

动物细胞在鼓泡式生物反应器中的死亡速率

谭文松 戴干策 陈志宏 陈因良

(华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

摘要 通过实验测定,证明生物反应器中细胞死亡速率与气体鼓泡速率成正比而与反应器体积成反比。实验发现气泡大小对细胞死亡速率具有两种作用,一种作用在于影响气泡表面积生成速率;另一种作用则在于影响细胞在气泡表面的吸附程度,其最佳直径为5mm左右。血清和 Pluronic F68 能显著降低细胞死亡速率,当 Pluronic F68 浓度达到 0.1% 时, k_d 趋于零。所有这些实验结果均与前文提出的生物反应器设计模型具有很好的一致性。

关键词 鼓泡式生物反应器, 动物细胞培养, 细胞死亡速率, 血清, Pluronic F68

在上文^[1]中,作者在动物细胞破损机理基础上建立了生物反应器的设计模型及其保证细胞生长的条件,并且从理论上对动物细胞培养生物反应器设计和操作的主要问题作了深入分析和讨论,为生物反应器选型、设计和操作参数的优化选择指明了方向。本文主要通过实验来研究细胞死亡速率与鼓泡式生物反应器设计和操作参数、培养基组成之间的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞和培养基

1.1.1 细胞:实验所用的细胞株为分泌抗人小细胞肺癌单克隆抗体 IgG_{2a} 的鼠-鼠杂交瘤细胞 2F7,由上海市肿瘤研究所建株并提供。

1.1.2 无血清培养基:无血清培养基(SFM)由两部分组成,一部分为 DMEM/F12 (1:1)混合培养基:(D8900, Sigma Chemical Co, USA),另一部分是由胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠等组成的无血清添加剂(SCI8910,上海市肿瘤研究所)。

1.1.3 添加剂:新生小牛血清,由华东理工大学生化工程研究所细胞培养技术研究室制备。非离子表面活性剂 Pluronic F68 (BASF, Ludwigshafen, Germany) 在使用前将 Pluronic 配成 10% (W/V) 的水溶液。

1.2 细胞培养

用于鼓泡试验的细胞悬浮液取自 1.5L CelliGen 生物反应器系统 (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA),实际工作体积为 1.3L。CelliGen 生物反应器的操作条件为: pH7.25, 溶氧 (DO) 60% 空气饱和度, 温度 36.8℃, 转速 60r/min, 并且自始至终采用表面通气, 培养基为无血清培养基^[2]。pH 由气体混合物 (空气、O₂、N₂ 和 CO₂) 中的 CO₂ 气体或加 5.6% NaHCO₃ 溶液进行控制。为了确保试验所用的细胞处于相

近的生理状态以获得可靠的实验结果, CelliGen 生物反应器采用间歇换液的半连续操作, 稀释率 $0.55d^{-1}$, 将生长在相同对数生长期的细胞取出以作试验用, 取出的细胞悬浮液中活细胞密度为 $1.5 \sim 1.55 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$, 细胞活性 $82\% \sim 85\%$ 。

由于取自 CelliGen 生物反应器的细胞悬浮液不含血清和 Pluronic F68, 因此当需要考察血清和 Pluronic F68 对细胞死亡速率的影响时, 在试验前直接将血清或 Pluronic F68 加入到取出的细胞悬浮液中至所需浓度即可。

1.3 鼓泡试验

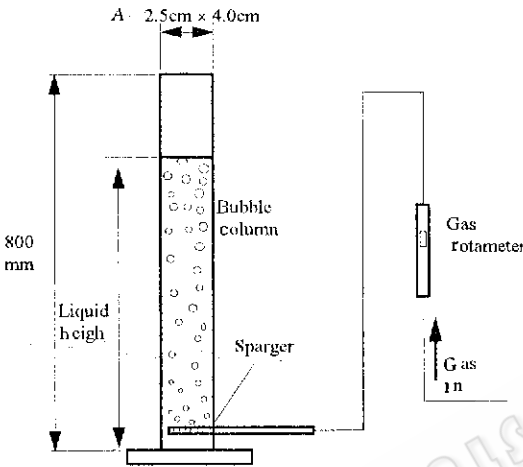


图 1 用于鼓泡试验的实验装置

Fig. 1 Experimental apparatus for gas sparging

1.3.1 鼓泡柱:鼓泡柱是气体鼓泡式生物反应器中最为简单的一种, 因此采用鼓泡柱研究气泡大小、气体流量、反应器体积、血清和 Pluronic F68 浓度对细胞死亡速率的影响。实验装置如图 1 所示, 鼓泡柱由有机玻璃制作而成, 气体分布器为一开孔的不锈钢管, 内径 2mm, 外径 3mm, 根据试验需要可以选用不同出口孔径的气体分布器, 其孔径 (mm) (孔数): 0.1 (15)、0.25 (10)、0.5 (5)、1.0 (3) 和 1.6 (2)。鼓泡所用的气体为空气, 其流量由气体流量计控制, 根据试验需要选用不同的气体流量, 其范围为 $35 \sim 500 ml \cdot min^{-1}$ 。试验选用的细胞悬浮液体积分别为 200、300、400、500、600 和 700ml。鼓泡柱中气泡大小由光电毛细管探头法测定^[3]。

1.3.2 细胞计数:用台盼蓝染色法和血球计数板确定活细胞密度和细胞活性, 计数不少于重复 3 次。

1.3.3 细胞死亡速率估计:在鼓泡试验过程中, 由于时间较短, 细胞生长可以忽略不计。假设细胞死亡速率遵循一级反应动力学规律, 即: $dC/dt = -k_d C$ (1)

一级细胞死亡速率常数 k_d 可由积分上式予以估计: $-\ln(C_t/C_0) = k_d t$ (2)

式中 C_t 和 C_0 分别是试验时间 $t=t$ 和 $t=0$ 时的活细胞密度/ $\cdot ml^{-1}$ 。

1.3.4 修正系数 f :测定了一级细胞死亡速率常数 k_d 之后, 可用前文^[1]式 (6) 估计修正系数 f 的大小。由于气泡大小对细胞在气泡表面的吸附具有重要影响, 小气泡时细胞在气泡表面覆盖率大, 吸附系数 α 大。但为简单起见, 我们取 $\alpha = 9.87 \times 10^4 cm^4$ ^[4], 该 α 对应于活细胞密度 $1.53 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$, 气泡直径 2.2~2.6mm, 而将气泡大小、气泡间相互作用及反应器操作条件等对细胞在气泡表面吸附的影响归结到修正系数 f 中去, 显然, $f\alpha$ 是鼓泡柱中细胞在气泡表面吸附的实际吸附系数, 所有被气泡吸附的细胞将被气泡兼并、破裂等产生的剪切力所破损而死亡。

2 结果与讨论

当气泡经过细胞悬浮液主体时，活细胞和死细胞都将在气泡表面发生吸附，然后被气泡带入泡沫层，其中活细胞被液膜排液、气泡聚并和破裂等过程产生的流体剪切力所破损，发现细胞活性在试验过程中没有下降反而略有上升，说明细胞死亡后没能回到培养基主体，这一实验现象说明细胞破损发生在泡沫上部。

前面曾假设细胞死亡遵循一级反应动力学规律，结果证明了这一假设，试验过程中活细胞密度变化的负对数 $-\ln(C_t/C_0)$ 与鼓泡时间 t 之间具有良好的线性关系，说明细胞死亡速率常数 k_d 在整个试验过程中可作为常数处理。

2.1 气泡大小对细胞死亡速率的影响

在一定气体鼓泡速率和反应器体积下，还过改变气体分布器的出口孔径可以获得不同的气泡大小。生物反应器中气泡大小对细胞破损具有两种作用：(1) 气泡大小对生成气泡表面积的影响，这已由生物反应器设计模型中 k_d 和 d_b 之间的反比关系所表示（前文^[1]式(6)），在相同气体鼓泡速率下，气泡直径减小将使生成的气泡表面积大增，从而加剧细胞破损，提高细胞死亡速率；(2) 气泡大小对流体绕气泡流动的影响，这是因为细胞在气泡表面吸附还是脱离气泡表面直接决定于运动气泡周围的流体力学条件，主要是流体粘性曳力对细胞的作用。当细胞吸附在气泡表面时，作用于细胞的有两个力，一个是亲和力，它将使气泡与细胞之间发生粘附，定大小由系统物性决定；另一个就是流体对细胞作用的粘性力，它将使细胞脱离气泡表面，其大小直接与气泡直径有关。因此气泡直径将影响亲和力和粘性力之间的相对大小，进而影响细胞在气泡表面的吸附程度，在设计模型中主要反映在气泡大小对修正系数 f 的影响上。

实验结果证实了气泡大小对细胞破损的这两种作用，如图 2 所示。细胞死亡速率常数 k_d 和修正系数 f 均随气泡直径增加而减小，当气泡直径达到 5mm 左右时， k_d 最小，表明该气泡大小对细胞具有最小的破损作用。然而，气泡直径的进一步增加反而引起了细胞死亡速率的提高。虽然气泡直径增加减小了气泡表面积的生成速率，使细胞死亡速率下降，但是另一方面，气泡直径过大，部分大气泡在上升过程中将发生分裂，影响细胞破损，尤为重要是在大气泡尾部流体将发生边界层分离和尾流现象，使得细胞在气泡尾部的夹带上升为导致细胞损失的主要因素，其机理与鼓泡塔和流化床中的颗粒夹带相同，从而加剧了细胞破损。图中所示当气泡直径从 5mm 增加到 6.5mm 时， f 值显著提高就表明了这种气泡尾部细胞夹带的严重性。

2.2 气体鼓泡速率对细胞死亡速率的影响

图 3 所示为不同气体鼓泡速率下细胞死亡速率常数的实验结果，实验证明细胞死亡

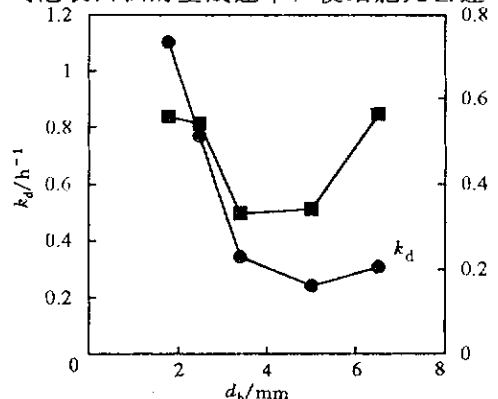


图 2 气泡大小对细胞死亡速率常数的影响
Fig. 2 Effects of bubble size on cell death rate constant in a bubble column
Gas sparging rate $F=500\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
Bubble column volume $V=500\text{ml}$

速率与气体鼓泡速率成正比。对于一定大小的气泡，气体流量增加对细胞破损作用的加剧主要归因对于气泡表面积生成速率的提高，与设计模型所预示的完全一致。同时也证明小气泡对细胞的破损作用更为严重。为便于分析和比较，用气泡表面积生成速率对细胞死亡速率常数进行了标绘，结果示于图 4。由图可见，即使在相同气泡表面积生成速率下，小气泡造成的细胞死亡速率也远大于大气泡，其原因已在前面作了分析。模型修正系数 f 反映了这种气泡大小对细胞破损的不同影响，如图 5 所示。

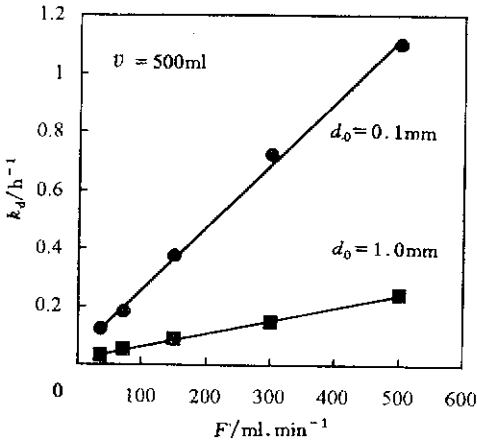


图 3 气体鼓泡速率对细胞死亡速率常数的影响
Fig. 3 Effect of gas sparging rate on cell death rate constant
 d_0 is the nozzle diameter of the sparger)

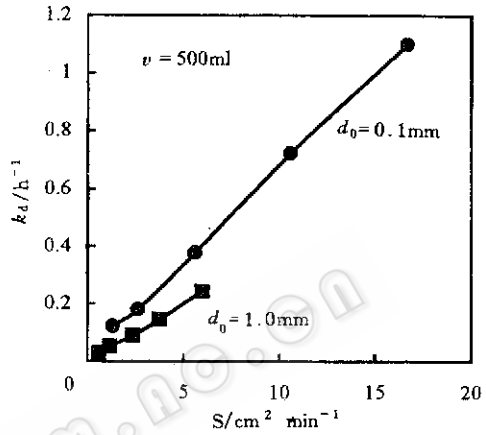


图 4 以气泡表面积生成速率标绘的细胞死亡速率常数
Fig. 4 Plot of the cell death rate constant versus the bubble surface area production rate

图 5 还同时表示了气体鼓泡速率对修正系数的影响，由图可见，对给定的气泡大小， f 在气体流量的较大范围内基本上保持常数，表明气体鼓泡速率对细胞在气泡表面的吸附影响不大。然而，当气体鼓泡速率小于某一临界值时， f 值随气体流量减小而显著增加，造成这一现象的主要原因可能是气泡间的相互作用所致。这是因为气泡周围流场的流体力学特性将受到其相邻气泡的影响，当气体流量较小时，气泡间相距较远，气泡运动接近单个气泡的情况，不利于细胞脱离气泡表面，从而加剧细胞在气泡表面的吸附而使细胞死亡速率有所提高。因此在进行生物反应器设计时必须保证气泡间有充分的相互作用，使细胞在气泡表面的吸附降至

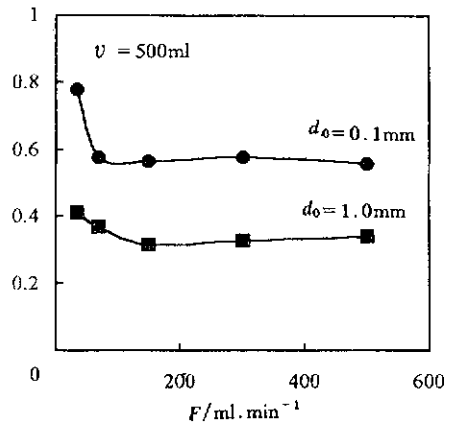


图 5 气体鼓泡速率对修正系数 f 的影响
Fig. 5 Effect of the gas sparging rate on the value of correction factor f

最低。当以表观气速作为判据时，气升式反应器提升筒或鼓泡柱截面上的表观气速必须大于气体鼓泡速率影响 f 的临界值，对于孔径分别为 0.1mm 和 1.0mm 的气体分布器，临界表观气速 U_{cr} 分别为 0.17 和 0.25 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。当气速大于该临界值时，它对细胞在气泡

表面的吸附程度没有影响。

2.3 反应器主要结构参数对细胞死亡速率的影响

当气体鼓泡速率和气体分布器孔径一定时, 生成的气泡大小也将一定, 由设计模型^[1]可知, 细胞死亡速率与反应器体积成反比, 如图 6 所示。文献 [5, 6] 报道增加鼓泡柱高度可以减小细胞死亡速率, 事实上, 当气体流量、气泡大小和反应器截面积 (或直径) 为定值时, 细胞死亡速率与鼓泡柱高度的倒数成正比, 但这些学者将高度变化对细胞破损的影响归结为高径比的影响, 认为高径比增加使反应器中造成细胞破损的体积分率减小, 因此他们建议采用较大的高径比 (>10)。然而, 我

们的研究表明高度的变化引起的是反应器体积的变化, 是增加了细胞悬浮液体积所致, 若增加反应器截面积 (或直径) 将有同样效果。这已被 van der Pol 等人^[7]的实验所证实。因此反应器高径比的选择更应从强化传质和混合角度予以考虑。

2.4 培养基组成对细胞死亡速率的影响

血清和 Pluronic F68 对细胞死亡速率的影响在设计模型中主要反映在吸附系数 α 上, 已经证明^[4]它们能有效地阻止细胞在气泡表面的吸附。我们在鼓泡柱中实验测定了血清和 Pluronic F68 对细胞死亡速率的影响, 结果示于图 7。由图可见, 实验结果与设计模型吻合很好, 细胞死亡速率常数 k_d 随血清和 Pluronic F68 浓度的提高而下降, 表明它们

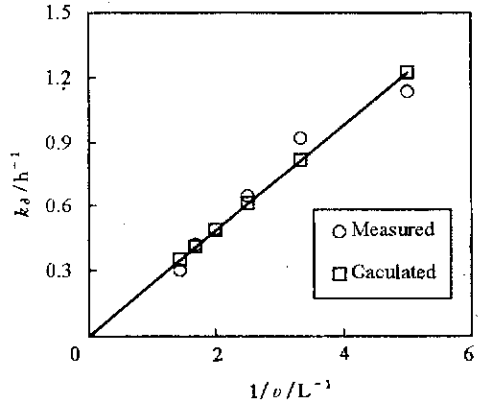


图 6 细胞死亡速率常数与反应器体积的关系
Fig. 6 Correlation between the cell death rate constant and bioreactor volume

Experimental conditions are gas sparging rate of $300\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ and average bubble diameter of 2.4mm

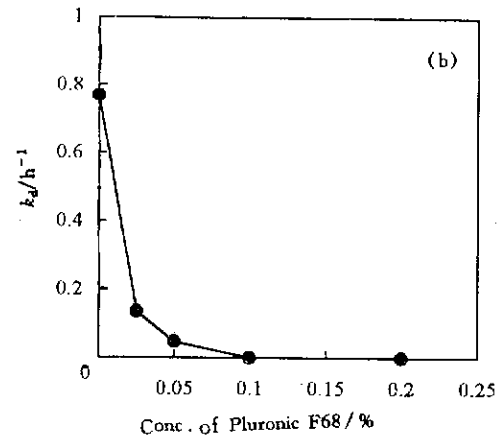
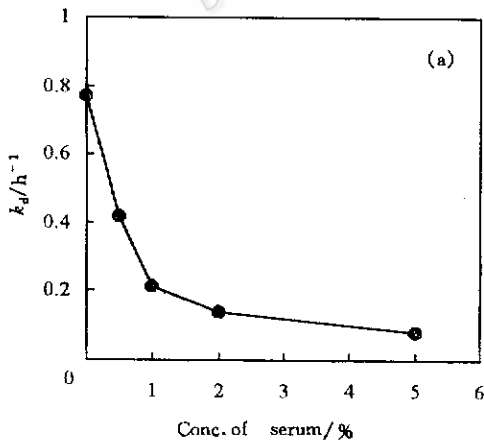


图 7 培养基组成对细胞死亡速率的影响

Fig. 7 Effects of media formulations on cell death rate

Experimental conditions are gas sparging rate of $500\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, bioreactor volume 500ml , and nozzle diameter (0.25mm) (a) the effect of serum concentrations; (b) the effect of PLuronic F68 concentrations.

对细胞均有十分显著的保护作用, 实验观察发现随细胞悬浮液中血清和 Pluronic F68 浓度的提高, 泡沫区的死细胞及细胞碎片明显减少甚至完全消失, 因此很显然, 它们的保护作用是阻止细胞在气泡表面吸附的结果。由图 7 (a) 和 (b) 可以发现, Pluronic F68 对细胞的保护作用明显优于血清, 在其浓度达到 0.1% 时, 细胞死亡速率常数降为零, 表明此时 Pluronic F68 对细胞提供了十分完全的保护作用。

3 结 论

上述结果充分证明前文^[1]提出的生物反应器设计模型较好地反映了反应器设计和操作参数、培养基组成对细胞死亡速率的影响, 完全可以指导气升式和鼓泡式生物反应器的设计和操作以及培养基组成的优化, 以使细胞死亡速率降至最低。本文研究还发现, 气泡大小对细胞死亡速率的影响来自两种作用, 一种作用在于影响气泡表面积生成速率; 另一种作用则在于影响细胞在气泡表面的吸附程度, 其最佳直径为 5mm 左右。

参 考 文 献

- (1) 谭文松, 戴干策, 陈因良. 生物工程学报, 1998, 12 (2): 152~157.
- (2) Tan W S, Chen Y L, Dai G C. In: Nienow, A. W ed, Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics, BHR Group Series No. 5, London: Mechanical Engineering Publications, 1993, pp. 153~161.
- (3) 高教岳, 江虹, 於兵等. 化工学报, 1990, 31 (1): 111~117.
- (4) Tan W S, Dai G C, Chen Y L. Cytotechnology, 1994, 15: 321~328.
- (5) Tramper J, Smit D, Straatman J *et al.* Bioproc Eng, 1988, 3: 37~41.
- (6) Handa-Corrigan A, Emery A N, Spier R E. Enzyme Microb Technol, 1989, 11: 230~235.
- (7) Van der PolL, Bakker W A M, Tramper J. Biotechnol Bieng, 1992, 40: 179~182.

Animal Cell Death Rates in Sparged Bioreactors

Tan Wensong Dai Gance Chen Zhihong Chen Yinliang

(Research Institute of Biochemical Engineering

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract The experimental results obtained from this work demonstrated that the cell death rate in sparged bioreactors is proportional to the gas sparging rate and inversely proportional to the bioreactor volume. It was found that the bubble size has two effects on cell death rate. The one is to affect the bubble surface area production rate and the other is to influence the adsorptivity of the cells on bubble surface. The optimum bubble diameter at which the cell death rate reaches minimum is about 5mm. The effect of media formulations on cell damage was also investigated. Both the serum and Pluronic F68 were found to reduce the cell death rate significantly. And as the concentration of Pluronic F68 increases to 0.1%, the value of k_d drops to zero. All the experimental data are in excellent agreement with the bioreactor design model developed in the previous paper.

Key words Sparged bioreactors, animal cell cultures, cell death rate, serum, Pluronic F68