

微载体培养技术及其在疫苗生产中的应用

王家敏¹, 平 玲¹, 徐水林², 马桂兰³, 魏园园¹, 乔自林¹, 马忠仁¹

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 兰州民海生物工程有限公司, 甘肃 兰州 730010; 3. 兰州百灵生物技术有限公司, 甘肃 兰州 730010)

摘要:微载体培养技术是一种新兴的细胞大规模培养技术,是目前贴壁依赖型细胞大规模培养的重要方法,其兼具贴壁培养和悬浮培养的优势,温度、溶氧浓度和 pH 等培养条件易控制,培养过程自动化、系统化,不易被污染。现就微载体培养技术的发展及其在疫苗生产中的应用进行了综述,并提出了动物细胞微载体大规模培养技术的发展方向。

关键词:微载体;细胞培养;疫苗

中图分类号:R318.08

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)12-0146-04

微载体培养技术是一种细胞大规模培养技术,由荷兰学者 Van Wezel 于 1967 年最先提出,是目前贴壁依赖型细胞大规模培养的重要方法,并成功研制出适应于动物细胞大规模培养的微载体^[1]。历经近 50 年的研发,动物细胞微载体培养技术已日渐完善和成熟,并已广泛应用于细胞工程行业,生产具有重要商业价值和实用意义的细胞产品及生物制品,如白蛋白、病毒疫苗和基因工程产品等。

1 微载体培养技术

1.1 微载体发展历程

微载体(microcarrier)是指直径为 60~250 μm 在细胞培养中使用的一类无毒性、非刚性、密度均一、通常为透明的微球,能使贴壁依赖性的细胞在悬浮培养状态下贴附在微球表面单层生长,极大地扩增了细胞贴附面积,更利于大规模培养和收集细胞。微载体一般是由天然葡聚糖或者其它合成的聚合物制成,其原理是把对细胞无害的微载体加入到培养容器的培养液中,使细胞在微载体表面贴附并生长,同时通过持续搅拌使微载体始终保持悬浮于培养液中,贴壁依赖性细胞必须贴附于固体基质的表面才能生长增殖,因此保证细胞进一步铺展和生长的关键是细胞在微

载体表面的贴附,贴附主要利用范德华力和静电引力。细胞能否在微载体表面贴附主要取决于细胞与微载体的接触概率和相容性。Van Wezel 使用交联左旋糖酐(cross-linked dextran)制作表面带有大量氨基集团(DEAE,二乙基氨基纤维素)的微小球体,这些球体表面带有很多离子,其离子交换当量可达 3.5 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质,当微载体悬浮在培养液中,浓度超过 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,接种细胞损失增加,培养时间延长;当浓度达到 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,部分细胞死亡,其原因是微球体表面所带的电荷过多。为了克服这一问题,生产的微载体对其表面涂以血清蛋白(serum proteins)、硝化纤维素(nitrocellulose)或者羧甲基纤维素(CMC, Carboxy methyl cellulose),以降低表面电荷^[1]。1979 年 Levine 开发了一种微载体,其表面所带电荷少,培养液中微载体浓度可达 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。20 世纪 80 年代,市场上出现了许多商品化的微载体,如 Cytodex1、Cytodex2 和 Cytodex3,这些微载体是由 Famarica 公司利用中性葡聚糖凝胶表面偶联正电荷基团开发的系列产品,现已广泛应用于细胞工程产品的研发和生产。

1.2 微载体类型

根据物理性质一般可分为液体微载体和固体微载体两类,固体微载体较为常见,其又分为实心微载体和大孔/多孔微载体。

1.2.1 实心微载体 商品化的 Cytodex 系列是应用较为广泛的一种实心微载体。1972 年 Van Wezel 在报道纯化脊髓灰质炎疫苗中指出,原代猴肾细胞能在 DEAE-Sephadex A50 上贴附生长^[2],为细胞制品的发展打下了前期基础。1977 年 Van Wezel 经过多次试验证明,DEAE-Sephadex A50 中的火棉胶增加了微载体的毒性,对细

收稿日期:2014-07-23

基金项目:教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT13091);甘肃省科技计划资助项目(1203FKDA030、2013GS08044);兰州市科技计划资助项目(2013-4-101)

第一作者简介:王家敏(1987-),女,山东省诸城市人,硕士,助教,从事动物细胞培养和兽用生物制品研究。E-mail: 674965674@qq.com。

通讯作者:马忠仁(1962-),男,甘肃省临夏市人,博士,教授,从事动物医学生物工程技术研究。E-mail: 670267497@qq.com。

细胞的贴壁性生长有很大影响^[3]。1979 年 Levine 证明,降低 DEAE-Sephadex A50 的浓度可以克服细胞贴壁性差的问题^[4]。1980 年 B. MERED^[5]等用 DEAE-Sephadex 凝胶载体培养猴肾细胞和鸡胚原代细胞,该种载体具有少量的负电荷。1981 年 Pharmacia 公司将这种 DEAE-Sephadex 凝胶载体命名为 Cytodex^[6]。这种载体细胞贴壁速度和细胞生长速度较快,但在培养过程中,细胞极易受流动剪切力、球与球之间的碰撞以及搅拌速度等动力学因素的影响。

1.2.2 多孔微载体 1983 年,Nilsson 提出的关于将细胞通过压缩的途径固定理论,为多孔微载体的发展提供了突破性的进展^[7]。1987 年,Young 和 Dean 首次工厂化使用多孔微载体进行细胞培养^[8],标志着大规模细胞培养开始进入新的领域。多孔载体是以明胶和纤维素为材料,微球内部是网状小孔并且相互之间连通到载体表面,接种的细胞会进入微球的内部生长增殖,极大地增加了细胞稳固性,避免了细胞在培养过程中剪切力和气泡的影响,为细胞提供了充分的生长空间,并且增加了搅拌强度和通气量,可用于搅拌釜、填充床和流动床生物反应器,但是这种载体在空间上阻碍了病毒对细胞的感染和氧气等营养物质的摄取。

1.2.3 液体微载体 1983 年 Charles 利用碳氟化合物与培养液在搅拌情况下的临界点,形成蛋白质单层,这种蛋白质单层靠纤维素支持,贴壁型细胞在培养过程中因表面极性而贴附在表面生长^[9]。液体微载体的微球形成、细胞贴壁和细胞培养均在搅拌下完成,培养结束后停止搅拌,由于液相之间的溶解性存在差异,细胞在培养基中会与有机相分开,最终获得细胞。其不足之处是成本较高、制作工艺复杂,且载体不能重复使用。

1.2.4 片状载体 片状载体作为贴壁载体,直径为 6 mm 无纺聚酯纤维圆片,具有很大的比表面积($1\,200\text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$),可多次使用,严格意义上讲片状载体不属于微载体的范畴。但是自 20 世纪 90 年代中期,美国 NBS 公司在中国市场推出固定蓝式搅拌系统和片状载体(FibraCel)以来,相关的产品设备已广泛应用于病毒性疫苗、基因药物治疗和细胞分泌物等生物医药产业的实际生产中,并取得了良好的经济效益。张晋等^[10]利用 7.5 L 蓝式生物反应器片状载体培养 Vero 细胞,制备乙型脑炎灭活疫苗,Vero 细胞培养至 96 h,葡萄糖消耗量达高峰,细胞密度达峰值;接种病毒后 72 h,葡萄糖消耗量达高峰,灌流量为 $7\text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$,连

续收获 79 d,共可收获(40 ± 5)L 病毒液;接种病毒后 96 h 病毒滴度达高峰,为 $10.0\text{ lg LD}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$;制备的乙型脑炎灭活疫苗各项指标均达到《中国药典》三部(2005 版)要求。

2 微载体细胞培养技术在疫苗生产中的应用

1980 年,Meignier 等人首次将动物细胞微载体培养技术应用到脊髓灰质炎疫苗及口蹄疫疫苗的工业化生产中^[11]。Cytodex 可以应用于利用贴壁型动物细胞培养生产的生物制品。动物细胞微载体大规模培养系统可以增殖病毒并提供一个完善的系统用于多种疫苗的研发和生产,目前生产的疫苗包括脊髓灰质炎、狂犬病、流感、风疹、日本脑炎(乙型脑炎)、呼吸道合胞病毒(RSV)和口蹄疫(FMD)疫苗等。2008 年,我国将动物细胞大规模培养技术生产病毒性疫苗列为“十一五”国家科技支撑计划重点项目,以推动实现疫苗生产关键技术的革新和升级。目前,国内外已广泛应用生物反应器微载体细胞培养技术大规模自动化生产疫苗。

2.1 微载体大规模培养 Vero 细胞生产疫苗

Vero 细胞是由 Yasumura^[12]等几名日本学者于 1962 年从成年健康的非洲绿猴肾组织中分离获得的贴壁依赖型细胞系。1987 年,Vero 细胞成为世界卫生组织生物制品生产规程认可的可应用于病毒性疫苗生产的细胞基质^[13-14],并且该细胞系对脊髓灰质炎病毒、流感病毒、狂犬病病毒、流行性乙型脑炎病毒、甲型肝炎病毒、呼肠病毒和肾综合征出血热病毒等多种病毒敏感,目前在相关疫苗的研发和生产中均得到了大量应用。利用 360 L 的 NBS 生物反应器^[15],Cytodex1 载体浓度为 $25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,培养 Vero 细胞生产狂犬病疫苗,培养至第 6 天细胞密度达 $1.2 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7\text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,第 7 天按 $\text{MOI}=1:200 \sim 1\,000$ 接种狂犬病病毒,连续收获病毒 20 d,病毒滴度达到 $12.48\text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,所有检验均符合世界卫生组织的要求。R Jayakumar^[16]等人利用 Cultispher-G 微载体培养 Vero 细胞制备狂犬疫苗,狂犬病毒的 TCID_{50} 每毫升可达到 1×10^6 ,收获病毒滴度显著高于比同期转瓶培养。李薇^[17]等人在 15 L 生物反应器中用 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cytodex-3 微载体培养 Vero 细胞,培养 192 h,细胞总量最高可达 $1.7 \times 10^{10}\text{ cells}$,相当于同期 15 L 转瓶培养细胞数量的 20 倍,当细胞单层生长到 $6.0 \times 10^9 \sim 7.0 \times 10^9\text{ cells}$ 时,接种乙脑病毒,病毒滴度可达到 $7.0 \sim$

$7.5 \lg \text{PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并能够连续收获毒液 13~15 次。Baxter^[18] 公司利用 Cytodex-3 微载体无血清培养 Vero 细胞生产 H5N1 禽流感疫苗 (CEL-VAPAN) 的规模可放大到 6 000 L 生物反应器, 年生产能力达到 2 亿人份。2008 年 6 月, CEL-VAPAN 完成了 I、II 期临床试验, 研究成果发表于新英格兰医学杂志。

2.2 微载体大规模培养 MDCK 细胞生产疫苗

MDCK 细胞 (Madin-Darby canine kidney cells) 是于 1958 年由 Madin 和 Darby 从犬肾组织中分离培养获得的上皮样贴壁细胞, 该细胞系可连续传代^[19-21]。目前, 由于 MDCK 细胞系对多种病毒敏感, 已被广泛用于多种病毒的扩增和纯化, 如: 流感病毒 (Influenza virus, IV)、犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV)、猫粒细胞缺乏症病毒 (Feline panleukopenia virus, FPLV)、腺病毒 (Adenovirus) 及呼肠孤病毒 (Reovirus) 等。由于该细胞系对流感病毒增殖快、感染效率高, 且不易变异, 因此 MDCK 细胞已被公认为最适于生产甲、乙型流感病毒疫苗的细胞系。微载体大规模培养 MDCK 细胞生产流感疫苗工艺可代替传统的鸡胚生产工艺, 提高疫苗质量, 大大降低成本。张严予^[22] 等人利用微载体 ($3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex-3) 无血清培养 MDCK 细胞生产流感病毒 H1N1 疫苗, 细胞接种密度为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, MDCK 细胞的生长状态最好, 培养 5~6 d 微载体基本长满, 维持液 pH 7.4, 病毒的增殖状态最好, 产量最高, 血凝效价可达到 2^9 。Y. Genzel^[23] 等人利用生物反应器大规模微载体培养 MDCK 细胞, 并研究了马流感病毒增殖过程中细胞生长的物质代谢情况, 这为 MDCK 细胞应用于马流感疫苗工业化生产提供了理论基础。

2.3 微载体大规模培养 Marc-145 细胞生产疫苗

Marc-145 细胞是 Kim 等人于 1993 年利用限制稀释法从恒河猴的肾组织克隆得到, 并证明该细胞对猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) 敏感^[24]。目前, 该细胞系已广泛应用于 PRRSV 分离与疫苗生产。穆光慧^[25] 等人用 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cytodex-3 微载体培养 Marc-145 细胞生产 PRRS 疫苗, 细胞密度达到 $4.28 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 微载体上细胞已生长至满球, 接种病毒 48 h 后, 显微镜下可以观察到细胞病变, 部分病变细胞开始脱落, 57 h 后, 脱落细胞增多, 71 h 后, 绝大多数细胞从微载体上脱落, 出现大量游离细胞, 同时大量载体呈空球。按照 Reed-Muench 方法计算收获病毒液的 TCID_{50} , 病毒液滴度分别为 $1 \times 10^{7.5} \sim$

$1 \times 10^{6.0} \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 目前转瓶培养工艺也可以达到这个滴度。目前, 国内部分厂家正研究微载体大规模培养 Marc-145 细胞代替传统的转瓶培养法生产猪繁殖与呼吸综合症疫苗, 目前均处于试验研究阶段。

3 展望

目前, 国外许多生物制品企业普遍使用生物反应器微载体培养进行大规模工业化生产, 国内也有产品投放市场, 说明用微载体进行大规模培养生产已进入实际应用阶段, 其与传统的转瓶培养工艺相比, 具有提高产品的产量和质量, 减少污染及降低培养液的使用量等优势。

新型微载体要兼备材料学和生物学的特性, 商品化的微载体力学性能和重复性能达到比较高的水平, 但载体表面的细胞识别位点较少, 影响细胞在其表面的贴附和生长, 尚没有一种微载体适合培养各种类型的细胞, 理想的微载体应利于细胞的快速贴附和增殖, 利于细胞密度的快速增加, 不干预细胞代谢产物的合成和分泌。目前, 人们对病毒疫苗的需求越来越大, 生产过程中要求生产细胞株在感染和分泌前有一定的浓度和数量, 所以要深入研究微载体细胞培养放大及其接种工艺。该生产过程提高了产量, 降低了成本并减少了污染, 但是规模和技术会影响表达的稳定性和细胞贴附特性, 转化的程度越高, 细胞越难在微载体表面贴附和生长, 并且会在培养过程中出现细胞和载体聚集、pH 难以控制或者细胞生长状态不佳等现象。

目前, 动物细胞微载体大规模培养技术研究应从 4 个方面展开: (1) 改变微载体原材料的表面特性来调节其生物降解和力学性能, 提高细胞大规模培养的自动化、仿生化和精巧化水平; (2) 设计规模化生产用生物反应器和混合性能好、剪切力小的新型动物细胞培养系统; (3) 开发适应于多种细胞生长的新型无血清培养液; (4) 研究生物反应器微载体细胞培养过程的逐级放大工艺, 实现反应器间的无缝对接, 降低细胞传代过程中的污染。

参考文献:

- [1] Van Wezel A L. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture[J]. Nature, 1967, 216(5110): 64-65.
- [2] Van Wezel A L. New trends in the preparation of cell substrates for the production of virus vaccine[J]. Progress in Immunobiological Standardization, 1971, 5: 187-192.
- [3] Van Wezel A L. The large scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture[J]. Improvement of micro-

- carriers. Developments in Biological. Standardization, 1977, 37:143-147.
- [4] Levine D W, Wang DIC, Thilly W G. Optimization of growth surface parameters in microcarrier cell culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1979, 21:821-845.
- [5] Mered B, Albrecht P, Hope E, et al. Cell growth optimization in microcarrier culture[J]. In Vitro, 1980, 4:859-865.
- [6] Healthcare G E. Microcarrier cell culture principles and methods[M]. Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB, 1981.
- [7] Nilsson K, Scheirer W, Merten O W, et al. Entrapment of animal cells for production of animal cells and other biomolecules[J]. Nature, 1983, 66:183-193.
- [8] Young M W, Dean R C. Optimization of mammalian cell bioreactor[J]. Biotechnology, 1987, 5:835-837.
- [9] Charles R, Keese, Ivar Giaever. Cell growth on liquid interfaces: Role of surface active compounds[J]. Cell Biology, 1983, 80:5622-5626.
- [10] 张晋, 张月兰, 赵玉秀, 等. 篮式生物反应器制备 Vero 细胞乙型脑炎灭活疫苗[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(12):1085-1087.
- [11] 乐威. 微载体灌流培养制备 Vero 细胞狂犬病疫苗[D]. 武汉: 武汉大学出版社, 2004.
- [12] Montagnon B J, Vincent-Falquet J C. Experience with the Vero cell line[J]. Developments Biological Standardization, 1998, 93:119-123.
- [13] World Health Organization. Requirements for continuous cell lines used for biological substances[J]. WHO Technical Report Series, 1987, 745:99-115.
- [14] World Health Organization. Requirements for rabies vaccine (inactivated) for human use produced in continuous cell lines[J]. WHO Technical Report Series, 1987, 760:167-189.
- [15] 沈武玲, 王家敏, 于国伟. 微载体培养技术在生物医药领域的应用[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8):43-45.
- [16] Jayakumar R, Venkatesh G, Albert H, et al. Vero cell rabies vaccine for animals in microcarrier culture[J]. Indian Journal of Animal Sciences, 2002, 72(7):549-550.
- [17] 李薇, 孙振鹏, 孙燕, 等. 转瓶培养与生物反应器微载体培养乙脑病毒的比较[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(4):11-15.
- [18] Ehrlich H J, Müller M, Oh H M, et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture[J]. New England Journal of Medicine, 2008, 358(24):2573-2584.
- [19] Herzlinger D A, Easton T G, Ojakian G K. The MDCK epithelial cell surface antigen of the kidney distal tubule[J]. Journal of Cell Biology, 1982, 93:269-277.
- [20] Rindler M J, Chuman L M, Shaffer L, et al. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line(MDCK)[J]. Journal of Cell Biology, 1979, 81:635-648.
- [21] Madin S H, Darby N B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1958, 98(3):574-576.
- [22] Hu A Y, Tseng Y F, Weng T C, et al. Production of inactivated influenza H5N1 vaccines from MDCK cells in serum free medium[J]. Plos One, 2011, 6(1):e14587.
- [23] 刘晓琳, 李爱芳, 赵晨光. 中国生物制药产业的发展与展望——访中国工程院院士、第四军医大学细胞工程研究中心主任陈志南教授[J]. 中国医药技术经济与管理, 2009, 3(6):7-10.
- [24] Kim H S, Kwang J, Yoon I J, et al. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line[J]. Archives Virology, 1993, 133:477-483.
- [25] 穆光慧, 李嘉爱, 齐冬梅. 猪繁殖与呼吸综合征病毒在 Marc-145 细胞微载体上培养条件的研究[J]. 广东畜牧兽医科技, 2010, 35(1):37-40.

Microcarrier Culture Technique and Its Application in Vaccine Production

WANG Jia-min¹, PING Ling¹, XU Shui-lin², MA Gui-lan³, WEI Yuan-yuan¹, QIAO Zi-lin¹, MA Zhong-ren¹

(1. Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Lanzhou, Gansu 730030; 2. Lanzhou National Hyclone Bio-Engineering Company Limited, Lanzhou, Gansu 730010; 3. Lanzhou Lark Bio-Tech Company Limited, Lanzhou, Gansu 730010)

Abstract: Microcarrier cell culture technique is a new cell culture technology, which is primary method of large-scale culture of adherent-dependent cell currently. It possesses both adherent and suspension culture advantages, which is easy to control culture conditions such as temperature, oxygen concentration, pH and so on, and its culturing process is systematic, automated and hard to be contaminated. The development and application in vaccine production of microcarrier culture technology were summarized, and the development of large-scale animal cell microcarrier culture technique was proposed.

Key words: microcarrier; cell culture; vaccine

(该文作者还有令世鑫, 单位同第一作者)