

乳酸脱氢酶基因调控对 HEK-293 细胞代谢和腺病毒生产的影响

缪俊青, 易小萍*, 李祥超, 庄英萍

华东理工大学生物工程学院 生物反应器国家重点实验室, 上海 200237

缪俊青, 易小萍, 李祥超, 庄英萍. 乳酸脱氢酶基因调控对 HEK-293 细胞代谢和腺病毒生产的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3863-3875.

MIAO Junqing, YI Xiaoping, LI Xiangchao, ZHUANG Yingping. Effects of manipulating lactate dehydrogenase gene on metabolism of HEK-293 and production of human adenovirus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3863-3875.

摘要: 减少乳酸积累一直是哺乳动物细胞生物技术产业的一个目标。体外培养动物细胞时, 乳酸积累主要是 2 种代谢途径作用的综合结果: 一方面, 葡萄糖在乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 的作用下生成乳酸; 另一方面, 乳酸可通过乳酸脱氢酶 B (LDHB) 或乳酸脱氢酶 C (LDHC) 氧化为丙酮酸重新进入三羧酸循环。本研究综合评估了乳酸代谢关键基因调控对人胚胎肾细胞 (human embryonic kidney 293 cells, HEK-293) 细胞生长、代谢和人腺病毒 (human adenovirus, HAdV) 生产的影响, 有效提高了 HEK-293 细胞的 HAdV 生产能力, 并为哺乳动物细胞的乳酸代谢工程调控提供了理论基础。通过改造乳酸代谢关键调控基因 (敲除 *ldha* 基因以及过表达 *ldhb* 和 *ldhc* 基因), 有效改善了 HEK-293 细胞的物质和能量代谢效率, 显著提高了 HAdV 的生产。与对照细胞相比, 3 个基因改造均能促进细胞生长, 降低乳酸和氨的积累, 明显增强细胞的物质和能量代谢效率, 显著提高了 HEK-293 细胞的 HAdV 生产能力。*ldhc* 基因过表达对 HEK-293 细胞的生长、代谢和 HAdV 生产调控最显著, 最大细胞密度提高了约 38.7%, 乳酸对葡萄糖得率和氨对谷氨酰胺得率分别下降了 33.8% 和 63.3%, HAdV 滴度提高了至少 16 倍。此外, 相比于对照细胞株, 改造细胞株的腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 生成速率、ATP/O₂ 比率、ATP 与腺苷二磷酸 (adenosine diphosphate, ADP) 的比值以及还原型辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 含量均有不同程度的提高, 能量代谢效率明显改善。

关键词: 乳酸脱氢酶; 人胚胎肾细胞 (HEK-293); 物质代谢; 能量代谢; 腺病毒

*Corresponding author. E-mail: xpyi@ecust.edu.cn

Received: 2022-11-09; Accepted: 2023-01-09; Published online: 2023-02-13

Effects of manipulating lactate dehydrogenase gene on metabolism of HEK-293 and production of human adenovirus

MIAO Junqing, YI Xiaoping*, LI Xiangchao, ZHUANG Yingping

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Reducing lactate accumulation has always been a goal of the mammalian cell biotechnology industry. When animal cells are cultured *in vitro*, the accumulation of lactate is mainly the combined result of two metabolic pathways. On one hand, glucose generates lactate under the function of lactate dehydrogenase A (LDHA); on the other hand, lactate can be oxidized to pyruvate by LDHB or LDHC and re-enter the TCA cycle. This study comprehensively evaluated the effects of LDH manipulation on the growth, metabolism and human adenovirus (HAdV) production of human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells, providing a theoretical basis for engineering the lactate metabolism in mammalian cells. By knocking out *ldha* gene and overexpression of *ldhb* and *ldhc* genes, the metabolic efficiency of HEK-293 cells was effectively improved, and HAdV production was significantly increased. Compared with the control cell, LDH manipulation promoted cell growth, reduced the accumulation of lactate and ammonia, significantly enhanced the efficiency of substrate and energy metabolism of cells, and significantly increased the HAdV production capacity of HEK-293 cells. Among these LDH manipulation measures, *ldhc* gene overexpression performed the best, with the maximum cell density increased by about 38.7%. The yield of lactate to glucose and ammonia to glutamine decreased by 33.8% and 63.3%, respectively; and HAdV titer increased by at least 16 times. In addition, the ATP production rate, ATP/O₂ ratio, ATP/ADP ratio and NADH content of the modified cell lines were increased to varying degrees, and the energy metabolic efficiency was significantly improved.

Keywords: lactate dehydrogenase (LDH); human embryonic kidney 293 cells (HEK-293); substrate metabolism; energy metabolism; human adenovirus (HAdV)

近年来,随着溶瘤病毒及重组疫苗的兴起,人们对腺病毒的产量及质量的要求随之增加^[1-4]。重组腺病毒载体来源于 *E1* 基因区缺失的病毒,只能在补充携带 *E1* 基因的细胞系中复制,HEK-293 细胞及其变体是其常用的宿主细胞^[5]。

在体外培养动物细胞过程中,葡萄糖是细胞生物合成和能量生成的主要碳源。葡萄糖在动物细胞胞质中经糖酵解途径后生成丙酮酸,而丙酮酸主要有 2 个去向:一个是在丙酮酸脱氢

酶的催化下生成乙酰辅酶 A,进入三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环最终被氧化生成 ATP,为细胞的各种生命活动提供能量;另一个去向是在乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的催化下生成乳酸^[6-8]。研究表明,体外培养的动物细胞通常消耗大量的葡萄糖,其中接近 90%的葡萄糖被转化成了乳酸,只有很少一部分被氧化后进入 TCA 循环^[9-10]。腺病毒的生产依赖于宿主细胞的物质和能量代谢^[11],然而,体外培养动物细胞的物质和能量代谢不平

衡, 阻碍了腺病毒生产能力的进一步提高^[12-13]。近年来人们引进代谢工程手段, 即利用基因工程技术重新构建细胞代谢网络系统, 使代谢通量分布发生变化, 通过改善细胞的物质和能量代谢效率, 使体外培养的动物细胞物质和能量代谢更趋于平衡, 从而提高细胞的生长速率和产品的产率^[14]。

乳酸积累会使细胞活力和重组蛋白产量降低, 因此尽量减少其积累也是哺乳动物细胞生物技术产业的目标之一^[15]。乳酸的生成是以减少进入 TCA 循环的丙酮酸为代价的, 乳酸积累导致培养基酸化, 使得细胞活力和重组蛋白产量降低, 并将不需要的变异性引入细胞培养生物过程中^[16]。减少培养过程中的乳酸积累一般有 2 种手段: 减少乳酸的生成和增加乳酸的消耗(图 1)。一方面, 利用成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas) 或者基因沉默的方法突变 LDHA, 可通过降低 LDHA 的活性来减少乳酸生成。另一方面, 乳酸可以与丙酮酸相互转化, 丙酮酸可重新被转入线粒体内进入 TCA 循环产生能量(图 1)。所

以乳酸在某种程度上也是体外培养动物细胞的一种重要储备能源。但是大多数体外培养的动物细胞系代谢乳酸的能力较弱, 且受环境限制(如 pH 等), 无法有效消耗乳酸, 造成培养环境中的乳酸积累。因此, 在动物细胞培养过程中, 特别是细胞培养的后期阶段, 降低乳酸产量, 或者将细胞代谢转向乳酸消耗, 可有效提高目标产物的浓度, 这也一直是细胞培养过程开发的研究热点。

乳酸可被线粒体相关的 LDH 氧化成丙酮酸, 从而将细胞代谢转向为乳酸消耗的形式^[17]。如此细胞便可以循环利用其自身代谢生成的乳酸作为能量的补充来源^[18]。此外, 细胞氧化循环利用由糖酵解产生的乳酸, 能够有效减少葡萄糖的利用并提高其生物利用度。

LDH 属于 2-羟基酸氧化还原酶家族。它能催化丙酮酸和乳酸相互转化, 并伴随着 NADH 和辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 的相互转化。哺乳动物 LDH 同工酶主要包括 LDHA、LDHB、LDHC 和 LDHD。LDHA、LDHB 和 LDHC 是催化 L 型乳酸的异构体, 而 LDHD 是催化 D 型乳酸的异构体。L 异构体是在脊椎动物中存在的主要对映异构体^[19]。

LDHA 是糖酵解向氧化磷酸化转变的重要“分子开关”, LDHA 促使丙酮酸向乳酸转变^[20]。为了减少丙酮酸向乳酸的转化, 已有研究尝试利用反义信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)、同源重组和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 等手段对 LDHA 进行下调或者敲除^[21]。在后一种情况下, LDHA 活性降低 70%–85%, 乳酸产量降低 45%–80%, 葡萄糖消耗降低 55%–90%, 并且这种细胞代谢改变不会影响细胞的生长或生产力。

LDHB 是乳酸氧化途径的关键酶, 它催化乳酸和 NAD⁺ 转化为丙酮酸、NADH 和 H⁺, 控制溶

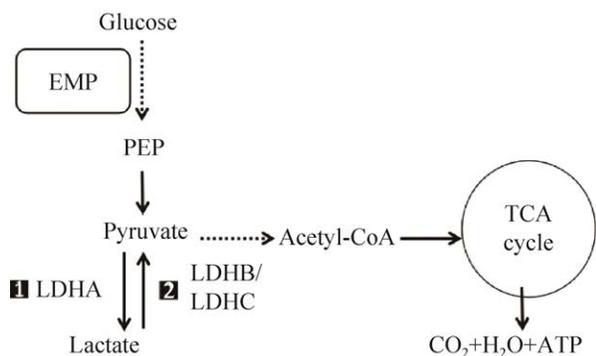


图 1 乳酸代谢调控的两种策略

Figure 1 Two strategies for regulation lactate metabolism. TCA: Tricarboxylic acid cycle; PEP: Phosphoenolpyruvic acid; EMP: Glycolysis.

酶体酸化、囊泡成熟和细胞内蛋白水解。乳酸经单羧酸转运子转运进入线粒体后,被LDHB氧化为丙酮酸^[22],之后,丙酮酸进入TCA循环。由于LDHB和与NAD⁺相关糖酵解酶(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)之间存在竞争抑制,以及乳酸盐对糖酵解酶己糖激酶和磷酸果糖激酶-1的变构性抑制,此途径会抑制糖酵解。

LDHC是男性生殖细胞中发现的第一个睾丸特异性同工酶,在精子形成过程中发现它对乳酸代谢至关重要^[23]。研究表明,减数分裂后雄性生殖细胞优先使用乳酸和丙酮酸而不是葡萄糖作为能量底物^[24]。与LDHA和LDHB相比,LDHC具有高热稳定性,并具有更宽的底物范围,但有关LDHC相关机制仍在探索中。

为了系统研究乳酸代谢关键调控基因改造对HEK-293细胞物质和能量代谢以及HAdV生产的影响,本研究通过基因工程手段构建了乳酸代谢关键调控基因改造(*ldha*基因敲除,*ldhb*和*ldhc*基因过表达)的重组单克隆细胞株,从细胞生长、物质和能量代谢以及HAdV生产等方面进行综合评估,以期通过改善HEK-293细胞的物质和能量代谢效率,提高HAdV的生产能力,并为动物细胞的乳酸代谢工程调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 表达载体的构建

*ldhb*基因的DNA片段经*Xho*I和*Xba*I酶双酶切后,与被*Xho*I和*Xba*I双酶切的pCI-neo载体

(购自Promega)连接,以构建pCI-LDHB载体。*ldhc*和*ldhc1*的DNA片段和pCI-neo载体经*Xho*I和*Sal*I酶(内切酶均购自New England Biolabs)双酶切后连接,以构建pCI-LDHC和pCI-LDHC1载体。将测序验证好的菌落接种至有氨苄抗性的LB培养基中,37℃过夜培养,用无内毒素质粒大提试剂盒[购自天根生化科技(北京)有限公司]提取阳性重组质粒。靶向各目的基因的引物都是通过在线设计工具(NCBI)和Oligo 7设计得到,其相关引物序列见表1和表2。所有引物合成和测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 HEK-293 细胞的培养、转染和重组细胞的筛选

HEK-293细胞(购自ATCC, CRL-3216)置于含5%二氧化碳的恒温培养箱(Thermo Fisher)中培养,培养温度为37℃,所用培养基为含10% FBS的DMEM/F-12(均购自Gibco)。转染前将HEK-293细胞按 4×10^5 cells/mL \times 2 mL接种到6孔板中培养18 h。按Lipofectamine 3000转染试剂(购自Invitrogen)说明书步骤将1 μg的pCI-LDHB、pCI-LDHC和pCI-LDHC1质粒分别转入培养了18 h的HEK-293细胞中。转染24 h后将6孔板中的培养基换成含5% FBS和800 μg/mL G418 (Sigma公司)的DMEM/F-12培养基。每隔2 d换一次培养基,待被转染的细胞在含G418的培养基中生长稳定后,用有限稀释法筛选单克隆细胞株。选择生长状态最优的单克

表1 基因PCR引物及酶切位点

Table 1 Primers and restriction sites for single gene overexpression

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction site
huLDHB-Fw-single	CCGCTCGAGTCCTTGTGCAAAATGGCAACT	CTCGAG
huLDHB-Rev-single	CTAGTCTAGAAGCCTAGAGCTCACTAGTCACA	TCTAGA
huLDHC-Fw-single	AATGCCTCGAGATGTCAACTGTCAAGGAGCAGC	CTCGAG
huLDHC-Rev-single	AATGCGTCGACTCCAAACAGTGGAACATTAGAAGGC	GTCGAC

表 2 RT-qPCR所用引物

Table 2 Primers used for RT-qPCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
huLDHB-Fw-single	GATGGTGGTTGAAAGTGCCT
huLDHB-Rev-single	CCCGGGCATTGAGGATACAT
huLDHC-Fw-single	CCTGCCATAGTCCATTATAGTCCT
huLDHC-Rev-single	CAACCATGGCAGCTTGTGG
hu β -actin-Fw-single	CATGAGATTGGCATGGCTTT
hu β -actin-Rev-single	GTCACCTTCACCGTTCCAGT

隆细胞株分别标记为HEK-LDHB、HEK-LDHC和HEK-LDHC1，并将转染空载体pCI-neo的HEK-293细胞标记为Control。HEK-LDHA单克隆细胞株由实验室前期构建，是将针对*ldha*基因外显子序列设计的小向导RNA (small guide RNA, sgRNA)，亚克隆至CRISPR/Cas9载体(购自Addgene, px458)上，转染HEK-293细胞后，经流式细胞仪(BD-FACSJa22)分选获得*ldha*基因敲除的单克隆细胞株HEK-LDHA。对照细胞和重组细胞株均传代2次后进行后续实验。

1.3 反转录荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

取 5.0×10^6 个细胞，抽提出总RNA，按逆转录试剂盒(购自Thermo Fisher)说明书步骤逆转录合成cDNA。并以cDNA为模板(1:10梯度稀释)，用特异性引物和SYBR Premix Ex Taq II酶(购自TaKaRa)进行荧光定量PCR。数据处理参考了Livak等^[25]提出的“比较循环阈值(cycle threshold, Ct)相对定量法”。

1.4 Western blotting 分析

分别取对照细胞和HEK-LDHA细胞，破碎并检测总蛋白含量后，稀释到相同蛋白浓度，加入相同体积的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液。蛋白采用10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)，电泳后转移到聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜上，膜

在含0.1% Tween 20和5%脱脂牛奶的三乙醇胺缓冲盐水溶液(tris buffered saline, TBS)中封闭1 h。用TBS盐溶液洗膜3次，膜在25℃条件下用LDHA或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)特异性抗体(购自CST, 1:1 000稀释)孵育2 h。用TBS盐溶液洗膜3次，然后用辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔IgG二抗孵育(购自ProteinTech, 1:2 000稀释)2 h。用TBS盐溶液洗膜3次，加入显影液(购自上海碧云天生物技术有限公司)，最后通过化学发光成像系统(Tanon5200s)进行成像以检测内参基因*GAPDH*和*ldha*表达水平。

1.5 细胞计数及葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和氨浓度检测

分别将对数生长期的重组单克隆细胞及对照细胞按照 4×10^5 cells/mL接种密度接种至6孔板中，每个细胞株接种5个6孔板，6孔板中每孔加入2 mL 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM/F-12培养基，放入37℃恒温培养箱培养；每24 h收集上清，细胞经胰酶消化和培养基重悬后取样，台盼蓝染色后用血球计数板测细胞浓度。培养上清1 000 r/min离心5 min后弃沉淀，用生化分析仪(罗氏诊断产品上海有限公司)检测上清中葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和氨的浓度。

1.6 线粒体提取

HEK-293野生型细胞经胰酶消化后用预冷的PBS重悬，细胞悬液的密度为 1.0×10^6 cells/mL。取2 mL细胞悬液于10 mL离心管中，用超声破碎仪(南京先欧仪器制造有限公司)破碎细胞，超声结束后立即将离心管置于冰中作短暂保存。将破碎后的样品转移到干净的EP管中，并加入1 mL细胞破碎液，于4℃条件下 $600 \times g$ 离心10 min。收集上清按线粒体抽提试剂盒(Biovision)说明书步骤抽提线粒体。

1.7 ATP/ADP 比例检测

对数生长期各细胞株胞内 ATP/ADP 的值用 ATP/ADP 比例检测试剂盒(Bioassay system)检测。对照细胞和重组细胞各取 1.0×10^6 个细胞, 100 μL 去离子水重悬细胞后, 分别取 10 μL 的细胞悬液迅速加入到白色不透明 96 孔板的各孔中, 1 min 后迅速向各待测孔加入 60 μL ATP 检测试剂并用酶标仪(Molecular Deviecs SpectraMax 型)读取各孔发光强度。10 min 后再次读取各孔发光强度, 并向各孔中分别加入 5 μL ADP 试剂, 1 min 后用酶标仪读取各孔发光强度, 按说明书上的方法计算各孔对应的 ATP/ADP 值。

1.8 NADH 检测

NADH 定量用 NADH 测定试剂盒(Bioassay system)检测。各取 1.0×10^6 个对照细胞和重组细胞, 向细胞中加入 40 μL NADH 提取液重悬样品。60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 5 min 后向各 EP 管中分别加入 8 μL 反应液和 40 μL NAD 提取液。4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 5 min。取 40 μL 上清, 加入按说明书配方配制好的工作试剂并用酶标仪检测吸光强度。

1.9 细胞耗氧速率检测

细胞耗氧速率采用呼吸检测仪 Oxygraph-2k Respirometer (OROBOROS)进行检测。对照细胞和各重组细胞经胰酶消化后用培养基重悬为密度为 1.0×10^6 cells/mL 的细胞悬液。在呼吸检测仪的 A、B 仓中均加入 2.1 mL 含 10% FBS 的新鲜 MEM 校正饱和氧浓度。然后迅速将 AB 仓中的新鲜培养基替换成对照细胞和各重组细胞的细胞悬液。待耗氧速率信号稳定后截信号稳定的一个时间段内耗氧速率曲线, 软件分析得到各细胞的耗氧速率。

1.10 细胞接毒及病毒滴度检测

对照细胞和各重组细胞按 3×10^5 cells/mL

的接种密度接入 T25 方瓶中, 加入 5 mL DMEM 培养基, 培养 48 h。然后取出方瓶弃上清, 并在每个 T25 方瓶中加入 10 mL 含 2% FBS 的 DMEM 培养基并接入 5% HAAdV 种毒(滴度 $\text{TCID}_{50} = 10^{-4.5}/0.1 \text{ mL}$), 继续培养 48 h。将培养的细胞于 -80°C 冷冻, 然后取出于 25°C 融化, 如此反复冻融 3 次。测毒时先用培养基 DMEM 将待测病毒液在无菌 EP 管中进行 1:10 系列稀释。对每个病毒样品, 取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 这 8 个稀释度, 分别接种 96 孔板, 每个稀释度设 7 个孔, 剂量为 100 μL /孔, 每孔中同步加入 100 μL 新消化的 HEK-293 细胞(密度为 3×10^5 cells/mL), 同时设一组未接毒的 HEK-293 细胞作对照。观察细胞病变, 10 d 后记录病变情况。

1.11 统计分析

所有实验均重复至少 3 次, 并且每次设置 3 个平行。采用 Graphpad Prism9 和 Excel 进行数据处理和分析。星号表示存在显著差异(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$), 一般以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著统计学差异。

2 结果与分析

2.1 HEK-293 细胞线粒体 LDHA、LDHB 和 LDHC 表达水平分析

由于乳酸转化为丙酮酸是发生在线粒体中, 为了解 LDHA、LDHB 和 LDHC 对于线粒体乳酸代谢的潜在影响, 抽提 HEK-293 细胞线粒体, 对 HEK-293 细胞线粒体中 LDHA、LDHB 和 LDHC 的表达水平进行 RT-qPCR 检测, 结果发现, 线粒体内 LDHB 和 LDHC 的 mRNA 水平明显高出 LDHA, 分别是 LDHA 的 2.3 倍和 2.5 倍(图 2), 表明在线粒体中相比于 LDHA, LDHB 和 LDHC 具有更高的表达水平。

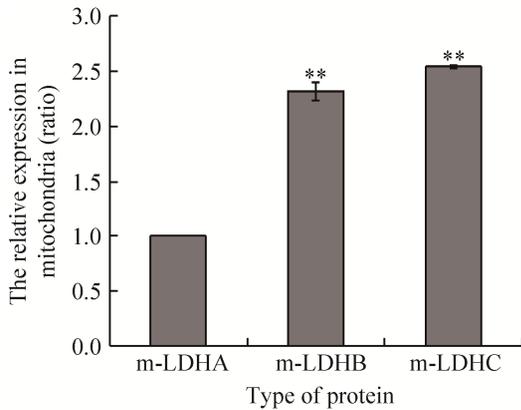


图 2 HEK-293 细胞线粒体中LDHA、LDHB和LDHC表达水平分析(**: $P < 0.01$)

Figure 2 Expression of LDHA, LDHB and LDHC in mitochondria of HEK-293 cells (**: $P < 0.01$).

2.2 *ldhc1* 基因的发现

进行 *ldhc* 基因片段扩增时出现了两种长度，一种在 1 000–2 000 bp 之间，而另一种则在 750–1 000 bp 之间(图 3A)。将两个片段分别克隆入大肠杆菌进行测序分析。测序结果显示，长基因片段与NCBI (GenBank 登录号: NM_002301)所述一致(标记为 *ldhc*)，短基因片段缺失了 758–1 000 bp 之间的碱基序列(图 3B)，标记为 *ldhc1*。序列对比分析发现LDHC催化乳酸转变为丙酮酸的活性位点在基因序列 1–758 bp 之间，推测短基因片段 *ldhc1* 也可能具有相应的功能，后续将进一步研究。

2.3 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株基因表达验证

通过 RT-qPCR 检测各改造细胞株相关调控基因的 mRNA 水平发现(图 4A)，对 *ldhb* 和 *ldhc* 基因分别进行过表达后，各改造细胞中相关基因的 mRNA 水平有不同程度的提高。*ldha* 基因敲除后，改造细胞中 LDHA 的表达水平显著降低(图 4B)。上述分析表明，在 HEK-293 细胞中已成功对乳酸代谢相关的 3 个关键调控基因进行了基因改造。

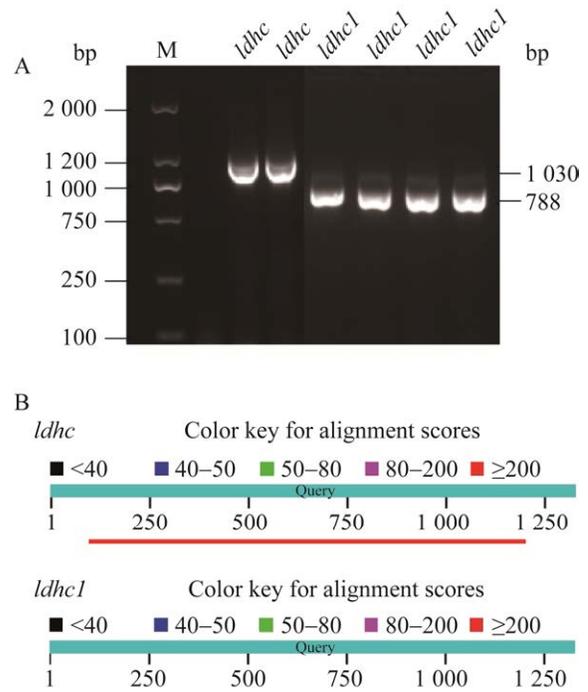


图 3 *ldhc*和*ldhc1* 片段的PCR分析图及序列比对分析图 A: 野生型HEK-293 细胞中*ldhc*和*ldhc1* 片段的PCR分析图. M: DL2000; 1–2: *ldhc*; 3–6: *ldhc1*. B: *ldhc*和*ldhc1* 的序列比对分析图

Figure 3 PCR analysis and sequence alignment analysis of *ldhc* and *ldhc1* fragments. A: PCR analysis in wild HEK293. M: DL2000; 1–2: *ldhc*; 3–6: *ldhc1*. B: Sequence alignment analysis on NCBI.

2.4 基于乳酸代谢调控的基因改造对 HEK-293 细胞生长的影响

检测各改造细胞株和对照细胞株在细胞生长各阶段的生长情况，结果如图 5 和表 3 所示。相比对照细胞，各改造细胞株在细胞培养前期生长变化不明显，但在培养后期，各改造细胞株维持了更长时间的细胞增殖，最大细胞密度均有明显提升(表 3)，LDHC和LDHC1 对细胞的生长调控最显著，最大细胞密度提高了约 38.7%，且具有相似的促进作用。

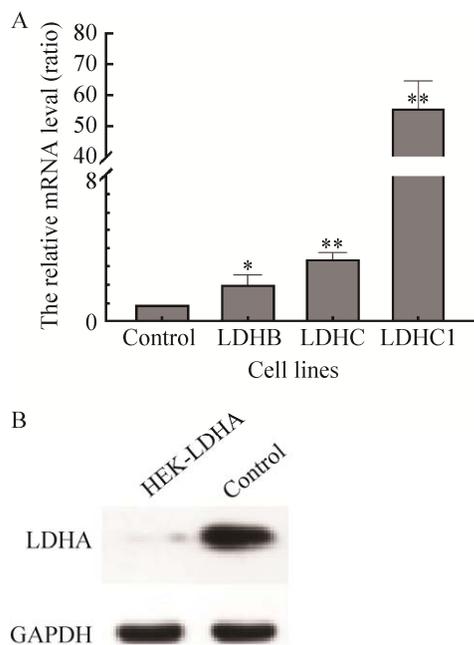


图4 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株基因表达验证(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$) A: HEK-LDHB、HEK-LDHC和HEK-LDHC1细胞中 $ldhb$ 、 $ldhc$ 和 $ldhc1$ 的mRNA水平验证. B: HEK-LDHA细胞中LDHA蛋白表达验证

Figure 4 Expression verification of various modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$). A: mRNA levels of *ldhb*, *ldhc* and *ldhc1* in HEK-LDHB, HEK-LDHC and HEK-LDHC1 cells. B: LDHA protein expression level in HEK-LDHA cells.

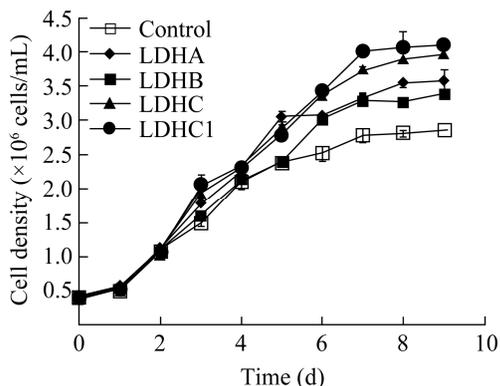


图5 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的生长情况

Figure 5 Growth of each modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism.

表3 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的生长特性

Table 3 Growth characteristics of various modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism

Cell-type	μ_{\max} (d^{-1})	Maximum cell density ($\times 10^6$ cells/mL)
Control	0.770 1	2.855
LDHA	0.679 7	3.575
LDHB	0.721 3	3.375
LDHC	0.796 5	3.960
LDHC1	0.707 7	4.090

2.5 基于乳酸代谢调控的基因改造对HEK-293细胞物质代谢的影响

每隔24 h分别取培养的各单克隆细胞和对照细胞上清,检测上清中葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和氨浓度。与对照细胞相比,基因改造后的重组HEK-293细胞葡萄糖和谷氨酰胺消耗变化不明显(图6A),但乳酸和氨的积累显著降低(图6B),乳酸对葡萄糖得率 $\Delta LAC/\Delta GLC$ 和氨对谷氨酰胺得率 $\Delta NH_3/\Delta GLN$ 均显著降低,其中LDHC对细胞代谢的影响最明显(表4),乳酸对葡萄糖得率和氨对谷氨酰胺得率分别下降了33.8%和63.3%。且在培养第3天出现明显的乳酸消耗,而对照细胞在培养第8天时才出现乳酸消耗。研究表明,基于乳酸代谢调控的基因改造能显著提高细胞的葡萄糖利用率,减少乳酸积累。

此外,在培养第5天或第6天(对数生长中后期)4株改造的重组细胞株均出现了明显的氨消耗,而对照细胞同样在培养第8天时才出现氨消耗,表明基于乳酸代谢调控的基因改造还能显著提高细胞的谷氨酰胺利用率,减少氨积累。同时也表明乳酸和氨的代谢调控存在一定的相关性,培养过程中发生乳酸消耗可一定程度促进氨的消耗,减轻氨副产物积累对细胞的影响。

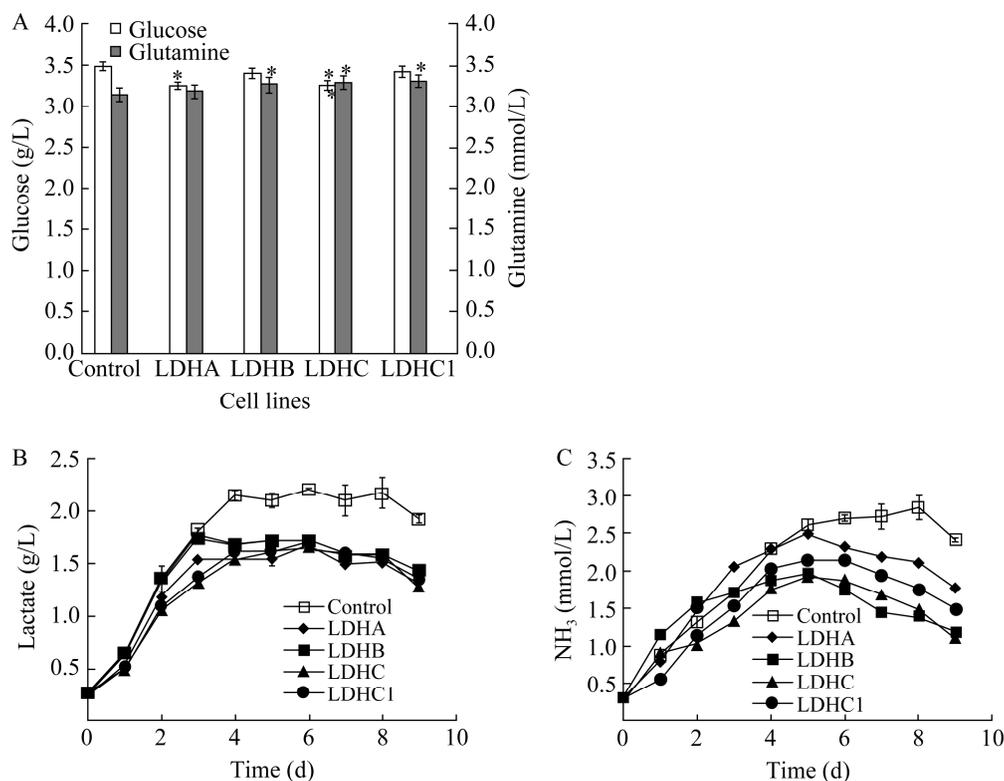


图 6 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的物质代谢情况 A: 各改造细胞株的葡萄糖和谷氨酰胺消耗情况(*: $P < 0.05$). B: 各改造细胞株的乳酸积累情况. C: 各改造细胞株的氨积累情况

Figure 6 Metabolism of each modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism. A: Glucose and glutamine consumption (*: $P < 0.05$). Lactate production (B) and NH_3 production (C) by control and modified cell lines.

表 4 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的代谢特征

Table 4 Metabolic characteristics of various modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism

Cell-type	$\Delta\text{LAC}/\Delta\text{GLC}$	$\Delta\text{NH}_3/\Delta\text{GLN}$
Control	0.954 4	0.687 1
LDHA	0.651 4	0.474 9
LDHB	0.689 7	0.278 6
LDHC	0.631 9	0.252 3
LDHC1	0.639 8	0.369 0

2.6 基于乳酸代谢调控的基因改造对 HEK-293 细胞能量代谢的影响

在细胞中 ATP 与 ADP 的相互转化实现贮能和放能, 从而保证细胞各项生命活动的能量

供应。所有活细胞都能通过细胞呼吸生成 ATP。而 NADH 不仅作为有氧呼吸作用中重要的辅酶, NADH 的“H”也携带大量能量。细胞外使用 NADH 能促进细胞内 ATP 水平的上升, 表明 NADH 能穿透细胞膜并提升细胞内的能量水平^[26]。因此, ATP 和 NADH 水平亦可用来表征细胞的能量水平。

培养 48 h 后分别取对照细胞株和各改造细胞株各 1.0×10^6 个细胞用于检测细胞耗氧速率, 细胞 ATP/ADP 比例和 NADH, 检测结果如表 5 和图 7-8 所示。与对照细胞相比, 各改造细胞株的 ATP 生成速率以及 ATP/O₂ 比率均有所提升(表 5)。表明在改造细胞株中细胞消

耗每分子氧可产生更多的 ATP, 细胞的能量代谢效率更高。

与对照细胞株相比(图 7), HEK-LDHA、HEK-LDHB、HEK-LDHC和HEK-LDHC1 改造细胞株的ATP/ADP比值分别提高了 29.2%、5.7%、21.5%和 26.2%。改造细胞中的NADH含量显著高于对照细胞, 其中, LDHB的改造对NADH的调控最显著, 相比对照细胞提高了131% (图 8)。这些结果显示, 基于乳酸代谢调控的基因改造能够明显改善HEK-293 细胞的能量代谢状态, 细胞呈现了更活跃的TCA循环。

表 5 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的ATP生成速率和ATP/O₂ 比值

Table 5 ATP production rate and ATP/O₂ ratio of each modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism

Cell-type	ATP generation rate (pmol/s 10 ⁶ cell)	ATP/O ₂ ratio (%)
Control	26.44±1.40	66.94±1.01
LDHA	32.07±0.09	71.70±0.14
LDHB	36.79±0.19	73.55±0.20
LDHC	29.22±0.70	79.53±0.72
LDHC1	27.44±0.58	70.27±0.99

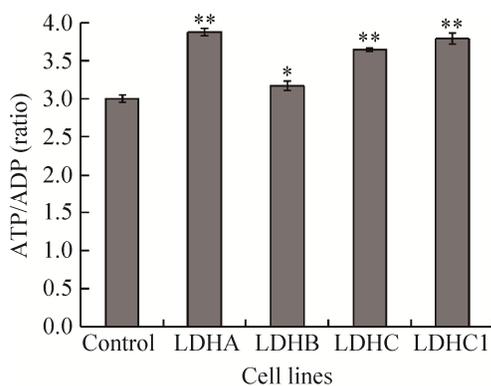


图 7 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的ATP/ADP比值(*: $P<0.05$; **: $P<0.01$)

Figure 7 ATP/ADP ratio of each modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

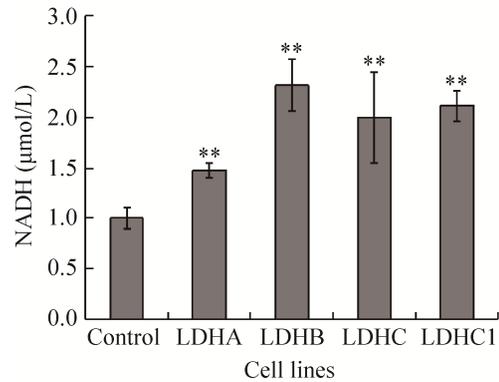


图 8 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株的NADH含量(: $P<0.01$)**

Figure 8 NADH content of each modified cell lines based on the regulation of lactate metabolism (**: $P<0.01$).

2.7 基于乳酸代谢调控的基因改造对HEK-293 细胞 HAdV 生产的影响

对照细胞株和各改造细胞株同时按相同的方法接入HAdV病毒 10 d后观察病变结果, 研究结果见图 9。与对照细胞相比, 改造细胞株生产HAdV的能力明显提升, 病毒滴度均显著提高, 其中HEK-LDHC和HEK-LDHC1 细胞株的HAdV滴度分别提高了 17.4 倍和 16 倍。研究

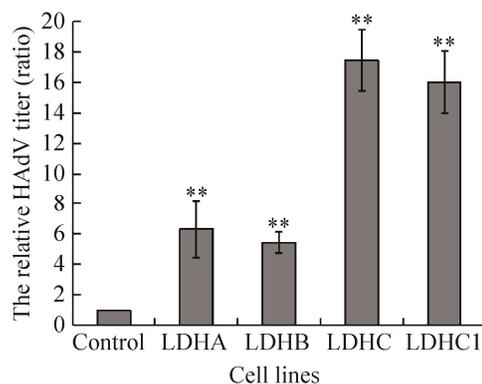


图 9 基于乳酸代谢调控的各改造细胞株HAdV生产情况(: $P<0.01$)**

Figure 9 Production of each modified cell lines HAdV based on the regulation of lactate metabolism (**: $P<0.01$).

结果表明,基于乳酸代谢调控的基因改造均能够明显增强HEK-293 细胞的HAdV生产能力,其中,以*ldhc*基因过表达对HEK-293 细胞的HAdV生产能力提升最显著,LDHC1 和LDHC 改造对HEK-293 细胞的HAdV生产具有相似的调控功能。

3 讨论

在细胞代谢旺盛期,HEK-293 细胞在大量消耗葡萄糖的同时会产生大量的乳酸。在培养基中葡萄糖几乎耗尽时,代谢副产物乳酸积累量高达 2.17 g/L,在培养后期培养基中的葡萄糖几乎被耗尽时细胞才会少量地代谢乳酸。这表明HEK-293 细胞具有较低的葡萄糖利用效率。而体外动物细胞培养过程中,乳酸积累主要是乳酸生成和乳酸消耗 2 个代谢途径综合作用的结果:一方面,大部分葡萄糖在LDHA的作用下生成乳酸,同时产生细胞快速生长所需的ATP,在这一过程中,LDHA是关键调控酶;另一方面,细胞质中的乳酸可通过乳酸转运蛋白进入线粒体,并通过线粒体LDH氧化为丙酮酸,线粒体LDHB或LDHC是乳酸消耗的主要调控酶。提高葡萄糖利用效率及有效降低培养环境中的乳酸积累,需要从降低乳酸生成和促进乳酸消耗两方面入手。

为了系统研究乳酸代谢关键基因调控对HEK-293 细胞物质和能量代谢以及HAdV生产的影响,本研究利用CRISPR/Cas9 基因编辑方法敲除*ldha*基因构建了HEK-LDHA改造细胞株(实验室冻存),通过降低LDHA的活性减少乳酸生成。此外,本研究通过过表达*ldhb*和*ldhc*基因以增强细胞代谢乳酸的能力,筛选获得了HEK-LDHB、HEK-LDHC和HEK-LDHC1 三株重组单克隆细胞株。

基于乳酸代谢调控的基因改造对细胞最大

细胞密度的影响比较明显,尤其是*ldhc/ldhc1* 基因的过表达显著促进了培养中后期细胞的生长(图 5)。葡萄糖消耗相差不大,但乳酸的积累显著降低(图 6),乳酸对葡萄糖得率显著下降,表明基于乳酸代谢调控的基因改造有效提高了葡萄糖的利用效率,更多葡萄糖代谢生成的丙酮酸或乳酸代谢转化的丙酮酸进入TCA循环。谷氨酰胺消耗也相差不大,这与葡萄糖和谷氨酰胺代谢相关的现象一致,但氨积累的减少比较意外,氨主要由谷氨酰胺代谢生成,如果谷氨酰胺消耗相似,氨的积累量也应该相似,但本研究中氨的积累在第 5 天出现明显下降,氨对谷氨酰胺得率显著下降,表明基于乳酸代谢调控的基因改造很可能触发了氨的消耗代谢途径,乳酸和氨的代谢调控存在一定的相关性,这有待于进一步证实。此外,与对照细胞相比,改造细胞株的ATP生成速率,ATP/O₂ 比率,ATP/ADP比值和NADH值均有所提升(表 5,图 7-8),表明调控后可能有更多的丙酮酸进入TCA循环产生ATP,改造细胞株的能量代谢更旺盛。基因改造明显提高了HEK-293 细胞HAdV的生产能力,以*ldhc*和*ldhc1* 基因对HEK-293 细胞HAdV生产能力的调控最显著(图 9)。此外,表征能量状态的ATP/O₂ 和ATP/ADP比值以及NADH值均明显提高,能量代谢效率更高。病毒的复制依赖于宿主细胞的物质和能量代谢状态,基于乳酸代谢调控的基因改造有效提高了HEK-293 细胞的物质和能量代谢效率,促进了细胞生长,从而明显提高了HAdV的生产能力。

综上所述,基于乳酸代谢调控的基因改造可明显促进 HEK-293 细胞的生长,提高葡萄糖和谷氨酰胺的代谢效率,降低乳酸和氨的积累,有效改善细胞的能量代谢状态,并由此显著提高了细胞的 HAdV 生产能力。比较 3 种基因改造,*ldhc* 和 *ldhc1* 基因过表达对细胞生长、物

质和能量代谢以及 HAdV 生产的调控最显著。本文系统地评价了乳酸代谢的 3 个关键调控蛋白 LDHA、LDHB 和 LDHC 对 HEK-293 细胞生长、物质和能量代谢及 HAdV 生产的影响,为乳酸代谢工程调控及单基因代谢调控研究提供了理论依据。后续可以根据本文得出的调控策略,进行多基因调控,将进一步提高 HEK-293 细胞生产 HAdV 病毒的能力。

REFERENCES

- [1] LASARO MO, ERTL HC. New insights on adenovirus as vaccine vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17(8): 1333-1339.
- [2] HAUT LH, ERTL HCJ. Obstacles to the successful development of an efficacious T cell-inducing HIV-1 vaccine[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 86(4): 779-793.
- [3] HILL AVS, REYES-SANDOVAL A, O'HARA G, EWER K, LAWRIE A, GOODMAN A, NICOSIA A, FOLGORI A, COLLOCA S, CORTESE R, GILBERT SC, DRAPER SJ. Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects[J]. *Human Vaccines*, 2010, 6(1): 78-83.
- [4] WATANABE M, NISHIKAWAJI Y, KAWAKAMI H, KOSAI KI. Adenovirus biology, recombinant adenovirus, and adenovirus usage in gene therapy[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2502.
- [5] NADEAU I, KAMEN A. Production of adenovirus vector for gene therapy[J]. *Biotechnology Advances*, 2003, 20(7/8): 475-489.
- [6] KROEMER G, POUYSSEGUR J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
- [7] PETCH D, BUTLER M. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1994, 161(1): 71-76.
- [8] AHN WS, ANTONIEWICZ MR. Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 598-609.
- [9] WARBURG O. The metabolism of carcinoma cells[J]. *The Journal of Cancer Research*, 1925, 9(1): 148-163.
- [10] WARBURG O. On the origin of cancer cells[J]. *Science*, 1956, 123(3191): 309-314.
- [11] MARANGA L, AUNINS JG, ZHOU WC. Characterization of changes in PER.C6 cellular metabolism during growth and propagation of a replication-deficient adenovirus vector[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 90(5): 645-655.
- [12] SHARON D, KAMEN A. Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(1): 25-40.
- [13] CARINHAS N, KOSHKIN A, PAIS DAM, ALVES PM, TEIXEIRA AP. ¹³C-metabolic flux analysis of human adenovirus infection: implications for viral vector production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(1): 195-207.
- [14] XIE L, MIAO JQ, LI XC, YI XP, CHU J. Regulation of the pyruvate metabolism node by monogene and polygene engineering of HEK-293 cells[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(61): 35760-35770.
- [15] WONG TL, CHE N, MA S. Reprogramming of central carbon metabolism in cancer stem cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863(7): 1728-1738.
- [16] YOUNG JD. Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(6): 1108-1115.
- [17] GLADDEN LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium[J]. *The Journal of Physiology*, 2004, 558(Pt 1): 5-30.
- [18] HASHIMOTO T, HUSSIEN R, OOMMEN S, GOHIL K, BROOKS GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2007, 21(10): 2602-2612.
- [19] VALVONA CJ, FILLMORE HL, NUNN PB, PILKINGTON GJ. The regulation and function of lactate dehydrogenase A: therapeutic potential in brain tumor[J]. *Brain Pathology(Zurich, Switzerland)*, 2016, 26(1): 3-17.
- [20] LI J, ZHU SC, TONG J, HAO H, YANG J, LIU ZK, WANG YX. Suppression of lactate dehydrogenase A compromises tumor progression by downregulation of the Warburg effect in glioblastoma[J]. *Neuroreport*, 2016, 27(2): 110-115.
- [21] RODRIGUES AF, GUERREIRO MR, FORMAS-

- OLIVEIRA AS, FERNANDES P, BLECHERT AK, GENZEL Y, ALVES PM, HU WS, COROADINHA AS. Increased titer and reduced lactate accumulation in recombinant retrovirus production through the down-regulation of HIF1 and PDK[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(1): 150-162.
- [22] BRISSON L, BANSKI P, SBORINA M, DETHIER C, DANHIER P, FONTENILLE MJ, HEE VF, VAZEILLE T, TARDY M, FALCES J, BOUZIN C, PORPORATO PE, FREDERICK R, MICHIELS C, COPETTI T, SONVEAUX P. Lactate dehydrogenase B controls lysosome activity and autophagy in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(3): 418-431.
- [23] HUA YB, LIANG C, ZHU JD, MIAO CK, YU YJ, XU AM, ZHANG JZ, LI P, LI S, BAO ML, YANG J, QIN C, WANG ZJ. Expression of lactate dehydrogenase C correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma[J]. *Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2017, 39(3): 1010428317695968.
- [24] GOLDBERG E, EDDY EM, DUAN CW, ODET F. LDHC: the ultimate testis-specific gene[J]. *Journal of Andrology*, 2010, 31(1): 86-94.
- [25] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] PELZMANN B, HALLSTRÖM S, SCHAFFER P, LANG P, NADLINGER K, BIRKMAYER GD, VRECKO K, REIBNEGGER G, KOIDL B. NADH supplementation decreases pinacidil-primed I K ATP in ventricular cardiomyocytes by increasing intracellular ATP[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2003, 139(4): 749-75.

(本文责编 陈宏宇)