

## 钙离子对 293 细胞结团和生长的影响

# Effect of Calcium on Aggregation and Growth of 293 Cells

赵 亮, 朱明龙, 张 旭, 谭文松\*

ZHAO Liang, ZHU Ming-Long, ZHANG Xu and TAN Wen-Song\*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

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

**摘 要** 分别在有血清和无血清条件下、方瓶和转瓶中考察了  $\text{Ca}^{2+}$  对 293 细胞结团和生长的影响。通过实验发现,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在 0.1~1.0mmol/L 范围内对 293 细胞的贴壁和结团性质有显著影响, 而对生长影响不大。结果表明: 有血清贴壁培养时, 较高的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度有利于细胞贴壁; 无血清悬浮培养中,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度越高, 细胞结团越严重, 细胞结团达到平衡后的平均粒径 ( $D, \mu\text{m}$ ) 与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 ( $c, \text{mmol/L}$ ) 在 0.1~0.5 mmol/L 范围内可用一次函数  $D = 58.65c + 16.96$  描述, 细胞结团尺寸是可调控的; 而细胞在不同的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下有相似的生长规律。

**关键词** 293 细胞, 细胞培养, 结团

**中图分类号** R392.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0482-04

**Abstract** The effect of calcium on the aggregation and growth of 293 cells grown in either serum-containing or serum-free medium was investigated in T-flask and spinner bottle, respectively. It was found that the concentration of calcium ion, in the range of 0.1mmol/L to 1.0mmol/L, affected adhesion and aggregation of 293 cells severely, but had no distinct effect on growth. The result indicated that the attachment of 293 cells was easier with higher calcium concentration in serum-containing medium. And 293 cells formed aggregates readily in suspension culture. This effect was more profound in cultures with higher calcium concentration. The average diameter ( $D, \mu\text{m}$ ) of 293 cell aggregates exhibited direct proportion to calcium concentration ( $c, \text{mmol/L}$ ) in serum-free medium. It can be depicted by a simple equation in the range of 0.1mmol/L to 0.5mmol/L, i.e.  $D = 58.65c + 16.96$ . The aggregation size of 293 cells is regulable in suspension culture, therefore, proper control allows for an easier cell retention, and thus a high cell concentration potentially can be achieved. However, similar growth of 293 cells was observed in cultures with different calcium concentration.

**Key words** 293 cells, cell culture, aggregation

近年来, 由于基因治疗方面的研究取得了可喜进展, 腺病毒载体的大规模扩增倍受人们的关注, 293 细胞培养因此成为国内外研究的热点<sup>[1,2]</sup>。与其它上皮细胞相似, 293 细胞易于结团, 结团尺寸可达到毫米级<sup>[3]</sup>。结团严重限制了 293 细胞的高密度培养和腺病毒的大规模扩增<sup>[4]</sup>。G. Schoofs (1998) 等人的研究中尝试了多种方法均不能有效地解决细胞结团严重的问题<sup>[5]</sup>。此外, 已有报道一些细胞采用结团的方式培养<sup>[6]</sup>, 适当地控制细胞结团尺寸, 能够提高灌注培养

中细胞截留系统的效率, 从而获得更高的细胞密度。Peshwa (1993) 等人发现钙离子浓度越高 293 细胞结团尺寸越大, 但所结团块内细胞活性良好<sup>[7]</sup>。然而系统地研究关于钙离子影响 293 细胞结团程度及生长规律, 以指导调控细胞结团尺寸的大小方面尚未有报道。本文分别在有血清和无血清、方瓶和转瓶中多种条件下较为系统地研究了  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对 293 细胞结团和生长的影响, 揭示了  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与细胞结团尺寸的基本关系, 为 293 细胞无血清培养基的开发、高密度悬浮培

Received: October 26, 2004; Accepted: December 28, 2004.

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64250984; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

养过程控制及腺病毒大规模扩增策略的设计提供了依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株和培养基

本研究所使用的293细胞由上海市肿瘤医院提供。

无血清培养基为本实验室自制。其基础培养基为无钙DMEM/F12(SIGMA Co., USA), 添加物包括胰岛素、转铁蛋白等成分, 配制时还添加了 $\text{NaHCO}_3$  (GIBCO Co., USA) 1.2g/L。实验时可根据需要添加不同浓度新生牛血清(NCS)(HYCLONE Co., USA)。

### 1.2 细胞培养与实验方法

在含0.5%血清和无血清培养基中考察 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对细胞生长与结团的影响时细胞采用方瓶培养, 在 $30\text{cm}^2$ 方瓶中, 按一定密度接种, 每瓶10mL培养基, 置于温度 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中静置培养。在含1%血清培养基中考察 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对细胞生长与结团的影响时采用转瓶培养。转瓶为本实验室自制150mL转瓶, 以一定密度接种, 工作体积50mL, 搅拌转速为60r/min, 置于 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。以上实验所用的细胞为在相应培养基中适应一段时间的293细胞。

### 1.3 检测方法

细胞结团疏松时, 采用台盼蓝染色, 用血球计数板计数。细胞结团严重时, 采用结晶紫染色法计数。

细胞结团的粒径分布用MALVERN激光测粒仪测量。

## 2 结果和讨论

### 2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对细胞结团的影响

在转瓶中以含1% NCS的培养基进行培养,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度分别为0.1、0.2和0.5 mmol/L。比较各 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下24h和48h细胞的结团形态(图1)发现, 随着 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的增加细胞结团也随之增大, 并且团块越来越致密, 在0.5mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下, 所结团块内细胞已无明显轮廓界限。图2A为各 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下24h的粒径分布, 可以看出细胞结团的粒径分布朝粒径增大的方向偏移。图2B则显示了在不同的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下细胞结团粒径大小随时间的变化也呈现不同的特点。在较低的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下, 如0.1mmol/L, 细胞结团的大小几乎不随时间的推移而增大, 结团较为松散; 而在0.5mmol/L的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下, 细胞结团随时间的推移而增大, 团块甚至可达毫米级, 游离分散的几乎没有活细胞, 并且结团越来越致密, 这将给物质传递带来极为不利的影响。在方瓶中以不同 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的无血清培养基进行培养。 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度分别为0.1、0.2、0.5和1.0mmol/L。比较各 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下37h细胞的结团形态(图3)、粒径分布(图4A)以及结团大小随时间的变化规律(图4B)可以发现, 与转瓶中有血清培养细胞结团的特性极其相似。

图5显示了 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对293细胞结团的影响。此图可以看出, 平衡时细胞结团的平均粒径随着培养环境中的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的增大而增大, 由37h时 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度与细胞结团平均粒径的关系可以得出此条件下293细胞结团尺寸与培养环境中

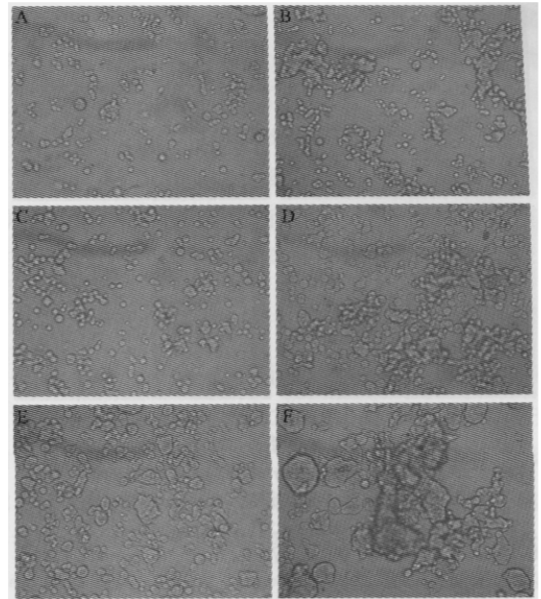


图1 293细胞在转瓶中不同 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下的形态  
Fig.1 The morphology of 293 cells cultivated in spinner bottle under different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations

A: 0.1mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  24h; B: 0.1mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  48h; C: 0.2mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  24h; D: 0.2mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  48h; E: 0.5mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  24h; F: 0.5mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  48h.

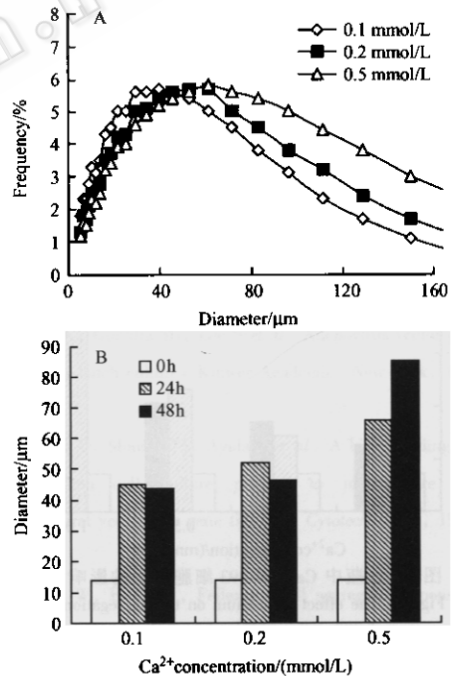


图2 转瓶中 $\text{Ca}^{2+}$ 对293细胞结团的影响

Fig.2 The effect of calcium on the aggregation of 293 cells cultivated in spinner bottle

A: size distribution of 293 cell aggregates cultivated in spinner bottle under different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations 24h after inoculation.  $\diamond$  0.1mmol/L;  $\blacksquare$  0.2mmol/L;  $\blacktriangle$  0.5mmol/L.

B: Average diameter of 293 cell aggregates cultivated in spinner bottle under different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations:  $\square$  0h;  $\text{▨}$  24h and  $\blacksquare$  48h after inoculation.

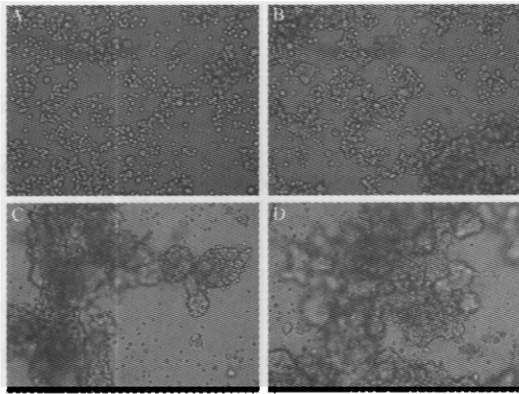


图3 293细胞在方瓶中不同Ca<sup>2+</sup>浓度下无血清培养37h的形态

Fig.3 The morphology of 293 cells cultivated in serum-free medium in T-flask under different Ca<sup>2+</sup> concentrations 37h after inoculation

A: 0.1mmol/L Ca<sup>2+</sup>; B: 0.2mmol/L Ca<sup>2+</sup>; C: 0.5mmol/L Ca<sup>2+</sup>; D: 1.0mmol/L Ca<sup>2+</sup>.

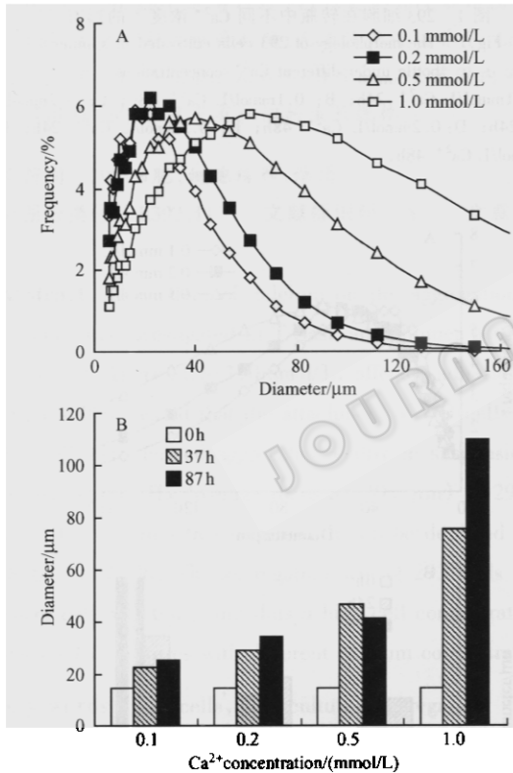


图4 方瓶中Ca<sup>2+</sup>对293细胞结团的影响  
Fig.4 The effect of calcium on the aggregation of 293 cells cultivated in T-flask

A: size distribution of 293 cell aggregates cultivated in serum-free medium in T-flask under different Ca<sup>2+</sup> concentrations 24h after inoculation.  $\diamond$  0.1mmol/L;  $\blacksquare$  0.2mmol/L;  $\blacktriangle$  0.5mmol/L;  $\square$  1.0mmol/L. B: average diameter of 293 cell aggregates cultivated in serum-free medium in T-flask under different Ca<sup>2+</sup> concentrations:  $\square$  0h,  $\text{hatched}$  37h and  $\blacksquare$  87h after inoculation.

的Ca<sup>2+</sup>浓度可用一次函数式(1)表示

$$D = 58.65c + 16.96 \quad (1)$$

式(1)中D表示细胞结团的平均粒径( $\mu\text{m}$ ), c表示培养环境中的Ca<sup>2+</sup>浓度(mmol/L)。图5表明, Ca<sup>2+</sup>浓度在0.1~0.5mmol/L时, 结团的平均粒径迅速达到平衡, 不随时间推移而增大, 因此, 在此Ca<sup>2+</sup>浓度范围内293细胞结团的平均粒

径与Ca<sup>2+</sup>浓度的关系可用式(1)描述。当Ca<sup>2+</sup>浓度为1mmol/L时, 随时间推移, 细胞结团平均粒径已严重偏离此方程。此方程可以指导我们根据需要控制细胞结团尺寸大小。

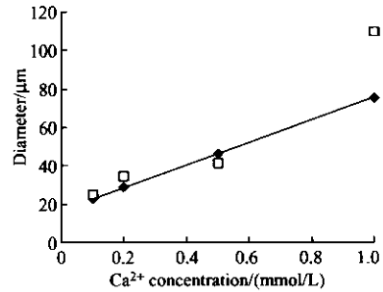


图5 Ca<sup>2+</sup>浓度对293细胞结团平均粒径的影响

Fig.5 The effect of calcium on the aggregation of 293 cells

$\blacklozenge$  37h;  $\square$  87h.

目前已有研究表明许多同种类型的上皮细胞间会形成紧密的粘连, 细胞之间的锚定连接需要粘着因子钙粘素和整联蛋白等参与。钙粘素的分子由720~750氨基酸残基组成, 不同的分子中约有50%~60%的序列相同, 其分子胞外N端的5个结构域中, 有4个同源性高且均含Ca<sup>2+</sup>结合部位。粘着因子均为整合膜蛋白, 在胞内与细胞骨架成分相连。目前至少可分成五种以上的类型, 多数要依赖Ca<sup>2+</sup>才起作用。研究表明较高的Ca<sup>2+</sup>浓度会使一些功能性的复合蛋白的聚集明显增多<sup>[8]</sup>。实验中观察到细胞结团平均粒径大小与Ca<sup>2+</sup>浓度成正比, 推测与293细胞易于结团有相似的机理。

### 2.2 Ca<sup>2+</sup>浓度对生长的影响

在方瓶中以含0.5% NCS的不同Ca<sup>2+</sup>浓度培养基对293细胞进行培养。细胞48h的形态如图6所示。实验发现Ca<sup>2+</sup>浓度对293细胞的贴壁形态有较明显的影响。在0.1mmol/L Ca<sup>2+</sup>浓度下, 细胞贴壁不牢, 并没有铺展成多边形, 而为圆形收缩状态, 有少量悬浮。随着Ca<sup>2+</sup>浓度的升高, 细胞有聚集、贴壁伸展的趋势。而在不同Ca<sup>2+</sup>浓度下, 细胞的比

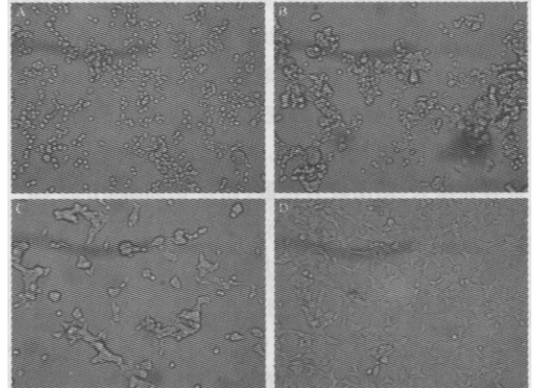


图6 293细胞在方瓶中不同Ca<sup>2+</sup>浓度下培养48h的形态

Fig.6 The morphology of 293 cells cultivated in T-flask under different Ca<sup>2+</sup> concentrations 48h after inoculation

A: 0.1mmol/L Ca<sup>2+</sup>; B: 0.2mmol/L Ca<sup>2+</sup>; C: 0.5mmol/L Ca<sup>2+</sup>; D: 1.0mmol/L Ca<sup>2+</sup>.

生长速率基本相同(图7A)。因此有血清贴壁培养时  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对细胞的生长没有显著影响,而对其贴壁状态有较显著的影响, $\text{Ca}^{2+}$  浓度越高细胞贴壁状态越好。可能由于上皮细胞通常存在的跨膜连接的糖蛋白,其细胞内的部分与附着蛋白相连,细胞外的部分与胞外基质的相互作用为  $\text{Ca}^{2+}$  依赖型。因此在有血清静态贴壁培养或微载体培养中,应保持  $\text{Ca}^{2+}$  在较高的浓度范围,有利于293细胞的贴壁生长。

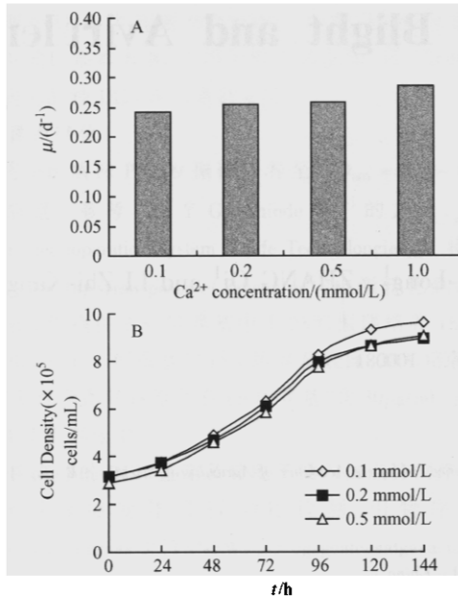


图7  $\text{Ca}^{2+}$  对293细胞生长的影响

Fig.7 The effect of calcium on the growth of 293 cells

A: specific growth rate of 293 cells cultivated in T-flask with 0.5% NCS under different  $\text{Ca}^{2+}$  concentration; B: effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on growth of 293 cells cultivated in spinner bottle.

在转瓶中以含1% NCS的不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度培养基对293细胞进行培养。其生长情况如图7B所示。由图可以看出,不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下细胞的生长曲线基本相似,因此有血清悬浮培养时  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对细胞生长没有显著影响。

在方瓶中以不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的无血清培养基对其进行培养,不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的无血清培养基中细胞的平均比生长速率基本一致。

综上所述,无论在有血清还是无血清、贴壁培养还是悬浮培养, $\text{Ca}^{2+}$  浓度在0.1~1.0mmol/L范围内对293细胞生长均无显著影响。该实验结果与Peshwa等(1992)在摇瓶实验中观察到的结果相类似<sup>[9]</sup>。在细胞生长过程中,结团过大将给物质传递带来的较大阻力,使团块内的细胞的营养物质耗竭和代谢副产物积累的问题更为突出;而在腺病毒感染过程中,较大的团块使病毒接触细胞的几率减少,严重影响病毒产量。因此在293细胞悬浮培养基的设计中为了使细胞易于分散,可将  $\text{Ca}^{2+}$  浓度控制在较低的范围,既可有效避免293细胞悬浮培养和腺病毒扩增过程中因细胞结团过大而造成

的诸多不利影响,又不至影响细胞的生长。本研究还发现293细胞在无血清培养中平衡时的结团尺寸与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成正比,可用简单的一次函数式(1)描述。因此在连续高密度灌注培养中,采用细胞适当结团的培养方式可以缓解细胞截留系统的压力,以获得较高的细胞密度和病毒产量,根据式(1)作适当修正,即可控制平衡时细胞结团的平均粒径以满足细胞截留系统的要求,实现高密度培养。

### 3 结论

$\text{Ca}^{2+}$  浓度在0.1~1.0mmol/L范围内变化对293细胞的生长没有显著影响。贴壁培养时,较高的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度有利于细胞贴壁。而悬浮培养时无论有血清还是无血清条件下,培养环境中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对293细胞的结团性质有显著影响:当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为0.1mmol/L时,细胞结团平均粒径小,团块松散;当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较高(大于0.5mmol/L)时,细胞结团致密,尺寸甚至可达毫米级。随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增大,细胞结团平均粒径增大,团块更致密。无血清培养  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在0.1~0.5mmol/L范围内,细胞结团达到平衡后的平均粒径  $D(\mu\text{m})$  与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度  $c$  (mmol/L)可用一次函数关系式  $D = 58.65c + 16.96$  描述,根据需要可通过调节  $\text{Ca}^{2+}$  浓度控制293细胞结团尺寸。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Wang YB, Huang S. Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *DDT*, 2000, 5: 10-14
- [2] Isabelle Nadeau, Amine Kamen. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnology Advances*, 2003, 20: 475-489
- [3] Johanne Côté, Alain Garnier, Bernard Massie *et al.* Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 59: 567-575
- [4] Wong K, Guardia MJ, Lee S *et al.* Adenovirus vector production in 293 fed-batch cultures. Kluwer Academic: New York. 1999, 367-369
- [5] Schoofs G, Monica TJ, Ayala J *et al.* A high-yielding serum-free, suspension cell culture process to manufacture recombinant adenoviral vectors for gene therapy. *Cytotechnology*, 1998, 28: 81-89
- [6] Tolbert W, Hitt MM, Feder J. Cell aggregate suspension culture. *In vitro*, 1980, 16: 486-490
- [7] Peshwa MV, Kyung YS, McClure DB *et al.* Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: Effect of calcium concentration on spatial distribution of viability. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41: 179-187
- [8] Matthey DL, Burdge G, Garrod DR. Development of desmosomal adhesion between MDCK cells following calcium switching. *J Cell Sci*, 1990, 97: 689-704