

半连续灌注培养中杂交瘤细胞的生长和代谢

史亚玲 张元兴* 张立 沈红 张嗣良

(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 考察了在半连续灌注培养中 WuT_3 杂交瘤细胞在不同灌注速率下细胞生长的动态变化,培养基中主要基质的消耗和代谢物的生成。当灌注速率 D 从 1.0/d 升高到 2.0/d 时,乳酸得率系数 $Y_{lac/glu}$ 降低 18%,氮得率系数 $Y_{amm/gln}$ 降低 40%,丙氨酸得率系数 $Y_{ala/gln}$ 升高 58%,甘氨酸得率系数 $Y_{gly/gln}$ 基本恒定。说明在灌注速率升高的条件下,细胞会调整代谢机制,丙酮酸和过量的谷氨酸通过转氨作用生成丙氨酸而非甘氨酸。

关键词 半连续灌注培养,灌注速率,杂交瘤,细胞培养

中图分类号 Q953.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0051-04

作为诊断试剂及治疗用途的单克隆抗体有着很大的市场。据报道,在 1992 年,单抗在美国的年销售额达 6 亿美元,预计在 1998 年将达 40 亿美元。正是这样的前景驱使人们开发单克隆抗体的高产量系统,以减少生产设备投资和操作费用。在 80 年代和 90 年代初,人们主要致力于新型反应器的开发,但随着以搅拌罐、静止单层培养及中空纤维为主的培养系统的建立,新型反应器开发的热浪已经降温^[1]。由于最终单抗的产量决定于细胞的密度、培养时间和单抗的比分泌速率,故越来越多的研究着重于细胞代谢和生理状况,保证产品质量和浓度。

杂交瘤细胞生产单克隆抗体有很多种方式,灌注培养和补料培养是发展的主流,然而也有很多其他可供选择的方式,如半连续灌注培养^{2,3}(重复批培养)、循环批培养、恒化培养等。本文采用半连续灌注培养方式,考察了在不同灌注速率下杂交瘤细胞的代谢情况。

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养基

WuT_3 鼠鼠杂交瘤细胞株由卫生部武汉生物制品研究所建立并提供,其生产的单克隆抗体用于预防与治疗肾移植的排斥反应。本文采用的自制的无血清培养基(SFM1),是在 RPMI 1640 的基础上添加氨基酸、维生素、转铁蛋白、一些无机离子及其他

成分形成的。

1.2 培养方法

杂交瘤细胞静态培养采用 250mL 方瓶,装液量 20mL,培养箱温度 36.8℃,CO₂ 浓度为 5%。本文利用细胞的附壁生长,以相同的接种密度接种到方瓶中,根据灌注速率的不同,每隔 8h 收获并加入不同量的新鲜培养基,活细胞截留率可达 90%。

1.3 分析

1.3.1 细胞计数:取细胞悬液 0.5mL,加 0.5mL 台盼蓝染色液,混合均匀后用血球计数板计数。

1.3.2 生化分析:葡萄糖浓度采用 YSI2700 型选择性生化分析仪(Yellow Springs Instrument Co., Inc)测定,乳酸浓度用乳酸脱氢酶法(LDH)测定,氨浓度采用尿素氮试剂盒(卫生部上海生物制品研究所)测定,单克隆抗体浓度采用免疫单扩散法测定,氨基酸浓度采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 细胞生长和主要基质代谢

图 1 给出了活细胞密度和细胞存活率在培养过程中的变化。在所研究的条件下,提高灌注速率 D ,最大活细胞密度也随着提高,当 D 从 0.75/d 升高到 2.0/d 时,最大活细胞密度从 1.6×10^6 mL 提高到 2.5×10^6 mL。当灌注速率从 0.75/d 升高到

收稿日期:1998-10-08,修回日期:1999-03-22。

基金项目:国家“九五”科技攻关课题资助(No.95-02-03-05)。

* 通讯联系人。

1.0/d 时,细胞密度增加 16%,而当灌注速率从 1.5/d 升高到 2.0/d 时,细胞密度增加 6.8%。灌注速率太低,细胞生长曲线接近于分批培养,虽然目前公认的主要营养物质和有毒副产物并未达到制约细胞生长的水平,但达到的细胞密度低,在最大活细胞密度下维持时间短。造成这种现象的原因还有待揭

示^[4]。在 1.5/d 以上的高灌注速率下,虽然进一步提高灌注速率仍可提高最大细胞密度,但对培养过程的改善幅度已经很小,最大活细胞密度下维持时间虽有显著增加,但并不能长期稳定,细胞存活率呈连续下降趋势。

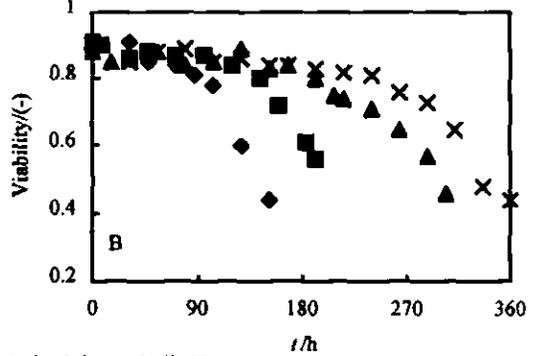
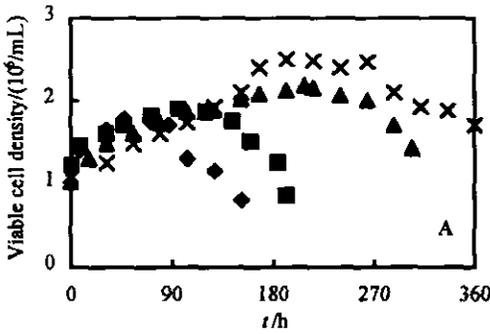


图 1 灌注速率对活细胞密度(A)和存活率(B)的作用

Fig. 1 Effect of the perfusion rates on the viable cell density (A) and viability (B)
D1 = 0.75/d (◆), D2 = 1.0/d (■), D3 = 1.5/d (▲), D4 = 2.0/d (×)

从图 2 看出,随着灌注速率的升高,残糖浓度降低,乳酸浓度也降低。在高的灌注速率下,细胞活性高,生长速率快,能维持细胞达到更高的密度,且细胞消耗葡萄糖的速率增加,导致培养基中的残糖浓度处于较低水平,这又使细胞更有效地利用葡萄糖,使之转化为乳酸的量减少。当灌注速率从 2.0/d 降到 1.5/d 时,定态时乳酸浓度升高 20%,而活细胞密度降低 6.8%,同时葡萄糖的比消耗速率降低 3%,当灌注速率从 1.0/d 降到 0.75/d 时,乳酸浓度

升高 10%,而活细胞密度降低 9%。说明在较高的灌注速率下,细胞所处的营养环境得到改善,乳酸浓度的增加对细胞的生长影响较小。图 3 给出了氨浓度随时间的变化,氨的量稳定在 0.9~1.3mmol/L,并未达到抑制细胞生长的水平^[5]。现在在很多灌注培养和补料培养中应用的策略是按营养消耗的速率进行补加,将营养水平维持在接近耗尽的情况下,乳酸和氨的浓度会大大下降,这在细胞培养中是十分重要的^[6-8]。

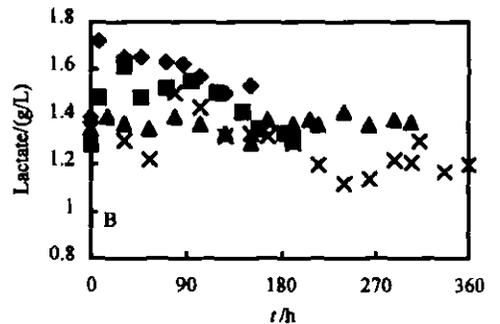
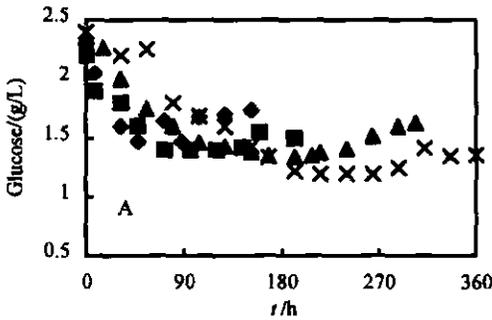


图 2 在半连续灌注培养中灌注速率对残糖(A)和乳酸浓度(B)的作用

Fig. 2 Effect of the perfusion rates on the remaining glucose (A) and lactate production (B) in the semicontinuous perfusion culture (the legends as in Fig. 1)

单抗的比生成速率随着灌注速率的升高而升高,但由于培养基停留时间的缩短,单抗浓度随着灌注速率的升高而降低(图 4)。这说明细胞所处的营养环境及较慢的生长速率对抗的比生长速率有很

大的影响。在不同的灌注速率下,当细胞生长处于定态(细胞的比生长速率为零)或死亡期(细胞的比生长速率小于零)时,其单抗的比生成速率显著升高^[4]。

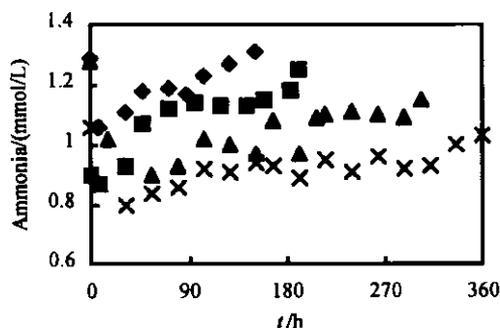


图3 灌注速率对氨生成的作用

Fig.3 Effect of the perfusion rates on ammonia production (the legends as in Fig.1)

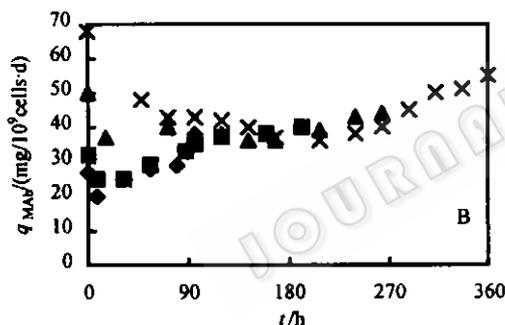
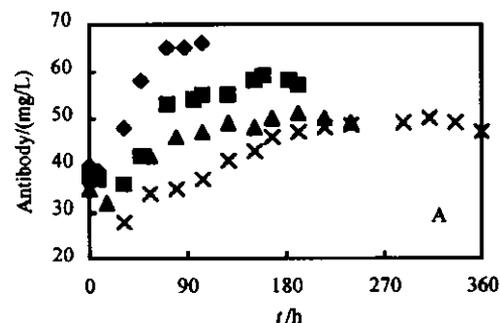


图4 灌注速率对单抗浓度(A)和比生成速率(B)的作用

Fig.4 Effect of the perfusion rates on the concentration(A) and specific production rate (B) of monoclonal antibody (the legends as in Fig.1)

与批培养和连续培养的细胞相似,细胞将调整它们的代谢机制以适应毒副产物的积累^[4,8,9]。从表1可以得出,葡萄糖生成乳酸的得率系数 $Y_{lac/glu}$ 和谷氨酰胺生成氨的得率系数 $Y_{amm/gln}$ 均随着灌注速率的升高而降低,尤其是当 D 从 0.75/d 升高到 1.0/d 时, $Y_{lac/glu}$ 降低 22%,当灌注速率从 1.0/d 升高到 2.0/d 时, $Y_{amm/gln}$ 降低 41%,这就说明灌注速率升高,细胞密度也升高,细胞生长的环境改变,导致细胞调整其代谢机制,使生成更少的乳酸和氨。

2.2 氨基酸代谢

从表2可以看出,有些氨基酸的比消耗速率在不同的灌注速率下有较大的变化,如谷氨酰胺和丙氨酸等。谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸都生成,

表1 不同灌注速率下的稳态参数

Table 1 The parameters at steady state at different perfusion rates

| Parameter | $D = 0.75$ | $D = 1.0$ | $D = 1.5$ | $D = 2.0$ |
|---------------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| $c_{glucose}/(g/L)$ | 1.60 | 1.42 | 1.38 | 1.23 |
| $c_{lactate}/(g/L)$ | 1.58 | 1.44 | 1.39 | 1.15 |
| $c_{ammonia}/(mmol/L)$ | 1.05 | 1.00 | 0.98 | 0.92 |
| $q_{glu}/(mmol/10^9 \text{ cells/d})$ | 4.08 | 4.54 | 6.17 | 6.38 |
| $q_{amm}/(mmol/10^9 \text{ cells/d})$ | | 0.63 | | 0.73 |
| $q_{lac}/(mmol/10^9 \text{ cells/d})$ | 9.64 | 8.34 | 9.5 | 9.58 |
| $Y_{amm/gln}$ | | 1.02 | | 0.60 |
| $Y_{lac/glu}$ | 2.35 | 1.83 | 1.54 | 1.50 |
| $Y_{ala/gln}$ | | 0.189 | | 0.299 |
| $Y_{gly/gln}$ | | 0.108 | | 0.107 |
| $Y_{gly/glu}$ | | 0.0148 | | 0.0167 |

表2 不同灌注速率下氨基酸的比消耗速率

Table 2 The specific consumption rates of amino acids at different perfusion rates (mmol/10⁹/d)

| | $D = 1.0$ | $D = 2.0$ |
|-----|-----------|-----------|
| Glu | -0.0735 | -0.0226 |
| Gly | -0.067 | -0.129 |
| Ala | -0.116 | -0.362 |
| Cys | 0.033 | 0.094 |
| Val | 0.03 | 0.03 |
| Met | 0.015 | 0.005 |
| Ile | 0.025 | 0.0483 |
| Leu | 0.022 | 0.0933 |
| Tyr | 0.011 | 0.0196 |
| Phe | 0.0095 | 0.00165 |
| Lys | 0.1009 | 0.227 |
| His | 0.00387 | 0.023 |
| Arg | 0.04 | 0.171 |
| Gln | 0.616 | 1.21 |
| Pro | -0.311 | -0.396 |
| Ser | 0.165 | 0.283 |
| Thr | 0.0169 | 0.0494 |

而其它氨基酸均被消耗,这些结果与文献报道一致^[10]。 $Y_{amm/gln}$ 、 $Y_{lac/glu}$ 随着灌注速率的升高而降低,而谷氨酰胺生成甘氨酸的得率系数 $Y_{gly/gln}$ 基本保持恒定,但谷氨酰胺生成丙氨酸的得率系数 $Y_{ala/gln}$ 有较大幅度的升高,说明在有效地去除废物和供给营养的情况下,丙酮酸将代谢生成更多的丙氨酸而非甘氨酸。葡萄糖和谷氨酰胺均可代谢生成丙酮酸,丙酮酸和谷氨酸通过转氨作用生成丙氨酸,因此谷氨酰胺的代谢将生成较少的氨,这也被表1中 $Y_{ala/gln}$ 的升高伴随着 $Y_{amm/gln}$ 的降低所证实。在整个培养过程中生成谷氨酸,当氨的浓度升高时,谷

氨酸将在细胞中积累以降低 $Y_{\text{amm}/\text{gln}}$, 使丙氨酸的得率系数 $Y_{\text{ala}/\text{gln}}$ 升高。这也说明细胞将调整其代谢机制, 使毒害效应降低^[4]。表 2 中谷氨酸的积累速率随着灌注速率的升高 1 倍而降低 69%, 过量的谷氨酸和丙酮酸代谢生成丙氨酸, 而没有生成甘氨酸, 所以 $Y_{\text{gly}/\text{gln}}$ 保持不变。

3 结 论

在半连续灌注培养方式下, 对 WuT₃ 杂交瘤细胞的生长和代谢的研究发现, 随着灌注速率的升高, 细胞密度升高, 而单抗浓度降低, 但单抗的比生成速

率显著升高。同时, 谷氨酰胺和丙氨酸等氨基酸的比消耗速率亦由于灌注速率的改变而有较大的改变。升高灌注速率, 丙酮酸和过量的谷氨酸通过转氨作用生成更多的丙氨酸, 使生成少量的氨, 以降低毒害作用。

尽管提高灌注速率后, 单抗的产率明显升高, 但由于高的稀释速率导致产物浓度降低, 不利于降低生成成本。在本研究的基础上, 我们将根据细胞在生长过程中各种营养的消耗来设计更高浓度的营养平衡配方, 以减少灌注速率, 使细胞密度、产物浓度和产率升高^[11]。

参 考 文 献

- [1] Hu W S, Aunins J G. *Biochem Eng*, 1997, **8**: 148~153
- [2] Drapeau D, Luan Y T, Popoloski J A. *Cytotechnology*, 1994, **15**: 103~109
- [3] Aunins J G. In *Animal Cell Technology: from Vaccines to Genetic Medicine*, 1997, 175~183
- [4] Gautam G B, Heath C A. *Appl Biochem Biotechnol*, 1995, **61**: 211~229
- [5] 沈 红. 华东理工大学硕士学位论文, 1998, 27~29
- [6] Seamans T C, Hu W S. *J Ferment Bioeng*, 1990, **70**: 241~245
- [7] Glacken M W, Fleischaker R J, Massie B. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **28**: 1376~1389
- [8] Miller W M, Blanch H W. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **32**: 947~965
- [9] Hiller G W, Clark D S, Blanch H W. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **42**: 185~195
- [10] Banik G G, Heath C A. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **48**: 289~300
- [11] Xie L, Wang D I C. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 109~113.

Growth and Metabolism of Hybridoma Cells in Semicontinuous Perfusion Cultures

SHI Ya-ling ZHANG Yuan-xing ZHANG Li SHEN Hong ZHANG Si-liang

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

Abstract The growth and metabolism of WuT₃ hybridoma cells were studied in semicontinuous perfusion cultures. The growth of cells, utilization of glucose, production of lactate, ammonia and monoclonal antibody were investigated. As the perfusion rate increased from 1.0/d to 2.0/d, the lactate yield coefficient from glucose $Y_{\text{lac}/\text{glu}}$ decreased 18%, the ammonia yield coefficient from glutamine $Y_{\text{amm}/\text{gln}}$ decreased 40%, the alanine yield coefficient from glutamine $Y_{\text{ala}/\text{gln}}$ increased 58%, the glycine yield coefficient remained almost constant. This indicates that cells would regulate their metabolic flux at higher cell density, and glutamate produced in quantity and pyruvate would turn into alanine rather than glycine by transamination. As a result, potentially toxic effects were reduced because less ammonia and lactate were produced.

Key words Hybridoma cell culture, semicontinuous perfusion, perfusion rate