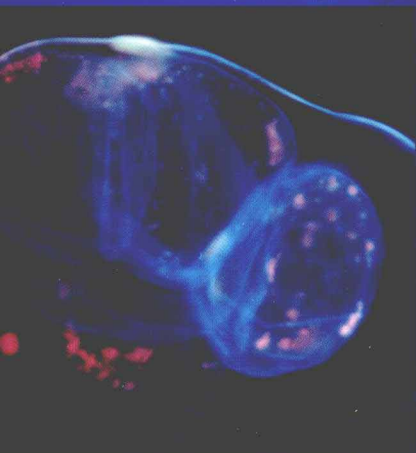




普通高等教育“十一五”国家级规划教材



细胞培养工程

主编 元英进

副主编 李 春 程景胜



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

中国生物工程学会 中国生物工程学会

细胞培养工程

2000.100000

2000.10.10.1000

中国生物工程学会



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

细胞培养工程

主 编 元英进

副主编 李 春 程景胜

参编者 (按姓氏笔画排序)

元英进 刘 燕 祁 峰 李 春 李艳菊

武占省 易丽娟 钟 成 董润安 程景胜



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本书以现代细胞培养技术和工程原理为基础，围绕动、植物细胞培养过程中的关键工程技术和生物学问题，论述了现代细胞培养工程的发展方向 and 前沿技术。

本书共分上、下两篇，上篇讲述细胞培养工程的基础知识，内容涵盖了细胞培养基本理论，动、植物细胞培养技术，细胞大规模培养及产品；下篇针对大规模细胞培养共性工程问题，阐述了大规模细胞培养过程的技术特点、反应动力学与操作模式、反应器及放大，并对动、植物细胞培养工艺开发、验证及优化进行了详细介绍。

本书对读者熟悉并系统掌握细胞培养工程的基本原理、理论和技术方法，运用这些知识进行工程创新和开发研究具有积极的指导作用，适用于高等院校生物技术、生物工程、生物制药等专业的本科生、研究生，也适合科研机构、企业等从事动、植物细胞培养科研开发和管理工作的

人员参考。

图书在版编目（C I P）数据

细胞培养工程 / 元英进主编. -- 北京：高等教育出版社，2012. 6
ISBN 978-7-04-034653-4

I. ①细… II. ①元… III. ①细胞培养－生物工程－高等学校－教材 IV. ①Q813.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2012）第 088696 号

策划编辑	王 莉	责任编辑	孟 丽	封面设计	张 楠	版式设计	杜微言
插图绘制	尹 莉	责任校对	王 雨	责任印制	尤 静		
出版发行	高等教育出版社			咨询电话	400-810-0598		
社 址	北京市西城区德外大街 4 号			网 址	http://www.hep.edu.cn		
邮政编码	100120				http://www.hep.com.cn		
印 刷	北京凌奇印刷有限责任公司			网上订购	http://www.landaco.com		
开 本	787mm×1092mm 1/16				http://www.landaco.com.cn		
印 张	13.5			版 次	2012 年 6 月第 1 版		
字 数	330 千字			印 次	2012 年 6 月第 1 次印刷		
购书热线	010-58581118			定 价	24.60 元		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 34653-00

前言

细胞培养技术现在已在生物、医学和制药等多个领域的研究和应用中被广泛采用。利用高产细胞系进行大规模、高效生产生物产品一直是细胞培养工程的终极目标,科学合理的大规模动、植物细胞培养工艺为实现这一目标提供了坚实的技术保障。

在我国生物医药的规划中,未来将要重点突破药物研制、新型疫苗、抗体药物以及规模化制剂、疾病早期诊断等一些关键的技术工艺。目前,绝大部分的生物技术药物都是动物细胞产品,例如,蛋白质、单克隆抗体、核酸等动物细胞产品的大规模高效培养技术是生物制药的关键技术,通过动物细胞培养技术生产生物产品已成为全球生物工业的主要支柱和生物制药领域所采用的主流技术。植物细胞培养可以实现人工调控,因此,植物细胞培养技术成为生产植物次级代谢物的具有潜力和吸引力的技术和研究领域。运用生物和工程技术相结合的方法,利用高产细胞系进行大规模植物细胞培养,对次级代谢物进行高效生产,成为植物细胞培养工程科技工作者的主要任务。

本书重点在于阐明如下细胞培养工程问题:① 培养细胞生产目标产物能否实现工业化的关键是提高培养细胞生长速度和代谢物的产量,因此,如何促使细胞高效表达目标代谢物是目前的研究热点之一;② 从工程角度出发,探讨了大规模培养放大过程的技术特点,包括培养体系的混合、流变、氧需求和供应,细胞成团、泡沫与壁增长以及流体的剪切力对大规模培养细胞生长与生产的影响;③ 重点介绍了各类生物反应器(搅拌式生物反应器、鼓泡塔生物反应器、气升式生物反应器、转鼓式生物反应器、光生物反应器、固定化生物反应器)的操作策略、反应器设计过程中应考虑的问题,以及细胞产品分离纯化、培养过程经济优化策略和验证。本书以现代细胞培养技术和工程原理为基础,紧紧围绕动、植物细胞培养过程中的关键工程技术和生物学问题,论述了现代细胞培养工程的发展方向和前沿技术。本书对读者熟悉并系统掌握现代动、植物细胞培养工程的基本原理、理论和技术方法,运用这些知识进行工程创新和开发研究具有积极的指导作用。

本书共分上、下两篇,上篇主要讲述细胞培养工程的基础知识,内容涵盖了细胞培养基本理论、动、植物细胞培养技术、细胞大规模培养及产品;下篇针对大规模细胞培养共性工程问题,阐述了大规模细胞培养过程的技术特点、反应动力学与操作模式、反应器及放大,并对动、植物细胞培养工艺开发、验证及优化进行了介绍。

本书由元英进主编,相关高校从事细胞培养工程教学和科研的中青年教师参加了本书的编写工作。各章编写分工如下:第一章“绪论”,天津大学元英进、北京理工大学李春;第二章“细胞培养基本理论及技术”北京理工大学李春、刘燕;第三章“动物细胞培养技术”,天津科技大学祁峰;第四章“动物细胞大规模培养及工业应用”,北京理工大学董润安;第五章“植物细胞培养技术”,北京理工大学李艳菊;第六章“植物细胞大规模培养及产品”北京理工大学李春、易丽娟;第七章“大规模细胞培养过程技术特点”,天津大学元英进、程景胜;第八章“细胞培养反应动力学与操作模式”,北京理工大学李春、武占省;第九章“细胞培养反应器及其放大”,天津科技大学钟

成;第十章“细胞培养工艺开发、验证及优化”,天津科技大学钟成。

虽然各位参编同仁在编著过程中做出了极大努力,力图全面、系统地介绍该学科的进展,但由于受到知识、经验和时间的限制,整理、撰写过程中难免有所遗漏、不尽完善或错误之处,敬请广大读者使用后多提宝贵意见,给予批评指正,以使其逐步完善。

编 者

2012 年 1 月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 概述	1
一、细胞培养工程概念及特点	1
二、细胞培养工程研究的内容	2
三、细胞培养工程产业化影响因素 及对策	2
四、细胞培养工程研究的意义及发	

展趋势	4
第二节 动物细胞培养技术发展历程	4
一、动物细胞培养的历史	4
二、动物细胞培养的现状 & 展望	5
第三节 植物细胞培养技术发展历程	7
一、植物细胞培养的历史	7
二、植物细胞培养的现状	8
三、植物细胞培养的展望	8

上篇 细胞培养工程基础知识

第二章 细胞培养基本理论及技术	13
第一节 细胞的结构	13
一、植物细胞结构	14
二、动物细胞结构	17
三、原核细胞、植物细胞和动物细胞 结构的比较	18
第二节 细胞培养的生物学基础	19
一、细胞形态	19
二、细胞的生长周期	21
三、细胞的全能性	22
四、细胞群体生长特点	23
第三节 无菌技术	26
一、无菌操作技术	26
二、无菌区	27
三、消毒	28
四、体外培养细胞无菌操作实例	29
第四节 显微操作技术	29
一、概述	29
二、显微操作实例	31

第三章 动物细胞培养技术	33
第一节 细胞株系的建立	34
一、基本概念	34
二、二倍体细胞系的建立	35
三、传代细胞系的建立	38
四、基因工程细胞系的建立	39
五、培养细胞活力的检测	41
六、细胞库建立及注意事项	42
第二节 动物细胞培养基	44
一、培养基的主要成分及其作用	44
二、培养基种类	45
三、无血清培养基	46
四、无蛋白培养基	47
五、培养基选择原则	47
六、其他常用培养基	50
第三节 细胞的冻存、复苏和运输	51
一、细胞的冻存	51
二、细胞的复苏和运输	52
第四节 动物细胞常用培养方法	53

一、贴壁培养	53	一、固体培养体系的建立	79
二、悬浮培养	54	二、悬浮培养体系的建立	81
三、微囊培养	54	第二节 高产细胞株系的选育	82
第四章 动物细胞大规模培养及工业应用	58	一、外植体的选择	82
第一节 动物细胞大规模培养技术	58	二、离体培养细胞的变异	83
一、微载体细胞培养系统	59	三、突变细胞的筛选	85
二、中空纤维细胞培养系统	64	第三节 植物细胞培养基	89
三、微囊培养系统	65	一、培养种类	90
第二节 营养与培养条件	65	二、培养基的营养成分	91
一、营养成分	66	三、植物细胞生长的影响因素	95
二、温度	67	第四节 植物细胞培养相关技术	97
三、pH	67	一、毛状根培养	97
四、渗透压	67	二、原生质体融合技术	100
五、溶氧	67	三、固定化细胞培养	104
六、搅拌	68	第六章 植物细胞大规模培养及产品	108
七、其他因素	68	第一节 植物细胞培养过程中的生物学问题	109
第三节 干细胞培养技术	68	一、培养植物细胞的分裂	109
一、干细胞概念与分类	68	二、细胞脱分化和再分化	110
二、胚胎干细胞	68	三、细胞聚集成团	111
三、成体干细胞	71	第二节 营养与环境条件	112
四、神经干细胞及其体外培养	73	一、培养基组成	112
第四节 动物细胞大规模培养产品	74	二、pH	113
一、单克隆抗体	74	三、光照	114
二、疫苗	74	四、温度	114
三、基因重组蛋白药物	74	五、前体饲喂	114
第五节 组织工程产品	75	六、气体组成	115
一、皮肤	75	第三节 植物细胞防御反应与次级代谢物的诱导生产	115
二、软骨	76	一、诱导子概述	116
三、骨	76	二、诱导子的信使作用	118
四、胰腺	76	第四节 植物细胞培养生产次级代谢物产品	120
五、血管	76	一、生物碱	121
第五章 植物细胞培养技术	78	二、类黄酮	123
第一节 植物细胞株系的建立	79		

三、蒴类和留体	125
---------------	-----

四、蒽醌类化合物	126
----------------	-----

下篇 大规模细胞培养共性工程问题

第七章 大规模细胞培养过程技术

特点	131
----------	-----

第一节 规模放大的基本原则	131
---------------------	-----

第二节 动、植物细胞培养体系的混合特性	133
---------------------------	-----

一、混合时间	133
--------------	-----

二、搅拌	133
------------	-----

三、气体交换	133
--------------	-----

第三节 动、植物细胞培养体系的流变学特性	134
----------------------------	-----

一、培养液流变学特性表征	134
--------------------	-----

二、培养液流变学特性与细胞生长	135
-----------------------	-----

第四节 动、植物细胞培养过程氧需求和供应	135
----------------------------	-----

一、气体成分	135
--------------	-----

二、通气	136
------------	-----

三、细胞培养过程中的氧传递	136
---------------------	-----

第五节 动、植物细胞成团、泡沫与壁增长	137
---------------------------	-----

一、动物细胞贴壁生长和植物细胞聚集	137
-------------------------	-----

二、动物细胞贴壁特性与培养方式	137
-----------------------	-----

三、泡沫	138
------------	-----

第六节 剪切力对动、植物细胞大规模培养的影响	138
------------------------------	-----

一、生物反应器中剪切力的产生	139
----------------------	-----

二、剪切力对动、植物细胞的影响	140
-----------------------	-----

三、细胞剪切力敏感性的研究方法	141
-----------------------	-----

四、细胞对剪切力的敏感性机理初探	142
------------------------	-----

第八章 细胞培养反应动力学与操作

模式	147
----------	-----

第一节 动、植物细胞培养生长动力学	147
-------------------------	-----

一、动、植物细胞生长动力学	147
---------------------	-----

二、生长动力学模型	150
-----------------	-----

第二节 动、植物细胞培养生产动力学	152
-------------------------	-----

一、产物生成动力学	152
-----------------	-----

二、产物生成动力学数学模型	153
---------------------	-----

第三节 动、植物细胞培养过程操作策略	155
--------------------------	-----

一、分批培养	156
--------------	-----

二、半连续培养	158
---------------	-----

三、连续培养	159
--------------	-----

四、流加培养	161
--------------	-----

五、灌注培养	164
--------------	-----

第四节 次级代谢物传递、储存和转化	167
-------------------------	-----

一、两相培养技术	167
----------------	-----

二、产物释放技术	169
----------------	-----

第九章 细胞培养反应器及其放大

第一节 常用的细胞培养反应器	173
----------------------	-----

一、细胞培养反应器类型	173
-------------------	-----

二、细胞培养反应器的比较与选择	178
-----------------------	-----

第二节 反应器培养过程存在的问题	179
------------------------	-----

一、氧传递	179
-------------	-----

二、混合	180
------------	-----

三、流体剪切力	181
---------------	-----

四、细胞-气泡相互作用	181
-------------------	-----

第三节 反应器流体力学性能研究	182
-----------------------	-----

一、CFD 模拟	182
----------------	-----

二、LDA 实验	185
----------------	-----

第四节 动、植物细胞培养反应器的设计与放大	186
-----------------------------	-----

一、反应器设计	186
---------------	-----

二、反应器的放大	187
----------------	-----

第十章 细胞培养工艺开发、验证及 优化	189	策略	193
第一节 动物细胞产品分离纯化	189	第四节 动、植物细胞培养过程优化 策略	193
第二节 植物细胞产品分离纯化	192	第五节 动、植物细胞培养工业化实例 ...	195
第三节 动、植物细胞培养过程经济		第六节 动物细胞培养过程策略举例	196
		第七节 植物细胞培养过程策略举例	198
索引			202

第一章 绪 论

动物和植物细胞可产生各种有用的物质,为人类提供药物、调味品、色素、香料、农药等,世界各国的科技人员对动、植物细胞培养技术进行了深入研究并取得了极大的发展。20 世纪 60 年代后,动、植物细胞培养成为研究和生产生物产物的非常有发展潜力的技术。进入 70 年代,随着分子遗传理论,以及 DNA 重组和单克隆抗体等生物技术的突破,工程技术人员采用了连续培养和固定化新技术,改变物理、化学因素调节细胞产物的合成,通过诱变产生高产细胞株,使动、植物细胞加快生长,有效成分含量比整体生物体中的含量提高,使得动、植物细胞培养技术获得了新生,进而发展成为一种精细的实验技术。80 年代后,部分动、植物细胞培养生产目标产物的产业化更将动、植物细胞培养工程推到一个新高度。然而,由于动、植物细胞生长缓慢,有效成分含量低,遗传稳定性差和对剪切力敏感等许多问题的存在,大部分动、植物细胞培养仍没有形成产业体系。但我们相信,经过生物学家和工程技术人员的共同努力,这些问题最终会得到解决,动、植物细胞培养工程将会对未来的生活发挥重要作用。

第一节 概 述

一、细胞培养工程概念及特点

细胞培养工程作为生物技术领域里的一个重要分支,包括通过幼胚、原生质体、细胞、组织、器官的培养生产重要代谢物、新的生物个体,以及进行动、植物细胞生理生化和遗传学的研究。它是一个综合细胞生理、生化和分子生物学、药理学、毒理学、化学、化学工程的交叉学科。

细胞培养工程结合了生物与工程技术两大学科领域的知识,对于通过动、植物细胞获得人类有用的物质过程进行研究和开发。与栽培的整株植物或培养的动物个体相比,用动、植物细胞培养方法生产有价值的天然产物具有以下优点:

(1) 动、植物细胞培养比动物个体或植株有更快的代谢速度,在培养物中细胞生长一旦开始(或启动),便会引起细胞团的快速分化,细胞生长周期也相对固定。这也是动、植物细胞能够作为研究次级代谢路径的优良模型体系的优势之一。

(2) 便于进行代谢物生产的人工调控。

(3) 培养在无菌条件下进行,可排除病菌和虫害的侵扰。

(4) 可以探索新的合成路线和获得新的有用物质。

与微生物细胞相比,动、植物细胞培养具有以下缺点:① 动、植物细胞生长缓慢,易聚集成团,细胞体积较大,对剪切力十分敏感,这就需要在相对低的剪切力下进行培养;但是,低剪切会导致混合不充分,从而影响营养物质的传递。② 动、植物细胞的生理和代谢活性低,对氧气传输速率要求不高,过高的通气速率反而抑制细胞生长和产物合成。③ 动、植物细胞生长缓慢,发酵时间长,难以保持整个培养过程无菌。

相对于动物细胞培养而言,植物细胞培养具有以下优点:① 植物细胞多为悬浮培养,无需支持物,有利于细胞大规模培养。② 植物细胞具有细胞壁,对剪切力的敏感性比动物细胞小。③ 动物细胞培养基中一般需要血清,成本昂贵,而植物细胞培养基组成简单,价格比较低廉,因此生产的成本低。而大多数动物细胞生长需要黏附在支持物上进行贴壁生长,从而使其大规模培养受到限制。

二、细胞培养工程研究的内容

细胞培养过程中的一些瓶颈问题限制动、植物细胞生产次级代谢物实现产业化,这些瓶颈问题主要表现在:① 基础知识的缺乏:对培养体系中的一些基本问题的认识不够,特别是对生物体在特定培养环境中一些代谢路径及其酶不清楚。为了更好地实现合成过程的人工调控,必须对其合成过程进行较为细致地研究。② 经济可行性:对于许多次级代谢物,比如食品成分,利用动、植物细胞培养方式的成本要高于它的经济价值。经济可行性问题需通过稳定高产株系的建立、培养条件的优化来解决。

细胞培养工程的研究任务主要包括如下几方面:

- (1) 高产细胞株的筛选和稳定性研究。
- (2) 细胞生长环境因子以及培养方式的研究。
- (3) 细胞生长和产物合成动力学研究。
- (4) 生物反应器中流体和传质研究。
- (5) 新型生物反应器研究和开发以及过程检测、模型化与控制。
- (6) 过程潜能的开发。

三、细胞培养工程产业化影响因素及对策

1. 细胞聚集成团问题

动、植物细胞通常比微生物个体大且生长速度慢,细胞直径为 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 。由于细胞分化后不易分离,在间歇培养后期易分泌胞外多糖,常常形成直径高达数毫米的上百个细胞的聚集体。细胞系、细胞年龄、培养条件及其环境条件的差异导致细胞团的形式也不同,过大的细胞聚集体一方面会影响反应器的混合及操作,另一方面导致营养物在细胞团内传输困难。但是,适宜尺度的细胞颗粒对细胞的生长及次级代谢物的形成更加有利,因此,控制细胞颗粒大小是反应器设计与操作应考虑的重要因素之一。

2. 流变学问题

培养液中聚集体颗粒的形成及颗粒间相互作用、细胞浓度的增加和胞外多糖的分泌最终导致发酵液具有高黏性,表现为非牛顿流体特性。细胞培养体系中培养液的流变学特性是指培养液体在外加剪切力作用下所产生的流变特性。在细胞悬浮培养过程中,细胞的年龄、形态和细胞颗粒的大小以及培养液中细胞的浓度影响培养体系的表现黏度。培养液的流变学特性对混合和氧传递的影响很大,如假塑性流体高剪切力下表现黏度低,此时,在桨区因高剪切混合及气泡分散较好,而远离桨区表现高的表现黏度而导致混合及氧传递差。培养液的流变学特性与氧传递密切相关,是反应器设计与放大所需考虑的重要因素,但目前还没有全面透彻的在线流变学研究。

3. 氧与通气问题

通常人们认为,动、植物细胞培养物生长所需临界溶氧浓度为空气饱和浓度的 15% ~ 20%,比氧消耗速率以干重计的数量级为 $10^{-6} \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{s})$,在细胞高密度培养和高流体黏度条件下氧的传质效率会降低。由于动、植物细胞代谢较慢,相对于微生物而言,其对氧的需求少,但是在代谢物合成时的需氧量可能显著高于细胞生长的临界需氧值。研究通气对动、植物细胞培养的影响主要集中在体积传质系数 $K_L a$,主要考虑通气和搅拌两个因素。已有研究表明,每个培养体系都存在一个 $K_L a$ 的下限,低于这个值,细胞的生长或生产就会受到抑制,高通气时产率会降低。另外,在生物反应器中,通气会产生一定量的泡沫,研究发现,泡沫的产生与通气速率和胞外蛋白含量密切相关,而胞外多糖或培养基其他成分对泡沫的产生和培养体系中泡沫稳定性的作用有待进一步研究。

4. 剪切力问题

在大规模培养时,通气和搅拌产生的剪切力对动、植物细胞的生长和次级代谢物的合成有很大的影响。动、植物细胞体积较大,加之植物细胞具有由纤维素组成的细胞壁和较大的液泡,使得动、植物细胞对剪切力的敏感性明显高于微生物。动、植物细胞对剪切敏感性也因品系和细胞年龄不同存在差别,细胞在长期剪切力作用下也可以获得剪切耐受力。

在搅拌式生物反应器中,动、植物细胞的生物学响应是桨区的湍流剪切力与主体区的层流剪切力两种剪切力作用的累积效应。不同区域剪切力的大小存在差异,对细胞造成的影响也不同。因此,动、植物细胞的流体力学敏感特性需要独立使用确定的层流场和湍流场,作用一定的时间后测定细胞的生物学响应来得到。通过在确定的湍流场中动、植物细胞剪切力敏感性的研究,可以确定动、植物细胞所能承受的最大剪切力以及适合细胞生长、代谢的临界剪切力,这将有助于反应器与桨型的设计。

研究剪切力对动、植物细胞的影响面临的主要问题包括:① 缺乏测定培养细胞剪切力敏感性条件的基本知识;② 将实验条件下的剪切力行为应用于实际生产是困难的;③ 剪切力实验结果难以解释,不同研究者的结果难以比较。克服剪切力对细胞的影响可采用如下的策略:建立耐剪切力细胞株,建立固定化动、植物细胞培养方法和开发低剪切力生物反应器等。

5. 反应器设计与放大问题

1959年,人们第一次提出了大规模动、植物细胞培养的概念。在以后的几年里,动、植物细胞培养反应器及放大领域的研究取得了很大的成功,目前工业上已有用 75 000 L 反应器进行紫草宁的生产。在用反应器培养动、植物细胞的过程中,有两个制约因素要考虑:① 在培养后期有限的空间内聚集大量细胞,使碳和氮等营养物传递不均一,从而导致大量细胞的死亡;② 剪切力是导致动、植物细胞死亡的另一主要原因。当今采用的搅拌式生物反应器多借用微生物发酵所用设备,易对植物细胞造成伤害而阻碍细胞的正常生长。现阶段,解决这一问题的主要方法是采用气升式和鼓泡塔生物反应器。另外,生物反应器在放大过程中应考虑动、植物细胞生长动力学和流变学特性,以便设计出合适的生物反应器。此外,更应注意对大规模的研究。

6. 其他问题

在选定了反应器之后,实现最优化控制是提高代谢产量的又一个要求,涉及以下几个方面:

(1) 培养方式的选择 传统的微生物培养主要有间歇培养、半间歇培养、流加和连续培养方式。而动、植物细胞培养基于细胞生长与次级代谢合成间的关系以及代谢物是否能够分泌到

培养基中,可采用两段法培养、固定化培养和两相培养等技术。

(2) 加强计算机技术用于细胞培养过程控制的研究 实现定位控制、顺序控制和关键控制,通过建立数学模型,以实现最优化控制。

(3) 加强多学科协作 细胞培养技术涉及生物、化工、自动控制等多学科,只有多学科的协作方能使其迅速发展。

(4) 培养基 开发最适培养基,以利于目标产物的产生、产物分离和降低大规模生产成本。

(5) 分离提取 研究和提高目标产物后续分离提取技术。

四、细胞培养工程研究的意义及发展趋势

高等动、植物是很多种极有价值的化学药品的来源,包括药品(阿码碱、可待因、奎宁、异羟基毛地黄毒苷、长春新碱)、香精、着色剂、激素等。目前,这些化学药品中的大部分是由整个动、植物(或器官)的繁殖而产生,再萃取、纯化为人需要的产品。这些天然产品与人类生活息息相关,具有很高利用价值,又由于它们往往具有特殊用途,且极难得到,所以价格昂贵。如,目前世界上广泛采用的抗恶性肿瘤的常用药硫酸长春新碱的售价为 33 万元/千克。但是传统的制备过程具有很多缺点,植物受气候、地理和季节的限制,产品的质量和数量受不可预测的环境因素影响,分离过程冗长而耗资巨大。

动、植物细胞大规模培养技术提供了不同于传统种植的方法来得到这些产物的途径,它可以克服上述来源过程的缺点,节省工地、人力。例如,日本三井石油公司 1983 年工业化培养紫草细胞来生产紫草宁,展示了植物组织大规模培养的前景。这一前景对生产那些高度依赖地理位置的植物产品更有意义,如藏红花植物、天山上的珍贵药材等。

第二节 动物细胞培养技术发展历程

一、动物细胞培养的历史

细胞体外培养技术已有一百多年的历史,因其初期发展比较缓慢,未能引起足够的重视。自 1907 年美国生物学家 R. Harrison 以淋巴液为培养基,在无菌试管中成功培养了蛙胚神经组织达数周,创立了体外组织培养法以来,人们在培养方法改进、新型培养容器开发、不同的培养液设计和污染防止等方面开展大量工作,使得动物细胞体外培养技术得到了不断地完善和发展,其发展简史见图 1-1。

直到 20 世纪 50 年代后期,细胞体外培养技术被广泛用于生物学研究的各个领域,使其得到了迅速发展。现在已经成为细胞工程、基因工程、抗体工程的重要组成部分。

动物细胞培养具有明显的目标产物表达方面的优势,是传统的微生物发酵技术所无法替代的。1962 年后,随着细胞分子生物学、培养系统及培养方法等领域的不断丰富和完善,人们开始扩大动物细胞培养规模。研究的不断深入推动了生物技术产业的迅速发展,而今动物细胞培养技术已在生物、医学研究和应用中被广泛采用。利用该技术生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单克隆抗体等,已成为医药生物高技术产业的重要部分,其大规模培养已成为生物制药领域最重要的关键技术之一。

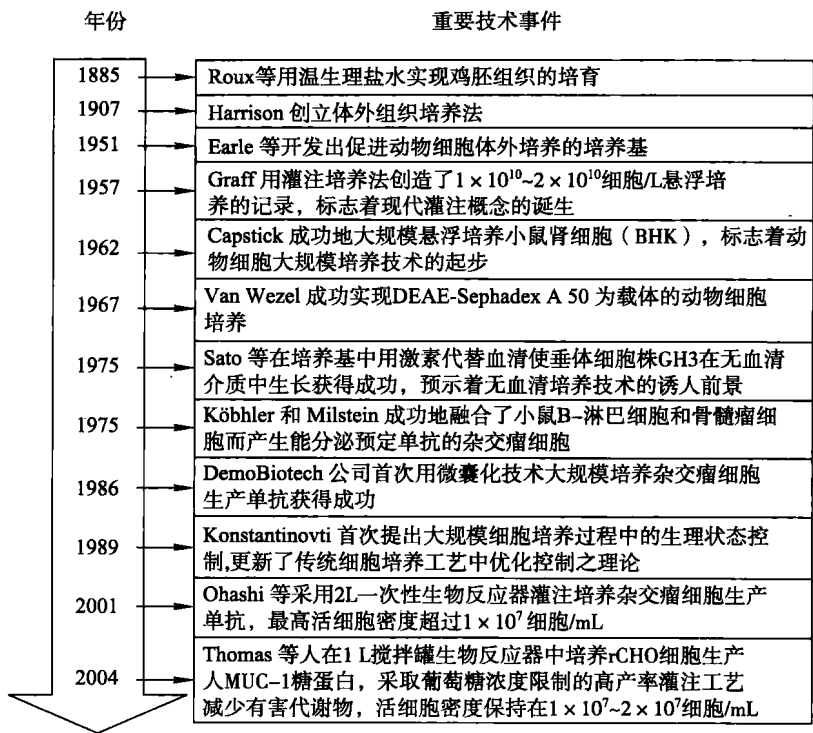


图 1-1 动物细胞培养技术发展历程

二、动物细胞培养的现状与展望

动物细胞大规模培养技术主要由高效表达的细胞系/病毒株、个性化细胞培养基、生物反应器工程、细胞培养工艺技术四大核心要素组成, 四者相辅相成。其中细胞系/病毒株是基质基础, 个性化细胞培养基是营养物质支持, 而生物反应器为主体的生产线及培养工艺是推动其大规模培养技术革新和工艺改进的硬件推动力, 也是提升生物制品的生产效率、生产规模、产品质量的基础。

在过去几十年间, 细胞培养经历了从使用转瓶、CellCube 等贴壁培养, 发展为以生物反应器进行大规模细胞培养, 特别是培养表达特异性蛋白的哺乳动物细胞。该技术自创立以来的快速发展表明, 要获得大量有用的细胞表达产物, 采用玻璃瓶静置或旋转瓶的培养方法已不能满足市场的需要, 采用动物细胞大规模培养技术是生物药物生产的必然趋势。

现代生物制药产业中有着众多核心技术, 其中哺乳动物细胞培养技术作为生物制药产业的下游通用性核心技术之一, 发挥着重要作用。现代生物制药产品中的大多数品种都利用动物细胞培养技术所获得, 其中, 动物细胞表达产品的销售额已占生物制药产品销售额的 70% 以上。现代生物制药技术中的哺乳动物细胞培养技术, 其核心内容在于如何实现哺乳动物细胞的规模化培养, 从而提高产能, 降低成本, 并提升产品质量。实现哺乳动物细胞工业化大规模培养的唯一途径是生物反应器培养。

国内大规模培养生产与国际相比具有较大的差距。仅从生物药物品种看, 北美制药企业占

据了全球的 63%, 欧洲为 25%, 日本为 7%, 包括中国在内的其他地区只有 5%; 从市场份额看, 也是北美和欧洲占了绝大多数, 两者之外的其他地区合计为 37%。从哺乳类细胞培养技术来看, 基因工程抗体的生产反应系统最大规模达到 20 000 L 以上。2008 年以前, 我国多数药物开发单位的细胞反应规模仍停留在 2~30 L 规模, 并且长期以来都是采用国外的技术和进口国外设备。随着生物产业的快速发展, 近年来在 market 需求的刺激下, 国内生物反应器产业发展较快, 生产有关产品的企业已达十多家, 在这些公司的努力下, 改变了过去基本由国外产品统治国内市场的局面。

目前, 可用于进行大规模培养的动物细胞主要有鸡胚、猪肾、猴肾、地鼠肾等多种原代细胞, 以及人二倍体细胞、CHO(中华仓鼠卵巢)细胞、BHK-21(仓鼠肾细胞)、Vero(非洲绿猴肾)细胞等传代细胞、贴壁依赖的成纤维细胞等。利用动物细胞培养生产的商业化产品主要包括多种疫苗(如: 口蹄疫疫苗、狂犬病疫苗、牛白血病病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒疫苗、乙型肝炎疫苗、疱疹病毒疫苗、巨细胞病毒疫苗等)、多种激酶(如尿激酶、激肽释放酶)、干扰素(α 和 β)、血纤维蛋白溶酶原激活剂、凝血因子 VIII 和 IX、促红细胞素、松弛素、生长激素、蛋白 C、免疫球蛋白以及 200 种单抗等。其中, 口蹄疫疫苗已于 1983 年由英国 Wellcome 公司利用动物细胞进行大规模培养生产, 它已成为动物细胞大规模培养方法生产的主要产品之一。

传统的生物化学技术获取生物制品的方法已远远不能满足需求, 随着细胞培养的原理和方法日臻完善, 动物细胞大规模培养技术趋于成熟, 动物细胞培养生产的产品将主要集中在疫苗、干扰素、单抗、基因重组产品几个方面。

动物细胞大规模培养主要依赖悬浮细胞培养和贴壁细胞培养两种方式。同时, 通过细胞培养规模的扩大、培养环境的优化、细胞特性的改变、产品的产率质量的提高来实现培养技术水平的提高。而利用动物细胞培养技术生产的生物制品已占世界生物高技术产品市场份额的 50%。这些生物技术药物如蛋白质、单克隆抗体及核酸等绝大部分是动物细胞产品, 因此, 动物细胞产品的大规模高效培养技术是生物制药的关键技术, 通过动物细胞培养技术生产生物产品已成为全球生物工业的主要支柱和生物制药领域所采用的主流技术, 全世界生物技术产品中使用动物细胞生产的已超过 80%。该技术具有很高的技术门槛, 因此, 严重阻碍了我国生物制药产业的发展。

就培养技术而言, 20 世纪 60—70 年代, 就已创立了可用于大规模培养动物细胞的微载体培养系统和中空纤维细胞培养技术。在国际上, 目前已经采用万升级的工业大规模间歇式生物反应器, 甚至悬浮连续式反应器进行动物细胞培养生产生物药物产品; 而 Genzyme、Genetic Institute 以及 Bayer 公司等则采用连续灌流工艺进行生产。对生物反应器的控制已实现现代计算机的二级控制, 并正朝人工智能以及细胞、生化、代谢分子水平的工业控制方向迅速发展。国外用于生产的动物细胞生物反应器产品已趋于大型化(最大到吨级规模)、多参数与高度自动化的计算机控制系统。就培养基而言已发展到的无动物蛋白质培养液。

在国内, 第四军医大学采用 5 L CelliGen 反应器连续灌注培养杂交瘤细胞, 研究杂交瘤细胞在无血清培养基中的生长、代谢情况和氧消耗的关系, 培养第 9 天细胞密度达到 8×10^6 细胞/mL 以上。中国医学科学院、中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室、兰州生物制品研究所有限公司致力于动物细胞流加悬浮培养工艺的研究与应用, 其中, 2004 年兰州生物制品研究所采用流加式旋转悬浮培养方法实现 15 L 转瓶中血型杂交瘤细胞培养, 并且在第 5 天活细胞

密度达到 3.8×10^6 细胞/mL。然而,我国未见有万升级的生物反应器用于生产动物细胞产品的报道,有关商品化大规模动物细胞反应器产品还处于空白,与国际水平存在很大的差距。

由于动物细胞培养技术的复杂性,目前我国批准上市的哺乳动物细胞尤其是 CHO 细胞表达的产品很少,只有促红细胞生成素(EPO)、CHO 基因工程乙肝疫苗以及最近批准上市的治疗性抗体药物益赛普(有效成分相当于美国食品药品监督管理局批准的 enbrel)和泰欣生(有效成分相当于美国食品药品监督管理局批准的 erbitux)等少数几种生物技术药物。而美国食品药品监督管理局在 2000 年 1 月—2004 年 12 月批准上市的 31 种生物技术药物中,约 70% 为哺乳动物细胞表达的重组蛋白。我国生物制药与欧美国家的主要差距在数量上的体现是哺乳动物细胞表达的产品寥寥无几。所以,在今后相当长的一段时间内,大规模的动物细胞培养在药物产品的生产方面具有重大的价值。

第三节 植物细胞培养技术发展历程

植物细胞培养的应用主要包括以下三个方面:有用物质(次级代谢物)的生产、植物无性系的快速繁殖和遗传突变体的筛选以及植物细胞遗传、生理、生化和病毒方面的深入研究。

植物细胞培养是指在离体条件下培养植物细胞的方法,将愈伤组织或其他易分散的组织置于液体培养基中,进行振荡培养,使组织分散成游离的悬浮细胞,通过继代培养使细胞增殖,获得大量的细胞群体。小规模悬浮培养在培养瓶中进行,大规模者可利用发酵罐生产。

植物细胞培养技术广泛用于农业、医药、食品、化妆品、香料等生产上,通过植物细胞培养可以获得的产品主要分为:初级代谢物(包括细胞本身为产物)和次级代谢物,大规模培养植物细胞主要用于生产次级代谢物。例如,紫草宁(shikonin)是典型的通过大规模培养植物细胞生产的产品。紫草宁既可作为染料又可入药,价格高达 4 500 美元/kg,但是紫草需要生长 2~3 年,其紫草宁浓度才达到干重的 1%~2%,远不能满足需要。而通过大规模培养紫草宁可在短时间内(3 周左右)大量生产紫草宁(干重的 14%左右)。由此可见,植物细胞培养技术应用于大规模生产有价值产品具有巨大潜力。

一、植物细胞培养的历史

Schleiden 和 Schwann 于 1838 年提出植物细胞理论,发现植物细胞具有全能性,为植物组织和植物细胞培养奠定了理论基础;Haberlandt 于 1902 年在营养溶液中首次培养了单细胞;Kogl 于 1934 年分离和确认了细胞生长素(吲哚乙酸 IAA);Thimann 于 1937 年认识到了这一激素在控制生长中的重要性;White 和 Gautheret 于 1939 年应用这一知识成功地建立了愈伤组织植物细胞继代培养;Van Overbeek 于 1944 年发现椰子汁对曼陀罗胚胎培养中细胞的生长的有利影响;Miller 和 Skoog 在椰子汁中发现了细胞分裂素(kinetin)。

Marashige 和 Skoog 于 1962 年开发了化学上满足植物良好生长的培养基。这一发现为植物细胞用于生产次级代谢物提供了前景,之后,研究者们做了很多培养技术改进工作,主要获得形态、生殖和植物细胞基因机制的探讨。进入 70 年代,人们把注意力主要集中于化学物质的生产。但随着工作的深入,工程上的问题就突现出来了,主要是反应器以及放大问题。

植物细胞培养是在植物组织培养技术基础上发展起来的。1902 年,Haberlandt 确定了植物