

纤维素多孔微载体的制备及其用于动物细胞培养

胡显文 肖成祖 黄子才 张正光

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 将纤维素铜氨溶液喷洒至 -40°C 的硅油:正己烷=1:4 的冷冻液中形成含冰晶的微球,用 -30°C 、40% 的 H_2SO_4 再生纤维素,并用 EDAE 盐酸盐修饰其表面,制成适合动物细胞培养的纤维素多孔微载体。利用该微载体培养能分泌尿激酶原(Pro-UK)的重组 CHO 细胞,在 100mL 搅拌瓶中换液培养 25d,细胞最高密度为 $6.3 \times 10^6/\text{mL}$,尿激酶原最高活性为 2325IU/mL,共获 28.7mg 产品。之后转入 1000mL 搅拌瓶中培养,可观察到细胞可从种子微载体中自动转移到新微载体中生长繁殖直至所有微载体中都长有细胞。在 25d 二级培养中,细胞最高密度为 $7.3 \times 10^6/\text{mL}$,尿激酶原最高活性为 3108IU/mL,共获含 353mg 尿激酶原的上清 13.7L。在培养后期换用无血清培养基培养,细胞生长及蛋白表达水平正常。

关键词 多孔微载体,动物细胞培养,尿激酶原

分类号 Q20 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0093-97

纤维素多孔微载体(Cellulose porous microcarriers)是近年来才发展起来的一种用于大规模高密度动物细胞培养优秀的细胞支持物^[1],其内部有许多网状的相互连通的小孔通向载体表面,细胞易于进入孔中生长、分裂。纤维素多孔微载体几乎具有 Griffiths 所要求的理想细胞支持物所有特征^[2],尤其解决了细胞固定化和剪切力对细胞损伤两大难题,能提高细胞培养密度,便于大规模细胞培养,因而刚一出现,便倍受瞩目。肖成祖等用 Cytopore 纤维素多孔微载体在 5L Celligen 反应器中成功地培养了悬浮细胞和贴壁细胞^[8],细胞密度均在 $10^7/\text{mL}$ 以上,很好地解决了悬浮细胞在连续培养中的截留问题。我们还率先利用 Cytopore 纤维素多孔微载体在 20L Biostat UC 中试规模反应器中,采用 0.1% 低血清培养基,连续 100d 培养 GL-11G 细胞,共获 1604L 含 51gPro-UK 的上清^[9]。由于进口的 Cytopore 纤维素多孔微载体价格较高,我们探索了纤维素多孔微载体的制备工艺,研制了适合动物细胞培养的纤维素多孔微载体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 制备纤维素多孔微载体的材料: α -纤维素,含 1% Cu^{2+} 、8% 氨的铜氨溶液(Schweizer's Reagent)^[3],二甲硅油(201-500,北京化工二厂);正己烷=1:4 的油性冷冻液,2-二乙氨基氯乙烷盐酸盐(DEAE 盐酸盐)(Sigma Co.)。

1.1.2 细胞株和培养基: 采用分泌 Pro-UK 的重组 CHO 细胞 GL-11G(军事医学科学院

生物工程研究所)。培养基为 DMEM:F12 = 1:1, 加入 0.5g/L 谷氨酰胺, 1.8g/L HEPES, 20KIU/mL Aprotini, 1g/L 蛋白胍, 补加多种氨基酸和 BIGBEF 低血清添加剂, 另加适量小牛血清和胰岛素, 过滤除菌^[4]。

1.2 方法

1.2.1 纤维素多孔微载体的制备: a. 将 α -纤维素溶解在 Schweizer 试剂中, 配成纤维素铜铵溶液, 于 4℃ 下避光保存。b. 将该溶液通过锐孔喷射成小液滴进入 -30~-40℃ 二甲基硅油:正己烷 = 1:4 的油性冷冻液中, 并不断搅拌, 小液滴凝固成含有冰晶等致孔性物质的固体小球, 于 -30℃ 放置 1h。c. 用 -30℃、40% 的 H_2SO_4 溶液将溶解在 Schweizer 试剂中的纤维素再生, 并融化其中的冰晶, 形成多孔微球。用洗涤剂清洗, 并用筛网筛选其中 200~300 μm 的微球。d. 将纤维素多孔微球加至含 0.1mol/L DEAE 盐酸盐、0.5mol/L NaOH 的溶液中, 置 60℃ 下不断搅拌 10h, 使其交联-DEAE 弱碱性阴离子交换基团, 以促进细胞贴壁。e. 交联后用 1% 的柠檬酸溶液洗涤一次, 再用蒸馏水洗涤 3 次, 尔后用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 于 121℃ 蒸汽灭菌 30min 后, 吸出 PBS, 用含 1% 小牛血清的培养基洗涤 2 次后置 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 细胞培养: 在 100mL 搅拌瓶中加入 10mL 处理好的自制多孔微载体, 并接种由方瓶培养制得的细胞悬液, 加培养基至 60mL, 置 37℃ 培养箱中搅拌培养, 搅拌转速为 30r/min, 逐日取样换液。待细胞在多孔微载体中长满后, 将其转入 1000mL (Bello, USA) 搅拌瓶中, 并加入 70mL 自制微载体, 加培养基至 500mL, 于 37℃ 搅拌培养, 搅拌转速为 30r/min, 逐日取样换液并观察细胞在新旧微载体之间自动转移。

1.2.3 细胞计数: 取样 5mL 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, 尔后加入含 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 37℃ 下 3h 后, 摇匀待微载体稍沉降后, 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。

1.2.4 Pro-UK 活性测定: 用改进的琼脂糖-纤维蛋白-平板法^[6]。

1.2.5 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)。

1.2.6 细胞转移观察: 取出样品后用 5mg/mL MTT 溶液染色, 置 37℃ 下 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。

2 结 果

2.1 多孔微载体的制备工艺对细胞贴壁生长的影响

分别以 1% 纤维素铜氨溶液, 另少量明胶作致孔剂, 以及 2% 纤维素铜氨溶液在相同条件下制备了多孔微载体 A 和 B, 结果如图 1(a)、(b) 所示, 用含凝胶性大分子物质的 1% 纤维素铜氨溶液制备的多孔微载体 A 孔径较大, 约为 10~30 μm 之间, 且微孔开放, 适合细胞进入其中生长。而以 2% 纤维素铜氨溶液制备的多孔微载体 B, 微孔的孔径约为 10~20 μm 左右, 且微球边缘开放度较小, 不利于细胞的进入。由于细胞膜上带负电荷, 微载体表面带有阴离子交换基团有利于细胞的贴壁。细胞培养实验表明, 在交联-DEAE 之前, 用其培养动物细胞 7d, 孔径较小且边缘较致密的多孔微载体 B 中几乎没有细胞贴壁,

而孔径较大边缘开放的多孔微载体 A 中也只有极少量的细胞被裹夹;交联-DEAE 之后,经过 25d 100mL 搅拌瓶培养,微载体 A、B 中均长有细胞,而微孔孔径较大的微载体 A 中的细胞多于微载体 B 中的细胞(图 1(c)、(d)),表明微载体表面带有适量负电荷有利于细胞的贴壁,且孔径较大的多孔微载体更有利于细胞的贴壁生长。

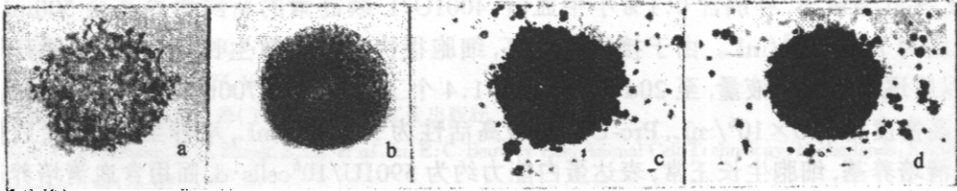


图 1 微载体制备条件对载体孔径和细胞培养的影响

Fig. 1 Influence of microcarrier preparing conditions on pore size and cell culture

(a) Porous microcarrier(A) made of 1% cellulose cuprammonium solution containing some gelatin, the pore size is between 10~30 μm , larger than that of microcarrier(B); (b) Porous microcarrier(B) made of 2% cellulose cuprammonium solution, the pore size is between 10 μm ~20 μm ; (c) Cell culture on porous microcarrier(A), the cells in it are denser than that in microcarrier(B); (d) Cell culture on porous microcarrier(B) Cells were dyed in black with MTT

2.2 细胞在新旧微载体中自动转移

在 1000mL 搅拌瓶细胞培养过程中,观察了细胞在种子多孔微载体与新加入的多孔微载体之间的自动转移。细胞由 100mL 搅拌瓶转移到 1000mL 搅拌瓶中后,有 12.5% 的多孔微载体长满细胞(即种子细胞),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入的未长细胞的多孔微载体中生长,培养至第 5 天,95% 的多孔微载体中都长有细胞,细胞需 5 d 左右便可基本完成自动转移,

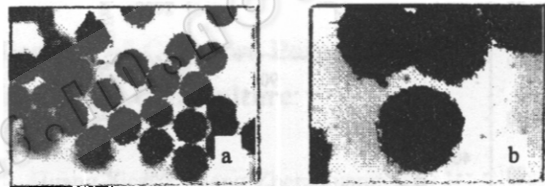


图 2 自制微载体和 Cytopore 微载体细胞培养的比较

Fig. 2 Comparison of cell culture on self-made microcarriers and on cytopore microcarriers

(a) Cell subculture on self-made microcarriers after 20days in 1000 mL spinner flask; (b) Cell subculture on cytopore microcarriers after 18days in 20L Biostat UC stirred tank.

Cells were dyed in black with MTT solution

而不需要胰酶的消化等方法来帮助接种。第 20 天取样用 MTT 染色,所有微载体中都长满了细胞(图 2(a))。图 2(b)为在 20L Biostat UC 搅拌罐中用 Cytopore 微载体培养 GL-11G 细胞,培养 18 d 后用 MTT 染色后的照片。Cytopore 微载体比自制微载体要形状规则、粒径均一。

2.3 100mL 搅拌瓶换液培养 GL-11G 细胞

由细胞培养方瓶经胰酶消化制得细胞悬液接种到 100mL 搅拌瓶中,接种密度为 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$,加入 10mL 多孔微载体,补加含 1% 小牛血清的新鲜培养基至 60mL,每隔一定时间部分换液。由于接种细胞密度低,细胞生长缓慢,延滞期较长,换液量小,随着培养的进行,细胞生长进入对数生长期,逐渐加大换液量,第 10 天后每天早晚各换液 1 次,第 14 天后每天换液 90mL(图 3)。细胞密度达到 $6.3 \times 10^6/\text{mL}$,Pro-UK 最高活性为 2325IU/mL,细胞表达蛋白能力为 523IU/(10^6 cells·d),25d 培养共收集上清 1690mL,上清中 Pro-

UK的平均活性为16 98IU/mL,按 Pro-UK 的比活为10 000IU/mg计算,上清中含有28.7mg 尿激酶原。

2.4 1000mL 搅拌瓶换液二级培养 GL-11G 细胞

将100mL 搅拌瓶25d 换液培养的 GL-11G 细胞全部转入1000mL 搅拌瓶中,加入70mL 多孔微载体,补加含0.1%小牛血清、400IU/L 胰岛素的新鲜培养基至500mL,接种密度为 7.3×10^3 /mL。由于接种密度高,细胞很快进入对数生长期,第二天便开始换液,以后逐渐加大换液量,至20d后,每天换1.4个工作体积即700mL 培养基(图4)。细胞最高密度为 7.3×10^6 /mL,Pro-UK 的最高活性为3108IU/mL,培养至第15天后换用无血清培养基,细胞生长正常,表达蛋白能力约为 $590 \text{ IU}/10^6 \text{ cells} \cdot \text{d}$,而用含血清培养基培养时,细胞表达蛋白的能力约为 $510 \text{ IU}/10^6 \text{ cells} \cdot \text{d}$,表明在细胞密度较高时,换用无血清培养基可以满足细胞的营养要求,多孔微载体的应用可以降低血清用量,为大规模高密度长期低(无)血清细胞培养提供了良好的支持。在25d 的二级培养中,共收获含353mg Pro-UK 的上清13.7L。

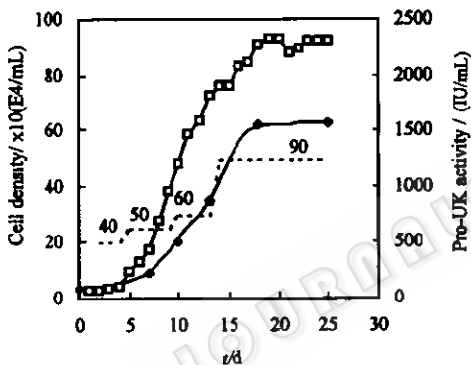


图3 100mL 搅拌瓶培养 GL-11G 细胞

Fig.3 GL-11G cell culture in 100mL spinner flask

◆ Cell density; □ pro-UK activity;
 ... Medium replacing rate(mL/d)

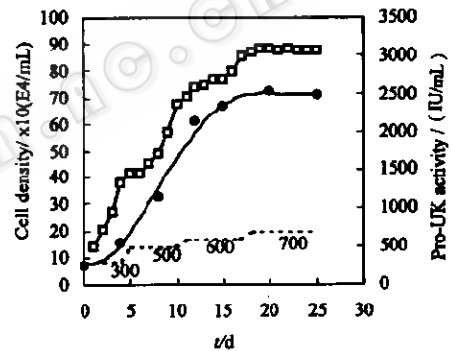


图4 1000mL 搅拌瓶培养 GL-11G 细胞

Fig.4 GL-11G cell culture in 1000mL spinner flask

◆ Cell density; □ pro-UK activity;
 ... Medium replacing rate(mL/d)

3 讨 论

纤维素多孔微载体具有以下特点:细胞固定化简单无害,适合贴壁细胞和悬浮细胞的连续培养;细胞固定化稳定,可降低或避免使用血清,适合长期培养;细胞生长在载体内部,能保护细胞免受机械损伤;比表面积大,为细胞提供了充分的生长空间;细胞能在微载体间自动转移,方便了二级培养的接种过程等。自从日本 Asahi 化工公司的 Shirokaze, J. 发明了纤维素多孔微载体以来^[7],它在实验室研究及中试生产中得到了应用并取得了满意的效果^[9,10]。最近,我们采用 Cytopore 纤维素多孔微载体在工作体积为20L 反应器中培养动物细胞,利用无血清培养基,细胞密度可达 2.4×10^7 /mL,上清中尿激酶原的最高活性超过10 000IU/mL,即产物浓度为100mg/mL,纯化后平均每天可获得1g 以上的基因

工程产品(尚未发表),表明纤维素多孔微载体在实际生产中可以很好地支持细胞生长和表达产物。

参 考 文 献

- [1] F. Cahn. *TIBTECH*, 1990, 8:131.
- [2] J. B. Griffiths. *TIBTECH*, 1990, 8:204.
- [3] 程能林, 胡声闻. 溶剂手册(下), 北京: 化学工业出版社, 1987, p349.
- [4] Xiao, C. Z., Huang, Z. C, Zhang, Z. G, *et al.* In: E. C. Beuvery Eds, *Animal Cell Technology*, Netherlands: Kluwer Academic, 1995, p. 97.
- [5] J. Shirokaze, M. Nogawa, R. Ogura. In: R. E. Spier Eds, *Animal Cell Technology*, Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994, p. 261.
- [6] C. Z. Xiao, *Chin. Med. Sci. J.*, 1994, 9(4):203.
- [7] J. Shirokaze. *UPS*, 1990, 49 558 014.
- [8] 肖成祖, 黄子才, 李文清等. 军事医学科学院院刊, 1996, 20:191.
- [9] Hu, X. W., Xiao, C. Z. Huang, Z. C. In: R. Sasaki Eds, *Animal Cell Technology*, Kyoto:1998, p. 106.
- [10] Y. Tomimori, M. Takagi, T. Sasaki. In: R. Sasaki Eds, *Animal Cell Technology*, Kyoto:1998, p. 9.

Preparation and Application of Cellulose Porous Microcarriers for Animal Cell Culture

Hu Xianwen Xiao Chengzu Huang Zicai Zhang Zhengguang

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

Abstract A cellulose cuprammonium solution was sprayed into the -40°C frozen liquid containing 20% Silicone oil and 80% hexane to form microspheres contained fine ice crystals, then regenerated the cellulose with 40% H_2SO_4 cooled to -30°C , and the microspheres were modified with diethylaminoethylchloride, the cellulose porous microcarriers for animal cell culture were prepared. Semi-continuous culture of recombinant CHO cells which can secret prourokinase(Pro-UK) was carried out in a 100mL and a 1000mL spinner flasks using this kind of microcarriers. During the 25 days cultivating process in a 100mL spinner flasks, the cell density reached $6.3 \times 10^6/\text{mL}$, the maximal activity of Pro-UK was 2325 IU/mL and the Pro-UK production was 28.7mg. The seed microcarriers with rCHO cells cultivated in the 100mL spinner flasks were transferred into a 1000mL spinner. During 25 days subculture, it was observed that cells began to move from seed microcarriers into vacant microcarriers and continued to proliferate until all the microcarriers were occupied. The cell density reached $7.3 \times 10^6/\text{mL}$ the maximal activity of Pro-UK was 3100 IU/mL and 13.7L supernant which contained 353 mg Pro-UK was harvested. During the later period of the cultivating process, the applying of serum-free medium had no significant effects on the cell growth and protein expressing.

Key words Porous microcarrier, animal cell culture, prourokinase