

# 肉毒碱促进 WUT3 细胞生长及单克隆抗体合成

陈国豪 徐殿胜 陆 兵 张元兴 俞俊棠

(华东理工大学生物化学工程系 上海 200237)

**摘 要** 利用鼠鼠杂交瘤细胞(WUT3)研究培养基中不同浓度的肉毒碱对细胞生长、葡萄糖利用速率、乳酸、氨、单克隆抗体生成速率的影响。结果表明,增加肉毒碱浓度(从0%~0.04%),细胞生长速率增加;葡萄糖消耗,乳酸生成,氨生成速率降低;单抗生成速率增加,当肉毒碱浓度达0.04%时,细胞最高密度增加1/3,葡萄糖消耗速率减少1/3,氨生成速率降低约40%,单抗生成速率增加约50%,乳酸生成速率降低50%,消耗的葡萄糖进入TCA循环比例增加,当葡萄糖浓度降低到0.4g/L时,葡萄糖已不再被利用。

**关键词** 肉毒碱,单克隆抗体,葡萄糖,乳酸,氨

杂交瘤细胞培养生产的单克隆抗体已被广泛应用于疾病的诊断与治疗,分子生物学探针,亲和层析,疫苗等,但由于细胞培养及后处理的复杂性,因此单抗生产成本相当高,研究细胞水平的增加细胞分泌单抗量对于工业化生产具有重要意义<sup>[1]</sup>。提高单抗分泌水平,降低成本,已成为满足临床大量需求的先决条件,寻求廉价,易得,易于分离纯化的免疫蛋白生成刺激因子(IPSF)以成为本行业的研究焦点<sup>[2,3]</sup>。据报道,肉毒碱可以刺激细胞生长<sup>[4]</sup>,它是脂肪酸代谢中脂肪酸酰基通过线立体内膜的携带体,它也可能影响细胞代谢中其它反应<sup>[5]</sup>。WUT3细胞是鼠鼠杂交瘤细胞,其分泌单抗为人体器官肾脏移植时抗人的特异性排斥反应单抗,同时又可作为诊断T3细胞的单抗。目前只有美国有此产品,命名为OKT3单抗。本文报道培养基中不同浓度的肉毒碱对细胞生长、细胞代谢中主要能源葡萄糖利用及代谢产物氨、乳酸形成及单克隆抗体形成的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞系

WUT3细胞是鼠鼠杂交瘤细胞株。产生单抗为类OKT3,由卫生部武汉生物制品研究所建株并提供。

### 1.2 培养基

RPMI1640培养基(Sigma Co.),肉毒碱,生化级(Sigma Co.),小牛血清(自制)。

### 1.3 细胞培养

取对数生长期WUT3细胞作种子,培养于RPMI1640培养基中,添加5%小牛血清,100 unit/ml青霉素及50 $\mu$ g/ml链霉素,于37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。培养中添加不同

国家85攻关资助课题。

本文于1995年3月31日收到。

浓度肉毒碱,每隔 24h 取样分析,重复 3 次,取平均值。

## 1.4 分析方法

1.4.1 细胞计数: 苔酚蓝染色法<sup>[6]</sup>, 血球计数板活细胞计数。

1.4.2 葡萄糖分析: 辣根过氧化物酶法<sup>[7]</sup>, 上海生物制品研究所生产试剂盒。

1.4.3 乳酸分析: 乳酸脱氢酶法<sup>[8]</sup>, Sigma 试剂盒。

1.4.4 氨分析: 脲酶 Berthelot 法<sup>[9]</sup>, 上海生物制品所生产试剂盒。

1.4.5 单抗分析: 采用免疫单扩扩散分析, 以标准单抗(Sigma)作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞生长

在 RPMI1640 培养基中添加肉毒碱, 使其浓度分别为 0, 0.01, 0.015, 0.02, 0.03, 0.04%, 对细胞生长的影响如图 1 所示。结果表明, 肉毒碱促进细胞生长, 当肉毒碱浓度过到 0.04% 时, 其细胞生长的最高密度达到  $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ , 而无肉毒碱时仅为  $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ , 其细胞的比生长速率增加 1/3。这可能是由于肉毒碱参与脂肪酸代谢, TCA 循环及与 DNA、RNA 合成有关。这一结论与国外有关报道上相吻合。

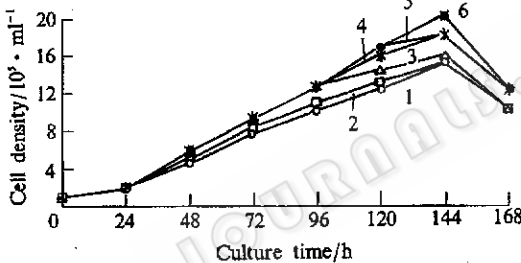


图 1 肉毒碱浓度对细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of carnitine concentration on cell growth

Conc. / %

1. 0.0, 2. 0.01, 3. 0.015, 4. 0.02, 5. 0.03, 6. 0.04

### 2.2 肉毒碱对细胞代谢及产物生成的影响

2.2.1 添加肉毒碱对葡萄糖消耗影响: 结果表明, 不论添加多少肉毒碱, 其整个过程中葡萄糖总的消耗量基本相同, 即从起始的 2.0g/L 到最终结束时的 0.4g/L, 但由于其细胞密度不同, 所以葡萄糖的比消耗速率在高肉毒碱浓度时较低, 当肉毒碱浓度为 0.04% 时其葡萄糖比消耗速率比对照减少 1/3。当葡萄糖浓度达到 0.4g/L 时, 葡萄糖浓度不再变化, 即葡萄糖不再被利用, 而此时细胞生长已达到高峰前期, 即将进入死亡期。此时, 葡萄糖浓度已限制细胞生长, 因此当

葡萄糖浓度达到 0.4g/L 时, 应当更换培养基。

2.2.2 加入肉毒碱对乳酸生成的影响: 乳酸生成变化如图 2 所示。结果表明, 当肉毒碱浓度高时, 其乳酸生成量较低。肉毒碱浓度为 0.04% 时, 其乳酸终点浓度为 1.0g/L, 而对照为 1.6g/L, 因此肉毒碱限制乳酸生成, 乳酸比生成速率减少 1/2。

葡萄糖是细胞生长及代谢的主要能源, 其代谢过程为葡萄糖-丙酮酸-(A)-进入 TCA 循环-二氧化碳, 水, 细胞成分, 代谢物-(B)-进入酵解途径-乳酸

反应 A、B 为两个竞争性反应, 进入 TCA 循环, 增加细胞生长; 而生成乳酸限制细胞生长。由葡萄糖消耗及乳酸生成结果表明, 加入肉毒碱后, 在相同葡萄糖消耗量下生成乳酸量减少, 因此增加消耗葡萄糖进入 TCA 循环比例, 当肉毒碱浓度为 0.04% 时, 增加量

约为 50%，这可能正是肉毒碱促进细胞生长的主要原因。

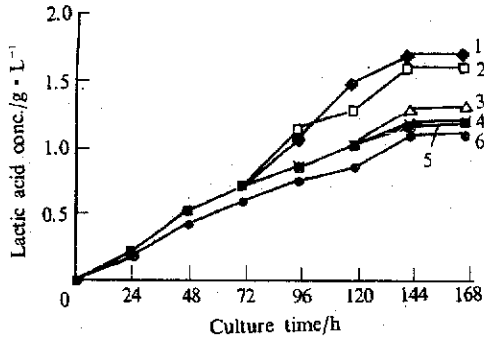


图 2 肉毒碱浓度对乳酸生成的影响

Fig.2 Effects of carnitine concentration on lactic acid production

Legends are the same as Fig. 1

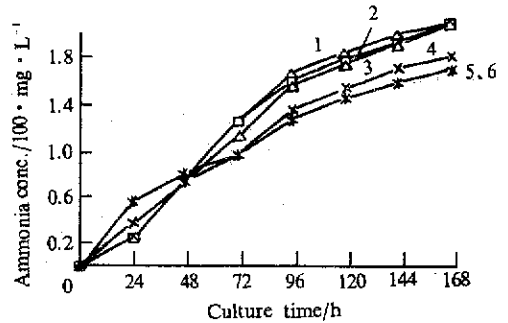


图 3 肉毒碱浓度对氨生成的影响

Fig.3 Effects of carnitine concentration on ammonia production

Legends are the same as the Fig. 1

2.2.3 添加肉毒碱对氨生成的影响：通常氨的形成是由另一主要能源谷氨酰胺降解及氨基酸消耗所致，加入肉毒碱后氨的生成变化如图 3 所示。结果表明，添加肉毒碱，氨的生成浓度降低，即肉毒碱限制氨的生成。当加入的肉毒碱浓度达到 0.04% 时，氨的比生成速率降低约 40%，因此肉毒碱减少谷氨酰胺及其它氨基酸的降解，降低了营养物质的利用速率，使其营养物质在整个培养过程得以均衡利用，而且限制生长的代谢产物乳酸，氨处于低浓度，因此促进细胞生长，这一结论与 Typlt H 结论相一致<sup>[4]</sup>。

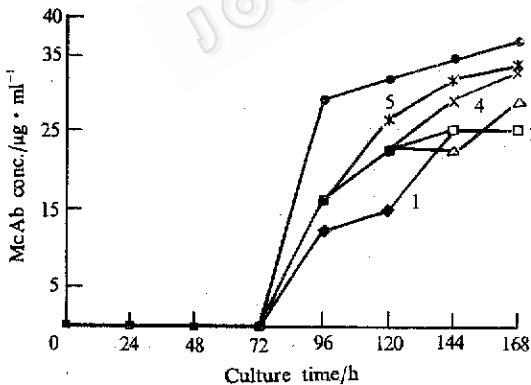


图 4 肉毒碱浓度对单抗生成的影响

Fig.4 Effects of carnitine concentration on McAb production

Legends are the same as Fig. 1

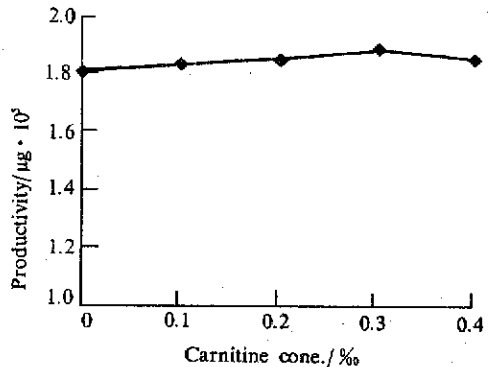


图 5 肉毒碱浓度对单抗产率的影响

Fig.5 Effects of carnitine concentration on productivity

Legends are the same as Fig. 1

### 2.3 肉毒碱对单抗生成的影响

培养基中加入肉毒碱后单抗生成变化如图 5 所示,结果表明,肉毒碱促进单抗生成,单抗生成的最高峰迟于细胞的最高密度,即使细胞进入了死亡期,也仍然有单抗生成。无肉毒碱时,单抗的最高浓度为  $25.4\mu\text{g/ml}$ ,而肉毒碱浓度为  $0.04\%$  时,其单抗浓度达到  $37.2\mu\text{g/ml}$  单抗生成量增加  $1/2$ 。但是,从细胞水平分析,如图 6 所示,单抗的比生成速率几乎相同,即不论有无肉毒碱,每个细胞生成单抗的水平相同。肉毒碱并不能提高细胞生成单抗的产率,其促单抗生成的原理是基于促进了细胞生长,提高了总的细胞密度。

## 3 结 论

肉毒碱促进细胞生长,但不能提高细胞生成单抗的产率。因此,在培养基中应当加入肉毒碱,加入浓度以  $0.04\%$  为宜。尤其是在连续灌注培养时,在细胞培养阶段,加入肉毒碱,可以在较短时间内使细胞达到一定密度,尽早进入单抗分泌期,缩短整个生产周期,可以提高经济效益。

### 参 考 文 献

- [1] Katherine L M. *Biotechnology Prog*, 1991, 7: 445~454.
- [2] Koji Yamada Ichiro Ikeda A, Takuya Sugahara *et al.* *Agric Biol Chem*, 1989, 53(11): 2987~2991.
- [3] 村上浩纪, 山田耕路, 桥爪秀一. 公开特许公报(A), 日本, 1990, 平 2-257892.
- [4] Typlt H, Claus R A, Nitsche K. *Journal of Biotechnology*, 1991, 18: 173~176.
- [5] 沈 同, 王镜岩, 赵邦梯等. 生物化学, 北京: 人民教育出版社, 1980, pp: 490~492.
- [6] 鄂 征. 细胞培养技术, 北京: 人民卫生出版社, 1981, 103.
- [7] George G G 著, 缪南辉, 陈石根译, "酶分析手册". 上海: 上海科学技术出版社 1982, 93~95.
- [8] Miller W M, Blanch H W, Wilke C R. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32: 947~965.
- [9] 董树沛, 陈因良. 生物工程学报, 1992, 8(4): 389~393.

### Enhanced WUT3 Cell Growth and Antibody Production by Using Carnitine

Chen Guohao Xu Diansheng Lu Bing Zhang Yuanxing Yu Juntang

(Department of Biochemical Engineering

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**Abstract** The effects caused by carnitine of different concentration on cell growth, glucose utilization rate, lactic acid, ammonia production and McAb production rate have been studied by using mouse-mouse hybridoma WUT3 cells. It is shown that with the increase of carnitine concentration (ranged from  $0\% \sim 0.04\%$ ) the rate of cell growth is increased, however the glucose utilization, lactic acid and ammonia production rate are decreased. When the carnitine concentration is risen to  $0.04\%$ , the maximum cell density is increased one-third, the rate of glucose utilization is decreased one-third, lactic acid production rate is decreased  $50\%$ , and ammonia production rate is decreased about  $40\%$ . But monoclonal antibody rate is increased about  $50\%$ , and the proportion of used glucose entering TCA circle is increased. When the glucose concentration is decreased to  $0.4\text{g/L}$ , it will not be utilized further.

**Key words** Carnitine, monoclonal antibody, glucose, lactic acid, ammonia