

悬浮培养 CHO 细胞生产重组人促红细胞生成素条件的优化 *

杨 栋^{1,2} 牛红军³ 陆 刚² 史嘉林² 孙浩明² 李 晖^{1△}

(1 哈尔滨医科大学 黑龙江 哈尔滨 150081 ; 2 哈药集团生物工程有限公司 黑龙江 哈尔滨 150025 ;

3 天津现代职业技术学院 天津 300350)

摘要 目的 通过对贴壁培养 CHO 细胞筛选驯化,得到高表达的细胞后进行悬浮培养生产重组人促红细胞生成素(rHuEPO)。方法 利用 96 孔板和 24 孔板对 CHO 细胞进行筛选,得到高表达细胞株后进行驯化,使其适合悬浮培养,经过摇瓶扩增后接种到生物反应器中无血清培养,每天监测葡萄糖含量,测 rHuEPO 表达量。结果 悬浮培养 CHO 细胞生产 rHuEPO,生产周期短,表达量比贴壁培养高出很多,操作方便,减少污染,易于放大,并建立了适合悬浮培养的 CHO 细胞株,为工业化悬浮培养 CHO 细胞生产 rHuEPO 提供了技术基础。结论 经过工艺优化后利用无血清悬浮培养生产促红细胞生成素平均表达量较贴壁培养高,生产周期短,有利于降低生产成本。

关键词 重组人促红细胞生成素;悬浮培养;贴壁培养

中图分类号 R813 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)26-5053-04

An Optimized Method for Suspension Culture of CHO Cells to Produce Recombinant Human Erythropoietin (EPO)*

YANG Dong^{1,2}, NIU Hong-jun³, LU Gang², SHI Jia-lin², SUN Hao-ming², LI Hui^{1△}

(1 Harbin Pharmaceutical Group Bioengineering Co., Ltd, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150025, China;

3 Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin, 300350, China)

ABSTRACT Objective: To screen and domesticate the adherent cultured CHO cells to obtain high expression of cell suspension culture for production of recombinant human erythropoietin erythropoietin (rHuEPO). **Methods:** Using 96-well and 24-well plates culture method to screen and domesticate the highly expressing CHO cell strain. Acclimate the high expression cell strain and make it suitable for suspension culture. It's inoculated into the bioreactor in serum-free culture after amplified by the shake flask, and monitoring of glucose content, measuring rHuEPO expression of daily. **Results:** The suspension culture of CHO cell production of rHuEPO has short production period, higher expression than adherent culture. On the other hand, it is easy to operate and scale-up, but not easy to pollute. Furthermore, we established of the CHO cell strain for suspension culture, which provided a technical basis for industrial production of CHO cells the rHuEPO. **Conclusion:** After process optimization, the use of serum-free suspension culture production of erythropoietin average expression has high, short production period, low cost of production. than adherent culture.

Key words: Recombinant human erythropoietin (EPO); Suspension culture; Adherent culture

Chinese Library Classification(CLC): R813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)26-5053-04

前言

天然 EPO 分子由 193 个氨基酸残基组成, 分子量为 18398D。肽链中有两个二硫键, 分别位于 7 位与 161 位、29 位与 33 位^[1-3]。4 个糖基化位点, 分别位于 24 位、38 位、83 位和 126 位, 前三个为 N 位糖链, 最后一个为 O 位糖链^[4-5]。

由于 EPO 的糖链部分占分子量的 30%~50% 左右, 分支程度不一, 其表现出分子量就不均一。血液存在的天然 EPO 的

分子量约为 30~39 kD^[6-7]。通过重组 DNA 在哺乳动物细胞中表达的 EPO, 其糖基化程度和分子量均与天然 EPO 类似, 在体内也具有促进红细胞生成的作用^[8]。

随着市场对 rHuEPO 需求量的增大, 一种生产成本低, 生产周期短的技术对工业化生产有重要意义, 我们通过对贴壁培养 CHO 细胞驯化后进行悬浮培养生产 rHuEPO 符合这种要求, 为工业化悬浮培养 CHO 细胞生产 rHuEPO 提供了技术基础。

* 基金项目 国家自然科学基金面上项目(30771863) 国家自然科学基金面上项目(81172616) ;

哈尔滨科技厅优秀学科带头人基金项目(RC2008XK004039)

作者简介 杨栋(1978-) 男, 工程师, 主要研究方向 基因工程与生物技术药物,

电话 0451-87135604 E-mail: yangdong_2000@163.com

△通讯作者 李晖 教授, 主要研究方向 生物大分子基因结构与功能研究,

电话 0451-86669577 E-mail: lihui@ems.hrbmu.edu.cn

(收稿日期 2012-02-26 接受日期 2012-03-21)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和培养基 表达 rHuEPO 的贴壁中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-EPO) 工程细胞株由本公司构建, 并冻存于细胞库。基础培养基: DMEM 培养液, 添加 10% 胎牛血清 (均为 SAFC 公司生产)。无血清培养基: 分别为基础培养液 B001 (AmProtein 生产), 流加培养液 F001 (AmProtein 生产), SFM 培养液 (SAFC 公司生产)。

1.1.2 试剂 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco), 其他试剂均为国产分析纯产品。ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司产品), 葡萄糖试剂盒 (中生北控公司产品)。

1.1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱 (日本三洋), 磁性培养瓶 2.2 L (美国 Nalgene 产品), 5 L 生物反应器 (美国 Celligen Plus)。

1.2 方法

1.2.1 细胞筛选 复苏 CHO-EPO 细胞, 培养于 T 25 cm² 细胞培养方瓶 (Corning) 中, 至细胞处于对数生长期时, 以 0.25 % 胰酶消化细胞, 血球计数板计数后, 应用有限稀释法在 96 孔板 (Corning) 中对 CHO-EPO 细胞进行克隆。待克隆细胞生长至板孔面积 70 % 左右时, 将基础培养基吸出, 添加 200 μ L SFM 培养液, 培养 48 h 后, 取上清液进行 Dot-blot 检测^[9]。将筛选得到的 rHuEPO 高表达 CHO-EPO 细胞转入到 24 孔板中, 待克隆细胞生长至板孔面积 70 % 左右时, 将基础培养基吸出, 添加 1000 μ L SFM 培养液, 培养 48 h 后, 取上清液进行 Dot-blot 检测, 进一步确认高表达细胞。

1.2.2 细胞株驯化 将筛选得到的 rHuEPO 高表达 CHO-EPO 细胞转入 T 25 cm² 细胞培养方瓶, 以基础培养基培养, 待细胞长满单层后, 加入 0.25 % 胰蛋白酶消化, 传代至装有基础培养基的 T 75 cm² 细胞培养方瓶 (Corning) 中继续培养, 当细胞铺

满瓶底时, 即得贴壁 CHO-EPO 细胞。取贴壁 CHO-EPO 细胞, 换液, 加入 15 mL 基础培养基和 15 mL 基础培养液 B001, 2 天后吸出一半培养液, 加入等量的基础培养液 B001, 每 2 天重复一次此操作, 直到胎牛血清浓度低于 1 % 后, 以基础培养基 B001 继续培养, 即培养基中血清浓度依次以 5 %、2.5 %、1.25 %、0.625 %、0 % 降低^[9,10]。细胞在基础培养基 B001 中密度达到 5×10^6 cells/mL 时, 即得悬浮 CHO-EPO 细胞。培养条件: 37℃, 5 % CO₂ 培养箱中静置培养。

1.2.3 摇瓶培养 将悬浮 CHO-EPO 细胞依次在装有基础培养基 B001 的 250 mL、1000 mL、3 L 摇瓶中扩增培养, 接种密度均为 5×10^5 cells/mL, 培养条件: 37℃, 摇床转速 80 rpm, 5 % CO₂ 培养箱中培养。

1.2.4 生物反应器悬浮培养 将 3 L 摇瓶培养得到的悬浮 CHO-EPO 细胞接种至生物反应器, 在 37℃, 搅拌速度 80 rpm, 溶氧 (D.O.) 60 %, pH 7.3 条件下以基础培养基 B001 增殖细胞。细胞密度达到 5×10^6 cells/mL 时, 改变培养条件, 细胞增殖阶段结束, 进入 rHuEPO 表达阶段。根据葡萄糖消耗情况, 调整流加培养基 F001 流加量和细胞培养上清液的收获量。每天取样检测 rHuEPO 活性, 当 rHuEPO 活性降低至 5000 IU/mL 时, 停止培养, 将收获的全部细胞培养上清液混匀, 再次取样检测 rHuEPO 活性, 计算 rHuEPO 总活性, rHuEPO 总活性 (IU) = rHuEPO 单位体积活性 (IU/mL) $\times$ rHuEPO 表达液体积。

本课题组前期研究表明, 在 rHuEPO 表达阶段影响悬浮 CHO-EPO 细胞表达 rHuEPO 的重要因素有: 接种密度、反应器搅拌速度、D.O.、pH 值。本研究将以上四种因素作为考察因素, 每个因素设定四个水平, 制定因素水平表, 见表 1。根据正交表 L₁₆(4⁴) 设定 rHuEPO 表达阶段培养条件, 做 4 因素 4 水平的正交实验^[11]。每次实验均悬浮培养 7 $\pm$ 0.5 天, 收获细胞培养上清液 10L (rHuEPO 活性均降低至 5000 IU/mL 左右)。

表 1 L₁₆(4⁴) 正交设计
Table 1 L₁₆(4⁴) Orthogonal Design

Level	A Inoculation density (mL)	B Agitation speed (rpm)	C D.O. %	D Expression stage pH
1	3 $\times 10^5$	50	45	7.25
2	4 $\times 10^5$	60	50	7.20
3	5 $\times 10^5$	70	55	7.15
4	6 $\times 10^5$	80	60	7.10

1.2.5 生物反应器微载体贴壁培养 将贴壁 CHO-EPO 细胞接种到装有微载体的生物反应器中, 接种密度为 5×10^5 cells/mL。在 37℃, 转速 110 rpm, D.O. 50, pH 7.3 条件下, 用基础培养基增殖贴壁 CHO-EPO 细胞。6 天后, 排尽基础培养基。在 37℃, 转速 110 rpm, D.O. 50, pH 7.2 条件下, 采用 SFM 培养基继续培养贴壁 CHO-EPO 细胞, 细胞进入表达 rHuEPO 阶段。每天根据葡萄糖消耗情况, 调整无血清培养基灌注量和细胞培养上清液收获量^[12-15]。在 rHuEPO 表达阶段, 每天取样检测 rHuEPO 活性, 当 rHuEPO 活性降低至 5000 IU/mL 时, 停止培

养, 将收获的全部细胞培养上清液混匀, 再次取样检测 rHuEPO 活性, 计算 rHuEPO 总活性。

1.2.6 检测方法 rHuEPO 体外活性参照 ELISA 试剂盒说明书测定; 葡萄糖含量参照葡萄糖试剂盒说明书测定, 采用 GOD-POD 法测定。

1.2.7 数据统计 根据 rHuEPO 总活性, 采用 SPSS11.5 对生物反应器悬浮培养结果进行多因素多水平分析。

2 结果与分析

2.1 rHuEPO 高表达 CHO-EPO 细胞的筛选

图 1 表明 C9、B10、B11、B12、C11、H5、F2、C3 孔表达量较高，将其分别转入到 24 孔板 C2、D2、E2、F2、C3、D3、E3、F3 孔后 24 孔板中 E2 表达量较高。

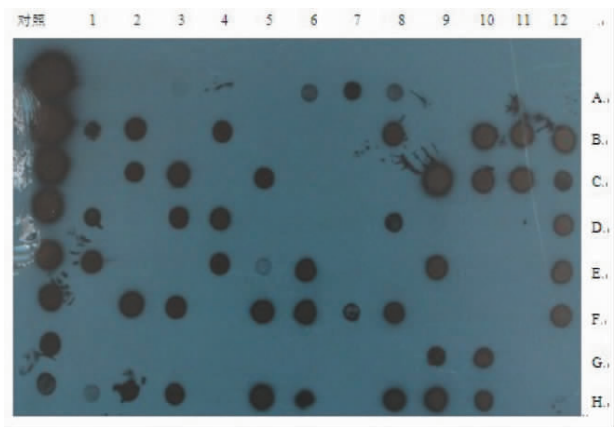


图 1 96 孔板细胞筛选结果

Fig.1 96 well plate cell screening results

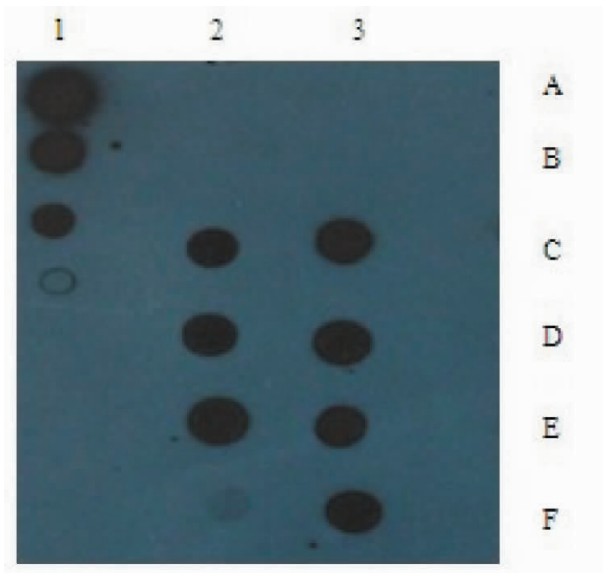


图 2 24 孔板细胞筛选结果

Fig.2 24 well plate cell screening results

表 2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal experiment

Serial number	A	B	C	D	EPO Activity IU/mL
1	1	1	1	1	14051
2	1	2	2	2	14461
3	1	3	3	3	15989
4	1	4	4	4	15102
5	2	1	2	3	15111
6	2	2	1	4	15265
7	2	3	4	1	14834
8	2	4	3	2	15001
9	3	1	3	4	16080
10	3	2	4	3	16401
11	3	3	1	2	16310
12	3	4	2	1	14243
13	4	1	4	2	16121
14	4	2	3	1	14912
15	4	3	2	4	15511
16	4	4	1	3	15502
K1	14900.75	15340.75	15282.00	14510.00	
K2	15052.75	15259.75	14831.50	15473.25	
K3	15758.50	15661.00	15495.50	15750.75	
K4	15512.50	14962.00	15614.50	15489.50	
R	857.75	699.00	783.00	1240.75	

2.2 生物反应器悬浮培养正交试验结果

反应器悬浮培养正交试验结果见表 2 和表 3。方差分析结果(表 3)表明 A 的显著值为 0.018 B 的显著值为 0.044 C 的

显著值为 0.027 D 的显著值为 0.007，四个因素均具有显著意义(P 小于 0.01 或小于 0.05)。从表 2 的 K 值和级差 R 的大小可知影响 rHuEPO 产量的主次顺序为 D>A>C>B，即表达阶

表 3 方差分析结果

Table 3 Anova results of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7891716.500(a)	12	657643.042	20.352	0.015
Intercept	3748316952.250	1	3748316952.250	115997.585	0.000
A	1901398.250	3	633799.417	19.614	0.018
B	990830.250	3	330276.750	10.221	0.044
C	1427234.750	3	475744.917	14.723	0.027
D	3572253.250	3	1190751.083	36.850	0.007
Error	96941.250	3	32313.750		
Total	3756305610.000	16			
Corrected Total	7988657.750	15			

Note: a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .939); Dependent Variable: rHuEPO expression IU/mL.

段 pH 值 > 接种密度 > 溶氧 > 搅拌转速, 产 rHuEPO 的最佳组合为 A3B3C4D3。

综上所述, 采用生物反应器悬浮培养法生产 rHuEPO 的最佳条件为: 接种密度 5×10^5 cells/mL、搅拌转速 70 rpm、溶氧 60%、表达阶段 pH 值 7.15。

2.3 生物反应器微载体贴壁培养结果

反应器微载体贴壁培养, 有血清阶段培养 6 天, 无血清阶段培养 12 天, 共收获上清液 50 L, EPO 表达量为 8010 IU/mL, rHuEPO 总活性为 4.00×10^8 IU。

2.4 生物反应器悬浮培养优化条件的验证

在 2.1 得出的最佳生产条件下, 采用生物反应器悬浮培养法生产 rHuEPO, 共进行 3 次。第一次培养 7 天, 收获上清液 10 L, rHuEPO 的表达量为 16502 IU/mL, rHuEPO 总活性为 1.65×10^8 IU; 第二次培养 6 天, 收获上清液 9.6 L, rHuEPO 的表达量为 16558 IU/mL, rHuEPO 总活性为 1.59×10^8 IU; 第三次培养 7 天, 收获上清液 11 L, rHuEPO 的表达量为 16432 IU/mL, rHuEPO 总活性为 1.80×10^8 IU。由三次验证试验可知, 每次平均培养 6.67 天, 收获上清液 10.2 L, rHuEPO 的表达量为 16471 IU/mL, rHuEPO 总活性为 1.68×10^8 IU。

3 讨论

由于无血清培养基中不含有血清或生物提取物, 其成分及含量清楚, 无血清培养可避免由于血清的成分复杂而难以纯化的因素, 有利于细胞培养批与批之间的稳定性, 避免血清中其他物质对细胞的污染或对细胞产生毒性, 更有利于细胞的分化^[16-20]。目前, 利用贴壁培养方式生产 rHuEPO 的技术比较成熟, 采用无血清悬浮培养技术生产 rHuEPO 的报道较少。本课题组成功驯化得到高表达 rHuEPO 的悬浮 CHO-EPO 工程细胞, 并对该工程细胞的悬浮培养条件进行了优化, 为工业化悬浮培养 CHO 细胞生产 rHuEPO 提供了技术基础。由于贴壁培养过程中加入了血清, 给下游纯化增加了难度, 采用无血清培养后, 在下游纯化过程中更容易得到高纯度的 rHuEPO, 减少纯化的投入。采用悬浮培养 CHO-EPO 工程细胞生产 rHuEPO, 便于产业化放大, 减少污染。随着无血清培养基的研究和进一步

发展, 无血清悬浮培养已成为一种趋势, 目前, 在抗体生产方面已大量应用。从上述试验可以得出, 利用无血清悬浮培养生产促红细胞生成素平均表达量较贴壁培养高, 生产周期短, 有利于生产成本。无血清悬浮培养收获上清液较少, 可以通过放大生物反应器的方法解决, 或在生物反应器上加装细胞分离器的方法加以解决。

参考文献(References)

- [1] Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 7580-7586
- [2] Littlewood JT. Erythropoietin for the treatment of anemia associated with hematological malignancy [J]. *Hematol Oncol*, 2001, 19: 19-30
- [3] Cuzzole M, Mercuriali F, Brugnara C. Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia [J]. *Blood*, 1997, 84: 4248-4267
- [4] Oster W, Schindl F, Heinrichs H, et al. Clinical evaluation of erythropoietin (EPO) in oncology [J]. *Behring Inst Mitt*, 1991, 90: 62-68
- [5] Reid CDL, Fidler IJ, Oliver DO, et al. Erythroid progenitor cell kinetics in chronic haemodialysis patients responding to treatment with recombinant human erythropoietin [J]. *British Journal of Haematology*, 1988, 70: 375-380
- [6] Keen MJ, Rapson NT. Development of a serum-free culture media for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line [J]. *Cytotechnology*, 1995, 17: 153-163
- [7] Semenza GL. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1994, 8(5): 863-867
- [8] 莎姆布鲁克. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 549-556
Shamu BJ. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* [M]. Beijing: Science Press, 2005: 549-556
- [9] 黄斌, 牛红星, 朱明龙, 等. rCHO 细胞无血清适应及悬浮培养 [J]. 华东理工大学学报, 2004, 30(1): 38-42
Huang Bin, Niu Hong-xing, Zhu Ming-Long, et al. rCHO cells in serumfree adaptation and suspension culture [J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 2004, 30(1): 38-42

(下转第 5052 页)

- activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A 1992, (89):7208-7212
- [17] Thiel G, Blatt M R, Fricker M D, et al. Modulation of K⁺ channels in Vicia stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, (90):11493-11497
- [18] Leblanc N. A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasmamembrane[J]. J Biol Chem, 1999, (274):28314-28320
- [19] Baulry J M. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin[J]. Plant Physiol, 2000, (124):1229-1238
- [20] Tian H, Klambt D, Jones A M. Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor[J]. J Biol Chem, 1995, (270):26962-26969
- [21] Henderson J. Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin[J]. Planta, 1997, (202):313-323
- [22] Li Jin, Wu Zhao-yang, Xiao Lang-tao, et al. A Novel Piezoelectric Biosensor for the Detection of Phytohormone β -Indole Acetic Acid [J]. Analytical Sciences, 2002, 18(1):1-5
- [23] Li Jin, Xiao Lang-tao, Zeng Guang-ming, et al. A Renewable Amperometric Immunosensor for Phytohormone β -indole Acetic Acid Assay [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 494(1):177-185
- [24] Wang Ruo-zhong, Xiao Lang-tao, Yang Ming-hui, et al. Amperometric Determination of Indole-3-acetic Acid Based on Platinum Nanowires and Carbon Nanotubes [J]. Chinese Chemical Letters, 2006, 17(12):1585-1588
- (上接第 5056 页)
- [10] Ozturk SS, Palsson BO. Physiological changes during the adaption of hybridoma cells[J]. Biochemical and Biotechnology, 1991, 37: 35-46
- [11] 黄志宏, 方积乾. 数理统计方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 258-259
- Huang Zhi-hong, Fang Ji-qian. Mathematical Statistics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 258-259
- [12] 汪东海. 重组人促红细胞生成素中唾液酸含量对体内生物活性的影响 [J]. 中国生物制品杂志, 1999, 12(4): 227-228
- Wang Dong-hai. Recombinant human erythropoietin erythropoietin hormone in sialic acid content on the in vivo biological activity [J]. Chinese Journal of Biological Products, 1999, 12(4): 227-228
- [13] 郑立恒, 李恒, 宋桂芹, 等. CHO 无血清培养基研究 [J]. 四川生理科学杂志. 2007, 29(1): 3-5
- Zheng Li-heng, Li Heng, Song Gui-qin, et al. CHO serum-free medium for research [J]. Journal of Physiological Sciences, 2007, 29(1): 3-5
- [14] 陈昭烈, 肖成祖. 动物细胞无血清培养基及其应用 [J]. 生物工程进展, 1994, 14(5): 23-27
- Chen Zhao-lie, Xiao Cheng-zu. Serum-free medium be using culture Animal cells and its application[J]. Advances in bioengineering, 1994, 14(5): 23-27
- [15] 申烨华, 耿信笃. CHO 细胞表达系统研究新进展 [J]. 生物工程进展. 2000, 20(4): 23-25
- Shen Ye-hua, Geng Xin-du. CHO cell expression system progress [J]. Advances in bioengineering, 2000, 20(4): 23-25
- [16] Keen MJ, Rapson NT. Development of a serum free culture media for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line [J]. cytotechnology, 1995, 17: 153-163
- [17] Glassy MC, Tharakan JP, Chao PC. Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production [J]. Biochemical and Biotechnology, 1988, 32: 1015-1028
- [18] 余泽华, 刘冬连, 陈曲侯. 昆虫细胞无血清培养基的研究进展 [J]. 生物工程进展, 1996, 16(1): 45-49
- Yu Ze-hua, Liu Dong-lian, Chen Qu-hou. Insect cell research progress in serum-free medium [J]. Biological Engineering Progress, 1996, 16(1): 45-49
- [19] 王智宇, 王佳凤. 进口与国产 DMEM 在 CHO 细胞培养中的应用 [J]. 中国临床医学实践论坛. 长春: 吉林科学技术出版社, 2003: 19-20
- Wang Zhi-yu, Wang Jia-feng. Import and domestic DMEM in CHO cell culture [J]. Chinese Clinical Practice Forum. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 2003: 19-20
- [20] 熊宗贵. 生物技术制药 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 156-160
- Xiong Zong-gui. Biotechnology pharmaceutical [M]. Higher Education Press Of Beijing, 1999: 156-160