

多孔微球固定化 CHO 工程细胞生产 rt-PA 的研究

陈昭烈 吴本传 刘 红 林福玉 李世崇 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 以 Cytopore 多孔微球固定产重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)CHO 工程细胞株 4B3 在 2L 搅拌式生物反应器用无血清培养基 DF5S 连续灌流培养。4B3 细胞的最大活细胞密度和 rt-PA 生产水平分别达到 $8.83 \times 10^6/\text{mL}$ 和 12473 IU/mL。含 rt-PA 的 4B3 细胞培养上清经 MPG 吸附层析和 Lysine-sepharose 4B 亲和层析两步纯化,rt-PA 的纯度达到 98%。

关键词 细胞培养,CHO 工程细胞,组织型纤溶酶原激活剂

分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0450-54

组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)是由 527 个氨基酸组成的具有转化纤溶酶原为纤溶酶的丝氨酸类蛋白酶^[1]。它与血栓基质中的纤维蛋白有显著的亲和力并受其激活,选择性地作用于血栓中的纤溶酶原使之转化为纤溶酶,从而发挥高效特异的溶栓作用。自 1987 年重组人组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)作为第一个批准用于临床治疗以血栓形成为主要病理变化的疾病的重组真核细胞产品以来,rt-PA 已广泛用于急性心肌梗塞、肺梗塞和脑梗塞的救治。由于国外生产的 rt-PA 价格昂贵,难用于我国的医疗保健,因此需自力更生研究开发国产 rt-PA 产品。本文介绍在搅拌式生物反应器中用无血清培养基和 Cytopore 多孔微球高密度固定化产 rt-PA CHO 工程细胞生产 rt-PA。

1 材料和方法

1.1 细胞

产 rt-PA CHO 工程细胞 4B3 是由含 rt-PA 目的基因和 dhfr 标记基因的表达载体,用电击法转染 CHO-dhfr 细胞所建立的具有稳定表达 rt-PA 表型的细胞株,rt-PA 的表达水平为 $800 \sim 1000 \text{ IU}/10^6 \text{ cells}/\text{d}$ (由本所蛋白质工程研究室构建)^[2]。

1.2 培养基和载体

DMEM、F12 为 GIBCO 产品。自制 DF5S 无血清培养基以优化的 DMEM:F12(1:1)为基础培养基,添加胰岛素、亚硒酸钠、乙醇胺、维生素 C 和含柠檬酸铁、硫酸锌和硫酸铜的微量元素混合液配制而成^[3]。所有无血清培养基添加成分均购自 Sigma 公司,小牛血清(NBS)为国产试剂,Cytopore 多孔微球购自 Pharmacia。

1.3 4B3 细胞的固定化培养

在 2000mL 的 Bellco 转瓶内用含 2%(V/V)NBS 的 DMEM:F12(DF+NBS)扩殖

4B3 细胞,待细胞形成致密单层后,用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化,经不含 NBS 的 DMEM:F12 洗涤后,分别用 DF+NBS 和 DF5S 悬浮 4B3 细胞,在 250mL Bellco 搅拌瓶内用 Cytopore 2g/L 固定化 4B3 细胞。自培养的第 2 天起更换培养基,培养基更换量从培养体积的 40% 逐渐增加至 85%。在 2L 生物反应器(B. Braun Biostat B)中用 Cytopore 2g/L 和 DF5S 灌流培养 4B3 细胞,细胞接种密度为 2.6×10^6 cells/mL,设置培养温度为 37℃,pH7.20,搅拌速度 50r/min,OD(溶解氧)30%~50%。第三天起开始灌流,灌流量由 500 mL/d 逐渐加大至 2800 mL/d。取样测定细胞密度、rt-PA 活性、葡萄糖浓度和乳酸浓度。

1.4 rt-PA 的纯化和纯度分析

参考文献 [4],用微孔径玻璃珠(MPG)吸附层析和 Lysine-sepharose 4B 亲和层析纯化含 rt-PA 的 4B3 细胞培养上清,用 SDS-PAGE 结合紫外光谱扫描确定 rt-PA 的纯度。

1.5 细胞计数和 rt-PA 活性测定

用改良 MTT 比色法^[5]计数 4B3 细胞的活细胞密度,所用试剂四甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Fluka 产品,N,N-二甲基酰胺、Triton X-100 为国产试剂;rt-PA 活性测定采用琼脂糖-纤维蛋白-平板法^[6];rt-PA 标准品由英国国立生物标准和控制研究所(86/670,NIBSA)提供。

1.6 葡萄糖和乳酸的测定

葡萄糖测定采用 GOD-PAP 法,所用试剂盒为北京中生生物高技术公司产品;乳酸测定采用酶比色法,所用试剂为德国 Centric 公司的乳酸测定盒。

2 结 果

2.1 DF5S 和 Cytopore 对 4B3 细胞的生长和 rt-PA 表达的影响

将 4B3 细胞从含 2% NBS 的 DMEM:F12 转入用 DF5S 培养,其生长方式由贴壁依赖型转变为非贴壁依赖型,呈单个球形细胞和细胞团块悬浮于 DF5S 中(图 1)。在方瓶中用 DF5S 悬浮培养 4B3 细胞,rt-PA 的表达水平与用 DF+NBS 培养相当,但 4B3 细胞的生长速率和饱和细胞密度只分别相当于用含血清培养基培养的 80% 和 70% 左右(表 1)。

多孔微球是既能用于支持细胞贴壁依赖性生长又能用于固定化非贴壁依赖性细胞的

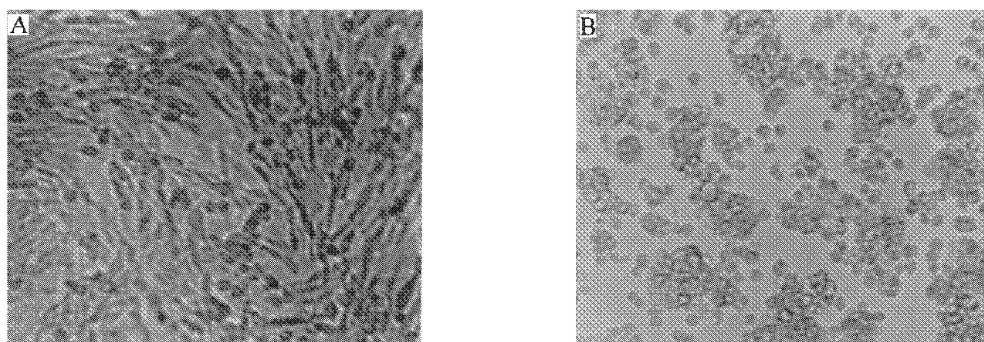


图 1 4B3 细胞在 DF5S 中培养的细胞生长

Fig. 1 Growth of 4B3 cells cultured in DF5S

A. DF+NBS, B. DF5S

表1 4B3细胞在DF5S中的细胞生长和rt-PA表达

Table 1 Growth and rt-PA expression of 4B3 cells in DF5S

Medium	Growth rate /h	Saturated cell density 10 ⁴ /mL	Specific rate of rt-PA production/IU/10 ⁶ cells/d
DF + NBS	0.041	134 ± 31	1006 ± 264
DF5S	0.033	94 ± 27	926 ± 232

一种新型细胞培养载体^[7]。为了在生物反应器中用DF5S灌流培养4B3细胞时,有效地截留4B3细胞,提高4B3细胞的培养密度和rt-PA的

生产水平,在搅拌瓶中比较了有血清和无血清培养条件下,用Cytopore多孔微球固定化培养4B3的细胞生长和rt-PA生产。从图2结果看,用DF5S培养4B3的细胞生长和rt-PA生产效果均优于用含血清培养基培养。在培养开始的6天内4B3细胞在含血清培养基和无血清培养基中的生长和rt-PA生产效果相同,随后4B3细胞在无血清培养基DF5S中的细胞生长效果和rt-PA生产水平均比含血清培养基培养条件下高10%~20%。

2.2 在反应器中用DF5S和Cytopore培养4B3细胞的生长和rt-PA生产

在2L搅拌式生物反应器内4B3细胞接种密度2.6 × 10⁵ cells/mL,用Cytopore和DF5S连续灌流培养4B3细胞,整个培养过程持续46d。当4B3细胞达到较高的培养密度时4B3细胞不仅充填了Cytopore的孔隙,并在载体的表面形成了多层致密的细胞团(图3)。活细胞密度于第20天达到8.83 × 10⁶ cells/mL,随后细胞密度逐渐下降并于第29天后稳定在4~5 × 10⁶ cell/mL;

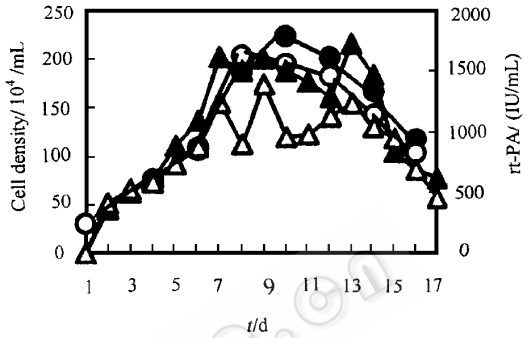


图2 在搅拌瓶中用Cytopore和DF5S固定化培养4B3的细胞生长和rt-PA生产

Fig.2 Growth of rt-PA production of 4B3 cells immobilized with cytopore and DF5S in spinner flask

●- Cell (DF5S); ○- Cell (DF + NBS)
▲- rt-PA (DF5S); △- rt-PA (DF + NBS)

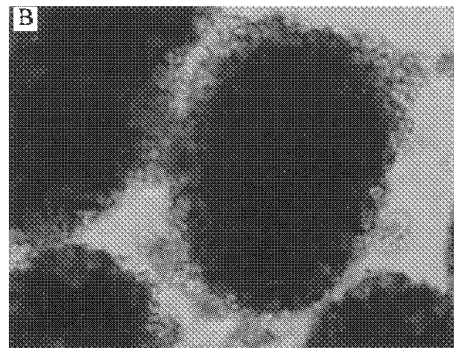
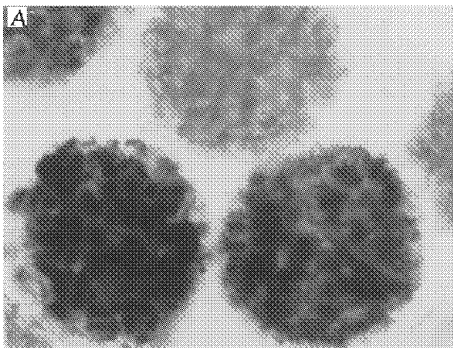


图3 在2L生物反应器中用Cytopore和DF5S固定化培养4B3的细胞生长

Fig.3 Growth of 4B3 cells immobilized with cytopore and DF5S in a 2L bioreactor

A Cell took up the inner space of microcarrier ;

B Cell formed compact layers and clumps on the surface of microcarrier

rt-PA 的生产水平于第 22 天达到 12473 IU/mL, 随后亦逐渐下降, 于第 27 天后稳定在 4000 IU/mL 左右的水平(图 4)。由于在培养过程中动态地对培养基实施连续灌流, 培养基中葡萄糖含量一直维持在能满足细胞代谢需要的水平, 但随着培养时间的延长, 培养基中乳酸的浓度缓慢上升, 乳酸的最高含量达到 23.6 mmol/L(图 5)。

2.3 rt-PA 的纯化

含 rt-PA 的 4B3 细胞培养上清经 MPG 吸附层析和 Lysine-sepharose 4B 亲和层析两步纯化, rt-PA 的纯度提高 380 倍, 比活性达 4.6×10^5 IU/mg 蛋白, rt-PA 的活性总回收率超过 100%。

用 SDS-PAGE 还原电泳分析纯化的 rt-PA, 在分子量为 65 kD 的区域有一条很浓的蛋白质着色带, 在分子量为 33 kD 和 36 kD 的区域各有一条明显的蛋白质着色带(图 6)。紫外光谱扫描分析, 经纯化处理的 rt-PA 的纯度超过 98%。

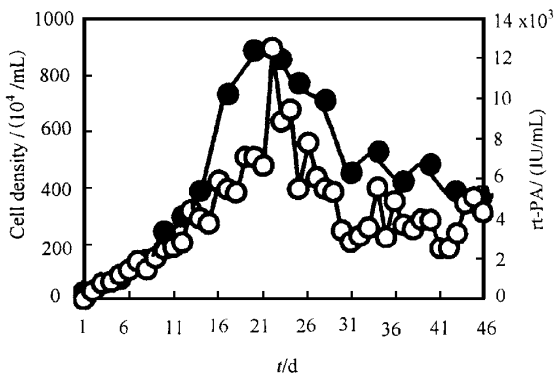


图 4 在 2L 生物反应器中用 DF5S 和 Cytopore 固定化培养 4B3 的细胞生长和 rt-PA 生产

Fig.4 Growth and rt-PA production of 4B3 cells immobilized with cytopore in DF5S a 2L bioreactor

●- Cell; ○- rt-PA

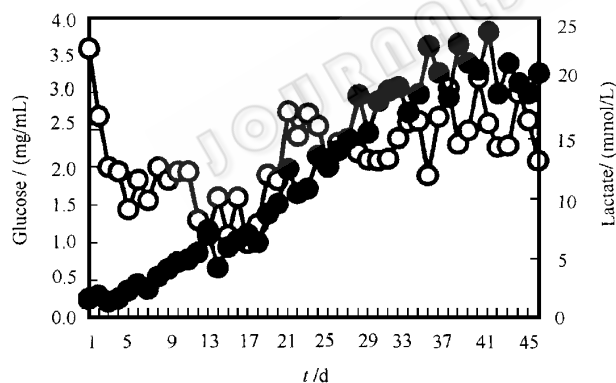


图 5 在 2L 生物反应器用 DF5S 和 Cytopore 固定化培养 4B3 细胞的葡萄糖和乳酸代谢

Fig.5 Glucose consumption and lactate production of 4B3 cells immobilized with cytopore in DF5S a 2L bioreactor

●- Glucose; ○- Lactate

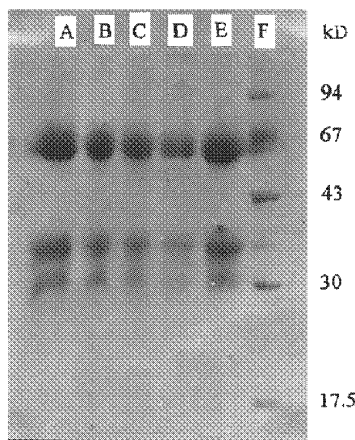


图 6 rt-PA 的 SDS-PAGE 还原电泳图谱

Fig.6 Reduced SDS-PAGE of rt-PA

A~E: rt-PA of different batches;

F: Marker

3 讨论

动物细胞的高密度培养和无血清培养是优质、高效地生产具有重要医用价值的重组动物细胞产品的关键技术^[8]。由于 rt-PA 的临床使用剂量大(1.25 mg/kg), 且 rt-PA 易与动物血清中的某些蛋白质结合形成复合物^[9], 增加了 rt-PA 产品生产及质量控制的难度。

采用无血清培养技术生产 rt-PA,由于所用的无血清培养基的成份明确,质量一致,蛋白含量低,因而不仅有利于 rt-PA 的纯化和质量控制,同时也有利于提高 rt-PA 生产的稳定性。

动物细胞微载体灌流技术是实现细胞高密度培养的有效技术手段。传统的实心球型微载体只能支持贴壁依赖性生长的细胞,因而要在无血清培养条件下使悬浮生长的 4B3 细胞达到较高的培养密度,只能使用既能支持贴壁依赖性细胞生长,又可固定悬浮生长细胞的多孔微球。采用 Cytopore 多孔微球和 DF5S 固定化培养 4B3 细胞,既能有效地对 4B3 细胞进行固定,从而便于对培养体系实施灌流,又有利于 4B3 细胞的生长和 rt-PA 生产,表明 DF5S 能满足 4B3 生长细胞的需要,同时 Cytopore 对 4B3 细胞有较好的相容性。

MPG 是具有多孔特性的二氧化硅,其表面含有大量能与糖蛋白结合硅羟基。根据 MPG 蛋白结合量大,流速高的特点把 MPG 吸附层析作为纯化 rt-PA 的第一步,以 Lysine-sepharose 4B 亲和层析作为第二步,使整个纯化流程具有纯化效率高、回收率高和可连续操作的优点,可用于扩大规模生产 rt-PA。

由于 rt-PA 的临床使用剂量很大,rt-PA 的生产只有达到一定规模才有其实际意义。要提高 rt-PA 的生产规模,一方面要以具有良好生长特性和高水平表达 rt-PA 的工程细胞株作为前提,另一方面须进一步扩大培养规模和优化生产工艺。

参 考 文 献

- [1] J. B. Griffiths, A. Eletricuwala. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1987, Vol. 34, pp. 147~166.
- [2] 欧阳应斌, 黄培堂, 徐秀英等. 生物技术通讯, 1995, (1): 11~15.
- [3] Chen Z. L., Liu H., Wu B. C. *et al.* American Chemical Society 216th National Meeting, Division of Biochemical Technology. August 23~27, 1998, Boston, Massachusetts.
- [4] 陈昭烈, 吴本传, 刘红. 发明专利公报, 公开号: 1161973A, 1997, 13 卷第 42 号.
- [5] 贾熙华, 肖成祖. 军事医学科学院院刊, 1993, 17: 207~211.
- [6] 韩素文, 俞炜源, 李秀珍等. 军事医学科学院院刊, 1987, 11: 101~118.
- [7] B. Griffiths. *Cytotechnology*, 1990, 3: 109~116.
- [8] H. Murakami. *Cytotechnology*, 1990, 13: 3~7.
- [9] A. Lubinieck, R. Arathoon, G. Polastri *et al.* Butterworth, 1989, pp. 442~457.

Study on rt-PA Production by Recombinant CHO Cells Immobilized with Porous Microcarrier

Chen Zhaolie Wu Benchuan Liu Hong Lin Fuyu Li Shichong Huang Peitang
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract Using porous microcarrier Cytopore, immobilized cultivation of a recombinant CHO cell line 4B3 producing tissue type plasminogen activator (rt-PA) was performed in a 2L stirred tank bioreactor with the perfusion of a serum-free medium DF5S. The highest viable cell density of 4B3 and the highest production level of rt-PA were 8.83×10^6 cells/mL and 12473 IU/mL, respectively. Purified by MPG absorption chromatography and Lysine-Sepharose 4B affinity chromatography, the purified rt-PA with a purity exceed 98% was obtained from the culture supernatant.

Key words Cell culture, recombinant CHO cell, rt-PA