

用微载体悬浮培养系统增殖细胞和病毒

肖成祖 张吟庵 孔惟惟 王宏霞

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

我们用我院制备的MC-1型微载体成功地培养了BHK-13, BHK-21, 和CHO-KI三株细胞。当微载体浓度为5 mg/ml, 细胞接种量为 30×10^4 细胞/ml左右时, 一般在三天都可达到 1×10^6 细胞/ml。此时接种 10^{-1} 或 10^{-2} 的VSV, 在37℃培养20-24小时, 病毒产量可达到6 Log TCID₅₀/ml以上, 其中以CHO-KI细胞的产量最高, 它们与静止培养的细胞产量基本一致, 也不亚于鸡胚细胞增殖的产量。目前用该系统增殖的VSV已用于IFN的研究工作中。实验的结果也表明, 用该系统增殖其它病毒和制备疫苗, 以及大量培养已引入重组IFN基因的CHO工程细胞也将是可行的。

微载体细胞培养不仅已被用于生产干扰素, 而且也被用来增殖细胞和病毒以生产疫苗。1964年法国已用上千升的大发酵罐增殖Vero细胞。并产生小儿麻痹疫苗, 该工艺已获法国当局的许可^[1]。我们在前两文^[2,3]中分别报道了用我院自己制备的MC-1型微载体, 用以结合转瓶或作悬浮培养, 成功地生产了大量高活性鼠干扰素, 本文将进一步报道用该微载体增殖水泡口炎病毒(VSV)的结果。

我们在干扰素的研究中需用大量VSV, 过去我们都用鸡胚细胞增殖, 操作比较烦琐, 1981年Goorha等^[4]介绍了用转瓶增殖BHK细胞和VSV的方法, 同年Crespi等^[5]报道了用微载体培养CHO-KI细胞并增殖VSV的结果, 这些方法都较用鸡胚细胞增殖好, 量大, 滴度高, 操作简便。为此我们选择了三种地鼠细胞, 并用MC-1型微载体悬浮培养系统, 观察了细胞生长和病毒增殖的情况, 结果也取得了成功, 目前该系统增殖的病毒已用于我们的干扰素研究中。

材料与 方法

细胞 我们比较了三种地鼠细胞, 包括BHK-13, BHK-21和CHO-KI细胞, 前两株由我所病毒室保存, 后一株由北师大惠赠。毒力测定用A549细胞, 由我所病毒室惠赠。

病毒 VSV Indiana株, 由病毒研究所惠赠, 以前常规用鸡胚细胞增殖, 在A549细胞上测定, 其毒力一般为6 Log TCID₅₀/ml左右, 用鸡胚细胞空斑测定法一般为 10^7 pfu/ml。

微载体 MC-1型, 由我院二所按Levine介绍的方法, 用国产的DEAE和Sephadex G50制成, 粒径为75-120μ, 阴离子交换量为1.4meq/g。处理方法见另文^[3]。

细胞培养 培养基用Eagle MEM, 加5%小牛血清, 250u/ml卡那霉素, 有时另

本文于1987年6月16日收到

加200u/ml庆大霉素, 10 mM Hepes液, pH用NaHCO₃调至7.2左右。培养搅拌器采用美国Wheaton Biostir产品, 为了使微载体在尽可能低的搅拌速度下不沉降, 我们在Wheaton培养瓶的搅拌轴上加一带有球形头部的侧棒, 这样搅拌速度可保持在50r/m左右, 没有微载体沉积在周边的现象。培养前先用甲基硅树脂酒精溶液将培养容器硅化。微载体浓度一般采用5 mg/ml, 先用培养基洗去PBS, 然后加入细胞和所需量的培养基。由于该三种细胞的贴壁率较高, 故一般在培养开始即作连续搅拌。培养过程中每天换液1/2—3/4, 同时取样计数。静止培养时用容积为100ml的培养瓶, 培养量10ml。

细胞计数和扫描电镜样品制备 详见另文^[3]

病毒增殖 静止培养一般在第三天当细胞长满单层后换上10ml生产液, 并加10⁻¹或10⁻²的VSV 0.2, 或先不加生产液, 直接加入病毒, 待37℃吸附30分钟后再加生产液, 继续培养20小时左右, 置-30℃, 隔天冻融后2500r/m离心, 吸出上清, 分装置低温保存, 同时留样测定毒力。微载体培养一般也在第3—4天待细胞达到1×10⁶细胞/ml时, 尽量吸去培养基, 然后加10⁻² VSV 0.5ml, 立即或吸附30分钟加生产液, 继续连续低速搅拌, 20小时后置-30℃, 以后处理同静止培养。

毒力测定 用40孔微量板, 各孔加入0.1ml培养基, 再加0.1ml A549细胞液(含5—6×10⁴细胞), 6小时后待细胞基本贴壁伸展后, 将测定样品以10倍稀释, 每稀释度取0.1ml加入2—4孔, 一般在36小时左右判定结果, 并计算出Log TCID₅₀/ml。

结 果

细胞在微载体上的附着和增殖 实验中可见, 我们选择的三株细胞, BHK—13, BHK-21和CHO-K1均能较好地附着于我院制备的MC-1型微载体上, 并很快地伸展和繁殖, (图1, A.B.C.)。当微载体浓度为5 mg/ml时, 看不出有明显毒性, 一般在第三、四天即可增殖至1×10⁶细胞/ml左右(图2)。

CHO-K1细胞在微载体上连续扩增 在前文中^[3], 我们曾介绍用胰酶—柠檬酸盐加高速搅拌法成功地进行L929细胞的扩增, 这次对CHO-K1细胞也进行了同时的观察, 并对该法的解离效果进行了分析, 即在消化前取样用柠檬酸结晶紫染色液法计数作为分母, 消化后取细胞悬液计数作为分子, 两者进行比较求得解离率。结果可见该法的解离率平均为69%。当扩增比为3或4倍时, 细胞可成功地解离和再吸附, 第二天即可见所有微载体上均有细胞附着, 经四天培养, 细胞密度又可再次达到120×10⁴/ml左右, 经两次扩增, 细胞数可增加近百倍(图3)。

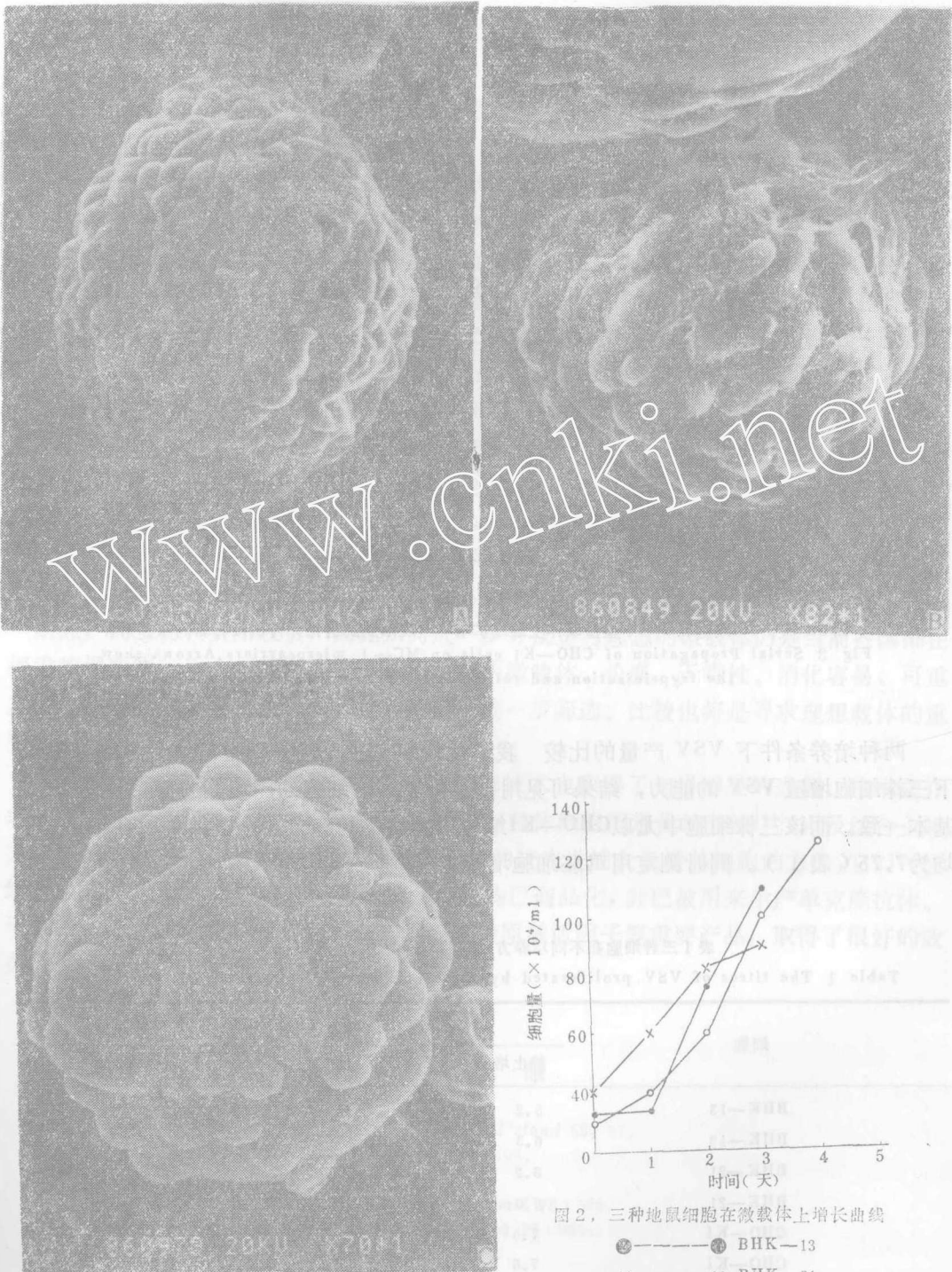


图1 生长在MC-1型微载体上的三种细胞系的扫描电镜摄影 A: BH-K13, B: BHK-21C: CHO-KI
Fig1 Scanning electron micrographs of three cell lines growing on MC-1microcarriers, A, BHK-13, B.BHK-21, C,CHO-KI

图2. 三种地鼠细胞在微载体上增长曲线
●——● BHK-13
×——× BHK-21
○——○ CHO-KI
Fig 2 The proliferated curves of three cell lines on MC-1 microcarriers.

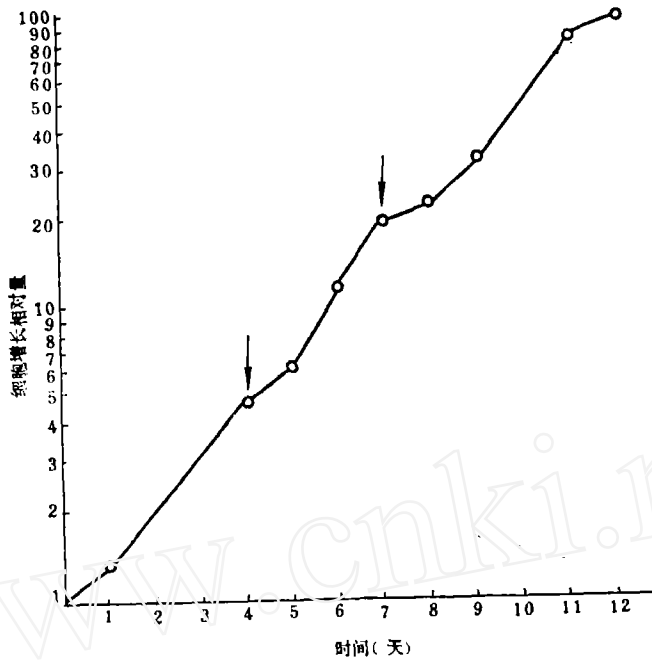


图3 CHO-K1细胞在MC-1型微载体上连续扩增 →表示胰酶消化并再次接种新的培养条件
Fig 3 Serial Propagation of CHO-K1 cells on MC-1 microcarriers. Arrows show the trypsinization and re-oculation into new culture

两种培养条件下 VSV 产量的比较 我们比较了在静止培养和微载体悬浮培养条件下三株细胞增殖 VSV 的能力, 结果可见用微载体培养的细胞的产毒能力与培养的细胞基本一致。而该三株细胞中尤以CHO-KI细胞增殖病毒的能力最高, 其 Log TCID₅₀ 平均为7.75 (表1)。同时测定用鸡胚细胞增殖的 VSV, 其 Log TCID₅₀ 为6.0。

表1 三种细胞在不同培养方式下的VSV毒力

Table 1 The titres of VSV proliferated by three cell lines with various cultured ways

| 细胞 | V S V毒力 (LogTCID ₅₀) | |
|--------|----------------------------------|-------|
| | 静止培养 | 微载体培养 |
| BHK-13 | 5.2 | 6.0 |
| BHK-13 | 6.3 | 5.5 |
| BHK-21 | 6.2 | 7.3 |
| BHK-21 | 6.0 | 7.5 |
| CHO-KI | 7.5 | 7.3 |
| CHO-KI | 7.5 | 8.2 |
| CHO-KI | 9.3 | — |

讨 论

我们的实试结果表明,采用微载体悬浮培养系统可成功地进行细胞的大量培养和病毒的大量增殖,该法的优越性是很明显的,它把悬浮培养的优点与贴壁的特性很好地结合了起来,从而可用现代化的发酵罐进行贴壁细胞和病毒的大规模的工业化生产。此次我们用 CHO-K1 细胞成功地生产了高滴度的 VSV,它不仅解决了我们在干扰素研究中对 VSV 的需要,而且也为我们用 CHO 工程细胞大量生产基因工程干扰素提供了经验。近年来利用 CHO 细胞作为宿主细胞,导入各种重组的干扰素基因质粒,并靠它自发地分泌干扰素已有不少成功的报道^[6,7],它的优点是产量高,所得的干扰素与自然干扰素完全一样,后处理简单。目前我们所正在进行该方面的工作。因此该系统的建立,不仅解决了当前的应用,也为今后大量培养工程细胞,大量制备基因工程干扰素准备了条件。当然,用该系统生产其他病毒并制作疫苗理应可行。

前文介绍了采用胰酶-柠檬酸盐加高速搅拌进行细胞连续扩增的方法,这次在 CHO 细胞的试验中证明也是可行的。但是实验也表明其解离率并不完全,仅 69%,其原因正象 Varani 等^[8]指出的那样,与微载体材料的性质有关,我们从电镜中看到,细胞在葡聚糖基质上生长时周边紧贴着载体,因而不易消化解离(见图 1)。考虑到该载体有这一缺点,而且材料费用较贵,因此如何进一步寻找更为理想的微载体仍是当前各国都在探索的课题^[9]。Varani 等^[8]在文中介绍的玻璃微载体、价廉、无毒性、消化容易、可重复使用,的确值得一试。另外从各种塑料中进一步筛选、比较也将是寻求理想载体的重要途径。

随着当今生物工程的发展,细胞大量培养技术也取得了相当明显的进展。除本文介绍的微载体培养法外,中空纤维培养法^[10]和巨载体细胞固定化培养法^[11],以及结合上述方法采用的灌注培养法,都是近些年来新崛起的较先进的大量培养细胞的方法,它们可使细胞的浓度达到 $10^7-10^8/ml$ 。这些设备国外均已商品化,并已被用来生产单克隆抗体、干扰素、白细胞介素 II、尿激酶、组织纤溶酶原激活因子等重要产品,取得了很好的效益,值得我们进一步加以研究和应用。

参 考 文 献

- [1]. Montagnon B.J, et al., 1984, *Develop Biol stand* 55: 37.
- [2]. 肖成祖等, 1983, 军事医学科学院院刊(2): 195.
- [3]. 肖成祖等, 1987, 病毒学杂志.2(4): 43.
- [4]. Goorha R.M, et al., 1981, *Methods Enzymol* 78: 309.
- [5]. Crespi C.L, et al., 1981, *Biotechnol Bioeng* 23: 983.
- [6]. Chernajovsky Y, et al., 1984, *DNA* 3: 297.
- [7]. Mory Y, et al., 1986, *DNA* 5: 191.
- [8]. Varani J., 1983 *Biotechnol Bioeng* 25: 1359.
- [9]. Reuveny S., 1985, *Advances in Cell Culture* 4: 213.
- [10]. Strand J.M, et al., 1984 *Biotechnol Bioeng* 26: 563.
- [11]. Nilsson K, et al., 1983, *Nature* 302: 629.

Proliferation of Cells and Virus with Microcarrier Suspension Culture System

Xiao Cheng-zu Zhang ling-an Kong Wei-wei Wang Hong-xia

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of
Military Medical Sciences, Beijing*)

We have successfully cultured three cell lines BHK-13, BHK-21 and CHO-KI with MC-1 type microcarrier made in our Academy. When the microcarrier was in concentration of 5 mg/ml, the cell density was about 30×10^4 cells/ml, all of them could proliferate to 1×10^8 cells/ml after 3-day suspension culture. At this time, inoculated VSV diluted 10 or 10^2 times, incubated at 37°C for 20-24 hs, the viral titer in these media were about 6 Log TCID₅₀ or much higher. The yield of CHO-KI cell was the highest. Its titre was 7 - 8 Log TCID₅₀. The titres of them were similar to those in stationary culture and also not a little bit inferior to those proliferated with chick embryo. Now we have already used it in our IFN research. These experiments also showed that the cells could be released from microcarriers with trypsin-citrate solution and more rapid stirring speed. So we are sure that this microcarrier suspension culture system must be suitable to produce various vaccines and IFNs with CHO cells transformed by recombinant IFN genes.