

# 用国产生物反应器大规模高密度培养Vero细胞

董树沛 陈因良 顾小华 严 春

(华东化工学院生化工程研究所, 上海)

宋家骊 陈列胜 陈文兰

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

本文考察了在2.5L CelliGen细胞培养器和国产20L CellCul-20细胞培养生物反应器中采用微载体技术培养细胞的情况。分析了用CellCul-20细胞培养生物反应器进行大规模培养时细胞的生长、代谢规律,研究了从2.5L扩大到20L规模的细胞转移条件。采用微载体球间直接转移技术,提高了接种效率,减少了接种步骤和污染机会。当国产GT-25微载体用量为5g/L,采用连续灌注工艺培养Vero细胞,在国产20L CellCul-20细胞培养生物反应器中,连续培养5天,细胞数增加7倍,细胞密度超过 $1.0 \times 10^7$  cells/ml。本文开发的细胞培养工艺,对于中试及工业规模的动物细胞大量培养具有一定的指导意义。

**关键词** Vero细胞; 微载体; 细胞培养; 生物反应器

作者曾报道了在1.5 L CelliGen 细胞培养器中进行 Vero 细胞培养时,微载体的种类及浓度、细胞的接种量、溶解氧水平等对 Vero 细胞生长过程的影响<sup>[1]</sup>。本文主要在 2.5L、5L CelliGen 细胞培养器、国产 20L CellCul-20 细胞培养生物反应器中,进行如何提高细胞浓度,探索细胞代谢规律,改进细胞在不同规模反应器间的转移方法等方面的研究。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 细胞: Vero细胞(ATCC)
2. 培养基: EMEM + LH90%, CS10%, 抗生素100u/ml; Eagle 培养基(EMEM), (卫生部上海生物制品研究所, 水解乳蛋白(LH), (OXOID Ltd); 小牛血清(CS), (卫生部上海生物制品研究所); 抗生素(硫酸庆大霉素), 药用粉剂或针剂(上海第三制药厂)

粉剂EMEM 中葡萄糖含量为 1g/L,

在配制培养基中补加葡萄糖,使其在培养基中的含量为4g/L,使用前调 pH至所需值。

3. 微载体: GT-2(华东化工学院研制);由变性胶原制成的淡黄色球形微珠,干珠粒径为 90—110 $\mu$ m,溶胀后光滑透明,比重为1.03~1.04<sup>[2]</sup>。

4. 反应器: 2.5L、5L CelliGen 细胞培养器(NBS Co,USA) 20L CellCul-20细胞培养生物反应器(华东化工学院研制),见图1。

### (二) 方法

1. 微载体的预处理和灭菌:使用前,称取一定量的微载体,每克微载体用50ml PBS(pH7.0—7.2)缓冲液泡胀,每2h更换PBS溶液,更换2—3次后浸泡过夜,在121 $^{\circ}$ C,灭菌30min,然后更换无菌的新鲜培养基浸泡,备用<sup>[3]</sup>。

2. 细胞培养:用 CelliGen 细胞培养器培养细胞:将灭菌的微载体(30g)与新鲜培养基在培养器中浸泡,再加入一

本文于1991年3月9日收到。

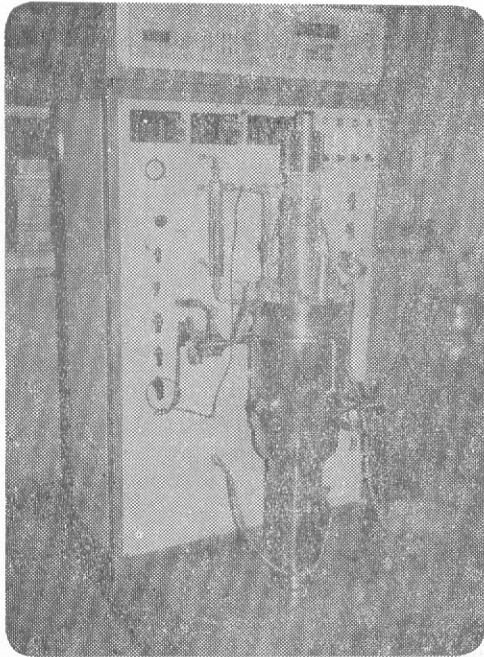


图1 国产20L CellCul-20细胞培养生物反应器

Fig.1 CellCul-20 cell culture bioreactor(20L)  
定数量经胰酶消化得到的 Vero 细胞进行静态吸附。每隔45—60min 搅拌一次, 3—5h 后, Vero 细胞已基本与微载体贴附<sup>[4]</sup>。此时, 启动搅拌, 进入正常培养过程。培养过程控制条件为: pH7.0—7.2, 溶解氧40—60% 空气饱和度, 搅拌速度30—55r/min, 温度37℃, 培养5—7天后, 作为20L 细胞培养生物反应器的种子细胞。

CellCul-20细胞培养生物反应器的细胞培养: 对20L 细胞培养生物反应器进行二次就地高温蒸汽灭菌, 在无菌条件下, 分别将灭菌过的微载体(40g) 和新鲜培养基用无菌空气压入20L 生物反应器内, 进行微载体的预浸泡。然后, 将CelliGen细胞培养器培养的细胞作为种子细胞转入20L 生物反应器, 在静态条件下, 进行球间细胞接触转移<sup>[5,6]</sup>。每45—60min 搅拌一次, 4—7h 后, 启动搅拌, 进入正常培养过程。培养过程控制条件基本同种

子细胞培养, 整个细胞培养过程均为自动控制。每天取样进行细胞计数, 测定葡萄糖、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量, 并观察细胞生长情况。

3. 分析方法: 葡萄糖含量测定: 使用上海生物制品研究所葡萄糖测定试剂盒; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量测定: 使用上海生物制品研究所尿素氮测定试剂盒, 其中尿素氮标准液改用硫酸铵标准液。

## 结果与讨论

### (一) 不同细胞接种量对细胞浓度的影响

分别在GT-2微载体浓度为4.3g/L, 接种量为 $8 \times 10^5$  cells/ml(A组)和微载体浓度为5g/L, 接种量为 $1.6 \times 10^6$  cells/ml(B组)的条件下, 进行Vero细胞培养, 细胞浓度和细胞贴壁率的动力学状态见图2。

由图2可知: 培养3天后, 由于接种量不同, B组的细胞密度为A组的2倍, B组的细胞数为 $5 \times 10^6$  cells/ml, A组的细胞数为 $2.5 \times 10^6$  cells/ml, 从图2的细胞贴壁率可看出, B组细胞在微载体上的贴壁率要比A组高。实验结果表明, 高的接种量有利于细胞贴壁, 缩短培养规模放大过程中的停滞期, 有利于实现培养细胞的高密度生长。图3的照片显示了新、老微载体间已发生了球间细胞转移, 细胞通过“架桥”现象, 从老微载体向新微载体转移过去并贴壁生长。因此, 为了获得高密度的细胞, 缩短培养周期, 提高细胞接种量是必须的。

### (二) CellCul-20细胞培养生物反应器的Vero细胞培养

本文分别在NBS公司2.5L CelliGen培养器和国产20L CellCul-20生物反应器中进行了Vero细胞培养的研究, 并以2.5

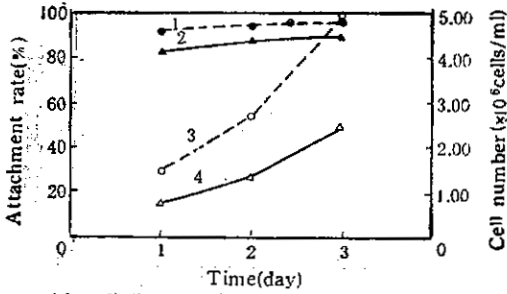


图2 接种量对细胞贴壁率、细胞生长的影响

Fig.2 Effect of cell inoculation densities on Vero cell attachment and growth

Note: 1. 在接种量  $1.6 \times 10^6$  cells/ml 条件下的细胞贴壁率

1. Cell attachment rate on GT-2 microcarrier (cell inoculation density is  $1.6 \times 10^6$  cells/ml)

2. 在接种量  $0.8 \times 10^6$  cells/ml 条件下的细胞贴壁率

2. Cell attachment rate on GT-2 microcarrier (cell inoculation density is  $0.8 \times 10^6$  cells/ml)

3. 在接种量  $1.6 \times 10^6$  cells/ml 条件下的细胞生长曲线

3. The curve of cell growth on GT-2 microcarrier (cell inoculation density is  $1.6 \times 10^6$  cells/ml)

4. 在接种量  $0.8 \times 10^6$  cells/ml 条件下的细胞生长曲线

4. The curve of cell growth on GT-2 microcarrier (cell inoculation density is  $0.8 \times 10^6$  cells/ml)

L罐作为种子罐扩大到 20 L 生物反应器中进行培养。结果见图 4

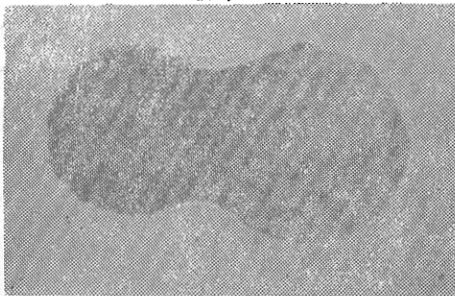


图3 新-老微载体连在一起，细胞发生转移并生长

Fig.3 Cells are moving from old microcarriers to new microcarriers and growth

由图 4 可见，在 2.5L 培养器内进行 Vero 细胞培养，5 天后细胞增长率为 4.5 倍，在 20L 生物反应器内进行 Vero 细胞培养，5 天后细胞增长率为 4.4 倍，二者的

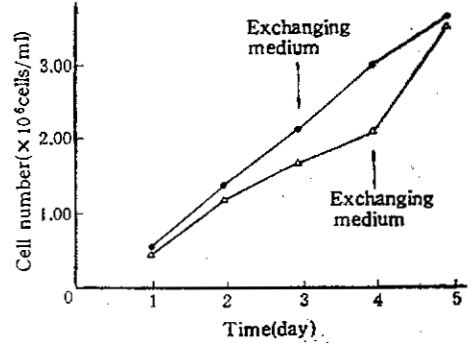


图4 二种不同容积培养反应器细胞生长比较

Fig.4 Contrast cell growth between two different volume of cell culture bioreactor

●—●: 2.5L CelliGen

△—△: 20L CellCul-20

增长率相当。取样观察，细胞在二种反应器内均生长良好，形态正常。

从二者的细胞生长情况来看，用 CellCul-20 细胞培养生物反应器进行细胞培养是完全成功的，该生物反应器提供了细胞生长所必需的合适温度、pH、溶解氧、转速，并对这些参数进行了精确的控制。反应器的搅拌系统和控制系统在细胞培养工艺条件下，能使微载体均匀悬浮，对高密度细胞培养，能提供足够的供细胞生长所需的溶氧浓度。从 2.5L 扩大到 20L 生物反应器进行细胞培养，仍保持了良好的细胞生长速率，正常的细胞形态。

在 20L 生物反应器中，采用连续灌注培养工艺进行 Vero 细胞培养<sup>[7,8]</sup>，其细胞生长曲线见图 5。

二天后，采用连续灌注培养工艺，经五天培养，细胞密度超过  $1.0 \times 10^7$  Cells/ml。此时，大部分微载体上细胞致密生长，在一些微载体连在一起的交界处，细胞呈多层生长。这说明，在连续灌注培养工艺条件下，培养基能满足细胞生长的需要，可以使细胞更致密和多层生长而不会脱落下来，而且细胞几乎是连续地以对数生长方式进行繁殖，能够在较短的时

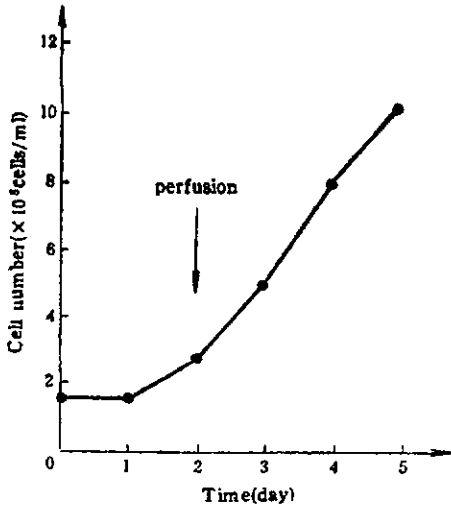


图5 细胞生长曲线 (20L CellCul-20)  
Fig.5 The curve of cell growth in 20L CellCul-20

间内达到较高的细胞数，这对于进行细胞培养规模的放大，缩短培养时间极为有利。

在细胞生长过程中，培养基的营养物质被迅速消耗，培养基中葡萄糖被迅速利用。连续灌注后，葡萄糖含量维持在一相对稳定的较低水平上。培养第二天可测到乳酸、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的生成，在连续灌注条件下，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量也基本维持在一定水平上。一般认为，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>来自培养基中的谷氨酰胺，经细胞代谢产生，而乳酸则来自葡萄糖的酵解过程<sup>[8]</sup>。

**(三) 由CelliGen细胞培养器扩大到20L 细胞培养生物反应器过程中的细胞转移技术**

采用2.5L或5L CelliGen培养器作为20L生物反应器的“种子罐”或“前级反应器”<sup>[8]</sup>，经过4—7天培养，微载体上已基本长满细胞，细胞数已达到20L生物反应器的接种要求，可以转入20L生物反应器中作为种子细胞。

在微载体细胞悬浮培养中，细胞接种或扩大细胞培养规模，常用酶法，EDTA

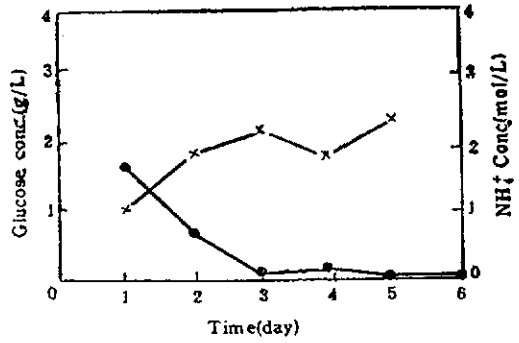


图6 葡萄糖、氮代谢  
Fig.6 Metabolism of glucose and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>  
●—●: 葡萄糖 (Glucose)  
×—×: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

法或酶-EDTA 联合法等进行细胞消化，消化下来的细胞作为种子细胞与灭菌的新鲜微载体吸附后继续生长。在悬浮培养中，细胞不但可以在被吸附的微载体上生长、繁殖，而且可以通过微载体间的接触，碰撞等发生转移，转移到其他微载体上生长。在2.5L或5L培养器扩大到20L生物反应器过程中，细胞转移的好坏，将直接影响到后继的细胞生长速率<sup>[10]</sup>。经过几种方法的比较，采用微载体——微载体静态接触转移的方法，可以有效地解决放大过程中的细胞接种要求，该方法与常规的酶法等相比，具有细胞受损伤程度小，新微载体吸附的细胞均一等，操作步骤简单，溶液中游离细胞少，微载体可连续使用及适用于工业生产等特点，是一种理想的扩大培养规模的细胞转移方法。接种一天后取样观察，溶液中基本上无游离细胞，长满细胞的老微载体与新微载体间发生了细胞转移，并有部分新、老微载体通过“细胞桥”连在一起生长，见图3。当然，在培养过程中，由于搅拌，微载体间相互碰撞等因素，“细胞桥”会断裂，连在一起的微载体又会分开悬浮于培养基中，微载体上的细胞则继续生长。无论是数个微载体连在一起，还是单个微载体，细胞

均表现出良好的生长。

### 参 考 文 献

- [1] 徐殿胜等: 华东化工学院学报, 15(4):441, 1989.
- [2] 陈因良等: 生物工程学报, 8(2), 出版中, 1992.
- [3] Hirstenstein, M., *Develop. Biol. Standard.*, 46:109, 1980.
- [4] Van Wezel, A., et al., *Develop. Biol. Standard.*, 46:151, 1980.
- [5] Lydersen, B. K., "Large Scale Cell Culture Technology", Hauser Publishers, p65, 1987.
- [6] Varani, J., *J. Biol. Standard.*, 14:331, 1986.
- [7] Wu, W-S., et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 27:1466, 1985.
- [8] Spier, R. E. and Griffiths, J. B., "Animal Cell Biotechnology", Academic Press, London, Vol.3, p44, p380, 1988.
- [9] Beck, C., *Chem. Eng.*, 2:121, 1987.
- [10] Aunins, J. G., et al., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 17:699, 1986.

## Large-scale Culture of Vero Cells in High Density by Using CellCul-20 Bioreactor

Dong Shupeì Chen Yinliang Gu Xiaohua Yan Chun  
(Research Institute of Biochemical Engineering East China University  
of Chemical Technology, Shanghai)

Song Jiali, Chen Liesheng, Chen Wentan  
(Shanghai Institute of Biological Products Shanghai)

High density Vero cells were cultivated in a 20 liter CellCul-20 home-made bioreactor and a 2.5 liter CelliGen. Also, the cell growth, its metabolism and technique of cell transfer and scale-up of culture volume were investigated. GT-2 microcarriers were used and beads to beads transfer technique was employed. It was shown that the efficiency of inoculation was increased and operating steps and risks of contamination were decreased in this experiment. The cell density was higher than  $1.0 \times 10^7$  cells/ml and was 7 times higher in comparing with the inoculation number after 5 days' perfusion cultivation. Obviously, this work is significant for large-scale culture of animal cells in pilot and industrial scales.

### Key words

Vero cell; microcarrier; cell culture; bioreactor.