

# 静置培养 MDCK 细胞的生长及代谢动力学研究

暴艳敏<sup>1</sup>,王家敏<sup>1</sup>,马 祺<sup>2</sup>,令世鑫<sup>1</sup>,马卫国<sup>1</sup>,马忠仁<sup>3</sup>,乔自林<sup>1</sup>

(1. 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;2. 兰州百灵生物技术有限公司,甘肃 兰州 730010;3. 西北民族大学 生物工程与技术国家民委重点实验室,甘肃 兰州 730030)

**摘要:**为研究 MDCK 细胞的生长及代谢动力学特征,试验采用低密度静置培养,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  $\text{NH}_4^+$  的含量,计算细胞指数生长期的比代谢速率。结果表明:MDCK 细胞生长曲线呈“S”型,最大增殖密度为  $53.8 \times 10^4 \text{ upf} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,倍增时间为 24.2 h;对数生长期 Gluc 和 Gln 的比代谢(消耗速率为  $-2.20 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$  和  $-3.85 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$ , Lac 和  $\text{NH}_4^+$  的比生成)速率为  $2.25 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$  和  $2.22 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$ 。

**关键词:**MDCK 细胞;生长特征;代谢动力学

**中图分类号:**Q254 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)06-0071-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.06.0071

MDCK 细胞(Madin-Darby canine kidney cells)是从犬肾组织中分离培养获得的上皮样贴壁传代细胞<sup>[1]</sup>。该细胞系可以用于多种病毒的分离培养,如流感病毒(Influenza virus)、呼肠孤病毒(Reovirus)、腺病毒(Adenovirus)、犬细小病毒(Canine parvovirus,CPV)、猫粒细胞缺乏症病毒(Feline panleukopenia virus,FPLV)等<sup>[2-3]</sup>。因此 MDCK 细胞系在这些病毒尤其是流感病毒的监测、研究及其疫苗生产上具有重要的应用价值<sup>[4-5]</sup>。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,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。本文通过对静置培养条件下 MDCK 细胞生长的葡萄糖(Gluc)、乳酸(Lac)、谷氨酰胺(Gln)和氨( $\text{NH}_4^+$ )的代谢进行测定和分析,建立了 MDCK 细胞对其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

供试 MDCK 细胞由甘肃省动物细胞工程技

术研究中心提供。供试材料还有 DMEM(Gibco)、胎牛血清(HyClone,使用时按培养液体积的 10% 添加)、胰蛋白酶(Gibco,使用浓度为 0.25%)、凯氏细胞培养瓶(Corning,T25)等。

仪器设备有细胞计数器(INNOVATIS,CASY TT),多参数生化分析仪(Applitech,NO-VA400),倒置相差显微镜(Olympus,CKX41 型),二氧化碳培养箱(Thermo,3111 型)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞准备** 常规法复苏 MDCK 细胞,显微镜观察,待 80% 以上细胞贴壁后,换液培养<sup>[6]</sup>。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** 取复苏后适应培养第 3 代的 MDCK 细胞,用胰酶消化后制成细胞悬液并计数,按有限稀释法将细胞悬液稀释至  $1.0 \sim 2.0 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。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  $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  中培养。每隔 24 h,取 3 瓶细胞将上清混合均匀后取 3 mL 冷冻留样,用于细胞代谢试验,然后分别消化计数和检查细胞活力,直至细胞密度降低为止。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。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<sup>[7]</sup>。计算细胞倍增

收稿日期:2015-02-04

**基金项目:**国家民委领军人才计划资助项目;国家自然科学基金资助项目(31160033);甘肃省科技计划资助项目(1308 RJZA142);西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(31920150029,31920130066)

**第一作者简介:**暴艳敏(1984-),女,辽宁省朝阳市人,在读硕士,从事动物疫苗开发和质量控制研究。E-mail:286330873@qq.com。

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

时间<sup>[8]</sup>。

1.2.3 代谢动力学模型 将收集的各培养阶段的培养液样品用多参数生化分析仪检测 Gluc、Gln、Lac 和  $\text{NH}_4^+$  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。以培养时间为横坐标,Gluc、Gln、Lac 和  $\text{NH}_4^+$  浓度平均值为纵坐标绘图,即得代谢曲线图<sup>[9-10]</sup>。计算细胞指数生长期比代谢速率<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞生长曲线

从图 1 看出,MDCK 细胞培养 3 个代次各阶段的平均细胞密度绘制的生长曲线呈“S”型,细胞生长经历了生长滞缓期、对数增殖期和生长平台期。细胞有一段潜伏期或缓慢生长期,为细胞的适应阶段,是细胞在传代过程由蛋白酶消化引起细胞损伤后的修复时期,此后,细胞进入指数生长期;120 h 后细胞生长进入平台期,细胞密度变化不大,细胞活力下降。细胞的最大增殖密度为  $53.8 \times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,倍增时间为 24.2 h。由此可

以判断 MDCK 细胞个体较小,增殖较快。

### 2.2 MDCK 细胞代谢动力学分析

MDCK 细胞在生长代谢过程中消耗 Gluc 和 Gln,同时代谢产生废物 Lac 和  $\text{NH}_4^+$  (见表 1),凯氏细胞瓶培养 MDCK 细胞时,DMEM 中的 Gluc、Gln 量足够细胞生长所用,代谢废物 Lac 和  $\text{NH}_4^+$  的积累量对细胞的生长影响不大,限制细胞生长的因素是贴附面积。

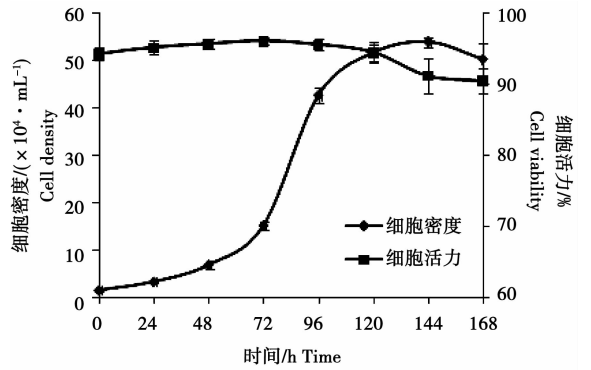


图 1 MDCK 细胞生长密度和活力曲线图  
Fig.1 The growth curve of MDCK cells

表 1 MDCK 细胞 3 个代次培养各阶段 Gluc、Lac、Gln 和  $\text{NH}_4^+$  的结果分析  
Table 1 Analysis on the concentration of Gluc,Lac,Gln,Glu and  $\text{NH}_4^+$  in the culturing of MDCK cells

项目 Item	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Gluc/(g·L <sup>-1</sup> )	4.34±0.03	4.26±0.08	4.18±0.12	3.80±0.13	3.18±0.11	2.61±0.24	2.46±0.23	2.25±0.25
Lac/(g·L <sup>-1</sup> )	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.35±0.03	1.31±0.07	1.53±0.09	1.60±0.13	1.52±0.16
Gln/(mmol·L <sup>-1</sup> )	4.19±0.04	4.08±0.03	3.64±0.02	3.02±0.06	2.34±0.09	1.59±0.16	1.35±0.15	0.89±0.18
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.20±0.03	0.24±0.02	0.54±0.03	0.90±0.04	1.62±0.06	2.15±0.11	2.58±0.14	2.85±0.20

由表 2 可知,对数生长期 Gluc 和 Gln 的比代谢(消耗)速率分别为  $-2.20 \text{ mg}\cdot(10^6 \text{ cells}\cdot\text{d})^{-1}$  和  $-3.85 \mu\text{mol}\cdot(10^6 \text{ cells}\cdot\text{d})^{-1}$ ,Lac 和  $\text{NH}_4^+$  的比代谢(生成)速率分别为  $2.25 \text{ mg}\cdot(10^6 \text{ cells}\cdot\text{d})^{-1}$  和  $2.22 \mu\text{mol}\cdot(10^6 \text{ cells}\cdot\text{d})^{-1}$ 。可用于指导 MDCK 细胞微载体、片状载体大规模培养时流加培养、灌流培养、换液培养营养物质添加量确定以及 MDCK 细胞个性化培养液的设计。

表 2 MDCK 细胞指数生长期 Gluc、Lac、Gln 和  $\text{NH}_4^+$  平均比代谢速率分析

项目 Items	48~72 h	72~96 h	96~120 h	平均值 Average
Gluc/mg·(10 <sup>6</sup> cells) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	-3.35	-2.08	-1.18	-2.20
Lac/mg·(10 <sup>6</sup> cells) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	3.08	3.22	0.45	2.25
Gln/μmol·(10 <sup>6</sup> cells) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	-5.46	-2.28	-1.55	-3.85
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /μmol·(10 <sup>6</sup> cells) <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	3.17	2.41	1.09	2.22

### 3 结论与讨论

试验结果表明,MDCK 细胞在静置培养条件下细胞密度生长曲线呈“S”型,平均最大增殖密度为 $53.8 \times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,倍增时间为 24.2 h,细胞活力在所绘制的生长曲线内保持在较高水平,在培养后期有明显下降,生长过程中需要消耗培养液中的 Gluc 和 Gln,产生代谢废物 Lac 和  $\text{NH}_4^+$ ,在对数生长期 Gluc 和 Gln 的比代谢(消耗)速率分别为  $-2.20 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$ 、 $-3.85 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$ ,Lac 和  $\text{NH}_4^+$  的比代谢(生成)速率分别为  $2.25 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$  和  $2.22 \mu\text{mol} \cdot (10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})^{-1}$ 。

Gluc 和 Gln 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。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<sup>[12-13]</sup>。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。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,间接影响细胞的生长、代谢和产物的合成<sup>[14]</sup>。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。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<sup>[15-17]</sup>。

#### 参考文献:

[1] Herzlinger D A, Easton T G, Ojakian G K. The MDCK epithelial cell surface antigen of the kidney distal tubule[J].

Journal of Cell Biology, 1982, 93: 269-277.

- [2] Mochizuki M. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI1640 medium without animal protein[J]. Vaccine, 2006, 24: 1744-1748.
- [3] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279: 393-396.
- [4] Halperin S A, Smith B, Mabrouk T, et al. Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children[J]. Vaccine, 2002, 20: 1240-1247.
- [5] David Onions, William Egan, Ruth Jarrett, et al. Validation of the safety of MDCK cells as a substrate for the production of a cell-derived influenza vaccine [J]. Biologicals, 2010, 38: 544-551.
- [6] 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.
- [7] 令世鑫, 关伟军, 冯玉萍, 等. 河曲马骡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.
- [8] 乔自林, 冯玉萍, 李明生, 等. 兰州大尾羊耳缘组织成纤维细胞系的建立[J]. 黑龙江农业科学, 2012 (10): 64-68.
- [9] 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.
- [10] 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 增值能力比较[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(7): 182-185.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Cruz H J, Moreira J L, Carrondo M J T. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 66: 104-113.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.

# 三种园林绿化树种抗二氧化硫污染能力比较试验

邓明净<sup>1</sup>,朱美秋<sup>1</sup>,王彩芬<sup>1</sup>,李彦慧<sup>2</sup>

(1. 保定职业技术学院,河北 保定 071000;2. 河北农业大学,河北 保定 071000)

**摘要:**为了探究园林绿化树种对二氧化硫(SO<sub>2</sub>)污染的抗性,以梓树、黄杨、女贞3种常用城市园林苗木为试材,进行SO<sub>2</sub>静态熏气处理,研究3种园林绿化树种的抗SO<sub>2</sub>污染能力。结果表明:随着SO<sub>2</sub>处理浓度的增加,3种常用城市园林树种叶片的超氧化物歧化酶(SOD)含量、丙二醛(MDA)含量、脯氨酸含量、相对电导率呈逐渐增加的趋势;过氧化物酶(POD)含量呈下降趋势。3种园林树种抗污染能力的大小顺序为:黄杨>梓树>女贞。

**关键词:**园林树种;二氧化硫;抗污染能力

中图分类号:S664.1 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)06-0074-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.06.0074

随着我国工业化和城市化进程的高速发展,霾出现频率不断增加。河北地区是霾的多发地区。霾的形成与大气污染物浓度密切相关<sup>[1]</sup>。SO<sub>2</sub>气体是我国当前主要的大气污染物质之一<sup>[2-3]</sup>。SO<sub>2</sub>污染对农作物、森林、湖泊、建筑物都会产生不良影响<sup>[3]</sup>。城市绿化植被是城市生态系统极为重要的组成部分,承担着美化环境、净化空气、甚至是修复

和治理大气污染的作用。利用植物的同化功能来治理大气污染尤其是近地表城市大气的长期混合污染,是近年来国际上正在加强研究和迅速发展的前沿性课题<sup>[4]</sup>。有关SO<sub>2</sub>对植物生长发育影响的报道较多<sup>[2-5]</sup>,但植物对大气环境污染物的耐受能力与适应性千差万别,同一种植物对不同类型的污染物和不同种植物对同一类型污染物的净化能力各异<sup>[4]</sup>。梓树、黄杨、女贞是河北城市绿化常用苗木。目前有关梓树、黄杨、女贞对SO<sub>2</sub>污染的抗性能力的研究国内外报道较少。本试验以梓树、黄杨、女贞3个树种为试材,研究3个树种对SO<sub>2</sub>气体抗性能力的差异,丰富了植物抗污染理论,为城市园林绿化树种的选择和科学配置提供了理论依据,使其发挥了更大的生态效益和社会效益。

收稿日期:2014-03-12  
基金项目:河北省教育厅资助项目(2008125)  
第一作者简介:邓明净(1978-),女,河北省正定县人,硕士,讲师,从事果树和观赏植物栽培生理研究。E-mail: dengmingjing2005@163.com。  
通讯作者:李彦慧(1971-),女,河北省易县人,博士,教授,博士生导师,从事抗性生理和植物栽培管理工作。

## Growth and Metabolism Kinetic Research of MDCK Cells in Stationary Culture

BAO Yan-min<sup>1</sup>, WANG Jia-min<sup>1</sup>, MA Qi<sup>2</sup>, LING Shi-xin<sup>1</sup>, MA Wei-guo<sup>1</sup>, MA Zhong-ren<sup>3</sup>, QIAO Zi-lin<sup>1</sup>

(1. Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030; 2. Lanzhou Lark Bio-Technology Limited Company, Lanzhou Gansu 730010; 3. Key Laboratory of Bioengineering and Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, Northwest University for Nationalities Lanzhou, Gansu 730030)

**Abstract:** In order to research growth and metabolism dynamics characteristics of MDCK cells, low cell density cultured method was used to determine cell density and viability every day. The content of Gluc, Lac, Gln and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in medium were determined by multi-parameter biochemical analyzer, and the specific metabolic rate were calculated. The results showed that the growth curve of MDCK cells was "S" type, the largest density was 53.8×10<sup>4</sup> upf·mL<sup>-1</sup> and the doubling time was 24.2 h. Specific consumption rate of Gluc and Gln were -2.20 mg·(10<sup>6</sup> cells·d)<sup>-1</sup> and -3.85 μmol·(10<sup>6</sup> cells·d)<sup>-1</sup> in logarithmic phase, and specific generation rate of Lac and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were 2.25 mg·(10<sup>6</sup> cells·d)<sup>-1</sup> and 2.22 μmol·(10<sup>6</sup> cells·d)<sup>-1</sup>.

**Keywords:** MDCK cell; growth characteristics; metabolism kinetics