

## 小牛皮提取的胶原-微载体用于贴壁细胞大规模培养

陈因良 李雨田 张书元 宋瑶君 叶南章  
华平 袁滔 丁健椿

(华东化工学院生化工程研究所, 上海)

由于胶原蛋白具有与含牛血清培养基中纤粘素(Fibronectin)一类物质相结合的特点, 因而胶原是一类来源广泛的可用作制备细胞培养基质的优良基质。经过各种形式的细胞培养试验, 以变性胶原为材料合成得到的GT-2微载体可成功地用于Vero、CHO、Bowes以及鱼类细胞的贴壁培养。培养规模包括不同容积的静置培养、滚瓶培养以及1.5L和20L进口和国产生物反应器的大规模细胞培养。

**关键词** 胶原; 微载体; 细胞培养; 生物反应器

微载体技术是近二十多年来迅速发展起来并得到广泛采用的大规模培养动物细胞的新工艺<sup>[1-4]</sup>。微载体培养是在搅拌容器中让贴壁生长细胞在球形微珠上生长并对均相的培养环境中进行细胞培养过程观察和控制。微载体具有许多良好的理化特性, 特别是其优良的生物相容性和高比表面(S/V)性, 使微载体培养技术近年来得到迅速发展<sup>[5-9]</sup>。

胶原广泛存在于动物的各种器官中, 约占蛋白质总量的四分之一, 许多研究表明, 变性胶原多肽一级结构的某些特定位置上具有与培养液中纤粘素相结合的特点<sup>[11,12]</sup>, 形成一种胶原-纤粘素的复合物, 从而以此为媒介有助于细胞的贴附与生长。因此采用变性胶原为基质, 制成用于培养各类细胞的专用介质或微载体, 将是一个十分有效的途径。

本文从新生小牛皮中提取了酸溶性胶原, 用层析和电泳方法对该胶原在变性条件下进行分析, 并与氨基酸组分分析相对照, 考察了胶原的纯度, 原胶原蛋白的单股肽链及多聚体的分布情况, 以变性胶原为

原料, 通过反相悬浮成珠技术制备的GT-2微载体, 在不同规模的培养器中对Vero、CHO、Bowes以及鱼类细胞的贴壁培养, 观察细胞贴壁率和生长形态以及代谢规律。

## 材 料 和 方 法

### (一)原料和试剂

牛皮采自新生24h内小牛。小牛由上海第六牧场提供。胃蛋白酶(猪)是中国科学院上海生物化学研究所产品。胶原(标准品)是美国Sigma公司产品。标准蛋白分子量(SDS-PAGE用)购自瑞典pharmacia公司 Electrophoresis Calibration Kit。金霉素系上海第九制药厂产品。

### (二)细胞

Vero细胞由卫生部上海生物制品研究所惠赠, CHO细胞(dhfr<sup>-</sup>)由中国预防医学科学院北京病毒所任贵芳教授惠赠。Bowes细胞培养由上海医科大学分子遗传

本文于1991年2月27日收到。

室协助进行。草鱼吻端细胞与胚胎细胞由浙江淡水水产研究所提供。

### (三)方法

1. 胶原的制备: 新生(24h内)小牛皮(约5kg), 去毛, 剔除皮下组织及小量脂肪, 清洗后切成小块, 捣碎。分别用 5% NaCl 和 1%  $\text{NaHCO}_3$  清洗以除去溶解物质。再溶于10L pH2.5水中, 加入 1g 胃蛋白酶和 0.5g 金霉素, 温度保持在 20℃ 以下, 间断搅动, 共计 5 天。所得粘稠胶原溶解物用纱布过滤。pH 用 NaOH 调至 10。在 4℃ 下放置 4h 以使胃蛋白酶失活。再用 HCl 调节 pH 至 7—8。胶原沉淀物用冷冻离心收集后再次把沉淀物溶解在 pH3 的稀盐酸溶液中。重复上述步骤, 在 pH7.5 左右收集沉淀, 经冷冻干燥后保存 [13,14]。

2. 胶原蛋白的氨基酸组分分析: 胶原(冻干)在 6mol/L HCl、110℃ 下水解 24h, 用氨基酸自动分析仪进行氨基酸组分分析(由中国科学院上海生化研究所协助分析)。其中羟脯氨酸按文献[15]分析。结果为甘氨酸(Gly)33.4%, 脯氨酸(Pro)11.2%, 羟脯氨酸(Hpr)9.0%。其它氨基酸组分见图 1。

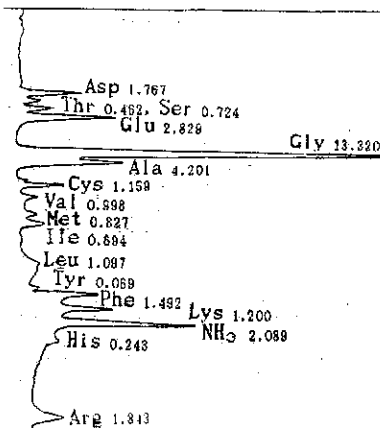


图 1 胶原蛋白的氨基酸组分分析  
Fig.1 Amino acid composition of tropocollagen

3. 离子交换层析: 按文献[16]方法, 载体用 CM23 (Whatman 进口分装)。缓冲液用 0.02mol/L HAc-NaAc 系统, pH4.8。用不同浓度的 NaCl 溶液进行梯度洗脱。采用 2238UVICORD S II 检测器(LKB), 226nm 波长检测。

胶原样品按 5mg/ml 溶于上述缓冲液中, 40—45℃ 保温 30min。离心除去不溶物备用。经处理后的层析介质浸泡于缓冲液中, 柱床为 0.9×10cm。平衡后上样, 上样量 20ml。洗脱温度为 45℃, 图谱见图 2。



图 2 变性胶原羧甲基纤维素离子交换层析图谱  
Fig.2 Ion-exchange chromatography of denatured collagen on carboxymethyl cellulose (CM23, whatman)

4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 本文制备的胶原与 Sigma 公司胶原样品均以 15mg/ml、标准蛋白样品以 5mg/ml 浓度上样。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 4.0—4.5% 进行蛋白质电泳后用考马斯亮蓝染色。结果如图 3 所示。

5. 胶原膜制备与细胞贴壁试验: 配制胶原 0.3% HCl 溶液(pH3), 涂复在培养皿上, 置于超净工作台上无菌空气干燥

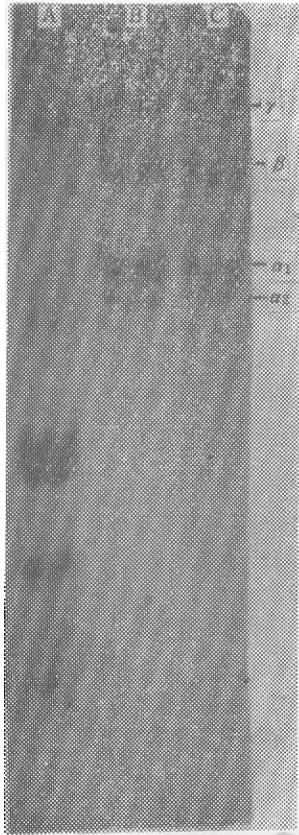


图3 胶原蛋白SDS-PAGE凝胶电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE gel electrophoretic profiles of proteins

A-Electrophoresis calibration kit (Pharmacia)  
B-Acid soluble collagen prepared in this paper  
C-Acid soluble collagen (Sigma)

并用紫外线照射 3h, 以使其交联。经 Hank's 溶液洗涤三次后在每个培养皿上接种 CHO 细胞, 接种浓度为  $1.4 \times 10^6$  Cells/ml。在  $37^\circ\text{C}$  二氧化碳培养箱中分别培养 2.5 和 3.5h 取样, 用相同的培养基洗脱后计数得到贴壁细胞数(见表 1)。

6. GT-2 微载体合成: GT-2 微载体由明胶溶液进行悬浮成珠后用戊二醛交联以提高机械强度。制备程序为: 将油相加到反应器中, 搅拌同时加热至  $45-55^\circ\text{C}$ 。配制好的 10% 原料液加入搅拌反应器中使其分散成珠。取样用显微镜观察粒径大小和分布, 待符合要求后继续搅拌 3—5min

表 1 胶原涂膜细胞贴壁试验

Table 1 Test of cell attachment on collagen membrane

Type	Culture (h)	Ratio of cell attachment (%)	Average value (%)
Denatured collagen	2.5	14.9	21.6
		21.3	
		28.7	
	3.5	24.5 53.7 37.2	34.2
Non-denatured collagen	2.5	12.8	13.6
		11.1	
		17.0	
	3.5	18.5 27.1 32.4	26.0

使之稳定。滴加戊二醛(25%)进行交联。反应完全后停止搅拌, 静止分层。取出微珠经洗涤、过筛、脱水和干燥后备用。微载体能耐  $121^\circ\text{C}$  高温灭菌并能在培养液中长期悬浮培养。

### 7. 细胞培养

(1) 培养基: Eagle's MEM 培养基, 补加 10% 小牛血清, 庆大霉素  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , 用 5.6%  $\text{NaHCO}_3$  溶液调节 pH 至 7.0—7.4。

(2) 贴壁率试验: 用 250ml 转瓶, GT-2 微载体浓度为  $2\text{g}/\text{L}$ , 使用前用 PBS 缓冲液浸泡, 换液 2—3 次, 经高温灭菌后用上述培养基浸泡过夜。以大于  $8 \times 10^5$  Cells/ml 细胞密度接种后的转瓶置于  $\text{CO}_2$  培养箱内, 搅拌转速为  $50\text{r}/\text{min}$ , 每隔 30min 搅拌一次, 每次 2min。当搅拌停止时微载体沉落。按一定时间间隔取上清液计数游离细胞, 由接种细胞数减去游离细胞即得细胞在微载体上的贴壁率如图 4 所示。

(3) 大规模细胞培养: GT-2 微载体分别在 1.5 和 5L 的生物反应器中进行哺

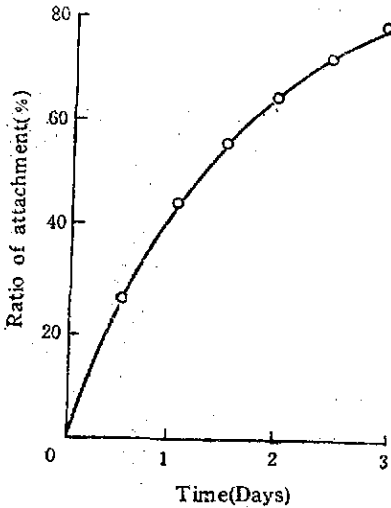


图 4 Vero细胞在GT-2微载体上贴壁率的测定  
Fig.4 Attachment ratio of Vero cells on GT-2 MC

乳动物细胞 Vero、CHO、Bowes 和草鱼吻端细胞、胚胎细胞的大量培养。1.5L 为美国 NBS 公司的 CelliGen，20L 为华东化工学院研制的 CellCul-20。接种的细胞分别在 2L 方瓶或滚瓶中培养得到。20L 细胞培养采用 CelliGen 为种子罐。在无菌条件下进行接种、转移。细胞的转移用微载体球间转移代替传统的胰酶或 EDTA 消化细胞方法。培养条件为：pH7.0—7.2，溶解氧 40—60% 空气饱和度，搅拌速度 30—55r/min，温度 37℃。培养过程中的 pH、溶氧、转速和温度均采用自动控制。细胞倍增试验系在 1.5L 罐中培养 Vero 细胞，每隔一天从罐内取样，在洗去游离细胞后转移微载体上细胞并进行计数，计算

表 2 Vero细胞在GT-2微载体上的生长情况  
Table 2 Growth of Vero cells on GT-2 MC

Time (Days)	0	1	2	3	4	5
Cell account $\times 10^6$ (Cells/ml)	0.80	0.84	2.00	4.00	7.5	11.70
Times of cell number	1.0	1.1	2.5	5.0	9.4	14.6

细胞增殖数和倍增数。表 2 数值是两次试验的平均值。

## 结果和讨论

### (一)实验结果分析

1. 由于组成胶原每条肽链的氨基酸出现 Gly-X-Y 重复序列 (X、Y 其中之一为 Pro 或 Hpr)，分析结果 Gly 33.4% (约占 1/3) Pro、Hpr 各占约 10%，Hpr/Pro=0.8，其数值与文献报道相符。因此组成分析可以确定为胶原蛋白。

2. CMC 离子交换层析图谱(图 2)与文献[16]图谱比较分析，可以认为从新生小牛皮提取的胶原由于来源于未成熟的

组织，原胶原蛋白尚未完全地共价交联，单股肽链  $\alpha$  和二聚体  $\beta$  的含量较高，与 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示的结果相符。

3. SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳把本文以新生小牛皮为原料通过酶解—酸抽提法制得的胶原与 Sigma 公司的产品作了对照比较，所得结果完全相符。证明胶原的纯度和分子量分布与进口 Sigma 产品相当。与标准蛋白的条带对照测得单股肽链的分子量为 90kDa，二聚体为 180kDa 左右。由胶原膜培养实验结果(表 1)表明，变性胶原由于具有较多的单股肽链，较易与培养基中的纤粘素等一类物质结合生成复合物而有利于细胞的贴附生长。因

而是一种优良的合成微载体的材料。

4. 由变性胶原合成的 GT-2 微载体在 1.5L 和 20L 生物反应器中进行动物细胞

的大规模培养，细胞生长良好。图 5 为 Vero, Bowes, CHO 细胞在 GT-2 微载体上生长形态的电镜照片。图 6 和图 7 分别

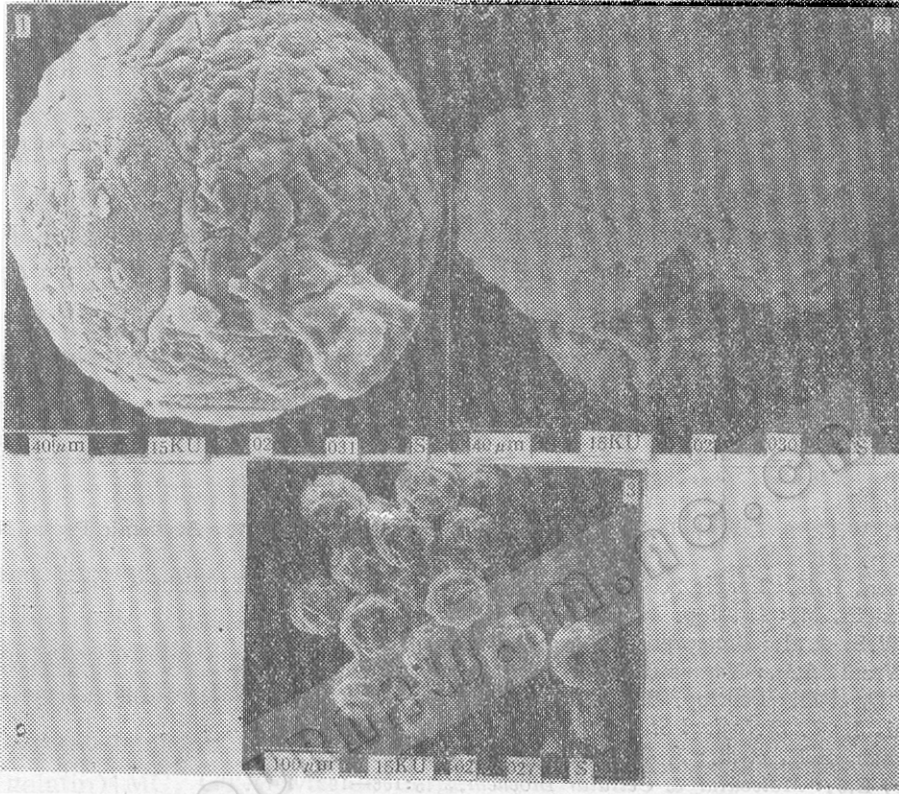


图 5 Vero (1)、Bowes 黑色素瘤细胞 (2) 和 CHO 细胞 (3) 在 GT-2 微载体上生长形态  
Fig.5 Growth of Vero (1), Bowes melanoma (2) and CHO (3) on the GT-2 MC

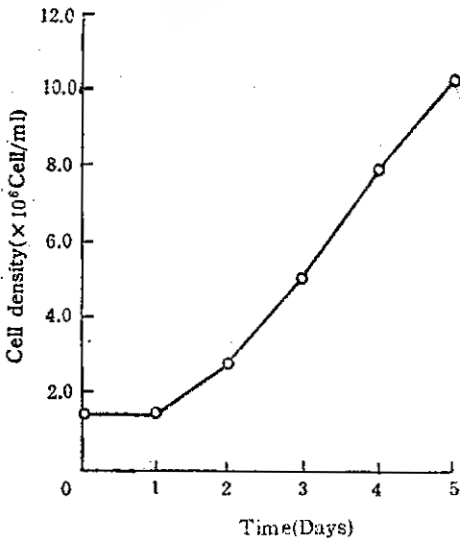


图 6 用 GT-2 微载体培养 Vero 细胞的情况  
Fig.6 Cultivation of Vero cells with GT-2 MC

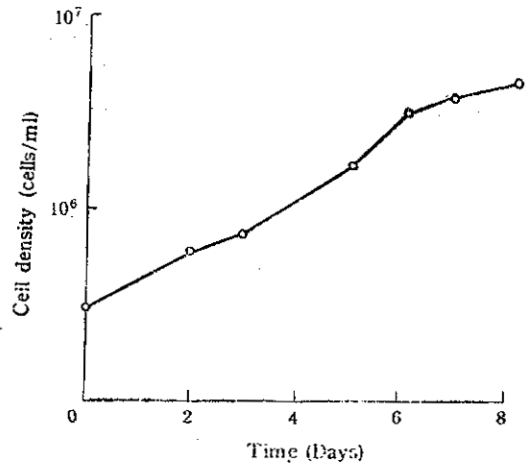


图 7 草鱼吻端细胞在 GT-2 微载体上的生长情况  
Fig.7 Growth of grass carp lip cells on GT-2 MC

为 GT-2 微载体应用于生物反应器中细胞的生长、代谢过程。表 2 指出, 在 1.5L CelliGen 罐、微载体用量 15g/L、培养 5 天后细胞增殖 14.6 倍。

## (二) 结论

1. 以胶原为基质制备成培养贴壁生长细胞的介质具有来源广泛、价格低廉的优点。以戊二醛交联制成的 GT-2 变性胶原微载体经静置的和不同规模反应器的细胞培养结果表明是一类性能优良的微载体, 适合于 Vero、CHO、Bowes、鱼类细胞等纤维形、上皮形态样细胞的贴壁生长、大量培养。

2. 培养皿涂复进行细胞贴壁培养结果表明, 变性胶原优于非变性胶原。这是由于胶原是一种具有超螺旋结构的纤维蛋白, 常以多聚体的形式出现。胶原变性后单股肽链的含量增大, 有利于和纤粘素结合进而利于细胞的贴壁生长。

3. 通过变性胶原的离子交换层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明, 由新生小牛皮提取得到的胶原含有较多分子量较小的(约 90KD) $\alpha$  肽链。将适用于偶联在交联葡聚糖凝胶微珠、多孔或中空玻璃微珠以及塑料微珠表面, 从而可以开发出多种新型的微载体。

## 参 考 文 献

- [1] Thilly, W.G. & Levin, D.W. *Methods in Enzymology*, Vol. 73, Academic Press, New York, p. 184, 1979.
- [2] Lydersen, B.K.: *Larger Scale Cell Culture Technology*, Hauser Publishers, 1987.
- [3] Hirtenstein, M.: *Develop. Biol. Standard.*, 46:109, 1980.
- [4] Wu, W.S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27:1466, 1985.
- [5] Van Wezel, A.L.: *Nature (London)*, 216:65, 1967.
- [6] Gebb, C. et al.: *Develop. Biol. Standard*, 55: 57-65, 1982.
- [7] Varani, J.: *J. Biological Standardization*, 14: 331-336, 1988.
- [8] Kleinman, H.K. et al.: *J. Cell Biology*, 88: 473-485, 1981.
- [9] Miller, E.J.: *Molecular & Cellular Biochem.*, 13:166-192, 1976.
- [10] Stryer, L.: *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, 1981.
- [11] Engvall, E. & Ruoslahti, E.: *Int. J. Cancer*, 20: 1-5, 1977.
- [12] Obrink, B. et al.: *FEBS LETTERS*, 56: 166-169, 1975.
- [13] Kasai, S. et al.: U.S. patent, 4559304, 1985.
- [14] 蔡武城等: 生物化学实验技术教程, 复旦大学出版社, 上海, 1983.
- [15] Block, R.J.: *Amino Acid Handbook Methods and Results of Protein Analysis*, Charles C. Thomas Publisher, U.S.A., 1959.
- [16] Miller, E. J. & Rhodes, R.K.: *Methods in Enzymology*, Vol. 82, Academic Press, New York, p. 33-64, 1982.

## Cultivating Anchorage-dependent Animal Cells with Collagen and Denatured Collagen Microcarrier

Chen Yinliang Li Yutian Zhang Shuyuan Song Yaojun

Yie Nanzhang Hua Ping Yuan Tao Ding Jianchun

(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University of Chemical Technology, Shanghai)

It was shown that collagen substrates enhance the growth as well as the differentiation of many cells in culture. Collagen is the major fibrous element of animal bodies and the pure collagen was extracted from the new born calf skin by using chemical and biochemical methods. The analyses of ion exchange chromatography and electrophoresis show that the main components of denatured collagen are  $\alpha$  monomers and  $\beta$  dimers. Collagen and denatured collagen solution were coated on petri dishes and after drying by air aseptically, they were irradiated by ultra violet ray to crosslink collagen. On these membranes various cells were cultured and the denatured collagen was proved as a very good matrix for culturing anchorage-dependent cells. A kind of denatured collagen (gelatin) MC, GT-2 was developed by crosslinking gelatin with glutaraldehyde in a suspension polymerization process. These microcarriers were successfully used in different culture scales to culture various anchorage-dependent cells such as Vero, CHO and Bowes. These scales include Tflasks, spinner bottles, roller bottles and 1.5, 2.5, 5.0 and 20 liters bioreactors.

### Key words

Collagen; microcarrier; cell culture; bioreactor