贴壁细胞在新型Wave生物反应器内的微载体悬浮培养

Linnea Pauler, Cecilia Annerén
GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, SE-751 84, Uppsala, Sweden

背景

WAVE Bioreactor™ 最初被设计用于人、动物、植物和昆虫细胞的悬浮培养，以及细菌和真菌的培养。然而，诸多研究结果显示WAVE可以成功的使用微载体进行贴壁细胞的扩增和培养。WAVE Bioreactor提供一次性的无菌培养袋，无需清洗和灭菌，使其也特别适合治疗性细胞的GMP生产，如T淋巴细胞或骨髓间充质干细胞(mesenchymal stromal/stem cells，MSCs)。许多治疗性细胞实质上是贴壁细胞(例如MSCs)，因此需要贴壁到合适的表面以进行扩增。微载体是直径100-300 μ m的微球，专为贴壁细胞贴壁悬浮生长而设计。

如今，MSCs细胞一般在T型瓶中单层贴壁培养。这种方法需要数量很多的T型瓶以达到所需要的细胞数，并需要劳动密集型的操作和较大的存储空间。使用微载体可以在一个 WAVE Cellbag™培养袋中进行贴壁细胞的培养，因此减少劳动强度，同时降低多个容器的污染风险。我们研究的目的是开发可靠的操作方法在WAVE Bioreactor中进行贴壁细胞的培养，使用狗肾 (MDCK)细胞作为模型细胞。

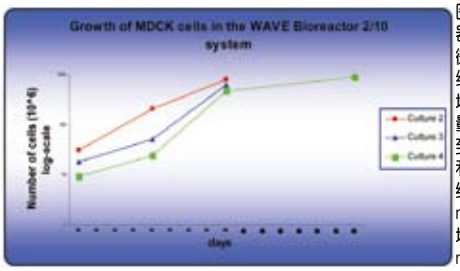

图1.WAVE生物反应器中使用Cytodex微载体进行MDCK细胞的培养。三次培养中，细胞接种量从30 × 106)减少到9 × 106。第二和第三次培养的最终培养体积为600 ml，第四次最终培养体积为1000 ml。

培养	细胞接种量(106)	贴壁位置	微载体数(106)	最终细胞	搅拌
1	30	培养袋外	Cytodex 3	细胞不生长	17rpm, 7°
2	30	培养袋外	Cytodex 3	780 (培养8天)	10rpm, 5°
3	18	培养袋内	Cytodex 3	600 (培养8天)	10rpm, 5° (初始8rpm)
4	9	培养袋内	Cytodex 1	878 (培养15天)	10rpm, 5° (初始8rpm)

表1. MDCK细胞在WAVE Bioreactor 2/10系统中的培养

图2. WAVE Bioreactor和MDCK细胞在WAVE Cellbag内Cytodex 1微载体上的生长。

方法

Cytodex™1或3型微载体先经过溶胀和高压灭菌，之后MDCK细胞分别在无菌培养袋内或外进行微载体贴壁。为了使细胞与微载体之间可以充分接触，前期的贴壁阶段采用较少的初始培养体积，细胞完成贴壁后，将培养体积增加到所需的最终体积。当细胞在微载体上扩增并达到80-90% 汇合时，使用胰酶将细胞消化下来传代，再加入更多新的Cytodex微载体以增加可贴附的表面积，传代比为1:3。我们可以重复这个传代过程进行细胞不断的扩增，最终获得1L规模含有3 g Cytodex的细胞培养液。

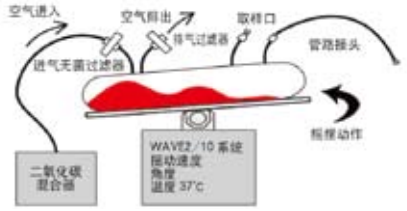

图3. WAVE Bioreactor 2/10反应器示意图。Cellbag置于摇床上。新鲜的空气通过无菌过滤器经过管路从二氧化碳混合器被不断通入袋中。无菌取样经过取样口完成。细胞、培养基和微载体方便的经过管路进行转移。

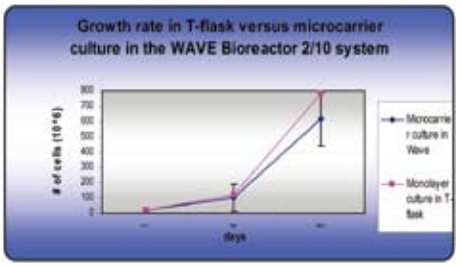

图4. MDCK细胞在T型瓶和WAVE Bioreactor微载体培养比较。细胞生长速度根据单层培养所获得的数据进行计算，在WAVE Bioreactor内微载体培养的生长曲线是3次成功培养的平均值。初始细胞接种量按19 × 106计算。

	WAVE Bioreactor内微载体培养8天	T型瓶内单层培养8天 (理论值)
所需要的培养基体积	950ml	2400ml
需要的设备	1个Wave Cellbag	80个T型瓶(175cm²)

表2.在WAVE Bioreactor内微载体培养和T型瓶内常规单层培养8天所需要的培养基体积和设备。

结论

- 在3次使用Cytodex™1和Cytodex™3型微载体的培养实验中，MDCK细胞密度大约可以达到1 × 106/ml。
- 使用WAVE2/10反应器和1L的细胞培养袋可以获得的细胞数大约为1 × 109。
- WAVE反应器内微载体细胞培养与常规的T型瓶培养之间的比较显示，两者的细胞生长速度相似。然而，WAVE反应器所需的培养基体积不到常规T型瓶培养系统的一半。此外，当使用WAVE反应器时，约80个T型瓶可以被减少为一个WAVE培养袋，操作简便。
- 以上结果表明，WAVE系统非常适合生产细胞治疗所需剂量的细胞，我们目前采用这种方法用于治疗性干细胞的扩增和生产。