

多孔微载体无血清培养 rCHO 细胞生产 u-PA

胡显文¹ 肖成祖¹ 李佐虎² 郭志霞¹ 高丽华¹ 张正光¹ 胥照平¹ 王 菲¹

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 在 30L 搅拌式反应器中无血清培养分泌尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)的 DNA 重组 CHO 细胞,定期部分更换 Cytopore 多孔微载体,使生长在多孔微载体中的细胞不断更新繁殖,解决大规模细胞培养中的细胞凋亡问题。在 91 d 连接换液培养过程中,细胞密度可维持在 $(1.3 \sim 2.6) \times 10^7/\text{mL}$,活细胞比率维持在 90% 以上。在 7.5L 搅拌罐中培养细胞,利用外部周期性压力振荡刺激并结合载体更新技术,可减轻密度效应对细胞生长和表达的影响,在一定程度上提高细胞在高密度培养条件下的表达水平。在 67 d 连续换液培养中,细胞最高密度为 $2.64 \times 10^7/\text{mL}$,活细胞比率维持在 95% 以上。与稳压操作相比,利用周期变压刺激技术可提高产量 10%~20%,且可降低葡萄糖厌氧代谢生成乳酸的转化率,利用 4 步纯化工艺,从含 u-PA 约 135 g 的 2100 L 上清中获得约 80 g u-PA (单链比例约为 90%)。

关键词 动物细胞培养,多孔微载体,尿激酶原,无血清培养基,周期外部刺激

中图分类号 Q813.1⁺1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0387-05

在动物细胞大规模高密度培养过程中,常常碰到 2 个问题:一是细胞凋亡问题。细胞体外培养时,诱发细胞凋亡的主要原因是细胞生长的环境条件较恶劣,如营养缺乏,代谢产物的累积,pH 和溶氧控制不当,机械搅拌剪切力较大等,尤其在无血清培养基中更易发生。细胞凋亡大大缩短了细胞培养时间,从而严重降低反应器的生产能力和利用效率^[1]。二是细胞在密度条件下,由于细胞的多层生长,存在细胞接触抑制效应^[2],细胞的生长和表达均受严重影响,在多孔微载体培养中有时会下降近 1 倍^[3]。如何保持或提高细胞在密度生长条件下的表达水平,关系到产物的浓度和产量以及培养基的利用率。基因工程细胞在方瓶中单层培养时,只要及时换液和适时传代,细胞就可无限增殖,而不发生细胞凋亡。例如,我们已有的分泌 Pro-UK 的基因重组 CHO 细胞株,经过 104 次传代培养(约 1 年),细胞生长良好并保持最初的表达水平^[4],可见保持细胞良好的生长环境(合适的 pH、溶氧和低剪切力)、充足的营养供应和及时的废物去除,是避免体外培养细胞凋亡的关键。生物体是复杂的非线性体系,生命中普遍存在着生物节律,生命活动的周期性变化是其重要特征之一。当前,周期性操作(Periodic op-

eration)越来越引起研究者的关注。近年来已有不少有关利用周期性温度或压力变化来提高基因工程菌质粒的稳定性,或提高微生物、昆虫细胞、植物细胞或动物细胞培养的密度和产量的报道^[5~7]。本文采取定期部分更新载体方法,减少细胞凋亡的诱因,并引入外部周期性压力振荡,改善细胞与培养基之间的传质性能,刺激细胞提高生产效率,部分恢复由于密度效应而下降的细胞表达水平。

1 材料与方 法

1.1 细胞株、培养基和多孔微载体

培养分泌尿激酶原(pro-UK)的重组 CHO 细胞株 CL-11G(本所构建),细胞在方瓶培养中的表达水平约 500IU/(10^6 cells·d)。采用无血清培养基,基本组成为 DMEM/F12(1:1)添加适量蛋白胍、胰岛素及某些氨基酸和无机盐等。为防止在细胞培养中单链 pro-UK 过度降解成双链尿激酶,在培养基中加入少量 Aprotinin(Bayer Co.)。

Cytopore 纤维素多孔微载体(Pharmacia Co.),用前用 0.1 mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液(PBS)浸泡 4 h 后,倾去 PBS,再用 PBS 洗涤 3 次。121℃ 高压灭菌 30 min 后,吸出 PBS,用 DMEM/F12 培养基浸

泡备用。Cytopore 多孔微载体机械强度高,可回收重复使用。

1.2 反应器和培养方法

7.5L(工作体积 = 5L)Biostat CT 及 30 L Biostat UC(工作体积 = 20 L)(B. Braun Co., Germany)在位灭菌搅拌式反应器。针对旋转过滤器在连续细胞灌流培养过程中易堵塞的问题^[8],开发了可反冲的细胞截留系统。换液(或灌流)连续培养时,通过细胞截留系统将生长在微载体中的细胞截留在反应器中,提高细胞培养密度和反应器的生产能力^[9]。

细胞由方瓶(单层贴壁培养)→转瓶(单层贴壁培养)→搅拌瓶(多孔微载体培养)→5L CelliGen 反应器(多孔微载体培养)→7.5 L Biostat CT 反应器或 30L Biostat UC 反应器(多孔微载体培养)逐级放大培养。由于细胞能在长满细胞的微载体和空微载体之间自动转移,每级放大培养时,预先在更大规模的反应器中加入适量培养基和经过处理的多孔微载体,长满细胞的多孔微载体通过管道直接进入下一级反应器中,而无需胰酶的消化来帮助细胞培养的接种和放大^[10]。控制 pH = 7.0 ± 0.05, DO = 7% ~ 40%, 温度 = 37.0°C ± 0.1°C, 搅拌转速为 70 ~ 90 r/min, 多孔微载体的浓度为 2 ~ 4 g/L 培养基。

采用批式换液连续培养方式,每天通过细胞截留系统换液 1 ~ 1.2 个工作体积,将微载体截留在反应器中,收获含产品的上清并加入新鲜培养基。当多孔微载体中长满细胞后,在细胞表达水平急剧下降前,用新载体部分更换长满细胞的载体。并且在 7.5 L 反应器的罐顶施加振幅 = 0.4 bar、频率 = 0.04 Hz 的周期梯形压力振荡。

1.3 检测方法

1.3.1 细胞计数: 取样 5 mL 于 10 mL 试管中, 1500 r/min 下离心后吸出上清,加入含 0.1% 结晶紫的 0.1 mmol/L 柠檬酸溶液,使总体积至 5 mL,每隔 1 h 用吸管吹打、摇荡,置于室温下 3 h 后,用吸管紧靠液面吸取适量液体于血球计数板上,数出被染成深紫色的细胞核数。活细胞数测定,用 0.2% 胰酶消化,将多孔微载体内的细胞释放至溶液中,取部分细胞悬液离心后去除上清,用 0.05% 台盼蓝溶液染色后,在显微镜下数出拒染细胞(活细胞)占总细胞的百分比^[11],悬浮于上清中的细胞可直接用血球计数板计数。

1.3.2 细胞转移观察: 噻唑蓝(MTT)染色法^[12]。

1.3.3 pro-UK 活性测定: 用改进的琼脂糖-纤维蛋白-平板法^[4]。

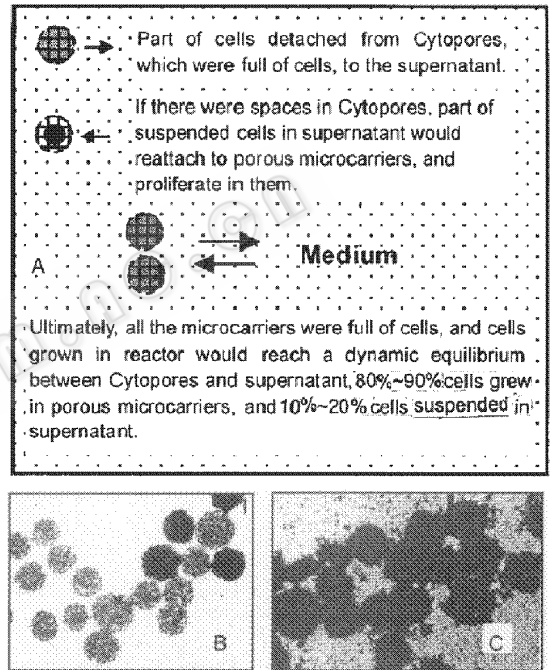
1.3.4 葡萄糖和乳酸的测定: 葡萄糖浓度用血糖诊断试剂盒测定(中国科学院百泰技术公司)。乳酸浓度由乳酸酶试剂盒测定(Centronic GmbH)。

1.3.5 SDS-PAGE 和 Western blot 分析: 参考文献^[13]。

2 结果和讨论

2.1 多孔微载体培养细胞生长模型

用多孔微载体培养细胞时,细胞生长在微载体和培养基之间存在一个动态平衡(图 1)。当多孔微载体内部长满细胞,而培养基中悬浮生长的细胞较



(A) Model of cell growth on Cytopore porous microcarriers (• cells; ⊕ porous microcarrier). (B) Inoculation. The seed beads that contained cells were dyed black with MTT, and about 3/4 microcarriers was vacant. (C) Cells occupied all of the microcarriers after a period of culture.

图 1 用多孔微载体培养细胞

Fig. 1 Cell culture on porous microcarriers

少(如刚换液后)时,部分细胞会自动从微载体中脱落进入培养基中。反之,如果培养基中细胞密度较高,且有的微载体中尚有生长空间(如部分更新微载体后),悬浮在培养基中的细胞又会重新贴附在多孔微载体上并在其中生长繁殖。类似化学反应中的化学平衡,最终所有的微载体中都长满了细胞,并且约 10% ~ 20% 的细胞在培养基中悬浮生长,而约 80% ~ 90% 的细胞则生长在多孔微载体中。细胞在微载体和培养基之间的转移对细胞培养非常有利(1)可改善传质性能。当微载体中长满细胞后,微载体内

的细胞与培养基间传质阻力会增加,培养基中的营养成分难于扩散至微载体中心,而微载体中心的细胞代谢产物如乳酸、氨及目的产物由于传质阻力增大而在微载体内部积累,使细胞生长的微环境恶化(这可能是细胞脱落的主要原因),从而严重影响细胞的生长和分泌。细胞从载体上脱落后,使微载体中的细胞变得较稀疏,减小了传质阻力,而悬浮于培养基中的细胞与培养基之间传质阻力可忽略。(2)使放大培养简便安全。细胞在微载体间的自动转移,方便了接种过程,大大减小了染菌机率,可为任何规模的细胞培养制备种子,这也是优越于固定床反应器的一个方面。

2.2 7.5 L 反应器中周期压力振荡培养细胞

考察了微载体浓度和周期压力振荡对细胞培养的影响(图2)。细胞密度随多孔微载体浓度的增加而增加,但微载体浓度从 3 g/L 增加至 4 g/L,细胞密度增加幅度不明显。当细胞密度大于 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 时,对于无泡供氧反应器($K_{La} \sim 12\text{h}^{-1}$)维持 $\text{DO} = 40\%$ 非常困难,因此限制培养密度进一步提高的主

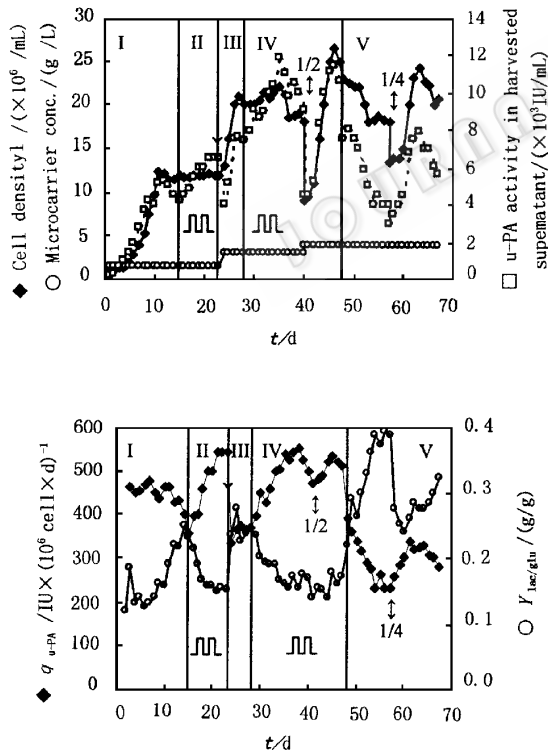


图2 在 7.5L 反应器中无血清培养 CL-11G 细胞

Fig.2 CL-11G cells culture in a 7.5L stirred tank

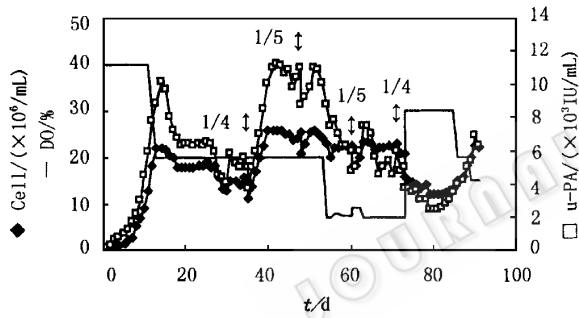
(\downarrow : Add new microcarriers; \downarrow : Replace part of microcarriers, value beside \downarrow : Microcarrier replacement ratio; Phase II, IV: Culture with cyclic pressure oscillation; Phase I, III, V: Control culture)

要因素是溶氧和营养的供应。在细胞密度小于 $10^7/\text{mL}$ 时,应用周期变压刺激,容易促使 CO_2 从培养基中逸出,使培养基 pH 升高而对细胞生长不利。但细胞密度大于 $10^7/\text{mL}$ 时,应用周期压力振荡技术,可大大降低为维持 pH 而加入的碱液量,这可能是由于周期变压促进了气液、固液传质而降低了葡萄糖(Glc)厌氧代谢生成乳酸(Lac)的比例,以及细胞代谢生成的 CO_2 与逸出的 CO_2 达到平衡。周期变压下细胞的比生长速率($\mu = 0.244\text{d}^{-1}$)与常压培养($\mu = 0.164 \sim 0.286\text{d}^{-1}$)无显著差别,这表明振幅 = 0.4 bar、频率 = 0.04 Hz 的周期变压不会损伤动物细胞。在 Phase I 前期,细胞的表达水平(q_{u-PA})在 $400 \sim 475\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$,但所有微载体中都长满了细胞后(图 1(C)),即使细胞密度相对稳定($\sim 1.1 \times 10^7/\text{mL}$),上清中 u-PA 活性也从 $5200\text{IU}/\text{mL}$ 降至 $4200\text{IU}/\text{mL}$, q_{u-PA} 逐渐从 $460\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$ 下降至 $355\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$,说明在高密度培养条件下细胞密度效应对蛋白表达有负面影响。在 Phase II 采用周期变压刺激后,上清中 u-PA 活性从 $4200\text{IU}/\text{mL}$ 增至 $6500\text{IU}/\text{mL}$, q_{u-PA} 也增加到 $540\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$, q_{u-PA} 在 Phase IV(变压)的平均值为 $491 \pm 63\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$,而在 Phase III、V(常压)分别为 $363 \pm 16\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$ 和 $296 \pm 39\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$,这些结果表明周期变压刺激能部分恢复由于密度效应而下降的细胞表达水平。周期变压操作还可减少葡萄糖通过厌氧代谢途径生成乳酸的比例,从而提高培养基的利用效率。在周期变压操作下,葡萄糖生成乳酸的转化系数($Y_{Lac/Glc}$ (图 2(B)))。在 67 d 连续换液培养中,细胞最高密度为 $2.64 \times 10^7/\text{mL}$,活细胞比率维持在 95% 以上;收获上清中 u-PA 最高浓度可达 $\sim 118\text{mg}/\text{L}$,细胞密度大于 $7 \times 10^6/\text{mL}$ 后每天换液 5~6L,共获得含 u-PA 约 21.1 g 的上清 313 L。

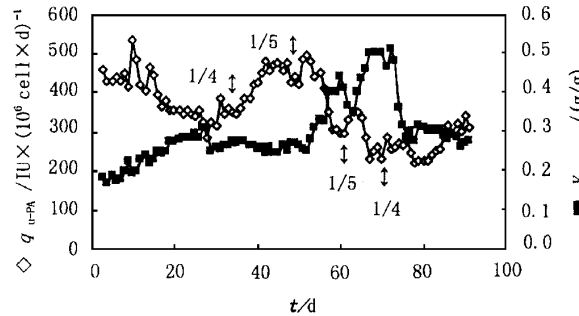
2.3 30L 反应器中部分载体定期更新培养细胞

从图 2 可看出,随着培养的进行,细胞的表达水平有逐渐下降的趋势,这与微载体更新比例有关。长满细胞的多孔微载体在反应器中停留的时间越长,传质性能会越差,在微载体中心的细胞可能会由于营养的缺乏和代谢产物的累积而影响细胞的生长和表达,甚至导致细胞凋亡^[1]。我们曾在 Celligen 反应器中连续培养该细胞株 90 d,每隔 20~30 d 微载体更换 50%~90%,细胞的表达水平一直维持在 $500\text{IU}/(10^6\text{cells} \cdot \text{d})$,可见在动物细胞长期高密

度培养过程中,微载体定期部分更新对维持细胞高活性、高表达非常必要。在培养过程中定期部分更换微载体,强制细胞在新旧微载体之间转移,使生长在微载体内部的细胞不断更新繁殖,保持旺盛活力;而每天的大量换液则去除一部分细胞和细胞碎片,及时去除代谢产物,补充新鲜培养基,从而消除或尽可能减小细胞凋亡的诱发因素。部分更新微载体后,能部分恢复细胞的表达水平(q_{u-PA}),减上葡萄糖生成乳酸的比例 $Y_{Lac/Glc}$ (图 3(B))。但是微载更新的频率和比例需要优化,更新比例过大,虽然对保持单个细胞的表达水平有利,但会损失大量细胞,而降低反应器的总生产效率。采用这一方法,在 30 L Biostat UC 反应器中连续 91 d 换液无血清培养 CL-11G 细胞,细胞最高密度可达 $2.6 \times 10^7/\text{mL}$ (活细胞比率 $> 90\%$);细胞密度在第十天达到 $10^7/\text{mL}$ 后,一直维持在 $(1.3 \sim 2.6) \times 10^7/\text{mL}$ 水平。收获上清中 u-PA 最高浓度大于 100 mg/L ,共获得含 u-PA 约 114 g 的上清 1827L (图 3)。



(A) Cell growth curve



(B) Cell expression level and yield coefficient of lactate produced on glucose consumed

图 3 在 30L 反应器中无血清培养 CL-11G 细胞

Fig.3 CL-11G cells culture in a 30 L stirred tank

(\uparrow) Replace part of microcarriers; value beside \uparrow : Microcarrier replacement ratio;

我们为细胞提供优良的生长环境来防止细胞凋亡的发生,非常简单有效地解决了这一问题,在国外

尚未见有关报道。

2.4 u-PA 的质量和产量

尿激酶原也称单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (Single-chain urokinase-type plasminogen activator, scu-PA),在纤溶酶或激肽释放酶等蛋白酶的作用下,将其 Lys158-Ile159 链裂解成为具有酶催化活性的双链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (tcu-PA),即高分子量尿激酶 (HMW-UK),并可继续降解为低分子量尿激酶 (LMW-UK)。与链激酶和尿激酶相比,尿激酶原具有较高的特异性溶血栓作用^[14,15]。但 Pro-UK 极易转变成双链 UK,如何保持单链形式是 Pro-UK 生产过程中的一大难题。细胞培养过程中通过

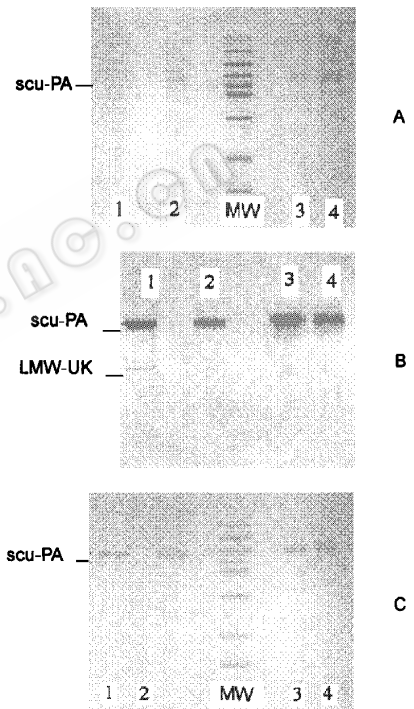


图 4 培养上清及两批纯化产品的 SDS-PAGE 分析及培养上清的 Western blot 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis and Western blot analysis of supernatant and SDS-PAGE of purified u-PA product

(A) SDS-PAGE analysis of supernatant. Sample from 7.5 L reactor (lanes 1, 3); Sample from 30 L reactor (lanes 2, 4); MW marker (Gibco BRL :97.4, 66.2, 55.0, 42.7, 40.0, 31.0, 21.5, 14.4 kD).

(B) Western blot analysis of supernatant sample from 7.5 L reactor (lanes 1, 3); Sample from 30 L reactor (lanes 2, 4).

(C) SDS-PAGE of u-PA product purified from cell culture supernatant by four-column process before freeze-drying. MW marker (Gibco BRL :97.4, 66.2, 55.0, 42.7, 40.0, 31.0, 21.5, 14.4 kD); Batch 1 (lanes 1, 3); Batch 2 (lanes 2, 4);

Electrophoresis under reducing and non-reducing conditions is shown in lanes 1, 2, and lanes 3, 4.

采取一些方法来抑制蛋白酶活性,减小细胞死亡以及减小产物在反应器中的停留时间,以减小 Pro-UK 的降解,可保持收获的上清中 u-PA 的单链比例在 80%~90% 左右(图 4)。由于采用无血清培养基,除胰岛素外几乎没有其他大分子物质,而且上清中 u-PA 的含量在 60~100 mg/L 之间,因此可不作任何处理直接用 SDS-PAGE 分析收获的上清。从图 4 可知,Pro-UK 是上清中的主要成分之一。

由于 Pro-UK 与低剂量的 UK 联合使用溶栓效

果大大超过单独使用 Pro-UK,而副作用又远小于单独使用 UK^[14],因此在产品中保留一定比例的 UK 即可增加疗效,又可降低纯化成本。产品质量控制策略为(1)经凝胶过滤 HPLC 分析为单一峰,保证产品为单双链 u-PA 的混合体(2)经 SDS-PAGE 分析,非还原条件下一条带,还原条件下单链比例 > 80%。采取四步法纯化工艺,从约 2100 L 细胞培养上清中获得单链比例 > 90% 的冻干合格 u-PA 约 80 g,总回收率 > 60%。

参 考 文 献

- [1] Mastrangelo A J, Betenbaugh M J. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**: 198~202
- [2] Cherry R S, Papoutsakis E T. *Biotechnol Bioeng*, 1989, **33**: 300~305
- [3] Mignot G, Faure T, Ganne V. *Cytotechnology*, 1990, **4**: 163~171
- [4] 高丽华, 肖成祖, 于芳. *生物技术通讯*, 1997, **8**(2): 94~96
- [5] Weber A E, San K Y. *Biotechnol Bioeng*, 1989, **49**: 659~666
- [6] Zhang W, Bai X, Bu Z *et al.* *Biotechnol Lett*, 1998, **20**(1): 63~66
- [7] Kubota T, Yamauchi M, Onozaki J *et al.* *Oral Biol*, 1993, **38**: 23~30
- [8] 胡显文, 肖成祖, 黄子才等. *生物工程学报*, 1998, **14**(3): 348~351
- [9] Hu X W, Xiao C A, Huang Z C *et al.* In: *Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century*, Kluwer Publishers, Netherland, 1999, 81~86
- [10] Xiao C Z, Huang Z C, Hu X W *et al.* *Cytotechnology*, 1999, **30**: 143~147
- [11] Pharmacia Fine Chemicals. *Microcarriers Cell Culture: Principles and Methods*. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden, 1981, 64
- [12] 胡显文, 肖成祖, 黄子才等. *生物工程学报*, 1999, **15**(1): 93~97
- [13] 韩素云, 俞炜源, 程度胜等. *生物工程学报*, 1997, **13**(2): 127~131
- [14] 俞炜源, 张正光, 肖成祖. *生物技术通讯*, 1998, **9**(1): 35~44
- [15] Sasahara A A, Barker W M, Weaver W D *et al.* *J Vasc Interv Radiol*, 1995, **6**: 84S-93S

Production of u-PA with rCHO Cell Culture on Porous Microcarriers in Serum-free Growth Medium

HU Xian-Wen¹ XIAO Cheng-Zu¹ LI Zuo-Hu² GUO Zhi-Xia¹
GAO Li-Hua¹ ZHANG Zheng-Guang¹ XU Zhao-Ping¹ WANG Fei¹

¹ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

² State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract A novel technique was developed to deal with apoptosis in large-scale animal cell culture. By means of replacing part of Cytopore porous microcarriers at regular intervals, a rCHO cell line, which produces urokinase-type plasminogen activator (u-PA), was cultivated continuously with serum-free medium in a 30L stirred tank for 91 days. The cell density was maintained at $(1.3 \sim 2.6) \times 10^7/\text{mL}$, and >90% of cells was viable. In order to reduce the effect of cell density on cell growth and expression, a cyclic pressure oscillation was exerted on a 7.5L reactor headspace to enhance cell expression at high cell density to a certain extent. During the 67 days of medium-replacement culture, the maximal cell density reached $2.64 \times 10^7/\text{mL}$, and cell viability was always kept above 95% when combined with microcarrier-replacement. Compare to control culture, culture with cyclic pressure oscillation could enhance cell expression level and reduce the ratio of glucose metabolized anaerobically to produce lactate. With four-step purification process, about 80 g u-PA (>90% scu-PA) was recovered from ~2100 liters supernatant which contained ~135 g u-PA.

Key words Animal cell culture, porous microcarrier, prourokinase, serum-free medium, periodic artificial stimulus