

杂交瘤细胞的代谢流量分析

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 应用代谢流量平衡模型定量分析了杂交瘤细胞的代谢流量分布。结果表明,在连续培养的杂交瘤细胞中,当葡萄糖和谷氨酰胺的流加浓度分别为 13.8 和 2.6 mmol·L⁻¹时,86.2%的葡萄糖通过糖酵解生成乳酸,7.5%的生成脂类,进入 TCA 循环的仅占 0.83%,谷氨酰胺中的氮有 3%用于核酸的合成,54.5%生成氨,另有 38.2%生成非必需氨基酸,碳骨架 61.6%生成非必需氨基酸,34.1%进入 TCA 循环。

关键词 代谢流量分析,代谢网络,杂交瘤细胞

中图分类号 Q953 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0740-07

动物细胞培养已经广泛地应用于生产疫苗、重组蛋白、医疗诊断试剂和抗体等多种产品。为了提高动物细胞的生产效率,需要深入了解细胞的生理生化行为,特别是细胞的代谢。如果能够定量细胞内的代谢流量,就可以知道特定培养条件下细胞合成代谢和分解代谢,了解细胞生长和产物生产的代谢需求,进而合理地设计培养基,选择培养方式。

关于细胞主要代谢物质,如葡萄糖、氨基酸、乳酸和氨等代谢动力学已有大量报道^[1-4]。这些研究大多涉及胞外的底物吸收速率和产物的生成速率,而对动物细胞胞内代谢分析的研究还比较少。进行代谢流量测定常用的实验手段是同位素示踪方法,包括放射性底物标记实验^[5]和¹³C 核磁共振分析^[6]。这些方法可以阐明部分代谢途径,但实验成本昂贵,操作复杂。Varma 和 Palsson 等提出用代谢流量平衡分析方法定量分析胞内代谢网络^[7]。代谢流量平衡分析只需知道代谢网络的化学计量关系和细胞的代谢需求,通过建立相应的代谢矩阵,就可以定量分析细胞内主要代谢流量。代谢矩阵的解往往并不唯一, Savinell 和 Palsson 等应用线性优化的方法,求解出胞内的代谢流量分布^[8]。但 Bonarius 等认为线性优化的方法有明显的缺点,只能得到边界条件的极值^[9],线性优化的目标函数往往不易确定。Bonarius 等用最小欧氏范数的方法求解线性矩阵所得的结果和用放射性底物标记实验的结果最为

接近^[9]。本文应用代谢流量平衡分析的方法对杂交瘤细胞的代谢网络进行定量分析,得到杂交瘤细胞的胞内代谢流量,并进一步分析了主要代谢途径。

1 杂交瘤细胞代谢网络

本文以杂产瘤细胞 AB2-143.2 为分析对象,实验数据来源于 Miller 研究小组^[2],本文所用的实验数据包括细胞干重,细胞比生长速率,葡萄糖和氨基酸的比消耗速率,抗体和乳酸的比生成速率。

图 1 综合了文献中有关哺乳动物细胞的主要代谢网络^[2,6,8,9]。本文将计算图 1 中每步反应的代谢流量,其中涉及的主要代谢物质包括:底物葡萄糖、谷氨酰胺和其它氨基酸,产物乳酸、抗体,细胞内大分子物质蛋白质、多糖、脂类、DNA 和 RNA 等以及代谢中间物质。

为了降低代谢网络的复杂性和减少代谢流量平衡方程,本文按以下原则简化细胞内复杂的代谢网络:(1)按照固定比例进行的反应,简化为一个反应方程,特别是大分子物质的合成如 DNA 和 RNA 等;(2)只列出主要代谢物质的流量平衡方程;(3)对每一个独立的代谢反应都分开考虑。

根据以上原则和图 1 的代谢网络,建立相应的化学计量平衡方程,列于附录 I 中。下面分别计算各个化学计量平衡方程的代谢流量。

收稿日期 2000-01-18,修回日期 2000-06-08。

基金项目 国家自然科学基金项目资助(29606011)。

* 通讯联系人。

2 代谢流量计算

2.1 合成胞内大分子物质和抗体的代谢流量

为了简化细胞代谢网络,在本文中大分子物质的合成分别用一个化学计量平衡方程表示(附录 II 方程 33 ~ 37),包括蛋白质、多糖、脂类、DNA 和 RNA。

哺乳动物细胞中各种大分子物质所占比例文献报道不多,并且差异也较大^[10,11]。本文采用 Bonarius 所测定的实验结果^[10],列于表 1 中的第 3 列。Mille 等测定杂交瘤 AB2-143.2 细胞干重为 $26 \times 10^{-11}(\text{g} \cdot \text{cell}^{-1})$ ^[2],单个细胞中大分子的绝对含量列于第 2 列,根据其绝对含量可以计算每种大分子单体在单个细胞中的摩尔数 x_i (表 1 第 5 列):

$$x_i = \frac{DW_i}{MW_i} \tag{1}$$

其中 DW_i 和 MW_i 分别表示 i 种大分子在单个细胞中的绝对干重和大分子单体摩尔质量。

每种大分子物质合成的代谢流量为:

$$b_i = \mu \cdot x_i \tag{2}$$

μ 是细胞比生长速率。Miller 等报道杂交瘤 AB2-143.2 细胞的比生长速率是 $0.56/\text{d}$ ^[2]。由(1)式和(2)式分别计算出的胞内大分子物质的摩尔数和合成的代谢流量列于表 1 第 5、6 列中。

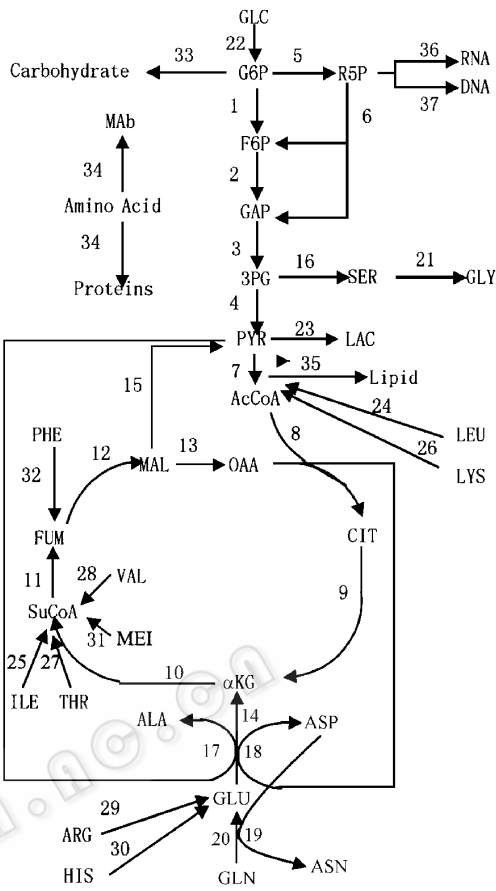


图 1 杂交瘤细胞的代谢网络

Fig. 1 Metabolic network of the hybridoma cells

表 1 细胞组成和大分子物质的代谢流量

Table 1 Cellular composition and flux of macromolecular

| | Absolute values $\mathcal{K}(10^{-11} \text{g} \cdot \text{cell}^{-1})$ | Fraction of DW /% | Molecular weight $\mathcal{K}(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})$ | Corresponding monomer | |
|-------|--|----------------------|---|---|---|
| | | | | Molar number $\mathcal{K}(10^{-14} \text{mol} \cdot \text{cell}^{-1})$ | Flux $\mathcal{K}(10^{-14} \text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ |
| C | 1.846 | 7.1 | 162 C | 11.40 | 6.15 |
| P | 18.356 | 70.6 | 108 AA | 170.00 | 91.80 |
| Lipid | 2.522 | 9.7 | 281 L | 8.98 | 4.85 |
| RNA | 1.508 | 5.8 | 319 NMP | 4.72 | 2.55 |
| DNA | 0.364 | 1.4 | 308 NMP | 1.18 | 0.64 |
| DCW | 26 | | | | |

合成抗体的代谢流量可以直接取自于杂交瘤 AB2-143.2 细胞抗体的比生成速率,为 $12.9 \times 10^{-14} \text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2.2 氨基酸合成胞内蛋白、核酸(DNA 和 RNA)和抗体的代谢流量和净代谢流量

从表 1 中可知合成 RNA 和 DNA 的代谢流量,即附录 II 方程 36 和 37 的代谢流量,根据氨基酸 i 合成核酸的化学计量系数,可以计算出氨基酸 i 用

于合成核酸的代谢流量 r_{ni} ,列于表 2 第 4 列中。由于合成核酸时生成了 GLU,所以 $r_{n\text{GLU}}$ 为负值。

氨基酸 i 用于合成生物量(包括胞内蛋白质和核酸)和抗体的代谢流量 r_{bi} 为:

$$r_{bi} = b_p \cdot \theta_i^p + b_{\text{MAb}} \cdot \theta_i^{\text{MAb}} + r_{ni} \tag{3}$$

这里 b_p 和 b_{MAb} 是合成胞内蛋白质和抗体的代谢流量, θ_i^p 和 θ_i^{MAb} 是氨基酸 i 分别在蛋白质和抗体中的组成(百分比), r_{ni} 为氨基酸 i 合成核酸的代谢

流量 r_{bi} 为氨基酸 i 用于合成生物量和抗体的代谢流量,正值表示氨基酸 i 用于合成了生物量和抗体,负值表示合成了氨基酸 i 。胞内蛋白质^[14]和抗体^[15]的氨基酸组成分别列于表 2 第 2 列和第 3 列中,合成核酸的 r_{ni} 列于表 2 第 4 列,每种氨基酸的 r_{bi} 列于表 2 第 5 列中。

细胞从培养基中吸收氨基酸后,除用于合成生物量和抗体外还进入其它代谢途径,把氨基酸的这

部分代谢流量称为净代谢流量 r_{nci} :

$$r_{nci} = r_{ci} - r_{bi}$$

(4)

r_{ci} 为氨基酸 i 的比消耗速率, r_{ci} 为正值时表示细胞从培养基中吸收消耗了氨基酸 i ,为负值时表示生成氨基酸 i ; r_{nci} 为负值时表示经过除生物合成和生成抗体以外的代谢途径生成了氨基酸 i ,为正值时表示消耗了氨基酸 i 。氨基酸净代谢流量 r_{nci} 列于表 2 第 7 列。

表 2 氨基酸的比消耗速率和净代谢流量

Table 2 Specific consumption rate and net catabolic rate of amino acid

| Amino acid | θ_i^P (%) | θ_i^{MAb} (%) | Flux of nucleic acid (r_n) | Flux of biomass (r_b) | Specific consumption rate(r_c) | Net catabolic rate(r_{nc}) |
|------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| ASP | 5.5 | 4.0 | 4.14 | 9.71 | 2.2 | -7.51 |
| GLU | 4.6 | 5.0 | -5.42 | -0.55 | -4.1 | -3.55 |
| ASN | 4.4 | 3.4 | 0 | 4.48 | 3.0 | -1.48 |
| SER | 7.1 | 5.3 | 0.96 | 8.16 | 4.5 | -3.66 |
| GLN | 3.9 | 5.5 | 6.06 | 10.35 | 100 | 89.65 |
| HIS [#] | 2.1 | 1.5 | 0 | 2.12 | 3.0 | 0.88 |
| GLY | 7.5 | 6.8 | 1.38 | 9.14 | -4.1 | -13.24 |
| THR [#] | 6.0 | 7.9 | 0 | 6.53 | 6.9 | 0.373 |
| ALA | 9.0 | 6.5 | 0 | 9.10 | -40 | -49.10 |
| ARG [#] | 4.7 | 4.4 | 0 | 4.88 | 5.2 | 0.32 |
| TYR | 3.5 | 4.1 | 0 | 3.74 | 1.9 | -1.84 |
| CYS | 2.8 | 2.4 | 0 | — | — | — |
| VAL [#] | 6.9 | 8.6 | 0 | 7.44 | 8.0 | 0.56 |
| MET [#] | 1.7 | 1.4 | 0 | 1.74 | 3.2 | 1.46 |
| TRP [#] | 1.1 | 1.5 | 0 | — | — | — |
| PHE [#] | 3.5 | 3.6 | 0 | 3.68 | 3.0 | -0.68 |
| ILE [#] | 4.6 | 4.5 | 0 | 4.80 | 8.0 | 3.19 |
| LEU [#] | 7.5 | 6.9 | 0 | 7.78 | 9.7 | 1.92 |
| LYS [#] | 7.0 | 7.0 | 0 | 7.33 | 6.9 | -0.43 |
| PRO | 4.6 | 6.5 | 0 | — | — | — |

Amino acid composition of protein and MAb are from literature^[12] and^[13]. Values of r_n , r_b , r_c and r_{nc} are given in $10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$. [#] : The essential amino acid.

2.3 可直接计算的代谢流量

根据以上的分析和计算结果可以直接计算附录 I 的方程 22~32 的代谢流量,包括葡萄糖消耗,乳酸生成和必需氨基酸除生成蛋白质和抗体外进入其它代谢途径的代谢流量。附录 I 方程 22 和 23 可根据葡萄糖消耗速率和乳酸生成速率直接计算。对于必需氨基酸可根据碳平衡计算,如方程 24 中亮氨酸的代谢流量为:

$$F_{24} = r_{cLEU} - r_{bLEU}$$

(5)

r_{cLEU} 为从培养基中的吸收速率, r_{bLEU} 为用于生成生物量和抗体的代谢流量, r_{cLEU} 和 r_{bLEU} 取自表 2,如此直接计算的代谢流量列于表 3 中。

表 3 直接计算的代谢流量分布

Table 3 Calculated metabolic fluxes

| No. | Equation | Metabolic fluxes ($10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) |
|-----|--|---|
| 22 | GLC→G6P | 290 |
| 23 | PYR→LAC | 500 |
| 24 | LEU + αKG→3AcCoA | 1.92 |
| 25 | ILE + αKG→SuCoA + AcCoA + GLU | 3.19 |
| 26 | LYS + αKG→2AcCoA + GLU | -0.42 |
| 27 | THR + αKG→SuCoA + GLU | 0.37 |
| 28 | VAL + αKG→SuCoA + GLU | 0.56 |
| 29 | ARG + αKG→2GLU | 0.32 |
| 30 | HIS→GLU + NH ₄ ⁺ | 0.88 |
| 31 | MET→SuCoA + NH ₄ ⁺ | 1.46 |
| 32 | PHE + αKG→FUM + 2AcCoA + GLU | -0.68 |

2.4 根据代谢流量平衡模型计算的代谢平衡方程

附录 I 中方程 1~21 涉及非必需氨基酸 (NAA) 代谢、糖酵解、磷酸戊糖途径、TCA 循环和苹果酸穿梭等代谢途径,它们的代谢流量用代谢流量平衡模型计算^[7]:

$$S \cdot v = b \tag{6}$$

$S_{(m \times n)}$ 是代谢网络的化学计量系数矩阵,其元素 S_{ij} 是第 i 个化合物在第 j 个反应中的计量系数, S_{ij} 为正、负或零分别表示第 j 个反应产生、消耗或不涉及第 i 个化合物; v 是代谢流量矢量; b 是细胞代谢物质净产生的速率矢量,其中对应于底物、中间代谢物和产物的元素值分别为负、零和正。

根据附录 I 中的化学计量方程 1~21 列出 S , 方程中涉及的代谢物质净产生速度矢量 b 根据质量平衡计算,其计算公式和结果在表 4 中。本文 S 矩阵中 m 为 20, n 为 21,方程组为“欠定”方程组 (Underdetermined Equation), v 矢量有多个解。Bonarius 报道用最小欧氏范数求得矢量 v 的分布和用放射性底物标记实验结果最为接近^[10]。本文用 MATLAB 最小欧氏范数求解“欠定”方程组的方法计算代谢流量分布,结果列于表 5 中。

3 代谢流量分析

3.1 葡萄糖代谢流量分析

葡萄糖有 3 个主要的代谢途径,即进入磷酸戊糖途径和 TCA 循环及经过糖酵解途径生成多糖和乳酸。Miller 等在连续培养时流入反应器的葡萄糖浓度为 $13.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,葡萄糖浓度很高^[2]。表 6 表明绝大部分葡萄糖通过糖酵解途径直接转化为乳酸,而进入磷酸戊糖途径和 TCA 循环的葡萄糖很少。生成多糖所消耗的葡萄糖占葡萄糖总消耗的 2.1%。通过磷酸戊糖途径生成核糖和 NADPH,然后生成核酸的葡萄糖占葡萄糖消耗的 1.1%,这一结果表明体外培养的动物细胞磷酸戊糖途径很不活跃,这与 Sharfstein 等的研究结果相似^[6]。磷酸戊糖途径在细胞中主要有两个重要作用,一是生成核糖用于核酸的合成,另一个是生成还原性 NADPH。从代谢流量分析看,体外培养的动物细胞磷酸戊糖途径的主要作用是生成核糖,而较少用于合成还原性 NADPH。葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸后,经丙酮酸脱氢酶催化生成 AcCoA,主要进一步生成了脂肪酸,占葡萄糖总消耗的 7.5%,经丙酮酸而进入

表 4 代谢物质的生成速率

Table 4 Motebolites production rates

| Equation | Production rates ($10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) |
|---|---|
| $r(\text{G6P}) = -F_{22}(\text{GLC}) + F_{33}(\text{C})$ | -283.85 |
| $r(\text{F6P}) = 0$ | 0 |
| $r(\text{GAP}) = 0$ | 0 |
| $r(\text{3PG}) = 0$ | 0 |
| $r(\text{PYR}) = F_{23}(\text{LAC})$ | 500.00 |
| $r(\text{R5P}) = F_{36}(\text{RNA}) + F_{37}(\text{DNA})$ | 3.19 |
| $r(\text{AcCoA}) = -3F_{24}(\text{LEU}) - F_{25}(\text{IEL}) - 2F_{26}(\text{LYS}) - 2F_{32}(\text{PHE}) + 9F_{33}(\text{Lipid})$ | 34.90 |
| $r(\text{OAA}) = 0$ | 0 |
| $r(\text{CIT}) = 0$ | 0 |
| $r(\alpha\text{KG}) = F_{24}(\text{LEU}) + 2F_{25}(\text{ILE}) + F_{26}(\text{LYS}) + F_{27}(\text{THR}) + F_{28}(\text{VAL}) + F_{29}(\text{ARG}) + F_{32}(\text{PHE})$ | 9.56 |
| $r(\text{SuCoA}) = -F_{25}(\text{ILE}) - F_{27}(\text{THR}) - F_{28}(\text{VAL}) - F_{31}(\text{MET})$ | -5.58 |
| $r(\text{FUM}) = -F_{32}(\text{PHE}) - 0.79F_{36}(\text{RNA}) - 0.8F_{37}(\text{DNA})$ | -2.54 |
| $r(\text{MAL}) = 0$ | 0 |
| $r(\text{GLU}) = -F_{25}(\text{ILE}) - F_{26}(\text{LYS}) - F_{27}(\text{THR}) - F_{28}(\text{VAL}) - 2F_{29}(\text{ARG}) - F_{30}(\text{HIS}) - F_{32}(\text{PHE}) - r_{\text{nc, GLU}}$ | -2.09 |
| $r(\text{SER}) = -r_{\text{nc, SER}}$ | 3.66 |
| $r(\text{ALA}) = -r_{\text{nc, ALA}}$ | 49.10 |
| $r(\text{ASN}) = -r_{\text{nc, ASN}}$ | 1.48 |
| $r(\text{ASP}) = -r_{\text{nc, ASP}}$ | 7.51 |
| $r(\text{GLN}) = -r_{\text{nc, GLN}}$ | -89.65 |
| $r(\text{GLY}) = -r_{\text{nc, GLY}}$ | 13.24 |

表 5 代谢流量平衡模型估计的代谢流量分布

Table 5 Estimated metabolic fluxes by flux balance model

| No. | Equation | Estimated metabolic fluxes ($10^{-4}\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) |
|-----|--------------------------------------|--|
| 1 | G6P→F6P | 280.66 |
| 2 | F6P+ATP→2GAP | 280.66 |
| 3 | GAP→3PG+NADH+ATP | 561.32 |
| 4 | 3PG→PYR+ATP | 548.48 |
| 5 | G6P→R5P+2NADPH | 3.19 |
| 6 | R5P→0.67F6P+0.33GAP | 0 |
| 7 | PYR+CoA→AcCoA+NADH | 80.70 |
| 8 | AcCoA+OAA→CIT+CoA | 45.80 |
| 9 | CIT→αKG+NADH | 45.80 |
| 10 | αKG+CoA→SuCoA+NADH | 127.99 |
| 11 | SuCoA→FUM+ATP+FADH ₂ | 133.57 |
| 12 | FUM→MAL | 136.11 |
| 13 | MAL→OAA+MADH | 54.79 |
| 14 | GLU→αKG+NADH | 20.81 |
| 15 | MAL→PYR+CO ₂ | 81.32 |
| 16 | 3PG+GLU→SER+αKG+NADH | 12.83 |
| 17 | GLU+PYR→αKG+ALA | 49.10 |
| 18 | GLU+OAA→αKG+ASP | 8.99 |
| 19 | GLN+ASP+2ATP→ASN+GLU | 1.48 |
| 20 | GLN→GLU+NH ₄ ⁺ | 88.18 |
| 21 | SER→GLY | 13.24 |

TCA 循环的很少,仅占 0.83%。另有一小部分葡萄糖经 3PG 生成了丝氨酸和甘氨酸,其中部分用于核酸的合成。

3.2 谷氨酰胺代谢流量分析

谷氨酰胺是体外动物细胞培养中重要的代谢营养物,它不仅为细胞生长提供氮源,而且为细胞生长提供碳源和能量。

谷氨酰胺中氮分布:

谷氨酰胺首先为核酸中碱基的合成提供氮源。谷氨酰胺中含有两个氮原子,只有氨基上的氮原子用于碱基的合成,脱去氨基后,剩余的氨基和碳骨架生成谷氨酸^[14]。在细胞中,谷氨酰胺主要通过谷氨酰胺酶脱氨生成氨和谷氨酸进入代谢途径,生成的谷氨酸有多种代谢途径。谷氨酸可经谷氨酸脱氢酶催化脱氢生成 α-酮戊二酸和氨,还可由转氨酶催化途径生成 α-酮戊二酸和非必需氨基酸如丙氨酸、天冬氨酸等,生成的 α-酮戊二酸进入 TCA 循环^[15]。

代谢流量分析表明,谷氨酰胺经过谷氨酰胺酶和谷氨酸脱氢酶生成的氨占谷氨酰胺总氮量的 54.5%,通过各种转氨途径生成非必需氨基酸,包括

表 6 谷氨酰胺和葡萄糖的质量平衡

Table 6 Material balances on glutamine and glucose

| | Metabolic ($10^{-12}\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) | Fluxes % |
|-------------------|--|-------------|
| Glutamine balance | | |
| Total nitrogen | 2 | |
| Protein and Mab* | 0.086 | 4.28 |
| NAA | 0.778 | 38.16 |
| DNA | 0.012 | 0.60 |
| RNA | 0.048 | 2.40 |
| NH ₃ | 1.090 | 54.50 |
| Carbon Skeleton | | |
| Protein and MAb* | 0.043 | 4.28 |
| NAA | 0.616 | 61.60 |
| TCA cycle | 0.341 | 34.10 |
| Glucose balance | | |
| Total | 2.90 | |
| Carbohydrates | 0.062 | 2.10 |
| Lipids | 0.220 | 7.50 |
| DNA and RNA | 0.032 | 1.10 |
| Ser | 0.037 | 0.63 |
| Gly | 0.046 | 1.58 |
| Lac | 2.500 | 86.20 |
| TCA cycle | 0.024 | 0.83 |

* This is the amount of glutamine that is directly incorporated into proteins and MAb, the amount of glutamine carbon skeleton or nitrogen via NAAs is not included in this term

丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和谷氨酸等,占谷氨酰胺总氮量的 38.16%,而直接生成胞内蛋白质和抗体只占 4.28%。Miller 等连续培养杂交瘤细胞所用谷氨酰胺浓度较高,为 $2.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2],所以大量生成氨^[15]。

谷氨酰胺碳分布:

表 6 代谢流量分布表明,谷氨酰胺的碳骨架有三条代谢途径,一是进入 TCA 循环,二是通过转氨途径生成非必需氨基酸,还有部分直接合成胞内蛋白和抗体。直接合成蛋白质和抗体占 4.28%。谷氨酰胺由 α-酮戊二酸进入 TCA 循环后只有少部分被完全氧化,大部分通过苹果酸和草酰乙酸流出 TCA 循环生成丙氨酸、天冬氨酸和其它非必需氨基酸,占 61.6%,剩余的碳骨架为进入 TCA 循环并被氧化的量,占 34.1%。

4 结 论

本文通过对连续培养的杂交瘤细胞代谢分析表明(1)在高葡萄糖浓度时($13.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),约 36.2%的葡萄糖生成乳酸,7.5%的葡萄糖通过 A

CoA 生成脂类。葡萄糖进入磷酸戊糖途径主要作用是生成核糖 ,而很少生成还原性 NADPH。葡萄糖直接进入 TCA 循环的量很少 ,仅占 0.83%。另有少量的葡萄糖生成丝氨酸和甘氨酸 ,部分用于核酸的合成 (2)培养基中谷氨酰胺含量高时(2.6 mmol ·L⁻¹) 54.5% 的谷氨酰胺中的氮通过氨直接离开细胞 ,另有 38.16% 的氮合成非必需氨基酸(NAA)。谷氨酰胺另一个重要作用是为核酸(DNA 和 RNA)的合成提供氮源 ,约占谷氨酰胺氮源的 3%。谷氨酰胺的碳骨架主要合成了非必需氨基酸 ,占 61.6% ,另有 34.1% 的谷氨酰胺进入了 TCA 循环。

在细胞培养过程中培养基中营养的缺乏和毒性代谢副产物的积累都会导致细胞死亡。因此必须合理地设计培养基成分 ,才能使营养物质既能满足细胞的需要 ,又不会因为过量而生成大量的副产物影响细胞生长。Xie 等应用化学计量方程计算出细胞生长和生成抗体的营养需求 ,进而设计出合理的培养基 ,最终大大提高了细胞密度和抗体产量^[16]。本文应用代谢流量平衡分析的方法 ,能够定量计算细胞主要代谢网络的代谢流量分布 ,特别是营养成分 ,合理设计培养基 ,调控细胞代谢途径 ,并能够在胞内水平上深刻理解细胞生物化学反应 ,从而提高动物细胞培养的生产效率。

附 录

I 代谢计量平衡方程

- (1)G6P→F6P
- (2)F6P + ATP→2GAP
- (3)GAP→3PG + NADH + ATP
- (4)BPG→PYR + ATP
- (5)G6P→R5P + 2NADPH
- (6)R5P→0.67F6P + 0.33GAP
- (7)PYR + CoA→AcCoA + NADH
- (8)AcCoA + OAA→CIT + CoA
- (9)CIT→αKG + NADH
- (10)αKG + CoA→SuCoA + NADH
- (11)SuCoA→FUM + ATP + FADH₂
- (12)FUM→MAL
- (13)MAL→OAA + NADH
- (14)GLU→αKG + NH₄⁺ + NADH
- (15)MAL→PYR + CO₂
- (16)BPG + GLU→SER + αKG + NADH
- (17)GLU + PYR→αKG + ALA
- (18)GLU + OAA→αKG + ASP
- (19)GLN + SAP + 2ATP→ASN + GLU
- (20)GLN→GLU + NH₄⁺
- (21)SER→GLY

- (22)GLC + ATP→G6P
- (23)PYR + NADH→LAC
- (24)LEU + αKG + 2ATP→3AcCoA + 2NADH + FADH₂
- (25)ILE + ATP + 2CoA + αKG→SuCoA + AcCoA + 3NADH + FADH₂ + GLU
- (26)LYS + CoA + αKG→2AcCoA + 3NADH + FADH₂ + 2CO₂ + GLU
- (27)THR + ATP + CoA + αKG→SuCoA + NADH + GLU
- (28)VAL + αKG + ATP + CoA→SuCoA + 3NADH + FADH₂ + CO₂ + GLU
- (29)ARG + αKG→2GLU
- (30)HIS→GLU + NH₄⁺
- (31)MET + 2ATP→SuCoA + NH₄⁺ + NADH
- (32)PHE + αKG→FUM + 2AcCoA + GLU

II 胞内大分子物质和抗体的化学计量平衡方程

多糖 Bonarius 认为胞内大部分多糖用于生成糖蛋白 ,并主要由 6-磷酸葡萄糖生成^[10]。生成多糖的化学计量平衡方程为 :

G6P + 3.46ATP→C (33)

蛋白质(抗体) :蛋白质(抗体)由 20 种氨基酸通过肽键聚合而成。在真核细胞中每延伸一个氨基酸残基需要 4 个 ATP^[17] ,蛋白质(抗体)的代谢流量平衡方程用下式表示 :

Amino acid + 4ATP→Protein (34)

脂类 :细胞中的脂类包括脂肪、磷脂和类固醇。磷脂和类固醇是细胞膜的重要成分。脂肪和磷脂的合成前体是甘油和脂肪酸 ,主要碳骨架来自于脂肪酸。Banarius 以油酸(C18)为脂肪酸的代表 ,实验数据表明大于和小于 18 个碳的脂肪酸数量大致相等^[10] ,所以本文以油酸代表脂肪酸。为了简化方程 ,本文没有对类固醇单独计算 ,而是用生成脂肪酸表示生成脂类的化学计量平衡方程 ,如(35)式。由于类固醇碳原子数大于 18 ,所以计算值要比实际值偏低。

9AcCoA + 8ATP + 16NADPH→Lipid (35)

核酸 :为了简化代谢网络 ,根据合成每种核苷酸的化学计量平衡方程^[14]和 DNA、RNA 的核苷酸组成^[10] ,本文将 DNA 和 RNA 的生物合成分别用一个化学计量平衡方程表示 :

R5P + 1.3ASP + 1.9GLN + 0.49GLY + 8.9ATP + 0.35SER→0.79FUM + 1.7GLU + RNA + 0.71NADH + 0.015CO₂ (36)

R5P + 1.3ASP + 0.3SER + 1.9GLN + 0.2GLY + 1.2NADPH→0.8FUM + 1.7GLU + DNA + 0.7NADH (37)

代谢网络中没有进一步考虑核苷酸的降解。由于 RNA 的迅速降解 ,RNA 的实际合成速率要高于通过细胞组分计算的合成速率。但是 RNA 降解后所形成的核苷酸可以重新生成核酸 ,假设降解的核苷酸又全部生成 RNA ,而没有进入其他代谢途径 ,所以用(36)式表示 ,这比实际值偏小。

III 本文中所用符号代表的含义

- b 不能直接计算的代谢网络中代谢物质产生的速率矢量(m)
- b_i 合成胞内大分子 i 的代谢流量(10⁻¹⁴mol · cell⁻¹ · d⁻¹)
- b_{MAb} 合成抗体的代谢流量(10⁻¹⁴mol · cell⁻¹ · d⁻¹)
- b_p 合成胞内蛋白质的代谢流量(10⁻¹⁴mol · cell⁻¹ · d⁻¹)
- C 多糖(10⁻¹¹g · cell⁻¹)
- DCW 细胞干重(10⁻¹¹g · cell⁻¹)
- DW_i 胞内大分子 i 的干重(10⁻¹¹g · cell⁻¹)
- MW_i 胞内大分子 i 的组成单体的摩尔质量(mol⁻¹)

| | |
|--|---|
| MAb 抗体($10^{-11}\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}$) | v 代谢流量矢量(n) |
| P 蛋白质($10^{-11}\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}$) | x_i 胞内大分子 i 在细胞中的摩尔数($10^{-14}\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}$) |
| r_{bi} 氨基酸 i 用于生物合成和生成抗体的代谢流量($10^{-14}\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) | θ_i^{MAb} 氨基酸 i 在抗体中的组成(%) |
| r_{ci} 氨基酸 i 的比消耗速率($10^{-14}\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) | θ_i^{P} 氨基酸 i 在蛋白质中的组成(%) |
| r_{nci} 氨基酸 i 的净代谢流量($10^{-14}\text{mol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) | μ 细胞比生长速率(d^{-1}) |
| S 代谢网络的化学计量系数矩阵($m\times n$) | 其它代谢中间物质略。 |

参 考 文 献

[1] Miller W M ,Blanch H W ,Wilke C R. *Biotechnol Bioeng* ,1988 ,**32** :947~865

[2] Miller W M ,Wilke C R ,Blanch H W. *Biotechnol Bioeng* ,1989 ,**33** :487~499

[3] Ozturk S S ,Riley M R. *Biotechnol Bioeng* ,1992 ,**39** :418~431

[4] Kurokawa H ,Ogawa T ,Kamihira M *et al.* *J Ferment Biogng* ,1993 ,**76** :128~133

[5] Fitzpatrick L ,Jenkins H A ,Butler M. *Appl Biochem Biotechnol* ,1993 ,**43** :93~116

[6] Sharfstein S T ,Tucker S N ,Mancuso A ,Blanch H W ,Clark D S. *Biotechnol Bioeng* ,1994 ,**43** :1059~1074

[7] Varma A ,Palsson B O. *Bio/Technology* ,1994 ,**12** :994~998

[8] Savinell J M ,Palsson B O. *J Theor Biol* ,1992 ,**154** :421~454

[9] Bonarius H P J ,Ozemre A ,Timmerarends B *et al.* In :*Animal Cell Technology* ,Netherland :Kluwer Academic Publisher ,1997 :633~638

[10] Bonarius H P J ,Hatzimanikatis V ,Meesters K P H. *Biotechnol Bioeng* ,1996 ,**50** :299~318

[11] Xie L Z ,Wang D I C. *Cytotechnology* ,1994 ,**15** :17~29

[12] Creighton T E. *Proteins Structures and Molecular Principles* ,San Francisco :W H Freeman ,1984

[13] Edelman G M ,Cunningham B A ,Gall W E *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* ,1969 ,**63** :78~85

[14] Xie LZ ,Wang D I C. *Biotechnol Bioeng* ,1996 ,**52** :579~590

[15] Glacken M W. *Bio/technology* ,1988 ,**6** :1041~1050

[16] Xie L Z ,Wang D I C. *Biotechnol Bioeng* ,1996 ,**51** :725~729

[17] Xie L Z ,Wang D I C. *Biotechnol Bioeng* ,1996 ,**52** :591~601

Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells

GAO Hong-Liang CONG Wei OUYANG Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering ,Institute of Chemical Metallurgy ,The Chinese Academy of Sicences ,Beijing 100080)

Abstract Metabolic flux distribution of hybridoma cells in continuous culture with $13.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose and $2.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamine using metabolic flux balance model was analyzed quantitatively in this paper. Results showed that the 86.2% of glucose was consumed for lactate and 7.5% for lipids 0.83% of glucose was consumed in the TCA cycle. The 3% of nitrogen in glutamine was used for synthesis of nucleotide 54.5% of nitrogen was consumed for ammonia and 38.2% was used for synthesis of nonessential amino acid(NAA). The 61.6% of carbon skeleton of glutamine was consumed for NAA and 34.1% entered the TCA cycle.

Key words Metabolic flux analysis ,metabolic network ,hybridoma cells