

# 动物细胞培养技术在流感疫苗研发中的应用进展

侯俊杰

北京生物制品研究所有限责任公司，北京 102600

DOI:10.61369/MRP.2025040002

**摘要：** 流感属于发病率较高的呼吸道急性传染病，接种流感疫苗是预防控制流感的有效方法。现阶段，鸡胚培养技术是生产流感疫苗的主要技术，但在实际应用的过程中存在诸多缺陷。伴随科技水平的持续提高，动物细胞基质在流感疫苗研发中得到广发应用，无血清全悬浮培养、贴壁培养等培养技术日趋完善，流感疫苗的研发水平显著提高。本文概述流感疫苗研发中动物细胞培养技术的应用进展，希望为相关人员提供参考信息。

**关键词：** 动物细胞培养技术；流感疫苗；研发

## The Application Progress of animal Cell culture Technology in the Research and Development of Influenza Vaccines

Hou Junjie

Beijing Institute of Biological Products Co., LTD. Beijing 102600

**Abstract：** Influenza is an acute respiratory infectious disease with a relatively high incidence rate. Vaccination against influenza is an effective method for the prevention and control of influenza. At present, chicken embryo culture technology is the main technology for producing influenza vaccines, but there are many deficiencies in the actual application process. With the continuous improvement of the technological level, animal cell matrix has been widely applied in the research and development of influenza vaccines. Culture techniques such as serum-free total suspension culture and adherent culture have become increasingly perfect, and the research and development level of influenza vaccines has significantly improved. This article summarizes the application progress of animal cell culture technology in the research and development of influenza vaccines, hoping to provide reference information for relevant personnel.

**Keywords：** animal cell culture technology; influenza vaccine; research and development

大量研究证实，接种流感疫苗能够有效预防机体感染流感病毒，显著降低流感的发病率及死亡率。鸡胚培养技术成熟稳定，在流感疫苗研发及生产中应用广泛，但存在培养周期长、鸡胚供应不稳定等问题，无法满足流感流行期间的疫苗需求，且流感病毒适应鸡胚传代的过程中可产生抗原性改变，导致疫苗的保护作用降低。相关研究证实，动物细胞培养技术研发生产的流感疫苗效力与鸡胚培养近似，且未观察到流感病毒产生抗原突变，生产过程中的安全性更高，培养过程中对原料的供应及质量控制要求较低，具有良好的应用价值。

### 一、动物细胞培养的基本概念

动物细胞培养主要指模分离动物细胞后置入与其体内生理环境近似的环境中，进而实现细胞在体外的存活及增殖。具体开展动物细胞培养的过程中，技术人员需在动物体内取出细胞，并放置于酸碱度、温度适中且无菌的环境中进行培养，并为动物细胞提供所需的营养物质，使其能够更快更好的生长繁殖，维持正常的功能与结构。在动物体中获取的细胞组织首次培养为原代培养，如原代培养细胞达到特定周期，则需转移至其他无菌容器内，此过程为传代培养<sup>[1]</sup>。完成传代的动物细胞如与原代细胞的结构、功能近似，则视为培养成功，此时获得的细胞为细胞株或

细胞系。

### 二、动物细胞培养技术内容研究进展

#### （一）动物细胞体外培养生物学特性分析

动物细胞整体强度较低，无细胞壁结构，对于环境中的剪切力较为敏感，适应体外环境的能力较弱。同时，动物细胞培养的过程中，细胞间相互作用、神经体液调节等功能确实，组织结构显著改变，导致动物细胞失去原有的动态平衡环境，使其分化能力显著下降，甚至可能进展为恶性细胞。为此，技术人员在动物细胞体外培养的过程中需严格监测细胞的状态及倍增情况，观察

是否存在微生物感染,确保生长条件与环境的适宜<sup>[2]</sup>。

## （二）动物细胞培养环境分析

相关研究认为,动物细胞培养过程中所需的环境如下。①无病毒及无菌环境。动物细胞培养是否成功与环境密切相关,在实施培养的过程中需加强观察,如发现代谢物需及早清除,并确保培养过程中使用的各类物品无毒无菌,确保动物细胞的生存环境负荷要求。②空气环境。动物细胞所需的空气环境包括洁净的空气及氧气,也需二氧化碳促进细胞的增殖,调节 PH 值。③温度。动物细胞培养的过程中如温度过高可影响正常代谢,如温度过低则可影响细胞的生长,甚至导致细胞大量死亡。④培养基。细胞的生长过程中需要培养基的支持,目前常用的培养基为合成培养基及自然培养基,天然培养基为动物体内分离提取后获得,多为淋巴结、血清、血浆。合成培养基内含维生素、氨基酸、糖、无机盐等细胞生长所需的物质,必要时可加入一定量的血清<sup>[3]</sup>。

## （三）动物细胞培养技术研究进展

### 1. 悬浮培养技术

悬浮培养技术适用于肿瘤细胞、悬浮适应细胞,此类细胞具有非贴壁依赖性的特点,在进行培养的过程中无需附着物,可在液体培养基中悬浮及增殖。悬浮培养技术融合生物发酵相关技术,可实现自动化操作,在进行动物细胞传代培养的过程中仅需依据特定的比例稀释新鲜的培养基,可实现大规模动物细胞培养。动物细胞规模化悬浮培养的关键是培养工艺、生物反应器、培养基、驯化改造贴壁细胞。在进行动物细胞循环的过程中,为维持细胞稳定性,使细胞的活力处于 90% 以上,需适当调整培养基中血清的浓度。血清的主要作用是能够为动物细胞生长提供所需的各类营养物质,但存在不同批次质量差异较大、成分不清晰、潜在致病因子及微生物污染、下游纯化难度较大、成本偏高等问题。技术人员在进行动物细胞悬浮培养的过程中,多依据动物细胞的营养需求,选用无血清的个性化人工合成培养基。悬浮培养技术的关键设备为生物反应器,常用的生物反应器包括一次性、中空纤维式、搅拌式、气升式、中空纤维式、固定床、堆积床、流化床,培养工艺包括灌流培养、连续培养、半连续培养、流加培养、分批培养等,技术人员需依据细胞的特性、培养产物性质合理选择<sup>[4]</sup>。

### 2. 贴壁培养

贴壁培养可应用于具有贴壁依赖性细胞的培养中,此类细胞在体外培养的过程中需要贴敷在塑料、玻璃等不具有活性物质的材料表面生长繁殖,伴随细胞数量的增多,其生长的空间逐渐缩小,营养环境不佳,极易诱发接触抑制的问题。在进行动物细胞贴壁培养的过程中,可通过细胞工厂、转瓶等方式增加培养总量,但二维空间的培养模式存在培养表面积/体积较低的问题,无法精准控制培养参数,为此可采用微载体同步完成悬浮培养与贴壁培养,进而提高单位体积中细胞培养的密度<sup>[5]</sup>。目前采用的微载体携带电荷,带电机制与细胞膜作用后能够黏附在微载体的表面,使动物细胞能够在搅拌槽内部保持悬浮的状态,也可在其他类型的支撑系统中生长繁殖,进而显著增加培养面积,保证细胞

培养的条件统一,最终实现自动化可控管理贴壁细胞,进而保证培养达到预期效果。

## 三、动物细胞培养技术在流感疫苗研发中的应用进展

### （一）MDCK 细胞悬浮培养技术

#### 1. MDCK 细胞

MDCK 细胞即犬肾细胞,属于上皮样贴壁培养的传代细胞。上世纪 50 年代,美国研究人员在健康犬的肾脏中获取此类细胞,经原代培养后细胞呈现出纤维样的特点,通过传代培养发现大部分细胞为上皮样。研究恩怨对 MDCK 细胞的免疫学、生长、细胞遗传学特性进行分析,结果显示其主要特点是形态规则,体积加大,扁平状,多边形或梭形,细胞核为扁圆形,培养过程中能够发现蛋白紧密连接后形成的单细胞层,并具有接触抑制的特点。目前,MDCK 细胞广泛应用于新病毒、犬细小病毒、禽流感病毒等多种类型病毒增殖及纯化中,对流感病毒感染表现出迅速增殖及高效感染的特点,WHO 推荐其作为首批替代传统鸡胚的流感疫苗研发生产传代细胞。

#### 2. MDCK 细胞培养技术的研究进展

传统的 MDCK 细胞培养技术存在高度分化、易感染性偏低、稳定性不足、生长速度缓慢等问题,且培养的过程中需要粘附于培养基表面,受培养基表面积限制的影响,无法完成大规模生产。同时,MDCK 细胞贴壁培养的过程中需要加入适量动物血清,以满足细胞贴壁生长增殖过程中对于营养成分及生物因子的需求。动物血清生物安全风险较高,极易在动物细胞中混入病原体及微生物,并可导致生长成本增加。悬浮培养是 MDCK 细胞的全新培养技术,其主要优势为无需贴壁及消化,不受培养基表面积及生长表面基质的影响,可降低培养成本,扩大培养规模,高效完成流感疫苗的大规模生产,并可保证产品的质量及生物安全。在进行 MDCK 悬浮培养的过程中,技术人员合理利用细胞生物学技术,降低 MDCK 细胞生长过程中对于基质的依赖性,使其能够在悬浮条件下快速生长繁殖,避免细胞之间接触及机械损伤,显著提高细胞的存活率,提升细胞的生命周期及生活活性。在进行 MDCK 细胞悬浮培养的过程中,通过优化调整培养基组成可为 MDCK 细胞提供所需的生长因子、营养物质,保证生长环境适宜,使 MDCK 细胞能够正常代谢及生长。技术人员在进行悬浮筛选及驯化的过程中,技术人员需详细评估 MDCK 细胞株的整体稳定性、表达产物、遗传特性是否一致,通过精细化的验证及筛选将最优质的细胞株应用于流感疫苗的研发生产中。目前针对 MDCK 细胞的悬浮驯化方法如下,①在 MDCK 细胞驯化为悬浮细胞前,需优先在其能够使用的培养基中完成培养,这一过程可通过直接或间接的方法完成。直接驯化 MDCK 细胞的过程中,需逐渐降低培养基中血清含量,使其能够适应无血清条件的培养。间接驯化 MDCK 细胞的过程中,需引入小分子化合物及生物因子,使细胞能够及时适应无血清的培养条件。②基因改造。相关研究表明,人体 Siat7e 全长基因表达与细胞贴壁依赖性相关,利用 SiRNA 技术阻断该基因的表达能够改进其贴壁性能,进而满足悬

浮培养的需求。研究人员利用基因工程的技术方案,建立能够表达 Siat7e 的 MDCK 细胞系,进而实现悬浮培养的要求<sup>[6]</sup>。

### 3.MDCK 细胞培养技术在流感疫苗研发中应用的研究进展

临床研究表明,MDCK 细胞中含有  $\alpha 2$ 、6 及  $\alpha 2$ 、3 连接唾液酸受体,能够有效支持禽流感病毒、人流感病毒的感染及增殖,已广泛应用于分流流感病毒及疫苗研发生产中。现阶段,利用 MDCK 细胞培养技术研发的流感疫苗已获得多个机构的批准,其中瑞士 Novartis 公司中 Celtura 疫苗属于 H1N1 大流行流感疫苗,Optaflu 疫苗属于包含 2 个 A 型与 1 个 B 型株的三价流感疫苗。部分研究人员利用反向遗传技术,在 MDCK 悬浮细胞中接种重组病毒,结果显示实际病毒产量较贴壁 MDCK 细胞更高,而产生这一结果的主要原因是悬浮 MDCK 细胞能够为重组病毒提供适宜的环境。另据研究表明,贴壁 MDCK 细胞、悬浮 MDCK 细胞的抗原特性、氨基酸替换模式存在较大的差异,其原因是不同的培养条件两种细胞系表面蛋白糖基化、蛋白表达存在显著差异。悬浮培养能够有效解决贴壁细胞培养模式对于表面积的限制,更容易实现规模化生产。悬浮 MDCK 细胞培养多的过程中,需优先完成驯化,常用的驯化方法包括无血清驯化、贴壁细胞悬浮循环、高密度生物反应器循环,但驯化的过程中耗时较长。最新研究发现,悬浮 MDCK 细胞中部分细胞粘附相关蛋白表达水平低于贴壁 MDCK 细胞,可通过基因工程修饰靶点的模式构建相对稳定的 MDCK 悬浮细胞系统。临床研究发现,部分流感病毒在 MDCK 细胞中具有较低的复制率,为解决此类问题,可通过反向遗传学、经典重组等方式建立稳定高产的疫苗株,并可通过细胞修饰实现产量的提高。MDCK-SIAT1 细胞通过  $\alpha 2$ 、6 唾液酸转移后形成的 cDNA 稳定转染获得。国外研究机构建立 MDCK-London 细胞系,其主要特点是生长速率较快,对于很多种流感病毒株均有较高的敏感度。部分研究人员建立 TGM2 过表达与取出的 MDCK 细胞系,结果显示取出 TGM2 基因能够促进病毒核蛋白基因表达上调,提升病毒滴度。

### (二) REC.C6 细胞悬浮培养技术

REC.C6 细胞系主要特点是对人 5 型腺病毒 E1 基因,使人胚胎视网膜上皮细胞系永生代,在缺少微载体及血清的状态下,可确保动物细胞能够在体积较大的生物反应器中悬浮生长至比较高

的密度。REC.C6 细胞中包含  $\alpha 2$ 、6 及  $\alpha 2$ 、3 连接唾液酸受体,对于人流感病毒株及禽流感病毒株均有较高的敏感性。另据研究表面,分离获得的人流感病毒及无法在鸡胚复制增殖的分离株,利用 REC.C6 细胞系进行扩增不会产生适应性突变的问题,可保证选用的临床分离株抗原的匹配度,据此认为 REC.C6 细胞能够作为流感疫苗毒种及大规模生长过程中适宜的底物。最新研究中,研究人员开发出以 REC.C6 细胞为基础培养的人用 H7N1 流感疫苗,经临床研究证实其安全性及耐受性良好,但加入氧化铝佐剂后能够诱导较低水平的免疫应答作用,其有效性无法满足相关机构的要求。

### (三) Vero 细胞微载体悬浮培养技术

Vero 细胞系是非洲健康成年绿猴肾脏中费力培养的上皮细胞,可应用于狂犬病疫苗、脊髓灰质炎疫苗研发生产中,WHO 推荐将 Vero 细胞系应用于流感疫苗的研发生产中。Vero 细胞系的主要优势是遗传性状稳定、生长增殖迅速、安全性良好等,美国相关企业利用 Vero 细胞培养研发的 H5N1 单价流感疫苗已经获得权威机构批准。相关研究证实,Vero 细胞具有贴壁依赖性的特点,早期经过转瓶培养的方案实施规模化生产,后期通过技术更新采用贴壁培养、悬浮培养相结合的微载体技术可实现大规模高密度培养。目前,生物反应器低血清微载体悬浮培养技术成为主流技术方案,培养过程中血清的含量明显减少,血清替代物等安全性较高的物质在培养中得到应用,并取得良好的应用效果。Vero 细胞具有多病毒易感的特性,接种后能够获取较多的扩增病毒,并可增加病毒颗粒数量,进而获得效果良好的疫苗。

## 四、结语

目前,动物细胞培养技术在流感疫苗研发生产中的优势日益突显,但相关技术尚未成熟完善,各类技术方案在实际应用的过程中均存在一定缺陷,优化及升级的空间较大。为此,技术人员需重点进行细胞培养环境的优化,通过有效的技术方案改进细胞特性,逐渐扩大生产规模,提升疫苗的质量与产量,并在实践中不断总结经验,以提升疫苗的安全性及有效率。

## 参考文献

- [1] 陶源,胡又佳,朱宝泉.基于哺乳动物细胞培养的流感疫苗生产[J].世界临床药物,2011,32(9):539-542.
- [2] FDA批准经动物细胞培养技术生产的第一季节性流感疫苗 Flucelvax[J].世界临床药物,2012,33(12):767.
- [3] 王石磊,陈则.基于 MDCK 细胞培养的流感疫苗研究进展[J].国际生物制品学杂志,2012,35(6):298-301.
- [4] 乔春晓,何召庆.流感疫苗生产用 MDCK 细胞悬浮培养技术研究进展[J].兽医导刊,2015(15):47-48.
- [5] 阿丽塔,姜柯羽,王敏,等.国外甲型 H1N1 流感疫苗研发及利用分析[J].医学与社会,2011,24(11):60-64.
- [6] 邵铭,袁力勇,刘书珍,等.流感疫苗血凝素含量测定替代方法在甲型 H1N1 流感疫苗研发中的应用[J].药物分析杂志,2012,32(2):353-355.