

杂交瘤细胞在CelliGen培养器中大量连续培养

陈 贻 锴

(福建医学院基因工程研究室, 福州)

鼠-鼠杂交瘤细胞DA4-4(ATCC, HB57)分泌抗人IgM的单克隆抗体 IgG₁, 该细胞被培养在1.5L CelliGen-中空纤维柱连续灌注系统中, CelliGen细胞培养器显示很低的机械剪切力, 提高搅拌速度到150rpm增加了氧的传递, 但不杂交瘤细胞造成损害。在连续培养时, DA4-4细胞密度可达 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上, 单克隆抗体浓度高达 4.75mg/ml, 该培养系统每日可收获抗体1.0g左右。

关键词 杂交瘤细胞; 搅动式细胞培养器; 连续灌注系统; 单克隆抗体。

随着人们在生物学、医学、农业和工业等领域广泛使用单克隆抗体, 促进了大量培养杂交瘤细胞和大量生产单克隆抗体技术的发展, 各种悬浮培养器、中空纤维^[1]、微胶囊、固定化细胞^[2]、灌注培养系统都相应而生。中空纤维和微胶囊等固定细胞培养器提供了低或无机械剪切力, 能不断补充各种营养成分供杂交瘤细胞生长, 使细胞保持在高密度的状态。但固定细胞培养技术易造成细胞的不均匀状态, 影响细胞的活力和抗体表达, 且培养空间有限, 不易放大, 从而限制了大规模生产的应用。搅拌式细胞培养器是将细胞直接悬浮培养在培养器中, 依靠机械搅动维持细胞和培养液处于均匀的状态, 这样细胞培养的温度、pH、溶解氧(DO)和葡萄糖含量等一些重要的生物学参数容易得到监测和控制, 且易放大, 是工业化生产单克隆抗体的方向。这些搅拌式细胞培养器已经发明并成功地应用于单克隆的生产^{[3][4][5]}。但是很多杂交瘤细胞对机械剪切力十分敏感, 稍微高的搅拌速度就对细胞造成损伤, 在一定程度上限制了他们的应用。鉴于此, 美国New Brunswick Scientific Co. 发明了一种称为

CelliGen搅拌式细胞培养器, 设计一特殊的细胞提升式搅拌器, 具有搅拌时机械剪切力低, 培养液不出现泡沫等特点^[6]。我们连续培养杂交瘤细胞于1.5L Celli Gen培养器中, 结果获得了高密度的细胞和高浓度的抗体。

材 料 和 方 法

(一) 细胞和细胞传代

DA4-4 为鼠-鼠杂交瘤细胞, 它分泌单克隆抗体IgG₁, 为抗人IgM 抗体, 获自 American Type Culture Collection (ATCC, HB57)。

DA4-4细胞生长在Dulbeccos改良的Eagles培养基中(DMEM), 并补充有葡萄糖(4.5mg/ml), NCTC-135(10%)、碳酸氢钠(3.7mg/ml)、草酸(150μg/ml)、胰岛素(75.5ng/ml)、2-巯基乙醇(3.92μg/ml)、丙酮酸钠(110μg/ml)和庆大霉素(50μg/ml), 这些培养基和添加物购自美国Gibco公司和Sigma公司, 培养基中还加有 Primatone RL (0.25%,

本文于1991年6月20日收到。

Sheffield Products, USA) 和小牛血清 (5% Hyclone, USA)。

DA4-4 常规地生长在 T-塑料扁瓶中, 置 6% CO₂、37°C 的二氧化碳孵箱中培养, 每 3—4 天传代一次。

(二) 细胞培养系统(图 1)

1.5L CelliGen 培养器与中空纤维柱 (Hollow fiber cartridge, A/G Technology #CFP1-E-4) 通过管道联结起来, 设置必需的蠕动泵, 构成连续培养系统。该系统配有精密的温度、pH、转速、DO 探针和水平控制仪, 随时监测和自动控制这些参数。

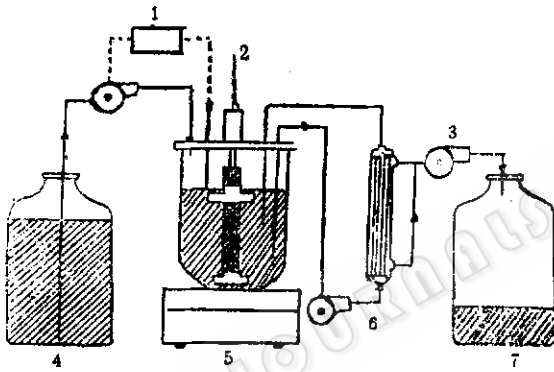


图 1 CelliGen-中空纤维连续灌注系统示意图
Fig.1 Schematic drawing of the perfusion system using a CelliGen bioreactor and hollow fiber cartridge

1. 水平控制仪, Horizontal control;
2. 气体, Gaes;
3. 蠕动泵, Peristaltic pump;
4. 新鲜培养基, Fresh medium;
5. 细胞培养缸, CelliGen bioreactor
6. 中空纤维柱, Hollow fiber cartridge;
7. 消耗培养基, Consume medium of cell

(三) 细胞计数及其活力的检查

每天直接从培养器内采集细胞悬液, 用血球计数板计算细胞浓度, 细胞的活性则用台盼兰排斥试验判定^[7]。

(四) 代谢产物的检测

培养液中葡萄糖、乳酸和 NH₄⁺ 的含

量采用酶学方法测定, 这些试剂均购自美国 Sigma 公司, 并参照厂家推荐的方法操作 (Sigma diagnostics No.115-uv, No. 826-uv 和 No.170-uv)。

(五) 单克隆抗体含量的测定

参照 Velez 等人^[8]的方法, 采用放射免疫扩散试验 (RID) 和酶联免疫试验 (ELISA) 来测定。对于 RID 试验, 以 7.5μg/ml 浓度的兔抗鼠 IgG 溶解在 1.5% 琼脂糖凝胶中制板并打孔, 每孔加 5μl 待测样品, 平板密封并置 37°C, 72 小时后将平板染色, 与鼠 IgG 标准样品比较, 根据蛋白扩散圈的直径计算其含量。

对于 ELISA 试验, 以 10μg/ml 浓度的人 IgG 溶液作为抗原包被 96 孔塑料平板。酶结合物为过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 酶反应底物为 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline sulfonate 和 H₂O₂ (ABTS)。用酶标检测仪读出样品显色反应的 OD 值, 并与鼠抗人 IgM 的 IgG 标准品比较, 计算待测样品的蛋白含量。

结果和讨论

CelliGen 细胞培养器的工作容积为 1.3L, DA4-4 细胞的接种浓度为 15 × 10⁴/ml, 开始给定的培养条件为:

温度	37°C
pH	7.10
通气量	0.2L/mim
转动速度	45rpm
DO	45% 空气饱和度

在培养的最初几天, 细胞增殖显示相对静止, 从第 5 天开始, 细胞明显增加, 其浓度达接种量的 2 倍 (29 × 10⁴/ml)。这时考虑到营养的消耗和代谢产物的积累, 启动中空纤维柱连续灌注系统进行运转, 每日更换培养液量为 1 L。到培养的

8天, 活细胞浓度已增加到 1.62×10^6 /ml, 此时溶解氧实际值为 32% 空气饱和度, 达不到所给定的 45%, 显示溶解氧供给开始不足。

随着细胞大量增殖, 培养罐中细胞浓度不断升高, 溶氧值则大幅度下跌。为了增加氧的传递能力, 我们用纯氧取代 CelliGen 四种气体 (O_2 、 N_2 、 CO_2 和空气) 的供应, 以最大增加氧分压, 并逐渐提高搅拌速度。结果显示, 纯氧通气对细胞没有毒性, 不影响细胞的活力。增加搅拌速度, 对促进细胞生长有明显作用。在培养的 11 天, 细胞浓度提高到 8.38×10^6 /ml, 此时搅拌器的转速为 80rpm, 溶氧为 1%, pH 为 6.93, 为了将 pH 控制在 7.10 左右, 启动硷泵, 自动地往培养罐滴加 0.5N NaOH 溶液。

从培养的 12 天到 22 天, 搅拌器的转动速度基本控制在 90rpm, 每日灌注量为 1.3—1.8L。当细胞浓度增加到 18.00×10^6 /ml 后, 就不再继续增加, 而维持在 15×10^6 /ml 左右。此期间, 溶氧值为 0, 看来, 溶氧供应不足是限制细胞浓度继续增加的一个主要障碍。从培养的 23 天起, 每 2 天增加 10rpm 的搅拌速度。转速增加到 160rpm, 并未见细胞受损, 反而有利细胞增殖, 细胞数达 25×10^6 /ml, 但溶氧一直显示为零。当转速为 170rpm 时, 活细胞浓度达 32×10^6 /ml, 溶氧提高到 8—16%。在这个过程中, 每日新鲜培养液的灌注量并没有改变, 显而易见, 搅拌速度的提高, 加速了氧的气液传递, 结果培养液中溶解氧的含量增加, 从而满足了更多细胞氧的需要, 使细胞不断增生。这也说明, CelliGen 培养器机械剪切力很低, 大幅度提高搅拌速度, 并未对细胞造成明显的损伤。依靠纯氧通气和增加搅拌速度, CelliGen 连续灌注系统完全可以维持生长

的细胞浓度在 20×10^6 /ml 以上。但这个过程中, 培养器溶氧一直为 0, 表明 CelliGen 系统所提供的溶氧能力还有一定限制, 有待进一步改进。在培养的 39 天和 40 天, 转速提高到 180rpm, 培养液中活细胞数直线下跌, 为 11.8×10^6 /ml 和 2.2×10^6 /ml, 而溶氧值升到 58% 和 31%。显示此搅拌速度对细胞造成明显的损害。细胞数的减低, 则造成 DO 值的回升。图 2。

在细胞连续培养时, 死细胞浓度亦随着活细胞的增加而大量增加, 于培养的 19 天, 活细胞和死细胞浓度都达 15×10^6 /ml, 然后死细胞浓度超过活细胞浓度, 在 $16—25 \times 10^6$ /ml 范围内波动, 于培养的 33 天起, 死细胞浓度又低于活细胞浓度, 但仍维持在 $18—24 \times 10^6$ /ml 之间。在 39 和 40 天, 活细胞浓度大量降低, 死细胞数为 23×10^6 /ml 和 17×10^6 /ml, 这可能是 CelliGen 培养器搅拌系统的低剪切力, 不仅活细胞不易受损, 连死细胞也不易被裂解, 这样死细胞在培养罐内的累积, 造成高密度死细胞的现象。图 3。

DA4-4 细胞新陈代谢产物的测定显示, 在培养的 1—10 天, 细胞浓度低于 6×10^6 /ml 时, 培养液中葡萄糖的含量在 1mg/ml 以上, 而当活细胞浓度超过 10×10^6 /ml 时, 葡萄糖浓度低于 0.13mg/ml, 提示培养液的一些营养成分明显不足。于培养的 19 天, 细胞浓度超过 15×10^6 /ml, 我们开始补充更多的葡萄糖, 增补的培养基葡萄糖浓度从 4.5mg/ml 提高到 6.5mg/ml, 结果细胞浓度超过 20×10^6 /ml, 培养液中葡萄糖浓度维持在 0.15mg/ml 左右。说明提高一些营养成分的含量还是必要的。当然这个值比 Ve'ez 等人^[9] 提议的维持培养液中葡萄糖浓度在 1mg/ml 水平有很大距离, 但这样低浓度的葡萄糖, 并未见对细胞生长和抗

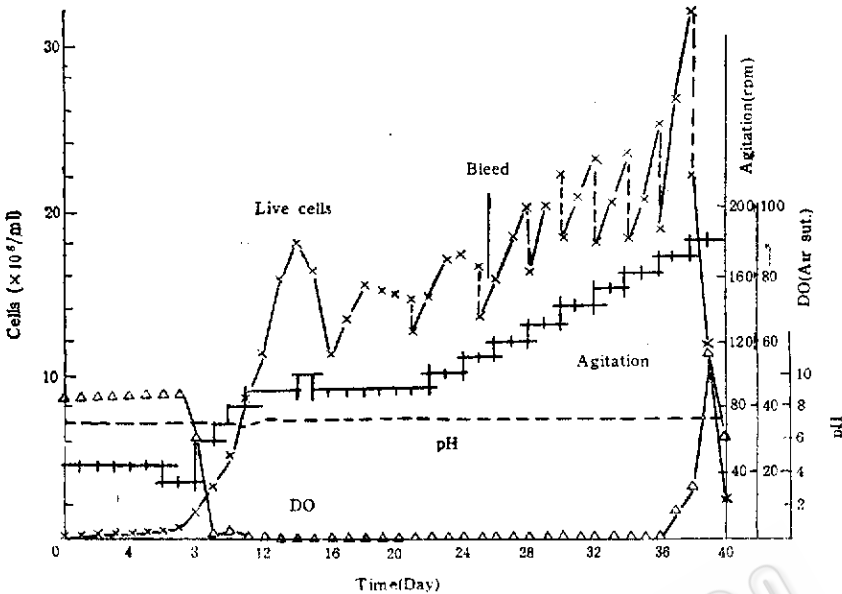


图2 培养条件对DA4-4细胞生长的影响
Fig.2 Influence of culture on DA4-4 cell growth

体的分泌有不良的影响。

培养液中乳酸的浓度随着细胞浓度的增加而增加，当细胞浓度超过 $11 \times 10^6/ml$ (12天)，乳酸的浓度达 $3.0mg/ml$ 。在细胞浓度继续增加过程中，乳酸浓度介于 $3.0-5.0mg/ml$ 之间，未见对细胞造成毒性作用。但培养后期，转速增加到 $160rpm$ 以上，乳酸浓度呈线性下降，达到 $1.5mg/ml$ 左右。显然细胞搅拌提升器的转速达到 $160rpm$ 时，其机械性剪切力已影响到细胞的正常代谢，虽然细胞尚未死亡，但活力受到影响，乳酸的产生减低。

细胞培养液中 NH_4^+ 浓度基本上维持 $45-70\mu g/ml$ 之间，仅仅当搅拌速度提高到 170 和 $180rpm$ 时， NH_4^+ 浓度分别为 $83.6\mu g/ml$ 和 $127.4\mu g/ml$ 。细胞浓度跌至 $2.2 \times 10^6/ml$ 。Reuveny 等人报道^[10] 细胞培养液中 NH_4^+ 浓度超过 $76\mu g/ml$ ($4.5mM/L$) 时，它对杂交瘤细胞具有毒性作用。可以认为，搅拌速度大于 $160rpm$ 时，机械剪切力对细胞的破坏，

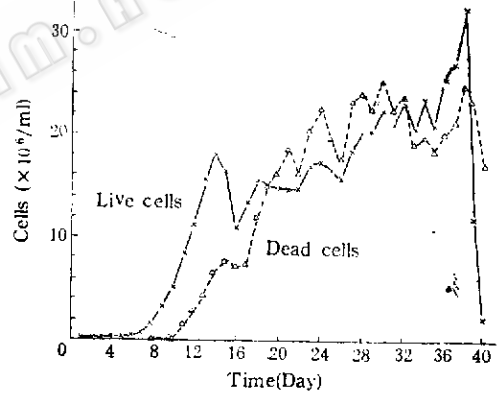


图3 在连续培养中DA4-4细胞的活力
Fig3 Activities of DA4-4 cell in CelliGen perfusion system

造成细胞 NH_4^+ 大量释放，而大量 NH_4^+ 的存在，反过来又对细胞造成毒性作用，因此在培养的最后几天，细胞浓度大幅度下降。图4。

用琼脂糖免疫扩散试验检测细胞培养液中单克隆抗体含量显示，随着细胞浓度的增加，抗体浓度不断提高，在培养的19天，抗体浓度为 $1.0mg/ml$ ，此时转速是 $90rpm$ 活细胞浓度达 $15 \times 10^6/ml$ ，在

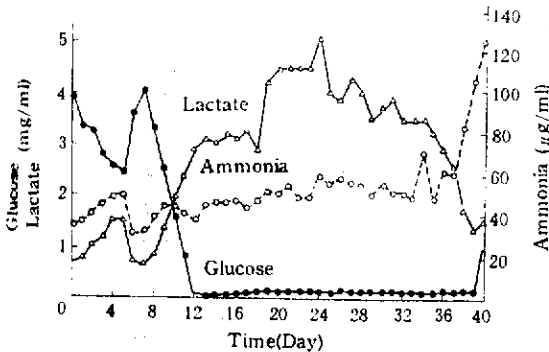


图4 在连续培养中DA4-4细胞代谢

Fig4 Metabolism of DA4-4 cell in CelliGen perfusion system

培养的34天, 抗体浓度为4.75mg/ml, 此时转速是150rpm, 活细胞浓度达 23.5×10^6 /ml, 但当转速提高到180rpm, 细胞浓度大量下降时, 抗体浓度亦随着下降至3.0mg/ml左右。

用EISA 试验检测结果基本上与RID一致。单克隆抗体含量随着细胞浓度的增加而增加。在培养的34天, 抗体浓度达最高值5.60mg/ml, 在最后的2天, 抗体浓度为1.50mg/ml。以人IgM作为包被抗原的ELISA法和以兔抗鼠IgG作为抗体的RID法检测单克隆抗体的结果一致, 表明大量细胞悬浮培养所表达的抗体是有生物学活性的。当细胞浓度达 18×10^6 /ml时, 培养液抗体的浓度为3mg/ml以上, 可以与小白鼠腹水抗体浓度相当。很明显, CelliGen 连续培养系统提供高浓度的细胞, 从而也产生了大量的抗体。图5。

为了观察单克隆抗体从中空纤维细管渗出的能力, 我们收集了一些中空纤维柱的无细胞渗出液, 在培养26—38天时, 培养罐中的RID抗体浓度为3.22—4.75mg/ml, 而中空纤维柱渗出液中抗体浓度为0.07—0.10mg/ml, 渗透率为1.5—

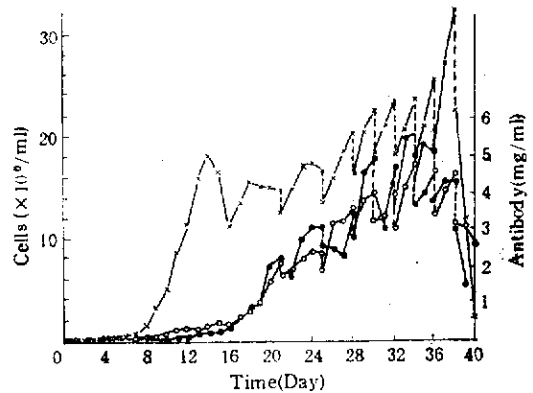


图5 DA4-4细胞抗体的表达

Fig5 Antibody expretion of the DA4-4 cells in CelliGen perfusion system
x-x live cells, o-o Antibody(RID),
-.- Antibody (ELISA)

3.1%。在另一连续培养试验中, 我们亦观察到单克隆抗体从中空纤维柱的渗出率第一天为56%, 第十二天降为4%, 许多学者报道可以从中空纤维柱渗出液中收获抗体, 看来此方法行不通。由于大量的单克隆抗体滞留在培养罐中, 因此可以考虑直接从培养罐中收集。

我们于不同时间, 直接从培养罐中放出细胞悬液, 收集的抗体量随细胞浓度增高而逐渐增加, 从0.42g到1.80g。当细胞浓度达到 20×10^6 /ml以上时, 抗体浓度高达3.6mg/ml以上, 这时直接从培养罐中采集250—300ml细胞悬液, 每次可收获1.0g左右抗体。而且一些不易通过中空纤维柱渗出的代谢产物和细胞碎片等在细胞悬液排放过程也同时被清除, 这样保持细胞始终处于良好的生活环境中, 有利于他们的代谢和增殖。可以见到, 在收集后第二天, 培养罐中细胞和抗体浓度又恢复到原来水平。因此当细胞处于高浓度状态时, 通过每天直接排放细胞悬液来收获大量抗体是一种可取的方法。表1和图5。

CelliGen—中空纤维柱连续灌注系统对细胞生长的各种重要参数如温度、通气量、转速、pH 和营养的补充始终保持良好的控制。该系统显示很低的机械剪切力, 转速提高到 150rpm, 对杂交瘤细胞

无不良影响, 但增加DO 的供应, 从而满足了高密度细胞生长和抗体的表达。通过直接排放细胞悬液, 每日可收获 1.0g 左右单克隆抗体, 这为大量自动化生产单克隆抗体提供了一个理想的方法。

表 1 CelliGen培养系统抗体的收集

Table 1 Live cell counts and antibody harvest in a CelliGen perfusion system

Time(Day)	Live cells ($\times 10^6$ /ml)	Antibody cono.* (mg/ml)	Bled volume from vessel(ml)	Harvested antibody(g)
21	14.7	2.12	200	0.42
25	16.6	2.40	250	0.60
28	20.1	3.61	250	0.90
30	22.4	4.00	250	1.00
32	23.2	4.00	300	1.20
34	23.5	4.75	300	1.43
36	25.2	4.60	340	1.56
38	32.1	4.50	400	1.80

* Measure by RID assay

参 考 文 献

- [1] Horkinson, J.: *Biotechnology*, 3,225,1985.
- [2] Littlefield SG, et al.: *Hybridoma*, 3,75,1984.
- [3] Teder, J.and Tolbert, W.R.: *Am. Biotechnolo. Lab*, 3,24,1985.
- [4] Van Wezel AL. et al *Dev, Biol. Stand*, 60,229,1985.
- [5] Reuveny, S. et al.: *J. Immunol. Methods*, 86,61,1986.
- [6] Martin, N. et al.: *Bio/Technology*, 5,838,1986.
- [7] Paterson, Jr MK.: *Enzymol.*, 58,141,1979.
- [8] Velez, D. et al.: *J. Immunol. Methods*, 86,45,1986.
- [9] Velez, D. et al.: *J. Immunol. Methods*, 102,275,1987.
- [10] Reuveny, S. et al.: *J. Immunol. Methods*, 86,53,1986.

A Perfusion System for High Productivity of Monoclonal Antibody by Hybridoma Cells in A CelliGen Bioreactor

Chen Yikai

(Laboratory of genetic engineering, Fujian medical college, Fuzhou)

DA4-4 (ATCC HB57) is a shear sensitive mouse-mouse hybridoma cell, producing monoclonal antibody IgG1 against human IgM. It was grown successfully in a perfusion propagation system consisting of a 1.5L CelliGen stirred bioreactor and Hollow fiber cartridge. CelliGen system had low shear forces and cells can grow well at high agitation of 150 rpm. The culture was maintained for 40 days and cell number reached 32×10^6 /ml. Maximal monoclonal antibody concentration was 4.75mg/ml. This system produced about 1.0g of antibody per day at its peaks.

Key words

Hybridoma cells; stirred bioreactor; perfusion system; monoclonal antibody