

# 微载体培养分泌HBsAg的Bu3细胞生长动力学研究

陈志宏 施源 袁颂兰 丁健椿

(华东化工学院生化工程研究所, 上海)

本文研究微载体半连续悬浮培养表达乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的基因工程哺乳动物细胞(Bu3)的工艺过程,建立了细胞在微载体上的生长模型、葡萄糖消耗和乳酸生成模型。实验表明,微载体悬浮培养系统能使贴壁依赖性Bu3细胞达到高密度和产物高表达。

**关键词** 细胞培养;微载体;动力学;HBsAg

乙型肝炎是一种严重威胁着人类健康的传染性疾病,在我国乙肝病毒携带者占全国人口的10%以上<sup>[1]</sup>,其传染方式主要靠血液和母婴传播,乙肝疫苗能有效地阻断母婴垂直传播。随着基因工程技术的发展,HBsAg基因在哺乳动物细胞中表达成功<sup>[2,3]</sup>。通过大量培养表达HBsAg的基因工程细胞,可以大量获取制备乙肝疫苗的主要原料。因此,需要实现动物细胞的大规模培养。研究大规模动物细胞培养始于本世纪60年代<sup>[4-6]</sup>,主要有两种选择:悬浮培养系统和贴壁依赖性系统,两者适用于不同的细胞,各有千秋。虽然动物细胞大量培养研究已开展了20多年,但真正受到人们的重视并投以巨大大人力物力加以研究还是近几年的事。目前,新一代药物、疫苗、生长因子及其他药用价值的蛋白正在崛起,而这些蛋白结构十分复杂,要求分子有精确的折迭和糖基化,基因重组技术的发展和完善使之成为可能,但克隆的细菌和酵母系统难以保持这类蛋白质高度的生理活性。而经基因重组的哺乳动物细胞能产生并分泌这类蛋白,因此,大规模动物细胞培养在这类药物产品的工业化生产方面起到了关键作用。目前,总趋势是向高密度、高产量、大容

积、自动化方向发展。微载体培养系统能提供大的比表面积,为贴壁依赖性细胞达到高密度提供了基础条件,细胞所处环境均一、温和,容易监测、控制,汇集了贴壁培养系统和悬浮培养系统的优点于一体,因而成为大规模动物细胞培养工业化进程中很有效的技术之一。已用于培养多种细胞和病毒生产生物制品,如口蹄疫疫苗<sup>[8]</sup>、小儿麻痹症<sup>[9]</sup>和疱疹疫苗<sup>[10]</sup>等。国内在这方面起步较晚,尚未进入工业化生产阶段。本文对采用微载体在细胞生物反应器中半连续培养基因工程动物细胞,分泌HBsAg的过程进行了开发研究,建立了细胞在微载体上的生长模型、葡萄糖消耗及乳酸生成模型,对于大规模细胞培养过程的监控和放大具有指导意义。

## 材料与方 法

### (一) 细胞株及材料

1. 细胞株:表达HBsAg的基因工程细胞(Bu3)为克隆HBV中HBsAg表达

本文于1990年4月9日收到。

本论文工作在长春生物制品研究所完成,工作中得到了张权一、张兴义研究员的支持和关心以及官桂范、于洪涛等同志的帮助。同时还得到中国预防医学科学院病毒学研究所任贵方教授的指导,特此致谢。

基因的重组 DNA 动物细胞。由中国预防医学科学院病毒学研究所建立。

2. 培养基: DMEM(GIBCO Laboratories, Life Technologies, Inc., NY, USA), 配制时, 加入 L-脯氨酸 34.5mg/L, 甘氨酸 7.5mg/L。使用前, 另加200mmol/L氨甲喋呤0.1%。

3. 微载体: Cytodex3(Pharmacia AB, Uppsala, Sweden), 先用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 浸泡至少3h, 高压灭菌 (121°C, 30min), 再用生长液浸泡过夜, 备用。

## (二) 分析方法

1. 细胞计数: 取1ml 均匀悬浮的培养样品于刻度试管中, 待微载体沉淀后, 去弃上清, 用无  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  PBS 洗2次, 加入胰酶消化 (37°C, 5min), 并不时搅拌。离心 (2000rpm, 5min), 去上清, 重新悬浮并吹打细胞微载体并加入锥虫蓝染色。如需要, 稀释至一定倍数, 用血球计数器计数活性细胞。重复3次, 取平均值。

2. 葡萄糖: 葡萄糖浓度采用葡萄糖测定试剂盒 (上海生物制品研究所), 在

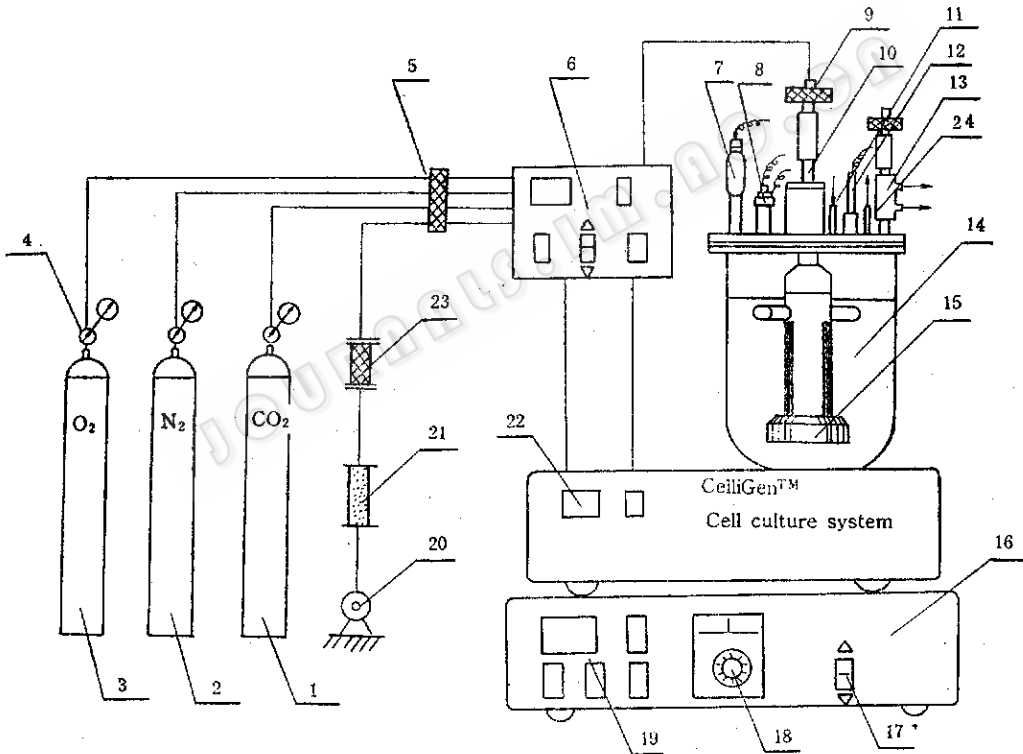


图 1 细胞培养装置流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of Buz cell culture system

1.  $\text{CO}_2$  钢瓶 ( $\text{CO}_2$ )    2.  $\text{N}_2$  钢瓶 ( $\text{N}_2$ )    3.  $\text{O}_2$  钢瓶 ( $\text{O}_2$ )    4. 减压阀 Regulator  
 5. 过滤器 Filter    6. 温度转速选择调节  $^{\circ}\text{C}$ , rpm mode select, UP/down    7. pH 电极 pH probe    8. 溶氧电极 DO probe    9. 过滤器 Filter    10. 气体入口 Gas in  
 11. 过料口 Feed inlet    12. 温度电极 Temp. probe    13. 冷凝器 Condenser    14. 罐体 Culture vessel    15. 搅拌浆 Stirrer    16. 控制器 Controller  
 17. 调节开关 UP/down    18. 功能选择 Function select    19. pH, DO选择调节 pH DO mode select, UP/down    20. 空压机 Air compressor    21. 油水分离器 Oil-water separator    22. 电源 Power    23. 过滤器 Filter    24. 出料口 Outlet

505nm处读取A值。

3. 乳酸: 乳酸浓度采用乳酸脱氢酶(Sigma)<sup>[11]</sup>法, 在340nm处读取A值。

4. HBsAg: HBsAg滴度采用反向被动血凝法(RPHA)<sup>[12]</sup>。

### (三) 实验装置

本文采用1.5L CelliGen细胞培养系统(NBS Co., Edsion, NJ, USA), 装置流程图如图1所示。

### (四) 实验方法

从液瓶中收集种子细胞, 计数, 在400ml体积中接种于6g微载体(5g/L)上, 每30min搅拌2min, 以利于细胞与微载体的接触和细胞贴壁, 3—6h后, 加入生长液至最终培养体积(1200ml), 以保持微载体悬浮的转速连续搅拌(约40rpm)。每2天换液一次, 先停止搅拌让微载体沉积, 抽去上清培养液, 再加入新鲜培养液, 进行半连续培养。培养条件为pH7.0—7.4, 溶氧(DO)20—50%, 37℃, 小牛血清7—10%, 初始细胞接种密度为 $2.0 \times 10^6$  cells/ml。每天取样观察细胞生长, 检测细胞数、糖浓度、乳酸浓度以及HBsAg滴度。

## 结果与讨论

### (一) 细胞生长动力学

Bu3细胞在悬浮的微载体培养系统中如同细胞在瓶壁表面贴壁生长一样, 在接种后的最初几天, 处于滞后期, 此时, 细胞比生长速率近似为零。有时, 由于胰蛋白酶消化处理的影响, 还可能出现损伤部分细胞而呈略为减少的趋势。在滞后期过后, 细胞在微载体表面开始呈梭状伸展, 逐渐进入对数生长期, 其间细胞密度不断增加, 如图7所示。微载体表面也不断被细胞所覆盖, 细胞逐渐扩展呈单层汇合,

此时, 微载体再不能提供空余表面供细胞生长。细胞的生长会因此受到抑制, 有时也会出现多层生长现象。随着大量细胞的生长, 细胞对营养的需求越来越大, 有些细胞不能摄取到充足的营养而造成细胞不断老化, 出现部分细胞脱落现象。随着老化的细胞脱落, 新细胞不断生长, 形成一个恒定状态。细胞比生长速率趋近于零, 细胞密度基本不变。这样可保持不断地收获含有细胞分泌产物的培养液。

根据对Bu3细胞在微载体表面贴壁生长情况分析, 可作如下假定: (1) 在细胞接种后存在一个延迟期, 细胞比生长速率为零。延迟时间( $t_L$ )定义为细胞接种后适应新环境所需的时间, 此间细胞尚未开始生长, 它根据具体情况而定; (2) 细胞在微载体上生长存在一个临界接种密度, 低于此临界接种量, 细胞比生长速率为负值; (3) 延迟期后, 细胞密度较低时(与长满时相比)细胞比生长速率近似为定值; (4) 细胞在微载体表面长满后, 处于稳态, 细胞比生长速率为零; (5) 比生长速率从恒定值平稳过渡为零。

根据上述分析和假定简化, 可建立如下细胞生长模型:

$$\frac{dX}{dt} = \begin{cases} 0 & (t < t_L) \quad (1) \\ \mu_{max} \cdot (1 - e^{-(C)(X_m - X)/(X - X_c)}) \cdot X & (t \geq t_L) \quad (2) \end{cases}$$

式(1)、式(2)满足上述假设, 也能较好地描述实际过程。

延迟期 $\mu = 0$ ; 接种量低于临界值时,  $\mu < 0$ ; 对数生长期,  $\mu = \mu_{max}$ ; 平稳期,  $\mu = 0$ 。

根据实验数据, 用改进高斯-牛顿法对模型参数进行辨识, 得出模型参数 $\mu_m$ 、 $C$ 、 $X_m$ 、 $X_c$ 、 $t_L$ 的辨识值分别为0.50, 2.0,  $2.3 \times 10^6$ ,  $8.0 \times 10^4$ , 3。图2表示了模型输出与实验数据有较好的吻合。值

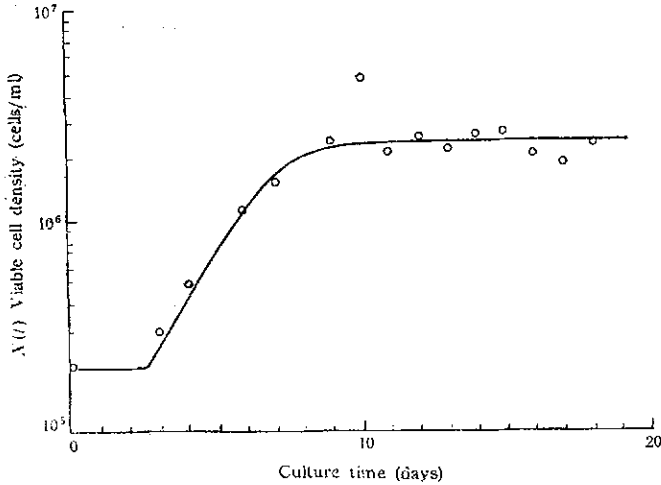


图2 生长动力学模型与实验数据比较

Fig.2 Comparison of growth kinetics model and experimental data

—模型输出 Model      °实验数据 Experimental data

得说明的是,当细胞在微载体表面长呈单层汇合后,出现多层生长现象时,模型不能很好地描述实际过程。

## (二) Bu3 细胞糖代谢及乳酸生成动力学

Bu3 细胞生长的主要碳源葡萄糖浓度的高低及其消耗对细胞生长有着重要影响,主要代谢产物的乳酸浓度过高对细胞生长极为不利。实验结果表明,Bu3 细胞对葡萄糖的消耗及乳酸的生成主要与细胞密度和糖浓度有关。细胞生长愈快,细胞密度愈高,糖耗愈快,相应产乳酸也愈多。糖浓度愈高,其消耗速率愈快,相应乳酸生成愈多。通过对培养过程中糖耗及乳酸生成情况分析,认为,在对数生长期,糖耗速率主要与细胞生长速率有关;对数生长期,糖耗除了与细胞密度有关外,还受到葡萄糖浓度的影响。乳酸生成速率与葡萄糖消耗速率成正比。于是,提出如下相应糖耗及乳酸生成模型:

(a)对数生长期

$$\frac{dG}{dt} = -Y_{GX1} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

$$\frac{dL}{dt} = -Y_{LG1} \cdot \frac{dG}{dt} \quad (4)$$

(b)维持期

$$\frac{dG}{dt} = -Y_{GX2} \cdot \frac{GX}{K_G + G} \quad (5)$$

$$\frac{dL}{dt} = -Y_{LG2} \cdot \frac{dG}{dt} \quad (6)$$

由于培养方式为半连续式,2—3天换液一次,因此,以每个换液周期进行考察。根据实验数据,采用改进高斯算法进行模型参数的辨识,得出模型参数 $Y_{GX1}$ 、 $Y_{LG1}$ 、 $Y_{GX2}$ 、 $Y_{LG2}$ 、 $K_G$ 的辨识值分别为4.2, 1.5,  $1.0 \times 10^{-7}$ , 0.8, 3.0。图3—6表示了模型输出与实验数据的吻合情况。如图3、4所示,对数生长期,细胞糖耗速率主要与细胞生长有关,随着细胞的迅速生长,糖耗及相应乳酸生成速率加快,表现为在相同换液频率情况下,残糖浓度不断降低,由2.4mg/ml降至0.3mg/ml;相应乳酸生成浓度由1.8mg/ml上升至2.3mg/ml。在维持期,如图5、6所示,糖耗速率与乳酸生成速率主要受糖浓度的影响(因细胞密度基本不变),表现为

不同的周期内，更换新鲜培养基 24h后残糖浓度均为 2.0mg/ml 左右，乳酸浓度 2.5mg/ml 左右，即  $\Delta G$  为 2.5mg/ml， $\Delta L$  为 2.5mg/ml，（高糖时），48h 后，即

低糖浓度时，残糖均为 0.8mg/ml 左右，乳酸均为 2.8mg/ml 左右，相应  $\Delta G$  为 1.2mg/ml， $\Delta L$  为 0.3mg/ml。说明糖浓度高时，糖耗及乳酸生成速率快，糖浓度

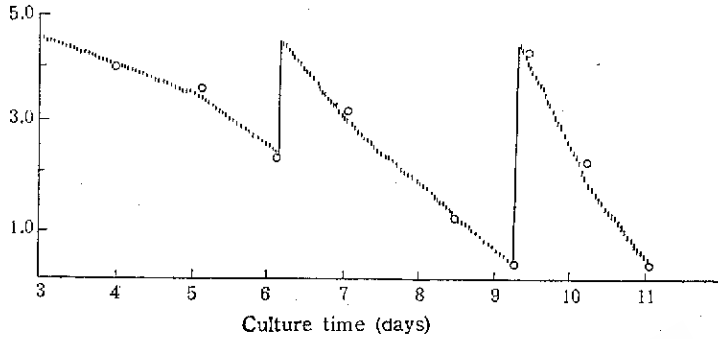


图 3 对数生长期糖耗模型与实验数据(纵座标为 $G(t)$ )

Fig.3 Glucose consumption model and experimental data at logarithmic growth phase

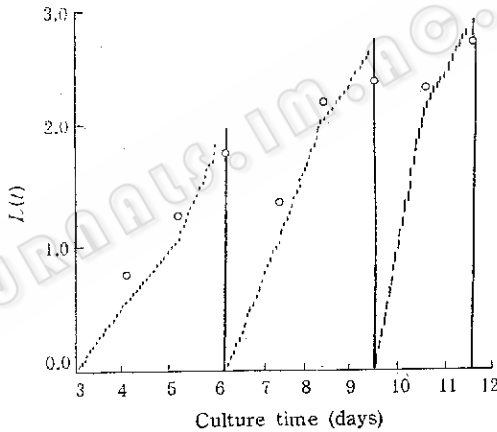


图 4 对数生长期乳酸生成模型及实验数据

Fig.4 Lactate accumulation model and experimental data at logarithmic growth phase

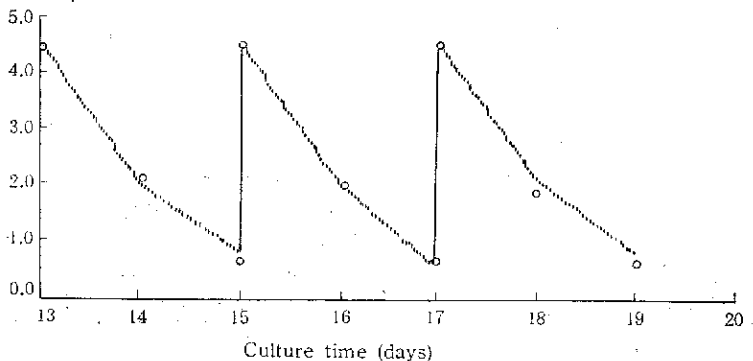


图 5 维持期糖耗模型及实验数据(纵座标为 $G(t)$ )

Fig.5 Glucose consumption model and experimental data at maintenance phase

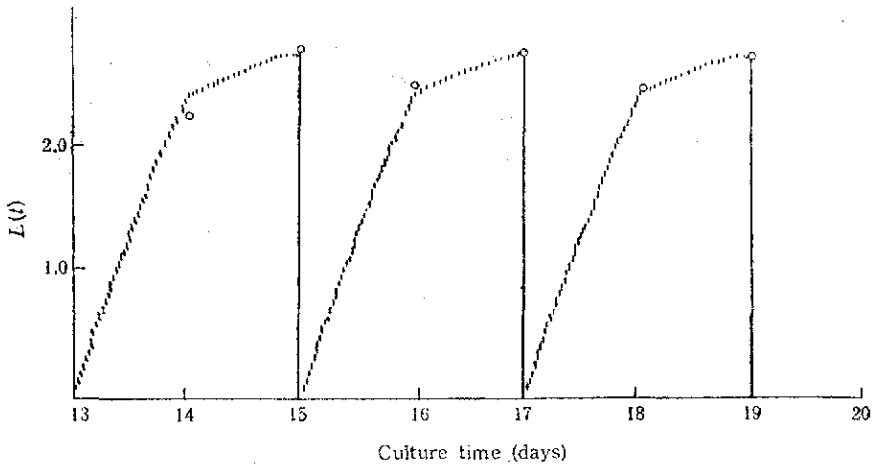


图6 维持期乳酸生成模型及实验数据

Fig.6 Lactate accumulation model and experimental data at maintenance phase

低时，其糖耗及乳酸生成速率慢。

(三) 产物HBsAg的分泌

对于产物HBsAg的分泌量，其滴度变化如图7所示，主要随细胞密度的增加而提高。在培养初期，细胞密度较低，仅 $2.0 \times 10^5$  cells/ml。随着细胞不断生长，细胞密度不断提高，HBsAg滴度随之从

1:32上升到1:64和1:128。当细胞长满微载体表面，活性细胞达 $2.3 \times 10^6$  cells/ml并处于稳定状态时，HBsAg滴度又上升至1:256。表明HBsAg滴度的高低，主要取决于细胞密度的多少及细胞活性的高低。理论上认为，Bu3细胞克隆的HBsAg基因整合于细胞染色体上，因此，活性细

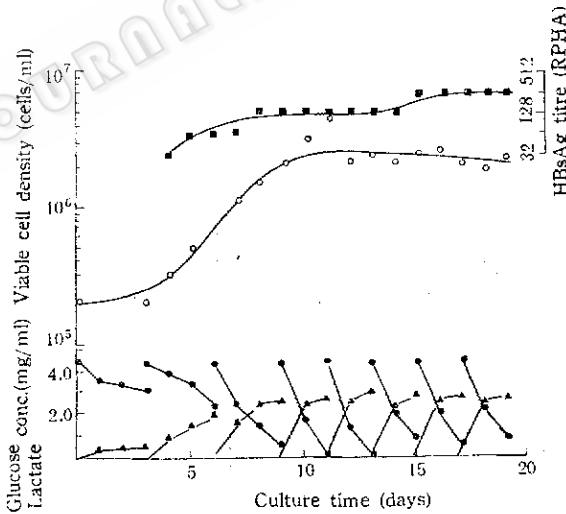


图7 产物分泌与细胞密度的关系

Fig.7 Relationship between HBsAg secretion and viable cell density

符号说明

- |                 |                                  |
|-----------------|----------------------------------|
| C 可调节模型参数       | $\mu$ 比生长速率( $\text{day}^{-1}$ ) |
| G 葡萄糖浓度(mg/ml)  | X 细胞密度(cells/ml)                 |
| $K_G$ 饱和常数      | $X_c$ 临界细胞接种密度(cells/ml)         |
| L 乳酸浓度(mg/ml)   | $Y_{GX1}, Y_{GX2}$ 细胞糖耗速率系数      |
| t 培养时间(day)     | $Y_{LG1}, Y_{LG2}$ 乳酸生成糖耗速率系数    |
| $t_d$ 延迟时间(day) |                                  |

胞的增加使得合成 HBsAg 的场所增加, 从而提高了 HBsAg 的分泌量。但在实际过程中, 细胞长满微载体表面处于维持期动态平衡时, 甚至细胞有所减少时, HBsAg 滴度反而有所提高, 这可能是由于细胞的脱落和破碎、分解, 释放出更多的产物或与产物合成有关的酶。HBsAg

基因的转录和转译过程受控于宿主细胞有关酶系的活力, 以及除自身代谢外额外能量的供给, 当葡萄糖有效利用率提高, 减少乳酸的生成积累, 可以提供给细胞更多的能量, 对 HBsAg 的胞内合成亦可能起到积极作用。

### 参 考 文 献

- [1] 黄楨祥: 病毒性肝炎研究进展, 科学技术出版社, 1986.
- [2] 任贵方等: 微生物学报, 24: 326, 1984.
- [3] Michel, M. L. et al.: *Bio/Technology*, 3(6):561, 1985.
- [4] van Wezel, A. L. et al.: *Nature*, 216:84, 1987.
- [5] Capsitick, P. B. and Telling, B. C. et al.: *Nature(London)*, 195:1163, 1962.
- [6] Himmelfarb, P. et al.: *Science*, 164:555, 1969.
- [7] Meignier, B.: *Develop. Biol. Standard.*, 42:141, 1979.
- [8] Meignier, B. et al.: *Develop. Biol. Standard.*, 46:249, 1980.
- [9] Montagnin, B. J. et al.: *Develop. Biol. Standard.*, 47:55, 1981.
- [10] Griffiths, B. et al.: *Eur. J. Cell Biol.*, 22:606, 1980.
- [11] Sigma Technical Bulletin No. 826-UV.
- [12] 武建国等: 实用临床免疫学检验, 江苏科学技术出版社, 1989.

## Growth Kinetics of Bu3 Cells Secreting HBsAg in Microcarrier Culture

Chen Zhihong Shi Yuan Yuan Songlan Ding Jianchun  
(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University of Chemical Technology, Shanghai)

The process is studied in which Bu3 cells secreting HBsAg are cultured on microcarriers semi-continuously, a propagating model of Bu3 cells on microcarriers, glucose consumption, lactic acid accumulation models are established. It is illustrated that microcarrier culture technology enables the anchored Bu3 cells to reach high yield and high HBsAg expression.

### Key words

Cell culture; microcarrier; HBsAg; kinetics