

天然纳米材料凹凸棒土促进 Sp2/0 细胞增殖的研究 *

张海燕^{1,2} 吴凡² 王诺鑫² 蔡冬清³ 郭建平¹ 丁克俭^{2,Δ}

(1♀ 山西大学 化学与化工学院 山西 太原 030006 2♀ 北京交通大学理学院生命科学与生物工程研究院 北京 100044 ;

3 中国科学院等离子体物理研究所 离子束生物工程重点实验室 安徽 合肥 230031)

摘要 目的:研究天然纳米材料凹凸棒土(ATP)对 Sp2/0 细胞增殖的作用,并探讨这种作用与 ATP 优化细胞培养环境相关。方法:通过 CCK8 法和细胞计数方法,比较正常培养方式和添加天然纳米材料凹凸棒土培养方式下 Sp2/0 细胞的生长曲线、细胞活性,除外,Sp2/0 细胞培养过程中谷氨酰胺的消耗以及细胞代谢产物 NH₄⁺ 浓度随时间的变化。结果:一定浓度范围天然纳米材料凹凸棒土可有效的提高了 Sp2/0 细胞的细胞活性和细胞密度,促进了 Sp2/0 细胞的增殖。结论:天然纳米材料凹凸棒土通过降低细胞代谢产物中铵离子浓度,优化了细胞培养环境,促进了 Sp2/0 细胞增殖。

关键词:凹凸棒土 细胞培养 细胞活性 小鼠骨骨髓瘤(Sp2/0)细胞株

中图分类号:Q95-3,Q813,Q818 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2010)06-1039-04

Improvement of growth and proliferation of SP2/0 cell by Natural-nanomaterial Attapulgite*

ZHANG Hai-yan^{1,2}, WU Fan¹, WANG Nuo-xin¹, CAI Dong-qing³, GUO Jian-ping², Ding Kejian^{2,Δ}

(1♀ College of Chemistry & Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan, 030006 ;

2♀ college of Life sciences and Bioengineering, School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044 ;

3Key Laboratory of Ionbeam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Science, Hefei 230031)

ABSTRACT Objective: To study the effect natural nanomaterial attapulgite (ATP) on the growth and proliferation of Sp2/0 cell, and whether this effect is related to the optimized cultivation circumstance by ATP. **Methods:** Adopting CCK-8 methods and cell counter, Sp2/0 cell viability and cell density in normal and ATP-assisted cultivation are measured. In addition, concentration of glutamine and ammonium in cell medium was measured, respectively. **Results:** Under some concentration range, the ATP can improve the Sp2/0 cell viability and cell density to some degree. **Conclusion:** ATP enhances the growth and proliferation of Sp2/0 cell by optimizing its culture environment.

Key words: Attapulgite; Cell Cultivation; Cell viability; Sp2/0 cell line

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813, Q818 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2010)06-1039-04

前言

近些年来,现代生物技术包括细胞工程、基因工程和酶工程技术等得到快速发展,这些技术的快速发展终究离不开动物细胞培养技术支持。哺乳动物细胞培养其是目前生物、医学研究和应用中广泛采用的技术方法,其产生的激素、干扰素、酶、生长因子、疫苗和单抗等具有重要的医用价值,是医药生物高技术产业的重要组成部分^[1]。但是,由于受不同细胞体外培养的特异性、复杂性以及生产成本的限制,目前的细胞培养技术仍难于满足现代生物技术发展的要求^[2],迫切需要研究和发动物细胞大规模培养技术以及新的细胞培养工艺,同时,如何降低细胞培养成本,提高细胞培养的效率以及生物制品的产率也是目前生物技术研究领域亟待解决的科学问题,而优化细胞培

养环境可能成为解决以上问题的有效手段之一^[3-4]。

凹凸棒土(Attapulgite,简称 ATP)是一种层链状过渡结构的以含水富镁铝的硅酸盐粘土矿物,且具有纳米通道结构的天然矿物材料,其理想的化学分子式为: Mg₃Si₈O₂₀(OH)₂(OH₂)₄·4H₂O, ATP 具有 Si-O 四面体典型结构。通常情况下,凹凸棒晶长约 1μm,宽约 10~25nm,其主要成份见表 1^[5-6]。由于凹凸棒土内部多孔道,比表面积大,大部份的阳离子和一定大小的有机分子均可直接被吸附进孔道中,利用其优良吸附性、胶体性、填充性、热稳定性以及离子交换性等特殊性能,凹凸棒土已在工业、环境等领域得到了广泛应用^[7-10]。本文中的实验将精细凹凸棒土添加到细胞培养液中,通过对小鼠骨骨髓瘤细胞的活性、细胞密度、谷氨酰胺的消耗以及细胞代谢产物 NH₄⁺ 浓度随时间的变化,研究了天然纳米材料凹凸棒土对小鼠骨骨髓瘤细

* 基金项目:国家自然科学基金委项目(No.10707007),国家科技基础条件平台建设项目(No.2005DKA21101)和

国家"十一五"科技支撑计划项目(No.2008BAK41B01)

作者简介:张海燕(1983-),女,硕士研究生,主要研究方向:生物化学

♀ 二单位对本工作具有同等贡献,排名不分前后

Δ通讯作者:丁克俭,电话:010-51688577, E-mail: dkjian@bjtu.edu.cn

(收稿日期:2010-01-10 接受日期:2010-02-08)

胞的体外培养的影响 结果表明天然纳米材料凹凸棒土可以优化细胞培养环境,促进 Sp2/0 的生长。

表 1 凹凸棒晶体的主要化学成分及其含量百分比

Table 1 Chemical composition of the attapulgite samples

Component	Weight (%)
SiO ₂	57.06
Al ₂ O ₃	16.59
MgO	8.63
Fe ₂ O ₃	6.11

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

Sp2/0(小鼠骨髓瘤细胞)由 ATCC 提供,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,RPMI-1640 培养基购自 Invitrogen(USA)公司,Cell Counting Kit-8 细胞增殖测定试剂盒购自 Dojindo 公司,凹凸棒土由江苏盱眙欧伯特凹土有限公司提供,铵离子试剂盒购自南京建成生物工程研究所。使用的仪器包括:TECNAI12 透射显微镜(FEI 公司)、酶标仪(TECAN USA)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)和 TE2000-S 倒置显微镜(Nikon, Japan)。

1.2 精细凹凸棒土的制备

取经 200 目筛的 ATP 初级粉体,与盐酸的质量体积比(以 g/ml 计)为 1/10 加入浓度为 5mol/L 的盐酸中,于 60℃ 恒温搅拌处理 60 分钟,然后用去离子水洗涤至溶液为中性,同时可充分洗去 ATP 中的杂质,5000r/min 离心 5 分钟。将离心后的 ATP 以质量体积比为 1/5 加入到浓度为 5g/L 的聚丙烯酸钠溶液中,恒温搅拌 60 分钟后置于超声振荡器中,超声至 ATP 充分水化,用去离子水充分洗去加入的聚丙烯酸钠,高速离心、干燥、高压灭菌后,获得纯度高和离散性好的精细凹凸棒土。

1.3 Sp2/0 细胞培养

取 0.2g 精细凹凸棒土加入 35ml 去离子水超声 90 分钟,高压灭菌后配成 0.95mg/ml 的凹凸棒土水溶液备用。正常 Sp2/0 细胞是在含 20%胎牛血清,1%谷氨酰胺(200mmol/L),1%的双抗的 RPMI-1640 培养液中生长。在本文实验中,当 Sp2/0 细胞处在对数生长期时,按体积比 5:1 取细胞密度 1×10^5 个/ml 小鼠骨髓瘤细胞悬液和 0.95mg/ml 的 ATP 水溶液的接种于培养皿中,置 37℃ 5%CO₂ 培养箱内培养待用,同时设置空白对照组,三天后检测细胞形态。

1.4 Sp2/0 细胞计数和细胞活性

细胞计数:将 1.3 的培养皿中 Sp2/0 细胞悬液稀释至 200~2000 细胞/ml,取 1ml 制备的 Sp2/0 悬浮液加入 1ml 0.4%的台盼蓝溶液,轻轻混匀,数分钟后,用血球计数板计数,重复三次取平均值。细胞活性测定:利用 CCK-8 富含的高水溶性 WST-8 在活细胞有氧呼吸作用下会被线粒体去氢酶还原成水溶性的黄色产物 Formazan,其生成量与活细胞数量成正比关系的原理。实验过程中,取上述制备的正常培养和 ATP 辅助培养的 Sp2/0 细胞悬液 100ul 接种于 96 孔板中,各设置的 3 个复孔,同时设置空白对照,加入 CCK-8 试剂 2 小时后,利用 TECAN 酶标仪测定细胞悬浮液在 450nm 处的 OD 值。

1.5 谷氨酰胺和铵离子浓度的测定

在接种 Sp2/0 细胞悬液的 96 孔板中,我们按照谷氨酰胺测试盒的测试步骤,分别测定空白管 OD₁、标准品 OD₂ 以及测定管 OD₃,利用如下公式可计算出谷氨酰胺浓度 CGLU

$$CGLU = \frac{OD_3 - OD_1}{OD_2 - OD_1} \times C.D \quad (1)$$

这里 C 是标准浓度,通常为 2mol/L, D 为稀释倍数,谷氨酰胺浓度随时间变化曲线如图 4 所示。至于培养液中铵离子浓度测定,我们同样按照铵离子测试盒的测试步骤,首先在 96 孔板中分别按体积比 1:1 和 1:3 添加蒸馏水和铵离子测试盒中的试剂 1,混合均匀后于 37℃ 水浴 15 分钟,再按 1:100 体积比添加试剂 3 和试剂 4,混合均匀,于 37℃ 水浴 15 分钟后,检测铵离子浓度的 OD 值。

2 结果

2.1 Sp2/0 细胞形态

图 1 是 Sp2/0 细胞在正常培养环境和含精细凹凸棒土培养液中培养三天后,在倒置显微镜下的细胞形态(放大倍率 $\times 100$),从图 2 可以清晰看出,在含精细凹凸棒土的培养液中生长的小鼠骨髓瘤细胞与在正常培养液下培养的细胞从形态上看并没有实质上的差异,相比正常环境下培养的细胞,在含凹凸棒土的培养液环境中的细胞分布相对均匀和分散,表明凹凸棒土对 Sp2/0 细胞的培养无负作用。

2.2 Sp2/0 细胞生长曲线与活性曲线

图 2 分别是小鼠骨髓瘤细胞在正常培养液和含有凹凸棒土培养液中培养的细胞生长曲线(图 2A)和细胞活性曲线(图 2B)。从细胞生长曲线图 2A 可知,凹凸棒土辅助培养下的 Sp2/0 细胞的生长曲线和正常培养下细胞生长曲线基本相似,存在细胞潜伏区和指数生长期,由于我们主要是为了研究凹凸棒土效应,在整个培养过程中并没有换培养液,和传统细胞生长曲线相比,细胞密度或活性达到峰值后由于营养成分少和细胞抑止因子的增多,细胞死亡数增加,活细胞数量将会逐渐减少,细胞生长曲线就开始有下降趋势,细胞生长过程中的平台期并没有出现。参比于无凹凸棒土培养液情况,从 Sp2/0 细胞活性曲线可知,Sp2/0 细胞在含有凹凸棒土的培养液中生长状况明显具有优势,凹凸棒土辅助培养的 Sp2/0 细胞相比于正常培养条件下的细胞活性和密度都得到了提高。从图 Fig. 2(A)、Fig.2(B)可知,在 SP2/0 细胞培养的初始时间段(1-2 天内),含凹凸棒土培养液中生长的细胞的活性以及细胞密度相比于正常培养的细胞活性和细胞密度要低,我们认为凹凸棒土对细胞培养液中的营养物质同样具有上述吸附或胶体相互作用,导致在细胞培养的初期含凹凸棒土的培养液中营养成分相比于正常培养下的培养液浓度较低(图 3,谷氨酰胺浓度随时间的变化曲线也证实了这一点),随着细胞生长,培养液中的营养成分浓度降低,被凹凸棒土吸附的营养成分将会被释放出来。

2.3 谷氨酰胺和铵离子浓度

图 3 为谷氨酰胺浓度随时间的变化曲线,即在细胞培养过程中谷氨酰胺的消耗曲线。从图 3 可以看出,在 Sp2/0 细胞整个培养过程中谷氨酰胺浓度不断降低,无论是对正常培养还是 ATP 辅助培养,其变化趋势基本保持一致;ATP 辅助培养下的

细胞培养液中谷氨酰胺浓度相比于正常培养的细胞培养液浓度较低,这主要是由上面提及的 ATP 物化性质决定的。图 4 是利用铵离子试剂盒测定的添加凹凸棒土和正常培养 Sp2/0 细

胞培养液中的铵离子浓度随时间变化曲线,从图 4 可以看出,相比于正常培养,添加凹凸棒土可以降低细胞培养液中的铵离子浓度。

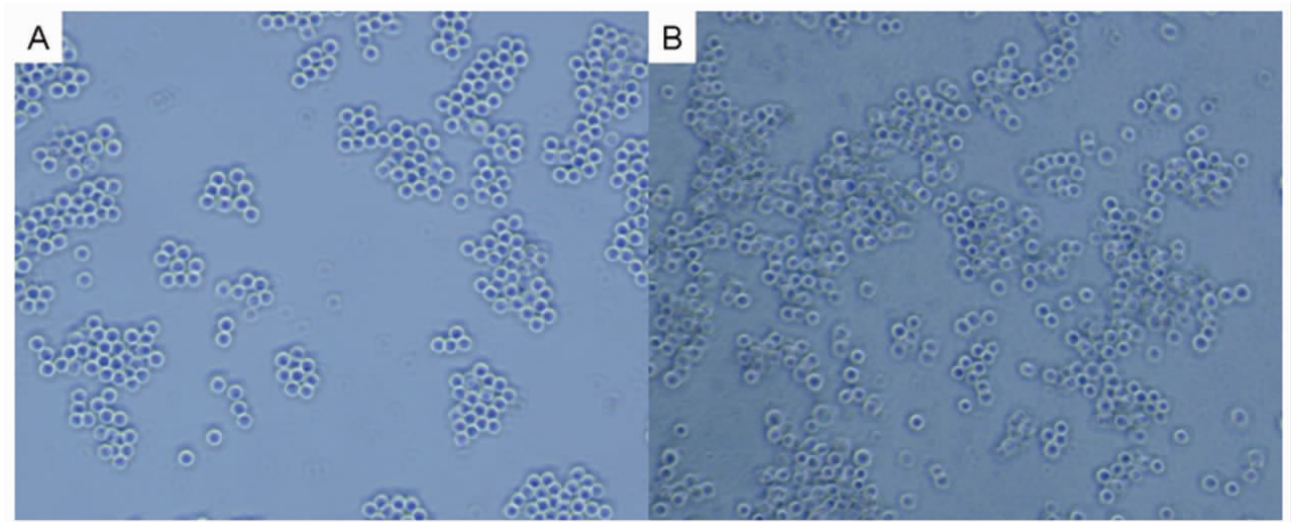


图 1 Sp2/0 细胞形态(A)SP2/0 正常环境培养下第三天形态(B)SP2/0 在含凹凸棒土的培养基中培养三天的细胞形态

Fig.1 Morphology of Sp2/0(A)Morphological observation of normal cell for three days (B)Morphological observation of normal cell containing the attapulgite for three days (× 100)

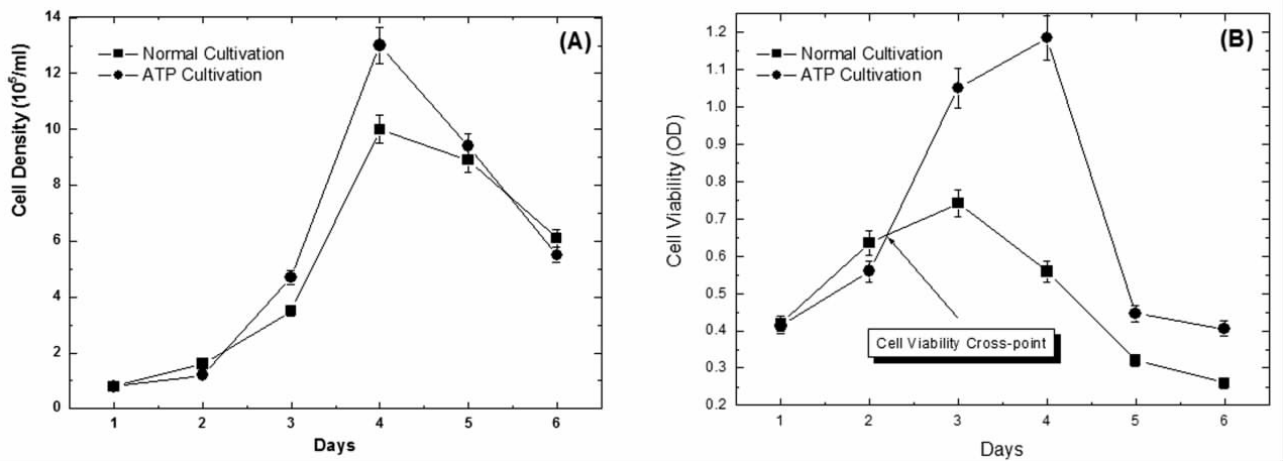


图 2 细胞生长曲线(A)细胞密度随时间变化曲线(B)细胞活性随时间变化曲线

Fig.2 Growth curve of Sp2/0 cell. (A)Density curve of Sp2/0 cell (B) Cell viability of Sp2/0 cell

3 讨论

细胞培养环境中抑制因素的积聚是细胞密度和细胞活性提高的主要制约因素,其中,体外动物细胞培养中铵离子的积聚是抑制细胞生长的主要因素之一,研究表明细胞代谢的副产物铵离子积聚到一定浓度就会降低细胞生长速率,同时铵离子的聚集使得细胞内 UDP 氨基己糖增加,影响细胞的生长及蛋白的糖基化过程^[12,13]。细胞培养过程中,培养液中氨一方面直接来源于培养基,另一方面来源于细胞代谢,有效降低铵离子浓度可以促经细胞生长。实验结果图 3 表明在细胞的培养过程中,尤其是指数生长期,含凹凸棒土的培养液中的铵离子浓度相比于正常培养细胞的培养液而言要低的很多,因此凹凸棒土优化了细胞生长的环境,细胞活性和细胞密度也相应得到提高。凹凸棒土降低培养液中的铵离子浓度的原因较为复杂,比

较认可的原因是凹凸棒土具有多孔性和大比表面积的结构,使凹凸棒土具有强的吸附性以及具有较高的运动粘度胶体性,同时,培养液中营养分子可与凹凸棒土晶粒形成胶体网络结构,细胞代谢的一些产物如氨离子、乳酸会被凹凸棒土所吸附,从而优化了细胞生长所依赖的环境^[14]。

4 结论

通过优化细胞培养环境,提高细胞的活性和生长速率进而降低细胞培养的昂贵费用,无疑是目前生物产业中一个急需解决的科学问题。本文我们研究了天然纳米材料凹凸棒土对 Sp2/0 细胞培养的影响,研究结果表明相比于正常培养液培养的细胞,在含凹凸棒土培养液中生长的 Sp2/0 细胞的细胞活性和细胞密度得到了大幅度。进一步研究表明导致上述实验结果的主要原因可能是由于凹凸棒土所具有的特殊的空间结构导

致细胞培养环境中制约细胞生长的因子浓度(如,铵离子)的降低。这为下一步拓宽凹凸棒土在大规模细胞培养中的应用研究

奠定了基础。

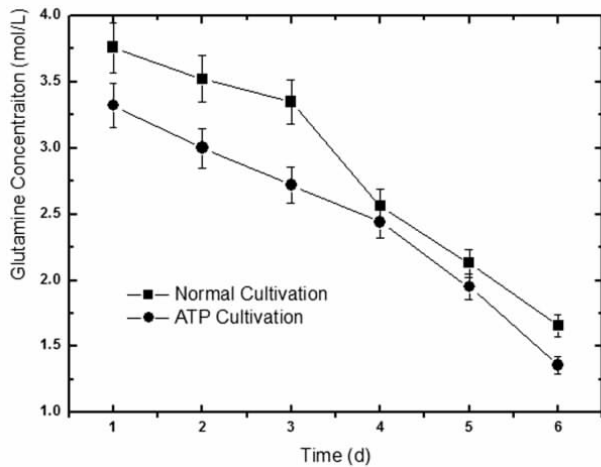


图3 细胞培养液中谷氨酰胺浓度随时间分布曲线

Fig 3. Concentration curve of glutamine

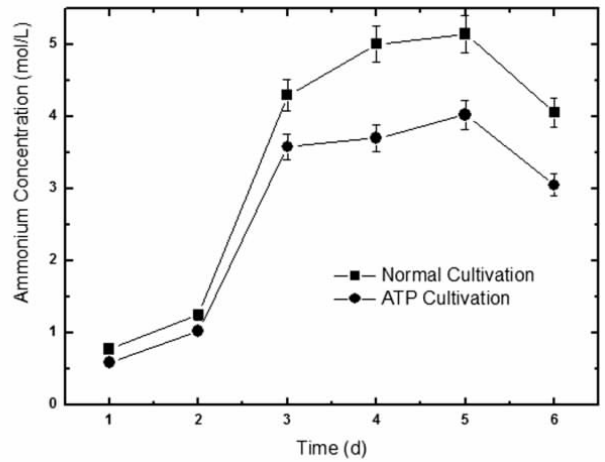


图4 细胞培养液中铵离子浓度随时间分布曲线

Fig 4. Concentration curve of ammonium

致谢:感谢北京交通大学生命科学与生物工程研究院张莹老师,王鑫和刘延凤同学以及中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所宋敬东老师对本工作的帮助和有益的讨论。

参考文献(References)

[1] 林福玉 陈昭烈 刘红等. 大规模动物细胞培养的问题及对策[J]. 生物技术通报, 1999, 1:32-35
Lin Fu-yu, Chen Zhao-lie, Liu Hong, et al., Problems and Solutions of Large-scale Mammalian Cell Culture. Biotech Inform [J]. 1999, 1: 32-35

[2] Altamirano C, Paredes C, Illanes A, et al. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium [J]. J Biotech, 2004, 110: 171-179

[3] Li Z, Hong S, Zhang Y X. Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy [J]. J Chem Technol Biot, 2004,79: 171-181

[4] 高量 游磊 朱明龙等. rCHO 细胞在葡萄糖限制流加培养过程中的生长与代谢特性[J]. 高校化学工程学报, 2006,1(20):74-78
Gao Liang, You Lei, Zhu Ming-long, et al. Growth and Metabolism of rCHO Cells in Glucose-Limited Fed Batch Culture [J]. J Chem Eng Chin Univers, 2006,1(20):74-78

[5] Ni P, Li J, Suo J S, et al. Study on mechanical properties of polyurethane-attapulgite nanocomposites [J]. J Mat Sci, 2004,39: 4671-4673

[6] Liu Y S, Liu P, Su Z X. Core-shell attapulgite@polyaniline composite

particles via in situ oxidative polymerization[J]. Synthetic Met, 2007, (157): 585-591

[7] Adolpho C, Baltar M, Luz A B, et al. Influence of morphology and surface charge on the suitability of palygorskite as drilling fluid [J]. Applied Clay Sci, 2009, 42: 597-600

[8] Ahmed A-F, Ahmad J, Rashid A-H. Aspects of cationic dye molecule adsorption to palygorskite[J]. Desalination , 2007, 214: 327-342

[9] Liu Y S, Liu P, Su Z X, et al. Attapulgite-Fe3O4 magnetic nanoparticles via co-precipitation technique [J]. Appl Surf Sci, 2008, 255: 2020-2025

[10] Chen H J, Cui Qun, Tang Y, et al. Attapulgite based LiCl composite adsorbents for cooling and air conditioning applications [J]. Appl Therm Eng, 2008, 28: 2187-2193

[11] Hiemenz P C. Principles of Colloid and Surface Chemistry[M]. New York: MarcelDekker, INC, 1986 , 7102730

[12] Ryll T, Valley U, Wagner R. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells [J]. Biotech Bioeng, 1994, 44: 184-193

[13] Fuchs C, K?ster D, Wiebusch S, et al. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of Escherichia coli [J]. J Biotech, 2002, 93: 243-251

[14] Barrer R.M, Mackenzie N, MacLeod D. M. Sorption by Attapulgite. II. Selectivity Shown by Attapulgite, Sepiolite and Montmorillonite for n-Paraffins [J]. J Phys Chem ,1954, 58(7):568-572