

本文引用:杜秋杰,王浩民,傅裕顺,等. 酵母和植物水解物在中国仓鼠卵巢细胞生产重组蛋白中的应用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(3): 286-289. DOI: 10. 7683/xyxyxb. 2023. 03. 017.

【综述】

酵母和植物水解物在中国仓鼠卵巢细胞生产重组蛋白中的应用研究进展

杜秋杰, 王浩民, 傅裕顺, 江宇阳, 杨 焱, 王小引, 王天云

(新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 目前, 重组蛋白药物主要是由中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达系统生产的。细胞培养技术特别是培养基是影响 CHO 细胞表达重组蛋白的关键因素。酵母和植物水解物作为细胞培养基的补充物, 已广泛应用于无血清培养基的优化, 以改善 CHO 细胞的生产性能, 提高重组蛋白药物的质量和产量。本文综述了酵母和植物水解物在 CHO 细胞生产重组蛋白中的应用, 以期研发更安全、有效的无血清培养基及提高重组蛋白药物的产量提供参考。

关键词: 酵母水解物; 植物水解物; 培养基; 中国仓鼠卵巢细胞

中图分类号: Q813 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2023)03-0286-04

Application of yeast and plant hydrolysates in the production of recombinant protein in Chinese hamster ovarian cells

DU Qiujie, WANG Haomin, FU Yushun, JIANG Yuyang, YANG Ye, WANG Xiaoyin, WANG Tianyun

(School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: At present, recombinant protein drugs are mainly produced by the Chinese hamster ovary (CHO) cell expression system. Cell culture technology, especially culture medium, is the key factor affecting the expression of recombinant protein in CHO cells. Yeast and plant hydrolysates, as supplements to cell culture media, have been widely used in the optimization of serum-free culture media to improve the production performance of CHO cells and improve the quality and yield of recombinant protein drugs. This paper reviews the application of yeast and plant hydrolysates in the production of recombinant protein from CHO cells, with a view to providing references for the development of safer and more effective serum-free culture medium and the improvement of the production of recombinant protein drugs.

Key words: yeast hydrolysates; plant hydrolysates; medium; Chinese hamster ovary cell

重组蛋白为采用基因工程技术生产的蛋白质, 具体是指将目的基因连接到合适表达载体后, 导入特定细胞, 从而利用宿主细胞的遗传系统表达有功能的蛋白质。重组蛋白药物是生物药物中的核心产品, 用于弥补体内蛋白的缺失, 从而对疾病的治疗发挥关键作用。随着基因工程技术的发展, 重组蛋白药物在临床治疗中的应用日益广泛。细菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞都可作为重组蛋白表达的宿主细胞。哺乳动物细胞具有类似于人类细胞的翻译后加工修饰功能, 已成为目前重组蛋白药物生产的

重要平台^[1], 其中中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞是最常用的宿主细胞, 近 70% 重组蛋白药物由 CHO 细胞表达生产^[2-3]。培养基为细胞培养的基础, 其在很大程度上影响重组蛋白的产量和质量。目前, 无血清培养基已成为哺乳动物细胞生产重组蛋白的必需原料^[4-5]。在无血清培养基的研发中, 各种水解物尤其是非动物源水解物的添加对细胞培养及其重组蛋白表达具有积极作用^[6-7]。本文综述了酵母和植物水解物在 CHO 细胞生产重组蛋白中的应用, 以期研发更安全、有效的无血清培养基及提高重组蛋白药物的产量提供参考。

1 无血清培养基

细胞培养基是细胞高效表达蛋白的基础, 安全、有效的细胞培养基可提高蛋白产量、简化蛋白提纯步骤。绝大多数细胞的体外培养需要在基础培养基

DOI: 10. 7683/xyxyxb. 2023. 03. 017

收稿日期: 2021-12-01

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(编号: 22A310009); 河南省高校大学生创新创业训练计划项目资助(编号: 202210472008)。

作者简介: 杜秋杰(1998-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生在读, 研究方向: 基因表达与调控。

通信作者: 王天云(1968-), 男, 山东梁山人, 博士, 教授, 研究方向: 重组蛋白表达; E-mail: wty@xxmu.edu.cn。

中添加体积分数 1% ~ 20% 的血清^[8-10],但血清批次间的差异、易被支原体污染以及血清中大量成分复杂的蛋白质等因素,严重影响了细胞培养及目的蛋白的分离、纯化^[11]。无血清培养基是无需添加血清即可维持细胞体外生长繁殖合成培养基,由基础培养基和添加成分组成。目前,培养基优化为动物细胞大规模培养的关键环节。无血清培养基的优化主要针对培养基中的碳源、氨基酸、维生素、微量元素、核苷酸等营养物质进行优化。

2 酵母和植物水解物在 CHO 细胞生产重组蛋白中的应用

有研究发现,在无血清培养基中添加蛋白水解物能够提高动物细胞蛋白表达系统的性能^[12]。蛋白水解物是蛋白质经酶、酸、碱和发酵等方法水解得到的混合物,其主要成分为肽类,还包括少量氨基酸、糖类、脂类、矿物质和维生素等物质。MIZRAHI^[13]研究发现,将蛋白水解物应用于动物细胞培养中可维持细胞生长,提高重组蛋白产量。研究表明,蛋白水解物中存在不同分子质量的活性短肽,这些肽段可作为外部分子信号影响细胞的增殖和代谢,并能促进细胞生长,提高细胞活力^[14]。由于动物源性蛋白水解物容易造成不可避免的培养基污染,因此,进一步优化无血清培养基的关键之一在于开发非动物源性水解物。在细胞培养中广泛使用的蛋白水解物是微生物源性(如酵母水解物)和植物源性水解物(如大豆蛋白水解物、谷类水解物等)。

2.1 酵母水解物 酵母水解物包括酵母提取物和酵母蛋白胨。酵母提取物是指酵母充分自溶后产生的水溶性成分,酵母蛋白胨是指酵母经外源酶水解后的可溶性蛋白质成分^[15]。酵母提取物作为动物细胞培养基中的非动物源性成分,已被广泛应用到重组蛋白的生产中。缪亚娜等^[16]在培养 CHO 细胞的无血清悬浮培养基中分别添加 1.0、2.5、5.0、10.0 g · L⁻¹ 酵母提取物,结果发现,含 5.0 g · L⁻¹ 酵母提取物的无血清悬浮培养基提高人血清白蛋白与白细胞介素-2(human serum albumin/interleukin-2, HSA/IL-2)表达量的效果最佳,细胞密度可达 9.9×10^3 L⁻¹,HSA/IL-2 表达量可达 104.06 mg · L⁻¹,分别是未添加酵母提取物对照组的 1.42 倍和 1.51 倍^[16]。SUNG 等^[17]在培养 CHO 工程细胞株的无血清悬浮培养基中添加 5 g · L⁻¹ 的酵母提取物,结果发现,血小板刺激因子的产量达到了 40.41 g · L⁻¹,是未添加酵母提取物的无血清悬浮培养基的 11.5

倍。HU 等^[18]研究发现,在培养 CHO 细胞的无血清培养基中添加酵母提取物可显著提高 Fc 融合蛋白的比生产率,其机制为酵母提取物通过将细胞周期阻滞在 G₁ 期,增强了 Fc 融合蛋白基因的转录;此外,酵母提取物通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路增强了 Fc 融合蛋白的翻译,并缓解了 Fc 融合蛋白翻译后步骤的阻滞。CHO 细胞的细胞动力学相关研究表明,添加酵母提取物可以延长细胞生长期,其机制为加快三羧酸循环和改善氧化代谢过程^[19]。

酵母水解物在促进细胞生产重组蛋白方面具有显著效果,是动物细胞无血清培养基的理想添加剂。MOSSER 等^[19]研究发现,将 1 g · L⁻¹ 的酵母提取物和 4 g · L⁻¹ 的酵母蛋白胨混合添加到 CHO 细胞培养基中,可使 CHO 细胞的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 表达量增加 180%。HO 等^[20]研究发现,相较于培养基中未添加酵母水解物的对照组,在培养基中添加酵母水解物可使 CHO DG44 细胞的阿达木单抗比生产率提高 2.35 倍^[20]。酵母水解物含有的氨基酸、短肽等成分可以改善细胞内代谢过程^[21]。此外,酵母水解物中各种氨基酸的分解代谢途径极大地影响了细胞内代谢产物的分布,进而改善细胞生长^[22-23]。细胞培养基很少含有核苷酸及其前体成分,细胞内的核苷酸大部分是从氨基酸等小分子从头合成的。细胞培养基中添加酵母水解物可以为细胞提供核苷酸、核苷和碱基等原料来构建补救合成途径;此外,还可以为细胞增加能量供应,而且有助于重组蛋白质的糖基化。

2.2 大豆水解物 在无血清培养基中添加大豆蛋白水解物,可促进细胞生长,提高重组蛋白的产量。SCHRÖDER 等^[24]研究发现,在培养 CHO-DUKXB11 细胞系特定的无血清、无蛋白培养基中添加 5 g · L⁻¹ 大豆蛋白胨,可使细胞在低和高接种密度下良好地生长。HO 等^[20]研究发现,与未添加大豆水解物的对照组相比,在 CHO DG44 细胞无血清培养基中添加 5 g · L⁻¹ 大豆水解物可使阿达木单抗滴度提高 1.65 倍,达到 784 mg · L⁻¹。CHUN 等^[25]研究发现,与无血清培养基中未添加水解物的对照组相比,在 CHO DG44 细胞分批培养中添加大豆水解物可使最大活细胞密度增加 1.44 倍,细胞生长速率增加 1.24 倍。XU 等^[26]研究发现,大豆水解物可以作为培养基中的蛋白质替代品,在培养基中加入大豆蛋白水解物可使 CHO-K1 细胞的单克隆效率提高 66%,其机制可能为大豆水解物中的多肽通过刺激

细胞的生长和增殖来提高细胞的克隆效率。GUPTA 等^[27]研究发现,与未添加水解物的对照组相比,在限定化学成分培养基中分别补充 30 种不同的大豆蛋白水解物,可使 CHO 细胞活细胞密度积分增加 1.5~4.4 倍,IgG 产量增加 1.2~2.8 倍;进一步采用非靶向代谢组学方法分析表明,大豆蛋白水解物中的乳酸苯酯和阿魏酸分别促进了细胞生长和 IgG 产量^[27]。

2.3 谷类水解物 谷类可分为禾谷类、豆菽类和薯类 3 大类。常被用于添加到动物细胞培养基中的谷类水解物为水稻水解物和小麦水解物。BALLEZ 等^[28]研究发现,在培养 CHO-320 细胞的无血清培养基中添加小麦水解物,可使细胞密度增加 25%, γ 干扰素的分泌量增加 60%。MOLS 等^[29]研究发现,在培养 CHO-320 细胞的无血清培养基中添加水稻水解物,可使重组 IFN- γ 的分泌量增加约 30%。谷类水解物促进 CHO-320 细胞生长和重组 γ 干扰素分泌不仅是由于水解物提供了营养物质^[28],还因为水解物中含有的蛋白酶抑制剂可以保护重组蛋白,使其不会被宿主细胞的内源性蛋白水解^[29]。

2.4 其他水解物 除了比较常见的酵母、大豆等水解物,其他的非动物源性水解物也被应用于无血清培养基中。ZHANG 等^[30]用蚕丝加工废液中的丝胶水解物替代胎牛血清加入到无血清培养基中培养 CHO 细胞,结果发现,与未添加水解物的对照组相比,添加 15 mg · L⁻¹ 丝胶水解物后细胞形态良好,存活率更高,细胞生长和增殖能力更好,且可提高趋化因子基因、抑制素 β A 亚基基因相对表达量。CHABANON 等^[31]研究发现,在无血清培养基中添加菜籽水解物培养 CHO 细胞,培养 170 h 后,与不添加水解物的对照组相比,最大细胞密度增加了 175%。

2.5 水解物混合物 BURTEAU 等^[32]研究发现,在无血清培养基中添加大豆水解物对 CHO 细胞的比生长速率有一定的促进作用,此外,添加酵母液可提高细胞特异性抗体生产力;添加 58% 的大豆水解物和 42% 的大麦面筋水解物时,与未添加水解物的对照组相比,细胞最大比生长速率提高了 20%;添加 34% 的大豆水解物、18% 的小麦面筋水解物和 48% 的酵母水解物混合物时,细胞特异性抗体生产力提高 52%。KIM 等^[33]研究发现,相较于未添加水解物的对照组,在培养 CHO-DG44 细胞的无血清培养基中添加 50% 大豆水解物和 50% 小麦面筋水解物的混合水解物(总质量浓度为 5 g · L⁻¹)可使最大活细胞浓度提高 1.6 倍;添加 17% 酵母提取物、

67% 大豆水解物和 17% 小麦面筋水解物混合物可使抗体浓度增加 2.8 倍。目前,酵母和植物水解物在细胞培养中的作用机制尚未完全明确,由于水解物的来源及生产工艺不同,导致其氨基酸组成、肽段分子质量大小及结构不同,因此,对细胞的影响也有所不同。

3 总结与展望

酵母和植物水解物作为培养基添加剂已被广泛用于 CHO 细胞生产重组蛋白中。酵母和植物水解物在无血清培养基中通常作为细胞能量来源,可促进细胞生长并提高重组蛋白的产量。然而,由于水解物在无血清细胞培养基中的作用机制尚未完全明确,因此,水解物的添加仍然具有一些不确定性。未来需进一步分析明确酵母和植物水解物对 CHO 生长及重组蛋白生产力发挥作用的有效成分及作用机制。

参考文献:

- [1] URQUHART L. Top companies and drugs by sales in 2019[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(4): 228.
- [2] 冯莹莹,肖梦珂,路江涛,等. APRT 缺陷型 CHO 细胞系的建立及其重组蛋白表达能力评价[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3453-3465.
- [3] FENG Y Y, XIAO M K, LU J T, et al. Development of an APRT-deficient CHO cell line and its ability of expressing recombinant protein[J]. *Chin J Biotechnol*, 2022, 38(9): 3453-3465.
- [4] AMIRI S, ADIBZADEH S, GHANBARI S, et al. CRISPR-interceded CHO cell line development approaches[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2023, Online ahead of print.
- [5] BIELSER J M, KRAUS L, BURGOS-MORALES O, et al. Reduction of medium consumption in perfusion mammalian cell cultures using a perfusion rate equivalent concentrated nutrient feed[J]. *Biotechnol Prog*, 2020, 36(5): e3026.
- [6] IGARASHI K, KASHIWAGI K. Functional roles of polyamines and their metabolite acrolein in eukaryotic cells[J]. *Amino Acids*, 2021, 53(10): 1473-1492.
- [7] 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, 116(4): 816-830.
- [8] 张邵博,靳冬武,李明生. 蛋白水解物制备工艺及其在生物技术领域中的应用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(2): 354-362.
- [9] ZHANG S B, JIN D W, LI M S. Research progress of preparation process of protein hydrolysates and its application in biotechnology fields[J]. *Natural Product Res Dev*, 2019, 31(2): 354-362.
- [10] XU W J, LIN Y, MI C L, et al. Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in CHO cells[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107(4): 1063-1075.
- [11] DELUCA K F, MICK J E, DELUCA J G. Production and purifica-

- tion of recombinant monoclonal antibodies from human cells based on a primary sequence[J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(4):101915.
- [10] 李伟风,樊振林,张洹瑜,等.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[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(4):905-916.
- LI W F, FAN Z L, ZHANG H Y, *et al.* Advances of serum-free medium for CHO cells for the production of recombinant protein[J]. *Chin J Cell Biol*, 2021, 43(4):905-916.
- [11] ROMANOVA N, SCHELLETTER L, HOFFROGGE R, *et al.* Hyperosmolality in CHO cell culture: effects on the proteome[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(7):2569-2586.
- [12] 谷瑞增,刘艳,林峰,等.蛋白水解物在动物细胞培养中的应用研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012, (9):21-27.
- GU R Z, LIU Y, LIN F, *et al.* Application and research progress of protein hydrolysates in animal cell culture[J]. *Biotechnol Bulletin*, 2012, (9):21-27.
- [13] MIZRAHI A. Primatone RL in mammalian cell culture media[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1977, 19(10):1557-1561.
- [14] 赵丽丽,刘忠,程凡亮,等.重组CHO细胞无血清培养基的研制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(7):910-913.
- ZHAO L L, LIU Z, CHENG F L, *et al.* Preparation of serum-free medium for culture of recombinant CHO cells[J]. *Chin J Biol*, 2014, 27(7):910-913.
- [15] 李秋霞,颜为红,贺海波,等.酵母浸出物FP103对CHO细胞生长的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(9):1000-1002, 1008.
- LI Q X, YAN W H, HE H B, *et al.* Effect of extract FP103 from yeast on growth of CHO cells[J]. *Chin J Biol*, 2020, 33(9):1000-1002, 1008.
- [16] 缪亚娜,熊文典,万爱妮,等.表达HSA/IL2的重组CHO细胞的无血清培养基优化研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(6):95-101.
- MIAO Y N, XIONG W D, WAN A N, *et al.* Optimization of serum-free medium for culturing recombined CHO expressing HSA/IL2[J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(6):95-101.
- [17] SUNG Y H, LIM S W, CHUNG J Y, *et al.* Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63(5):527-536.
- [18] HU D, SUN Y, LIU X, *et al.* Understanding the intracellular effects of yeast extract on the enhancement of Fc-fusion protein production in Chinese hamster ovary cell culture[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(20):8429-8440.
- [19] MOSSER M, CHEVALOT I, OLMOS E, *et al.* Combination of yeast hydrolysates to improve CHO cell growth and IgG production[J]. *Cytotechnology*, 2013, 65(4):629-641.
- [20] HO S C, NIAN R, WOEN S, *et al.* Impact of hydrolysates on monoclonal antibody productivity, purification and quality in Chinese hamster ovary cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2016, 122(4):499-506.
- [21] MAHBOUDI F, ABOLHASSAN M R, AZARPANAH A, *et al.* The role of different supplements in expression level of monoclonal antibody against human CD20[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2013, 5(3):140-147.
- [22] KIM D Y, CHAUDHRY M A, KENNARD M L, *et al.* Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production[J]. *Biotechnol Prog*, 2013, 29(1):165-175.
- [23] KIM J Y, KIM Y G, HAN Y K, *et al.* Proteomic understanding of intracellular responses of recombinant Chinese hamster ovary cells cultivated in serum-free medium supplemented with hydrolysates[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(6):1917-1928.
- [24] SCHRÖDER M, MATISCHAK K, FRIEDL P. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11[J]. *Biotechnol*, 2004, 108(3):279-292.
- [25] CHUN B H, KIM J H, LEE H J, *et al.* Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture[J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(5):1000-1005.
- [26] XU W, YU X, ZHANG J, *et al.* Soy hydrolysate mimic autocrine growth factors effect of conditioned media to promote single CHO-K1 cell proliferation[J]. *Tissue Cell*, 2019, 58:130-133.
- [27] GUPTA A J, WIERENGA P A, GRUPPEN H, *et al.* Influence of protein and carbohydrate contents of soy protein hydrolysates on cell density and IgG production in animal cell cultures[J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31(5):1396-1405.
- [28] BALLEZ J S, MOLS J, BURTEAU C, *et al.* Plant protein hydrolysates support CHO-320 cells proliferation and recombinant IFN-gamma production in suspension and inside microcarriers in protein-free media[J]. *Cytotechnology*, 2004, 44(3):103-114.
- [29] MOLS J, PEETERS-JORIS C, WATTIEZ R, *et al.* Recombinant interferon-gamma secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2005, 41(3/4):83-91.
- [30] ZHANG M, CAO T T, WEI Z G, *et al.* Silk sericin hydrolysate is a potential candidate as a serum-substitute in the culture of Chinese hamster ovary and henrietta lacks cells[J]. *J Insect Sci*, 2019, 19(1):10.
- [31] CHABANON G, ALVES DA COSTA L, FARGES B, *et al.* Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(15):7143-7151.
- [32] BURTEAU C C, VERHOEYE F R, MOLS J F, *et al.* Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-gamma-producing CHO cell line[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(7):291-296.
- [33] KIM S H, LEE G M. Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(4):639-648.