

# 重组 CHO 细胞培养过程中氨对细胞代谢的影响

孙祥明 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** 研究了重组 CHO 细胞批培养过程中,氨浓度对细胞的葡萄糖、谷氨酰胺及其它氨基酸代谢的影响。表明,细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的得率系数随着氨浓度的增加而降低,起始氨浓度为 5.66mmol/L 的批培养过程与起始氨浓度为 0.21mmol/L 的批培养过程相比,细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的得率系数分别下降了 78% 和 74%,细胞对其它氨基酸的得率系数也分别下降了 50%~70%。氨浓度的增加明显地改变了细胞的代谢途径,葡萄糖代谢更倾向于厌氧的乳酸生成。在谷氨酰胺的代谢过程中,谷氨酸经谷氨酰胺脱氢酶进一步生成  $\alpha$ -酮戊二酸的过程受到了氨的抑制,而氨对谷氨酸经谷氨酰胺转氨酶反应生成  $\alpha$ -酮戊二酸的过程有促进作用,但总体上谷氨酸进一步脱氨生成  $\alpha$ -酮戊二酸的反应受到了氨的限制。

**关键词** 动物细胞培养,代谢,CHO 细胞,葡萄糖,谷氨酰胺,氨

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)03-0304-06

促红细胞生成素(EPO)是治疗肾衰性和癌症化疗引起的贫血的有效药物,也可用于择期手术的自身输血血液储备,具有广阔的市场前景。利用重组 CHO 细胞培养生产的重组人 EPO 已经获准上市。提高 EPO 生产率的主要途径是实现细胞培养的高密度和提高细胞的产物表达能力。灌注培养是实现细胞高密度培养的有效选择<sup>[1]</sup>。细胞培养的高密度有赖于过程控制的优化,即维持适当的营养物浓度不至于导致细胞生长的营养限制,控制低的代谢副产物浓度,避免其对细胞生长的抑制。

氨和乳酸是细胞培养过程中的主要代谢副产物<sup>[2,3]</sup>。与乳酸相比,较低浓度的氨就会对细胞的生长产生抑制<sup>[3]</sup>。氨对杂交瘤细胞生长和代谢的影响已有大量的报道<sup>[3~7]</sup>,而对重组 CHO 细胞生长代谢影响的研究则很少。我们已经报道了在不同起始氨浓度的重组 CHO 细胞批培养过程中,最终的细胞密度随着氨浓度的提高而降低,氨对重组 CHO 细胞生长有明显的抑制作用并遵循二级抑制模型。氨对细胞生存的毒性作用不仅取决于氨的浓度,也取决于细胞在此氨浓度下生存的时间<sup>[8]</sup>。本文着重讨论氨对重组 CHO 细胞代谢的影响,为重组 CHO 细胞高密度培养过程中的氨控制及过程优化提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

表达人促红细胞生成素的重组 CHO 细胞,CHO-DEH-2,由山东东阿阿胶股份有限公司提供,培养基为 DMEM 与 F12 的 1:1 混合物,并添加 5%(V/V)的胎牛血清,培养基及血清均购自 Gibco 公司(USA)。

### 1.2 细胞培养

从细胞库中取出重组 CHO 细胞种子,在 75mL 的方瓶中加入 10mL 培养基进行复苏培养,细胞长满单层后,0.025%(W/V)的胰酶消化片刻,倾去胰酶加入 10mL 培养基并用移液管反复轻轻吹打成单细胞悬浮液,按 1:10 的接种比例传代培养。

取 5 只 100mL 血清瓶并以 0<sup>#</sup>、1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup> 和 4<sup>#</sup> 标记,分别加入 60mL 的培养基,除 0<sup>#</sup> 瓶外,其他 4 只瓶中分别加入一定量 1mol/L 的 NH<sub>4</sub>Cl 溶液,从而按照瓶号的顺序形成氨浓度递增的培养基,氨浓度以实测结果为准。

取 4 只单层长满的细胞培养瓶,用 0.025% 胰酶消化,并分别用 10mL 的培养基反复轻轻吹打成单细胞悬浮液。将 4 只瓶中的细胞悬浮液混合于一处

作为实验种子,并以每瓶 8mL 的接种量分别接入上述 5 只血清瓶中,并吹打混合均匀,实测的细胞密度为培养过程的接种密度。

取 60 只 75mL 细胞培养瓶,分成 5 组并以 0<sup>#</sup>、1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup> 和 4<sup>#</sup> 标记,将血清瓶中的细胞悬浮液以 5mL 的装液量——对应均匀地分装到各组培养瓶中,血清瓶中的细胞密度即为各级的细胞接种密度。所有方瓶置于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱(Shellab, USA)中培养,每天每组各取 2 瓶,计数培养液中的悬浮细胞密度( $X_m$ )后,将培养液在 1500r/min 的条件下离心 15min,取上清置于 -20℃ 冰箱中保藏。另在方瓶中加入 5mL 的胰酶消化细胞,并直接吹打成单细胞悬浮液,计数细胞密度( $X_s$ )。因此第  $n$  个取样点的细胞密度由下式给出:

$$X_n = X_m + X_s \quad (1)$$

### 1.3 分析方法

**1.3.1 细胞计数:**用血球计数板点样计数细胞密度,并用台盼蓝拒染法确定细胞的活性,每样计数 3 次,取平均值。

**1.3.2 葡萄糖、氨和乳酸浓度的测定:**葡萄糖和氨的浓度分别采用葡萄糖分析试剂盒和 Berthelot 比色法氨试剂盒(上海生物制品所)测定,乳酸浓度则采用乳酸脱氢酶法测定。

**1.3.3 氨基酸浓度的测定:**氨基酸浓度的测定采用邻苯二甲醛(OPA)(Fluka, USA)柱前衍生的反相高效液相色谱系统(HP1100, Hewlett Packard, USA)测定<sup>[9]</sup>。

**1.3.4 得率系数的计算:**在重组 CHO 细胞的批培养过程中,96h 起细胞的生长基本上进入稳定期,因此细胞对营养物的得率系数由下式计算:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{96} - X_0}{S_0 - S_{96}} \quad (2)$$

其中  $Y_{X/S}$  细胞对营养物的得率系数;  $X$  细胞密度;  $S$  营养物浓度。代谢产物对营养物的得率系数由下式计算:

$$Y_{P/S} = \frac{P_{96} - P_0}{S_0 - S_{96}} \quad (3)$$

其中  $Y_{P/S}$  产物对营养物的得率系数;  $P$  产物浓度;  $S$  营养物浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨对葡萄糖代谢的影响

在起始氨浓度为 0.21、1.74、3.09 和 4.28mmol/L 的重组 CHO 细胞批培养过程中,葡萄糖的利用并没有明显的差别,细胞进入稳定期(96h)和培养结束(120h)时所对应的葡萄糖浓度相差不大,而细胞密度则有着明显的不同。在起始氨浓度为 5.66mmol/L 的培养过程中,培养 96h 和 120h 所对应的葡萄糖浓度均略高于其它起始氨浓度批培养过程所对应的葡萄糖浓度,细胞密度则明显地低于其它起始氨浓度批培养过程所对应的细胞密度(表 1)。这反映了在不同氨浓度下,单位细胞水平的葡萄糖代谢有着明显的不同。

表 1 不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养 96h 和 120h 对应的活细胞密度和葡萄糖浓度

Table 1 Viable cell densities and glucose concentrations at 96h and 120h in the batch cultures of recombinant CHO cells with different initial ammonia concentrations

$A_0$ (mmol/L)	$G_0$ (mmol/L)	$X_0$ ( $10^5$ cells/mL)	96h		120h	
			$X_{96}$ ( $10^5$ cells/mL)	$G_{96}$ (mmol/L)	$X_{120}$ ( $10^5$ cells/mL)	$G_{120}$ (mmol/L)
0.21	22.5	0.57	12.2	12	12.2	11
1.74	22.5	0.56	9.6	13	10.2	10
3.09	22.5	0.58	7.7	13	8.4	10
4.28	22.5	0.87	4.5	13	5.6	10
5.66	22.5	0.76	2.8	14	3.4	13

在重组 CHO 细胞的培养过程中,细胞对葡萄糖的得率系数随着氨浓度的增加而明显下降(图 1)。起始氨浓度为 5.66mmol/L 培养过程的细胞对葡萄糖的得率系数仅为起始氨浓度为 0.21mmol/L 培养过程中细胞对葡萄糖得率系数的 22%。乳酸对葡萄糖的得率系数随着起始氨浓度的增加而增加。这表明,氨浓度的提高导致葡萄糖代谢更倾向于乳酸

的生成,在消耗的葡萄糖中,经厌氧代谢消耗的葡萄糖的比例随着氨浓度的提高而提高。在杂交瘤细胞 ATCC TIB 131 和 167.4G5.3 的培养过程中,McQueen 和 Bailey<sup>[7]</sup>以及 Ozturk 等<sup>[3]</sup>分别报道了与此相似的结果,而在另一株杂交瘤细胞 AB2-143.2 的培养过程中,Miller 等<sup>[10]</sup>发现细胞对葡萄糖的得率系数随着氨浓度的增加而增加,并且经过适当时间的适应

后,细胞对葡萄糖的得率系数又恢复到正常的水平。这表明对于不同的细胞株,氨对葡萄糖代谢有着不同的影响机理。

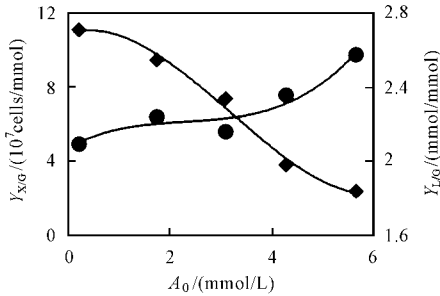


图1 重组 CHO 细胞批培养过程中起始氨浓度对细胞对葡萄糖得率系数(◆)和乳酸对葡萄糖得率系数(●)的影响

Fig.1 Effects of initial ammonia concentrations on the yield coefficients of cells versus glucose(◆) and lactate versus glucose(●) in the batch cultures of recombinant CHO cells

一般认为,氨对葡萄糖代谢的影响主要在于氨对糖酵解途径的关键酶活性的影响<sup>[7]</sup>。许多的研究表明,氨的添加导致了细胞质的酸化<sup>[4,11]</sup>,糖酵解途径的关键酶磷酸果糖激酶的活性随着胞质 pH 的降低而降低,当胞内 pH 值下降 0.2 个单位时,磷酸果糖激酶的活性完全丧失<sup>[12]</sup>,显然,葡萄糖的利用将会随着氨浓度的提高而逐渐受到限制。但在大多数细胞培养过程中,谷氨酰胺可代替葡萄糖,因此尽管氨抑制了葡萄糖的利用,细胞对葡萄糖得率将随着氨浓度的增加而增加。这种理论很好地解释了在某些细胞株的培养过程中,细胞对葡萄糖的得率系数随着氨浓度的增加而增加的现象<sup>[10]</sup>。但在本研究的重组 CHO 细胞以及杂交瘤细胞 ATCC TIB 13<sup>[7]</sup>和 167.4G5.3<sup>[3]</sup>培养过程中,均发现了细胞对葡萄糖的得率系数随着氨浓度增加而下降的现象,这表明,在这类细胞的培养过程中,可能 1) 尽管培养环境中氨浓度的提高导致了细胞质的酸化<sup>[4,11]</sup>,抑制了糖酵解途径<sup>[12]</sup>,但细胞仍可利用其它途径,如磷酸戊糖途径(HMP),大量利用葡萄糖,产生足够的能量满足由于氨浓度增加导致细胞维持能增加的需求<sup>[4]</sup>; 2) 这些细胞质膜上的转运蛋白(如  $H^+$ / $Na^+$  交换子)浓度较高或活性较高,能够将细胞内多余的  $H^+$  离子泵出细胞外,维持胞内正常的 pH 值<sup>[3]</sup>,培养环境中过高的氨浓度并不会导致胞内 pH 值的下降,糖酵解途径不会受到抑制,相反由于额外离子交换的能量需求促进了葡萄糖的利用。尽管本研究中的现有数据尚不足以确定氨对葡萄糖代谢影响的分子机理,但氨对细胞葡萄糖代谢的影响具有细胞株的特

异性已被证实,在本研究中的重组 CHO 细胞培养过程中,氨能促进葡萄糖代谢,并且大多数葡萄糖消耗于厌氧代谢过程,生成大量乳酸,乳酸对葡萄糖的得率系数随着氨浓度的增加而增加(图 1)。

## 2.2 氨对谷氨酰胺代谢的影响

在动物细胞培养过程中,谷氨酰胺也是主要的能源物质<sup>[13]</sup>。谷氨酰胺首先在谷氨酰胺酶的作用下生成谷氨酸,然后,谷氨酸在谷氨酸脱氢酶或谷氨酸转氨酶的作用下可分别生成  $\alpha$ -酮戊二酸和氨或  $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酸,从而进入三羧酸循环。因此讨论氨对谷氨酰胺代谢的影响必须综合考虑氨对谷氨酰胺消耗、丙氨酸和谷氨酸积累及氨的生成等三个方面的影响。

图 2 为不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养 96h 对应的谷氨酰胺浓度和细胞对谷氨酰胺的得率系数。培养 96h 时残留谷氨酰胺浓度随着起始氨浓度的增加而增加,而细胞对谷氨酰胺的得率则随着起始氨浓度的增加而降低。起始氨浓度为 5.66mmol/L 下,细胞对谷氨酰胺的得率系数仅为起始氨浓度为 0.21mmol/L 下的 26%。McQueen 和 Bailey<sup>[7]</sup>、Ozturk 等<sup>[3]</sup>以及 Glacken<sup>[11]</sup>等均报道了杂交瘤细胞 ATCC TIB 131 的细胞对谷氨酰胺的得率系数随着氨浓度的增加而降低的实验结果。

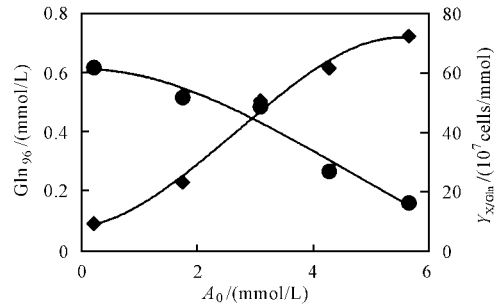


图2 不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养 96h 时的谷氨酰胺浓度(◆)和细胞对谷氨酰胺的得率(●)

Fig.2 The glutamine concentration(◆) and the overall yield coefficient(●) of cells versus glutamine at 96h in the batch cultures of recombinant CHO cells with different initial ammonia concentrations

氨和丙氨酸是谷氨酰胺分解代谢的主要副产物<sup>[14]</sup>。图 3 给出了不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞培养 96h 时氨和丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数。结果表明,氨对谷氨酰胺的得率系数随着起始氨浓度的增加而降低,起始氨浓度为 5.66mmol/L 对应的氨对谷氨酰胺的得率系数与起始氨浓度为 0.21mmol/L 的氨对谷氨酰胺的得率系数相比下降了

近 48%。Ozturk 等<sup>[3]</sup>和 Glacken 等<sup>[11]</sup>在不同的杂交瘤细胞培养过程中,也报道了氨对谷氨酰胺的得率系数随着氨浓度的增加而下降的现象,而在 MDCK 细胞的培养过程中,Glacken 等<sup>[15]</sup>则报道了氨对谷氨酰胺的得率系数基本上不随氨浓度的变化而变化。

丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数起初随着起始氨浓度的增加而增加,起始氨浓度为 4.28mmol/L 培养过程中丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数与起始氨浓度为 0.21mmol/L 培养过程中的丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数相比增加了 68%。在高的起始氨浓度下,随着起始氨浓度的增加而下降,起始氨浓度为 5.66mmol/L 培养过程中的丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数与起始氨浓度为 4.28mmol/L 培养过程中丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数相比下降了 22%。在杂交瘤细胞 167.4G5.3 培养过程中<sup>[3]</sup>,丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数在其实验范围内随着氨浓度的增加(0~3.75mmol/L)而单调性增加。在本实验中,丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数随着起始氨浓度从 4.28mmol/L 上升到 5.66mmol/L 而下降,有可能是因为过高的氨浓度抑制了细胞内其它代谢途径的流量,相应地降低了谷氨酸转氨酶的效率所致。

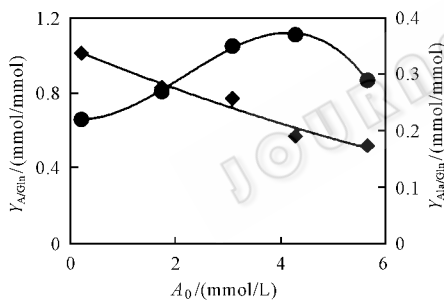


图 3 重组 CHO 细胞批培养,起始氨浓度与氨对谷氨酰胺得率系数(◆)和丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数(●)的关系  
Fig.3 Effects of initial ammonia concentrations on the yield coefficients of ammonia versus glutamine(◆) and alanine versus glutamine(●) in the batch cultures of recombinant CHO cells

氨对谷氨酰胺的得率系数随着氨浓度的增加而下降与丙氨酸对谷氨酰胺的得率系数随着氨浓度的增加(当氨浓度小于 4.28mmol/L 时)而增加存在着明显的互补性,反映了谷氨酰胺在高氨浓度下的代谢途径的变化。氨作为谷氨酸在谷氨酸脱氢酶作用下的反应产物对谷氨酸脱氢酶具有反馈抑制作用<sup>[15]</sup>,高氨浓度下,谷氨酸脱氢酶的活性受到抑制,限制了谷氨酸生成  $\alpha$ -酮戊二酸和氨的反应,相应的氨的生成也有所下降,而谷氨酸在转氨酶作用下生成  $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酸的流量相对增加,相应地丙

氨酸对谷氨酰胺的得率系数也有所提高。

在大多数动物细胞培养过程中,培养基中的谷氨酸的浓度随着培养的过程而逐渐增加<sup>[3]</sup>,图 4 为不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养过程中谷氨酸对谷氨酰胺的得率系数,结果表明,谷氨酸对谷氨酰胺的得率系数随着起始氨浓度的增加而增加。起始氨浓度为 5.66mmol/L 培养过程中谷氨酸对谷氨酰胺的得率系数较起始氨浓度为 0.21mmol/L 培养过程中谷氨酸对谷氨酰胺的得率系数增加了 1 倍。

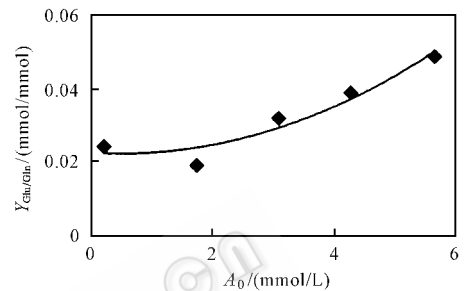


图 4 重组 CHO 细胞批培养过程中起始氨浓度对谷氨酸对谷氨酰胺得率系数的影响

Fig.4 Effect of initial ammonia concentrations on the yield coefficients of glutamate versus glutamine in the batch cultures of recombinant CHO cells

### 2.3 氨对其它氨基酸代谢的影响

在重组 CHO 细胞培养过程中,甘氨酸的代谢比较复杂,培养初期甘氨酸是消耗的氨基酸,其浓度随着培养的进程而降低,在培养的后期(对数生长期的后期和稳定期),其浓度又随着培养的进程而增加(数据未列出)。这种复杂性,不利于利用物料衡算的方法研究氨对其代谢过程的研究,因此在本文中不作讨论。另外,除了丙氨酸和谷氨酸是生成的氨基酸外,其它的氨基酸均是消耗的氨基酸。表 2 列出了在不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养 96h 时除谷氨酰胺、丙氨酸、谷氨酸和甘氨酸外所有氨基酸的浓度,在起始氨浓度为 0.21mmol/L 的批培养过程中,培养 96h 对应的氨基酸浓度明显低于其它起始氨浓度培养条件下对应的氨基酸浓度,并且在起始氨浓度为 1.74、3.09、4.28 和 5.66mmol/L 的培养过程中,培养 96h 对应的氨基酸浓度没有明显的差别。

表 3 为不同起始氨浓度下,重组 CHO 细胞批培养细胞对应于各种氨基酸的得率系数,其中由于天冬氨酸、天冬酰胺和色氨酸在培养基中的起始浓度很低,在细胞培养过程中的消耗也很少,定量分析过

表 2 不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养 96h 的氨基酸浓度 (mmol/L)

Table 2 Concentrations of amino acids at 96h in the batch culture with different initial ammonia concentrations (mmol/L)

$A_0$ (mmol/L)	0.21	1.74	3.09	4.28	5.66
Asp*	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04
Asn*	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
Aer	0.08	0.15	0.13	0.15	0.14
His	0.08	0.10	0.11	0.11	0.10
Thr	0.23	0.26	0.28	0.27	0.26
Arg	0.27	0.30	0.33	0.34	0.28
Tyr	0.11	0.12	0.13	0.13	0.12
Cys <sub>2</sub>	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07
Val	0.21	0.25	0.28	0.27	0.26
Met	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08
Trp*	0.03	0.04	0.06	0.07	0.05
Phe	0.10	0.12	0.13	0.13	0.12
Ile	0.18	0.21	0.24	0.23	0.22
Leu	0.18	0.23	0.25	0.24	0.24
Lys	0.13	0.17	0.18	0.17	0.17

\* The errors of these data were more than 20% because of too low the initial and end concentrations of these amino acids in medium. However the others were not more than 10%.

表 3 不同起始氨浓度下重组 CHO 细胞批培养细胞对氨基酸的得率系数 ( $10^7$  cells/mmol)

Table 3 The yield coefficients of cell to amino acids in the batch culture with different initial ammonia concentration ( $10^7$  cells/mmol)

$A_0$ (mmol/L)	0.21	1.74	3.09	4.28	5.66
$Y_{X/ser}$	0.78	1.25	0.78	0.65	0.39
$Y_{X/His}$	1.13	1.30	1.14	0.74	0.48
$Y_{X/Thr}$	0.79	0.86	0.86	0.55	0.32
$Y_{X/Arg}$	0.53	0.52	0.54	0.36	0.16
$Y_{X/Tyr}$	1.67	1.75	1.72	1.22	0.72
$Y_{X/Cys-Cys}$	2.54	2.59	3.22	1.67	1.27
$Y_{X/Val}$	0.63	0.67	0.64	0.41	0.24
$Y_{X/Met}$	1.82	1.71	1.52	0.85	0.65
$Y_{X/Phe}$	1.42	1.60	1.46	0.94	0.57
$Y_{X/Ile}$	0.71	0.72	0.72	0.47	0.27
$Y_{X/Leu}$	0.52	0.55	0.52	0.33	0.22
$Y_{X/Lys}$	0.63	0.68	0.66	0.42	0.30

程产生的误差导致细胞对这 3 种氨基酸的得率系数失去了有效意义,因此在表 3 中没有列出细胞对此 3 种氨基酸的得率系数。总之,在较低起始氨浓度下 (0.21 ~ 3.09mmol/L),细胞对氨基酸的得率系数变化不大,而当起始氨浓度较高时 (3.09 ~ 5.66mmol/L),细胞对氨基酸的得率系数随着氨浓度的增加而下降,并且下降的幅度均在 50% ~ 70% 之间。一方面氨浓度的提高对氨基酸的代谢有刺激作用,另一方面氨浓度的提高又抑制了细胞的生长,这样便造成了细胞对氨基酸的得率系数随着氨浓度的提高而降低的现象。

### 3 结 论

在重组 CHO 细胞培养过程中,高氨浓度下,葡萄糖的利用速率加快,并且更倾向于厌氧代谢的乳酸生成。谷氨酰胺的利用速率也随着氨浓度的增加而增加,氨浓度的提高对谷氨酸脱氢酶的活性具有一定的抑制作用,而对谷氨酸转氨酶反应有一定的促进作用(氨浓度小于 4.28mmol/L 时),总体上,谷氨酸的进一步脱氨反应受到了氨的限制,造成谷氨酸的积累。起始氨浓度的增加导致了细胞对所有氨基酸除了天冬氨酸、天冬酰胺、色氨酸和甘氨酸得率系数的下降,并且下降的幅度相差不大。

总体上,在重组 CHO 细胞的培养过程中,氨浓度的提高刺激了营养物的利用,营养物利用的加快,一方面是为了满足高氨浓度的环境中细胞维持能增加的需求,另一方面,氨浓度的提高改变了代谢途径,降低了营养物的利用效率,即单位消耗的营养物所得到的能量随着氨浓度的增加而下降,也促使了单位细胞营养物消耗的增加。

### REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Konstantinov K B, Tsai Y, Moles D *et al.* Control of long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat. *Biotechnol Prog*, 1996, **12**: 100 ~ 109
- [ 2 ] Lanks K. End products of glucose and glutamine metabolism by L929 cells. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 10093 ~ 10098
- [ 3 ] Ozturk S S, Riley M R, Palsson B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**: 418 ~ 431
- [ 4 ] Martinelle K, Haggstrom L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. *J Biotechnol*, 1993, **30**: 339 ~ 350
- [ 5 ] Racher A J, Looby D, Griffiths J B. Influence of ammonium ion and glucose on mAb production in suspension and fixed bed hybridoma

- [ 6 ] Newland M , Kamal M N , Greenfield P F *et al.* Ammonia inhibition of hybridomas propagated in batch , fed-batch and continuous culture. *Biotechnol Bioeng* ,1994 **43** :434 ~ 438
- [ 7 ] McQueen A , Bailey J. Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. *Biotechnol Bioeng* ,1990 **35** :1067 ~ 1077
- [ 8 ] SUN X M ( 孙祥明 ) , ZHANG Y X ( 张元兴 ). Effects of ammonia on the growth and EPO expression of recombinant CHO cells , *Chinese Journal of Process Engineering* ( 过程工程学报 ) 2001 , submitted
- [ 9 ] Fiorino A , Frigo G , Cucchett E. Liquid chromatographic analyses of amino and amino acids in protein hydrolysates by post-column derivatization with o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid. *J Chromatogr* ,1989 **476** :83 ~ 92
- [ 10 ] Miller W M , Wilke C R , Blanch H W. Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioproc Eng* ,1988 **3** :113 ~ 122
- [ 11 ] Glacken M W. Catabolic control of mammalian cell culture. *Bio/technology* ,1988 **6** :1041 ~ 1050
- [ 12 ] Trivedi B , Danforth W H. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J Biol Chem* ,1966 **241** :4110 ~ 4115
- [ 13 ] Reizter L J , Wice B M , Kennel D. Evidence that glutamine , not sugar , is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* ,1979 **254** :2669 ~ 2676
- [ 14 ] Moreadith R W , Lehninger A L. The role pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria :Role of mitochondrial NAD(P<sup>+</sup>) -dependent malic enzyme. *J Biol Chem* ,1984 **259** :6215 ~ 6221
- [ 15 ] Glacken M W , Adema E , Sinskey A J. Mathematical description of hybridoma culture kinetics :I. Initial metabolic rates. *Biotechnol Bioeng* ,1988 **32** :491 ~ 506

## Effects of Ammonia on Cell Metabolism in the Culture of Recombinant CHO Cells

SUN Xiang-Ming ZHANG Yuan-Xing\*

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

**Abstract** The effects of ammonia on metabolism of glucose , glutamine and other amino acids in the batch culture of recombinant CHO cells were investigated. It was showed that the yields of cells to glucose , glutamine and other consumed amino acids decreased with the increase of initial ammonia concentrations. In the batch culture with initial ammonia concentration 5.66mmol/L , the yields of cell to glucose and glutamine reduced 78% and 74% , respectively , compared to that with ammonia initial concentration 0.21 mmol/L , and the yields of cells to other consumed amino acids also reduced 50% ~ 70% . The metabolic pathways were altered in the cultures with the higher ammonia concentrations . The glucose consumption was more prone to form lactate by anaerobic metabolism. In the glutamine metabolic process , the reaction of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate by the glutamate dehydrogenase was inhibited by ammonia , and that by the glutamate amino transferase was facilitated. However , the yields of glutamate to glutamine decreased with the increase of ammonia concentrations , showing that the reaction of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate was inhibited by ammonia as a whole.

**Key words** animal cell culture , metabolism , CHO cell , glucose , glutamine , ammonia