

## 用改装的 Super-Spinner 搅拌瓶连续灌流培养 产凝血酶原 CHO 工程细胞

陈昭烈<sup>1\*</sup> Kai Iding<sup>2</sup> Dirk Lütkemeyer<sup>2</sup> Jürgen Lehmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071 )

<sup>2</sup>( 德国比勒菲尔德大学细胞培养技术研究所, 比勒菲尔德 )

关键词 连续灌流培养, CHO 工程细胞, 凝血酶原

中图分类号 Q813.1<sup>+</sup>1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0109-04

在动物细胞培养过程中对培养体系实施培养基连续灌流能及时地补充细胞生长所需的营养物质、控制细胞代谢产物对细胞的影响, 实现细胞的高密度长期培养, 提高目的产品的生产效率<sup>[1,2]</sup>。细胞连续灌流培养的前提是在实施培养基连续灌流的同时培养体系能有效地截留细胞<sup>[3]</sup>。这一前提增加了细胞培养装置的复杂程度, 使之特化为价格昂贵的生物反应器, 限制了细胞连续灌流培养的应用。如能通过对普通的细胞搅拌培养瓶进行改进, 使之能用于细胞的连续灌流培养, 则有利于细胞连续灌流培养的推广应用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞

产人重组凝血酶原 CHO 工程细胞 CHO2DS 是由含凝血酶原目的基因和 dhfr 标记基因及 G418 抗性基因的表达载体, 用电击法转染 CHO-dhfr 细胞所建立的具有稳定表达凝血酶原表型的细胞株(由 BASF AG Germany 提供)。在含维生素 K<sub>3</sub> 培养基中, CHO2DS 所产生的凝血酶原以羧化的活性单体存在于细胞培养上清中。

#### 1.2 培养基和载体

DMEM、F12 和新生牛血清为 GIBCO 产品。无蛋白培养基 DF6S 以优化的 DMEM:F12(1:1)为基础培养基, 添加丙酮酸钠、金精三羧酸(Aurintricarboxylic acid, ATA)、乙醇胺、柠檬酸铁、维生素 C、腐胺(Putrescine)和 Pluronic F68 配制而成<sup>[4]</sup>。丙酮酸钠和乙醇胺为 MERCK 产品, 其它培养基添加成分均购自 Sigma 公司。细胞固定化培养载体 Cytopore 1 多孔微球购自 Pharmacia。

#### 1.3 Super-Spinner 细胞搅拌培养瓶的改装

在 1L Super-Spinner 搅拌瓶的转动轴上固定一直径 2.6cm、高 4.5cm、孔径为 75 $\mu$ m 的不锈钢滤筒, 不锈钢滤筒的固定位置以瓶内注入 1L 液体时, 其上部高出液面 1.5cm

为准。自 Super-Spinner 搅拌瓶的瓶盖引入内径为 2mm 硅橡胶管作为培养基灌流管路, 进液管高出液面, 出液管插入不锈钢滤筒内, 培养基的灌流用蠕动泵驱动(图 1)。在 Super-Spinner 搅拌瓶的侧口通入细胞采样管和平衡液面气体分压的通入管。在瓶盖设两个通气口, 供气硅橡胶管与其相接并缠绕于固定在转动轴下部的支架上。缠绕于支架上的供气硅橡胶管, 在磁力搅拌器的驱动下随支架转动而起到搅拌叶片的作用。细胞培养时将 Super-Spinner 搅拌瓶置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内, 供气管路的进气管连接放置于培养箱内的气泵, 供气管路的气体压力由出气管路上的调节阀控制。

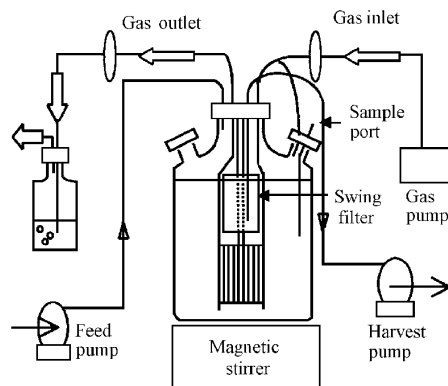


图 1 用 Super-Spinner 搅拌瓶改装的细胞连续灌流培养系统示意图

Fig. 1 A sketch map showing the continuous perfusion system based on a 1L modified Super-Spinner

#### 1.4 细胞培养

CHO2DS 细胞在组织培养瓶中用含 5% 新生牛血清的 DMEM:F12(1:1)贴壁培养, 待细胞形成致密单层后, 用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化, 经不含 NBS 的 DMEM:F12 洗涤后, 用 DF6S 悬浮 CHO2DS 细胞。将 CHO2DS 细胞接种于

经改装的 1L Super-Spinner 搅拌瓶, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下实施批次悬浮培养, 搅拌速度设置为 30 r/min; 在经改装的 1L Super-Spinner 搅拌瓶内用 Cytopore 12g/L 固定 CHO2DS 细胞, 自培养的第 3 天起实施配基连续灌流, 灌流量由 250mL/d 逐渐加大至 1500mL/d。取样测定细胞密度、凝血酶原浓度、葡萄糖浓度和乳酸浓度。

1.5 细胞计数和凝血酶原浓度测定

组织培养瓶中贴壁培养和 Super-Spinner 搅拌瓶批次悬浮培养的 CHO2DS 细胞密度用血球计数板直接计数; 用改良 MTT 比色法<sup>[5]</sup>计数 Cytopore 1 固定化培养的 CHO2DS 活细胞密度, 所用试剂四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 为 Fluka 产品, N, N-二甲基酰胺、Triton X-100 为 Sigma 试剂。采用 ELISA 测定细胞培养上清的凝血酶原浓度<sup>[6]</sup>, 人凝血酶原标准品为 Calbiochem-Novabiochen 公司产品, 羊抗人凝血酶原抗体购自 Cedarlane Laboratories 公司。

1.6 细胞粒径和细胞截留率测定

用细胞计数和分析系统 (CASY 1®, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Germany) 测定细胞粒径, 细胞粒径 ≤ 25μm 的 CHO2DS 按单个悬浮细胞计数, 细胞粒径 > 25μm 的 CHO2DS 计为悬浮的细胞团, 单个细胞在培养体系中所占的百分比按下式确定:

细胞粒径 ≤ 25μm 的 CHO2DS / (细胞粒径 ≤ 25μm 的 CHO2DS + 细胞粒径 > 25μm 的 CHO2DS) × 100;

细胞截留率按下式确定:  
(不锈钢滤筒外的细胞密度 - 不锈钢滤筒内的细胞密度) / 不锈钢滤筒外的细胞密度 × 100。

1.7 葡萄糖和乳酸的测定

采用 YSI-2700 乳酸、葡萄糖自动测定仪 (Yellow Spring Instruments USA) 检测细胞培养上清中的葡萄糖和乳酸浓度。

2 结 果

2.1 用改装的 Super-Spinner 搅拌瓶批次悬浮培养 CHO2DS

在改装的 1L Super-Spinner 搅拌瓶内用 DF6S 悬浮培养 CHO2DS 细胞, 细胞接种密度为  $2.3 \times 10^5$  cells/mL, 搅拌速度设置为 30 r/min。在培养的起始阶段 CHO2DS 细胞呈球形均匀悬浮于培养基中, 其中细胞粒径 ≤ 25μm 的 CHO2DS 占细胞总数的 93.1%。由于不锈钢滤筒的孔径远大于细胞粒径, CHO2DS 细胞易于穿过不锈钢滤筒的微孔进入不锈钢滤筒内, 不锈钢滤筒的细胞截留率只有 4.7%, 无法实施培养基连续灌流而只能采取批次培养方式。在培养的后期, 部分细胞形成粒径不等的细胞团悬浮于培养体系中, 细胞粒径 ≤ 25μm 的 CHO2DS 所占的比例下降为 57.9%, 不锈钢滤筒的细胞截留率升高至 29.4% (图 2)。整个培养过程持续 6d, 培养结束时 CHO2DS 细胞密度和凝血酶原浓度分别达到  $1.71 \times 10^6$  cells/mL 和 14.9mg/L (图 3)。

2.2 用改装的 Super-Spinner 搅拌瓶连续灌流培养 CHO2DS

在改装的 1L Super-Spinner 搅拌瓶内用 Cytopore 1 固定 CHO2DS 细胞, 细胞接种密度和 Cytopore 1 的使用浓度分别

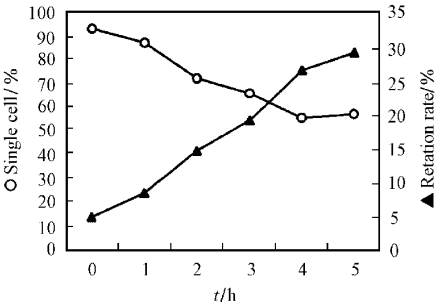


图 2 CHO2DS 细胞在改装的 1L Super-Spinner 搅拌瓶内悬浮培养的单个细胞比例和细胞截留率

Fig. 2 Percentage of single cell and cell retention of CHO2DS cells in a 1L modified Super-Spinner

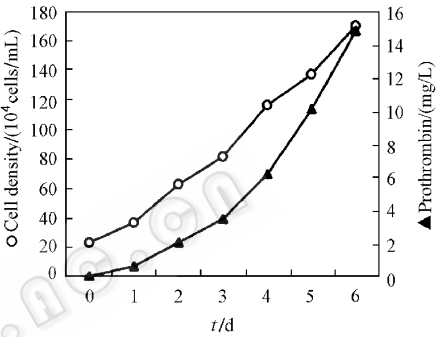


图 3 CHO2DS 在经改装 1L Super-Spinner 搅拌瓶内悬浮培养的生长和凝血酶原生产

Fig. 3 Growth of CHO2DS cells and prothrombin production in a 1L modified Super-Spinner

为  $2.6 \times 10^5$  cells/mL 和 2g/L。接种 4h 后, CHO2DS 细胞全部固定于 Cytopore 1 孔隙内, 从采样管和培养基灌流出液管获得的细胞培养上清中均无游离细胞存在。自培养的第 3 天起实施培养基连续灌流, 灌流量由 250mL/d 逐渐加大至 1500mL/d。CHO2DS 细胞密度和凝血酶原浓度在培养的第 9 天分别达到  $4.62 \times 10^6$  cells/mL 和 11.3mg/L 并在这一水平维持了 10d 后趋于下降, 至培养的第 24 天 CHO2DS 细胞密度和凝血酶原浓度分别降至  $2.85 \times 10^6$  cells/mL 和 7.2mg/L (图 4)。当 CHO2DS 细胞达到较高的培养密度时, CHO2DS 细胞占据了 Cytopore 1 孔隙并在其表面形成致密

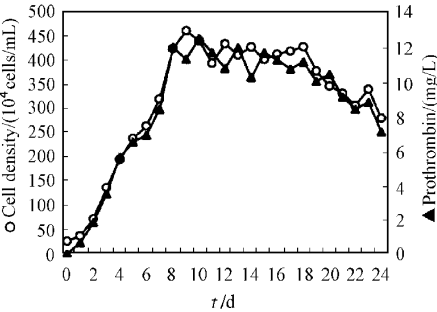


图 4 CHO2DS 细胞在改装的 Super-Spinner 搅拌瓶中连续灌流培养时的细胞生长和凝血酶原生产

Fig. 4 Growth of CHO2DS cells and prothrombin production in a

的细胞层(图 5)。部分细胞从 Cytopore 1 脱落,进入不锈钢滤筒内随培养基排出 Super-Spinner 搅拌瓶。在培养的后期不锈钢滤筒内的游离细胞密度达 $(1.8\sim2.7)\times10^5\text{cells/mL}$ , CHO2DS 细胞的截留率介于 91.3%~95.6%之间。由于在整个培养过程中实施了培养基连续灌流并根据有关检测指标调整培养基的灌流量,既保证了葡萄糖等营养物质的供给,又在一定程度上起到控制乳酸的过度积聚的作用(图 6)。

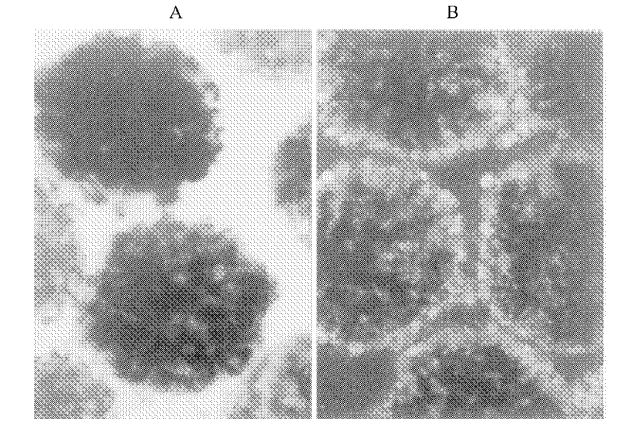


图 5 连续培养条件下固定于 Cytopore 1 的 CHO2DS 细胞生长  
Fig. 5 Growth of CHO2DS cells immobilized on Cytopore 1 in continuously perfused culture  
A. Cells took up the inner space of the carriers( MTT stained );  
B. Cells formed a compact layer and clumps on the surface of the carriers

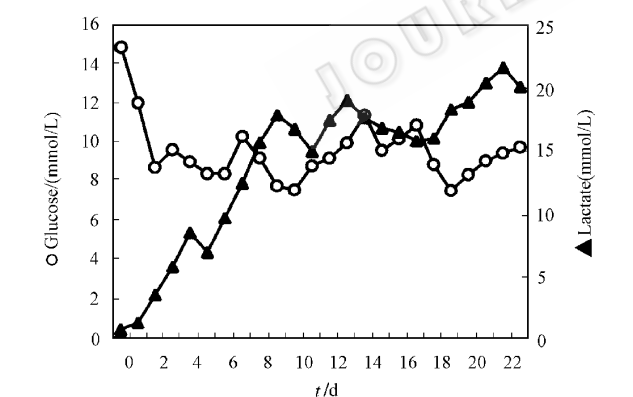


图 6 CHO2DS 细胞在改装的 Super-Spinner 搅拌瓶内连续灌流培养的葡萄糖消耗和乳酸积聚  
Fig. 6 Glucose consumption and lactate accumulation profiles in a 1L modified Super-Spinner with a perfused culture of CHO2DS

### 3 讨 论

随着越来越多的临床使用剂量介于毫克和克级水平的单克隆抗体和酶成为基因工程药物开发和产业化的重点,动物细胞的高密度培养和长期培养将成为决定产品能否开发成功的关键技术因素<sup>[7]</sup>。供氧不足、营养物质限制和毒性代谢产物积聚是影响细胞生长的主要细胞密度限制因素<sup>[3]</sup>。采用无气泡膜式通气管供氧和动态的培养基连续灌流是克服

以上细胞密度限制因素,提高细胞培养密度和培养时间的有效技术途径<sup>[8]</sup>。

Super-Spinner 搅拌瓶以缠绕于支架上的无气泡膜式通气管替代传统的搅拌叶片,在磁力搅拌器的驱动下产生均匀悬浮细胞的流体动力的同时,提高了培养体系的供氧能力<sup>[9]</sup>。细胞培养时将 Super-Spinner 搅拌瓶置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内,以培养箱内含 95% 空气、5% CO<sub>2</sub> 的气体为气源,通过调节气泵的泵速和通气管内压力,在改善培养体系的供氧的同时又有利于维持培养体系中适宜的 pH。在 1L 的 Super-Spinner 搅拌瓶中用 DF6S 批次悬浮培养 CHO2DS 细胞密度达到  $1.92\times10^6\text{cells/mL}$ <sup>[4]</sup>。

采用过滤的方式截留细胞是连续灌流培养中最为有效的细胞截留手段。与静止的滤器相比,固定于搅拌轴的旋转滤器有利于克服滤网的堵塞<sup>[10]</sup>。细胞截留和滤网堵塞是存在于采用滤网截留细胞的一对矛盾。孔径较小的滤网有利于提高细胞的截留率,但滤网堵塞的现象更易发生;孔径较大的滤网有利于克服滤网的堵塞,但往往是以降低细胞截留率为代价。结合细胞固定化培养技术,采用大孔径滤网的旋转滤器截留细胞既能有效地截留细胞又可消除滤网堵塞现象的发生。Cytopore 1 是一种以纤维素为材料的多孔性细胞固定化载体,即使在低血清或无血清的培养基中也能有效地固定贴壁依赖性细胞和非贴壁依赖性细胞,实施长期连续灌流培养<sup>[11]</sup>。以 Cytopore 1 为细胞固定载体,在改装的 Super-Spinner 搅拌瓶实施无蛋白培养基连续灌流培养,CHO2DS 的培养密度和培养时间分别达到  $4.62\times10^6\text{cells/mL}$  和 24d。实验结果表明,尽管由于改装的 Super-Spinner 搅拌瓶缺乏有效的溶氧和 pH 控制,限制了细胞培养密度的进一步提高,改装的 Super-Spinner 搅拌瓶仍不失为简便实用的细胞连续灌流培养装置。

### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Griffiths J B. Animal cell culture processes-batch or continuous? *J Biotechnology*, 1992, **22** :21~30

[ 2 ] Spier W. Animal cells in culture :moving into the exponential phase. *Trends Biotechnol.*, 1988, **6** :2~6

[ 3 ] Griffiths J B. Animal cells the breakthrough to a dominant technology. *Cytotechnology*, 1990, **3** :109~116

[ 4 ] CHEN Z L, Iding K, Lütkemeyer D, Lehmann J. A low-cost chemically defined protein free medium for a recombinant CHO cell line producing prothrombin. *Biotechnology Letters*, 2000, **22** ( 10 ) :837~841

[ 5 ] JLA X H (贾熙华), XIAO C Z (肖成祖). MTT method for the estimation of the number of cells cultivated in microcapsules. *Bull Acad Med Sci( 军事医学科学院院刊 )*, 1993, **17** :207~211

[ 6 ] Myrset A H, Helgeland L. A novel enzyme immunoassay for quantitation of rat prothrombin in microsomal subfractions. *J Immunoassay*, 1991, **12** ( 4 ) :597~609

[ 7 ] Lubiniecki A S. Historical reflections on cell culture engineering. *中国科学微生物研究*, 1998, **28** :139~145

- [ 8 ] Ozturk S S. Engineering challenges in high density cell culture system. *Cytotechnology* ,1996 ,**22** :3~16
- [ 9 ] Rirese R U ,Lütkemeyer D ,Bütemeyer H *et al* . Super-spinner : a low cost animal cell culture bioreactor for the CO<sub>2</sub> incubator. *Cytotechnology* ,1994 ,**14** ( 1 ) :1~9
- [ 10 ] Tokashiki M ,Takamatsu H. Perfusion culture apparatus for suspended mammalian cells. *Cytotechnology* ,1993 ,**13** :149~159
- [ 11 ] HU X W ( 胡显文 ) ,XIAO C Z ( 肖成祖 ) ,HUANG Z C ( 黄子才 ) *et al* . Large-Scale culture of rCHO cells using porous micro-carriers. *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) , 1998 ,**14** ( 3 ) :348~351

## Continuously Perfused Cultivation of Genetically-engineered CHO Cells Producing Prothrombin in a Modified Super-Spinner

CHEN Zhao-Lie<sup>1\*</sup> Kai Iding<sup>2</sup> Dirk Lütkemeyer<sup>2</sup> Jürgen Lehmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Institute of Biotechnology ,Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100071 ,China )

<sup>2</sup>( Institute of Cell Culture Technology ,University of Bielefeld ,P. O. Box 100131 ,33501 Bielefeld ,Germany )

**Abstract** A Super-Spinner was Modified by mounting a stainless steel filter ( pore size 75  $\mu\text{m}$  ) to the impeller shaft to retain cells while fresh nutrient is perfused. Using Macroporous microcarrier Cytopore 1 , continuously perfused cultivation of a recombinant CHO cell line CHO2DS producing prothrombin was performed with the perfusion of a protein-free medium DF6S. The cell retention rate was more than 90 % during the 24 days continuously perfused cultivation. The viable cell density of CHO2DS and prothrombin concentration reached  $4.62 \times 10^6$  ( cells. m/L ) and 11.3 ( mg/L ) respectively after 9 days culture.

**Key words** continuously perfused culture , recombinant CHO cell , prothrombin

Received June 28 2000

\* Corresponding author. Tel 86-10-63841526 ; Fax 86-10-63833521 ; E-mail: chenzt@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>