

Vero 细胞在气升式反应器中的微载体培养

戴晓萍 戚艺华 欧阳藩

(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)

哺乳动物细胞的大规模培养是生产许多医学上重要生物制品的一种主要方法之一⁽¹⁾。很多有工业价值的动物细胞都是贴壁细胞,必须附着在一定的表面上才能生长,微载体培养是一种有效的体系⁽²⁾。用于微载体培养的反应器多为搅拌式反应器,近年来,流化床式反应器越来越引起生物工程学家的重视。有希望用于大规模动物细胞培养的主要是液升和气升式。液升式反应器的优点是培养液可以间接氧饱和,气泡和细胞不直接接触。在气升式流态反应器中,气泡与细胞直接接触,其优点是操作方便,设备简单。本文报道通过气升流态化反应器实现高密度贴壁细胞培养工艺条件的研究。

1 材料和方法

1.1 细胞

Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞),由卫生部北京生物制品研究所提供。

1.2 培养基

199 培养基(Gibco),加 10% 灭活小牛血清,加 100U/ml 青链霉素。

1.3 微载体

Cytodex 1, 购自 Pharmacia LKB 生物技术公司,按常规方法处理。

1.4 细胞计数

采用文献〔4〕的方法。

1.5 葡萄糖分析

采用上海生物制品研究所生产的葡萄糖测定试剂盒分析。

2 气升式反应器的初步设计

内环流中心管气升式反应器主要由 3 个部分组成:气升管、降液区和气液分离器。本文将反应器设计成 200ml 小型内环流中心管气升式反应器。

微载体和培养液的比重分别约为 1.02~1.04 和 1.0~1.01,两者差异甚微,很小的气量就可将微载体悬浮,同时细胞对剪切力敏感,所以操作气量不能太大。本文的冷态实验采用操作气量 $\leq 0.03\text{vvm}$,热态实验采用操作气量 $\leq 0.12\text{vvm}$ 。

在小气量操作时,反应器结构和性能之间的关系不同于在高流速湍流区的情况,确定适当的分布器和反应器整体结构以保证微载体悬浮、消除沉降死区是设计的关键。通过实验初步确定:高径比 H/D 为 3:1;分布器为多层复合膜式,所用材料对细

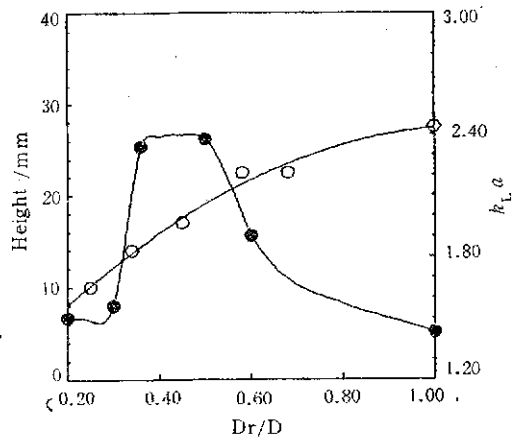


图 1 k_{La} 和泡沫高度随 D_r/D 的变化
—●— k_{La} , —○— 泡沫高度

胞无毒。实验发现,只有当反应器底部为锥形,并且气升管下端与分布器的距离=气体管下端与反应器底部的距离=10~20mm时,极低气量($\leq 0.02\text{vvm}$)下方能完全消除沉降死区。通过测定体积溶氧传递系数, k_{La} 和含血清营养液的泡沫高度确定:气升管和反应器的内径之比 D_r/D 选择为 0.36 (图 1),此时 k_{La} 接近最大,泡层较低。为增强混和性能,增加液体循环速度,适当降低泡层高度,顶部设计为扩大段,以便实现气液分离。

3 气升式反应器中微载体悬浮培养

反应器置于电热恒温培养箱中,通入空气和二氧化碳调节培养液的 pH 值,温度由培养箱自动控制。气升式反应器中微载体悬浮培养的条件和结果见表 1。所用微载体的浓度均为 2g/L 。

表 1 气升式反应器中微载体悬浮培养的条件和结果

批次	接种密度 / $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$	通气量 /vvm	Pluronic F-68 /%	换液量 / $\% \text{d}^{-1}$	最高细胞密度 / $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$
1	2.44	≤ 0.03	0	第二天起 30	4.11
2	1.95	≤ 0.03	0.3	第二天起 30 第五天起 50	10.50
3	2.48	$\leq 0.03 \rightarrow 0.12$	0.3	同上	11.31
4	2.25	≤ 0.03	0.3	第三天起 20	8.10

由表 1 可以得出:(1)无保护剂时直接通气对细胞生长不利。批次 1 是不加保护剂的培养结果,第四天细胞密度为 $4.11 \times 10^5/\text{ml}$,从图 4 (1) 可看出,微载体上细胞数少,脱落较多。说明气泡的产生影响了细胞的贴壁、生长和代谢,新鲜培养液的补充也不能提高细胞密度。

(2)加入保护剂可实现高密度培养。批次 2, 3, 4 均在培养液中加入 0.3% 的 Pluronic F-68,可以保护细胞免受伤害,提高终细胞密度,说明适量 Pluronic F-68 对 Vero 细胞有保护作用。

(3)加入保护剂,操作气量在一定范围内变化对细胞生长无影响。批次 2 和 3 的培养条件仅有操作气量不同。批次 2 的气量是 $\leq 0.03\text{vvm}$,批次 3 是逐日增加,由 $\leq 0.03 \rightarrow 0.06 \rightarrow 0.09 \rightarrow 0.12\text{vvm}$ 。结果表明:两批培养的对数生长期都为第二至第七天,终细胞密度基本接近(图 2)。由图 4 (2) 可见,适当提高操作气量,不会破坏由细胞生长引起的微载体之间的架桥,同时可以降低混和时间。

由于两批培养的细胞接种量略有差别,批次 3 的终细胞密度高于批次 2,可以说明在微载体浓度一

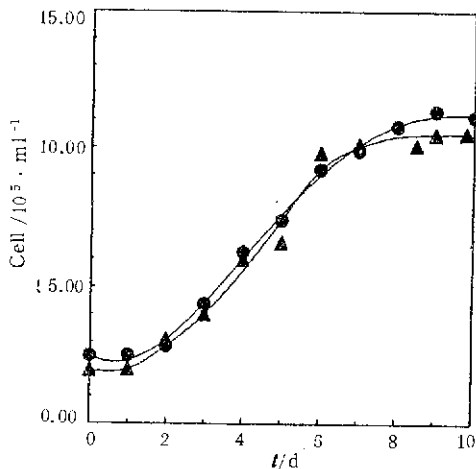


图 2 悬浮培养批次 2 和 3 的结果

—▲—批次 2, —●—批次 3

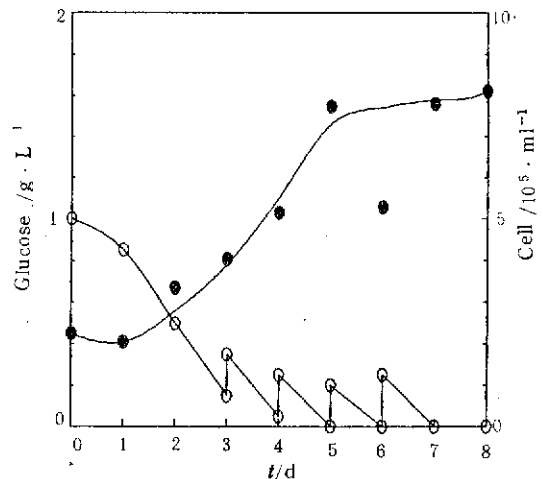


图 3 悬浮培养批次 4 的结果

—○—葡萄糖曲线, —●—细胞曲线

定时,适当提高细胞接种量,有助于终细胞密度的提高。

(4) 培养液的营养条件应满足残糖浓度大于 0。批次 4 (图 3) 中,从第三天起每天换液 20%,到第五天出现营养不足,葡萄糖残糖浓度为 0,无法满足细胞继续生长的需要,终细胞密度为 $8.11 \times 10^5/\text{ml}$,低于批次 2 和 3,细胞皱缩脱落。与营养充足的批次 2 和 3 比较可得到:使用 199 培养液培养 Vero 细胞,残糖控制应该大于 0。

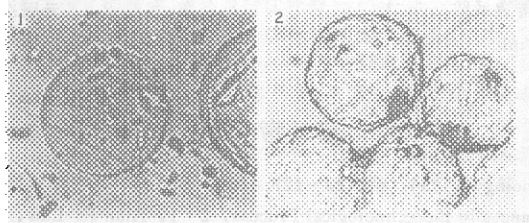


图 4 细胞在微载体上的生长照片

1. 无保护剂时培养 4d 的细胞, 2. 有保护剂时提高操作气量对细胞的影响。放大倍数 10×10

4 Vero 细胞贴壁抑制生长动力学模型

在细胞培养初期,细胞密度只有微小变化,细胞生长速度可以表示为:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad t < t_i \tag{1}$$

细胞进入生长期后,只有周边细胞可以分裂,细胞生长速率可以用下式表示

$$\frac{dx}{dt} = kx_p \quad t \geq t_i \tag{2}$$

周边细胞密度随细胞生长近似遵循二次函数的规律,可以假设:

$$x_p = ax^2 + bx + c \tag{3}$$

经过分析推导⁽⁶⁾可以得到:

$$\begin{cases} \beta = \beta_0 & t < t_i \\ \beta = \frac{\beta_0}{(1 - \beta_0)^{\exp[-K(t - t_i)]} + \beta_0} & t \geq t_i \end{cases} \tag{4}$$

图 5 表明:动力学模型的输出与实验数据基本吻合。

5 结 论

5.1 在气升式反应器中悬浮微载体培养 Vero 细胞,加入适量保护剂,营养供应充足的情况下,细胞可以正常生长至长满微载体表面,操作气量 $\leq 0.12 \text{vvm}$ 时对细胞生长基本无影响,终细胞密度可达到 $1.13 \times 10^6/\text{ml}$ 。

5.2 从周边细胞分裂的生长特点出发,建立了贴壁细胞的贴壁抑制生长动力学模型:

$$\begin{cases} \beta = \beta_0 & t < t_i \\ \beta = \frac{\beta_0}{(1 - \beta_0)^{\exp[-K(t - t_i)]} + \beta_0} & t \geq t_i \end{cases}$$

该模型能够模拟和预测微载体细胞的生长。

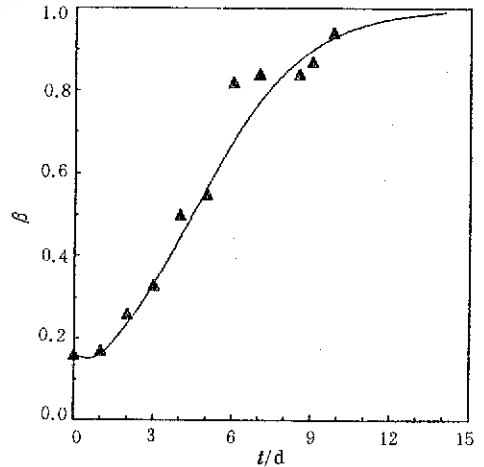


图 5 动力学模型的输出与实验数据的对照

▲ 实验数据, — 模型输出

符 号 说 明

a, b, c	常数	x_0	接种细胞密度/ ml^{-1}
D_r/D	气升管和反应器内径之比	x_p	周边细胞密度/ ml^{-1}
H/D	反应器高径比	t	培养时间/d
K	模型调节参数	t_d	延迟时间/d
k_{La}	体积溶氧传递系数/ min^{-1}	β	无因次化细胞密度
x	细胞密度/ ml^{-1}	β_0	无因次化细胞接种密度

参 考 文 献

- [1] Mizrahi A. *Bio/technology*, 1986, 4: 123~127.
- [2] Reuveny S. in: *Advances in Biotechnological Process*, 2: 1, Alan R. Liss, INC., New York, 1983.
- [3] Kruse P F, Patterson M K, in: *Tissue Culture: Methods and Application*, New York: Academic Press, 1973, p. 375.
- [4] 戴晓萍, 戚艺华, 欧阳藩. 第二届全国青年化学工程学术研讨会论文集, 广州: 1993, p. 485.

Vero Cell Culture on Microcarriers in a Designed Air-lift Bioreactor

Dai Xiaoping Qi Yihua Ouyang Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering,
Institute of Chemical Metallurgy, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A 200ml air-lift bioreactor was designed for microcarrier culture according to its characteristics. Vero cells were cultivated on microcarriers in the designed reactor. It was found that sparging could induce cell injury in the culture, and cells could be protected by supplementing the medium with 0.3% Pluronic F-68, resulting in significant increasing the final cell density. There was no different effect on cell growth in the adopted ventilation range, less than or equal to 0.12vvm. The final cell density could reach $1.13 \times 10^6/\text{ml}$ using 2g/L Cytodex 1 under appropriate conditions in this study. A contact-inhibited growth model was established to describe the growth kinetics for anchorage-dependent cells.

Key words Air-lift bioreactor, Vero cells, microcarriers