

different complex in nucleus such as RNA polymerase II holoenzyme, chromatin remodeling complexes, nucleosome and enhanceosome, which participate each step of gene transcription and assemble into active transcription complex. Formation of these complexes integrates lots of information of transcription regulation and increase the efficiency of

transcription, which is the basis of orderly efficient expression of genes. On the other hand, it is a challenge to study these transcription complexes and development of new technology is important.

Key words gene expression regulation, transcription complex, chromatin

外源蛋白在中国仓鼠卵巢巢细胞中高效表达的策略*

刘国奇 王海涛¹⁾

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 高效表达外源蛋白, 在生物制药中有重要意义. 中国仓鼠卵巢巢细胞 (Chinese hamster ovary cell) 是表达外源蛋白的最佳真核表达系统之一. 影响外源蛋白在 CHO 细胞表达的因素甚多, 主要包括载体、宿主细胞和外源基因几方面. 深入了解和灵活运用它们之间的关系, 有助于获得外源基因在 CHO 细胞中的高效表达.

关键词 重组蛋白, CHO 细胞, 高效表达

学科分类号 Q78

中国仓鼠卵巢巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO 细胞) 是表达外源真核基因的最佳宿主之一. 但不同研究报道的外源蛋白表达水平差异较大. 本文阐述优化外源蛋白在 CHO 细胞中高效表达的策略.

1 CHO 细胞表达体系

目前, 广泛应用于生物制药的真核表达系统主要有酵母和 CHO 细胞. 常用的 CHO 细胞系有两种: CHO 和 CHO (DHFR⁻). 与其他表达系统相比, CHO 细胞具有如下优点: a. 外源蛋白容易在 CHO 细胞中合成并分泌到培养基中; b. 表达蛋白的折叠及二硫键的形成几乎与天然蛋白质相同; c. 在正常的氨基酸位置上发生糖基化; d. 能完成其他翻译后加工与修饰; e. 能正确组装多亚基蛋白; f. 外源基因的整合稳定; g. 能以悬浮培养或在无血清培养基中达到高密度, 且培养体积能达到 1 000 L 以上. 因此, CHO 细胞在生物制药业中受到广泛重视.

2 优化表达载体系统

2.1 影响外源蛋白在 CHO 细胞中的表达的因素

a. 转录效率; b. mRNA 的加工; c. mRNA 的

稳定性及翻译效率; d. 目的基因拷贝数; e. 外源蛋白翻译后的加工、分泌和稳定性. 针对上述因素, 在构建或选择 CHO 细胞表达载体时应考虑如下调控元件: a. 启动子和增强子 (P/E); b. 多聚腺苷酸加尾信号 (pA); c. 内含子 (INS); d. 选择标记, 如共扩增基因二氢乙酸还原酶 (DHFR) 和谷氨酰胺合成酶 (GS); e. 多克隆位点 (MCS); f. 原核复制起始区 (ori) 和抗性基因 (如 Ap) 组成的载体骨架, 以方便在 *E. coli* 中基因克隆. 真核调控元件是 CHO 细胞表达载体的重点, 图 1 是哺乳动物细胞表达载体的模式图.

ori	P/E	INS	MCS	pA	P/E	DHFR	pA	AP
-----	-----	-----	-----	----	-----	------	----	----

图 1 CHO 细胞表达载体的模式图

2.2 选择强启动子

强启动子/增强子是获得高表达的第一步. 目前商业化的表达载体中主要使用三种启动子. SV40 启动子是非洲猿猴病毒的启动子, 是最早用

* 国家“863”计划资助: Z18-01.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 66948632, E-mail: wanght@public.bta.net.cn

收稿日期: 1999-10-09, 修回日期: 2000-03-06

于构建真核表达载体的启动子。此外还有人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, hCMV) 的启动子/增强子, 研究表明: hCMV 启动子比 SV40 的启动子的启动能力强^[1]。1989 年, Uetsuki 等^[2] 从人成纤维细胞的染色体中分离到人延伸因子的启动子 EF1- α 启动子。由于核糖体合成任何蛋白质时均需要延伸因子, 决定了该基因的启动子必须要有较强的启动能力。研究表明: EF1- α 启动子是迄今最强的启动子之一。

2.3 选择高效多聚腺苷酸加尾信号 (pA)

真核基因的 hnRNA 的加工过程需要多聚腺苷酸加尾信号 (pA)。实验表明: 除去 pA 后, 外源蛋白表达量降低 90%^[3]。研究表明: 有两处 DNA 序列决定着前体 mRNA 的多聚腺苷酸化。一是在多聚腺苷酸化位点上游 11~30 个核苷酸处的五聚体保守序列 AAUAAA; 二是切割和多聚腺苷酸加尾反应的识别位点^[4]。实验表明: 该处的缺失和点突变将阻止多聚腺苷酸化反应的正常进行。另一处不太保守的序列是 TG 共有序列。实验表明: 除去该共有序列可能影响前体 mRNA 3' 端加工的位置^[5]。目前多采用 SV40 的晚期及早期 pA, 牛生长素基因的 pA 和人工合成的 pA。

2.4 内含子序列

实验表明: 表达载体中引入天然或人工合成的内含子序列有利于引导外源蛋白前体 mRNA 的稳定性^[6], 从而增加翻译效率, 提高蛋白质的表达。有利于内含子的剪切的共有序列由三部分组成: 供体 (splicing donor, SD) 5' C (A) AG: GT (A) AGT 3', 位于内含子的 5' 端与外显子交界处; 受体 (splicing acceptor, SA) 5' CAG: G3', 位于内含子的 3' 端与外显子交界处; 在内含子受体位点的上游 11 nt 处为分支点 (branch point) T/C。不同的载体中内含子的长短不一, 但上述三个拼接位点不可少。

2.5 核糖体内部进入位点

在表达载体的设计中, 翻译水平也是重点考虑的环节。内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 是从细小 RNA 病毒中发现的^[7], 由它连接的开放阅读框架可以同时翻译。IRES 上游的阅读框架的翻译采用常规的依赖于帽子结构的扫描翻译起始模式; IRES 下游的阅读框架的翻译采取不依赖于帽子结构的直接翻译起始。IRES 序列被广泛应用于构建双顺反子或多顺反子哺乳动物细胞表达载体。用 IRES 构建多个顺反子

表达载体, 可以表达多亚基蛋白 (图 2)。

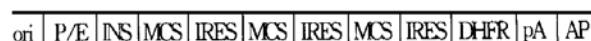


图 2 多顺反子表达载体

2.6 运用共扩增基因做选择标记

在 CHO 细胞表达载体中有两类选择标记。NEO 等是非扩增基因, 这种选择标记对目的基因的拷贝数没有影响, 主要用于构建瞬时表达载体。另一类选择标记具有扩增基因的功能, 也称共扩增基因^[8], 如二氢叶酸还原酶 (DHFR)、谷氨酰氨合成酶 (GS) 等。当携带共扩增基因的表达载体转染 CHO 细胞后, 随着培养基中选择性药物浓度的逐渐增加, 共扩增基因的拷贝数不断增加; 同时, 其侧翼的 DNA 片段也会相应得到扩增, 使目的基因的拷贝数增加几百到几千倍^[9], 从而达到外源基因的高效表达。表达外源蛋白最成功的这类载体受体系统主要有 CHO/DHFR 和 CHO/GS。

2.7 弱化选择标记基因的表达

一种双顺反子载体将选择基因通过一段寡聚核苷酸连在目的基因的 3' 端 (图 3a)^[10], 前体 mRNA 在翻译时, 位于目的基因 3' 端下游的共扩增基因的翻译起始的效率大大降低, 导致翻译水平明显低于上游的目的基因。

另一种载体则将共扩增基因插入到人工合成的内含子内部, 位于剪切的供体 (splicing donor, SD) 与分支点 (branch point) 之间, 目的基因紧接在内含子的下游 (图 3b)。因 DHFR 基因位于内含子内部, 前体 mRNA 在剪切时, 95% 的共扩增基因的 mRNA 被剪切掉^[11]。

上述两种载体具有相同的特点: 由于选择标记基因的表达水平降低, 与常规的表达载体相比, 选择压相同时, DHFR 基因拷贝数高, DHFR 的表达量大的细胞株得以生存。相应的外源基因的表达水平得到提高。

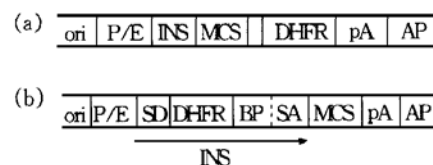


图 3 弱化选择标记的载体

2.8 表达元件在 CHO 细胞染色体上的整合

当环状质粒 DNA 导入 CHO 细胞后, 环状质粒首先随机断裂, 然后随机整合到 CHO 细胞染色

体DNA中(采用同源重组的定点整合除外)。为了最大限度地保证表达元件的完整性,一般在转染前要选择合适的酶切位点将DNA线性化。另一方面:DNA进入细胞后,在染色体中的整合是随机的,表达元件整合部位的上游及下游的DNA的遗传组成将影响外源蛋白的表达水平。能够提高外源基因表达水平的整合部位被称做热点(hot spot)。鉴于此,有人设计载体来筛选CHO细胞染色体上的热点,以提高目的基因表达。采取两种方法弱化选择标记NEO基因的表达。一是在上游进行突变,弱化NEO的表达翻译起始效率。二是在NEO

的内部插入一个人工合成的内含子(图4),内含子中Not I切点插入目的基因和DHFR基因,在图5所示的表达载体中NEO的表达受到了极大的弱化。在一定的G418浓度的培养基里,只有当人工组建的NEO基因整合在染色体DNA的热点部位时,NEO基因的表达量足够高,才能保证细胞存活。分离NEO抗性的克隆,进一步在MTX的培养基中培养,以提高基因的拷贝数。据报道:使用这种载体,在CHO细胞中的CD20的单克隆抗体表达量最高能达到2 g/L^[12]。



图4 人工合成的内含子的结构

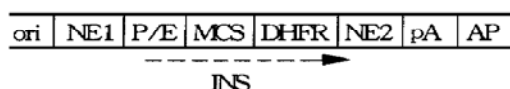


图5 筛选CHO热点的载体

NE1和NE2: NEO基因中插入人工内含子后形成的两个外显子

3 基因本身对表达的影响

用同样的载体受体系统表达不同的基因,表达水平可能相去甚远。Kozak^[13]系统分析了mRNA的5'端的序列与翻译效率的关系。结果表明:最有效的翻译起始的共有序列是5'-CCA/GCCATGG-3' (划线的为起始密码子),而且,最重要的是-3位的嘌呤,其次是+4位的G。实验表明:具有Kozak序列与否将使翻译起始的差异在一个数量级。

基因密码子的偏性问题值得注意。在不改变氨基酸组成的前提下,通过修饰密码子序列,也可以提高基因的表达水平。目前公认的观点为:通过优化基因的密码子序列可以适应tRNA的同工受体及宿主的反义密码子摇摆位置处被修饰的核苷酸的丰度;同时,也有利于翻译的二级结构的形成。

另外,有研究表明:基因组DNA比cDNA表达量要高。因此,在可能的条件下,尽量使用基因组DNA。

4 改造CHO细胞

通过遗传操作,改造CHO细胞,使之能表达一种对外源基因的表达有反式调控作用的蛋白,从

而提高外源蛋白的表达水平。Cockett等^[14]曾建立了特殊的CHO细胞株,该细胞株能稳定表达腺病毒E1A,它可以反式作用于表达质粒的CMV启动子。在表达人胶原蛋白的研究表明,上述CHO细胞株比CHO K1细胞株提高13倍的表达量。Owens等^[15]成功地用该系统表达完整的单克隆抗体,其表达量为每天12 μg/10⁶细胞。

5 细胞的增殖阻遏 (proliferation arrest)

研究发现,在一定的细胞密度条件下,目的蛋白的产量与细胞生长速率成正相关。但当细胞密度过大时,目的蛋白产量与质量降低。细胞增殖阻遏是指在自然条件下,当细胞增殖到高密度后,采取一定的手段,抑制细胞进一步增殖,使细胞增殖处于相对停滞状态。但细胞的代谢并没有停止,一直表达并分泌蛋白。

依赖于细胞周期的激酶p21和p27和肿瘤抑制因子p53被用于在G1期阻遏CHO细胞的增殖。p53是细胞周期和细胞凋亡中的关键调控因子,这两种功能都能影响细胞凋亡或诱导p21的产生,并启动DNA修复和细胞的存活。过量表达这三种蛋白质中的任何一种,都将抑制细胞周期中的cyclin-E-CDK2复合体的磷酸化酶的活性,并阻止细胞进入S期,从而使细胞被滞留在G1期^[16]。用携带上述三种蛋白质基因的多顺反子表达载体转染CHO细胞,表现出不同的反应。当p21的过度表达,可以阻遏细胞增殖,而且,没有细胞凋亡的表现,能提高目的蛋白表达15倍^[17]。在另一个实验中,构

建了双顺反子表达载体, 其中携带编码分化因子 *c/ebp a* (CAAT-增强子结合蛋白), 它具有诱导和稳定 p21 的作用. 运用这一表达方式, CHO 细胞周期被阻遏长达 2 周, 外源蛋白的表达量比对照细胞提高了 10~15 倍^[18].

6 翻译后修饰

翻译后的修饰作用, 对于糖蛋白分泌是非常重要的. 一般情况下, CHO 细胞中多数高效表达的蛋白质均能正确地完成信号肽的切割、N 链糖基化并顺利通过内质网. 但也有例外. 利用遗传工程的方法可以增加蛋白质的翻译后加工的有效性及分泌效率. 如 HIV 包膜糖蛋白 gp120 在 CHO 细胞中表达后, 翻译后加工效率较低, 用疱疹病毒的信号肽序列取代 HIV 原来的信号肽后增加了 gp120 的表达量. 将 gp120 的跨膜区缺失掉后, 提高了 gp120 的分泌^[19].

另一种重要的翻译后加工是糖基化, 即在多肽链的某些特定的氨基酸残基处连上寡聚糖. 有两种糖基化类型即 O 型或 N 型, 碳水化合物链分别在 Asn-X-Ser/Thr 基团的 Ser 或 Thr 氨基酸残基上. 糖基化的类型与多肽链的本身、宿主细胞有关. 与其他类型的宿主相比, CHO 细胞表达的外源蛋白, 其糖基化更接近人类细胞, 但仍有一定的差距. 有研究表明: 与人类细胞相比, CHO 细胞缺乏 $\alpha 2$, 6-唾液酸转移酶基因, 因而, 在表达某个特定的蛋白质时, 存在一定的缺陷. 为克服这一缺点, 可在 CHO 细胞中表达 $\alpha 2$, 6-唾液酸转移酶基因, 这种 CHO 细胞表达的 tPA 中就携带了 $\alpha 2$, 6-唾液酸或 $\alpha 2$, 3-唾液酸^[20].

综上所述, 影响外源基因在 CHO 细胞中表达的因素是非常复杂的, 建立稳定的高效表达外源蛋白的 CHO 细胞系并非易事. 本文着重探讨了与遗传因素有关的几个方面. 这些策略的运用, 将不同程度改善外源蛋白在 CHO 细胞中的表达水平. 当然, 外源蛋白在 CHO 细胞中的高效表达是一个涉及多学科的问题, 尚需多个研究领域的共同合作探讨.

参 考 文 献

- Boshart M, Weber F, Gerhard J, *et al.* A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 1985, **41** (2): 521~530
- Uetsuki T, Naito A, Nagata S, *et al.* Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. *J Biol Chem*, 1989, **264** (10): 5791~5798
- Kaufman R J, Sharp P A. Construction of a modular dihydrofolate reductase cDNA gene: analysis of signals utilized for efficient expression. *Mol Cell Biol*, 1982, **2** (11): 1304~1319
- Wickens M, Stephenson P. Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science*, 1984, **226** (4678): 1045~1051
- Sadofsky M, Connelly S, Manley J L, *et al.* Identification of a sequence element on the 3' side of AAUAAA which is necessary for simian virus 40 late mRNA 3'-end processing. *Mol Cell Biol*, 1985, **5** (10): 2713~2719
- Huang M T F, Gorman C M. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (4): 937~947
- Jackson R J. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci*, 1990, **15** (12): 477~483
- Schimke R T. Gene amplification in cultured animal cells. *Cell*, 1984, **37** (3): 705~713
- Kaufman R J, Sharp P A, Latt S A. Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences. *Mol Cell Biol*, 1983, **3** (4): 699~711
- Kaufman R J, Murtha P, Davies M V. Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *EMBO J*, 1987, **6** (1): 187~193
- Lucas B K, Giere L M, Demarco R A, *et al.* High level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (9): 1774~1779
- Werner R G, Noe W, Kopp K, *et al.* Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Arzneimittelforschung*, 1998, **48** (8): 870~880
- Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, **44** (2): 283~292
- Cockett M I, Bebbington C R, Yarranton G T, *et al.* The use of engineered E1A genes to transactivate the hCMV-MIE promoter in permanent CHO cell lines. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (2): 319~325
- Owens R J, Young R J. The genetic engineering of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 1994, **168** (2): 149~165
- Ko L J, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, 1996, **10** (9): 1054~1072
- Fussenegger M, Schlatter S, Dawyler D, *et al.* Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Nat Biotechnol*, 1998, **16** (5): 468~472
- Timchenko N A, Wilde M, Nakakishi M, *et al.* CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev*, 1996, **10** (7): 804~815
- Lasky L A, Groopman J E, Fennie C W, *et al.* Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science*, 1986, **233** (4760): 209~212
- Minch S L, Kallio P T, Bailey J E. Tissue plasminogen activator coexpressed in Chinese hamster ovary cells with alpha (2, 6)-sialyltransferase contains NeuAc alpha (2, 6) Gal beta (1, 4) GlcNAc linkages. *Biotechnol Prog*, 1995, **11** (3): 348~351

Optimized Strategies to Hyperexpress Recombinant Protein in Chinese Hamster Ovary Cells. LIU Guo-Qi, WANG Hai-Tao (*Institute of Microbiology and*

Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China).

Abstract It is very important to produce recombinant proteins for therapy in biopharmaceutical. Chinese hamster ovary cells (CHO cells) have become one of the best eukaryotic expression

systems in recent years. The factors influencing the high-level expression of foreign protein in CHO cells and the core strategies of overexpression of recombinant proteins in CHO cells were discussed.

Key words recombinant protein, CHO cells, high-level expression

促黄体生成激素释放激素类似物的研究进展

高兴明 唐艳春 叶蕴华¹⁾

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要 促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 激动剂药物已商品化, 用于治疗性激素依赖的癌症, LHRH 拮抗剂的研究还处于试验阶段。近几年, 在寻找高活性, 低组胺释放, 水溶性好, 稳定性高的拮抗剂研究方面, 已取得明显进展。一些较小的环肽及肽模拟物也表现出较好的生物活性。在十肽拮抗剂分子内, 中间四肽的 β II-turn 及 N 端的三肽对活性影响很大。

关键词 LHRH 类似物, 激动剂, 抗癌药, 拮抗剂

学科分类号 Q57

1971 年, Schally 等^[1]从 50 万头猪、羊下丘脑中分离出几毫克的促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 又称促黄体生成激素释放激素 (luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH), 并已人工合成确证了 LHRH 的结构, 为 $\text{Pyr-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$ 。LHRH 调控着垂体内促黄体生成激素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 的分泌。下丘脑 LHRH 的结构阐明和人工合成, 明确了中枢神经系统对垂体的控制作用, 大大推动了神经内分泌学和生殖生理学的发展。为了寻找非甾体避孕药和治疗性激素依赖性的癌症 (如前列腺癌、子宫癌), 人们已合成出 5 000 多种 LHRH 类似物, 其中少部分为激动剂 (agonists), 大部分为拮抗剂 (antagonists)。高活性的 LHRH 激动剂, 用于治疗癌症及用作避孕药, 已有产品在市场上出售。LHRH 拮抗剂的研究几乎与激动剂的研究同时起步, 但经历了复杂得多的过程后才得到超高活性的拮抗剂, 其研究目前处于试验阶段。

LHRH 拮抗剂和激动剂的作用机理不同。最初研究 LHRH 激动剂是为了治疗不孕症, 后来发现大剂量使用时有抗生育作用。LHRH 激动剂占据受体后引起受体微聚, 从而打开钙离子通道, 钙离

子流入细胞后激活细胞内相应的酶系统, 然后刺激促性腺激素的释放。激动剂引起的受体微聚也可导致与钙离子无关的脱敏作用, 在注入体内后开始一段时间促进促性腺激素的分泌, 以后则抑制促性腺激素的分泌^[2], 这是激动剂抗生育作用的原因。LHRH 拮抗剂与内源性 LHRH 竞争受体位点, 但不引起 LHRH 受体微聚, 所以既不能刺激促性腺激素的分泌, 也不引起脱敏作用, 其作用在于纯粹的竞争受体, 抑制由 LHRH 刺激的促性腺激素的分泌。这样, LHRH 拮抗剂就可能比激动剂的作用更专一, 更安全, 也更易于接受。

1 LHRH 激动剂

LHRH 结构阐明后, 人们开始寻找活性更高的 LHRH 类似物, 并在短期内取得突破性进展, 激动剂的活性大大提高^[3]。目前, 世界上 LHRH 激动剂的产值已达每年十几亿美元^[4]。表 1 列出了产量最大的几种激动剂药物, 这些高活性激动剂类似物中, 6 位均为 D 型氨基酸残基, 分子中只有 1 ~ 2 个氨基酸残基与 LHRH 分子不同。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (010) 62761430, E-mail:

收稿日期: 1999-10-13, 修回日期: 2000-04-17