

谷氨酰胺在杂交瘤细胞培养中的降解与代谢

辛艳* 杨艳 李强 孔健 曹竹安

(清华大学化学工程系 北京 100084)

关键词 谷氨酰胺, 化学降解, 杂交瘤细胞

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0478-03

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)是动物细胞培养中一种很特殊的必需氨基酸,常用培养基中其浓度在 0.7~5 mmol/L 之间,可作为细胞生长的主要能源和氮源,并参与合成嘌呤、嘧啶、蛋白质和多肽。但谷氨酰胺的水解又是培养体系中主要毒性副产物氨的重要来源,其水解途径有二(1)非酶水解即化学降解,生成氨和吡咯烷酮羧酸,这是个一级反应,其反应常数和温度、酸碱度、血清浓度有关(2)被谷氨酰胺酶所水解,生成氨和谷氨酸。在批式培养中,一部分谷氨酰胺被细胞作为能源消耗进入三羧酸循环,生成两分子氨,而参与生物量合成的谷氨酰胺并不产生游离的氨。因此,研究谷氨酰胺的化学降解规律及其在不同谷氨酰胺浓度的批次培养中对杂交瘤细胞生长的影响,对于设计最佳的谷氨酰胺给料浓度和方式,以减少氨的积累,具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞系、培养基及培养条件

本文所使用的是分泌 IgG 型抗 CEA(癌胚表面抗原)单抗的鼠-鼠杂交瘤细胞 C50,由北京生物制品研究所提供。培养基采用无糖无谷氨酰胺 DMEM(Gibco)培养时添加葡萄糖 20 mmol/L,胎牛血清 7%(天津川页)。谷氨酰胺预先配成高浓度溶液,实验时加入培养体系中,并注意使加入体系小于体系总体积的 5%。实验在方瓶中进行,环境为 37℃,5% CO₂,每批 2 个平行样,并做平行空白样。空白样的所有操作与样品相同,只是不接入细胞。

1.2 分析方法

葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺的浓度均由 SBA-40C 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)直接测定,氨浓度用靛酚蓝比色法测定,细胞计数采用 Trypan Blue 染色排除法。

2 结果和讨论

2.1 谷氨酰胺化学降解实验

图 1 描述了贮存(4℃)和培养条件下谷氨酰胺的化学降解曲线。文献报道谷氨酰胺化学降解符合一级动力学,即

$dC/dt = -kC$ (k 为降解速率常数),对实验数据进行指数拟合得到较好的相关性,结果表明 4℃ 下, k 为 0.0009 h⁻¹, $t_{1/2}$ 约为 32d,培养条件下, k 为 0.0032 h⁻¹ 略小于文献值(Glaken 等^[1]测得值为 0.0048 h⁻¹), $t_{1/2}$ 约为 9 d。

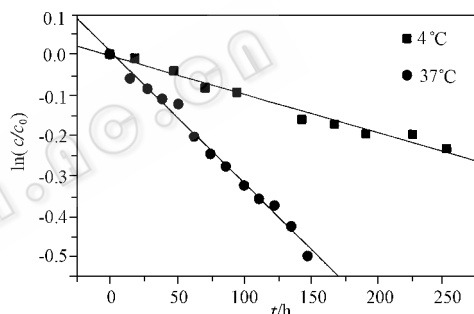


图 1 谷氨酰胺化学降解曲线

Fig.1 Chemical decomposition of Glutamine

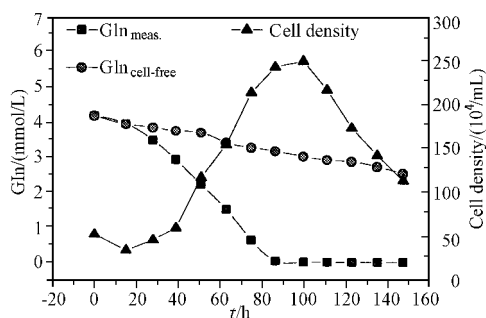


图 2 细胞生长曲线

Fig.2 Hybridoma cell growth curve

2.2 谷氨酰胺浓度梯度实验

常用培养基中谷氨酰胺的浓度为 0.7~5 mmol/L,为考察其化学降解对细胞培养的影响,进行了低浓度(1.1~4.15 mmol/L)和高浓度(9.31~19.75 mmol/L)初始谷氨酰胺的梯度实验。为消除葡萄糖代谢的影响,葡萄糖采用了足够高的浓度 20 mmol/L。

2.2.1 细胞生长曲线 图 2 是低浓度下典型的批次培养实验

收稿日期 2000-12-28, 修回日期 2001-04-12。

基金项目 杂交瘤细胞生产治疗用单抗基金资助(96-C02-03-05)。

* 通讯作者。Tel 86-10-62785603; Fax 86-10-62770304; E-mail xinyann@263.net 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

的谷氨酰胺代谢曲线(含空白)和细胞生长曲线。从图中可以看到,谷氨酰胺耗尽后约 8 h 细胞达到最大密度,随后即开始死亡。以前的实验证实,常规谷氨酰胺浓度下,批次培养结束时,各种氨基酸都有大量富余,说明低浓度下,谷氨酰胺的耗尽是细胞开始死亡的直接原因,只是有一定的滞后期, Higareda 等^[2]也观察到同样的现象。

2.2.2 谷氨酰胺化学降解的影响: 由于培养液中谷氨酰胺浓度的降低除了归因于细胞消耗外,化学降解也占了相当一部分,实际被细胞所利用的谷氨酰胺 C_{cell} 的消耗速率可表示为下式的形式:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{dC_{cell}}{dt} - kC$$

其中, C 为体系中实际的谷氨酰胺浓度; C_{cell} 为细胞实际利用的谷氨酰胺浓度; k 为一级降解速率常数; t 为时间。

由此可求得各浓度下扣除化学降解部分后的谷氨酰胺消耗曲线,亦即被细胞利用的谷氨酰胺消耗曲线(图未列出)。将上式对 t 积分即可得到培养过程中细胞实际利用的谷氨酰胺量,进而可以计算出谷氨酰胺的实际利用率以及细胞代谢中氮对谷氨酰胺的实际得率(即扣除降解所产生的氮)结果如图 3 所示。

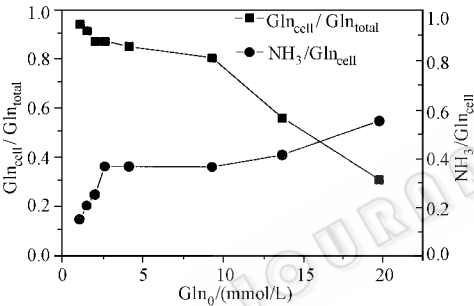


图 3 Gln 利用率和 NH_3 得率与 Gln 初始浓度的关系

Fig.3 Utilization of Gln and ammonium yield versus initial concentration of Gln

可以看到,当初始浓度低于 5 mmol/L 时,谷氨酰胺的利用率大于 80%,且初始浓度越低,利用率越高。随着初始浓度的升高,谷氨酰胺利用率逐渐降低,当大于 10 mmol/L 后,利用率急剧降低。与此同时,低浓度下 (< 4 mmol/L),氮对谷氨酰胺的实际得率随谷氨酰胺初始浓度的增加而增加,但初始浓度为 2.65 ~ 9.31 mmol/L 时该得率基本保持不变(约为 0.36)。当初始浓度继续上升至 19.75 mmol/L 时,该得率又有明显增加(由 1.1 mmol/L 时的 0.147 上升至 19.75 mmol/L 时的 0.552)。已知谷氨酰胺的代谢途径只有 4 种: (1) 水解; (2) 不完全氧化供能; (3) 完全氧化供能; (4) 合成细胞体及产物。其中,途径 (4) 几乎不产生氮,其它 3 种途径 1 分子的谷氨酰胺生成 1 分子或 2 分子的氮。从图 3 分析可知,在较低的谷氨酰胺浓度下,谷氨酰胺更多地被用于生物量的合成;而较高的谷氨酰胺浓度下,其更多的参与供能代谢。

2.2.3 谷氨酰胺比消耗速率: 图 4 是不同浓度下,细胞增殖期的谷氨酰胺比消耗速率曲线。从曲线看,谷氨酰胺比消耗速率先迅速上升,到达一个最高点后再逐渐下降。在达到最大细胞密度之前开始维持在一一定的值。这表明,细胞在培养

初期对谷氨酰胺有一个迅速的大量摄入的过程,这一现象与 Glacken 等报道的细胞在延迟期需要消耗大量的谷氨酰胺相符。但 Glacken 认为谷氨酰胺的代谢与细胞生长不相关,而前述结果表明,细胞所消耗的谷氨酰胺一部分参与生物量合成,一部分参与能量代谢。图 5 显示谷氨酰胺比消耗速率随细胞比生长速率的变化而变化,也支持了这一观点。

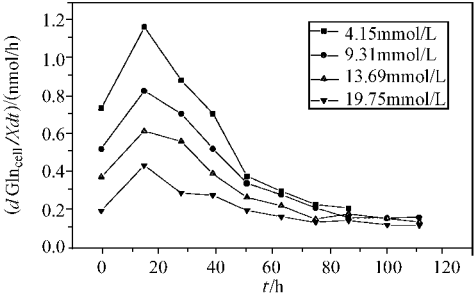


图 4 Gln_{cell} 比消耗速率时变曲线

Fig.4 Curve of the specific Gln consuming rate versus time

谷氨酰胺平均比消耗速率与其初始浓度的关系如图 6 所示。可以看到,当谷氨酰胺初始浓度小于 4.15 mmol/L 时,其比消耗速率逐渐上升,这与其他研究者的结论是一致的。Kurokawa 等指出^[3],在 0 ~ 2 mmol/L 的范围里,谷氨酰胺和其比消耗速率之间的浓度可被简单总结为线性关系;而 Jeong 等^[4]则将这一范围扩大到 0 ~ 5 mmol/L。

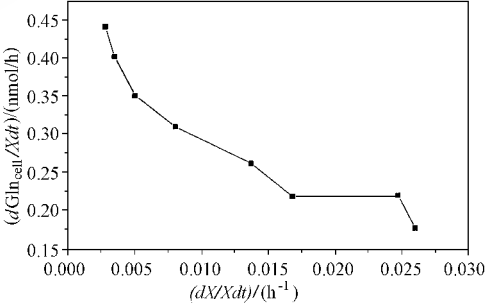


图 5 Gln 比消耗速率与细胞比生长速率的关系

Fig.5 Specific Gln consuming rate versus specific cell growth rate

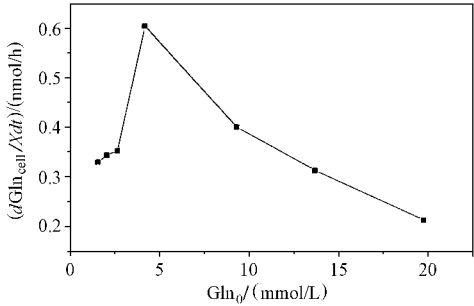


图 6 谷氨酰胺平均比消耗速率与 Gln 初始浓度的关系

Fig.6 Mean Gln specific consuming rate versus initial Gln concentration

当谷氨酰胺浓度继续增大时,其比消耗速率反而迅速下降。这可能有两方面原因:一是体系中高浓度的谷氨酰胺本身对细胞生长有一定的抑制作用,二是高浓度下化学降解的谷氨酰胺的量多,产生的铵离子量相应较大,对细胞生长有

负面影响。

3 结 论

由上述分析可知,为了提高谷氨酰胺的实际利用率,可在不明显影响 C50 细胞生长和死亡速率的情况下,采用尽量低的初始浓度,并以补料方式使其维持在较低浓度,从而减少培养体系中氨的积累。简单的批次培养中,为了得到更高的细胞密度和活力指数则可以适当提高谷氨酰胺的浓度,使副产物的积累在细胞的耐受程度以内即可。不过,这要以牺牲谷氨酰胺的利用率为代价。

REFERENCES (参考文献)

[1] Glaken M W, Fleischaker R J, Sinskey A J. Reduction of waste

product excretion via nutrient control possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in culture of mammalian cells. *Biotechnology & Bioengineering*, 1986 **28** :1376 ~ 1389

[2] Higareda A E, Possani L D, Ramirez O T. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnology & Bioengineering*, 1997 **56** :555 ~ 563

[3] Kurokawa H, Ogawa T, Kamihira M *et al.* Kinetic study of hybridoma metabolism and antibody production in continuous culture using serum-free medium. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993 **76** :128 ~ 133

[4] Jeong Y H, Wang S S. Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995 **17** :47 ~ 55

The Chemical Decomposition of Glutamine and Its Effect on Hybridoma Cell Culture

XIN Yan* YANG Yan LI Qiang KONG Jian CAO Zhu-An

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The chemical decomposition of glutamine is a first-order reaction. Its reaction constants under storage and culture conditions were determined as 0.0009 h^{-1} and 0.0032 h^{-1} respectively. Batch culture of hybridoma cell C50 with different initial contents of glutamine helped to understand its real metabolic characteristic. The results show that when the initial concentration of glutamine is lower than 5 mmol/L , more than 80% is used by cells. And the lower the initial content, the more being used. As the initial glutamine concentration increases, the ratio of its utilization decreases. When it reaches 10 mmol/L , the ratio decreases dramatically.

Key words glutamine, chemical decomposition, hybridoma cell

Received :December 28, 2000

This work was supported by grant from the Ninth Five-year National Program.

* Corresponding author. Tel 86-10-62785603; Fax 86-10-62770304; E-mail: xinyan@sem.mbi.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>