

用筐架式填充床生物反应器高密度培养工程细胞

陈幼妹 朱 慧 宋后燕

(上海医科大学分子遗传研究室 上海 200032)

王国政 张雯英 Corey Jcakin David Freedman

(New Brunswick Scientific Co. Inc, USA)

摘 要 用圆盘型聚酯载体筐架式填充床内作为细胞生长分裂的支持物,通过笼状唧筒生物反应器连续培养能合成和分泌 rt-PA 的工程细胞,经 28d 连续灌注培养,细胞密度达 4.7×10^7 /ml, rt-PA 浓度最高达 $9.9 \mu\text{g}/\text{ml}$, rt-PA 活性最高达 4068IU/ml。

关键词 生物反应器,填充床,工程细胞,聚酯载体

80年代以来细胞培养技术已广泛应用于研制和生产许多生物工程产品,如疫苗,单克隆抗体,激素和酶等,高密度大规模细胞培养是这些产品实现工业化生产的关键。

常规用培养瓶或滚瓶培养贴壁细胞,所得细胞数有限。Van, Wegel^[1]首先用微载体培养贴壁细胞,而今在国外用生物反应器加微载体培养哺乳类动物细胞的体积已达数吨以上^[2]的工业化生产规模。由于微载体提供巨大的表面积,并且用灌注系统及时补充营养和排除代谢废物,使细胞密度达到 $2 \times 10^6 \rightarrow 7 \times 10^6/\text{ml}$ 。但是使用普通生物反应器和葡聚糖类微载体培养细胞,微载体密度过高时对细胞会产生一定的毒性作用^[3],并引起混合气泡和剪切力^[4]以及低氧转移率等问题,使细胞密度难以进一步提高,进而影响工程细胞产品的生产效率。

我们利用美国 NBS 公司生产的新型 Celligen-聚酯载体筐架式填充床生物反应器配以合适的培养基和培养条件^[5],成功地培养了能合成和分泌 rt-PA 的工程细胞。并与静置培养、微载体搅拌培养系统进行了比较,在细胞贴壁率,细胞密度,目的产物生产水平等方面有了显著提高。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与培养基

能合成和分泌 rt-PA 的 EB 5 工程细胞株,由上海医科大学分子遗传学研究室宋后燕等构建^[6,7],工程细胞逐级用培养瓶,滚瓶扩增。生长期使用 DMEM 及 F12(GIBCO) 1:1 混合培养基,添加抗菌素,碳酸氢钠调节 pH,小牛血清浓度从 10、5、3 到 1% 呈阶梯式递减。收获期用 GIBCO 公司的 CHO-S-SFM II 无血清培养基并加合适氨基酸和转录水

本文于 1995 年 12 月 11 日收到。

平诱导剂。在灌注培养过程中葡萄糖浓度从 3.15g/L 增加到 10g/L。

1.2 细胞反应器与载体

图 1 表示 Celligen-聚酯载体筐架式填充床生物反应器结构,反应器总体积为 2.2L,工作容积 1.5L,筐架体积 0.65L,填充 65g 聚酯载体。载体用 PBS 浸泡后高压灭菌,冷却后移去 PBS,加入含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 新鲜培养基,接种 7×10^8 个细胞。2d 后开动连续灌注系统,培养基交换量为 2-3.5L/d,维持葡萄糖及细胞生长所需其他物质的浓度,培养过程中各项参数由计算机控制,搅拌速度为 100~160r/min, DO 50%, pH7.4。

反应器的筐架内填充圆盘型聚酯载体,这种圆盘型载体直径 6mm,由复层聚酯纤维交织,提供细胞贴附和间隙中扩增的场所。培养基能穿过孔隙,利于气体、营养物和代谢产物的交换与排除。

1.3 静止和微载体悬浮培养 rt-PA 工程细胞

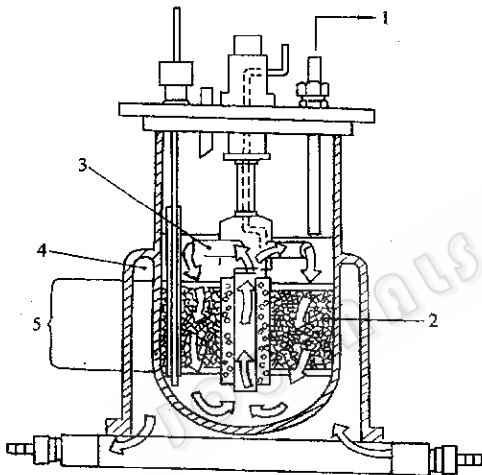


图 1 聚酯微载体筐架式填充床生物反应器结构

Fig.1 Diagram of Celligen plus packed-bed basket cell culture system

- | | |
|------------------------|------------------|
| 1. Harvest, | 2. Disk bed, |
| 3. Impeller port, | 4. Water jacket, |
| 5. Fibrous-bed basket, | |

细胞分别培养于 60ml 方瓶静止培养,接种 7.5×10^5 细胞,培养基 5ml,每天调换培养基,血清浓度 2 天降级一次,共 10d。搅拌式生物反应器培养用 NBS 公司制造的 1.5L Celligen 生物反应器,工作体积 1.2L,加入 Cytodex III (Pharmacia)6g。接种 3.6×10^8 细胞,各参数为搅拌速度 40~70r/min, pH7.2, DO 50%。2d 后启动灌注系统,灌注量 0.8~1.6L/d,血清浓度视细胞生长情况逐级降低,共培养 15d。

1.4 葡萄糖、乳酸、铵盐测定

葡萄糖、乳糖、铵盐分别用 Sigma 的试剂盒测定。

1.5 细胞计数

细胞密度用 0.1% 结晶紫染色后在血球计数板上进行计数。

1.6 t-PA 抗原浓度测定和 t-PA 活性测定

t-PA 抗原浓度用 ELISA 试剂盒, t-PA 活性用发色底物法试剂盒(购自 Biopool AB, Sweden)测定。

2 结果与讨论

2.1 细胞生长

分泌 r-tPA 的工程细胞静止培养生长曲线如图 2,细胞起始密度为 1.5×10^5 /ml,第 6 天为 2.2×10^6 /ml,细胞增殖 14 倍。以后由于血清浓度降低,细胞脱落崩解,细胞数随之降低,最后一天仅达 1×10^6 /ml,脱落率 49%。Celligene-Cytodex III 微载体悬浮培养接种

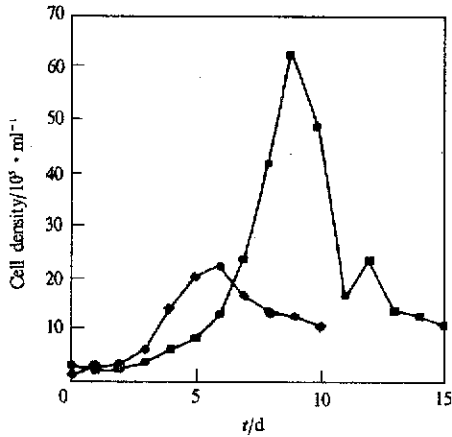


图2 CHO细胞静止培养和微载体搅拌反应器培养生长情况

Fig.2 rCHO cell growth in a static T-flask(25cm²)and microcarrier impeller bioreactor
 ◆— Static T-flask
 ■— Microcarrier impeller bioreactor

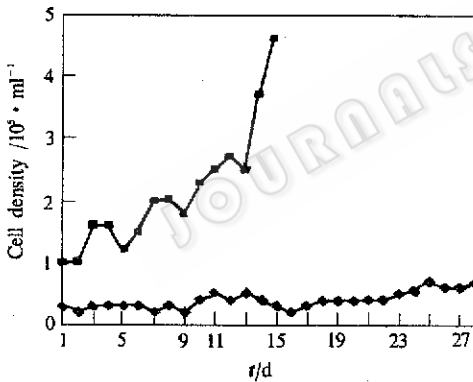


图3 CHO细胞在筐架式填充床反应器和微载体搅拌反应器中游离子细胞情况

Fig.3 Ionized cell in celligen Plus packed-bed basket system and microcarrier impeller bioreactor
 ◆ Celligene Plus
 ■ Microcarrier impeller bioreactor

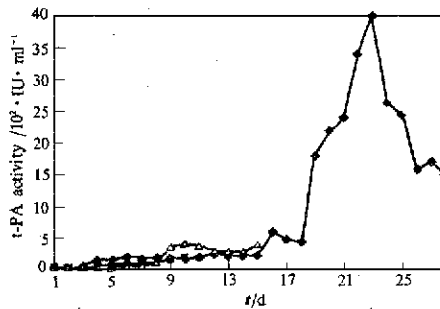
密度为 $3 \times 10^5/\text{ml}$, 接种后 5h, 约有 70% 细胞贴附于微载体上, 经 4d 滞留期后细胞密度开始骤增(图 2), 最高细胞密度达 $6.2 \times 10^6/\text{ml}$, 增加 20 倍(第 9d)。此时培养基灌注量达 1.6L/d, 脱落细胞为 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 脱落率为 3%, 第 12 天起用无血清培养, 脱落率上升到 10%, 第 15 天游离细胞大量出现, 脱落率达 60%。游离细胞数剧增的原因可能是: (1) 血清浓度降低, 在微载体表面与细胞粘附有关的纤维结合蛋白等减少。(2) 重组工程细胞分泌 t-PA, 激活纤溶系统使纤维粘连蛋白等降解。(3) 搅拌型生物反应器由搅拌产生剪切力使粘附差的细胞脱离载体。

在新型筐架式填充床生物反应器中由于载体固定于筐架中, 避免了剪切力影响, 使贴壁率增加, 细胞脱落显著减少。但是细胞生长在载体中, 培养过程中不能直接检测贴壁细胞数。本次实验接种细胞密度为 $5.6 \times 10^5/\text{ml}$, 2h 后取样, 游离细胞仅为 $2 \times 10^4/\text{ml}$, 96% 细胞已固定在载体上。最终筐架拆除细胞计数密度是 $4.7 \times 10^7/\text{ml}$, 细胞增加 80 倍。在收获培养基中悬浮细胞非常少, 即使在无血清培养基灌注培养时游离细胞仍只有 $8 \times 10^5/\text{ml}$, 脱离率低于 0.2%。图 3 显示从培养基中观察到游离细胞情况, 脱率低, 极有利于提高基因表达水平, 表达产物的稳定性和纯化。表 1 比较了 3 种不同培养系统中工程细胞生长情况, 可见在筐架式填充床反应器中细胞密度比 Celligene-微载体培养高 7 倍。

2.2 rt-PA 表达水平

3 个培养系统中 BE 5 细胞 rt-AP 表达水平见图 4, 静止培养时细胞分泌 rt-PA 的活性和浓度最高分别为 170IU/ml, 0.84mg/L, 微载体搅拌培养时, rt-PA 分泌量比静止培养增高, t-PA 浓度在 1mg/L 以上有 6d, 最高为 1.4mg/L, 但是搅拌培养时, 细胞从微载体上脱落率高, 悬浮细胞死亡崩解时释放的蛋白酶可水解 rt-PA, 影响了产品的表达水平。近年来有不少学者对此作了各种努力, 其中包括从载体、培养基直到生物反应器的改进。本次实验我们用 GIBCO 的 CHO-S-SFMII 无血清培养基在新型生物反应器中培养工程细胞,

收获液中 rt-PA 浓度高于 2mg/L 可达 13d, 最高为 10mg/L, t-PA 活性为 4068IU/ml, 日灌注量是 3.5L。表 2 比较了 3 种培养系统中工程细胞分泌 rt-PA 的水平。



4 静止培养、微载体搅拌培养及聚酯纤维载体填充床培养 rt-PA 表达情况

Fig.4 The production of rt-PA in static, microcarrier impeller

bioreactor and polyester packed-bed basket system

◆—Celligen Plus

△—microcarrier impeller bioreactor

■—static

表 1 3 种体系中 rCHO 细胞生长情况的比较

Table 1 Cell growth in static microcarrier and bed-packed system

Culture system	Static	Microcarrier impeller	Bed-packed
Inoculated cell density/ $\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$	1.5	3.0	5.6
Maximum cell density/ $\times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$	2.2	6.2	47
Cell increasement rate/%	14	20	80
Cell detachment rate/%	49	60	0.2

表 2 3 种体系中 BE5 细胞分泌 rt-PA 的水平

Table 2 t-PA antigen concentration in static, microcarrier and bed-packed system

Culture system	Static	Microcarrier impeller	Bed-packed
Maximum rt-PA antigen/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.84	1.4	9.9
Maximum rt-PA expression level/ $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$	170	440	4068

表 3 2 种体系中 BE5 细胞代谢情况比较

Table 3 Glucose consumption rate, lactate and ammonia production rates in microcarrier and packed-bed systems

Production yield	Microcarrier impeller	Packed-bed
Glucose consumption rate/ $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$	3.4	22.5
Lactate production rate/ $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$	0.3	12.8
Ammonia production rate/ $\text{mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$		6.5

2.3 细胞代谢

图 5 表示用筐架式填充床反应器培养 BE5 细胞过程中葡萄糖、乳酸和氨代谢情况。接种细胞后 2d, 葡萄糖消耗为 0.8g/L, 一周后为 12.6g/L, 用无血清培养基时第 18d 升到 15g/L, 最高可到达 22.5g/L。而乳酸及氨在反应器中浓度也逐渐升高, 最后 4d 乳酸积累

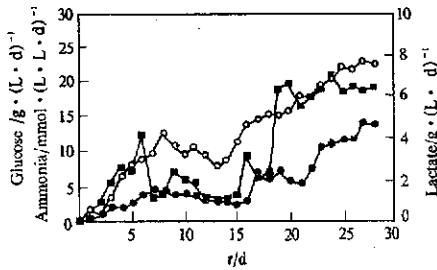


图 5 聚酯载体筐架式填充床内氨、乳酸、葡萄糖情况
Fig. 5 glucose consumption rate and lactate and ammonia production rates of rCHO cell cultivation in packed-bed-bioreactor

○ glucose, ■ lactate, ● ammonia

连续培养的时间。

产生率达 12.8g/L, 氨也同样达 6.5mmol/L。表 3 比较在 2 种生物反应器中细胞代谢产物的最高浓度。

葡萄糖为生物体代谢时的能源物质, 通常葡萄糖消耗多说明细胞代谢旺盛, 生长和分裂速度快; 乳酸和氨产生增多在一定程度上也是细胞代谢速率高的表现, 但乳酸和氨浓度过高不利于细胞的存活, 实验最后几天 rt-PA 表达水平下降, 可能也与此有关。因此需要改善氧供等参数和增加灌注量进一步优化细胞生长的微环境, 以便延长细胞

参 考 文 献

- [1] Van Wezel A L. Nature (london), 1967, 216:64~65.
[2] Nelson K L. Biopharm Manufact Feb. 1988.
[3] Croughan, M S, Hanel J F, Wang D I C. Biotechnol Bioeng, 1988, 32:975~982.
[4] Wang G, Zhang W *et al.* Cytochnology, 1992, 9:41~49.
[5] 宋后燕等. 上海医科大学学报, 1992, 19(增刊):12~17.
[6] 宋后燕等. 上海医科大学学报, 1992, 19(增刊):6~11.

High Density Engineering Cell Culture in a Packed Bed Bioreactor

Cheng Youmei Zhu Hui Song Houyan

(Department of Molecular Genetics, Shanghai Medical University, ShangHai 200032)

Wang Guozheng Zhang Wenying Corey Jackin David Freedman

(New Brunswick Scientific Co. Inc, USA)

Abstract A packed-bed perfusion system for the production of high yielding culture is described employing a stationary basket with polyester fiber disks as a support matrix for immobilized cell. A caged pumping impeller is also employed for internal liquid recirculation. Studies were conducted in a Celligen Plus packed-bed bioreactor with serum-containing medium for the growth of rCHO cells and serum-free medium for the production of t-PA. After 28 days of perfusion culture in the packed-bed system, a final density of 4.7×10^7 cells per cm^3 of bed volume was achieved. The highest density of rt-PA was 9.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the activity of rt-PA can be 4068 IU/ml. The process demonstrates that this system can increase the cell density and the production level of genetic product.

Key words Packed bed bioreactor, perfusion system, engineering cell