

# 抗凋亡基因*bcl-xl*过表达提高工程细胞IVCC及目的蛋白表达的研究

何太平\* 唐菁燕 宋春雷 聂艳桃 雷 韬 杨 波

(成都蓉生药业有限责任公司抗体药物开发研究室, 成都 610041)

**摘要** 用无血清培养基或化学成分明确的培养基生产治疗用重组蛋白已成为趋势。然而, 在此条件下凝血因子、糖蛋白激素等微量糖蛋白的表达十分困难, 其主要原因之一是在细胞培养过程中工程细胞大量凋亡造成的细胞密度低和生存期短。通过将早期抗凋亡基因导入工程细胞并进行过表达可改善工程细胞的活细胞密度积分(integral viable cell concentration, IVCC), 提高表达量。该研究将*bcl-xl*基因导入工程细胞, 筛选其高表达细胞株, 并验证工程细胞的抗凋亡能力, 获得了稳定表达抗凋亡蛋白和目的蛋白的工程细胞株。与母细胞相比, 稳定表达Bcl-xL的工程细胞的IVCC提高了50%, 最终目的蛋白表达增加超过200%, 显示抗凋亡基因*bcl-xl*的过表达可改善工程细胞在无血清悬浮培养过程中的细胞凋亡, 提高表达量, 为表达人凝血因子、糖蛋白激素等微量糖蛋白奠定了基础。

**关键词** 细胞凋亡; Bcl-xL; CHO细胞; 无血清培养基; 糖蛋白; 表达

在哺乳动物细胞内, 复杂的糖蛋白能很好地进行折叠、组装和翻译后修饰, 在分子结构、理化性质和生物学功能等方面与天然蛋白质很接近。动物细胞特别是中国仓鼠卵巢细胞(CHO)是其主要的表达细胞, 目前大部分上市的复杂蛋白药物是由CHO细胞表达的<sup>[1-3]</sup>。但是, 由于动物细胞生长较慢, 细胞密度相对较低, 使其生产成本较高, 生产能力不能满足市场需求。目前的研究主要是通过: (1)载体设计实现定点整合<sup>[4-6]</sup>或加入表达调控元件<sup>[7]</sup>, 促进基因表达; (2)优化培养工艺包括基础培养基、补料培养基及补料策略和工艺参数, 提高表达量; (3)通过细胞工程的方法导入或敲除影响细胞代谢、生长和凋亡的基因, 提高细胞的生长密度、生存期, 进而实现目的蛋白的高表达<sup>[8-9]</sup>。

细胞培养工艺经历了从有血清培养基到无血清培养基, 从有蛋白培养基到无蛋白培养基以及目前为大众普遍接受的化学成分确定的培养基(chemical-defined medium)的发展历程。然而, 在CHO工程细胞大规模无血清培养过程中, 由于缺少血清中的一些蛋白保护成分和生长因子, 随着营养物质的损耗、毒素的累积以及剪切力的作用, 使得工程细胞在培养的中后期大量凋亡<sup>[10]</sup>, 细胞存活率和密度

下降严重、细胞培养周期缩短、产率降低、成本增高。对宿主细胞进行基因改造使其具有更强的抗凋亡能力以延长细胞生存期, 从而提高细胞密度是提高目的蛋白表达量的重要策略之一。Bcl-2(B-cell lymphoma-2)蛋白家族在细胞凋亡发生早期起着重要的调控作用, Bcl-xL蛋白属于Bcl-2蛋白家族, 位于线粒体外膜并可与caspase结合, 通过阻止细胞色素C的释放和抑制caspase激活而抑制凋亡发生<sup>[11]</sup>。目前的研究也证实, 过表达*bcl-xl*基因能使CHO细胞获得抗凋亡能力, 提高重组抗体表达量。与Bcl-2蛋白相比, Bcl-xL蛋白保护细胞免于死亡的能力更强<sup>[9,12]</sup>。微量蛋白如凝血因子、糖蛋白激素等的重组表达较抗体难度更大, 表达量低, 关于表达此类蛋白的工程细胞改造却鲜有报道。

本研究在我们现有的表达糖蛋白激素FSH的工程细胞株中导入*bcl-xl*基因, 通过克隆筛选获得*bcl-xl*基因和目的产物高表达的细胞株, 并通过与未导入*bcl-xl*基因的母细胞比较, 分析评价其对细胞生长和表达的影响, 为凝血因子、糖蛋白激素等微量复杂蛋白的高表达奠定了基础。

收稿日期: 2012-03-06

接受日期: 2012-04-19

\*通讯作者。Tel: 028-84418129, E-mail: taipinghe@hotmail.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pcDNA3质粒、阳离子脂质体转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; 限制性内切酶及各种修饰酶购自TaKaRa公司; 胎牛血清(FBS)购自PAA公司; HyQSFM4 CHO无血清培养基购自Hyclone公司; RIPA细胞裂解液购自碧云天生物技术研究; BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo公司; Bcl-xL单克隆抗体购自Cell Signaling公司; 碱性磷酸酶标记的抗兔IgG购自Sigma公司; 蛋白分子量标准购自Bio-Rad公司; NBT/BCIP显色底物、DAPI染料、细胞凋亡原位检测试剂盒、蛋白酶抑制剂均购自Roche公司。

### 1.2 质粒pcDNA3/*bcl-xl*的构建

从基因库中获得鼠*bcl-xl*基因, 在其5'端和3'端分别设计*Apa* I和*EcoR* I内切酶位点, 由Invitrogen公司全基因合成后克隆到pcDNA3质粒上得到质粒pcDNA3/*bcl-xl*, 并经双酶切鉴定和测序分析。

### 1.3 真核细胞转染

人促卵泡激素(FSH)工程细胞株(CHO-FSH)由本室构建并液氮保存<sup>[13]</sup>。工程细胞从液氮中复苏后, 立即悬浮于30 mL无血清培养基中, 其中含2.0 g/L NaHCO<sub>3</sub>、4 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1% Fluronic 68 (Sigma公司)。于37 °C、摇床转速120 r/min进行无血清悬浮培养。取对数生长期CHO-FSH细胞4×10<sup>6</sup>个, 离心去上清后重悬于400 μL新鲜培养基中, 加入上述表达质粒4 μg。置于电转杯中, 240 V、25 Ω、50 μF电转。4 °C静置5 min, 移入T25细胞培养瓶中37 °C放置过夜。培养过夜后将细胞分置于96孔板中, 用含500 μg/mL G418的筛选培养基37 °C培养, 每4天更换新培养液直到克隆出现。用ELISA法检测和分析克隆上清中FSH的含量<sup>[13]</sup>。

### 1.4 细胞株的筛选及Bcl-xL的表达分析

阳性细胞克隆从96孔板→24孔板→T25细胞方瓶→Flask摇瓶进行逐步筛选和放大培养, 并检测FSH的表达量。选择表达水平高、细胞形态和生长情况好的细胞株进行扩大培养, 并冻存。筛选到的细胞株命名为CHO-FSH/Bcl-xL。

取无血清悬浮培养的对数生长期CHO-FSH/Bcl-xL和CHO-FSH细胞1×10<sup>7</sup>个, 800 r/min离心5 min, 弃上清。PBS洗涤, 离心, 弃上清。用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液于4 °C消化并裂解细胞30 min, 12 000 r/min、

4 °C离心20 min, 取上清液。用BCA蛋白测定试剂盒测定上清中的总蛋白质浓度。取20 μg总蛋白的上清样品, 加入4×上样缓冲液, 100 °C加热10 min, 制备为待测样品。

12% SDS-PAGE电泳分离上述蛋白质样品后湿法转至PVDF膜上, 用封闭液(含5% FBS和5% BSA)室温下封闭膜1 h, 将膜置于兔抗鼠Bcl-xL单抗中(1:1 000), 4 °C孵育过夜。洗涤后放入含有碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG(1:5 000)中, 室温孵育30 min, 洗涤, NBT/BCIP显色。

### 1.5 工程细胞的抗凋亡分析

DAPI染色: 取悬浮培养的CHO-FSH/Bcl-xL和CHO-FSH细胞各2×10<sup>5</sup>个, 接种于96孔板, 无血清静置培养。培养基中加入2 μmol/L Staurosporine(Sigma公司)、1 μg/mL DAPI, 37 °C孵育。分别在3, 5, 16 h时, 于荧光显微镜下观察、拍照并记录。

原位细胞凋亡检测: 取悬浮培养的CHO-FSH/Bcl-xL和CHO-FSH细胞各2×10<sup>5</sup>个, 接种于96孔板, 添加10% FBS, 37 °C孵育6 h, 使细胞贴壁。加入2 μmol/L Staurosporine后孵育16 h, 诱导凋亡(未诱导组作为对照)。应用原位细胞凋亡检测试剂盒, 按照试剂盒操作步骤进行细胞凋亡检测。荧光显微镜观察和拍照并记录。

### 1.6 工程细胞株的生长和表达分析

取对数生长期的CHO-FSH/Bcl-xL和CHO-FSH细胞按4×10<sup>5</sup>/mL接种于30 mL无血清培养基中, 于37 °C、摇床转速120 r/min进行悬浮培养。每天定时取样计数活细胞数, 测定上清中FSH的表达量, 绘制细胞生长曲线和表达曲线。

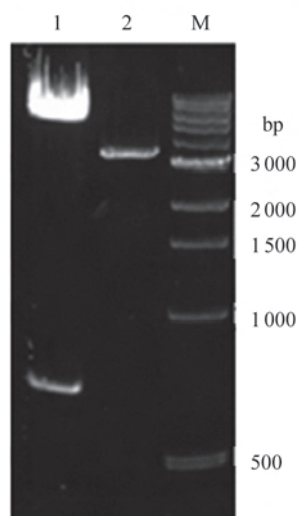
## 2 结果

### 2.1 质粒pcDNA3/*bcl-xl*的鉴定

质粒pcDNA3/*bcl-xl*经*Apa* I和*EcoR* I双酶切, 凝胶电泳分析, 可见700 bp的特异性片段, 大小与预期相符(图1)。测序结果证明序列正确。

### 2.2 Bcl-xL高表达株的筛选和建立

由于通过直接测定Bcl-xL的表达筛选细胞株较困难, 故本研究采用测定目的蛋白FSH的表达情况的方式间接筛选Bcl-xL高表达细胞株。含*bcl-xl*基因的表达质粒pcDNA3/*bcl-xl*转染工程细胞株CHO-FSH后, 接种于96孔板中, 共960孔。挑选镜检生长状态良好的36株克隆, ELISA检测FSH的表达量。根据检测

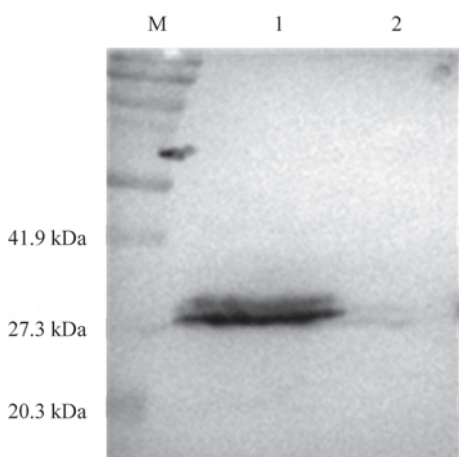


1: 质粒双酶切产物; 2: 未经酶切的质粒; M: 1 Kb DNA标准。  
1: double digested profile of plasmid; 2: undigested profile of plasmid;  
M: 1 Kb DNA ladder marker.

图1 质粒pcDNA3/bcl-xl双酶切图谱(*Apa* I/*Eco*R I)

Fig.1 Restriction map of plasmid pcDNA3/bcl-xl digested with *Apa* I and *Eco*R I

值和细胞状况, 从中挑选24孔克隆接种于24孔板中, 加入750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418进一步加压筛选。挑选能耐受更高浓度G418的6株细胞进入摇瓶培养。摇瓶培养后的细胞与原CHO-FSH工程细胞对比评价, 获得了细胞生长状况明显优于原始细胞的CHO-FSH/Bcl-xL-3E5, 命名为CHO-FSH/Bcl-xL。Western blot特



M: 蛋白质分子量标准; 1: CHO-FSH/Bcl-xL; 2: CHO-FSH。  
M: protein molecular standard marker; 1: CHO-FSH/Bcl-xL; 2: CHO-FSH.

图2 Bcl-xL蛋白的Western blot分析

Fig.2 Analysis of Bcl-xL expression by Western blot

异性检测胞内的Bcl-xL蛋白水平, 结果显示, CHO-FSH/Bcl-xL细胞内的Bcl-xL蛋白表达量明显高于CHO-FSH细胞(图2)。

### 2.3 CHO-FSH/Bcl-xL抗凋亡能力分析

用DAPI染料对CHO-FSH/Bcl-xL及CHO-FSH悬浮细胞进行活细胞染色。培养基中加入2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Staurosporine用于诱导细胞凋亡, 结果显示(图3), 诱导凋亡5 h后, CHO-FSH/Bcl-xL及CHO-FSH细胞核均匀, 均无明显凋亡; 诱导16 h后, CHO-FSH组细胞核固缩, 核染色质浓缩, 出现明显的凋亡小体, 其凋亡程度较同样条件诱导的CHO-FSH/Bcl-xL细胞严重。说明CHO-FSH/Bcl-xL细胞具有更强的抗凋亡能力。

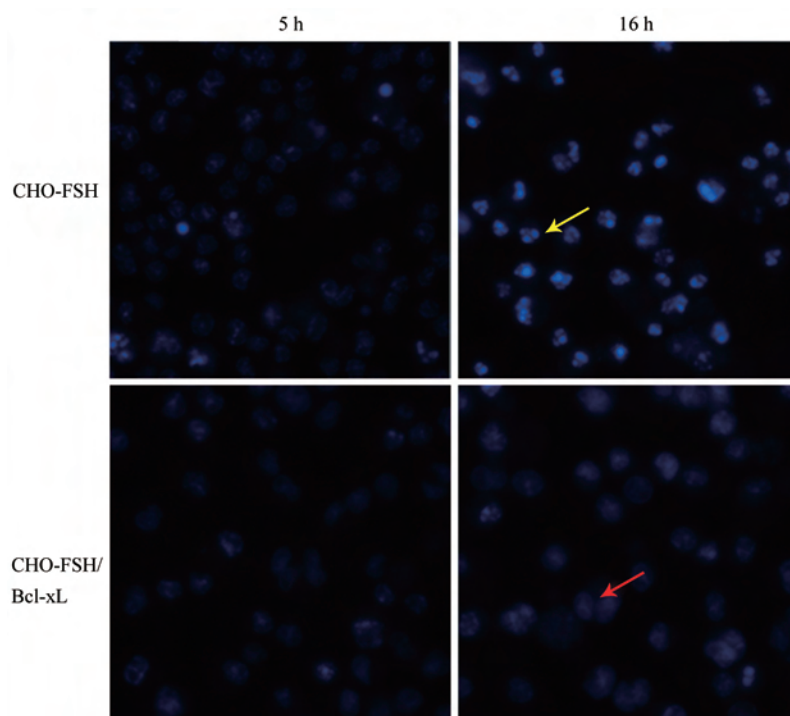
本研究采用原位末端转移酶标记技术(TUNEL检测)进一步直观验证了CHO-FSH/Bcl-xL细胞的抗凋亡能力。结果显示(图4), 明场光对照说明CHO-FSH/Bcl-xL和CHO-FSH细胞的数目及状态一致, 诱导处理16 h后, CHO-FSH细胞的荧光强度及产生荧光的细胞数均明显高于CHO-FSH/Bcl-xL细胞。此结果表明, 在诱导凋亡处理后, CHO-FSH组凋亡细胞的数目以及凋亡细胞中的DNA断链缺口程度均高于CHO-FSH/Bcl-xL细胞, CHO-FSH/Bcl-xL能更好地对抗凋亡。

### 2.4 活细胞密度积分分析

活细胞密度积分(integral viable cell concentration, IVCC)是衡量工程细胞活细胞峰值和细胞寿命的重要指标。将CHO-FSH/Bcl-xL与CHO-FSH细胞经摇瓶培养, 定时取样计数获得的IVCC如图5所示。细胞培养前期, CHO-FSH/Bcl-xL与CHO-FSH生长情况接近, 从第5天开始出现差异, 且差别逐渐增大, 第10天时CHO-FSH/Bcl-xL的活细胞积分可达 $39 \times 10^6/(\text{mL} \cdot \text{day})$ , 较CHO-FSH提高50%, IVCC得到明显改善。

### 2.5 Bcl-xL高表达株的FSH表达分析

生长状态相同的CHO-FSH/Bcl-xL和CHO-FSH细胞株按 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于30 mL新鲜的无血清培养基中, 每天定时取样并收集上清。上清冻存于 $-20^\circ\text{C}$ , 待收液完成后, ELISA检测上清中重组FSH的表达量。整个收液过程中Bcl-xL高表达细胞株CHO-FSH/Bcl-xL的FSH表达量(最高约12 U/mL)均明显高于CHO-FSH细胞, 而CHO-FSH最高仅为3.7 U/mL, 见图6。

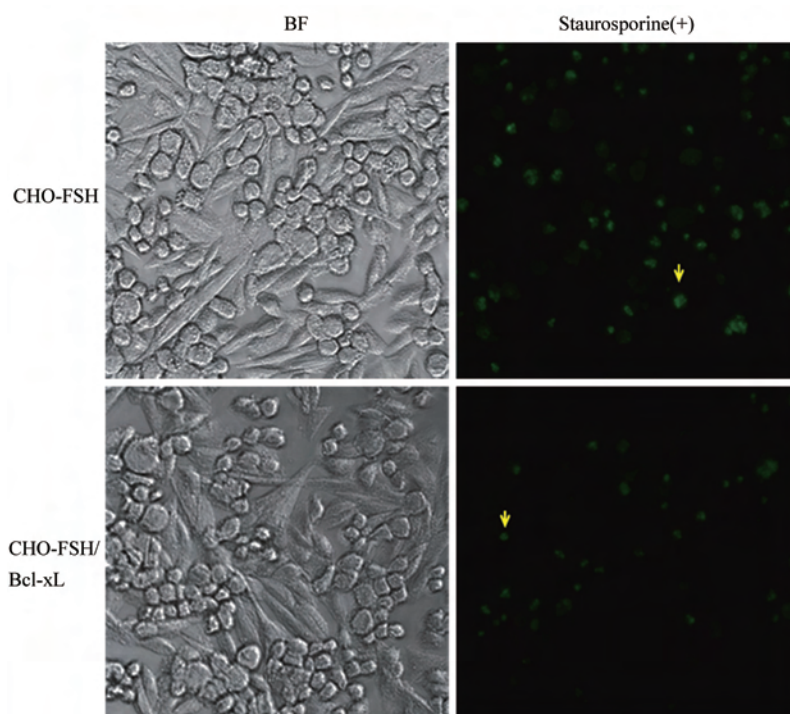


黄色箭头所示为明显凋亡的细胞, 红色箭头所示为核质较均匀的正常细胞。

The yellow arrow indicates the apoptotic cell, and the red arrow indicates non-apoptotic cell with uniform nucleoplasm.

图3 DAPI染色分析工程细胞株的抗凋亡能力(400×)

Fig.3 Anti-apoptosis analysis of cell line transfected with *bcl-xl* gene by DAPI(400×)



BF为明场光对照, 说明两株细胞在诱导处理前细胞密度一致, staurosporine(+)为诱导凋亡的实验组。黄色箭头指示产生DNA缺口的凋亡细胞。

BF (bright field control) indicates that the cell densities of CHO-FSH and CHO-FSH/Bcl-xL are similar before inducing apoptosis. Staurosporine(+) indicates cells were treated with 2  $\mu\text{mol/L}$  staurosporine for 16 h to induce apoptosis. Yellow arrows indicate apoptotic cells with DNA fragmentation.

图4 TUNEL原位杂交分析工程细胞的抗凋亡能力(400×)

Fig.4 Anti-apoptosis confirmation for cell line over-expressing *bcl-xl* gene by TUNEL *in situ*(400×)

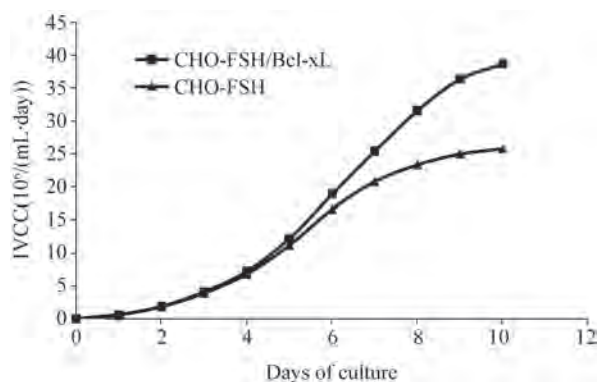


图5 CHO-FSH和CHO-FSH/Bcl-xL细胞株活细胞密度积分曲线

Fig.5 IVCC of CHO-FSH and CHO-FSH/Bcl-xL cell lines



图6 CHO-FSH和CHO-FSH/Bcl-xL细胞的FSH表达曲线

Fig.6 FSH expression levels in CHO-FSH and CHO-FSH/Bcl-xL cell lines

### 3 讨论

重组蛋白表达系统包括原核系统、酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统以及转基因植物和动物。近年来,植物细胞表达系统已取得了实质性进展<sup>[14]</sup>。然而,复杂糖蛋白如抗体、凝血因子、糖蛋白激素等则需要在动物细胞中进行表达,获得正确的折叠和翻译后修饰才能具有生物学活性。目前,由于大规模悬浮培养工艺的发展,抗体的表达已达10 g/L,而凝血因子、糖蛋白激素等微量蛋白的表达则较难,表达水平也较低<sup>[6,13]</sup>。为了避免动物源性添加剂在细胞培养过程中污染制品的风险,培养基的发展经历了无血清培养基→无蛋白培养基→化学成分明确的培养基的历程。然而,我们在研究中发现,不同于抗体生产,表达这些微量蛋白的工程细胞在无血清培养基中很难生长达到较高的细胞密度,进而造成表达低、产量有限、不易实现产业化,这也是制约

我国同类药物研发的技术瓶颈之一。

虽然该类微量蛋白固有的特性使其表达困难且表达水平低,但该类药物的用量也相对较低。因此,通过表达载体设计、细胞工程和培养工艺优化等技术手段较大幅度提高目的蛋白单位体积的表达量具有重要的意义。利用基因工程技术,在宿主细胞内导入抑制细胞凋亡的基因,可以延长细胞生长期、提高细胞密度,最终增加目的蛋白的表达。目前的大量研究表明,在表达抗体的哺乳动物细胞中引入抗凋亡基因,可以使细胞更强壮,增强细胞对不良环境的耐受能力、改变细胞某些代谢途径、提高细胞活性、增加抗体的表达量。该技术已应用于重组抗体的大规模生产,而在用于提高重组微量蛋白表达方面的相关研究却很少。在本研究中,我们将早期抗凋亡基因*bcl-xl*导入表达糖蛋白激素FSH的工程细胞中,经Western blot验证*bcl-xl*基因成功地转入了原工程细胞内,并在细胞内过表达Bcl-xL蛋白。抗凋亡分析进一步证实,表达抗凋亡蛋白的细胞能够更好地对抗凋亡,延长细胞生长周期和提高细胞密度,从而提高目的蛋白的表达水平。

稳定表达Bcl-xL和目的蛋白的工程细胞在对数生长期以及培养前期与母细胞的生长速度一致,说明抗凋亡蛋白对细胞生长无影响。在培养的中后期,细胞开始出现凋亡,此时可以明显观察到Bcl-xL蛋白的抗凋亡作用,CHO-FSH/Bcl-xL组IVCC提高了50%,最终目的蛋白表达增加超过200%,该结果显示抗凋亡基因*bcl-xl*的过表达可改善工程细胞在无血清悬浮培养过程中的细胞凋亡情况,延长细胞的生存期,提高细胞密度进而提高表达量。

在今后的工作中我们将进一步关注过表达Bcl-xL的工程细胞在生物反应器中的表现,并对其代谢进行分析进而设计和优化培养工艺,为下一步表达及工业化生产人重组凝血因子、糖蛋白激素等微量蛋白奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010; 28(9): 917-24.
- Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC, Lokteff M, Klinguer-Hamour C, Haeuw JF, *et al.* Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 2008; 9(6): 482-501.
- Omasa T, Onitsuka M, Kim WD. Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr Pharm Biotechnol*

- 2010; 11(3): 233-40.
- 4 Kito M, Itami S, Fukano Y, Yamana K, Shibui T. Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 60(4): 442-8.
- 5 Huang Y, Li Y, Wang YG, Gu X, Wang Y, Shen BF. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *J Immunol Methods* 2007; 322(1/2): 28-39.
- 6 何太平, 杨波, 谭晓晶, 唐菁燕, 雷韬, 宋春雷, 等. 重组复杂蛋白的快速表达体系的建立. *中国生物制品学杂志(He Taiping, Yang Bo, Tan Xiaojing, Tang Jingyan, Lei Tao, Song Chunlei, et al. Rapid production of recombinant complex proteins. Chinese Journal of Biologicals)* 2011; 24(11): 1259-63
- 7 Girod PA, Zahn-Zabal M, Mermoud N. Use of the chicken-lysozyme 5' matrix attachment region to generate high produce rCHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91(1): 1-11.
- 8 Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93(3): 917-30.
- 9 Dorai H, Ellis D, Keung YS, Campbell M, Zhuang M, Lin C, et al. Combining high-throughput screening of caspase activity with anti-apoptosis genes for development of robust CHO production cell lines. *Biotechnol Prog* 2010; 26(5): 1367-81.
- 10 Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Sterphanopoulos GN, Wang DI. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 1999; 62(6): 632-40.
- 11 Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria. *Genes Cells* 1998; 3(11): 697-707.
- 12 Figueroa B Jr, Chen S, Oyler GA. Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85(6): 589-600.
- 13 何太平, 唐菁燕, 徐珑, 宋春雷, 谭晓晶, 聂艳桃, 等. 重组人促卵泡刺激素在CHO细胞中的表达. *中国生物制品学杂志(He Taiping, Tang Jingyan, Xu Long, Song Chunlei, Tan Xiaojing, Nie Yantao, et al. Expression of human follicular stimulating hormones in CHO cells. Chinese Journal of Biologicals)* 2011; 24(12): 1409-12.
- 14 Williams SC. Drugmaker reaps what it sows with first plant-made biologic. *Nat Med* 2012; 18(1): 5.

## Improvement of IVCC and Increase of Productivity by Over-expression of *bcl-xl* Gene in Recombinant Cell Line

He Taiping\*, Tang Jingyan, Song Chunlei, Nie Yantao, Lei Tao, Yang Bo  
(Chengdu Rongsheng Pharmaceuticals Company, Ltd., Chengdu 610041, China)

**Abstract** Serum-free medium and chemical-defined medium are widely used for large-scale commercial production of therapeutic proteins. However, recombinant glycoproteins like coagulation factors and glycoprotein hormones are not expressed efficiently in these media. One of the most important reasons for this low productivity is due to apoptosis of cells during the cell culture process, which subsequently causes the low viable cell concentration and the short culture longevity. Over-expression of anti-apoptotic gene in the recombinant cells can improve IVCC (integral viable cell concentration), and therefore, increase the productivity. In this study, *bcl-xl* gene was transferred into an established CHO-FSH cell line. CHO-FSH/Bcl-xL, a stable clone expressing Bcl-xL protein and the interested protein, was developed by screening high-producing clone and investigating its anti-apoptosis ability. Compared with the parental cell line, IVCC of the cell line over-expressing *bcl-xl* gene was 150%, and its productivity increased over 200%. These results demonstrated that expression of anti-apoptotic gene *bcl-xl* could alleviate apoptosis, enhance culture performance and increase productivity under serum-free suspension cell culture, which suggested that this strategy could be used for large-scale producing trace glycoproteins including coagulation factors and glycoprotein hormones in serum-free suspension conditions.

**Key words** apoptosis; Bcl-xL; Chinese hamster ovary cell; serum-free medium; glycoprotein; expression

Received: March 6, 2012 Accepted: April 19, 2012

\*Corresponding author. Tel: 86-28-84418129, E-mail: taipinghe@hotmail.com