

自制多孔微球高密度培养 Vero 细胞的初步研究

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)

多孔微球是动物细胞高密度培养的有效手段,它是 1985 年由 Verax 公司开创的,最初用于流化床生物反应器生产单克隆抗体,后来又出现了 Percell 和 Siran 系统系列多孔微球^[1],并且使用的反应器种类和生产的产物都在增加,于是便成为一种新型的细胞培养手段而日益受到人们的重视。为此,我们在利用微载体进行 Vero 细胞高密度培养的同时,又对多孔微球的制备和培养工艺作了初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:传代 Vero 细胞由北京生物制品所惠赠。

1.1.2 培养基:DF (DMEM/F12=1/1) 培养基,为 GIBCO 产品。配制时每升加 1.4g NaHCO₃, 5g D-葡萄糖。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 和 2mmol/L L-谷氨酰胺, 100IU/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素。

1.1.3 试剂:司班 85 (Span 85) 为化学纯,美国进口分装。25%戊二醛溶液为化学纯,天津天泰精细化学品有限公司制造。丙酮、甲苯、95%乙醇、无水乙醇均为分析纯,北京化工厂制造。明胶为分析纯,上海化学试剂公司制造。NaHCO₃ 为分析纯,中国医药公司采购供应站经销。台盼蓝为 Chroma 进口分装,上海化学试剂站分装厂经销。MTT 即四甲基偶氮唑盐 (3-4, 5-Dimethylthiazololyl) 2, 5-diphenyltetrazoliumbromide) 为 Fluka 产品,用 PBS 配制成 5mg/ml,过滤除菌,4℃冰箱避光保存。

1.2 方法

1.2.1 多孔微球预处理:准确称取所需的多孔微球,每 0.1g 微球加 40ml 无钙镁 PBS 室温溶胀过夜,微球吸水后自然下沉。换以新鲜 PBS 洗涤后 0.1MPa 高压蒸气灭菌 30min,再洗涤 2 遍,重复高压灭菌一次。最后用 20ml 含 5% NCF 的培养基洗涤 2 遍,换为新鲜培养基洗涤后置 4℃冰箱浸泡待用。

1.2.2 Wheaton 搅拌瓶培养:在岛津 AEG-220 电子分析天平 (岛津制作所,日本)上准确称取所需多孔微球 (干燥时直径 76~150μm),经预处理后进行细胞培养。在 200ml 培养体积的 Wheaton 搅拌瓶中加入预处理的多孔微球、Vero 细胞和 DF 培养基,使起始培养体积为 100ml,然后置于 Wheaton Biostir 磁力搅拌器 (Model I, USA),每隔 30min 搅拌 2min,2~4h 后加足培养基连续搅拌培养。每天采样测糖和细胞计数。

1.2.3 细胞形态观察:取 1.0ml 多孔微球细胞培养样品,加 0.1ml MTT,置 37℃恒温箱保温 1h 以上,然后在显微镜下观察球着色情况。线粒体琥珀酸脱氢酶可催化 MTT 形成蓝色甲臜,形成量与话细胞数和功能状态成正相关^[2~4],因此根据着色情况可判断球内细胞生长状况。

1.2.4 细胞计数:在搅拌状态下取样 1~2ml,待微球下沉后轻轻吸去上清液用于葡萄糖测定,加等体积的 0.25%胰酶溶液,再添加 2ml 0.25%胰酶溶液,置 37℃水浴消化,并每隔 0.5h 用 1ml 吸管轻轻吹打几下,直到微球全部溶解。在 LD4-2A 型离心机上 1500r/min 离心 10min,去掉多余的 2ml 上清液,恢复样品原来体积。小心吸去上清液,加等体积 0.1%柠檬酸结晶紫溶液将细胞团块吹打均匀,在血球计数板上计数。若细胞密度很高,可用 0.1%柠檬酸结晶紫溶液稀释后计数。若仅计数活细胞,采用台

酚蓝拒染法。

2 结果

2.1 多孔微球制备

称取 3.2g 明胶 (gelatin), 加 40ml 蒸馏水 (DW) 和 2.4ml 吐温-80, 置 60℃ 水浴间歇搅拌制成含吐温-80 的 8% Gelatin 溶液 (B 液)。含 6% Span 85 的甲苯溶液 (A 液)。将 A 和 B 液混合可得 C 液, 将 C 液加入含 200ml 甲苯的三角烧瓶中可得 D 液。将制得的 D 液冷却, 并用 80ml 95% 乙醇洗涤 2 次, 40ml 丙酮洗涤 2 次, 室温干燥后可得粗制品。用不锈钢筛选取直径 76~150 μm 和 150~200 μm 的多孔微球。把 4.0ml 戊二醛加到 200ml 蒸馏水 (DW) 中, 然后加入 1.6g 多孔微球进行交联, 室温作用 1h 后, 用大量 DW 洗去没有反应的戊二醛。依次用 85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、丙酮各 80ml 脱水 2 遍, 最后置 37℃ 干燥即得成品。经交联后的多孔微球在 DW 中可吸水膨胀, 直径可扩大近两倍。

2.2 多孔微球高密度培养 Vero 细胞的初步观察

用自制多孔微球高密度培养 Vero 细胞。采用多孔微球 2mg/ml, 细胞接种密度 3×10^5 /ml, 经 15d 培养后细胞密度可达 8.52×10^6 /ml, 取样用扫描电镜观察表明生长在微球表面的细胞形态良好 (图 1-A, B, C), 用 MTT 染色表明绝大多数微球均有细胞生长, 因而自制多孔微球可很好地用于动物细胞培养。采用 5mg/ml 的多孔微球, 1.23×10^6 /ml 的细胞接种密度, 则经 12d 培养后细胞密度可达 1.24×10^7 /ml, 此时取样用胰酶消化和台盼蓝拒染法分析, 死细胞数约为 1×10^5 /ml, 仅占总细胞密度的 0.8%, 说明微球内部的细胞营养状态良好, 无坏死现象发生。

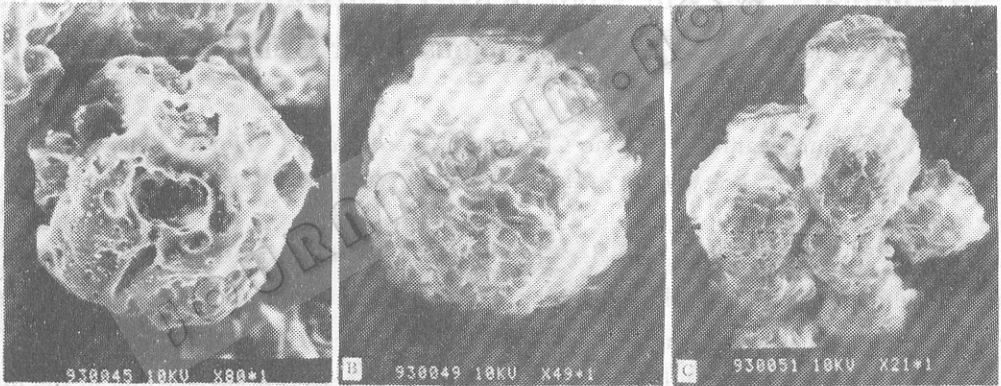


图 1-A 自制多孔微球的扫描电镜照相

图 1-B 培养细胞后的单个多孔微球的扫描电镜照相

图 1-C 培养细胞后的多个多孔微球的扫描电镜照相

3 讨论

多孔微球是近年来在国外兴起的新型动物细胞高密度培养技术, 它较传统的微载体更具有许多优点^[1,3,4]: (1) 可以培养贴壁依赖性动物细胞和悬浮细胞, 前者可在球的内外表面生长, 因而极大地增大了生长表面积; (2) 生长在球内的细胞可以免遭外界剪切力损伤; (3) 适用于固定床、流化床、气升式和普通搅拌式等多种生物反应器, 便于推广应用; (4) 可以长期固定培养细胞从而稳定地获取细胞分泌产物。因而, 多孔微球是一种很有发展前景的细胞培养载体。

我们参照 Nilsson 的报道^[5], 在工艺上进行了许多改进, 初步研制成功了多孔微球。传统上多孔微球有两种: 一种是用于固定床和流化床生物反应器, 所培养的细胞密度以每毫升床体积或微球体积支持的细胞数计算, 其直径和比重通常较大^[6-8]; 另一种即是用于搅拌式生物反应器, 其直径和比重通常较小, 细胞密度以每毫升培养基和微球的混合体积所支持的细胞数计算。一般文献 [9] 报道的多孔微球培养的贴壁依赖性动物细胞密度为 $1 \sim 2 \times 10^8$ /ml 床体积或微球体积。若本实验的细胞密度值换算为每毫升微球所支持的细胞数的话, 则细胞密度也接近 $1 \sim 2 \times 10^8$ /ml 微球体积。

尽管从理论上讲, 多孔微球细胞培养可以耐受较高的搅拌速度, 但细胞培养实践表明, 搅拌速度的调节仍要循序渐进。Shiragami 报道^[10], 随着 Cultispher-G 多孔微球浓度和搅拌速度的上升, 细胞密度

反而下降。这可能是因为在培养细胞先是随着在微球的外部表面生长, 然后才进入内部表面生长^[11], 在外部表面生长的细胞对搅拌剪切力自然是敏感的。

虽然多孔微球的制备和培养技术尚处于发展阶段, 还需不断完善, 但是该技术具有很好的应用前景, 值得进一步加以研究。

参 考 文 献

- [1] Griffiths B. *Cytotechnology*, 1990, 3: 109~116.
- [2] Mosman T. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55.
- [3] Cahn F. *Trends Biotechnol*, 1990, 8: 131~136.
- [4] Gotoh T, Honda H, Shiragami N *et al.* *Cytotechnology*, 1993, 11: 35~40.
- [5] Nilsson K, Duzsaky F, Mosbach K *et al.* *Bio/Technology*, 1986, 4: 989~990.
- [6] Reiter M, Hhoenwarter O, Gaida T *et al.* *Cytotechnology*, 1990, 3: 271~277.
- [7] Reiter M, Borth N, Bluml G *et al.* *Cytotechnology*, 1992, 9: 247~253.
- [8] Looby D, Griffiths J B. *Cytocechnology*, 1989, 1: 339~346.
- [9] Verax Corporation, Lebanon, USA, Application Note, 1988.
- [10] Shiragami N. *Bioprocess Eng*, 1993, 8: (5-6); 295~299.
- [11] Thomas J. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14: 203~208.

Preliminary Study of High Density Cultivation of Vero Cells with Self-made Porous Microspheres

Wang Dianliang Xiao Chengzu Chen Zhaolie Huang Zicai

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

Abstract During studying high density cultivation of Vero cells with Biosilon micro-carrier we also developed a kind of gelatin porous microsphere. Their diameter range were 76~150 μm (18.6%) and 150~200 μm (45.6%) respectively. Stained with MTT, it showed that Vero cells could proliferated both on the exterior surface and in the interior surface of the porous microspheres. When the concentration of porous microsphere was 5 mg/ml, inoculum cell density was $1.23 \times 10^6/\text{ml}$, Vero cell density could reach $1.24 \times 10^7/\text{ml}$, after 12 days of cultivation in a modified Wheaton spinner bottle. The dead cell density was about $1 \times 10^5/\text{ml}$, about 0.8% of the total cells. These experiments proved that the porous microsphere made by our laboratory was also suitable for high density cultivation of Vero cells.

Key words Self-made porous microsphere, Vero cell, high density cultivation