

· 基础研究 ·

组成型过量表达 hTERT 对 Vero 细胞体外培养生物学特性的影响 *

刘 红 王海涛 李世崇 叶玲玲 刘兴茂 陈昭烈[△]

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 目的 考察组成型过量表达人端粒酶催化亚单位 (hTERT) 对 Vero 细胞在无血清培养体系中的细胞形态、生长和代谢的影响。方法 以组成型过量表达 hTERT 的 Vero 细胞系 T1 为研究对象,以活细胞密度和细胞活力为主要观察指标,结合细胞形态和贴附伸展动态,考察 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在静止贴附培养、微载体固定化培养和悬浮培养体系中的细胞生长;以葡萄糖比消耗速率 (q_{glc})、乳酸比生成速率 (q_{lac})、乳酸转化率 ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) 和谷氨酰胺比消耗率 (q_{gln}) 为反映细胞代谢的主要观察指标,考察 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在静止贴附培养、微载体固定化培养的细胞代谢。结果 hTERT 组成型过量表达在降低 Vero 细胞的贴附伸展能力和对血清的依赖程度的同时,提高了细胞无血清批次培养后期的细胞活力和活细胞密度,并赋予了 T1 非贴附依赖性生长的能力。hTERT 组成型过量表达未对 Vero 细胞的代谢产生明显的影响。结论 hTERT 组成型过量表达可降低 Vero 细胞的贴附生长依赖性和对血清的依赖程度,是有应用潜力的改良哺乳动物细胞体外培养性状的技术途径。

关键词 hTERT 过量表达 Vero 细胞 细胞培养

中图分类号 Q782, Q75, Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 11-2001-05

Effects of Constitutively Overexpressing hTERT on Growth and Metabolism of Vero Cells Cultured in Vitro*

LIU Hong, WANG Hai-tao, LI Shi-chong, YE Ling-ling, LIU Xing-mao, CHEN Zhao-lie[△]

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the influences of constitutively overexpressing human telomerase reverse transcriptase (hTERT) on the growth and metabolism of Vero cells cultured in vitro. **Methods:** Using the viable cell density, cell viability as the major evaluation indexes, in combination with cell morphology and stretching dynamics, the growth of both the hTERT-overexpressing Vero cell line T1 and wild-type Vero cells cultured in static attachment and suspended microcarriers was evaluated; Using the specific consumption rate of glucose (q_{glc}), specific consumption rate of glutamine (q_{gln}), specific production rate of lactate (q_{lac}) and yield of lactate to glucose ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) as the evaluation indexes, the metabolism of both T1 cells and wild-type Vero cells cultured in static attachment and suspended microcarriers was determined. **Results:** Constitutively hTERT overexpression in T1 cells resulted in poorer capability of adhesion and extension, and reduced serum dependence, followed by the ability of adhesion independent growth in vitro to some extent. And no significant differences in metabolism between T1 cells and wild-type Vero cells cultured in static attachment and suspended microcarriers were observed. **Conclusion:** Constitutive overexpression of hTERT could reduce the dependency on serum and adhesion of Vero cells cultured in vitro, which indicated that constitutive overexpression of hTERT is a potential technical approach to optimize the characteristics of animal cells cultured in vitro.

Key words: hTERT; Overexpression; Vero cells; Cell culture

Chinese Library Classification (CLC): Q782, Q75, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2001-05

前言

近年来,随着全球范围内新的病毒性传染病疫情的不断出现,特别是 H5N1 禽流感病毒感染可能引发人间禽流感传播的潜在威胁,使预防控制病毒性传染病流行的任务更加紧迫,由此对提升病毒疫苗生产细胞质量和病毒疫苗生产技术提出了迫切要求^[1,2]。

Vero 细胞是世界卫生组织和我国生物制品规程批准使用的人用疫苗生产细胞系^[3]。目前,受 Vero 细胞贴附依赖生长特

性的限制,病毒疫苗的生产主要是通过 Vero 细胞的微载体固定化培养而得以实现^[4,5]。微载体的使用既提高了病毒疫苗生产的成本,更加大了病毒疫苗生产、特别是无血清病毒疫苗生产规模放大的技术难度。另一方面,Vero 细胞微载体固定化培养和病毒感染后出现的细胞凋亡,对病毒疫苗的生产效率和产品质量有着明显的影响^[6,7]。

人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 被认为是端粒酶的催化亚单位,是端粒酶活性表达的关键组分和限速因子,对细胞增殖、衰老、永生化和癌变起重要

* 基金项目“重大新药创制”国家重大科技专项课题(2009ZX09503-011),“十一五”国家科技支撑计划项目课题(2008BAI66B02)

作者简介 刘红 (1966-),女,高级实验师,研究方向 动物细胞工程,电话 86-10-66948822, E-mail: crazywht2003@163.com

[△]通讯作者 陈昭烈,电话: 010-66948818, E-mail: chenzt23@hotmail.com

(收稿日期 2011-01-10 接受日期 2011-01-30)

作用^[8,9]。来自体细胞、干细胞的 hTERT 功能研究资料证实, hTERT 的组成型过量表达能提高细胞抗凋亡能力和生长速率且细胞不出现致瘤性转化表型^[10,11]。有关 hTERT 功能研究的结果提示,组成型过量表达 hTERT 是值得探索的改善 Vero 细胞培养特性、提高病毒疫苗生产工艺水平的潜在技术手段。为此,本研究在成功构建了组成型过量表达 hTERT 的 Vero 细胞系的基础上,考察了组成型过量表达 hTERT 对 Vero 细胞体外培养生物学特性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 野生型 Vero 细胞购自 ATCC (American Type Culture Collection),组成型过量表达 hTERT 的 Vero 细胞系 T1 为本实验室采用 hTERT 高效表达载体 pHEF-ChMAR-hyg-hTERT 转染 Vero 细胞并经克隆筛选和鉴定的细胞系^[12]。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶 (购自 HyClone 公司);支持 Vero 细胞微载体培养的无血清培养基为本实验室以 DMEM/F12 为基础培养基,添加表皮生长因子、胰岛素、血清胺、金精三羧酸、海藻糖、维生素、微量元素和羟丙基- β -环状糊精等成分构成的无动物来源成分无血清培养基^[13];Cytodex-1 微载体购自 Amersham Biosciences。

1.2 方法

1.2.1 细胞传代 T1 细胞和野生型 Vero 细胞以 $1\sim 2 \times 10^5$ cells/ml 接种于 25 cm^2 组织培养瓶中,加入 8 ml 含 5 % (v/v) FBS、4 mmol 谷氨酰胺的 DMEM/F12,置 37°C 、5 % CO_2 培养。根据培养基的颜色变化更换新鲜培养基,待细胞形成致密单层后,用 0.125 % (w/v) 的胰蛋白酶进行消化、传代或作为细胞无血清培养的种子细胞。

1.2.2 细胞无血清静止贴附培养 处于对数生长后期的 T1 细胞和野生型 Vero 细胞经 0.125 % (w/v) 胰蛋白酶消化后,分别用无血清培养基悬浮并以 1×10^5 cells/well 接种于 24 孔组织培养板,置 37°C 、5 % CO_2 培养。每隔 24 h 分别选取 T1 细胞和野生型 Vero 细胞各 2 个培养孔,用于检测细胞的生长和代谢。

1.2.3 细胞无血清微载体固定化培养 处于对数生长后期的 T1 细胞和野生型 Vero 细胞经 0.125 % (w/v) 胰蛋白酶消化后,分别用无血清培养基悬浮并以 2×10^5 cells/ml 接种于内置磁力驱动板桨式搅拌叶片 ($5.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$) 的 250 ml Bellco 搅拌式细胞培养瓶 (Bellco Glass, USA) 内,按 2 mg/ml 加入预处理好的 Cytodex-1 并补充无血清培养基至 150 ml, 37°C 、5 % CO_2 培养条件下悬浮培养,搅拌速度先设置为 25 r/min,4 h 后提高到 50 r/min。每隔 24 h 分别从 T1 细胞和野生型 Vero 细胞微载体固定化培养物中吸取 2 ml 样品,用于检测细胞的生长和代谢。

1.2.4 细胞无血清悬浮培养 处于对数生长后期的 T1 细胞和野生型 Vero 细胞经 0.125 % (w/v) 胰蛋白酶消化后,分别用无血清培养基悬浮并以 $4\sim 5 \times 10^5$ cells/ml 接种于内置磁力驱动板桨式搅拌叶片的 250 ml Bellco 搅拌式细胞培养瓶内,补充无血清培养基至 150 ml, 37°C 、5 % CO_2 培养条件下悬浮培养,搅拌速度设置为 50 r/min。每隔 24 h 分别从 T1 细胞和野生型 Vero

细胞悬浮培养物中吸取 2 ml 样品,用于检测细胞的生长和细胞平均粒径。

1.2.5 细胞形态观察 在 Nikon Eclipse TE300 倒置显微镜 (Nikon, Japan) 下,用平场物镜观察无血清静止贴附培养的细胞形态。在均匀搅拌状态下用大口吸管吸取 Bellco 搅拌式细胞培养瓶中无血清微载体固定化培养或悬浮培养的细胞样品,在倒置显微镜下观察在固定于 Cytodex-1 表面生长的细胞形态和悬浮生长的细胞团。将固定于 Cytodex-1 表面生长的细胞样品用 PBS 清洗 3 次,加入 2 % (v/v) 戊二醛 4°C 固定 30 min;用 1 % (v/v) 锇酸固定 60 min, 4°C 条件下用无水酒精梯度脱水,乙酸异戊酯置换 1 h 或放置过夜;样品经六甲基二硅烷干燥后,用 EIKOIB-S 离子喷射仪喷金处理,用扫描电镜 (S-450, Hitachi) 观察并照相。

1.2.6 细胞计数、细胞活力和粒径分析 用 Cedex AS20 细胞密度和活力自动分析系统 (Innovatis, Germany) 计数细胞和分析细胞活力。在 250 ml Bellco 搅拌式细胞培养瓶内无血清悬浮培养形成的细胞团经 0.125 % (w/v) 胰蛋白酶消化分散后用 Cedex AS20 细胞密度和活力自动分析系统分析平均细胞粒径。

1.2.7 细胞代谢参数的测定 采用 YSI 7100 多参数生物分析系统 (Yellow Springs Instruments, USA) 定量检测细胞培养上清的葡萄糖、谷氨酰胺和乳酸的浓度。葡萄糖比消耗速率 (q_{glc})、谷氨酰胺比消耗率 (q_{gln})、乳酸比生产速率 (q_{lac}) 和乳酸对葡萄糖得率 ($Y_{\text{lac/glc}}$) 分别按公式 (1-1) ~ (1-3) 进行计量。下式中: x 为活细胞密度, s 为葡萄糖或谷氨酰胺浓度, p 为乳酸浓度, t 为时间。

$$q_{\text{glc}}(q_{\text{gln}}) = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \quad (1-1)$$

$$q_{\text{lac}} = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} \quad (1-2)$$

$$Y_{\text{lac/glc}} = -dp/ds \quad (1-3)$$

2 结果

2.1 组成型过量表达 hTERT Vero 细胞在无血清静止贴附培养中的生长和代谢

图 1 为倒置显微镜下观察的、在无血清培养基中静止贴附于 24 孔培养板生长的 T1 细胞及野生型 Vero 细胞的形态。野生型 Vero 细胞在无血清培养基中培养 2d 后,细胞处于完全伸展状态,细胞呈多角形或纤维状 (图 1A);T1 细胞则大部分细胞仍处于未完全伸展状态、细胞呈球形或多角形 (图 1B)。无血清培养 5d 后,野生型 Vero 细胞呈较规则纤维状或纺锤状 (图 1C);T1 细胞的细胞形态仍以球形或多角形为主 (图 1D)。

以活细胞密度和细胞活力为观察指标,考察野生型 Vero 细胞和 T1 细胞在无血清培养基中静止贴附于 24 孔培养板批次培养的细胞生长。批次培养的持续时间为 7d,在培养的前期阶段 T1 细胞与野生型 Vero 细胞的活力基本相同,培养后期 T1 细胞的活细胞密度及细胞均高于野生型 Vero 细胞 (图 2)。

以 q_{glc} 、 q_{lac} 、 $Y_{\text{lac/glc}}$ 和 q_{gln} 为主要观察指标,考察野生型 Vero 细胞及 T1 细胞在无血清培养基中静止贴附于 24 孔培养板批次培养的细胞代谢。在为期 7 d 的培养过程中,反映野生型

Vero 细胞及 T1 细胞代谢的 q_{glc} 、 q_{lac} 、 $Y_{lac/glucose}$ 和 q_{ghn} 指标均不存在明显的差异, 且同样呈现随细胞密度的提高逐渐下降的趋势 (图 3)。

2.2 组成型过量表达 hTERT Vero 细胞在无血清微载体固定化培养中的生长和代谢

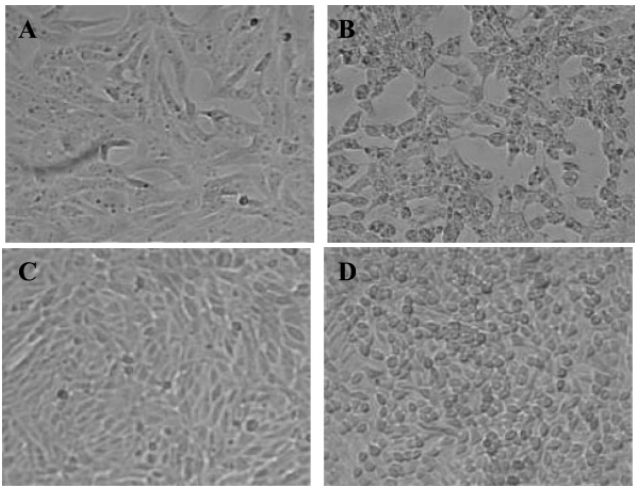


图 1 T1 细胞及野生型 Vero 细胞在无血清培养基中静止贴附培养的细胞形态 ($\times 100$)

注 A 培养 2d 的野生型 Vero 细胞, B 培养 2d 的 T1 细胞, C 培养 5d 的野生型 Vero 细胞, D 培养 5d 的 T1 细胞

Fig.1 Morphology of T1 cells and wild-type Vero cells cultured in serum-free medium in static attachment ($\times 100$)

Note: A, wild-type Vero cells at day 2; B, T1 cells at day 2; C, wild-type Vero cells at day 5; D, T1 cells at day 5

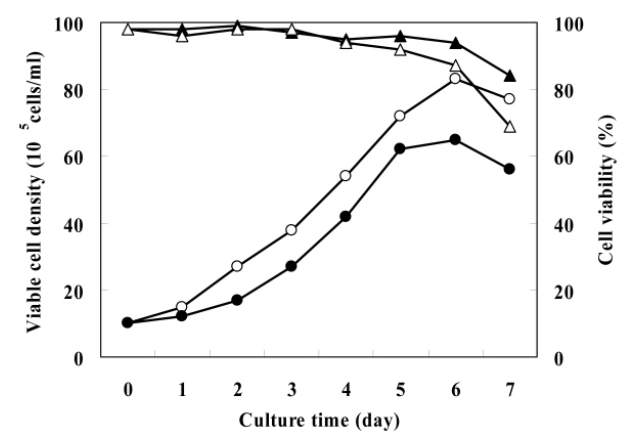


图 2 T1 细胞及野生型 Vero 细胞在无血清培养基中静止贴附培养的细胞生长

注 $\circ$ - T1 细胞的活细胞密度, $\bullet$ - 野生型 Vero 细胞的活细胞密度
 $\blacktriangle$ - T1 细胞的活力, $\triangle$ - 野生型 Vero 细胞的活力

图中数据代表两次不同实验的平均数

Fig.2 Growth of T1 cells and wild-type Vero cells cultured in serum-free medium in static attachment

Note $\circ$ - viable cell density of T1 cells, $\bullet$ - viable cell density of wild-type Vero cells

$\blacktriangle$ - T1 viability of T1 cells, $\triangle$ - viability of wild-type Vero cells

Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment

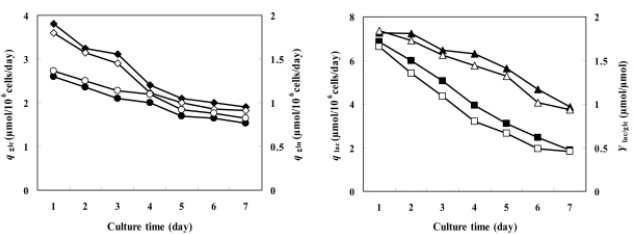


图 3 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在无血清培养基中静止贴附培养的代谢

注 $\blacklozenge$ - 野生型 Vero 细胞的 q_{glc} , $\diamond$ - T1 细胞的 q_{glc} ,
 $\bullet$ - 野生型 Vero 细胞的 q_{ghn} , $\circ$ - T1 细胞的 q_{ghn} ,
 $\blacktriangle$ - 野生型 Vero 细胞的 q_{lac} , $\triangle$ - T1 细胞的 q_{lac} ,
 $\blacksquare$ - 野生型 Vero 细胞的 $Y_{lac/glucose}$, $\square$ - T1 细胞的 $Y_{lac/glucose}$

图中数据代表两次不同实验的平均数。

Fig.3 Metabolism of T1 cells and wild-type Vero cells cultured in serum-free medium in static attachment

Note $\blacklozenge$ - q_{glc} of wild-type Vero cells, $\diamond$ - q_{glc} of T1 cells,

$\bullet$ - q_{ghn} of wild-type Vero cells, $\circ$ - q_{ghn} of T1 cells,

$\blacktriangle$ - q_{lac} of wild-type Vero cells, $\triangle$ - q_{lac} of T1 cells,

$\blacksquare$ - $Y_{lac/glucose}$ of wild-type Vero cells, $\square$ - $Y_{lac/glucose}$ of T1 cells

Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment

图 4A 为野生型 Vero 细胞及 T1 细胞在无血清培养基中, 分别以 2×10^5 cells/ml 的密度接种于 Cytodex-1 微载体浓度为 2 mg/ml、搅拌速度为 25 r/min 的悬浮培养体系的细胞贴附动态。在细胞接种后 80 min, 野生型 Vero 细胞贴附于 Cytodex-1 的比例明显高于 T1 细胞, 此时细胞贴附率分别为 61.1% 和 41.6%。随后 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在 Cytodex-1 表面的贴附率趋于接近, 接种后 180 min, 细胞贴附率分别为 94.5% 和 89.5%。在为期 6d 的培养过程中, T1 细胞与野生型 Vero 细胞的活力基本相同, 培养后期 T1 细胞的活细胞密度高于 T1 细

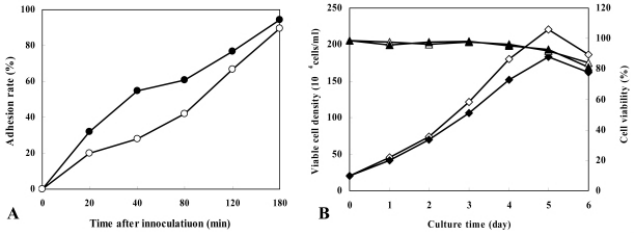


图 4 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在 Cytodex-1 微载体表面的贴附 (A) 和生长 (B) 动态

注 $\bullet$ - 野生型 Vero 细胞的贴附率, $\circ$ - T1 细胞的贴附率,
 $\blacklozenge$ - 野生型 Vero 细胞的活细胞密度, $\diamond$ - T1 细胞的活细胞密度,
 $\blacktriangle$ - 野生型 Vero 细胞的活力, $\triangle$ - T1 细胞的活力。

图中数据代表两次不同实验的平均数。

Fig.4 Profiles of the adhesion rate and growth of T1 cells and wild-type Vero cells cultured on suspended Cytodex-1 microcarriers in serum-free medium

Note: $\bullet$ - adhesion rate of wild-type Vero cells, $\circ$ - adhesion rate of T1 cells, $\blacklozenge$ - viable cell density of wild-type Vero cells, $\diamond$ - viable cell density of T1 cells, $\blacktriangle$ - viability of wild-type Vero cells,

$\triangle$ - viability of T1 cells

Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment.

胞和野生型 Vero 细胞。培养 5d 后,T1 细胞与野生型 Vero 细胞的活细胞密度分别由接种时的 20×10^4 cells/ml 提高到 221×10^4 cells/ml 和 183×10^4 cells/ml (图 4B)。

图 5 为倒置显微镜和扫描电镜下观察的固定于 Cytodex-1 表面生长的 T1 细胞和野生型 Vero 细胞。接种 6 h 后,野生型 Vero 细胞及 T1 细胞均已全部贴附于 Cytodex-1 表面,部分细胞伸展为纤维状或多角形(图 5A 和 5D)。培养 48 h 后,细胞在微载体的表面形成稀疏的融合单层,野生型 Vero 细胞的形态相对较扁平,T1 细胞的形态相对较饱满(图 5B 和 5E)。培养 96 h 后扫描电镜观察,T1 细胞和野生型 Vero 细胞在 Cytodex-1 表面形成致密的细胞单层,T1 细胞的边界较野生型 Vero 细胞清晰,细胞形态更饱满,细胞相对更密集(图 5C 和 5F)。

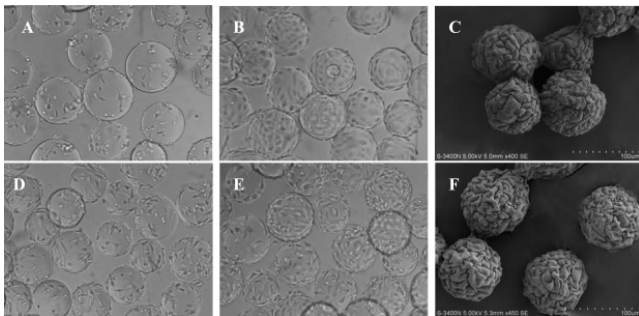


图 5 倒置显微镜和扫描电镜下固定于 Cytodex-1 微载体表面生长的 T1 细胞和野生型 Vero 细胞形态

注 :A 接种 6 h 后的野生型 Vero 细胞 ($\times 100$),B 培养 48 h 后的野生型 Vero 细胞 ($\times 100$),C 培养 96 h 后的野生型 Vero 细胞 ($\times 400$),D 接种 6 h 后的 T1 细胞 ($\times 100$),E 培养 48 h 后的 T1 细胞 ($\times 100$),F 培养 96 h 后的 T1 细胞 ($\times 450$)

Fig.5 Morphology of T1 cells and wild-type Vero cells cultured on suspended Cytodex-1 microcarriers in serum-free medium

Note: A wild-type Vero cells after 6 h inoculation ($\times 100$), B wild-type Vero cells after 48 h culture ($\times 100$), C wild-type Vero cells after 96 h culture ($\times 400$), D T1 cells after 6 h inoculation ($\times 100$), E T1 cells after 48 h culture ($\times 100$), F T1 cells after 96 h culture ($\times 450$)

以 q_{glc} 、 q_{lac} 、 $Y_{lac/glc}$ 和 q_{gln} 为主要观察指标,考察野生型 Vero 细胞和 T1 细胞在无血清培养基中微载体固定化培养的代谢。在整个培养过程中,反映野生型 Vero 细胞和 T1 细胞糖代谢的 q_{glc} 不存在明显的差异,且同样呈现随细胞密度的提高逐渐下降的趋势(图 6A)。反映 T1 细胞代谢的 q_{lac} 、 $Y_{lac/glc}$ 和 q_{gln} 指标虽与野生型 Vero 细胞的代谢指标呈现相同的自高而低的变化趋势,但其 q_{lac} 、 $Y_{lac/glc}$ 和 q_{gln} 均相对低于野生型 Vero 细胞的对应指标(图 6A 和 6B)。

2.3 组成型过量表达 hTERT Vero 细胞在无血清悬浮培养中的生长

以 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在 Bellco 搅拌式细胞培养瓶中无血清悬浮培养的活细胞密度和细胞活力为主要观察指标,结合野生型 Vero 细胞和 T1 细胞的平均细胞粒径和细胞聚集程度分析,考察悬浮培养模式下 T1 细胞和野生型 Vero 细胞的生长。在为期 6 d 的培养过程中,T1 细胞的活力一直保持在 98%以上,野生型 Vero 细胞在培养后期活力稍有降低,由培养开始的 98.8%降至 92.7% (图 7)。野生型 Vero 细胞和 T1 细胞在悬浮培养体系中的细胞生长速度较微载体固定化培养明显

减缓,但 T1 细胞的生长速度明显高于野生型 Vero 细胞,培养 6 d 后 T1 细胞和野生型 Vero 细胞的活细胞密度分别由接种的 4.5×10^5 cells/ml 提高到 13.5×10^5 cells/ml 和 7.9×10^5 cells/ml (图 7)。

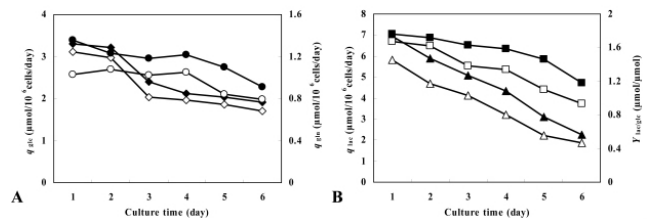


图 6 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在无血清培养基中固定于 Cytodex-1 微载体培养的代谢

注 :◆-野生型 Vero 细胞的 q_{glc} , -◇-T1 细胞的 q_{glc} ,
●-野生型 Vero 细胞的 q_{gln} , -○-T1 细胞的 q_{gln} ,
▲-野生型 Vero 细胞的 q_{lac} , -△-T1 细胞的 q_{lac} ,
■-野生型 Vero 细胞的 $Y_{lac/glc}$, -□-T1 细胞的 $Y_{lac/glc}$ 。

图中数据代表两次不同实验的平均数。

Fig.6 Metabolism of T1 cells and wild-type Vero cells cultured on Cytodex-1 microcarrier in serum-free medium

Note :◆- q_{glc} of wild-type Vero cells, -◇- q_{glc} of T1 cells,
●- q_{gln} of wild-type Vero cells, -○- q_{gln} of T1 cells
▲- q_{lac} of wild-type Vero cells, -△- q_{lac} of T1 cells,
■- $Y_{lac/glc}$ of wild-type Vero cells, -□- $Y_{lac/glc}$ of T1 cells

Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment

细胞团为其生长特征,T1 细胞所形成的细胞团相对较小、细胞间的接触不如野生型 Vero 细胞紧密(图 8)。随着细胞的聚集成团,野生型 Vero 细胞和 T1 细胞的平均粒径随培养时间的延长而有所缩小,分别由培养开始的 $18.03 \mu m$ 缩小到培养结束时的 $16.54 \mu m$ 和 $17.18 \mu m$ 。

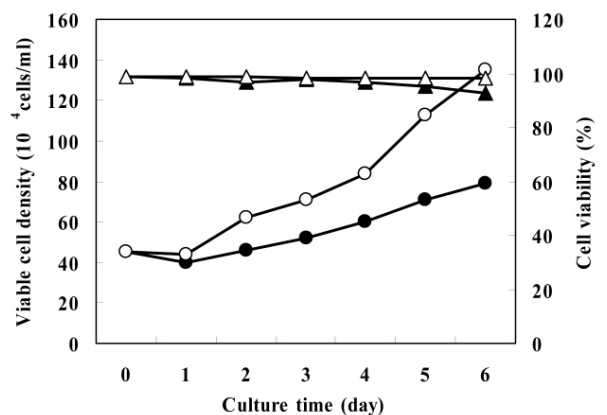


图 7 T1 细胞和野生型 Vero 细胞在无血清培养基中悬浮培养的细胞生长

注 :○-T1 细胞的活细胞密度,●-野生型 Vero 细胞的活细胞密度
-△-T1 细胞的活力,-▲-野生型 Vero 细胞的活力

图中数据代表两次不同实验的平均数。

Fig.7 Growth of T1 cells and wild-type Vero cells cultured in serum-free medium in suspension

Note :○-viable cell density of T1 cells, ●-viable cell density of wild-type Vero cells, -▲-viability of T1 cells,
-△-viability of wild-type Vero cells

Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment

在悬浮培养体系中,野生型 Vero 细胞和 T1 细胞以形成细胞团为其生长特征,T1 细胞所形成的细胞团相对较小、细胞间的接触不如野生型 Vero 细胞紧密(图 8)。随着细胞的聚集成团,野生型 Vero 细胞和 T1 细胞的平均粒径随培养时间的延长而有所缩小,分别由培养开始的 $18.03\mu\text{m}$ 缩小到培养结束时的 $16.54\mu\text{m}$ 和 $17.18\mu\text{m}$ 。

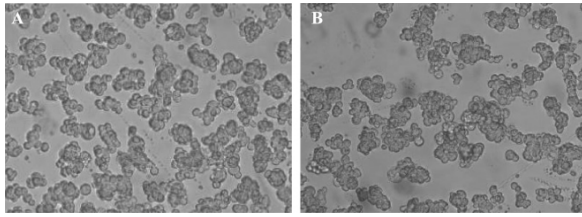


图 8 T1 细胞及野生型 Vero 细胞在无血清培养基中悬浮培养的细胞形态($\times 100$)

注 A 培养 5 d 的 T1 细胞,B 培养 5 d 的野生型 Vero 细胞

Fig.8 Morphology of T1 cells and wild-type Vero cells cultured in serum-free medium in suspension ($\times 100$)

Note: A T1 cells at day 5, B wild-type Vero cells at day 5

3 讨论

有关组成型异位表达 hTERT 用于构建永生生化细胞系、提高细胞抗凋亡能力和生长速率的报道主要来自有限世代的二倍体细胞和干细胞^[10,11,14]。Crea 等^[15]于 2006 年首次报道了异位表达 hTERT 对连续传代细胞体外培养特性的影响。过量表达 hTERT 的连续传代中国仓鼠卵巢细胞系 CHO K1 (Chinese hamster ovary cell line K1, CHO K1) 在批次培养中的细胞凋亡明显减少、活细胞密度显著提高、培养时间明显延长^[15]。这一研究结果为组成型过量表达 hTERT 能有效地改善永生生化细胞的生长特性、提高细胞培养效率提供了肯定的依据。

本研究中,有关 Vero 细胞体外培养的细胞形态和细胞贴附延展动态考察的研究结果表明 hTERT 组成型过量表达细胞系 T1 细胞在无血清静止贴附培养中呈现与纤维状或纺锤状野生型 Vero 细胞不同的球形或多角形态;T1 细胞在微载体固定化培养中与 Cytodex-1 贴附速率减缓。这些实验结果均反映了 hTERT 的组成型过量表达降低了 Vero 细胞的贴附伸展能力。

动物细胞的悬浮培养是现阶段以工程抗体和重组蛋白为代表的生物技术药物规模化生产的主流技术,也是细胞培养疫苗大规模生产的技术发展方向^[16,17]。结合 T1 细胞在包括静止贴附培养和微载体固定化培养的不同培养体系中,反映细胞生长的活细胞密度和细胞活力均不低于野生型 Vero 细胞的实验结果可以形成以下推论。hTERT 的组成型过量表达在降低 Vero 细胞的贴附伸展能力的同时,赋予了 T1 细胞非贴附依赖性生长的能力。这一体外培养生长特性的改变可能使贴附依赖性生长的 Vero 细胞通过悬浮驯化,获得悬浮生长的能力,从而为建立和发展大规模 Vero 细胞培养技术和新型高效病毒疫苗生产工艺提供基础。T1 细胞在悬浮培养体系中的细胞生长速度明显高于野生型 Vero 细胞的初步实验结果,也为以上推论提供了进一步的依据。

从野生型 Vero 细胞和 T1 细胞在不同培养体系中反映细胞生长的活细胞密度和细胞活力指标分析,培养后期 T1 细胞的活细胞密度高于野生系 Vero 细胞,在很大程度上是此阶段 T1 细胞活力高于野生系 Vero 细胞的体现。文献报道, hTERT 独立于端粒酶活性之外参与细胞生长的调控,表达 hTERT 的

细胞具有明显的抗凋亡能力^[11,18]。据此分析,培养后期 T1 细胞的活力高于野生系 Vero 细胞可能是缘于 hTERT 的组成型过量表达赋予了细胞抵御凋亡诱因的能力。

有关 hTERT 的组成型过量表达对细胞代谢影响的研究鲜有报道。本研究中,野生型 Vero 细胞和 T1 细胞在不同培养体系中表现为基本相同的葡萄糖、乳酸和氨基酸代谢特征。这一观察结果提示:尽管 hTERT 的组成型过量表达涉及众多基因的关联和调控,但所涉基因主要关乎细胞生长、膜结构、细胞间的相互作用和细胞凋亡, hTERT 的组成型过量表达可能不对细胞代谢产生明显的影响。

参考文献(References)

- [1] Fetzter S. Optimized vaccine development and manufacturing: a technology overview [J]. Biopharm International, 2008, 20(suppl 1):38-42
- [2] Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions [J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(11):1377-1383
- [3] Montagnon B J, Vincent-Falquet J C. Experience with the Vero cell line [J]. Dev Biol Stand, 1998, 93:119-123
- [4] Bluml G. Microcarrier cell culture technology [J]. Methods Biotechnol, 2007, 24:149-178
- [5] Souza MCO, Freire MS, Schulze EA, et al. Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures [J]. Vaccine, 27(46): 6420-6423
- [6] Mendonca RZ, Arrozio SJ, Antoniazzi MM, et al. Metabolic active-high density Vero cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding [J]. J Biotechnol, 2002, 97(1):13-22
- [7] Ren L, Yang R, Guo L, et al. Apoptosis induced by the SARS-associated coronavirus in Vero cells is replication-dependent and involves caspase [J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(8):496-502
- [8] Harrington L, McPhail T, Mar V, et al. A mammalian telomerase-associated protein [J]. Science, 1997, 275, 973-977
- [9] Blackburn EH. Telomere states and cell fates [J]. Nature, 2000, 408 (6808):53-56
- [10] Wieser M, Stadler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295 (5):1365-1375
- [11] Bermudez Y, Erasso D, Johnson NC, et al. Telomerase confers resistance to caspase mediated apoptosis [J]. Clin Interv Aging, 2006, 1(2):155-167
- [12] 王海涛, 叶玲玲, 李世崇等. hTERT 基因组型过量表达的 Vero 细胞系的建立[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6):1009-1012
- [13] 陈昭烈, 刘红, 刘兴茂等. 一种用于 Vero 细胞微载体培养的无动物来源成分无血清培养基 [P]. 中国发明专利, 申请号: 200910083176.7
- [14] Klinger RY, Blum JL, Hearn B, et al. Relevance and safety of telomerase for human tissue engineering [J]. PNAS, 2006, 103(8):2500-2505
- [15] Crea F, Sarti D, Falciani F, et al. Over-expression of hTERT in CHO K1 results in decreased apoptosis and reduced serum dependency [J]. Biotechnol, 2006, 121(2):109-123
- [16] Bulter M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(3):283-291
- [17] Chu LL, Robinson DK. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture [J]. Cur Opin Biotechnol, 2001, 12(2):180-187
- [18] Cao Y, Li H, Deb S, et al. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity [J]. Oncogene, 2002, 21 (20): 3130-3138