

搅拌生物反应器中杂交瘤细胞生长与破损的初步研究

谭文松 戴千策 陈志宏 陈因良

(华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

摘要 采用连续悬浮培养技术,在3种培养基组成下实验考察了生物反应器中机械搅拌强度和气泡对细胞生长和破损或伤害的作用,发现杂交瘤细胞在无血清培养基中培养时,120r/min的机械搅拌强度对细胞产生了生理伤害作用,而造成细胞破损的主要是气泡。血清和 Pluronic F68 对细胞均有保护作用,它们的存在能保护细胞免受流体剪切的生理伤害作用,适应更高的机械搅拌强度,Pluronic F68 能有效地防止气泡对细胞的破损作用。另外,对它的保护作用机理也作了讨论。

关键词 细胞培养,生物反应器,杂交瘤细胞,细胞破损,保护

随着细胞融合技术和重组 DNA 技术的发展,大量高值生物制品,如各类单克隆抗体、病毒疫苗等,可以应用动物细胞培养技术来进行生产,其中通过杂交瘤细胞体外大规模培养生产单克隆抗体就是一个典型的例子^[1]。因此应用生物反应器进行动物细胞的大规模培养越来越广泛地受到人们的高度重视。在生物反应器中为了支持细胞生长,必须提供足够的溶氧和均一的培养环境,其中最有效的办法是机械搅拌和直接通气鼓泡,但是由于动物细胞的脆弱性,这种生物反应器中的机械搅拌和鼓泡往往会导致十分严重的细胞破损和损伤^[2~6],从而大大制约了大规模动物细胞培养过程的实现。为此有必要探索生物反应器中导致动物细胞破损的一些基本因素以寻求防止细胞破损的有效途径。本文采用连续悬浮培养过程来系统考察流体运动和气泡这两种存在于生物反应器中的基本现象以及培养基组成对细胞生长和破损的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞和培养基

1.1.1 细胞: 为分泌抗人小细胞肺癌单克隆抗体 IgG_{2a} 的鼠-鼠杂交瘤细胞 2F7(上海市肿瘤研究所)。

1.1.2 培养基: (1)无血清培养基(SFM),见文献[7];(2)无血清培养基加 1.0% 新生小牛血清(NBCS,华东理工大学生化工程研究所细胞培养技术研究室);(3)无血清培养基加 0.1% Pluronic F68(BASF, Ludwigshafen, Germany)。

1.2 生物反应器培养

本文工作部分得到国家“863”高新技术研究发展计划生物技术领域的资助。

本文于 1994 年 12 月 12 日收到。

本实验采用一台 1.5L 的 CelliGen 生物反应器系统(New Brunswick Scientific Co., edison, NJ, USA), 实际培养体积为 1.3L。温度和溶氧水平(DO)分别控制在 36.8℃ 和 60% 空气饱和度, pH 由补加 5.6% NaHCO_3 溶液或使用气体混合物中的 CO_2 予以控制, 一般为 pH7.25。实验过程中稀释率 D 始终保持恒值, 为 0.55d^{-1} 。为了便于实验结果的比较和分析, 在实验过程中采用对细胞没有任何伤害作用的 60r/min 和表面通气方式作为对比实验, 当细胞生长处于稳定状态时再改变参数考察细胞对此作出的瞬态和稳态响应。对每一种培养基组成均安排如下两组实验。

1.2.1 机械搅拌强度的影响: 当细胞生长处于稳定状态时, 改变机械搅拌转速(从 60 至 200r/min), 以研究流体湍流和气泡夹带对杂交瘤细胞生长和破损的影响。在高转速时, 若液面位置不提高, 将发生气泡夹带现象。在执行这部分实验时反应器采用表面通气。

1.2.2 气体鼓泡的影响: 当细胞生长处于稳定状时, 改用气体直接鼓泡方式以考察气体鼓泡对杂交瘤细胞生长和破损的影响。气体分布器装于搅拌桨上, 气体出口孔径为 0.5mm。为保持气体鼓泡的连续性, 在气体入口管道上加一个 100ml 的缓冲瓶, 在其后面接气体流量计, 控制气体流量为 100 或 $150\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在进行这部分实验时, 搅拌转速恒定在 60r/min。

1.3 细胞计数

每 12h 取样 10ml, 活细胞密度和细胞活性由台盼蓝染色法和血球计数板确定, 计数重复 3 次。

1.4 细胞生长速率估计

使用表观生长速率 μ_{app} 作为细胞生长和破损的特征参数, 定义

$$\mu_{\text{app}} = \mu_0 - k_d \quad (1)$$

式中 μ_0 为细胞的本征或真实比生长速率, 与反应器的流体力学条件无关, 只受细胞本身和基质控制; k_d 为细胞比死亡速率, 与细胞所处的生理和物理环境有关。

在反应器系统中对活细胞浓度作物料衡算, 得

$$\frac{dC}{dt} = (\mu_{\text{app}} - D)C \quad (2)$$

式中 C 为活细胞密度, t 为培养时间, D 为连续培养过程的稀释率。当细胞生长处于稳定状态时, $DC/dt = 0$, 则有

$$\mu_{\text{app}} = D \quad (3)$$

如果某一参数的改变使得细胞密度随时间而下降, 则造成 μ_{app} 减小, 意味着细胞发生破损, 或细胞生长受到抑制。在此非稳态状态下, $dC/dt < 0$, 积分式(2)得

$$\ln \frac{C}{C_0} = (\mu_{\text{app}} - D)t \quad (4)$$

式中 C_0 为稳态时的活细胞密度(即某个参数改变时的初始活细胞密度)。通过活细胞密度 C 的自然对数对时间 t 的线性回归, 即可估计 μ_{app} 的大小。

2 结果与讨论

杂交瘤细胞在 CelliGen 生物反应器中的接种活细胞密度为 $2.0 \times 10^5 \text{cell}\cdot\text{ml}^{-1}$, 活性 92%, 开始实验前采用间歇操作方式, 当细胞生长处于对数生长中期, 活细胞密度达到

$8.7 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时开启连续培养系统。

2.1 无血清培养基加 1.0% 血清

2.1.1 机械搅拌强度: 当杂交瘤细胞在温和搅拌强度(60r/min)下生长达到稳定状态后,开始将转速逐步加大到 160r/min,由图 1 可见,除了在转速刚增加时活细胞密度和活性略有波动外,这些逐步递增的机械搅拌强度并未对细胞产生太大的伤害作用,细胞能很快适应新的搅拌条件而使其密度和活性稳定在与对照试验相同的水平。降低转速至 60r/min,使细胞生长重新回到温和搅拌环境,3d 后突然加大转速至 160r/min,实验发现开始时细胞受损严重,活细胞密度和活性明显下降,但是细胞经过一段时间适应后,能够恢复生长并且最终达到原来的稳定状态。上述现象表明,杂交瘤细胞能够适应高速机械搅拌,且适应过程与转速改变的方式和增加的幅度有关,这与 Petersen 等人^[8]在粘度计中的试验结果是相吻合的。

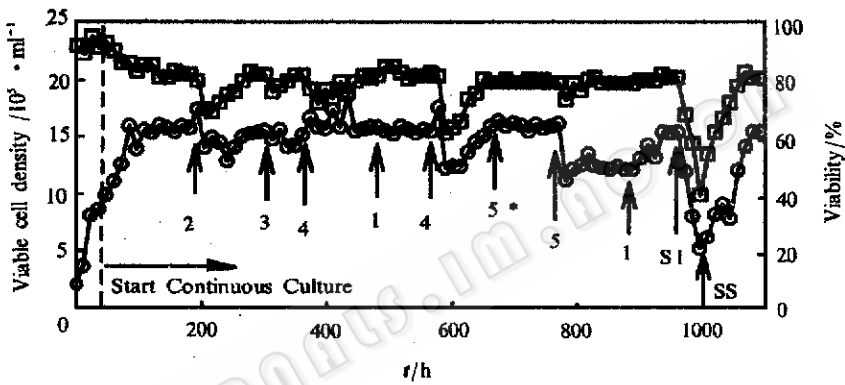


图 1 机械搅拌强度和气体鼓泡对杂交瘤细胞生长与破损的作用

Fig. 1 Effects of mechanical agitation intensities and gas sparging on growth and damage of hybridoma cells

Cultured in SFM supplemented with 1.0% serum. Up-arrows indicate the starting time of agitation and aeration changes.

Agitation speeds / $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$: 1. 60; 2. 80; 3. 120; 4. 160; 5. 200; 5*. 200 at higher liquid level.

Sparging——S1. at sparging rate of $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; SS. stop sparging.

○——viable cell density, □——viability

为了区分流体主体湍流运动和气泡对细胞的破损作用,在进行转速 200r/min 实验时采用两种不同的液面高度,当液面比通常高 15~20mm 时,可避免气泡夹带的发生。由图 1 可见,此时 200r/min 的机械搅拌强度对细胞没有伤害作用。然而一旦液面降至通常位置,液面上就发生严重的气泡夹带现象。随着气泡夹带、泡沫生成和气泡在泡沫中的聚并与破裂,可见到一些死细胞、细胞碎片团及由此生成的胶状物粘附于反应器的内壁上及存在于泡沫顶部。由图 1 可见细胞密度随之迅速下降,造成这一结果的原因就是细胞被气泡带至泡沫而遭破损、损失。但是,可以发现细胞生长又保持在一个新的稳定状态,在这一状态细胞密度低于原来的稳定状态,细胞活性不变, μ_{app} 仍等于 D。气泡带走细胞,使

k_d 增加,但同时因培养基中细胞数减少,原有底物或产物抑制被消除,使 μ_0 提高,当两者增加值相互抵销时即获得新平衡,但这并不意味着气泡夹带对细胞没有破损作用。

2.1.2 气体鼓泡: 当细胞在转速 60r/min 下生长回复到原稳定状态后,开始采用气体直接鼓泡。随着泡沫的形成以及气泡在泡沫中发生聚并与破裂,大量由死细胞、细胞碎片形成的絮状物粘附于反应器内壁和搅拌轴上,而且在泡沫顶部也形成一层由死细胞凝结成的粘稠物质。从图 1 可以清楚地发现鼓泡后活细胞密度和细胞活性陡然下跌, μ_{app} 下降至 $-0.11d^{-1}$, 表明气体鼓泡已对细胞产生严重破损作用。

上述实验结查表明生物反应器中造成细胞破损的主要是气泡,且这种破损作用首先发生的是细胞通过疏水作用主动在气泡表面吸附,随后被气泡带入泡沫层而遭破损。

2.2 无血清培养基

当细胞在温和搅拌和表面通气条件下恢复生长且基本达到稳定状态时,进料开始改用无血清培养基,从此时起,反应器中的血清将不断被洗出,浓度随之下降,如图 2 中虚线所示。由图可见,随着血清浓度的连续下降,活细胞密度和细胞活性出现剧烈的起伏波动,表明细胞生长受到血清浓度下降的严重影响,但经过一段时间适应后,杂交瘤细胞能成功地适应新的培养环境,而且其生长到达的稳定状态与有血清时相差无几。

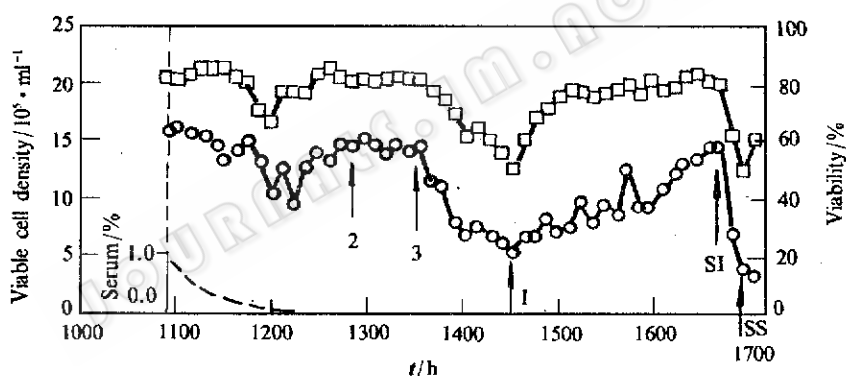


图 2 机械搅拌强度和通气鼓泡对杂交瘤细胞生长与破损的影响

Fig. 2 Effects of mechanical agitation intensities and gas sparging on growth and damage of hybridoma cells

Cultured in SFM only. The dashed line represents the serum concentration decreasing with time.

All the symbols are the same as in Fig. 1

2.2.1 机械搅拌强度: 由图 2 可见,当转速增加到 120r/min 时,虽然尚未发生气泡夹带现象,但该搅拌强度却引起了细胞密度和活性的显著下降, μ_{app} 降为 $0.338d^{-1}$, 已小于 D , 表明此时的机械搅拌强度已对生长在无血清培养基中的细胞产生了伤害作用。应用 Kolmogorov 湍流理论^[9]估计作用于细胞的湍流剪切力为 $0.173N \cdot m^{-2}$, 小于粘度计剪切试验中导致细胞破损的文献报道值 ($1 \sim 5N \cdot m^{-2}$)^[4,8]。反应器中的流体流动常呈湍流状态,细胞受到的是大小和方向均随时间和位置不断变化的脉动剪切应力,且作用时间远长于粘度计剪切试验。虽然生物反应器中的这种湍流剪切应力没有造成细胞破损,但其长

期作用往往会对动物细胞的生理特性产生重要影响,如增加细胞膜对一些金属离子的通透性^[10],改变细胞代谢活性^[11],降低细胞表面蛋白含量^[12]以及影响细胞骨架的完整性^[13]等,最后导致细胞更加脆弱而加速细胞死亡。我们称流体剪切力对动物细胞的这种作用为生理伤害作用(Biological Injury),显然,造成生理伤害的流体力学条件将与细胞本身的剪切敏感性有关。

2.2.2 通气鼓泡:当杂交瘤细胞在 60r/min 下恢复生长重新达到稳定状态时,改用气体直接鼓泡。与有血清时相似,在泡沫层、反应器壁和搅拌轴上出现大量细胞碎片和死细胞及由此凝聚而成的大量絮状物。由图 2 也可发现活细胞密度和细胞活性急剧下降,表明细胞遭到气体鼓泡的严重破损,其 μ_{app} 为 $-0.763d^{-1}$,比有 1.0% 血清时更小。比较以上有无血清两种实验结果,可以断定血清对细胞具有保护作用。

2.3 无血清培养基加 0.1% Pluronic F68

首先采用约 900ml 含 0.2% Pluronic F68 的无血清培养基进料,以使反应器中的 Pluronic F68 浓度尽快达到要求的浓度(0.1%),然后改用 0.1% Pluronic F68 的无血清培养基,待细胞恢复生长并达到稳定状态后再改变通气方式或搅拌强度,实验结果示于图 3。

2.3.1 气体鼓泡:随着气体直接鼓泡,形成了由一至二层气泡组成的泡沫层,泡沫特性与无 Pluronic F68 时完全不同,主要表现在泡沫结构和消泡速度上在有 Pluronic F68 时,泡沫层中气泡大小均匀,消泡速率明显加快。更重要的是,泡沫中、反应器壁及搅拌轴上没有发现死细胞、细胞碎片及由此生成的凝聚物,表明 Pluronic F68 的存在阻止了细胞在泡沫中的富集。由图 3 可见,在通气量 $100ml \cdot min^{-1}$ 时,细胞生长仍处于稳定状态, μ_{app} 与 D 相等。这一实验结果说明 Pluronic F68 对细胞具有很好的保护作用,且这种保护作用与改变气-液界面的物理化学特性有关,主要在于防止细胞在气泡表面的吸附。

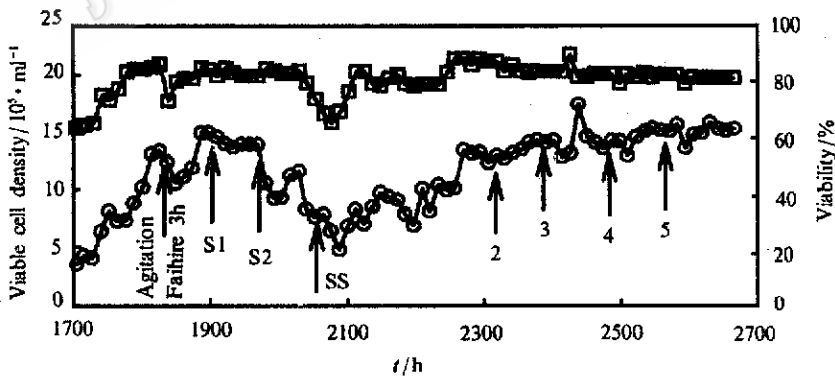


图 3 机械搅拌强度和通气鼓泡对杂交瘤细胞生长与破损的作用

Fig.3 Effects of mechanical agitation intensities and gas sparging on growth and damage of hybridoma cells

Cultures in SFM supplemented with 0.1% Pluronic F68.

S2 represents gas sparging at rate of $150ml \cdot min^{-1}$; others are the same as in Fig.1.

当气体鼓泡速率增加到 $150\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,活细胞密度却出现了下降的趋势, $\mu_{\text{app}} = 0.44\text{d}^{-1}$, 小于 D_0 。由于开始几天细胞活性没有变化,且泡沫中未出现死细胞,因此这种细胞密度的下降不是由细胞破损所致,而很有可能是培养基中某些蛋白类添加物在气液界面的变性和降解造成的^[14]。而当培养基中存在血清时,气液界面对蛋白质的这种变性作用会受到有效抑制^[15]。一般而言,蛋白质具有更高的疏水性,常吸附于气液界面的气体一侧,而 Pluronic F68 由于其亲水基团的作用,常吸附于气液界面的液体一侧,因此 Pluronic F68 不能防止气液界面对这些蛋白质的氧化和变性作用。

2.3.2 机械搅拌强度: 由图 3 可见,虽然在多次加速时,细胞密度和活性略有波动,但细胞生长始终保持在稳定状态,这一实验结果表明,在 Pluronic F68 存在时,转速高达 $200\text{r}/\text{min}$ 时的流体剪切力对细胞无任何伤害作用,即使发生气泡夹带也对细胞生长无影响。

上述一系列研究结果表明 plaronic F68 对细胞的保护作用要比血清强得多,尤其发生气泡夹带和气体鼓泡时,而且实验现象也清楚说明这种保护作用与阻止细胞在气泡表面的吸附有关。另一方面,血清和 Pluronic F68 也能有效防止流体剪切对细胞的生理伤害作用。毫无疑问,血清对细胞具有生理作用,在一定程度上会降低细胞的脆弱性,增强对流体剪切的耐受能力,故而就保护作用而言,血清具有双重性,生理作用和物理作用两者兼而有之。但是 Pluronic F68 的保护作用只能是物理的,因为动物细胞不可能象利用血清那样利用 Pluronic F68 等高分子聚合物,因此也就不可能通过生理途径使细胞本身更耐流体剪切。事实上,血清和 Pluronic F68 作为表面活性物质,因细胞表面的疏水性其分子无可避免地会在细胞表面发生吸附,从而降低细胞与培养基之间的界面张力,因此它们保护细胞免受流体剪切生理伤害的作用可以从其分子与细胞表面之间的疏水作用予以解释,其机理同于表面活性物质阻滞气泡和液滴表面运动的作用^[16]。当细胞在培养基主体中运动时,吸附于细胞表面的 Pluronic 分子或血清中的蛋白质分子犹如在细胞表面包裹了一层固化了的液体层,使细胞所受的流体剪切应力得到降低,从而起到对细胞的保护作用。由于细胞直径极小($10\sim 15\mu\text{m}$),因此这种表面固化作用将非常强烈。当然,这种保护作用是有限的,当流体运动速度和湍流强度极高时,表面吸附层就会被流体的高速剪切所破坏而离开细胞表面,因而失去表面阻滞作用和对细胞的保护作用。

致 谢 上海市肿瘤研究所李思德和沈翠英两位老师为本文工作提供了细胞株和无血清培养基,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Birch J R, Lambert K, Thompson P W *et al.* In: Lydersen B K (ed.), Large Scale Cell Culture Technology, New York: Hanser Publishers, 1987, pp. 1~20
- [2] Oh S K W, Nienow A W, Al-rubeai M *et al.* J Biotechnol, 1989, 12: 45~62.
- [3] Gardner A R, Gainer J L, Kirwan D J. Biotechnol Bioeng, 1990, 35: 940~947.
- [4] Tramper J, William J B, Joustra D *et al.* Enzyme Microb Technol, 1986, 8: 33~36.
- [5] Handa-Corrigan A, Emery A N, Spier R E. Enzyme Microb Technol, 1989, 11: 230~235.
- [6] Jobses I, Martens D, Tramper J. Biotechnol Bioeng, 1991, 37: 484~490.

- [7]沈翠英,沈 棣,肖忠明等.单克隆抗体通讯,1994,10(1):18~22.
- [8]Petersen J F, McIntire L V, Papoutsakis E T. J Biotechnol, 1988, 7:229~246.
- [9]Hinze J O. Turbulence. 2nd. ed. New York:McGraw-Hill, 1975,175~320.
- [10]Rasmussen H. Sci Amer, 1989, 261:66.
- [11]Smith C G, Greenfield P F. Biotechnol Bioeng, 1992, 40:1045~1055.
- [12]Lakhotia S, Bauer K D, Papoutsakis E T. Biotechnol Bioeng, 1993, 41:868~877.
- [13]Papoutsakis E T, Petersen J F, McIntire L V, In: Spier R E et al. (eds.), Production of biologicals from Animal Cells in Culture, London: Butterworths-Heinemann, 1991, 229~235.
- [14]Donaldson T L, Boonstra E F, Hammond J M. J Colloid Interface Sci, 1980, 74:441~450.
- [15]Wood L A, Thompson P W. In: The Proceedings of International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics, Cambridge, England, 1986, pp.157~172.
- [16]Levich V G. Physicochemical Hydrodynamics, New Jersey: Prentice-Hall, 1962.

Preliminary Investigations of Hybridoma Cell Growth and Damage in an Agitated Bioreactor

Tan Wensong Dai Gance Chen Zhihong Chen Yinlinag

(Research Institute of Biochemical Engineering

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract By employing the continuous suspension culture technology in this work, the effects of mechanical agitation and gas bubbles (from bubble entrainment or direct gas sparging) on the hybridoma cell growth and damage/injury in three media formulations were investigated. It was found that the agitation intensity of 120r/min produces biological injury effects on hybridoma cells cultured in serum-free medium. Our results demonstrated that the major source resulting in cell damage is the gas bubbles, and that most of the cell death occurs in the foam region. Both the serum and Pluronic F68 have protective effects on hybridoma cells against the biological injury of the fluid shear, and make the cells adaptable to much higher agitation intensities. The damage effect of gas bubbles on cells was observed to be prevented effectively when the medium was supplemented with 0.1% Pluronic F68. In addition, the mechanisms of cell damage and protection are also discussed.

Key words Cell culture, bioreactors, hybridoma cells, cell damage, protection