

# 抗凋亡策略在细胞大规模培养中的应用\*

王贤辉 米 力\*\*

(第四军医大学细胞工程研究中心 西安 710033)

**摘 要** 随着阐明凋亡发生的分子机制,现在可运用多种方法阻止细胞凋亡的发生。在大规模细胞培养过程中应用这些方法可促进细胞的存活,实现细胞大规模高密度培养,从而提高细胞生产有价值生物技术产品的能力。

用生物反应器进行动物细胞大规模生产过程中,细胞凋亡在细胞死亡中占主要部分。随着阐明凋亡发生的分子机制,现在可运用营养、基因、化学物质等多种方法抑制凋亡的发生,促进细胞的生存活力,延长细胞在规模培养过程中的有效培养时相,实现动物细胞的大规模高密度培养。

## 一、凋亡与细胞大规模培养的关系

本文所述的细胞大规模培养是指在体外用生物反应器进行动物细胞规模化培养,生产有价值的蛋白产品。动物细胞被用于宿主细胞,因为许多治疗性蛋白的功能需要翻译后修饰,而只有在哺乳动物细胞中才可以表达具有正确的翻译后修饰、有生物活性的蛋白。由于细菌生产系统有其自身的限制性,而使真核细胞生产系统广泛地被应用,来产生需进行翻译后修饰的生物活性蛋白。但是真核细胞与细菌相比,培养周期长、培养环境要求高、细胞非常脆弱。此外,大规模培养的外部环境易引起动物细胞的死亡,起初认为由于营养、温度、pH、代谢产物及细胞连续暴露于流体压力下等条件而引起的细胞坏死,但最近研究显示在大规模培养生物反应器中细胞的死亡中 80% 是凋亡所导致,而不是以前所认为的坏死。而在大规模细胞培养中,细胞死亡是维持细胞高活性和高密度的最大障碍。理论上讲,防止或延缓细胞死亡,可以极大提高生物反应器中细胞的培养密度和延长培养时间。细胞凋亡由一系列基因精确地调控,是多细胞生物发育和维持稳态所必需的生理现象。已知凋亡的最终执行者是 Caspase 家族,它们均为半胱氨酸蛋白酶,各识别一个 4 氨基酸序列,并在识别序列 C 端天冬氨酸残基处将底物切断。Caspase 含有可被自身识别的序列,可以切割活化自身而导致信号放大,并作用于下游 Caspase 成员,从而形成 Caspase 家族的级联放大,

最终作用于效应蛋白,引起细胞凋亡<sup>[1,2]</sup>。杂交瘤细胞、骨髓瘤和 CHO 细胞等工程细胞在大规模培养时受到外界刺激主要以凋亡型式死亡,所以在大规模培养时干扰细胞在培养中凋亡的发生,提高细胞特异性抵制遇到压力而引起凋亡的能力。因此,从抗细胞凋亡角度,改进培养体系和提高细胞的培养密度、延长细胞的培养周期,有可能提高目标产品的产量 2-3 倍<sup>[3]</sup>。

## 二、营养物质抗凋亡

在常规生物反应器构造中,营养耗竭或缺乏培养基中特殊的生长因子则引起凋亡,例如血清、糖或特殊氨基酸的耗尽。有人观察到在 D5 杂交瘤细胞中消耗谷氨酰胺与凋亡的关系,而半胱氨酸的耗尽启动 NS/O 骨髓瘤的 PCD<sup>[4]</sup>。因此,培养时氨基酸缺乏可引起杂交瘤细胞的凋亡。其他工程细胞包括 HeLa, HL-60 随着营养耗竭将阻止细胞增殖而不引起凋亡。培养基中添加氨基酸或其他关键营养可抑制凋亡、延长培养时间从而提高在价值蛋白产品的生产,因为产生蛋白是有活性细胞群的基本功能。最近研究表明杂交瘤在饥饿状态下诱导的细胞边缘性凋亡可被单一氨基酸挽救,如丝氨酸、组氨酸、甚至氨基酸类似物<sup>[5]</sup>。但培养液的添加并不一定促进细胞的生产,有人观察到在营养较差的培养基中杂交瘤单个细胞产生单抗的量最高,但整体抗体的产生与营养充足的培养基相比则减少,这是因为营养缺乏引起凋亡增加。抗体和其他异源性蛋白在细胞生长抑制或生长缓慢时产量最高,因为抗体或外源蛋白与细胞自身组成性蛋白的合成形成竞争,当

\* 基金项目:动物细胞大规模高效培养中试技术平台的建立(2002AA2Z344A)。

\*\* 通讯作者。E-mail: cherc2@fmmu.edu.cn

细胞增殖抑制时,细胞大部分资源用于外源蛋白的合成而不是增殖。控制营养补充和细胞周期抑制策略限制了细胞生长、促进细胞生产但可刺激 PCD 的发生。因此,在生物反应器操作策略中,必须在提供充足营养确保细胞生存的同时使细胞处于某一状态促进有效的生产目的蛋白<sup>[6]</sup>。

### 三、基因抗凋亡

与凋亡相关的一系列基因产物可对其进行正、负向的调控,因此可通过导入相应基因来调节细胞凋亡的机制。Bcl-2 基因是目前最为有效的抗凋亡基因,在多种细胞系中均表现出很强的抗凋亡活性。该基因定位于线粒体上,其功能是维持线粒体膜的完整性,阻止线粒体膜整合蛋白的释放,尤其是细胞色素 C 的释放,从而阻断 caspase-9 的激活,最终表现出凋亡抑制活性<sup>[7,8]</sup>。最近资料显示<sup>[9]</sup>,Bcl-2 基因转染的 CHO 细胞,在正丁酸钠(可引起凋亡)的存在下,细胞培养时间显著延长,而分泌抗体的产量是原来的 3 倍。

过表达 Bcl-2 可限制或完全阻止多种类型细胞在生物反应器操作时受到如营养限制、毒物聚积、病毒感染、缺氧以及流体力等刺激而引起的凋亡。杂交瘤细胞过表达 Bcl-2 可延长细胞在生长静止时期的时间提高产量。Simpson 等<sup>[10]</sup>报道转染 Bcl-2 的 TB/C3 细胞可促细胞活力和增加抗体的滴度。ITO 等<sup>[11]</sup>报道表达 Bcl-2 的 2E3 细胞比对照细胞可提高四倍的单抗产量。鼠前列腺癌细胞 AT3 稳定整合人 Bcl-2 基因后可延长细胞活力,以及感染 Sindb's 病毒载体后重组蛋白产生的时间,异源蛋白在 AT3-BCL-2 的细胞中一周内可被观察到而感染 AT3-NEO 对照细胞仅两天。

由许多 Bcl-2 家族成员与 Bcl-2 具有相同或更好抑制凋亡的功能,如 Bcl-X<sub>L</sub> 在哺乳动物细胞中表达,具有阻止由许多种刺激包括营养缺乏、放射和糖皮质激素等所引起的凋亡。而且类似 Bcl-2 的蛋白如源于腺 E1B-19K 和源于 EB 病毒的 BHRF-1 都抗凋亡的功能。利用基因的方法阻止 caspase 的活性是一个新的研究点,因为 caspase 的激活,是凋亡效应期的保守步骤。此外一些病毒调节物已被确定可在不同细胞系中调控凋亡。CrmA 源于天花病毒、P35 源于杆状病毒两者可抑制 caspase 活性延迟由病毒感染、营养缺乏、无生长因子等刺激引起的凋亡<sup>[12]</sup>。

### 四、化学方法抗凋亡

凋亡发生时细胞许多部位发生生化物质的改变,有些变化如改变细胞氧化还原条件产生活性氧在凋亡信号阶段发生,其他的如破坏线粒体膜电位、激活 caspase 则发生在凋亡效应阶段,这在绝大多数细胞死亡中是相同的<sup>[13]</sup>。因此阻止这些生化物质的改变可能阻止或至少延迟细胞凋亡的发生,所以运用化学物质可抑制信号效应阶段的发生,被认为是抗凋亡策略之一。

已被证实,在许多情况下,活性氧介导凋亡的发生,但有现象表明 PCD 可在无氧环境条件下发生,说明自由基并不是凋亡道路中必不可少的,但是抗氧化剂能抑制凋亡。事实上 NAC [N-acetylcysteine] 和 PDTTC [pyrrolidine dithiocarbamate] 可有效阻止由 TNF $\alpha$ 、CD3 抗体和病毒感染引起的凋亡至少证明它们有延迟凋亡,增加病毒感染时蛋白的产量而用硫醇和其他抗氧化物质仅有限阻止凋亡的信号道路<sup>[14]</sup>。

在效应期阻止凋亡比在信号阶段阻止凋亡具有更广泛的应用价值,因为效应期是集中道路,其中之一的变化是线粒膜电位发生改变导致其通透性转运孔(PT)开放,使凋亡诱导因子 AIF 和细胞色素 C 释放到胞质中,激活 caspases,进一步促进细胞死亡。有阻止 PT 开放能力的化学试剂可抗凋亡。Bongkreikic acid 有上述能力,显示具有抵抗由多种刺激引起的凋亡。AT3-NEO 细胞感染 Sindbis 病毒载体后在米酵菌酸(bongkreikic acid)存在情况下,比无化学物质保护下的对照细胞生存增长两天并且可检测到异源蛋白的表达。

效应期另一关键步骤是与线粒体 PT 相关并位于其下游的 caspase 家族蛋白的激活,一旦裂解掉它们的非活性部分这些蛋白将激活内源性核酶 PAP (poly ADP-ribose polymerase)降解板层,引起其他生理变化导致降解期的发生。这些提示 Caspase 的激活代表效应的最后步骤,其后细胞将不可逆的死亡。因此能抑制这一蛋白家族活性的化学试剂被用于抗凋亡,例如 Z-VAD.fmk, YVAD.Cmk, BD-fmk 等都具有和 caspase 家族蛋白作用底物相匹配的裂解点。这些抑制剂已显示出抑制营养缺乏,抗 Fas 抗体,病毒感染等引起的 PCD<sup>[15]</sup>。目前已有十几种 Caspases 已被确定,它们每一个或多或少数在不同细胞系中对 PCD 起作用,但阻止某一 caspase 的活性对于凋亡影响较小,也许最有效阻止凋亡的策略是制造一

个多 caspase 抑制物至少对关键 caspase 抑制,运用化学试剂延迟细胞死亡延长生产细胞培养的时相已被阐明,添加这些化学试剂是一种简单有效的方法,将会被广泛应用到蛋白生产的工业中。

## 五、展 望

利用抗凋亡的策略在细胞生长、静止和死亡阶段均可延长细胞的生存期并延长培养细胞的生产时相。将来有抑制细胞凋亡能力的营养物质、基因、化学试剂会不断涌现,而且对于凋亡发生机理的阐明将会更加促进和提高细胞的生存和蛋白的生产,并且将这些方法运用到工业生产中。

## 参 考 文 献

- [1] Boise LH, Postema CE. 1993, *Cell*, **74**(4):597-608.
- [2] Golstein P. 1997, *Science*, **275**(5303):1081-1082.
- [3] Emery AN, Al-Rubeai M. 1994, *Cytotechnology*, **15**(1-3):65-71.
- [4] Mercille S, Massie B. 1994, *Cytotechnology*, **15**(1-3):117-128.
- [5] Xie L, Wang DI. 1997, *Trends Biotechnol*, **15**(3):109-113.
- [6] Franek F, Dolnikova J. 1991, *Cytotechnology*, **7**(1):33-38.
- [7] Reed JC. 1994, *J Cell Biol*, **124**(1-2):1-6.
- [8] Murphy TC. 2001, *Biotechnol Bioeng*, **75**(6):621-629.
- [9] Kim NS, Lee GM. 2000, *Biotechnol Bioeng*, **71**:184-193.
- [10] Simpson NH, Milner AN, Al-Rubeai M. 1997, *Biotechnol Bioeng*, **54**:1-16.
- [11] Itoh Y, Ueda H, Suzuki E. 1995, *Biotechnol Bioeng*, **48**:118-122.
- [12] Gagliardini V, Lee RK. 1994, *Science*, **263**(5148):826-828.
- [13] Hockenbery DM, Oltvai AN. 1993, *Cell*, **75**(2):241-251.
- [14] Chen Y, Jones DP. 2001, *Toxicol Appl Pharmacol*, **170**(3):172-180.
- [15] Kohler c, Orrenius S. 2002, *J Immunol Methods*, **265**(1-2):97-110.

# 适体及其在流式细胞术检测中的应用\*

杨明杰\*\* 周建婷

(广东省疾病预防控制中心 广州 510300)

**摘 要** 适体是一种本质为 RNA 或 DNA 的小分子,它们能以配基形式像抗体一样与靶蛋白呈高亲和力特异性结合,可在一定程度上取代抗体用于检测和治疗。就适体筛选的指数富集配基系统进化技术原理、适体的优越性及其适体在流式细胞术检测中的应用进行了综述。

核酸不仅是遗传信息的载体,有的核酸分子还具有酶的作用,如 DNA 酶(DNAzyme)和 RNA 酶(Ribozyme)等,还有的核酸分子能以配基形式特异地与靶蛋白高亲和力结合,像抗体一样具有识别和调节靶蛋白功能的作用,这种核酸分子称为适配子(Ligands),亦被形象地称为适体(Aptamers)。1990年,Gold 等<sup>[1]</sup>报道了适体的筛选方法——指数富集配基系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)技术,这一技术迅速得到广泛应用,近年更是倍受重视,不仅筛选出了凝血酶、HIV-1 衣壳蛋白、阿默茨病淀粉肽和微管蛋白等多种蛋白质的适体,还筛选出了与小肽、氨基酸、有机物、金属离子等特异结合的适体,不少报道还成功将适体用于诊断和治疗<sup>[2,3]</sup>。本文就 SELEX 技术原理及其适体在流式细胞术检测中的应用进行了综述。

## 一、SELEX 技术原理及流程

SELEX 技术的基本原理如下:在一定条件下,一些单链小分子 DNA 或 RNA 可发生适应性折叠,形成有复杂空间结构的分子,以配基的形式,通过氢键、范德华力、疏水作用等特异地与靶分子高亲和力结合,这些核酸分子即“适体”。因此,先合成一个大容量随机核酸文库,并将其扩增并转化为单链 DNA 或 RNA 分子,在一定条件下与靶分子混合,然后洗去不与靶分子结合或结合力低的核酸分子,筛

\* 基金项目:中国博士后基金(编号:2002031289)、广东省医学科学技术研究基金(编号:B2002006)资助课题。

\*\* 通讯作者。E-mail: ymingjie@sohu.com  
感谢杨杏芬、曾瑞萍教授的审校!