

# 用微载体技术培养家蚕 BmN 细胞的实验研究

邓小昭<sup>1</sup> 周永春<sup>2</sup> 张林元<sup>1</sup> 刁振宇<sup>1</sup> 陈宜峰<sup>3</sup>

(南京军区军事医学研究所分子遗传学研究室 南京 210032)<sup>1</sup>

(第二军医大学分子遗传学教研室 上海 200433)<sup>2</sup>

(南京师范大学生物系 南京 2100243)<sup>3</sup>

**摘 要** 观察了家蚕 BmN(从 Silkworm Bombyx mori 获得的细胞系)细胞在微载体 Cytodex 3 上的贴壁分布,提出其分布符合 Poisson 规律,并由此估计了不同细胞接种浓度时裸球的百分比,与实际观测结果基本符合;研究了不同接种浓度与微载体浓度时细胞的生长情况,家蚕 BmN 细胞在 Cytodex 3 上生长的临界接种数为一珠粒 6.4 个细胞。当微载体浓度为 3 g/L 时,最低的接种浓度为  $1.0 \times 10^5$ /ml。

**关键词** 微载体,昆虫细胞培养

近年来,应用昆虫杆状病毒作载体在昆虫细胞或虫体中高效表达外源基因的技术已得到广泛的推广应用。这一基因工程表达系统安全、高效、容量大,表达的产物具有生物活性,是一种很有潜力的表达系统,已有数百种动物、植物、微生物、病毒的基因在这一系统中成功表达<sup>(1)</sup>。而大规模有效、经济地培养昆虫细胞是以此表达系统进行生化产品生产的关键之一。

与哺乳动物细胞相比,昆虫细胞对培养环境更加敏感<sup>(2)</sup>,尚未见到家蚕 BmN 细胞悬浮培养获得成功的报道。

我们曾用基因工程重组病毒转染在 100ml 小方瓶中静止培养的家蚕 BmN 细胞,表明能稳定地表达人  $\alpha$ -干扰素,表达水平为  $1.6 \times 10^6$  IU/ml<sup>(3)</sup>。其后又作了由方瓶过渡到 1000ml 滚瓶的放大培养,目前表达水平为  $3.2 \times 10^6$  IU/ml。为更进一步提高细胞生长密度,获得更高、更稳定的表达,选择了微载体 Cytodex 3,对家蚕 BmN 细胞的生长情况、细胞接种浓度、微载体浓度等参数作了实验研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

家蚕 BmN 细胞系复旦大学生物系惠赠。细胞培养基是 TC100 (GIBCO 产品),加 10% 小牛血清、100IU/ml 青霉素和 100 $\mu$ g/ml 链霉素。细胞在 27℃ 下培养。每隔 3~7d,以 1:3 比例传代培养。

### 1.2 微载体

采用微载体 Cytodex 3 (Pharmacia Sweden 产品),这是一种在交联葡聚糖珠体上涂

江苏省“八五”攻关课题一部分。

参加本研究工作的还有李光富,陈华标同志。

本文于 1994 年 5 月 5 日收到。

有一层胶原蛋白的微载体, 适合于在平板上培养效率低的贴壁依赖性细胞株的培养。

### 1.3 微载体的预处理

称取一定数量的微载体, 加到经硅化的玻璃瓶中, 加入无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS 溶液, 在室温下间歇缓慢搅拌 3h, 倾去浮在表面的杂质, 反复数次后高压灭菌。使用前置于一定量的家蚕 BmN 细胞种子液中, 再加入适量培养基 (其体积约为最终培养体积的 1/3), 在 27℃ 培养箱内, 每隔半小时缓慢摇匀 2min。在细胞附壁阶段结束后, 将 BmN 细胞连同微载体一起移至 1000ml 滚瓶中, 补充培养基至工作容积 (200ml), 开动机器, 转速为 20r/min。

### 1.4 不含微载体上清液的细胞计数

取样分析未贴壁于 Cytodex 3 的游离细胞。取 2ml 微载体-细胞悬液加入到刻度离心管中, 让微载体自由下沉, 当微载体刚刚下沉到底部时, 迅速吸取上清液, 进行细胞计数。

### 1.5 贴壁于微载体上的细胞计数

从取样瓶中吸取混合均匀的微载体-细胞悬液 2ml, 加入刻度离心管中, 让其充分自由下沉, 吸掉上清液, 加入 2ml 无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS 溶液洗涤一次, 去上清液, 再加入 2ml 培养基, 充分吹打, 使细胞充分脱落。静置使微载体自由下沉。当微载体刚刚沉降至离心管底部时, 迅速吸取上清液 1ml 于另一试管中, 进行计数。

## 2 实验结果

### 2.1 BmN 细胞在 Cytodex 3 微载体上贴壁和培养过程中的密度观察及分布

将 BmN 细胞接种于含 Cytodex 3 微载体的培养液中, 使细胞随机吸附在微载体表面上。在显微镜下观察, BmN 细胞在 Cytodex 3 上贴壁时间大致为 14~18h, 然后细胞进入生长期, 直至在微载体表面长满, 进入生长平衡期。我们观察了不同培养时间下 BmN 细胞的形态。结果见图版 1。

图版 I-a 培养时间为 24h, 大多数细胞贴附于微载体上, 呈圆形, 还没有开始生长。图版 I-b 培养时间为 48h, 细胞处于指数生长前期。图版 I-C 培养时间为 96h, 细胞长满整个微载体, 相当紧密。

### 2.2 BmN 细胞在微载体 Cytodex 3 上贴壁分布的理论分析与实验观察

为了分析细胞在微载体上的贴壁情况, 假设 (1) 接种的细胞都是分散成单个; (2) 任一活细胞贴壁于某微载体上的机率相等; (3) 微载体大小粒径均匀。因此, 当 BmN 细胞接种于含 Cytodex 3 的培养基时, 细胞将依据某种分布函数以随机形式附壁于微载体上, 且应为整数离散分布。若其分布符合 Poisson 规律, 则应满足下列分布模型:

$$W_{(j)} = \frac{e^{-U} \cdot U^j}{j!} \quad (1)$$

$U$ : 每个微载体上的平均细胞数

$W_{(j)}$ : 有  $j$  个细胞的微载体的频率

为了观察实际分布情况, 将 BmN 细胞以  $4 \times 10^4/\text{ml}$  接种于含微载体 Cytodex 3 的培养基中, (微载体浓度为 3g/L, Cytodex 3 每克干重大约含有  $4.0 \times 10^6$  个珠粒), 14h 后进行观

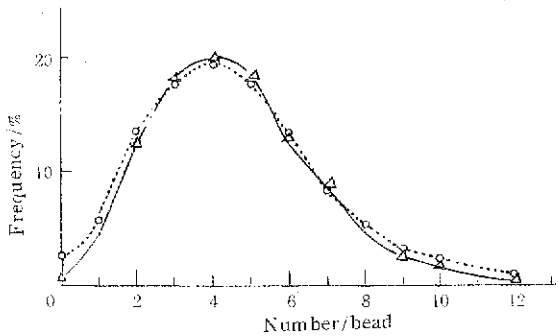


图 1 BmN 细胞在 Cytodex 3 上的贴壁分布  
Fig. 1 Distribution of BmN cells attached on Cytodex 3 bead

—△— Poisson theory value  
—○— Actual observation values

察。此时细胞贴壁情况良好，但还没有生长，贴壁于微载体上的都是种子细胞。由图 1 可以看出，通过显微镜计数的实验观测值与泊松分布理论值能较好地吻合。

实际上，微载体 Cytodex 3 本身的粒径不是完全均匀的，有一个分布范围 (134~218μm)。平均粒径为 175μm。而且，细胞优先贴壁于粒径小的微载体<sup>[4]</sup>。考虑了这两个因素后，公式 (1) 演变为：

$$F_{(i)} = \sum_{i=1}^I f_i \cdot g_{i(j)} \\ = \sum_{i=1}^I f_i \cdot \frac{e^{-\alpha(Di)} \cdot U_{(Di)}^r}{J!} \quad (2)$$

由公式 (2) 计算出在不同的细胞接种数时，微载体中出现裸球的概率，并与实际观测到的结果作比较 (见表 1)。

表 1 细胞接种数对培养过程中裸球数目的影响

Table 1 The influence of inoculative cells number on the bare beads probability

Number of cells in inoculum (cells/bead)	Observe ratio of bare beads (a) /%	Theoretical ratio of bare beads (b) /%
3.2	50	45
4.8	25	16
6.4	8	2

(a) Bare beads ratio by actual microscope observation (at 27℃ for 48h).

(b) Bare beads probability calculated from equation (2)

用微载体培养细胞，一般要求培养过程中裸球数小于 10%。由表 1 可知，对于 BmN 细胞在 Cytodex 3 上的生长，临界接种细胞浓度约为  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 。计算出的理论值与实际测定值间的差异可能与细胞种类、种子细胞分散程度、贴壁过程的差异等因素有关。

2.3 细胞的接种浓度对细胞生长的影响

在 1000ml 滚瓶中培养家蚕 BmN 细胞，微载体 Cytodex 3 的浓度为 3g/L，培养温度 27℃，滚瓶转速为 20r/min，培养液体积为 200ml。接种浓度不同时，细胞的生长表现出不同的特性，其结果见图 2。

从图 2 可见在转瓶培养时，当微载体浓度为 3g/L，接种细胞浓度在  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  以上时，培养 6~7d 以后，细胞的最终浓度能达到  $1.0 \times 10^6$  左右。当接种细胞浓度低于  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ ，培养 7d 后细胞密度只有  $4.0 \times 10^5/\text{ml}$ ，生长速度明显偏低，使得要获得相同的细胞密度所需要的培养时间大大延长。

2.4 微载体浓度对 BmN 细胞生长速率的影响

图 3 表示用滚瓶培养 BmN 细胞，在相同的细胞接种浓度时，不同微载体浓度对细胞

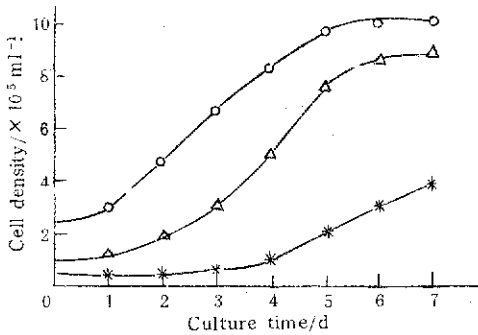


图2 接种细胞浓度对其生长的影响

Fig. 2 The influence of inoculum concentration on BmN cells growth

Cell inoculum conc. /  $\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 

—○— 2.50, —△— 1.0, —\*— 0.6

生长的影响。当细胞接种浓度为  $3.2 \times$

$10^5/\text{ml}$ , 微载体 Cytodex 3 浓度为  $5\text{g/L}$  时, 最终细胞密度可达  $1.9 \times 10^6/\text{ml}$ ; 微载体浓度为  $3\text{g/L}$  时, 最终的细胞密度为  $1.3 \times 10^6/\text{ml}$ , 同时, 生长速度低于前者。这是因为前者提供给细胞生长的表面积增大了 1.7 倍。当接种细胞浓度为  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  时, 结果却相反。微载体为  $3\text{g/L}$ , 培养 7d 后细胞密度为  $1.16 \times 10^6/\text{ml}$ , 而微载体为  $5\text{g/L}$ , 培养 7d 后细胞密度只有  $7.8 \times 10^5/\text{ml}$ 。这是因为微载体浓度过高, 平均每个小球上贴壁的细胞数减少, 裸球的比例增大。当小球上的细胞数低于临界值时, 生长受到阻碍, 使得细胞的总体生长速率减慢。

### 3 讨论

为了使细胞能以正常的生长速率达到最大的细胞密度, 微载体浓度需与接种浓度相配合。Hu W. S. 等<sup>[5]</sup>提出了临界细胞接种量的概念, 认为每个微载体上贴壁的细胞数只有超过某个值时, 细胞才能正常生长。这是因为只有贴壁细胞在微载体表面形成一个良好的微环境时, 细胞生长和繁殖才启动。同时, 又由于最终的细胞生长密度要受到培养表面积的限制, 接种浓度越大, 细胞总的生长倍数就越小。对 BmN 细胞在 Cytodex 3 上的生长, 由表 1 可知, 当接种数为每粒微载体 6.4 个细胞时, 裸球数为 8% 左右; 而当接种数为 4.8 个细胞时, 裸球数为 25%, 这就使最终的细胞密度达不到正常生长的浓度。由图 2 显示 BmN 的接种浓度低于  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  时, 细胞的生长速度很低。因此, 根据本实验研究的结果, 要使 BmN 细胞在 Cytodex 3 上的生长倍数大于 10, 裸球数小于 10%, 最佳的细胞接种浓度应为每粒微载体达 7~10 个细胞。

### 参 考 文 献

- [1] Luckow V L, Summers M D. Bio/Technology, 1988, 6: 47~55.
- [2] 陈因良, 陈志宏:《细胞培养工程》, 上海: 华东化工学院出版社, 1992, 123~124.
- [3] 张林元, 邓小昭, 李淑德等. 生物工程进展, 1993, 13 (3): 3~4.
- [4] Butler M. Advances in Biochemical Engineering/Bio technology, 1987, pp. 521~523.
- [5] Hu W S. Biotech. and Bioeng, 1982, 24 (2): 365~369.

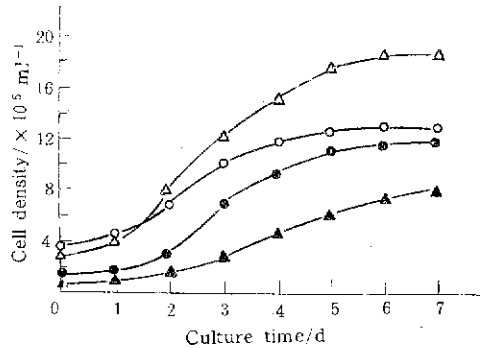


图3 微载体浓度对 BmN 细胞生长的影响

Fig. 3 The influence of Cytodex 3 concentration on BmN cells growth

Cytodex 3/g · L<sup>-1</sup>, Cell inoculum conc. /  $\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 

—○— 3 3.2

—△— 3 1

—●— 5 3.2

—▲— 5 1

## Experimental Research of Microcarrier Culturation of Silkworm BmN Cell

Deng Xiaozhao<sup>1</sup> Zhou Yongchun<sup>2</sup> Zhang Linyuan<sup>1</sup> Diao Zhenyu<sup>1</sup> Cheng Yifeng<sup>3</sup>

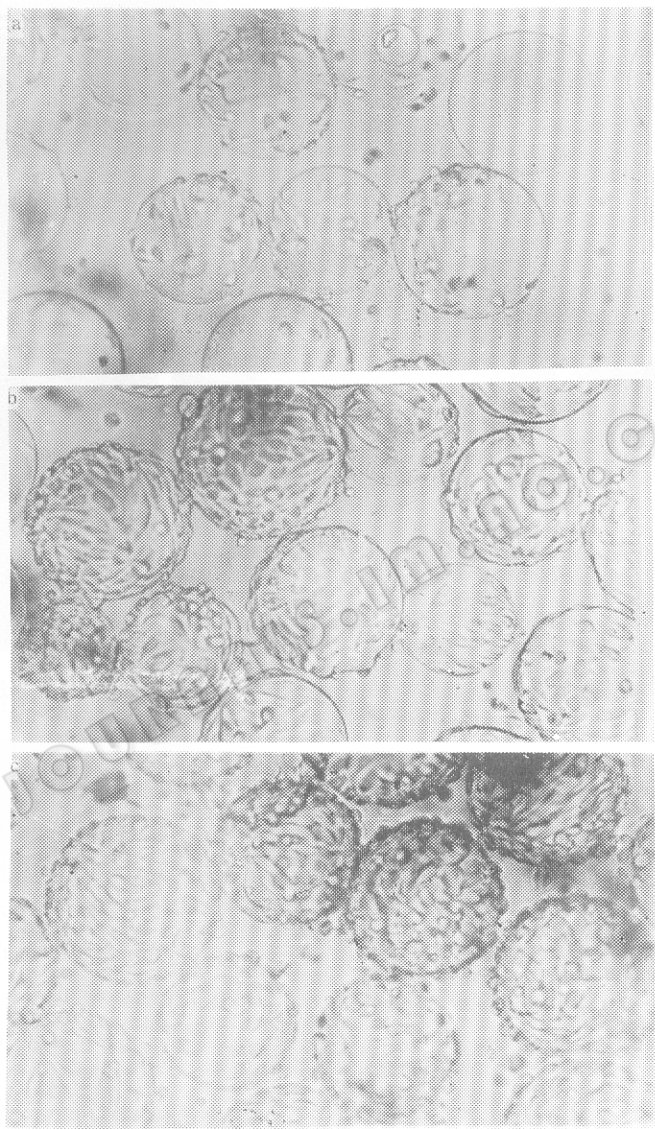
(Molecular Genetics Laboratory, Nanjing Military Medical Research Institute, Nanjing 210002)<sup>1</sup>

(Laboratory of Molecular Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433)<sup>2</sup>

(Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210024)<sup>3</sup>

**Abstract** Distribution of silkworm BmN cell attachment to Cytodex 3 microcarrier was observed and could be described by Poisson distribution equation. From both empirical results and by application of the poisson equation the proportion of empty beads was shown. Influence of cell inoculation concentration and microcarrier concentration on cell growth was studied here. The critical cell number was determined to be 6.4 per microcarrier bead. The minimal cell inoculation concentration was  $1.0 \times 10^5$ /ml when Cytodex 3 microcarrier concentration was 3g/L.

**Key words** Microcarrier, silkworm BmN cell culture



BmN cell on Cytodex 3	No.	Culture time/h
(120X)	a	24h
	b	48h
	c	96h