关键词：2-乙酰氨基芴；大鼠；肝卵圆细胞；增殖
中图法分类号：R322.47；R329.28 文献标识码：B

参考文献：

[1] Thorgeirsson S S. Hepatic stem cells[J]. Am J Pathol, 1993, 142(5): 1331-1333.
[2] 陈耀凯，王宇明，李俊刚，等. 大鼠肝卵圆细胞增殖模型的建立与优化[J]. 中华肝脏病杂志，2002，10(3)：185-188.
[3] Alison M, Golding M, Lalani E N, *et al*. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells [J]. J Hepatol, 1997, 26(2): 343-352.

（编辑 刘洪娥）

技术方法

文章编号：1000-5404(2003)08-0740-02

应用生物反应器培养Vero细胞制备甲肝病毒

Preparation of hepatitis A virus by cultivation of vero cells with bioreactor

孙明波，李国良，李卫东，张丽旌，徐其武，匡祥晶，姜述德，廖国阳 （中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所，昆明 650118）

提 要：目的 研究用生物反应器培养Vero细胞制备甲肝病毒W株的可行性。方法 Vero细胞悬浮吸附HAV W株后，接种到搅拌式生物反应器中，用微载体进行培养，对营养物质、代谢产物及病毒的增殖进行分析。结果 经四周的培养，病毒收获时，细胞密度达1.4×10^6/ml，甲肝病毒抗原滴度达1∶64。结论 W株已适应于Vero细胞中，用生物反应器培养产毒，有较好的应用前景。

甲肝病毒(Hepatitis A virus, HAV)灭活疫苗经过10多年的研究开发，目前已有HAVRIX®、VAQTA®、AVAXIM®及EPAXAL®等商品疫苗在全世界广泛使用，我国目前还没有甲肝灭活疫苗投放市场。由于甲肝灭活疫苗使用的抗原量远大于减毒活疫苗，传统的静置和转瓶培养方法难以满足需要。应用微载体培养技术能克服传统方法的缺陷，可大规模自动化培养细胞及病毒，满足市场对疫苗的需求。目前，应用微载体培养Vero细胞已成功制备了狂犬疫苗和小儿麻痹疫苗等病毒疫苗，取得了良好的效果。若能将此技术应用到甲肝灭活疫苗的生产中，将会取得良好的社会效益和经济效益。

HAV适应于Vero细胞的报道很有限，国内应用Vero细胞分离及适应甲肝病毒很不理想。国外也未见用微载体系统培养Vero细胞制备甲肝疫苗的成功报道。为此，我们用本实验室分离并在Vero细胞上适应的甲肝病毒W株，采用微载体Vero细胞进行培养，与静置培养相比较，研究生物反应器培养W株的可行性，探索较为合理的培养方法[1~3]。

基金项目：云南省自然科学基金资助项目(1999C0023Q)
作者简介：孙明波(1969-)，男，云南省昆明市人，硕士，助理研究员，主要从事病毒疫苗方面的研究，发表论文5篇。电话：(0871)8334519
通信作者：廖国阳，电话：(0871)8334330
收稿日期：2002-04-15；修回日期：2002-09-11

1 材料与方法

1.1 生物反应器

7 L生物反应器为荷兰Applikon公司产品。工作体积4 L，培养时设定控制值后，设备自动调节O_2、N_2、CO_2(纯度99.9%)和空气的混合比例以及碳酸氢钠的加入量来控制溶氧和pH。

1.2 微载体

使用Phamacia Cytodex-I型微载体。

1.3 培养基

培养基使用MEM(Gibco)。补加青链霉素100 U/ml，葡萄糖10 mmol/l，谷氨酰胺5 mmol/L，细胞培养加入10%新生牛血清，病毒培养及灌流液加入2%新生牛血清。

1.4 细胞和病毒

Vero细胞来源于ATCC。本室保存，实验时使用传代细胞为142~146代。病毒株为W株，由本实验室分离和适应，抗原滴度为1∶128。

1.5 病毒吸附

将细胞在T250培养瓶上进行静止培养，待培养5~6 d细胞长成单层后，消化收集细胞制成细胞悬液，装入Bellco搅拌瓶中，加入甲肝病毒W株，置于35 ℃，以30 r/min悬浮吸附6 h。

1.6 细胞及病毒培养

Vero细胞吸附HAV后，接种到发酵罐中，接种细胞浓度1×10^5/ml。进入发酵罐培养后，pH控制在(7.2±0.2)，温度(37±0.2) ℃，溶氧控制在40%空气饱和度，搅拌速度40 r/min。待细胞数达到1×10^6/ml左右时，转入病毒培养，此时，pH控制在(7.2±0.2)，温度(35±0.2) ℃，溶氧控制在25%空气饱和度，搅拌速度50 r/min。同时进行灌流，流量为20 ml/h。当培养28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

d 后, 消化收集细胞, 进行超声破碎获得病毒悬液。

1.7　代谢物测定

发酵样品以 1 500 r/min, 离心 10 min, 取上清存放于－20 ℃待检, 葡萄糖、氨和乳酸采用 Sigma 试剂盒(Sigma 16-UV, 171-UV 和 826-UV)检测。

1.8　HAV 抗原滴度测定

胰酶消化带毒细胞, 反复冻融后超声破碎细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, 取上清用唐山市防疫站制造的甲肝抗原酶标试剂盒测定抗原滴度。

2　结果

2.1　发酵罐中细胞的生长和代谢

Vero 细胞悬浮吸附 W 株甲肝病毒 6 h 后, 接种到发酵罐中, 接种浓度 1×10^5 /ml, 随着培养的进行逐渐增加, 培养至 78 h 时, 活细胞数达 11.17×10^6 /ml。转入病毒培养, 细胞数一直维持在 1×10^6 /ml 以上, 至病毒收获时为 1.4×10^6 /ml。细胞培养阶段, 起始葡萄糖和谷氨酰胺浓度分别为 7.81 mmol/L 和 5.2 mmol/L, 随着细胞数的增加逐渐下降。78 h 转入病毒培养, 更换为维持液后, 两者浓度分别为 7.40 mmol/L 和 4.80 mmol/L。随着培养的进行, 两者浓度逐渐下降, 到培养后期, 随着罐流量的增加, 下降趋势有所减缓。乳酸的起始浓度为 1.27 mmol/L, 随细胞数的增加, 逐渐积累, 到 78 h 换培养液后, 下降到 1.87 mmol/L。随着病毒培养过程的进行逐渐增加, 后期随灌流量的增加, 其堆积量有所降低。具体数值见表 1。

表 1　培养过程中细胞生长代谢及病毒增殖的数值

Tab 1　Parameters of cell growth, metabolism and virus production during cultivation

时间 (h)	细胞密度 ($\times 10^5$)	葡萄糖 (mmol/L)	氨 (mmol/L)	乳酸盐 (mmol/L)	滴度 (1∶)
0	1.50	7.81	0.18	1.27	0
19	2.85	6.69	0.67	2.91	0
49	6.00	5.22	0.93	4.86	0
65	8.50	3.67	1.07	8.87	0
78	11.70	7.40	1.19	3.87	0
89	12.05	5.15	1.50	7.23	0
113	12.17	3.14	1.89	10.27	0
160	12.5	2.76	2.35	11.85	8
233	11.15	1.54	2.14	13.11	16
402	15.60	1.31	2.12	13.08	32
570	14.1	0.89	2.57	12.97	64
666	14.0	0.63	2.68	12.68	64

2.2　发酵罐中病毒的生长情况

W 株病毒经悬浮吸附后, 进入发酵罐培养, 在细胞培养阶段用试剂盒未检测到病毒抗原, 78 h 后转入病毒培养, 前期也未检测到抗原, 培养至 160 h 时, 检测到抗原滴度为 1∶8, 之后逐渐增加, 培养结束时为 1∶64, 收获病毒液 4 000 ml。

2.3　静置培养

Vero 细胞悬浮吸附甲肝病毒 6 h 后, 接种 T250 培养瓶, 培养液加入 150 ml, 细胞接种浓度为 5×10^4 /ml。置 35 ℃孵箱培养, 培养至 7、14、21 d 各换液 1 次, 至 28 d 培养结束, 胰酶消化收集细胞, 活细胞总数为 4×10^7, 每个 T250 培养瓶收获病毒液 5 ml, 病毒滴度为 1∶128。

3　讨论

Vero 细胞在发酵罐中的生长及病毒培养早中期, 其营养物质的代谢与我们以前进行的研究[4]相比, 没有明显的改变, 看来 Vero 细胞感染 W 株后, 其代谢模式变化不大。在病毒培养期间, 由于控制了溶氧(25%)、温度(35 ℃)及仅加入 2%的牛血清, 因而细胞数的变化不大, 基本维持在同一水平上。在 570 h, 病毒增殖达高峰, 之后病毒滴度不再增加。

考虑静置培养换液和发酵灌流使用的培养液, 用静置培养制备病毒, 一个 T250 培养瓶用培养液 150 ml, 收获病毒时, 每毫升培养液可获病毒 1∶1.42, 而发酵罐每毫升培养液可产病毒 1∶16, 单位体积产毒量是静置培养的 11 倍。从单位细胞收获看, 静置培养每 10^5 个细胞产毒 1∶1.6, 而发酵罐每 10^5 个细胞产毒 1∶4.57, 相当于静置培养的 3 倍。从病毒收获量比较, 一个 4 000 ml 培养体积的发酵罐产毒量相当于 400 个 T250 培养瓶的产毒量。可以看出发酵罐培养 W 株病毒比静置培养有着不可比拟的优势, 既提高了细胞密度和产毒量, 又减少了大量的人力物力投入。其原因可能在于发酵罐能够较好的控制温度、溶氧及 pH 值等, 加上连续进行的灌流培养, 使营养物质不断得到补充, 代谢废物不断移出, 使培养环境大大改善, 因而细胞密度和病毒的产量都大大提高。

在我们的研究中, 虽然发酵罐培养的产毒量明显高于静置培养, 但不论是静置培养还是发酵罐培养, 其产毒量还是偏低, 要应用到生产中还有一定的距离, 还需进行进一步的研究。从前期进行的 W 株的筛选适应工作[5], 以及我们的研究结果可以看出, W 株已经适应到 Vero 细胞中, 在生物反应器进行培养是可行的, 其效果明显优于静止培养。今后要用 Vero 细胞做进一步的传代适应, 提高产毒量, 同时继续探索病毒培养方法, 优化培养条件, 进一步提高病毒产量。

关键词: Vero 细胞; 甲肝病毒; 生物反应器; 培养
中图法分类号: R373.21　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Hennessey J P Jr, Oswald C B, Dong Z, *et al*. Evaluation of the purified, inactivated hepatitis A vaccine (VAQTA)[J]. Vaccine, 1999, 17(22): 2830－2835.

[2] Bell B P, Shapiro C N, Alter M J, *et al*. The diverse patterns of hepatitis Aepidemiology in the United States-implications for vaccination strategies [J]. J Infect Dis, 1998, 178(6): 1579－1584.

[3] 史　江, 郑纪山, 张　云. 甲型肝炎病毒灭活试验方法的研究 I. 甲型肝炎病毒在不同细胞株中的增殖及其免疫荧光法检测[J]. 中国消毒学杂志, 1993, 10(4): 198－201.

[4] 孙明波, 张丽旌, 廖国阳, 等. Vero、CHO 和杂交瘤细胞在生物反应器中的生长和代谢[J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(4): 213－216.

[5] 井申荣, 尹卫东, 万宗举, 等. 微载体培养 MEK 和 Vero 细胞试制甲肝灭活疫苗[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(4): 257－260.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net