Vero 细胞批式培养中的氨基酸代谢

高红亮， 丛 威， 欧阳藩
(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室， 北京 100080)

摘 要：用高效液相色谱(HPLC)测定了批式培养的 Vero 细胞培养液中氨基酸的变化，结果表明 Vero 细胞在生长过程中需要消耗 12 种氨基酸，同时生成 4 种氨基酸，Vero 细胞在生长期吸收 Leu，Thr，Ile，Lys，Phe 和 Tyr 较多，而在静止期这些氨基酸却消耗较少.

关键词：Vero 细胞; 氨基酸; 代谢
中图分类号：Q952 文献标识码：A 文章编号：1009–606X(2001)02–0176–04

1 前 言

在动物细胞大规模培养中，提高细胞密度可以提高目的产物的浓度. 在批式培养中，限制细胞生长的因素有很多，如营养物的缺乏、代谢副产物的抑制、传氧速率的限制、pH 的变化、剪切力的损伤等[1]，其中营养物质对细胞生长的影响尤为重要. 动物细胞生长需要多种营养物质，包括糖、氨基酸、维生素、无机盐和生长因子等[2]. 目前对动物细胞营养物质的研究集中于葡萄糖和谷氨酰胺，对其它营养物的研究较少. 氨基酸是动物细胞培养基的重要组成成份，对细胞生长有重要作用. 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，降低成本. Vero 细胞是动物细胞大规模培养中广泛使用的细胞系之一， 已用于生产疫苗、hGH、 UK 和 tPA 等蛋白药物[3]. 目前对 Vero 细胞的氨基酸代谢研究很少. 本文主要研究了批式培养 Vero 细胞的氨基酸代谢动力学，发现 Vero 细胞生长过程中需要吸收 12 种氨基酸，同时生成 4 种氨基酸.

2 材料与方法

2.1 材料

细胞：Vero 细胞，由卫生部北京生物制品研究所提供.

培养基：DMEM 无葡萄糖和无谷氨酰胺培养基(GIBCO 产品)，配制时补加 $NaHCO_3$ 2 g/L、葡萄糖 1 g/L、谷氨酰胺 0.5 g/L(实验 A1)和葡萄糖 2 g/L、谷氨酰胺 0.3 g/L(实验 A2)，用时再加 10% 小牛血清(天津市川页生化制品有限公司产品).

2.2 方法

细胞转瓶培养：细胞接种于 100 ml (工作体积) 转瓶中，置于 CO_2 培养箱中 37°C 恒温培养，转速为 60 r/min. 细胞计数：取 0.5 ml 均匀悬浮的培养液，去上清液后加 0.5 ml 含 1 g/L 结晶紫的柠檬酸溶液，均匀混合，37°C 保温 1 h，然后用血球计数板计数[2]. 葡萄糖和乳酸测定：采用 YSI2700 生化分析仪. 氨浓度测定：采用尿素氮试剂盒(卫生部上海生物制品研究所)，标准品用 NH_4Cl. 谷氨酰胺测定：样品经邻苯二甲醛(OPA)衍生后，用 HPLC 测定[4]. 其它氨基酸的测定：200 μl 样品中加入 100 mmol/L 异硫氰酸苯酯(乙腈溶液)100 μl 和 1 mmol/L 三乙胺(乙腈溶液)100 μl，室温下放置反应 1 h. 反应液中加入 400 μl 己烷, 放置, 取下层溶液用一次性滤膜过滤器(0.45 μm)过滤. 取滤液 4 μl 注入 HPLC. 色谱柱用 Shim-pack CLC–ODS(M) 4.6 mm×150 mm. 流动相 A：0.1 mol/L CH_3COONa (pH 6.50):CH_3CN = 93:7，流动相 B：CH_3CN:H_2O=4:1，检测波长 254 nm.

收稿日期：2000–03–08， 修回日期：2000–04–17
基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：29606011); 中国科学院多相反应开放实验室基金资助项目
作者简介：高红亮(1973–)，男，河南省林洲人，博士，生物化工专业；丛威：联系人.

3　结果与讨论

3.1 细胞生长曲线

细胞生长曲线如图 1 所示. 实验 A1 细胞接种密度为 1.5×10^5 个/ml， 细胞从 24 h 后进入指数生长期，但仅维持了 24 h，到 48 h 后，细胞密度几乎不再增加. 实验 A2 细胞接种密度为 2×10^5 个/ml，细胞很快进入指数生长期，到 72 h 后，细胞密度开始降低.

3.2 细胞的氨基酸代谢

表 1 是 Vero 细胞培养 24~48 h 氨基酸的比消耗速率(specific concumption rate, SCR)， 表中“ – ”表示生成. 从表中可以看出, Vero 细胞的氨基酸代谢可以分为 3 类：(1) 快速消耗的氨基酸，包括 Gln，Arg，His，Leu，Thr 和 Ile 等；(2) 缓慢消耗的氨基酸，包括 Ser，Tyr，Phe，Val 和 Met 等；(3) 积累的氨基酸，包括 Asp，Glu，Ala 和 Pro 等.

表 1 Vero 细胞培养 24~48 h 氨基酸的平均比消耗速率

Table 1　Specific consumption rate of amino acid during 24~48 h of Vero cell culture [$\times10^{-11}$ mmol/(cell·h)]

Acid	Gln	Arg	Thr	Ile	Leu	His	Ser	Tyr	Phe	Val	Met	Lys	Asp	Glu	Ala	Pro
A1	2.938	1.937	0.325	0.336	0.448	0.206	0.089	0.111	0.178	0.137	0.036	0.302	–0.38	–1.444	–1.694	–3.133
A2	2.053	3.84	0.277	0.38	0.168	0.347	0.117	0.11	0.066	0.117	0.104	0.11	–0.246	–1.66	–0.986	–1.14

3.2.1　氨基酸的消耗

Vero 细胞在生长过程中需要消耗大量的谷氨酰胺，它不仅是细胞主要的氮源物质，而且还是细胞的重要能源物质[5]. 氨是谷氨酰胺主要的副产物，对细胞生长有抑制作用[6].

从图 2 可见，在 A1 和 A2 的整个培养过程中谷氨酰胺浓度不断降低，表明细胞停止增殖后谷氨酰胺的消耗未明显降低，此时它主要用于维持细胞的消耗. 谷氨酰胺代谢的同时产生大量的氨.

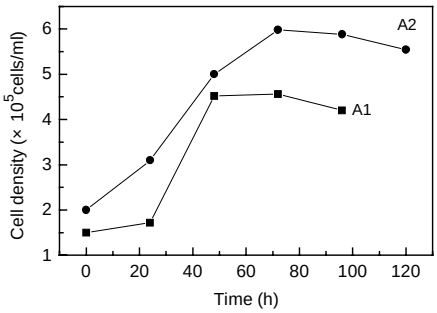

图 1 Vero 细胞生长曲线

Fig.1 Growth curve of Vero cell

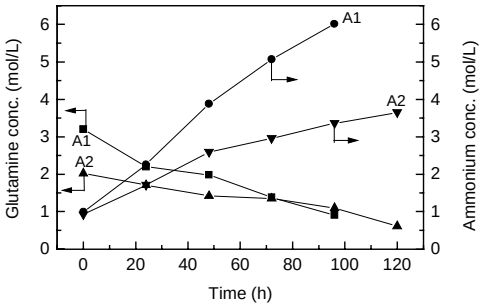

图 2 谷氨酰胺和氨浓度变化曲线

Fig.2 Concentration curve of glutamine and ammonium

图 3 是 Vero 细胞消耗的氨基酸代谢曲线. 表明除谷氨酰胺外，动物细胞的生长还需其它氨基酸. 从表 1 和图 3 看，Arg 消耗很快，实验 A1 中到 48 h 时已几乎被细胞全部吸收，在实验 A2 中到 24 h 时 Arg 浓度已降为 0.034 mmol/L. 在 Vero 细胞的生长过程中，有些氨基酸消耗很少，如 Ser, Tyr, Phe, Val 和 Met. Leu, Thr, Ile, Lys, Val, Phe 和 Tyr 的代谢曲线趋势相同. 从 24 到 48 h， 氨基酸的消耗增快，此时细胞处于指数生长期，生长迅速，48 到 96 h 几乎停止消耗，而细胞也停止生长. 实验 A2 也有类似结果， 其中 Thr, Ile, Lys, Phe, Tyr, Ser 和 Met 的消耗曲线趋势相同. 0~72 h 这些氨基酸消耗较快，尤其在 24~48 h 消耗最快，对应细胞生长期，而此后消耗很慢，对应细胞的静止和衰亡期. 这表明这些氨基酸主要用于细胞的生长，而较少用于维持细胞消耗.

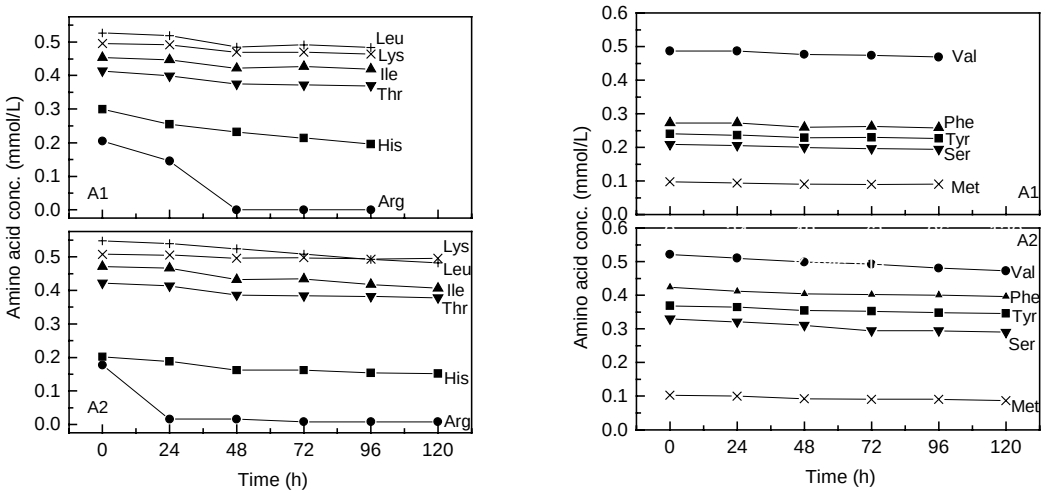

图 3 消耗氨基酸浓度变化曲线

Fig.3 Concentration curves of consumed amino acids

3.2.2 氨基酸的积累

图 4 是生成氨基酸浓度变化曲线，表明 Vero 细胞在生长过程中还生成另外几种氨基酸，包括 Glu, Asp, Ala 和 Pro. Glu 主要由谷氨酰胺经谷氨酰胺酶脱氨生成，同时生成氨. Arg 和 His 的代谢最终也会生成 Glu[7]. Glu 可以通过两条途径生成 α–酮戊二酸：一是谷氨酸脱氢酶氧化脱氨直接生成 α–酮戊二酸，二是通过转氨酶生成 α–酮戊二酸. 哺乳动物细胞中的转氨酶主要是丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶，前者以 Glu 和丙酮酸为底物生成 Ala，后者以 Glu 和草酰乙酸为底物生成 Asp[8]. Pro 也由 Glu 直接合成，但需要能量和还原力[7].

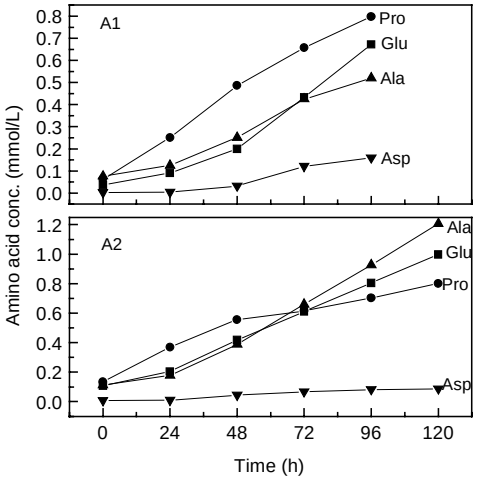

图 4 生成的氨基酸浓度变化曲线

Fig.4 Concentration curves of produced amino acids

实验 A1 和 A2 培养液中 Pro, Glu 和 Ala 浓度增加十分迅速，Asp 增加相对较慢. Glu 通过转氨途径， 把其中的氨基生成 Ala 和 Asp, 可以减少氨的生成，因为氨对细胞生长有抑制作用[6]，所以这样有利于细胞的生长. Fitzpatrick[9]研究表明, 在有些杂交瘤细胞中丙氨酸转氨酶的活性远高于谷氨酸脱氢酶的活性，所以大大减少了氨的产生. 但鼠杂交瘤细胞大量消耗 Pro[10]和 Asp[11]，这与 Vero 细胞代谢大不相同.

3.3 Vero 细胞的葡萄糖代谢

图 5 是 Vero 细胞消耗葡萄糖和生成乳酸的实验结果. 实验 A1 表明，0 ~ 48 h 葡萄糖浓度降低很快，48 h 后几乎为 0；实验 A2 葡萄糖浓度在整个培养过程中都在降低. 这表明在 Vero 细胞生长过程中葡萄糖消耗十分迅速. 培养液中乳酸的浓度增加十分迅速，乳酸主要是葡萄糖的代谢副产物，实验 A2 乳酸浓度逐渐积累，最后达到 13.22 mmol/L. 而实验 A1 中到 48 h 乳酸浓度达到最高 (8.56 mmol/L)，此后略有下降，这可能是因为在缺少葡萄糖时，细胞以培养液中的乳酸作为碳源，参与了细胞的其它代谢活动，因为在细胞液中乳酸可氧化成丙酮酸[12].

实验 A1 中细胞密度于 48 h 停止增加(图 1)，此时葡萄糖和 Arg 浓度几乎为 0 (图 5)，但在实验 A2 中，Arg 在 24 h 时浓度仅为 0.034 mmol/L，已接近 0，细胞直到 72 h 才停止增殖，说明 A1 中细胞停止增殖可能是培养液中葡萄糖的缺乏引起的. 实验 A2 中细胞于 72 h 停止增殖可能是由于乳酸或氨积累抑制所致.

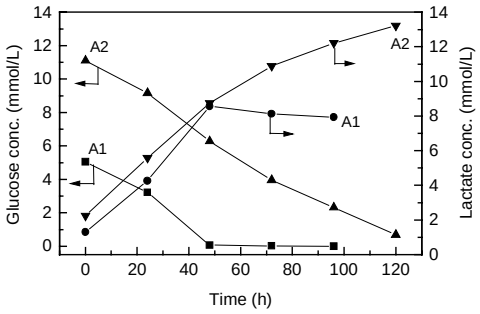

图 5 葡萄糖和乳酸浓度变化曲线

Fig.5 Concentration curves of glucose and lactate

4 结 论

(1) Vero 细胞生长增殖需要包括谷氨酰胺、Arg 和 His 在内的 12 种氨基酸.

(2) Vero 细胞在代谢过程中同时大量产生 Glu, Ala, Asp 和 Pro.

(3) Vero 细胞在生长期吸收 Leu, Thr, Ile, Lys, Phe 和 Tyr 较多，而静止期这些氨基酸消耗很少.

(4) 实验 A1 中 Vero 细胞在培养 48 h 后细胞密度即停止增加，这可能是由于培养液中缺乏葡萄糖造成的.

参考文献:

[1] Hiller G W, Clark D S, Blanch H W. Transient Responses of Hybridoma Cells in Continuous Culture to Step Changes in Amino Acid and Vitamin Concentrations [J]. Biotech. Bioeng., 1994, 44: 303–321.

[2] 陈因良, 陈志宏. 细胞培养工程 [M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992. 62–63, 96.

[3] 王佃亮, 肖成祖, 陈昭烈, 等. 微载体高密度培养 Vero 细胞的研究 [J]. 生物工程学报, 1996, 12: 164–170.

[4] 刘放南, 盛学勤, 陈永明. 高效液相色谱法测定超滤后血浆中的谷氨酰胺 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23: 475–477.

[5] Reitzer L J, Wice B M, Kennell D. Evidence that Glutamine, Not Sugar, is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells [J]. J. Bio. Chem., 1979, 254: 2669–2676.

[6] Ryll T, Valley U, Wagner R. Biochemistry of Growth Inhibition by Ammonium Ions in Mammalian Cells [J]. Biotech. Bioeng. , 1994, 44: 184–193.

[7] 沈同, 王镜岩. 生物化学, 第 2 版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 110.

[8] Glacken M W. Catabolic Control of Mammalian Cell Culture [J]. Biotechnology, 1988, 6: 1041–1050.

[9] Fitzpatrick L, Jenkins H A, Butler M. Glucose and Glutamine Metabolism of a Murine B-lymphocyte Hybridoma Grown in Batch Culture [J]. Appl. Biochem. Biotech., 1993, 43: 93–116.

[10] Vriezen N, Romein B, Luyben K, et al. Effects of Glutamine Supply on Growth and Metabolism of Mammalian Cells in Chemostat Culture [J]. Biotech. Bioeng., 1997, 54: 272–286.

[11] Hiller G W, Aeschlimann A D, Clark D S, et al. A Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism in Continuous Suspension Culture on Serum-free Medium [J]. Biotech. Bioeng., 1991, 38: 733–741.

[12] Lanks K W. End Products of Glucose and Glutamine Metabolism by L929 Cells [J]. J. Biol. Chem., 1987, 262: 10093–10097.

Amino Acid Metabolism of Vero Cells in Batch Culture

GAO Hong-liang, CONG Wei, OUYANG Fan

(State Key Lab.Biochem.Eng., Inst. Chem. Metall., CAS, Beijing 100080, China)

Abstract : Amino acids are very important nutrients in mammalian cell cultivation. Amino acids metabolism varies greatly from one cell line to another, and specific culture media were therefore designed to cover the needs of individual lines. The paper investigated the amino acid metabolism of Vero cells in batch culture by HPLC. The results showed that 12 amino acids (Gln, Arg, His, Leu, Thr, Ile, Lys, Ser, Tyr, Phe, Val and Met) were consumed, and 4 amino acids (Glu, Asp, Ala and Pro) were produced during the growth of Vero cells. 6 amino acids (Leu, Thr, Ile, Lys, Phe and Tyr) were consumed quickly only in the exponential phase of growth and consumed very slowly in the stationary phase of growth.

Key words: Vero cell; amino acid; metabolism