

# 流体动力对 HEK293 细胞的细胞团形成及细胞生长和代谢的影响 Effects of Hydrodynamic on Aggregates Formation, Growth and Metabolism of HEK293 Cells in Suspension Culture

刘 红, 刘兴茂, 吴本传, 叶玲玲, 倪小平, 黄培堂, 陈昭烈\*

LIU Hong, LIU Xing-Mao, WU Ben-Chuan, YE Ling-Ling, NI Xiao-Ping, HUANG Pei-Tang and  
CHEN Zhao-Lie\*

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 10071, China

**摘 要** 利用 HEK293 细胞在悬浮培养中具有聚集成团的体外培养特性, 在 250mL 的 Bellco 的搅拌培养体系中, 以 HEK293 细胞团的粒径、细胞数、细胞活力、葡萄糖比消耗率( $q_{glc}$ )、乳酸比产率( $q_{lac}$ )和乳酸转化率( $Y_{lac/gluc}$ )为观察指标, 考察 HEK293 细胞在搅拌速度分别设置为 25、50、75 和 100r/min 的培养条件下的细胞团形成、粒径分布以及细胞生长和代谢。HEK293 细胞在搅拌速度为 50r/min 和 75r/min 培养条件下所形成细胞团的粒径大小适中、离散度小。培养 7d 后, HEK293 细胞团的平均粒径分别为 201 $\mu$ m 和 175 $\mu$ m, 其中粒径  $\geq 225\mu$ m 的细胞团所占比例均低于 10%; 在整个培养过程中, 细胞团中的 HEK293 细胞活力维持在 90% 以上,  $q_{glc}$ 、 $q_{lac}$  和  $Y_{lac/gluc}$  等反映 HEK293 细胞代谢的参数保持相对恒定。实验结果提示: 合适的搅拌速度所产生的流体动力既可使细胞团的粒径控制在合适的范围内, 也可为细胞团中的 HEK293 细胞提供基本满足其正常生长和代谢需要的物质传递效率。

**关键词** 流体动力, HEK293 细胞, 细胞团, 生长, 代谢

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0101-06

**Abstract** By using the size distribution of cell aggregates, viable cell density, cell viability, specific consumption rate of glucose ( $q_{glc}$ ), specific production rate of lactate ( $q_{lac}$ ) and lactate transform rate ( $Y_{lac/gluc}$ ) as the evaluation indexes, the effects of hydrodynamic on aggregates formation, growth and metabolism of HEK293 cells in suspension culture were examined in 250mL spinner-flasks by setting the agitation rates at 25, 50, 75 and 100r/min, respectively. It was found that agitation plays an important role in HEK293 cell aggregates formation and cell aggregates size distribution. After 7d cultivation in spinner-flasks operated at 50r/min and 75r/min, the average diameter of HEK293 cell aggregates was 201 $\mu$ m and 175 $\mu$ m, respectively, with the fraction of aggregates larger than 225 $\mu$ m less than 10%. The cell viability was kept above 90% with the metabolic indexes, including  $q_{glc}$ ,  $q_{lac}$  and  $Y_{lac/gluc}$  kept constant. These results demonstrated that hydrodynamic derived from the proper agitation play a decisive role in controlling the formation and size distribution of HEK293 cell aggregates, and provided sufficient mass

Received: July 5, 2005; Accepted: August 26, 2005.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA2Z334F) and the Key International Science and Technology Cooperation Project of China (No. 2001AA215461).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63841526; E-mail: CHENZL23@hotmail.com

国家高技术研究发展计划资助项目(No. 2002AA2Z334F), 国际科技合作重点计划项目资助(No. 2001AA215461)

transfer to support the normal growth and metabolism of HEK293 cells in suspended aggregates.

**Key words** hydrodynamic, HEK293 cells, aggregates, growth, metabolism

人胚肾 293 细胞系 (human embryonic kidney 293 cell line, HEK293 细胞) 是用于制备重组腺病毒载体和重组蛋白的主要生产细胞<sup>[1-3]</sup>。目前, 重组腺病毒载体和重组蛋白的生产主要采用批次悬浮培养和填充床固定化培养的工艺方法。重组腺病毒载体和重组蛋白的生产效率取决于生物反应器中 HEK293 细胞的活细胞密度和代谢效率。流加批次悬浮培养工艺虽然具有便于细胞采样、观察和生产规模易于放大的优点, 但难以为 HEK293 细胞的高密度生长和 HEK293 细胞表达产物的高效生产提供充足的营养成分、有效地控制有害细胞代谢产物的积累浓度。填充床固定化培养工艺虽然可通过培养基的连续灌注操作克服流加批次悬浮培养工艺的不足, 提高 HEK293 细胞表达产物的生产效率。但这一生产工艺存在不能对培养细胞进行采样观察、重组腺病毒载体收获不便和生产规模放大困难的缺点。

HEK293 细胞在搅拌培养体系中具有相互聚集、形成细胞团的倾向<sup>[3,5]</sup>。利用 HEK293 细胞的这一培养特性, 可以采用沉降或过滤的技术手段, 使 HEK293 细胞团截留在搅拌培养体系中, 起到类似于微载体和/或多孔微载体固定化培养的作用, 并结合动物细胞培养过程的动态监测和优化控制, 实现 HEK293 细胞的高密度长期培养及其表达产品的高效生产。

由于细胞团中的细胞密度近似于组织中的细胞密度, 存在于细胞团内的物质扩散限制可能影响细胞活力。由搅拌叶片转动所产生的流体动力既是搅拌培养体系中影响物质扩散效率和细胞团粒径分布的主要因素, 也可形成损伤细胞的流体剪切力<sup>[6,7]</sup>。基于此, 本研究着重考察在 250mL 的 Bellco 搅拌培养体系中, 流体动力对 HEK293 细胞的细胞团形成以及细胞生长和代谢的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HEK293 细胞购自 Invitrogen 公司。DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶购自 GIBCO BRL 公司。谷氨酰胺购自 Sigma 公司。加强型小牛血清 (cosmic calf serum, CCS) 购自 HyClone 公司。

### 1.2 细胞传代

HEK293 细胞接种于 100mL 的组织培养瓶中,

加入 10mL 含 5% (V/V) CCS、4mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM/F12, 置 37℃ 培养。根据培养基的颜色变化更换新鲜培养基, 待细胞形成致密单层后, 用 0.25% (W/V) 的胰蛋白酶进行消化、传代或作为细胞悬浮培养的种子细胞。

### 1.3 细胞悬浮培养

HEK293 细胞以  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  cells/mL 接种内置磁力驱动板桨式搅拌叶片 (5.5 cm × 2.5 cm) 的 250mL Bellco 搅拌式细胞培养瓶 (Bellco Glass, USA) 内, 补充含 1% (V/V) CCS、4mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM/F12 培养基至 150mL, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下悬浮培养, 搅拌速度分别设置为 25、50、75 和 100 r/min。根据培养基的颜色变化, 采用静置沉降法按 80% ~ 95% 培养体积更换新鲜培养基。

### 1.4 细胞的计数和活力分析

用 0.25% (W/V) 胰蛋白酶消化组织培养瓶中 HEK293 细胞和 Bellco 搅拌式细胞培养瓶中的 HEK293 细胞团, 采用 Cedex AS20 细胞密度和活力自动分析系统 (Innovatis, Germany) 进行细胞计数和活力分析。

### 1.5 细胞团的计数和细胞团的粒径分析

在搅拌状态下均匀悬浮 HEK293 细胞团, 用大口吸管吸取细胞样品 1mL, 根据细胞团数量的多寡, 酌情用培养基对细胞样品作 1 ~ 5 倍稀释。用剪除尖端的移液器吸头吸取 50 ~ 100μL 加入 96 孔细胞培养板中, 在 Nikon Eclipse TE300 倒置显微镜 (Nikon, Japan) 的 4 × 平场物镜下计数每个细胞样品的 4 个重复孔中的细胞团总数。

用 Pro-150ES 彩色数码摄像系统 (Pixera, USA) 摄取 Nikon Eclipse TE300 倒置显微镜 4 × 平场物镜下 HEK293 细胞团图像, 用 Simple PCI 5.1 图像分析软件 (Compix Inc., USA) 中的图像处理和分析模块测量 HEK293 细胞团的粒径、分析 HEK293 细胞团的粒径分布。

### 1.6 细胞代谢参数的测定

采用 YSI 7100 多参数生物分析系统 (Yellow Springs Instruments) 进行检测。葡萄糖比消耗速率 ( $q_{glc}$ )、乳酸比生成速率 ( $q_{lac}$ ) 和乳酸生成量对葡萄糖消耗量的得率系数 (乳酸转化率,  $Y_{lac/gluc}$ ) 分别按 (1-1) ~ (1-3) 式进行计量。

$$q_{\text{glc}} = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \quad (1-1)$$

$$q_{\text{lac}} = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} \quad (1-2)$$

$$Y_{\text{lac}/\text{glc}} = - dp/ds \quad (1-3)$$

上式中:  $X$  为活细胞密度,  $s$  为葡萄糖浓度,  $p$  为乳酸浓度,  $t$  为时间。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流体动力对 HEK293 细胞团的形成和细胞团粒径分布的影响

动物细胞在搅拌式生物反应器中悬浮培养的流体动力主要来自于搅拌桨的驱动,搅拌桨将能量传递给流体,引起生物反应器内流体的运动。流体的运动在使培养环境均一、传质充分的同时,不可避免地产生影响细胞团形成、特别是细胞团粒径分布的流体动力<sup>[8]</sup>。在搅拌式细胞培养瓶中研究流体动力对细胞培养的影响,虽也可直观地采用搅拌叶片的转速即搅拌速度这一参数进行描述,但由于不同的生物反应器存在罐体及搅拌桨构型和大小不同的差异,细胞培养工艺的放大不能简单地直接借鉴描述流体动力的搅拌速度参数,应以流体动能( $N_{em}$ )和积分剪切因子(integrated shear factor,  $ISF$ )作为重要的参数<sup>[9]</sup>。Bellco 搅拌式细胞培养瓶的搅拌装置为非通气的板浆式搅拌器,其传递给流体的能量及产生的积分剪切因子可由以下关系式求得:

$$N_{em} = N_{ep} N^3 D_i^5 \quad (2-1)$$

$$ISF = \frac{2\pi ND_i}{D_R - D_i} \quad (2-2)$$

(2-1)式中  $N_{em}$  为搅拌器传给流体的能量,  $N_e$  为牛顿数,  $\rho_l$  为液体密度,  $N$  为转速,  $D_i$  为搅拌桨直径。(2-2)式中  $D_R$  为培养容器的直径。

利用 HEK293 细胞在悬浮培养中具有聚集成团的体外培养特性,在 250mL 的 Bellco 的搅拌培养体系中,考察搅拌速度分别设置为 25、50、75 和 100 r/min 所产生的流体动力对 HEK293 细胞的细胞团形成和细胞团粒径分布的影响。如图 1 所示,HEK293 细胞在 4 种不同的搅拌速度下均能在培养 1d 后形成平均粒径  $\geq 50\mu\text{m}$  的细胞团,其中,搅拌速度为 25r/min 所形成的细胞团的平均粒径达到  $113\mu\text{m}$ 。随着培养时间的延长,HEK293 细胞团的平均粒径不断加大,培养 7d 后,搅拌速度为 25、50、75 和 100 r/min 所形成的细胞团的平均粒径分别为  $351\mu\text{m}$ 、 $201\mu\text{m}$ 、 $175\mu\text{m}$  和  $442\mu\text{m}$  (图 1)。这一观察结果提

示:搅拌速度设置为 25r/min 不能使细胞充分悬浮,易于诱发细胞团的聚结、汇合;搅拌速度设置为 100 r/min 产生的剪切应力可能使部分细胞团崩解,进而相互聚结、融合。

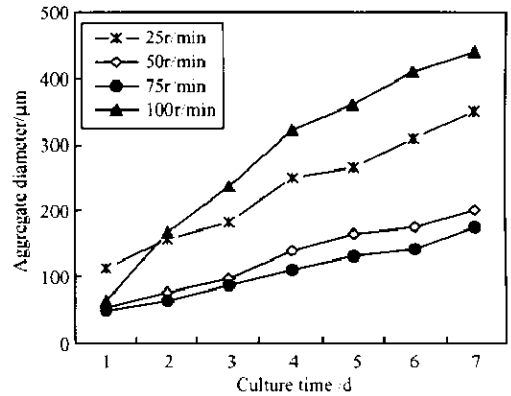


图 1 流体动力强度对 HEK293 细胞的细胞团形成和细胞团粒径分布的影响

Fig. 1 Effects of hydrodynamic on the formation and diameter distribution of HEK293 cell aggregates in suspended cultures Results are expressed as the mean values of duplicate samples

尽管有文献报道, BHK 细胞在悬浮培养中形成粒径达到  $400\mu\text{m}$  的细胞团,其中央区域仍未出现中心性细胞坏死<sup>[10]</sup>。考虑到悬浮培养体系中 HEK293 细胞团的粒径分布必然存在程度不等的差异,粒径较大的细胞团内部存在物质扩散限制、细胞活力受损的可能,悬浮培养中 HEK293 细胞团的平均粒径以控制在  $300\mu\text{m}$  之内为宜。

参照商品化多孔微载体 Cytopore 的平均粒径,将 HEK293 细胞团划分为粒径  $\geq 225\mu\text{m}$  和粒径  $< 225\mu\text{m}$  两组,并以其各自在细胞团总数中所占比例考察不同强度流体动力对 HEK293 细胞团粒径分布的影响。随着培养时间的延长,25r/min 和 100 r/min 处理组中粒径  $\geq 225\mu\text{m}$  的细胞团所占比例不断增加,分别由培养 1d 的 6% 和 11% 增加到培养 7d 的 99% 和 91%; 50 r/min 和 75 r/min 处理组中粒径  $\geq 225\mu\text{m}$  的细胞团所占比例在整个培养过程中一直保持在低于 10% 的水平 (图 2)。

动物细胞在悬浮培养体系中形成细胞团的平均粒径影响着细胞培养的具体操作工艺和细胞的生长代谢。细胞团粒径过小不利于细胞截流和灌注培养的实施;细胞团粒径过大可能造成细胞团内传质效率受限,影响细胞的生长代谢<sup>[11, 12]</sup>。结合本实验流体动力对细胞团的形成和细胞团粒径分布的影响的观察结果,在利用 HEK293 细胞在悬浮培养中相互聚集、形成细胞团的生长特征,实施 HEK293 细胞高密度灌注培养的具体操作中,可在培养的早期将搅

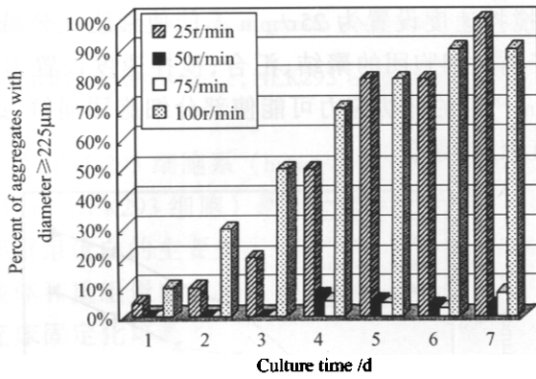


图2 流体动力强度对 HEK293 细胞团粒径分布的影响

Fig. 2 Effect of hydrodynamic on diameter distribution of HEK293 cell aggregates in suspended cultures. Results are expressed as the mean values of duplicate samples

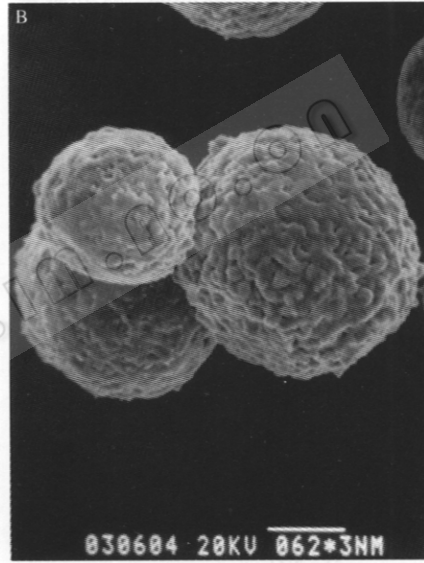
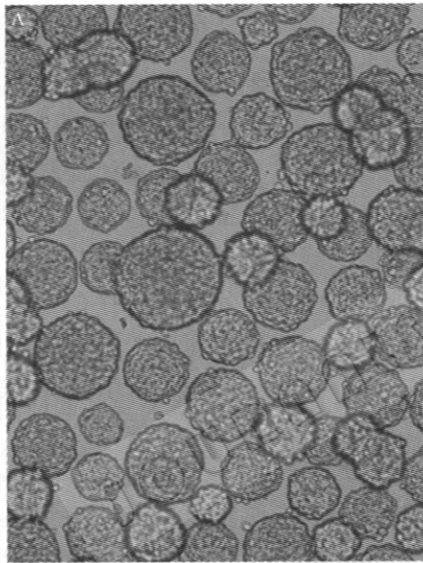


图3 倒置显微镜和扫描电镜下的 HEK293 细胞团

Fig. 3 Morphology and scanning electron micrograph of HEK293 cell aggregates in suspension culture. Agitation rate was set at 50r/min. A: 5 d in culture, 40 × magnification; B: 5 d in culture, 162 × magnification.

于细胞团内的扩散限制必然影响着物质的传递效率,由此对细胞的生长和代谢带来不利的影响<sup>[13]</sup>。图4所示为搅拌速度分别设置为25、50、75和100 r/min所产生的流体动力对细胞团中 HEK293 细胞生长的影响。HEK293 细胞的接种密度为  $2.7 \times 10^5$  cells/mL, 培养7d后,在搅拌速度为25、50、75和100r/min培养条件下 HEK293 细胞的活细胞密度分别达到  $20.4 \times 10^5$ 、 $38.2 \times 10^5$ 、 $34.2 \times 10^5$  和  $18.6 \times 10^5$  cells/mL(图4A)。在搅拌速度设置为50r/min和75r/min培养条件下,HEK293 细胞的活力在整个培养过程中维持在90%以上;搅拌速度设置为25和100r/min培养条件下的 HEK293 细胞活力由起始培养的94.4%,分别下降到培养7d后的72.4%和

拌速度设置为25r/min,加快细胞团的形成;随后把搅拌速度提高到50~75r/min,提高传质效率、控制细胞团的平均粒径和粒径分布的离散程度。

## 2.2 流体动力对细胞团中 HEK293 细胞生长和代谢的影响

在搅拌式生物反应器中以细胞团的形式悬浮培养的 HEK293 细胞不同于在其悬浮培养和贴附于微载体表面的二维生长,细胞之间紧密相连、形成类似于组织样三维结构的球形细胞团(图3)。

理论上,在搅拌式生物反应器中流体动力对以细胞团的形式悬浮培养的 HEK293 细胞的生长和代谢的影响不同于 HEK293 细胞的悬浮培养和微载体固定化培养。流体动力不仅影响细胞培养体系中的气液传质,也影响着培养体系中的液固传质。存在

67.5% (图4B)。结合流体动力对 HEK293 细胞团粒径分布影响的观察结果分析,在250mL的Bellco搅拌培养体系中,流体动力对细胞团中 HEK293 细胞生长的影响主要是通过影响细胞团的平均粒径及粒径分布的离散程度而实现的。

以葡萄糖比消耗率( $q_{glc}$ )、乳酸比产率( $q_{lac}$ )和乳酸转化率( $Y_{lac/glucose}$ )为观察指标,考察以细胞团的形式悬浮培养的 HEK293 细胞在搅拌速度分别设置为25、50、75和100r/min的培养条件下的细胞代谢。HEK293 细胞在搅拌速度为50r/min和75r/min培养条件下的  $q_{glc}$ 、 $q_{lac}$  和  $Y_{lac/glucose}$  在整个培养过程中相对稳定,分别维持在  $(6.42 \pm 0.51) \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells}/\text{day}$ 、 $(9.32 \pm 1.0^8) \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells}/\text{day}$  和  $(1.47 \pm 0.11)$  水平(图

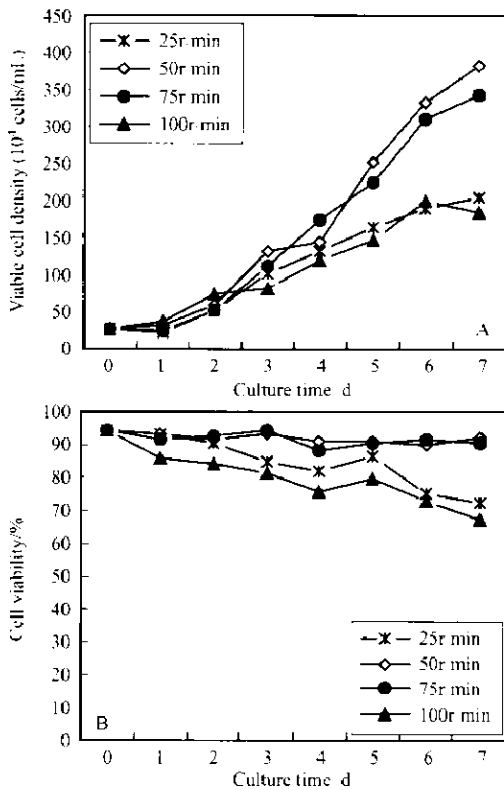


图4 流体动力强度对悬浮培养细胞团中 HEK293 细胞生长的影响

Fig. 4 Effect of hydrodynamic on the growth of HEK293 cells in suspended aggregate

Results are expressed as the mean values of duplicate samples.

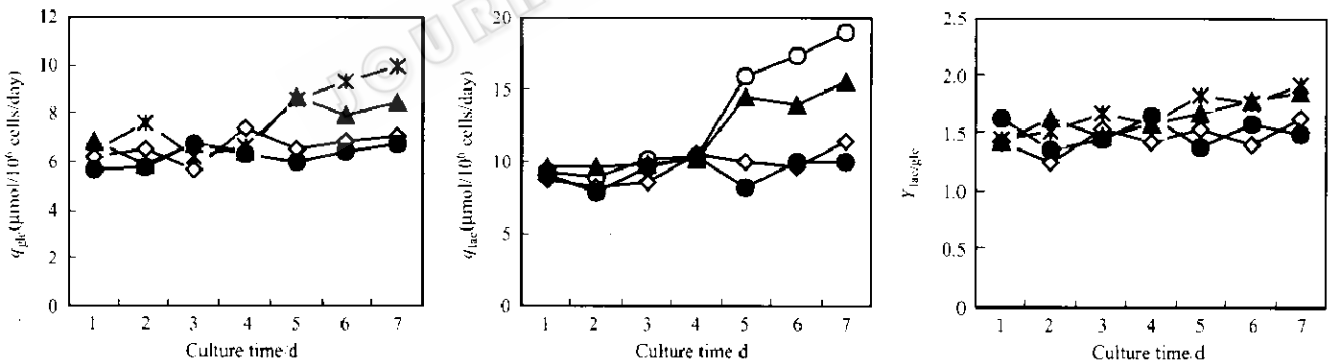


图5 流体动力强度对悬浮培养细胞团中 HEK293 细胞代谢的影响

Fig. 5 Effects of hydrodynamic on the  $q_{glc}$ ,  $q_{lac}$  and  $Y_{lac/glc}$  of HEK293 cells in suspended cell aggregates

\*: 25r/min; ◇: 50r/min; ●: 75r/min; ▲: 100r/min

Results are expressed as the mean values of duplicate samples.

## REFERENCES (参考文献)

[1] Wurn F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10: 156 - 159

[2] Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv*, 2003, 20: 475 - 489

[3] Côte J, Garnier A, Massie B *et al*. Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vector by 293SF-3F6 cells. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 59: 567 - 575

5)。搅拌速度设置为 25r/min 和 100r/min 的 HEK293 细胞则随着培养时间的延长,呈现出  $q_{glc}$ 、 $q_{lac}$  和  $Y_{lac/glc}$  升高趋势。培养结束前 3d, 25r/min 培养条件下 HEK293 细胞的  $q_{glc}$ 、 $q_{lac}$  和  $Y_{lac/glc}$  分别为  $(9.25 \pm 0.58) \mu\text{mol}/10^6$  cells/day、 $(15.96 \pm 3.17) \mu\text{mol}/10^6$  cells/day 和  $(1.84 \pm 0.07)$ ; 100r/min 培养条件下 HEK293 细胞的  $q_{glc}$ 、 $q_{lac}$  和  $Y_{lac/glc}$  分别为  $(8.35 \pm 0.32) \mu\text{mol}/10^6$  cells/day、 $(14.67 \pm 0.68) \mu\text{mol}/10^6$  cells/day 和  $1.76 \pm 0.08$ (图 5)。实验结果表明,流体动力强度既可直接影响以细胞团的形式悬浮培养的 HEK293 细胞的代谢,也可通过影响细胞团的平均粒径及粒径分布的离散程度而影响 HEK293 细胞的代谢。

## 3 结论

流体动力强度是影响 HEK293 细胞在搅拌式生物反应器中细胞团形成及细胞团粒径的分布的重要因素。流体动力强度对以细胞团的形式悬浮培养的 HEK293 细胞的生长和代谢的影响,主要是通过影响细胞团的平均粒径及粒径分布的离散程度而发挥作用的。搅拌速度设置为 50 ~ 75r/min 所产生的流体动力既有利于 HEK293 细胞形成粒径适中、粒径分布较为集中的细胞团,也可提供能基本满足悬浮细胞团中 HEK293 细胞正常生长和代谢需要的物质传递效率。

[4] Peshwa MV, Kyung YS, McClure DB *et al*. Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: effect of calcium concentration on spatial distribution of viability. *Biotechnol Bioengng*, 1993, 41: 179 - 187

[5] Zhao L (赵亮), Zhu ML (朱明龙), Zhang X (张旭) *et al*. Effect of calcium on aggregation and growth of 293 cells. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2005, 21: 482 - 485

[6] Moreira JL, Alves PM, Aunins JG *et al*. Changes in animal cell natural aggregates in suspended batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41: 203 - 209

- [ 7 ] Moreira JL, Alves PM. Hydrodynamic effects on BHK cells grown as suspended natural aggregates. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**:351 - 360
- [ 8 ] Zhang YX (张元兴), Xu XS (许学书). *Bioreactor Engineering*. Shanghai: East China University of Science and Technology Press (华东理工大学出版社), 2001
- [ 9 ] Sinskey AJ, Fleischaker RJ, Tyo MA *et al*. Production of cell-derived products: virus and interferon. *Ann NY Acad Sci*, 1981, **369**: 47 - 59
- [ 10 ] Moreira JL, Alves PM, Rodrigues JM *et al*. Studies of baby hamster kidney (BHK) natural cell aggregates in suspended batch cultures. *Ann NY Acad Sci*, 1994, **745**:122 - 133
- [ 11 ] Renner WA, Jordan M, Eppenberger HM *et al*. Cell-cell adhesion and aggregation: influence on the growth behavior of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **41**:188 - 193
- [ 12 ] Moreira JL, Santana PC, Feliciano AS *et al*. Effect of viscosity upon hydrodynamically controlled natural aggregates of animal cells grown in stirred vessels. *Biotechnol Prog*, 1995, **11**:575 - 583
- [ 13 ] Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science*, 1988, **240**: