

## 中空纤维细胞培养的新进展

John J. S. Cadwell

**摘要:** 基因工程和单克隆抗体技术的发展极大地促进了对细胞培养新技术的研究。为了研究出一种简单、经济的细胞培养系统, 生物技术的一个新领域诞生了: 使用生物反应器大规模培养细胞。在某些实验室, 基于中空纤维的生物反应器被证明是一种进行细胞培养的理想方法。本文阐述了中空纤维系统的应用研究及其最新进展。

随着基因工程和单克隆抗体技术的发展, 细胞培养展现出全新的生命力。经过遗传工程改造的哺乳动物细胞能表达并分泌有科学和治疗价值的蛋白。单克隆抗体技术(是一种将免疫的鼠细胞与无限生长分裂的癌细胞融合在一起的技术)使从培养细胞中得到大量单克隆抗体成为可能。为了大量生产这些可用于商业目的的蛋白, 提高细胞培养效率就显得尤为重要。

许多高投入和设备密集型方法都可以规模化生产出所需的蛋白质。随着这些先进的分子生物学技术逐渐步入到普通的实验室中, 一些研究生已可以制备出重组蛋白或单克隆抗体。对于学院式研究或是刚起步的生物技术公司来说, 利用大制药公司所使用的设备进行生产是不切实际的。为了研究出一种简单、经济的细胞培养系统, 生物技术的一个新领域诞生了: 利用生物反应器进行大规模细胞培养。在实验室规模的研究中, 基于中空纤维的生物反应器已被证明是一种培养  $10^9$ - $5 \times 10^{10}$  个细胞的理想方法。本文阐述了中空纤维系统的应用研究及其新进展。

中空纤维是一种很小的、圆柱形的透滤材料, 形状类似于喝水用的吸管, 并且直径只有人的头发丝般粗细(200  $\mu\text{m}$ )(见图1)。人们将大束的纤维装入圆柱形的外壳中, 这样, 一些自筒末端(末端通道)进入的液体

会流过纤维内部, 而圆柱形外壳外的侧面通道可以通到纤维的外部区域(毛细管外层空间, 或者 ECS)。通常, 细胞被放在纤维外, 那里它们能够贴壁生长, 而细胞培养基可以在纤维内不断地循环以提供细胞所需的营养和氧气。透滤材料的性质决定了像葡萄糖和乳酸盐这样的小分子可以随意地穿过纤维, 而蛋白质这样的较大分子则不能穿过。如果有细胞因子或自分泌因子存在(它们可以加强或抑制细胞的生长), 则可以通过选择纤维的孔径或者截留分子量(MWCO)

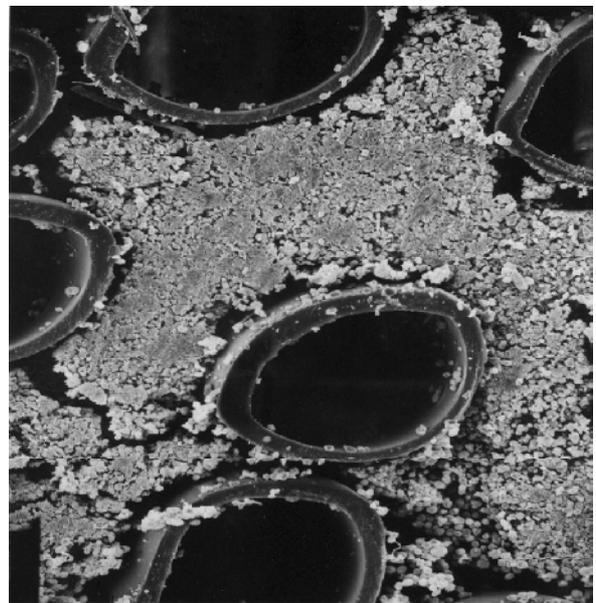


图1 显示纤维和培养中的淋巴细胞的中空纤维筒横截面。

**作者简介:** Mr. S. Cadwell is President, FiberCell Systems, 905 West 7th St. #334, Frederick, MD 21701, U.S.A.; tel.:301-471-1269; fax: 301-865-6375; e-mail: jcadwell@fibercellsystems.com

(molecular weight cutoff) 来控制不同因素对细胞生长的影响。

Knazek 等<sup>[1]</sup>首次将中空纤维系统用于细胞培养, 其发展的细胞培养方法同一些体外方法一样, 可以得到  $10^8$  cells/mL 或者更多, 而不是只有  $10^6$  /mL (利用标准细胞培养技术得到的细胞量)。中空纤维系统可以在很小的体积内提供非常大的表面积, 其表面积可以达到  $200\text{cm}^2/\text{ml}$ , 从而可以在一个非常小的体积范围内让大量细胞附着。细胞通过纤维壁可以十分有效地交换营养和代谢物, 并且由于在制造过程中可以控制纤维的 MWCO, 从而可以调整纤维的过滤性能, 使之保留纤维特异蛋白质和细胞因子或者允许它们通过纤维进入循环基质当中。

尽管中空纤维生物反应器并不是一项新技术, 但是随着材料和方法的改进, 这一技术得到了不断地创新。下面是两个典型的实例。第一个例子是一种新型的聚砜材料, 这种材料可以提供极高的总滤过率——一个有 30-kD MWCO 的典型纤维质纤维的总滤过率大约是  $15 (\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2/\text{mm Hg}/\text{hr})$ 。FiberCell 20-KD MWCO 的聚砜纤维(catalog nos. C2011 and C2018, **FiberCell Systems**, Frederick, MD)的总滤过率超过 140.2。另外一个例子是“波”的应用。波被引入到在外壳内均匀分布的纤维束中, 由于波的作用使得纤维束中的所有纤维具有一致的性能, 从而消除了沟道效应(channeling effect)和由纤维间隔过大而引起的死区。

体积只有 15mL 的中号中空纤维生物反应器(catalog nos. C2011 and C2008, **FiberCell Systems**)能提供  $2200\text{cm}^2$  的表面积。体积为 60ml 的较大的反应器(C2018 和 C2003)可以提供  $1.2\text{m}^2$  的表面积。

中空纤维生物反应器的一个特点是培养的细胞浓度可以超过  $10^8$  /mL。而一般的旋转烧瓶培养的哺乳动物细胞浓度大约是  $10^6$  /mL。高浓度细胞可以产生高浓度分泌蛋白, 并能进行

有效地细胞感染, 还可以减少细胞对血清的需求甚至使细胞在无血清培养基中生长。

中空纤维生物反应器和其他细胞培养技术的另一个基本区别在于: 中空纤维能形成易于细胞附着的多孔渗透支撑, 最类似于活体内的细胞生长方式。由于营养输送是由下至上的, 因此细胞很容易彼此堆积, 形成一个具有多层细胞的层面。在中空纤维生物反应器上进行细胞传代是不必要的。根据它们的生长特点, 这些培养物可以保留到扩增期。已经有研究人员用单根 FiberCell 中空纤维生物反应器连续一年生产一种单克隆抗体。中国仓鼠卵巢细胞(CHO)株和 HEK293 人胚肾细胞株可以在三个月或者更长时间在同一个生物反应器中进行蛋白表达。

## 1 单克隆抗体的生产

中空纤维生物反应器的第三个特点是可以通过细胞因子的分子量来调节它们对细胞生长的影响。最常见的例子是用杂交瘤细胞株生产单克隆抗体。这是中空纤维生物反应器的第一次大规模应用。杂交瘤细胞分泌组织生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 它是一种可以抑制杂交瘤细胞生长的细胞因子。功能型 TGF- $\beta$  的分子量大约是 27kD。一根有着合适 MWCO 的中空纤维过滤器允许 TGF- $\beta$  扩散通过, 而杂交瘤细胞分泌的抗体则在毛细管外层的空隙间堆积, 并达到很高的浓度。通过稀释细胞因子浓度从而使之进入循环介质可以减小或者消除 TGF- $\beta$  的抑制效果。这一机理对淋巴细胞同样有效; 淋巴细胞中有抑制其生长的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )。

采用中空纤维生物反应器生产单克隆抗体的优点包括:

——比用烧瓶培养生产抗体的浓度高 100 倍, 可以达到  $0.5\text{--}5\text{mg}/\text{mL}$ 。

——收集液体积为 15-60mL，每两天收集一次。

——利用杂交瘤细胞适合在无血清培养基



图2 循环着的无血清培养基和由毛细管外层空间获得的几组收集液的凝胶结果。

道 A: MW 标准品。道 B, D, E, F 和 G: 从毛细管外层空间得到的收集液。道 C: 循环着的无血清培养基。凝胶结果显示, 分子量为 147kD 的 IgG 保留在纤维上, 而分子量为 60kD 或者更小的分子则能穿过纤维进入循环基质中。

中生长的特性易于得到高细胞浓度 (见图 2)。

——与通过腹水产生的单克隆抗体相比, 用中空纤维生物反应器生产的单克隆抗体可以减少内毒素的产生。

——利用中空纤维生物反应器可以很容易地得到未知的、人源的和非鼠源的抗体。

——利用中空纤维生物反应器可以连续六个月 (或是更长时间) 不停地生产抗体。

一个中空纤维生物反应器系统能够生产 100mg 到几克抗体。

## 2 分泌蛋白的生产

人们热衷于中空纤维生物反应器的另一个原因是它可以用于重组蛋白质的生产。CHO 和 HEK293 细胞株最长采用的细胞株, 但人们也用其它类型的细胞株进行重组蛋白的生产, 包括一些昆虫细胞株 (例如: 果蝇细胞)。假如没有抑制性细胞因子, 纤维 MWCO 的选择就仅仅取决于分泌蛋白的分子量大小。用中空纤维生物反应器生产分泌蛋白的表达量是烧瓶培养的 100 倍, 可以达到 100-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 3 给出了在无血清培养基中表达重组 IgG 蛋白的 HEK293 细胞株表达的蛋白质数据和分泌的乳酸盐数据。通常, 当葡萄糖剩至一半时就要更换培养基, 但周末除外。在周五下午, 要收集大量的产物以减少细胞量, 仅向系统中加入 1L 新鲜的培养基就能使之度过整个周末。典型的系统每两天消耗 1L 无血清培养基。有两个现象非常有趣。首先是生产效率, 尽管每天的产量都有显著变化, 但在一段时间内, 如果收集液体积为 20mL, 得到的蛋白产量都接近 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。总体上说, 900mL 体积培养 2 个月后可以得到 276mg 蛋白质, 平均浓度为 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每天 4.5mg。

另一个有趣的现象很容易从图中见到。乳酸盐浓度和蛋白质产量在周一达到峰值。此时, 已经有两天多没换过培养基了并且也没

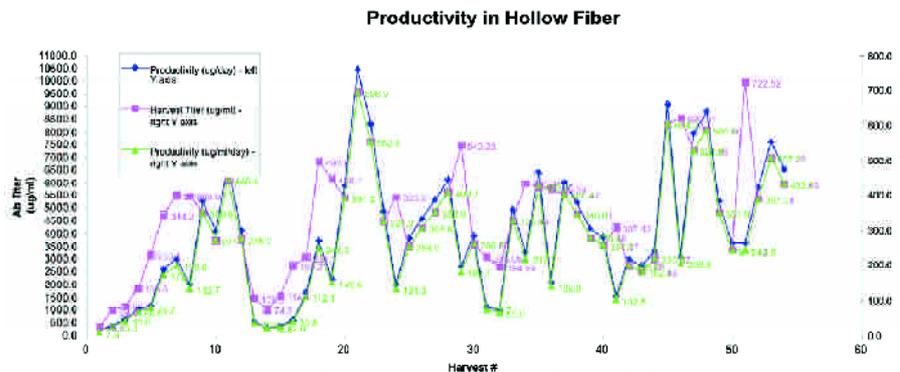


图3 HEK293在无血清培养基中表达的重组IgG蛋白质的产量。

有收集过产物。蛋白质有机会在周末得以累积，而培养基则被完全消耗。葡萄糖低于 100mg/mL；pH 低于 6；有大量的乳酸盐产生，最大值为 3.8mg/mL。尽管一两天以后细胞的代谢率显著降低，但令人吃惊的是，在这种乳酸盐浓度下仍有大量细胞存活并不断表达产物。随着培养物的成熟和细胞浓度的增加，恢复时间变得更短。在 FiberCell 盒中生长的其它类

系统生产重组蛋白质的优点和用其生产抗体的优点相同，此外，非常复杂和 / 或高度糖基化的蛋白质通过改进蛋白折叠方式与烧瓶培养产生的同种蛋白相当。中空纤维生物反应器可以生产 10mg 到几百毫克的重组蛋白，这是一种非常有效的手段。

### 3 病毒的生产

应用中空纤维生物反应器生产病毒对研究人员具有很大吸引力。高浓度生长的细胞为病毒繁殖提供快速、一致的感染动力学基础，也能够获得具有很高滴度的病毒。对于不同的病毒，有效的生产方法也可能有所不同。许多生产病毒的初步尝试都是用 3T3 或者 PA317 包装的细胞株生产逆转录酶病毒。这些细胞株源于纤维化组织的成纤维细胞，非常易于贴壁附着。细胞很快就能长满中空纤维盒，使收集液体积由 10–15mL 减少到只有 0.5mL。尽管可以得到高滴度的病毒，但是由于重新获得的病毒总体积很小，使得这一方法效率很低。此外，如果必须以感染的方式繁殖病毒，那么只有外层细胞可能会被感染而产生病毒。

某些改良过的用于细胞株悬浮培养的无血清培养基的出现解决了中空纤维系统生产病毒的这一缺陷。如果 HEK293 细胞能够适应悬浮培养，那么就可以用腺病毒或其它需要感染才能繁殖的病毒对其进行感染从而产生病毒。这一方法的最早由 Chung 等<sup>[2]</sup>报道的，该方法也在阿拉巴马州基因治疗中心（伯明翰）Alex Kotov 的努力下得到发展<sup>[3]</sup>。其基本原则是：如果包装细胞可以进行悬浮培养，并且病毒可以通过感染转入细胞内，那么就可以用中空纤维系统大量生产该病毒。

已经应用这种方法成功地生产出爱泼斯坦-巴尔病毒和 HIV 病毒。有时可以看到，用中空纤维系统生产的 HIV 病毒比用烧瓶培养生

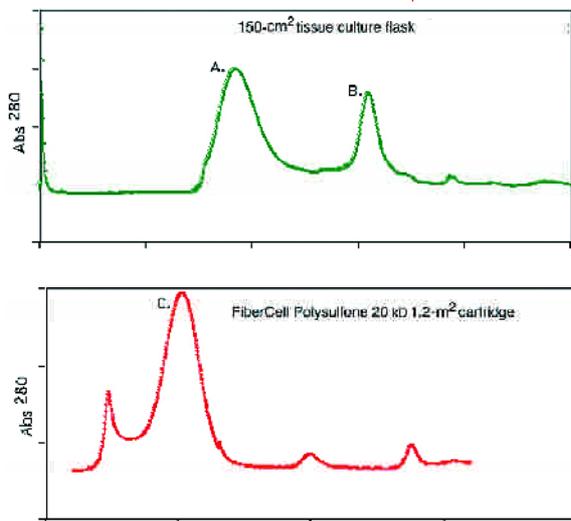


图4 对用烧瓶培养生产的hexamerized IgG1和用FiberCell中空纤维生物反应器培养生产的hexamerized IgG1进行比较。

型细胞也可以观察到这一现象，这种对乳酸盐的高抗性是纤维总滤过率高的结果。

图4对在 T150 烧瓶和在 FiberCell 中空纤维生物反应器系统中进行培养的重组 CHO 细胞株的蛋白产量进行了比较。重组 CHO 细胞在 T150 烧瓶中培养至将要汇集成片时进行收集并接种到生物反应器中。它表达的蛋白是 hexamerized IgG1，由 6 个带有 3 个 IgA 尾的 IgG1 亚基组成的。在烧瓶中，大约有 40% 的表达蛋白以没有进行适当折叠的单体亚基形式存在；而转入 FiberCell 生物反应器后，大约有 95% 的蛋白以正确折叠的六聚形式存在。总体积 4L 的体系 10 周可以产生 475mg 蛋白。用中空纤维

产的多出 1000 倍。对于中空纤维生物反应器系统来说，生产病毒是一个相对较新的应用并且仍在进一步发展中。

## 4 疟原虫培养

培养疟原虫需要感染红血球细胞，即费力又耗时。疟疾寄生虫是相对厌氧的生物体，并且利用葡萄糖的能力很差。这意味着培养基需要不断更换。在烧瓶中生长的红血球细胞浓度通常要求不超过 6% 的血球比率。健康国立研究所 (Bethesda, MD)<sup>[4]</sup> 采用一种改进的方法在 FiberCell 盒中培养红血球细胞使之浓度达到 100% 血球比率，并且可以用疟原虫在盒内直接进行感染。一盒收集量相当于 60 多个 T25 烧瓶的产量。

## 5 改进型聚砜 (PS+) 纤维

抗体的生产，蛋白的表达和条件培养基 (conditioned medium) 的传代是中空纤维生物反应器的一些传统应用。中空纤维生物反应器的更多应用不再是利用它们极大的细胞容量，而是利用它们的其它能力。改进型聚砜 (PS+) 纤维 (FiberCell 系统) 表面易于吸附蛋白质，细胞因子、抗体，或其它类蛋白质。这种纤维可以用 70% 乙醇进行活化，活化的纤维吸附蛋白质的浓度可以达到 10-100ug/cm<sup>2</sup>。这种纤维可以用于研究生物化学表面对特殊细胞长期培养的效果。

## 6 内皮细胞培养

标准培养瓶中培养的内皮细胞生长活跃并不断分裂，但它们并不形成紧密连接。在持续

切应力和充足培养基下生长的内皮细胞会以生理方式产生作用。以此方式生长的内皮细胞能形成单层、饱和的紧密型连接。基因表达谱和蛋白表达谱一样受到影响<sup>[5-7]</sup>。由 Barbara Ballerman 博士、Eudora Eng 博士最初还有霍普金斯大学 (巴尔的摩, MD) 的 Johns 提供的尚未发表的数据表明，血管内皮生长因子 (VEGF) 可以引起低切变条件下生长的内皮细胞增殖率的增加。

不同大小的切应力可以诱导内皮细胞发生形态改变。图 5 对比了人肺内皮细胞在低切变 (5 dynes/cm<sup>2</sup>) 和高切变 (15 dynes/cm<sup>2</sup>) 下的不同效果。低切变照片 (图 6) 中可以看到在纤维表面有一单层细胞。而在高切应力下，细胞则以丛状损伤的方式堆积在一起 (图 7)。在体内也可以观察到这一现象，而在烧瓶中培养时则观察不到。

如图 8 所示，在纤维内培养内皮细胞的同时，可以在纤维外层培养另一种细胞。纤维内培养内皮细胞，纤维外培养血管平滑肌细胞时，试验表明，当流动速律变化时，平滑肌 G-蛋白结构和内皮素受体表达会受到直接的影响。原因是由内皮细胞分泌的某些能够穿过纤维的物质可以使平滑肌细胞发生改变。

改进型聚砜纤维可以用来研究细胞外基质

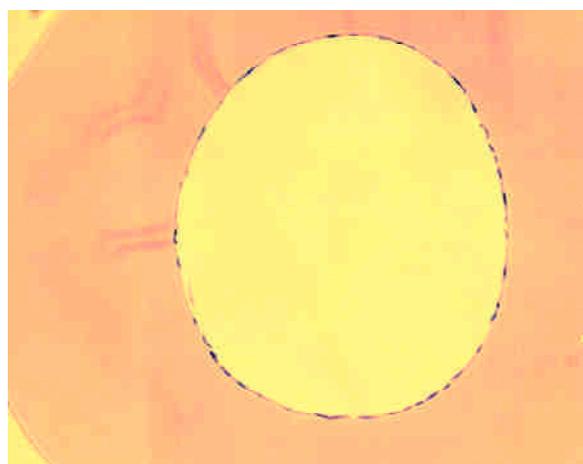


图5 内部接种有脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的纤维横截面。

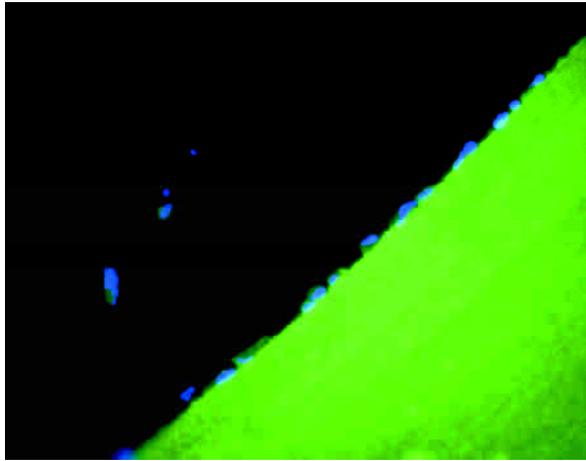


图6 生理性切应力( 5 dynes/cm<sup>2</sup> )下的肺内皮细胞。

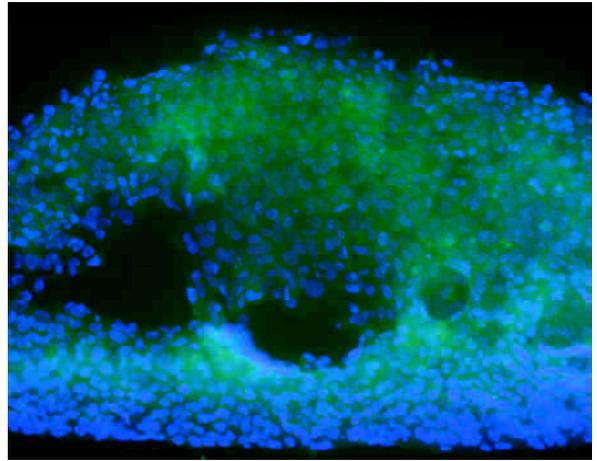


图7 病理性切应力( 15 dynes/cm<sup>2</sup> )下的肺内皮细胞。

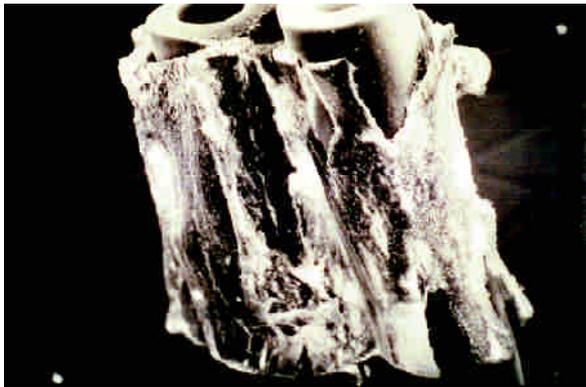


图8 与血管平滑肌共同培养的牛大动脉内皮细胞。

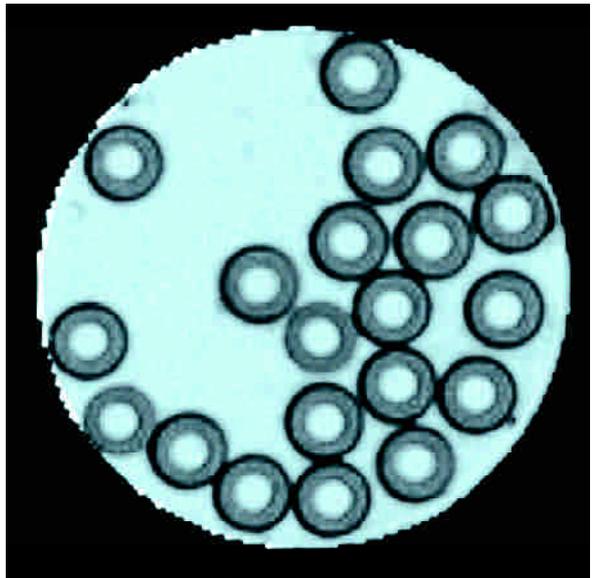


图9 在包被有胎牛血清的纤维表面上生长的成骨细胞。

对不同细胞长期培养的影响。图 9 显示了生长在涂有血清蛋白的纤维表面的成骨细胞。由于图中的核磁共振图像分辨率相对较低，所以这些细胞本身不能被清楚地分辨。然而，围绕纤维的黑圈表明有无机物沉淀存在，这是形成骨骼的第一步。通过这种方法也可以研究其它类型的基质和骨形态发生肽 (bone morphogenic peptide (BMP-2)) 的效果。

改进型聚矾纤维还可以用于附着能刺激淋巴细胞增生的特异抗体和促进肝细胞或胰岛细胞生长的特异配体，并且可以用来研究细胞外基质对细胞长期生长和分化的影响。用这种纤维可以研究细胞的生长和分化，而以前传统的细胞培养系统则不能实现。

尽管这并不是一项新技术，但是纤维材料的显著优点导致了中空纤维生物反应器系统的产生，这一系统即提高了生产效率，又简化了操作过程。应用中空纤维生物反应器能够生产 100 毫克到几克的抗体或者重组蛋白质，也可以在一些研究室里培养  $10^9$ - $5 \times 10^{10}$  个细胞。用这一系统培养和生产病毒的操作方法仍在不断发展之中，这使它能生产更大浓度的病毒产物的优点显得更为突出。或许 30 年后，中空纤维生物反应器仍是用于实验室大

规模细胞培养的首选方法。

## 参考文献

1. Knazek RA, Gullino PM, Kohler PO, Dedrick RL. Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. *Science* 1972; 178(56):65-6.
2. Gardner TA, KoSC, Yang L, Cadwell JJS, Chung LWK, Kao C. Serum-free recombinant production of adenovirus using a hollow fiber capillary system. *BioTechniques* 2001; 30(2):422-8.
3. Isayeva T, Kotova O, Krasnykh V, Kotov A. Advanced methods of adenovirus vector production for human gene therapy: roller bottles, microcarriers, and hollow fibers. *BioProcessing J* 2003; 2(4):75-81.
4. Li T, Glushakova S, Zimmerberg J. A new method for culturing *Plasmodium falciparum* shows replication at the highest erythrocyte densities. *J Infect Dis* 2003; 187:159-62.
5. Ott MJ, Ballermann BJ. Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to in vitro shear stress. *Surgery* 1995; 117(3):334-9.
6. Waybill PN, Chinchilli VM, Ballermann BJ. Smooth muscle cell proliferation in response to co-culture with venous and arterial endothelial cells. *J Vasc Interv Radiol* 1997; 8(3):375-81.
7. Redmond E, Cahill P, Sitzman J. Flow mediated regulation of endothelin receptors in co-cultured vascular smooth muscle cells: an endothelium-dependent effect. *J Vasc Res* 1997:895-902.

## New Developments in Hollow-Fiber Cell Culture

John J.S. Cadwell

**Abstract:** The growth of genetic engineering and hybridoma technologies has been a strong impetus for the investigation of new techniques for cell culture. The search for a simple, cost-effective cell culture system has resulted in the birth of a new area of biotechnology: the use of bioreactors to grow cells on a large scale. A bioreactor based on hollow-fiber bundles is shown to be an ideal method for culturing cells in any laboratory. Classical applications of hollow-fiber systems are described, in addition to some more recent ones.

(赵鹏译, 张维冰校)