

氨、乳酸对杂交瘤细胞生长代谢的影响

陈志宏 陈因良 陈建 沈翠英*

(华东化工学院生化工程研究所, 上海)

本文通过在不同浓度乳酸、氨的条件下培养 2F7 杂交瘤细胞, 考察了氨、乳酸对 2F7 杂交瘤细胞生长代谢过程的影响, 包括对葡萄糖消耗、乳酸生成、细胞活性的影响。实验表明, 当加入氨或乳酸分别达 2.5mmol/L、2.5mg/ml 时, 对细胞产生抑制作用, 5 mmol/L 氨或 5.0mg/ml 乳酸将对细胞产生严重抑制作用。

关键词 氨; 乳酸; 杂交瘤; 单克隆抗体; 细胞培养

在动物细胞培养过程中, 由于细胞的代谢作用以及谷氨酰胺的分解, 在培养液中往往要产生并积累一定浓度的氨或铵离子。人们已经认识到, 氨对于不少细胞, 如杂交瘤细胞、MDCK 细胞等具有抑制或毒性作用, 当达到一定浓度后, 会抑制细胞的生长, 甚至使细胞死亡^[1,2]。减少氨的生成或除去生成的氨则可以提高细胞产量^[3]。

关于氨在动物细胞培养中的重要影响已有不少报道^[3]。对于单抗的比生成速率, 氨的影响要比对细胞生长小得多^[4,5]。

乳酸作为葡萄糖的代谢产物之一, 被认为是另一种抑制细胞生长的代谢副产物, 乳酸的产生和积累降低了培养液的 pH, 恶化了培养环境。Thorpe 等发现当加入乳酸达到 4 mmol/L 时, 便会抑制细胞生长^[6]。

材料与 方法

(一) 材料

1. 细胞株: 2F7 杂交瘤细胞是分泌抗小细胞肺癌单克隆抗体(IgG)的鼠源杂

交瘤细胞, 由上海肿瘤研究所融合建株并提供。细胞生长温度为 37°C, pH 7.2~7.4。

2. 培养基: 专用无血清培养基以 DME/F12(1:1)为基础培养基, 另加补充因子等配制而成。细胞复苏时, 加入 1% 小牛血清, 使用前另加青霉素 50 u/ml。链霉素 50μg/ml。

(二) 实验方法

1. 细胞培养: 从培养瓶中收集生长旺盛的种子细胞, 离心弃上清, 收集细胞。以相同细胞密度分别接种至 5 个培养瓶中, 然后分别加入含 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10mmol/L NH₄Cl 的无血清培养基(其它成分相同)25ml, 于 CO₂ 培养箱中, 在相同条件(37°C, 5% CO₂, 95% 空气)下进行培养, 每天取样, 观察细胞生长情况, 计数细胞密度, 分析葡萄糖、乳酸及氨的浓度。考察 NH₄Cl 对细胞生长代谢的影响。

改变培养基中成分, 即分别加入乳酸使其浓度达 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mg/ml (其余成分相同), 重复上述实验。考

本文于 1991 年 9 月 16 日收到。

* 上海市肿瘤研究所

察乳酸对细胞生长代谢的影响。

2. 样品分析

(1) 细胞计数：取均匀混合的样品 1 ml, 加入0.1% 锥虫蓝染色, 用血球计数器计数活细胞及总细胞数。

(2) 葡萄糖：采用葡萄糖氧化酶(上海生物制品研究所)法^[7], 测OD_{595nm}值。

(3) 乳酸：采用乳酸脱氢酶(Sigma CO.)法^[7], 测OD_{340nm}值。

(4) 氨：采用尿素氮测定试剂盒(上海生物制品研究所)测定OD_{550nm}。

结果与讨论

(一) NH₄⁺对2F7细胞生长的影响

图 1 表示不同NH₄Cl 浓度下2F7细胞生长的情况, 如图所示, 初始NH₄Cl浓度为 0 时, 细胞生长较快, 3 天后, 最大细胞密度达7.8 × 10⁵ cells/ml。初始NH₄Cl浓度提高至 2.5 mmol/L 时, 细胞生长减慢, 最大细胞密度也下降至 4.1 × 10⁵ cells/ml, 表明NH₄Cl 对细胞生长产生了一定的抑制作用。当初始NH₄Cl浓度进一步提高至5.0, 7.5 和10mmol/L时, 细胞生长更慢, 细胞密度也大大降低, 甚至几乎不生长, 表明当 NH₄Cl 浓度大于 5.0 mmol/L 时, 对 2F7 细胞生长产生了严重抑制作用。由图 2 还可以看出, NH₄Cl 对细胞活性也有很大影响, 随着初始NH₄Cl浓度的提高, 细胞活性逐渐降低。

McQueen等研究了 NH₄Cl 对杂交瘤(ATCC TIB 131)细胞生长的影响^[4], 发现加入3mmol/L NH₄Cl 时, 对细胞生长影响不大, 当NH₄Cl 提高至10mmol/L时, 对细胞生长造成了严重抑制作用, 对于氨的生长抑制作用机理, McQueen等推断, 主要有两种可能：一是弱酸性NH₄⁺进入细

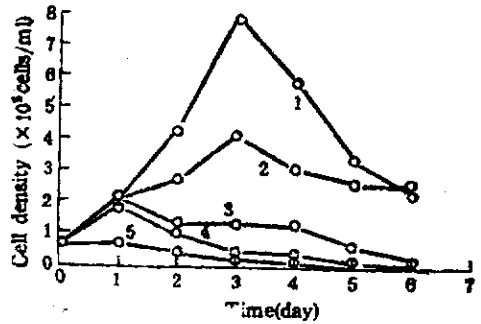


图 1 NH₄⁺对2F7细胞生长的影响
Fig 1 Effect of NH₄⁺ on 2F7 cell growth
1. 0 mmol/L; 2. 2.5mmol/L;
3. 5.0mmol/L; 4. 7.5mmol/L;
5. 10mmol/L

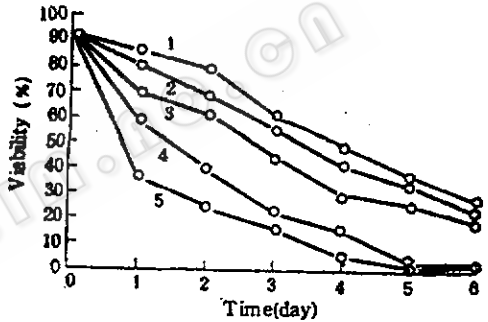


图 2 NH₄⁺对2F7细胞活性的影响(图例同图 1)
Fig.2 Effect of NH₄⁺ on 2F7 cell viability
(Legend is as in Fig 1)

胞质导致 pH 下降, 另一种情况是弱碱性 NH₃进入溶酶体, 导致 pH 上升。通过测定不同外部pH和NH₄Cl 浓度下胞内pH, 发现主要是第一种机理抑制了细胞生长。

对于不同的细胞, 氨的抑制浓度不尽相同。Reuveny等在摇瓶中培养杂交瘤(VII H-8), 4天后NH₄⁺达4.5mmol/L, 此时, 发现细胞大量死亡。直接加入NH₄Cl达2 mmol/L 时产生抑制作用, 达 4 mmol/L 时具有毒性作用^[2]。Nahapetian等在间歇培养 Vero 细胞过程中, NH₃达 2mmol/L时, 细胞停止生长^[8]。在其它研究中, 人们也发现当 NH₄⁺达 2 mmmol/L时, 细胞生长停止。

由于 NH_3 影响细胞的生长,因此,在细胞培养过程中应尽量阻止 NH_3 的产生或除去已生成的 NH_3 。 NH_3 的主要来源是谷氨酸的代谢或分解,而谷氨酸对多数细胞生长又必不可少,完全除去它是不现实的,因此,应选择尽可能低的谷氨酸。对于有些细胞,可用谷氨酸或谷氨酸盐代替谷氨酸,不过,浓度要大大提高。也可用 α -酮戊二酸代替谷氨酸。另一种方法是使用中空纤维管除去生成的氨和乳酸等有害物质,也可使用填充ZCP-50吸附剂的透析管来降低氨的浓度。

(二) NH_4^+ 对葡萄糖消耗及乳酸生成的影响

NH_4^+ 对细胞生长的影响,主要是影响了细胞的代谢。图3和图4分别表示不同 NH_4Cl 浓度下,2F7细胞的葡萄糖消耗及乳酸生成情况。如图3所示,随着初始 NH_4Cl 浓度的不断增加,2F7细胞对葡萄糖的消耗逐渐降低,相应乳酸生成浓度也逐渐减小(如图4所示)。

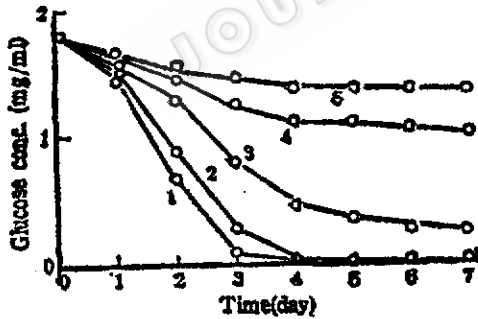


图3 NH_4^+ 对葡萄糖消耗的影响

Fig 3 Effect of NH_4^+ on glucose consumption

1. 0 mmol/L; 2. 2.5 mmol/L;
3. 5.0 mmol/L; 4. 7.5 mmol/L;
5. 10 mmol/L

McQueen等研究了 NH_4Cl 对杂交瘤细胞生长代谢的影响^[4],发现当 NH_4Cl 浓度从3.0 mmol/L提高至10 mmol/L时,细胞的葡萄糖消耗、乳酸生成均降低了。这

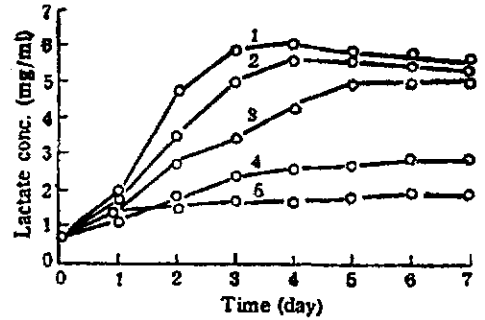


图4 NH_4^+ 对乳酸生成的影响(图例同图3)

Fig 4 Effect of NH_4^+ on lactate production
(Legend is as in Fig.3)

可能是由于 NH_4^+ 浓度的提高,降低了胞内pH,从而抑制了葡萄糖的酵解。磷酸果糖激酶是葡萄糖酵解途径的一个控制酶,它对pH具有依赖性,pH下降0.2单位就足以使之失活^[9]。Moore等也阐述了胞内pH上升(0.2单位)与糖酵解速率增加(50%)的关系^[10]。

(三) 乳酸对2F7细胞生长代谢的影响

乳酸是细胞培养过程中影响细胞生长代谢的副产物之一。图5和图6分别表示了不同浓度乳酸对2F7细胞生长及其葡萄糖消耗的影响。如图5所示,当培养基中不加入乳酸时,细胞生长迅速,培养3天,最大细胞密度达 9×10^5 cells/ml。当加入1.0、2.5 mg/ml乳酸时,细胞生长有所减慢,最大细胞密度也分别降低至 4.6×10^5 和 3.4×10^5 cells/ml,表现出乳酸对细胞生长的抑制作用。当加入乳酸浓度增至5.0和10.0 mg/ml时,细胞则几乎不生长,表现出严重的毒性作用。

对于葡萄糖的消耗,如图6所示,不加入乳酸时,细胞生长较快,对葡萄糖的消耗也较快,3天后基本耗尽。当加入1.0 mg/ml乳酸时,葡萄糖的消耗有所下降,但在培养4天后,葡萄糖仍被耗尽。

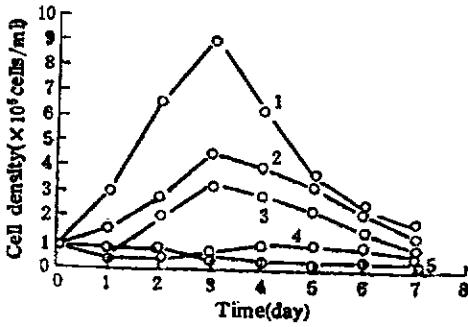


图 5 乳酸对2F7细胞生长的影响

Fig.5 Effect of lactate on 2F7 cell growth

1. 0 mg/ml; 2. 1.0mg/ml;
3. 2.5mg/ml; 4. 5.0mg/ml;
5. 10mg/ml

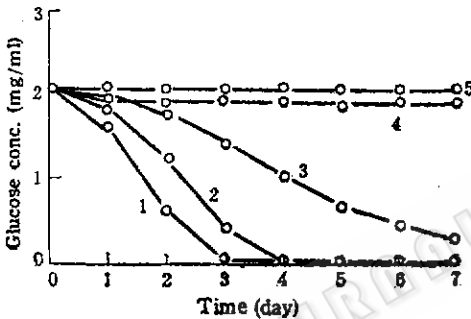


图 6 乳酸对葡萄糖消耗的影响(图例同图 5)

Fig.6 Effect of lactate on glucose consumption
(Legend is as in Fig.5)

随着加入乳酸的浓度不断增加, 细胞对葡萄糖的消耗也不断减慢, 当加入的乳酸大于5.0mg/ml时, 由于细胞几乎不生长, 因而对葡萄糖不消耗。

对于不同的细胞, 乳酸的抑制浓度不同。Thorpe等发现当乳酸加入浓度达0.36mg/ml时, 会抑制杂交瘤细胞的生长繁殖^[6]。而Reuveny等在接种 1.0×10^6 cells/ml的摇瓶中, 加入0.5~2.5 mg/ml的乳酸也未发现抑制作用, 细胞和单抗的产率反而增加了, 但高于2.5mg/ml则表现出毒性作用^[2]。Velez等还发现当葡萄糖差不多耗尽时, Ⅷ H-8细胞还能利用乳酸^[11]。对于2F7细胞的培养, 也发现类似的现象, 如图3和图4所示, 当葡萄糖即将耗尽时, 培养液中的乳酸均略有下降。

为了减少乳酸的产生对细胞生长造成不利影响, 可以从乳酸的主要来源——葡萄糖着手, 例如, 用果糖或半乳糖代替葡萄糖以降低乳酸的生成。另外, 在培养过程中应注意控制溶解氧的水平, 以免由于缺氧而致使葡萄糖进入厌氧呼吸途径而产生大量乳酸。

参 考 文 献

- [1] Butler, M. et al.: *J. Biotechnol.*, 1:187-196, 1984.
- [2] Reuveny, S. et al.: *J. of Immunol. Methods*, 86:53-59, 1986.
- [3] Spier, R. E. and Graffiths, J. B.: *Morden. Approaches to Animal Cell Technology*, Butterworth & Co, UK, 1987.
- [4] McQueen, A. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 35:1067-1077, 1990.
- [5] Negrotti, M. et al.: *Proc. Second Engineering Foundation Conference on Animal Cell Culture Santa Barbara, CA, USA, Dec. p65, 1989.*
- [6] Thorpe, J. S. et al.: Paper presented at ESACT 8, Tiberias.
- [7] 陈志宏等: *生物工程学报*, 7(2):159-163, 1991.
- [8] Nahapetian, A. T. et al.: *J. Cell Sci.*, 81:85-103, 1986.
- [9] Busa, W. B.: In *Na⁺/H⁺ exchange, Intracellular pH and Cell Function* (Aronson, P. C. and Boron, W. F. eds.), Academic, New York, p291, 1986.
- [10] Moore, R. D. et al.: In *Intracellular pH: Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Function* (Nuccitelli, R. and Deamer, D. W. eds), Liss, A. R., New York, p385, 1982.
- [11] Velez, D. et al.: *J. of Immunol. Methods*, 86:45-52, 1986.

Effect of Ammonium and Lactate on Hybridoma Cell Growth and Metabolism

Chen Zhihong Chen Yinliang Chen Jian Shen Cuiying
(*Research Institute of Biochemical Engineering, East China
University of Chemical Technology, Shanghai*)

Ammonia and lactate are by-products of animal cells. Both of them have significant effects on cell growth and metabolism. Investigating the effects of ammonia and lactate on cell growth and metabolism is a prerequisite for large-scale cell culture and optimization. In this paper, The effects of ammonium and lactate on 2F7 hybridoma cells which produce IgG monoclonal antibody against small cell lung cancer were investigated, including lactate production. The results suggested that 2.5 mg/ml lactate or 2.5 mmol/L ammonium was inhibitory to 2F7 cell growth, and that even severe inhibitions were observed when lactate or ammonium was increased to 5.0 mg/ml or 5.0 mmol/L respectively.

Key words

Ammonia; lactate; hybridoma; monoclonal antibody; cell culture