

1 株悬浮培养的 Vero 细胞驯化及其生物学特性研究

付兰博¹⁾, 阮朝列²⁾, 陈昶旭¹⁾, 高羽¹⁾, 鲍晓琳¹⁾, 刘伯川¹⁾, 周健¹⁾, 李卫东¹⁾
(1) 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650118; 2) 云南大学生态与环境学院 & 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南昆明 650091)

[摘要] **目的** 将贴壁培养的 Vero 细胞驯化成悬浮培养细胞, 并对其生物学特性进行研究。**方法** 采用无血清培养和“摇床适应法”对细胞进行培养优化, 对其进行成瘤性、短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分析、透射电子显微镜形态, 以及对流感病毒敏感性检测。**结果** 成功建立悬浮细胞系 Vero-S, Vero-S 细胞生长期在 24 ~ 72 h, 平台期在 108 ~ 144 h 之间, 衰退期在 144 h 以后, 细胞 PDT 为 36 h, 细胞密度在 $14.01 \sim 14.88 \times 10^8$ 个/L 之间, 细胞平均圆度在 0.73 ~ 0.75 之间, 细胞直径在 12.12 ~ 14.44 μm 之间。Vero-S 细胞在裸鼠皮下形成肿瘤, 而悬浮培养前的 Vero 细胞不具有成瘤性; STR 显示为猴源细胞系; 电镜下细胞结构完整; Vero-S 细胞对流感病毒感染不敏感。**结论** 悬浮细胞系 Vero-S 细胞的生长经历与贴壁细胞类似的生长期、平台期、衰退期, 且细胞大小均一, 建立的悬浮培养基能够支持 Vero-S 细胞高密度生长。STR 结果表明悬浮 Vero 细胞具有完全的遗传稳定性, 透射电镜下与贴壁 Vero 细胞无明显区别。为细胞悬浮驯化培养技术提供参考价值, 并可用于细胞致肿瘤的机理研究。

[关键词] Vero 细胞; 细胞悬浮驯化技术; 成瘤性; 病毒敏感性

[中图分类号] S961.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2024)06 - 0007 - 08

Domestication and Biological Characteristics of a Vero Cell Line in Suspension Culture

FU Lanbo¹⁾, RUAN Chaolie²⁾, CHEN Changxu¹⁾, GAO Yu¹⁾, BAO Xiaolin¹⁾,
LIU Bochuan¹⁾, ZHOU Jian¹⁾, LI Weidong¹⁾

(1) *Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Kunming Yunnan 650118;*
2) *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China*)

[Abstract] **Objective** To domesticate adherently cultured Vero cells into suspension-cultured cells and investigate their biological characteristics. **Methods** Cell culture was optimized using serum-free media and the "shaker adaptation method." Additionally, tumorigenicity, short tandem repeat (STR) profiles, morphological characters under transmission electron microscope (TEM), and influenza virus sensitivity were analyzed in these cells. **Results** Suspension cell line Vero-S was successfully established. The growth period of Vero-S cells ranged from 24 to 72 hours, with a plateau phase between 108 and 144 hours, and a decline phase after 144 hours. The population doubling time (PDT) was 36 hours, and cell density ranged from 14.01 to 14.88×10^8 cells/L. Average cell roundness ranged from 0.73 to 0.75, and cell diameter ranged from 12.12 to 14.44 μm . Vero-S cells formed tumors subcutaneously in nude mice, while Vero cells before suspension culture did not exhibit tumorigenicity. STR

[收稿日期] 2024 - 02 - 09

[基金项目] 云南省重大科技专项基金资助项目(202302AA310002); 云南省基础研究专项基金资助项目(202301AU070048); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金资助项目(2021-I2M-1-043); 协和实验室建设专项-基于大人群队列探索呼吸共病共性机制和干预手段研究基金资助项目(2023-I2M-2-001)

[作者简介] 付兰博(1998~), 女, 辽宁鞍山人, 在读硕士研究生, 主要从事细胞培养、疫苗研发工作。

[通信作者] 周健, E-mail: zhoujian@imbcams.com.cn; 李卫东, E-mail: lwd@imbcams.com.cn

analysis indicated a primate origin of the cell line. Under electron microscopy, cell structure appeared intact. Vero-S cells showed insensitivity to influenza virus infection. **Conclusion** The established suspension cell line Vero-S exhibiting growth patterns similar to adherent cells, with uniform cell size and high-density growth supported by the established suspension culture medium. STR results demonstrated complete genetic stability of suspended Vero cells, with no apparent differences observed under transmission electron microscopy compared to adherent Vero cells. This study provides reference for suspension culture domestication techniques and can be applied in mechanistic studies of cell tumorigenicity.

[**Key words**] Vero cells; Cell suspension domestication technology; Tumorigenicity; Virus sensitivity

Vero 细胞, 即非洲绿猴肾脏细胞, 其通过自发永生化而形成连续的细胞系。Vero 细胞被监管机构(world health organization, WHO)认为是最为广泛接受的连续细胞系, 低传代(不超过170代)的Vero 细胞由于其安全性和对不同病毒的允许性而被广泛用于人类疫苗的生产^[1-3]。Vero 细胞易感染多种病毒, 自 1986 年 WHO 批准 Vero 细胞用于病毒疫苗生产以来, 已经用于不仅限于新型冠状病毒、狂犬病毒、脊髓灰质炎病毒、肠道病毒 71 病毒(EV-71)、流感(单价和多价)和其他疫苗的生产^[4-7]。Vero 细胞的生长依赖于细胞贴壁, 实验室采用的细胞贴壁培养技术获得的细胞往往数量有限不能满足大规模的生产需求。悬浮培养提供了更高的细胞密度和更容易的工艺放大, 因此人们也逐渐驯化了一些贴壁依赖性细胞使其进行悬浮培养。目前报道已经成功驯化的贴壁细胞有 MDCK(Madin-Darby canine kidney)^[8-9] 细胞、BHK-21(Baby Hamster Syrian Kidney)^[10-12] 细胞、CHO(Chinese hamster ovary)^[13-14] 细胞等。

国内外对于 Vero 细胞的悬浮培养也取得了一些初步的成果^[15], 主要是通过改变细胞培养基的成分和驯化细胞使其适应悬浮培养的环境, 但是无成瘤性的 Vero 细胞悬浮驯化仍然是一个国内外尚未解决的难题。因此, 本研究以贴壁培养的 Vero 细胞为主要研究对象, 旨在探索驯化 Vero 细胞进行悬浮培养的技术, 为最终研制出无成瘤性的 Vero-S 细胞悬浮培养奠定基础 and 积累经验, 同时本研究以驯化的悬浮细胞系接种流感病毒, 为流感疫苗的大规模制备提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 细胞及病毒

Vero 细胞 134 代来源于欧洲动物细胞收藏中心(European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC), 编号为 03129010, 由中国医学科学院

医学生物学研究所贴壁培养 2 次, 建立 136 代的原始 Vero 细胞库。本实验使用的细胞代次为 148 代。人二倍体 KMB17 细胞, 由中国医学科学院医学生物学研究所建立和保存。

流感病毒毒株 H3N2 A/HongKong4801/2014/NYM CX-263B(编号: 15/184E2)、H1N1A/Michigan/45/2015/NYM CX-276/42020(编号: 16/248E13)、B 型流感病毒 B-Y B/Phuket/3073/2013(编号: 14/312E3) 和 B 型流感病毒 B-V B/Brisbane/60/2008/NYM CBX-35/41950(编号: 15/300E13), 来源于英国 NIBSC, 由中国医学科学院医学生物学研究所传代和保藏。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12 培养基(贴壁培养用)购自苏州宜兴塞尔生物科技有限公司, 使用时添加 5% 新生牛血清(newborn bovine serum, NBS); Vero 细胞无血清悬浮培养基 VS-002 为实验室自行研制, 主要由鸡肝细胞悬浮培养基 NF-1(购自四川百诺吉生物公司), 并添加 2 mg/L 转铁蛋白、50 mg/L 牛血清白蛋白、3 mg/L 地塞米松配制而成; NBS 购自兰州民海生物工程有限公司。

细胞荧光计数仪(S3)购自上海睿钰生物科技有限公司; 二氧化碳恒温摇床购自瑞士阿道夫科耐; 125 mL 透气三角摇瓶购自美国康宁公司。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/C 无胸腺雌性裸鼠(4~6 周龄)购自中国医学科学院医学生物学研究所小动物试验部[许可证号: SCXK(滇)K2022-0002]; 实验动物伦理审查批准文号: DWSP202110005, 动物实验设施许可证编号: SYXK(滇)K2019-0003。

1.4 Vero 细胞悬浮驯化

贴壁培养的 Vero 培养形成致密单层后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 1000 r/min 离心 10 min 去除含血清培养基。用无血清悬浮培养基将细胞沉淀制成 15×10^8 个/L 单细胞悬液, 接种于 125 mL 摇瓶中, 30 mL/瓶。置于 CO₂ 恒温

恒湿摇床上进行悬浮驯化, 设置摇床转速 110 r/min、5% CO₂、37℃、湿度 60%。驯化期间每隔 48 h 通过 1000 r/min 离心 10 min 将 1/2 旧培养基去除, 更换相同体积新鲜培养基, 并取样进行细胞镜检、细胞密度检测、活率检测等。重复上述步骤, 直至检测到细胞开始增殖。细胞增殖后按 1:4 进行传代培养, 并进行细胞冻存, 命名为 Vero-S。

1.5 Vero 细胞生物学特征

细胞复苏后, 按 1:4 进行传代培养。取样进行形态学检查、活力检查、生长曲线测定。形态学检查采用显微镜观察法; 复苏后悬浮培养于 0、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144、156、168 h 取样检测细胞密度和活率, 绘制生长曲线, 计算倍增时间 PDT。(PDT=T/A, 其中, $A=\log_2(Y/X)$, Y 表示生长周期中最大密度 24 h 前的细胞密度, X 表示细胞初始接种密度, T 表示 Y 所处生长周期中的时间。

1.6 无菌检查

细菌、真菌和支原体检查采用培养法, 按照《中国药典》三部(2020 版)^[16]生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制规程和检定方法对 Vero-S 细胞进行污染检查。

1.7 STR 鉴定

采用 STR 鉴定对 Vero-S 细胞进行物种鉴定, 对照为贴壁培养的 Vero 细胞, 此步委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

1.8 透射电镜检查

取培养中的 Vero-S 细胞悬液各 0.015 L, 1500 r/min 离心 10 min 去除上清, 制成细胞沉淀后加入 2.5% 戊二醛固定液固定, 将样品切成 70~100 nm 范围内, 经过丙酮脱水、醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后进行装片、扫描。对照组为贴壁培养的 Vero 细胞。

1.9 成瘤性检查

将 Vero-S 细胞和贴壁培养的 Vero 细胞制成 5×10^{10} 个/L 的活细胞悬液, 颈部肩胛骨处皮下接种 4~5 周的 SPF 级胸腺缺陷型 BALB/C 雌性裸鼠, 200 μ L/只(相当于接种 10^7 个活细胞), 阴性对照组为 148 代贴壁培养的 Vero 细胞。每周观察及触摸所有动物在注射部位是否有结节形成, 观察 8 周, 记录观察结果。结节大小采用“长径 \times 短径”(mm \times mm)方式记录, 结节达 2 cm 以上时则应处死。按照“椭球形”计算结节体积, 体积 $V=\pi/6 \times L \times H \times W=0.52 \times L \times W^2$ (L 为长径, W

为短径)。

1.10 流感病毒敏感性

为了测试 Vero 悬浮驯化前后对流感病毒感染的敏感性, 以 MOI=0.01 分别接种 H3N2、H1N1、B-V、B-Y 4 种亚型流感病毒于 Vero-S 细胞和悬浮前贴壁培养的 Vero 细胞, 每种亚型接种 3 瓶, 并且添加 TPCK 胰蛋白酶至终浓度 1 g/L, 34.5℃ 培养 60 h, 收获液于 -80℃ 冻融 1 次, 检测血凝效价。

2 结果

2.1 Vero 细胞的悬浮驯化

驯化期间, 活细胞密度在前 40 d 内缓慢下降, 第 40 d 最低, 为 0.72×10^9 个/L; 活细胞密度在第 30 d 至 50 d 维持稳定; 第 50 d 缓慢上升, 说明此时细胞逐步适应悬浮培养环境, 并开始缓慢增殖, 见图 1。驯化第 40 d 细胞呈团状、结团较多、无细胞碎片; 第 60 d 细胞大多数呈单个、分散状态, 无细胞碎片、大小不均一, 但存在结团现象; 第 70 d 细胞呈单个、分散状态, 无细胞碎片, 大小不均一, 见图 2。

2.2 Vero-S 细胞生物学特征

Vero-S 细胞生长曲线均呈现典型的“S”型, 见图 3A。Vero-S 细胞延迟期在 0~24 h 之间、指数生长期在 24~72 h 之间、平台期在 108~144 h 之间、衰退期在 144 h 以后, 细胞 PDT 为 36 h。复苏后, 显微镜观察到 Vero-S 细胞呈单个、分散、大小均一的状态, 见图 3B。荧光计数仪检测到细胞密度在 $14.01 \sim 14.88 \times 10^8$ 个/L 之间, 细胞平均圆度在 0.73~0.75 之间, 细胞直径在 12.12~14.44 μ m 之间。

2.3 污染检查和 STR 鉴定结果

细菌及真菌检查为阴性(-); 支原体检查为阴性(-)。使用短串联重复序列(STR)对悬浮 Vero 细胞系的 8 个基因座进行分型, Vero-S 细胞 STR 位点基因分型结果见表 1、图 4。

2.4 透射电镜检查结果

从电镜图可以看出, Vero-S 细胞和贴壁培养的 Vero 细胞细胞膜、细胞核和细胞中的细胞器完整, 细胞状态良好。Vero-S 细胞和贴壁培养的 Vero 细胞之间未发现明显的结构差异, 见图 5。

2.5 成瘤性检查结果

Vero-S 细胞接种了 6 只裸鼠, 均出现肿瘤, 成瘤性为 100%, 并且体积在 $1.47 \text{ cm}^3 \sim 1.61 \text{ cm}^3$

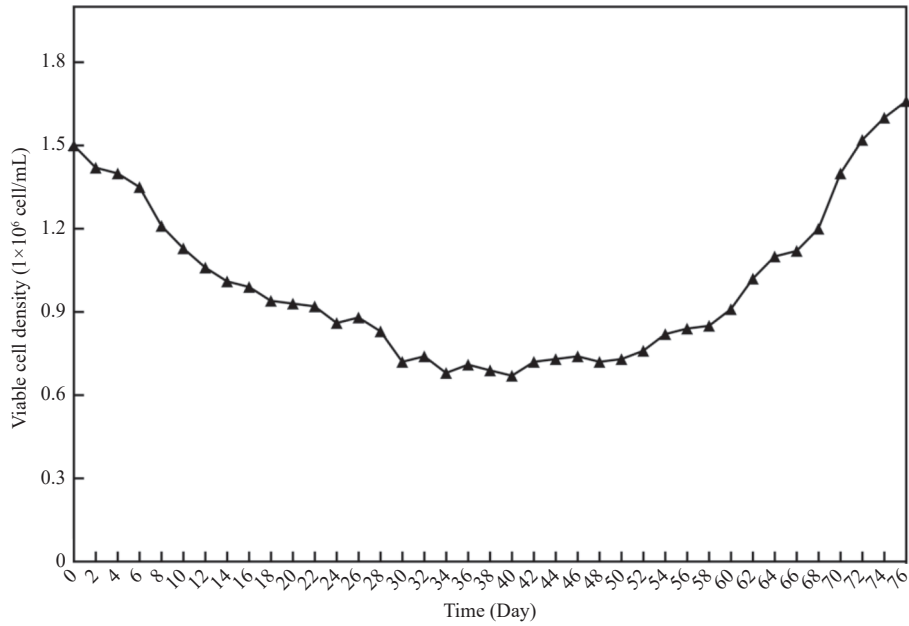


图 1 Vero 细胞悬浮驯化曲线(400 ×)

Fig. 1 Vero cells suspension adaptation curve (400×)

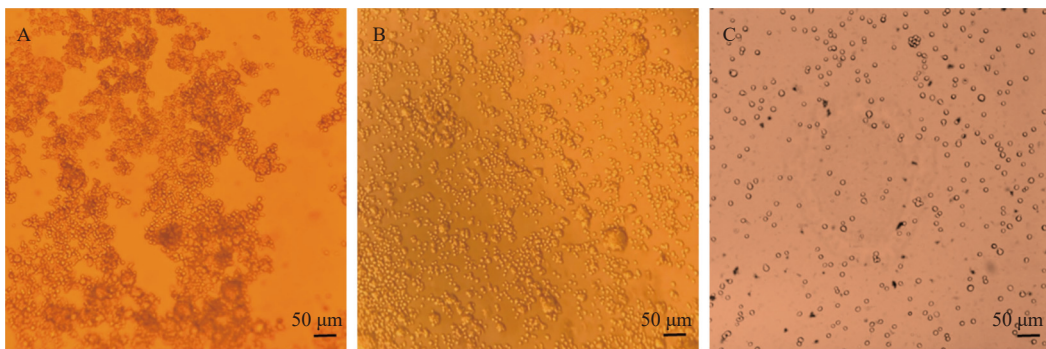


图 2 Vero 细胞驯化期间形态(400 ×)

Fig. 2 Morphology of Vero cells during adaptation period (400×)

A: Vero 细胞驯化 40 d 形态; B: Vero 细胞驯化 60 d 形态; C: Vero 细胞驯化 70 d 形态。

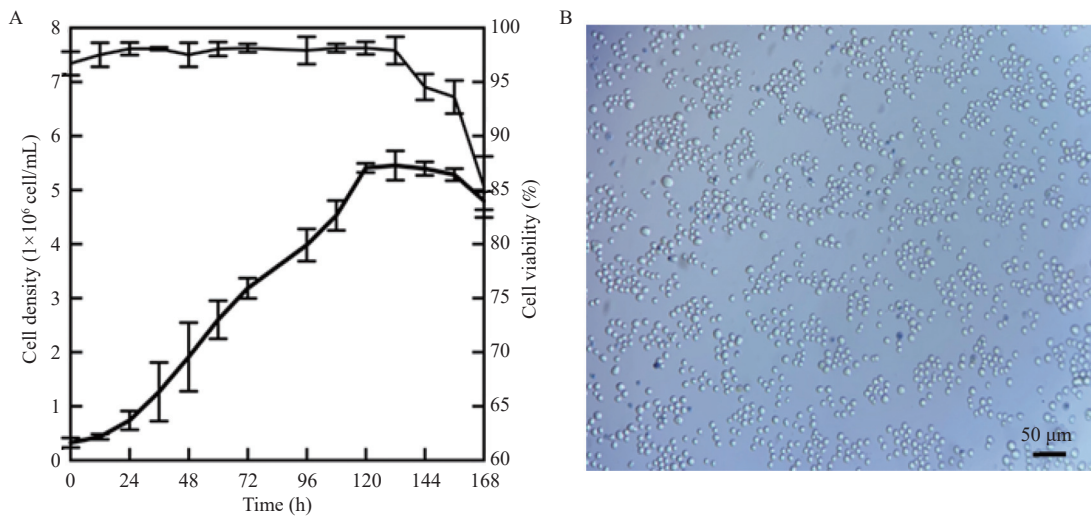


图 3 Vero-S 细胞生物学特征

Fig. 3 Morphology of Vero-S cells

A: Vero-S 细胞生长曲线; B: Vero-S 细胞形态(400 ×)。

表 1 Vero-S 细胞的 STR 位点基因分型结果

Tab. 1 Results of STR loci genotyping for Vero-S cells

STR位点	等位基因1	等位基因2	重复次数	重复次数
D1S518	191.04	194.99	15	16
D4S2408	346.03	349.93	16	17
D5S1467	180.06		10	
D6S1017	354.84	358.7	10	11
D8S1106	134.07		12	
D17S1304	210.15	214.31	14	15
D19S245	245.76		21	
DYS389	328.29		12	

之间。对照组悬浮前的 Vero 细胞(P150)和人二倍体KMB17 细胞共接种了 5 只裸鼠, 期间未观察到有肿瘤性结节产生, 也未发生死亡情况, 见图 6。说明悬浮前的 Vero 细胞和 KMB17 细胞都不具有成瘤性。此外, 观察期内未发现裸鼠有不进食、不进水或其它异常行为。

2.6 流感病毒敏感性

血凝实验显示, 贴壁培养的 Vero 细胞对流感病毒 H3N2、H1N1、B-V、B-Y 血凝效价分别为 1 : 1024、1 : 512、1 : 512、1 : 256; Vero-S 细胞对流感病毒 H3N2、H1N1、B-V、B-Y 共 4 种亚型的血凝效价均为 0, 与阴性对照组一致, 说明 Vero-S 细胞对流感病毒不敏感, 可能是由于驯化过程改变了细胞的特性。

3 讨论

Vero 细胞系作为第 1 个被 WHO 批准用于人类用病毒疫苗连续细胞系, 由于其干扰素表达缺陷, 对许多病毒敏感, 这种广泛的易感性导致了基于 Vero 细胞生产的相应致病病毒疫苗的开发, 包括全灭活、减毒、活病毒疫苗等类型, 具有极高的商业价值。为了降低制造成本, 从上游生物工艺开发的角度来看, 作为生产基质的细胞越多, 可以产生的病毒就越多。因此, 悬浮 Vero 细胞系的开发显得尤为重要, 在悬浮培养中, 细胞不需要受到贴壁面积的限制, 而且无需胰蛋白酶消化, 在已经建立了其他哺乳动物细胞系(HEK293 和 CHO)的情况下, Vero 细胞的悬浮培养也成为一种可能情况。然而, Vero 细胞系在悬浮培养物中的生长适应是一个非常具有挑战性的过程, 由于底物、代谢物、产物的扩散障碍, 单细胞悬浮比

细胞聚集体更具有开发价值。尽管已经建立了微载体和固定床生物反应器技术, 悬浮细胞系仍然是病毒生产的最佳底物^[17]。

在长期的、大规模的人工培养过程中, 细胞群体的生理活动可能会受到损害, 例如分泌功能和代谢能力的改变。有研究表明, 细胞代谢状态以及表观遗传的改变可能导致细胞成瘤性增加^[18], Vero 细胞在无血清培养介质中悬浮生长时, 需要大量能量以满足自身生存要求, 如可能依赖高水平的糖酵解以满足 ATP 供应, 这与正常贴壁细胞明显不同, 正常细胞则主要依赖发生氧化磷酸化来满足代谢增殖要求, 上述观点与 Otto Warburg 的癌症起源学说也相符合, Weinberg 认为线粒体代谢的改变以及活性氧大量产生可能是细胞成瘤性增加的原因之一^[19]。同时, 与贴壁细胞不同的是, 悬浮细胞在传代时较难鉴定细胞代次, 高代次的 Vero 细胞也是成瘤性增加的可能原因^[20]。目前对于一些动物细胞系是否可以在不改变其遗传或抗原特性的情况下扩增病毒尚不可知, 需对细胞库进行鉴定和测试以及开发适合多种疫苗毒株复制和增殖的细胞基质。此外, 动物细胞容易受到来自呼吸道病毒、肠道病毒、疱疹病毒的病原体感染, 因此需要更严格的质量控制, 以确保细胞基质疫苗接种的安全性。在建立能够稳定增殖的细胞系基础上, 未来动物细胞培养技术的发展应侧重于优化细胞培养环境、改变细胞生物学特性, 以提高生产规模和疫苗生产^[21]。

本研究使用商业化鸡肝细胞悬浮培养基 NF-1, 并添加 2 mg/L 转铁蛋白、50 mg/L 牛血清白蛋白、3 mg/L 地塞米松配制成 Vero 细胞悬浮培养基, 采用“摇床驯化法”初步驯化了贴壁培养的 Vero 细胞进行悬浮培养, 整个驯化时间约 70 d, 细胞倍增时间为 36 h, 复苏后细胞呈透亮、球形(圆度 0.73 ~ 0.75)、分散无聚团状态, 大小均一(12.12 ~ 14.44) μm 、无细胞碎片, 细胞增殖良好。STR 鉴定结果表明悬浮的 Vero 细胞与 Almeida 等^[22] 报道的分型结果完全一致, 表明悬浮 Vero 细胞具有完全的遗传稳定性。据报道, Litwin 等^[23] 于 1992 年开发出了 Vero 细胞悬浮培养基, 并证明悬浮细胞若要达到 1×10^9 个/L 的细胞密度水平需要长达 20 ~ 30 d 的停滞期。Paillet 等^[24] 报道 VeroE6 细胞在自制的无血清培养基 SFM 中经过 120 d 驯化适应后得到可悬浮培养的 Vero 细胞, 并且 Vero 细胞一旦适应悬浮培养后将持续保持悬浮培养特性, 细胞无聚团现象。SamiaRourou 等^[25]

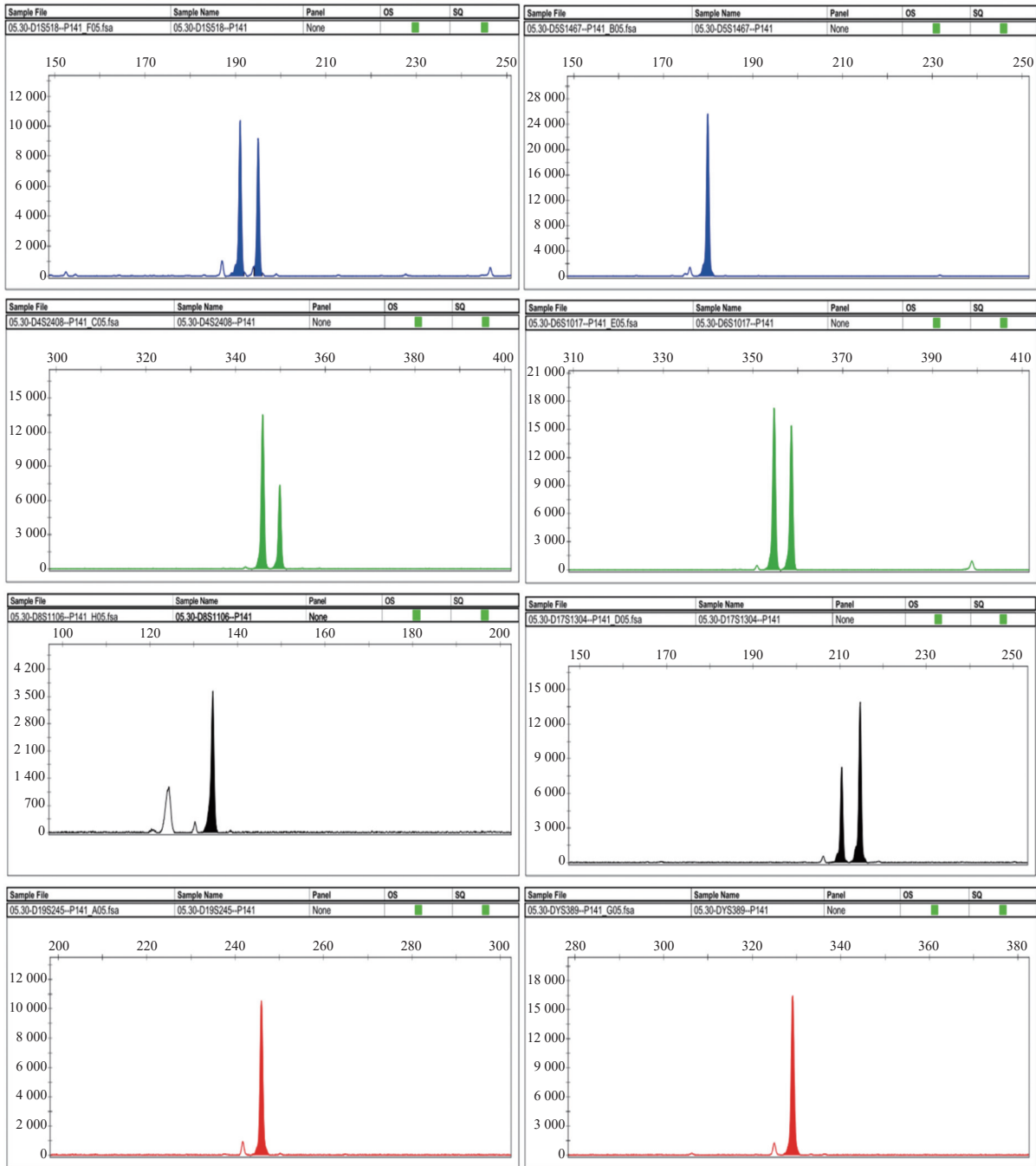


图 4 Vero-S cells 的 STR 位点基因分型图

Fig. 4 STR loci genotyping chart of Vero-S cells

A: D1S518 位点基因型为 15/16; B: D5S1467 位点基因型为 10; C: D4S2408 位点基因型为 16/17; D: D6S1017 位点基因型为 10/11; E: D8S1106 位点基因型为 12; F: D17S1304 位点基因型为 14/15; G: D19S245 位点基因型为 21; H: DYS389 位点基因型为 12。

利用重组胰蛋白酶将贴壁的 Vero 细胞分离后通过自制 IPT-AFM 无血清培养基驯化贴壁的 Vero 细胞悬浮培养只用了 60 d, 比 Paillet 等^[24] 用时减少了一半。笔者的结果显示, Vero 细胞从贴壁驯化为悬浮培养需要 70 d, 与文献报道相当^[23]。虽然已有 Vero 细胞悬浮培养的报道, 但总体发现目前的 Vero 细胞悬浮培养仅仅限于实验室的研发和科

研, 且驯化时间较长, 最短为 60 d, 并且 Vero 细胞悬浮培养基都源于实验室自制, 尚未有商业化的 Vero 细胞悬浮培养基。由于笔者驯化获得的 Vero-S 细胞具有成瘤性, 尚不能用于人用生物制品的生产, 仍需继续努力探索悬浮培养技术。同时, 对于 Vero-S 细胞可以进一步开展基因组学和病毒敏感性的研究, 积累科学数据。

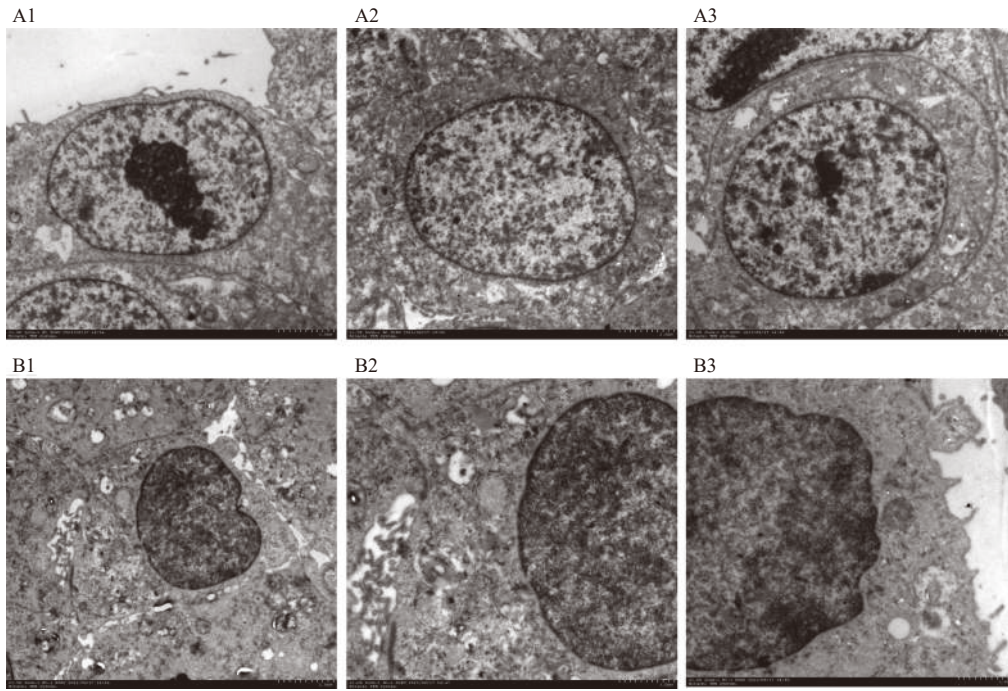


图 5 Vero 细胞电镜图片

Fig. 5 Electron microscopy image of Vero cells

A1 ~ A3: 不同视野下贴壁培养的 Vero 细胞形态; B1: 1500 倍电镜下 Vero-S 细胞形态; B2 ~ B3: 3000 倍电镜下不同视野的 Vero-S 细胞形态。



图 6 成瘤性检查裸鼠情况

Fig. 6 Tumorigenicity assessment in nude mice

A: 接种悬浮前的 Vero 细胞(P150)的裸鼠未出现肿瘤; B: 接种人二倍体 KMB17 细胞的裸鼠未出现肿瘤; C1 ~ C6: 接种悬浮培养的 Vero-S 细胞的 6 只裸鼠均出现不同大小的肿瘤。

[参考文献]

[1] Ahmad N, Nawi A M, Jamhari M N, et al. Post-exposure prophylactic vaccination against rabies: A systematic review[J]. Iran J Public Health, 2022, 51(5): 967-977.

[2] Lai C C, Chen I T, Chao C M, et al. COVID-19 vaccines: Concerns beyond protective efficacy and safety[J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(8): 1013-1025.

[3] Yun S, Ying H, Lu X X, et al. Comparative study on the

immunogenicity and efficacy of different post-exposure intramuscular rabies vaccination regimens in China[J]. Bio-medical and Environmental Sciences, 2024, 37(2): 178-186.

[4] Guan W, Lan W, Zhang J, et al. COVID-19: antiviral agents, antibody development and traditional Chinese medicine[J]. Virologica Sinica, 2020, 35(6): 685-698.

[5] Someya K, Okemoto-Nakamura Y, Kurata T, et al. Establishment of measles virus receptor-expressing Vero cells

- lacking functional poliovirus receptors[J]. *Microbiol Immunol*, 2023, 67(3): 166–170.
- [6] Pandey K, Pandey M, Kumar V, et al. Bioprocessing 4.0 in biomanufacturing: Paving the way for sustainable bioeconomy[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2024, 4(2): 407–424.
- [7] Guo M, Zheng R, Wu H L, et al. Inhibition of enterovirus 71 infection by polysaccharides extracted from *Picochlorum* sp. 122 via the AKT and ATM/ATR signaling pathways[J]. *Arch Virol*, 2021, 166(12): 3269–3274.
- [8] 赵彩红, 王美皓, 李自良, 等. 无血清悬浮培养 MD-CK 细胞系的建立及生物反应器高密度培养 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(11): 1362–1369.
- [9] 刘丽, 郭骐源, 郝建丽, 等. 无血清悬浮 MDCK 细胞培养流感病毒纯化工艺的初步建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(9): 1100–1104.
- [10] 李政蓉, 金宏丽, 黄培, 等. BHK-21 细胞悬浮培养狂犬病病毒(rCVS-11-dG 株)工艺的建立及病毒免疫原性评价 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(2): 129–134.
- [11] 陈丽, 倪敏舒, 徐悦, 等. 伪狂犬病毒在 BHK-21 悬浮细胞中的增殖特性 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(10): 166–170.
- [12] Moroz V D, Gasanov N B, Egorov A D, et al. A method for the production of recombinant VSVs with confirmation of biological activity[J]. *Acta Naturae*, 2024, 16(1): 59–66.
- [13] Cui W, Liu S. Optimization of adaptation parameters from adhesion cell culture in serum-containing media to suspension in chemically defined media by superlative box design[J]. *Cytotechnology*, 2024, 76(1): 39–52.
- [14] Du Q, Zhang X, Wang T, et al. Effects and mechanisms of animal-free hydrolysates on recombination protein yields in CHO cells[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(22): 7387–7396.
- [15] Popuche D, Huaman A, Loyola S, et al. Development and validation of a vero cell-based suspension method for the detection of Zika virus[J]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2023, 40(3): 297–306.
- [16] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 三部 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 11–13.
- [17] Kiesslich S, Kim G N, Shen C F, et al. Bioreactor production of rVSV-based vectors in Vero cell suspension cultures[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(7): 2649–2659.
- [18] Hinz B, Lagares D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2020, 16(1): 11–31.
- [19] Wu K, El Zowalaty A E, Sayin V I, et al. The pleiotropic functions of reactive oxygen species in cancer[J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(3): 384–399.
- [20] Sato Y, Bando H, Di Piazza M, et al. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(11): 1095–1111.
- [21] Liu S, Yang G, Li M, et al. Transcutaneous immunization via dissolving microneedles protects mice from lethal influenza H7N9 virus challenge[J]. *Vaccine*, 2022, 40(47): 6767–6775.
- [22] McPhail J A, Burke J E. Molecular mechanisms of PI4K regulation and their involvement in viral replication[J]. *Traffic*, 2023, 24(3): 131–145.
- [23] Cavallini C, Olivi E, Tassinari R, et al. Deer antler stem cell niche: An interesting perspective[J]. *World J Stem Cells*, 2024, 16(5): 479–485.
- [24] Vázquez-Ramírez D, Jordan I, Sandig V, et al. High titer MVA and influenza A virus production using a hybrid fed-batch/perfusion strategy with an ATF system[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(7): 3025–3035.
- [25] Kalle. S R M Z H. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media[J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 6987–6995.