

气升式生物反应器 在杂交瘤细胞培养中的应用

谭文松 陆 健 张元兴

〈华东理工大学生化工程研究所 上海 200237〉

摘 要 在前述研究工作基础上,设计开发了10L规模的动物细胞培养用气升式生物反应器。应用该生物反应器悬浮培养杂交瘤细胞,通过平行试验,考察了该反应器设计的合理性和可靠性。结果显示该反应器不存在限制细胞生长、代谢和产物生成的因素,而且细胞破损被彻底消除,表明该气升式生物反应器给细胞生长、代谢和产物生成提供了理想的培养环境,其设计是成功的。

关键词 气升式生物反应器,杂交瘤细胞,细胞培养

自从1979年Katinger等^[1]首次报道了应用气升式生物反应器成功地进行动物细胞的悬浮培养以来,气升式生物反应器在动物细胞培养技术中的应用一直引起了人们的极大兴趣。在该类生物反应器中,气体既为细胞生长提供足够的溶氧,又为细胞提供混合均匀的培养环境,其主要特点是流场分布均匀、气液传质性能好、结构简单、无机械搅拌有利于无菌控制等,因此,气升式生物反应器最适宜于动物细胞大规模培养过程。英国Celltech公司是应用气升式生物反应器进行动物细胞大规模培养的成功范例,该公司的Birch等人^[2]于1985年报道了应用100L规模的气升式生物反应器进行大规模杂交瘤细胞培养。据称目前该公司已设计开发了10000L规模的气升式生物反应器用于各类单抗的大量生产^[3]。国内生物技术的发展及其产业化,迫切要求研制大规模生物反应器与之配套。为此,作者从认识细胞破损现象^[4~7]出发,结合气液相局部流体力学特性及流场分布等研究^[8],以揭示和掌握生物反应器的设计放大规律,然后通过过程优化选择合适的结构参数和控制策略,设计制造了国内第一台10L规模的气升式生物反应器,用于培养哺乳动物细胞、昆虫细胞等生产各类生物制品。本文主要报道应用该气升式生物反应器培养杂交瘤细胞,并通过平行试验,对试验结果与理想培养环境下的1.5L CelliGen生物反应器培养实验结果作出比较和分析,以考察气升式生物反应器的设计是否合理、正确和可靠。

1 材料与方法

1.1 细胞和培养基

1.1.1 细胞:实验所用的细胞株为鼠-鼠杂交瘤细胞WuT3,由卫生部武汉生物制品研究所提供,该杂交瘤细胞分泌抗人T淋巴细胞的单克隆抗体IgG_{2a},用于治疗肾移植排斥反应。

本文部分工作获上海市科学技术发展基金和“八五”国家科技攻关计划的资助。
本文于1995年1月24日收到。

1.1.2 培养基:基础培养基为 RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 配制时加碳酸氢钠 $2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 pH 控制的缓冲剂, 分别补加葡萄糖和谷氨酰胺 1 和 $0.3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 初始浓度分别为 16.7 和 $4.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加入青霉素和链霉素各 100u/ml。新生小牛血清 5% (NBCS, 华东理工大学生化工程研究所细胞培养技术研究室)。

用于气升式生物反应器培养杂交瘤细胞的培养基在基础培养基中再补加 0.2% Pluronic F68 (BASF, Ludwigshafen, Germany) 和 0.02% 聚硅烷消泡剂 A (A5633, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 以抑制细胞破损和过多的泡沫生成, 当其浓度达到 0.05% 时尚未发现对细胞生长有任何毒性作用。

1.2 细胞种子培养

在 1.5L CelliGen 生物反应器系统 (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) 中进行, 该反应器的操作条件为: pH7.00, 溶氧 (DO) 50% 空气饱和度, 温度 36.8°C , 机械搅拌转速 60r/min, 并且自始至终采用表面通气, 其中 pH 和 DO 由 4 气体 (空气、 N_2 、 O_2 和 CO_2) 自动控制在设定值。当杂交瘤细胞生长处于对数生长中期, 活细胞密度达到 $8.7 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ (活性 88%) 时, 取出约 1150ml 细胞悬浮液用于接种气升式生物反应器, 然后再加入相同体积的新鲜培养基至 CelliGen 生物反应器中继续培养, 作为气升式生物反应器的对照试验。

1.3 生物反应器培养

1.3.1 对照试验:选用 CelliGen 生物反应器作为对照试验, 其操作条件如上所述。在这种培养环境下细胞生长、代谢和产物生成将主要受其本身的生理特性所制约, 对照试验所得的结果是理想的, 因此可用于比较和评判气升式生物反应器所得的实验结果及其优劣。

1.3.2 气升式生物反应器:气升式生物反应器为内循环式, 由不锈钢制作而成, 如图 1 所示。气体由置于提升筒下部的气体分布器鼓泡进入反应器, 根据流体流动局部流场的测定结果, 气体分布器选用“+”字形结构, 以便使气体和流场分布均匀, 气体分布器的出口孔径为 1mm, 孔数 16, 由此生成的气泡直径约为 5mm。选用这种气泡直径, 首先是使因细胞破损而导致的细胞死亡速率最小; 其次是为了加快泡沫的破泡速率, 防止过多泡沫在液面上聚集。另外, 为了有利于气液分离和降低泡沫层高度, 反应器上部的气液分离段直径放大 50%, 这样, 随流体进入环隙降液区的气泡可以忽略不计。

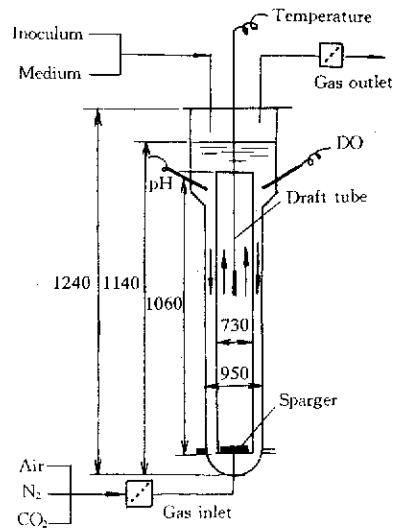


图 1 10L 气升式生物反应器及杂交瘤细胞培养系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the 10L airlift bioreactor and hybridoma cell culture system
Dimension: mm

操作参数(温度、pH、DO、压力)控制采用先进的可编程自动控制系统, pH和溶氧(DO)的控制采用3气体关联控制模式, 通过调节 N_2 、 CO_2 与空气的配比, 完成对pH和DO的关联控制。加热和冷却由夹套循环水完成。在控制系统中选用培养液温度为被控参数, 夹套循环水为被控对象, 采用PD控制规律, 实验证明其控制误差 $\leq \pm 0.1^\circ C$ 。

1.3.3 气升式生物反应器中细胞培养:反应器的工作体积为9L, 在杂交瘤细胞培养过程中其操作pH、溶氧(DO)温度同种子培养条件, 气体鼓泡速率 $300 \sim 400 ml \cdot min^{-1}$ 。细胞接种后采用间歇培养方式, 考察细胞生长、代谢和产物分泌情况并与对照试验比较。

1.4 分析测定方法

1.4.1 细胞计数:每12h取样, 用血球计数板和台盼蓝染色法确定活细胞密度和细胞活性(活细胞分率), 计数重复3次。样品经细胞计数后离心, 收取上清置于 $-30^\circ C$ 低温保存, 以备其它分析用。

1.4.2 营养物和代谢副产物测定:培养上清中葡萄糖浓度由葡萄糖氧化酶-过氧化物酶终点比色法测定, 试剂盒购自卫生部上海生物制品研究所。乳酸浓度由乳酸脱氢酶(LDH)法测定, 培养上清中氨(或铵离子)的浓度采用尿素氮测定试剂盒(卫生部上海生物制品研究所)测定。测定时不使用脲酶, 而且改用 $5 mmol \cdot L^{-1} NH_4Cl$ 作为标准品, 其余操作遵照试剂盒使用说明书进行。

1.4.3 单克隆抗体测定:培养上清中单克隆抗体采用夹层酶联免疫吸附测定法(Sandwich type ELISA), 首先加入抗原(人IgG)包盖多孔板的孔表面, 然后加入含有鼠抗人目标单抗的上清, 使目标单抗与人IgG结合。加入酪蛋白溶液以封闭剩下的结合位点, 然后加入过氧化物酶分子标记的羊抗鼠IgG, 作为第三层去结合鼠单抗, 最后加入柠檬酸溶液形成第四层, 它将与过氧化物酶分子发生反应出现黄色, 在酶标仪的492nm波长处读取光密度值。在同一块多孔板上对标准品作系列稀释, 以作出标准曲线, 根据读得的光密度值从标准曲线上查取该孔中的单抗浓度再乘以稀释倍数(如200、400倍等)即得样品中的单抗浓度。最后求取平均值。主要试剂购自美国Sigma公司。

2 结 果

2.1 细胞生长

杂交瘤细胞WuT3在两台生物反应器中生长的实验结果示于图2。在CelliGen生物反应器中杂交瘤细胞的初始浓度为 $1.6 \times 10^5 ml^{-1}$, 气升式生物反应器中的活细胞初始浓度为 $1.1 \times 10^5 ml^{-1}$, 细胞活性均为88%, 由图2可见, 随着细胞生长, 活性同时上升, 在对数生长期细胞活性大于90%, 而且气升式反应器中的细胞活性还略高于CelliGen反应器。就细胞生长而言, 两台反应器的实

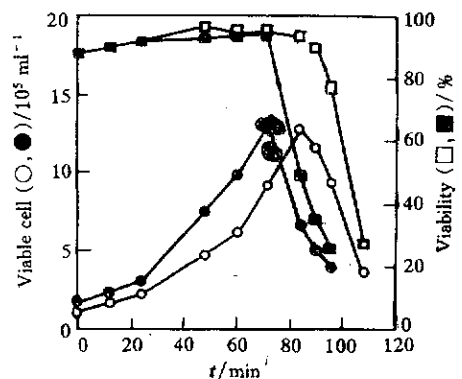


图2 杂交瘤细胞在两台生物反应器中培养试验所得细胞生长实验结果的比较

Fig. 2 Comparison of experimental results of hybridoma cell growth in the two bioreactors. CelliGen: open symbols; air-lift: closed symbols

验结果没有明显差别,只是因气升式反应器的细胞接种密度相对较低,致使细胞生长较 CelliGen 反应器滞后了一段时间(约 12h)。在对数生长期,杂交瘤细胞在 CelliGen 反应器中的比生长速率为 0.0293h^{-1} ,在气升式反应器中的比生长速率为 0.0292h^{-1} ,两者相等,所得最大活细胞密度也基本相同,CelliGen 反应器的最大活细胞密度为 $13.1 \times 10^5\text{ml}^{-1}$,气升式反应器的最大活细胞密度为 $12.8 \times 10^5\text{ml}^{-1}$ 。对数生长期后,细胞密度和活性急剧下降,经过 24h 大部分细胞已经死亡,两台反应器的实验结果一致。

2.2 细胞代谢

在两台反应器中间歇培养时杂交瘤细胞代谢的实验结果示于图 3。由图可见,葡萄糖浓度在对数生长期急剧下降,而乳酸和氨浓度则迅速上升,说明杂交瘤细胞在对数生长期代谢活性很高。对实验结果进行比较可以发现,除了与细胞生长具有相同滞后现象外,杂交瘤细胞在 CelliGen 和气升式反应器中具有相同的代谢特性,葡萄糖消耗以及乳酸和氨的生成主要发生在对数生长期,在对数生长期结束时,葡萄糖浓度趋于零,而乳酸和氨浓度趋近最大值。上述研究结果表明,影响细胞生长、代谢的主要是生理因素,而不是生物反应器的物理因素。因此,要实现杂交瘤细胞的高密度培养,尚有待于详细深入地研究营养物质、代谢副产物以

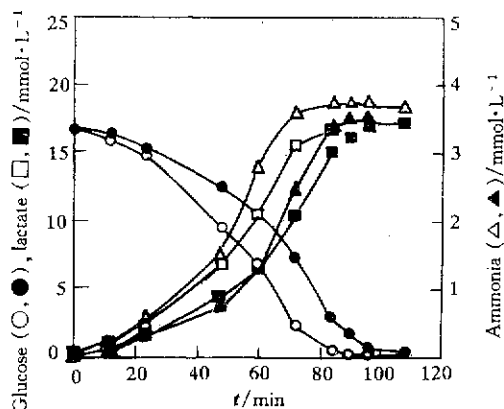


图 3 杂交瘤细胞代谢实验结果

Fig. 3 Experimental results of hybridoma cell metabolism

Legend are the same at Fig. 1

及细胞生理环境对细胞生长、代谢的影响,在此基础上才能采取正确有效的调控手段以改善细胞的生理行为。

2.3 单抗生成

图 4 所示为两种反应器中杂交瘤细胞的单抗生成曲线,由图可见,由于细胞接种密度的差别,杂交瘤细胞在气升式生物反应器中的单抗分泌曲线要比 CelliGen 生物反应器滞后约 12h,但其变化趋势及最终达到的单抗浓度却非常一致。与许多杂交瘤细胞的单抗分泌特性相似,WuT3 杂交瘤细胞的单抗分泌与其生长关系不大,单抗浓度在对数生长期和细胞衰亡期持续上升。在培养过程结束时,培养上清中的单抗浓度达到 $45\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

通过对杂交瘤细胞 WuT3 在两台反应器中间歇培养的平行实验研究,证明我们对气升式生物反应器的设计是成功的,原来碰到的使鼓泡式生物反应器难以设计和放大的动物细胞

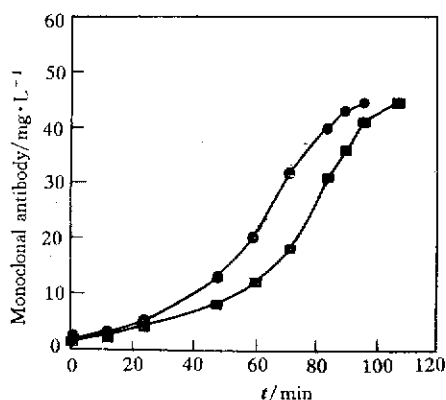


图 4 杂交瘤细胞在 CelliGen (●) 和气升式 (□) 生物反应器中的单抗生成曲线

Fig. 1 Curves of monoclonal antibody formation of the hybridoma cells cultured in CelliGen (●) and airlift (□) bioreactors

易损问题在该反应器中已获解决, 实验结果与理想培养环境的 CelliGen 生物反应器一致, 说明气升式生物反应器不存在限制细胞生长的因素, 它给细胞提供的是理想的培养环境。

4 讨 论

生物反应器的设计是否正确合理, 关键要看它是否存在限制细胞生长的因素, 上述实验结果充分证明了该气升式生物反应器设计的合理性。由于我们对气升式生物反应器的研究是从其关键问题入手, 通过对生物反应器中动物细胞破损机理的研究, 揭示了如何通过生物反应器的设计、培养基组成的优化来防止细胞破损的发生, 然后结合生物反应器传递与混合特性研究, 认识和掌握气升式生物反应器的设计和放大规律。因此, 在这些研究工作基础上, 我们已有能力和把握将气升式生物反应器放大到更大的规模。

另一个问题是我们设计的气升式生物反应器能否支持动物细胞的高密度培养, 回答是肯定的, 通过反应器参数和培养基组成的优化成功地解决了反应器中的细胞易损问题, 其次是设计的气升式生物反应器具有较高的传质速率, K_{La} 大于 10h^{-1} , 足以满足 10^7ml^{-1} 以上的细胞生长对传质和混合的要求。

参 考 文 献

- (1) Katinger H W, D, Scheirer W, Kromer E. *Ger Chem Eng*, 1979, 2: 31~38.
- (2) Birch J R, Boraston R, Wood L. *Trends Biotechnol*, 1985, 3: 162~166.
- (3) Birch J R, Lambert K, Thompson P W *et al.* In: Lydersen B K. *Large Scale Cell Culture Technology*, New York: Hanser Publishers, 1987. pp. 1~20.
- (4) Tan W S, Chen Y L, Dai G C. In: Nienow A W, *Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*, BHR Group Series No. 5, London: Mechanical Engineering Publications, 1993, 153~161.
- (5) Tan W S, Dai G C, Chen Y L. *Cytotechnology*, 1994, 15: 321~328.
- (6) 谭文松, 戴干策, 陈因良. *生物工程学报*, 1996, 12 (2): 152~157.
- (7) 谭文松, 戴干策, 陈志宏等. *生物工程学报*, 1996, 12 (4): 471~476
- (8) Tan W S, Dai G C, Ye W *et al.* *Chem Eng J*, 1995, 57: B31~36.

Application of the Airlift Bioreactor for Hybridoma Cell Cultures

Tan Wensong Lu Jian Zhang Yuanxing

(Research Institute of Biochemical Engineering

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract On the basis of the previous work, a 10 liter scale airlift bioreactor for animal cell cultures has been designed and developed. Here, the experimental results of the hybridoma cells cultured in suspension in this bioreactor have been reported. By the tests run in parallel, the reasonableness and reliability of the airlift bioreactor design was investigated at the same time compared with the performance of the CelliGen bioreactor system. The experimental results show that cell damage usually found in sparged bioreactors is prevented completely in this airlift bioreactor, and there are no factors present in it to limit the cell growth. This indicates that the culture environment provided by this airlift bioreactor for animal cell growth, metabolism and product formation is ideal. Therefore, it can be concluded that the design of this airlift bioreactor is successful.

Key words Airlift bioreactor, hybridoma cells, cell cultures