

微载体高密度培养 Vero 细胞的研究

王佃亮 肖成祖 陈昭烈 黄子才

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 微载体是动物细胞高密度培养的有效手段。首先在硅化的方瓶中对 Cytodex 1、Cytodex 3、Biosilon、Bellco Glass Microcarrier、CT-1、CT-3、MC-1、CT-2 8 种国产和进口微载体进行了比较和筛选。确定以 Biosilon 作为 Vero 细胞高密度培养的首选微载体。用 500ml Wheaton 搅拌瓶探索影响 Vero 细胞高密度培养的条件,表明 50~60mg/ml 的微载体浓度、 $1\sim 2\times 10^5$ /ml 的细胞接种密度、适当的通气 (95%O₂+5%CO₂) 对该细胞的高密度培养具有重要意义。在 200ml 培养体积的 Wheaton 搅拌瓶中,微载体浓度为 50~60mg/ml,细胞接种密度为 9.24×10^5 /ml,搅拌速度为 65~85r/min,经 25d 培养,Vero 细胞密度可达 2.34×10^7 /ml,表明 50~60mg/ml 的微载体浓度对培养细胞没有毒性。接着在 1.5L CelliGen 生物反应器中进行培养,细胞接种密度为 4.98×10^5 /ml,培养体积为 1.2L,日灌流量从 0.20L 逐渐加大到 3.65L,经 22d 连续灌流培养,最终细胞密度可达 2.05×10^7 /ml。对高密度培养的 Vero 细胞接种疱疹性口炎病毒 (VSV) 实验表明,细胞密度高病毒滴度也高。

关键词 微载体, 高密度培养, Vero 细胞

现代动物细胞大量培养技术始于 60 年代初 Capstick 及其同事^[1]对 BHK 细胞的研究工作。当时是为了满足制造十分有利可图的 FMD 疫苗的需要。后来随着 IFN、t-PA、EPO 等一系列具有重要治疗价值的细胞产品被陆续发现,使人们认识到利用动物细胞大量培养技术来生产这些药用蛋白较原核细胞表达系统有较大的优越性,因为重组 DNA 技术修饰过的动物细胞能够正确地加工、折叠、糖基化、转运、组装和分泌由插入的外源基因所编码的蛋白质,而细菌系统的表达产物则常以没有活性的包涵体形式存在。所以,动物细胞生物技术迅速地发展起来。Vero 细胞一般以 $1\sim 2\times 10^6$ /ml 的细胞密度工业化生产疫苗^[2~5]。近年来,利用 Vero 细胞作为基因工程细胞已成功地表达了 hGH、UK、t-PA 等蛋白药物^[6~8]。如果能将细胞密度提高到 $1\sim 2\times 10^7$ /ml,必能大幅度降低生产成本,提高经济效益和社会效益。因而,Vero 细胞的高密度培养及生物制品生产意义重大。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞: Vero 细胞 (134~180 代) 用于病毒生产,由卫生部北京生物制品所惠赠。

1.1.2 病毒: VSV Indiana 株,为本研究室收藏。

1.1.3 培养基: 方瓶细胞培养用 DMEM 培养基, Wheaton 搅拌瓶和 CelliGen 生物反应器细

为国家“八五”科技攻关项目“生物技术实用化研究”。

本文于 1994 年 10 月 18 日收到。

胞培养用 DF (DMEM/F12=1/1) 培养基, 这两种培养基均为 GIBCO 产品。配制时每升加 1.4g NaHCO₃、5g D-Glucose。使用时再加 5% NCF (无支原体新生小牛血清, 杭州市四季青生物工程材料研究所生产)。10mmol/L HEPES、179mmol/L NaHCO₃、2mmol/L-Glutamine、100IU/ml Penicillin 和 100μg/ml Streptomycin。

1.1.4 微载体: 8 种国产和进口微载体: MC-1 (军事医学科学院); CT-1、CT-3、GT-2 (华东化工学院); Cytodex1、Cytodex3 (Pharmacia, Sweden); Glass Microcarrier (Bellco Glass, Inc., USA); Biosilon (Nunc, Denmark)。方瓶培养时, Biosilon 微载体由于购买的是已处理的消毒包装, 故可直接使用, 其余的各称取 20mg 微载体分别加入 8 个已硅化的方瓶中, 用 40ml 无钙镁 PBS 洗涤 2 次, 换为新鲜 PBS 在 0.1MPa 高压蒸气灭菌 30min, 最后用含血清的工作培养基浸泡 10h 以上或过夜, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 方瓶培养: 取 100ml 方瓶 8 个, 向每瓶中加入 2~3ml 的 3% 甲基硅树脂酒精溶液, 轻轻摇匀, 然后吸出并空干, 置 150℃ 烤箱 1.5h 烤干备用。分别向 8 个灭菌的硅化方瓶中加入 Vero 细胞和 8 种微载体, 接种细胞密度为 2×10^5 /ml, 各种微载体浓度为 2mg/ml, 每隔 0.5h 轻轻摇晃几下, 2h 后停止摇晃, 置 37℃ 温箱培养, 次日起每天换液 4ml, 每隔 2d 采样计数和葡萄糖测定。

1.2.2 Wheaton 搅拌瓶培养: 500ml Wheaton 搅拌瓶, 在搅拌棒两则各加 1cm² 的不锈钢叶片, 这样可在较低的搅拌转速下将细胞、培养基和微载体混合均匀⁽⁹⁾。加入灭菌的 Biosilon 微载体, Vero 细胞和 DF 培养基使起始培养体积为 60ml, 置于 Bellco 磁力搅拌器 (转速 0~200r/min, Bellco Biotechnology, USA) 上以转速为 65r/min, 每隔 45min 搅拌 2min, 6h 后加足培养基至 200ml 开始正式培养。Wheaton 搅拌瓶和磁力搅拌器均置于 37℃ 温箱内, 为了阻止磁力搅拌器产生的热量直接传给培养的细胞, 可在搅拌瓶和搅拌器之间垫几层纱布。每天取样测定葡萄糖和细胞计数, 然后决定是否换液。

1.2.3 CelliGen 生物反应器培养: 将灭菌后的 1.5L 培养罐安装到生物反应器上, 用蠕动泵抽净里面的液体, 加入 Biosilon 微载体, Vero 细胞和 DF 培养基, 微载体浓度为 50mg/ml, 细胞接种密度为 4.98×10^5 /ml, 培养体积 1.2L。开始时生物反应器的参数设置: 温度 37℃, DO40% 空气饱和浓度, 搅拌速度 40r/min, pH7.4。为阻止 pH 剧烈变化, 用 7.5% (w/v) NaHCO₃ 代替 NaOH 调节培养液的酸碱度。每天取样测定, 然后调节灌流控制器控制灌流量。

1.2.4 细胞形态观察和计数: 细胞的形态观察用倒置显微镜 (重庆光学仪器厂生产), 对于 Wheaton 搅拌瓶培养, 在搅拌状态下取样 1~2ml; 对于 CelliGen 生物反应器培养, 在搅拌状态下用蠕动泵采样 10ml, 所取样品用 LD4-2A 型离心机 (北京医用离心机厂制造) 1500r/min 离心 10min, 去上清液后, 加入等体积的 0.1% 柠檬酸结晶紫溶液, 然后置于 37℃ 温箱内保温 1h 以上, 剧烈振荡并用吸管反复吹打, 待微载体沉到管底时迅速吸取上部液体在血球计数板上计数细胞核⁽¹⁰⁻¹²⁾。在高密度培养条件下细胞在微载体表面呈多层生长, 因而可适当延长保温时间, 并每隔 1h 振摇几次, 4~5h 后取样将样用 0.1% 柠檬酸结晶紫溶液成溶液成倍稀释后在血球计数板上计数细胞核。

1.2.5 葡萄糖测定: 取样离心, 根据葡萄糖氧化酶法 (GOD-PAP 法), 采用解放军三零

二医院葡萄糖测定试剂盒测定。

1.2.6 病毒增殖: 在 200ml 培养体积的 Wheaton 搅拌瓶中加入 Biosilon 微载体、Vero 细胞和 DF 培养基共 60ml, 以 60~70r/min 每隔 45min 搅拌 3min, 4h 后停止搅拌, 加足 200ml 培养基开始正式培养。当细胞密度达到 1.06×10^7 /ml 时, 接种 2.00ml 病毒原液。接种时, 先尽量去掉培养上清液, 加入病毒 (A549 细胞测定其毒力为 7.5log TCID₅₀/ml 和生产液 (含 1%NCF 的 DF 培养基) 共 60ml, 每隔 10min 以 50r/min 搅拌 1min, 0.5h 后加足 200ml 生产液以 70r/min 连续搅拌培养。每隔 8h 采样 1~2ml, 将样品冻存于 -70℃ 冰箱过夜, 融化后的样品用 A549 细胞测定毒力。

1.2.7 毒力滴定: 紫外线照射 40 孔微量板灭菌 0.5h 以上, 向各孔加入 0.2ml A549 细胞液 (含 $6 \sim 8 \times 10^4$ 细胞), 6h 后待细胞基本铺满单层后, 将待测样品以 10 倍稀释, 每稀释度取 0.1ml 加入 4 孔, 在 36h 左右判定结果, 并按 Karbef 公式计算 TCID₅₀。

2 结果

2.1 微载体的筛选

在硅化的方瓶中对 8 种微载体培养 Vero 细胞的情况进行了观察, 结果 (见表 1) 表明细胞在微载体上均可贴附和铺展, 经 4~5d 培养后大多数微载体的细胞密度均可达 1×10^6 /ml 上。尽管 Biosilon 微载体比重较大 ($1.05\text{g}/\text{cm}^3$), 表面积 ($225\text{cm}^2/\text{g}$) 较其它微载体 (如 Cytodex 1 为 $6000\text{cm}^2/\text{g}$) 小得多, 但在显微镜下可见细胞在微载体表面呈多层生长, 又考虑到在培养时无须对培养容器进行硅化且可回收使用, 故我们选择 Biosilon 微载体作为 Vero 细胞高密度培养的首选微载体。

表 1 8 种微载体培养 Vero 细胞的比较

Table 1 Results of comparison eight kinds of solid microcarrier for cultivating Vero cells

Name	Anchorage	Growth	Highest cell density/ $\times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$	Cost /\$ (yuan) $\cdot \text{g}^{-1}$	Reuse
Cytodex 1	+++	+	125	10	+
Cytodex 3	++	+++	122	12	-
Biosilon	+	++	120	1	+
Glass	+	++	110	8	+
CT-1	+++	+	136	15	+
CT-3	++	+++	78	20	-
CT-2	++	+++	138	15	?
MC-1	+++	+	108	10	+

2.2 搅拌瓶培养

2.2.1 微载体浓度对细胞培养密度的影响: 当 Vero 细胞接种密度为 7.69×10^5 /ml 时, 不同的 Biosilon 微载体浓度所达到的细胞密度见图 1。若采用 30mg/ml 的微载体培养至第 5d 细胞密度可达 2.19×10^6 /ml, 继续培养时细胞密度开始下降; 若采用 50mg/ml 的微载体浓度而其它条件保持不变, 则培养至第 6d 细胞密度可达 3.70×10^6 /ml, 且细胞密度继

续呈上升趋势。

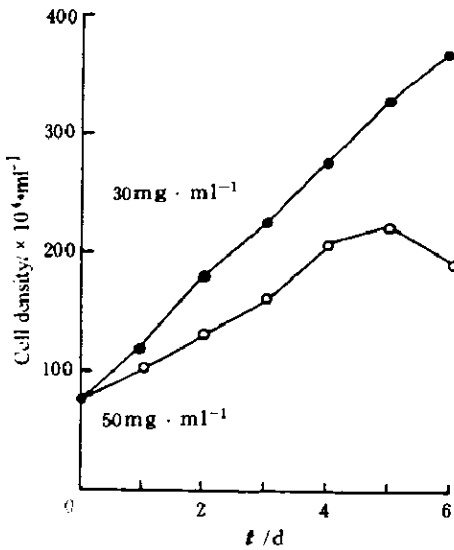


图 1 微载体浓度对细胞培养的影响
Fig. 1 Relation between microcarrier

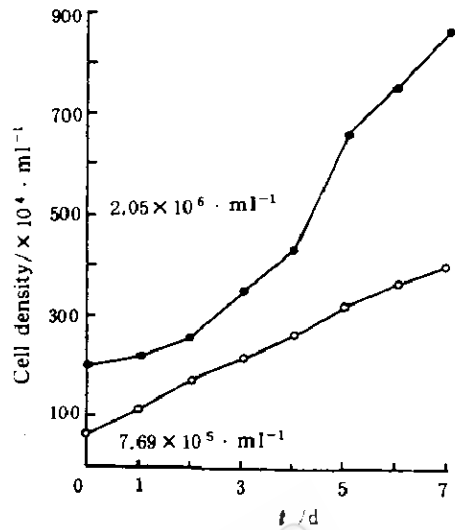


图 2 接种密度对细胞培养的影响
Fig. 2 Relation between inoculum density and cell density

2.2.2 接种密度对细胞培养的影响：当 Biosilon 微载体浓度为 50mg/ml 时，改变 Vero 细胞接种密度，经 7d 培养后其细胞的增殖密度见图 2。若接种密度为 7.69×10^5 /ml 时，终细胞密度为 4.01×10^6 /ml；若接种密度为 2.05×10^6 /ml 则终密度可达 8.81×10^6 /ml。

2.2.3 通气对细胞生长的影响：实验可见，当微载体浓度为 50mg/ml，细胞接种密度为 9.24×10^5 /ml 培养至第 3d 时细胞密度可达 2.41×10^6 /ml，若此时仅换液而不充氧，则细胞密度呈下降趋势。若在换液同时用接有无菌吸管的钢瓶充氧（95%O₂+5%CO₂）1min，细胞密度就会缓慢上升。另一次实验，微载体浓度为 60mg/ml，细胞接种密度为 1.65×10^6 /ml，经 2d 培养细胞密度可达 2.67×10^6 /ml，此后在换液同时并通气 1min，细胞密度不再出现下降现象（图 3）。

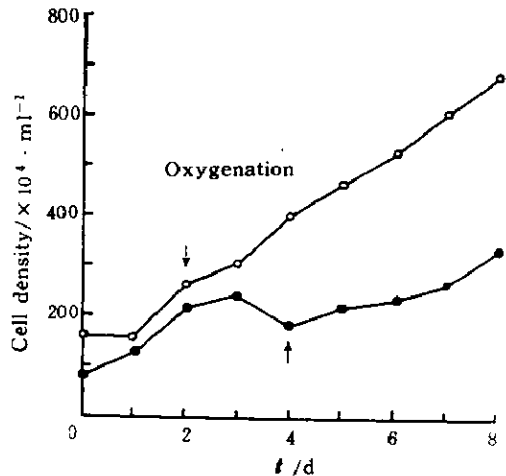


图 3 通气对细胞培养的影响
Fig. 3 Relation between gassing and cell density

2.2.4 培养细胞所能达到的细胞密度：在 200ml 培养体积的 Wheaton 搅拌瓶中 Biosilon 微载体浓度为 50mg/ml。细胞接种密度为 9.24×10^5 /ml，搅拌速度为 65~80r/min，培养 25d 培养后细胞密度可达 2.34×10^7 /ml，且细胞在微载体表面形态良好。在高密度培养条件下，细胞的生长现象与低密度培养时有所不同（图版 I-C、D、E、F、G、H）。

2.2.5 细胞在微载体间转移现象的观察：当向已培养 5d 的培养物中加入新的微载体，经

过 2d 培养后,老微载体上的细胞可以通过接触和碰撞而转移到新微载体上(图版 I-A、B)。实验同时表明,用 Biosilon 微载体培养 Vero 细胞时,若加入新鲜微载体后每隔 30~45min 搅拌 2~5min,然后启动搅拌比连续搅拌培养细胞转移效果要好。加入新鲜无菌微载体后,微载体的实际浓度已达 60mg/ml;在另一次实验中直接以 60mg/ml 的微载体浓度起始培养,经 15d 后 Vero 细胞密度可达 $1.16 \times 10^7/\text{ml}$ 。

2.2.6 葡萄糖消耗:在细胞培养的开始阶段葡萄糖消耗较少,随着培养细胞密度的不断增加葡萄糖消耗也不断增加。细胞 ($10^6/\text{ml}$) 对葡萄糖的消耗量平均为 0.45mg/d (表 2)。为保证高密度培养的细胞对葡萄糖的需要,我们将培养基中的葡萄糖增加到 6mg/ml (图 4),并且每天换液 3 次,日累积换液量可达 400~500ml (图 5)。

表 2 Vero 细胞在高密度培养
条件下的葡萄糖消耗量

Table 2 Glucose consumption of Vero cells
cultivated at high density

Cell density $/\times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$	Glucose Consumption /mg	Glucose mean $/\text{mg} \cdot (10^6 \cdot \text{d})^{-1}$
164.88	1.28	0.776
161.38	0.34	0.211
266.75	1.32	0.495
303.38	2.25	0.742
404.38	1.62	0.401
470.00	1.94	0.413
528.25	2.21	0.418
610.17	2.87	0.470
683.25	2.60	0.381
700.63	4.06	0.579
835.00	3.49	0.418
934.75	4.51	0.473
1010.63	3.55	0.351
1147.50	3.05	0.266

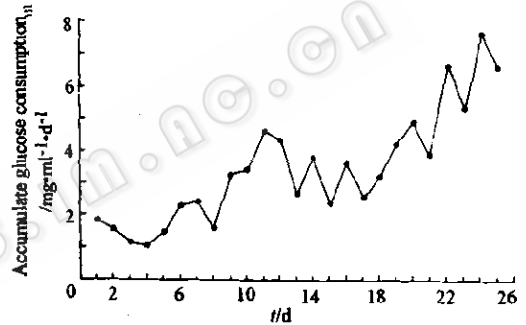


图 4 细胞在密度培养条件下的日累积葡萄糖消耗
Fig. 4 Accumulate glucose consumption per day of
Vero cells cultivated at high density

2.3 CelliGen 生物反应器灌流培养

当采用 1.5L CelliGen 生物反应器,培养体积为 1.2L,接种细胞为 $4.98 \times 10^5/\text{ml}$,搅拌速度为 40~50r/min, pH7.1~7.4。从第三天开始灌流培养,随着培养细胞密度的增加,灌流量从 0.20L/逐渐增加至 3.65L/使培养基中的葡萄糖浓度控制在 1~3mg/ml,经 22d 培养细胞密度可达 $2.05 \times 10^7/\text{ml}$ (图 6)。

2.4 细胞密度和病毒产量关系的观察

为了证实高密度培养的优点,我们观察了不同细胞密度的病毒产量,结果见表 3。当细胞密度为 $1.21 \times 10^6/\text{ml}$ 时接种病毒,病毒滴度在 16h 达到最高峰为 $7 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$,之后病毒滴度开始下降,表明细胞密度提高病毒产量也相应提高。由于高密度培养的细胞已长成多层,深层的细胞可能逐渐被感染,致使其最高病毒滴度出现时间延迟。

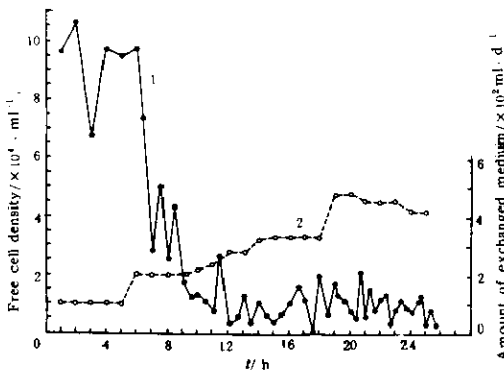


图 5 培养 Vero 细胞时的换液量
和所换液中的游离细胞密度

Fig. 5 Amount of exchanged medium and free cell density of Vero cells cultivated with Biosilon

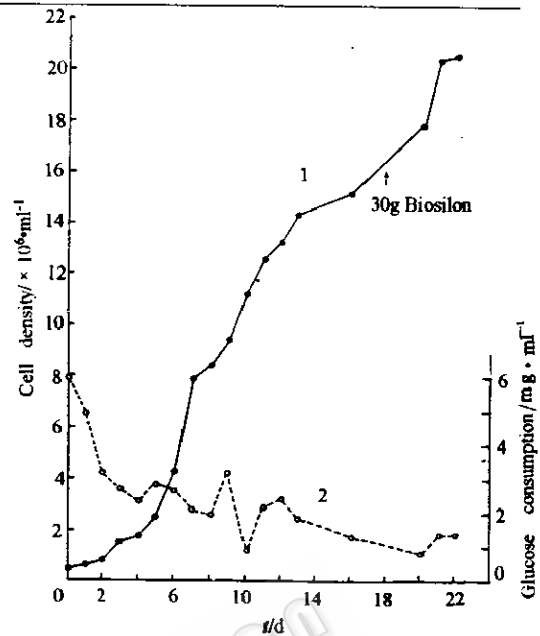


图 6 细胞密度和葡萄糖消耗

Fig. 6 Cell density and glucose consumption of Vero cells cultivated on Biosilon
CelliGen 1.2L; Biosilon concentration 50mg/ml

表 3 细胞密度与病毒滴度的关系

Table 3 Relation between cell density and virus titer

Cell density / $\times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$	Virus titer/ $\log \text{TCID}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$						
	0	8	16	24	32	40	48 (h)
120.75	5.00	5.75	7.00	6.75	6.25	5.75	5.75
1054.50	6.00	6.25	6.75	7.50	7.75	8.00	7.25

3 讨 论

利用 Biosilon 微载体进行 Vero 细胞高密度培养, 除需要满足细胞培养的基本条件(如适宜的温度、pH 等)外, 还应着重考虑: (1) 高的细胞接种密度: Vero 细胞的接种密度可以低到 $8 \times 10^4/\text{ml}$ 或每个微载体上 5 个细胞^[13]。但当接种密度低时, 细胞在微载体上附着的起始速率要小于高细胞接种密度, 不利于细胞贴壁。接种密度的提高有助于缩短细胞培养周期, 从而使培养细胞尽快达到最终密度。对于 Vero 细胞, 若细胞密度培养目标是 $1 \sim 2 \times 10^7/\text{ml}$, 则接种密度可选择 $1 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ 。(2) 高的微载体浓度: 微载体的使用浓度一般为 $2 \sim 5/\text{ml}$, 这样低的微载体浓度所提供的细胞生长表面十分有限。近几年有资料报道^[14~15]Cytodex 系列微载体的使用浓度可以提高到 $10 \sim 20\text{mg}/\text{ml}$; Fabry L. 等^[15]使用 $20\text{mg}/\text{ml}$ 的 Cytodex 3 微载体可使 Vero 细胞培养到 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ 左右的高密度。(3) 适当的溶氧水平: 动物细胞对氧的需求较微生物细胞低的多, 但在高密度培养条件下溶氧往往成为阻碍细胞增殖的重要限制因素。高密度培养的动物细胞对氧的需

求也提高了,因此适当地提高溶氧水平有利于细胞的生长和代谢。(4) 灌流培养:灌流培养是提高细胞密度的有效措施,它的特点是不断加入新鲜培养基。并不断抽走含细胞代谢废物的消耗培养基,使细胞在相对稳定的生长环境里增殖。我们在实验中之所以能够获得 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 以上的高密度,与灌流培养技术的应用是分不开的。

参 考 文 献

- [1] 王佃亮, 肖成祖. 生物工程进展. 1994, 14 (3), 45~49.
- [2] Montagnon B J. Develop Biol Standard. 1989, 70: 27~47.
- [3] Griffiths B. Cytotechnology. 1990, 3: 109~116.
- [4] Brochier B. Nature. 1991, 354: 520~522.
- [5] Kieng M P. Nature. 1984, 312: 163~166.
- [6] Ohno T. Cytotechnology. 1991, 7: 165~172.
- [7] Colbere-Garapin F. Develop Biol Standard. 1985, 59: 109~112.
- [8] Matsushita T. Annals New York Academy of Sciences. 1992, 665: 137~145.
- [9] 肖成祖, 张吟庵, 孔惟惟等. 见: 肖成祖主编, 干扰素研究进展和技术, 北京: 人民军医出版社, 1991, pp. 179~185.
- [10] Van Wezel A L. Nature. 1967, 216: 64.
- [11] Sanford K K, Earle W R, Evang U S *et al.* J Natl Cancer inst. 1994, 11: 773~795.
- [12] Johanson A. Develop Biol Standard. 1980, 46: 125~129.
- [13] Hu W S. Biotechnol Bioeng. 1985, 27: 585~595.
- [14] 陈志宏, 施原, 丁健春. 生物工程学报, 1991, 7 (2), 159~163.
- [15] Fabry L. In: Spier R E *et al* eds. Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., 1989, pp. 361~365.

Studies on High Density Cultivation of Vero Cells with Microcarriers

Wang Dianliang Xiao Chengzu Chen Zhaolie Huang Zicai

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract First of all, Biosilon have been chosen from eight kinds of solid microcarriers as the most suitable one for high density cultivation of Vero cells, because it has some advantages than others, such as it can be reused and its price was the lowest. Then some conditions affecting high density cultivation of Vero cells including microcarrier concentration, inoculum density and gassing were studied with a 500ml modified Wheaton spinner bottle. When the inoculum cell density was $9.24 \times 10^5/\text{ml}$, the cell density could reach $2.34 \times 10^7/\text{ml}$ after 25 days of cultivation, it showed that Biosilon microcarrier concentration of 50~60mg/ml had no toxicity at all on cells. When cultivation with 1.5L CelliGen bioreactor at the cell inoculum density of $4.98 \times 10^5/\text{ml}$, and the perfusion volume was increased from 0.20 to 3.65L/d gradually, finally the cell density could reach $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ after 22 days of cultivation. When vesicular stomatitis virus (VSV) was inoculated into the culture of $1.21 \times 10^6/\text{ml}$ at the same MOI (multiplicity of infection), the virus titer reached 7log TCID₅₀/ml and 8log TCID₅₀/ml respectively.

Key words Microcarrier, high density cultivation, Vero cell