

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.009

葡萄糖浓度对细胞融合效果的影响*

杨明轩 游孟昊 王美文 黄文君 杜 中[△]

(中国农业大学生物学院 农业生物技术国家重点实验室 北京 100193)

摘要 目的:细胞融合是细胞生物学领域近 30 年来得到迅速发展的一项新兴技术手段,因其操作简便、人工可控等优点在研究核质互作、肿瘤发生、疫苗研发和培育新型生物品种等方面均有广泛应用。其中,利用聚乙二醇(PEG)进行化学融合是细胞融合中最常用且简便的技术手段。PEG 化学融合效果受到多种因素影响,如 PEG 浓度、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、pH 值等,然而对于糖类物质在细胞融合中的影响未见报道。本文旨在为了更全面了解 PEG 法诱导的化学细胞融合,通过优化融合条件以提高化学细胞融合效率。**方法:**选取鸡血细胞为材料,通过改变原 Hanks 缓冲液中葡萄糖浓度,观察比较各组细胞融合率,探究葡萄糖浓度在化学细胞融合中的影响,并通过对比结果获得了对于鸡血细胞应采用的最适葡萄糖浓度区间。**结果:**对于鸡血细胞融合实验,葡萄糖浓度在 10-14 mmol/L 范围内细胞融合效率较原 Hanks 液配方高 2 倍左右。**结论:**葡萄糖对细胞融合效果具有一定的影响,可以通过调节葡萄糖浓度提高细胞融合率,从而为 PEG 化学细胞融合提供一种更为优化的方案。

关键词:葡萄糖;PEG 法细胞融合;鸡血细胞

中图分类号:Q813 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)17-3236-04

The Effect of Glucose Concentration on Cell Fusion*

YANG Ming-xuan, YOU Meng-hao, WANG Mei-wen, HUANG Wen-jun, DU Zhong[△]

(State Key Laboratory of Agricultural biotechnologies, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing, 100193, China)

ABSTRACT Objective: Cell fusion is one of the new cytological techniques in recent 30 years. Because it is easy to be operated and controlled, cell fusion is now widely used in many fields such as nucleoplasm research, tumor genesis, vaccine development and nurturing new biological species etc. Polyethylene glycol (PEG) chemical fusion is the most common cell fusion technology. There are many factors affecting the PEG chemical fusion such as the PEG concentration, Ca^{2+} , Mg^{2+} , pH value and et al. However, the effect of glucose concentration on cell fusion has not been reported. In order to understand the factor influencing the chemistry of PEG-induced cell fusion better, we optimized fusion conditions, and improved the fusion rate of the PEG chemical fusion. **Methods:** Choose chicken red blood cells as material, and vary the concentrations of glucose in the original Hanks buffer. By comparing with the cell fusion rate in different glucose concentration, the effect of glucose concentration on the cell fusion and the better glucose concentration for fusion rate were explored. **Results:** Based on the original Hanks buffer recipe in chicken cell fusion, we adjusted the concentration range of glucose to 10 mmol/L-14 mmol/L, which contributed to a higher rate of cell fusion. **Conclusion:** Glucose concentration has an effect on cell fusion and higher concentration of glucose is better for cell fusion. This work provides an optimization for the PEG chemical fusion.

Key words: Glucose; PEG chemical fusion; Chicken red blood cell

Chinese Library Classification(CLC): Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3236-04

前言

细胞融合(cell fusion)是指多个细胞在外力(物理、化学或生物因素)作用下融合形成一个多核细胞的过程,也称细胞杂交(cell hybridization)、原生质体融合(protoplast fusion)或体细胞杂交(somatic hybridization)^[1-4]。

在自然条件下,体内或体外培养的细胞均可以发生自然融合,然而自发的细胞融合并不多见。自 1958 年 Okada 首次表明

紫外灭活的仙台病毒可以诱导体外培养细胞融合成多核体,从而证明了人工诱导细胞融合的可能^[5]。近 30 年来,细胞融合技术已经迅速成为了细胞工程中一项重要技术。细胞融合技术不仅为研究核质关系、基因调控及定位、肿瘤发生、衰老控制等理念领域的研究提供了有力的手段,而且在细胞遗传、动植物远缘杂交育种、细胞免疫以及医药、食品、农业等方面均有广泛应用。特别是单克隆抗体制备、哺乳动物的克隆、抗癌疫苗的研发等方面细胞融合技术已经成为其重要技术手段^[4,6-9]。根据细胞

* 基金项目:国家自然科学基金项目(J1103520);生物学院本科生创新能力提升计划(15052503)

作者简介:杨明轩(1992-),男,本科,研究方向:细胞生物学, E-mail: ymxtyz@cau.edu.cn

[△]通讯作者:杜中, E-mail: duzhong@cau.edu.cn

(收稿日期:2013-12-28 接受日期:2014-01-23)

融合过程使用的融合剂不同,人们将细胞融合方法大致可分为:①生物法:病毒诱导的细胞融合,如1958年由Okada发现的仙台病毒^[9];②化学法:化学因子诱导的细胞融合,如1974年由华裔科学家高国楠(Kao)发现的聚乙二醇(PEG: polyethyleneglycol)^[4,10];③物理法:激光、电脉冲诱导的细胞电融合(cell electrofusion)^[4,10]。

其中PEG法诱导细胞融合因其容易制备、活性稳定、融合效率高、操作简便等特点,被广泛应用于生物、遗传、医药等研究领域^[4,11-13]。然而由于目前对于PEG法的融合机理目前并不完全了解,尤其是对于Hanks液配方中各物质在细胞融合中的作用亦不够明了,其融合率会受到多种影响因子影响:李保华^[14]、李秀兰^[15]、马云^[13]、仇燕^[10]和吴绍函^[16]等研究表明在细胞融合过程中PEG浓度、细胞密度、融合温度、融合时间、缓冲液pH值以及钙镁离子等均会影响细胞融合率。

因此我们通过选择葡萄糖浓度—细胞营养代谢及维持生理环境关键物质—展开探讨,希望为化学细胞融合法改良方案提供新的思维。我们选择以鸡血细胞为研究材料,探究葡萄糖浓度对于细胞融合效果的影响,通过调整Hanks液中葡萄糖浓度从而获得在一定细胞密度的鸡血细胞中PEG法较高的细胞融合率^[16]。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料

取一龄公鸡静脉血。按常规方法制备鸡血细胞储备液。

表1 不同葡萄糖浓度对应的葡萄糖质量

Table 1 The mass of glucose in different glucose levels

Glucose c. (mM)	0	2	4	5	6	8	10	12	14	20
Mass of glucose(g)	0	7.9268	15.8536	19.8170	23.7804	31.7072	39.6340	47.5608	55.4876	79.2680

1.3.2 细胞融合 取贮存鸡血液,1000 rpm 离心 5 min,去保存液后,以 0.85 %生理盐水用血球计数法和梯度稀释方法调节细胞浓度为 3×10^8 个/mL;将制备好的鸡血细胞悬液 1.0 mL 放入离心管中,分别加入 5 mL 上述 10 种 Hanks 缓冲液混匀,然后以 1000 rpm 离心 5 min,弃上清,将细胞团块充分弹散。分别滴加 50 % PEG 的细胞融合液 1.0 mL,混匀。37℃ 水浴中静置 2 min 进行融合。融合完成后,缓慢滴加 5.0 mL 相应 Hanks 缓冲液以终止 PEG 的作用,在 37℃ 水浴内静置 5 min。以 1000 rpm,离心 5 min,弃上清,取细胞悬液滴片,滴加 Janus green B 染液染色 3 min,盖上盖玻片,用普通光学显微镜观察细胞融合情况。

1.3.3 细胞融合率的计算 在显微镜视野内,计数其中已发生融合的细胞核,未融合细胞核数,计算融合细胞核数占细胞核总数之百分比即融合率,且进行多视野测定再加以平均统计。

其计算公式如下:

$$\text{融合率}(\%) = \frac{\text{融合细胞数(个)}}{\text{细胞总数(个)}} \times 100\%^{[3]}$$

1.4 统计学分析

采用 Spearman 相关系数计算葡萄糖浓度与细胞融合率之间的相关程度并进行全局分析。

药品和试剂包括:PEG (MW=4,000),一水合葡萄糖(国药集团),0.85 %生理盐水,不同糖浓度的 Hanks 溶液,Janus green B 染液(Solarbio 公司)。

不同糖浓度的 Hanks 缓冲液配方:甲液:NaCl 160.0 g, KCl 8.0 g, MgSO₄·7H₂O 2.0 g, MgCl₂·6H₂O 2.0 g, 三蒸水 800.0 mL, CaCl₂(无水) 2.8 g, 三蒸水 100.0 mL,将两种液体混合后,加水至 1000.0 mL,滤纸过滤,储存于 4.0℃;乙液:Na₂HPO₄·12H₂O 0.06 g, KH₂PO₄ 1.2 g, 葡萄糖质量根据表 1 所示,三蒸水 800.0 mL,滤纸过滤,加入 0.5 % 酚红 80.0 mL,加水定容至 1000.0 mL,储存于 4.0℃。

使用前,取甲乙液各 1 份,双蒸水 18 份,用 5.6 % NaHCO₃ 溶液调节 pH 至 7.40,制得 Hanks 使用液。

1.2 仪器与用具

普通光学显微镜,离心机,恒温水浴锅,血球计数器,量筒,酒精灯,滴管,离心管,烧杯,载玻片,盖玻片等。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞融合液(Hanks 溶液)的处理 根据表 1 用葡萄糖调节 Hanks 溶液使其含葡萄糖浓度分别为 0 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 5 mmol/L, 6 mmol/L, 8 mmol/L, 10 mmol/L, 12 mmol/L, 14 mmol/L, 20 mmol/L; 共 10 种只有葡萄糖含量不同的 Hanks 缓冲液。称取 1.0 g PEG (MW=4,000)放入试管内,在酒精灯上融化,迅速加入 1.0 mL 预热的预制 Hanks 缓冲液混匀制成 50 % PEG 溶液。放入 37℃ 水浴中待用。

2 结果

2.1 鸡血细胞融合过程的观察

通过利用 Janus green B 染液染色处理后,我们可以通过普通光学显微镜观察到鸡血细胞融合过程。一般来说细胞融合可根据融合程度分为五个阶段:①细胞间细胞膜相互接触并发生粘连;②细胞膜局部打开并发生融合;③细胞质相通并形成细胞质通道,此时细胞膜融合面积也会随着胞质通道形成逐渐增大;④胞质通道不断增大,融合细胞形态由最初的哑铃型逐渐向椭圆形发展;⑤两细胞膜及细胞质完成融合,细胞连为一体,此时形成的融合细胞多为含有两个或多核的近圆形细胞或含有融合不充分细胞核的细胞;⑥细胞核完成融合^[3]。该过程可以在不同梯度的实验组的实验结果中发现(如图 1)。同时可以明显看出,随着葡萄糖浓度不断上升,细胞融合效果存在一个先升后降的过程,并且在低葡萄糖浓度(0 mmol/L)及高葡萄糖浓度(20 mmol/L)组中发现细胞形态多数发生异常,主要表现为低浓度组细胞膜涨破甚至细胞核相比于其他浓度梯度组明显偏大,高浓度组细胞膜呈现皱缩甚至出现不规则长条状(如图 1-A, 1-E)。

2.2 葡萄糖浓度差异对鸡血细胞融合效果的影响

通过镜检观察我们可以发现,不同的葡萄糖浓度对于细胞融合效果会造成不同的影响。在本次实验中,我们对各组细胞融合情况进行拍照并对每组照片随机截取部分典型区域镜检

统计,最终数据处理如下(表2)。通过数据及图表显示,在10 mmol/L-14 mmol/L 葡萄糖浓度下,细胞融合现象明显,融合效果较好,其中经过检测,12 mmol/L 葡萄糖浓度下细胞融合率为原 Hanks 液葡萄糖浓度(5 mmol/L)下的2倍左右。

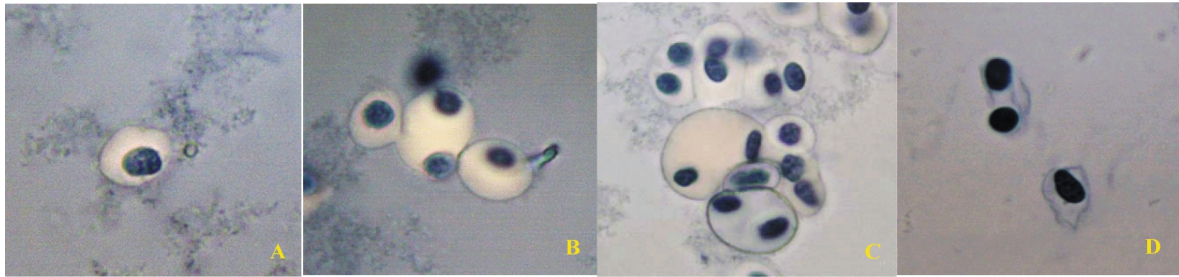


图1 细胞融合镜检,放大倍数(100×)

Fig. 1 Microscopy of cell fusion, Magnification (100×)

Note: A. 0 mmol/L glucose; B. 5 mmol/L glucose; C. 12 mmol/L glucose; D. 20 mmol/L glucose

表2 不同葡萄糖浓度对细胞融合效果的影响

Table 2 The effect of glucose concentration on cell fusion

Glucose c. (mM)	0	2	4	5	6	8	10	12	14	20
Fusion rate (%)	0.953	1.261	3.959	5.890	7.005	9.231	11.630	12.307	10.311	4.949

通过表2表明,葡萄糖浓度与细胞融合率为非线性关系。为了证明其两指标间的显著性差异,通过采用 Spearman 相关系数计算相关程度得出两指标间的相关系数为0.709, p 值为0.027,表明此两指标显著相关。

3 讨论

作为细胞工程的核心基础技术之一的细胞融合技术,不仅可用于生物学的基础理论研究,而且因其能够不受种属局限从而实现种间生物体的细胞融合,使得远缘杂交成为可能,因此,在生产实践上也具有重要的应用价值^[3,16]。自从1974年 Michal Luk 发现高效融合剂聚乙二醇(PEG)并证明其可使不同科属原生质体之间发生融合,并且融合率可达20%以上以来,PEG法逐渐作为病毒的替代物成为了细胞融合的诱导剂^[16,17]。目前我们可知,PEG法促使细胞融合的原因是PEG依靠对水的极高亲和性而与水分子以氢键结合,从而产生渗透梯度导致细胞间或囊泡间的聚集,最终使得细胞发生融合^[10]。然而PEG法对细胞的作用效果一直受到多重因素影响:其中鲁云凤^[18]等人研究表明PEG的浓度对蟾蜍红细胞融合有较大影响,主要表现在过高的PEG浓度会导致细胞坏死,而其坏死原因分析是因为过高的PEG对细胞产生了较大的毒性。而赵彦禹^[9]、赵咏梅^[9]、仇燕^[10]、马云^[13]、李秀兰^[15]等人更是通过实验表明,在鸡血细胞融合过程中,PEG浓度、融合时间、细胞密度、融合温度、 Ca^{2+} 均对细胞融合率有一定的影响。然而目前对于葡萄糖浓度在PEG法融合细胞过程中对细胞融合效果的影响尚未有报道。而葡萄糖作为细胞生理代谢中重要的营养物及生理调节物,其在维持细胞形态及生理活动中处于重要地位。

本实验中,为了探究葡萄糖浓度对细胞融合效果的影响,设计了多组浓度梯度。通过对实验结果的处理分析可以看出,

葡萄糖浓度确实对细胞融合效果有一定的影响,这可能是由于在Hanks液中葡萄糖浓度差异导致了细胞外界生理环境的改变,尤其是在融合过程中,细胞对于能量的摄取及胞外渗透压等条件的改变,从而对细胞融合效率产生影响。根据对比CK组及原Hanks液葡萄糖浓度,在本实验细胞浓度下含12 mmol/L的葡萄糖浓度的Hanks缓冲液具有最佳细胞融合率,并且融合细胞形态较为完整。同时在低葡萄糖浓度(0 mmol/L)及高浓度葡萄糖(20 mmol/L)下,细胞出现了不同程度的皱缩及死亡,经过Janus green B染色观察甚至发现在低浓度葡萄糖缓冲液中其部分细胞核亦发生膨胀。综上所述,对于PEG化学细胞融合技术,在处理鸡血细胞融合过程中可以通过调节增加葡萄糖浓度至10-14 mmol/L,从而促进细胞融合效果,获取更多融合细胞,为后续研究提供更多可供使用的材料。

然而正如鲁云凤等对蟾蜍红细胞融合的实验结果表明,对不同种属的细胞融合其最适融合温度并不相同^[16],因此本实验所得最适葡萄糖浓度范围也应仅限于鸡血细胞融合,对于其他种属细胞而言,可能并非其最适葡萄糖浓度。

细胞融合技术自1958年Okada^[9]发现并使用仙台病毒进行细胞融合以来,正迅速地在细胞生物学乃至整个生物领域得到充分的应用。同时人们在实际应用中其根据不同环境条件改变又会带来各种新的问题,而在解决问题的同时又是对其技术方案的改革创新,这种螺旋上升的研究道路促使了科学的进步与文明的发展。同时我们可以预见到,随着科学技术的发展,通过多学科交叉、多领域的技术配套,从而不断改进细胞融合条件,亦将成为提高细胞融合效果的新思路^[16]。

致谢:本实验的方案设计、结果分析及审阅得到中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室陈立群副教授的细心指导与大力支持。

参考文献(References)

- [1] 李小玉, 胡火珍, 张建国. 用鸡红细胞取代 Hela 细胞进行细胞融合的实验研究[J]. 四川解剖学杂志, 2002, 10(3): 132-133
Li Xiao-yu, Hu Huo-zhen, Zhang Jian-guo. The study on fusion experiment of chicken red blood cells instead of Hela cells [J]. Sichuan Journal of Anatomy, 2002, 10(3): 132-133
- [2] 赵彦禹, 张艳华, 冯照军. 鸡红细胞融合最适条件的探讨[J]. 生物磁学, 2006, 6 (1): 43-44
Zhao Yan-yu, Zhang Yan-hua, Feng Zhao-jun. Best Condition Studies on Fusion of Chicken Red Blood Cells [J]. Biomagnetism, 2006, 6 (1): 43-44
- [3] 赵咏梅, 郭云婷, 马蕊, 等. PEG 介导细胞融合的最适条件探究[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2007, 10 (3): 76-78
Zhao Yong-mei, Guo Yun-ting, Ma Rui, et al. Optimal Condition of PEG-Induced Cell Fusion [J]. Journal of Xi'an University of Arts&Science(Nat Sci Ed), 2007, 10(3):76-78
- [4] 赵志强, 郑小林, 张思杰, 等. 细胞融合技术 [J]. 生物学通报, 2005, 40 (10): 40-41
Zhao Zhi-qiang, Zheng Xiao-lin, Zhang Si-jie, et al. Cell fusion technology [J]. Bulletin of Biology, 2005, 40(10): 40-41
- [5] Okada Y, Biken s J. The introduction of cell fusion with non-activity Xitai virus [J]. Nature, 1958, (1): 103-110
- [6] Kugler A, Stuhler G, Walden P, et al. Rrgression of human metastatic tenal cellcarcinoma after vaccinated with tumor cell-dendritic cell hybrids[J]. Nat Med, 2000, 6: 332
- [7] Holmes LM, Li J. A rapid, novel strategy to induce rumor cell specificitytotoxic T lymphocyte (CTL) responses using instant dendritomas [J]. J Immunother, 2001, 6(6): 332-336
- [8] Lattanzi G, Ognibene A, Sabatelli P, et al. Emerin expression at theearly stages of myogenic differentiation [J]. Differentiation, 2000, 66 (4-5): 208-217
- [9] Hei T K, Wu L J. Mutagenic effects of a single and an exact numberof alpha particles in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, (94): 3765-3770
- [10] 仇燕, 李朝炜, 苗芳. 聚乙二醇诱导鸡红细胞融合条件的优化[J]. 生物技术, 2011, 21(3): 50-53
Qiu Yan, Li Zhao-wei, Miao Fang. Optimal Condition of PEG-Induced Chicken Red Blood Cells Fusion [J]. Biotechnology, 2011, 21(3): 50-53
- [11] Anna Piliszek, Jacek A Modlinski, Kazimiera Pyniak, et al. Foetal fibroblasts introduced to cleaving mouse embryos contribute to full-terra development[J]. Reproduction, 2007, 133(1): 207-218
- [12] Elizabeth H. Chen, Eric N. Olson. Unveiling the mechanisms of cell fusion[J]. Science, 2005, 308(5720): 369-373
- [13] 马云, 何昆, 王晓玉, 等. PEG 诱导鸡红细胞融合影响因素探讨[J]. 德州学院学报, 2011, 27(2): 54-58
Ma Yun, He Kun, Wang Xiao-yu, et al. Study on Influential Factors of Chicken Red Blood Cell Fusion Induced by PEG [J]. Journal of Dezhou University, 2011, 27(2): 54-58
- [14] 李保华. 细胞融合技术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(15): 6187-6188, 6207
Li Bao-hua. Research Progress in Cell Fusion Technique [J]. Journal of Anhui Agri. Sci, 2008, 36(15): 6187-6188, 6207
- [15] 李秀兰, 姜曰水. 聚乙二醇诱导细胞融合影响因素探究[J]. 菏泽学院学报, 2007, 29(5): 79-82
Li Xiu-lan, Jiang Yue-shui. A Study on the Fusion Frequency with PEG as the Revulsant [J]. Journal of Heze University, 2007, 29(5): 79-82
- [16] 吴绍函, 许辰琪, 温馨, 等. Mg^{2+} 浓度对细胞融合效果的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(11): 2037-2039, 2099
Wu Shao-han, Xu Chen-qi, Wen Xin, et al. The effect of Mg^{2+} concentration on cell fusion. [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(11): 2037-2039, 2099
- [17] 王克明. 细胞融合技术及其进展 [J]. 浙江科学学院学报, 2004, 16 (2): 113-116
Wang Ke-ming. Technology and advances of cell fusion [J]. Journal of Zhejiang University of Science and Technology, 2004, 16 (2): 113-116
- [18] 鲁云凤, 杨柯金, 杨建伟, 等. 蟾蜍红细胞融合条件的正交设计优化[J]. 生物技术, 2009, 19(6): 44-45
Lu Yun-feng, Yang Ke-jin, Yang Jian-wei, et al. Uniform Orthogonal Test and Optimal Condition of Toad Red Blood Cells Fusion [J]. Biotechnology, 2009, 19(6): 44-45