

微载体大量培养动物细胞的实验研究**

朱德厚 陈尊器* 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

用微载体(Microcarrier)大量培养细胞是近十多年发展起来的一种新方法,其基本原理是利用固体小颗粒作为载体,通过连续搅拌悬浮于培养液中,细胞在载体的表面附着,并成单层生长繁殖。由于扩大了细胞的附着面,能充分利用生长空间和营养液,因此大大地提高了细胞的生长效率和产量,具有节省人力、物力、时间和空间等优点,为满足日益发展的细胞生物学研究和实际应用提供有利条件。近年国外已做了一些工作^[1-2]。但国内尚未见报道。鉴于悬浮培养往往需要某些特殊设备条件,一定程度上限制了其推广应用,我们采用一种自行设计的悬浮培养装置,开展大量培养动物细胞的实验研究,并用一些检测方法,作为检测培养细胞的产量和功能状态的新指标,获得比较满意的效果。

材料及方法

一、微载体及其处理

选用 DEAE-Sephadex-A50 及 Cytodex-1 为微载体,在 pH7.4 的磷酸缓冲液(PBS)中浸泡过夜,然后吸去上清液,再以同溶液洗涤 5 次,经过 10 磅 15 分钟高压灭菌,吸除上清液,以含有 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配制成 20 毫克/毫升浓度,置 4℃ 冰箱备用。

二、细胞

本实验曾用人体肝癌 BEL-7402 细胞系、大鼠肝癌 CBRH-7919 细胞系及 HeLa 细胞,在含有 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液、pH7.4、温度 37℃ 中培养 60—72 小时后,经胰酶溶液消化,收集细胞供接种。

三、接种及培养

吸取经过处理的微载体,按 2 毫克/毫升浓度加于自制的悬浮培养瓶(图 1)内,分别接种 5×10^4 /毫升细胞,每瓶先加 20 毫升培养液,轻轻摇动混匀后,

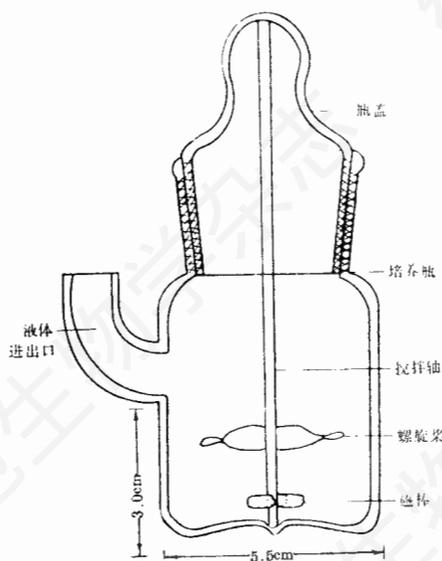


图 1 悬浮培养瓶

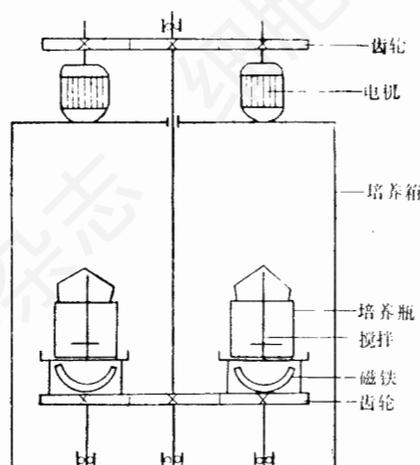


图 2 悬浮培养装置

静置于 37℃ 恒温箱内 4 小时,再加培养液至 50—60 毫升,使最终浓度为 100—120 毫克/10⁶细胞/瓶,然后移置于自行设计的装有连续转动磁力搅拌器的恒温

* 河南省肿瘤研究所。

** 许海滨同志协助摄影,特此致谢。

培养箱中(图2), 转速50次/分, 温度37℃行悬浮培养。在培养后的第3、5、7天各取样一瓶进行观察。

另一部分实验按上述方法接种细胞后, 在培养的第3、5、7天取样之前4小时, 取出培养瓶, 静置片刻, 待微载体自行下沉后, 小心吸弃旧培养液, 用无血清的Eagle's营养液洗涤3次, 然后加入含有2微居里/毫升的 ^3H -亮氨酸的缺亮氨酸Eagle's营养液20毫升, 置悬浮培养箱内搅拌再培养4小时。

对照组采用加微载体和不加微载体两种, 以与悬浮培养相同的载体和细胞浓度, 接种于小培养瓶中行静置培养, 在相应时间内取样进行观察。

四、培养细胞的收集

取样的悬浮培养物, 静置片刻, 待微载体自行下沉后, 小心吸弃去上清液, 经PBS洗涤3次, 加入1:1的0.02% EDTA:0.25%胰酶液10毫升, 置37℃孵育箱中10分钟进行消化, 然后吸去上清液, 加入适量PBS, 用吸管轻轻吹打几次, 立即通过尼龙网滤去微载体。滤液离心1000转/分5分钟, 收集细胞。

对照组静置培养物仿照上法收集细胞, 但未加微载体的标本可不经尼龙网过滤, 直接用0.25%胰酶液消化后离心收集细胞。

五、观察指标及方法

1. 镜检、摄影

收集细胞前, 先吸取未经消化的少量微载体置于自制的玻璃小圆圈中^[3], 在Nikon CFMA型倒置显微镜下观察细胞的形态并摄影。部分标本做了定格摄影, 观察微载体上的细胞生长分裂全过程。

2. 活体染色及计数

吸取收集的细胞悬液2滴, 加等量1%台盼蓝液行活体染色, 立即在血球计数板上计数, 得出死、活细胞值, 求取细胞生长曲线。

3. 测总蛋白量

收集细胞加入适量的0.1N NaOH液, 充分搅匀, 置40℃恒温水浴箱中过夜, 离心3500转/分10分钟, 去除沉淀。取一定量的上清液, 加碱性硫酸铜及Folin试剂, 在72型分光光度计上以波长500nm测光密度, 并计算出被检细胞所含的总蛋白量。

4. 测同位素标记细胞的脉冲值

经 ^3H 标记的标本, 收集细胞后, 用磷酸-亮氨酸缓冲液(P-L buffer)及PBS各洗涤3次, 最后以PBS1毫升制成细胞悬液。吸取悬液0.1毫升滴制滤纸片, 每个样品共3片, 吹干后经三氯醋酸、乙醇、

乙醚处理, 置入于10毫升脂溶性闪烁液中, 在NE 8312型液闪仪测脉冲值。

另吸取0.3毫升细胞悬液, 加入10%三氯醋酸, 充分搅匀, 离心3500转/分10分钟, 弃去上清液, 沉淀再用5%三氯醋酸及P-L buffer反复洗涤各3次后, 加入0.2N NaOH至0.9毫升, 吸取平分置入三个各装有10毫升水溶性闪烁液的检测瓶中, 在NE 8312型液闪仪测脉冲值。

结 果

一、本实验用HeLa、BEL-7402及CB-RH-7919三种细胞系, 经悬浮或静置培养3-7天, 95%以上的微载体上都有细胞紧密附着, 生长繁殖旺盛。培养初期, 每一微载体上只有少数细胞附着, 随着培养时间的延长, 细胞逐步铺开、生长、繁殖至几十个或百余个细胞的茂密单层, 铺展于微载体的表面(图版: 图1-3)。相差显微镜下观察和定格摄影记录可见细胞透明, 界限清晰, 伸展铺开, 运动活跃, 并行直接分裂和有丝分裂(图版: 图4)。经活体染色测得活细胞率在90%以上。培养细胞计数结果如图3、4。

从图中可见, 微载体悬浮培养HeLa及

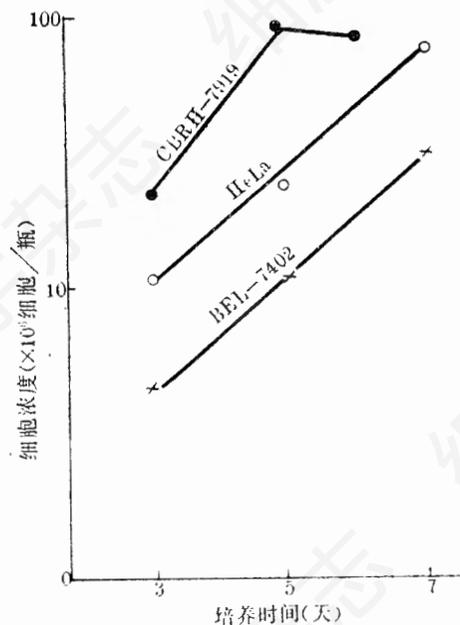


图3 三种细胞系悬浮培养生长曲线

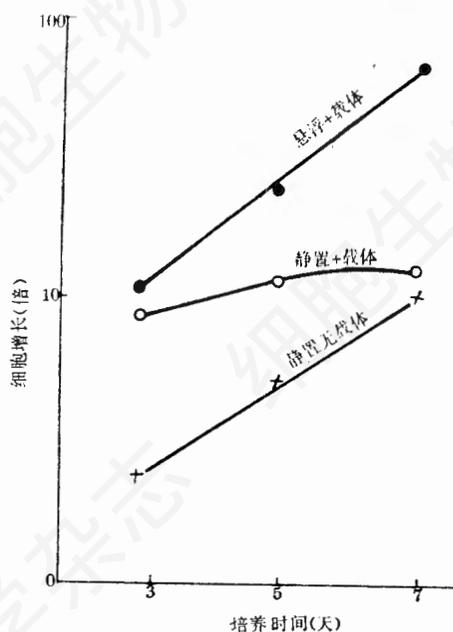


图4 三种方法培养 HeLa 细胞增长的比较

BEL-7402 细胞系，其最高产量第七天分别为原接种细胞数的 63.5 及 31 倍，CBRH-7919 细胞系在第 5 天为 95 倍。HeLa 细胞系加微载体悬浮培养分别与加或不加微载体的静置培养比较，悬浮培养的产量较两组对照分别提高了 49.3 及 52.4 倍。

二、HeLa 细胞加载体悬浮培养 3—7 天后的总蛋白量和经 ^3H -亮氨酸标记后测脉冲值结果如表 1、2。

表 1 悬浮培养不同时间 HeLa 细胞的总蛋白量*

| 3 天 | | 5 天 | | 7 天 | |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| 平均值 (r) | 增长 (倍) | 平均值 (r) | 增长 (倍) | 平均值 (r) | 增长 (倍) |
| 1023 | 4.6 | 2173 | 9.8 | 7730 | 35.0 |

* 以预测 100 万细胞得 221r 为基数 1，计算增长倍数。

表 2 悬浮培养后不同时间 ^3H 标记 HeLa 细胞的脉冲值

| 方法 | 3 天 | 5 天 | 7 天 |
|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| | 脉冲数/60 秒 | 脉冲数/60 秒 | 脉冲数/60 秒 |
| 纸片法 | 60×10^4 | 133×10^4 | 175×10^4 |
| 直接法 | 35×10^4 | 60×10^4 | 99×10^4 |

从表中结果可见，随着培养时间的延长，细胞总蛋白含量和同位素掺入量均有相应增加。将此结果再与同一时间内的细胞计数相比较如图 5，可见到四个指标的对数座标曲线有平行的趋势。

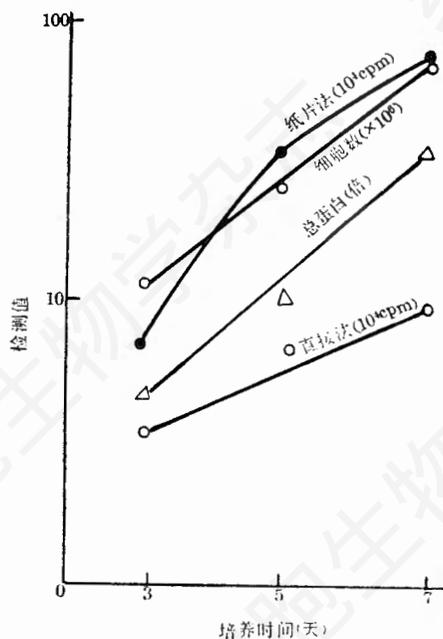


图 5 HeLa 细胞悬浮培养四个指标比较

三、经过培养后从微载体上洗脱下来收集的细胞，再接种培养也均能继续正常生长繁殖。悬浮培养的微载体可以回收，适当处理后仍可再用。

讨 论

五十年代以来，随着哺乳动物细胞体外培养技术的进展，在细胞生物学的研究和疫苗、生化制剂的生产上都需要大量细胞。实验室常采用的单层静置培养或转瓶培养法，由于生长表面小，细胞产量低，已不能满足日益发展的需要。虽然曾有人试图设计某些能够增加细胞产量的培养器和方法，例如多表面繁殖器^[4]、塑料螺旋管转瓶法^[5]和毛细管繁殖器^[6]等等，但仍然存在附着表面的限制以及不便于随意取样检查和监视培养环境等缺点。十余年前，

Van Wezel 首先提出和试用微载体悬浮培养法^[7], 成功地培养了双倍体人胚肺细胞、原代兔肾细胞和胚兔皮肤纤维母细胞等, 为增加培养细胞的产量提供了小容积、大表面的良好条件, 从而引起大家的关注和进一步研究, 获得提高5—10倍的细胞产量, 并逐步从实验阶段发展到实际应用^[8-13]。这种方法的成败, 关键之一是选择适宜的微载体。作为微载体的基本要求, 必须对细胞无毒性, 不影响营养液成分, 大小适于被搅拌浮动, 能供细胞良好附着生长, 透明无色, 便于观察检查等等。曾试用过如小玻璃球、小塑料球以及葡聚糖颗粒, 但都因为重量、毒性和表面电荷的问题不能满足要求而不适用。经过不断研究改进, 交联处理后的DEAE-Sephadex较为合适, 近年某些新产品质量上又有进一步改善。我们实验采用DEAE-Sephadex A-50及Cytodex-1作为微载体, 在每个培养瓶加以100—120毫克/100万细胞/60毫升培养液的浓度, 转速50转/分和37℃恒温条件下, 用自行设计的磁力连续搅拌装置, 对HeLa细胞、BEL-7402及CBRH-7919细胞系进行悬浮培养, 5—7天内可使细胞生长繁殖产量自原接种数分别增加至63.5、31及95倍, 远较文献报道的倍数为高。HeLa细胞加微载体悬浮培养与加或不加入微载体的静置培养对照组比较, 实际提高产量分别为49.3及52.4倍。经过活体染色, 培养细胞存活达90%以上。细胞在微载体上运动活跃, 能进行直接分裂和有丝分裂。所用的两种微载体的培养效果基本相同, 但Cytodex-1的透明度更佳, 摄影图象更清晰。文献上已成功培养的细胞包括正常双倍体细胞、移植细胞、杂交细胞和单克隆细胞共60余种, 但迄今尚未见到人体肝癌细胞系微载体悬浮培养方面的报道。

另一方面, 本实验采用自行设计的悬浮培养瓶的底面积为27cm², 按单层细胞培养贴壁面积计算, 约相当于2.5只11cm²的小培养瓶。若在悬浮培养瓶中加入120毫克的微载体,

所加颗粒的总表面积约为700cm², 相当于增加了63只小培养瓶的培养面积。再从消耗培养液量上看, 每一悬浮培养瓶在一次培养中用培液60毫升, 于培养的第4—5天需换液一次, 每瓶共消耗培养液120毫升, 平均能获得5000万左右的细胞产量, 相当于用15只小培养瓶进行培养的总产量。用小培养瓶培养细胞通常每瓶加培养液5—6毫升, 在培养的第2、4及6天各换液一次, 即每瓶共需消耗培养液20—24毫升, 若欲得到同样产量的细胞, 需消耗培养液300—360毫升。对比之下, 微载体悬浮培养法较之静置培养法可节省培养液2.5—3.0倍。上述这些结果表明, 微载体悬浮培养法具有大大提高细胞产量、减少培养液的消耗, 节省人力、物力、时间和空间等优点, 为实验研究和生产应用提供了有效的手段。

检测培养细胞产量的指标, 一般常用直接计数或经活体染色、计核的方法。虽然这些方法比较简便易行, 但由于稀释倍数大和其他因素, 准确性差, 误差也大, 但文献上尚未见到应用更多的其他可靠指标。我们用直接测定培养细胞总蛋白量和同位素掺入脉冲值, 随着培养时间的延长和细胞数的增加, 总蛋白量和同位素掺入量也均有相应增长, 三者的对数座标曲线成平行的趋势, 初步表明这些检测方法以成为估计细胞产量和功能状态的有效指标。

小 结

微载体悬浮培养法培养哺乳动物细胞, 可以在较短时间内获得大量活细胞。我们选用DEAE-Sephadex-A50及Cytodex-1两种微载体, 以100—120毫克/100万细胞/瓶的浓度, 转速50转/分, 37℃恒温条件下培养HeLa、BEL-7402及CBRH-7919三种细胞系, 结果表明, 培养5—7天内其产量分别可增加63.5、31及95倍, 远较文献报道为高。HeLa细胞加微载体悬浮培养与加或不加微载体的静置培养对照组比较, 实际提高产量分别为49.3及52.4倍。95%的微载体上都有培养细

胞茂密生长繁殖, 并进行直接分裂及有丝分裂, 活细胞率在90%以上, 且有进行亮氨酸掺入的功能。同时, 可节省培养液消耗量2.5—3.0倍。测定培养细胞总蛋白量及同位素掺入量, 可作为判定细胞实际产量和功能状态的指标。

微载体悬浮培养法为细胞生物学研究和病毒及其他生物制品的生产提供了大量的细胞, 且可为某些不能在悬浮培养情况下生长的细胞, 如原代细胞、双倍体细胞的转向悬浮培养及大量繁殖提供有效的手段。

参 考 文 献

- [1] Van Wezel A. L., 1973, *Tissue Culture- Methods and Applications* ed. by Paul F. Kruce, Academic Press, p. 372—377.
 [2] Levien, D. W. et al., 1977, *Cell Culture and its Application*, ed by Action, R. t. et al., Academic Press, New York, p. 191—216.
 [3] 陈瑞铭等, 1978. *实验生物学报*, 11: 157—165.
 [4] Weiss, R. E. et al., 1968, *Biotech. Bioeng.*, 10: 601—615.
 [5] House, W. et al., 1972, *Exp. Cell Res.*, 71: 293—296.
 [6] Knazer, R. A. et al., 1972. *Science*,

178: 65—67.

- [7] Van Wezel A. L., 1967. *Nature*, 216: 64—65.
 [8] Schleicher, J. B. et al., 1968, *Biotech. Bioeng.*, 10: 617—624.
 [9] Chi-Byi Horng et al., 1975. *Biotech. Bioeng.*, 17: 713—732.
 [10] Knight, E., 1977, *App. Envir. Microbiol.*, 33: 666—669.
 [11] Giard, D. J. et al., 1977, *App. Envir. Microbiol.*, 34: 668—672.
 [12] Levine D. W. et al., 1977, *Somatic cell Genetics*, 3: 149—155.
 [13] Van Wezel A. L. et al., 1978, *Process Bioch.*, 13: 6—8.
 [14] Microcarrier Cell Culture technical notes. Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

图 版 说 明

图 1 HeLa 细胞, Cytodex-1 悬浮培养 5 天, 细胞生长繁殖旺盛, 相差 $\times 350$ 。

图 2 CBRH-7919 细胞, Cytodex-1 悬浮培养 3 天, 相差 $\times 700$ 。

图 3 BEL-7402 细胞, DEAE-Sephadex-A50 悬浮培养 3 天, 相差 $\times 350$ 。

图 4 HeLa 细胞, Cytodex-1 悬浮培养 36 小时, 箭头示有丝分裂, 相差定格摄影 $\times 700$ 。

陆荣华等图版说明

图 版 说 明

图 1 人体肝癌细胞 BEL-7402 系与鸡胚中肾联合培养 84 小时, 癌细胞(Ca)紧密粘着于中肾器官(M)周围, 成索状(箭头)浸润于组织深层。H.E.染色 $\times 108$

图 2 人体肝癌细胞 BEL-7404 系与鸡胚中肾联合培养 24 小时, 癌细胞(Ca)紧密粘着于中肾器官

(M)周围, 四个癌细胞(箭头)侵入于组织的浅层。H.E.染色 $\times 360$ 。

图 3 人体肝癌细胞 BEL-7402 系与鸡胚中肾联合培养 84 小时, 肾小管(M)有部分上皮脱落, 为浸润的癌细胞所取代(箭头), H.E.染色 $\times 360$ 。

图 4 正常人胚肺 SL7 细胞(C)系与鸡胚中肾联合培养 48 小时, 细胞成簇聚集, 紧密粘着于器官(M), 但不浸润组织(箭头), H.E.染色 $\times 215$ 。