

CHO 细胞生长过程的建模及仿真研究

罗荣富¹ 杜仰光² 邵惠鹤¹

(上海交通大学自动控制系, 上海 200030)¹

(华东理工大学自动化研究所, 上海 200237)²

摘要 运用了一种以代谢协调和代谢调节概念为基础的生物工艺过程建模思想, 以实际过程为背景建立了中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 的微载体培养生长模型, 进行了仿真研究并得出了一些有意义的结论。

关键词 CHO 细胞培养, 微载体, 数学模型, 仿真

动物细胞的大规模人工培养, 是近 20 年来发展起来的一门新技术^[1]。近年来, 这方面的研究工作已经取得了长足的进展, 其中包括培养技术的更新以及过程数学模型的建立等^[2-4]。大多数动物细胞均属贴壁依赖性细胞, 其培养需要一个很大的依附表面, 因此目前大多采用能提供大比表面积的方式, 其中微载体培养技术被认为是最有前途、最有潜力的系统^[1,2]。本文报道了中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 的微载体培养生长模型的建立, 采用了一种以代谢协调和代谢调节概念为基础的生物工艺过程建模思想^[3]。

1 过程描述

1.1 细胞

中国仓鼠卵巢细胞 (简称 CHO), 它属于传代细胞系, 培养时 pH 值控制在 7.0—7.4 之间, 温度控制在 37℃。该细胞能够产生乙肝抗原 HB_sAG。

1.2 微载体

选用 Cytodex3, 使用前用磷酸缓冲液 (PBS) 浸泡和洗涤, 然后于 121℃ 高温灭菌, 再用培养基浸泡 24 小时。

1.3 培养基

选用合成培养液 DMEM, 外加抗生素, 小牛血清和其它物质。

1.4 细胞培养反应器

选用美国 New Brunswick Scientific 公司生产的 CelliGen 细胞反应器, 其容量为 5L, 其结构如图 1 所示。CelliGen 的搅拌系统是经过特殊设计的低剪切力系统, 可以构成微载体-悬浮液的循环, 又不致于伤害附着于微载体上的细胞, 而且细胞的供氧是按照气泡→培养液→细胞的方式进行的, 细胞不会与罐笼中产生的气泡直接接触。为了更好地分析其传质过程, 培养器的气液相被分为四相, 即: 培养器顶部气相 G₁、培养液液相 L₁、气体交换器中气泡 G₂、气体交换器中的培养液 L₂ (无微载体)。此外, 在建模过程中还做

了如下假设,即通入培养器的四种混合气体总流量保持恒定;培养过程中温度、压力均保持恒定。

2 建模思路

生物工艺过程可以用一个协调系统的模型结构来表示⁽³⁾,如图 2 所示,它由三个子模型构成:代谢协调器、反应模型和代谢调节器。与代谢协调器和反应模型有关的信息包括:细胞生长速率、基质吸收速率、产物形成速率、代谢过程的化学计量关系、各代谢途径的动力学性质以及它们之间的相互钳制作用。关于过程动态性质和代谢调节方面的信息则由代谢调节器模型来描述。

3 CHO 细胞的微载体培养生长模型的建立

首先考虑以下限制性因素:

基质吸收速率: $0 \leq q_s \leq \min$

$$(K_s \cdot S, q_{s,max}) \quad (1)$$

$$\text{摄氧率: } 0 \leq q_o \leq K_o \cdot O_r \quad (2)$$

$$\text{微载体表面积限制: } 0 \leq X \leq X_{max} \quad (3)$$

$$\text{细胞合成能力限制: } 0 \leq \mu \leq \mu_{max} \quad (4)$$

细胞生长过程可以表示为:在(1) — (4)式约束下的比生长速率最大的过程,即: $\mu \rightarrow \text{maximum}$,这也是代谢协调器的目标。下面建立过程反应模型:

细胞生长模型:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu X \\ X(0) = X_0 \end{cases} \quad (5)$$

基质消耗模型:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = -\mu X Y_{S/X} \\ S(0) = S_0 \end{cases} \quad (6)$$

产酸率模型(假设产酸率与细胞生长率成正比):

$$\frac{dC_A}{dt} = Y_{C/X} Y_{L/C} \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

为了描述过程动态性质,有必要建立传质模型:

L_1 相中氧平衡模型:

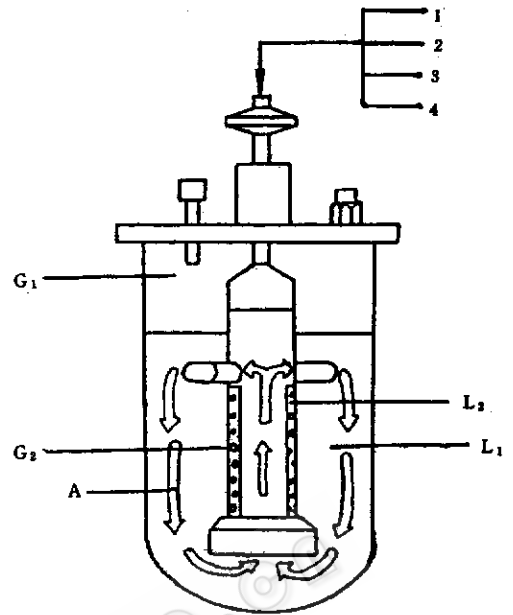


图 1 CelliGen 结构简图

Fig. 1 Diagram of CelliGen's structure

1. AIR; 2. O₂; 3. N₂; 4. CO₂

A. Micro-carriers system

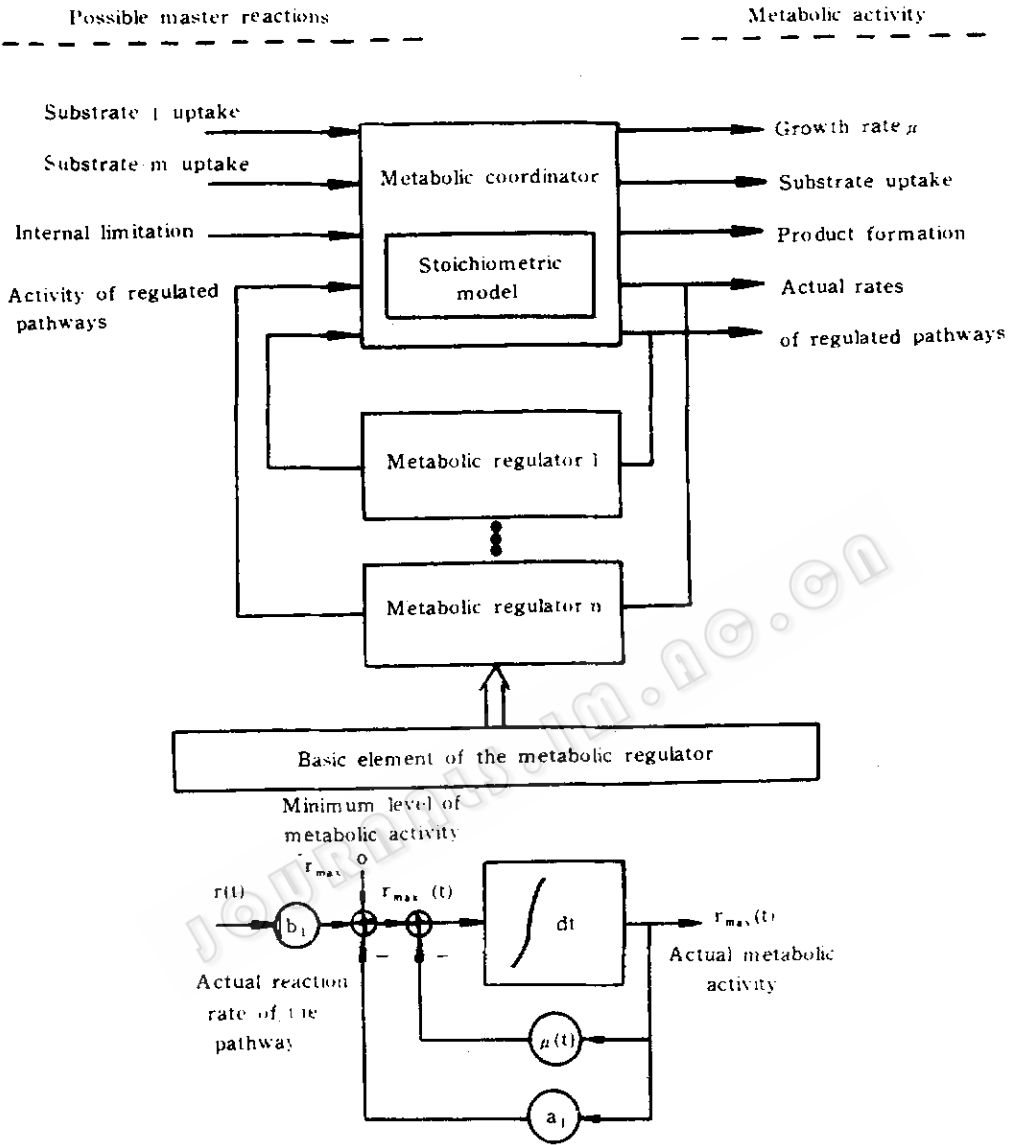


图 2 用控制回路系统表示的代谢过程

Fig. 2 Metabolic process expressed by control loop systems

$$\begin{cases} \frac{dPO_2^I}{dt} = OTR_{z1} + OTR_T - OUT/O_{r0} \\ PO_2^I(0) = PO_{20}^I \end{cases} \quad (8)$$

其中，L₂ 到 L₁ 的氧传递速率为：

$$OTR_{z1} = K_{La0}^I [PO_2^I(t) - PO_2^I(t)]$$

G₁ 到 L₁ 的氧传递速率为：

$$OTR_T = K_{La0}^r \left\{ \frac{PX_{Or}(t)}{H_{O_2} \cdot O_{r0}} - PO_2^I(t) \right\}$$

氧吸收速率为:

$$OUR = \mu \cdot X \cdot Y_{OIX}$$

L₂ 相中氧平衡模型:

$$\begin{cases} \frac{dPO_2^2}{dt} = OTR(t) - OTR_{21}(t) \\ PO_2^2(0) = PO_{20}^2 \end{cases} \quad (9)$$

其中, G₂ 到 L₂ 的氧传递速率为:

$$OTR(t) = K_{Lac} \left\{ \frac{P}{H_{O_2} \cdot O_{FO}} \cdot \frac{[X_{OR}(t) + 4X_{ORR}]}{5} - PO_2^2(t) \right\}$$

同样, L₁ 和 L₂ 中二氧化碳平衡模型为:

$$\begin{cases} \frac{dC_c^1}{dt} = CPR(t) - CTR_T(t) - CTR_{21}(t) \\ C_c^1(0) = C_{c0}^1 \end{cases} \quad (10)$$

$$\begin{cases} \frac{dC_c^2}{dt} = CTR_{21}(t) - CTR(t) \\ C_c^2(0) = C_{c0}^2 \end{cases} \quad (11)$$

其中, G₁ 到 L₁, L₂ 到 L₁, G₂ 到 L₂ 的二氧化碳传递速率分别为:

$$CTR_T(t) = K_{Lac}^T \left\{ C_c^1(t) - \frac{PX_{CT}(t)}{H_{CO_2}} \right\}$$

$$CTR_{21}(t) = K_{Lac}^{21} [C_c^1(t) - C_c^2(t)]$$

$$CTR(t) = K_{Lac} \left\{ C_{c2}(t) - \frac{P(X_{CT}(t) + 5X_{CTE})}{6H_{CO_2}} \right\}$$

G₁ 相中氧气和二氧化碳的摩尔分数方程如下:

$$\begin{aligned} \frac{dX_{OR}(t)}{dt} = \frac{RTV_F}{PV_r} \left\{ \frac{PV^k}{RT} (X_{ORR}(t) - (X_{OR}(t))) - \frac{CTR + CTR_{21} \cdot V_F/V_F}{M_{CO_2}} X_{OR}(t) \right. \\ \left. - \frac{OTR_T(t) + OTR_{21}(t) \cdot V_F/V_F}{M_{O_2}} (1 - X_{OR}) \right\} \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \frac{dX_{CT}(t)}{dt} = \frac{RTV_F}{PV_r} \left\{ \frac{PV^k}{RT} (X_{CT}^k(t) - (X_{CT}(t))) + \frac{OTR_T(t) + OTR_{21}(t) \cdot V_F/V_F}{M_{O_2}} X_{CT}(t) \right. \\ \left. + \frac{CTR_T(t) + CTR_{21}(t) \cdot V_F/V_F}{M_{CO_2}} (1 - X_{CT}(t)) \right\} \end{aligned} \quad (13)$$

最后, 关于基质消耗的代谢调节器如下:

$$\frac{dq_{smax}}{dt} = (A_1 - \mu)q_{smax} + B_1(q_s + q_{smax0}) \quad (14)$$

至此, (1) — (14) 式就构成了 CHO 细胞的微载体培养生长模型。

4 仿真与讨论

上述模型的仿真研究结果如图 3 所示 (模型参数通过辨识得到, 详见文献 [4])。首

先,从图中可以得出以下的定性结论:(1)在基质更新周期之内,CHO细胞的数目是单调递增的;(2)在相同的周期内,基质浓度和溶氧强度是单调递减的;(3)在基质更新之后,细胞生长有一段明显的滞后;(4)当微载体表面被全部占满时,细胞数目不再增长。

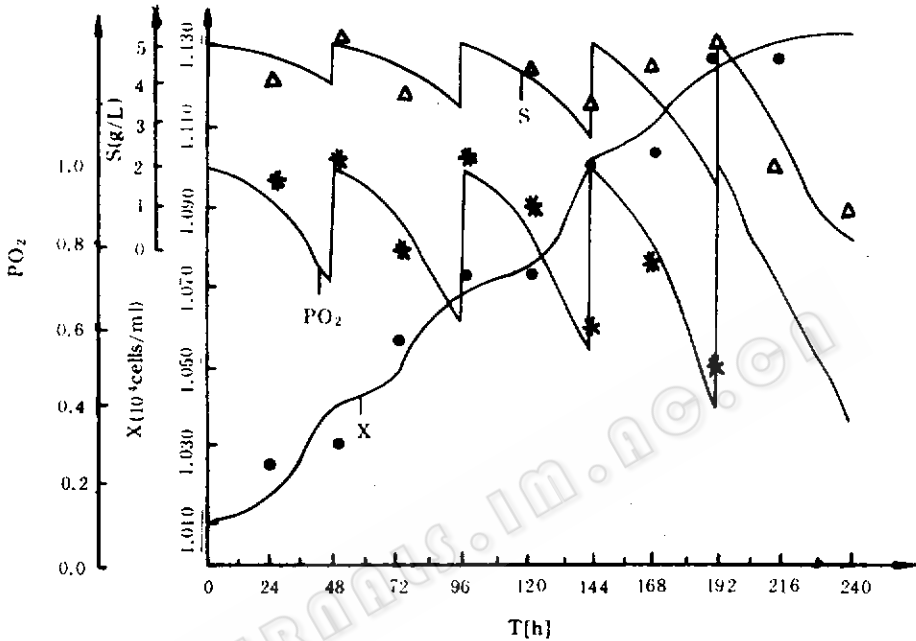


图3 CHO细胞生长模型仿真结果

Fig. 3 Simulation results of CHO cell growth model

这些结论与有关实验结果^[2]是一致的。此外,从图3还可看出:仿真计算值与实测值(分别以 Δ 、*、 \cdot 表示)比较接近。于是我们可以得出结论:基于代谢协调和代谢调节概念的建模思想是可行的,它对于其它生物工艺过程动态模型的建立有重要的参考价值。

两个值得注意的问题是:(1)模型的建立是有条件的,使用时也就有其各自的局限性,在本文的建模过程中也做了一些假设,但这些假设并不影响建模思想的一般性;(2)该模型对未知系统的适应性尚有待进一步考查。

参 考 文 献

- [1] 陈因良、陈志宏. 细胞培养工程, 上海: 华东化工学院出版社, 1992年.
- [2] 袁颂兰. 微载体动物细胞培养过程的建模、辨识与控制, 华东化工学院硕士论文, 1989年.
- [3] Bellgardt, K., -H. 全国首届生化过程模型化与控制学术讨论会论文集, 上海: 华东化工学院出版社, 1989年, pp. 26-44.
- [4] Du, Y G Luo, Luo, R F and Shao. H H A model for animal cells growth process, the 2nd international biotechnology conference, May 6-9, 1990, Seoul.

符号说明

A_1 : 动态结构参数 (h^{-1})	q_s : 基质比消耗速率 $(g \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1})$
B_1 : 动态结构参数 (h^{-1})	q_{oF} : 溶氧比吸收速率 $(g \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1})$
C_{A1} : L_1 中乳酸浓度 $(g \cdot L^{-1})$	q_{smax} : 基质最大比消耗速率 $(g \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1})$
C_1^* : L_1 中溶 CO_2 浓度 $(g \cdot L^{-1})$	R : 通用气体常数
C_2^* : L_2 中溶 CO_2 浓度 $(g \cdot L^{-1})$	S : L_1 中基质浓度 $(g \cdot L^{-1})$
H_{O_2} : O_2 的亨利系数	T : 培养温度 (K)
H_{CO_2} : CO_2 的亨利系数	μ : 细胞比生长速率 (h^{-1})
K_o, K_s : Blackman 常数	μ_{max} : 最大比生长速率 (h^{-1})
K_{CO} : 呼吸熵	V_F : L_1 液体体积 (L)
K_{La_1} : L_2 与 L_1 的氧体积传递系数 (h^{-1})	V'_F : L_2 液体体积 (L)
K_{La_2} : G_1 与 L_1 的氧体积传递系数 (h^{-1})	V_T : G_1 气体体积 (L)
K_{La_3} : G_2 与 L_1 的氧体积传递系数 (h^{-1})	V_E : 进入 CelliGen 的气体速率 $(L \cdot h^{-1})$
K_{La_4} : L_2 与 L_1 的 CO_2 体积传递系数 (h^{-1})	X : L_1 中细胞浓度 $(cells \cdot L^{-1})$
K_{La_5} : G_2 与 L_1 的 CO_2 体积传递系数 (h^{-1})	X_{max} : L_1 中最大细胞浓度 $(cells \cdot L^{-1})$
K_{La_6} : G_2 与 L_2 的 CO_2 体积传递系数 (h^{-1})	X_{OT} : G_1 中 O_2 的摩尔分数
M_{O_2} : O_2 的分子量 $(g \cdot mole^{-1})$	X_{CT} : G_1 中 CO_2 的摩尔分数
M_{CO_2} : CO_2 的分子量 $(g \cdot mole^{-1})$	X_{OTE} : 通气中 O_2 的摩尔分数
O_F : L_1 中溶 O_2 浓度 $(g \cdot L^{-1})$	X_{CTE} : 通气中 CO_2 的摩尔分数
O_{F_1} : L_1 中溶 O_2 的饱和浓度 $(g \cdot L^{-1})$	$Y_{o/X}$: 细胞对 O_2 的消耗系数 $(g \cdot cell^{-1})$
P : 生物反应器压力 (Pa)	$Y_{s/X}$: 细胞对基质的消耗系数 $(g \cdot cell^{-1})$
P_{O_1} : L_1 中溶 O_2 强度	$Y_{C/X}$: 细胞对 CO_2 的产生系数 $(g \cdot cell^{-1})$
P_{O_2} : L_2 中溶 O_2 强度	$Y_{L/C}$: 比例系数

Modelling and Simulation of CHO Cells Growth Process

Luo Rongfu¹ Du Yangguang² Shao Huihe¹*(Department of Automatic Control, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200300)¹**(Research Institute of Automatic Control, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)²*

Abstract In this paper, the metabolic coordination and metabolic regulation based methodology for the model development of biotechnological processes is applied to the growth process of the Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The mathematical model is proposed for the process which is carried out in a commercial bioreactor. Simulation research is performed and some discussions are given.

Key words CHO cells cultivation, micro-carriers, mathematical models, simulation