

搅拌式生物反应器中造血细胞的灌注培养

Perfusion Culture of Hematopoietic Cells in a Stirred Tank Bioreactor

迟占有, 姜 华, 蔡海波, 谭文松*, 戴干策

CHI Zhan-You, JIANG Hua, CAI Hai-Bo, TAN Wen-Song* and DAI Gan-Ce

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

摘 要 为了消除造血细胞静态培养中存在的浓度梯度和搅拌悬浮培养时换液引起的波动, 为造血细胞体外扩增提供更理想的培养环境和操作方式, 利用自主开发的造血细胞重力沉降截留系统结合有溶氧和 pH 控制的生物反应器进行了脐血造血细胞的灌注培养。两次灌注培养中总细胞分别扩增 11.5 和 18.6 倍, 扩增倍数最大时, CFU-Mix 分别扩增 23.2 倍和 20.4 倍, CFU-GM 扩增 13.9 倍和 21.5 倍, BFU-E 扩增 8.0 倍和 6.9 倍, CD34⁺ 细胞扩增 17.1 倍和 15.4 倍。培养到 12d 时, 第一次实验由 267×10^6 单个核细胞扩增得到 1082×10^6 个总细胞, 6.31×10^6 个 CFU-GM, 6.2×10^6 个 CFU-Mix 和 23×10^6 个 CD34⁺ 细胞, 第二次实验由 180×10^6 单个核细胞扩增得到 1080×10^6 个总细胞, 4.65×10^6 个 CFU-GM, 11.0×10^6 个 CFU-Mix 和 25.0×10^6 个 CD34⁺ 细胞, 这达到了临床规模, 由于控制了较低的溶氧和稳定的培养环境, 细胞中干/祖细胞含量显著高于方瓶。但灌注培养到后期细胞密度达到较高后, 细胞生长受到抑制, 这应该是由细胞密度过高本身所引起。搅拌式反应器中进行灌注培养有利于造血干/祖细胞的进一步扩增, 培养得到的细胞中干/祖细胞含量较高, 培养规模达到了临床要求, 但过高的细胞密度将对造血细胞的生长产生抑制。

关键词 脐血, 造血细胞, 生物反应器, 灌注培养

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)04-0622-06

Abstract To optimize the culture environment and protocol of hematopoietic cells' expansion, avoiding the fluctuation caused by medium changing in stirred culture and concentration gradient in static culture, the hematopoietic cells from cord blood (CB) were cultured in a stirred bioreactor connected with a cell retention system, which is a gravity sedimentation settler designed for hematopoietic cell. Total cells expanded 11.5 and 18.6 fold respectively in the twice perfusion stirred cultures, in which CFU-Mix was expanded 23.2 and 20.4 fold, CFU-GM 13.9 fold and 21.5 fold, BFU-E 8.0 fold and 6.9 fold, CD34⁺ cells 17.1 fold and 15.4 fold. After 12-day culture, it was obtained that 1082×10^6 total cells, 6.31×10^6 CFU-GM, 6.2×10^6 CFU-Mix and 23×10^6 CD34⁺ cells from 267×10^6 CB mononuclear cells (MNC) in the first culture, and 1080×10^6 total cells, 4.65×10^6 CFU-GM, 11.0×10^6 CFU-Mix, and 25.0×10^6 CD34⁺ cells from 180×10^6 CB MNC. These two cultures met to the clinical scale. Due to the optimized dissolved oxygen (DO) and stable culture environment, the rate of stem/progenitor cells to total cells in the perfusion culture was higher than that in T-flask cell-retention feeding culture. But the cell growth was inhibited in the later phase of perfusion culture, when the cell density is high. The inhibition should be attribute to the high cell density

Received: February 28, 2005; Accepted: April 27, 2005.

This work was supported by a grant from the Shanghai Modern Biology and Medicine Foundation (No. 004319003).

* Corresponding author. Tel: 86-21-64253394; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

上海市现代生物与医药项目基金资助 (No. 004319003).

itself. The perfusion culture environment in bioreactor with optimal DO and pH controlling is more favorable for stem/progenitor cells' maintenance and expansion, and the expanded cells' number has reached a clinical scale. But the high cell density in the later phase of perfusion culture caused inhibition to mature hematopoietic cell's growth.

Key words cord blood, hematopoietic cell, bioreactor, perfusion

灌注培养方式能维持稳定的培养环境、减少不必要的环境波动、及时补充营养物和移出代谢物,从而有利于细胞的扩增、容易实现高密度培养,在动物细胞培养中是较理想的操作方式。几种灌注培养系统也被开发和应用于灌注培养造血细胞中,总细胞和干/祖细胞都有较大扩增^[1]。但作为静态培养系统,细胞沉在底部,氧分压和细胞因子浓度存在梯度,细胞所处微环境的氧传递和细胞因子的传递可能存在限制,这可能是造成细胞不能进一步扩增的因素^[1],为克服此矛盾,搅拌式生物反应器被用于造血细胞的悬浮培养^[2,3],在原来的工作中我们也开发了用于造血细胞培养的搅拌式生物反应器^[4],并用于脐血造血细胞的搅拌悬浮培养^[5],本文中我们将自行设计和开发的造血细胞重力沉降截留系统与此反应器相结合,实现了造血细胞的搅拌悬浮灌注培养。

1 材料与方法

1.1 脐血(CB)的采集和单个核细胞(MNC)的分离

脐血由上海国际和平妇婴保健院提供。脐血经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心后,收集单个核细胞,并以IMDM培养基洗涤2次。

1.2 培养基和细胞因子

体外培养基为IMDM(Gibico公司),使用时添加20%胎牛血清(FBS),以及SCF(50 ng/mL)、IL-3(5 ng/mL)、IL-6(20 ng/mL)、G-CSF(2.0 ng/mL)和GM-CSF(2.0 ng/mL),其中SCF、IL-6购于北京宝赛生物技术公司,IL-3购于Pepro-Tech(Rocky Hill, NJ),G-CSF购于上海三维制药厂,GM-CSF购于上海海济生物技术有限公司。

1.3 造血细胞的集落检测

集落的检测体系为IMDM培养基,添加20%胎牛血清,4 mmol/mL谷氨酰胺(Sigma),含0.9%甲基纤维素(4000cp, Sigma),以及人重组造血生长因子SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、EPO,其浓度分别为50 ng/mL、20 ng/mL、20 ng/mL、20 ng/mL、20 ng/mL和2 u/mL,并添加1%牛血清白蛋白(BSA)。取(1~3)×10⁴培养或没培养的单核细胞加入0.5 mL集落培养基中,置于37℃、5% CO₂、湿度饱和的二氧化碳培

养箱中培养12d后,记CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix数,其中CFU-Mix为至少含有粒细胞和红细胞的集落。

1.4 细胞表型分析

流式细胞仪分析中所用抗体为Pharmingen公司产品,标记抗体后的细胞用流式细胞仪(BD公司)分析,结果用Lysis II软件处理。

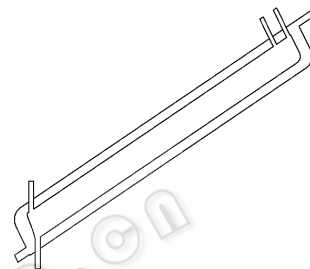


图1 带有水浴夹套的沉降器示意图

Fig. 1 Scheme of inclined cell settler with water-jacket

1.5 造血细胞沉降截留系统

实验中所用造血细胞沉降截留系统为带有水浴夹套的倾斜式沉降器(示意如图1),其制作材料为生化低毒玻璃,尺寸为 $W = 2\text{ cm}$, $H = 1\text{ cm}$, $L = 30\text{ cm}$ 。细胞悬液从带水浴夹套的倾斜式沉降截留装置底端的上表面的进口流入,从底端下表面的出口流出,回流至生物反应器,清液溢流口位于上端的上表面。在反应器中培养的细胞悬浮液经过此沉降截留装置后,实现了细胞与培养液的分离过程,分离后,细胞回流至反应器中继续培养,而分离出的废液(培养基)流出系统,同时通过反应器入口加入相同流量的新鲜培养基,这就实现了细胞在反应器中的灌注培养。

1.6 造血细胞生物反应器的灌注培养

图2为连续灌注培养装置示意图,采用上流式

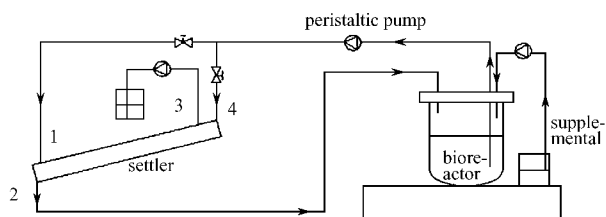


图2 连续灌注培养装置示意图

Fig. 2 Scheme of the continuous perfusion culture system

沉降过程对培养中的造血细胞进行截留,细胞从1号口进入沉降系统,2号口回流,3号口为废液出口,而3号口上的4号口平时关闭,在需要反冲时,关闭1号和3号口,打开4号口以较大流量反冲。

进行细胞培养时,先用上述培养基悬浮脐血单个核细胞,在T-175方瓶(Nunc)中以 2×10^6 cells/mL的密度培养4d后,以 0.6×10^6 cells/mL(第一批)或 0.5×10^6 cells/mL(第二批)接种至反应器中,反应器的温度控制为 37°C ,pH控制在7.15,溶氧控制为饱和溶解空气的25%,搅拌转速为30r/min。培养到第6天时开始进行灌注培养,灌注速率为 $D/V = 1/3$ (d^{-1})培养到10d后,提高为 $D/V = 1/2$ (d^{-1})。实验以T-25型方瓶(Nunc公司)培养作对照,接种密度与反应器中相同,每瓶装液7mL,置于 37°C 、5%二氧化碳、湿度饱和的二氧化碳培养箱中培养,方瓶培养换液时按相应反应器的灌注速率进行细胞回流换液。

转瓶中换液培养有两种方式,稀释换液和细胞回流换液。稀释换液时,将细胞混合均匀,取出一定体积的细胞悬浮液,然后加入等量含有同样细胞因子的新鲜培养基,细胞回流换液时,取出相应体积的细胞液,离心后小心倒掉上清液,用新鲜培养基悬浮细胞后转移回瓶中。

1.7 葡萄糖、乳酸的测定

采用YSI2000型选择性生化分析仪(Yellow springs, USA)测定培养环境中的葡萄糖和乳酸浓度。

2 结果与讨论

2.1 细胞扩增

两次实验(分别以a和b表示)中总细胞的扩增如图3所示,由图可见,a实验中反应器中细胞扩增倍数一直没有方瓶高,直到14d后,方瓶中细胞不再生长,而反应器中继续生长,最终反应器中扩增倍数高于方瓶,但a中培养初期反应器中细胞扩增倍数不如方瓶高,原因应该在于第一次实验中存在一定的细胞损失。这次实验中发现沉降器与反应器的连接管直径过大(5mm),细胞在管中沉积而不能及时返回反应器,从而造成了细胞的损失。第二次实验中,所有连接管均采用了直径较小(1mm)的硅胶管,没有细胞损失,这次实验细胞扩增倍数一直高于方瓶,两次实验总细胞最大扩增倍数分别为11.5和18.6倍。

两批实验都表明,反应器灌注培养中CFU-Mix(图4)的扩增有很大优势,方瓶中CFU-Mix的扩增

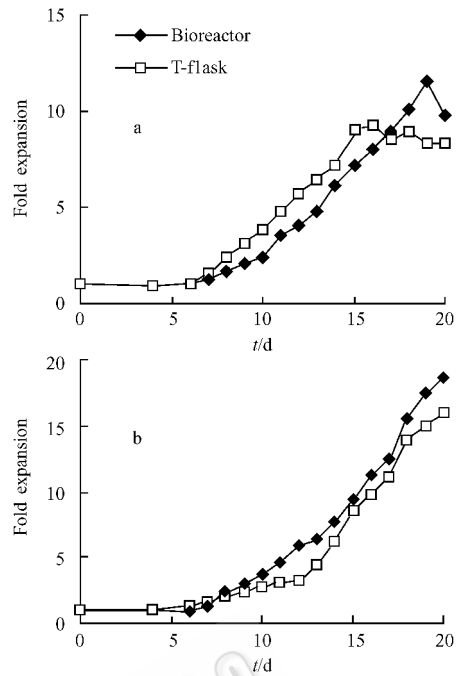


图3 灌注培养中总细胞的扩增

Fig.3 The expansion of total cell in perfusion culture

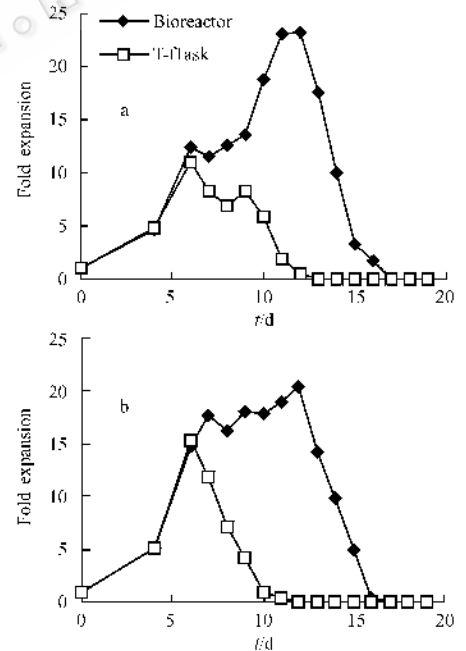


图4 灌注培养中CFU-Mix扩增

Fig.4 The expansion of CFU-Mix in perfusion culture

在第6~7天即已达到最大,而后扩增倍数快速下降,但反应器中扩增倍数一直增加,到12d左右达到最大,而后逐渐下降。这说明利用有溶氧控制的搅拌式反应器结合灌注培养能更好地维持造血干/祖细胞的扩增,反应器中CFU-Mix最大扩增倍数为23.2倍和20.4倍。

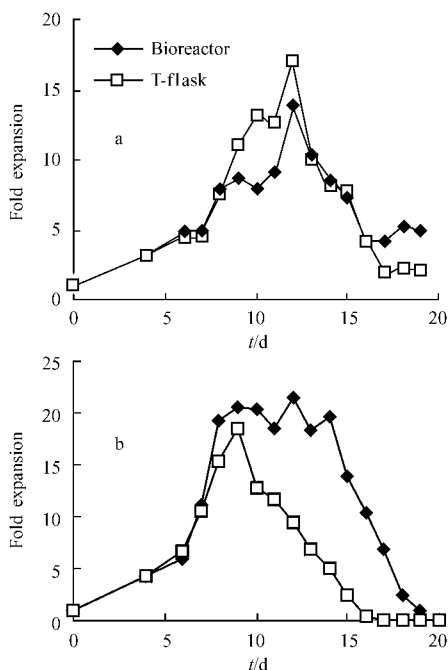


图5 灌注培养中 CFU-GM 的扩增

Fig.5 The expansion of CFU-GM in perfusion culture

CFU-GM 的扩增如图 5 所示,第二批实验反应器中最大扩增倍数高于方瓶,而且扩增维持时间较长,最大时扩增 21.5 倍。但第一批效果不明显,反应器中最大扩增倍数为 13.94 倍,这应该与总细胞减少有关,因为从 CFU-GM 的密度来看,反应器中略高于方瓶中。

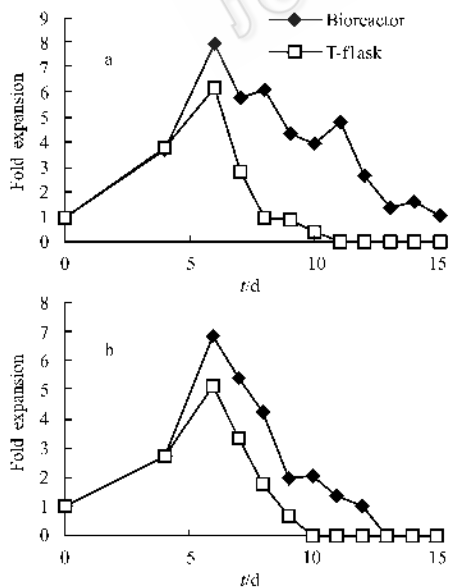


图6 灌注培养中 BFU-E 扩增

Fig.6 The expansion of BFU-E in perfusion culture

BFU-E 扩增倍数没有 CFU-GM 高,最大时,反应器中扩增倍数分别为 8.0 倍和 6.9 倍,反应器 10d

后仍能检测到红系集落,但此时方瓶中几乎检测不到(图 6)。

CD34⁺ 细胞的扩增中,反应器显著高于方瓶中的扩增倍数,方瓶中 CD34⁺ 细胞最大扩增倍数在 7d,而后下降,而反应器中在 7d 后继续扩增,14d 时,两批实验中分别扩增 17.1 倍和 15.44 倍(图 7)。

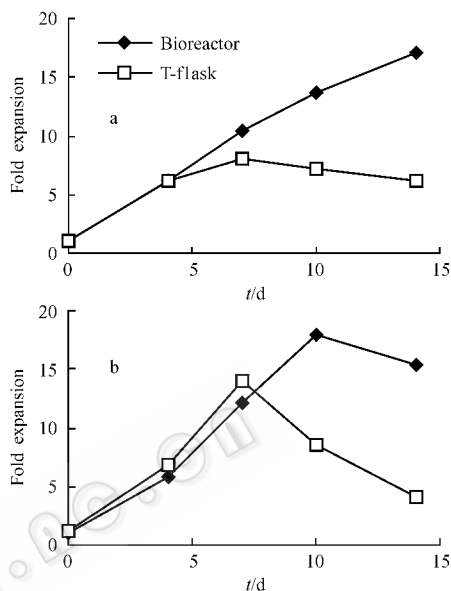


图7 灌注培养中 CD34⁺ 细胞的扩增

Fig.7 The expansion of CD34⁺ cells in perfusion culture

由于单份脐血细胞量的限制,在反应器灌注培养的同时设置反应器换液培养或静态灌注培养作为对照是不现实的,因此本实验中采用的对照是简单的方瓶培养。此前,我们进行了在该反应器中的换液培养实验^[5],与反应器换液培养相比,灌注培养中 12d 时 CFU-GM 的扩增倍数与之相当,但两批灌注培养中 CFU-Mix 的扩增倍数都较换液培养中高出较多,这说明灌注培养中环境比较稳定,避免了换液波动,更有利于干/祖细胞的维持。

2.2 扩增得到细胞的总量和干/祖细胞含量

表 1 为两次灌注实验中实际培养得到的细胞总数,培养到 12d 时,第一次实验由 267×10^6 单个核细胞扩增获得了 1082×10^6 个总细胞, 6.31×10^6 个 CFU-GM, 6.2×10^6 个 CFU-Mix 和 23×10^6 个 CD34⁺ 细胞,第二次实验由 180×10^6 单个核细胞扩增得到 $1,080 \times 10^6$ 个总细胞, 4.65×10^6 个 CFU-GM, 11.0×10^6 个 CFU-Mix 和 25.0×10^6 个 CD34⁺ 细胞。

最近 Aastrom 公司利用其开发的连续灌注系统,以添加 FBS、HS 和细胞因子 PIXY321、FL、EPO 的培养基对每份脐血单个核细胞的一部分(通常为 1×10^6 个细胞,其余细胞直接移植)进行扩

增,用得到的细胞进行了 28 个病历的 I 期临床实验。结果表明,在其自动连续灌注系统中培养 12d 后,总细胞和集落形成细胞都有所扩增(扩增倍数如表 1)。扩增后细胞的临床实验表明体外扩增脐血造血细胞可以达到临床规模,而且安全可靠^[6]。把我们的结果与之相比(表 1),发现 Aastorm 系统中总细胞平均扩增 2.9 倍,我们的系统中两次实验分别为 4.05 倍和 6.0 倍,Aastorm 系统中 CFU-GM 扩增倍数非常高,而我们的系统中 CFU-GM 分别扩增 13.9 倍和 21.5 倍,CFU-Mix 分别扩增 23.2 和 20.4 倍。

表 1 反应器灌注培养与 Aastrom 临床实验中细胞扩增结果的比较*

Table 1 Comparison of the expansion result of our bioreactor and Aastrom clinical result

	Result of Aastrom			Perfusion culture 1 in our bioreactor			Perfusion culture 2 in our bioreactor		
	0 day	12 day	Expansion fold	0 day	12 day	Expansion fold	0 day	12 day	Expansion fold
10 ⁶ cells									
total cells	216	587	2.9	267	1 082	4.05	180	1 080	6.00
CFU-GM	0.123	8.40	88.3	0.453	6.31	13.90	0.216	4.65	21.53
BFU-E				0.179	0.45	2.67	0.148	0.15	1.01
CFU-Mix				0.267	6.20	23.21	0.540	11.00	20.37
Total CFU				0.90	12.96	14.41	0.90	15.80	17.47
CD34 ⁺ cells				1.50	23.00	15.37	1.51	25.02	16.72
CD34 ⁺ lin-cells	2.3	1.6	0.9						

* The results of Aastrom were derived from reference[6].

比较 12d 时反应器和方瓶中各系祖细胞(表 2)的含量发现,方瓶中仅 CFU-GM 的含量与反应器中相当,而对于 CFU-Mix 和 BFU-E 培养到 12d 时方瓶中已经基本检测不到,这表明反应器中灌注培养更能维持干/祖细胞的扩增。比较 12d 时的干/祖细胞含量还具有临床意义,因为 10~12d 是细胞培养后临床应用的最佳收获时间,如果收获过早,细胞扩增倍数不高,总细胞和干/祖细胞达不到数量要求,过晚则细胞中干/祖细胞含量下降至较低水平,反应器灌注培养得到的细胞中 12d 时仍含有较高数量的干/祖细胞,这无疑有利于其临床应用。

表 2 12d 时灌注培养中各类祖细胞的含量

Table 2 The rate of lineage progenitor cells in 12th day

	CFU-Mix	CFU-GM	BFU-E	CD34 ⁺ cell
	/1000cells	/1000cells	/1000cells	rate* /%
a Bioreactor	5.73	5.83	0.42	3.15
T-flask	0.09	5.06	0.00	1.05
b Bioreactor	10.19	4.31	0.14	3.99
T-flask	0.00	3.50	0.00	2.44

* The rate of CD34⁺ cells in 10th day

2.3 细胞密度过高时细胞生长抑制问题

与原来进行的稀释换液培养^[5]相比,灌注培养到第 18 天时总细胞扩增倍数不高,为此我们比较了两者在第 12 天和 18 天的扩增倍数(如表 3),发现灌

Aastrom 实验采用了仅检测 CFU-GM 的集落分析体系,而我们的集落分析实验中,是在同一培养系统中分别计数 CFU-Mix、CFU-GM 和 BFU-E,由于采用了不同的集落分析体系,这些结果难以进行直接比较。但在我们的体系中的 CFU-Mix 是比 CFU-GM 更原始的祖细胞,在完全向 CFU-GM 诱导的体系中应该可以分化为 CFU-GM。因此,从这个角度讲,我们培养得到的总细胞和祖细胞的数量都高于 Aastrom 实验中的结果,有希望应用于临床试验。

注培养第 12 天的扩增倍数与换液培养相当,但到第 18 天时,远不及换液培养中扩增倍数高,而从第 18 天扩增倍数与第 12 天扩增倍数之比来看,灌注培养要低的多,由此可见细胞生长的抑制发生在灌注培养的后期。

表 3 不同培养方式中细胞扩增倍数分析

Table 3 The analysis of expansion fold in different culture protocol

	Dilution	Dilution	Perfusion culture 1	Perfusion culture 2
	Feeding culture 1	Feeding culture 2		
Expansion Fold on 12th Day	5.72	5.69	4.05	6.00
Expansion Fold on 18th Day	37.22	26.29	10.08	15.56
18th Day / 12th Day	6.51	4.62	2.49	2.59

培养进行到后期时,细胞基本为成熟细胞,而成熟细胞在临床上有缩短粒细胞、血小板恢复期等作用,如何扩增得到更多的成熟细胞也是造血细胞体外扩增的重要内容之一,因此,其抑制问题有必要进行深入的探讨。

为此,考查了灌注培养中细胞乳酸和葡萄糖的代谢情况,如图 8 所示,左图为乳酸和葡萄糖的浓度变化,右图为其代谢速率,由图看见,灌注培养环境中乳酸维持在 25mmol/L 以下,葡萄糖则维持在 10

mmol/L 以上,而原来的研究表明^[7],自身代谢产生的乳酸即使超过 30mmol/L 时也不会引起对细胞生长的抑制,而反应器 pH 一直控制在 7.15,也不可能是由于 pH 下降引起,因此,对生长的抑制应该是另有原因。

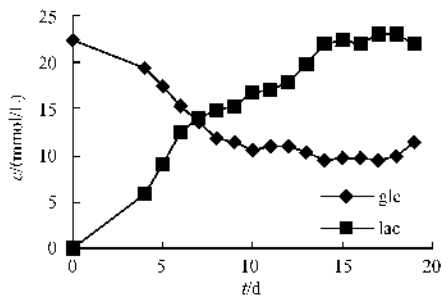


图8 灌注培养中乳酸和葡萄糖的代谢情况

Fig.8 The metabolic of lactate and glucose in perfusion culture

为证明该抑制是否是由于营养物质限制或代谢物抑制引起,我们利用转瓶进行了换液培养实验,实验中所用细胞因子与反应器中相同,单个核细胞接种密度为 2.0×10^6 cells/mL,稀释换液频率为每 2 天换液 50%,而细胞回流换液为每天换液 50%,总细胞和 CFU-GM 的扩增结果结果如图 9 所示,由图看见,与稀释换液相比,细胞回流换液时细胞扩增显然受到了抑制,但在此换液速率下,细胞密度最终生长达到 1×10^7 cells/mL,即每天换液 50% 的换液频率可维

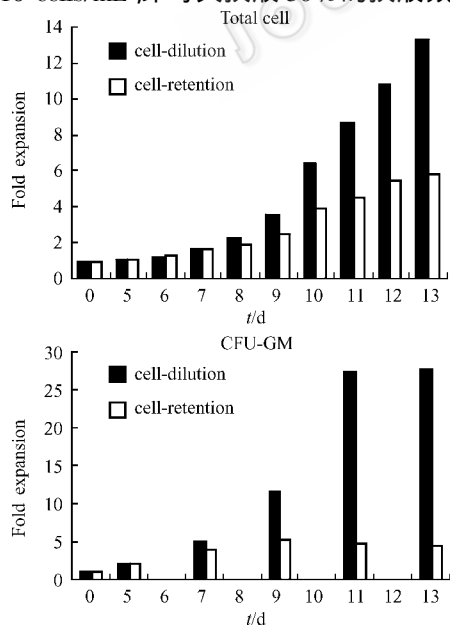


图9 换液方式对转瓶中总细胞和 CFU-GM 扩增的影响

Fig.9 The effect of feeding protocol on expansion of total cell and CFU-GM in spinner flask

持 1×10^7 cells/mL 的细胞生长,与之相比,反应器灌注培养中细胞密度最终不超过 7×10^6 cells/mL,因此,在灌注速率为 $D/V = 0.5$ 情况下应该不是由于营养物质限制或代谢物抑制而引起细胞生长的抑制。

既然这种抑制与培养环境中营养物质限制和代谢物抑制无关,则这很可能是由于培养到后期过高的细胞密度引起。而且, Yang 等^[8]对造血细胞代谢的研究也表明,造血细胞的乳酸代谢速率会受到比生长速率和细胞密度的影响,比生长速率越快,则乳酸代谢越快,但细胞密度越高,乳酸代谢受到抑制,这就是说,过高的细胞密度会抑制乳酸的代谢,而乳酸代谢的抑制跟生长缓慢是相联系的,由此可见,灌注培养到后期细胞密度较高后,细胞的生长受到过高细胞密度的抑制而不能进一步扩增。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Cabrita GJ, Ferreira BS, da Silva CL *et al.* Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *Trends in Biotechnology*, 2003, **21**(5): 233–240
- [2] Collins PC, Nielsen LK, Patel SD *et al.* Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. *Biotechnology Progress*, 1998, **14**: 466–472
- [3] Kim Byung-soo. Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor. *Biotechnology Letters*, 1998, **20**: 595–601
- [4] Chi ZY(迟占有), Xia QM(夏泉鸣), Kang ZZ(康自珍) *et al.* *In vitro* culture of hematopoietic cells and development of bioreactor. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003, **19**(5): 587–592
- [5] Chi ZY(迟占有), Jiang H(姜华), Cai HB(蔡海波) *et al.* *Ex vivo* culture of umbilical cord blood hematopoietic cells in stirred tank bioreactor with a feeding protocol. *Journal of East China University of Science and Technology*(华东理工大学学报), in press
- [6] Jarosca J, Goltry K, Smith A *et al.* Augmentation of umbilical cord blood(UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aastrom Replicell system. *Blood*, 2003, **101**(12): 5061–5067
- [7] Patel SD, Papoutsakis ET, Winter JN *et al.* The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. *Biotechnology Progress*, 2000, **16**(5): 885–892
- [8] Yang H, Papoutsakis ET, Miller WM. Model-based estimation of myeloid hematopoietic progenitor cells in *ex vivo* cultures for cell and gene therapies. *Biotechnology & Bioengineering*, 2001, **72**: 144–155