

研究简报

表达外源 rhBMP2 的 CHO 细胞株稳定性分析

翟春利, 闫继东, 杨爽, 杜君, 袁伟, 王兆奇, 朱天慧

南开大学医学院分子遗传实验室, 天津 300071

摘要: 骨形态发生蛋白 2(BMP2)属于 TGF- β 超家族,是诱导成骨活性最强的 BMPs 之一,具有广泛的临床应用的前景。本实验室已成功构建高效表达 rhBMP2 的重组 CHO 细胞株,现选取其中一株表达量最高的细胞 rCHO(hBMP2)-C8 进行长期体外培养,并在培养过程中比较了添加和去除压力筛选中使用的 MTX 对细胞生长, rhBMP2 基因拷贝数及 rhBMP2 分泌蛋白表达的影响;检测了该细胞株在无血清培养基中可以连续表达 rhBMP2 的时间以及培养基中 rhBMP2 的温度敏感性等等。该研究为进一步采用动物细胞规模化培养技术生产 rhBMP2 奠定了基础。

关键词: BMP2, CHO 细胞株, 稳定性, 规模化培养

Stability Analysis of CHO Cell Line Expressing Heterologous rhBMP2

Chunli Zhai, Jidong Yan, Shuang Yang, Jun Du, Wei Yuan, Zhaoqi Wang, and Tianhui Zhu

Laboratory of Molecular Genetics, College of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Bone morphogenetic protein 2 (BMP2), which belongs to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, is a multifunctional molecule with distinct abilities to induce bone formation. BMP2 has been identified to have eminent pharmaceutical importance for clinical application. We previously constructed stable cell line in Chinese hamster ovary cells (CHO) that highly expressed recombinant human BMP2 (rhBMP2). For large-scale production of the recombinant protein used in clinical application, it is critical to have both high expression and stability of the protein. In the present study, the stability of the cell line (rCHO(hBMP2)-C8) with the highest expression, as well as the stability of rhBMP2 protein were investigated systematically. We cultured the rCHO (hBMP2)-C8 cell line in the presence or absence of MTX for two months, the cell growth and rhBMP2 production characteristics were examined during the culture; we found the duration that the rCHO(hBMP2)-C8 cell line could secret rhBMP2 continually into the serum-free medium. Moreover, we detected the temperature sensitivity of rhBMP2 in culture medium. This study will contribute to our understanding for further producing rhBMP2 by large-scale culture technology.

Keywords: BMP2, CHO cell line, stability, large-scale culture

骨形态发生蛋白(Bone morphogenic protein, BMP)属于 TGF- β 超家族的成员,最初因其能促进成骨细胞、成软骨细胞的分化和诱导异位骨的形成而得名。目前发现的 BMP 家族成员有 20 个左右,其中 BMP2 是研究最为广泛、诱导成骨活性最强的

BMPs 之一。大量的实验已经证实了 BMP2 临床应用的安全性和有效性,显示出其在治疗难愈性骨折^[1],骨缺损修复,脊柱融合术,牙齿组织工程,整形外科等众多临床应用中的巨大潜力。

由于 BMPs 在骨组织中含量甚微,通过基因重

Received: September 14, 2007; **Accepted:** October 25, 2007

Supported by: the Natural Science Foundation of Tianjin Municipality (No. 05YFJMJC01800).

Corresponding author: Tianhui Zhu. Tel: +86-22-23505501; Fax: +86-22-23505501; E-mail: zhuth@nankai.edu.cn

天津市自然科学基金 (No. 05YFJMJC01800) 资助。

组技术制备 BMP2 可以满足基础与临床应用研究的需要。本实验室在前期工作中采用 DHFR/MTX 筛选扩增系统构建了高效表达 rhBMP2 的重组 CHO 细胞株^[2]。本实验主要对其中一株表达量最高的细胞 rCHO(hBMP2)-C8 在长期体外培养过程中蛋白分泌稳定性及产物稳定性做了深入的研究, 为进一步扩大规模产业化生产 rhBMP2 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株

稳定转染细胞株 rCHO(C)和 rCHO(hBMP2)-C8^[2]由本实验室构建, 其中 rCHO(C)是转染 pSV2-dhfr 的对照细胞, rCHO(hBMP2)-C8 是稳定转染 hBMP2 的细胞株。C2C12 细胞为本室保存。rCHO(C)和 C2C12 细胞 10% FBS 的 DMEM 培养, rCHO (hBMP2)-C8 细胞为含 10% FBS、1 $\mu\text{mol/L}$ MTX、0.7 mg/mL^{-1} G418 的 DMEM 培养。细胞培养基均含 100 u/mL 青霉素-100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 培养条件均为 37°C, 5% CO_2 。

1.2 工具酶及试剂

Trizol Reagent 购自北京鼎国生物技术有限公司, 逆转录酶 MMLV 购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司, 蛋白酶 K 购自上海生工生物公司, 荧光染料 EvaGreen 购自美国 BIOTIUM 公司, 细胞培养试剂购自 Invitrogen 公司。hBMP-2 ELISA Kit 购自武汉博士德公司, Cell Counting Kit-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所, 碱性磷酸酶活性测定试剂盒、氨甲喋呤(MTX)购自 Sigma 公司。

1.3 细胞株均一性分析

利用有限稀释法对细胞株 rCHO(hBMP2)-C8 进行亚克隆。细胞在 25 cm^2 方瓶中长满后胰酶消化, 计数, 以 1 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中。待各亚克隆传到六孔板后, 收集 24 h 培养基上清, ELISA 检测表达水平。

1.4 细胞株稳定性分析

传代稳定性: rCHO(hBMP2)-C8 细胞复苏后接种在六孔培养板, 每 3~4 天传代 1 次, 收集条件培养基保存在 -70°C, 同时台盼蓝计数活细胞数。在添加和不添加 MTX 两种条件下分别连续传代 20 次, 传代过程中冻存保留每代的细胞。

冻存后稳定性: 细胞置液氮冻存 3 个月以上, 复苏后在体外连续传代 5 次, 比较冻存前后的表达

水平。另外, 细胞经反复液氮冻存复苏 3 次后, 检测蛋白表达水平有无变化。

1.5 荧光定量 PCR

根据 hBMP2 的 mRNA 序列设计引物, 上游引物序列: 5'-GTATCACGCCTTTTACTGC-3', 下游引物序列: 5'-CAACCTTTTCATTCTCGTC-3'。以 GAPDH 作为内参, 上游引物: 5'-TGAAGGTCGGTG TGAACGGAT-3', 下游引物: 5'-CATGTAGGCCA TGAGGTCCACCAC-3'。25 μL 反应体系中含有模板 100 ng, 10 \times PCR buffer 2.5 μL , dNTPs 100 $\mu\text{mol/L}$, 上下游引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶 1 u, 荧光染料 EvaGreen 0.4 μL , 加水至 25 μL 。反应条件为 94°C 3 min, 94°C 30 s, 60°C 1 min, 共 40 个循环。

1.6 碱性磷酸酶活性测定

BMP2 能够诱导鼠成肌细胞系 C2C12 向成骨细胞方向转化^[3], 因此通过体外检测 C2C12 细胞在 rhBMP2 的诱导下, 成骨细胞特征性标志物碱性磷酸酶表达水平的变化, 来检测 rhBMP2 的骨诱导作用。以 3×10^3 个细胞/孔接种 C2C12 于 96 孔细胞培养板中, 24 h 后, 换成含 20% 条件培养基、5% FBS 的 DMEM, 并以只含 5% FBS 的 DMEM 培养 C2C12 细胞作为对照, 每 2 天换 1 次液。刺激培养 5 d, 先用 CCK-8 试剂检测各孔在 450 nm 处的 OD 值。加入碱性磷酸酶的底物室温孵育 30 min, 用 Microplate Reader 在 405 nm 波长测定 OD 值, A_{405} 除以 A_{450} 以标准化 ALP 结果。每组样品取 5 个复孔的平均值作图。

2 结果

2.1 细胞株均一性分析

采用有限稀释法对细胞株做进一步亚克隆鉴定, 共获得 12 个亚克隆系, 分别测定其 rhBMP2 表达水平。如图 1 所示, 12 个亚克隆系 rhBMP2 的表达水平相差不大, 生长速率也基本一致(数据未显示), 说明 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株纯度可靠, 比较均一。

2.2 细胞株稳定性分析

rCHO(hBMP2)-C8 细胞复苏后体外连续传代 20 次, 在传代培养过程中检测细胞生长速率, 同时收集条件培养基 -70°C 保存。Elisa 检测其中 8 代培养基上清, 在添加和不添加 MTX 两种条件下, rhBMP2 蛋白分泌速率都无明显变化, 同时传代过程中细胞

比生长速率(μ)也无明显变化(图 2)。细胞置液氮冻存三个月以上或者经液氮反复冻存复苏三次后,冻存前后表达水平无明显差别(数据未显示)。说明 rCHO(hBMP2)-C8 细胞具备传代稳定性和冻存稳定性。

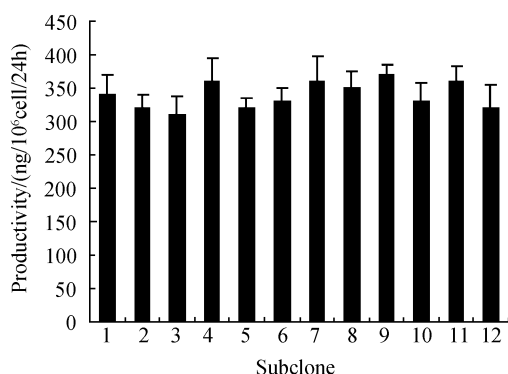


图 1 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株均一性分析

Fig. 1 Homogeneity analysis of rCHO(hBMP2)-C8 cell line

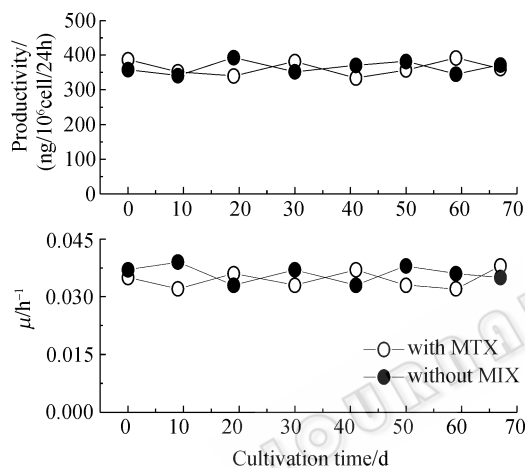


图 2 在添加和不添加 MTX 条件下 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株的稳定性

Fig. 2 The stability of rCHO(hBMP2)-C8 cell line cultured in the presence and absence of MTX

外源蛋白在 CHO 细胞中的表达水平与重组基因拷贝数有直接的关系,因此我们以细胞基因组 DNA 作为模板,利用实时荧光定量 PCR 检测传代过程中细胞内 rhBMP2 基因拷贝数有无变化。由于鼠与人的 BMP2 基因有很高的同源性,用人源 BMP2 序列设计的引物也能扩增出鼠的内源 BMP2 片段。对照细胞 rCHO(C)中只有一个拷贝内源 BMP2 基因,因此定量 PCR 通过 rCHO(hBMP2)-C8 细胞 ΔC_T 与 rCHO(C)细胞 ΔC_T 的比较得出 $\Delta\Delta C_T$ 从而得出 rCHO(hBMP2)-C8 细胞内 BMP2 基因的相对拷贝数 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)。结果如表 1 所示, rCHO(hBMP2)-C8 细胞

内 hBMP2 基因得到了有效扩增;在添加 MTX 和不添加 MTX 两种情况下,经过连续两个月的体外培养, rCHO(hBMP2)-C8 细胞内 hBMP2 基因拷贝数没有明显变化,进一步说明了该细胞株的稳定性。

以 cDNA 为模板利用荧光定量 PCR 检测 rhBMP2 在转录水平上的相对表达,同样以对照细胞 rCHO(C)中内源 BMP2 的表达作为对照。结果如表 1 所示,在添加 MTX 和不添加 MTX 两种情况下,经过连续两个月的体外培养, rCHO(hBMP2)-C8 细胞株在 mRNA 水平都能有效的表达 rhBMP2。

表 1 在长期培养过程中细胞内 hBMP2 基因拷贝数与转录水平相对表达变化

Table 1 Changes of hBMP2 gene copies and relative expression at transcriptional level during long term culture

Cells	Passages	Relative copy Numbers	Relative Expression
rCHO(C)	-	1	1
rCHO(hBMP2)-C8 With MTX	P1	391	48645
	P10	418	50360
	P20	380	45703
rCHO(hBMP2)-C8 Without MTX	P1	413	51419
	P10	372	47315
	P20	396	48074

2.3 在无血清培养基中细胞株分泌 rhBMP2 的动态分析

在一次传代后细胞能持续稳定地表达外源基因产物的时间长短,是衡量细胞株优劣的一个指标。 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株经一次传代细胞生长密度达到 80%~90%后,换无血清培养基培养,每 24 h 收集条件培养液并换为新鲜培养基,连续收集 7 d 后换为 10%血清培养基培养 1 d,然后再换为无血清培养基连续收集 7 d。分别测定细胞每天分泌 rhBMP2 的含量及其生物学活性,结果表明经过中间一天的有血清培养基补偿, rCHO(hBMP2)-C8 细胞株可以持续稳定的分泌 rhBMP2 两周,两周内分泌 rhBMP2 蛋白的数量没有降低(图 3)。这一特性对大量生产表达产物非常有利。

2.4 rhBMP2 在细胞培养上清中的稳定性

将 rCHO(hBMP2)-C8 细胞培养上清无菌分装,分别置于 4℃, 25℃, 37℃ 环境中一定时间,通过碱磷酶活性分析来检测 rhBMP2 在不同环境中的活性变化。结果如图 4 所示,细胞培养上清在 4℃, 25℃ 放置 48 h 活性无明显变化, 37℃ 放置 24 h 后活性也无明显变化, 37℃ 放置 48 h 后活性降低了 30%左右。

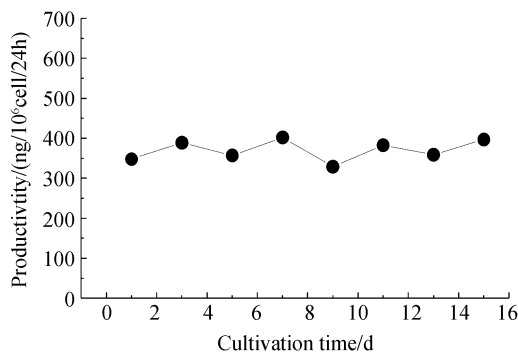


图3 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株在无血清培养基中蛋白分泌特征

Fig. 3 rhBMP2 production characteristics of rCHO (hBMP2)-C8 in serum-free medium

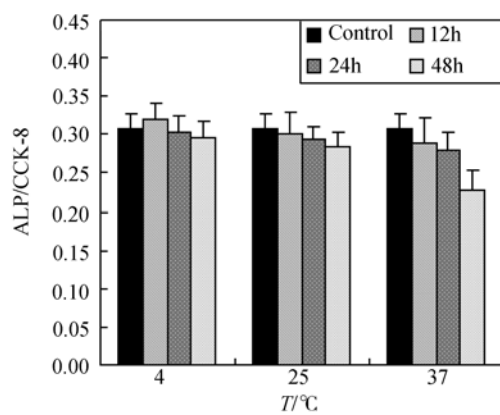


图4 培养基上清中 rhBMP2 的温度敏感性

Fig. 4 Temperature sensitivity of rhBMP2 in culture medium

3 讨论

BMP2 是 BMP 家族重要的一员, 具有很强的诱导成骨活性。大量的研究表明 rhBMP2 可以用于脊柱融合术、骨缺损修复、颌面整形以及关节病变之中等等。Sandhu^[4]比较了添加 rhBMP2 和单纯自体骨移植在脊柱融合术中的作用, 发现添加 rhBMP2 成功诱导融合的效率(100%)远远高于自体骨移植(33%)。Schimandle^[5]的研究发现, rhBMP2 诱导的脊柱融合在生物力学指标如强度硬度等方面均优于自体骨移植诱导的融合。BMP2 的应用范围还在不断的扩大, 已经成为一个很有治疗应用前景的生物小分子。

我们实验室在前期工作中利用 MTX 扩增系统筛选到了高效表达 rhBMP2 的重组 CHO 细胞株, 本文对表达量最高的一株细胞 rCHO(hBMP2)-C8 的稳定性做了深入的分析。首先我们检测了该细胞株的均一性, 从某种角度上来说, 细胞株均一性是稳定

性的前提。如果细胞株不均一, 表达量低的细胞生长速率往往高于表达量高的细胞从而在培养过程中逐渐占了优势, 导致总的蛋白产率的降低。我们利用有限稀释法对 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株进行了亚克隆筛选, 得到的 12 株亚克隆细胞株表达水平无明显差异, 表明该细胞株比较均一。

由于 MTX 价格昂贵且对人体有害, 因此在产业化培养 CHO 细胞生产重组蛋白时有必要撤除培养基中的 MTX。目前对于撤除 MTX 后长期培养过程中重组细胞株的稳定性尚无定论, 不同的重组 CHO 细胞株稳定性程度不同。Dyring^[6]报道的 CHO 细胞株撤除 MTX130 天后, 仍能稳定高效表达人胰岛素样生长因子结合蛋白 1(hIGFBP-1)。Fann^[7]等构建的 CHO 细胞株在撤除 MTX50 天内, 由于 t-PA 基因拷贝数的减少, 蛋白产率降低了 60%。我们比较了 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株在添加和撤除 MTX 两种条件下, 经过两个月的连续传代培养 rhBMP2 蛋白分泌的稳定性。结果发现在两种条件下, rhBMP2 基因拷贝数都没有降低, 蛋白产率也很稳定。有研究表明, 重组 CHO 细胞株的稳定性可能与目的基因在宿主细胞染色体 DNA 上的整合位点以及扩增单位的结构特征有关。与整合在染色体其它区域的扩增基因相比, 整合于染色体端粒区域的扩增基因更加稳定^[8], 在撤除 MTX 长期培养过程中更能稳定表达目的蛋白。

Ohta^[9]等研究了纯化后的 rhBMP2 蛋白在不同温度(50°C~120°C)处理后的稳定性, 但 rhBMP2 在培养基上清中的稳定性尚未有人报道。我们发现 rhBMP2 在 4°C 和室温(25°C)条件下比较稳定, 在 37°C 放置 24 h 后活性也没有明显变化, 37°C 放置 48 h 后活性降低了 30%。从该结果我们可以得到两个启示: (1)在细胞培养过程中, 应尽量缩短 rhBMP2 在 37°C 生物反应器中的停留时间, 每天收集条件培养基; (2)rhBMP2 的纯化工作可以在室温进行。

本文对 rCHO(hBMP2)-C8 细胞株的生长与蛋白分泌特征进行了一系列研究, 结果表明该细胞株具备均一性和传代稳定性, 能长期稳定高效表达 rhBMP2 蛋白; 在细胞生长密度达到 80%~90%时可以更换为无血清培养基, 在每天收集条件培养基的情况下可以连续收集 2 周; rhBMP2 后续的纯化工作可以在室温进行。该研究为进一步采用动物细胞规模化培养技术生产 rhBMP2 奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Kain MS, Einhorn TA. Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot Ankle Clin*, 2005, **10**(4): 639–650.
- [2] Zhang DY, Yang S, Lü SJ, *et al.* Expression, characterization and biological activity analysis of recombinant human bone morphogenetic protein 2 in CHO cells. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(6): 968–972.
张道永, 杨爽, 吕树军, 等. 重组人骨形态发生蛋白2在CHO细胞中的表达、鉴定及活性分析. *生物工程学报*, 2006, **22**(6): 968–972.
- [3] Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 1994, **127**: 1755–1766.
- [4] Sandhu HS, Toth JM, Diwan AD, *et al.* Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion. *Spine*, 2002, **27**(6): 567–575.
- [5] Schimandle JH, Boden SD, Hutton WC. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine*, 1995, **20**(12): 1326–1337.
- [6] Dyring C, Mellstrom K. Stable, recombinant expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 (hIGFBP-1) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Cytotechnology*, 1997, **24**: 193–200.
- [7] Fann CH, Guirgis F, Chen G, *et al.* Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, **69**: 204–212.
- [8] Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, *et al.* Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol. Prog*, 2000, 16710–16715.
- [9] Ohta Hiroshi, Wakitani Shigeyuki, Tensho Keiji, *et al.* The effects of heat on the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Bone Miner Metab*, 2005, **23**: 420–425.

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月4日出版), 单价55.00元, 全年定价660元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。

《生物工程学报》月刊(每月25日出版), 单价65.00元, 全年定价780元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。

《微生物学通报》月刊(每月20日出版), 单价48.00元, 年价576元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。

《菌物学报》双月刊(单月15日出版), 单价80元, 全年定价480元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>