

# 大规模动物细胞培养技术研究进展

邹寿长<sup>1</sup>, 李干祥<sup>2</sup>, 杨葆生<sup>2</sup>, 徐秀英<sup>3</sup>

(1. 中信股份有限公司, 中国广东 深圳 518002;

2. 深圳市斯贝克生物药业有限公司, 中国广东 深圳 518129;

3. 军事医学科学院生物工程研究所, 中国北京 100071)

**摘要:** 利用动物细胞大规模培养技术可生产多种生物制品。为提高细胞活力和表达水平及有利于表达产物的纯化, 采用有多种添加成分的无血清培养基培养细胞, 选择更有利于细胞生长又可提高培养细胞密度的微载体和条件温和、易操作、气体交换速度快的生物反应器。在线监控细胞生存环境和生理活动, 减少培养过程培养基中的抑制因素, 可创造更适合细胞生存的环境, 提高表达水平。向细胞中导入抗凋亡基因, 可提高细胞活性和蛋白产量。利用多孔微载体以球转球方式大规模培养动物细胞有很好的发展前景。

**关键词:** 细胞培养; 生物反应器; 动物细胞; 微载体

中图分类号: Q813.11; Q952

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2001)02-0102-07

## Progress in Technology for Scale-up Culture of Animal Cells

ZOU Shou-chang<sup>1</sup>, LI Gan-xiang<sup>2</sup>, YANG Bao-sheng<sup>2</sup>, XU Xiu-ying<sup>3</sup>

(1. CITIC-Xiangya Holdings Co. Ltd, Shenzhen 518002, Guangdong, China;

2. Shenzhen SPEC Bio-Pharmaceutical Industry Co. Ltd, Shenzhen 518129, Guangdong, China;

3. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**Abstract:** Many biological products were manufactured by means of large-up culture of animal cells. To increase the cell-specific productivity and to facilitate purification, serum-free media supplemented with several nutriment were used for cell culture, and microcarriers were chosen in favor of cell growth and high cell density. Bioreactors with simple manipulation, good qualification and aeration were adopted. More suitable conditions for cell growth could be given, and higher expression level could be gained through on-line supervising the environment for cell growth and decreasing restraint factors in cell culturing. The expression of anti-apoptosis genes using recombinant DNA technology could increase cell viability and productivity. The beads-to-beads transfer method of porous microcarriers was emphasized in large-up culture of animal cells.

**Key words:** cell culture; bioreactor; animal cell; microcarrier

(*Life Science Research*, 2001, 5(2): 102~108)

动物细胞培养开始于本世纪初。1962年, 其规模开始扩大, 发展至今已成为生物、医学研究和应用中广泛采用的技术方法, 利用动物细胞培养生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单抗等, 已成为医药生物高技术产业的重要部分<sup>[1]</sup>。

利用动物细胞培养技术生产的生物制品已占世界生物高技术产品市场份额的50%<sup>[2]</sup>。大量资料表明, 生物技术药物是当前新药开发的重要领域, 生物技术制药工业是下一个10年制药工业的重要新门类, 期间将有数百种生物技术新药上市<sup>[3]</sup>。美

收稿日期: 2000-10-26; 修回日期: 2001-02-12

作者简介: 邹寿长(1965-), 男, 湖南溆浦人, 博士研究生, 从事生物工程产业化实践及生命伦理学研究, Tel: +86-0755-5114336, E-mail: zouse@inetcall.com; 李干祥(1965-), 男, 湖南邵阳人, 副总工程师, 从事GMP管理和生物制药, Tel: +86-0755-8760851-189; 杨葆生(1964-), 男, 湖南隆回人, 硕士, 从事生物制药, E-mail: comind@sina.com; 徐秀英(1951-), 女, 福建福州人, 硕士研究生导师, 从事生物工程产品的研究和开发。

国最新预测几种畅销基因工程药物 2000 年全球销售额 EPO 大于 30 亿美元, G-CSF 大于 20 亿美元, HGH、IFN、UK 均大于 10 亿美元, 胰岛素和降钙素大于 5 亿美元<sup>[4]</sup>。动物细胞大规模培养技术是生物技术制药中非常重要的环节。目前, 动物细胞大规模培养技术水平的提高主要集中在培养规模的进一步扩大、优化细胞培养环境、改变细胞特性、提高产品的产率与保证其质量上。

## 1 细胞培养环境的最优化

在大规模培养动物细胞的过程中, 最根本的是使细胞的培养条件达到最优化, 尽可能消除或减轻环境对细胞的影响, 维持细胞高存活力和高效表达, 同时又要充分考虑细胞表达产物的后续纯化。

### 1.1 配制细胞生长最适合的培养基

动物细胞培养基是细胞赖以体外生长、增殖、分化的重要因素。目前, 大规模动物细胞培养中已经普遍使用无血清培养基, 在此之前使用过天然培养基、合成培养基<sup>[1]</sup>。无血清培养基避免了血清培养基污染的可能性, 并减少了纯化的难度。但无血清培养基没有广泛的适应性, 不同的细胞甚至不同的细胞株和细胞系有各自独立的无血型培养基配方。如在 DMEM F12(1:1) 培养基中添加了 Se、乙醇胺、多种维生素、蛋白胍、胰岛素、转铁蛋白和一些细胞因子, 构成了 SFM-p。SFM-p 不含牛血清白蛋白而能维持细胞生长和 rHuEPO 的生产<sup>[5]</sup>。但采用无血清培养而诱发的细胞凋亡也成为动物细胞无血清培养技术中急待解决的问题。在培养基中加入某些化合物, 如金精三羧酸(ATA)、锌离子、抗氧化剂和细胞因子等, 在一定程度上可阻止因采用无血清培养基而导致的细胞凋亡<sup>[2]</sup>。

### 1.2 生物反应器的选择

动物细胞的大规模培养需要特殊的生物反应器。与微生物和植物细胞不同, 动物细胞的外层是质膜, 脆性大, 在反应器中务必减少剪切力<sup>[6]</sup>。自 70 年代以来, 用于动物细胞培养的生物反应器有很大的发展, 种类越来越多, 规模越来越大。根据生物反应器的用途不同, 有悬浮培养用、贴壁培养用和包埋培养用生物反应器等<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.1 气升式(air lift)生物反应器

气升式生物反应器的基本原理是气体混合物从底部的喷射管进入反应器的中央导流管, 使得中央导流管侧的液体密度低于外部区域从而形成循

环。气升式生物反应器主要采用内循环, 但也有采用外循环式。1979 年 Katinger 等首次应用气生式生物反应器进行动物细胞悬浮培养。英国 Celltech 公司是应用气生式生物反应器进行动物细胞大规模培养的成功范例, 1985 年应用 100 L 规模的气生式生物反应器进行大规模培养杂交瘤细胞。该公司已经开发出了 10 000 L 规模的气生式生物反应器用于各类单抗的大量生产。国内已经有人设计制造了 10 L 规模的气生式生物反应器用于培养哺乳动物细胞、昆虫细胞等各类生物制品<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.2 中空纤维管(hollow-fiber)生物反应器

其原理为泵动培养液通过成束的合成空心纤维管(毛细管)而使细胞固着在毛细管内壁生长。如果毛细管的直径为 350  $\mu\text{m}$ , 表面积/体积比率为 30.7, 大量成束的毛细管内壁提供了大量的生长表面积。它的用途较广, 既可培养悬浮生长的细胞, 又可培养贴壁依赖性细胞, 细胞密度最高可达  $10^9 \text{ mL}^{-1}$ 。主要用于杂交瘤细胞生产单克隆抗体。

#### 1.2.3 流化床(fluidized bed)生物反应器(FBR)

流化床生物反应器的基本原理是培养液通过反应器垂直向上循环流动, 不断提供给细胞必要的营养成分, 使细胞得以在微粒中生长; 同时, 不断加入新鲜培养液。这种反应器的传质性能好, 并在循环系统中采用膜气体交换器, 能快速提供给高密度细胞所需要的氧, 同时排出代谢产物; 反应器中的液体流速足以使细胞微粒悬浮却不损坏脆弱的细胞。流化床生物反应器满足了高密度细胞培养, 使高产量细胞长时间停留在反应器中, 优化了细胞生长与产物合成的环境等细胞培养的要求。可用于贴壁依赖性细胞和非贴壁依赖性细胞的培养<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.4 搅拌罐(stir tank)生物反应器(STR)

B. Braun MD10 搅拌罐生物反应器, 内装一个 100  $\mu\text{m}$  孔径的旋转滤器, 工作体积为 8 L。一个数字控制装置(DCU)用于控制温度、pH 值、搅拌速度和溶氧(DO)。底部的环形喷气结构起通气作用<sup>[9]</sup>。新鲜培养基分散进入旋转滤器的外部区域, 从旋转滤器的中间获得无微载体的收集液。旋转滤器一般由不锈钢丝网构成, 有良好的生物相容性, 易于清洗和消毒, 可重复和长期使用。这种装置已经大规模悬浮培养多种细胞。

#### 1.2.5 固定床(fixed bed)生物反应器

在流化床玻璃柱的底部加一个有 0.5 mm 小孔的钢网。但培养基循环的方向相反, 微载体堆积

于钢网上没有移动。固化床内的线性流速减低至 14 cm/min (流化床内的线性流速 75 cm/min), 气体通过硅胶膜扩散。把外部通气装置的通气管长度从 10 m 缩短至 2 m, 可以减少工作体积大于 70 ~ 100 mL。开孔玻璃载体(硼酸硅玻璃)直径 400 ~ 700  $\mu\text{m}$ , 孔径 60 ~ 120  $\mu\text{m}$ , 孔积率 50%, 可供细胞附着<sup>[10]</sup>。

### 1. 2. 6 堆积床(packed bed)生物反应器

Celligen Plus 堆积床生物反应器的工作原理为: 当推进器(impeller)旋转时, 培养基通过推进器的中心空管螺旋式地从罐体底部往上流, 然后从 3 个出口中流出, 通过堆积床向下流动至罐体底部, 再通过推进器的中心管往上流。细胞附着在堆积床的聚酯片上, 气体从喷射器喷出进入培养基中。通过调节气体混合物的组成成分, 完成对 pH 和 DO 的控制, 加入氧气或氮气以满足培养过程中氧气的吸收; 当 pH 太高时加入 CO<sub>2</sub>; 空气作为一种填充气体, 保持气体进入罐体时流速的稳定。培养基通过蠕动泵从培养基储存瓶(media reservoir)中进入反应器, 收集液通过蠕动泵从反应器中流出进入收集瓶。堆积床有以下特点: 贴壁依赖性和悬浮细胞可成功地在堆积床内附着; 细胞不接触气液界面, 低漩流和低剪切力, 细胞受到的伤害很小; 反应器能以分批式或连续/灌流方式运转, 并可维持长时间; 聚酯片提供高的表面积/体积比率, 维持高细胞密度。

### 1. 2. 7 一次性(disposable)生物反应器

这种生物反应器由预先消毒的、FDA 认可的、对生物无害的聚乙烯塑料箱组成, 箱中部分填充培养基并接种细胞。箱中其余部分是空气, 培养过程中空气连续通过这里, 空气通过完整的过滤器进入箱体。前后摇动箱体使液气界面产生波动, 大大提高了氧气的溶解量, 有利于排出 CO<sub>2</sub> 控制 pH 值, 也促使培养液混合均匀, 细胞和颗粒不会下沉。废气通过一个消毒过滤器和逆止阀。整个生物反应器置于传统的细胞培养用 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 便于控制温度和 pH 值, 或者在箱体底部加热控制温度。培养细胞的密度可达到  $7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  和 100 L 的工作体积。使用前箱体用  $\gamma$  射线消毒, 用后丢弃。特殊的开孔可进行无菌加样、取样, 而不必把生物反应器置于层流罩中。装置简单, 易于操作, 成本低, 低剪切力, 无空气鼓泡减低了气泡对细胞的损害。可用于培养动物细胞和植物细胞, 并十分适合生产病毒。已经此反应器成功悬浮培

养重组 NS0 细胞生产单克隆抗体; 悬浮培养人 293 细胞生产腺病毒(adenovirus); 用昆虫 s19 细胞生产棒状病毒(baculovirus); 用微载体 Cytodex 3 培养人 393 细胞。

### 1. 3 微载体的选择

许多被培养的动物细胞都是贴壁依赖性细胞, 所以大规模动物细胞培养中都使用微载体。理想的微载体应有利于细胞的快速附着和扩展, 有利于细胞高密度生长, 不干涉代谢产物的合成和分泌, 允许细胞易于脱落<sup>[12]</sup>。自 1967 年以来, 微载体已成功应用于培养原代细胞和建立细胞系, 如 CHO 细胞和 VERO 细胞, 以生产重组蛋白。而且自使用微载体后已经取得了许多技术上的进步。微载体的大小和电荷量达到了最优化, 以提高细胞的生长能力; 表层材料如骨胶原/明胶、玻璃、聚赖氨酸用于微载体的表面; 微载体的基质材料更多, 如 DEAE-葡聚糖、骨胶原/明胶、玻璃、聚丙烯、聚丙烯酰胺、纤维素。球形微载体因制造容易而普遍使用, 近年来开始使用的多孔微载体可提供大的表面积/体积比率和最大的细胞密度<sup>[13]</sup>。细胞成功地在微载体上扩展的能力随细胞系和培养基不同而变化, 为特定细胞选择合适的微载体比选择微载体本身更重要。选择微载体对细胞附着、细胞的进一步扩展和重组蛋白的表达有更大的影响。以下为部分微载体的介绍(见表 1)。

Cytodex 和 Cytopore 微载体都适合高密度细胞培养。因为 Cytopore 微载体有更大的表面积, 漂浮的细胞比率低, 细胞生长速度更快, 所以比 Cytodex 微载体更适合高密度细胞培养。Cytodex 1 和 Cytodex 3 有更快的细胞转移速度, 细胞的球转球过程在微载体之间完成, 而不是通过漂浮的细胞。因大多数细胞生活在多孔的 Cytopore 微载体内, 表面的细胞较少, 降低了细胞的转移速度, 所以 Cytodex 和 Cytopore 微载体有不同的细胞转移速度。

多孔微载体的研制替代了容易使细胞受机械搅拌与喷气损伤的常规载体。对于有些细胞株尽可能贴在微载体内, 但“移动性”很差, 因此需要发明一种更好的培养方式, 提高微孔的开放性或者改善其表面特性, 从而提高细胞贴壁率同时增加细胞移动性。

军事医学科学院在化工冶金研究所的协助下用聚苯乙烯试制了 SH-2 型微载体, 可以耐受

表 1 部分微载体  
Table 1 Some microcarriers

微载体 Microcarrier	厂家 Maker	类型 Type	基质 Matrix	电荷 Charge Q/C	密度 Density $\rho / (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	小孔直径 Size d/ $\mu\text{m}$	面积 Area A/ $(\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	装载量 Load $\rho / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
Biosilon	Nunc	实心	聚丙烯乙烯	-	1.05	160 ~ 300	255	20
Cytodex 1	Pharmacia	实心	DEAE-葡聚糖	+	1.03	147 ~ 248	4400	2.5
Cytodex 3	Pharmacia	实心	DEAE-葡聚糖	+	1.04	141 ~ 211	2700	2.5
Collagen	SoloHill	实心	聚丙烯乙烯	无	1.03	150 ~ 210	325	20
Plastic	SoloHill	实心	聚丙烯乙烯	无	1.03	150 ~ 210	325	20
FACT	SoloHill	实心	聚丙烯乙烯	无	1.03	150 ~ 210	325	20
ProNectin	SoloHill	实心	聚丙烯乙烯	无	1.03	150 ~ 210	325	20
Plastic Plus	SoloHill	实心	聚丙烯乙烯	+	1.03	150 ~ 210	325	20
Culispher-G	Hyclone	多孔	明胶	无	1.04	170 ~ 270	-	1
Culispher-GL	Hyclone	多孔	明胶	无	1.04	170 ~ 270	-	1
Cultispher-S	Hyclone	多孔	明胶	无	1.04	170 ~ 270	-	1
Cytopore 1	Pharmacia	多孔	纤维素	+ 1.1	1.03	200 ~ 280	11 000	1
Cytopore 2	Pharmacia	多孔	纤维素	+ 1.8	1.03	200 ~ 280	11 000	1

110 高压蒸汽灭菌, 在 121 °C 下使用也仅部分结团. 使用后经胰酶消化、硫化处理后可以反复使用. 采用 SH-2 型微载体和新研制的低血清培养基添加剂 BIGBEGF-2, 在改进了的灌流系统控制下灌流培养产尿激酶原 CHO 工程细胞 CL-11G, 所得细胞密度超过  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ , 尿激酶原平均活性为 4 007 IU/mL, 最高达 6 614 IU/mL, 均高于以前采用 5% 血清培养基和 Biosilon 微载体培养时的水平<sup>[14]</sup>. 此外, 还用 CT-3 型微载体(由华东理工大学研制)成功培养了 Vero 细胞<sup>[15]</sup>.

#### 1.4 过程监控

大规模动物细胞培养中, 生物离线取样特别是产物浓度测定需要较长的时间, 不能及时反应细胞生存环境中的各种参数变化. 在线过程监控显得非常重要, 可以创造适合细胞生存的最佳环境, 减少污染. 现已经能对温度、pH 值、溶解氧浓度进行在线分析, 并可进行有效控制. 最近几年中有关细胞培养过程监控的研究迅速增多. 测量在线氧吸收速率确定从细胞生长期生产病毒到感染期和细胞死亡后终止感染的转换时间; 用在线葡萄糖分析仪的测定调整灌流速度<sup>[1]</sup>; 估测目前和未来生物反应过程中葡萄糖的吸收率及乳糖的生成率的软件已经研制成功<sup>[16]</sup>.

#### 1.5 维持细胞培养所需的最佳条件

影响细胞培养的主要因素有: CO<sub>2</sub>、溶氧 (DO)、温度、pH 值、葡萄糖、氨、乳酸、甲基乙二醛 (MG)、培养基成分等. 一般来说, 最适 CO<sub>2</sub> 水平

为 4% ~ 10%<sup>[1]</sup>, 溶氧维持在 20% ~ 50%, 温度大多数在 37 °C, pH 值在 7.0 ~ 7.4 之间. 葡萄糖是细胞培养过程中主要的能量来源, 必须维持在一定水平. 氨、乳酸、甲基乙二醛 (MG) 等是动物细胞培养的主要限制因素. 氨离子抑制 Gln 代谢途径, 应限制 Gln 用量, 并尽可能去除培养基中的氨; 高浓度乳酸抑制细胞生长, 应降低培养基中葡萄糖浓度以减少乳酸产生, 在大规模动物细胞培养中常常添加果糖, 以减少葡萄糖的使用量; 甲基乙二醛 (MG) 能改变氨基酸、蛋白质和核酸的氨基和巯基, 也主要通过降低葡萄糖用量来降低 MG 浓度.

## 2 改变细胞特性

在大规模动物细胞培养的初期, 细胞数量不断增加, 表达重组蛋白的能力也在逐步提高. 细胞表达随细胞数量达到顶峰之后, 细胞数量和表达水平将下降. 因为用于生产具有重要医用作用的生物活性蛋白的工程细胞, 其基因组普遍整合了病毒载体, 这就从根本上决定了细胞最终命运是细胞凋亡. 目前已知参与细胞凋亡调控基因包括 c-myc、c-jun、bcl-2、c-fos、ras、p53、bcl-x、bax 等, 有些促进细胞凋亡, 有些抑制细胞凋亡<sup>[12]</sup>. 将抑制细胞凋亡的 bcl-2 基因导入细胞, bcl-2 基因的过量表达可抑制 Gln 或缺氧引起的细胞凋亡, 减少细胞特定营养成分的消耗, 提高细胞密度和目的蛋白产量<sup>[17]</sup>. 已证实 bcl-2 基因的过度表达可以提

高灌流培养中杂交瘤细胞的活性和抗体的生产率<sup>[17]</sup>.

### 3 大规模动物细胞培养技术

常用的动物细胞培养方法有分批培养、补料分批培养、半连续培养、连续培养等. 60年代开始的灌注培养技术为动物细胞的高密度大规模培养开辟了广阔的前景. 在属于连续培养方式的灌注培养中, 细胞保留在反应器系统中, 收获培养液的同时不断加入新鲜培养基. 灌注培养的主要优点是连续灌注的培养基可以提供充分的营养成分, 并带走代谢产物. 同时, 细胞保留在反应器中, 可以达到很高的细胞密度. 同其他方法相比, 灌注培养的产率可以提高一个数量级, 并可以大大降低劳动力的消耗. 灌注培养主要分为两大类: 悬浮灌注培养和床层灌注培养. 悬浮灌注培养是在普通悬浮培养的基础上, 加上一个细胞分离器而成, 以微载体悬浮培养加旋转过滤分离器最为常见. 床层灌注培养则把细胞直接保留于床层, 不需要分离器. 其中堆积床和大孔载体培养的应用较广<sup>[18]</sup>.

#### 3.1 用堆积床(packed bed)生物反应器生产基因重组蛋白

动物细胞的大规模、高密度和长期培养, 是实现动物细胞产品高效、优质、低成本生产的前提条件<sup>[2]</sup>. 邓继先等在堆积床生物反应器用含5% FBS的DMEM F12培养基培养产生人促红细胞生成素(rHuEPO)的细胞8~10 d后, 使用自制的无血清培养基(SFM-p)生产rHuEPO. SFM-p培养基既能维持细胞生长, 又能生产rHuEPO, 也便于纯化分离rHuEPO<sup>[19]</sup>. 在堆积床生物反应器中细胞附着在圆形聚酯片上生长, 培养基不断通过聚酯片层, 细胞大多数在孔内生长, 增加了搅拌转速的调节范围, 能供应给细胞充分的营养物质和氧气, 细胞的生长条件较温和.

#### 3.2 通过球转球方法(beads-to-beads)生产基因重组蛋白

堆积床反应器培养需要准备较多的种子, 必须先用转瓶进行贴壁培养, 然后用胰酶消化使细胞脱落, 以扩大培养规模. 工作量大, 增加了污染的机会, 限制了工艺的放大. 丛春水等采用多孔微载体培养CHO细胞, 生产rhEPO<sup>[20]</sup>. 利用细胞可在微载体之间自动转移的现象, 先在200 mL搅拌器(Wheaton公司生产)中培养, 待细胞长满载

体时, 直接转入到Celligen 2.2 L生物反应器(NBS公司生产)灌流培养, 大大简化了扩大生产规模的工艺. 细胞密度达到 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ , rhEPO最高可达9.7 mg/L, Cytopore微载体(直径200  $\mu\text{m}$ , 孔径30  $\mu\text{m}$ )的用量浓度为2.5 g/L. 在Celligen的1.5 L或5 L生物反应器中, 利用多孔微载体Cytopore和低血清培养基补充成分BIGBEF-3, 成功培养了CHO细胞系CL-41G生产尿激酶原和杂交瘤细胞生产抗尿激酶原单克隆抗体. 细胞密度可达 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ . 球转球方法(beads-to-beads)可以扩大CL-41G细胞培养至Biostat UC 20 L生物反应器大量生产尿激酶原, 也扩大杂交瘤细胞培养生产纯化尿激酶原需要的单克隆抗体<sup>[21]</sup>. 通过球转球方法(beads-to-beads), 让老微载体上的细胞通过球间架桥, 转移到新微载体上, 使细胞在新微载体上生长. 这种方法操作简单, 污染机会相对较少. 以CelliGen 5 L细胞培养用生物反应器作为种子罐, 当Vero细胞生长到一定密度时, 将细胞和新的微载体一起移入体积为50 L的Cell-Cul-50A细胞培养反应器(华东理工大学研制)中, 进行转球操作, 然后进入正常培养阶段. 整个培养过程为自动控制, 温度控制在 $(37 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ , 溶解氧为50%空气饱和度, 转速为20~30 r/min. 通过换液和灌注的方法, 培养8 d, 细胞密度达到 $1.1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ , 然后接种狂犬病毒, 连续培养10 d, 病毒滴度达到国家标准<sup>[15]</sup>. Deyu Kong等用微载体灌流培养CHO细胞生产单细胞集落抑制因子(M-CIF)<sup>[22]</sup>. 开始时, 用T形瓶培养细胞, 达到80%~90%汇合时以1:3~1:4的分配比例进行传代. 然后用转瓶微载体培养以便进行生物反应器接种, 2 L微载体培养液接种到15 L灌流生物反应器中. 头三天采用分批培养方式, 反应器中微载体量为5 g/L. 第4天开始灌流培养. 第8天微载体的装填量增加到10 g/L, 第20天时通过补充50%新微载体把微载体的装填量降低到5 g/L, 第27天补充第20天时同样数量的新微载体. 3 L(工作体积2 L)和15 L(工作体积8 L)中间装有旋转滤器的微载体灌流生物反应器运行两个多月时间, 各收集了60 L和300 L滤液. 灌流培养期间, 细胞密度达到 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ . 重要的是, 在非选择条件下CHO细胞稳定表达M-CIF, 并保持在4~10 mg/L的水平, 表达率保持在 $1.8 \sim 3.4 \text{ mg} / 10^6 \text{ d}^{-1}$ . 重组CHO细胞在微载体之间的转移能力非常有利于

微载体培养的扩增和补充新的微载体

### 3.3 其他动物细胞大规模培养技术

用 3.5 L、14 L、75 L 搅拌式生物反应器 (Chemap AG, 瑞士), 逐级放大培养 W<sub>u</sub>T3 细胞. 先用 3.5 L 和 14 L 生物反应器培养 W<sub>u</sub>T3 杂交瘤细胞, 用人血清代替牛血清培养 W<sub>u</sub>T3 细胞, 在 1% 人血清中添加适当成分, 可以达到 10% 小牛血清浓度下的细胞浓度 ( $1.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) 和单抗产量 (大于  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). 放大到 75 L 生物反应器中采用半连续式培养, 收获时细胞浓度为  $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 单抗产量为  $40 \sim 70 \text{ mg}/\text{L}$ , 平均日产量为 1 g. 采用健康人血清代替牛血清培养, 上清液经分离纯化后, 制品中人  $\gamma$  蛋白不必进一步除去, 对制品的使用不会产生不良反应, 可降低生产成本<sup>[23]</sup>. 此外, 利用昆虫细胞表达系统可生产高含量的活性蛋白, 并可用大规模灌流培养<sup>[24]</sup>. 利用牛关节软骨细胞、聚合骨架、生物反应器可以培养工程软骨<sup>[25]</sup>.

一般来说, 贴壁依赖性动物细胞培养在硬质的培养基质上, 收集时用胰酶处理. 这种处理可能对细胞有伤害作用, 如细胞膜蛋白的水解. 为避免这种影响, 已经有人尝试用液/液界面进行细胞培养. 让细胞在培养基和疏水性液体之间的界面生长<sup>[26]</sup>. 硅油和多种荧光碳 (如 FC-40、FC-70、KPF-91、KPF-102 和 KPF-142) 可作为基质, 即疏水性液体. 用这种基质培养成纤维细胞 (L-929, 鼠细胞系) 时, 在培养周期的早期细胞的生长依赖于基质类型. 而且在界面的细胞培养比聚丙烯酰胺表面慢, 细胞扩展较小, 表明细胞在界面的附着不太好. 更特别的是, 细胞在 MEM/FC-70 界面彼此附着, 形成多细胞结构的半球形聚合体. 此外, 同样界面之间可进行传代, 不需要使用胰酶, 也不延迟细胞的生长. 尽管这种细胞培养的模式较小, 在 34.6 mm 内径的多孔盘中加入 4 mL 荧光碳和 5 mL MEM 培养基, 但这是一种更有效的细胞培养方法, 可能发展成较大规模的细胞培养方法.

此外, 在进行动物细胞大规模培养之前, 建立高表达水平的细胞株, 并对细胞株进行特性分析, 是非常重要的. 军事医学科学院通过构建 EPO 真核表达质粒, 成功的实现了其在 CHO 细胞中的表达. 通过特性分析, 发现表达产物具有与天然 EPO 相同的生物活性和免疫原性<sup>[27]</sup>, 为大规模培养 CHO 细胞生产 rHuEPO 提供了高质量的工程

细胞株.

## 4 结 语

一项新的细胞培养技术的发展成熟需要较长的时间. 大规模培养动物细胞是一项复杂而且经验性很强的工作. 严格控制细胞培养的环境, 防止污染, 是进行大规模培养的前提. 通过减少培养基中各种不利因素, 配置细胞生长的专一性无血清培养基, 以及选择条件温和、易操作、气体交换速度快的生物反应器和最适合细胞生长的微载体, 可提高细胞的活性和表达水平.

### 参考文献 (References):

- [1] 林福玉, 陈昭烈, 刘红, 等. 大规模动物细胞培养的问题及对策[J]. 生物技术通报(LIN Fu-yu, CHEN Zhao-lie, LIU Hong, *et al.* Problems and solutions of large-scale mammalian cell culture[J]. Biotechnology Information), 1999, 1: 32-35.
- [2] 陈昭烈. 动物细胞培养过程中的凋亡[J]. 生物工程进展 (CHEN Zhao-lie. Apoptosis in animal cell culture[J]. Progress in Biotechnology), 1998, 18(6): 17-20.
- [3] 吴梧桐. 下一个 10 年的生物技术与生物制药[J]. 中国药理学杂志(WU Wu-tong. Biotechnology and pharmaceuticals 10 years later[J]. Chin Pharm), 1999, 34(1): 3-6.
- [4] 丁锡中. 基因工程药物的过去、现在和将来[J]. 生物工程进展(DING Xi-zhong. The past, nowadays and future of drugs of gene engineering[J]. Progress in Biotechnology), 1998, 18(3): 2-6.
- [5] 邓继先, 杨琴, 程萱, 等. 用于生产 rHuEPO 的无血清培养基的研究[J]. 军事医学科学院院刊(DENG Ji-xian, YANG Qin, CHENG Xuan, *et al.* Study on a serum-free medium used for production of rHuEPO[J]. Bull Acad Mil Med Sci), 1997, 21(4): 244-250.
- [6] 钱凯先. 人体与动物细胞大量培养的进展[J]. 生物技术(QIAN Kai-xian. Progress of large-scale human and animal cell culture of [J]. Biotechnology), 1993, 3(6): 1-3.
- [7] 梅乐和. 生化生产工艺学[M]. 北京: 科学出版社(MEI Le-he. Process of biochemical production[M]. Beijing: Science Press), 1999. 211-217.
- [8] 谭文松, 陆健, 张元兴. 气生式生物反应器在杂交瘤细胞培养中的应用[J]. 生物工程学报(TAN Wen-song, LU Jian-ZHANG Yuan-xing. Application of the airlift bioreactor for hybridoma cell cultures[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 1996, 12(4): 477-481.
- [9] KONG D, CARDAK S, CHEN M, *et al.* High cell density and productivity culture of Chinese hamster ovary cells in a fluidized bed bioreactor[J]. Cytotechnology, 1999, 29: 215-220.
- [10] MEISSNER P, SCHRODER B, HERFURTH C, *et al.* Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of

human hematopoietic progenitor cells[J]. *Cytotechnology*, 1999, 30: 227-234.

- [ 11 ] SINGH Vijay. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation[J]. *Cytotechnology*, 1999, 30: 149-158.
- [ 12 ] VARANT J, PIEL F, JOSEPHS S, *et al.* Attachment and growth of anchorage-dependent cells on a novel, charged-surface microcarrier under serum-free conditions [ J ]. *Cytotechnology*, 1998, 28: 101-109.
- [ 13 ] KONG D, CHEN M, GENTZ R, *et al.* Cell growth and protein formation on various microcarriers [ J ]. *Cytotechnology*, 1999, 29: 149-156.
- [ 14 ] 肖成祖, 黄子才, 陈昭烈, 等. 用国产 SH-2 型微载体和低血清培养基灌流培养 CHO 工程细胞[J]. 军事医学科学院院刊(XIAO Cheng-zu, HUANG Zi-cai, CHEN Zhao-lie, *et al.* Perfusion cultivation of genetically-engineered CHO cell line with home-made SH-2 type microcarrier and low-serum medium[J]. *Bull Acad Mil Med Sci*), 1995, 19 (2): 81-85.
- [ 15 ] 张立, 严春, 范卫民, 等. Vero 细胞的微载体培养[J]. 华东理工大学学报(ZHANG Li, YAN Chun, FAN Wei-min, *et al.* Inoculum technology in large-scale cell culture on microcarriers[J]. *Journal of East China University of Science and Technology*), 1998, 24(6): 659-663.
- [ 16 ] DOWD J, WEBER I, RODRIGUEZ B, *et al.* Predictive control of hollow-filter bioreactors for the production of monoclonal Antibodies[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 63: 484-492.
- [ 17 ] FASSNACHT D, ROSSING R, SINGH R P, *et al.* Influence of bel-2 on antibody productivity in high cell density perfusion cultures of hybridoma [ J ]. *Cytotechnology*, 1999, 30: 95-105.
- [ 18 ] 丛春水, 邓继先, 苏志国. 动物细胞的灌注培养方法[ J ]. 生物技术( CONG Chun-shui, DENG Ji-xian, SU Zhi-guo. Methods of animal cell perfusion culture [ J ]. *Biotechnology*), 1999, 9(2): 26-29.
- [ 19 ] 邓继先, 杨琴, 程萱, 等. 用无血清培养基在填充床生物反应器生产 rHuEPO[J]. 生物工程学报(DENG Ji-xian, YANG Qin, CHENG Xuan, *et al.* Production of rHuEPO with a serum-free medium in packed bed bioreactor[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 1997, 13(4): 375-379.
- [ 20 ] 丛春水, 邓继先, 肖成祖, 等. 用多孔微载体 Cytopore 高密度培养 CHO 工程细胞生产 rHEPO[J]. 生物技术通报( CONG Chun-shui, DENG Ji-xian, XIAO Cheng-zu, *et al.* The Production of rHEPO via High Density Cultivation of Recombinant CHO Cell Line by Using Poros Microcarrier Cytopore [ J ]. *Biotechnology information*), 1999, (1): 40-42.
- [ 21 ] XIAO C, HUANG Z, LI W, *et al.* High density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopore[J]. *Cytotechnology*, 1999, 30: 143-147.
- [ 22 ] KONG D, GENTZ R, ZHANG J. Long-term stable production of monocyte-colony inhibition factor (M-CIF) from CHO microcarrier perfusion cultures [ J ]. *Cytotechnology*, 1998, 26: 131-138.
- [ 23 ] 邹昌勇, 杜厚明, 冷武军, 等. 应用生物反应器大规模培养杂交瘤细胞生产体内用 WuT3 单克隆抗体[J]. 中国生物制品学杂志(ZOU Chang-yong, DU Hou-ming, LENG Wu-jun, *et al.* Large-scale cultivation of WuT3 hybridoma cell secreting therapeutic McAb in bioreactors [ J ]. *Chinese Journal of Biologicals*), 1998, 11(1): 18-21.
- [ 24 ] ZHANG J, COLLINS A, CHEN M, *et al.* High-density perfusion culture of insect cells with a BioSep ultrasonic filter[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 59(3): 351-359.
- [ 25 ] OBRADOVIC B, CARRIER R, VUNJAK-NOVKOVIC G, *et al.* Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 63(2): 197-205.
- [ 26 ] SHIBA Y, OHSHIMA T, SATO M. Growth and morphology of anchorage-dependent animal cells in a liquid/liquid interface system [ J ]. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57(5): 583-589.
- [ 27 ] 徐秀英, 陈琳, 卢柏松, 等. 人红细胞生成素(EPO)工程细胞建立及特征分析[J]. 生物工程进展(XU Xiu-ying, CHEN Lin, LU Bo-song, *et al.* The analysis of biological characteristics for the erythropoietin engineering cell lines [ J ]. *Progress in Biotechnology*), 2000, 20(3): 72-75.