

用于重组蛋白药物生产的CHO细胞 无血清培养基的研究进展

李伟风^{1,2} 樊振林^{1,2} 张洹瑜^{1,2} 林艳^{1,3} 王天云^{1,2*}

(¹新乡医学院基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 新乡 453003;

²河南省重组药物蛋白表达系统国际联合实验室, 新乡 453000; ³新乡医学院护理学院, 新乡 453003)

摘要 哺乳动物表达系统因其具有类似于人源化细胞的翻译后修饰方式, 已经成为重组蛋白药物生产的主要表达系统。中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞是生产重组蛋白的理想哺乳动物细胞宿主, 目前近70%批准上市的重组蛋白药物是由CHO细胞生产的。常规细胞培养所用的培养基需要补充血清才能正常生长, 但血清存在来源批次不一、下游分离纯化困难、支原体污染潜在风险等缺点, 因此, CHO细胞生产重组蛋白药物要求必须用无血清培养基培养避免以上问题产生。近年来, 围绕无血清培养基进行了大量研究, 并取得了显著进展。该文综述了CHO细胞的特性、无血清培养基的基础成分及作用, 以及一些特殊添加剂的作用等方面的研究进展。

关键词 CHO细胞; 无血清培养基; 糖基化; 关键成分

Advances of Serum-Free Medium for CHO Cells for the Production of Recombinant Protein

LI Weifeng^{1,2}, FAN Zhenlin^{1,2}, ZHANG Huanyu^{1,2}, LIN Yan^{1,3}, WANG Tianyun^{1,2*}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; ²Henan International Joint Laboratory of Recombinant Therapeutic Protein Expression System, Xinxiang 453000, China;

³School of Nursing, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract Mammalian expression system has become the main expression system for the production of recombinant protein, due to its similarity of the post-translational modification to the human cells. CHO (Chinese hamster ovary) cells are ideal mammalian expression hosts for recombinant protein production. The medium used for routine cell culture requires supplemental serum for normal growth. However, due to the disadvantages of serum, such as different sources and batches, difficulty in downstream separation and purification, and potential risk of mycoplasma contamination. Therefore, serum-free culture medium is required for CHO cells to produce recombinant protein drugs to avoid the above problems. In recent years, a lot of researches have been performed on serum-free medium, and remarkable progress has been made. In this review, the characteristics of CHO cells, the basic components and functions of serum-free medium, and the functions of some special additives are reviewed.

Keywords CHO cells; serum-free medium; glycosylation; key component

收稿日期: 2020-10-22

接受日期: 2021-02-04

河南省高等学校重点科研项目计划(批准号: 20A350007)和河南省高校重点科研项目(批准号: 19A350008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3029488; E-mail: wtianyun@126.com

Received: October 22, 2020

Accepted: February 4, 2021

This work was supported by the Key Scientific Research Projects of Higher Education of Henan Province (Grant No.20A350007) and the Key Scientific Research Projects of Higher Education of Henan Province (Grant No.19A350008)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3029488; E-mail: wtianyun@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5523>

哺乳动物表达系统生产的重组蛋白具有类似于人源化细胞的翻译后修饰方式,常用于表达重组蛋白药物,中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞是其中最常用的,约70%的重组蛋白药物是由CHO细胞生产的^[1]。常规的细胞培养需要添加血清,但血清的成分复杂、批次不一,存在如外源病毒因子和致病因子污染、血清残留导致的过敏反应,以及细胞培养的标准化和终产品纯化难度大等缺点^[2-3],难以用于重组蛋白药物的生产。无血清培养基组成成分明确,可避免血清的不同批次或不明组分对细胞培养的影响,能在很大程度上避免或改善含血清培养基所带来的上述缺陷^[4],目前广泛用于重组蛋白药物生产过程中CHO细胞的培养。

1 CHO细胞简介

CHO细胞系最初是在中国仓鼠的卵巢组织中建立的,经过长期驯化和改造,目前已经发展出多个不同的CHO细胞系,常见的有CHO-K1、CHO-S、CHO-DXB11、CHO-DG44等^[5-6]。最原始的CHO-K1细胞是贴壁培养,需要添加5%~10%的血清才能生长,发展至今的CHO-K1细胞已驯化成适用于悬浮培养,并且多种已上市的蛋白药物都是基于CHO-K1细胞开发生产的。CHO-S细胞也是野生型细胞株,与CHO-K1都来源于最原始的CHO细胞系^[7]。驯化后的CHO-S细胞能在无血清的、化学成分确定的培养基中悬浮高密度培养,是被广泛用作重组蛋白表达的宿主细胞^[8]。CHO-DXB11细胞系(也称为DUK-XB11),是二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, *DHFR*)基因突变形成的,*DHFR*突变导致细胞不能还原叶酸,阻碍细胞生长,因此,只有成功转入外源*DHFR*基因的细胞存活下来^[9]。但随着传代次数的增加,细胞有较低概率恢复*DHFR*基因活性,而*DHFR*基因完全缺失的CHO-DG44细胞则可以避免这一问题,并且在培养基中添加甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)可以诱导细胞的*DHFR*基因及其他与双顺反子关联在一起的目的基因的扩增,从而提高重组蛋白产量^[10]。谷氨酰胺合成酶(glutamine synthesis, GS)表达系统是将外源基因插入到含有GS基因表达载体的下游,是生物制药行业广泛应用的哺乳动物表达系统之一。宿主细胞可以选择内源性表达GS基因的中国仓鼠卵巢细胞CHO-K1,CHO-K1细胞表达内源性的GS基因,因此,阳性转染子需要在蛋氨酸亚基代砜(methionine sulfoximine, MSX)加压和无

谷氨酰胺培养基的双重筛选中获得。实验证明,采用GS筛选系统的CHO-K1细胞筛选效率高,这一研究成果在促进重组药物蛋白的表达、提高蛋白产量、降低生产成本等方面具有重大意义^[11]。2011年,CHO细胞系由深圳华大基因研究院(Huada Gene Research Institute, BGI)与GT Life Sciences (GT)公司首次完成了对其基因组的测序工作^[12]。

CHO细胞作为哺乳类的细胞,与真核表达系统中的酵母细胞、果蝇细胞S9的翻译后修饰相比,更接近人源细胞蛋白质中的修饰^[13]。CHO细胞和其他哺乳动物细胞相比有以下多方面优势:(1)不仅具有贴壁生长的特点,还能在无血清无蛋白培养基中进行高密度悬浮培养,适于大规模的工业化生产;(2)人病毒在CHO细胞中繁殖较少,潜在危险小;(3)隶属于成纤维细胞,内源性蛋白分泌少,可高效分离和纯化重组蛋白;(4)具有重组蛋白的高表达和高扩增能力。同时,CHO细胞也有着自身无法避免的遗传缺陷,即其胞内不含脯氨酸合成基因,导致无法将谷氨酸转变为谷氨酸- γ -半醛,并且在其合成的过程中还需要在对应的培养基中添加辅助生长的L-脯氨酸^[14]。

2 无血清培养基基本组成及作用

2.1 CHO无血清培养基的关键成分

最早动物来源的细胞培养所使用的培养基通常是由血清(人或胎牛)、血浆或者组织类似营养成分的提取物构成,血清包含多种血浆蛋白、多肽、脂肪、碳水化合物、生长因子、激素及无机盐等,其主要功能包括:(1)提供必要营养成分,血清包含多种氨基酸、维生素、无机盐、脂肪及核酸衍生物;(2)提供贴壁生长及扩散因子,血清包含一些化合物,如纤维黏连蛋白、层黏连蛋白等,它们促进贴壁生长;(3)提供激素及多种生长因子,血清含有多种激素,如胰岛素、肾上腺皮质激素(氢化可的松、地塞米松等)、固醇激素(雌二醇、睾酮、孕酮等),能刺激细胞生长和增殖,促进分化功能,血清中的生长因子包括成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、褶皱生长因子及其他因子;(4)提供结合蛋白,结合蛋白运输低分子物质,例如,白蛋白运输维生素、脂肪(脂肪酸、胆固醇)及激素,转铁蛋白运送铁^[15]。

但是由于这种培养基成分复杂、性质不确定,并且有容易增加污染的风险,因此,开发一种无血清、化学成分确定(chemically defined, CD)的培养基

至关重要。但是相对于需要添加血清的基础培养基(DMEM和DMEM-F12等)来说,无血清培养基缺乏了动物血清成分(常见的胎牛血清和新生牛血清等),通常需要添加一些额外的组分,才能更好地维持细胞生长。无血清无蛋白细胞培养基已经去除了任何动物来源的蛋白质,通常只含有一些类固醇激素和脂类前体等,以替代动物激素、生长因子的作用,此外也会补充一些小分子肽类片段。CD培养基所有成分的浓度都完全明确,即使添加少量的蛋白质,也是可经过纯化处理、成分明确、浓度确定的蛋白质。可以从以下组分进行优化改善:(1)促生长因子及激素类物质通常用来维持并促进细胞的正常生长;(2)结合蛋白和转运蛋白类如转铁蛋白参与铁的代谢过程;(3)各类微量元素如铁、锌、钴、硒等常见微量元素,都具有不同的生理功能。而我们目前常用的无血清培养基配方通常由20种氨基酸、碳源、脂类混合物、维生素、微量元素、生长因子等多种基础元素组成,不同的无血清培养基配方中也会增加一些其特有的营养和保护成分^[16]。因商业化的无血清培养基配方大多涉及商业机密,无法完全列出配方组成及含量,现在文中对其中的特殊成分及作用进行汇总(表1)。但是要开发化学成分明确的无血清培养基,还是需要首先阐明无血清培养基的基本组成成分,并明确无血清培养基中支持细胞生长所需的特定的营养成分及其最低含量。

2.1.1 氨基酸 氨基酸是CHO细胞培养基,尤其是CD培养基中的关键成分。研究表明,氨基酸种类和浓度的不同比例对培养基中细胞的生长曲线和效价,甚至相关产物的糖基化模式产生极大影响^[17]。特定浓度的氨基酸不仅可以提高细胞密度和表达量,还能保护生物反应器中的细胞^[18]。研究表明,氨基酸还可以充当信号分子,从而降低哺乳动物的细胞凋亡率,因此,在培养基设计中确定氨基酸浓度十分重要^[19]。

氨基酸有两大类:(1)必需氨基酸(essential amino acid, EAA)是细胞不能合成的,必须作为细胞培养基的组分^[20];(2)非必需氨基酸(nonessential amino acid, NEAA)是可以由哺乳动物细胞自身合成的。另有多种浓度氨基酸的响应表面分析显示,NEAA和EAA的不同浓度比可以提高重组单抗的产量^[21]。必需氨基酸通常以高浓度供应。在某些培养基研究中,添加色氨酸可增加生产抗体滴度和细胞密度^[22]。然而,色氨酸可被氧化并转化为四氢戊氧基、5-羟基色氨酸、N-乙酰基犬尿氨酸或其他氧化产物,可能导致细胞生长降低,导致培养基不同成分的变化,因此在处理和存放培养基时,应避免强光照射以防止色氨酸氧化和降解^[26]。苏氨酸也可改善细胞生长情况和生产力,避免细胞因用不同培养基培养而受到影响,同时也可影响重组蛋白的唾液酸化^[23]。高浓度的赖氨酸和组氨酸可以有效减少细胞环境中的酸性物质而不会影响生

表1 在DMEM-F12基础之上添加的组分(根据参考文献[15-16,75]修改)

Table 1 Adding components based on DMEM-F12 (modified from the references [15-16,75])

成分 Component	作用 Function	成分 Component	作用 Function
Ca(NO ₃) ₂	Supply trace elements	Fe/Co	Supply trace elements
KNO ₃	Supply trace elements	Soy protein hydrolysates	Provide cellular proteins
NH ₄ NO ₃	Supply trace elements	Yeast extract	Provide nutrition
Succinic acid	Promote cell growth	2-mercaptoacetic acid	Provide nutrition
NaHCO ₃	Adjust the pH	2-aminopyridine	Provide nutrition
Ribose	Provide nucleotides	Acid hydrolyzed casein	Provide trace protein
Thiamine	Supply trace elements	Soluble starch	Regulate the cell growth
Cellulose	Regulate cell growth	Riboflavin hydrochloride	Provide vitamins
Alditol	Involved in sugar regulation	Choline bitartrate	Provide nutrition
Inositol	Provide nutrition	Reduced glutathion	Provide amino acids
VE	Provide nutrition	Sodium selenite	Promote the absorption of various elements
VB ₆	Provide nutrition	Lipoic acid	pH regulation
Putrescine	Regulate the intracellular	Ferric citrate	Involved in metabolic regulation
Fructose	Involved in glucose metabolism	Ethanol amine	Provide an aerobic growth environment
Trehalose	Involved in glucose metabolism	Block polyether F-68	Protect cells from shear force

产率,同时还可以在细胞指数生长阶段稍微降低细胞生长速率,进而在后期提高细胞活力^[24]。

NEAA包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸^[25]。虽然细胞本身可以自行合成一些必需氨基酸,但是细胞生长和蛋白生产还是需要对应培养基中的部分或者所有NEAA来支持的。

研究表明,丙氨酸的初始浓度相对较低,细胞一般会以较为缓慢的速度来消耗丙氨酸,或消耗其他氨基酸产生丙氨酸^[26]。当细胞培养过程中乳酸含量达到一定浓度时,丙氨酸的产生速率与其中的氨基酸浓度呈正相关。丙氨酸的积累量在不超过3 mmol/L时对细胞生长几乎没有抑制作用^[26]。

精氨酸的缺乏会导致指数期的CHO细胞被强制停留在G₀或G₁期^[27]。因此在抗体生产过程中,CHO细胞大量消耗精氨酸的同时,还可以有效降低酸性物质的比例。这一研究结果与赖氨酸不同,高浓度的精氨酸会抑制细胞生长,并降低生存能力,此外,精氨酸浓度的升高会导致抗体产物异质性的增加^[27]。

与精氨酸类似,天冬酰胺和天冬氨酸同样是在细胞关键代谢途径中占主导地位的NEAA^[28]。尤其是在细胞的指数生长期,天冬酰胺和天冬氨酸与葡萄糖、谷氨酰胺和谷氨酸具有同样的作用,使其在能量补充和三羧酸循环中起着重要作用^[28]。此外,天冬酰胺和天冬氨酸也存在着一定的培养基培养局限性,会导致单抗的生产量下降。主要表现在天冬酰胺控制蛋白产物的半乳糖基化方面,同时也会在抑制DNA损伤和凋亡中产生明显影响^[29]。通过降低天冬酰胺浓度可以减少氨的生成,同时也可降低细胞内pH值,增强 β -1,4半乳糖转移酶的活性和表达,最终使细胞从G₀期转变为G₁期或G₂期^[29]。

半胱氨酸是在CHO细胞重组抗体(蛋白)产物的三级和四级结构折叠中起着至关重要作用的一种特殊的NEAA。CHO细胞培养基中严重缺少半胱氨酸会导致3天内CHO细胞活力下降至40%以下,这可能是致命且不可逆转的。此外,浓度大于1 mmol/L的半胱氨酸会导致脂质过氧化,或形成羟基自由基,这都是对哺乳动物细胞有毒性的成分^[30]。在细胞培养中应该严格控制半胱氨酸的浓度。

甘氨酸在细胞培养过程中被消耗的速度相对较慢,与其他氨基酸相比其被需要的量相对较少。

在CHO细胞中,甘氨酸是胸腺嘧啶从头合成的副产物,但是对于缺乏DHFR的CHO-DG44细胞系,胸腺嘧啶从头合成的阻断会导致甘氨酸缺乏^[31]。因此,基于DG44的CHO细胞系在培养基中的甘氨酸浓度需要仔细设计,尤其是在含有可阻止叶酸还原的叶酸类似物MTX的培养基中^[32]。

丝氨酸是消耗量第二多的氨基酸,是CHO细胞中一碳单位代谢的主要供体氨基酸。但其中大部分被细胞消耗的丝氨酸都会以甘氨酸的形式来帮助胸腺嘧啶核苷的合成^[33]。虽然丝氨酸在培养过程中也起着重要作用,但是当其浓度小于1 mmol/L时,天冬酰胺消耗量会增加,就类似于丙氨酸、乳酸和氨的产生一样会对细胞产生一定的负面影响,会抑制细胞的生长。这些都说明了在细胞培养过程中应将培养基中丝氨酸的浓度提高以满足细胞对其的高消耗。也有研究表明,培养基中额外的丝氨酸可以提高抗体滴度并增加细胞峰值密度^[34]。

酪氨酸在单克隆抗体生产效率提高方面起着关键性作用,低浓度的酪氨酸会影响蛋白质翻译,同时会降低单个细胞的生产率,甚至会使其降为零^[30,35]。酪氨酸将其浓度一直保持在1 mmol/L以上可以有效避免酪氨酸和酪氨酸残基的缺乏或错误掺入。但又因酪氨酸的化学性质,是一种较难溶解的氨基酸,所以在实验过程中最好将其母液配置为较低浓度。

在特定浓度范围内,培养基中大多数氨基酸对于CHO细胞培养均非常重要。所以大多补料培养基中的氨基酸都会以高浓度比存在。同时为了使一些氨基酸具有较高的溶解度和稳定性,都会将补料培养基的pH值提高并避光保存。目前已经出现了一些替代物来改善氨基酸的溶解度和稳定性。其中最为常见的有磷酸酪氨酸二钠盐,用其来代替酪氨酸,以提高其在培养基中的溶解度;通过中性pH条件将半胱氨酸,这个最不稳定的氨基酸氧化成胱氨酸。S-磺基半胱氨酸,一种高度可溶且稳定的半胱氨酸衍生物可作为半胱氨酸的替代来源和抗氧化剂^[36]。

2.1.2 碳源 在大多数培养基配方中,尤其是用于CHO细胞培养的CD培养基中,葡萄糖是主要的能源和碳源^[37]。高浓度的葡萄糖会在细胞培养的后期阶段导致乳酸的积累增加,而高浓度的乳酸会抑制哺乳动物细胞生长,这也促进了低葡萄糖浓度培养基的应用和发展。为了进一步降低葡萄糖水解产生的

代谢产物对细胞生长的不利影响,许多其他供能物质可以用来替代培养基中的葡萄糖。

半乳糖是重要的替代碳源之一。半乳糖在糖酵解中通过丙酮酸酶的分解产生丙酮酸这一点与葡萄糖一样。通过对这一糖酵解过程的代谢分析可以看出在培养基中,CHO细胞会先消耗葡萄糖,再消耗半乳糖^[38]。这种代谢变化可使乳酸生成量降低,也可促进乳酸消耗,从而提高细胞活力。然而,由于己糖激酶分解半乳糖的活性较低,添加半乳糖来完全替代葡萄糖仍会抑制细胞生长和细胞活力^[38]。另外,培养基中半乳糖的增多也会影响CHO细胞生成单抗的糖基化和唾液酸化修饰。针对这个问题,CHO细胞生产抗体的半乳糖糖基化调控水平,可以通过改变氯化锰、尿苷和半乳糖的添加量来加以控制。用甘露糖完全替代培养基中的葡萄糖可以加速细胞生长,减少乳酸积累,从而提高蛋白产量,但高浓度的甘露糖会抑制细胞内的 α -甘露糖苷酶,从而促进蛋白质的甘露糖糖基化,造成抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)和抗体清除率升高^[39]。与半乳糖和甘露糖一样,果糖也可以通过控制乳酸的积累来延缓CHO细胞活力的下降。但是,使用葡萄糖被果糖完全替代的培养基培养CHO细胞会导致细胞生长速率和生产单抗的滴度降低^[40]。

2.1.3 脂质 脂质是生物膜的主要组成成分,同时可用作CHO细胞中的供能物质和信号分子^[41]。它们还是负责蛋白质合成、折叠、翻译后修饰和分泌的内质网(endoplasmic reticulum, ER)和高尔基体的关键组成部分。通常,CHO细胞能够自行合成脂质,所以能够在无脂质培养基中生长,而细胞增殖速率和蛋白产物活性没有明显下降^[42]。然而,在无血清培养基中补加脂质有利于细胞活力提高和产物糖基化。实际上脂质和脂质前体类型的不同会对CHO细胞生长产生很大影响差异。因此,在培养基中使用合适的脂质添加剂对细胞生长具有重要影响。

磷脂是CHO细胞细胞膜的主要成分。已证明外源补加磷脂(如磷脂酸和溶血磷脂酸)可刺激CHO细胞在不添加生长因子的无血清培养基中生长,作为磷脂的主要成分,胆碱和乙醇胺对CHO细胞具有促进作用^[43]。因此,在许多商业培养基,如DMEM和RPMI-1640中,都已添加了胆碱。脂肪酸和胆固醇在培养基中不是高度可溶并且稳定的。作为替代品,

脂肪酸和胆固醇的前体物质和类似物在培养基中更易溶也更稳定,已被证明有利于促进细胞生长。同时,在这项研究中还证实了培养基中的少量酒精可以增加脂质溶解度而不影响细胞生长^[44]。尽管脂肪酸在培养基中是很重要的组分,但脂肪酸的浓度应保持在相对较低的水平,因为高浓度的脂肪酸可能会引起CHO细胞脂毒性^[45]。

2.1.4 维生素 维生素在信号级联以及酶抑制和激活中充当辅酶、辅基或辅因子。维生素的高还原能力可以保护细胞免受氧化自由基的侵害^[46]。尽管在培养基中需要的含量不多,但维生素是细胞培养基,尤其是化学成分确定的培养基中的重要成分。已证明在CHO细胞培养基中添加维生素可将单抗的产量提高3倍,但是并非培养基通常含有的所有维生素对细胞生长都具有重要意义^[47]。许多维生素易被空气氧化分解、受热分解和见光分解,例如普遍使用的抗坏血酸和生育酚对空气氧化敏感,抗坏血酸、硫胺素、核黄素和钴胺素对光敏感^[48]。因此,在储存培养基的过程中,避光和低温至关重要。

2.1.5 水、盐和微量元素 哺乳动物细胞对水中的杂质高度敏感,其中可能包括微量元素、细菌、内毒素(来源于细菌细胞膜)和微量有机物质等^[49]。为了防止杂质污染细胞培养基,以及培养基中离子和微量元素的浓度不受控制导致培养基成分不一致的现象,同时要使培养基达到最佳性能,建议使用高纯水^[50]。注射用水易于使用、高度纯化且不含内毒素,许多专门为细胞培养而设计的市售瓶装水产品符合此规格,并保证不含支原体,以防支原体污染细胞^[50]。

盐在CHO细胞培养基中起着重要的化学和生物作用,如维持细胞膜电势、渗透压,起到缓冲作用。通常加入CHO细胞培养基中的盐离子主要包括钠离子、钾离子、镁离子、钙离子、氯化物、磷酸盐、(铋)碳酸盐、硫酸盐和硝酸盐^[51]。所有哺乳动物细胞都利用钠离子和钾离子梯度产生跨膜电位,从而支持信号传输以及营养和离子富集。据报道称,钠钾离子比例较低或钾浓度相对较高的培养基有助于提高CHO细胞的生存能力和蛋白生产能力^[52]。钙和镁的缺乏已被证明可通过CHO细胞中的清道夫受体触发细胞凋亡,而细胞内过量的钙也可能导致细胞凋亡^[53]。磷酸盐是信号级联、能量转移以及许多细胞成分(例如核酸)合成过程中的关键阴离子供体,已证明在补料

培养基中添加磷酸盐有利于提高细胞活力和促进细胞生长^[54]。在许多情况下,细胞培养基中微量元素的有效浓度通常极低,甚至可能低于分析仪器的检测阈值。许多微量金属元素对于代谢途径的调节以及某些酶和信号分子的活性都至关重要。

在CHO细胞培养中,缺乏铜会导致乳酸脱氢酶和其他线粒体氧化酶的活性下降,从而导致细胞缺氧^[55]。然而,高铜浓度也会增加抗体产物变异体的相对含量。铁是化学成分明确培养基中的必需成分。铁在线粒体氧化途径和其他重要酶的氧转移中起着关键作用。但是,游离铁,尤其是游离三价铁离子,即使微量也会导致高氧化应激^[56]。含有铁载体或螯合剂的培养基以毒性最小化的方式改善细胞对铁的吸收。亚硒酸盐、铁和柠檬酸盐的搭配最佳,可通过改善铁的吸收情况来促进铁载体缺乏培养基中CHO细胞的生长,并能达到与环庚三烯酚酮相当的效果,而不添加亚硒酸盐时,则无明显效果。然而,硫酸亚铁和柠檬酸钠的组合可以提高生产抗体的效价。据报道,在化学成分明确且无蛋白质的CHO细胞培养基中,锌是对单克隆抗体产量影响最大的微量元素之一;在商业化的培养基中添加锌已被证明能提高1.2倍的单抗产量^[57]。此外,锌还可以激活应激蛋白的功能,从而减少细胞凋亡^[57]。

2.1.6 生长因子 研究表明,生长因子是细胞培养基中不可或缺的一部分,没有生长因子,细胞生长可能会受到显著抑制甚至停止^[58]。在无血清培养基中,为了最大限度降低培养基配方的总体复杂性,大都仅提供少量特定生长因子。如在某些CHO细胞的无血清培养基中经常添加一些自分泌生长因子,包括脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、成纤维细胞生长因子8(fibroblast growth factor 8, FGF8)、生长调节性癌基因 α (growth-regulated oncogene alpha, GRO α)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、肝细胞瘤衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、巨噬细胞集落刺激因子1(colony stimulating factor 1, CSF1)和血管内皮生长因子C(vascular endothelial growth factor C, VEGFC)等,添加1种或多种生长因子如FGF8、HGF和VEGFC可促进无血清培养基中细胞的增殖。另外,胰岛素及其类似物是无血清培养基中使用最广泛的生长因子。胰岛素

可促进细胞对葡萄糖和氨基酸的利用率,主要作用是刺激细胞增殖,促进糖原和脂肪酸的合成。研究证明,在无血清培养基中添加胰岛素类似物如胰岛素生长因子1(insulin growth factor 1)和胰岛素样生长因子-1-长链精氨酸-3(insulin growth factor-1 long arginine 3),即使培养基中所加的胰岛素类似物浓度低于胰岛素,CHO细胞活力仍与胰岛素添加时相似或效果更佳^[59]。转铁蛋白是一种重要的转运蛋白,能够与铁结合,促进细胞对铁离子的吸收利用,并具有解毒作用,其促生长作用可能与其具有生长因子的功能相关。通常在CHO细胞培养基中补充外源性多胺类包括腐胺、亚精胺和精胺。腐胺是合成精胺和亚精胺的前体,而精胺和亚精胺在细胞中是可以相互转化的。研究表明,多胺中的每一种都可以单独提高细胞生长速度和活力,而精胺可能是这3种中最为有效的^[60]。许多CHO细胞培养基都含有几种不同的多胺。但是多胺分解代谢可通过多种途径产生氧化物质、醛类、丙烯醛和氨,它们可抑制细胞生长,最终影响细胞活力^[60]。因此,细胞培养基中多胺的补充应经过精心设计控制在细胞毒性极限以下。

2.1.7 缓冲系统 缓冲系统也是细胞培养基的重要组成部分。尽管氨基酸和多价离子可以提供一定的缓冲能力,但是细胞培养基仍然需要强力的缓冲试剂,以维持培养基的pH^[61]。许多传统的细胞培养基,例如DMEM和RPMI-1640,都使用碳酸氢盐缓冲系统(CO₂/NaHCO₃),但是为了提高pH值的稳定性,培养基中还含有两性离子缓冲剂,例如HEPES在7.2~7.4的pH范围内提供强大的缓冲能力^[62]。此外,培养基中含有的磷酸根离子也是重要的缓冲能力来源。

3 特殊添加剂及其作用

近年来,在大多数工业化生产蛋白药物的过程中,为了提高蛋白表达量以及单个细胞的蛋白生产效率,都会采取一系列增产措施,其中优化无血清培养基、添加特殊添加剂成为了当下对蛋白质糖基化研究的热门领域,通过在培养基中补充添加剂可以调节总糖基化的水平和类型,添加剂对细胞生长和容量生产力的影响分别针对每个糖基化类别(甘露糖基化、半乳糖基化和唾液酰化)。为了对总糖基化水平进行微小调节,还可以通过补充组合添加剂,通过改变添加剂的种类和浓度以得到目标糖基化谱^[63]。

还有从其他机制方面添加相关添加剂进行调节, 例如在无血清培养基中添加氢化肉桂酸(hydrocinnamic acid, HCA)、丙谷二肽(*N*-(2)-*L*-alanyl-*L*-glutamine, Ala-Gln)、酵母提取物(yeast extract, YE)、二氯乙酸钠(sodium dichloroacetate, DCA)、甜菜碱、丁酸钠(sodium butyrate, NABU)、丙戊酸钠(valproic acid sodium, VPA)、锌、白藜芦醇4-苯基丁酸和缬草酸等小分子添加剂^[64]。添加剂在使用前首先要明确其是否存在细胞毒性, 是否对蛋白质合成、翻译后修饰存在不利影响, 以及是否对蛋白药物存在潜在的化学修饰等, 这样才可以用于提高蛋白产量^[65]。同时, 也需要对蛋白质生产率和避免治疗性蛋白质化学损伤方面的益处进行有效评估。此部分根据影响重组蛋白表达量的机制的不同对添加剂进行分类综述。

通过去甲基化、抗氧化机制抑制细胞凋亡, 改善细胞代谢, 调节细胞周期: HCA是由肉桂酸经氧化脱水后形成, 参与了基因组的去甲基化, 并通过调节无血清培养基中氨基酸的浓度以促进CHO细胞的生长。此外, 研究表明, HCA还可以明显改善细胞代谢, 影响细胞分化和凋亡; 由于HCA是脂溶性分子, 部分实验中会使用DMSO配制HCA试剂, 由于DMSO含有一定的细胞毒性, 应注意DMSO的含量^[66]。DCA为水溶性小分子, 参与基因组的去甲基化, 多用于研究抗肿瘤药物。DCA是丙酮酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的激活剂, 用于乳酸酸中毒的治疗。研究发现, DCA能够通过丙酮酸脱氢酶来调节细胞代谢和细胞周期, 从而抑制细胞凋亡^[67]。这一研究成果使CHO细胞在无血清培养基中可长期生长, 利于研究人员培养观察, 并且可以进一步采用补料流加培养等方式进行实验探究。儿茶素是一种抗氧化剂, 能够防止过氧化物和氧自由基对CHO细胞的氧化。相较于普遍使用的抗氧化剂白藜芦醇和维生素C, 儿茶素具有更好的抗氧化活性。作为培养基添加剂, 儿茶素可以有效减缓细胞生长, 降低氨和乳酸水平, 有利于蛋白药物的生产^[68]。白藜芦醇以浓度依赖性的方式将酸性物质转化为IgG的主要物质来防止蛋白质聚集, 合理调整抗体的生物相似电荷变异图谱以及降低ER应激、蛋白质氧化和凋亡的水平; 也可清理胞内的羟基自由基, 为细胞提供一定程度的保护, 提高IgG产量, 是工业生产中扩大单抗产量的可选方式。白藜芦醇在不改变IgG特性的情况下, 通过减缓细胞生长和提高细胞特异性蛋白生产力来作用于CHO细胞

生长^[69]。

通过抑制组蛋白去乙酰化酶, 提高组蛋白乙酰化水平来提高蛋白表达量: VPA是临床上用来治疗癫痫病的一类抗惊厥药, 在无血清培养基中加入VPA可抑制组蛋白去乙酰化酶, 促进组蛋白乙酰化, 进而促进基因转录, 提高蛋白产量^[70]。然而, 在CHO细胞培养基中加入VPA等组蛋白去乙酰化酶抑制剂时, 会诱导细胞自噬。而NABU可促进核小体中组蛋白H3和H4的赖氨酸残基上发生可逆性超乙酰化, 从而促进基因转录, 在不影响细胞活性的情况下有效地提高蛋白表达量。研究表明, NABU可使多种外源蛋白(如凝血VIII因子、组织纤溶酶原激活物、人血小板生成素及一氧化氮合成酶等)在CHO细胞中高表达, 表达产物不同, 蛋白表达量的提高程度也存在差异^[71]。SMITH等^[72]的研究显示, NABU还可造成细胞周期阻滞, 阻碍细胞生长, 促进细胞凋亡; 此外, NABU通过使细胞周期停滞在G₁期来抑制细胞生长, 以避免细胞因自身增殖造成的葡萄糖消耗升高和乳酸大量积累, 有效地提高重组蛋白在CHO细胞中的表达量。

通过提供细胞所需的营养物质, 改善细胞培养环境, 来促进细胞生长: 如Ala-Gln是氨基酸类肠外营养剂, 在临床上常用于为危重症患者快速提供必需营养物质。相关研究显示, Ala-Gln在无血清培养基中可替代谷氨酰胺为细胞提供氨根离子, 及时为细胞补充氮元素, 促进细胞增殖和蛋白合成^[73]。Ala-Gln还可以通过促进谷胱甘肽合成来增强细胞的抗氧化能力, 通过抑制甘油磷脂代谢以保护细胞膜。人血小板裂解液(human platelet lysate, HPL)是凝血机制被激发后, 被激活的血小板裂解后进行进一步提纯所获得的液体成分, 且含有多种生物活性因子, 由于去除了残余的细胞结构, 因此免疫原性较低, 是有效的血清替代品^[74]。氯化胆碱和胆碱是卵磷脂的重要成分, 参与维持细胞膜的正常结构和功能, 有利于促进细胞合成和吸收氨基酸, 还对脂质代谢具有重要作用^[75]。

通过影响细胞培养过程中的渗透压水平, 使细胞在合适的生长环境中长期生长, 以此提高蛋白表达量: 如YE蛋白表达的促进作用可能与转录水平mRNA的合成提高有关^[76]。由于YE的化学成分复杂, 结合相关研究, 推测其中发挥作用的物质可能为有机酸(丁酸、戊酸)、活性多肽或者其他小分子物质

等。在细胞代谢方面,添加YE能够提高细胞摄取葡萄糖的速率,促进细胞对葡萄糖的吸收利用。甜菜碱是一种需要在高渗条件下使用的培养基添加剂,可以明显提高难以表达的蛋白质的产量。

糖基化是单克隆抗体和其他重组蛋白的关键质量属性之一,它对抗体效应、安全性和半衰期等都有着重要的影响,研究人员往往要根据其抗体的作用机制和具体特征,利用不同方法以实现合适的糖基化谱^[77]。在上游生产期间,研究人员发现可以通过选择合适的细胞系、基因工程、优化工艺条件(如培养基和添加剂)等方式来改变糖基化谱。据报道,2F-PerAcfuc是唯一有效的岩藻糖基化调节剂,改变该化合物在细胞培养中的浓度可能是获得中等水平岩藻糖基化的一种有效的方法,但如果想要获得完全无岩藻糖基化,可以利用细胞工程靶向技术,例如岩藻糖基转移酶8或GDP-甘露糖4,6-脱水酶可能是增加ADCC的更直接和更有效的替代方案^[78]。ER质量控制过程也是确保糖蛋白正确折叠的一种特殊而复杂的机制,其中,糖基结构被各种折叠蛋白和糖苷酶作为识别序列,这些相互作用可以导致ER的折叠或糖蛋白的降解。如果考虑到ER中糖基结构对折叠和降解的重要性,在糖基化途径的早期阶段,锰、尿苷和半乳糖的结合可导致半乳糖化和唾液酸化的增加,而额外补充地塞米松可显著增加唾液酸的末端占用率。在生物仿制药的开发过程中,其他特定的添加剂或添加剂的组合也能有效地实现微小改变^[78]。这些数据旨在为特定生物类似物的质量轮廓提供一个良好的补充策略,尽管后续实验必须以特定的细胞系和产品来进行,但是在不降低其相关滴度的情况下作必要的调整仍然是强制性的。总的来说,细胞培养基添加剂是非常有效的糖基化调节剂,操作起来快速方便、能缩短开发时间,从而降低总体开发成本。

为了更大程度地减少蛋白药物的生产成本,提高无血清培养基的性能,相关领域的研究人员对血清和血浆进行了深入研究,提取适合无血清培养基中细胞生长的特殊添加剂,使其可以完全替代血清甚至优于血清^[79]。虽然在无血清培养基中添加这些化学成分不明确的特殊添加剂可以使不同批次间的差异减小、蛋白的含量降低,但是无法明确这些特殊添加剂的化学成分是唯一美中不足的。与此同时总结了若干种类特殊试剂,具体信息见表2。

4 总结与展望

CHO细胞无血清培养基的研究是生物工程领域中的热门话题,无论是在研究还是在生产实践方面都对无血清培养基有着重要的影响。随着对细胞营养与代谢、细胞周期、细胞凋亡、糖基化水平、信号转导以及外源蛋白表达机制等各方面机理的认识不断深入,相关领域研究人员在细胞培养基的设计与研究中获得了更多科学便捷的技术方法。市场上大量的无血清细胞培养基已被广泛使用。目前,国外一些品牌(Thermo/Gibco、SABC Bio、Hyclone/GE Health)有化学成分明确、无动物源、不含血清的CD培养基,而国内也有一些只含低动物源、水解物的无血清培养基,缺乏完全CD无血清培养基的品牌,但由于技术经验的限制,国内培养基含有水解物,无法做到产品批次及质量稳定,规模化生产难以实现,前期需要巨大的资金投入。近年来,大量科研者从多方面开发研究高性能的无血清培养基和工艺,推动了细胞培养水平的大幅提升,其中生物反应器的类型和培养模式在很大程度上也影响了终产品质量。如今CHO细胞密度可达到 $(1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7)$ 个/mL,流加培养抗体表达3~5 g/L,也有抗体表达10 g/L以上的案例报道。

细胞培养基不仅需要为细胞提供必需的供能物质、氨基酸、维生素和无机盐等营养物质,还需提供利于细胞生命活动进行的合适的pH值,并且能够吸收细胞代谢物。CHO细胞无血清培养作为一项重要的现代生物技术,已在许多领域得到越来越深入的研究和广泛的应用。作为其技术核心的无血清培养基虽具有许多传统的含血清培养基无法比拟的优势,但仍需在培养通用性、生产高效性以及降低成本和安全风险等方面不断改进。随着诸多重磅炸弹抗体药物的专利到期临近,生物类似药物开发的最大挑战在于其质量和原研药相比的一致性,优化培养基就可以起到改善抗体药物质量指标、糖基化修饰和电荷异构体等的作用。相信将来随着对细胞代谢、细胞周期、细胞凋亡、信号转导以及外源蛋白表达机制等各方面机理的认识不断深入,在细胞培养基的设计与研究中采用更多科学便捷的方法技术,特别是蛋白质组学和代谢组学的不断成熟和发展,必将为哺乳动物细胞无血清培养基的开发提供快捷通道,从而使细胞培养技术在生物制药、基因工程、细胞移植等领域得到更安全、更低成本和更广泛的应用。

表2 特殊添加剂类型信息
Table 2 The information of special additive types

名称 Name	主要机制 Key mechanism	细胞活性 Cell viability	细胞密度 Cell density	细胞毒性 Cytotoxicity	参考文献 Reference
VPA	HDAC1 (inhibition of histone deacetylase 1)	++++	++++	-	[70]
NABU	Deacetylase inhibitors increase histone acetylation levels	+++	+++	+(day1)	[71-72]
DCA	Pyruvate dehydrokinase activator, metabolic lactic acidosis	++++	+++	-	[67]
HCA	Inhibition of tyrosine kinases	+++	+++	++ (+DMSO)	[66]
Lithium acetate	For the separation of saturated and unsaturated fatty acids, organic catalyst	+++	+++	-	[64]
Sodium succinate	Organic catalyst for the separation of saturated and unsaturated fatty acids	++	++	+	[64]
Ferric citrate	Determination of spices, buffers, magnesium	++	++	-	[64]
Dexamethasone	Glucocorticoid inhibits the expression of cyclooxygenase	++++	+++	-	[63]
Hydrocortisone	Glucocorticoid is a hormone that inhibits or induces gene transcription	++	+	+	[64]
Lipid emulsion	Provide essential fatty acids to maintain cellular structure and reduce metabolic complications	+++	+++	-	[64]
Choline chloride	Nutritional supplement, defat agent to promote the absorption of amino acids	+++	+++	-	[64]
Phosphatidylcholine	Amphiphilic lipids, signal transduction, message transmission	++++	+++	-	[64]
Ala-Gln	An amino acid parenteral nutrient similar to glucose	+++	+++	-	[73]

“+”表示相对值; “+”越多表示相应的功能越强; 不同试剂间“+”数量关系, 不代表试剂效能的具体数量关系, 只表示能力的相对大小; “-”表示无数据。

“+” indicates relative value; the more “+”, the stronger the corresponding function; the “+” quantitative relationship between different reagents does not represent the specific quantitative relationship of reagent efficacy, but only represents the relative size of ability; “-” indicates no data.

参考文献 (References)

- [1] 李未思. 单克隆抗体生产中CHO细胞培养工艺研究进展[J]. 生物化工(LI W S. Research progress of CHO cell culture technology for monoclonal antibody production [J]. Sheng Wu Hua Gong), 2018, 4(3): 133-7.
- [2] GUO X, WANG C, WANG T Y. Chromatin-modifying elements for recombinant protein production in mammalian cell systems [J]. Crit Rev Biotechnol, 2020, 40(7): 1035-43.
- [3] WANG T Y, GUO X. Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems [J]. Appl Microbiol Biot, 2020, 104(13): 5673-88.
- [4] CHROMIKOVA V, ZARAGOZA M A, KRAMMER F. Generation of a serum free CHO-DG44 cell line stably producing a broadly protective anti-influenza virus monoclonal antibody [J]. PLoS One, 2017, 12(9): 1-11.
- [5] JIA Y L, GUO X, WANG T Y, et al. Novel short synthetic matrix attachment region for enhancing transgenic expression in recombinant Chinese hamster ovary cells [J]. Cell Biochem, 2019, 120(10): 18478-86.
- [6] LI Q, ZHAO C P, WANG T Y, et al. Two human MARs effectively increase transgene expression in transfected CHO cells [J]. Cell Mol Med, 2019, 23(2): 1613-6.
- [7] 纪丽, 邹奕芬, 殷莹, 等. 改良无血清培养基对贴壁细胞体外培养的影响[J]. 中华实验外科杂志 (JI Y, ZOU Y S, YIN Y, et al. Effects of serum free culture medium on adherent cell culture *in vitro* [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery), 2019, 36(4): 726-30.
- [8] HUTTALA O, PALMROTH M, HEMMINKI P, et al. Development of versatile human *in vitro* vascularized adipose tissue model with serum-free angiogenesis and natural adipogenesis induction [J]. Basic Clin Pharmacol, 2018, 5(3): 123-35.
- [9] 周琴, 韩倩倩, 张兰兰, 等. CHO细胞中通过基因过表达提高治疗性蛋白产量的策略[J]. 生物学杂志 (ZHOU Q, HAN Q Q, ZHANG L L, et al. Gene overexpression enhances therapeutic protein production in CHO cells [J]. Journal of Biology), 2020, 213(1): 96-100.
- [10] KAAS C, KRISTENSEN C, BETENBAUGH M J, et al. Sequencing the CHO-DXB11 genome reveals regional variations in genomic stability and haploidy [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 160-72.
- [11] HUAMIN L, YANBIN Q I, ZHIBIN L. Suspension domestication and serum-free culture of CHO-K1 cells [J]. J Shunde Polytechnic, 2019, 12(10): 15-32.
- [12] KIM O, LEE D, LEE A C, et al. Single cell genomics: whole genome sequencing of single circulating tumor cells isolated by applying a pulsed laser to cell-capturing microstructures [J]. Small, 2019, 15(37): 1093-117.
- [13] 肖政, 范里, 谭文松. 半乳糖流加对CHO细胞生长代谢及其表达的Fc融合蛋白糖基化的影响[J]. 生物技术通报 (XIAO Z, FAN L, TAN W S. Effects of galactose supplementation on growth, metabolism and glycosylation of FC fusion protein ex-

- pressed in CHO cells [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(8): 138-45.
- [14] STOLFA G, SMONSKY M T, BONIFACE R, et al. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem [J]. *Curr Opin Biotech*, 2019, 10(9): 1341-420.
- [15] YANG Z, XIONG H R. Culture conditions and types of growth media for mammalian cells [M]. Italy: Biomedical Tissue Culture, 2012.
- [16] 王天云, 贾岩龙, 王小引, 等. 哺乳动物细胞重组蛋白工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2020.
- [17] METTANANDA S, CLARK K, FISHER C A, et al. Phenotypic and molecular characterisation of a serum-free miniature erythroid differentiation system suitable for high throughput screening and single cell assays [J]. *Exp Hematol*, 2018, 60(4): 10-20.
- [18] CARRILLO-COCOM L M, GENEL-REY T, ARAÍZ-HERNÁNDEZ D, et al. Amino acid consumption in naïve and recombinant CHO cell cultures: producers of a monoclonal antibody [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(5): 809-20.
- [19] HEIZER E M, RAYMER M L, KRANE D E. Amino acid biosynthetic cost and protein conservation [J]. *J Mol Evol*, 2011, 72(5/6): 466-73.
- [20] LIBRARY W P. Non-essential amino acid [J]. *Encycl Cancer*, 2011, 8(12): 2537.
- [21] ZHU Y T, WANG C Y, PANG S Y, et al. A modified method by differential adhesion and serum-free culture medium for enrichment of cancer stem cells [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 18(1): 8-23.
- [22] TUTINO M L, SCARANO G, MARINO G, et al. Tryptophan biosynthesis genes *trpEGC* in the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* [J]. *J Bacteriol*, 2019, 175(1): 299-302.
- [23] NI H M, CHAO X J, DENG F, et al. Receptor-interacting serine/threonine kinase 3 (RIP3)-mixed lineage kinase like protein (MLKL)-mediated necroptosis contributes to ischemia-reperfusion injury of steatotic livers [J]. *Am J Pathol*, 2019, 17(6): 25-38.
- [24] RICHTER B L, SILVA T S D C, MICHELATO M, et al. Combination of lysine and histidine improves growth performance, expression of muscle growth-related genes and fillet quality of grow-out Nile tilapia [J]. *Aquacul Nutr*, 2020, 28(3): 916-25.
- [25] MELS C M, DELLES C, LOUW R, et al. Central systolic pressure and a nonessential amino acid metabolomics profile: the African prospective study on the early detection and identification of cardiovascular disease and hypertension [J]. *J Hypertension*, 2019, 37(1): 149-67.
- [26] KRISTENSEN L, FOLKE M. Volume-regulatory Keflex during concentrative uptake of alanine in isolated rat hepatocytes [J]. *Biochem J*, 2019, 221(1): 265-8.
- [27] GEEROMS M, HAMDY M, MIZUNO H, et al. Abstract 74: serum-free *ex vivo* quality and quantity cultured endothelial progenitor cells improve the fat graft vascularization and survival [J]. 2017, 5(41): 55-6.
- [28] 颜敏, 刘静, 夏天, 等. 细胞蛋白质组学和代谢组学整合策略表征散斑型BTB/POZ蛋白质突变调控的关键代谢通路[J]. 色谱 (YAN M, LIU J, XIA T, et al. Integration strategy of cellular proteomics and metabolomics characterizes key metabolic pathways regulated by speckle BTB/POZ protein mutation [J]. *SEPU*, 2019, 37(8): 887-96.
- [29] DEEPIKA K, PREETHI S P, SHARMA P. Interaction of aspartic acid and asparagine with RNA nucleobases: a quantum chemical view [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2019, 36(4): 726-30.
- [30] BROOKS D J, FRESCO J R, LEAK A M, et al. Increased frequency of cysteine, tyrosine, and phenylalanine residues since the last universal ancestor [J]. *Mol Cellular Pro*, 2002, 1(2): 125-31.
- [31] LIU J, BARFIELD R M, RABUKA D, et al. Bifunctional reagents for formylglycine conjugation: pitfalls and breakthroughs [J]. *Chem Bio Chem*, 2020, 31(9): 70-8.
- [32] MARYAM K, BAHRAM R, ALI A A, et al. Investigation into the effect of mechanical activation on the leaching of chalcopyrite in a glycine medium [J]. *Hydrometallurgy*, 2020, 70(2): 1-14.
- [33] BOWNES L V, WILLIAMS A P, MARAVATI R, et al. Serine-threonine kinase receptor associate protein confers stemness in neuroblastoma-science direct [J]. *J Am Coll of Surgeons*, 2020, 231(4): 777-83.
- [34] DUDEK H, DATTA S R, GREENBERG M E, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase akt [J]. *Science*, 1997, 275(5300): 661-5.
- [35] MIJAKOVIC I, DEUTSCHER J. Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*: a 10-year retrospective [J]. *Front Microbiol*, 2020, 6(18): 233-41.
- [36] VERHAGEN N, WIJAVA A W, TELEKI A, et al. Comparison of l-tyrosine containing dipeptides reveals maximum ATP availability for l-prolyl-l-tyrosine in CHO cells [J]. *Eng Life Sci*, 2020, 56(5): 577-82.
- [37] KAHN C R, SALTIEL A R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, 2001, 34(6): 633-6.
- [38] LEMIEUX R U, DRIGUEZ H. Chemical synthesis of 2-O-(α -L-fucopyranosyl)-3-O-(α -D-galactopyranosyl)-D-galactose. The terminal structure of the blood-group B antigenic determinant [J]. *J Am Chem Soc*, 1975, 97(14): 4069-75.
- [39] CHEN W, HU T, YE J, et al. A CCAAT-binding factor, SIN-FYA10, negatively regulates ascorbate accumulation by modulating the D-mannose/L-galactose pathway in tomato [J]. *Hortic Res*, 2020, 473(3): 769-73.
- [40] CRAIK J D, ELLIOTT K R. Transport of D-fructose and D-galactose into isolated rat hepatocytes [J]. *Biochem J*, 2019, 192(1): 373-5.
- [41] GEIGER O. Biogenesis of fatty acids, lipids and membranes [M]. Germany: Springer, Cham, 2019.
- [42] ZAUNER W, BRUNNER S, BUSCHLE M, et al. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport [J]. *Bioch Bioph Acta*, 2019, 1428(1): 57-67.
- [43] WU Y, CHEN Z, DARUISH W S, et al. Choline and ethanolamine plasmalogens prevent lead-induced cytotoxicity and lipid oxidation in hepG₂ cells [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67(27): 26-35.
- [44] PEETERS R A, VEERKAMN J H, DEMEL R A. Are fatty acid-binding proteins involved in fatty acid transfer [J]. *Bioch Bioph Acta*, 2019, 1002(1): 8-13.

- [45] KNUDSEN J, GRUNNET I. Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase. Synthesis of medium-chain-length (C8-C12) acyl-CoA esters by goat mammary-gland fatty acid synthetase [J]. *Biochem J*, 2019, 202 (1): 139-43.
- [46] MRIDULA C, FITZSIMONS P E E, STRAIN J J, et al. Non-alcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations [J]. *Clin Chem*, 2000, 46(8 Pt 1): 1162-70.
- [47] ESNOUF M P, GREEN M R, HILL H A, et al. Evidence for the involvement of superoxide in vitamin K-dependent carboxylation of glutamic acid residues of prothrombin [J]. *Biochem J*, 2019, 174(1): 345-8.
- [48] HALISE I G, ANDREA A, CEM Y, et al. New anticancer drug candidates sulfonamides as selective hCA IX or hCA XII inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 77(8): 23-41.
- [49] MARIUS M, FREDERIC V, BONNEVAV T. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices [J]. *Biologicals*, 2020, 42(2): 121-46.
- [50] 李浩然, 田芳芳. 灭菌注射用水中硝酸盐限量检查方法的分析与探讨[J]. *北方药学杂志*(LI H R, TIAN F F. Analysis and discussion on the limit of nitrate in sterilization water for injection [J]. *Journal of Northern Pharmaceutical*), 2019, 81(2): 380-3.
- [51] PANKAJ K, PRIYANKA K, KAMLA R, et al. Effect of organic and inorganic salt environment on the complex coacervation of in situ formed protein nanoparticles and DNA [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 122(3): 1290-6.
- [52] LICHTSHEIN D, KAHACK H R, BLUME A J. Use of a lipophilic cation for determination of membrane potential in neuroblastoma-glioma hybrid cell suspensions [J]. *P Natl Aca Sci*, 2019, 76(2): 650-4.
- [53] GYLFE E. Insulin secretagogues induce Ca²⁺-like changes in cytoplasmic Mg²⁺ in pancreatic beta-cells [J]. *Bioch Bioph Acta*, 2019, 1055(1): 82-6.
- [54] KATALIN K, KUO A, BARNATHAN E S, et al. Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA [J]. *Bioch Bioph Acta*, 2019, 1369(2): 320-34.
- [55] QIU Q, YU B, HUANG K, et al. A fluoran-based Cu²⁺-selective fluorescent probe and its application in cell imaging [J]. *J Fluor*, 2020, 30(4): 66-72.
- [56] PARKES J G, RANDELL E W, OLIVIERI N F, et al. Modulation by iron loading and chelation of the uptake of non-transferrin-bound iron by human liver cells [J]. *Bioch Bioph Acta*, 2019, 1243(3): 373-80.
- [57] JIANG Z, CHEN J, LI J, et al. Exogenous Zn²⁺ enhance the biodegradation of atrazine by regulating the chlorohydrolase gene *trz N* transcription and membrane permeability of the degrader *Arthrobacter* sp. DNS10 [J]. *Chemosphere*, 2019, 238(23): 124-34.
- [58] HAMMACHER A, NISTER M, HELDIN C H. The A-type receptor for platelet-derived growth factor mediates protein tyrosine phosphorylation, receptor transmodulation and a mitogenic response [J]. *Biochem J*, 2019, 264(1): 15-20.
- [59] MOON J S, NAM Y S, KANG J H, et al. Regulatory role of insulin-like growth factor-binding proteins in odontogenic mineralization in rats [J]. *J Mol Histol*, 2020, 8(12): 1-13.
- [60] ANDREI A N. Biodiesel fuel production by *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst in optimized medium [J]. *Mycosci Aff J Mycol*, 2018, 59(2): 147-52.
- [61] FOSTER A W, PERNIL R, PATTERSON C J, et al. sensing and buffering in cells [J]. *Nature Chem Biol*, 2018, 23(6): 24-38.
- [62] LIU X, YANG H, XIONG P, et al. Comparative studies of Tris-HCl, HEPES and NaHCO₃/CO₂ buffer systems on the biodegradation behaviour of pure Zn in NaCl and SBF solutions [J]. *Corros Sci*, 2019, 157(24): 205-19.
- [63] ZHANG L, ANAREAS C, STEVENSON J, et al. Combined effects of glycosylation precursors and lactate on the glycoprofile of IgG produced by CHO cells [J]. *J Biotechnol* 2019, 28(9): 71-9.
- [64] ZHOU J, GAO H, XIE W, et al. Bovine serum albumin affects N-glycoforms of murine IgG monoclonal antibody purified from hybridoma supernatants [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(4): 1583-94.
- [65] CHUA C C, CHUA B H L, CHEN Z, et al. Dexamethasone induces caspase activation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2003, 1642(1/2): 79-85.
- [66] SHEN Q, WANG Y X, SHEN J, et al. Growth and cell properties of modified *Lactobacillus plantarum* CICC21001 with supplementing C18-FFAs to growth medium *in vitro* [J]. *Curr Microbiol*, 2018, 75(4): 1133-41.
- [67] WANG P, CHEN M, YANG Z, et al. The effects of sodium dichloroacetate on mitochondrial dysfunction and neuronal death following hypoglycemia-induced injury [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 405-18.
- [68] LI Y, ZHAO Y, HAN J, et al. Effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on the biological properties of human dental pulp stem cells and inflammatory pulp tissue [J]. *Arch Oral Biol*, 2021, 54(3): 252-61.
- [69] FREMONT L. Biological effects of resveratrol [J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 663-73.
- [70] BRODSKY V Y, MALCHENKO L A, LAZAREV D S, et al. Glutamic acid signal synchronizes protein synthesis kinetics in hepatocytes from old rats for the following several days. cell metabolism memory [J]. *Biochemistry*, 2018, 83(3): 294-8.
- [71] SHI X, WU T, COLE C M, et al. Optimization of ClpXP activity and protein synthesis in an E. coli extract-based cell-free expression system [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3488-96.
- [72] SMITH D R, PADILLA W J, VIER D C, et al. Composite medium with simultaneously negative permeability and permittivity [J]. *Phys Rev Lett*, 2000, 84(18): 4184-7.
- [73] HANSEN M, OH P. Lyman α radiative transfer in a multiphase medium [J]. *Mon Not Roy Astron Soc*, 2018, 50(1): 58-63.
- [74] 谢贤哲, 徐燕, 何家林, 等. 人血小板裂解液在人牙髓间充质细胞体外增殖与分化中的应用[J]. *安徽医科大学学报*(XIE X Z, XU Y, HE J L, et al. Application of human platelet lysate in the proliferation and differentiation of human pulp mesenchymal cells *in vitro* [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*), 2019, 54(10): 1551-6.
- [75] RITACCO F V, WU Y, KHETAN A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: history, key components, and optimization strategies [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34(6): 12-26.
- [76] SPEARMAN M, CHAN S, JUNG V, et al. Components of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract as defined media additives that

- support the growth and productivity of CHO cells [J]. *J Biotechnol*, 2016, 10(233): 129-42.
- [77] FAN Y, MULLER C, LUND A M, et al. Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(3): 115-26.
- [78] EHRET J, ZIMMERMANN M, EICHHORN T, et al. Impact of cell culture media additives on IgG glycosylation produced in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 9(9): 1840-50.
- [79] NIE J, SUN Y, HAN F, et al. Rapid process development of serum-free pseudorabies virus production with the quality by design approach [J]. *Cytotechnology*, 2020, 72(2): 564-82.