

# 犬肾细胞 MDCK 无血清贴壁及单细胞悬浮培养

黄锭, 赵亮, 谭文松

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

**摘要:** 近年来, 因病毒侵害人类每年都要蒙受巨大的经济损失和社会损失。犬肾细胞 MDCK 以其具有的培养容易、增殖快、流感病毒感染效率高等特点, 成为适用于流感病毒疫苗生产的重要细胞系之一。以 MDCK 细胞为研究对象, 在自制无血清培养基中成功实现了 MDCK 细胞从有血清培养到无血清培养的驯化; 并通过单细胞悬浮培养驯化过程实现了 MDCK 细胞的无血清单细胞悬浮培养, 获得了适于无血清单细胞悬浮生长的 ssf-MDCK 细胞株, 无血清单细胞悬浮批培养最大活细胞密度可达  $3.81 \times 10^6$  cells/mL, 最大比生长速率可达  $0.056 \text{ h}^{-1}$ , 分别较有血清贴壁培养提高了 3.6 和 1.6 倍。此外, 通过比较有血清贴壁培养、无血清贴壁培养和无血清单细胞悬浮培养三种体系中 MDCK 细胞的生长和基本代谢情况发现: 无血清培养过程细胞生长快, 代谢副产物产率低, 尤其是单细胞悬浮培养方式能获得较高的细胞密度, 更有利于大规模生产。该结果为 MDCK 细胞培养过程的优化和放大奠定了基础, 也为其他动物细胞培养过程和疫苗等生物制品的工业化生产提供了借鉴。

**关键词:** MDCK 细胞, 无血清培养基, 单细胞悬浮培养

## Adherent and single-cell suspension culture of Madin-Darby canine kidney cells in serum-free medium

Ding Huang, Liang Zhao, and Wensong Tan

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** In recent years, there are tremendous economic and social losses across the world because of virus-related diseases. It is well known that Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells are easily handled, quickly amplified and efficiently infected with influenza virus. Therefore, they are considered as one of the most important cell lines for the production of influenza vaccine. In this work, we first developed a serum-free adherent culture process for MDCK cells with an in-house prepared serum-free medium MDCK-SFM. Next, we derived a cell line named ssf-MDCK, which was amenable for single-cell suspension culture in the serum-free medium. We found that during serum-free batch culture of MDCK cells, the peak viable cell density and maximum specific growth rate were  $3.81 \times 10^6$  cells/mL and  $0.056 \text{ h}^{-1}$ , respectively; 3.6- and 1.6-fold increase compared with those in serum-containing adherent batch culture. In addition, we compared growth and metabolic characteristics of MDCK cells in serum-containing adherent culture, serum-free adherent culture and serum-free single-cell suspension culture. We found that

**Received:** March 5, 2010; **Accepted:** May 13, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 20706016).

**Corresponding author:** Wensong Tan. Tel: +86-21-64250948; Fax: +86-21-64252250; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20706016) 资助。

less metabolic by-products were produced in both serum-free cultures. In serum-free single-cell suspension batch culture, the viable cell density was highest. These results are critical for establishing large-scale suspension culture of MDCK cells as subsequent well as large-scale influenza vaccine production.

**Keywords:** Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, serum-free medium, single-cell suspension culture

MDCK 细胞系由 Madin 和 Darby 于 1958 年从美国 Cocker Spaniel 母曲架犬的肾脏组织分离培育建立<sup>[1]</sup>, 通常是以贴壁方式生长的上皮样细胞。目前, MDCK 细胞系广泛用于多种病毒的扩增和纯化, 如: 呼肠孤病毒 (Reovirus)、腺病毒 (Adenovirus)、犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV)、猫粒细胞缺乏症病毒 (Feline panleukopenia virus, FPLV) 及禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 等<sup>[2-5]</sup>。由于其病毒感染效率高、增殖快, 且不易变异, MDCK 细胞系被公认为最适于甲、乙型流感病毒疫苗生产的 3 种细胞系之一<sup>[6]</sup>。传统的 MDCK 细胞培养大多采用有血清贴壁培养方式<sup>[7]</sup>。血清是由血浆去除纤维蛋白而形成的一种复杂混合物, 其含有细胞生长所需的生长因子、激素、载体蛋白、贴壁因子、微量元素以及其他营养物质, 可以有效地促进细胞生长和产物表达。然而, 血清的应用也存在许多问题: 易受病毒、支原体或其他病原体的污染; 批间差异造成产品批次间的质量难以严格控制; 大量血清蛋白的存在增加了下游分离纯化的难度, 部分蛋白难以通过分离纯化手段彻底去除, 影响了产品的最终质量; 此外, 血清来源困难、价格昂贵, 大规模动物细胞培养过程中使用血清将会大大增加生产成本。

为了克服血清带来的诸多不利因素, 近年来 MDCK 细胞的无血清培养技术取得了一些进展, 几种适合 MDCK 细胞贴壁生长的商业无血清培养基相继问世<sup>[8-13]</sup>。如美国 Sigma-Aldrich 和 Gibco 公司分别推出了 Ex-Cell MDCK 和 EpiSerf 无血清培养基。但这些商业培养基价格昂贵、配方保密, 只适用于部分小规模实验研究而不适合大规模生产; 不能直接满足特定细胞株和生物制品生产的需要, 给过程优化等研究开发工作带来诸多不利, 阻碍了其产

业化进程。因此, 开发可支持 MDCK 细胞大量扩增的化学成分明确的无血清培养基是一项必不可少的基础工作。

目前, MDCK 细胞的培养方法基本采用二维单细胞层贴壁培养。在单细胞层培养体系中, 细胞增殖易受到基质表面积的限制, 难以实现大规模生产, 且消化过程亦会增加工艺的复杂性、生产时间和成本。而单细胞悬浮培养可以不受细胞生长表面的限制, 易于实现细胞及产品的大规模生产。有关 MDCK 细胞培养方式、代谢特征和培养过程的研究工作不多<sup>[7]</sup>, 尤其未见单细胞悬浮培养方式的相关报道。因此, MDCK 细胞无血清单细胞悬浮培养系统的开发与研究对其产业化进程意义重大。

本文以 MDCK 细胞为研究对象, 分别在自制适合贴壁和单细胞悬浮培养无血清培养基中成功进行了无血清驯化, 并通过单细胞悬浮培养驯化方法, 首次获得了适合无血清单细胞悬浮培养的 MDCK 细胞株。在此基础上, 研究了有血清贴壁、无血清贴壁和无血清单细胞悬浮培养三种培养体系中 MDCK 细胞的生长代谢特性, 为 MDCK 细胞培养、病毒疫苗扩增的过程优化和放大奠定了基础, 同时也为其他动物细胞培养过程和疫苗等生物制品的工业化生产提供借鉴。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 细胞株

犬肾上皮连续细胞系 MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) 细胞, 购自 ATCC。

### 1.2 培养基

有血清培养基: DMEM (GIBCO 公司) 补加 584 mg/L 谷氨酰胺 (Sigma 公司), 3 700 mg/L 碳酸氢钠 (Sigma 公司), 实验中根据需要添加不同浓度

的新生牛血清 NBS (Newborn bovine serum, GIBCO 公司)。

**无血清培养基:** 在 DMEM/F12 (1:1) 培养基的基础上, 添加胰岛素、转铁蛋白、胆固醇、碳酸氢钠、HEPES、Pluronic F68 等成分配制而成, 经 Millipore 公司 0.1  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌。培养基配制所用的试剂均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

### 1.3 细胞培养方法

**MDCK 细胞方瓶贴壁培养:** 待细胞生长至铺满方瓶底部 80%~90% 后, 去掉培养基, 用无钙镁磷酸缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) (0.2 mL/cm<sup>2</sup>) 漂洗; 室温下用含 0.25% (W/V) 胰蛋白酶和 0.02% (W/V) EDTA 的无菌消化液 (0.2 mL/cm<sup>2</sup>) 消化 0.5~1 min; 倒掉大部分消化液, 置于 5% CO<sub>2</sub> 湿度培养箱 37 °C 孵育至细胞收缩变圆, 轻摇方瓶至脱落; 用预热好的培养基稀释接种到方瓶, 接种密度为  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  cells/mL。

**MDCK 细胞微载体搅拌瓶培养:** 微载体用 PBS 洗涤 3 次, 每次洗涤 30 min, 用移液管吸出 PBS 后灭菌待用。消化细胞后, 用预热好的培养基稀释细胞, 接种至装有微载体的无菌搅拌瓶, 接种密度为  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  cells/mL, 微载体用量为 2 mg/mL, 培养液体积为 200 mL。置于 36.8 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 搅拌瓶转速为 50 r/min, 每搅拌 10 min 后静置 20 min, 如此间歇搅拌 1.5 h, 之后改为连续搅拌。

**单细胞悬浮培养:** 以  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  cells/mL 的活细胞密度接种至方瓶或搅拌瓶。方瓶置于转速为 50 r/min 的摇床上培养, 搅拌瓶转速为 50 r/min。

### 1.4 细胞驯化方法

#### 1.4.1 无血清驯化方法

**逐步适应法:** 第一阶段将 MDCK 细胞从含 10% NBS 的 DMEM 培养基转至含 5% NBS 的培养基 (由含 10% NBS 的 DMEM 与无血清培养基 MDCK-SFM 按 1:1 混合而成); 第二阶段将细胞转至含 1% NBS 的培养基 (由含 10% NBS 的 DMEM 与无血清培养基 MDCK-SFM 按 1:9 混合而成);

第三阶段将细胞消化离心后转入到无血清培养基 MDCK-SFM。

#### 1.4.2 单细胞悬浮驯化方法

调整无血清培养基 MDCK-SFM 中组分及浓度, 采用硅化方瓶-摇床体系进行单细胞悬浮驯化。具体方法为: 方瓶表面用硅化剂处理, 以阻止细胞贴壁; 同时, 调整培养基组分, 使进一步优化后的培养基可以支持因硅化而未能贴壁的细胞增殖。先在优化后的培养基中静止培养 MDCK 细胞, 再将所得的细胞全部转移到摇床上培养 (50 r/min, 不分传以保证足够的细胞数量); 再将上清中的悬浮细胞转入硅化过的方瓶中置于摇床上培养, 刚开始每 2 天更换新鲜培养基但不分传, 待细胞比生长速率趋于稳定后每次传代前将细胞密度调整至适当值 (约  $3.0 \times 10^5$  cells/mL), 直至细胞完全失去黏附瓶壁的能力, 并能够以单细胞悬浮方式稳定增殖。

### 1.5 检测方法

#### 1.5.1 细胞计数

以台盼蓝染色, 用血球计数板计死细胞和活细胞数, 计算细胞活力。

活细胞密度 = 每大格活细胞平均数  $\times 10^4$ ;

细胞活性 = (活细胞数/细胞总数)  $\times 100\%$ 。

#### 1.5.2 葡萄糖、乳酸和氨浓度的测定

葡萄糖浓度采用葡萄糖试剂盒 (购自上海科欣生物技术研究所) 测定, 操作按使用说明书进行。

乳酸浓度用乳酸测定试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所) 测定, 操作按使用说明书进行。

氨浓度采用尿素氮 (BUN) 试剂盒 (购自上海申索试剂有限公司) Berthelot 比色法测定。本文直接测定样本中氨浓度, 故不使用试剂盒提供的脲酶和尿素氮校准液, 改用 5 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl 作为标准液。其他操作按使用说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 有血清贴壁培养

为了解 MDCK 细胞的基本生长代谢特性, 为无

血清培养基的开发及无血清驯化奠定基础, 首先考察了有血清培养基 (含 10% NBS 的 DMEM) 中贴壁培养的生长情况以及葡萄糖、乳酸和氨的基本代谢情况。

图 1 为 MDCK 细胞在含 10% NBS 的 DMEM 培养基中贴壁培养的生长曲线。接种后, 细胞经约 24 h 的延滞期, 进入对数生长期, 在 50 h 时可以达到最大比生长速率, 约  $0.036 \text{ h}^{-1}$ , 培养至 84 h 细胞密度达到最大值  $1.07 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ; 之后比生长速率和细胞活力迅速降低, 至 90 h 细胞比生长速率减少到  $0 \text{ h}^{-1}$ , 即进入生长稳定期; 稳定期非常短, 不到 12 h, 之后比生长速率继续下降, 即进入细胞衰亡期。

图 2 为 MDCK 细胞在有血清贴壁批培养中的葡萄糖、乳酸和氨浓度。由图可见, 细胞生长过程中累积消耗  $13.87 \text{ mmol/L}$  葡萄糖, 累积产生乳酸  $23.42 \text{ mmol/L}$ , 过程中乳酸对葡萄糖的得率约为  $1.69 \text{ mmol/mmol}$ , 表明约有 84.43% 的葡萄糖经糖酵解途径生成的丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下生成了乳酸; 同时最终整个培养过程共产生了  $4.56 \text{ mmol/L}$  氨。

## 2.2 无血清贴壁培养

### 2.2.1 无血清贴壁驯化

采用逐步适应法驯化过程中的细胞生长情况如图 3 所示。第一阶段为第 6~14 天, 细胞并未出现明

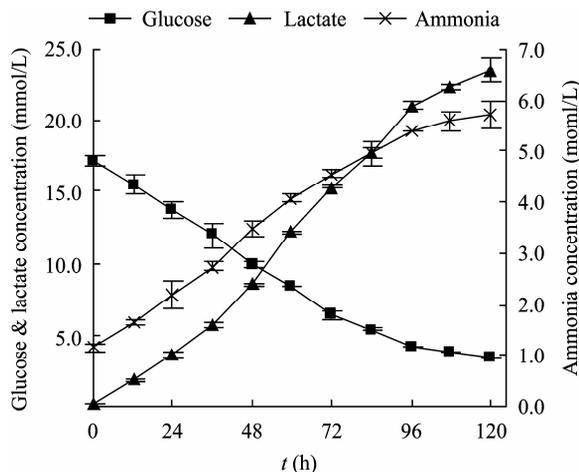


图 2 MDCK 细胞有血清贴壁批培养中的葡萄糖、乳酸、氨浓度

Fig. 2 Glucose, lactate and ammonia concentration in batch culture of adherent MDCK cells with serum containing medium.

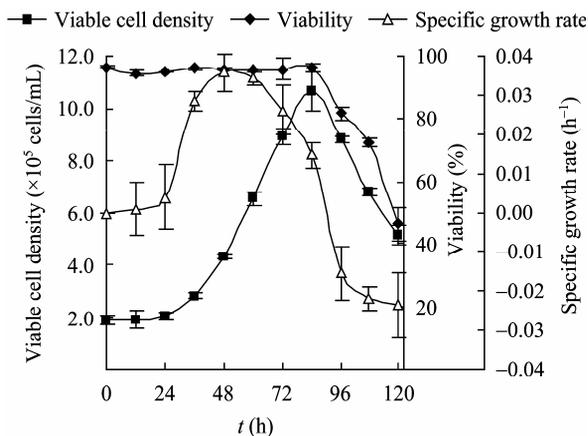


图 1 MDCK 细胞有血清贴壁批培养的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of adherent MDCK cells in batch culture with serum containing medium.

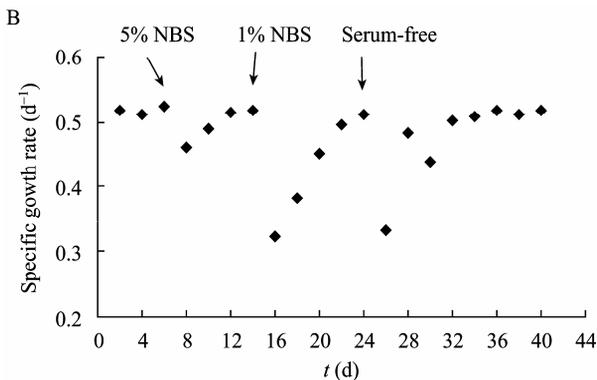
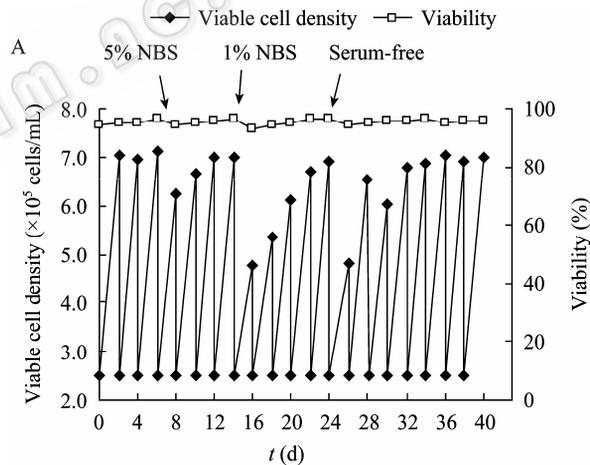


图 3 逐步适应法驯化过程中 MDCK 细胞生长情况

Fig. 3 Changes of cell growth during gradual adaptation. (A) Changes of viability and viable cell density. (B) Changes of specific growth rate.

显的不适应, 最大细胞密度  $X_{\max}$ 、细胞活性和细胞平均比生长速率  $\bar{\mu}$  略有下降, 至第 12 天 (即含 5% NBS 培养基中培养 6 d) 细胞生长状态恢复到初始水平; 第二阶段为第 14~24 天, 细胞的平均比生长速率  $\bar{\mu}$  从  $0.51 \text{ d}^{-1}$  下降到  $0.32 \text{ d}^{-1}$ , 但之后细胞状态迅速恢复, 传代 4 次即恢复到初始状态; 第三阶段为第 24~32 天, 细胞消化离心后直接转到 MDCK-SFM 中培养, 细胞活性和比生长速率出现短暂下降, 经 2 代培养即可恢复。经 26 d 驯化后, 细胞状态与有血清培养基中相当, 平均比生长速率保持在 0.52 左右, 活性维持在 95% 以上, 接种后培养 2 d 最大活细胞密度  $X_{\max}$  可达  $6.95 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  左右, 与含 10% NBS 的 DMEM 培养基中 ( $\bar{\mu}=0.52 \text{ d}^{-1}$ ;  $V=96.45\%$ ;  $X_{\max}=6.99 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ ) 相当, 表明已完成细胞从有血清培养到无血清培养的驯化过程。

从细胞形态学方面看, 驯化后在无血清培养基中贴壁生长的 MDCK 细胞贴壁均匀, 细胞边缘轮廓不是很明显, 细胞之间结合则更加紧密, 而无血清适应前在有血清培养基 (含 10% NBS 的 DMEM 培养基) 中贴壁生长的 MDCK 细胞轮廓十分清晰, 细胞之间结合不似无血清细胞紧致。驯化前后细胞形态对比如图 4 所示。

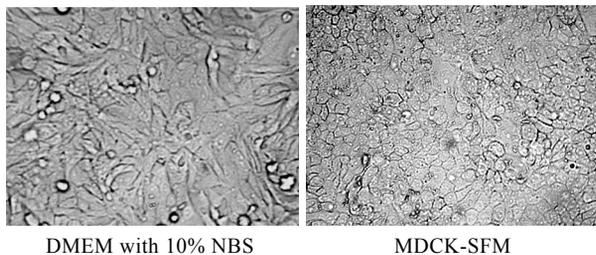


图 4 MDCK 细胞在无血清驯化前后贴壁培养形态对比  
Fig. 4 Morphological comparison of adherent MDCK cells in adherent culture before and after serum-free adaptation.

### 2.2.2 无血清贴壁批培养

图 5 为 MDCK-SFM 中 MDCK 贴壁细胞生长情况, 由图可见, 在无血清培养基 MDCK-SFM 中, MDCK 细胞的生长过程中延滞期较短, 仅为 12 h 左右, 此后即进入对数生长期, 在 36 h 时达最大比生

长速率, 约  $0.035 \text{ h}^{-1}$ , 至 84 h 后细胞密度达到最大值  $1.10 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ; 之后比生长速率迅速降低, 至 96 h 时减少到  $0 \text{ h}^{-1}$ , 即进入生长稳定期; 此后比生长速率继续下降, 细胞进入衰亡期。

如图 6 所示, 在 MDCK 细胞无血清贴壁批培养过程中共累积消耗葡萄糖  $14.33 \text{ mmol/L}$ , 累积产生  $15.21 \text{ mmol/L}$  乳酸, 乳酸对葡萄糖的得率约为  $1.06 \text{ mmol/mmol}$ , 表明约有 53.04% 的葡萄糖经糖酵解途径生成的丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下生成了乳酸; 同时, 整个培养过程共生成  $4.55 \text{ mmol/L}$  氨。

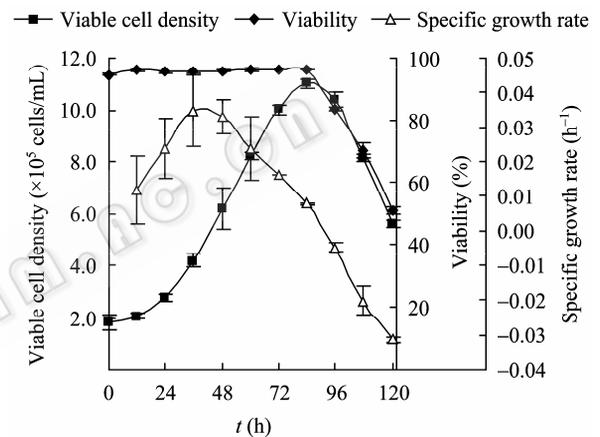


图 5 无血清贴壁批培养中 MDCK 贴壁细胞生长情况  
Fig. 5 Growth of adherent MDCK cells in serum-free batch culture.

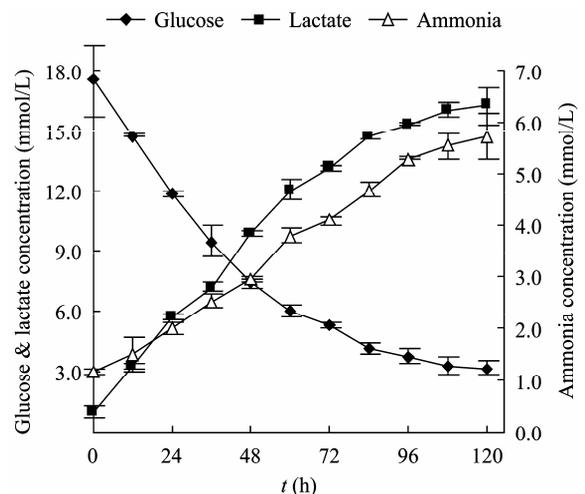


图 6 MDCK 细胞无血清贴壁批培养中的葡萄糖、乳酸、氨浓度  
Fig. 6 Glucose, lactate and ammonia concentration in adherent batch culture of MDCK cell with serum-free medium.

## 2.3 无血清单细胞悬浮培养

### 2.3.1 无血清单细胞悬浮驯化

MDCK 细胞的单细胞悬浮驯化过程为：先在适合单细胞悬浮培养的无血清培养基中静止培养 MDCK 细胞，细胞部分贴壁，大部分悬浮于上清液中；再将所得细胞全部转移到摇床上培养（不分传以保证足够的细胞量，转速为 50 r/min，对应图 7 中 2 d 处），悬浮细胞明显增殖；再将上清中的悬浮细胞转入硅化过的方瓶中置摇床上培养，刚开始每 2 天将细胞 1:2 传代（对应图 7 中 4 d 处），待细胞比生长速率趋于稳定后每次传代前将细胞密度调整到  $3.0 \times 10^5$  左右，2~3 代后细胞基本失去黏附能力，能够以单细胞悬浮方式稳定增殖，即单细胞悬浮驯化成功。

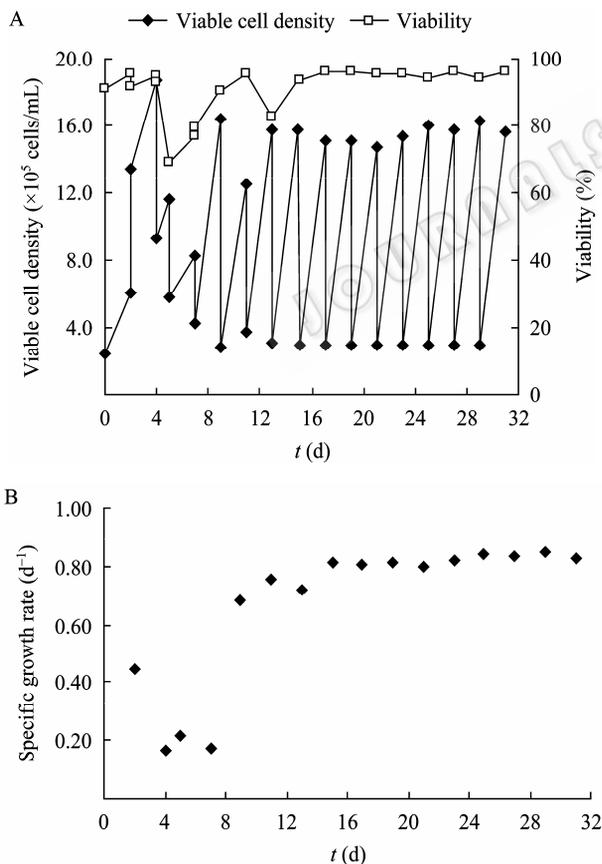


图 7 单细胞悬浮驯化过程中 MDCK 细胞生长情况变化  
Fig. 7 Changes of cell growth during adaptation of MDCK to single-cell suspension cells. (A) Changes of viability and viable cell density. (B) Changes of specific growth rate.

从图 7 中可知，在适合单细胞悬浮培养的无血清培养基中驯化 2 周左右即可使 MDCK 细胞脱离贴壁依赖性，获得适合单细胞悬浮方式稳定生长的细胞株。细胞生长状态稳定后，平均比生长速率  $\mu$  可达  $0.84 d^{-1}$ ，最大细胞密度  $X_{max}$  维持在  $1.60 \times 10^6$  cells/mL 左右，细胞活力  $V$  可保持在 96% 以上。驯化得到的细胞命名为 ssf-MDCK 细胞株。

### 2.3.2 无血清单细胞悬浮批培养

本节考察了 MDCK 单细胞悬浮细胞株 ssf-MDCK 在优化的无血清培养基 MDCK-SHP 中的生长和基本代谢情况。从图 8 中可以看出，MDCK 细胞单细胞悬浮培养过程中基本不出现延滞期，仅前 12 h 细胞生长略显缓慢，此后即迅速进入对数生长期，在 36 h 时可以达到最大比生长速率，约  $0.056 h^{-1}$ ，至 72 h 细胞密度达到最大值  $3.81 \times 10^6$  cells/mL；之后比生长速率迅速降低，至 80 h 时减少到  $0 h^{-1}$ ，即进入生长稳定期，到此时细胞活力始终维持在 96% 左右；与贴壁培养的 MDCK 细胞相似，单细胞悬浮生长的 MDCK 细胞稳定生长期也不长，经历不到 12 h 的稳定期后比生长速率便迅速下降，进入衰亡期。

ssf-MDCK 细胞单细胞悬浮培养过程的基本代谢情况如图 9 所示。批培养过程中累积消耗葡萄糖 17.54 mmol/L，累积产生 22.98 mmol/L 乳酸，乳酸对葡萄糖的得率约为 1.31 mmol/mmol，表明约有 70.75% 的葡萄糖经糖酵解途径生成的丙酮酸在乳

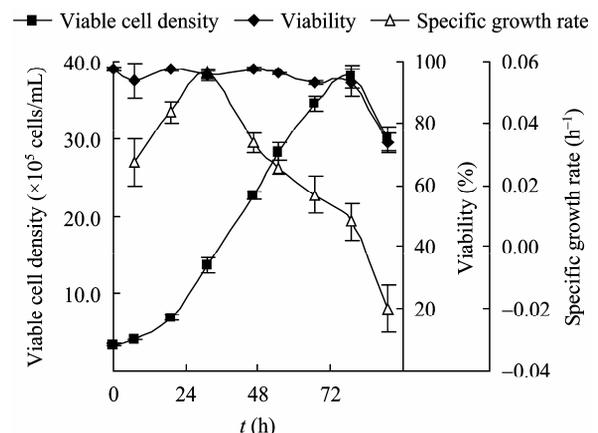


图 8 单细胞悬浮批培养过程中 MDCK 生长情况  
Fig. 8 Growth of MDCK cells in single-cell suspension batch culture.

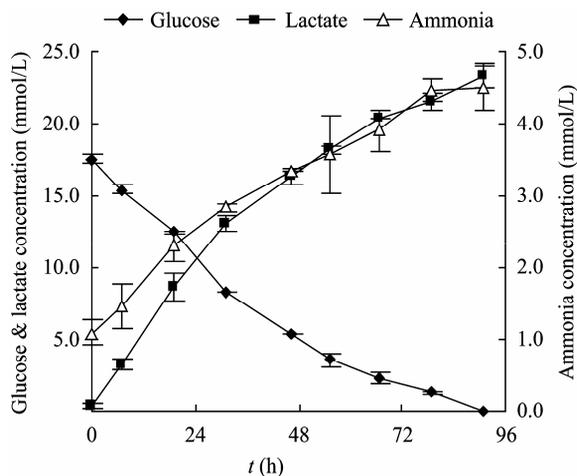


图 9 MDCK 细胞单细胞悬浮培养批培养过程中的葡萄糖、乳酸、氨浓度

Fig. 9 Glucose, lactate and ammonia concentration in single-cell suspension batch culture of MDCK cells.

酸脱氢酶的作用下生成了乳酸；同时，整个培养过程共生成 3.42 mmol/L 氨。

### 2.3.3 三种培养体系中 MDCK 细胞生长代谢比较

通过对 MDCK 细胞的有血清贴壁、无血清贴壁和无血清单细胞悬浮培养 3 种培养过程中细胞的生长和基本代谢情况进行比较，发现（如表 1 所示）：无血清贴壁培养过程中 MDCK 细胞生长的延滞期为有血清贴壁过程的 50%，表明无血清培养过程

MDCK 细胞在接种后能快速适应环境，且生长速度快；乳酸比生成速率、氨比生成速率和乳酸对葡萄糖的转化率分别为有血清贴壁培养过程的 58.19%、82.80% 和 64.81%，这意味着无血清贴壁培养过程 MDCK 细胞产代谢副产物少，有利于培养环境的稳定，使得过程更易控制，从而有利于细胞的维持和病毒的扩增。

无血清单细胞悬浮培养过程的延滞期、细胞倍增时间和最大比生长速率分别为有血清贴壁培养的 25.00%、63.16% 和 156.86%，说明无血清培养过程中培养环境对细胞生长有利，细胞生长速度快，易于在短时间内扩大培养规模；最大活细胞密度、活细胞密度对时间的积分和细胞增殖倍数分别为有血清贴壁培养过程的 357.28%、335.06% 和 200.53%，表明无血清培养可支持 MDCK 细胞高密度生长；葡萄糖比消耗速率、乳酸比生成速率、氨比生成速率和乳酸对葡萄糖的转化率分别为有血清贴壁培养过程的 38.81%、31.57%、24.19% 和 81.48%，这意味着无血清单细胞悬浮培养过程中 MDCK 细胞耗葡萄糖少，生成代谢副产物较少，有利于支持细胞更高密度生长、维持和病毒的扩增，同时能有效缓解规模放大中的许多问题。

表 1 MDCK 细胞有血清贴壁培养、无血清贴壁培养和无血清单细胞悬浮培养的比较

Table 1 Performance comparison among serum-containing adherent culture, serum-free adherent culture and serum-free single-cell suspension culture of MDCK cells

	Serum-containing adherent culture	Serum-free	
		Adherent culture	Single-cell suspension culture
Lag phase (h)	~24	~12	~6
Doubling time (h)	19±2	19±4	12
Time of peak viable density (h)	84	84	79
Duration (h)	101±1	100±1	88±1
Integral of viable cell concentration (10 <sup>9</sup> cells·day/L)	2.31±0.31	2.72±0.06	7.74±0.14
Peak viable density (10 <sup>5</sup> cells/mL)	10.65±0.16	11.02±0.78	38.05±1.48
Cell viability during log phase (%)	95.76±0.47	95.94	96.50±0.51
Expansion fold of viable cell density (fold)	5.61±0.94	6.12±0.09	11.25±0.27
Peak specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	0.036±0.005	0.035±0.008	0.056±0.002
Specific glucose consumption rate (mmol/(10 <sup>9</sup> cells·d))	5.72±0.34	5.15±1.12	2.22
Specific lactate production rate (mmol/(10 <sup>9</sup> cells·d))	9.28±0.70	5.40	2.93±0.04
Specific ammonia production rate (mmol/(10 <sup>9</sup> cells·d))	1.86±0.15	1.54±0.01	0.45
Lactate produced/glucose consumed (mmol/mmol)	1.62±0.03	1.05±0.20	1.32±0.02

Integral of viable cell concentration and duration were calculated until the viability decreased to approximately 80%.

综上所述, MDCK 细胞无血清培养过程中, 细胞能够更高效地利用葡萄糖, 仅生成少量代谢副产物, 能支持较高的细胞密度和比生长速率, 尤其是无血清单细胞悬浮培养过程中最大细胞密度和最大比生长速率分别为有血清贴壁培养过程的 3.6 倍和 1.6 倍。这些结果对 MDCK 细胞大规模培养和病毒扩增过程优化和放大具有重要的应用价值。

### 3 结论

本研究首先考察了 MDCK 细胞在含血清培养基 (含 10% NBS 的 DMEM 培养基) 中生长和代谢特性, 在自制无血清培养基 MDCK-SFM 中成功实现了 MDCK 细胞从有血清培养到无血清培养的驯化; 进一步采用硅化方瓶-摇床体系实现了 MDCK 细胞的无血清单细胞悬浮培养, 获得了适合于无血清单细胞悬浮培养的 ssf-MDCK 细胞。

通过对有血清贴壁培养、无血清贴壁培养和无血清单细胞悬浮培养 3 种培养过程中 MDCK 细胞的生长和基本代谢情况的比较发现: 无血清贴壁培养过程中细胞的延滞期明显较有血清培养过程缩短, 细胞比生长速率增大, 最大活细胞密度和对数生长期细胞活力与有血清培养过程相近, 乳酸、氨的比生成速率及乳酸对葡萄糖的转化率降低。无血清单细胞悬浮培养过程中细胞延滞期进一步缩短, 细胞生长速度增快, 活细胞密度和细胞活力提高, 葡萄糖比消耗速率、乳酸和氨的比生成速率都大幅降低, 而乳酸对葡萄糖的转化率有所升高。

综上所述, 无血清培养过程可以克服血清的引入所带来的种种问题, 尤其是单细胞悬浮培养方式由于细胞生长快、所支持的细胞密度高、代谢副产物产率低等优点使得更易于实现高密度的培养过程, 有利于过程优化和放大, 具有重要的应用价值, 对病毒疫苗等制品的生产工业意义重大。

### REFERENCES

[1] Madin SH, Darby JNB. Established kidney cell lines of  
Journals.im.ac.cn

normal adult bovine and ovine origin. Proc Soc Exp Biol Med, 1958, 98(3): 574-576.

- [2] Rodgers SE, Barton ES, Oberhaus SM, et al. Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. J Virol, 1997, 71: 2540-2546.
- [3] Mochizuki M. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. Vaccine, 2006, 24: 1744-1748.
- [4] Mochizuki M, Hashimoto T. Growth of feline panleukopenia virus and canine parvovirus *in vitro*. Jpn J Vet Sci, 1996, 48(4): 841-844.
- [5] Subbarao K, Klimov A, Jacqueline Katz, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science, 1998, 279: 393-396.
- [6] Tree JA, Richardson C, Fooks AR, et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. Vaccine, 2001, 19: 3444-3450.
- [7] Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. Expert Rev Vaccine. 2009, 8(12): 1681-1692.
- [8] Taub M, Chuman L, Saier MH, Sato G. Growth of madin-darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line in hormone-supplemented, serum-free medium. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 3338-3342.
- [9] Merten OW, Kierulff KV, Castignolles N, et al. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. Cytotechnology, 1994, 14: 47-59.
- [10] Merten OW, Kallel H, Manuguerra JC, et al. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. Cytotechnology, 1999, 30: 191-201.
- [11] Mochizuki M. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. Vaccine, 2006, 24: 1744-1748.
- [12] Genzel Y, Olmer RM, Schafer B, et al. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. Vaccine, 2006, 24: 6074-6087.
- [13] Tree JA, Richardson C, Fooks AR, et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. Vaccine, 2001, 19: 3444-3450.