

# 谷氨酰胺对微囊化重组 CHO 细胞生长代谢及内皮抑素表达的影响 The Effect of Glutamine on the Growth, Metabolism and Endostatin Production of Microencapsulated rCHO Cells

周 晶<sup>1,2</sup>, 张 英<sup>1,2</sup>, 王 为<sup>1</sup>, 马隽宇<sup>1,2</sup>, 张华安<sup>1,2</sup>, 郭 昕<sup>1</sup>, 马小军<sup>1\*</sup>

ZHOU Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, MA Jun-Yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Hua-An<sup>1,2</sup>, GUO Xin<sup>1</sup> and MA Xiao-Jun<sup>1\*</sup>

1 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

1 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**摘 要** 微囊化技术是一种有发展潜力的生物技术,在细胞移植和药物控释等方面具有广泛的应用。然而由于目前微囊化细胞规模化培养技术还不成熟,阻碍了其在临床治疗中的推广与应用。为了了解微囊化重组 CHO 细胞的生长代谢特性为今后规模化培养优化提供技术参考,考察了主要氮源物质谷氨酰胺对微囊化重组 CHO 细胞生长代谢及内皮抑素表达的影响。结果显示:当谷氨酰胺起始浓度从 2.69mmol/L 增加到 9.05mmol/L 时最大活细胞密度并没有增高,细胞增殖没有显著差异。当谷氨酰胺起始浓度较低(2.69mmol/L)时,葡萄糖的比消耗速率较大;当谷氨酰胺起始浓度增高时(7.91mmol/L~9.05mmol/L)葡萄糖和谷氨酰胺的比消耗速率增大,但细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的利用率降低。谷氨酰胺对产物表达有显著影响,起始浓度为 4.97mmol/L 时的内皮抑素累积浓度最高,达 546.36ng/mL,过低和过高谷氨酰胺起始浓度下内皮抑素的累积浓度均较低。

**关键词** 谷氨酰胺,微囊化,CHO 细胞,代谢,内皮抑素

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0162-05

**Abstract** Cell transplantation is a promising technology in cancer therapy, however, immunological rejection is the major problem of cell transplantation. Based on the permselective property of microcapsule membrane, encapsulated cells can be immuno-protected. The normal physiological state and function expression of cells can be maintained so as to realize allo- or xenotransplantation. The microencapsulated cells grow in three dimensions, giving a more biologically representative *in vivo* model, which hints difference in characters of growth and metabolism compared to the monolayer cells. Therefore, characterization of growth and metabolism of microencapsulated recombinant CHO cells is essential for further large-scale culture. In present study, the effect of concentration of glutamine on the growth, metabolism and endostatin production of microencapsulated cells was investigated.

In the experimental range of initial glutamine concentrations from 2.69mmol/L to 9.05mmol/L in the culture of microencapsulated recombinant CHO cells, the maximum density of active cells and multiplication ratios almost kept constant.

Received: July 25, 2005; Accepted: October 11, 2005.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China(No. 20236040) and National High Technology Research and Development Program of China(863 program)(No. 2003AA205111).

\* Corresponding author. Tel: 86-411-84379139; E-mail: maxj@dicp.ac.cn

国家自然科学基金重点项目(No.20236040);国家高技术研究与发展计划项目(No.2003AA205111)资助。

The specific consumption rate of glucose increased with lower initial glutamine concentration (2.69mmol/L). When initial glutamine concentration was much higher (7.91mmol/L ~ 9.05mmol/L), the specific consumption rates of both glucose and glutamine increased while the efficiencies of glucose and glutamine decreased. The highest efficiencies of glucose and glutamine utilization were observed with initial glutamine concentration of 4.97mmol/L. It was also demonstrated that glutamine had significant effect on the accumulation of endostatin. The accumulative concentration of endostatin reached its peak of 546.36 ng/mL with the initial glutamine concentration of 4.97mmol/L.

**Key words** glutamine, microencapsulation, CHO cells, metabolism, endostatin

肿瘤是危害人体健康的主要疾病之一,但人们一直没有找到最为行之有效的治疗方法。随着基因工程技术的进步,一种新型有效的肿瘤疗法——基因工程细胞移植也迅速发展起来。然而,移植过程中免疫排斥反应的发生限制了该疗法在临床治疗中的推广与应用。80年代初 Lim 等人<sup>[1]</sup>将微囊化技术与组织细胞移植相结合,利用微囊膜的免疫隔离特性解决了上述疗法中的“瓶颈”问题。近些年有多人使用分泌内皮抑素的微囊化细胞对肿瘤进行移植治疗<sup>[2,3]</sup>,并取得了良好的治疗效果。然而,这些研究仅限于小规模实验室范围。微囊化组织细胞移植技术的产业化发展,如进行大量的临床研究,需要严格控制培养条件以制备大量的生长状态良好、产物分泌旺盛的微囊化细胞<sup>[4]</sup>,因此有必要对微囊化细胞培养过程进行优化。

谷氨酰胺是细胞培养过程中重要的氮源和能源物质,而其代谢副产物氨又会同时抑制细胞的生长,因此,谷氨酰胺的加入量是对细胞培养过程进行优化和控制的主要参数之一。然而谷氨酰胺对微囊内细胞生长代谢的影响目前未见报道。本文着重研究谷氨酰胺对微囊化重组 CHO 细胞生长、代谢以及内皮抑素表达的影响,以期对细胞规模化培养的优化提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 细胞株及试剂:**表达内皮抑素(Endostatin)的重组中国仓鼠卵巢细胞(rCHO)(由上海细胞所惠赠),海藻酸钠(Alginate)、聚赖氨酸(Poly-L-lysine)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、嘌呤霉素(Puromycin)、FITC 标记的二抗、PI 及 DMEM/F12 培养基均购自 Sigma 公司,兔抗人 endostatin 抗体为 LAB VISION 公司产品,L-谷氨酰胺(L-Glutamine)为上海源聚生物科技有限公司产品,胎牛血清由北京三利生物制品厂提供,其它试剂均为分析纯产品。

**1.1.2 主要仪器:**Olympus CK40 型生物倒置显微镜

(日本 Olympus 光学工业株式会社),MS-353 酶联免疫检测仪(Labsystems Co. Ltd, 芬兰),UV2550 紫外分光光度计(岛津公司,日本),Heraeus BB16UV CO2 恒温培养箱(Heal Force Development Co. Ltd, 中国),SBA-40C 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所),大功率高压脉冲微胶囊制备仪(本实验室研制),激光共聚焦显微镜(Leica SP2, Germany)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 APA 微囊化细胞的制备:**制备方法参照文献[5]。对数生长期的细胞与无菌的 1.5% 海藻酸钠溶液混合均匀,细胞浓度为  $2 \times 10^6$  cells/mL。利用微胶囊制备仪将该悬液滴入 1.1% 氯化钙溶液中进行凝胶化反应,形成含有细胞的海藻酸钙胶珠。胶珠与适量的多聚赖氨酸溶液进行成膜反应,形成聚赖氨酸/海藻酸钠微胶囊。然后将微胶囊重新悬浮于 0.15% 的海藻酸钠溶液中,中和其表面正电荷。用 3% 的柠檬酸钠液化微胶囊内的海藻酸钙凝胶,再用生理盐水洗去微胶囊和细胞碎屑,即制备出实验所需微囊化重组 CHO 细胞。

**1.2.2 谷氨酰胺起始浓度对微囊化细胞培养的影响:**预先配制好不同谷氨酰胺浓度培养基,分成 4 组,每组对应不同谷氨酰胺浓度培养基。将包封重组 CHO 细胞的微囊接种到 24 孔板中,微囊与培养基体积比为 1:10,培养 12d。每两天吸取一定量上清于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待测,每组 3 个重复。

**1.2.3 微囊内活细胞密度测定:**利用 MTT 检测细胞活性原理间接反映活细胞密度<sup>[6,7]</sup>。具体方法如下:在吸取上清后的孔中加入 5mg/mL MTT 溶液(100 $\mu\text{L}$ /孔),继续培养 24h,待紫色结晶完全后将微囊筛出,用 1mL DMSO 将微囊内细胞形成的结晶充分溶解,吸取 150 $\mu\text{L}$  溶解液加入 96 孔板中用酶联检测仪检测波长 570nm 下的吸光度值(630nm 为参考波长)。作出吸光度值与细胞密度的标准曲线,即可计算出相应活细胞密度。

**1.2.4 微囊内细胞代谢测定:**葡萄糖、乳酸浓度使用 SBA-40C 型生物传感分析仪测定,谷氨酰胺浓度

采用水解法与生物传感分析仪联用<sup>[8]</sup>测定,氨浓度的测定使用尿素试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司),具体操作步骤参考试剂盒说明书。内皮抑素浓度采用 ELISA 法测定,试剂盒购自美国 R&D 公司,具体操作步骤参考试剂盒说明书。

**1.2.5 微囊内细胞的免疫组化:**制备微囊化细胞的石蜡切片,常规脱蜡至水,微波抗原修复,羊血清封闭后滴加兔抗人 endostatin 抗体(1:50)4℃过夜,PBS 充分洗涤后以 FITC 标记的二抗(1:64)37℃孵育 1h,PBS 洗涤后 PI(5μg/mL)复染核,90%甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微囊化细胞的培养

图 1 表示了微囊化重组 CHO 细胞的生长过程。微囊化初期(A),细胞在微囊内呈单个分散状态;培养 1~2d 后(B),细胞开始聚集,呈立体生长状态;之后进入对数生长期(C),细胞团逐渐增大;进入稳定期(D)后,细胞团占据微囊内大部分空间,达到极高密度。

### 2.2 谷氨酰胺起始浓度对微囊化细胞生长的影响

图 2 为不同谷氨酰胺起始浓度下微囊化重组

CHO 细胞的生长曲线。从图上可以看出,细胞活性较好,生长没有延滞期,第 1 天就进入对数生长期,到第 4 天时细胞生长趋于稳定,稳定期持续时间较长,从第 8 天起细胞开始衰亡,并且不同谷氨酰胺起始浓度对细胞生长周期没有影响。

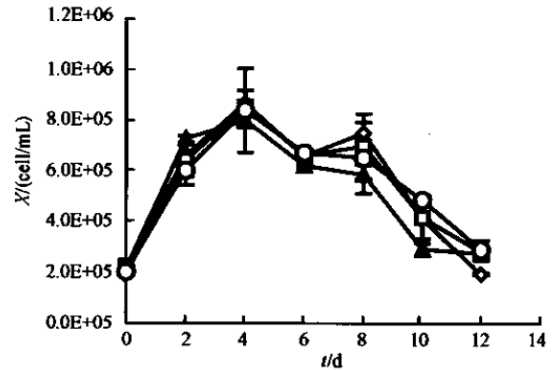


图 2 不同谷氨酰胺起始浓度下微囊化重组 CHO 细胞的生长

Fig. 2 Growth of microencapsulated rCHO cells with different initial glutamine concentrations

◆2.69mmol/L, □4.97mmol/L, ▲7.91mmol/L, ○9.05mmol/L.

Schneider 等研究发现高谷氨酰胺浓度下鼠杂交瘤细胞的生长和单克隆抗体生产均达到最优<sup>[9]</sup>。而在本实验中,高谷氨酰胺浓度并没有刺激细胞生长,

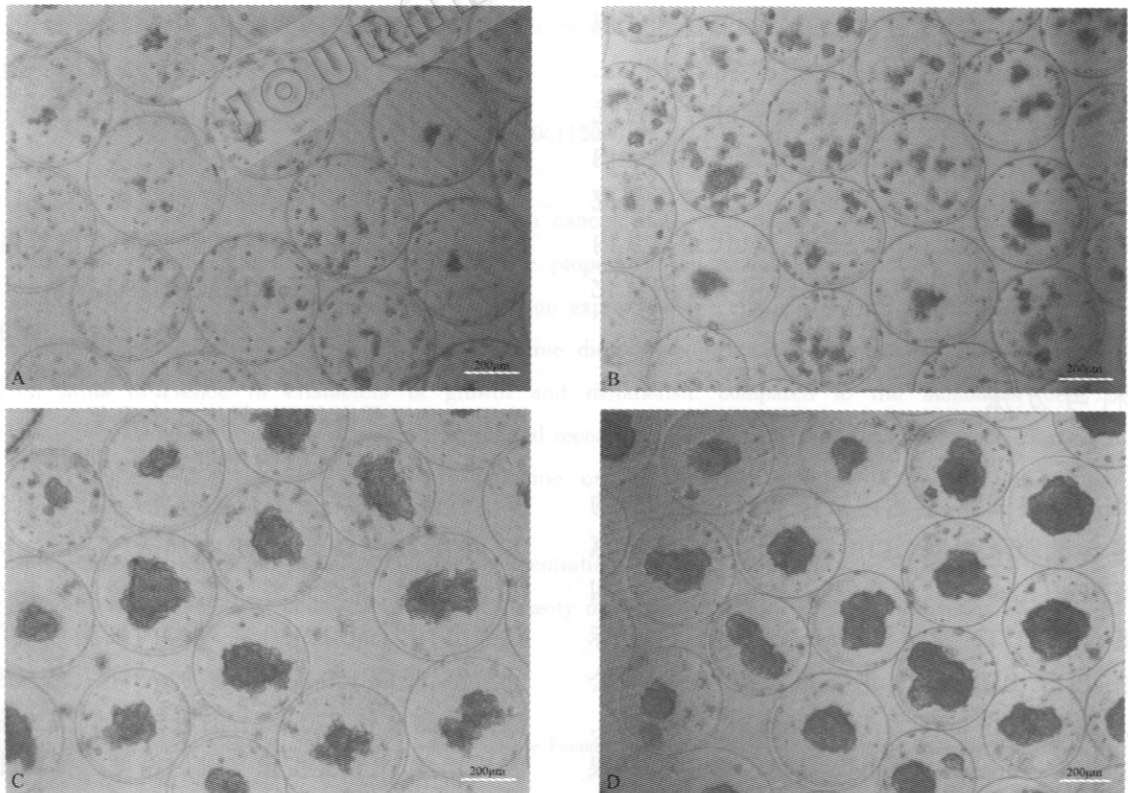


图 1 微囊化重组 CHO 细胞生长过程(倒置显微镜, × 100)

Fig. 1 The images of growth profile of microencapsulated rCHO cells( × 100)

A: the initial state B: the process of conglomerating C: logarithmic phase D: stationary phase.

可见谷氨酰胺对微囊化重组 CHO 细胞生长无显著影响。

### 2.3 谷氨酰胺起始浓度对微囊化细胞葡萄糖代谢和谷氨酰胺代谢的影响

有研究报道在高底物(葡萄糖、谷氨酰胺)浓度条件下培养时,细胞对底物的消耗会超过其正常生长代谢所必需的量,从而底物的利用率大大降低<sup>[10]</sup>。从本次实验结果来看,在高谷氨酰胺浓度下,葡萄糖和谷氨酰胺的比消耗速率增大(表 1),但细胞数量以及产物产量与其它起始谷氨酰胺浓度下培养相比没有提高(图 3),故葡萄糖和谷氨酰胺的利用率降低。而在谷氨酰胺起始浓度较低时(2.69mmol/L),葡萄糖的比消耗速率最大,达到  $7.23 \times 10^{-9}$  [mmol/(cells·d)],说明动物细胞体外培养所必需的两种主要营养物质——葡萄糖、谷氨酰胺起着互补作用,谷氨酰胺不足时细胞会消耗更多葡萄糖以满足生长代谢所需。在谷氨酰胺起始浓度为 4.97 mmol/L 时葡萄糖利用率最高。

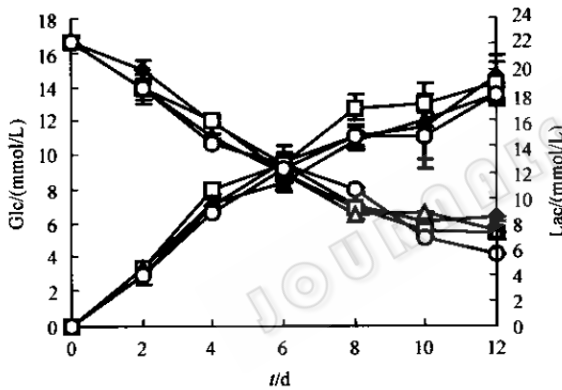


图 3 不同谷氨酰胺起始浓度下微囊化重组 CHO 细胞培养中葡萄糖、谷氨酰胺的消耗以及乳酸、氨的生成

Fig. 3 Consumptions of glucose and glutamine, and productions of lactate and ammonia of microencapsulated rCHO cells with different initial glutamine concentrations

◆2.69mmol/L; □4.97mmol/L; ▲7.91mmol/L; ○9.05mmol/L.

### 2.4 谷氨酰胺起始浓度对微囊化细胞内皮抑素表达的影响

在微囊化细胞成团后,采用 endostatin 抗体和 FITC 标记的抗体对微囊化细胞切片进行免疫组化鉴定,胞浆中可见 endostatin 阳性染色(图 4)。

图 5 为不同谷氨酰胺起始浓度下微囊化重组 CHO 细胞批培养产物内皮抑素的累积浓度。在本实验浓度范围内,内皮抑素浓度先随着谷氨酰胺起始浓度的增加(2.69 ~ 4.97 mmol/L)而增加,之后又随着谷氨酰胺起始浓度的增加(4.97 ~ 9.05 mmol/L)而减少,在谷氨酰胺起始浓度为 4.97 mmol/L 时产物浓度最大,达 546.36 ng/mL。表明谷氨酰胺对内皮抑素表达有显著的影响。

在谷氨酰胺起始浓度过高时,会产生过多的代谢副产物——氨,这些氨的来源是细胞代谢和谷氨酰胺水解共同产生。在谷氨酰胺起始浓度 2.69 mmol/L ~ 4.97 mmol/L 时,谷氨酰胺的比消耗速率较小,同时氨对谷氨酰胺的得率系数较小(表 1),但细胞生长代谢旺盛(图 3),表明较低谷氨酰胺起始浓度条件下谷氨酰胺的利用率较高,Cruz 等在研究 BHK 细胞的连续培养时也得到类似结果<sup>[11]</sup>。

表 1 葡萄糖、谷氨酰胺的比消耗速率以及氨对谷氨酰胺的得率系数

Table 1 Specific consumption rates of glucose and glutamine, and yield coefficient of ammonia to glutamine

$C_{Gln}/$ (mmol/L)	$q_{Glc}/[10^{-9} \text{ mmol}/$ (cells·d)]	$q_{Gln}/[10^{-9} \text{ mmol}/$ (cells·d)]	$Y_{Amn/Gln}/$ (mmol/mmol)
2.69	$7.23 \pm 0.40$	$2.52 \pm 0.10$	$0.80 \pm 0.12$
4.97	$5.59 \pm 0.19$	$2.59 \pm 0.10$	$0.79 \pm 0.06$
7.91	$6.66 \pm 0.19$	$4.72 \pm 0.10$	$0.88 \pm 0.09$
9.05	$6.70 \pm 0.30$	$3.68 \pm 0.50$	$0.95 \pm 0.10$

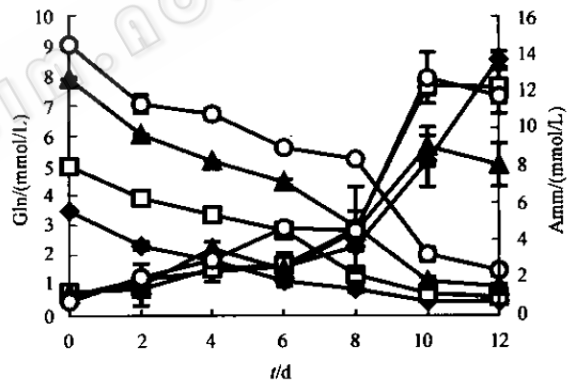


图 4 微囊化重组 CHO 细胞 endostatin 免疫组化染色

Fig. 4 Immunofluorescent image of microencapsulated rCHO cells stained by endostatin antibody

已知内源性氨离子(由细胞代谢产生)对细胞的毒性作用与外源性氨离子(由谷氨酰胺水解产生及

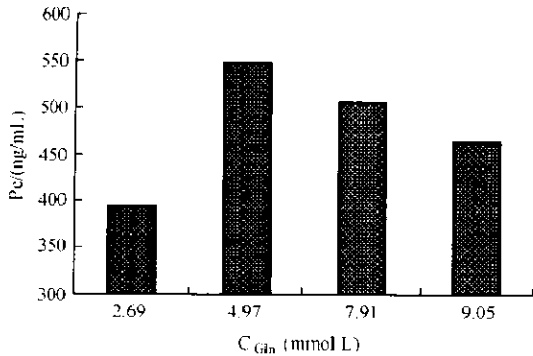


图5 不同谷氨酰胺起始浓度下微囊化重组 CHO 细胞培养中内皮抑素浓度

Fig. 5 Endostatin production of microencapsulated rCHO cells with different initial glutamine concentrations

人为加入)的毒性作用有所不同<sup>[12]</sup>,一般来说内源性氨离子的毒性作用较小。有文献报道当培养体系中氨离子浓度达到 3.5mmol/L 时细胞生长就受到严重抑制<sup>[13]</sup>。而在本实验中,当起始谷氨酰胺浓度较高时,细胞代谢所产生的氨离子的累积没有影响到细胞生长,却抑制了产物合成<sup>[14]</sup>,这也说明了内源性氨离子对细胞的毒性作用。另一方面,当谷氨酰胺起始浓度过低时,氮源不足,细胞可以维持生长,但是产物合成受阻,造成最终产量较低。

综上所述我们得出:在批培养微囊化重组 CHO 细胞时,4.97mmol/L 的谷氨酰胺起始浓度较为适宜,此时细胞代谢旺盛,能有效利用碳源物质(葡萄糖)和氮源物质(谷氨酰胺),并且产物浓度最高。虽然增加或减少谷氨酰胺浓度对细胞增殖倍数、最大活细胞密度均无显著影响,但过高的谷氨酰胺起始浓度会抑制内皮抑素生成,并且使底物的利用率下降。在今后的规模化培养时,建议将谷氨酰胺浓度维持在 4.97mmol/L 左右。

## REFERENCES(参考文献)

[1] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 1980, **210**: 908-910  
 [2] Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R *et al*. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer

cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(1): 29-34  
 [3] Joki T, Machluf M, Atala A *et al*. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(1): 35-39  
 [4] Orive G, Hernandez RM, Gaseon AR *et al*. Encapsulated cell technology: from research to market. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**(9): 382-387  
 [5] Ma XJ, Vaccie I, Sun AM. Generation of alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Art Cells Blood Subs and Immob Biotech*, 1994, **22**(1): 43-69  
 [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, **95**: 55-63  
 [7] Tang H(唐浩), Shang P(商澎), Qian AR(竇爱荣) *et al*. Comparison of cell-counting assays in cancer metastasis experiments in vitro. *J Fourth Mil Med Unit* (第四军医大学学报), 2004, **25**(7): 596-599  
 [8] Chen KF(陈奎发), Jiang N(蒋楠), Yang Y(杨艳) *et al*. Determination of glutamine with the method of acidic hydrolysis coupled with enzyme membrane. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 2002, **28**(9): 26-28  
 [9] Schneider YJ, Lavoix A. Monoclonal antibody production in semi-continuous serum- and protein-free culture. Effect of glutamine concentration and culture conditions on cell growth and antibody secretion. *J Immunol Methods*, 1990, **129**(2): 251-268  
 [10] Sanfeliu A, Paredes C, Cair JJ *et al*. Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme Microb Technol*, 1997, **21**: 421-428  
 [11] Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJT. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **66**: 104-113  
 [12] Schneider M, Marison IW, von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol*, 1996, **46**(3): 161-185  
 [13] Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM *et al*. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **27**(1-2): 43-52  
 [14] Andersen DC, Gooch CF. The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **47**: 96-105