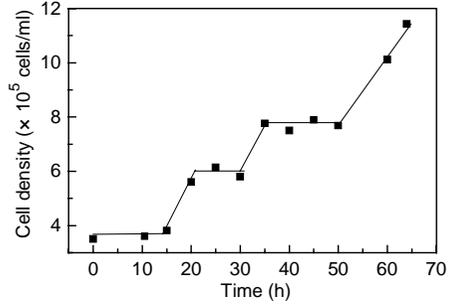


图 6 RdR 双阻断旋转瓶中 Vero 细胞密度
Fig.6 Cell density of Vero cells with double TdR block on Cytodex-3 in spinner flasks

3.7 TdR 双阻断细胞的流式细胞仪分析(FACS)

FACS 结果如图 7 所示. 在双阻断恢复生长后的 0 h, DNA 含量分布几乎为一个单峰,这与细胞被阻断后处于 G1/S 期的边界相一致;恢复生长 3 h 后, DNA 含量分布表明处于 S 期的细胞大大增加,达 71.6%; 6 h 和 9 h 后, G2 和 M 期细胞数明显增加,其中 9 h 后 G2 和 M 期细胞达 65.0%,达到最大值; 12.5 h 后, G2 和 M 期细胞逐渐减少, G1 期细胞增加; 13.5 h 后, DNA 含量分布又成为一个单峰,表明第一轮细胞分裂结束. 此后细胞逐渐失去同步化生长的特性. 我们的实验结果与 Al-Rubeai 等^[10]的实验结果比较一致.

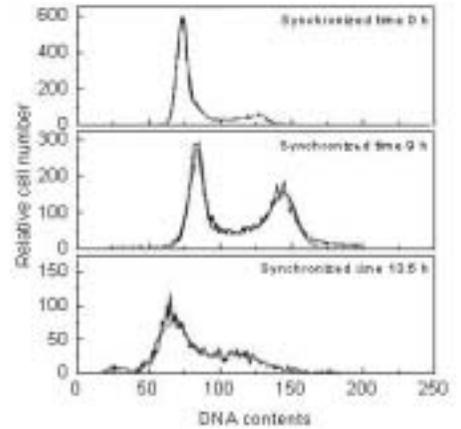


图 7 同步化 Vero 细胞的 DNA 含量分布
Fig.7 DNA distributions of synchronized Vero cells

4 结论

- (1) 实验表明,处于指数生长期的 Vero 细胞,用 2 mmol/L TdR 阻断生长 11 h 后,恢复生长 14 h,再用 2 mmol/L TdR 阻断细胞生长 11 h,此时细胞同步化程度最高.
- (2) 应用以上方法,处理在方瓶中贴壁生长的 Vero 细胞和旋转培养瓶中用 Cytodex-3 培养的 Vero 细胞,其 SI 值分别为 65.0%和 60.0%.
- (3) TdR 双阻断法同步化动物细胞操作比较简便,可以大量制备同步化的 S 期细胞,并且对细胞的正常生理代谢产生的干扰是可逆的^[4],因此可以进行细胞代谢分析或其它的生物学特性的研究.

参考文献:

[1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 173-175.
 [2] 鄂征. 组织培养技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 202-203.
 [3] World Health Organization WHO Technical Report Series, Vol.747 [R]. Geneva: World Health Organization, 1987. 5-24.
 [4] World Health Organization WHO Technical Report Series, Vol. 745 [R]. Geneva: World Health Organization, 1987. 99-105.
 [5] 梁云燕, 王代树, 方家椿, 等. 一种高效率细胞同步化方法的改良与运用 [J]. 细胞生物学杂志, 1991, 13: 137-140.
 [6] 叶秀珍, 朱得厚, 陈瑞铭. 人体肝癌细胞系(BEL-7402)的同步化研究—S 期和 M 期同步细胞 [J]. 实验生物学报, 1979,

- 12: 207–212.
- [7] Bostock C J, Prescott D M, Kirkpatrick J B. An Evaluation of the Double Thymidine Block for Synchronizing Mammalian Cells at the G1–S Boder [J]. *Exp. Cell Res.*, 1971, 68: 163–168.
- [8] Williamson D H, Scopes A W. A Rapid Method for Synchronizing Division in the Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. *Nature*, 1962, 193: 256–257.
- [9] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1991. 128–132.
- [10] Al-Rubeai M, Emery A N. Mechanisms and Kinetics of Monoclonal Antibody Synthesis and Secretion in Synchronous and Asynchronous Hybridoma Cell Cultures [J]. *J. Biotech.*, 1990, 16: 67–86.

Synchronous Growth of Vero Cells with Double Thymidine Block

GAO Hong-liang¹, CONG Wei¹, ZHI Wen-bo¹, OUYANG Fan¹, SHAO Man-jun²

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Chem. Metall., CAS, Beijing 100080, China;

2. Lab. Multi-phase Reaction, Inst. Chem. Metall., CAS, Beijing 100080, China)

Abstract: The optimum conditions of synchronous growth of Vero cells with double thymidine (TdR) block were investigated, including the concentration of TdR, treatment time and recovery time. The proper operation procedure is as follows: exponentially growing Vero cells were arrested with 2 mmol/L TdR for 11 h, cultured in normal medium for 14 h and arrested with TdR for another 11 h. In this way, the Synchronous Index (SI) reached 65.0% for the Vero cells culture in bottles and 60.0% for Vero cells growing on Cytodex-3 microcarriers in spinner flasks.

Key words: Vero cell; synchronous growth; double thymidine block