

## 小鼠睾丸支持细胞体外培养特性

师冰洋<sup>1</sup>, 张淑香<sup>1</sup>, 郭美锦<sup>1</sup>, 王永红<sup>1</sup>, 张嗣良<sup>1</sup>, 史小林<sup>2</sup>

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 首都医科大学生殖医学中心, 北京 100069

**摘要:** 支持细胞是睾丸的重要组成部分, 其主要功能是为生精细胞提供适宜的生长环境。从幼鼠睾丸中分离得到支持细胞, 并通过苏木精-伊红和 Fas-L 免疫组化染色对分离得到的细胞进行了鉴定。通过对原代小鼠睾丸支持细胞的贴壁、生长和培养液中葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸等营养底物及其副产物乳酸、铵根离子等的代谢以及培养液渗透压和 pH 的研究, 发现支持细胞的贴壁时间主要集中在接种后 2~4 h; 当培养液中铵根离子浓度高于 2.3 mmol/L, 渗透压高于 326 mosm/kg, pH ≤ 6.8 时支持细胞生长进入衰亡期; 在氨基酸代谢方面, 发现培养过程中丙氨酸和谷氨酸浓度迅速增加, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸浓度略有降低, 丝氨酸、精氨酸和甘氨酸浓度基本保持不变。因此培养液中铵根离子浓度的过量积累、渗透压和 pH 的异常和贴壁面积不足是限制支持细胞静态生长的主要因素。研究结果为支持细胞大规模培养及工艺优化奠定了基础。

**关键词:** 支持细胞, 分离与鉴定, 体外培养, 代谢特性

## Metabolic characterization of rat sertoli cell *in vitro* culture

Bingyang Shi<sup>1</sup>, Shuxiang Zhang<sup>1</sup>, Meijin Guo<sup>1</sup>, Yonghong Wang<sup>1</sup>, Siliang Zhang<sup>1</sup>, and Xiaolin Shi<sup>2</sup>

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

2 Reproductive Medical Center of Capital Medical University, Beijing 100069, China

**Abstract:** Sertoli cell (SC) is intrinsic to the testis and provides an appropriate growth environment for the germ cells. It was separated from rat's testis and identified by hematoxylin and eosin staining (HE) and immunocytochemical reaction, then cultivated *in vitro*. Culture conditions such as pH, osmotic pressure and metabolic parameters that include consumption rates of glucose, glutamine, amino acids and formation rates of lactic acid, ammonium ion were investigated. It was showed that adhesion process of SCs was accomplished within 2–4 hours after inoculation. It was also observed that the SCs entered into the decline phase when the concentration of ammonium ion and lactic acid were above 2.3 mmol/L and 14 mmol/L, respectively, which caused osmotic pressure above 326 mosm/kg and pH below 6.8 in the medium. As the changes of amino acids during culture were concerned, Glu and Ala accumulated rapidly, while Val, Leu, Ile reduced slightly and at the same time Ser, Arg, and Gly were stable. The restrict factors for SCs grown in static culture might be high osmotic pressure and low pH, which were generated when glutamine and glucose were metabolized into lactic acid. The findings could be fundamental in the process optimization of large scale Sertoli cells *in vitro* culture.

**Received:** December 9, 2008; **Accepted:** February 19, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z216), Shanghai Biotechnology Industrialized Platform (No. 07DZ22914), National Special Fund for State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (No. 2060204).

**Corresponding author:** Shuxiang Zhang. E-mail: zhangsx1976@yahoo.com.cn

Meijing Guo. E-mail: guo\_mj@ecust.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA02Z216), 上海市生物技术产业化平台(No. 07DZ22914), 国家重点实验室专项经费(No. 2060204)资助。

**Keywords:** sertoli cell, separation and identification, *in vitro* culture, metabolic characterization

睾丸支持细胞(Sertoli cells, SCs)是生精小管上皮中的一种重要功能细胞,主要有以下特性:1)通过形成血-睾屏障使各阶段生精细胞免于免疫系统的监视,并合成活性因子,如 FAS 配体(FAS ligand, FAS-L)等,抑制针对屏障以外的生精细胞的免疫应答。Selawry 等<sup>[1]</sup>最先将大鼠的 SCs 与胰岛共同移植到大鼠肾被囊处,发现 SCs 可在移植处提供局部的免疫抑制从而创造一个睾丸外的免疫豁免微环境。2)提供大量营养物质和多种可溶性的营养因子及调节蛋白,提高生精细胞活性,刺激精子的形成和生长;3)对其他细胞(如神经元细胞、神经干细胞等)有营养和促生长作用。Sanberg 等<sup>[2]</sup>将大鼠 SCs 与牛肾上腺嗜铬细胞共同移植到 PD(Parkinson disease, PD)大鼠体内;而 Cameron 等<sup>[3]</sup>采用模拟微重力技术将大鼠 SCs 和 NT2 以 1:4 的比例制成盘状的细胞聚合体,做为可供移植新型组织结构,应用于 HD(Huntington's disease, HD)均取得了很好的效果;单独移植同样可以改善病鼠的异常运动,表明 SCs 对多巴胺(Dopamine, DA)神经元具有独立的营养作用。此后相继进行了脑内 SCs 与其他细胞的共移植<sup>[4,5]</sup>或 SCs 的单独移植<sup>[6-10]</sup>试验,在大鼠的 PD 和 HD 的研究进展模型中均得到了满意结果。因此支持细胞在细胞治疗和医药方面有很好的前景,现已成为研究热门之一。

然而支持细胞移植需要大量的健康的细胞,因此如何得到大量具有正常生理功能的支持细胞是目前急需解决的问题。关于支持细胞培养方面的研究目前报道主要集中在支持细胞与其他细胞的共培养和永生细胞株的建立两方面<sup>[11-20]</sup>,还没有针对支持细胞本身的适宜培养环境和代谢特性的研究。为此,着重研究了体外静态培养下支持细胞的贴壁过程、底物消耗和产物生成等代谢特性及渗透压、pH 等培养环境,进一步探讨了支持细胞体外培养时的主要影响因素,为支持细胞的大规模培养奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和试剂

实验动物: 出生 10~15 d 的 ICR 雄性小鼠 4 只,

由上海必凯实验动物中心提供。

培养基: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 高糖)固体培养基购自 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清(Fetal calf serum, FCS)、胰和胶原蛋白酶均购自 Invitrogen 公司。兔抗 Fas-L 抗体及兔 SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司;显色剂 3,3-二氨基苯胺(Diaminobenzidine, DAB)购自北京中衫金桥技术有限公司。

### 1.2 SCs 的体外分离

细胞分离主要参照 Welsh 和 Wiebe<sup>[21]</sup>的方法,略加改进。以下各步操作均在无菌条件下进行。分离雄性 ICR 小鼠的双侧睾丸,将生精小管剪成 1 mm 小段,0.2% I 型胶原酶和 0.1% 胰蛋白酶等体积混合消化 30 min,之后吹打成细胞悬液,经 200 目细胞筛过滤后静置 5 min,弃上清。将细胞重悬,以  $1 \times 10^6$  cells/mL 浓度接种于培养瓶中,37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境(标准环境)培养,进行差速贴壁 10 min,以除去培养液中的杂细胞,然后更换培养瓶继续培养并作为 P<sub>0</sub> 代,此后传代的细胞的代数以此类推称之为 P<sub>1</sub> 代、P<sub>2</sub> 代……

### 1.3 SCs 的体外培养

批培养: 不同浓度的 P<sub>2</sub> 代 SC 细胞接种 24 孔细胞培养板中(A:  $0.2 \times 10^5$  cells/mL; B:  $0.5 \times 10^5$  cells/mL; C:  $1 \times 10^5$  cells/mL),于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每天取 3 个样,重复 3 次,进行细胞计数并留样分析。

换液培养: 方法大致与批培养相同,只是隔日更换 50% 的培养液。

### 1.4 细胞的鉴定

细胞鉴定采用苏木精-伊红染色和 SCs 的 FAS-L 免疫细胞化学染色的方法<sup>[22]</sup>。

### 1.5 分析

细胞计数: 台盼蓝工作液染色,血球计数板计数。

代谢分析: 葡萄糖浓度采用葡萄糖试剂盒(卫生部上海生物制品研究所)测定;氨离子浓度采用尿素氮测定试剂盒(卫生部上海生物制品研究所);乳酸浓度采用乳酸测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定;氨基酸浓度测定采用邻苯二甲醛(OPA,

Fluka, Switzerland)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、硼酸缓冲液、洗脱程序、进样程序等均由随机的技术报告确定。

渗透压: 全自动冰点渗透压测定仪(FM-8P, 上海医大仪器厂)测定。

计算:

比生长速率:

$$\mu = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{C_t}{C_0} \quad (1-1)$$

式中  $t$  为培养时间(d),  $C_t$  为  $t$  时活细胞密度(cells/mL),  $C_0$  为接种时活细胞密度(cells/mL)。

葡萄糖、谷氨酰胺比消耗速率( $q_{Gluc}$ 、 $q_{Gln}$ ):

$$q_{Gluc} \text{ 或 } q_{Gln} = -\frac{1}{C} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (1-2)$$

乳酸、氨比生成速率( $q_{Lac}$ 、 $q_{Amm}$ )

$$q_{Lac} \text{ 或 } q_{Amm} = \frac{1}{C} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (1-3)$$

乳酸生成对葡萄糖消耗的得率系数( $Y_{Lac/Gluc}$ )、氨生成对谷氨酰胺消耗的得率系数( $Y_{Amm/Gln}$ ):

$$Y_{Lac/Gluc} \text{ 或 } Y_{Amm/Gln} = -\frac{dP}{dS} \quad (1-4)$$

支持细胞对营养物消耗的得率系数( $Y_{cells/Gluc}$ 、 $Y_{cells/Gln}$ ):

$$Y_{cells/Gluc} \text{ 或 } Y_{cells/Gln} = -\frac{dX}{dS} \quad (1-5)$$

上式中  $C$  为活细胞密度( $\times 10^5$  cells/mL),  $S$  为葡萄糖、谷氨酰胺的浓度(mmol/L),  $P$  为乳酸、氨的浓度(mmol/L),  $t$  为时间(d)(考虑到谷氨酰胺的自然降解因素, 其消耗浓度取  $dS = dS_{\text{apparent}} - Kt$ , 其中  $dS_{\text{apparent}}$  为表观消耗浓度,  $K$  为自然降解常数, 取值为  $0.0048$  mmol/(L·h),  $t$  为培养时间)。

贴比率:

$$= \frac{\text{接种细胞数} - \text{未贴壁细胞数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\% \quad (1-6)$$

### 1.6 统计学分析

数据用平均数( $\bar{x}$ )表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析的多重比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小鼠睾丸支持细胞鉴定

支持细胞明显特征之一是具有双核仁结构。小

鼠睾丸分离的细胞在体外传代培养过程中, 细胞体积增大, 呈不规则片状。通过 HE 染色后观察到细胞质为红色而细胞核呈紫色, 并出现明显的双核仁结构(图 1a)。对这些双核仁细胞进行 Fas-L 免疫细胞化学染色后, 观察到胞质中 Fas-L 呈强阳性表达, 核圆形或椭圆形, 不着色, 有时可见双核, 阴性对照未见 Fas-L 阳性表达的细胞(图 1b), 表明这些分离培养的细胞为支持细胞。睾丸是 Fas-L 主要的非淋巴来源, 在构成睾丸组织的细胞中, 只有 SC 大量持续分泌 Fas-L, 通过 Fas/FasL 系统发挥其免疫豁免功能, 因此 Fas-L 可作为 SC 的特异性标记<sup>[22]</sup>。

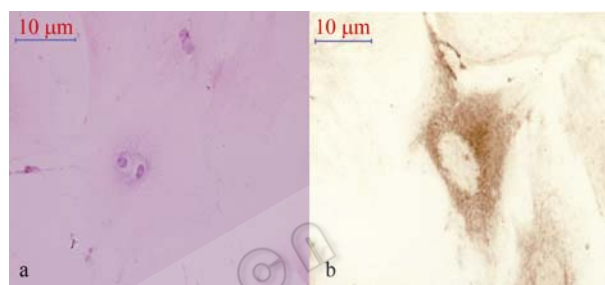


图 1 小鼠睾丸支持细胞 HE 染色和免疫细胞化学反应鉴定

Fig. 1 Identification of rat sertoli cell using HE stain and immunocytochemical reaction. (a) Sertoli cell stained with HE. (b) SCs immunocytochemically labelled with FAL-L antibody.

### 2.2 接种密度对小鼠支持细胞静态贴壁的影响

以 3 种不同密度接种, 对小鼠支持细胞进行贴壁研究(图 2)。A、B、C (A:  $0.2 \times 10^5$  cells/mL; B:  $0.5 \times 10^5$  cells/mL; C:  $1 \times 10^5$  cells/mL) 3 种接种密度的贴壁时间都主要集中在 2~4 h, 只是高密度接种的贴壁率要比低密度的略高。在细胞培养中, 影响细胞贴附和铺展的主要因素有 2 种: 一是二价阳离子(DC); 二是吸附糖蛋白扮演一种类似“桥”的角色, 这是因为在正常生理 pH 下, 真核细胞表面带有不均匀的负电荷, 而传统的培养基质(如塑料、玻璃)表面也带有负电荷, 在这样的相互作用模式下, 细胞显然无法贴附到培养基质上, 但在这个系统中引入“桥”后, “负电荷-桥-负电荷”相互作用模式是可行的。大多数支持细胞在 2 h 之前的贴壁可能主要是在新环境中的适应过程, 2~4 h 之间细胞在这种“桥”的作用下贴壁, 4 h 之后没有贴壁的细胞大多都已死亡, 而接种密度高时, 细胞之间能形成协同生长效应(图 2a)。

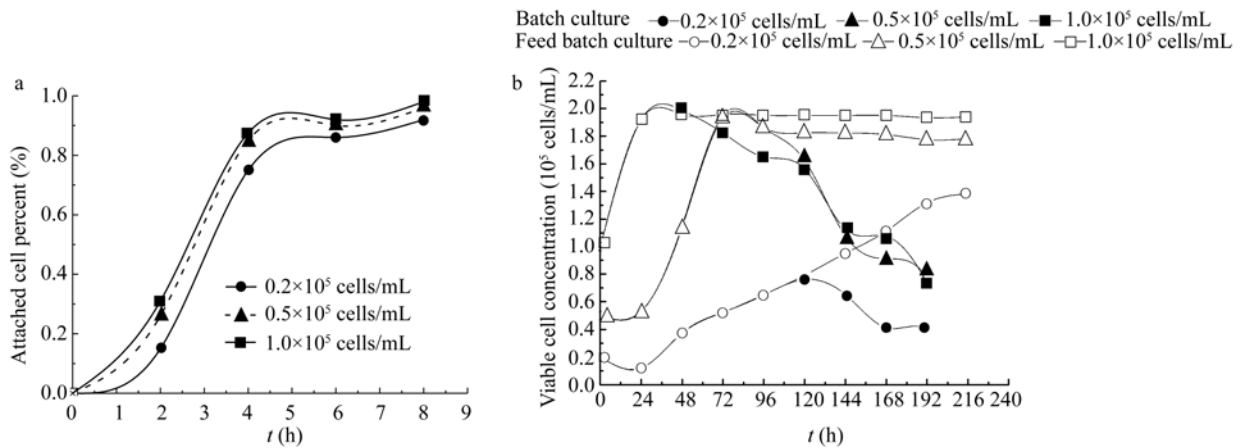


图2 小鼠支持细胞不同接种密度体外贴壁培养(A: 贴壁率和 B: SC 生长曲线)

Fig. 2 Anchorage-dependent culture of rat SCs. (a) Adherent rate curve. (b) The growth curve.

### 2.3 接种密度和培养方式对小鼠支持细胞生长影响

以 3 种不同密度接种(A:  $0.2 \times 10^5$  cells/mL; B:  $0.5 \times 10^5$  cells/mL; C:  $1.0 \times 10^5$  cells/mL)对小鼠支持细胞进行批培养和换液培养。批培养时,以密度 A 和 B 接种有明显的 24 h 延迟期,此后进入对数生长期, A 密度接种的细胞的比生长速率在第 3 天时达到最大( $0.63 \times 10^5$  cells/mL),而 B、C 密度接种的细胞在第 2 天达到最大,最大细胞浓度基本一致,是 A 密度接种细胞密度的 3 倍。此后 3 种接种密度细胞的比生长速率逐渐减小,第 4 天时变为负值,进入衰亡期。换液培养时,以密度 B 和 C 接种的细胞维持稳定细胞密度,达  $2.0 \times 10^5$  cells/mL,而以 A 密度接种的细胞对数生长期延长,直到第 9 天达到最高密度( $1.3 \times 10^5$  cells/mL),是批培养密度的 2 倍,但仍然小于 B、C 接种密度的细胞浓度。换液培养前 4 天的细胞比生长速率变化基本与批培养一致,但是后期基本维持在  $0 \text{ h}^{-1}$ ,因此没出现衰亡期。这种现象可能是由于低接种密度是呈片状贴壁生长,而高密度接种时,支持细胞是呈核圆形生长的,在  $0 \sim 1.0 \times 10^5$  cells/mL 接种范围内单个细胞的贴壁面积与总接种密度呈负相关关系(表 1)。以上 2 种培养方式的最大细胞密度都为  $2.0 \times 10^5$  cells/mL(图 2b),以 B 浓度接种细胞对数生长期细胞比生长速率最大(表 1)。因此,在静态培养条件下,支持细胞的生长面积限制了细胞的最大生长密度,而最佳的接种密度为  $0.5 \times 10^5$  cells/mL。

### 2.4 小鼠支持细胞体外培养的葡萄糖代谢

在小鼠睾丸支持细胞批培养过程中,葡萄糖浓度逐渐降低,72 h 后基本维持在较高的浓度不变

表 1 不同接种浓度细胞的大小和比生长速率

Table 1 Size and specific growth rate of sertoli cell grown in static culture with different inocula

Inocula ( $10^5$ cells/mL)	Cell diameter ( $\mu\text{m}$ )	Specific growth rate [ $10^5$ cells/(mL·d)]	
		Batch culture	Fed-batch culture
0.2	40.5	0.161	0.171
0.5	10.3	0.711	0.723
1.0	7.20	0.501	0.493

Cell diameter in table 1 in are measured 72 h after inoculation.

(> 18 mmol/L); 而乳酸浓度在 0~72 h 迅速升高(图 4),之后稳定于 19.5~23.5 mmol/mL。如图 2b 所示,低、中、高三种不同接种浓度的支持细胞进入衰亡期时,乳酸的浓度分别为 10 mmol/L、15.1 mmol/L 和 15.2 mmol/L,但是本研究所做的乳酸和渗透压脉冲试验表明:当乳酸浓度达到 15.1 mmol/L 时,并不是乳酸本身促使细胞进入衰亡期,而是由乳酸所引起的渗透压升高的原因(数据未给出)。这与孙祥明等<sup>[23]</sup>研究 CHO 细胞所得出的结论是一致的。整个过程中,葡萄糖比消耗速率与其对应的乳酸比生成速率的变化趋势是相似的。而在换液培养时,葡萄糖浓度在 18~24 mmol/L 之间,不同接种浓度细胞的乳酸的最终浓度几乎相同,是批培养乳酸浓度的 60% 左右,乳酸浓度得到了有效的控制(图 3 和图 4)。

如图 5 所示,在批培养中,细胞对葡萄糖的得率系数总体趋势是先增加后减小的,在对数生长期较高。对数生长期结束时,以 B 浓度接种的换液培养细胞对葡萄糖的总得率系数最大,而以 A 浓度接种的批培养细胞对葡萄糖的总得率系数最小(表 2)。另外,乳酸对葡萄糖的得率在对数生长期都维持了

较高的水平, 甚至都超过最大理论值 2 mmol/mmol。这主要是因为, 在细胞培养中乳酸的生成不仅仅来自于葡萄糖的代谢过程, 氨基酸(特别是谷氨酰胺)和培养液中丙酮酸的代谢均能生成乳酸<sup>[24]</sup>, 但葡萄糖代谢乃是乳酸累积的主要来源, 72 h 之后逐渐减少到 0.5~2 mmol/mmol 的范围内。结果表明批培养时随着培养液中葡萄糖浓度的降低和乳酸的不断增加以及渗透压等环境因素的变化, 葡萄糖的代谢途径发生了变化, 趋向于能产生更多能量的三羧酸途径。由图 3 和图 4 计算出批培养前 3 天以 A、B、C 三种不同浓度接种的细胞的葡萄糖比消耗速率( $q_{Gluc}$ )分别为 0.75 mmol/( $10^9$  cells·d)、1.54 mmol/( $10^9$  cells·d)、

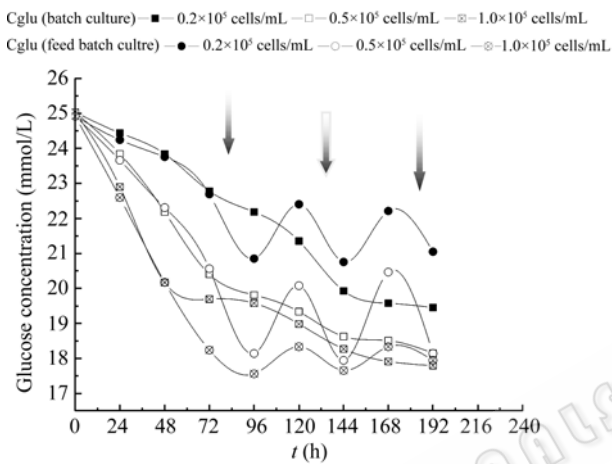


图 3 不同接种浓度时葡萄糖浓度变化  
Fig. 3 Profiles of residual glucose concentration with different inoculum amounts. The icon “↓” instructs the time of feed medium.

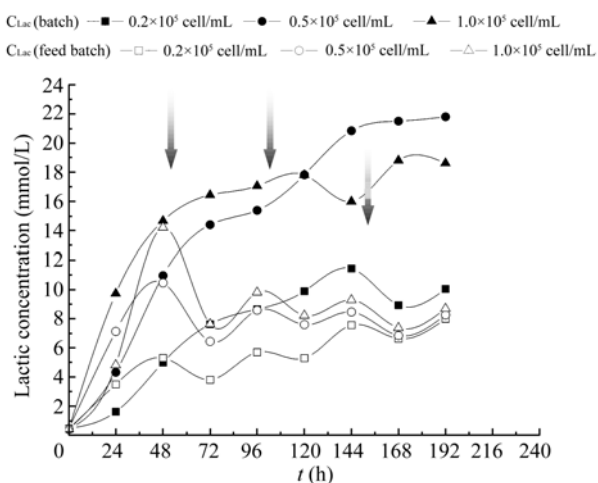


图 4 不同接种浓度培养液中乳酸浓度变化  
Fig. 4 Profiles of lactic acid concentration with different inoculum amounts.

1.78 mmol/( $10^9$  cells·d); 乳酸对葡萄糖的得率 ( $Y_{Lac/Gluc}$ ) 分别为 1.92 mmol/mmol、1.67 mmol/mmol、1.45 mmol/mmol。华平等<sup>[25]</sup>研究猪睾丸支持细胞时所得  $q_{Gluc}$ =3.03 mmol/( $10^9$  cells·d), 而  $Y_{Lac/Gluc}$ =0.84 mmol/mmol, 这可能是由于种属细胞差异所致。

### 2.5 小鼠支持细胞体外培养的谷氨酰胺代谢

在动物细胞的培养中, 谷氨酰胺是细胞生长代谢的氮源和能源<sup>[26]</sup>。在批培养中, 谷氨酰胺逐渐消耗且比消耗速率逐渐减小, 最低浓度达到 1.8 mmol/L, 说明谷氨酰胺并不是支持细胞生长的限制因素。随着谷氨酰胺浓度的减小, 丙氨酸的比生成速率和其对谷氨酰胺的得率逐渐减小; 而虽然谷氨酰胺消耗速率的显著减小决定了氨比生成速率也逐渐减小, 但氨对谷氨酰胺的得率逐渐增加(图 6、7 和 8), 这表明谷氨酰胺代谢由生成  $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酸的途径向生成  $\alpha$ -酮戊二酸和氨途径发生了迁移。这可能主要是谷氨酰胺浓度逐渐减小和渗透压的逐渐增大造成的, 因为转氨代谢途径可以产生更多的 ATP, 使细胞来缓解能量物质的减小和渗透压增大带来的不利影响。有趣的是, 在批培养中, 尽管接种浓度不同, 当铵根离子的浓度达到 2.3 mmol/L 时, 支持细胞都进入了衰亡期(图 2b, 图 6)。而一般情况下, 当培养基中铵根离子浓度达 4.5~5.5 mmol/L 时, 将对细胞生长产生较大的毒性<sup>[27]</sup>, 这表明原代小鼠支持细胞可能对铵根离子有较强的

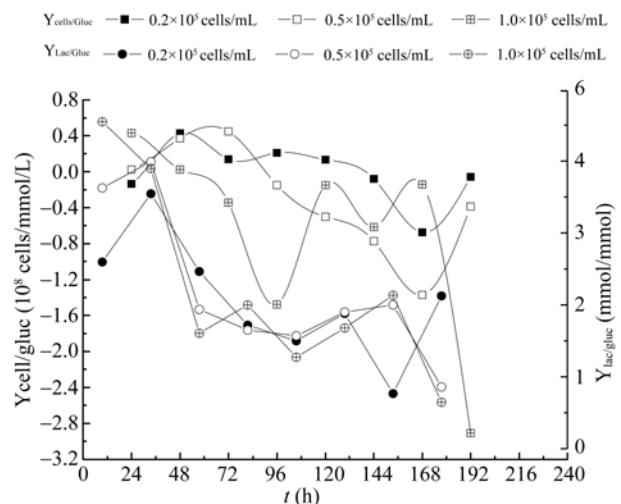


图 5 批培养过程葡萄糖的细胞得率系数( $Y_{cells/Gluc}$ )和乳酸生成对葡萄糖消耗的得率系数( $Y_{Lac/Gluc}$ )  
Fig. 5 Time course of  $Y_{cells/Gluc}$  and  $Y_{Lac/Gluc}$  in batch culture with different inoculum amounts.

表 2 细胞对葡萄糖的平均得率系数( $Y_{\text{cells}/\text{gluc}}$ )

Table 2 Average  $Y_{\text{cells}/\text{gluc}}$  of SCs culture

Inoculum ( $10^5$ cells/mL)	Batch culture ( $10^8$ cells/mmol)	Fed-batch culture ( $10^5$ cells/mmol)
0.2	0.148	0.153
0.5	0.228	0.328
1.0	0.203	0.202

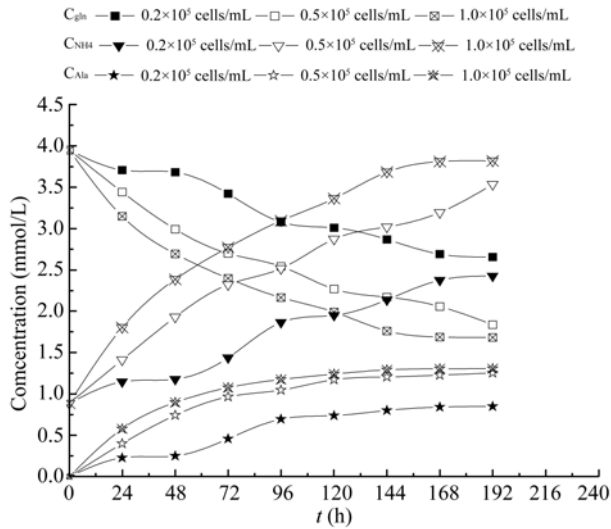


图 6 批培养谷氨酰胺、丙氨酸、铵根离子浓度变化  
Fig. 6 Metabolism of glutamine, Ala,  $\text{NH}_4^+$  in batch culture with different inoculum amounts.

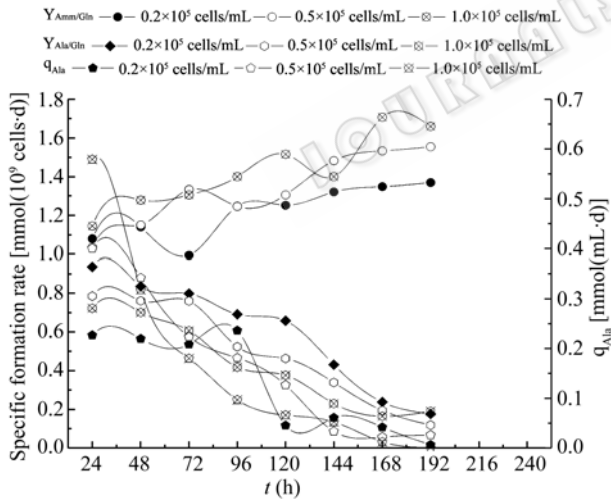


图 7 批培养丙氨酸及氨对谷氨酰胺得率及丙氨酸比生成速率  
Fig. 7  $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ ,  $Y_{\text{Ala}/\text{Gln}}$  and  $q_{\text{Ala}}$  in batch culture with different inoculum amounts.

敏感性。在整个过程中，谷氨酰胺的比消耗速率是先增加后减小的，因为细胞在延迟期需要摄取大量的谷氨酰胺，这与辛燕等<sup>[28]</sup>研究杂交瘤细胞时所得结果是一致的。

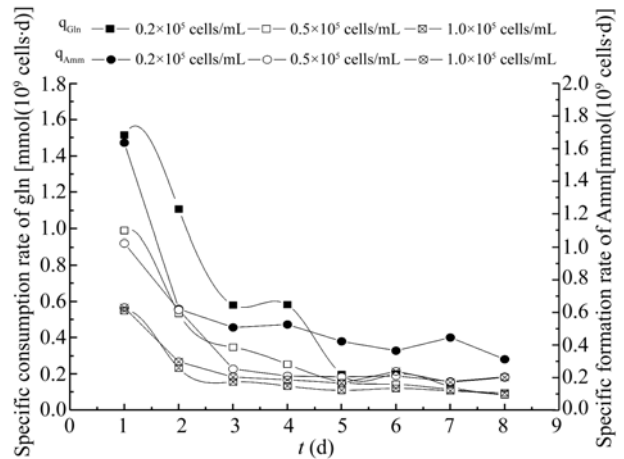


图 8 批培养谷氨酰胺比消耗速率( $q_{\text{Gln}}$ )及氨的比生成速率( $q_{\text{Amm}}$ )  
Fig. 8  $q_{\text{Gln}}$  and  $q_{\text{Amm}}$  in batch culture with different inoculum amounts.

### 2.6 氨基酸、乳酸代谢和渗透压变化

氨基酸是动物细胞培养基的重要组成成份，对细胞生长代谢有重要作用。了解动物细胞生长中的氨基酸代谢，有助于优化培养基设计，给细胞创造更好的生长环境。SC 批培养中，发现不同接种浓度的细胞氨基酸浓度的变化趋势大致相同，呈现规律变化的有 8 种，其中，丙氨酸和谷氨酸浓度迅速增加；缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸浓度略有降低；丝氨酸、精氨酸和甘氨酸浓度略有增加，而除丙氨酸和谷氨酸之外，在对数生长期过后，氨基酸的浓度基本保持不变，这说明主要参与细胞的生长而较少用于维持细胞的消耗(图 9)。这与白血病氨基酸代谢有显著的差异，白血病细胞培养过程中精氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丙氨酸、酪氨酸浓度随活细胞密度升高而减低；苏氨酸、丝氨酸、蛋氨酸和组氨酸浓度随活细胞密度升高而升高<sup>[29]</sup>。而高红亮等<sup>[30]</sup>在研究 Vero 细胞是发现除丙氨酸和谷氨酸之外，天冬氨酸和脯氨酸浓度也增大，本实验中并未发现。

如图 10，不同接种浓度的批培养中，渗透压都随着时间逐渐增大，以 A、B、C 三种密度接种(A:  $0.2 \times 10^5$  cells/mL; B:  $0.5 \times 10^5$  cells/mL; C:  $1 \times 10^5$  cells/mL)，培养液的最大渗透压分别为 322 mosm/kg、336 mosm/kg、330 mosm/kg。支持细胞进入衰退期的渗透压为 326 mosm/kg (图 2b, 图 10)，本研究所做的渗透压脉冲试验也充分证实了以上结论。在换液培养中，渗透压都随着换液的频率而呈现有规律的波动，但是最大渗透压仅为 315 mosm/kg。

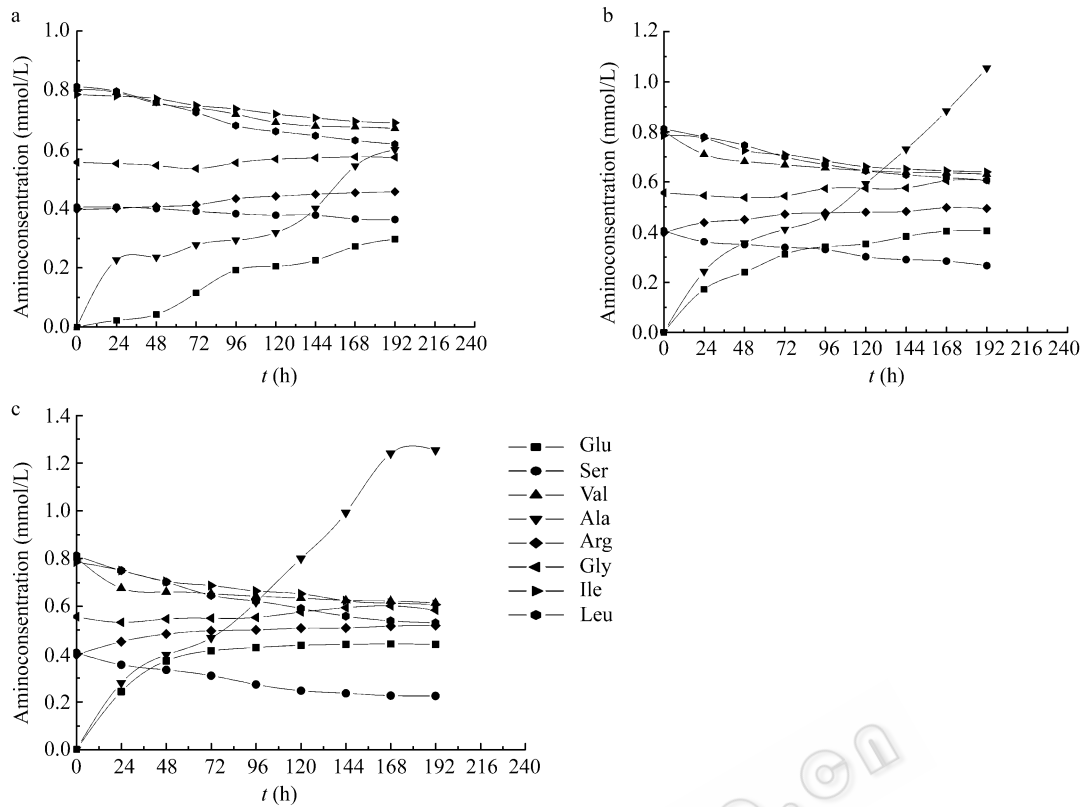


图 9 不同接种量时批培养过程的氨基酸代谢

Fig. 9 Metabolism of amino acids in batch culture with different inoculum amounts. (a)  $0.2 \times 10^5$  cells/mL. (b)  $0.5 \times 10^5$  cells/mL. (c)  $1.0 \times 10^5$  cells/mL.

Batch culture —■—  $0.2 \times 10^5$  cells/mL —●—  $0.5 \times 10^5$  cells/mL —▲—  $1.0 \times 10^5$  cells/mL  
 Feed batch culture —□—  $0.2 \times 10^5$  cells/mL —○—  $0.5 \times 10^5$  cells/mL —△—  $1.0 \times 10^5$  cells/mL

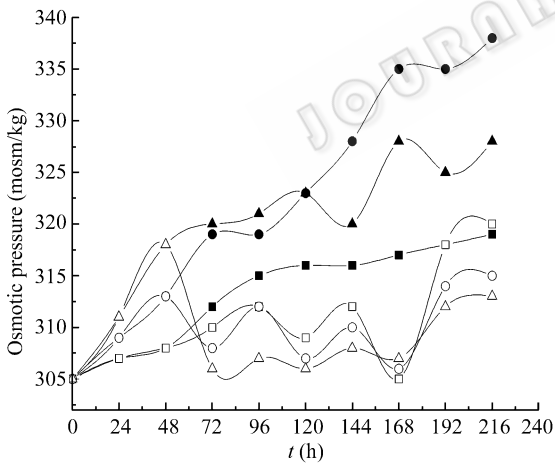


图 10 SCs 培养的渗透压变化

Fig. 10 Osmotic pressure in SCs culture with different inoculum amounts.

显然, 批培养中环境的渗透压超出了正常范围, 这也是造成过早进入衰亡期的原因之一; 而换液培养则保持了正常的渗透压, 细胞的稳定期能维持较长的时间(图 4)。与此同时, 在批培养时不同接种浓度培养液 pH 值都明显下降, 培养结束时, pH 为

6.5~6.9, 低于支持细胞最适生长的 pH 范围(7.2~7.4), 因而严重影响细胞的生长代谢, 当 pH 为 6.9 时细胞进入衰退期; 而在换液培养中, pH 得到了有效地控制, 维持在 7.0 左右(图 11)。因此, 在批培养中培养液的 pH 也是影响细胞生长的重要因素。

Batch culture —■—  $0.2 \times 10^5$  cells/mL —●—  $0.5 \times 10^5$  cells/mL —▲—  $1.0 \times 10^5$  cells/mL  
 Feed batch culture —□—  $0.2 \times 10^5$  cells/mL —○—  $0.5 \times 10^5$  cells/mL —△—  $1.0 \times 10^5$  cells/mL

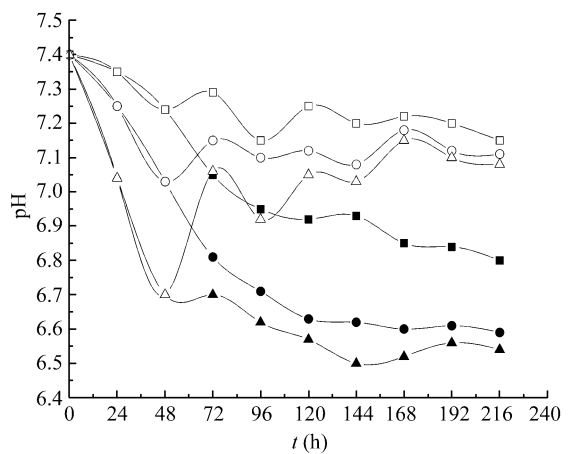


图 11 SCs 培养的 pH 变化

Fig. 11 pH profiles in SCs culture with different inoculum amounts.

乳酸对细胞生长的影响可能来自 2 个方面, 一是乳酸本身对细胞生理生化的影响; 二是因乳酸浓度的增加而导致了培养基渗透压的增加, 继而影响细胞生长。支持细胞的比生长速率随着乳酸浓度的增加而降低的主要原因是渗透压的作用。渗透压变化会导致细胞生长的减缓<sup>[31]</sup>。Ozturk 等<sup>[31]</sup>研究了不同起始乳酸浓度下杂交瘤细胞 167.4G5.3 的批培养过程, 发现对数生长期的细胞比生长速率随着乳酸浓度的增加而下降, 并提出只有当浓度超过 40 mmol/L 时乳酸本身才会对细胞的生长有抑制作用, 浓度小于 40 mmol/L 时乳酸对细胞生长的抑制作用主要来自培养环境的渗透压变化<sup>[32]</sup>。SC 最高的乳酸浓度为 23.2 mmol/L, 所以本身对细胞产生的影响不大。

研究表明大部分培养的细胞对渗透压的耐受力较大, 在正常环境中, 渗透压在 260~320 mosm/kg 之间<sup>[33]</sup>。渗透压的增加扰乱了正常的离子跨膜梯度, 细胞维持能量需求相应增加, 跨膜运输需要消耗更多的能源物质, 所以能引起能源物质(主要是葡萄糖和谷氨酰胺)代谢途径的变化, 从而容易造成细胞的死亡或凋亡。

### 3 结论

以静态培养的小鼠睾丸支持细胞为研究对象, 通过对培养过程葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸等营养物质代谢及其代谢副产物乳酸、铵根离子等积累、培养液渗透压和 pH 的深入研究, 得出以下结论:

1) 支持细胞静态培养的贴壁时间主要集中在接种后的 2~4 h。

2) 培养过程中, 培养瓶贴壁面积的限制是造成细胞密度较低( $<2.1 \times 10^5$  cells/mL)的主要因素。这表明要提高细胞的单位密度必须要增加贴壁面积, 利用微载体或滚瓶培养是不错的选择, 为支持细胞的高密度培养指明了方向。

3) 在批培养中当细胞培养液中葡萄糖和谷氨酰胺的浓度未达到限制浓度, 而当培养液中氨浓度高于 2.3 mmol/L, 渗透压高于 326 mosm/kg, pH 6.8 时支持细胞生长进入衰亡期。因此要严格控制环境参数, 注意临界点, 避免细胞衰亡。

4) 批培养中谷氨酰胺在延迟期和对数生长期消耗迅速, 对数生长期结束之前主要进行脱氢途径, 而之后主要进行转氨代谢。

5) 批培养过程丙氨酸和谷氨酸浓度迅速增加; 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸浓度略有降低; 丝氨酸、精氨酸和甘氨酸浓度基本保持不变。这为支持细胞培养基优化提供了线索。

### REFERENCES

- [1] Selawry HP, Cameron DF. Sertoli cell-enriched fractions in islet successful cell transplantation. *Cell Transplant*, 1993, 2(2): 123-129.
- [2] Sanberg PR, Borlongan CV, Saporta S. Teati-derived sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain. *Nat Biotechnol*, 1996, 14 (13): 1692-1695.
- [3] Cameron DF, Hushen JJ, Colina L. Formation and structure of transplantable tissue constructs generated in simulated. *Cell Transplant*, 2004, 13 (7-8): 755-763.
- [4] Willing AE, Othberg AI, Saporta S. Sertoli cells enhance the survival of co-transplanted dopamine neurons. *Brain Res*, 1999, 822 (1-2): 246-250.
- [5] Willing AE, Sudberry JJ, Othberg AI. Sertoli cells decrease microglial response and increase engraftment of human hNT neurons in the hemiparkinsonian rat striatum. *Brain Res Bull*, 1999, 48 (4): 441-446.
- [6] Borlongan CV, Cameron DF, Saporta S. Intracerebral transplantation of testis-derived sertoli cells promotes functional recovery in female rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *Exp Neurol*, 1997, 148 (1): 388-392.
- [7] Liu HW, Kuang YJ, Wu JC. Intrastriatal transplantation of sertoli cells may improve amphetamine-induced rotation and tyrosine hydroxylase immunoreactivity of the striatum in hemiparkinsonian rats. *Brain Res*, 1999, 838 (1-3): 227-232.
- [8] Sanberg PR, Borlongan CA, Othberg AI. Testis-derived sertoli cells have a trophic effect on dopamine neurons and alleviate hemiparkinsonism in rats. *Nat Med*, 1997, 3 (10): 1129-1132.
- [9] Sapota S, Camerron DF, Borlongan CV. Survival of rat and porcine sertoli cell transplants in the rat striatum. *Exp Neurol*, 1997, 146 (2): 299-304.
- [10] Rodriguez AI, Willing AE, Saporta S. Effects of Sertoli cell transplants in a 3-nitropropionic acid model of early Huntington's disease: A preliminary study. *Neurotox Res*, 2003, 5 (6): 443-450.
- [11] Chung SSW, Mo MY, Silvestrini B. Rat testicular N-cadherin its complementary deoxyribonucleic acid cloning and regulation. *Endocrinology*, 1998, 139 (2): 1853-1862.
- [12] Braghiroli L, Silvestrini B, Sorrentino C. Regulation of  $\alpha_2$ -macroglobulin expression in rat sertoli cells and



- hepatocytes by germ cells *in vitro*. *Biol Reprod*, 1998, **59** (4): 111–123.
- [13] Hakovirta H, Yan W, Kaleva M. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology*, 1999, **140**: 1492–1498.
- [14] Henriksen K, Kangasniemi M, Parvinen M, *et al.* *In vitro*, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *Endocrinology*, 1997, **137**: 2141–2149.
- [15] Hu J, Shima H, Nakagawa H. Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates Sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis development. *Endocrinology*, 1999, **140**: 3416–3421.
- [16] Paquis-Flucklinger V, Michiels JF, Vidal F. Expression in transgenic mice of the large T antigen of polyoma virus induces sertoli cell tumors and allows the establishment of differentiated cell lines. *Oncogene*, 1993, **8**: 2087–2094.
- [17] Rassoulzadegan M, Paquis-Flucklinger V, Bertino B. Transmeiotic defferentiation of male germ cells in culture. *Cell*, 1993, **75**: 997–1006.
- [18] Szalay K, Domonkos A, Kovács J. 45T-1, an established cell line with characteristics of sertoli cells, forms organized aggregates *in vitro* after exposure to tumor necrosis factor alpha. *Cell Biol*, 1999, **8**: 331–338.
- [19] Chan MC, Mather JP, McCray G, *et al.* Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand Gas-6 in testicular somatic cells. *J Androl*, 2000, **21**: 291–302.
- [20] van der Wee K, Hofmann MC. An *in vitro* tubule assay identifies HGF as a morphogen for the formation of seminiferous tubule in the postnatal mouse testis. *Exp Cell Res*, 1999, **252**: 175–185.
- [21] Welsh MJ, Weibe JP. Rat sertoli cells: A rapid method for obtaining viable cells. *Endocrinology*, 1975, **96**: 6182–6186.
- [22] Griffi TS, Brunner T, Fletcher SM. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 1995, **270** (5): 1189–1192.
- [23] Sun XM, Zhang YX. Effects of lactate on growth, metabolism and EPO expression of recombinant CHO cells. *J Chem Ind Eng*, 2002, **53**(10): 1034–1039.
- 孙祥明, 张元兴. 乳酸对重组 CHO 细胞生长代谢及 EPO 表达的影响. *化工学报*, 2002, **53** (10): 1034–1039.
- [24] Zi elke HR, Sumbilla CM, Sevdalian DA, *et al.* *Cell Physiol*, 1980, **10**: 433–441.
- [25] Hua P, Wang JC, Zhuo Y, *et al.* Effects of *in vitro* cultivation by using different strategies on metabolism of swine testicular cell. *Ani Husb Vet Med*, 2007, **39** (6): 34–35.
- 华平, 王建超, 周燕, 等. 体外培养方式对猪睾丸细胞代谢的影响. *畜牧与兽医*, 2007, **39** (6): 34–35.
- [26] Dai MS, Liu TQ. A study of the metabolism parameters of NSCs. *Tiss Eng*, 2002, **12** (4): 101–110.
- [27] Chen ZH, Chen YL, Shen CY. Effect of ammonium and lactate on hybridoma cell growth and metboism, *Chin J Biotech*, 1992, **8**: 348–353.
- 陈志宏, 陈因良, 沈翠英. 氨、乳酸对杂交瘤细胞生长的影响. *生物工程学报*, 1992, **8**: 348–353.
- [28] Xin Y, Yang Y, Li Q, *et al.* The chemical decomposition of glutamine and its efect oil hybridoma cell culture. *Chin J Biotech*, 2001, **17** (4): 478–480.
- 辛艳, 杨艳, 李强, 等. 谷氨酰胺在杂交瘤细胞培养中的降解与代谢. *生物工程学报*, 2001, **17** (4): 478–480.
- [29] Lang S. The amino acid metabolism in U937, K562 leukemia cells. *Med J Chin PLA*, 1995, **2** (20): 127–128.
- 梁实. U937, K562 白血病细胞的氨基酸代谢. *解放军医学杂志*, 1995, **2**(20): 127–128.
- [30] Gao HL, Cong C. Amino acid metabolism of Vero cells in batch culture. *Chin J Proc Engine*, 2001, **1**(2): 176–179.
- 高红亮, 丛成. Vero 细胞批式培养中的氨基酸代谢. *过程工程学报*, 2001, **1**(2): 176–179.
- [31] Ozturk SS, Palsson BO. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**: 234–239.
- [32] Ljunggren J, Haggstrom L. Glutamine limited fed-batch culture reduces ammoniumion production in animal cells. *Biotechnol Lett*, 1990, **12**: 705–710.
- [33] Foreinsel RI. *Culture of Animal Cells*. 5th Ed. Beijing: Science Press, 2004: 32–35.
- 弗雷谢尼 RI 著. 章静波, 徐存拴等译. *动物细胞培养*. 第五版. 北京: 科学出版社, 2004: 32–35.