第 20 卷第 1 期
2001 年 1 月

无 锡 轻 工 大 学 学 报
Journal of Wuxi University of Light Industry

Vol.20,No.1
Jan.,2001

文章编号:1009 – 038X(2001)01 – 0011 – 05

杂交瘤细胞代谢流分析模型及其在批式培养中的应用

仝志明, 曹竹安
(清华大学化学工程系,北京 100084)

摘 要:通过物料衡算和线性规划方法建立了进行代谢流分析的数学模型,并首次应用于批式培养过程.分析结果表明,细胞对葡萄糖等底物的代谢效率很低,细胞对谷氨酰胺等氨基酸浓度的变化响应迟缓,在底物充裕的迟滞期及谷氨酰胺限制条件下的代谢效率高于对数生长期.另外限制谷氨酰胺等氨基酸进入能量代谢,既可减少氨的积累,也会减少乳酸的生成.

关键词:杂交瘤;代谢流分析;物料衡算;批式培养
中图分类号:Q813 文献标识码:A

Metabolic Flux Analysis Model of Hybridoma Cell and Its Application to Batch Culture

TONG Zhi-ming, CAO Zhu-an
(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: An improved mathematical model of metabolic flux analysis by material balances and linear programming method was established, which was first applied to batch culture process in this paper. The analysis results indicate that the metabolic efficiency of substrates such as glucose is very low. It showed that the response of cell metabolism to the step change of glutamine and other amino acid concentration was time-delayed. Metabolic efficiency was higher both in lag phase with highest substrate concentrations and glutamine-limited phase than that in exponential phase. It was also concluded that restraining glutamine from entering energy metabolism could reduce the accumulation of both ammonia and lactate.

Key words: hybridoma; metabolic flux analysis; material balances; batch culture

代谢流的分析在微生物培养中应用比较广泛[1],它有助于理解细胞各代谢途径的特点,并提供代谢调控或优化的信息.较直接及准确的方法是通过同位素标记及核磁共振(NMR)来测定,但该方法用于杂交瘤细胞时通常需要非均相的中空纤维反应器,以获得较高的细胞密度[2~4],才能产生足够的信号强度.此时,细胞的比生长速率很小,与一般生产中所用的批式或连续培养条件下的情况不相一致,因此获得的数据缺乏普遍性[5].

另外一种方法不需要复杂的设备,相对比较简单,通过测定胞外代谢物及菌体组成,根据物料平衡和已知的代谢途径来计算[6].由于动物细胞代谢网络的复杂性,建立的质量平衡方程组常常不能得到唯一解,因此有一定的局限性.可能的解决办法有 3 种,一是合并反应,减少变量个数;二是通过共谢物的测定来确定循环反应的流量;三是利用线性

收稿日期:2000 – 01 – 24;修订日期:2000 – 09 – 24.
基金项目:国家"九五"科技攻关项目资助课题(96-C02-03-05).
作者简介:仝志明(1971 –),男,山西运城人,工学博士,讲师.

规划的方法来求取最优化解[7].

近来应用上述两种代谢流分析的方法研究动物细胞培养过程引起了人们的关注,目前已经研究了杂交瘤细胞在中空纤维反应器中培养[3,4]以及连续培养[5]中的行为,但尚缺乏对批式或补料培养过程的分析.为此,作者在改进前人工作的基础上,建立利用物料衡算方法进行代谢流分析的模型,并应用于杂交瘤细胞的批式培养过程.

1 代谢流分析模型的建立

1.1 物料衡算关系的建立

细胞的代谢网络十分复杂.细胞消耗葡萄糖、氨基酸、维生素等底物,用以合成细胞物质(蛋白质、核酸、脂类、糖类等)、单抗产物,并生成生命活动必需的能量.从物料平衡的角度可以把这一复杂问题简单表示为:

$$U_{glc} + \sum_{j=1}^{20} U_{AA,j} + U_{vitamin\ e} + U_{salt} + U_{serum} = \text{Cell} __ \text{Mass} + \text{MAb} + \text{Lac} + NH_3 + CO_2$$

式中左边依次为葡萄糖的消耗量、20 种氨基酸的消耗、维生素、无机盐以及某些血清组分的消耗;右边依次为生成的细胞物质,单抗产物、副产物乳酸、氨及二氧化碳.维生素、无机盐以及血清组分的消耗量相对很少,物料衡算时通常忽略它们.

根据式(1)的物料平衡,假设胞内代谢物的浓度近似处于稳态[6,8],通过培养过程中两次测定结果之差就可求得细胞在此期间所消耗的底物量及氨和乳酸生成量;然后根据总生物量和单抗的生成量、细胞组成(蛋白质、核酸、脂类、糖类等)以及每种大分子物质各自的组成,可计算出用于物质合成所消耗的底物;各种底物的总消耗与用于物质合成消耗量之差就是底物用于能量代谢的消耗(能量代谢的结果是底物分解生成乳酸、氨及二氧化碳.)

1.2 代谢网络的建立

底物进入能量代谢后经过极其复杂的网络进行代谢,图 1 为简化代谢网络.网络中包括了所有氨基酸的代谢,增加了磷酸戊糖循环支路,并合理简化了苹果酸穿梭系统.图中虚线所示流量可利用上面的物料衡算直接计算得到,而实线所示流量却不行,因为磷酸戊糖途径和苹果酸-丙酮酸穿梭循环的存在给代谢网络增加了 2 个自由度,使得物料衡算方程组的系数矩阵缺秩.

1.3 建立线性规划方法

根据 Bonarius 等的研究结果[7],采用最大能量生成为目标函数的线性规划方法得到的结果与同位素示踪的结果基本一致.经分析比较后,选择了以最大 NADH 生成的方法来求得代谢流分布的确定解.为此,得到了如下的线性规划问题:

目标函数:$\text{Max}(\text{NADH}) = \text{Max}(F_4 + F_6 + F_8 + F_{10} + F_{11} + F_{13})$

约束条件:

$$F_2 + F_{15} = F_1 - F_{21}$$

$$6F_2 - 3F_3 + 4F_{15} = 4F_{37}$$

$$3F_3 - 3F_4 + F_{15} = F_{37}$$

$$F_4 - F_5 = F_{22}$$

$$F_5 + F_{14} - F_6 - F_7 = F_{26} + F_{25}$$

$$F_6 - F_8 = F_{27} - F_{28}$$

$$F_{10} - F_8 = F_{34}$$

$$F_{11} - F_{10} = F_{31}$$

$$F_{12} - F_{11} = F_{30}$$

$$F_{14} + F_{13} - F_{12} = 0$$

$$F_7 - F_8 + F_{13} = F_{35}$$

$$F_6 \geqslant 0;\ F_7 \geqslant 0;\ F_{15} \geqslant 0$$

求解该问题可得到杂交瘤细胞各代谢流的分布,见图 1.

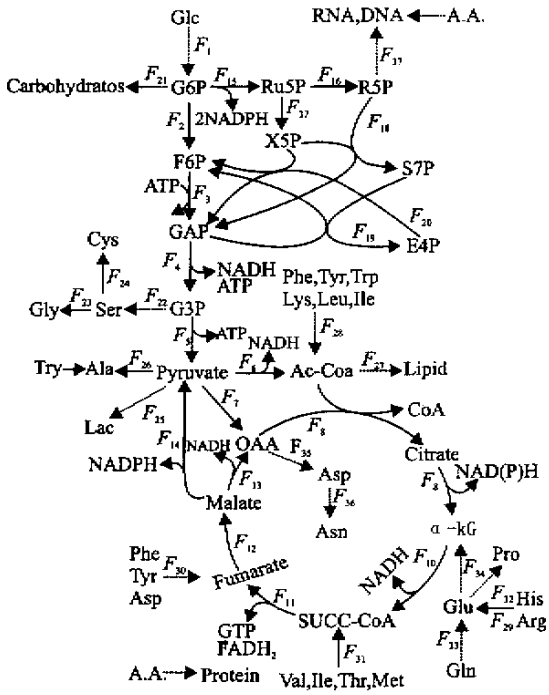

图 1 杂交瘤细胞代谢网络示意图

Fig.1 Metabolism flux net work of hybridoma cell

万方数据

2　细胞株、材料与方法

使用分泌抗 CEA 单抗杂交瘤细胞株 C50. 采用 DMEM 培养基添加 5% 胎牛血清，CO_2 培养箱中批式培养. 生物量以细胞计数结果和细胞体积来计算，氨基酸以 C18 柱进行 HPLC 分析，葡萄糖使用酶试剂盒，乳酸、氨采用分光光度法分析，详见文献[9].

3　结果与讨论

3.1　细胞生长与底物代谢

细胞生长如图 2 所示，从图 3 中可以看到批式培养中谷氨酰胺耗尽是培养结束的直接原因. 图4 表明，在谷氨酰胺耗尽后其它必需氨基酸的代谢出现了第二个峰值(65 h)，这体现细胞在谷氨酰胺的不足的条件下通过增加消耗其它必需氨基酸来进行补偿. 非必需氨基酸的代谢曲线示于图 5 中，负值表示生成. 其中持续生成的主要是丙氨酸和半胱氨酸.

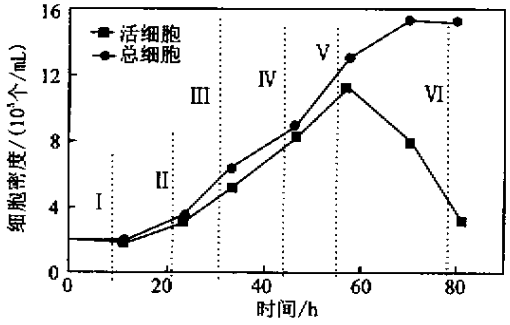

图 2　细胞生长曲线

Fig.2　Cell growth in batch culture

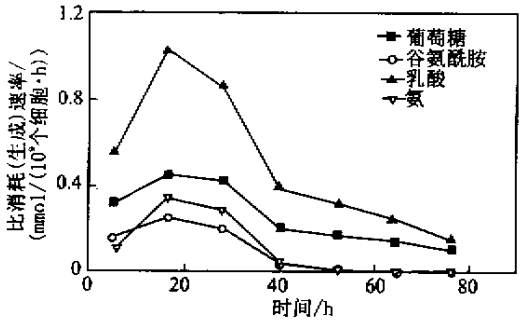

图 3　葡萄糖及谷氨酰胺代谢曲线

Fig.3　Metabolism of Glc & Gln

3.2　批式培养代谢流分布的总体特点

表 1 列出了计算得到的部分代谢流量(以各时期葡萄糖消耗为 100). 可总结出如下特点：

万方数据

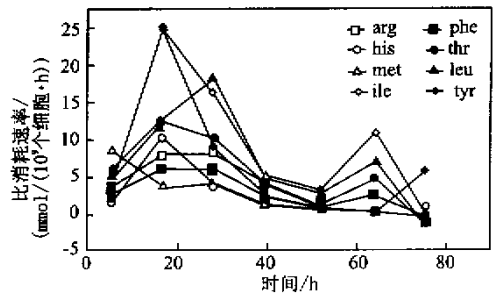

图 4　部分必需氨基酸代谢曲线

Fig.4　Metabolism of part of essential amino acid

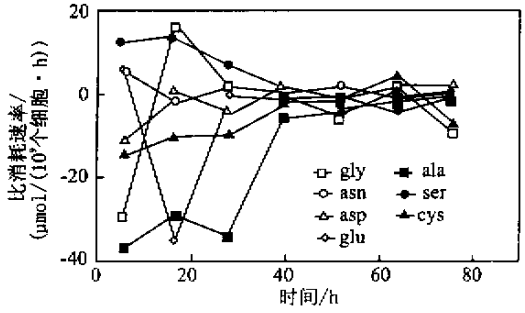

图 5　非必需氨基酸代谢曲线

Fig.5　Metabolism of non-essential amino acid

1) 比较 F_2 和 F_{15}可知，葡萄糖主要是经糖酵解途径代谢，而经磷酸戊糖途径代谢的比例几乎为 0，这和 Mancuso 等[13] C-NMR 的实验结果较一致[3].

2) 细胞对氨基酸浓度的变化响应迟缓. 细胞从接种前较低的谷氨酰胺浓度环境中进入接种后谷氨酰胺浓度较高的环境中后，并没有立刻增加对谷氨酰胺的消耗，而是经过了一段适应后才快速消耗谷氨酰胺. 这表现在培养开始的迟滞期 Ⅰ，谷氨酰胺消耗量仅是葡萄糖的 22%；随着培养的进行，在指数生长期 Ⅱ、Ⅲ，其消耗量才逐渐增大至葡萄糖的 70%左右(比较 F_1 和 F_{33}). 同样，从图 4 中也可以看到，当谷氨酰胺耗尽后(约 40 h)，其它必需氨基酸的消耗并没有立刻增加，而是经过了 10 ~ 20 h 的延迟后才逐渐出现了第二个峰值，见图 1.

这些特点意味着杂交瘤细胞对氨基酸浓度变化的响应相当迟缓，其它研究者也有类似发现[10]. 这可能解释了最近关于谷氨酰胺代谢存在多稳态的报道[11]，为实现细胞高效率代谢提供了可能的帮助.

3) 丙酮酸主要来自葡萄糖，大部分生成乳酸. 如表 2 所示，来自 TCA 循环的丙酮酸(F_{14})比例在培养过程中变化较大. 它受到两个因素的影响，一是细胞响应谷氨酰胺浓度变化的迟滞现象，如前所述，接种后尽管谷氨酰胺浓度较高，在迟滞期 Ⅰ 来

自 TCA 循环的丙酮酸只有 11%，低于指数生长期Ⅱ、Ⅲ的比例.影响丙酮酸来源变化的另一个因素显然是谷氨酰胺的浓度.在谷氨酰胺浓度较低的时期Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ，谷氨酰胺及其它氨基酸参与能量代谢的流量大大减少，使得葡萄糖生成丙酮酸的比例增加.由于氨基酸进入能量代谢要转氨或脱氨，因而限制谷氨酰胺等氨基酸的浓度可减少氨的有害积累.

表 1 批式培养中各时期部分代谢流分布

Tab.1 Metabolism flux distribution of various growth phases in batch culture

	时期Ⅰ 0 ~ 12 h	时期Ⅱ 12 ~ 24 h	时期Ⅲ 24 ~ 34 h	时期Ⅳ 34 ~ 47 h	时期Ⅴ 47 ~ 58 h	时期Ⅵ 58 ~ 81 h
F_1	100	100	100	100	100	100
F_2	97	95	95	96	99	102
F_5	179	185	180	185	191	204
F_6	28	7	13	25	41	44
F_7	0	0	0	0	0	0
F_{10}	46	73	93	39	45	71
F_{12}	58	83	98	41	47	82
F_{14}	22	67	59	18	1	14
F_{15}	0	0	0	0	0	0
F_{25}	160	235	214	173	149	173
F_{26}	13	10	11	5	3	0
F_{28}	2	12	27	2	5	23
F_{33}	22	72	66	22	5	1
F_{34}	20	61	60	18	1	1
F_{37}	1	1	1	1	0	0

表 2 批式培养中丙酮酸代谢的来源和去向的比例

Tab.2 Pyrurate metabolism flux distribution in batch culture

时间区间	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ
来自 TCA 循环 F_{14}/%	11	27	25	9	1	7
生成乳酸 F_{25}/%	80	93	90	85	77	80
生成乙酰 CoA F_6/%	14	3	5	12	21	20

约 80% ~ 90%的丙酮酸生成了乳酸.值得注意的是，这一比例和来自 TCA 循环的丙酮酸比例呈现相似的变化规律.作者认为，由于额外进入 TCA 的碳以苹果酸穿梭的方式在胞液中生成丙酮酸(F_{14})的同时产生 NADH，造成胞液中较高的 NADH/NAD^+ 比例，从而促使丙酮酸快速生成乳酸以再生 NAD^+ 在增加乳酸生成的同时，丙酮酸生成乙酰辅酶 A 的比例则明显减少，使得碳源的利用效率下降.因此，限制谷氨酰胺浓度，减少必需氨基酸进入能量代谢的意义不仅在于可以减少氨的积累，同时还能够减少乳酸的积累，提高碳源利用效率.

同时，丙酮酸生成乙酰辅酶 A 的比例相当低，尤其在指数生长期.这是杂交瘤细胞的一个普遍特点，设法增强丙酮酸脱羧酶系的活力是提高底物利用效率的一个可能的方法.

4 结 论

在合理简化代谢网络的基础上，利用物料衡算和线性规划方法可以得到杂交瘤细胞代谢网络中的流量分布.代谢流分析结果表明，在批式培养中杂交瘤细胞的代谢效率很低.葡萄糖主要经糖酵解途径代谢，大部分谷氨酰胺进入能量代谢，80%以上的丙酮酸低效转化为乳酸.细胞对谷氨酰胺等氨基酸浓度的变化响应迟缓，在底物充裕的迟滞期表现出与在谷氨酰胺限制条件下相似的高代谢效率.另外限制谷氨酰胺等氨基酸进入能量代谢，可同时减少氨和乳酸的积累.

万方数据

参考文献:

[1] HUA Q, FU P C, YANG C. Microaerobic lysine fermentations and metabolic analysis[J]. **Biochem Eng J**, 1998(2): 89 ~ 100.

[2] SHARFSTEIN S T, TUCKER S N, MANCUSO A, *et al*. Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1994, 43: 1059 ~ 1074.

[3] MANCUSO A, SHARFSTEIN S T, TUCKER S N, *et al*. Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1994, 44: 565 ~ 585.

[4] MANCUSO A, SHARFSTEIN S T, FERNANDEZ E J, *et al*. Effect of extracellular glutamine concentration on primary and secondsary metabolism of murine hybridoma: An in vivo ^{13} C nuclear magnetic resonance study[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1998, 57: 172 ~ 186.

[5] BONARIUS H P J, HATZIMANIKATIS V, MEESTERS K P H, *et al*. Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balance[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1996, 50: 299 ~ 318.

[6] VALLINO J J, STPHANOPOULOS G. Metabolic flux distributions in corynebacterium glutamicum during growth and lysine overproduction[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1993, 41: 633 ~ 646.

[7] BONARIUS H P J, TIMMERARENDS B. Metabolite-balancing techniques vs. ^{13} C tracer experiments to determine metabolic fluxes in hybridoma cells[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1998, 58: 258 ~ 262.

[8] JEONG Y H, WANG S S. Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1995, 17: 47 ~ 55.

[9] **仝志明.杂交瘤细胞代谢研究及培养策略**[D]. **北京:清华大学**, 1999.

[10] MILLER W M, WILKE C R, BLANCH H W. The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II glutamine pulse and step changes[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1989, 33: 487 ~ 499.

[11] FOLLSTAD B D, BALCARCEl R R, STEPHANOPOULOS G, *et al*. Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1999, 63(6): 675 ~ 683.

万方数据

(责任编辑 李春丽)