

贴壁培养方式中昆虫细胞的生长限制性因素研究

赵 佼 周 燕 谭文松 俞俊棠

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

关键词 昆虫细胞, 贴壁培养, 环境因素, 生长性能, 代谢参数

分类号 Q952 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0383-87

以昆虫细胞为宿主生产病毒杀虫剂或进行基因工程产品的开发, 是动物细胞培养领域十分有吸引力的研究方向。近年来, 昆虫细胞的体外培养尽管在培养条件的优化^[1]、培养基的开发^[2]以及工艺流程的设计^[3]等诸多方面取得了令人鼓舞的进展, 但由于对影响细胞生长及代谢的各类限制性因素尚缺乏全面系统的了解, 因而目前的技术水平还远不能设计出优化的培养系统以满足产业化的需要。

众所周知, 细胞的生长和产物的形成是多种环境因素和细胞内复杂代谢反应的综合结果, 因此, 对生长限制性因素的考察也应有全局观念, 即: 在重视生化环境(外因)对细胞培养过程影响的同时, 也不能忽视细胞株自身性能(内因)对最终培养结果的影响。以往的研究^[4, 5]大多仅就个别营养限制性因素进行孤立地探讨, 缺乏从内外因两方面对昆虫细胞培养过程的认识。

最近, 以微载体技术或堆积床技术贴壁培养昆虫细胞业已证明具有很大的发展前途^[6, 7]。为此, 本文以贴壁培养的秋黏虫细胞(IPLB-Sf21-AE)和粉蚊夜蛾细胞(BTI-Tn-5B1-4)为研究对象, 在考察环境限制性因素的同时, 亦从细胞自身特点出发考察了不同细胞株的生长及代谢性能。研究结果可望为贴壁培养技术的深入应用以及培养过程的合理设计提供参考。

1 材料和方法

1.1 细胞株

秋黏虫细胞 IPLB-Sf21-AE, 由中科院上海生物化学研究所吴祥甫教授惠赠; 粉蚊夜蛾细胞 BTI-Tn-5B1-4, 由华中师范大学昆虫学研究所洪华珠教授提供。

1.2 培养基

所用基础培养基为 TC-100(GIBCO), 为避免培养后期葡萄糖消耗殆尽所导致的细胞生长受阻^[8], 配制时补加葡萄糖至 2.2g/L。此基础培养基将根据实验需要添加酵母提取物和胎牛血清等添加剂。

1.3 实验方法

1.3.1 生长限制性因素系列实验: 以补加葡萄糖后的 TC-100 为基础培养基, 通过添加不同浓度的酵母提取物和胎牛血清或改变接种密度以考察这些因素对细胞生长的影响。根据需要配制的新鲜培养基将贴壁细胞吹打成单个悬浮细胞, 按所需接种浓度接种于 15 cm² 方瓶中, 每瓶 5 mL 细胞悬液, 置 28℃ 培养, 每 24h 取样一次。为了减少误差, 每次平行取三个样本, 用移液管轻轻吹打成单个悬浮细胞后由血球计数板和台盼蓝染色法确定活细胞数, 取其平均值为该时刻的细胞密度。细胞计数完毕后离心去细胞(1500 r/min, 10 min), 以 YSI2700 型选择性生化分析仪测定上清中乳酸和葡萄糖含量。

1.3.2 代谢参数的计算机求解: 以 3 次样条函数求一阶微分的算法^[9]计算各取样点葡萄糖消耗速率($Q_{Glucose}$)和乳酸累积速率($Q_{Lactate}$)的瞬时值, 并以对数生长期各取样点数据的平均值作为此阶段细胞的

碳源代谢参数。对数期细胞的比生长速率则由细胞密度的对数对时间进行线性回归而得。有关计算机程序详见文献[8]。

2 结果与讨论

2.1 影响昆虫细胞贴壁培养效果的外因分析

2.1.1 酵母提取物对细胞生长的影响: 在 0~6 mg/mL 范围内考察了酵母提取物(Yeastolate, 以下简称 YE)对 IPLB-Sf21-AE 和 BTI-Tn-5B1-4 细胞生长的影响(见图 1, 图 2)。结果表明, YE 对 2 株细胞均具有明显的生长促进作用。TC-100 培养基中适量添加 YE, 可显著提高细胞在贴壁培养方式中的培养密度。IPLB-Sf21-AE 细胞不仅能铺满单层, 而且能继续脱离固体介质表面生长。

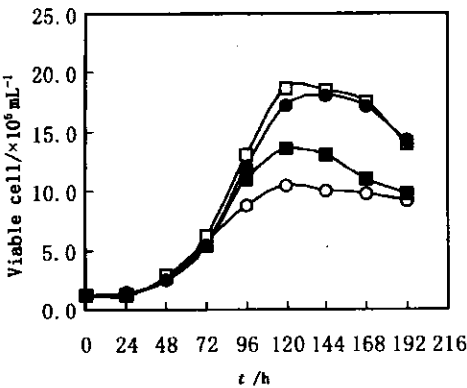


图 1 YE 对 IPLB-Sf21-AE 细胞生长的影响
Conc. of YE/(g/L): ○—0; ■—1; □—3; ●—6

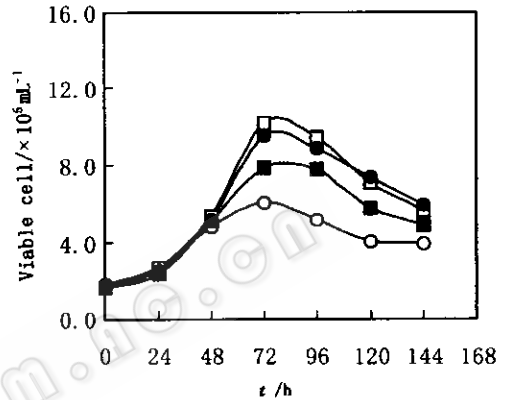


图 2 YE 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞生长的影响
图例同图 1

有关资料表明^[10], YE 富含水溶性的 B 族维生素和嘌呤碱基, 而维生素正是维持细胞生长的一种重要生物活性物质, 它们在细胞中大多形成酶的辅基或辅酶, 对促进细胞生长, 增加细胞密度, 促进细胞贴附都有作用。YE 的加入, 弥补了 TC-100 培养基中 B 族维生素含量偏低的缺陷^[11], 因而对促进细胞的增殖, 保持细胞的活性十分有利。

实验中发现, YE 浓度在 3 mg/mL 时, 细胞生长状况与 6mg/mL 的对照培养相似, 可见, YE 促进细胞增殖的作用有一定限度, 并非与其含量成比例。而且有研究表明^[12], YE 浓度过高, 还会抑制细胞的生长。因此, 在贴壁培养昆虫细胞时, 我们选择 TC-100 培养基中 YE 的添加浓度为 3mg/mL。

2.1.2 血清对细胞生长的影响: 昆虫细胞离体培养过程中常需加入价格昂贵的胎牛血清(以下简称 FBS), 其费用已成为昆虫细胞大规模培养的制约因素, 而且 FBS 成分十分复杂, 会给基因工程表达产物的后处理带来困难, 这是目前杆状病毒基因工程表达产物不能大规模开发和利用的重要原因之一。目前昆虫细胞贴壁培养 FBS 的用量一般为 10%^[13], 由于不同昆虫细胞系的生长特性有很大差异, 因而对 FBS 的要求也应有所不同。本文系统考察了限制 IPLB-Sf21-AE 和 BTI-Tn-5B1-4 细胞贴壁生长的 FBS 浓度, 目的是在尽可能减少 FBS 用量的前提下获得细胞的高密度生长, 以降低成本并有利于后处理。

实验表明; 对于 IPLB-Sf21-AE 细胞的贴壁培养, 4% 的 FBS 尚未成为细胞生长的限制性因素(图 3), 细胞均能铺满单层。若 FBS 降为 1%, 细胞生长则明显受到抑制, 细胞形态不饱满, 不能均匀贴壁生长, 有结团趋势。

对于 BTI-Tn-5B1-4 细胞的贴壁培养, 5% 以下的 FBS 即已成为细胞生长的限制性因素(图 4), 最高细胞密度和比生长速率均明显下降, 细胞形态则变得粗壮, 且轮廓不清, 部分细胞倾向于聚集生长。

以上现象说明, 在昆虫细胞的贴壁培养中, FBS 不仅对细胞的生长繁殖具有外在促进作用, 同时对

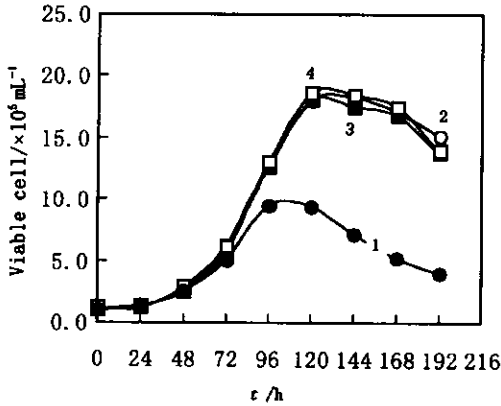


图3 血清对 IPLB-Sf21-AE 细胞生长的影响
 Conc. of FBS/%: ●-1; ○-4; ■-5; □-10

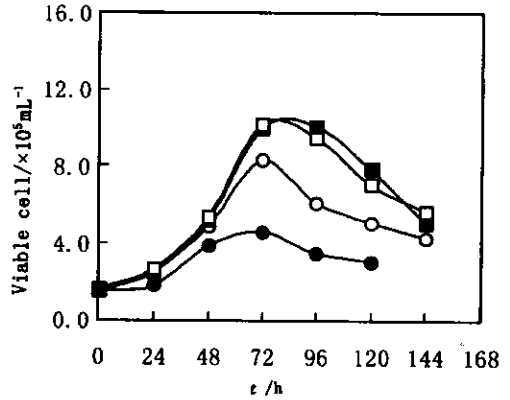


图4 血清对 BTI-Tn-5B1-4 细胞生长的影响
 Conc. of FBS/%: ●-1; ○-4; ■-5; □-10

细胞的贴壁和保护亦有明显作用。FBS 低于一定的浓度,其对细胞膜的保护作用减弱,传代过程中的吹打更易对细胞膜造成损害,从而导致细胞形态不佳并聚集生长。这一现象与 Renner^[14]的细胞间粘附与聚集理论相吻合。Renner 认为受损细胞更倾向于聚集生长,因为这些细胞会释放出脱氧核糖核酸(DNA),DNA 在细胞间起一种粘结剂的作用,促使细胞之间互相粘附生长。

2.1.3 接种密度对细胞生长的影响: 接种密度在很大程度上影响细胞生长和生存是一个普遍现象。不同接种密度的对比实验表明,对于 IPLB-Sf21-AE 和 BTI-Tn-5B1-4 细胞,接种密度对细胞生长的影响迥然不同。IPLB-Sf21-AE 细胞生命力旺盛,接种密度对其生长速率和最高细胞密度几乎无影响,接种密度仅影响细胞延迟期的长短(图 5)。接种量大时比接种量小时延迟期短,这可能是由于细胞能更快地分泌某些对数生长期所需物质的缘故。当接种量大时,就能更快地达到这些物质的临界浓度而进入对数生长期。

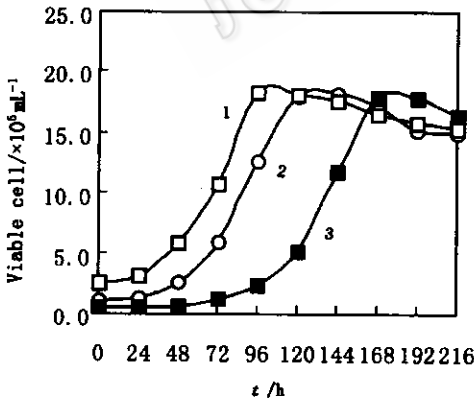


图5 接种密度对 IPLB-Sf21-AE 生长的影响
 Conc. of Cell/×10^5/mL: □-2.5; ○-1.0; ■-0.5

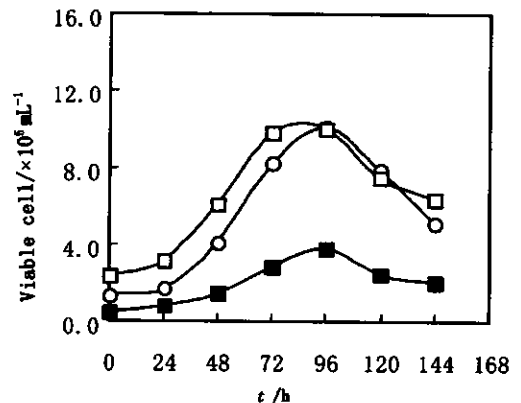


图6 接种密度对 BTI-Tn-5B1-4 的影响
 Conc. of Cells/×10^5/mL: □-2.4; ○-1.2; ■-0.5

BTI-Tn-5B1-4 细胞的贴壁生长则受接种密度的影响较大,对低接种密度尤其敏感(图 6)。实验中发现,当细胞接种量为 5×10^4 /mL 时,细胞生长速率明显减慢,最高细胞密度仅能达到 3×10^5 /mL。可

见,细胞接种密度低,BTI-Tn-5B1-4 细胞改变并适应新环境的能力也小,从而使细胞的生长处于停滞状态。由此也可以看出,BTI-Tn-5B1-4 细胞的贴壁生长对环境要求较高,生命力不如 IPLB-Sf21-AE 强。

2.2 影响昆虫细胞贴壁培养效果的内因分析

细胞生长密度是多种环境因素及细胞本身生理状态综合作用的结果。在考察外部环境因素的同时,兼顾细胞株自身性能的影响,将有助于全面掌握影响细胞生长的各类限制性因素,并可针对性地开展细胞系的选育及改良工作。血清浓度及接种密度的系列实验已初步表明 BTI-Tn-5B1-4 细胞的贴壁生长对环境要求较高,其内在的生命力不如 IPLB-Sf21-AE 细胞强。在消除限制性环境因素的影响以后,进一步分析两株细胞的生理代谢参数可知(表 1),BTI-Tn-5B1-4 细胞的生长速率及生长期持续时间均不及 IPLB-Sf21-AE 细胞。尽管在相同培养条件下,前者的糖耗速率(Q_{Glu})和乳酸累积速率(Q_{Lac})均明显高于后者,但细胞产量却不及后者,说明 BTI-Tn-5B1-4 细胞对葡萄糖的有效利用率远不及 IPLB-Sf21-AE 细胞,表中所列的细胞得率系数($Y_{X/Glu}$)和乳酸得率系数($Y_{Lac/Glu}$)亦很好地证明了这一点。

由于在贴壁培养方式下,BTI-Tn-5B1-4 细胞在对数生长末期的残糖浓度仍高达 1.30 mg/mL,因而可排除葡萄糖的耗竭所导致的细胞衰亡。根据 BTI-Tn-5B1-4 细胞所表现出的对糖的高消耗速率但低利用率的特性,可初步推断葡萄糖的分解代谢物阻遏效应和“溢流代谢”^[6]现象可能是导致其生长速率受到抑制并过早进入衰亡期的原因之一。因为由代谢生理学可知,高糖耗速率会引起所谓的“分解代谢物阻遏效应”,其实质就是高糖耗速率直接造成了细胞内环状 3',5'-腺苷单磷酸(cAMP)浓度的降低,而环状 cAMP 不仅在酶的表达方面而且在调节方面都起着重要作用^[15];而所谓“溢流代谢”现象(Overflow metabolism),是指糖代谢的代谢流(Metabolic flux)产生了分支,生成了部分氧化的代谢产物。这些代谢副产物降低了葡萄糖的利用效率,同时也对细胞的正常生长代谢起抑制或阻遏作用。

表 1 两个细胞株的生理代谢参数比较

Table 1 Comparison of metabolic parameters between two different cell lines

Metabolic parameters	IPLB-Sf21-AE	BTI-Tn-5B1-4
Specific growth rate(μ)/h ⁻¹	0.0319	0.0288
Glucose consumption rate(Q_{Glu})/ μ g(10 ⁶ cells) ⁻¹ h ⁻¹	12.302	23.239
Lactate accumulation rate(Q_{Lac})/ μ g(10 ⁶ cells) ⁻¹ h ⁻¹	1.206	6.940
Cell yield factor($Y_{X/Glu}$)/ $\times 10^6$ cells/mg	2.670	1.240
Lactate yield factor($Y_{Lac/Glu}$)/mg·mg ⁻¹	0.0980	0.299
Maximum cell density(χ_{max})/ $\times 10^6$ cells·mL ⁻¹	1.850	1.010
Cell doubling time(t_d)/h	21.7	24.1
Duration of exponential phase(t_e)/h	60	48

BTI-Tn-5B1-4 作为 90 年代开发的新型宿主细胞,在昆虫细胞-杆状病毒表达系统中具有广阔的应用前景^[16]。若能以基因工程或细胞选育的手段对其自身的生长及代谢性能加以改良,使其对糖的高消耗速率但低利用率的特性得到抑制,将能进一步推动此细胞株在工业上的应用。可以预计,从细胞株自身特点出发改善细胞的生长性能以获得高密度体外培养将是细胞培养领域十分有吸引力的研究方向。

参 考 文 献

- [1] B. Maiorella, D. Inlow, A. Shauger *et al.* *Bio/Technology*, 1988, 6: 1406~1410.
- [2] X. Lery. *J. Invertebrate Pathology*. 1990, 55: 342~349.
- [3] K. Kompier. *Biotechnol. Lett.* 1988, 10(12): 849~854.
- [4] M. Drews, T. Paalme, R. Vilu. *J. Biotechnol.*, 1995, 40: 187~198.

- [5] H. Lee, T. H. Park. *Biotechnol. Lett.* 1994, 16(4):327~332.
- [6] T. J. Wickham, G. R. Nemerow. *Biotechnol. Prog.* 1993, 9:25~30.
- [7] I. S. Chung, R. A. Taticek, M. L. Shuler. *Biotechnol. Prog.* 1993, 9:675~678.
- [8] 赵 佼.[博士学位论文]:华东理工大学,1998.
- [9] J. H. Ahlberg, E. N. Nilson. *The Theory of Splines and Their Application.* New York and London:Academic Press, 1967, pp. 10~72.
- [10] 余泽华,刘冬连,陈曲候.生物工程进展,1996,16(1):45~48.
- [11] GIBCO BRL Products & Reference Guide. Life Technologies:1997/1998,1~47.
- [12] C. J. Wyss. *J. Insect Physiol.* 1977, 23:739~747.
- [13] B. Maiorella, D. Inlow, A. Shauger. *Bio/Technology*, 1988, 6:1406~1410.
- [14] W. A. Renner, M. Jordan, H. M. Eppenberger. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 41:188~193.
- [15] 俞俊棠,唐孝宣.生物工艺学.上海:华东化工学院出版社,1991,p.32.
- [16] K. Arun, L. S. Michael. *Biotechnol. Prog.*, 1995, 11:412~419.

Identification of Growth-limiting Factors for Insect Cells Grown in Stationary Cultures

Zhao Jiao* Zhou Yan Tan Wensong Yu Juntang

(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Biotechnology, Shanghai 200237)

Abstract An investigation was undertaken into the growth properties of two different insect cell lines grown in stationary cultures. The environmental factors which could affect the growth of attached cells were identified and a significant increase in density of attached cells were obtained by optimization of several environmental factors. In addition to the identification of environmental factors, the study also went deep into the growth characteristics inherent in different cell lines. It was shown that BTI-Tn-5B1-4 cells were stricter with culture conditions as compared with IPLB-Sf21-AE cells. Under identical culture conditions, BTI-Tn-5B1-4 cells had both lower growth rate and shorter exponential growth phase than IPLB-Sf21-AE cells. Further analysis of metabolic rates revealed that higher glucose utilization rate but lower yield factor was typical of BTI-Tn-5B1-4 cells.

Key words Insect cells, stationary cultures, environmental factors, growth properties, metabolic rates