

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.10.01

# MDCK 细胞悬浮驯化及对 H9 亚型 禽流感病毒敏感性的研究

习 硕, 赵 蕾, 史爱华, 章振华, 李 林, 沈 佳, 崔丽娜, 姜北宇, 张建伟\*

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

[收稿日期] 2019-07-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 10-0001-06 [中图分类号] Q813.11

**[摘 要]** 为获得对 H9 亚型禽流感病毒敏感的纯悬浮 MDCK 细胞株, 通过逐渐降低血清的方法对贴壁依赖的 MDCK 细胞进行了无血清纯悬浮驯化, 最终获得了一株对 H9 亚型禽流感病毒敏感的纯悬浮细胞株 MDCK-sus。通过测定表明, 该细胞株能够迅速增殖, 倍增时间为 24 h, 使用 H9 亚型禽流感病毒 BX13 株感染该细胞, 培养 72 h, 培养液的病毒 HA 价可达到 1:512, 每 0.1 mL 病毒含量达到  $10^{8.5}$  EID<sub>50</sub>, 为利用生物反应器大规模悬浮培养制备 H9 亚型禽流感病毒抗原奠定了基础。

**[关键词]** MDCK 悬浮细胞; 禽流感病毒; 敏感性

## Conversion of MDCK Cell Line to Suspension Culture and Its Sensitivity Study to H9 Subtype Avian Influenza Virus

XI Shuo, ZHAO Lei, SHI Ai-hua, ZHANG Zhen-hua, LI Lin, SHEN Jia,

CUI Li-na, JIANG Bei-yu, ZHANG Jian-wei\*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Corresponding author: ZHANG Jian-wei, E-mail: jweizhang@sina.com

**Abstract:** In order to obtain all suspension MDCK cell line sensitive to H9 subtype avian influenza virus, the adherent MDCK cells were domesticated in serum-free suspension by gradually decreasing serum levels and a pure suspension cell line MDCK-sus susceptible to H9 subtype avian influenza virus was finally obtained. The results indicate that the cell line can multiply rapidly with a doubling time of 24 hours. After 72 hours of incubation with H9 subtype avian influenza virus BX13 strain, the virus HA of the culture medium can reach 1:512, and the viral content can reach  $10^{8.5}$  EID<sub>50</sub> every 0.1 mL, which laid a foundation for the production of H9 subtype avian influenza virus antigen by large-scale suspension culture in bioreactor.

**Key words:** MDCK suspension cell; avian influenza virus; sensitivity

基金项目: 北京市农林科学院畜牧兽医研究所公益院所基金(XMS201908)

作者简介: 习 硕, 硕士研究生, 从事兽用生物制品研究。

通讯作者: 张建伟。E-mail: jweizhang@sina.com

禽流感 (Avian influenza, AI) 是由禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 引起的禽流行性感。自 1878 年首先在意大利发现以来,全世界范围内都有禽流感毒株引起的流感的流行,不仅给养禽业造成巨大的经济损失,还给人类的公共卫生带来严重威胁<sup>[1]</sup>。接种由流行毒株制备的疫苗,是预防禽流感最有效的手段。目前,国内的禽流感病毒疫苗抗原主要采用鸡胚增殖的方法制备,然而使用鸡胚疫苗存在以下缺点:首先,病毒在鸡胚中的连续传代易造成 HA 基因发生变异<sup>[2-3]</sup>,从而导致病毒的免疫原性和病毒毒力的变化;其次,收获的尿囊液中存在的鸡胚杂质可造成被免疫鸡的过敏反应;第三,大规模生产时鸡胚来源不同,致使抗原批间一致性差;最后,收获毒液后残留的带毒鸡胚,处理不当也会造成潜在生物安全危害,为此急需寻求一种新的模式制备禽流感疫苗抗原<sup>[4]</sup>。

利用传代细胞制备疫苗抗原为解决以上问题提供了思路,该方法制备的抗原具有稳定、重复性高、变态反应少等优点,在流感疫苗抗原制备领域,很多学者对 MDCK 细胞制备禽流感疫苗抗原进行了研究,MDCK 细胞是由 Madin 和 Darby 采用健康雄性英国小猎犬 (cocker spaniel) 的肾脏建立的细胞系<sup>[5]</sup>,由于该细胞系对各种禽流感病毒均较敏感,已广泛应用于禽流感病毒的检测及培养领域,同时认为 MDCK 细胞最适合用于增殖禽流感病毒<sup>[6-7]</sup>。但多数研究以贴壁培养为主,本研究拟对 MDCK 贴壁细胞进行悬浮驯化,以简化将来用于大规模生物反应器培养时的培养工艺。

采用 MDCK 纯悬浮细胞连续传代培养增殖禽流感病毒制备禽流感疫苗抗原与采用鸡胚制备疫苗抗原相比,不仅疫苗抗原的纯度更高,而且还可以降低处理鸡胚废弃物的成本,减少生物安全危害,不仅有重要的实用价值还有社会意义。本试验进行了 MDCK 贴壁细胞的悬浮驯化研究,以之作为基质制备禽流感病毒疫苗抗原,为采用更安全、高效、质量可控的细胞培养方式生产禽流感疫苗抗原工艺奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和病毒株 贴壁 MDCK 细胞株购自中国兽医药品监察所,传代至 F71;H9 亚型禽流感病毒 BX13 株由北京市农林科学院畜牧兽医研究所免疫预防研究室 2013 年从北京某鸡场分离、纯化及鉴定,毒株代号为 A/Chicken/Beijing/BX/13 (H9N2) 株 (BX13), HA 效价为  $2^9$ , 毒价为  $10^{7.7}$  EID<sub>50</sub>/0.1 mL。

1.1.2 鸡胚 10 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 DMEM 培养液购自 HyClone 公司;无血清培养基 MS01 购自苏州市沃美生物技术有限公司;胎牛血清 (FBS) 购自 PAN 公司;台盼蓝染液购自 Sigma 公司;TPCK - Trypsin 购自 Gibco 公司;1% 鸡红血球由本研究室采集成年公鸡血液制备;T25、T175、T225 细胞培养瓶购自 Corning 公司;250 mL 三角瓶购自 Corning 公司。

1.1.4 仪器设备 细胞摇床购自上海一恒科技有限公司;倒置显微镜购自上海光学仪器厂;血球计数板购自上海市求精生化试剂仪器有限公司。

## 2 方法

2.1 MDCK 贴壁细胞无血清培养基适应驯化 MDCK 贴壁细胞用含 10% FBS 高糖 DMEM 培养基 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 静置培养至细胞状态良好。待细胞生长至 90%, 弃去培养液,加入含有 5% FBS 的培养液,培养细胞直至细胞长满;逐渐减少培养基中 FBS 含量,直至细胞完全适应含 1% FBS 的 DMEM,用无血清培养基 MS01 替代含有血清的 DMEM。

2.2 MDCK 贴壁细胞的悬浮驯化 将适应了无血清培养基的 MDCK 细胞消化转移至 250 mL 三角瓶,细胞初始接种密度为  $5 \times 10^5$  /mL,培养体积为 50 mL,将三角瓶置于摇床上,转速为 100 r/min, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养。每 48 h 取出驯化的细胞,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,取沉淀细胞用新鲜培养基重悬,继续培养直至细胞比生长速率稳定,进行分瓶传代,使细胞进一步适应,直至 MDCK 细胞完全失去贴壁的能力,以悬浮方式稳定增殖,悬浮细

胞命名为 MDCK - sus。

2.3 细胞计数及形态观察 以台盼蓝染色法,用血球计数板计活、死细胞数,绘制细胞生长曲线。

2.4 禽流感病毒在 MDCK 悬浮细胞中的增殖 取生长良好的 MDCK - sus 细胞分别稀释成密度为  $5 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$ ,置于三角瓶中,每瓶的培养体积为 50 mL,以感染复数(MOI) = 0.01 接种 H9 亚型禽流感病毒 BX13 株,同时加入 TPCK - Trypsin 使其终浓度为  $3.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,接种完毕后将三角培养瓶放置在细胞摇床上,转速为 100 r/min,  $35^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  进行振荡培养;每 24 h 取样测定培养液上清的 HA 价。

2.5 病毒 HA 效价的测定 测定方法为在 96 孔血凝板中每孔加入 50  $\mu\text{L}$  生理盐水,第 1 孔加入 50  $\mu\text{L}$  待检细胞培养上清,充分混匀后取 50  $\mu\text{L}$  加入第 2 孔,依次进行倍比稀释至第 10 孔,并设阳性、阴性和空白对照孔,稀释完毕后每孔中加入 50  $\mu\text{L}$  1% 鸡红细胞悬液,振荡混合,室温静置 20 ~ 30 min,观察记录结果,测定结果取以  $\log_2$  为底的倍数表示。

2.6 病毒  $\text{EID}_{50}$  的测定 接毒后 72 h,收获培养的 4 个细胞密度制备的病毒液,放入  $-20^\circ\text{C}$  冰箱冻融 2 次,取  $2.0 \times 10^6/\text{mL}$  细胞密度制备的病毒液用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释,取  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  4 个稀释度,各尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚,每胚 0.1 mL,置于  $37^\circ\text{C}$  孵育 120 h,每 24 h 照蛋一次,弃去 24 h 内死亡鸡胚,逐个收获 48 ~ 120 h 鸡胚液,分别测定 HA 效价,HA 效价不低于 1:16 判为感染,按照 Reed - Muench 法计算  $\text{EID}_{50}$ 。

### 3 结果与分析

3.1 MDCK 贴壁细胞无血清培养基适应驯化 复苏 MDCK 贴壁细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养,逐渐降低血清含量至 1%,低血清驯化初期,MDCK 细胞生长环境从含 10% FBS 的 DMEM 过渡到 5% FBS 的 DMEM 时,细胞未表现明显的不适应,细胞生长速度未放缓,细胞形态未出现肉眼可见的变化;当驯化适应至 1% FBS 条件时,MDCK 细胞生长速度比 10% FBS 组稍慢,细胞伸展拉伸,经过一段时间的驯化,细胞已适应 1% 血清生长环境,生长速度逐渐恢复,生长状态良好,但细胞形态出现变圆趋势,贴壁较松散,少量细胞甚至悬浮于培养基呈现悬浮生长状态。用无血清培养基 MS01 替换含 1% 血清的 DMEM 培养基。

3.2 MDCK 贴壁细胞的悬浮驯化 细胞无血清全悬浮驯化初期,细胞生长速率较低,经过一段时间的传代,细胞适应。以  $5 \times 10^5/\text{mL}$  的密度转移细胞至 250 mL 三角瓶,培养体积为 50 mL,转速为 100 r/min,每 24 h 观察细胞生长状态,在 MS01 无血清培养基悬浮驯化后期,MDCK 细胞边缘清晰,表现完整的单细胞悬浮生长状态,细胞大小较均一,结团现象较少,经过 48 h 的培养,细胞密度达到  $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。倍增时间为 24 h,细胞活率达到 99% 以上,说明 MDCK 细胞已经完全适应了无血清全悬浮生长环境。

3.3 细胞计数及形态观察 MDCK 贴壁细胞经培养驯化,细胞状态如图 1,MDCK 悬浮细胞生长曲线及对应细胞密度如图 2 和表 1。



A: 正常 MDCK 贴壁细胞;B: 适应低血清生长环境的 MDCK 细胞;C: 无血清驯化后 MDCK 细胞悬浮培养形态  
A: Normal MDCK adherent cells;B: Adapted to low serum environment MDCK cells;C: All suspension MDCK cells

图 1 MDCK 细胞悬浮培养

Fig 1 Suspension culture of MDCK cells

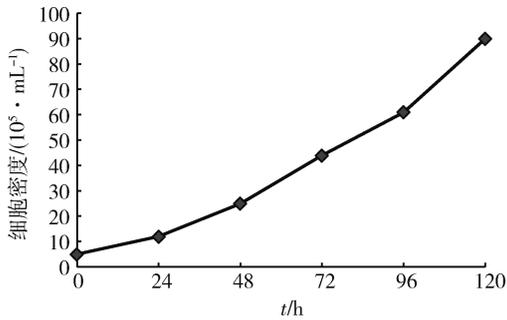


图 2 MDCK 悬浮细胞生长曲线

Fig 2 The growth curve of MDCK suspension cell

表 1 MDCK 悬浮细胞生长曲线对应细胞密度

Tab 1 MDCK suspension cell growth curve corresponds to cell density

培养时间/h	0	24	48	72	96	120
细胞密度/(10 <sup>5</sup> · mL <sup>-1</sup> )	5	12	25	44	61	90

3.4 禽流感病毒在 MDCK 悬浮细胞中的增殖 以不同密度的 MDCK 悬浮细胞进行 H9 亚型禽流感病毒 BX13 株的培养,添加 3.5 μg/mL 的 TPCK - Trypsin,感染复数(MOI)为 0.01,每 24 h 取样观察细胞病变,结果显示接毒后 24 h 和 48 h 的细胞活率分别为 98% 和 94%,72 h 的细胞病变率为 100%。

3.5 病毒 HA 效价的测定 每 24 h 取样测定培养液 HA 滴度,结果见表 2。

3.6 病毒 EID<sub>50</sub>的测定 将 H9 亚型禽流感病毒 BX13 株以适宜的 MOI 和 TPCK 胰蛋白酶浓度接种密度为 2.0 × 10<sup>6</sup>/mL 的细胞,收获培养 72 h 接种制备的病毒液,测定培养液病毒含量为 10<sup>8.5</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL(表 3)。

#### 4 讨论与结论

我国兽医生物制品行业多采用鸡胚接种收获尿囊液的方式制备禽流感疫苗抗原,但鸡胚接种制备疫苗抗原存在诸如鸡胚来源不固定,有外源病毒污染的可能等因素。以传代动物细胞生产病毒

表 2 MDCK 悬浮细胞密度对 H9 亚型

禽流感病毒抗原 HA 滴度的影响

Tab 2 Effect of MDCK suspension cells density on HA titer of H9 subtype AIV antigen

毒株	细胞密度/(10 <sup>5</sup> · mL <sup>-1</sup> )	HA/log2				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
H9N2 BX13	5	2	3	4	5	5
	10	3	4	5	7	7
	15	5	5	7	8	8
	20	6	6	9	9	9

表 3 MDCK 悬浮细胞制备的 H9 亚型禽流感病毒抗原 EID<sub>50</sub>测定结果Tab 3 Results of the EID<sub>50</sub> titer of H9 subtype AIV antigen prepared by MDCK suspension cells

病毒稀释度	接种鸡胚数	HA 阳性数	HA 阴性数	EID <sub>50</sub> /0.1 mL
10 <sup>-6</sup>	5	5	0	
10 <sup>-7</sup>	5	5	0	
10 <sup>-8</sup>	5	4	1	8.5
10 <sup>-9</sup>	5	1	4	

疫苗抗原,可在短时间内增殖大量病毒,既能在短期内提供足够数量的疫苗抗原,又能保证产品的效果和安全性,同时可以降低病毒在鸡胚中连续传代可能导致病毒变异的风险。

有研究表明,禽流感病毒在 MDCK 细胞中能够增殖稳定,适应性较强<sup>[8-9]</sup>,因此以 MDCK 细胞作为载体制备禽流感疫苗抗原越来越受到重视,其生物安全性也已经得到了世界各国的广泛认可。早期很多学者<sup>[10-11]</sup>也对微载体培养禽流感病毒的方式进行了研究探索,采用微载体作为细胞附着基质增殖 MDCK 细胞生产禽流感疫苗抗原,步骤繁琐、污染风险大、生产成本低,此外,由于微载体培养存在微载体处理,放大困难等诸多问题因此没有能够在禽用疫苗领域推广。

全悬浮 MDCK 细胞的大规模培养,可以根据需求有效扩大细胞密度,解决疫苗产量低的问题,同时降低生产成本。本实验中,采用逐渐降低血清含量直至无血清培养的方法,最终获得了能够在无血清培养基中培养的 MDCK 悬浮细胞株,此株细胞可以稳定增殖传代,本研究掌握了一种从贴壁细胞到悬浮细胞驯化的方法,其他贴壁细胞的驯化也可借鉴此种方法。

文献报道采用类似方法悬浮驯化细胞,细胞倍增时间约 48 h<sup>[12]</sup>。本实验所获得的悬浮细胞倍增时间为 24 h,在营养充足的条件下适应高密度生长,有利于缩短细胞的培养时间,对规模化生产具有重要意义,并保持较高的活率,满足增殖禽流感病毒的要求。

本实验获得的 MDCK 悬浮细胞株对 H9N2 BX13 株禽流感病毒敏感,将该病毒株以适量的 MOI 和适合的 TPCK 胰蛋白酶浓度接种细胞密度为  $1.0 \times 10^6/\text{mL} \sim 2.0 \times 10^6/\text{mL}$  的细胞液时,接种后 72 h 培养液的 HA 毒价可以达到  $7\log_2 \sim 9\log_2$ ,每 0.1 mL 的 EID<sub>50</sub> 达到  $10^{8.5}$ ,证明该细胞株适合于禽流感病毒抗原的制备,可以作为制备禽流感病毒抗原的候选细胞株,该细胞株对禽流感病毒的增殖能力与 MDCK 贴壁细胞相当。陈宏等对重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 在 MDCK 细胞上增殖条件的研究中报道<sup>[13]</sup>,贴壁细胞增殖病毒操作过程繁琐,同一批次不同细胞瓶中病毒滴度存在差异,时间成本大。采用 MDCK 悬浮细胞繁殖病毒产量远高于鸡胚培养和贴壁细胞培养,并且同一批次病毒质量均一稳定,为后续生物反应器逐级放大培养制备禽流感疫苗奠定了基础。

本研究通过逐步降低血清的方法使 MDCK 贴壁细胞适应无血清培养,获得了能够快速增殖并对 H9 亚型禽流感病毒敏感的 MDCK 纯悬浮细胞株,该细胞株为将来规模化使用生物反应器生产制备禽流感疫苗抗原奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 李建丽,刘国英,张金花. H9 亚型禽流感的流行特点及其疫苗市场分析[J]. 兽医导刊, 2010, 25(3): 69-71.  
Li J L, Liu G Y, Zhang J H. Epidemiological characteristics and vaccine market analysis of H9 subtype avian influenza [J]. Veterinary Orientation, 2010, 25(3): 69-71.
- [2] 杜燕, 姜本红, 武专昌, 等. 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因的变异[J]. 病毒学报, 2012, 28(1): 1-6.  
Du Y, Lou B H, Wu Z C, et al. Influence of antibody-mediated immune pressure on neuraminidase gene mutation of avian influenza virus H9N2 [J]. Chinese Journal of Virology, 2012, 28(1): 1-6.
- [3] 姜本红, 朱秀同, 孙贝贝, 等. 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的变异[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 955-959.  
Lou B H, Zhu X T, Sun B B, et al. Mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under selective pressure of antibody [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(7): 955-959.
- [4] 吴培培, 唐应华, 褚轩, 等. 适应 H9 亚型禽流感病毒增殖的 MDCK 悬浮细胞株的驯化及其生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1377-1383.  
Wu P P, Tang Y H, Chu X, et al. Domestication of MDCK suspension cell lines for the H9 subtype of avian influenza virus proliferation and its biological characteristics evaluation [J]. Jiangsu J of Agr Sci, 2016, 32(6): 1377-1383.
- [5] Madin S H, Darby N B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine Society for Experimental Biology & Medicine, 1958, 98(3): 574.
- [6] Belshe R B, Mendelman P M. Safety and efficacy of live attenuated, cold-adapted, influenza vaccine-trivalent [J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2003, 23: 745-767.
- [7] Liu J, Shi X, Schwartz R, et al. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine [J]. Vaccine, 2009, 27(46): 6460-6463.
- [8] Merten O W, Hannoun C, Manuguerra J C, et al. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation [J]. Adv Exp Med Biol, 1996, 397: 141-51.
- [9] Cattoli G, Brasola V, Capua I. Plaque morphology of Italian H7N1 LPAI isolates in MDCK cells and in primary cells of different

- avian species[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(3):1161-1163.
- [10] 李春艳,肖晶,李曦,等. 微载体规模化培养 MDCK 细胞增殖 H9N2 亚型禽流感病毒的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(12): 1149-1153.
- Li C Y, Xiao J, Li X, *et al.* Research on multiplication of the H9N2 subtype avian influenza virus in large-scale microcarrier-based MDCK cell culture system[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2009, 25(12): 1149-1153.
- [11] 龚迪,易小萍,张元兴. MDCK 细胞微载体悬浮培养放大工艺研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(9): 55-60.
- Gong D, Yi X P, Zhang Y X. A study on scale-up process for microcarrier culture of MDCK cells using low serum medium[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(9): 55-60.
- [12] 张良艳,姚志东,邢丽,等. MDCK 细胞的悬浮驯化及初步应用[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(3): 382-384.
- Zhang L Y, Yao Z D, Xing L, *et al.* Conversion of MDCK cell line to suspension culture and its application for influenza virus production [J]. *Letters In Biotechnology*, 2013, 24(3): 382-384.
- [13] 陈宏,杨柳,宋海岩,等. 悬浮 MDCK 细胞的驯化与 H5 亚型禽流感病毒的培养[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(17): 3405-3414.
- Chen H, Yang L, Song H Y, *et al.* Research on multiplication of H5 subtype Re-7 recombinant avian influenza virus in MDCK cell culture system [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 51(17): 3405-3414.

(编辑:李文平)