氨对悬浮培养幼仓鼠肾细胞(BHK-21) 生长代谢的影响

武发菊¹,尚勇良¹,安芳兰¹,董文教¹,宋玉霞¹,董金杰¹,陈苗苗¹, 牟克斌^{1,2},黄银君^{1,2},刘学荣^{1,2}

(1 中农威特生物科技股份有限公司,甘肃 兰州 730046;2 中国农业科学院 兰州兽医研究所,甘肃 兰州 730046)

[摘 要] 【目的】研究在幼仓鼠肾细胞(BHK-21)悬浮培养过程中,不同浓度氨对其生长代谢的影响。【方法】 用添加0,1.8,2.5,5.5,8.0和15.0mmol/L氨的培养基培养BHK-21细胞,每隔12h取样1次,用细胞计数仪进行 细胞计数,测定细胞活力,采用AO/EB双染色法和AnnexinV-FITC/PI流式细胞仪2种方法检测细胞的凋亡情况, 同时测定细胞培养过程中葡萄糖、氨和乳酸浓度的变化。【结果】在BHK-21细胞连续培养过程中,当氨的添加浓度 低于1.8mmol/L时,其对细胞的生长几乎不产生抑制作用,细胞活性、细胞总数与对照组差异不显著,未出现细胞聚 集成团现象;当氨添加浓度达到15.0mmol/L时,BHK-21细胞直接进入死亡期;当氨的添加浓度为2.5~8.0mmol/L 时,氨对细胞生长的抑制作用由弱变强,这种抑制作用在细胞培养至24h开始出现。另外,随着氨添加浓度的增加,葡 萄糖的消耗量减少,细胞代谢产生的乳酸和氨降低。【结论】氨对悬浮培养的BHK-21细胞的生长和代谢有显著影响。

[关键词] 细胞培养;BHK-21 细胞;氨抑制;细胞凋亡 [中图分类号] Q813.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2011)02-0028-05

Effects of ammonia on the growth and metabolism of BHK-21 suspension cells

WU Fa-ju¹, SHANG Yong-liang¹, AN Fang-lan¹, DONG Wen-jiao¹, SONG Yu-xia¹, DONG Jin-jie¹, CHEN Miao-miao¹, MU Ke-bin^{1,2}, HUANG Yin-jun^{1,2}, LIU Xue-rong^{1,2}

(1 China Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co., Ltd, Lanzhou, Gansu 730046, China;
2 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: [Objective] The study was carried out to research the effects of ammonion in different concentrations during the culture on BHK-21 suspension cells. [Method] The media of 0,1.8,2.5,5.5,8.0 and 15.0 mmol/L ammonion were used to culture the BHK-21 suspension cells. Sampling was taken every 12 h,cells were counted and vitality was determined by the cell count instrument. Double AO/EB dyeing and Annexin V-FITC/PI flow cytometric analysis were used to detect cell apoptosis, concentration of glucose, ammonia, and lactic acid in the process of cell metabolism. [Result] The growth and metabolism of BHK-21 cells weren't influenced after 1.8 mmol/L of ammonia was added. Cell activity and number were not significantly different with the control group, and the phenomenon of the cell conglobation didn't appear; When the concentration reached above 15.0 mmol/L, the growth stopped. The ammonion at a concen-

[基金项目] 中农威特生物科技股份有限公司资助项目(YF-20080001)

[作者简介] 武发菊(1979-),女,甘肃白银人,助理研究员,主要从事兽医生物制品学、细胞生物学研究。

E-mail:wufaju2007@126.com

^{* [}收稿日期] 2010-06-09

[[]通信作者] 刘学荣(1977-),男,甘肃庆阳人,研究员,主要从事国家重大动物疫病预防用生物制品技术研究。

tration between 5.5 and 8.0 mmol/L, showed obvious inhibiting effect on the growth and metabolism of BHK-21 cells at 24 h. Along with the addition of ammonia, the consumption of glucose decreased, the same with product of lactic acid and ammonion. [Conclusion] Ammonia showed significant influence on the growth and metabolism of BHK-21 cells.

Key words: cell culture; BHK-21 cell; ammonia inhibition; cell apoptosis

近一个世纪以来,为了预防和控制口蹄疫的发 生及流行,许多国家一直没有间断过对口蹄疫疫苗 的研究,而我国现行口蹄疫灭活疫苗的生产工艺相 对落后,生产病毒的幼仓鼠肾细胞(BHK-21)培养环 境复杂,抑制因素较多,从而限制了细胞密度的提 高,其中氨离子的积累是抑制细胞生长的主要因素 之一。在细胞培养过程中,氨来源于培养基和细胞 代谢两方面。氨的积聚使细胞内 UDP 氨基己糖增 加,从而影响细胞的生长及蛋白的糖基化过程;氨还 可以抑制谷氨酰胺的代谢途径,使天冬氨酸和谷氨 酸的消耗增加,从而影响细胞的氨基酸代谢;同时, 氨浓度的升高,改变了细胞内局部微环境的 pH,对 细胞的正常生理功能造成影响。为了减少培养过程 中氨的累积,常用的方法是限制培养基中的谷氨酰 胺含量,用谷氨酸或二肽等多种物质来替代谷氨酰 胺[1-3];此外,采用电动学技术、固定吸附技术或在培 养基中补加多种氨基酸也可减少氨的累积[4-6]; 随着 基因工程手段的运用,将谷氨酰胺合成酶基因(GS) 转入细胞,以氨和谷氨酸为底物,使得细胞自身具有 合成谷氨酰胺的能力等方法,也可以降低氨的毒副 作用[7]。与乳酸相比,较低浓度的氨就会对细胞的 生长产生抑制,诱发细胞凋亡。目前,已有大量关于 氨对杂交瘤细胞^[8]、重组 CHO 细胞^[9] 生长代谢影 响的研究报道,但有关氨对 BHK-21 细胞生长代谢 影响的研究尚比较少。为此,本试验研究了氨对 BHK-21 细胞生长代谢的影响,旨在为 BHK-21 细 胞高密度培养过程中氨浓度的控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要仪器

BHK-21 悬浮细胞种子,购自 ECACC,由中农 威特生物科技股份有限公司研发部保存。培养基为 自制的 GMEM+F68,并添加有体积分数 7%的胎 牛血清(兰州荣晔生物技术有限责任公司)。

主要仪器有细胞计数仪(德国 INNOVATIS 公司)、氨离子测定仪(美国 Thermo 公司)、荧光显微镜(日本 Olympus)和流式细胞仪 FACS-Calibur 型(美国 BD 公司)。

1.2 BHK-21 细胞的培养

从细胞库中取出 BHK-21 悬浮细胞种子,置于 100 mL小方瓶中,加入 12 mL 培养基进行复苏培 养,待细胞长满单层后,用胰酶消化,倾去胰酶,加入 培养基,用移液管反复轻轻吹打成单细胞悬浮液,按 1:3(体积比)的接种比例进行传代培养。将长好的 BHK-21 贴壁细胞消化后,调整细胞密度为 0.75× 10⁶ mL⁻¹后转入摇瓶进行扩大培养。待细胞形态生 长良好,以 1.0×10⁶ mL⁻¹密度接入 250 mL 三角瓶 中,每瓶 100 mL,共接种 18 瓶,分为 6 组,每组重复 3 瓶,除 1 组对照组外,其他 5 组(处理 2~6)分别加 入一定量 的氯化铵浓缩液,使氯化铵浓度分别为 1.8,2.5,5.5,8.0 和 15.0 mmol/L,置于 37 ℃培 养,每隔 12 h取样备检。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 细胞活力 用细胞计数仪进行细胞计数,并 测定细胞活力。

1.3.2 葡萄糖、氨和乳酸浓度 葡萄糖浓度采用葡萄糖氧化酶法测定,乳酸浓度采用乳酸脱氢酶法测定,氨浓度采用氨离子测定仪测定。

1.3.3 细胞凋亡率 采用 AO/EB 双染色法和 Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪 2 种方法检测细胞 的凋亡情况。

(1)AO/EB 双染色法。制备单细胞悬液,使细胞密度为 10^7 mL^{-1} ,取细胞悬液 25 μ L,加入 2 μ L AO 染液(100 μ g/mL)及 2 μ L EB 染液(100 μ g/mL),滴于载玻片上,盖片封片后用荧光显微镜 直接观察,于 20 min 内计数 500 个细胞。

(2)Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪法。将正 常培养和诱导凋亡的悬浮细胞($0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ mL⁻¹)用 PBS 洗 2 次,加入 100 µL Binding Buffer 和 10 µL FITC 标记的 Annexin-V(20 µg/mL),室 温避光 30 min,再加入 PI(50 µg/mL)5 µL,避光反 应 5 min,加入 400 µL Binding Buffer,用流式细胞 仪进行检测。

1.4 数据处理

试验重复3次取平均值,利用 SPSS 软件进行 统计检验。

2 结果与分析

2.1 氨对 BHK-21 细胞生长的影响

据报道,大多数哺乳动物细胞在氨浓度为1~5 mmol/L时生长就会受到抑制,氨主要通过干扰细 胞正常的电化学梯度、抑制酶反应以及改变胞内 pH等对细胞生长产生抑制作用^[10]。有研究发现, 3.09 mmol/L的氨浓度会对CHO-dhfr-细胞生长产 生明显抑制作用^[11],2.6 mmol/L的氨可抑制 BHK 细胞在转瓶中的生长^[12],2 mmol/L的氨浓度则会 使 HeLa 细胞密度降低 75%^[13]。

从图 1 可以看出,当氨添加浓度为 1.8,2.5 mmol/L 时,其对 BHK-21 细胞产生了弱抑制作用; 当氨添加浓度为 5.5,8.0 mmol/L 时,在培养开始 氨便对 BHK-21 细胞的生长产生了明显的抑制作 用,其中在氨添加浓度达到 5.5 mmol/L 时,BHK-21 细胞的生长完全被抑制,细胞没有出现对数生长 期,活细胞密度一直维持在初始细胞密度水平,然后 进入衰亡期;当氨添加浓度达到 15.0 mmol/L 时, BHK-21 细胞直接进入死亡期。





从图 1 还可以看出,氨浓度较低时,细胞的生存 维持时间相对较长,处理 2 的细胞能一直维持生长, 且活性与对照组无显著性差异;处理 3 的细胞能维 持生长到 132 h;处理 4 的细胞可维持生长到 108 h; 处理 5 和 6 的细胞仅能维持生长 72 h,之后细胞生 长进入衰亡期,此时凋亡率接近 30%。

2.2 氨对 BHK-21 细胞活性的影响

从图 2 可见, 氨的添加并不会立刻表现出对细胞活性的显著影响; 当氨添加浓度为 1.8 mmol/L 时, BHK-21 细胞的活性与对照组差异不大,活性始终保持在 94%以上;随着氨浓度的进一步提高及作 用时间的延长, BHK-21 细胞活性明显下降; 当氨浓 度为 2.5, 5.5, 8.0 和 15.0 mmol/L 时, BHK-21 细 胞活性分别在培养 72, 60, 36 和 24 h 后开始下降, 该结果表明, 氨对 BHK-21 细胞的生存具有一定毒性。另外, 通过检测细胞凋亡情况发现, 处理 3, 4, 5, 6 的 BHK-21 细胞, 在培养开始后的 24 h 开始凋亡, 但此时细胞活性仍较高。从上述结果可知, BHK-21 细胞不会对氨产生适应性, 氨对 BHK-21 细胞的毒性作用是不可逆转的, 并且这种毒性作用 随着氨浓度的增加和作用时间的延长而加重。





Fig. 2 Effect of different initial ammonia concentrations on BHK-21 cell viability

2.3 氨对 BHK-21 细胞凋亡的影响

细胞发生凋亡时其形态特征和生化代谢会发生 一系列的改变。目前检测细胞凋亡的方法很多,但 一般认为形态学变化是判断凋亡的基础,而流式细 胞术是近年来广泛使用的一种先进的细胞多参数分 析方法,本试验联合应用 AO/EB 双染色法和 Annexin-FITC/PI 流式细胞仪法检测了 BHK-21 细胞 的凋亡情况。AO/EB 双染色法检测可见,正常 BHK-21 细胞呈绿色荧光,凋亡 BHK-21 细胞呈栝 黄色荧光,坏死 BHK-21 细胞呈红色荧光(图 3)。



图 3 氨对 BHK-21 细胞凋亡影响的 AO/EB 双重 荧光染色观察(20×) a. 正常细胞;b. 凋亡细胞;c. 坏死细胞

Fig. 3 Observation of the influence of AO/EB dual

fluorescent dye about ammonia on BHK-21 apoptosis (20×) a. Normal cell; b. Apoptotic cell; C. Necrotic cell

由表1可知,加入不同浓度的氨作用12h后, 各试验组均未观察到明显的细胞凋亡;作用24h 后,随着氨浓度的增加BHK-21细胞凋亡率呈增加

表 1 不同浓度氨对 BHK-21 细胞凋亡的影响

Table 1 Effect of different initial ammonia concentrations on the apoptosis of BHK-21 cells

处理 Treatment 「	凋亡率/% Rate of apoptosis			
	12 h	24 h	48 h	72 h
1(CK)	1.3 a	1.2 a	1.5 a	1.1 a
2	1.2 a	1.4 a	1.3 a	1.3 a
3	1.6 a	1.3 a	1.5 a	2.3 a
4	1.1 a	1.7 b	4.2 b	6.1 b
5	1.3 a	5.2 b	8.2 b	14.5 b
6	1.3 a	12.5 b	8.0 b	5.0 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著(P<0.05)。

Note: The different small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

2.4 氨对 BHK-21 细胞代谢的影响

2.4.1 氣对葡萄糖代谢的影响 一般认为,氨对葡 萄糖代谢的影响主要表现为对糖酵解途径中关键酶 活性的影响。有研究表明,氨的添加可导致细胞质 的酸化,糖酵解途径的关键酶(磷酸果糖激酶)活性 随着胞质 pH 的降低而降低,当胞内 pH 值下降 0.2 个单位时,磷酸果糖激酶的活性将完全丧失^[14]。

从图 4 可以看出,对照组葡萄糖不断被消耗,直 到 BHK-21 细胞进入死亡期后,葡萄糖的消耗速率 才有所降低。添加氨的处理组随着氨浓度的提高, BHK-21 细胞消耗的葡萄糖呈减少趋势。与细胞的 生长曲线相对应,氨浓度为 1.8 mmol/L 时,葡萄糖 的消耗稍低于对照组;当氨浓度为 2.5 mmol/L 时, 葡萄糖的消耗明显低于对照组;而当氨浓度为 5.5,





3 讨论与结论

Miller 等^[15]在 AB2-143.2 杂交瘤细胞的培养 过程中发现,杂交瘤细胞对氨具有很好的适应性,氨 浓度的提高不会导致细胞死亡,经过一定时间的适 8.0,15.0 mmol/L时,葡萄糖的消耗受到很强的抑制,在培养36h后几乎不再有葡萄糖的消耗。上述结果表明,在不同氨浓度下,单位细胞的葡萄糖代谢 有明显的不同。



图 4 不同浓度氨对 BHK-21 细胞葡萄糖消耗的影响

Fig. 4 Influence of different initial ammonia concentrations on glucose consumption about BHK-21 cells

2.4.2 氢对乳酸生成的影响 代谢副产物乳酸主 要来自葡萄糖,不同氨浓度下乳酸的积累与葡萄糖 的消耗相对应。由图 5 可知,当氨浓度为 1.8 mmol/L时,乳酸浓度稍低于对照;当氨浓度为2.5, 5.5 mol/L时,乳酸浓度与对照相比明显降低;当氨 浓度为 8.0,15.0 mmol/L时,乳酸的产生受到强烈 抑制,在培养 24 h 后,几乎不再有乳酸产生。

2.4.3 氨对氨积累值的影响 从图 6 可知,在 BHK-21 细胞培养过程中,随着氨添加浓度的提高, 细胞代谢产生的氨呈减少趋势,但添加 1.8,2.5 和 5.5 mmol/L 氨的处理组,其氨积累量均随培养时 间的延长而增加。





应后,细胞能恢复到最初的生长水平。随后 Newland 等^[16]在 SP2/0-Ag-14 杂交瘤细胞的培养过程 中也发现了相似的现象。对于 T 淋巴瘤细胞, Trusky 等^[17]观察到氨能降低该细胞的死亡速率。 本试验的结果则表明,在 BHK-21 细胞连续培养过 程中,氨浓度低于 1.8 mmol/L 时,其对细胞的生长 几乎不产生抑制作用,细胞活性、细胞总数与对照组 差异不显著,在整个培养过程中也未出现细胞聚集 成团现象;当氨添加浓度达到 15.0 mmol/L 时, BHK-21 细胞直接进入死亡期;当氨添加浓度为 2.5~8.0 mmol/L 时,氨对细胞生长的抑制作用由 弱变强,这种抑制作用在细胞培养初期就很明显,细 胞数目增长缓慢;另外,随着氨添加浓度的增加,葡 萄糖消耗减少,乳酸积累降低。总之,氨对 BHK-21 细胞的生长和代谢有显著影响,在长期的高氨条件 (>2.5 mmol/L)下,BHK-21 细胞不会对氨产生适 应性,即氨对 BHK-21 细胞生长的抑制作用是不可 逆的,并且这种抑制作用随着氨作用时间的延长而 加重。

[参考文献]

- [1] Altamirano C, Illanes A, Casablances A, et al. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture [J]. Biotechnol Prog, 2001, 17: 1032-1041.
- [2] Atanassov C L, Seiler N, Rebel G. Reduction of ammonia formation in cell cultures by L-alanyl-L-glutamine requires optimization of the dipetide concentration [J]. J Biotechnol, 1998, 62: 159-162.
- [3] Genzel Y, Ritter J B, Kning S, et al. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells [J]. Biotechnol Prog, 2005, 21:58-69.
- [4] Chang Y D, Grodzinsky A J, Wang D I C. In-situ removal of ammonium and lactate through electrical means for hybridoma cultures [J]. Biotechnol Bioeng, 1995, 47(3): 308-318.
- [5] Jeong Y H, Wang S S. In-situ removal of ammonium ions from hybridoms cell culture media: Selection of adsorbent [J]. Biotechnol Technol, 1992, 6:341-346.
- [6] Chen P F, Harcum Sarah W. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells [J]. J Biotechnol, 2005, 117: 277-286.
- [7] 张 芳,易小萍,孙祥明,等. 重组 CHO-GS 细胞降低氨毒副作用的代谢研究 [J]. 生物工程学报,2006,22(1):94-100.
 Zhang F,Yi X P,Sun X M, et al. Metabolism of recombinant CHO-GS cell reducing of toxic effect of ammonia [J]. Chinese

Journal of Biotechnology, 2006, 22(1):94-100. (in Chinese)

[8] 张 立,金亦辉,张元兴.在无血清培养基中代谢副产物对杂交 瘤细胞生长代谢的影响:Ⅱ. 氨的作用 [J].中国生物制品学杂 志,2002,15(2):82-86. Zhang L,Jin Y H,Zhang Y X. Influence of by-product(ammonia)in serum-free medium on growth and metablism of hybridoma cells [J]. Chin J Biologicals,2002,15(2):82-86. (in Chi-

nese)

[9] 孙祥明,张元兴. 氨对重组中国仓鼠卵巢细胞生长及人红细胞 生成素表达的影响 [J]. 华东理工大学学报,2002,28(2):172-175.

Sun X M, Zhang Y X. Effects of ammonia on the growth and EPO expression of recombinant CHO cells [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2002, 28(2):172-175. (in Chinese)

- [10] Li J.Sun X.Zhang Y. Improvement of hepatitis surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant Chinese hamster ovary cells [J]. Process Biochem, 2006,21(2):79-85.
- [11] 孙祥明,张元兴. 氨对重组中国仓鼠卵巢细胞代谢的影响
 [J]. 生物工程学报,2001,17(3):304-309.
 Sun X M,Zhang Y X. Effects of ammonia on cell metabolism in the culture of recombinant CHO cells [J]. Chinese Journal of Biotechnolgy,2001,17(3):304-309. (in Chinese)
- [12] 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 Microbiol Technol, 2000, 27:43-52.
- [13] Hassell T, Gleave S, Butler M. Growth inhibition in animal cell culture: The effect of ammonia and lactate [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1991, 30:29-41.
- [14] Wurm F M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells [J]. Nature Biotechnol, 2004, 22: 1393-1398.
- [15] Miller W M, Wilke C R, Blanch H W. Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture [J]. Bioproc Eng, 1988, 3: 113-122.
- [16] Newland M,Kamal M N,Greenfield P F,et al. Ammonia inhibition of hybridomas propagated in batch, fed-batch and continuous culture [J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 43(4): 434-438.
- [17] Truskey G A, Nicolakis D P, Dimasi D, et al. Kinetic studies on unstructured models of lymphocyte metabolism in fedbatch culture [J]. Biotechnol Bioeng, 1990, 36(8):797-807.