

在静态和动态培养条件下杂交瘤细胞的生长和代谢

张 立 沈 红 张元兴*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要 通过对 WuT3 杂交瘤细胞在静态和动态培养条件下的比较,发现细胞生长和代谢有很大不同。在静态培养条件下,细胞培养周期较长,细胞密度较高,但在动态培养条件下,细胞代谢更加旺盛,葡萄糖、氨基酸等营养物质的消耗加快,乳酸、氨、丙氨酸等代谢产物的比生成速率较大。

关键词 杂交瘤细胞,方瓶培养,转瓶培养,细胞培养

中图分类号 Q953.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0373-05

自从 1975 年 Kohler 和 Milsten 建立杂交瘤技术以来,由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体已应用到许多方面,特别是在疾病诊断和治疗及亲和层析分离中,单克隆抗体具有十分诱人的应用前景。到 1989 年为止,仅英国批准上市单抗诊断试剂就达 100 多种,日本也有 100 多种单克隆抗体诊断试剂在市场上销售。90 年代,全世界仅单抗诊断试剂盒的年产值就达 20 亿美元,预计到 1999 年可上升到 60 亿美元^[1]。

传统的培养方式是在方瓶或滚瓶中静态培养,这种方式操作复杂,生产力低,不能满足市场需求。在生物反应器中培养细胞是近年来大规模培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体的重要方法,并获得了许多成功经验。但细胞在方瓶中静态培养和在转瓶或反应器中动态培养有许多不同,如葡萄糖、氨基酸等营养物质的利用,乳酸、氨等产物的生成都有很大差异。在此,我们研究了 WuT3 杂交瘤细胞在静态和动态培养条件下的生长和代谢,为以后大规模培养奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞株

WuT3 是由骨髓瘤细胞 NS1 和经免疫的 Balb/c 小鼠的脾细胞融合而成,分泌抗人 T 淋巴细胞 CD3 抗原的单克隆抗体,单抗类型为 IgG2a。该细胞是由卫生部武汉生物制品研究所建株并提供。

1.2 培养基

无血清培养基(Serum-free medium, SFM)。在 RPMI 1640 基础上添加氨基酸、维生素、转铁蛋白、无机盐和其它成分。

1.3 培养方 法

1.3.1 静态培养:在容积为 300mL 的方瓶中装液 60mL,细胞接种密度为 1.3×10^5 cells/mL,方瓶放到 5% CO₂ 培养箱中,培养温度为 36.8℃,每隔 12h 取样计数。

1.3.2 动态培养:在容积为 300mL 的转瓶中装液 60mL,转速为 60r/min,细胞接种密度为 1.8×10^5 cells/mL,同时补加 0.02% 甲基纤维素和 0.01% Pluronic F68 作为保护剂,转瓶放到 5% CO₂ 培养箱中,培养温度为 36.8℃,每隔 12h 取样计数。样品离心后取上清,测葡萄糖、乳酸、氨、氨基酸等。所有实验重复 3 次,最后结果取 3 次实验数据的平均值。

1.4 分析方 法

1.4.1 细胞密度:血球计数板计数,用台盼蓝染色法区分活细胞。

1.4.2 葡萄糖浓度:用葡萄糖氧化酶(POD-GOD)法测定^[2]。

1.4.3 乳酸浓度:用乳酸脱氢酶法(LDH)测定^[2]。

1.4.4 氨浓度:采用尿素氮试剂盒(上海生物制品研究所)测定^[2]。

1.4.5 氨基酸测定:采用茚三酮法氨基酸分析仪

收稿日期:1999-05-13,修回日期:2000-01-06。

基金项目:国家九五重点攻关项目(95-02-03-05)。

* 通信联系人。

测定。其中谷氨酰胺和天冬酰胺的分析需要水解,用 6mol/L HCl 水解 5h,分别测定谷氨酰胺和谷氨酸的总量以及天冬酰胺和天冬氨酸的总量,再减去前面茚三酮法测定的谷氨酸和天冬氨酸的量,即得谷氨酰胺和天冬酰胺的量。

1.4.6 单抗浓度:用免疫单扩散法测定^[3]。

2 实验结果

2.1 细胞生长

在动态和静态培养条件下,细胞生长情况如图 1 所示。在静态培养条件下,细胞生长有较为明显的延迟期,这可能是由于细胞接种密度较低引起的。在静态下最大细胞密度为 10.7×10^5 cells/mL,而在动态下仅为 8.0×10^5 cells/mL,在静态培养条件下,细胞的衰亡过程长达 84h,较动态培养条件延长了近 48h,整个细胞培养周期较动态培养延长了 60h。一般来说,在单抗比生成速率一定的情况下,单抗的产量与细胞密度和培养周期有关^[4],即

$$\frac{d[MAB]}{dt} = q_{MAB} \cdot X_V$$

积分后,

$$[MAB] = \int_0^t q_{MAB} \cdot X_V dt = q_{MAB} \int_0^t X_V dt$$

其中 $[MAB]$ 为单克隆抗体的浓度。因此,静态培养更有利于提高单抗产量。

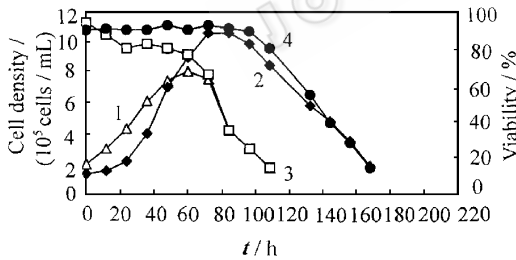


图 1 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中的生长

Fig. 1 The growth of WuT3 hybridoma cells cultured in flask and spinner bottles

1. Spir(cells) 2. Flask(cells);
3. Spir(viability) 4. Flask(viability)

在静态培养条件下,由于迟滞期的存在,细胞的比生长速率先呈上升趋势,进入对数生长期,达到最大表观比生长速率 $\mu_{app} = 0.052 h^{-1}$ (图 2)。随后细胞的比生长速率逐渐下降,但在培养后期,细胞表观比生长速率的下降趋势有所减缓。在动态培养条件下,细胞的表观比生长速率一直下降至细胞全部死亡。

无论是静态培养还是动态培养,在整个培养过

程中,细胞存活率都呈现出两个阶段(图 1)。第一阶段是活细胞密度达到最大值之前,细胞存活率的变化较为平缓,尤其是在静态培养条件下,因为没有搅拌,不存在剪切力对细胞壁的伤害。第二阶段是细胞进入衰亡期后,细胞存活率呈迅速下降趋势。这可能是由于共同存在某些限制(如营养物质耗尽)或抑制(如副产物积累)细胞生长的物质而引起。

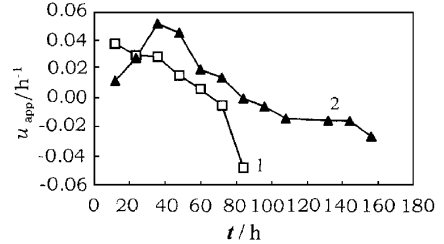


图 2 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中的表观比生长速率

Fig. 2 The apparent specific growth rate (μ_{app}) of WuT3 cells cultured in flask and spinner bottles

1. Spinner; 2. Flask

2.2 葡萄糖的消耗和乳酸的生成

无论是动态还是静态,培养开始时葡萄糖消耗和乳酸生成较快,到培养后期,葡萄糖和乳酸浓度基本保持不变(图 3),说明细胞代谢受到了抑制,不再消耗葡萄糖生成乳酸。但是在静态和动态培养条件下,累积乳酸浓度不同,最大值分别为 1.9 和 1.5g/L。文献^[5]报道,乳酸对细胞的抑制浓度在 3.0~4.0g/L 以上,这说明尽管细胞生长存在限制性因素,但并不是乳酸造成的。

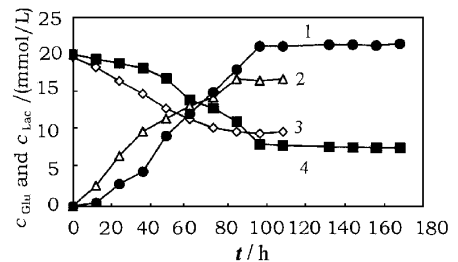


图 3 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中葡萄糖的消耗和乳酸的积累

Fig. 3 The glucose consumption (c_{glu}) and lactate accumulation (c_{lac}) by WuT3 cells cultured in flask and spinner bottles

1. Flask(Lac) 2. Spir(Lac) 3. Spir(glu) 4. Flask(glu)

在动态培养条件下,细胞的葡萄糖消耗呈下降趋势,最大葡萄糖比消耗速率为 $0.083 \times 10^{-9} g / (cell \cdot h)$,即 $0.236 \times 10^{-9} mmol / (cell \cdot h)$ 。在静态

下,细胞的葡萄糖比消耗速率呈波浪下降趋势,最大葡萄糖比消耗速率为 $0.066 \times 10^{-9} \text{g}/(\text{cell} \cdot \text{h})$,即 $0.210 \times 10^{-9} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 。

在静态培养的迟滞期内,乳酸的比生成速率较低,说明细胞生长需要合成大量胞内物质,这个过程消耗较多的葡萄糖作为合成材料或能源物质。当细胞进入对数生长期,乳酸比生成速率达到最大值,在动态和静态下,最大乳酸比生成速率很接近,分别为 $0.09 \times 10^{-9} \text{g}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 和 $0.10 \times 10^{-9} \text{g}/(\text{cell} \cdot \text{h})$,即 $0.47 \times 10^{-9} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 和 $0.43 \times 10^{-9} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 。随后,乳酸比生成速率均呈下降趋势。

从代谢速率可看出,最大葡萄糖比消耗速率在动态下较静态下大得多,而最大乳酸比生成速率却很相近,即最大乳酸比生成速率与最大葡萄糖比消耗速率之比在动态下较静态下小,也就是说在动态下产生的乳酸相对较少。这可能是在动态下因搅拌的存在,混合均匀,溶氧水平相对较高,TCA 循环较旺盛,葡萄糖利用率有所提高。

2.3 氨基酸的代谢和氨的生成

随着细胞生长和代谢,氨不断积累,但无论在静态还是动态,最大氨浓度均为 $4.0 \text{mmol}/\text{L}$ (图 4),且当氨浓度达到 $4.0 \text{mmol}/\text{L}$ 所对应的时间,也正是细胞进入死亡期的时间。一般细胞死亡有两种模式:细胞坏死(Necrosis)和细胞凋亡(Apoptosis)。对杂交瘤细胞而言,90%的死细胞是通过凋亡途径死亡^[6]。引起细胞凋亡的因素很多,主要是谷氨酰胺限制、葡萄糖限制和氨抑制。在本实验中,在静态还是动态下,当细胞进入死亡期时谷氨酰胺浓度分别为 1.5 和 $1.8 \text{mmol}/\text{L}$,葡萄糖浓度分别为 2.3 和 $2.0 \text{g}/\text{L}$,所以并不是谷氨酰胺或葡萄糖的限制引起了细胞死亡。但是,在培养过程中,细胞代谢和谷氨酰胺分解产生的高浓度氨很可能是导致细胞死亡的

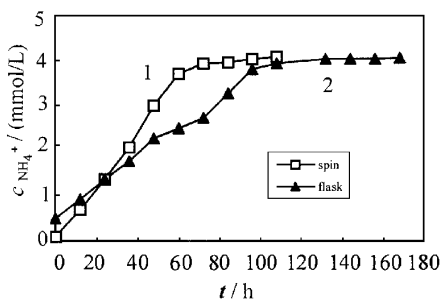


图 4 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中氨的积累

Fig. 4 The ammonia accumulation ($c_{\text{NH}_4^+}$) by WuT3

cells cultured in flask and spinner bottles

1. Spinner; 2. Flask

原因。关于氨对细胞生长的抑制已有很多报道,但不同的细胞株抑制浓度不同,一般在 $1 \sim 5 \text{mmol}/\text{L}$ 之间^[7,8]。对 WuT3 杂交瘤细胞而言,当氨浓度达到或高于 $4.0 \text{mmol}/\text{L}$ 时,抑制细胞生长,引起细胞凋亡。

从 WuT3 杂交瘤细胞的代谢(表 1 和表 2)可看出,无论是静态培养还是动态培养,谷氨酰胺消耗的量远远高于其它氨基酸消耗的量。谷氨酰胺在细胞代谢过程中主要作为氮源物质,又可作为碳源物质;在动态培养中亮氨酸、异亮氨酸、谷氨酰胺的比消耗速率远大于在静态培养中的对应值,而谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸的比生成速率也有类似现象,只有精氨酸有相反的趋势。

表 1 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中某些氨基酸的平均比消耗速率 $10^{-12} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$]

Table 1 The average specific consumption rate of some amino acids by WuT3 hybridoma cells cultured in flask and spinner bottles [$10^{-12} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$]

	Ser	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Thr	Gln
Flask	5.80	0.75	3.11	1.02	4.04	5.46	1.20	1.66	2.74	1.64	29.9
Spinner	4.01	0.58	3.71	1.00	8.60	8.29	1.29	1.10	2.92	1.75	58.2

表 2 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中某些氨基酸的平均比生成速率 $10^{-12} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$]

Table 2 The average specific production rate of some amino acids by WuT3 hybridoma cells cultured in flask and spinner bottles [$10^{-12} \text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$]

	Glu	Gly	Ala	Arg
Flask	6.26	3.20	17.6	1.42
Spinner	17.2	7.37	43.5	0.97

2.4 单抗的生成

从培养结束时单抗的浓度可以看出(图 5),方瓶中的单抗浓度为 $48 \text{mg}/\text{L}$,而转瓶中仅为 $32 \text{mg}/\text{L}$ 。

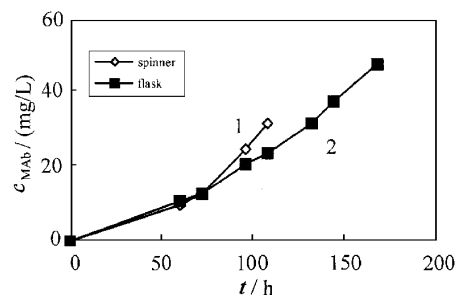


图 5 WuT3 杂交瘤细胞培养中单抗的积累

Fig. 5 The MAb concentration (c_{MAb}) in WuT3 cell culture

这是因为方瓶培养中达到的最大细胞密度较高,培养周期较长,也就是积分公式中的积分项较大,所以单抗浓度较高。

3 讨 论

葡萄糖作为碳源和能源物质,在细胞代谢过程中主要用于合成细胞组份、生成乳酸、丙氨酸和 CO_2 。每 1mol 葡萄糖全部通过糖酵解途径最多可生成 2mol 乳酸,葡萄糖还可通过磷酸戊糖途径用于合成核苷酸所必需的核糖,但用于这部分的葡萄糖和用于合成其它细胞组份所消耗的葡萄糖只占葡萄糖总消耗量的一小部分。同时谷氨酰胺通过 TCA 循环由草酰乙酸到丙酮酸也可生成乳酸,在物料核算中,这两部分可以抵销。因此可以将乳酸看成是由葡萄糖生成的。从乳酸累积量和葡萄糖消耗量的关系可以看出,WuT3 细胞在静态和动态培养条件下,葡萄糖转化为乳酸的摩尔得率分别为 1.86 和 1.74(图 6),即相当于 93% 和 87% 的葡萄糖转化成乳酸。由此可见,葡萄糖产生的能量主要对应细胞的无氧生长。其它有关杂交瘤细胞的批培养报道,葡萄糖转化为乳酸的比例关系也在 80%~90% 之间^[9],与本实验结果很接近。在有氧条件下,大量葡萄糖转化成乳酸,对这一现象目前尚无令人信服的解释。原因之一,可能是缺少对糖酵解途径的控制,其次是线粒体中氧化磷酸化的效率太低。要提

高葡萄糖的利用率,必须对葡萄糖糖酵解途径进行调控,控制培养基中的葡萄糖浓度,已被证实是一条既简单又有效的途径。

在细胞代谢过程中,谷氨酰胺既作氮源又作能源,其代谢途径比葡萄糖更复杂^[10]。谷氨酰胺在谷氨酰胺酶的作用下,脱氨生成谷氨酸,同时生成一份 NH_4^+ ,或通过转氨作用用于合成其它生物物质,如嘌呤、嘧啶。谷氨酸在脱氢酶作用下,转化为 α -酮戊二酸,再生成一份 NH_4^+ , α -酮戊二酸进入 TCA 循环或通过转氨作用再转化为谷氨酸,在胞内谷氨酸也可通过转氨作用生成丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸等氨基酸。通过 WuT3 杂交瘤细胞在动态和静态培养条件下,营养物消耗和产物生成的比较可看出,细胞在动态培养条件下,谷氨酰胺和葡萄糖的比消耗速率较静态下高 28.3×10^{-12} 和 50.9×10^{-12} mmol/(cell·h),丙氨酸、乳酸和氨的比生成速率较静态高 26.0×10^{-12} 、 34.2×10^{-12} 和 33.3×10^{-12} mmol/(cell·h)。

从这些实验结果可以推测,在动态培养条件下,细胞多消耗的谷氨酰胺的量并没有以谷氨酸的形式累积,而是几乎全部转化生成 α -酮戊二酸,进入 TCA 循环,因为多消耗的谷氨酰胺的量正好与多生成的丙氨酸的量相吻合。由此可见,动态培养条件下的葡萄糖转化为乳酸的摩尔得率较低的原因是因为有部分的丙酮酸转化生成了丙氨酸。根据实验数据,在动态培养条件下亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和赖氨酸的比消耗速率较静态培养条件分别高 2.83×10^{-12} 、 4.56×10^{-12} 、 0.6×10^{-12} 和 0.18×10^{-12} mmol/(cell·h),它们的加和为 8.17×10^{-12} mmol/(cell·h),与在动态培养条件下的谷氨酸的比生成速率较静态培养条件高出的值 10.9×10^{-12} mmol/(cell·h)接近。所以动态培养条件下,细胞多生成的谷氨酸的量是由亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和赖氨酸通过转氨作用,耦合了 α -酮戊二酸转化为谷氨酸而生成的,而自身转化为乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环。由此可见,细胞在动态培养条件下的 TCA 循环较静态培养条件活跃。

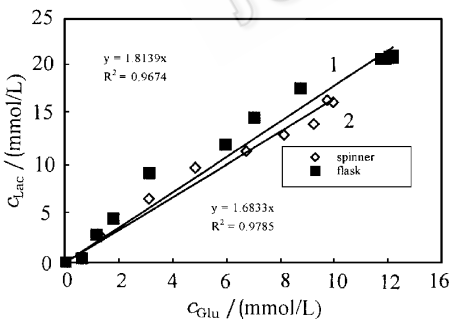


图 6 WuT3 杂交瘤细胞在方瓶和转瓶培养中葡萄糖消耗和乳酸积累的关系

Fig. 6 The relationship of glucose consumption (c_{Glu}) and lactate production (c_{Lac}) in WuT3 cell culture

参 考 文 献

- [1] Bibila T A. *Biotechnol Prog*, 1994, **10**: 87~96
- [2] Zhang L, Zhang Y X, Yan C *et al.* *Appl Biochem Bioeng*, 1997, **62**: 291~302
- [3] Shen H, Zhang L, Zhang Y X *et al.* In *Biochemical Engineering: Marching Toward The 21st Century of Biotechnology-Proceedings of AP-BIOCHEC 97*, Shen Z Y (eds), Beijing: Tsinghua University Press, 1997, 217~231

- [4] 张元兴 ,方宏勋 ,容秉培 . 生物工程学报 ,1998 ,14 :326~331
- [5] Miller W M ,Wilke C R ,Blanch H W . *Bioprocess Eng* ,1988 ,3 :113~122
- [6] Singh R P ,Al-Rubeai M ,Gregory C D *et al* . *Biotechnol Bioeng* ,1994 ,44 :720~726
- [7] Hassell T E . *Appl Biochem Biotechnol* ,1991 ,30 :29~41
- [8] Glacken M W ,Fleischaker R J ,Sinskey A J . *Biotechnol Bioeng* ,1986 ,28 :1376~1389
- [9] Miller W M ,Wilke C R ,Blanch H W . *Biotechnol Bioeng* ,1988 ,32 :947~965.
- [10] Mancuso A ,Sharfstein S Y ,Tucker S N *et al* . *Biotechnol & Bioeng* ,1994 ,44 :563~585

Growth and Metabolism of Hybridoma Cells Cultured in Flask and Spinner Bottles

ZHANG Li SHEN Hong ZHANG Yuan-Xing

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ,East China University of Science & Technology ,Shanghai 200237)

Abstract The growth and metabolism of WuT3 hybridoma cells were very different when cells were cultured in flask and spinner bottles. In the flask bottles a longer culture duration and the higher cell density were met ,whereas in the spinner bottles the more vigorous cell metabolism took place ,resulting in that either the specific consumption rates of glucose and amino acids or the specific production rates of lactate ammonia and alanine were higher.

Key words WuT3 hybridoma cell ,flask culture ,spinner culture ,cell culture