

静置培养 BHK-21 细胞生长及代谢动力学研究

付智财¹,王家敏²,沈武玲²,令世鑫²,马忠仁²,乔自林²

(1. 新疆天康畜牧生物技术股份有限公司,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011;2. 西北民族大学 甘肃省动物细胞工程技术研究中心,甘肃 兰州 730030)

摘要:为研究 BHK-21 细胞的生长及代谢动力学特征,试验采用低密度静置培养方法,每天测定细胞生长密度和活力,并利用多参数生化分析仪测定培养液中 Gluc、Lac、Gln 和 NH_4^+ 的含量,计算细胞指数生长期的比代谢速率。结果表明:BHK-21 细胞生长曲线呈 S 型,最大增殖密度为 $50.3 \times 10^4 \text{ upf} \cdot \text{mL}^{-1}$,倍增时间为 21.1 h;对数生长期 Gluc 和 Gln 的比消耗速率为 $-3.79 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $-9.95 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,Lac 和 NH_4^+ 的比生成速率为 $2.81 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $6.30 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

关键词:BHK-21 细胞;生长特征;代谢动力学;比代谢速率;比消耗速率;比生成速率

中图分类号:Q254

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)02-0062-03

BHK-21 细胞(Baby hamster kidney cell)是从叙利亚幼鼠肾组织中分离培养获得的成纤维型贴壁细胞系,该细胞常用于多种病毒的增殖和纯化,如口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)、脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)、呼肠孤病毒(Reovirus)和水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)等,目前,该细胞广泛应用于口蹄疫疫苗的规模化生产^[1]。在疫苗生产过程中需要对细胞的培养条件进行不断地优化来提高细胞密度和病毒产量,而细胞代谢动力学特征研究是细胞培养条件优化最重要的内容之一。该文通过对静置培养条件下 BHK-21 细胞生长的葡萄糖(Gluc)、乳酸(Lac)、谷氨酰胺(Gln)和氨(NH_4^+)的代谢进行测定和分析,建立了该细胞对 Gluc、Lac、Gln 和 NH_4^+ 等物质的代谢动力学模型,为该细胞高密度培养条件优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基(Gibco),新生牛血清(兰州民海,使用时按培养液体积的 10% 添加)和胰蛋白酶(Gibco,使用浓度为 0.25%)等。所用细胞为 BHK-21 细胞,由甘肃省动物细胞工程技术研究

中心提供。仪器设备为多参数生化分析仪(Applitech, NOVA400)、细胞计数仪(INNOVATIS, CASY TT)、二氧化碳培养箱(Thermo, 3111 型)及倒置相差显微镜(Olympus, CKX41 型)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞准备 常规法复苏 BHK-21 细胞,显微镜观察,待 80% 以上细胞贴壁后,换液培养^[2]。细胞长成致密单层后按 1:4 传代培养,选用复苏后培养第 3、4、5 代的细胞分别进行生长动力和代谢动力学试验。

1.2.2 细胞生长动力学及活力曲线绘制 (1)低密度细胞悬液制备:取复苏后适应培养第 3 代的 BHK-21 细胞,用胰酶消化后制成细胞悬液,计数,按有限稀释法的原则,将细胞悬液稀释至 $1.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^4 \text{ upf} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。(2)接种及培养:将稀释好的细胞悬液接种到 24 个 T25 的细胞瓶中,每瓶 10 mL,置 37°C , 5% CO_2 中培养。(3)计数、活力检查及样品收集:从接种培养算起,每隔 24 h,取 3 瓶细胞将上清混合均匀,取 3 mL 冷冻留样(用于细胞代谢试验),然后分别消化计数,检查细胞活力,直至细胞密度降低为止。(4)平行试验:同法对第 4、5 代的细胞进行试验,并计算各培养阶段的细胞密度和活力的平均值及其标准偏差。(5)生长曲线绘制:以培养时间为横坐标,平均细胞密度和细胞活力为纵坐标,绘制细胞的生长曲线和活力变化曲线。(6)计算细胞倍增时间^[3]:倍增时间 = T/A (式中: $A = \log_2 Y/X$, 其中, Y 为细胞峰值前 1 d 计得的数, X 为接种细胞数, T 为培养时间)^[4]。

1.2.3 代谢动力学模型 (1)样品检测:将收集的各培养阶段的培养液样品用多参数生化分析仪

收稿日期:2013-10-21

基金项目:甘肃省科技重大专项资助项目(1203FKDA030);西北民族大学中央高校基金资助项目(31920130066)

第一作者简介:付智财(1979-),男,内蒙古自治区呼伦贝尔市人,学士,研究初级兽医师,从事口蹄疫疫苗的工艺研究和生产管理研究。E-mail:59938426@qq.com。

通讯作者:乔自林(1976-),男,甘肃省永靖县人,高级实验师,从事动物细胞培养技术与生物反应器高密度培养工艺研究。E-mail:670267497@qq.com。

检测 Gluc、Gln、Lac 和 NH_4^+ 的浓度,并计算 3 个代次细胞各培养阶段的平均值及其标准偏差。(2)代谢曲线绘制:以培养时间为横坐标,Gluc、Gln、Lac 和 NH_4^+ 浓度平均值为纵坐标绘图,即得代谢曲线图^[5-6]。(3)细胞指数:生长期比代谢速率^[7]计算求得

$$q_{o2} = \frac{2}{X_1 + X_2} \cdot \frac{\Delta S}{\Delta t}$$

其中, X_1 和 X_2 是 2 个取样点的细胞密度; ΔS 是 2 个取样点被测物浓度的变化值; Δt 是子个取样点的时间间隔。

2 结果与分析

2.1 细胞生长曲线

BHK-21 细胞在静置培养条件下生长曲线呈 S 型,前 24 h 为适应期,24~120 h 为对数生长期,以后便进入平台期和衰退期,平均最大增殖密

度为 $50.3 \times 10^4 \text{ upf} \cdot \text{mL}^{-1}$,倍增时间为 21.1 h,绘制细胞生长曲线图如图 1 所示。细胞活力在所绘制的生长曲线内保持较高水平,在培养后期开始下降。连续培养 3 个代次各阶段的平均细胞密度和活力见表 1。

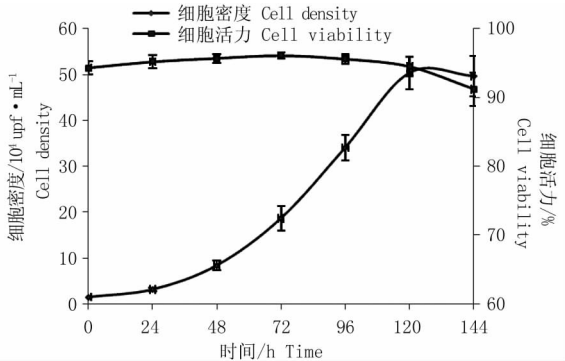


图 1 BHK-21 细胞生长密度和活力曲线
Fig. 1 The growth curve of BHK-21 cells

表 1 BHK-21 细胞 3 个代次不同培养阶段的平均细胞密度及活力

项目 Items	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
细胞密度/ $\times 10^4 \text{ upf} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cell density	1.44 ± 0.10	3.09 ± 0.31	8.33 ± 1.07	18.6 ± 2.64	34.0 ± 2.72	50.3 ± 3.59	49.6 ± 4.41
细胞活力/% Cell viability	94.3 ± 0.90	95.2 ± 0.98	95.7 ± 0.64	96.1 ± 0.47	95.6 ± 0.72	94.5 ± 1.38	91.2 ± 2.46

2.2 BHK-21 细胞代谢动力学分析

BHK-21 细胞在生长过程中要消耗 Gluc 和 Gln,同时代谢要产生废物 Lac 和 NH_4^+ (见表 2),在 72~96 h 内消耗 Gluc、Gln 和生成 Lac、 NH_4^+ 的量最高,在整个对数生长期内 Gluc 和

Gln 的比消耗速率为 $-3.79 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $-9.95 \text{ } \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,Lac 和 NH_4^+ 的比生成速率为 $2.81 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $6.30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (见表 3)。

表 2 BHK-21 细胞 3 个代次培养各阶段 Gluc、Lac、Gln 和 NH_4^+ 的结果分析

项目 Items	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Gluc/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.34 ± 0.03	4.16 ± 0.08	3.95 ± 0.12	3.46 ± 0.13	2.39 ± 0.11	2.14 ± 0.24	1.94 ± 0.23
Lac/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.03	1.63 ± 0.07	1.72 ± 0.09	2.12 ± 0.13
Gln/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.79 ± 0.04	3.56 ± 0.03	2.64 ± 0.02	1.48 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
$\text{NH}_4^+ / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.20 ± 0.03	0.60 ± 0.02	1.19 ± 0.03	1.96 ± 0.04	2.80 ± 0.06	3.14 ± 0.11	3.45 ± 0.10

表 3 BHK-21 细胞指数生长期 Gluc、Lac、Gln 和 NH_4^+ 平均比代谢速率

项目 Items	24~48 h	48~72 h	72~96 h	平均值 Mean value
Gluc/ $\text{mg} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	-3.68	-3.64	-4.07	-3.79
Lac/ $\text{mg} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	0.00	4.60	3.84	2.81
Gln/ $\mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	-15.59	-8.61	-5.67	-9.95
$\text{NH}_4^+ / \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	10.0	5.72	3.19	6.30

3 结论与讨论

葡萄糖和谷氨酰胺是细胞培养基中的主要碳源和能源。谷氨酰胺代谢能为动物细胞生长提供 30%~65% 的能量,大部分的葡萄糖通过糖酵解途径为细胞提供中间代谢物质和能量,最终生成乳

酸,只有很少部分进入三羧酸循环(TCA)和磷酸戊糖途径。谷氨酰胺是动物细胞培养中最重要的氨基酸,也是培养基中浓度最高的氨基酸。谷氨酰胺是细胞生物合成中氮的主要来源,核酸中的嘌呤、嘧啶和氨基糖中的氮来自谷氨酰胺。谷氨酰胺也可以作为碳源直接参与细胞大分子物质的合成。

谷氨酰胺的存在可以促进其它氨基酸的运输和利用。在细胞培养中,谷氨酰胺不稳定,容易降解。细胞也会过量利用谷氨酰胺,导致氨的积累。控制培养基中谷氨酰胺的浓度,可以有效降低氨的积累,改善细胞的生长环境^[8-9]。

乳酸是在培养过程中动物细胞代谢葡萄糖产生的主要代谢产物之一,对细胞的生长、代谢和产物的合成有着重要的影响。乳酸主要来源于葡萄糖的代谢过程,谷氨酰胺及其它氨基酸的代谢也能产生少量乳酸(此部分乳酸约占乳酸总量的10%左右)。在有氧的条件下,依细胞类型和培养条件的不同,葡萄糖转变成乳酸的量在5%~10%,最大可达70%。乳酸对细胞生长的不良影响主要是改变培养环境的pH和渗透压,间接地影响细胞的生长、代谢和产物的合成。尽管不同的细胞系对乳酸具有不同的耐受能力,但只要维持pH恒定,一般均能耐受较高浓度的乳酸。在pH恒定的情况下,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影响;二是因乳酸的添加而导致了培养基渗透压的增加,继而影响细胞生长^[10]。

氨主要是由谷氨酰胺等氨基酸脱氨产生的。细胞培养过程中,谷氨酰胺的消耗比其它氨基酸的总和还多,80%~90%的氨都是由谷氨酰胺代谢产生的。与乳酸相比,较低浓度的氨就会对细胞生长产生抑制。氨的积累使细胞内的UDP氨基己糖增加,影响细胞的生长及蛋白质的糖基化过程。氨抑制谷氨酰胺代谢途径,使天冬氨酸和谷氨酸的消耗增加,影响细胞的氨基酸代谢。同时氨浓度的提高改变了细胞内局部微环境的pH,影响细胞的正常生理功能。氨不仅对细胞的生长具有较强的抑制作用,而且对细胞的生存也具有毒性。当氨的浓度高于 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对细胞的生长具有明显的抑制作用^[11-13]。

该研究建立了BHK-21细胞生长及代谢动

力学模型,为BHK-21细胞应用于口蹄疫疫苗的生产提供了基本理论依据。

参考文献:

- [1] 张春红,黄毓茂.口蹄疫疫苗研究进展[J].畜牧与兽医,2010,42(2):96-99.
- [2] 王家敏,平玲,沈武玲,等. MDCK细胞库的建立及其生物学特性研究[J]. 山西农业科学,2012,40(12):1231-1234,1261.
- [3] 王家敏,乔自林,冯若飞,等. 青海大通马耳缘组织成纤维细胞系的建立及生物学特性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2012(17):7-9,116.
- [4] 令世鑫,关伟军,冯玉萍,等. 河曲马睾丸组织成纤维细胞系的建立及生物学特性研究[J]. 西北农业学报,2012,21(7):10-14.
- [5] Cruz H J, Freitas C M, Alves P M, et al. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 43-52.
- [6] 冯磊,吴培培,褚轩,等. Marc-145细胞无血清培养驯化、代谢分析及PRRSV增殖能力比较[J]. 江苏农业科学,2012,40(7):182-185.
- [7] 刘兴茂,刘红,叶玲玲,等. CHO工程细胞无血清悬浮培养的生长代谢特征及动力学模型[J]. 生物工程学报,2010,26(1):85-92.
- [8] 高红亮,丛威,欧阳藩. 体外培养的哺乳动物细胞的葡萄糖和谷氨酰胺代谢[J]. 生物技术通报,2000(2):17-22.
- [9] Cruz H J, Ferreira A S, Freitas C M M. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 579-585.
- [10] Cruz H J, Moreira J L, Carrondo M J T. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 66: 104-113.
- [11] 田波,武发菊,安芳兰,等. 氨和乳酸对悬浮培养的BHK-21细胞生长和胞内酶活性的影响[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(9):37-40.
- [12] 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[J]. 化工学报,2002,53(10):1034-1039.
- [13] 孙祥明,张元兴. 葡萄糖对重组CHO细胞生长代谢及EPO表达的影响[J]. 生物工程学报,2001,17(6):698-702.

Growth and Metabolism Kinetic Research of BHK-21 Cells in Stationary Culture

FU Zhi-cai¹, WANG Jia-min², SHEN Wu-ling², LING Shi-xin², MA Zhong-ren², QIAO Zi-lin²

(1. Xinjiang Tiankang Husbandry and Biological Technology Company, Limited, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region 830011; 2. Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030)

Abstract: In order to research the growth and metabolism kinetic characteristics of BHK-21 cells, low cell density cultured method was used to determine cell density and vitality every day. The contents of Gluc, Lac, Gln, and NH_4^+ in medium were determined by multi-parameter biochemical analyzer, and the specific metabolic rate were calculated. The results showed that the growth curve of BHK-21 cells was "S" type, the largest density was $50.3 \times 10^4 \text{ upf}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the doubling time was 21.1 h. Specific consumption rate of Gluc and Gln were $-3.79 \text{ mg}\cdot(10^6 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $-9.95 \mu\text{mol}\cdot(10^6 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in logarithmic phase, and specific generation rate of Lac and NH_4^+ were $2.81 \text{ mg}\cdot(10^6 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $6.30 \mu\text{mol}\cdot(10^6 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Key words: BHK-21 cell, growth characteristics, metabolism kinetics; specific metabolic rate; specific consumption rate; specific generation rate