

微囊化杂交瘤细胞培养的基础应用研究

宁国伯 钱军华 郭明珠

(第二军医大学三六九研究室、上海)

本文探讨了海藻酸钠的结构组分对微囊强度的重要作用。提出了微囊化批量生产中估算活细胞的方法以及影响满囊比的主要因素等。制备微囊的成功率达到95%以上,满载率可达95%。微囊化杂交瘤细胞在静态培养6—10天后,细胞浓度为 $8.8 \times 10^6 - 2.1 \times 10^7$ cell/ml微囊。单抗浓度为379 μ g/ml微囊。微囊化产物经 SDS 电泳呈现一条或两条蛋白带,表明单抗纯度较高。

关键词 微囊; 强度; 满囊比

微囊化培养哺乳动物细胞是生物技术的研究课题之一。用它制备的产物具有高浓度、高纯度、高活力等优点。在大规模培养杂交瘤细胞,重组哺乳动物细胞, LAK 细胞, 研制太空生物制剂等方面, 均有良好的应用前景^[1-4]。有关技术途径, 国际上已有专利^[5]。据报告, 1986年美国已投资建厂。我们从1986年开展工作, 经通力协作, 解决了一些技术性较强的问题, 取得了较好进展。

材 料 和 方 法

(一) 主要器材

主要试剂和细胞株: 海藻酸钠(ALG, 国产), 聚-L-赖氨酸(PLL Sigma), CHES(环己胺磺酸, 国产), TSC(柠檬酸钠溶液)、Dower阴离子交换树脂(Sigma), RPMI₁₆₄₀培养基(日本)及杂交瘤细胞株(由本校建立, 其中有抗白色念珠菌的 II-2 杂交瘤细胞株, 抗尿激酶的 B₆ 细胞株, 抗甲状腺瘤球蛋白的 C₂ 细胞株)。

主要设备有细胞成囊装置, XN₃ 型毛细管粘度计, 倒置显微镜, 组织培养

板, 二氧化碳孵箱, 酶标检测仪和岛津分光光度计等。

(二) 主要方法

1. 微囊形成方法: 按 Lim(1982)^[5] 和 Goosen(1985)^[6] 的方法。海藻酸钠和细胞的混悬液经过微珠发生器制成微珠, 与 1.2% CaCl₂ 溶液作用, 形成固态微珠, 洗涤后, 与 0.05% PLL 产生交联反应, 形成半渗透膜, 经液化处理, 形成微囊。

2. 海藻酸钠的糖醛酸组分 M/G(M 为甘露糖醛酸, G 为古罗糖醛酸) 测定方法: 按纪明候(1980)^[7] 的方法。

3. 微囊化杂交瘤细胞的培养方法: 将制备的微囊, 按适当的密度, 分散在 24 孔组织培养板或玻璃培养瓶中, 置于二氧化碳孵箱内, 37°C 高温培养, 定期取样, 并半量更换培养液, 直到所需时间。

4. 半满囊机率的计算方法:

微囊密度(D) = 分类微囊数 / 分类孔数

分布频率(F) = 分类满囊比大于 0.5 的微囊数 / 各类微囊

本文于1991年3月4日收到。

本课题由国家自然科学基金和军队科研基金资助。

总数

$$\text{半满囊机率} = F/D$$

结果与讨论

(一) 海藻酸钠的构成组分对微囊强度的重要作用

在微囊化培养杂交瘤细胞中, 微囊强度是至关重要的。我们观察了 M/G 比值与微囊强度的关系。结果见表 1。从表 1

表 1 海藻酸钠的构成组分与微囊强度

Table 1 The relationship between constitute component of sodium alginate and strength of microcapsule

批号 No.	M/G 比值 M/G Ratio	成囊率 MFP* (%)	微囊破损率 MRP** (%)	
			离 心 Centrifugation	搅 拌 Stirring
1	2.67	100.0	1.2	1.0
2	2.17	100.0	1.4	1.5
3	3.78	100.0	24.8	27.3
4	4.46	100.0 (或0.0)	63.0	50.6

* 成囊率(MFP)是与PLL交联后, 经液化处理, 所得完整空心微珠的百分比。

MFP represents fraction of intact microcapsule with empty core formed after treated with PLL and liquified.

** 破损率(MRP)是指完整空心微囊经2000r/min离心或悬浮搅拌4h后破损的百分比。

Microcapsule rupture percentage represents fraction of intact microcapsule with empty core which ruptured after centrifugation and stirring in suspension.

可知, 1号和2号 ALG 的 M/G 比值较低, 说明 G 组分含量高, 凝胶性强, 经液化处理, 即使离心或悬浮搅拌后, 微囊破损率也很低。3号 ALG 的 M/G 比值较高, 虽然成囊率可达 100%, 但经离心后, 微囊破损率高, 不能满足实际应用。

4号 ALG 的古罗糖醛酸含量更低, 用它制备微囊难以成功。为便于比较, 将其浓度由 1.2% 提高到 2.0%, (其他批号 ALG 的浓度仍为 1.2%), 结果相对粘度由 21.8

(生理盐水为参照液)相应升高到 141.7, 成囊率由 0.0% 升高到 100.0%, 但经离心和悬浮搅拌后, 微囊破损率相当高。这进一步证明, ALG 的 M/G 比值对微囊强度起重要作用。

(二) 微囊化杂交瘤细胞存活率的计算模型

按 Lim 的制囊程序, 制备微囊是一个多级反应过程, 它包括细胞的固定化, 制备半渗透膜, 液化处理以及洗脱等程序。在此过程中, 细胞处于缺食的情况下, 进行着化工及机械处理, 难免有一部分细胞受伤或死亡。我们进行的小样品试验表明, 按制囊程序, 经不同阶段处理后, 每个微珠或微囊中能长成克隆的细胞数, 已明显减少(见表 2), 液化后存活率大约

表 2 制备微囊过程中杂交瘤细胞存活的变化

Table 2 Change of hybridoma cell survive in the envelope course

实 验 次 No. of test	对照细胞数 Contrast cells	每个微珠或微囊内生长的克隆数 Clone number in microdro- p or microcapsule		
		固定化 Immo- bilizing	液化前 Before li- quidizing	液化后 After li- quidizing
1	9.2	6.9	5.0	5.5
2	18.0	16.9	14.5	9.6
3	22.0	20.3	17.7	9.8
4	12.4	10.7	9.1	6.4
5	29.2	16.2	12.0	10.4
6	32.7	15.2	9.2	5.6
7	33.5	15.6	7.0	8.5
平均 Ave- rage	22.4	14.5	10.7	8.0
存活率 Survive (%)	100.0	64.7	47.8	35.7

只有 35%。如果严格注意等渗条件, 或加一些保护剂, 存活率还可以提高。问题在实际生产中, 试剂用量大, 输入输出试剂的时间长, 势必增加化工及机械处理时间, 导致存活率降低。为此, 我们进行了

模拟研究。按Lim的制囊程序,试剂配方不变,仅增加各阶段的作用时间。结果表明,随着操作时间延长,存活率逐渐下降,且呈线性关系,见图1,根据直线方程式的原理,存活率可用(1)式表达。

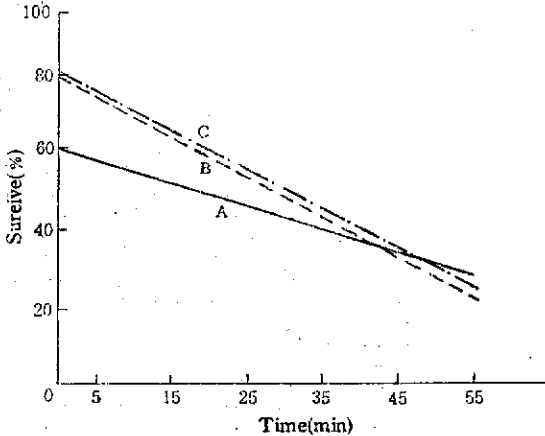


图 1 3 种试剂对固定化细胞存活的影响

Fig.1 Effect of different reagent on immobilized cell survive

A. 1.2% CaCl₂; B. 0.1% CHES;
C. 0.01mol/L TSC

$$V_1 = V_{0.1} - K_1 t \quad (1)$$

V_1 为第一阶段(即固定化阶段),
作用7min后的存活率

$V_{0.1}$ 为 t_0 时的存活率

K_1 为常数,即直线的斜率

同理,如有几个阶段,则

$$V_n = V_{0.n} - K_n t \quad (2)$$

上述情况,是单因素分别作用的结果,实际工作中,是多因素综合作用的结果,所以,总的存活率为

$$V = V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdots V_n \quad (3)$$

$V_1, V_2, V_3 \cdots V_n$ 的存活率,通过试验是可以测定和计算的。

现在,我们可以估算每个微囊中实际存活的杂交瘤细胞数 N

$$N = N_0 \cdot V \quad (4)$$

N_0 代表接种在每个微珠中的细胞数,它等于接种细胞的总数除微囊总数。

微囊总数是微珠堆密度(D)与微珠体积(\bar{V})的乘积。 \bar{V} 值可以测定。 D 值根据经验公式(5)^[8]进行计算

$$D = \frac{900}{\pi} \left(\frac{1600}{d} \right)^3 \quad (5)$$

微珠直径 d ,根据需要确定其大小,一经确定,不难算出微囊总数。此时,需要接种的杂交瘤细胞数也不难计算。然后,根据(4)式,即可估算出每个微囊中存在的活细胞数量。

在批量生产中,估算活细胞数是十分重要的。因为满载率和满囊的高低,以及总体培养效果,往往与此有关。例如,在实验室制备少量微囊,用1.2% CaCl₂溶液作用15min,0.1% CHES液作用3min,0.01mol/L柠檬酸钠液作用10min,操作并不困难;相反,在批量生产中,试剂用量大,势必延长操作时间。假定接种的细胞数和试剂浓度与小样本相同,只是试剂作用时间不同, CaCl₂, CHES,柠檬酸钠溶液作用时间,分别为35min,30min和30min。然后,按上述模型,估算每个微囊中的活细胞数。表3的结果说明,两者相差数倍。结果提示我们,在类似情况中,若制备少量微囊,获得的满载率可能是100.0%,但若为批量生产,满载率可能极低。因此,必须改进操作。实际上,三种试剂只代表三个主要过程,不是制备微囊的全过程,全过程经系列处理后,存在的活细胞数更低。经多次试验,我们已经说明这一点。必须强调,细胞数量是重要的,细胞质量同样重要。

(三) 微囊化杂交瘤细胞的生长及产物积累特性

随着微囊化杂交瘤细胞存活模型的探讨和影响因素的解决,使常规实验的满载率达到95%以上,甚至100.0%,但满载

表3 常规法和批量生产中存活细胞数的比较

Table 3 Comparison of viable cell number for routine with batch process

假设接种的细胞数 Cell number	常规法 Routine method			批量生产 Batch process		
	固定化 Immobilizing	液化前 Before liquide	液化后 After liquide	固定化 Immobilizing	液化前 Before liquide	液化后 After liquide
	150	80.4	49.7	36.2	61.6	14.4
50	26.8	16.6	11.2	20.6	4.8	2.5
10	5.4	3.3	2.2	4.1	1.0	0.5
5	2.7	1.6	1.1	2.0	0.5	0.2

率100%，并不等于满囊率100%，即每个微囊都充满克隆。它还受其他因素的影响。

1. 影响满囊比的主要因素: 表4的结果说明, 在静态培养中微囊密度对半满囊机率影响甚大, 微囊密度低者, 半满囊机率高, 反之则低。

PLL 分子量是影响微囊孔径的主要因素, 对囊内外物质交换起着十分重要的作用。对杂交瘤细胞的实验结果表明, 在静态培养条件下, PLL分子量较大者, 满囊率高, 相反, 则明显减少, 差距达6倍以上。

其次, 其他条件完全相同, 培养容器不同, 满囊比也明显不同, 把制备的微囊分别放到组织培养板和玻璃培养瓶中, 同时观察并更换培液, 结果表明, 前者的半满囊机率明显高于后者。其中一个可能的原因, 是玻璃培养瓶凹凸不平, 有些地方微囊密度较高。

最后, 因制囊过程处理不当, 细胞受伤, 囊内杂交瘤细胞长成巨形细胞, 它们不能增殖分化, 只见体积增大, 到一定程度为止。因此, 不能充满微囊。虽然满载率可达100%, 但满囊比很低。

2. 微囊化培养杂交瘤细胞的峰值浓度与满载率和满囊比的关系: 表5的结果

表4 微囊密度与半满囊机率的关系

Table 4 Relation between microencapsule density and rate of half-full microencapsule

平均微囊密度 (D) (囊数/孔) Average density of microencapsule(D) (number/well)	满囊比大于 0.5的微囊数 Number of higher 0.5 rate of full microencapsule	分布频率(F) (%) Frequency of distribution (F)	半满囊机率 (%) F/D (%)
15.2(1—30)	214	15.5	102.0
42.2(30—60)	186	13.5	32.0
78.0(60—90)	240	17.4	22.3
100.5(90—120)	324	23.5	23.4
179.2(120—150)	127	9.0	5.0
173.0(150—180)	181	13.1	7.6
231.5(180以上)	109	7.9	3.4

表明, 如果处于良好的制囊过程和培养条件, 满载率和满囊比二者都高, 峰值浓度自然也高, 反之则低。

表5 微囊化培养杂交瘤峰值浓度的影响因素

Table 5 Factor affecting highest concentration of culture hybridoma in microencapsule

实验序号 No. of test	满载率 Rate of full load (%)	满囊比 Rate of full microencapsule	峰值浓度 Cell highest concentration (10^4 cell ml ⁻¹)
1	19.1	0.30	105.3
2	97.6	0.12	266.7
3	97.9	0.37	841.0
4	65.6	0.51	1100.0
5	62.2	0.57	1000.0
6	94.7	0.67	1800.0
7	98.1	0.63	2100.0

3. 微囊化杂交瘤细胞的生长曲线及单抗累积特性: 图2的结果说明, C₃细胞株经微囊化培养后, 细胞浓度、分泌产物与培养时间的关系, 随着静态培养时间的延长, 囊内细胞浓度相应增加, 单克隆抗体的浓度随之而升高。第10天的平均单抗浓度比第一天大约高20倍, 从而达到浓

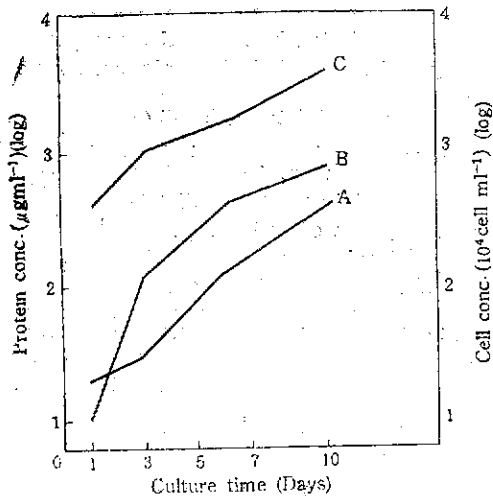


图 2 微囊化培养 C_3 杂交瘤细胞中单抗浓度和细胞浓度与培养时间的关系
Fig.2 Relationship between monoclonal antibody and cell conc. with culture time in microcapsule
A. McAb conc.; B. Cell conc.; C. Protein conc.

集的目的。此外，微囊化的提取产物，经 SDS 电泳分析(考马斯亮蓝染色)，呈现一条或二条蛋白带，说明单抗较纯。

关于 ALG-PLL 介质形成微囊的机理，Lim (1982)^[6] 已有介绍，但用它培养杂交瘤细胞的规律和影响因素，报告甚少。我们的研究可能对同行有参考价值。

参 考 文 献

- [1] Kevin, J.G. et al., *In Vitro Cellular and Devel. Biology*, 24(1):35, 1988.
- [2] Bugarski, B. et al., *Appl. Microbiol. Biotech.*, 30(3):264, 1989.
- [3] Arnold, R.G. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 10:82, 1984.
- [4] Edward, B.R. et al., *J. Immunology Methods*, 126(2):273, 1990.
- [5] Lim, F. et al., U.S. Patent, 4352883, 1982.
- [6] Goosen, H.F.A. et al., *Biotech. Bioeng.*, 27(2):146, 1985.
- [7] 纪明侯等: 海洋与湖沼, 12(3):240—247, 1980.
- [8] 宁国伯等: 生物工程学报, 5(2):113, 1989.

Base Applied Study of Culture Hybridoma in Microencapsulation

Ning Guobo Qian Junhua Guo Mingzhu

(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai)

We reported here that constitute components of sodium alginate are very important factors affecting strength of microcapsule. Method of estimating viable cells number in microcapsule in batch culture hybridoma has been developed and influence factors on the rate of full microcapsule. Now making microcapsules are very good. Rate of forming microcapsule and rate of full load was above 95%. Cell density of hybridoma were found to reach 8.8×10^6 — 2.1×10^7 cell ml⁻¹ by the static culture for 6—9 days. McAb accumulated in the intracapsule to a final concentration of 379 μg ml⁻¹. Analysis of the intracapsule protein by SDS gel electrophoresis demonstrated that it was pure.

Key words

Microcapsule; strength; rate of full microcapsule