

# 丁酸钠对 CHO-EPO 工程细胞株 rhEPO 表达量的影响

刘小萍 汪彦 朱奎 曹韞旭 陆德如

(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

**摘要** 以稳定整合有 pED-EPO 的 CHO-EPO 工程细胞株为研究对象,在无血清条件下,系统观察了 0.5、1.0、2.5 和 5.0 mol/L 4 个浓度的丁酸钠作用于该细胞株的情况,结果表明:丁酸钠对 CHO-EPO 工程细胞的生长有明显的抑制作用;影响 CHO-EPO 工程细胞 EPO 表达,浓度 1.0 mol/L 可提高 EPO 表达量 2.5 倍左右,并可持续较长的一段时间;延缓 CHO-EPO 工程细胞在无血清培养时的细胞脱落;提高 CHO-EPO 工程细胞 EPO mRNA 水平。

**关键词** 丁酸钠,重组人促红细胞生成素,中国仓鼠卵巢细胞(CHO)

丁酸盐(Butyrate)在肠道内形成,存在于动物脂肪中。在体内浓度虽低,而活性却远远高于其他同族的脂肪酸,有着重要的生物学活性<sup>[1]</sup>。目前研究表明,对于培养的哺乳动物细胞系,丁酸可以(1)调节细胞的生长<sup>[2]</sup>,抑制细胞的生长繁殖,这种抑制是可逆的,去除丁酸后,细胞的生长又恢复到原来的水平。(2)诱导蛋白的合成,如血红蛋白、血清白蛋白等<sup>[3]</sup>。(3)调控基因的表达,丁酸主要在转录水平上影响基因的表达,这种影响也是可逆的。(4)诱导细胞的分化<sup>[5]</sup>。

Andrew J D 等人<sup>[4]</sup>用丁酸钠处理整合有外源基因的 CHO 细胞,发现丁酸钠可提高腺病毒主要晚期启动子/SV40 增强子调控的外源 VIII 因子(Factor VIII)和 von Willebrand 因子(vWF)mRNA 的转录。Palermo D P 等人<sup>[6]</sup>报道,用滚瓶培养的重组 CHO 细胞在无血清或低血清条件下,丁酸钠可提高 9 种不同的 t-PA(组织纤溶酶原激活物)类似物的产量,分别达到 2~9 倍,并且可以延长滚瓶培养的周期。

本研究用丁酸钠处理 pED-EPO 质粒转染 CHO-DHER<sup>-</sup> 细胞后获得的稳定高表达株 C105 工程细胞,旨在观察丁酸钠作用于该工程细胞株的效应,寻找提高 EPO 产量的途径,以期在大规模制备 EPO 的过程中降低物耗,提高生产效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株

CHO-EPO 工程细胞株 C-105:由本研究所建株并保存。

### 1.2 主要生化试剂和试剂盒

DMEM/F12 和小牛血清(GIBCO 公司产品)。DIG 标记及检测试剂盒和 EPO-ELISA 检测试剂盒,Boehringer Mannheim 公司产品。丁酸钠及其它试剂均为国产分析

上海市科技发展基金资助项目。

本文于 1996 年 8 月 23 日收到。

纯。

### 1.3 CHO-EPO 工程细胞株的培养

细胞常规培养于含 5% 小牛血清, 青霉素钠, 硫酸链霉素, L-脯氨酸的 DMEM/F12 培养基中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 及在一定湿度的培养箱中培养。实验组及对照组均以 10<sup>5</sup>/ml 细胞接种, 待细胞生长至 95% 单层时, 分别收集培养液上清, 用 PBS 清洗细胞单层, 换入含青霉素, 硫酸链霉素和非必需氨基酸的 DMEM/F12 无血清培养基, 对照组不加丁酸钠, 实验组分别加入 0.5、1.0、2.5 和 5.0 mmol/L 的丁酸钠, 每隔 72h 收集培养液上清一次, 连续收集 4 次。样品于 4℃ 冰箱保存。

### 1.4 细胞计数

参阅《组织培养技术》<sup>[7]</sup>的方法, 用血球计数板计数。

### 1.5 细胞总 RNA 的提取

参考文献[8], 采用一步法提取细胞总 RNA。

### 1.6 DIG EPO-cDNA 探针的标记及检测

按 DIG 标记及检测试剂盒说明书进行。

### 1.7 RNA 斑点杂交及检测

参考文献[9], 取适当大小的尼龙膜, 用 DEPC 处理的水浸湿, 然后浸于 20xSSC 中 5min, 于多孔过滤加样器上铺两张浸湿的滤纸, 然后将膜铺于滤纸上, 装好加样器。RNA 样品加入变性缓冲液(50% 甲酰胺, 7% 甲醛, 1xSSC), 于 68℃ 温育 15min, 立即冰浴冷却, 然后加入两倍体积 20xSSC。加样器用 10xSSC 抽吸两次, 加入准备好的 RNA 样品, 真空抽吸, 再用 10xSSC 抽吸两次, 取出膜, 膜置 254nm 紫外线照射 5min 进行固定。将膜放入杂交管, 100cm<sup>2</sup> 加入 20ml 膜预杂交液(50% 甲酰胺, 5xSSC, 50mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> pH7.2, 2% 封阻剂, 7% SDS, 0.1% 十二烷基肌氨酸钠), 于 50℃ 预杂交 2h, 然后用 100cm<sup>2</sup> 加入 2.5ml 膜杂交液(含 25ng/ml 标记 DNA)代替预杂交液, 50℃, 杂交 12h。膜用 DIG 标记及检测试剂盒进行检测。

### 1.8 EPO-ELISA 的检测

按 EPO-ELISA 检测试剂盒说明书进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 丁酸钠对 CHO-EPO 细胞生长的影响

CHO-EPO 细胞经有血清培养至 95% 单层后, 用 PBS 清洗细胞两次, 换入无血清培养基, 对照组不加丁酸钠, 实验组分别加入上述浓度的丁酸钠继续培养。每隔 72h 做一次细胞计数, 连续 4 次。结果表明, 丁酸钠对 CHO-EPO 细胞的生长有明显的抑制作用, 并且与丁酸钠的浓度呈线性关系(见图 1)。

### 2.2 丁酸钠对 CHO-EPO 细胞 EPO 表达的影响

CHO-EPO 细胞按上述方法培养后, 收集培养液上清, 用 EPO-ELISA 检测对照组及实验组培养液上清中 EPO 的含量, 结果表明 0.5、1.0 和 2.5 mmol/L 丁酸钠均可提高 CHO-EPO 细胞 EPO 表达量, 其中 1.0 mmol/L 的丁酸钠作用最强, 提高 EPO 表达量达 2.5 倍左右, 并可持续较长的一段时间(如图 2)。

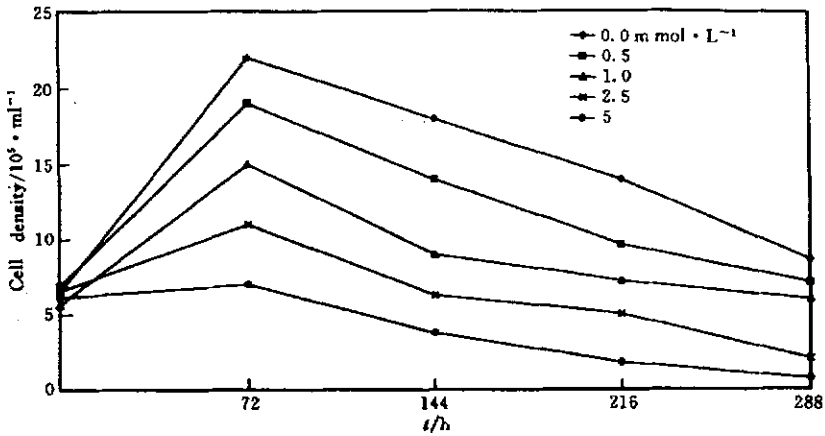


图 1 不同浓度丁酸钠对 CHO-EPO 细胞生长的影响

Fig.1 Effect of different sodium butyrate concentrations on growth of CHO-EPO cells

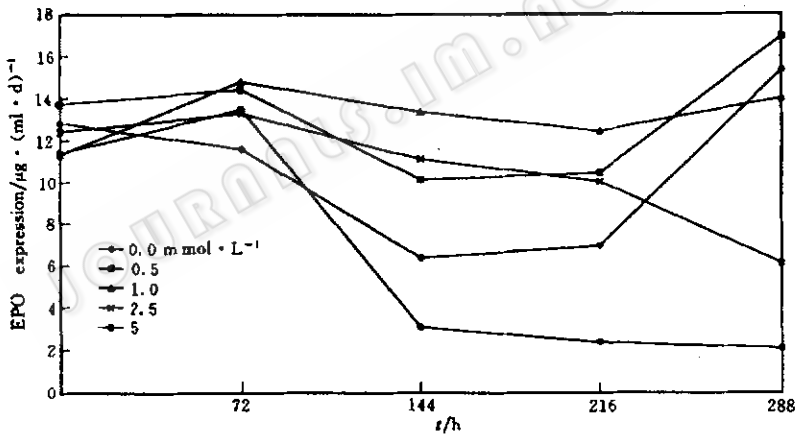


图 2 不同浓度丁酸钠对 CHO-EPO 细胞 EPO 表达量的影响

Fig.2 Effect of different sodium butyrate concentrations on the EPO expression of CHO EPO cells

2.3 丁酸钠对 CHO-EPO 细胞形态及生长状态的影响

用前述浓度的丁酸钠作用于 CHO-EPO 细胞。观察细胞形态及生长状态,发现经丁酸钠处理的细胞体积增大、细胞质充分铺展、呈长梭形,并且细胞开始脱落的时间晚于对照组细胞,0.5 和 5.0mmol/L,丁酸钠作用的细胞开始脱落的时间较对照组晚 2~10d,见图版 1-A。

2.4 丁酸钠对 CHO-EPO 细胞 EPO mRNA 水平的影响

用 DIG 标记的 EPO 探针检测经 1.0mmol/L 丁酸钠作用 72、144 和 216h 后细胞 EPO mRNA 水平的变化。RNA 斑点杂交结果表明,丁酸钠处理的细胞,EPO mRNA 水平较对

照组高(见图版 I-B-C)。

### 3 讨 论

用丁酸钠处理稳定整合有外源基因的 CHO 细胞, 提高分泌蛋白表达量的研究已有报道<sup>[4,6]</sup>。丁酸钠对基因表达的影响, 主要是通过抑制组蛋白脱乙酰化酶的活性, 引起组蛋白的超乙酰化<sup>[1,10]</sup>。目前的研究表明, 组蛋白的超乙酰化可能是基因激活的一种机制。乙酰基团的诱导可中和组蛋白分子上的正电荷, 其结果是减小组蛋白和 DNA 之间的相互作用, 使得转录因子对它们的 DNA 识别位点更易于接近, 从而促进转录水平的提高。

### 参 考 文 献

- [1] Kruh J. *Mol & Cell Biochem*, 1982, 42: 65~82.
- [2] Chabanas A, Khoury E, Goeitz P *et al.* *J Mol Biol*, 1985, 183: 141~151.
- [3] Allard K, Loise R, Hans M G P *et al.* *Clinical Biochem*, 1992, 25: 317~319.
- [4] Anclew J D, Louise C W, Randal J K. *J Biol Chem*, 1989, 264: 20620~20607.
- [5] Mitsuko K, Yukio N, Masashi M *et al.* *Exp Cell Res*, 1991, 192: 46~51.
- [6] Palermo D P, Degraaf M E, Maroti K R *et al.* *J Biotech*, 1991, 19: 35~48.
- [7] 郭 征等. 组织培养技术, 北京: 人民卫生出版社, 1993, 第二版。
- [8] Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156~166
- [9] 金冬雁, 黎孟枫等. 分子克隆实验指南, 北京: 科学出版社, 1993, 第二版。
- [10] Hebbes T R, Throne A W, Crane-Robinson C *et al.* *J EMBO*, 1988, 7: 1395~1402

## The Effect of Sodium Butyrate on the Expression of Recombinant Human Erythropoietin in Engineered CHO-EPO Cell Line

Liu Xiaoping    Wang Yan    Zhu Kui    Cao Yunxu    Lu Deru

(Molecular Genetic Teaching and Research, Section Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract** C105 is a engineered CHO-EPO cell line producing recombinant human erythropoietin (rhEPO). Various concentrantions (0.5, 1.0, 2.5 and 5.0mmol/L) of sodium butyrate (NaBut) were added into the serum-free cell culture respectively to increase its EPO expression level. The results suggested that NaBut could: (1) Inhibit the engineered cells growth markedly; (2) Increase EPO expression within a long period at all concentrations except 5.0mmol/L, and 1.0mmol/L is the optimal one; (3) Delay the cells falling off in the serum-free culture; (4) Increase EPO mRNA level.

**Key words** Sodium butyrate, recombinant human erythropoietin (rhEPO), chinese hamster ovary cell

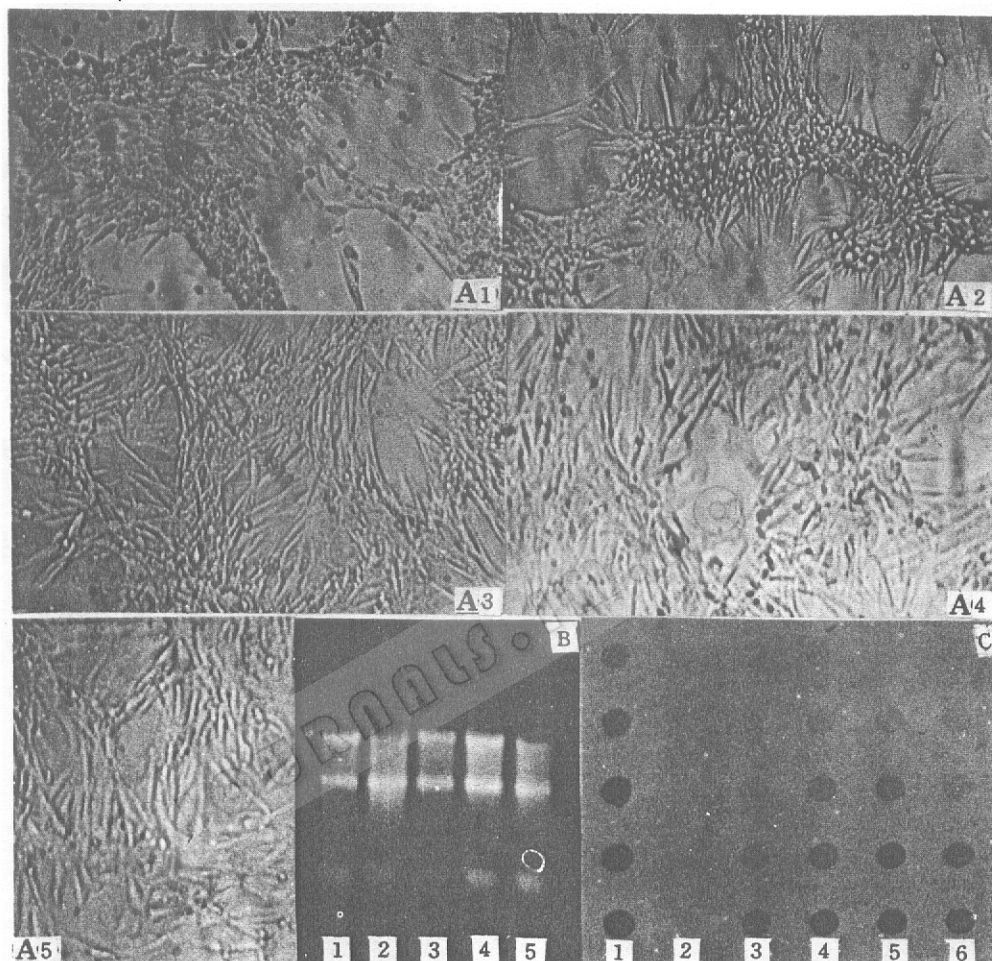


Plate I -A Effect of different NaBut concentrations on the CHO-EPO cell growth and shap, 288h after treatment.

1. 0mmol/L, 2. 0.5mmol/L, 3. 1mmol/L, 4. 2.5mmol/L, 5. 5mmol/L.

Plate I -B Electrophoretogram of the total RNA from CHO-EPO Cells.

1. CHO-DHFR-cells, 2. 72h under 0mmol/L NaBut, 3. 72h under 1mmol/L NaBut, 4. 144h under 1mmol/L NaBut, 5. 216h under 1mmol/L NaBut.

Plate I -C Dot-blot of the mRNA with DIG-EPO cDNA probe

1. pED-EPO plasmid, 2. CHO-DHFR<sup>-</sup> cells, 3. 72h under 0mmol/L NaBut, 4. 72h under 1mmol/L NaBut, 5. 144h under 1mmol/L NaBut, 6. 216h under 1mmol/L NaBut