

通过高表达 Igf1/Bcl-2 或 Bcl-2/Cyclin E 基因组合 使 CHO 细胞适于在无蛋白培养基中抗凋亡培养

来大志 翁少洁 齐连权 于长明 付玲 于婷 陈薇*

(北京微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘 要 哺乳动物细胞表达系统是生产重组蛋白药物最常用的表达系统。但在无蛋白培养基中,哺乳动物细胞生长活力差,且容易发生细胞凋亡,因而难以大规模培养。为解决此问题,应用双顺反子表达载体在 CHO-dhfr⁻ 细胞中同时表达 Igf-1/Bcl-2 或 Bcl-2/Cyclin E 基因组合,通过 Bcl-2 使细胞获得抗凋亡能力,通过 Igf-1 或 Cyclin E 促进细胞生长分裂,使细胞获得在无蛋白培养基中生长的能力。以上述基因组合转染 CHO-dhfr⁻ 细胞,应用 Western blot 从 G418 抗性克隆中分别筛选到 Bcl-2 高表达克隆若干个,对其中表达 Bcl-2 最高的 CHO-IB3 和 CHO-BC1 做进一步 Western blot 和流式细胞分析,确认此两个细胞株分别高表达 Igf-1/Bcl-2 和 Bcl-2/Cyclin E 基因组合。分别通过撤去血清和加入放线菌素 D 诱导细胞凋亡,并以流式细胞术和 DNA Ladder 法检测细胞凋亡,证明 CHO-IB3 和 CHO-BC1 均具有较强的抗细胞凋亡能力。MTT 法证明两个细胞株在不含血清的 IMDM 培养基中的增殖活力显著高于 CHO-dhfr⁻ 对照细胞。在细胞培养瓶中的连续培养实验表明,CHO-IB3 和 CHO-BC1 在本实验室设计的 IMEM 无蛋白培养基中的生长速度和活细胞数显著高于 CHO-dhfr⁻ 对照细胞。提示此两个细胞系能够在无血清培养基中抗凋亡高活力生长,适于作为生物工程宿主细胞。

关键词 CHO 细胞,细胞培养,细胞凋亡,细胞周期,无蛋白培养基

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0066-07

在大规模培养哺乳动物细胞生产重组蛋白时,无蛋白培养基由于具有化学成分明确、批次间差异小、排除了可能由血清带来的病毒、支原体等污染物以及下游蛋白纯化容易等优点,已经取代了有血清培养基,成为大规模细胞培养的首选培养基。但由于没有血清提供生长因子和其它必需成分,细胞的生长活力很差,生长缓慢,且容易发生细胞凋亡。胰岛素样生长因子(Igf-1)是一种与胰岛素类似的生长因子,可以通过上调细胞核内 Cyclin D1 的浓度而促进细胞的生长分裂。细胞周期蛋白 E(Cyclin E)是一类 G1 期蛋白,在 G1 期表达持续增高,当达到一定量时,便推动细胞周期进入 S 期。所以 Igf-1 和 Cyclin E 都是细胞生长分裂的促进蛋白。本实验中我们试图通过使细胞自身高表达 Igf-1 或 Cyclin E 而使细胞获得在无蛋白培养基中高活力生长的能力。为了抑制细胞凋亡,我们通过双顺反子表达载体在细胞中同时高表达 Bcl-2 蛋白而实现此目标。Bcl-2 是一种线粒体膜整合蛋白,通过维护线粒体膜的完

整性,阻止细胞色素 c(Cyt c)的释放,抑制 Caspases 的激活,而最终抑制细胞凋亡。Bcl-2 的抗凋亡能力在多种生物工程宿主细胞中均得到证明。本实验中我们试图通过同时表达 Igf-1/Bcl-2 或 Bcl-2/Cyclin E 基因组合,而使细胞同时具有可以在无蛋白培养基中生长和抗细胞凋亡的能力。

1 材料和方法

1.1 基因克隆

应用 RNAgents[®] Total RNA Isolation System (Promega) 分别从 CHO 细胞和 BALB/c 小鼠的肝脏中提取总 RNA,并应用 SuperScript[™] Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) 把 RNA 反转录成 cDNA。

Bcl-2 基因的克隆:根据已发表序列^[1]设计套式 PCR 引物。外引物 pBcl05/pBcl03 和内引物 pBcl15sma/pBcl13xba 的序列见表 1。以外引物和内引物扩增 CHO cDNA 各 30 cycles,退火温度分别是

55℃和 59℃。产物进行琼脂糖凝胶电泳,从胶上切下约 710bp 的片段,连接入 pGEM-T 载体,测序。

Cyclin E 的克隆 比较人、大鼠和小鼠的 Cyclin E 序列(GenBank 序列号: M74093、D14015、X75888) 根据共有序列,设计外引物 pCneOF/pCneOR 和内引物 pCneIF/pCneIR,序列见表 1。以外引物和内引物扩增 CHO cDNA 各 30 cycles,退火温度分别是 57℃和 55℃。产物进行琼脂糖凝胶电泳,从胶上切下约 1.2kb 的片段,连接入 pGEM-T 载体,测序。

Igf-1 的克隆 根据小鼠 Igf-1 序列(GenBank numbers: X04482),设计外引物 pIgfOF/pIgfOR 和内引物 pIgfIF/pIgfIR,序列见表 1。以外引物和内引物扩增鼠肝 cDNA 各 30 cycles,退火温度分别是 59℃和 55℃。产物进行琼脂糖凝胶电泳,从胶上切下约 400bp 的片段,连接入 pGEM-T 载体,测序。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this work

Name	Sequence
pBelo5	TGTGGGGCCGGACTCAGG
pBelo3	GCATATTTTGGGGAGCAGGTC
pBeli5sma	TAT CCCGGGCCACCATGGCTCAAGCTGGGAGAAC
pBeli3xba	GCG TCTAGATTATCACTTGTGGCCAGGTAGG
pCneOF	TTCGGTCTGAGTCCAAAGTC
pCneOR	CGCGTACCCTATCAACAGCAACC
pCneIF	CCATGCCAAGGGAGAGG
pCneIR	TTAGCAGCTTCTGGAGC
pIgfOF	TTGGGGAAAGGATGGACTCTAAC
pIgfOR	GCGGTGACGTGGCATTTTCTGT
pIgfIF	ATGTCGTCTTCACATCTC
pIgfIR	CTACATTCTGTAGTCTTG
pBelFBt	CCACCATGGCTCAAGCTGGGAG
pBelRXba	GCG TCTAGATCACTTGTGGCCAGGTAG
pCE6FBt	CCACCATGCCAAGGGAGAGGAAG
pCE6RXba	GCG TCTAGATCACTTGTCTCTCTC
pIGXhoF	GT CTCGAGCCACCATGTCGTCTTCACATC
pIGSaXbR	CC GTCGACCTACATTCTGTAGGTC
pBelixhof	TAT CTCGAGCCACCATGGCTCAAGCTGG
pBelisalr	GCG GTCGACTTATCACTTGTGGCCAGG

1.2 载体构建

哺乳动物细胞双顺反子表达载体 pCdhf5 由本室构建^[2]。从该载体中以 *Xho* I / *Not* I 切下 IRES 序列及其两侧多克隆位点,连接进以相应限制酶切割过的 pCI-neo 中,即为 pCI-neo-IRES,用于本实验双表达 Bcl-2/Cyclin E 和 Igf-1/Bcl-2。用高保真 Pyrobest 酶以引物对 pBelFBt/pBelRXba 和 pCE6FBt/pCE6RXba

(序列见表 1)分别从经测序正确的 T-载体中扩增出 Bcl-2 基因和 Cyclin E 基因。产物经 *Xba* I 酶切后,均插入 pCI-neo-IRES 的 *Sma* I / *Xba* I 位点,分别命名为 pCI-NI-B 和 pCI-NI-C。酶切和序列测定加以验证。两载体均以 *Xho* I 和 *Sal* I 酶切,并用牛肠碱性磷酸酶去磷。用高保真 Pyrobest 酶以引物对 pIGXhoF/pIGSaXbR 和 pBelixhof/pBelisalr(序列见表 1)分别从经测序正确的 T-载体中扩增出 Igf-1 基因和 Bcl-2 基因。用 *Xho* I 和 *Sal* I 酶切,回收片段,并分别与经 *Xho* I 和 *Sal* I 酶切并去磷的 pCI-NI-B 和 pCI-NI-C 载体连接,得 pCI-NI-IB 和 pCI-NI-BC。酶切和序列测定对载体加以验证(图 1)。

1.3 细胞转染

应用 LipofectamineTM 2000 Reagent 把 pCI-NI-IB 和 pCI-NI-BC 分别转染于 CHO-dhfr⁻ 细胞中,根据试剂说明书操作。以 800 μ g/mL G418 筛选阳性克隆。各取 20 个 G418 阳性克隆做放大培养,直至长满 T25 培养瓶。液氮冻存保种。

1.4 Western blot

Bcl-2 是线粒体膜或核外膜整合蛋白,提取全细胞蛋白。每个克隆仔细计数 10⁶ 个细胞,悬于 300 μ L 裂解液(TBS, pH 7.2; 1% NP-40; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS; 0.5mmol/L PMSF; 0.1mol/L DTT) 中冰浴 30min。12 000g 于 4℃离心 10min,上清加入 100 μ L 4 \times 加样缓冲液(200mmol/L Tris 6.8; 8% SDS; 0.4% 溴酚蓝; 40% 甘油),100℃变性 5min,离心。各取 25 μ L 样品于 12% SDS-PAGE 胶中电泳。电泳结束后,将胶内蛋白以 30V 于 4℃过夜电转于 PVDF 膜(Immobilon-P, Millipore)上。转膜缓冲液为含 20% 甲醇的 SDS 电泳缓冲液。PVDF 膜以 5% 脱脂奶粉封闭 2h,兔抗 Bcl-2 多抗和碱性磷酸酶标记羊抗兔二抗各反应 4h,而后以 NBT/BCIP 底物显色。

Cyclin E 是核内蛋白,需制备核内蛋白提取物。计数 4 \times 10⁷ 个细胞,PBS 洗 2 遍,离心收集细胞,加入 700 μ L 预冷的 Buffer A(10mmol/L HEPES-KOH pH 7.9 于 4℃; 1.5mmol/L MgCl₂; 10mmol/L KCl),冰上低渗膨胀 15min。用 1mL 的针管,装上国标 5 号针头,抽入 Buffer A,再针头朝上将其推出,使针管内无空气。缓缓抽入细胞悬液,再突然打出,反复 10 次,破碎细胞。12 000g 4℃离心 1min,沉淀细胞核。去上清,细胞核沉淀加入 200 μ L 裂解液重悬,冰浴 30min。12 000g 4℃离心 10min。上清即为细胞核内蛋白提取物。电泳、转膜及染色方法同上。

① 中国科学院长春应用化学研究所, 2006 年 10 月 17 日收稿

养瓶中,直至约 90%汇片。弃去培养基, PBS 洗涤 1 遍,加入 20mL 不含血清的 IMDM/HT(0.1mmol/L Hypoxanthine, 0.016mmol/L Thymidine)培养基,继续培养 4d。取 5 瓶细胞培养基共 100mL, 20 000g 离心 20min, 去除细胞碎片。上清用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤,而后真空冷冻干燥浓缩至约 50mL。4 $^{\circ}$ C 对 0.02mmol/L 磷酸盐缓冲液(PB)透析过夜。再次真空冷冻干燥浓缩至约 10mL,再次对水透析。将透析后样品真空冻干成粉末,而后溶于 300 μ L 水中。电泳、转膜及染色方法同上。

所用抗体兔抗 Bcl-2 多抗(sc-492),山羊抗 Cyclin E 多抗(sc-9568)和山羊抗 Igf-1 多抗(sc-1422)购自 Santa Cruz Biotech;碱性磷酸酶标记抗兔和抗羊二抗购自 Promega。碱性磷酸酶 NBT/BCIP 底物 Western Blue[®] 购自 Promega。

1.5 流式细胞术分析基因表达

分析 Bcl-2 和 Cyclin E 时,消化下一瓶 T25 细胞, PBS 洗涤,离心收集细胞。用 3mL PBS 将细胞悬起,加入 1mL 4%多聚甲醛,混匀,室温 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。离心收集细胞。细胞重悬于 3mL 穿透缓冲液(0.15% Triton X-100, 0.1% BSA, PBS),室温 20min。离心收集细胞。细胞悬于 200 μ L 染色缓冲液(1% BSA, 0.005% Tween-20, 0.1% sodium azide, PBS),加入一抗(同 1.4),4 $^{\circ}$ C 暗处染色过夜。加染色液至 3mL,离心。再次以染色液洗涤 2 遍。细胞悬于 200 μ L 染色缓冲液,加入相应 FITC 标记的抗羊或抗兔二抗(中山生物),4 $^{\circ}$ C 暗处染色 4h。加染色液至 3mL,离心。再次以 PBS 洗涤 2 次。悬于 2mL PBS,上机分析。

1.6 细胞凋亡检测

通过流式细胞术检测外化磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)而检测细胞凋亡。磷脂酰丝氨酸是细胞膜的正常组分,位于细胞膜的内侧。PS 与 Annexin V 有很强的结合能力。当细胞凋亡发生时,细胞膜外翻,而使 PS 暴露于细胞膜外。外露的 PS 可以与 EGFP 标记的 Annexin V(Clontech)紧密结合,从而应用流式细胞仪可以把凋亡细胞检测出来。根据 Clontech 说明书操作。

通过检测片段化 DNA 而检测细胞凋亡。细胞染色体片段化是细胞凋亡的一个典型特征。片段化的 DNA 可以通过凝胶电泳检测出来。以 Qiagen 质粒提取试剂盒从 10⁶ 个待检细胞中提取小片段 DNA,并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段,紫外灯下观察拍照。

1.7 细胞增殖活力检测

培养细胞弃去培养基,加入配制于无血清培养基中的 MTT 溶液(0.5~1mg/mL),37 $^{\circ}$ C 继续培养 4h。弃去 MTT 溶液,染料沉淀溶于异丙醇中,测量 560nm 的光吸收。

1.8 细胞计数

应用血球计数板对细胞进行计数,通过台盼蓝排除染色法区别活细胞和死细胞。

2 结 果

2.1 基因克隆和载体构建

中国仓鼠 Bcl-2 基因、中国仓鼠 Cyclin E 基因和小鼠 Igf-1 基因均获得成功克隆,其中 Cyclin E 为首次在中国仓鼠中得到克隆。三个基因序列都已注册 GenBank,序列号分别是: AF404339、AY046321 和 AF440694。双表达载体 pCI-NI-IB 和 pCI-NI-BC 经酶切和序列测定证明为正确。

2.2 外源基因高表达克隆的筛选

取转染了双表达载体 pCI-NI-IB 和 pCI-NI-BC 的 G418 抗性克隆各 20 个,Western blot 检测 Bcl-2 的表达量,选择出表达 Bcl-2 最高的克隆各 3 个,即 IB3、IB4、IB5 和 BC1、BC2、BC7。结果如图 2A 和图 2B 所示。取表达 Bcl-2 最高的 IB3 和 BC1 细胞株做进一步分析。用 Western blot 进一步分别检测两个细胞株 Igf-1 和 Cyclin E 的表达量,结果如图 2C 和图 2D 所示,Igf-1 和 Cyclin E 的表达量均显著高于对照细胞株。进一步用流式细胞术分析 IB3 和 BC1 细胞中 Bcl-2 的表达量及 BC1 细胞中 Cyclin E 表达,确认 IB3 和 BC1 分别高表达 Bcl-2 和 Cyclin E(图 3A 和图 3B)。

2.3 IB3 和 BC1 抗凋亡能力检测

IB3、BC1 连同 CHO-dhfr⁻ 对照细胞株均以 IMDM/HT 无血清培养基培养 24h,或在 IMDM/HT/10% FBS 培养基中加入终浓度为 0.5 μ g/mL 的放线菌素 D(Actinomycin D)培养细胞 24h,对细胞凋亡进行诱导。应用 DNA Ladder 法或流式细胞术对细胞凋亡进行检测。结果如图 4 和图 5 所示。无论撤去血清还是加入放线菌素 D 诱导细胞凋亡,IB3 和 BC1 细胞株显示的 DNA Ladder 均显著少于对照细胞株(图 4),表明 IB3 和 BC1 具有比对照细胞株更强的抗凋亡能力。应用流式细胞术对放线菌素 D 诱导的细胞凋亡进行分析,IB3 的凋亡率为 47.1%,BC1 的凋亡率为 52.5%,而 CHO-dhfr⁻ 对照细胞的凋亡率高达 92.6%,结果与 DNA Ladder 法相符(图 5)。

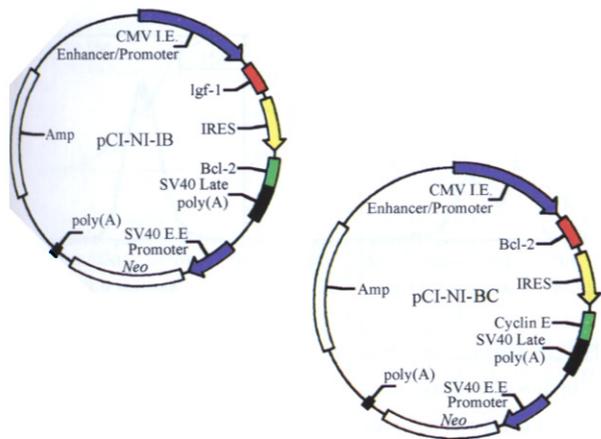


图1 双顺反子表达载体

Fig.1 Di-cistronic expression plasmids

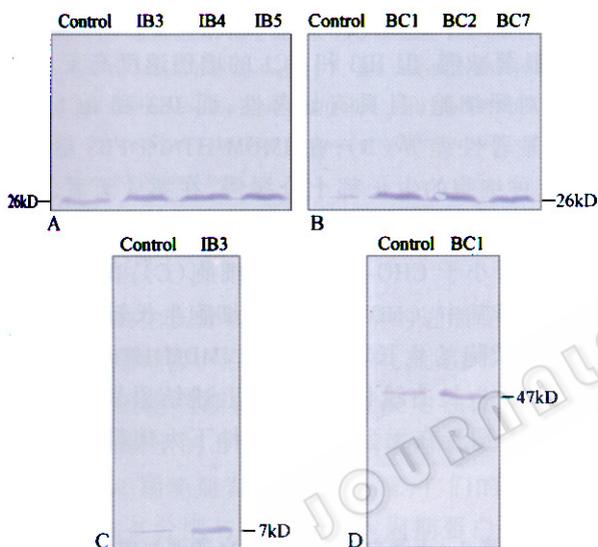


图2 Western blot 分析基因的表达

Fig.2 Western blot analysis of expressed genes

A: The expression of Bcl-2 (26kD) in 20 G418-resistant clones previously transfected with pCI-NI-IB was analyzed by Western blot. Three clones that expressed highest level of Bcl-2 were shown here. They expressed considerably higher level of Bcl-2 than the CHO-dhfr⁻ control clone.

B: The expression of Bcl-2 (26kD) in 20 G418-resistant clones previously transfected with pCI-NI-BC was analyzed by Western blot. Three clones that expressed highest level of Bcl-2 were shown here. They expressed considerably higher level of Bcl-2 than the CHO-dhfr⁻ control clone.

C: The expression of Igf-1 (7kD) in IB3 was analyzed by Western blot. The clone expressed much higher level of Igf-1 than the CHO-dhfr⁻ control clone.

D: The expression of Cyclin E (47kD) in BC1 was analyzed by Western blot. The clone expressed much higher level of Igf-1 than the CHO-dhfr⁻ control clone

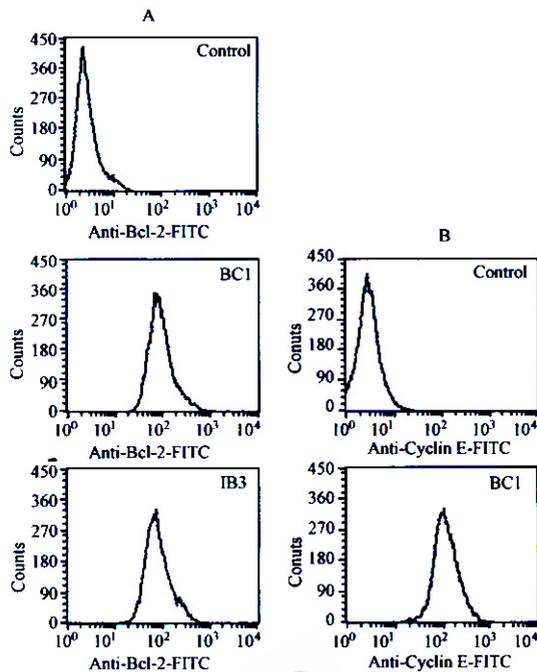


图3 流式细胞术分析基因的表达

Fig.3 Flow cytometry analysis of expressed genes Bcl-2 expression in BC1 and IB3 (A) and Cyclin E expression in BC1 (B) were analyzed by flow cytometry. The two genes showed much higher expression level in engineered cells than in CHO-dhfr⁻ control cells

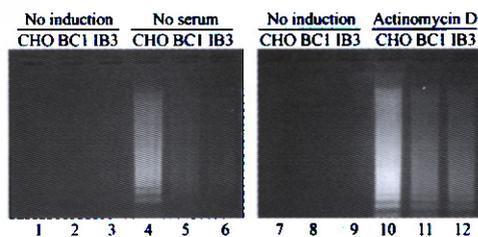


图4 DNA ladder 法检测细胞凋亡

Fig.4 Apoptosis analysis by DNA ladder detection

For BC1, IB3 and CHO-dhfr⁻, apoptosis was induced by withdrawal of serum (4 ~ 6) or by addition of actinomycin D (10 ~ 12). Controls were set without apoptosis induction (1 ~ 3, 7 ~ 9). In the figure, BC1 (5, 11) and IB3 (6, 12) showed much less fragmented DNA than control cells (4, 10), which meant that BC1 and IB3 were more resistant to apoptosis

2.4 IB3 和 BC1 细胞在无血清培养基中增殖活力的检测

接种 CHO-dhfr⁻、IB3 和 BC1 细胞各 5×10^3 个于 24 孔细胞培养板中,在含 10% FBS 的 IMDM/HT 培养基中培养 24h,促使细胞贴壁。弃去培养基,换成不含血清的 IMDM/HT,继续培养 96h。弃去培养基,加入含 1mg/mL MTT 的 IMDM/HT 培养基 37℃ 培养 4h,弃去上清,染料沉淀溶于异丙醇中,测量 560nm 的光吸收。结果如图 6 所示。IB3 和 BC1 细胞株在 560nm 的光吸收显著高于 CHO-dhfr⁻ 对照细胞株,证明 IB3 和 BC1 在无血清培养基中的增殖能力高于 CHO-dhfr⁻。

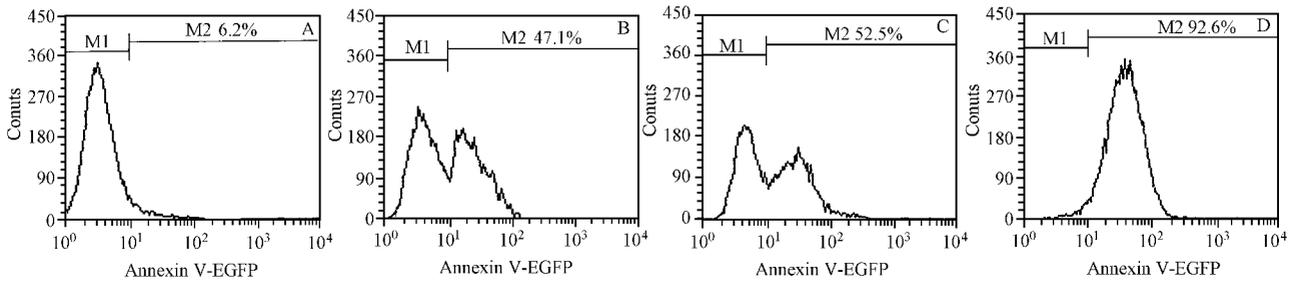


图5 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis analysis by flow cytometry

Apoptosis was induced with $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ actinomycin D for 24h, then externalized PS was detected with flow cytometry. A: CHO-dhfr⁻ control without apoptosis induction, 6.2% underwent apoptosis; the rate of apoptosis of un-induced IB3 and BC1 was similar (not shown here); B: IB3 induced with actinomycin D, 47.1% underwent apoptosis; C: BC1 induced with actinomycin D, 52.5% underwent apoptosis; D: CHO-dhfr⁻ induced with actinomycin D, 92.6% underwent apoptosis

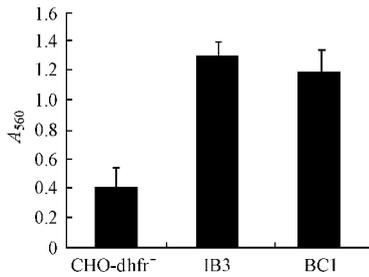


图6 MTT法检测无蛋白培养基中细胞增殖能力

Fig.6 MTT assay of cell proliferation in protein-free medium

Cells were cultured in equal number in protein-free medium IMDM/HT for 96 hours before MTT test. The figure showed that IB3 and BC1 proliferated faster than CHO-dhfr⁻ control ($P < 0.01$). In the figure, the bars represent standard deviation calculated from three independent tests

2.5 IB3和BC1细胞的连续培养

以 1×10^4 个细胞/孔的浓度接种 CHO-dhfr⁻、IB3 和 BC1 细胞于 6 孔细胞培养板中,每种细胞做 3 个复孔。于 IMDM/HT/10% FBS 中培养 24h 使细胞贴壁,而后弃去培养基,PBS 充分洗涤细胞。把每种细胞分成 4 组,分别加入 IMDM/HT/10% FBS、IMDM/HT/1% FBS、IMDM/HT/0% FBS 以及 IMEM 无蛋白培养基。IMEM 无蛋白培养基由本室设计,为 IMDM 培养基添加表 2 所列的成分而构成。为使细胞易于贴壁而不致影响实验结果,IMEM 中另添加 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ Fibronectin 和 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ Vitronectin。连续培养细胞 2 周,每天更换新鲜的培养基。对于 IB3,更换方法为取走一半细胞培养上清,以保留细胞自身分泌表达的 Igf-1,而后加入相同体积的新鲜培养基。其它细胞的换液方法相同,以具有可比性。每隔 1 天消化在各个培养条件下的三种细胞各三个培养孔,进行活细胞计数。结果如图 7 所示。在 IMDM/HT/10% FBS 培养基中,三种细胞差别不明显,增殖速度都很

快(A);在 IMDM/HT/1% FBS 培养基中,细胞增殖速度都显著减慢,但 IB3 和 BC1 的增殖速度高于 CHO-dhfr⁻ 对照细胞,且具有显著性,而 IB3 和 BC1 之间没有显著性差异(B);在 IMDM/HT/0% FBS 培养基中,三种细胞的生长都十分缓慢,在第 4 天后,细胞开始死亡,细胞数开始降低,但 IB3 和 BC1 的细胞数降低趋势小于 CHO-dhfr⁻ 对照细胞(C);在 IMEM 无蛋白培养基中,CHO-dhfr⁻ 对照细胞生长较差,而 IB3 和 BC1 细胞的生长较好,与在 IMDM/HT/1% FBS 培养基中的生长曲线相似(D)。上述结果表明 IB3 和 BC1 具有适于在无蛋白培养条件下大规模培养的潜力。

表2 无蛋白培养基 IMEM 的添加成分

Table 2 Supplement for protein-free medium IMEM

Component	Concentration
Na_2SeO_3	$20\mu\text{g}/\text{L}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$2.5\mu\text{g}/\text{L}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$850\mu\text{g}/\text{L}$
ZnCl_2	$400\mu\text{g}/\text{L}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$80\text{mg}/\text{L}$
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$30\text{mg}/\text{L}$
Alanine	$10\text{mg}/\text{L}$
Sodium pyruvate	$100\text{mg}/\text{L}$
Linoleic acid	$180\mu\text{g}/\text{L}$
Putrescine-2HCl	$200\mu\text{g}/\text{L}$
Ethanoamine	$3\text{mg}/\text{L}$
Hydrocortisone	$1\text{mg}/\text{L}$
Glutamic acid	$60\text{mg}/\text{L}$
Asparagine	$60\text{mg}/\text{L}$
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$80\mu\text{mol}/\text{L}$
N(2-hydroxyethyl) iminodiacetic acid	$80\mu\text{mol}/\text{L}$

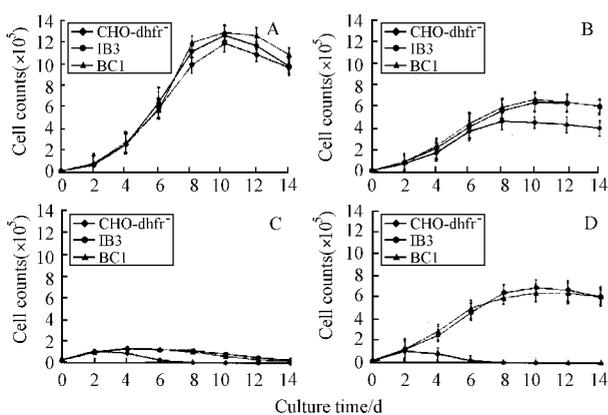


图7 遗传改造过的细胞的连续培养

Fig.7 Continuous culture of genetically engineered cells

CHO-dhfr⁻, IB3 and BCl1 cells were cultured in IMDM/HT/10% FBS (A), IMDM/HT/1% FBS (B), IMDM/HT (C) and IMEM protein-free medium (D) continuously for 2 weeks. Cell numbers were counted every other day. In protein-free medium (D), IB3 and BCl1 exhibited much higher cell number than the control CHO-dhfr⁻ cell line ($P < 0.01$ after day 4). In the figure, the bars represent standard deviation calculated from three independent tests

3 讨论

细胞的生长分裂即细胞周期的进展受到一系列基因的精细调控。在细胞周期中,从G1期进入到S期对整个细胞周期的进展具有决定性的作用。在G1期早期表达的D族细胞周期蛋白Cyclin D1、D2、D3和在G1期晚期表达的Cyclin E,它们的表达量均持续增加,并分别与相应的细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(Cyclin-dependant kinase, Cdk)结合,激活Cdk的激酶活性,使一系列底物磷酸化,推动细胞周期进入S期^[3]。

各类有丝分裂刺激因子可以通过信号转导对细胞周期发挥作用。如胰岛素(Insulin)和胰岛素样生长因子I(Insulin-like growth factor I, Igf-1)通过结合各自的受体,作用于胰岛素受体底物(Insulin receptor substrates, IRSs)经信号放大过程,而上调Cyclin D的表达^[4]。因而,在细胞中高表达Igf-1和Cyclin E,都可以推动细胞周期进展,促进细胞的分裂增殖。

在大规模培养哺乳动物细胞生产重组蛋白时,往往可以观察到细胞死亡,使得细胞难以维持高密度和高活力,导致生产提前终止。这种细胞死亡往往与细胞凋亡有关^[5,6]。一般认为至少有两个细胞凋亡通路:受体介导的细胞凋亡和线粒体介导的细胞凋亡,最近有证据显示内质网也介导细胞凋亡^[7]。受体介导的凋亡通路需要可溶性配体分子(如

CD95L, TNF, Apo3L, Trail等)或其它细胞的表面分子与相应的细胞凋亡相关受体(CD95、TNFR1、Apo3、DR4/5等)结合,促使受体胞内区与相应分子结合,而激活初始Caspase,即caspase-8^[8]。而线粒体介导的细胞凋亡通路通过从线粒体膜上释放细胞色素c(Cyt c)而起始。释放到胞浆中的Cyt c先与Apaf-1结合,而后进一步结合Caspase-9酶原,并使之激活。Apaf-1、Cyt c和活化的Caspase-9组成一个全酶,称为凋亡体(Apoptosome)^[9-12]。当初始Caspases(Caspases-8和Caspase-9)激活后,均可通过级联方式激活下游Caspases,并最终激活效应蛋白酶Caspase-3,而使两个凋亡通路汇合起来。Caspase-3裂解关键底物,使细胞最终走向凋亡:磷脂酰丝氨酸(PS)外翻,核浓缩,DNA片段化,细胞内容物被包进膜内,形成凋亡小体(Apoptotic bodies),并通过PS被临近的吞噬细胞识别和吞噬^[13,14]。细胞凋亡通路受到严紧的调节。例如线粒体膜整合蛋白Bcl-2可以通过维持线粒体膜的完整性,阻止Cyt c释放而抑制细胞凋亡。因此,在细胞中高表达Bcl-2蛋白,可以使细胞对细胞凋亡耐受。

本研究中,通过对CHO细胞进行改造,使之适于在无蛋白培养基中生长,并且具有抗凋亡能力。因而,当这些细胞株用于外源基因表达时,不需要再进行细胞株的无血清培养基适应工作,而且易于培养,为大规模表达重组蛋白药物创造了便利条件。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Timicic MT, Christmann M, Daina B. Cloning and functional analysis of cDNA encoding the hamster Bcl-2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **275**: 899-903
- [2] Liu GQ(刘国奇), Chen XM(陈小密), Xu J(徐静) et al. Construction of dicistronic expression vector in mammalian cell with IRES and dhfr. *Bull Acad Mil Med Sci(军事医学科学院院刊)*, 2000, **24**(1): 9-15
- [3] Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 1993, **73**: 1059-1065
- [4] Hamelers IHL, van Schaik FMA, Sipkema J. Insulin-like growth factor I triggers nuclear accumulation of cyclin D1 in MCF-7S breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 47645-47652
- [5] Cotter TG, Al-Rubeai M. Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends Biotechnol*, 1995, **13**: 369-377
- [6] Al-Rubeai M, Singh RP. Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**: 152-156
- [7] Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature*, 2000, **403**: 29-30
- [8] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, **281**: 1305-1308
- [9] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281**: 1309-1312
- [10] Reed JC. Cytochrome c: can't live with it, can't live without it.

- [11] Desagher S , Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* , 2000 , **10** : 369 – 377
- [12] Finkel E. The mitochondria : is it central to apoptosis. *Science* , 2001 , **292** : 624 – 626
- [13] Green DR. Apoptotic pathways : paper wraps stone blunts scissors. *Cell* , 2000 , **102** : 1 – 4
- [14] Hengartner MO. Apoptosis : corralling the corpses. *Cell* , 2001 , **104** : 325 – 328

Construction of Two Robust CHO Cell Lines Resistant to Apoptosis and Adapted to Protein-free Medium by Over-expression of Igf-1/Bcl-2 or Bcl-2/Cyclin E Genes

LAI Da-Zhi WENG Shao-Jie QI Lian-Quan YU Chang-Ming FU Ling YU Ting CHEN Wei*

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology , Beijing 100071 , China)

Abstract Serum used widely in mammalian cell culture is also a potential source of bacterial , mycoplasmal and viral contaminations. In addition , the complex biological components in serum make harder the subsequent product recovery process. High cost , high batch variation and potential source limitation are among the other shortcomings. So serum-free or even protein-free medium are preferable for recombinant protein production. However , without serum to provide essential components such as hormones , growth factors and binding proteins , cells are easy to die. In this study , CHO-dhfr⁻ cells were genetically engineered to make them adapted to IMEM , a protein-free medium , and resistant to apoptosis. The genes in choice are insulin-like factor (Igf-1) , Bcl-2 and cyclin E. Bcl-2 is a mitochondrial membrane-integrated protein. It can block the release of cytochrome c by maintaining the integrity of mitochondrial membrane , and thus inhibit apoptosis. Igf-1 is similar both in structure and function to insulin , a growth factor added to serum-free medium to promote cell growth and is the only protein component in many currently used serum-free media. cyclin E is a cell cycle protein expressed continuously in G1 phase. When cyclin E accumulates to certain amount , cell cycle was driven to S phase. So cyclin E is a proliferation-promoting protein. By co-express Igf-1/Bcl-2 or Bcl-2/cyclin E in CHO-dhfr⁻ cells with a dicistronic expression vector , we constructed two cell lines : CHO-IB and CHO-BC. The high expression of each protein was confirmed by Western blot and flow cytometry. Apoptosis was analyzed by flow cytometry and DNA ladder detection , and the two cell lines were both found much more resistant to apoptosis induced by withdrawal of serum or addition of actinomycin D than the CHO-dhfr⁻ parent cell. Cell proliferation assay by MTT method showed that the two cell lines proliferated much faster than CHO-dhfr⁻ in IMDM medium without serum. Continuously culture assay proved that the two cell lines grow very well in IMEM protein-free medium supplemented with fibronectin and vitronectin to ease adherence. When compared to CHO-dhfr⁻ , the two cell lines exhibited much more viable cell numbers and faster growth rate.

Key words CHO cells , cell culture , apoptosis , cell cycle , protein-free medium