

重组 CHO-GS 细胞降低氨毒副作用的代谢研究

Metabolism of Recombinant CHO-GS Cell Reducing of Toxic Effect of Ammonia

张 芳, 易小萍, 孙祥明, 张元兴*

ZHANG Fang, YI Xiao-Ping, SUN Xiang-Ming and ZHANG Yuan-Xing*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

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

摘 要 在重组 CHO-GS 细胞无血清批培养过程中, 由于 GS 系统的引入, 使氨对细胞的毒副作用显著降低, 从而引起细胞生长和代谢途径发生变化。当起始氨浓度为 1.42 mmol/L 时, 细胞最高密度可达到 15.6×10^5 cells/mL, 随着氨浓度的增加, 尽管细胞生长受到一定的抑制, 但在氨浓度为 12.65 mmol/L 时, 细胞密度仍可达到 8.9×10^5 cells/mL。当起始氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时, 细胞对葡萄糖的得率系数和乳酸对葡萄糖的得率系数降低, 己糖激酶 (HK)、丙酮酸激酶 (PK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 酶活分别提高了 43%、140% 和 25%, 表明细胞对葡萄糖的利用增加, 糖代谢更倾向于高能量生成途径。在谷氨酰胺代谢途径中, 氨促进了谷丙转氨酶 (GPT) 酶活, 谷氨酸到 α -酮戊二酸的转化逐渐倾向于谷丙转氨途径, 谷氨酸脱氢酶 (GDH) 酶活降低, 脱氨途径相应受到抑制。此外, 氨浓度的增加使细胞群体处于 G_0/G_1 期的比例逐渐升高, 当氨浓度为 12.65 mmol/L 时, 重组蛋白比生产速率比氨浓度为 0.36 mmol/L 时提高了 2.1 倍。

关键词 重组 CHO 细胞, 谷氨酰胺合成酶, 无血清培养, 代谢, 氨

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0094-07

Abstract The toxic effect of ammonia on rCHO-GS cell decreased obviously due to the transfection of GS system in serum-free culture. The maximum cell density, 15.6×10^5 cells/mL was obtained in the culture with 1.42 mmol/L ammonia. The growth of rCHO-GS cell was inhibited with an increased ammonia concentration. However, a cell density of 8.9×10^5 cells/mL was obtained when the concentration of ammonia was 12.65 mmol/L. The intracellular metabolic pathways were affected due to the decrease of the toxic effect of ammonia on rCHO-GS cell. With the increase of initial ammonia concentration from 0.36 mmol/L to 12.65 mmol/L, the yield coefficients of cell to glucose and lactate to glucose decreased. The activities of hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK), and lactate dehydrogenase (LDH) increased by 43%, 140% and 25%, respectively, indicating that the utilization of glucose increased and the glycolysis pathway was more prone to efficient energy metabolism pathway. An increased activity of glutamate-pyruvate aminotransferase (GPT) showed that the conversion from glutamate to α -ketoglutarate was shifted to glutamate-pyruvate transamination pathway. The deamination pathway was inhibited due to a decreased activity of glutamate dehydrogenase. In addition, the number of cells in G_0/G_1 phase increased and the specific production rate of recombinant protein increased by 2.1-fold with the increase of initial ammonia concentration from 0.36 mmol/L to 12.65 mmol/L.

Key words rCHO cell, glutamine synthetase, serum-free medium, metabolism, ammonia

Received: September 19, 2005; Accepted: November 4, 2005.

This work was supported by the grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2004AA223792).

* Corresponding author. Tel: 86-21-64253065; E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

国家高技术研究发展计划资助项目 (863 计划) (No. 2004AA223792)。

动物细胞对培养环境要求较高,难以满足日益增长的规模化生产的需求。减少培养过程中代谢副产物的累积,可以达到优化细胞生长环境的目的。氨作为细胞培养过程中的主要代谢副产物,通常 1~5 mmol/L 的浓度便会对细胞生长产生抑制作用。限制培养基中谷氨酰胺的含量,用谷氨酸或二肽等多种物质来替代谷氨酰胺是减少氨生成的常用方法^[1-3];此外,采用动电学技术、固定吸附技术或在培养基中补加多种氨基酸等方法也可以降低氨的毒副作用^[4-6]。然而,由于培养环境的限制性以及细胞株的特异性,上述方法并没有被广泛应用。随着基因工程手段的引用,将谷氨酰胺合成酶基因(GS)转入细胞,以氨和谷氨酸为底物,使得细胞自身具有合成谷氨酰胺的能力,可以大大减少氨在培养基中的累积。GS 系统已经在 CHO 和 NSO 细胞中广泛使用,外源蛋白表达均有很大的提高^[7,8]。

动物细胞培养过程的优化一般建立在细胞生长代谢特征研究的基础上,近年来,氨对细胞影响的研究主要集中在杂交瘤、BHK 和 CHO-*dhfr*⁻ 细胞生长代谢、蛋白表达及其糖基化等方面的研究^[9-11],CHO-GS 细胞中由于 GS 系统的引入,使氨对细胞的毒副作用大大降低,引起细胞代谢特征与其它细胞株有显著的差异,本文从胞内水平考察了 CHO-GS 细胞在无血清培养过程中代谢途径的变化机制,为今后 CHO 细胞高密度培养过程中的氨控制及过程优化提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

重组 CHO-GS 细胞:用含单抗蛋白的目的基因和谷氨酰胺合成酶(GS)基因标记的表达载体,转染宿主细胞 CHO,再通过 L-氨基亚砷蛋氨酸(MSX)加压促使 GS 基因和目的蛋白基因扩增,筛选获得重组细胞株。

培养基为实验室自制无血清无谷氨酰胺培养基,基础培养基为含有 17.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 (无谷氨酰胺),同时添加氨基酸、脂肪酸、维生素和微量元素等多种成分^[12]。基础培养基、添加物和碘化丙锭均购于美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

在 75mL 的方瓶中加入 10mL 培养基培养 CHO-GS 细胞,当细胞长满单层后直接加入 10mL 新鲜培养基,用移液管反复轻轻吹打成单细胞悬浮液,按 1:2 的接种比例传代培养。

收集一定数量的指数生长中期的细胞为种子,加入 350mL 新鲜无血清培养基,混匀后分装于 5 只标记为 0*、1*、2*、3* 和 4* 号的 100mL 血清瓶中,0* 瓶作为对照,其他 4 只瓶中分别加入一定量 70mmol/L 的 NH₄Cl 溶液,按照瓶号的顺序形成氨浓度递增的细胞悬浮液,谷氨酰胺的对照实验需在培养基中补加 2.5mmol/L 的谷氨酰胺。将每只血清瓶中的悬浮液混匀,每组以 4 mL 的加入量分别接种在 16 只 25mL 的方瓶中,所有方瓶置于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养。每天每组各取 2 瓶,计数细胞密度。

在细胞代谢特征分析中,细胞以 3.3×10^5 cells/mL 密度均匀接种在 500mL 方瓶中,每瓶加入含有不同起始氨浓度的无血清培养基 25mL。细胞培养 96 h 后,分别收集上清和细胞,用于代谢物、酶活和细胞周期的检测。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞计数:用血球计数板点样计数细胞密度,并用台盼蓝拒染法确定细胞的存活率,每次重复 3 次,取平均值。

1.3.2 葡萄糖、氨和乳酸的测定:葡萄糖和氨的浓度的测定分别采用葡萄糖分析试剂盒和尿素氮测定试剂盒(上海生物制品研究所),乳酸浓度的测定采用乳酸测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3.3 氨基酸测定:氨基酸的浓度采用邻苯二甲醛(OPA, Fluka, USA)柱前衍生的反相高效液相色谱系统(HP1100, Hewlett Packard, German)测定。流动相的组成、磷酸缓冲液、洗脱程序和进样程序等均由随机的技术报告给出,OPA 衍生试剂根据文献配制^[13]。

1.3.4 胞内粗酶的提取与测定:细胞培养 96h 后,倒掉上清,加 PBS 清洗 2 遍,精确计数细胞,每次测定需要 $6 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 个细胞。于 600g 离心 8min 后,弃掉上清,加入 1mL 提取液(4 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PBS, pH 7.5),吹散细胞,移入 1mL 的离心管中,冰浴超声波处理 2 min(输出功率 360 W,脉冲工作时间 0.6 s,间隙时间 0.4 s)。从超声所得混合液中取 100 μ L,用于蛋白浓度的检测(采用考马斯亮蓝测试盒,购自南京建成生物研究所),剩余混合液于 15 000 g 离心 15 min,收集上清液,置于 -80℃ 保存待测。

己糖激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶和谷氨酰胺合成酶检测试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;谷草转氨酶和谷丙转氨酶检测试剂盒,购于上海生物制品研究所;谷氨酸脱氢酶测定,参考文献[14]。

1.3.5 细胞周期分布的测定:细胞培养 96h 后,轻

轻倒掉上清,加 PBS 清洗 2 遍,精确计数细胞,每次测定需要细胞数量约 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 个,反复轻轻吹打单细胞悬液,避免细胞结团或碎片存在而影响检测结果。细胞悬液于 600 g 离心 8 min 后,弃掉上清,约留 0.5 mL 细胞悬液,迅速加入 -20°C 预冷的 70% 乙醇固定细胞标本,充分混匀后置于 -20°C 冰箱中保存待测,保存时间不超过 1 周。测定时,离心去掉乙醇,用 PBS 清洗 1 次,600 g 离心 8 min 后,弃掉上清。然后加入 1 mL PBS 和 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ RNase 5 μL , 37°C 水浴 1 h,之后加入 1 g/L 碘化丙锭 5 μL ,染色 5 min 后上机检测。

1.3.6 计算公式:细胞生长对营养物消耗的得率系数 (cells/mmol), 产物对底物的得率系数 (mmol/mmol), 营养物的比消耗速率 [$\text{mmol}/(\text{cell} \cdot \text{d})$] 和抗体比生成速率 [$\text{IU}/(\text{cell} \cdot \text{d})$] 分别由以下公式表示:

$$Y_{x/s,t_{n+1}} = \frac{X_{t_{n+1}} - X_{t_n}}{S_{t_n} - S_{t_{n+1}}} \times 10^3$$

$$Y_{p/s,t_{n+1}} = \frac{Q_{p,t_{n+1}}}{Q_{s,t_n}} = \frac{P_{t_{n+1}} - P_{t_n}}{S_{t_n} - S_{t_{n+1}}}$$

$$Q_{s,t_{n+1}} = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \approx \frac{2(S_{t_{n+1}} - S_{t_n})}{(X_{t_{n+1}} + X_{t_n})(t_{n+1} - t_n)} \times 10^3$$

$$Q_{p,t_{n+1}} = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \approx \frac{2(P_{t_{n+1}} - P_{t_n})}{(X_{t_{n+1}} + X_{t_n})(t_{n+1} - t_n)} \times 10^3$$

其中 X , S 和 P 分别表示细胞密度 (cells/mL), 营养物浓度 (mmol/L) 和抗体浓度 (IU/mL), t 为时间 (d)。

2 结果与讨论

2.1 GS 系统的引入使氨对细胞毒副作用降低

重组 CHO-GS 细胞以 2.6×10^5 cells/mL 的密度

接种在不同起始氨浓度的培养基中批培养,生长曲线如图 1A 所示。从图中可以看出,在起始氨浓度为 $0.36 \sim 3.54$ mmol/L 的批培养中,氨对细胞生长没有影响,当氨浓度为 1.42 mmol/L 时,细胞最高密度可达到 15.6×10^5 cells/mL。氨浓度继续增加到 6.38 mmol/L 时,细胞生长受到抑制,但是在 12.65 mmol/L 的高浓度,细胞最高密度仍可达到 8.9×10^5 cells/mL。若用补加 2.5 mmol/L 谷氨酰胺的培养基培养 CHO-GS 细胞,由于细胞可以直接利用谷氨酰胺,GS 酶活性降低,仅 4.26 mmol/L 的氨浓度就可以抑制细胞生长(图 1B)。据文献报道,大多数哺乳动物细胞在氨浓度为 $1 \sim 5$ mmol/L 时生长就会受到抑制,氨主要是通过干扰细胞正常的电化学梯度,抑制酶反应以及改变胞内 pH 等对细胞生长起到抑制作用。研究发现,3.09 mmol/L 的氨浓度会对 CHO-*dhfr*⁻ 细胞生长产生明显的抑制作用^[15], 2.6 mmol/L 的氨可抑制 BHK 细胞在转瓶中生长^[10], 2 mmol/L 的氨浓度则会使 HeLa 细胞密度降低 75%^[16]。Martinelle 和 Häggström 提出 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 的跨膜运输模型,认为细胞在生长过程中产生的氨比培养基中添加的氨对细胞毒性更大^[17]。这说明正是由于 GS 系统的引入,使氨对 CHO-GS 细胞毒副作用显著降低。

2.2 重组 CHO-GS 细胞葡萄糖代谢途径的变化

氨对重组 CHO-GS 细胞毒副作用的降低,会引起细胞代谢途径的变化。当氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时,细胞对葡萄糖的得率系数和乳酸对葡萄糖的得率系数分别下降了 34% 和 16% (图 2)。表明氨促进了细胞对葡萄糖的利用,但是所消耗的葡萄糖并没有通过厌氧途径生成更多的乳酸,而是直接氧化或通过其它途径如磷酸戊糖

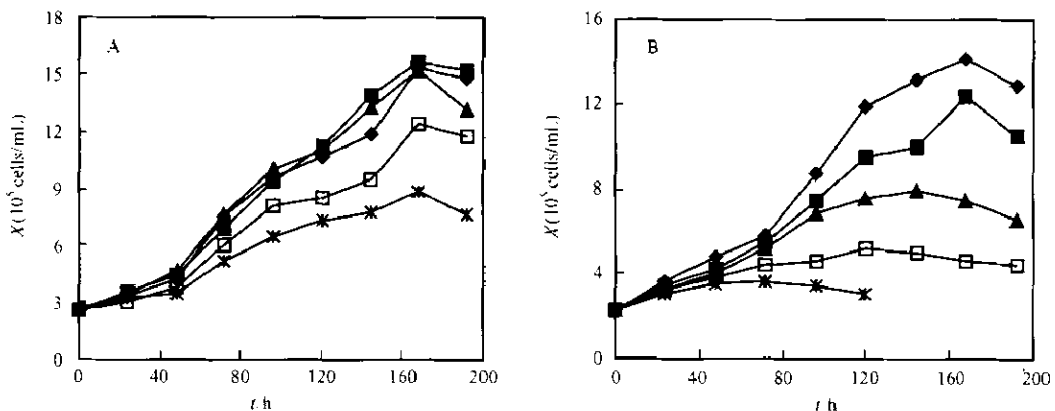


图 1 在不同起始氨浓度的谷氨酸和谷氨酰胺培养基中分批培养重组 CHO-GS 细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth of rCHO-GS cells in the batch cultures with different initial ammonia concentrations in the glutamate- and glutamine-based media

A: glutamate-based medium: $\text{c}_{\text{NH}_4^+}$ (mmol/L): (0.36, ■ 1.42, ▲ 3.54, □ 6.38, * 12.65;

B: glutamine-based medium: $\text{c}_{\text{NH}_4^+}$ (mmol/L): (0.54, ■ 1.73, ▲ 4.26, □ 7.28, * 13.05.

途径,生成更多的能量来满足高氨浓度下细胞维持能增加的需求。在 CHO-*dhfr*⁻ 细胞和杂交瘤细胞的培养中,尽管细胞对葡萄糖的得率系数随着氨浓度的增加而明显下降,但乳酸对葡萄糖的得率系数也相应增加,氨浓度的增加使得葡萄糖代谢更倾向于乳酸的生成^[9,15]。这充分说明由于细胞株的特异性,氨对其葡萄糖代谢有着不同的影响机理。

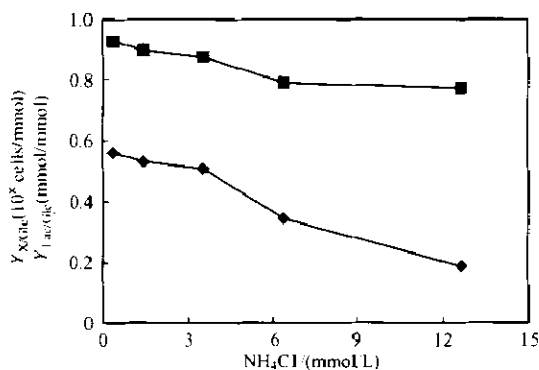
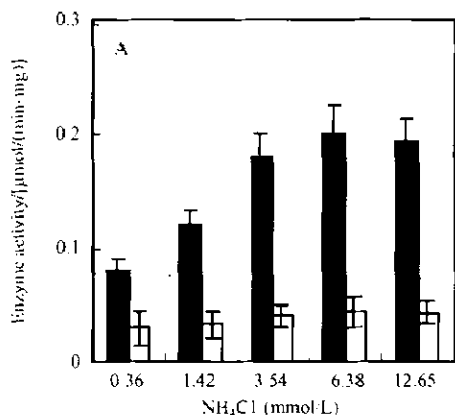


图2 不同起始氨浓度下重组 CHO-GS 细胞批培养 96h 细胞对葡萄糖得率系数(◆)和乳酸对葡萄糖得率系数(■)
Fig. 2 The yield coefficients of cell to glucose (◆) and lactate to glucose (■) of rCHO-GS cells at 96h in the batch cultures with different initial ammonia concentrations

在胞内水平上,氨通过作用于酶调控位点来干扰酶平衡反应, Schneider 等认为氨浓度的提高会干扰糖代谢的反馈调节,导致糖酵解效率提高^[18]。当氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时,己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性分别提高了 43%、140% 和 25%(图 3)。在糖代谢途径中,葡萄糖首先在 HK 酶的作用下生成 6-磷酸葡萄糖,之后经过一系列反应生成丙酮酸,丙酮酸可以生成乙酰辅酶 A 或草酰乙酸进入三羧酸循环,也可以在 LDH 酶作用下生成乳酸。HK 酶活的增加表明细胞对葡萄糖的利用增加,与葡萄糖的比消耗速



率提高是一致的(数据未显示)。PK 酶可以催化磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸,PK 酶活的增加倍数明显高于 LDH 酶活的增加,表明经糖酵解生成丙酮酸的量增加,且大部分进入了 TCA 循环,为细胞生长提供能量,这与图 2 中乳酸对葡萄糖的得率系数逐渐降低也是一致的。

2.3 重组 CHO-GS 细胞氨基酸代谢途径的变化

对于大多数哺乳动物细胞,谷氨酰胺是重要的营养物质和能源物质,谷氨酰胺耗尽会直接限制细胞生长。重组 CHO-GS 细胞由于转染了 GS 基因,可以直接生长在不含谷氨酰胺的培养基中。表 1 为不同起始氨浓度下重组 CHO-GS 细胞批培养 96 h 的氨基酸利用,负值为生成性氨基酸。从表中可以看出,谷氨酸为主要消耗性氨基酸,但其比消耗速率却随起始氨浓度的增加逐渐减少,当氨浓度为 12.65 mmol/L 时,谷氨酸变为累积性氨基酸,而谷氨酰胺的比生成速率却比氨浓度为 0.36 mmol/L 时提高了 2.1 倍。谷氨酸除了由培养基直接提供外,还可以通过谷草转氨酶或谷丙转氨酶途径由 α-酮戊二酸生成,这表明高的氨浓度促进了三羧酸循环(TCA)途径中 α-酮戊二酸转化为谷氨酸,且谷氨酸的生成量逐渐高于参与谷氨酰胺合成的消耗量。在重组 CHO-*dhfr* 细胞培养中,随着氨浓度的增加,细胞对谷氨酰胺的利用速率降低,谷氨酸在培养基中逐渐累积,当氨浓度从 0.21 mmol/L 增加至 5.66 mmol/L 时,谷氨酸对谷氨酰胺的得率系数提高了 1 倍^[15]。

此外,在细胞培养过程中,当氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时,天冬酰胺和丝氨酸的比消耗速率分别提高了 24% 和 36%,天冬酰胺可以提供 NH₄⁺ 给谷氨酸,用于谷氨酰胺的合成;丝氨酸可以参与细胞分解代谢,直接生成丙酮酸,最后进

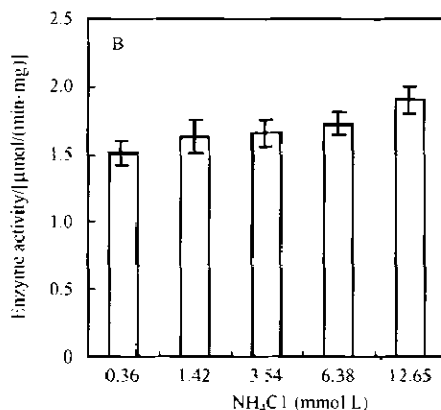


图3 不同起始氨浓度批培养重组 CHO-GS 细胞 96h 己糖激酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的活性
Fig. 3 Activities of hexokinase (A, ▭), pyruvate kinase (A, ■) and lactate dehydrogenase (B) of rCHO-GS cells at 96h in the batch cultures with different initial ammonia concentrations

人 TCA 循环,为细胞生长提供能量,表明细胞为了维持高氨环境中较高的维持能,促进了单位细胞对氨基酸的利用。

表 1 不同起始氨浓度下重组 CHO-GS 细胞分批培养 96 h 时的氨基酸比消耗速率

Table 1 The specific consumption rates of amino acids in the batch cultures of rCHO-GS cells with different initial ammonia concentrations at 96 h

Q_{AA} [$\times 10^{-10}$ mmol/(cell·d)]	NH_4Cl /(mmol/L)				
	0.36	1.42	3.54	6.38	12.65
Q_{glu}	1.5	1.4	1.2	0.22	-0.15
Q_{asn}	2.1	2.1	2.1	2.2	2.6
Q_{asp}	/	/	-0.12	-0.35	-0.62
Q_{ser}	1.4	1.4	1.4	1.4	1.9
Q_{ala}	-2.3	-2.6	-3.4	-3.9	-4.8
Q_{gin}	-0.45	-0.55	-0.74	-0.96	-1.4

在谷氨酰胺代谢途径中,谷氨酸首先在谷氨酰胺合成酶(GS)的作用下结合氨合成谷氨酰胺,谷氨酰胺进入线粒体再通过一系列的代谢途径最后生成 α -酮戊二酸,进入三羧酸循环。从图 4 中可以看出,氨促进了 GS 酶活,当起始氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时,GS 酶活提高了 71%,表明高

的氨浓度促进了谷氨酰胺的合成,用于满足细胞的生长需求,这与谷氨酰胺比生成速率随着氨浓度的增加逐渐增加是一致的(表 1)。氨浓度的增加促进了 GPT 酶活,对 GOT 酶影响不明显,当氨浓度为 6.38 mmol/L 时 GPT 酶活最高,比对照(氨浓度为 0.36 mmol/L)提高了 25%,与表 1 中丙氨酸的比生成速率的增加一致。在骨髓瘤细胞培养中发现,补加 10 mmol/L 的氨对谷氨酰胺的消耗没有影响,但是促进了谷丙转氨酶途径中代谢流量的增加^[19]。GDH 酶活受到氨的抑制,氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时,酶活下降了 47%,Martinelle 和 Häggström 等认为氨对细胞的毒性主要是抑制了谷氨酸脱氢酶的活性,阻止谷氨酸转化为 α -酮戊二酸^[17]。但是 Bonarius 等在杂交瘤细胞培养中发现,氨浓度的添加可以促进谷氨酸脱氢酶的活性增加,通过氨和 α -酮戊二酸的可逆反应来减少氨的累积^[20]。上述结果表明,氨对细胞代谢的影响具有细胞株依赖性,在本实验中,随着氨浓度的增加,重组 CHO-GS 细胞中谷氨酸到 α -酮戊二酸的转化逐渐偏向于谷丙转氨途径,同时由于谷氨酸脱氢酶活的降低,脱氨途径受到抑制。

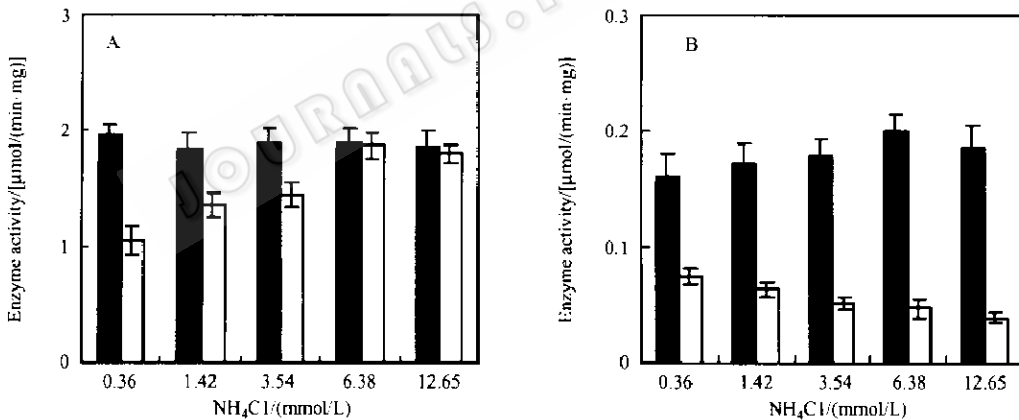


图 4 不同起始氨浓度下重组 CHO-GS 细胞分批培养 96h 谷草转氨酶、谷氨酰胺合成酶、谷丙转氨酶和谷氨酸脱氢酶的活性
Fig. 4 Activities of glutamate-oxaloacetate aminotransferase (A, □), glutamine synthetase (A, ■), glutamate-pyruvate aminotransferase (B, ■) and glutamate dehydrogenase (B, □) of rCHO-GS cells at 96 h in the batch cultures with different initial ammonia concentrations

2.4 重组 CHO-GS 细胞周期和蛋白表达的变化

图 5 为不同起始氨浓度下,重组 CHO-GS 细胞周期分布图数据处理结果。图中暗色尖峰代表细胞周期的 G_0/G_1 期,其积分面积代表细胞数量分布,斜线平坦区代表了 S 期,后面较平缓的暗色峰代表了 G_2/M 期。从图中可以看出,细胞群体在 G_0/G_1 期的分布比例显著高于 S 期和 G_2/M 期。随着氨浓度的增加,细胞群体处于 G_0/G_1 期的比例显著增加,S 期相应减少,当氨浓度为 6.38 mmol/L 时, G_0/G_1 所占比例最高为 81.2%,比对照(氨浓度为 0.36 mmol/L)

提高了 20%,S 期却降低了 44%。当氨浓度继续增加到 12.65 mmol/L 时,由于较高的氨浓度干扰了细胞正常的生理生化状态,细胞周期分布没有规律。 G_0/G_1 期是 DNA 合成前期,主要进行胞内蛋白质、RNA 以及多聚核蛋白体的合成,易受营养因子等外界环境因素的影响,当细胞在培养过程中因营养物缺乏或一些调节因子的作用,可使 G_0/G_1 期发生阻滞而延长。许多研究认为,使细胞捕获在 G_0/G_1 期有助于提高重组蛋白质的生产,Li 等发现添加 DMSO 会导致细胞 G_0/G_1 期发生阻滞,从而可以提高

乙肝表面抗原的表达^[21]; Kaufmann 等将 CHO 细胞的培养温度从 37℃ 降低到 30℃, 发现低温使细胞群体处于 G₀/G₁ 期的细胞比例逐渐增加, 认为这是使重组蛋白质总产量提高的主要因素^[22]; Simpson 和 Lee 等发现高渗透压促进了细胞对葡萄糖和谷氨酰胺等营养物质的利用, 提高了外源基因 mRNA 的转录水平, 并且使细胞捕获在细胞周期的 G₁ 期, 从而促进了单抗的合成^[23,24]。上述研究与本实验结果是一致的, 氨浓度的增加促使细胞捕获在 G₀/G₁ 期, 从而使外源蛋白质的比生产速率有显著的提高(图 6)。S 期与 DNA 合成相关, 细胞群体在 S 期所占细胞比例降低, 表明氨浓度的增加除了影响胞内许多酶反应以外, 还影响一些与 DNA 合成相关的过程。

在动物细胞培养过程中, 氨可以诱导细胞发生凋亡, 但目前对氨诱导细胞发生凋亡的机理还不清楚。Westlund 等以杂交瘤细胞为研究对象, 认为由于 Na⁺、K⁺ 和 Cl⁻ 的协同运输作用, 使 NH₄⁺ 与 K⁺ 发生竞争, 进入胞内引起胞质酸化, 这是凋亡现象的一个典型特征^[25]。而 Mirabet 等分别考察了氨对 Jurkat 细胞、GH₄ 细胞和 LLC-PK1 细胞的毒性影响, 发现在相同培养条件下氨只抑制 Jurkat 细胞发生凋亡, 认为由于细胞代谢产物 DPCA (dipropylcyclopentylxanthine) 和 DNA 结合, 使 DNA 发生核小体间的特异性断裂, 从而诱导细胞发生凋亡^[26]。在本实验中没有观察到细胞凋亡现象, 这可能与细胞株特异性有关。

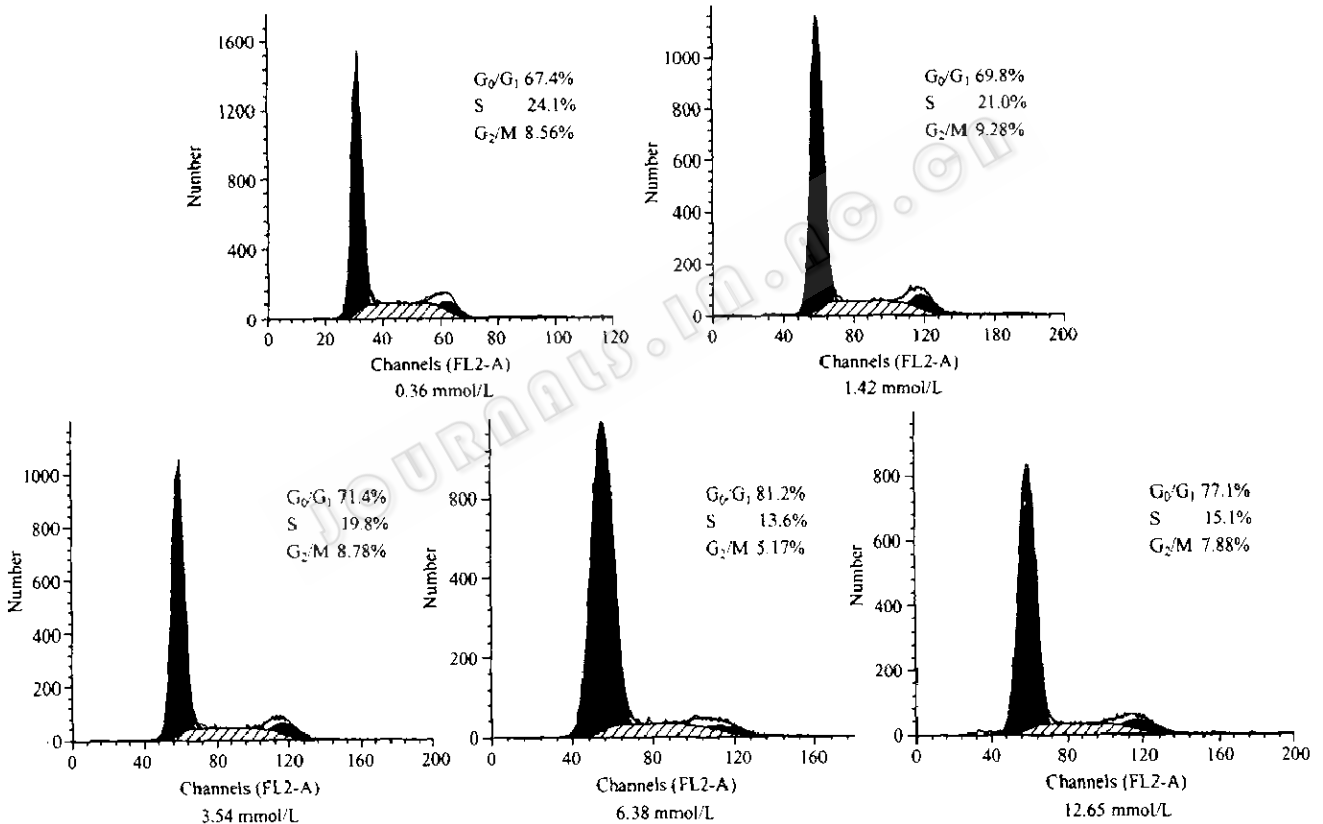


图 5 不同起始氨浓度下重组 CHO-GS 细胞的周期分布

Fig. 5 Cell cycle analysis of rCHO-GS cells cultured with different initial ammonia concentrations

3 结论

在重组 CHO-GS 细胞无血清培养过程中, 当起始氨浓度为 1.42 mmol/L 时, 细胞最高密度可达到 15.6×10^5 cells/mL, 氨浓度继续增加至 12.65 mmol/L, 细胞密度仍可达到 8.9×10^5 cells/mL, 而在含谷氨酰胺培养基中, 仅 4.26 mmol/L 的氨浓度就可以抑制细胞生长, 正是由于 GS 系统的引入, 细胞可

以利用谷氨酸和氨合成谷氨酰胺, 使氨对细胞的毒副作用显著降低。随着起始氨浓度的增加, 糖代谢途径中的己糖激酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶酶活增加, 表明细胞参与糖酵解的流量增加, 且更倾向于高能生成途径。在谷氨酰胺代谢中, 当起始氨浓度从 0.36 mmol/L 增加到 12.65 mmol/L 时, 细胞对天冬酰胺和丝氨酸的利用增加, 而谷氨酸在 12.65 mmol/L 变为生成性氨基酸; 氨促进了谷丙转氨酶活

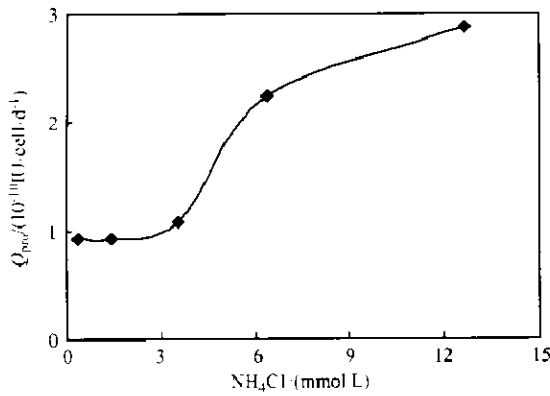


图6 不同起始氨浓度批培养中 CHO-GS 细胞重组蛋白比生产速率

Fig. 6 The specific production rate of recombinant protein of rCHO-GS cells in the batch cultures with different initial ammonia concentrations

性的增加,抑制了谷氨酸脱氢酶活性,表明谷氨酸转化为 α -酮戊二酸的脱氨途径受到抑制,转氨途径逐渐从谷草转氨酶途径偏移到谷丙转氨酶途径。对细胞周期检测结果表明,氨的添加促使细胞群体处于 G_0/G_1 期的比例增加,重组蛋白的比生产速率有显著提高,但没有出现细胞凋亡现象。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Altamirano C, Illanes A, Casablancas A *et al.* Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol Prog*, 2001, **17**:1032 - 1041
- [2] Atanassov CL, Seiler N, Rebel G. Reduction of ammonia formation in cell cultures by L-alanyl-L-glutamine requires optimization of the dipetide concentration. *J Biotechnol*, 1998, **62**:159 - 162
- [3] Genzel Y, Ritter JB, Köning S *et al.* Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**(1):58 - 69
- [4] Chang YD, Grodzinsky AJ, Wang DIC. In-situ removal of ammonium and lactate through electrical means for hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **47**(3):308 - 318
- [5] Jeong YH, Wang SS. In-situ removal of ammonium ions from hybridoma cell culture media: selection of adsorbent. *Biotechnol Technol*, 1992, **6**:341 - 346
- [6] Chen PF, Harcum Sarah W. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *J Biotechnol*, 2005, **117**:277 - 286
- [7] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnol*, 2004, **22**:1393 - 1398
- [8] Dempsey J, Ruddock S, Osborne M *et al.* Improved fermentation processes for NS0 cell lines expressing human antibodies and glutamine synthetase. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**:175 - 178
- [9] Ozturk SS, Riley MR, Palsson BO. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**(4):418 - 431
- [10] Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM *et al.* Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microbiol Technol*, 2000, **27**:43 - 52
- [11] Yang M, Butler M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **68**(4):370 - 380
- [12] Zhang L(张立), Zhang YX(张元兴), Zhang F(张芳). A new serum-free medium for the culture of recombinant Chinese hamster ovary cells. China patent(中国发明专利), 200410018258.0, 2004
- [13] Fiorina A, Frigo G, Cucchetti E. Liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates by post-column derivatization with o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid. *J Chromato*, 1989, **476**:83 - 92
- [14] Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol III, 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1983
- [15] Sun XM(孙祥明), Zhang YX(张元兴). Effects of ammonia on cell metabolism in the culture of recombinant CHO cells. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2001, **17**(3):304 - 309
- [16] Hassell T, Gleave S, Butler M. Growth inhibition in animal cell culture: The effect of ammonia and lactate. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, **30**:29 - 41
- [17] Martinelle K, Häggström L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. *J Biotechnol*, 1993, **30**:339 - 350
- [18] Schneider M, Marison I M, von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol*, 1996, **46**:161 - 185
- [19] Martinelle K, Häggström L. Effects of NH_4^+ and K^+ on the energy metabolism in Sp2/0-Ag14 myeloma cells. *Cytotechnology*, 1999, **29**:45 - 53
- [20] Bonarius HPJ, Houtman JHM, de Gooijer CD *et al.* Activity of glutamate dehydrogenase is increased in ammonia-stressed hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **57**(4):447 - 453
- [21] Li J, Sun X, Zhang Y. Improvement of hepatitis surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Process Biochem*, 2006, in press
- [22] Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M *et al.* Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **63**(5):573 - 582
- [23] Simpson NH, Singh RP, Emery AN *et al.* Bel-2 over-expression reduces growth rate and prolongs G1 phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **64**(2):174 - 186
- [24] Lee MS, Lee GM. Effect of hyperosmotic pressure on cell growth and antibody production in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Cytotechnology*, 2001, **36**:61 - 69
- [25] Westlund A, Häggström L. Ammonium ion transport by the $Na^+ K^+ 2Cl^-$ cotransporter induces apoptosis in hybridoma cells. *Biotechnol Lett*, 1997, **20**:87 - 90
- [26] Mirabet M, Navarro A, Lopea A *et al.* Ammonium toxicity in different cell lines. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56**(5):530 - 537