

·基础研究·

诱导表达 p27 对 HEK293 细胞生长代谢的影响 *

叶玲玲 刘 红 李世崇 刘兴茂 陈昭烈[△]

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 目的:研究诱导表达 p27 对 HEK293 细胞生长和代谢的影响。方法:将 pTet-on 载体和响应于 Dox 的 p27 诱导表达载体共转染 HEK293 细胞,随机挑选单克隆细胞株。以细胞周期分布和活细胞密度为主要观察指标,考察稳定转染的细胞在 Dox 诱导下的细胞生长;以 Qglc、Qlac 和 Qgln 为主要观察指标,考察转染细胞在 Dox 诱导下的细胞代谢。结果:p27 基因的表达使 HEK293 细胞的增殖速度显著降低,G1 期细胞比例显著升高,葡萄糖消耗和乳酸生产减少。结论:诱导表达 p27 基因是对 HEK293 细胞进行 G1 期阻滞的一种有效策略。

关键词: HEK293 细胞;细胞周期;代谢;p27;诱导表达

中图分类号: Q78, Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2011) 21-4001-04

Effects of p27 Inducible-Expression on the Growth and Metabolism of HEK293 cells*

YE Ling-ling, LIU Hong, LI Shi-chong, LIU Xing-mao, CHEN Zhao-lie[△]

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of p27 inducible-expression on the growth and metabolism of HEK293 cells. **Methods:** The vector pTet-on and Dox-responsive p27-expressing vector were co-transfected into HEK293 cells and individual clones were isolated randomly. Cell growth and metabolism were assessed by cell-cycle distribution and viable cell density, Qglc, Qlac and Qgln as indexes, respectively. **Results:** The expression of p27 increased percentage of G1 cells, reduced consumption of glucose and production of lactate of HEK293 cells. **Conclusions:** The inducible-expression of p27 is an effective strategy for G1-phase arrest of HEK293 cells.

Key words: HEK293 cells; Cell cycle; Metabolism; p27; Inducible-expression

Chinese Library Classification(CLC): Q78, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4001-04

前言

哺乳动物细胞在体外培养体系中的生长一般经历四个阶段,即迟滞期、指数生长期、平台期和衰退期。在用于生物制药的哺乳动物细胞大规模培养中,为获得足够的生产细胞,最初阶段的高速生长是必需的,但在超过一定的细胞密度后如果增殖不受控制会引起营养和氧气的耗竭、有毒代谢物的积累、细胞死亡和产物的降解,从而影响细胞表达产品的生产效率和质量,在指数生长的中、末期对细胞进行增殖控制可有效提高产量和延长生产时间^[1]。参与核糖体生物合成和蛋白合成的几种基因在 G1 期表达较高,被阻滞于细胞周期 G1 期的细胞在代谢上更为活跃,细胞蛋白含量显著增加^[2,3]。应用代谢工程的技术手段和基因调控表达策略,将细胞周期调控基因整合于哺乳动物细胞的基因组中,赋予细胞增殖调控的体外培养特性,已成为哺乳动物细胞大规模培养技术中实施 G1 期阻滞的重要手段^[4-6]。

来源于人胚肾的 HEK293 细胞 (human embryonic kidney 293 cells) 具有不存在啮齿类病毒感染的潜在威胁、高效的原核水解和独特的 - 羧基化修饰、能够表达完全人型糖基化的重组

蛋白的优点,是日益受到重视的生物技术药物表达系统^[7]。p27 是一种 27 kDa 的热稳定蛋白,在 G1/S 期进展过程中,通过与多种 cyclin/CDK 复合体结合行使其抑制功能^[8]。通过外源启动子表达 cDNA 来增加 p27 的丰度能够将不同细胞系的细胞周期抑制在细胞周期的 G1 期,p27 介导的细胞生长抑制已被用于改善重组蛋白的生产和基因治疗领域^[9,10]。

本研究借助 Tet-On 系统在 HEK293 细胞中诱导表达 p27 基因,考察诱导表达 p27 基因对 HEK293 细胞生长、细胞周期分布和葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺代谢的影响,目的在于探索将 p27 基因用于 HEK293 细胞增殖控制的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器来源

HEK293 细胞和 pcDNA3.1 (+) 载体购自 Invitrogen; pc-Hy 载体 (将 pcDNA3.1(+)-载体的筛选标记 Neor 替换为 Hygro) 为本课题组构建;pTet-on 和 pTRE 载体购自 Clontech; 人 p27 cDNA 载体 pCMV-SPORT6-p27 购自美国 Open Biosystems 公司。各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB; PCR 聚合酶 pyrobest 和 LA Taq 购自 Takara; DMEM/F12 (1:1) 培养基、胰蛋

* 基金项目:国家 "重大新药创制" 科技重大专项 (No. 2009ZX09503-011)

作者简介:叶玲玲 (1979-), 女, 博士, 研究方向:动物细胞工程, 电话:010-66948820; E-mail: lingling_ye@163.com

△通讯作者:陈昭烈, E-mail: chenlz23@sina.com

(收稿日期:2011-04-18 接受日期:2011-05-12)

白酶和谷氨酰胺购自 GIBCO; 新生牛血清 (newborn bovine serum, NBS) 购自兰州民海; G418 和潮霉素 B (Hygro) 购自 Merck; 质粒提取和凝胶回收试剂盒购自天根; 强力霉素 (Dox) 购自 Sigma; 小鼠抗 p27 单抗和兔抗 β -actin 多抗购自武汉博迈德生物工程有限公司; 转染试剂 LipofectamineTM 2000 和转染专用培养基 OPTI-MEM I 购自 Invitrogen。

Cydex 细胞计数仪购自德国 INNOVATIS; YSI 多参数生化分析系统购自美国 YSI; 流式细胞仪购自美国 B&D 公司, 型号为 FACSCalibur。

1.2 响应于强力霉素的 p27 诱导表达载体的构建

从 pTRE 质粒上扩增 Tet- 响应启动子 $P_{hCMV^{*}-1}$ 片段, 引物序列为: CMVstar-5 (5'-GATCACGCGTT TTACCACTCCC-TATCAGTG-3') 和 CMVstar-3 (5'-GATCGCTAGCCCC-TATAGTGAGTCGTATTAG GCTGGATCGGTCCCGGTG-3'), 该片段经 Mlu I/Nhe I 酶切后连入同样酶切的 pc-Hy 载体, 正确连接得到的载体命名为 pc-Hy-star。从 pCMV-SPORT6-p27 质粒上扩增 p27 片段, 引物序列为: p27-5 (5'-GACGCTAGCAT-GTCAAACGTGCGAGTGTCTAACG-3') 和 p27-3 (5'-GCTCT-TAAGTTACGTT TGACGTCTTCTGAGG-3'), 该片段经 Nhe I/Afl II 酶切后连入同样酶切的 pc-Hy-star 载体 PhCMV^{*}-1 下游, 得到响应于 Dox 的 p27 诱导表达载体, 命名为 pc-Hy-star-p27。

1.3 细胞培养、转染和筛选

HEK293 细胞正常贴壁培养于添加了 5 % NBS (v/v) 的 DMEM/F12 (1:1) 培养基中, 37℃, 5 % CO₂。

转染前一天, 将处于指数生长期的细胞消化计数, 按 2.5×10^5 cells/ml 的密度接种于 24 孔板中, 1 ml/孔。转染时, 用 100 μ l OPTI-MEM I 培养基稀释 0.86 μ g pc-Hy-star-p27 质粒和 1.14 μ g pTet-on 质粒, 另用 100 μ l OPTI-MEM I 培养基稀释 2 μ l LIPOFECTAMINE 2000 试剂, 二者混合, 室温静置 20 min。将该混合物加入到 2 孔已更换 0.5 ml 新鲜生长培养基的 HEK293 细胞中, 每孔 100 μ l, 摇动培养板, 混匀。转染 4-5 h 后向转染细胞孔中补加 1 ml 生长培养基。

37℃培养 24 h 后, 将上述转染细胞传代一个新的 25 cm² 培养瓶中。待细胞贴壁后培养基更换为含 400 μ g/ml G418 和 300 μ g/ml Hygro 的筛选培养基。每 3 d 换液, 两周后阴性细胞全部死亡, 阳性细胞已形成集落, 得到的稳定转染混合克隆称为 HEK-OP。

1.4 转染细胞的单克隆化

将 HEK-OP 细胞用胰酶消化成单细胞悬液并计数, 通过逐步的梯度稀释, 调整细胞密度至 10 cells/ml, 将此细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μ l。置于 37℃, 5% CO₂ 培养。5 d 后, 显微镜下观察, 挑选只含一个细胞集落的孔, 做好标记, 继续培养。2 周后, 将单细胞形成的克隆消化传代至 24 孔细胞培养板中扩大培养并冻存。

1.5 活细胞密度和细胞活力的测定

胰酶消化细胞, 用生长培养基重悬, 吹打成单细胞悬液, 取 1 ml 细胞悬液上 Cydex 细胞计数仪测定细胞密度和细胞活力。

1.6 培养上清中生化指标的测定及代谢参数的计算

通过 YSI 生化分析系统测定培养上清中的葡萄糖、乳酸和谷氨酰胺含量, 依下列公式计算葡萄糖比消耗速率 (Q_{glc})、乳酸比生成速率 (Q_{lac}) 和谷氨酰胺比消耗速率 (Q_{gln}): $Q_i = \Delta i(t_2 - t_1) / D_{cell}(t_2)$ 。其中 i 代表葡萄糖或乳酸, Q_i 代表 t_1 到 t_2 期间 i 物质的比消耗速率或比生成速率 (μ mol/10⁶ cells/d), $\Delta i(t_2 - t_1)$ 代表 t_1 到 t_2 期间单位体积消耗或产生的 i 物质的量, $D_{cell}(t_2)$ 代表 t_2 时刻的细胞密度。

1.7 p27 表达的诱导和细胞周期的测定

HEK-OP 单克隆化得到的细胞株接种于 24 孔细胞培养板, 1.0×10^5 cells/ml, 1 ml/孔, 待贴壁后其中的一半细胞更换为含 2 μ g/ml Dox 的生长培养基, 隔天换液。

诱导剂存在下继续培养 3 d 后, 胰酶消化细胞, 3000 rpm 离心 3 min 收集细胞, PBS 洗涤 1 次。向沉淀中加入 0.3 ml 含 10% NBS (v/v) 的 PBS, 混匀后再加入 0.7 ml 无水乙醇, 再次混匀, -20℃过夜。经固定的细胞 3000 rpm 离心 3 min, 吸弃上清, PBS 洗涤 1 次。加入 0.2 ml 100 μ g/ml RNase A, 37℃水浴孵育 30 min。加入 0.3 ml 100 μ g/ml PI, 置暗处染色 20 min 后上机检测。

1.8 Western Blot 检测 p27 的表达

Western Blot 实验由北京康为世纪生物科技有限公司完成。p27 抗体稀释度为 1:200, β -actin 抗体稀释度为 1:3000。

2 结果

2.1 响应于 Dox 的 p27 诱导表达载体的构建

Tet- 响应启动子 $P_{hCMV^{*}-1}$ 扩增自 pTRE 载体, 由 7 个串联重复的四环素特异操纵子序列和下游的最小 CMV 启动子组成, 长度约 430 bp (图 1)。通过 Mlu I/Nhe I 酶切位点连入 pc-Hy 载体中, 代替野生型 CMV 启动子, 得到响应于 Dox 的诱导表达载体 pc-Hy-star。人 p27 cDNA 扩增自商业化载体 pCMV-SPORT6-p27, 长度约 600 bp (图 2.2), 通过 Nhe I/Afl II 酶切位点连入 pc-Hy-star 载体下游, 得到响应于 Dox 的 p27 诱导表达载体 pc-Hy-star-p27。

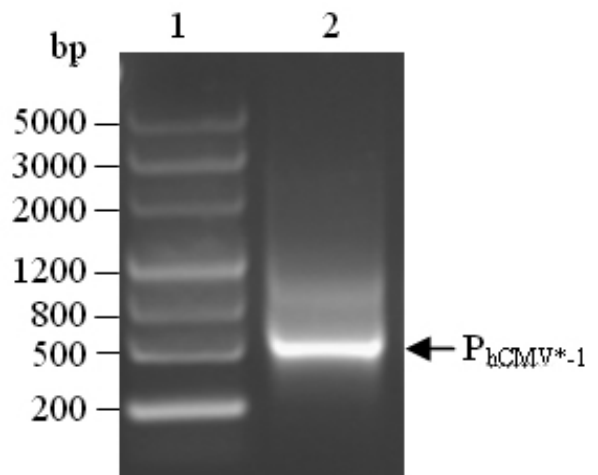


图 1 PCR 扩增 tet- 响应启动子: 1: DNA 分子量标准; 2: PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of tet-responsive promoter: 1: DNA marker;

2: PCR product

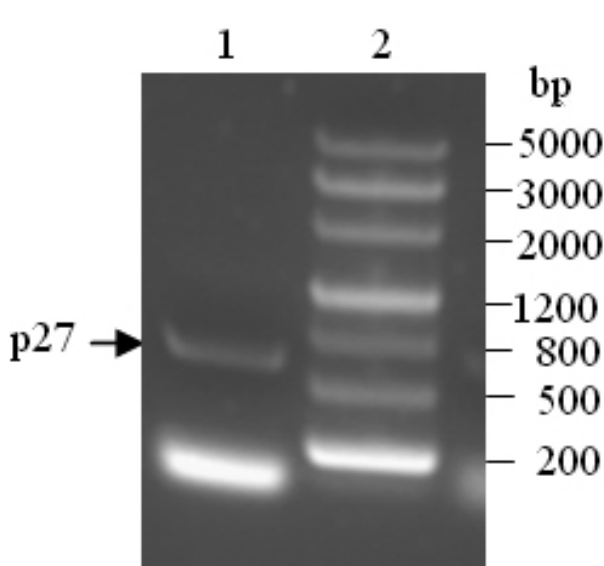


图2 PCR 扩增 p27 cDNA: 1: PCR 扩增产物; 2: DNA 分子量标准
Fig. 2 PCR amplification of p27 cDNA: 1: PCR product; 2: DNA marker

2.2 p27 过表达对 HEK293 细胞周期的影响

pTet-on/pc-Hy-star-p27 共转染的 HEK293 细胞(稳定转染的混合克隆称 HEK-OP)经单克隆化得到 58 株细胞,这些细胞接种至 24 孔板,加入 2 μ g/ml Dox 培养 3 d 后检测有无诱导剂存在下细胞周期情况(图 3),结果表明,大多数细胞 G1 期比例显著升高,相对升高比例集中在 10-25%之间,最多的高达 69.53%。本研究选择 12 号(HEK-OP-12)和 38 号(HEK-OP-38)两株单克隆进行下一步的研究。

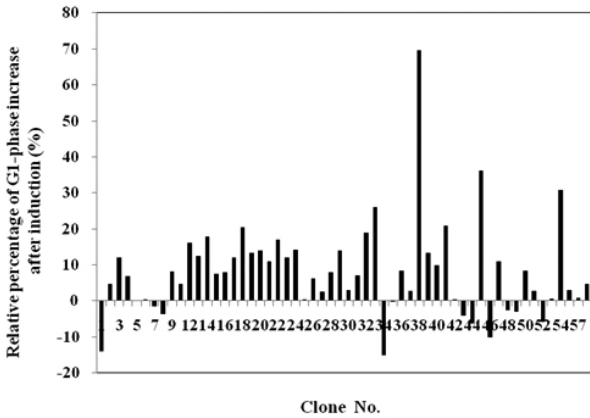


图3 p27 过表达对 HEK-OP 细胞 G1 期细胞比例的影响
Fig. 3 Effects of p27 overexpression on G1-phase percentage of HEK-OP cells

2.3 p27 在 HEK293 细胞中表达的鉴定

Western Blot 检测经 Dox 诱导 3 d 后,p27 基因在 HEK-OP-12 和 HEK-OP-38 细胞中的表达情况,以未转染的 HEK293 细胞作为对照(图 2.4)。由结果可见,未转染细胞中未检测到 p27 的明显表达,转染后 HEK-OP-38 细胞中的 p27 表达显著高于 HEK-OP-12 细胞,这与二者诱导后 G1 期细胞比例的变化情况一致。

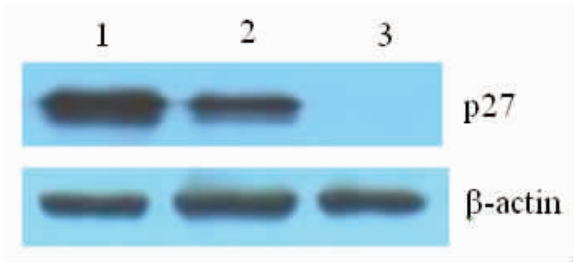


图4 Western Blot 检测 p27 的表达: 1: HEK-OP-38; 2: HEK-OP-12; 3: HEK293
Fig. 4 Expressing level of p27 detected by Western Blot: 1: HEK-OP-38; 2: HEK-OP-12; 3: HEK293

2.4 p27 过表达对 HEK293 细胞生长和代谢的影响

本研究进一步考察了 HEK-OP-12 和 HEK-OP-38 两株诱导表达 p27 的单克隆细胞在有诱导剂存在下细胞的生长和代谢情况。结果表明,在诱导剂 Dox 存在下,两株细胞均出现了生长显著变慢的现象,活细胞密度始终低于相应的对照细胞,在观察的时间范围内,HEK-OP-12 和 HEK-OP-38 细胞在诱导后达到的最高细胞密度分别降低了 38%和 58%(图 5)。不同时间的细胞周期分布情况表明,诱导后两株单克隆细胞均出现 G1 期比例显著升高的现象,在加入诱导剂的最初阶段 G1 比例升高最明显,HEK-OP-12 和 HEK-OP-38 细胞最高相对升高比例分别达到 26%和 38%,此后,差异逐渐减小,至第 8 d 时,有无诱导剂情况下 G1 期比例接近(图 6)。

在代谢方面,当诱导剂存在时,葡萄糖比消耗速率和乳酸比生成速率显著低于对照细胞,而谷氨酰胺比消耗速率在有无诱导剂情况下未见明显差异(图 7)。

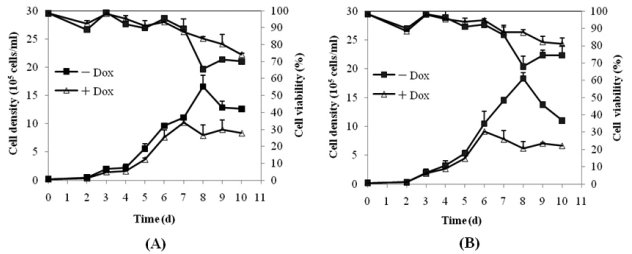


图5 p27 过表达对细胞生长的影响:(A): HEK-OP-12; (B): HEK-OP-38
Fig. 5 Effects of p27 over-expression on cell growth: (A): HEK-OP-12; (B): HEK-OP-38

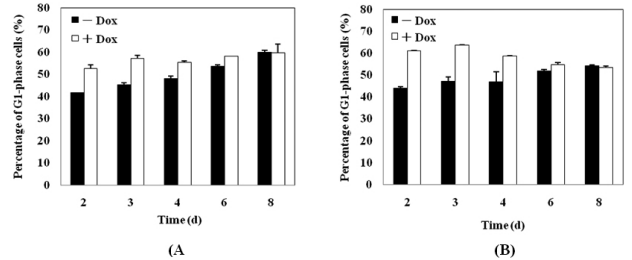


图6 p27 过表达对 G1 期细胞比例的影响:(A) HEK-OP-12; (B) HEK-OP-38

Fig. 6 Effects of p27 over-expression on G1-phase percentage: (A): HEK-OP-12; (B): HEK-OP-38

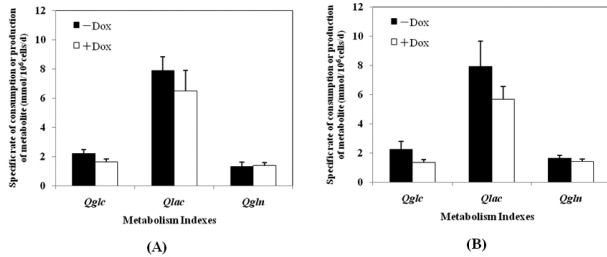


图 7 p27 过表达对细胞代谢的影响: (A): HEK-OP-12; (B): HEK-OP-38

Fig. 7 Effects of p27 over-expression on cell metabolism:

(A): HEK-OP-12; (B): HEK-OP-38

3 讨论

在哺乳动物细胞大规模培养过程中,提高整个培养体系的生产效率主要从两个方面入手:提高单个细胞的重组蛋白比产率和培养期间的累积活细胞密度^[11]。细胞增殖控制技术是一种新兴的代谢工程策略,通过对生产细胞系的细胞周期进行条件阻滞,避免因细胞过度增殖所致的细胞活力迅速降低,同时,使细胞将浪费在生物质合成上的代谢能量全部用于重组蛋白的生产,从而达到提高培养体系总产量的目的^[12]。

哺乳动物细胞表达产品的生产效率主要取决于细胞的比产率和活细胞密度,因而用于细胞增殖控制的基因需要以诱导表达的方式来实现其对细胞增殖的调控。目前用于增殖控制基因的表达调控系统包括四环素、蜕皮激素、米乐甾酮(muristerone)和 IPTG 诱导的基因表达调控系统^[5, 6, 13, 14]。四环素诱导的基因表达调控系统是由 Gossen 等于 1992 年建立的,以四环素及其衍生物强力霉素为诱导剂,包括 Tet-Off 和 Tet-On 两种调控方式^[15]。该系统是以大肠杆菌转座子 Tn10 来源的四环素抗性操作元为基础,利用 Tet 抑制因子(TetR)可特异性的结合 tet 操纵子(tetO)并阻断操作元的转录这一特性建立起来的。Tet-On 系统包括两个基本质粒,一是调控质粒 pTet-On,表达反义四环素转录激活因子 rtTA(由反义四环素抑制因子 rTetR 和单纯疱疹病毒 VP16 转录激活结构域融合而成);另一个是响应质粒 pTRE,是由四环素响应元件(TRE,由 7 个四环素特异操纵子序列 tetO 串联而成)、最小 CMV 启动子(PminCMV)和目的基因三部分组成。当加入诱导剂时,rtTA 与 TRE 结合,激活目的基因的转录;而当诱导剂不存在时,rtTA 不与 tetO 结合,因而不能启动目的基因的转录。

Carvalho AV 等采用四环素诱导的基因表达调控系统考察了 p27 诱导表达对生产 SEAP 的 CHO 细胞生长和代谢的影响,结果表明,SEAP 比产率提高 4 倍,同时谷氨酰胺和葡萄糖比消耗速率增加 2 倍^[16]。本研究在 HEK293 细胞中采用 Tet-On 系统诱导表达 p27 基因,证实了 p27 基因表达导致细胞 G1 期阻滞的作用。p27 的表达使 HEK293 细胞生长速度明显减缓,平台期显著延长,且生长阻滞的程度与 p27 表达水平表现出了一定的相关性。p27 基因诱导表达使 HEK293 细胞葡萄糖比消耗速率和乳酸比生成速率显著降低,这一细胞代谢指标变化提示,p27 基因诱导表达在抑制细胞增殖的同时降低了能量代谢的需求。结合 p27 基因诱导表达对 HEK293 细胞的谷氨酰胺比消耗速率无明显影响的实验结果推断,p27 基因的诱导表达既

能有效地抑制 HEK293 细胞的过度生长、延长细胞培养时间,也可能将原本用于细胞增殖的能量代谢部分地转化到细胞表达产物的生产、提高细胞表达产品的产率,进而达到提高细胞表达产品的生产效率和质量的目的是。

参考文献(References)

- [1] Zeng AP, Deckwer WD. Model simulation and analysis of perfusion culture of mammalian cells at high cell density [J]. Biotechnol Prog, 1999, 15: 373-382
- [2] Trummer E, Fauland K, Seidinger S, et al. Process parameter shifting: Part II. Biophasic cultivation-a tool for enhancing the volumetric productivity of batch processed using Epo-Fc expressing CHO cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 94: 1045-1052
- [3] Bi JX, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1 arrested CHO cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 85: 741-749
- [4] Fogolin MB, Wagner R, Etcheverrigary M, et al. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells[J]. J Biotechnol, 2004, 109: 179-191
- [5] Fussenegger M, Schlatter S, Daetwyler D, et al. Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 468-472
- [6] Khoo SHG, Al-Rubeai M. Detailed understanding of enhanced specific antibody productivity in NS0 myeloma cells [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102(1): 188-199
- [7] Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production[J]. Curr Opin Biotechnol, 2009, 20(6): 700-707
- [8] Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21[J]. Cell, 1994, 78: 67-74
- [9] Sunley K, Butler M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest[J]. Biotech Adv, 2010, 28: 385-394
- [10] Fussenegger M. The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering and advanced gene therapies[J]. Biotechnol Prog, 2001, 17: 1-51
- [11] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 1393-1398
- [12] Weber W, Fussenegger M. Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering [J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18: 399-410
- [13] Meents H, Enenkel B, Werner RG, et al. p27Kip1-mediated controlled proliferation technology increases constitutive sICAM production in CHO-DUKX adapted for growth in suspension and serum-free media [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 79: 619-627
- [14] Watanabe S, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. Regulation of cell cycle and productivity in NS0 cells by the over-expression of p21CIP1 [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 77: 1-7
- [15] Gossen M, Zhu L, Schimke RT. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5547-5551
- [16] Carvalho AV, Marcelino I, Carrondo MJT. Metabolic changes during cell growth inhibition by p27 overexpression [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 63: 164-173