

## 用多孔微载体大规模培养 rCHO 细胞

胡显文 肖成祖 李文青 黄子才 张正光

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

多孔微载体是近年来发展起来的一种用于大规模高密度培养动物细胞的支持物,具有许多优点,如:容易固定细胞,适合于贴壁细胞和悬浮细胞的固定化连续灌流培养;细胞生长在载体内部,增加了细胞固定化的稳定性,可降低血清用量,适合长期培养;能保护细胞免受机械损伤,增加搅拌强度和通气量,强化反应器的传质;比表面积大,为细胞提供了充分的生长空间;细胞固定化过程简单无害,细胞能从长满细胞的微载体中自动转移到未长细胞的新载体中生长,接种方便,操作简单,特别适合于搅拌式、气升式、固定床和流化床等生物反应器的大规模培养<sup>[1,2]</sup>。

尿激酶原(pro-UK)是一种重要的溶栓药物,与一般的生物医药制品相比,pro-UK 给药量较大(约 20mg/人~80mg/人),小规模生产不能满足市场需求。本文报道利用 20L 搅拌式反应器培养分泌 pro-UK 的重组 CHO 细胞的工艺条件,取得了初步结果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞株和培养基

采用分泌 pro-UK 的重组 CHO 细胞株 GL-11G(军事医学科学院生物工程研究所)。培养基为 DMEM/F12(1:1),补加 BIGBEF 低血清添加剂,另加 1% 小牛血清,过滤除菌<sup>[3]</sup>。

#### 1.2 多孔微载体

Cytopore 纤维素多孔微载体(Pharmacia Co.),用前用 0.1mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液(PBS)浸泡 4h 后倾去 PBS,再用 PBS 洗涤 3 次,在 121℃ 高压灭菌 40min 后,吸出 PBS,用含 1% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基浸泡备用<sup>[4]</sup>。

#### 1.3 反应器

Biostat UC20(B. Braun Co., Germany)20L 搅拌式反应器。通过改变氮气、氧气、空气和二氧化碳的流量来控制溶氧和 pH,采用 23m 长、 $\phi 3\text{mm} \times 0.35\text{mm}$  薄壁硅胶管无泡气体交换系统,灌流培养或换液培养时,通过孔径为 20 $\mu\text{m}$  的不锈钢旋转滤器截留细胞和微载体。

#### 1.4 培养方法

由方瓶→转瓶→搅拌瓶→5L CelliGen 反应器→20L Biostat 反应器逐级放大培养。在 20L 反应器中预先加入 15L 培养基和 30g 经过处理的多孔微载体,5L CelliGen 反应器制备的种子通过管道直接进入 20L 反应器中,控制  $\text{pH} = 7.1 \pm 0.1$ ,  $\text{DO} = 40\% \pm 5\%$ , 温度  $= 37.0^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ , 搅拌转速为 40r/min, 多孔微载体的浓度为 2g/L 培养基。

#### 1.5 检测方法

1.5.1 细胞计数:取样 5ml 培养液于 10ml 试管中,待多孔微载体沉降后用吸管尽可能多地吸出上清,加入含 0.1% 结晶紫的 0.1mol/L 柠檬酸溶液,使总体积至 5ml,每隔 1h 用吸管吹打、摇荡,置于室温下 3h 后,用吸管紧靠液面吸取适量液体于血球计数板上,数出被染成深紫色的细胞核数。

“863”计划资助项目。

收稿日期:1997-04-11,修回日期:1997-12-22。

- 1.5.2 pro-UK 活性测定:用改进的琼脂糖-纤维蛋白-平板法<sup>[5]</sup>。
- 1.5.3 葡萄糖的浓度:用血糖诊断试剂盒测定(中国科学院百泰技术公司)。
- 1.5.4 细胞转移观察:取出样品后用 5mg/ml 噻唑蓝(MTT)溶液染色 2~4h 后,长有细胞的多孔微载体为黑色,未长细胞的多孔微载体仍为本白色,在显微镜下观察,计算出长有细胞的多孔微载体占全部微载体的百分数<sup>[6]</sup>。

2 结 果

2.1 细胞在新旧多孔微载体间的自动转移

在第 2 批培养实验中,观察了细胞在长有细胞的多孔微载体与新加入的多孔微载体之间的自动转移(图 1)。细胞由 5L CeliGen 反应器中转移到 20L Biostat UC20 反应器中后,有 25% 的多孔微载体长满细胞(即 5L 罐培养的种子细胞),随着培养的进行,部分细胞逐渐地由种子多孔微载体中转移到新加的未长细胞的多孔微载体中生长,培养至第 4d,95% 的多孔微载体中都长有细胞,基本完成了自动转移,而不需要胰酶消化,特别适合于逐级放大培养过程。

2.2 Biostat UC20 反应器半连续培养 GL-11G 细胞

培养接种密度为  $6.5 \times 10^5/\text{ml}$ ,每隔一定时间部分换液,根据葡萄糖的浓度确定换液量(图 2)。在培养初期,细胞密度低,换液间隔时间长,换液量少,随着培养的进行,逐渐加大换液量。一般当葡萄糖浓度下降到  $3.0\text{g/L} \sim 3.2\text{g/L}$  时便换液,培养到 16d 时,细胞密度达到  $6.6 \times 10^6/\text{ml}$ ,pro-UK 最高活性为  $8\,063\text{IU/ml}$ (图 2),共收集上清 55L,上清中 pro-UK 的平均活性为  $4\,723.2\text{IU/ml}$ 。按基因工程尿激酶原的比活 =  $104\,000\text{IU/ml}$  计算,上清中共有 2.5g 产品。

2.3 Biostat UC20 反应器连续培养 GL-11G 细胞

培养可分为 4 个阶段,见图 3、图 4。

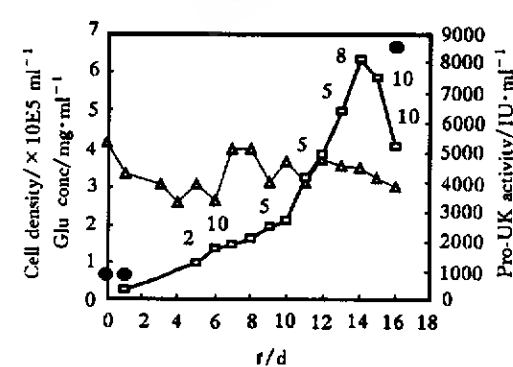


图 2 Biostat UC20 反应器半连续培养 GL-11G 细胞  
Fig.2 Semi-continuous culture of GL-11G cells in a Biostat UC20 stirred tank bioreactor  
(●)Cell density; (□) pro-UK activity; (△) Glucose conc., The digits above pro-UK activity curve were the quantity of feeding medium/harvesting supernatant per day (L/d)

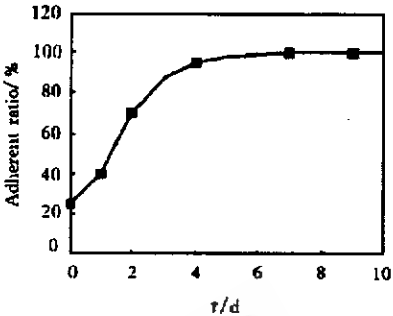


图 1 细胞在新旧多孔微载体间的自动转移  
Fig.1 Cells moved from seed porous microcarriers containing cells to vacant porous microcarriers

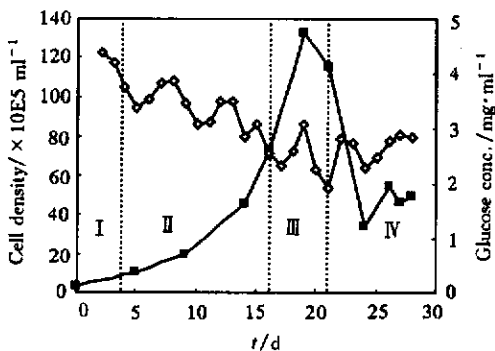


图 3 Biostat UC20 反应器连续培养 GL-11G 细胞  
Fig.3 Continuous culture of GL-11G cells in a Biostat UC20 stirred tank bioreactor  
(■)Cell density, (□)Glucose conc.  
I . Feed-batch culture, II . Semi-continuous culture, III . Perfusion culture, IV . Chemostat culture

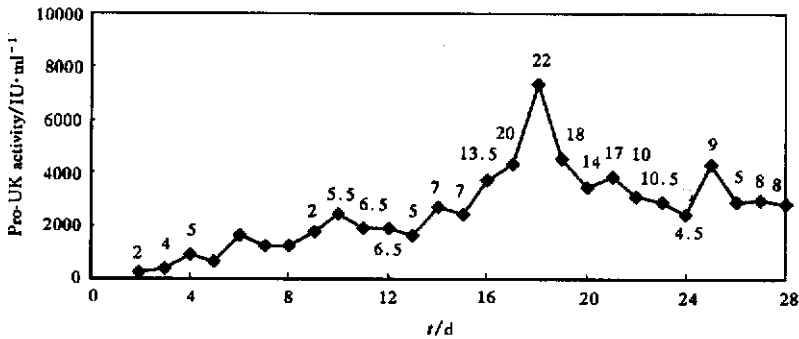


图4 用Cytapore纤维素多孔微载体在20L Biostat UC20反应器连续培养GL-11G细胞生产尿激酶原

Fig. 4 Pro-UK produced by GL-11G cell line cultivated on cytopore cellulose porous microcarriers in a 20L Biostat UC20 stirred tank bioreactor

The digits above pro-UK activity curve were the quantity of feeding medium/harvesting supernatant per day(L/d)

第一阶段为流加培养,由于种子细胞较少,为提高接种密度,细胞接种时装液量为14L,接种密度为 $3.35 \times 10^5/\text{ml}$ ,在第2、3d流加培养至20L。

第4d至第16d为换液培养,由于在此期间细胞密度较低,采用换液培养可减轻代谢产物积累对细胞生长的影响,又可提高上清中产物的浓度。这一阶段收获 pro-UK 平均活性为2314UI/ml的上清52L。

培养至16d后,葡萄糖的浓度已降至2.5g/L以下,换液量为13.5L/d已不能满足细胞生长的需要,此时改为灌流培养,灌流速度控制在20L/d左右,在第16d~第22d的灌流培养中,细胞生长旺盛,最高密度达到 $1.33 \times 10^7/\text{ml}$ ,此时溶氧下降很快,以通90%的氧气为主,以空气替代氮气来调节溶氧。pro-UK的最高活性达到7335IU/ml,在5d灌流培养中收获上清91L,平均活性为4712.3IU/ml。

第22d截留细胞的旋转滤器已堵塞,灌流培养难以实现,换液培养1d后改为恒化培养,恒化培养细胞密度急剧下降,培养液中的产物活性也随之降低,在第23d~第28d培养中,细胞密度基本维持在 $4.5 \times 10^6/\text{ml}$ 左右,pro-UK的活性在3000IU/ml,共收集培养液55L,平均活性为3022IU/ml。

在连续28d的大规模细胞培养期间,共收集 pro-UK 的平均活性为3592IU/ml的培养上清204L,含有7.05g产品。

### 3 讨 论

在20L Biostat UC20无泡通气搅拌式反应器中,利用Cytapore纤维素多孔微载体培养rCHO细胞,细胞生长良好,细胞最高密度可达 $1.33 \times 10^7/\text{ml}$ ,pro-UK最高活性可到8000IU/ml。硅胶管无泡通气系统能克服直接通气产生泡沫和损伤细胞的缺点,为细胞的生长和反应器的正常运行创造了有利条件,其缺点是氧传递速率较小,当细胞密度较高( $>3 \times 10^6/\text{ml}$ )时,必须以氧气代替空气才能满足细胞对氧的需求。Biostat UC20反应器还存在一些亟待解决的问题,如在细胞密度较高时,由于细胞和微载体的粘附,旋转滤器易于堵塞而影响反应器的正常运转。有两种方法可解决这一问题,利用在位连续离心的方法分离细胞和培养液,分离出来的细胞回流到反应器中,而毋需用不锈钢筛网截留细胞,我们曾利用美国Sorvall公司生产的CENTRITech®细胞培养用连续离心机悬浮培养rCHO细胞,取得了较好效果;也可采用肖成祖等人发明的灌流培养反冲洗系统,该系统采用密闭的不锈钢筛网滤器,灌流培养时通过

定时器每隔一段时间反冲洗滤器一次,防止细胞和微载体粘附在筛网上<sup>[7]</sup>,利用该技术改造 Biostat UC20 反应器后,连续培养 100d 而不产生严重堵塞问题,取得了很好的效果(待发表)。

多孔微载体的比表面积大,微载体用量可以减小,一般约为 2g/L。细胞生长在微载体内部,增加了细胞固定化的稳定性,减少了流体剪切力对细胞的损伤,可降低血清用量,增加搅拌转速以强化传质。细胞可从长满细胞的种子微载体自动转移到未长细胞的新微载体中生长,细胞培养从 500ml 搅拌瓶→5L CelliGen 反应器→20L Biostat 反应器,都是直接加入长有多孔微载体中的种子细胞后,再加入新的多孔微载体,无需经胰酶消化后接种,大大方便了接种过程,适合大规模细胞培养。

换液培养结合了批式培养和灌流培养的特点,在细胞密度不高的情况下,既可收获产物浓度较高的上清,又可消除代谢产物积累对细胞生长的不利影响,比较充分地利用培养基;而在细胞密度较高时,采用灌流培养可以进一步提高细胞密度、产物浓度和产量。

### 参 考 文 献

- 1 Cahn F. TIBTECH, 1990, 8, 131~136
- 2 Griffiths, J B TIBTECH, 8, 1990, 204~209
- 3 Xiao C Z, Huang Z C, Zhang Z G *et al.* In: Beuvery E C eds, Animal Cell Technology Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1995, 97~10
- 4 肖成祖,黄子才,李文青等,军事医学科学院院刊. 1996, 20, 191~194
- 5 Xiao C Z. Chin Med Sci J, 1994, 9(4):203
- 6 肖成祖,黄子才,周鹤山等. 中国专利 ZL 91208893.1.

## Large-scale Cultivation of rCHO Cells Using Porous Microcarriers

Hu Xianwen Xiao Chengzu Li Wenqing Huang Zicai Zhang Zhengguang

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

**Abstract** Large-scale culture of recombinant CHO cells was carried out with cytopore cellulose porous microcarriers in a 20L Biostat UC20 stirred tank reactor, which equipped with silicone tubing bubble-free oxygenator. During 16 days semi-continuous culture, the cell density reached  $6.6 \times 10^6$ /ml, and maximal pro-UK activity was over 8 000IU/ml, and 55L supernatant contained 2.5g pro-UK was harvested. The rCHO cells had been continuously cultivated for 28 days, after 16 days culture, the cell density increased up to  $1.33 \times 10^7$ /ml, the maximal pro-UK activity was 7335 IU/ml, 204L supernatant was harvested, the pro-UK production was 7.05g. Cells can move from seed microcarriers occupied by cells into vacant microcarriers spontaneously and continue to proliferate until all the microcarriers contained rCHO cells. It shows that the porous microcarriers is very useful and convenient for large scale cell culture.

**Key words** Animal cell culture, porous microcarrier, pro-UK