

# 杂交瘤细胞培养中摄氧速率(OUR)的在线检测及其与细胞生长及代谢的关系

冯 强 米 力 李 玲 王贤辉 陈志南\*

(第四军医大学国家 863 西安细胞工程基地 西安 710032)

**摘 要** 在批式及灌流培养条件下研究了杂交瘤细胞在无血清培养基中的生长、代谢情况与氧消耗的关系。应用动力学方法在线进行 OUR 的检测,同时离线取样检测其他参数。结果发现 OUR 与谷氨酰胺的消耗、抗体的生成及活细胞密度间有明显的相关关系,进一步的分析还发现在对数生长期,OUR 与活细胞密度间具有良好的线性关系, $q_{OUR} = (0.103 \pm 0.028) \times 10^{-12}$  mol/cell/h,可以通过它来进行细胞密度的在线检测。并通过以  $\Delta OUR = 0$  时刻作为灌流调整点进行连续灌流培养的初步实验验证了 OUR 作为培养过程反馈控制参数的可能性。

**关键词** 摄氧速率,杂交瘤细胞,在线检测,细胞密度,谷氨酰胺,灌流培养

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0593-05

近年来,动物细胞大规模培养技术发展迅速,通过这一技术生产的生物医药制品占整个生物技术产品利润的一半以上<sup>[1]</sup>。

在线分析和控制是动物细胞大规模培养优化策略中的关键技术之一。尤其在流加和灌流培养过程中,通过在线检测关键参数(细胞密度、营养和代谢产物的浓度等)可以实时了解培养过程中细胞所处的状态,并以此为依据调整灌注速率和补料策略<sup>[2]</sup>,最终达到提高生产效率的目的。

摄氧速率(OUR)是指单位体积培养基中的细胞在单位时间内对氧的摄取量。而细胞对氧的直接消耗是用于 FADH<sub>2</sub>、NADH 的氧化,同时反映了细胞生成及消耗能量的状况。因此 OUR 的意义在于它可以快速、间接地反映细胞生长及能量代谢的变化情况,降低了取样频率。此外利用 OUR 还可以克服篮式生物反应器(如美国 NBS 公司产品)不能够直接取样的限制。本文利用动力学原理在线测定 OUR 的方法<sup>[3,4]</sup>研究了 OUR 与细胞密度及其他相关参数间的关系,为在流加和灌注培养中及时调整灌注时间和速率、决定补料时间和补料策略提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系和培养条件

生产用杂交瘤细胞株 HAb18 分泌抗人肝癌单克隆抗体。所分泌的高亲和性抗人肝癌单抗现已完

成 I、II 期临床研究<sup>[5]</sup>。

无血清培养基 CCM1(美国 Hyclone 公司),添加 1% 小牛血清。杂交瘤细胞在方瓶中培养,接种 1L super spinner 摇瓶(德国 B. Braun 公司)扩大培养。待细胞密度达到  $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$  cells/mL 后离心弃上清,用新鲜的 CCM1 培养基(不添加血清)重悬后接种生物反应器。

### 1.2 培养系统

5L BIOSTAT B 生物反应器(德国 B. Braun 公司),工作体积 5.0 L。培养条件为温度 37℃,pH 值采用 0.5mol/L NaOH 与进气 CO<sub>2</sub> 浓度相结合的方法控制在  $7.0 \pm 0.1$ ,搅拌转速 60r/min,溶氧浓度通过四气系统(air, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>)控制在 60% 空气饱和度。每天在线测定 OUR 同时取样进行细胞密度、葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺及抗体浓度的测定。接种密度为  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  mL,活性大于 95%。

5L CelliGen 反应器(美国 New Brunswick Scientific 公司),工作体积为 3.5L,装载 200g Fibracel(NBS 公司)。培养条件为 pH 7.0~7.2,DO 40% 空气饱和度,搅拌速度 60r/min,反应器温度控制在 37℃。反应器的操作程序如下:1)用 3.5L PBS 对反应器进行无菌消毒;2)以基础培养基置换 PBS,通气搅拌 24h;3)接种 HAb18 细胞,细胞密度为  $2 \times 10^5$  cells/mL;4)在第 24~48h 内先进行静止培养,待细胞的葡萄糖消耗达 50%时,灌流 0.5 体积的基础

培养基,以后依次增加灌流体积,以维持葡萄糖浓度在该水平。5)每天取样进行葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺及抗体的测定。

### 1.3 在线检测所用软件 and 控制系统

在线监控软件为 AFS-BioCommand 系统(NBS 公司 2.62 版),计算机通过 AFS-BioCommand Interface 数据转换盒与生物反应器主机相连进行反馈控制。

### 1.4 离线分析方法

1.4.1 细胞计数:定时取样后用台盼蓝染色法计数活细胞数和死细胞数,每样计数 3 次后取平均值。

1.4.2 葡萄糖和乳酸的测定:葡萄糖用 GOD-POD 法测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)测定;乳酸用乳酸脱氢酶法测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

1.4.3 谷氨酰胺用美国 YSI2735 生化分析仪测定。

1.4.4 抗体浓度测定:用夹心 ELISA 法检测。

### 1.5 各参数计算方法

1.5.1 摄氧速率(OUR)的测定与动力学分析:采用动力学方法进行测量。测定 OUR 时,先把 DO 值增加到 70% 空气饱和度左右,保持表面通气,停止深层通气,开始测定过程。当 DO 值降到 40% 左右时,恢复深层通气。OUR 则通过下式计算:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a \times (C^* - C_L) - OUR \quad (1)$$

$$C_L = DO\% \cdot C^* \quad (2)$$

式中  $C_L$  为液相氧浓度 (mol/L),  $C^*$  为空气在培养液中的饱和度,取值为 0.197 mmol/L<sup>[2]</sup>,OUR 测定过程中表面通氮气以消除表面通气的影响。

1.5.2 比摄氧速率的计算:比摄氧速率( $q_{OUR}$ )是指培养过程中每个细胞的平均摄氧速率,它反应了细胞在检测时刻的呼吸强度。由定义可知其计算公式为:

$$q_{OUR} = \frac{OUR}{X} \quad (3)$$

式中  $X$  为活细胞密度。

1.5.3 营养物质的比消耗速率、代谢产物的比生成速率及细胞的比生长速率:在细胞生长过程中会不断消耗氧、葡萄糖等底物和生成代谢产物包括抗体及乳酸、氨等副产物。而它们都有其各自的速率,与  $q_{OUR}$  相似,其计算公式为

$$\text{底物 (Substrate) 比消耗速率} \quad q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (4)$$

$$\text{产物 (Products) 比生成速率} \quad q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (5)$$

$$\text{比生长速率} \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

式中  $X$  为活细胞密度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 杂交瘤细胞批式悬浮培养的生长动力学特性

2.1.1 杂交瘤细胞 HAb18 的生长曲线:用 5L BIO-STAT B 生物反应器(德国 B. Braun 公司)悬浮批式培养杂交瘤细胞,接种细胞密度为  $1.5 \times 10^5$  cells/mL,活性大于 95%。培养过程中在线检测 OUR,每 6h 取样离线检测活细胞密度,葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、氨等物质的浓度。

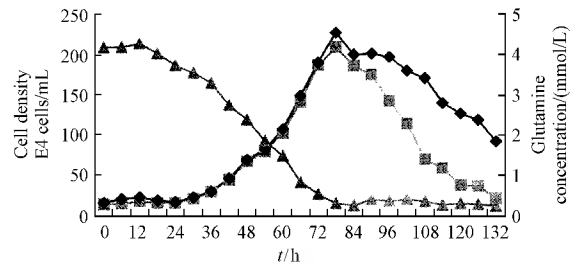


图 1 批式培养过程中 HAb18 细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of HAb18 cell in batch culture

—■— Live cell ; —◆— Total cell ; —▲— Glutamine

由图 1 可以看出从接种 0 时刻起,细胞生长的过渡期大概为 30h,此后细胞开始进入对数生长期,保持稳定的增长,比生长速率  $\mu$  约为  $0.05 \sim 0.07 \text{h}^{-1}$ ,最大活细胞密度可达到  $2 \times 10^6$  cells/mL。直到约 70h 开始进入衰退期。谷氨酰胺是一种必需氨基酸,是细胞增殖的主要能源。在培养过程中发现,当谷氨酰胺浓度低于 0.5 mmol/L 时,细胞开始大量死亡。此时葡萄糖的最低限制浓度和乳酸、氨的最高限制浓度还远未达到此前研究得出的界限值(数据未列出)。这说明在应用 CCM-1 无血清培养基进行批式培养的过程中,谷氨酰胺是最早出现的限制性底物,直接影响了细胞的生长。尽管有文献报道,在较低的葡萄糖和谷氨酰胺浓度下(分别为 0.13 g/L 和 0.17 mmol/L)可以使细胞的代谢途径发生改变,且不影响细胞活性并显著降低乳酸和氨的得率<sup>[6]</sup>,但其培养过程还伴随有优化后的浓缩营养成分的添加。因此在单纯批式培养中细胞状态开始下降时谷氨酰胺的浓度虽然偏高,但其原因可能是:1)在没有运用综合手段调整细胞代谢状态的情况下,谷氨酰胺的最低限制浓度较高;2)一些在培养早期就会限制细胞生长的营养成分(如生长因子、胰岛素等)的残浓度不易测量,但其消耗速率与谷氨酰胺比较相近。因此谷氨酰胺消耗至一定水平(如残浓度为 0.5 mmol/L)时,间接地反映了实际限制物质的耗竭,细胞开始大量死亡。

2.1.2 OUR 与细胞密度及抗体分泌间的关系:在培养过程中观察发现 OUR 与细胞密度及抗体产率间

存在高度关联的关系。

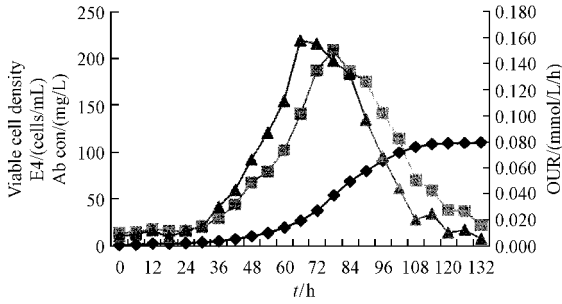


图2 批次培养过程中 OUR 与活细胞密度及抗体浓度间的关系

Fig.2 The relationships between OUR, live cell density and concentration of Ab in batch culture  
—■— Viable cell density; —◆— Ab con.; —▲— OUR

由图2可以看出 OUR 先于活细胞出现峰值,随后 OUR 的下降先于细胞计数的结果,反映出细胞代谢旺盛程度的下降。在其他报道中也有类似的情况<sup>[7]</sup>。对比细胞数和 OUR 的变化,可以看出:1) OUR 与活细胞密度呈良好的正相关关系,如果能够定量描述二者的相关系数,则可以由 OUR 定量描述活细胞密度。2) 活细胞密度的变化趋势总是滞后于 OUR, 后者的变化可以在细胞状态改变前给出“预警信号”。

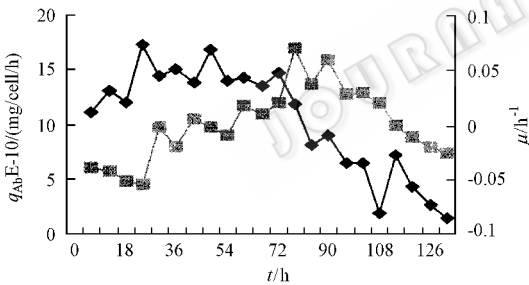


图3 批次培养过程中抗体比生成速率与细胞比生长速率间的关系

Fig.3 The relationship between specific productivity of Ab and  $\mu$  in batch culture  
—■—  $q_{Ab}$ ; —◆—  $\mu$

由图3中可以看出,抗体的分泌与细胞生长呈负生长偶联关系,即细胞的比生长速率下降时抗体的比生成速率反而上升。但最终随着 OUR 及活细胞数的下降,抗体的分泌也趋于停止。由于氨基酸和谷氨酰胺的消耗与抗体分泌及 OUR 有直接的正比关系<sup>[8]</sup>,因此从 OUR 到达峰值至培养结束这段过程中细胞状态的变化可以作如下解释:首先细胞生长变缓进入稳定期,OUR 不再增长(见图2),但抗体的比生成速率开始上升。对比图1中谷氨酰胺的消耗曲线可以看出,随着培养基中的营养物质尤其是

谷氨酰胺等限制性底物逐渐消耗至较低浓度,OUR 率先开始快速下降,其后是抗体分泌速率降低和活细胞的大量死亡。

2.1.3  $q_{OUR}$  与  $q_{Lac}$  及谷氨酰胺浓度间的关系:为了进一步找出 OUR 与其他参数关联的机理,通过对大量数据的分析和筛选,我们认为  $q_{OUR}$  与  $q_{Lac}$  及谷氨酰胺浓度间的关系可以较好地解释细胞生长与 OUR 间的关系。

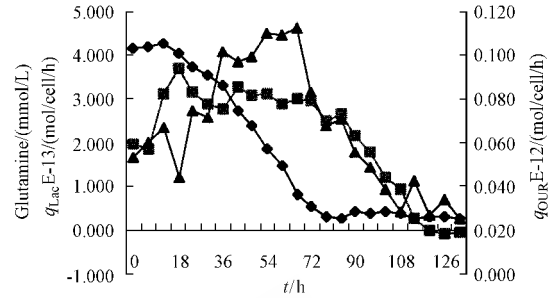


图4 批次培养过程中  $q_{OUR}$  与  $q_{Lac}$  及谷氨酰胺浓度间的关系

Fig.4 The relationships between  $q_{OUR}$ ,  $q_{Lac}$  and glutamine in batch culture  
—■—  $q_{Lac}$ ; —◆— Glutamine; —▲—  $q_{OUR}$

由图4并对比图1可以看出,当谷氨酰胺浓度高于 0.5mmol/L 时,细胞一直处于旺盛生长阶段。这段时间内  $q_{Lac}$  的值基本保持在  $(0.312 \pm 0.013) \times 10^{-12}$  mol/cell/h,同时  $q_{OUR}$  也相应稳定在  $(0.103 \pm 0.028) \times 10^{-12}$  mol/cell/h。当谷氨酰胺浓度低于 0.5mmol/L 时, $q_{OUR}$  首先快速下降,随后  $q_{Lac}$  也开始下降,甚至出现负值。

在细胞生长代谢过程中,所需能量的供应主要来自 NADH 和  $FADH_2$  的氧化及糖酵解途径。由于细胞内 ATP 的浓度与其转化速率相比可以忽略不计,因此可认为 ATP 生成速率近似等于其消耗速率<sup>[9]</sup>。而细胞处于不同时期时  $q_{ATP}$  虽会相应变化,但在对数生长期或稳定期内近似认为  $q_{ATP}$  为定值<sup>[10]</sup>。同时据文献报道,ATP 的生成与氧的消耗及乳酸的生成有如下定量关系<sup>[11]</sup>:

$$r_{ATP} = r_{Lac} + 6r_{O_2} \quad (5)$$

则等式两边同除以细胞密度得到

$$q_{ATP} = q_{Lac} + 6q_{OUR} \quad (6)$$

由等式(6)可以看出当  $q_{Lac}$  保持不变时, $q_{ATP}$  与  $q_{OUR}$  间便存在确定系数的线性关系,则当  $q_{ATP}$  为定值时,可由公式(3)得出活细胞密度与 OUR 间存在确定系数的线性关系。

另一方面,由于谷氨酰胺作为重要的能源物质,主要通过 TAC 循环来产能,同时以固定的化学计量

比来消耗氧气<sup>[12]</sup>。在本研究中可以看出(见图1),应用 CCM-1 无血清培养基进行杂交瘤细胞培养时,谷氨酰胺是主要的限制性底物,当低于一定值时(在本研究中为 0.5mmol/L)细胞状态便开始急剧下降,同时  $q_{OUR}$  也开始大幅降低(见图3)。

由以上关系可以看出,当谷氨酰胺保持在一定浓度之上,细胞处于对数生长期时,活细胞密度可以利用已测得的  $q_{OUR}$  均值利用公式(3)计算得出。

在本研究中  $q_{OUR}$  取平均值为  $0.103 \times 10^{-12}$  mol/cell/h,但在不同细胞系之间  $q_{OUR}$  变化较大<sup>[3]</sup>,且同一细胞系的培养环境不同也会造成  $q_{OUR}$  的改变,因此应用 OUR 在线准确地检测细胞密度需要相对稳定的培养环境作为保证。在连续培养过程中,在线检测的 OUR 数据与离线计数的细胞密度相比可以得出  $q_{OUR}$  的值,而  $q_{OUR}$  的变化可以及时反映培养体系内细胞活性的变化。因而此对应关系便可作为连续培养策略调整和优化的指导依据<sup>[13]</sup>。

## 2.2 杂交瘤细胞连续灌流培养时 OUR 与细胞生长及产物分泌的关系

采用 5L CelliGen 反应器连续灌流培养杂交瘤细胞,接种细胞密度为  $2 \times 10^5$  cells/mL,活性大于 95%。培养过程中在线检测 OUR,每 6h 取样离线检测抗体、葡萄糖等物质的浓度。过程中 OUR 与抗体分泌的关系见图 5。

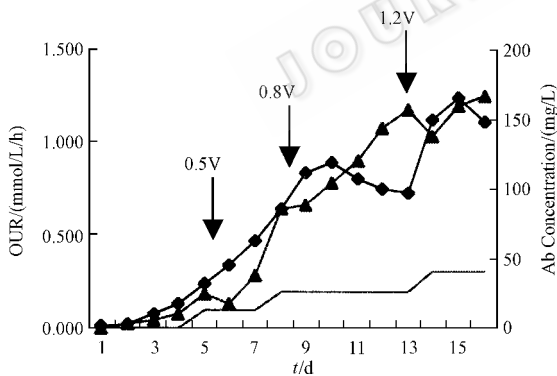


图 5 连续灌流培养过程中 OUR 与抗体浓度间的关系

Fig.5 The relationship between OUR and various concentrations of antibody in perfusion culture  
—Perfusion rate; —◆— OUR; —▲— Ab concentration

由两者的关系可以看出,在灌流培养方式下,OUR 可在较长时间内保持增长趋势。培养至第 9 天时,按  $q_{OUR}$  均值为  $0.1 \times 10^{-12}$  mol/cell/h 计算,反应器内细胞密度已达到了  $8 \times 10^6$  cells/mL 以上。而随着细胞密度的迅速增高,在灌流速率不变的情况下 OUR 已开始下降。这说明现有灌流速率已不能满足细胞的代谢需求,而在提高灌流速率后可以看到

OUR 迅速响应开始升高。伴随 OUR 的变化,抗体的分泌量在一定的延迟时相后也发生了相应的变化。由于灌流方式可以及时补充营养物质及排出代谢产物,可能使细胞在相对较长的时间内保持旺盛生长的状态,所以培养过程中 OUR 的持续上升可以认为是初期细胞的旺盛生长及随后细胞增殖虽然变缓而抗体分泌速率迅速上升两种因素的综合影响。

因此根据 OUR 与抗体分泌间的相关关系,初步确定以  $\Delta OUR = 0$  时刻作为灌流调整点进行连续灌流培养。结果见图 6。

离线检测的结果表明葡萄糖浓度在灌流开始后从 1.4g/L 一直升高到最终的 2.1g/L。对比图 5 可以说明,以 OUR 为参考调整灌流速率虽然可以使细胞的生长及抗体分泌在较长时间内处于增长状态。但其缺点是灌流体积偏大,超过了细胞的消耗量,这就造成了产物的稀释和培养基的浪费,导致培养效率的降低。同时从培养基组分优化的角度考虑,如果将各组分浓度调整到消耗量的变化与 OUR 相一致,则可以在保证细胞生长与抗体分泌不受影响的情况下提高营养物质的利用率,从而提高培养效率。

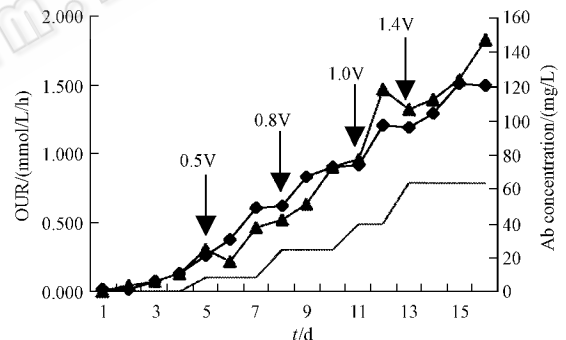


图 6 以 OUR 控制连续灌流的培养过程中 OUR 与抗体浓度间的关系

Fig.6 The relationship between OUR and concentration of antibody in perfusion culture controlled by OUR  
—Perfusion rate; —◆— OUR; —▲— Ab concentration

## 3 讨 论

在大规模培养过程中,OUR 可作为细胞密度、抗体分泌速率等其它参数的“预警”指标。由于它间接反应了细胞的生长和代谢状态,所以可以作为灌流速率和浓缩营养物流加速率等培养参数优化控制的依据。同时可以明确以下几点:1)应用 OUR 及时调整灌流速率有可能避免细胞生长和抗体分泌出现较大的波动,实现培养过程中的稳定增长;2)灌流速率具体的设定值与 OUR 在数值上的关系还应引入限制性营养物的浓度等参数加以综合考虑,否则会

期,OUR 与活细胞密度有良好的线性关系,可以利用它来进行细胞密度的在线检测与分析。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Spier R E. Recent advances in animal cell biotechnology. In: *Animal Cell Culture and Production of Biologicals*. Netherland: Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1991, pp. 41 - 46
- [ 2 ] Ducommun P, Bolzonella I, Rhiel M *et al.* On-line determination of animal cell concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **72**( 5 ) :515 - 522
- [ 3 ] Ruffieux P A, Urs von Stockar U, Marison I W. Measurement of volumetric(OUR) and determination of specific( $q_{O_2}$ ) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 1998, **63** :85 - 95
- [ 4 ] ZHOU Y (周亚竟), TAN W (谭文松), ZHAO (赵佼) *et al.* On line measurement of oxygen uptake rate in the cultivation of vero cells using the dynamic method. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**( 4 ) :525 - 527
- [ 5 ] The Fourth Military Medical University(第四军医大学). Injection of Iodine 131 Labeled Hepatoma Fragment Mab. (碘<sup>131</sup>I]肝癌片段抗体注射液), Clinic trial No.98XL - 57, 1999XL0140
- [ 6 ] Anna F E Anshu G, Fu Peng-Cheng *et al.* Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian

- cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, **67**( 1 ) :25 - 34
- [ 7 ] TONG Z M(全志明), LI F(李峰), CAO Z A(曹竹安) *et al.* Energy metabolism of hybridoma cell in serum free culture. *Chin J Biologicals*(中国生物制品学杂志), 1999, **12**( 4 ) :197 - 200
- [ 8 ] Zeng A P, Hu W S, Deckwer W D. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnology Progress*, 1998, **14** :434 - 441
- [ 9 ] Jan L, Lena H. Specific growth rate as a parameter for tracing growth limiting substances in animal cell culture. *Journal of Biotechnology*, 1995, **42**( 1 ) :163 - 175
- [ 10 ] Gautam G B, Carole A H. Hybridoma growth and antibody production as a function of cell density and specific growth rate in perfusion culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **48** :289 - 300
- [ 11 ] Eyer K, Heinze E. On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **49**( 3 ) :277 - 283
- [ 12 ] Lin J Q, Takagi M, Qu Y B *et al.* Possible strategy for on-line monitoring and control of hybridoma cell culture. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, **11** :205 - 209
- [ 13 ] Eyer K, Oeggerli A, Heinze E. On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **45** :54 - 62

## On-line Monitoring of Oxygen Uptake Rate and Its Application in Hybridoma Culture

FENG Qiang MI Li LI Ling WANG Xian-Hui CHEN Zhi-Nan\*

(Cell Engineering Research Centre, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

**Abstract** On-line analysis and control are critical for the optimization of product yields in animal cell culture. The close monitor of viable cell number helps to gain a better insight into the metabolism and to refine culture strategy. In this study, we use the oxygen uptake rate(OUR) to estimate the number of viable cell and the OUR-based feed-back control strategy for nutrients feeding to improve the efficiency of cell culture.

A hybridoma cell line(HAB18) was cultured in fed-batch and perfusion model using serum free medium in 5L CelliGen Plus bioreactor(NBS Co., American) and 5L Biostat B bioreactor(Braun Co., Germany). The system and the method for on-line monitoring OUR in bioreactors, based on the dynamic measurement of dissolved oxygen(DO), were developed. The method of on-line cell concentration estimation was established based on the relationship between the growth of the hybridoma and the uptake rate of oxygen. This method was then used to determine OUR and the concentrations of cell, antibody, glucose, lactate, glutamine and ammonia in the bioreactors at given times. The relationship between OUR and nutrients metabolism was studied and OUR-based feed-back control strategy, which used the state  $\Delta OUR = 0$  as the regulation point, was established and used to control the rates of nutrients or medium feeding rate in the perfusion culture.

The results showed that there was close relationship between OUR, concentration of live cells, productivity of antibody and consumption of glutamine. The sudden decrease in OUR may be caused by glutamine depletion, and with different delay times, the viable cell concentration and antibody productivity also decreased. The further analysis revealed the linear relationship between OUR and the density of live cells in the exponential growth phase as  $q_{OUR} = (0.103 \pm 0.028) \times 10^{-12}$  mol/cell/h. These findings can be applied to the on-line detection of live cell density. Our study also indicated that by adjusting the perfusion rate with OUR-based feed-back control strategy, it is feasible to continuously increase in viable cell density and antibody concentration in the perfusion culture.

**Key words** oxygen uptake rate, hybridoma, on-line monitoring and control, cell density, glutamine, perfusion

Received: 02-24-2003

This work was supported by a Grant from Hi-Tech Research and Development Programme of China(863)(No. 2002AA217011 and No. 2002AA2Z3441).

\* Corresponding author. Tel 86-29-3374545; Fax 86-29-3293906; E-mail: zhccerc2@immu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部

http://journals.im.ac.cn