PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
XXXX,XX(XX):1~15
www.pibb.ac.cn

CHO细胞表达系统在生物制药中的优化策略*

张瑞明[1)] 李梦琳[1)] 朱洪伟[1,2,3)**] 张兴晓[1,2,3)**]

([1)] 鲁东大学生命科学学院，烟台 264025；[2)] 鲁东大学生命科学学院烟台市动物病原微生物与免疫学重点实验室，烟台 264025；
[3)] 鲁东大学生命科学学院黄河中下游宠物传染病时空传播与公共卫生协同创新中心，烟台 264025）

摘要 中国仓鼠（Chinese hamster ovary，CHO）因其良好的遗传稳定性、翻译后修饰能力以及高表达和可规模化特性，已成为重组蛋白药物生产的首选宿主系统，广泛应用于单克隆抗体生产、疫苗抗原表达及Fc融合蛋白等生物制剂领域。然而，在工业化应用过程中，CHO细胞仍面临三大核心挑战：高密度培养导致的代谢负担、糖基化修饰不一致以及长期表达水平衰减。这些问题不仅引发培养周期延长、乳酸和氨等有害代谢产物积累，还会造成表达量波动和产品质量异质性，限制其在高产、稳产及降本增效方面的潜能。本文围绕CHO表达系统的关键瓶颈，从高密度培养代谢调控、糖基化均一性优化及长期表达稳定性维持三方面进行系统梳理，重点总结分子构建优化、细胞培养与工艺提升、细胞株工程改造及靶向整合等关键技术进展，并构建问题导向的技术优化框架。此外，结合基因编辑、合成生物学与人工智能技术的前沿发展，探讨了其在实现高效、稳定及经济型CHO细胞工厂构建中的应用前景，为新一代生物制药生产体系的创新与优化提供系统性参考。

关键词 CHO细胞表达系统，代谢负担，糖基化修饰，表达稳定性，优化策略
中图分类号 Q81，Q78 **DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0365 **CSTR**：32369.14.pibb.20250365

自1957年Puck首次建立CHO细胞系以来，CHO细胞因其遗传稳定性、易转染、可适应悬浮培养以及具备哺乳动物特异性蛋白翻译后修饰能力，逐渐成为全球最重要的工业化蛋白药物生产宿主细胞。经过数十年发展，衍生出了CHO-K1、CHO-S、CHO-DG44、CHO-DXB11等多个亚型，广泛应用于单克隆抗体、Fc融合蛋白、疫苗以及细胞因子等生物制品的表达[1-4]。目前，CHO细胞表达体系在商业化生产中的应用规模与工艺成熟度已远超其他宿主系统，成为全球重组蛋白药物生产的主导平台，是现代生物制药不可或缺的核心细胞系[5]。近年来，随着中国生物制药产业的快速崛起，CHO细胞系在本土创新药研发与产业化中的战略地位日益凸显。

尽管CHO表达体系已成为治疗性蛋白和疫苗生产的主流平台，在工业化生产中表现出优越的产量与可扩展性，但其仍受到三大瓶颈的限制：高密度培养过程中的代谢负担、糖基化修饰等差异性以及长期表达稳定性不足[6-7]。因此，亟需系统性提升CHO表达体系的产量、质量稳定性，满足复杂生物制品的大规模产业化生产需求[8]。

本文围绕CHO细胞表达体系在重组蛋白药物生产中的优化策略展开综述，从高密度培养的代谢负担、糖基化修饰不一致及长期表达衰减三方面出发，系统梳理了分子层面、细胞工程层面及工艺控制层面的多维度优化途径。探讨了细胞培养的优化、功能性添加剂应用、启动和调控元件、糖基化调控与细胞工程改造，以及目的基因（gene of interest，GOI）靶向整合等关键技术策略。分析了各优化措施对细胞生理状态、蛋白质表达量、产品质量及糖基化特征的调控机制，并归纳了典型研究

* 烟台市校地融合发展项目（2022）资助项目。
** 通讯联系人。
朱洪伟 Tel：0535-6010257，E-mail：hwzhu@ldu.edu.cn
张兴晓 Tel：0535-6673485，E-mail：zhagnxingxiao@ldu.edu.cn
收稿日期：2025-08-03，接受日期：2025-10-21

案例与主流优化思路。为CHO表达体系的系统性优化提供技术与理论参考。

1　高密度培养中的代谢负担优化

CHO细胞在生产中需要维持长期的高密度悬浮培养，以实现高产量的蛋白质表达。然而，此过程常伴随细胞代谢负担增加、乳酸积累、氨毒性上升以及能量代谢紊乱等问题。这些代谢副产物不仅会抑制细胞生长和蛋白质表达，还可能影响目标蛋白的质量和糖基化均一性。因此，需要通过多方面策略进行优化，包括调整培养参数、添加代谢调节添加剂，以及通过代谢工程手段调控关键代谢途径，以降低代谢副产物的产生，改善细胞能量利用效率，从而提高CHO细胞的培养稳定性和重组蛋白的产量与质量。

1.1　细胞培养的优化

CHO细胞培养与生产过程中常面临细胞凋亡、氧化应激、代谢废物积累等问题，限制了重组蛋白的产量和质量。通过对关键参数（如酸碱度、溶氧、葡萄糖和乳酸水平等）的实时监测与调控，优化培养条件可显著提升产量与一致性。表1总结了CHO细胞生产过程中常用的培养条件优化策略。

表1　CHO细胞生产过程中常用的培养条件优化策略

Table 1　Strategies for optimizing CHO cell culture conditions in biopharmaceutical manufacturing

条件名称	最佳范围或最佳值	优化效果	文献
温度（temperature）	37°C（生长阶段）；33°C （生产阶段）	温度下调可调节细胞周期（增强G0/G1），促使细胞从生长转向高效表达模式，提高蛋白质产量	[9]
酸碱度（pondus hydrogenii，pH）	6.8~7.2	低pH处理阻滞细胞周期G0/G1、降低凋亡信号和 提高N-糖基化均一性；高pH会增加蛋白质产量，但会增加糖基化模式异质性	[10]
溶解氧（dissolved oxygen，DO）	50%~100%	在极端DO水平（如3%或200%）下，细胞的生长率与产量均显著下调，而在范围内则表现稳定。DO波动会导致细胞持续代谢应激，进而导致产量显著下降	[11]
渗透压（osmotic pressure）	300 mOsm/kg（生长阶段），410~470 mOsm/kg（生产阶段）	渗透压升高可抑制细胞增殖，但同时诱导细胞体积增大，从而提升单位细胞蛋白产能	[12]
乳酸（lactic acid）	<3.5 g/L	乳酸累积与养分浪费直接相关，其过量存在会阻碍细胞氧化代谢	[13]
葡萄糖（glucose）	3~6 g/L	培养初期葡萄糖浓度维持于3~6 g/L 有助于细胞增殖，蛋白质表达阶段控制于 2~4 g/L 可有效抑制乳酸生成，增强三羧酸循环（TCA）活性并提升蛋白质产量	[14]

mOsm/kg：毫渗透压摩尔浓度，表示每千克溶剂中所含溶质颗粒的渗透压浓度单位。

1.2　添加剂的使用

CHO细胞可以在无血清培养基（serum-free medium，SFM）中实现高密度培养[15]。SFM主要成分包括碳水化合物、氨基酸、维生素、微量金属元素和盐类，对细胞增殖至关重要。除基本成分外，一些非必需组分亦可通过调控细胞代谢与表达过程，进一步改善代谢负担与提升生产性能（表2）。

表2　添加剂改善代谢负担并提升CHO细胞表达性能的机制与效果

Table 2　Mechanisms and effects of additives in reducing metabolic burden and enhancing expression performance in CHO cells

添加剂名称	作用机制	效果	文献
丁酸钠（sodium butyrate）和地西他滨（Decitabine）	选择性阻断G0/G1细胞周期；抑制 CHO细胞凋亡	丁酸钠单独使用时，qP提高143%；组合使用时，qP提高212%	[16]

续表

添加剂名称	作用机制	效果	文献
舒拉明（Suramin）	抑制细胞凋亡和唾液酸酶活性，增加活细胞密度和细胞存活率	Fc融合蛋白产量提高32%	[17]
黄芩素（Baicalein）	清除活性氧类（ROS），缓解内质网应激	单克隆抗体产量提高70%	[18]
4-（2，5-二甲基-1H-吡咯-1-基）-N-（2，5-二氧代吡咯烷-1-基）苯甲酰胺（4-（2，5-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl）-N-（2，5-dioxo-pyrrolidin-1-yl） benzamide）	抑制细胞生长、提高细胞内 ATP 与葡萄糖摄取，调控糖基化	单克隆抗体产量提高64%	[19]
紫色素（violacein）	诱导G1和G2/M期阻滞	IgG重链和轻链的mRNA表达水平分别显著升高了 47.3%~71.1%和44.4%~46.4%	[20]
儿茶素（catechins）	通过抑制拓扑异构酶来影响细胞周期	单克隆抗体产量提高50%	[21]
丙戊酸（valproic acid）	组蛋白去乙酰化抑制剂，导致染色质结构松弛，增强启动子活性和基因转录	单克隆抗体产量提高20%	[22]
（E）-N-（2-氨基苯基）-3-［1-（4-（1-甲基吡唑-4-基）苯基）磺酰］吡咯-3-基丙-2-烯酰胺（I-4（（E）-N-（2-aminophenyl）-3-［1-［4-（1-methylpyrazol-4-yl） phenyl］ sulfonylpyrrol-3-yl］ prop-2-enamide））	显著增加组蛋白H3的乙酰化和甲基化修饰，导致染色质结构松弛，增强启动子活性和基因转录；诱导细胞周期停滞于G0/G1期	重组抗体产量提高约143%	[23]
4-（乙酰氨基）-N-（2-氨基苯基）苯甲酰胺（4-（acetylamino）-N-（2-aminophenyl）benzamide）	增加人巨细胞病毒（CMV）启动子区域组蛋白H3乙酰化，重新构建染色质结构，显著提升目标蛋白mRNA表达水平	qP提升约200%，最大抗体浓度提升约130%	[24]
哌柏西利（Palbociclib）	抑制细胞周期依赖性蛋白激酶（CDK）4/6的活性，诱导G0/G1期停滞	qP提升100%~214%	[25]
S-腺苷甲硫氨酸（SAM）和甲硫代腺苷 （MTA）	SAM促进甲基化修饰；MTA反馈调控甲基循环，同时诱导细胞进入G1期，减少细胞分裂，更多能量分配给蛋白质生产	SAM和MTA 的添加使 qP提高50%，同时使细胞活性维持较高水平	[26]

qP：细胞单位生产率（specific productivity），是指单位细胞数量在单位时间内产生的目标蛋白量，反映单个细胞的表达能力，通常用来评价不同细胞株、工艺或培养条件对表达效率的影响。

1.3　基因工程改造

在CHO细胞工程中，使用过表达正调控因子（如目标蛋白糖基化抗凋亡因子、分泌路径和代谢调控因子）与敲低负调控因子（如代谢限制因子等）能显著改善糖基化模式、细胞存活、分泌效率和重组蛋白产量。表3总结了关键研究及其作用机制与效应。

表3　CHO细胞中正/负调控因子基因改造对代谢负担与重组蛋白表达的影响

Table 3　Effects of genetic modification of positive and negative regulatory factors on metabolic burden and recombinant protein expression in CHO cells

调控因子	操作方式	作用机制	表达效果/优势	文献
MPC1/2	过表达	增强线粒体代谢，降低乳酸积累	乳酸浓度降低约50%，细胞比生长速率提升20%~30%，表达量提升40%	[27]
HSP27	过表达	延缓Caspase激活并抑制凋亡	存活天数延长48 h，表达量提升130%	[28]
Sar1A	过表达	加快内质网-高尔基体分泌路径	qP提升约80%	[29]
SIRT6	过表达	激活抗凋亡Bcl-2抑制Caspase-3	表达提升70%~180%	[30]
YTHDF3	过表达	促进N^6-甲基腺苷（m^6A）修饰mRNA的翻译	qP提升50%~100%	[31]

续表

调控因子	操作方式	作用机制	表达效果/优势	文献
YAP5SA	过表达	增强细胞的G1/S细胞周期转化；增加细胞尺寸，增加细胞生长速率；激活的Yes相关蛋白信号抑制Bax表达，延缓细胞凋亡，提升细胞存活能力	qP提升约50%，总产量提高约200%	[32]
IGF-1R	敲除	重编程细胞代谢，降低对生长信号的依赖	表达量提升600%	[33]
ATF6β 和 WFS1	敲低	缓解未折叠蛋白反应负担，优化抗体折叠与分泌	产量提升30%~50%	[34]
MAT2A	降低	减缓细胞周期，释放蛋白质翻译与折叠资源	重组蛋白表达提升30%~40%	[35]
Apaf1	敲除	CHO-S细胞即便在培养后期应激条件下，仍能有效阻断Caspase-9的活化	重组蛋白表达提升68%~116%；降低 CHO细胞的凋亡比例	[36]
Bak1、Bax 和 Bok	敲除	敲除后阻断细胞应激（如渗透压、代谢废物积累、pH 波动等）引发的凋亡信号转导	产量提升了约10%~30%	[37]

MPC1/2：线粒体丙酮酸载体1/2（mitochondrial pyruvate carrier 1/2）；HSP27：热休克蛋白27（heat shock protein 27）；Sar1A：分泌及Ras相关GTP酶1A（secretion associated Ras related GTPase 1A）；SIRT6：沉默调节蛋白6（Sirtuin 6）；YTHDF3：YTH 结构域家族蛋白3（YTH domain-containing family protein 3）；YAP5SA：Yes激酶相关蛋白5 SA（Yes-associated protein 5SA）；IGF-1R：类胰岛素样生长因子1受体（insulin-like growth factor 1 receptor）；ATF6β：激活转录因子6 β（activating transcription factor 6 beta）；WFS1：沃尔夫拉明 ER 跨膜糖蛋白（Wolframin ER transmembrane glycoprotein）；MAT2A：S-腺苷甲硫氨酸合成酶2A（methionine adenosyltransferase 2A）；Apaf1：凋亡蛋白酶激活因子1（apoptotic protease activating factor 1）；Bak1：Bcl-2同源拮抗/杀伤因子1（Bcl-2 homologous antagonist/killer 1）；Bax：Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein）；Bok：Bcl-2相关卵巢杀伤因子（Bcl-2-related ovarian killer）。

1.4　小结

在高密度培养中，代谢调控的核心是实现能量平衡与副产物最小化。短期优化多依靠工艺干预，如添加代谢调节剂和精准调控培养条件，可快速改善细胞代谢状态，但可重复性和长期稳定性有限。相较之下，基因工程改造后的CHO细胞更能维持代谢稳态与长期表达，提高细胞对高密度环境的适应性和能量利用效率。未来，结合多组学驱动的代谢建模与人工智能（artificial intelligence，AI）预测，可构建具“代谢负担自感应-自调控”能力的智能CHO细胞工厂，实现低废物积累、高能效分配与系统动态最优化，推动培养向高产稳产低成本发展。

2　糖基化修饰均一性

哺乳动物细胞不同表达宿主及不同批次之间常出现糖基化模式差异，影响其免疫原性和药效活性[38-39]。解决糖基化修饰均一性问题的主要策略包括通过基因工程手段改造CHO细胞、优化培养条件等方法。

2.1　人源糖基化细胞工程改造

基于人源化糖基化模式，对CHO细胞进行基因工程改造可有效提升其产物的人源化程度与治疗适用性。靶向调控关键糖基转移酶的表达水平，可使CHO细胞的糖基化谱更接近人类天然蛋白。如敲低岩藻糖基转移酶8（fucosyltransferase 8，*FUT8*）、过表达ST6 β-半乳糖苷α-2，6-唾液酸转移酶1（ST6 beta-galactoside alpha-2，6-sialyltransferase 1，*ST6Gal1*）、α-1-抗胰蛋白酶（alpha-1-antitrypsin）和敲低ST3 β-半乳糖苷α-2，3-唾液酸转移酶4（ST3 beta-galactoside alpha-2，3-sialyltransferase 4，*ST3GAL4*）等方式对CHO细胞糖基化路径进行基因工程化改造，可减少非人源糖残基引起的免疫原性，提升蛋白的稳定性、生物活性和药代动力学特性，从而适用于生产高品质治疗性抗体和糖蛋白药物[40-42]。

2.2　优化培养条件

通过定向优化培养基条件，可有效调控糖基化模式，从而提升产品质量与均一性。在葡萄糖基础上添加甘露糖或半乳糖等替代碳源，可通过改变糖苷前体的可用性影响N-连接糖基化谱，实现糖基化模式向期望模式的转变[43]。添加锰离子（Mn^{2+}）可增强半乳糖基转移酶活性，促进末端半乳糖基化和唾液酸化，从而获得更均匀且生物活性更高的糖蛋白谱[44]。此外，降低培养温度或采用低渗培养可延长蛋白质在内质网-高尔基体的停留时间、降低代谢速率，并改变糖基转移酶/糖苷水解酶的表达与活性，通常有利于复杂糖型的形成，但可能同时影响产率和细胞生长[12]。随着系统生物学和代谢建模技术的发展，基于模型的预测优化方法正在推动从经验性工艺调整向数据驱动的理性设计转变，为CHO细胞产物的质量一致性与功能优化提

供了新的策略基础[45]。

2.3　体外糖基化修饰

蛋白质表达后在体外通过化学与酶促手段重建人源型糖链，是克服非哺乳动物表达体系所导致的非人源糖型，进而降低免疫原性与药代动力学差异的重要策略。该方法通常包括两个核心步骤：首先利用内切糖苷酶去除天然异质糖链，随后借助改造后的糖基转移酶与化学合成的活化糖供体，在体外实现定义化的复杂型N-糖结构重建[46]。近年来，研究者进一步开发了基于酶固定化法的连续流体系统，通过将糖基转移酶固定于微反应通道中，在同一体系内顺序完成去糖、转糖基与末端唾液酸化等步骤。该流程显著提高了反应效率与可重复性，所得产物表现出高度均一且可控的糖基化模式，验证了体外重塑在人源化糖蛋白制备与工艺放大中的潜在可行性[47-48]。

2.4　小结

在糖基化一致性优化中，培养条件调控以高灵活性和低成本优势被广泛应用，该策略易受批次差异与培养系统波动影响，限制了其在工业化持续生产中的稳定性。尽管体外糖基化修饰已绕过了宿主依赖性限制，但仍受限于酶成本、原料和扩展性挑战。相比之下，基因编辑策略可从分子层面根本性实现人源化糖型，目前已商业化的CHO细胞通过敲除或修饰关键糖基转移酶基因，实现了更符合人源蛋白糖基化特征的糖基化修饰。未来，随着代谢-糖基化耦合建模与AI算法的发展，在生产过程中通过实时在线监测与数据反馈，动态预测并校正糖基化偏差，从而确保的蛋白批次间的均一性与功能稳定性。

3　长期表达衰减优化策略

长期表达衰减主要源于转基因在遗传与表观遗传层面的不稳定性，包括启动子甲基化、染色质异构化及插入位点效应等。通过优化表达载体、采用靶向整合技术及优化转染体系，可有效提升外源基因的遗传稳定性与长期表达水平。

3.1　分子构建阶段优化

3.1.1　启动子优化

在CHO细胞表达体系中，启动子直接决定GOI表达的基础水平，是表达载体的核心元件。CHO表达体系中常用的启动子包括人巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）增强子/启动子、猴病毒40早期启动子（simian virus 40 early promoter，SV40）、CMV增强子/鸡β肌动蛋白启动子（CMV enhancer/chicken β-actin promoter，CAG）、人延伸因子1α启动子（elongation factor-1 alpha promoter，EF-1α）等[49-52]。

CMV启动子因其高效启动GOI转录而在商业化CHO细胞表达载体中广泛应用。然而，CMV启动子在长期培养中易被甲基化或其他表观遗传机制沉默，导致表达水平随时间下降[53]。针对CMV启动子的改造与优化已成为提升重组蛋白表达水平与稳定性的研究热点。主要策略包括内含子序列优化、关键顺式作用元件的功能解析与调控模式研究、启动子甲基化抑制，以及利用CRISPR-Cas9表观遗传编辑技术实现靶向修饰，为提升CHO表达体系的效率提供了新的思路与手段[54-57]。此外，CHO细胞内源性启动子因其表达活性与细胞生长及代谢动态相协调，且能维持较高的表达水平，近年来受到广泛关注。研究人员从CHO微阵列表达数据与高密度培养的CHO细胞的RNA-Seq数据分析出比CMV表达水平更高更稳定的内源性启动子，例如热休克蛋白家族A成员5（heat shock protein family a member 5，*HSPA5*）、S100钙结合蛋白A6（S100 calcium binding protein A6，*S100A6*）基因的启动子[58]。

3.1.2　Kozak序列优化

Kozak序列是位于mRNA翻译起始密码子（AUG）附近的高度保守序列，典型序列为GCCGCC（A/G）CCATGG，其中－3位（A/G）和+4位（G）对翻译起始效率至关重要[59]。在CHO细胞中，经典Kozak序列的优化可显著提高翻译效率[36]。与经典Kozak序列相比，优化后的Kozak序列在CHO细胞表达重组蛋白时，可显著提高重组蛋白表达量（表4）[60-61]。

表4　不同 Kozak 序列对CHO细胞中重组蛋白表达效率的影响

Table 4　The impact of different Kozak sequences on recombinant protein expression efficiency in CHO cells

Kozak 序列	表达倍数（相对经典Kozak= 100%）	文献
GGCCGCCACCATGG	100%	/
CCGGCTGAAGATGA	129%~158%	［60］
GGCCGCCGCCATGA	160%~172%	［60］
GGCCGCGACCATGC	113%	［61］
GGCCGGCGACATGC	117%	［61］
GGCCGGAAGTATGA	130%	［61］

3.1.3 信号肽优化

在CHO细胞表达分泌型重组蛋白过程中，信号肽作为引导新生多肽链进入内质网的重要序列[62]，其结构与功能直接决定了蛋白分泌效率及最终产量。不同信号肽在CHO细胞中的识别效率存在显著差异，成为限制重组蛋白表达水平的重要因素之一[63-64]。2022年，Park等[65]建立了一个由退化密码子合成信号肽文库、位点定向整合系统与流式细胞荧光分选技术（fluorescence activated cell sorting，FACS）三部分组成的体外筛选平台，专为CHO细胞设计，用以寻找提升分泌效率的信号肽。值得注意的是，近年Pamela等[66]系统构建了由37个哺乳动物天然信号肽与文献挖掘序列组成的信号肽库，并针对不同类型单链抗体与融合蛋白开展高通量筛选，证实信号肽类型对蛋白质分泌表达水平具有显著影响，为CHO细胞表达体系的信号肽筛选提供了宝贵的资源与策略依据。此外，从结构功能角度出发，优化信号肽的N区正电荷含量、H区疏水性强度及C区切割位点的保守性，亦成为提升蛋白分泌水平的重要策略[67-71]。

3.1.4 目的基因优化

蛋白质翻译瓶颈是GOI表达设计中的关键问题之一，其效率受限常与表达宿主与GOI之间存在的密码子使用偏差差异有关[72]。研究表明，密码子优化可以显著提高外源蛋白的表达水平[63，73-74]。表5总结了常用的密码子优化工具及数据库，这些工具可基于CHO细胞的密码子偏好、GC含量及翻译调控等因素对GOI进行序列重编码。

表5 密码子优化工具及数据库

Table 5 Codon optimization tools and databases

数据库名称	链接	应用示例
Java密码子优化工具（Java Codon Adaptation Tool）	https：//www.jcat.de/	[75]
GenSmart™密码子优化工具（GenSmart™ Codon Optimization）	https：//www.genscript.com.cn/tools/gensmart-codon-optimization	[76]
IDT密码子优化工具（Codon Optimization Tool - IDT）	https：//eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool	[76]
在线密码子优化工具（ExpOptimizer）	https：//www.novopro.cn/tools/codon-optimization.html	[77]
密码子使用统计数据库（Codon Usage Database）	https：//www.kazusa.or.jp/codon/	[78]
密码子适应指数分析（Codon Adaptation Index Calculator）	https：//www.biologicscorp.com/tools/CAICalculator/	[79]
密码子协调工具（Codon HARMonizING）	https：//github.com/wrightgs/CHARMING	[80]

3.1.5 聚腺苷酸信号优化

聚腺苷酸信号（polyadenylation signal，PAS）通过调控mRNA的3'端加工，影响转基因表达的稳定性、效率和产量。哺乳动物与病毒来源的PAS（如SV40、牛生长激素（bovine growth hormone，*BGH*）基因、单纯疱疹病毒胸苷激酶（herpes simplex virus thymidine kinase，*HSV-TK*）基因）因其强效性被广泛应用。已有研究表明，不同的PAS对CHO细胞外源蛋白的表达水平具有显著影响。其中，SV40 PAS较BGH和HSV-TK PAS表现出更强的调控效能，能够提高稳定GOI表达水平并降低表达变异性[81]。此外，Omelina等[82]通过大规模并行报告基因分析（massively parallel reporter assay，MPRA）系统筛选出PAS下游+17~+44 bp区域T-rich短片段，显著提升外源蛋白的表达，eGFP在HEK293T中最高提升13倍，在CHO细胞中提升约7倍，显示出该区域序列的小改动即可显著增强切割和聚腺苷酸化（cleavage and polyadenylation，CPA）复合体作用及mRNA稳定性，从而提高表达效率。这一发现为CHO表达系统提供了简单有效的载体后端优化策略。因此，PAS优化策略应包含：a. 选用高效PAS元件（如SV40）；b. 在高效PAS下游+17~+44 bp区域范围内插入T-rich效率序列，促进转录终止与切割效率。

3.1.6 引入染色质修饰元件

在表达载体中引入基质附着区（matrix attachment region，MAR）、染色质开放元件（ubiquitous chromatin opening element，UCOE）、tRNA基因屏障和稳定抗阻遏元件（stabilizing and anti-repressor element，STAR）等常用染色质调控元件，可显著提高重组蛋白的表达水平与稳定性（表6）[83]。

3.2 基因整合策略

传统CHO细胞表达系统常采用pcDNA、pOptiVEC、pEE和pCAGGS等载体，但普遍不具备靶向整合功能。随机整合（random integration，

表6　染色质调控元件在 CHO 细胞表达系统中的应用

Table 6　Applications of chromatin regulatory elements in CHO cell expression systems

元件	描述	功能	备注	文献
基质附着区	与核基质结合的DNA序列，组织染色质结构	减少位置效应、优化染色质结构	没有方向依赖性，但有位置依赖性；距CMV启动子500 bp 和1 000 bp 时，GOI表达分别提高77%和56%	［84-86］
染色质开放元件	源自管家基因，包含始终未甲基化且持续转录的CpG岛	局部开放染色质，保护附近的转基因免受 DNA 甲基化和异染色质侵入，从而维持GOI的高表达	UCOE的加入增加mRNA的水平和单克隆抗体产量	［87］
tRNA基因屏障	tRNA 基因作为屏障，防止异染色质扩散	隔离GOI与周围异染色质区域，增强转录活性	在长期培养中，tRNA基因屏障在抑制转基因沉默方面表现优于UCOE，能够显著维持更高的eGFP$^+$细胞比例及mRNA水平	［88-89］
稳定抗阻遏元件	阻断阻遏蛋白的表观遗传调控元件	增强并维持长期转基因表达	eGFP的表达量提高200%，单抗表达量提高85%	［90］

RI）策略将GOI随机插入基因组，并辅以选择压力（如嘌呤霉素、杀稻瘟菌素等）筛选高表达克隆，是目前广泛应用的构建策略之一[36]。然而，该策略在应用中面临多项挑战。a. 由于 GOI 插入位点随机，不同克隆之间表达水平存在显著差异。b. 随机插入可能干扰宿主关键基因，诱发染色体重排、GOI 丢失等问题，影响细胞系的长期稳定性和表达一致性。c. 开发周期长、筛选压力大：需筛选大量克隆以获得理想表达水平的细胞系，显著增加早期开发成本。因此，为了提升表达稳定性与构建效率，近年来半靶向整合（semi-targeted integration，STI）与靶向整合（targeted integration，TI）策略逐渐成为CHO表达系统优化的重要方向。

3.2.1　转座酶介导的半靶向整合

STI利用转座子系统使GOI更倾向于插入转录活跃区域，从而提升表达水平与稳定性。常见的STI工具包括Sleeping Beauty、PiggyBac、Leap-In®以及Tol2转座酶系统，已在多种哺乳动物细胞表达平台中获得应用[2，91-93]。STI技术在表达一致性与工艺可行性方面展现出多重优势。a. 与RI相比，STI可显著减少 GOI插入位置对表达水平的随机影响。b. 相较于RI，STI可有效减少筛选工作量，从而缩短开发周期。c. 相比于靶向整合，STI技术流程更简洁、对平台依赖度低，具备较低的开发成本，适用于对时间和资源敏感的快速开发项目。尽管STI具有一定优势，但其整合精度有限且仍存在表达变异问题。在对表达稳定性与一致性要求较高的应用场景中，完全定点整合技术仍是更优选的方案。

3.2.2　靶向整合

TI是指将GOI精确插入CHO细胞基因组中特定位点的策略。相比于RI和STI，TI具有更高的精确性与可预测性。已有研究通过系统性表观基因组测序与数千并行报告基因测定（thousands of reporters integrated in parallel，TRIP）并行位点表达分析，筛选出CHO基因组内一批安全港（safe harbors）位点，该类位点处于不影响关键功能基因的基因组区域，可有效避免 GOI 插入诱发的基因扰动，显著提升GOI长期稳定表达水平[94-95]。目前，已有多种具备定点整合能力的系统被开发并应用于CHO细胞系构建。常用的靶向整合工具包括Cre/loxP、Flp/FRT、φC31 以及 CRISPR-Cas9 等。表7总结了当前主流定点整合系统的应用现状与主要特点。

3.3　细胞转染条件优化

细胞转染条件优化是CHO表达系统中不可或缺的一环。转染方法包括聚乙烯亚胺（PEI）转染、脂质体转染（lipofection）、电转（electroporation）和病毒转导（viral transduction）。表8对各类常用转染方法的适用场景及优劣进行了归纳比较。研究表明，通过添加辅助药物、共表达辅助载体、新型转染试剂和结合物理辅助手段，可显著提升转染效率与外源蛋白表达水平（表9）。

尽管传统转染方法已在CHO细胞表达系统中得到广泛应用，但其在转染效率、细胞毒性控制及表达一致性方面仍存在进一步优化空间。未来的研究应从递送效率提升、外源核酸免疫应答抑制以及核内转运效率增强等层面入手，通过开发更高效、低毒且可放大的转染体系，从根本上改善CHO细胞的转染性能与外源基因表达水平。

表7 常用靶向整合工具的应用现状与主要特点

Table 7 Current applications and key features of common targeted integration tools

系统名称	重组酶/整合酶	识别序列	重组机制	整合特性	技术优势	技术局限	应用于CHO细胞的研究/平台	文献
Cre/loxP系统	Cre重组酶（来源于P1噬菌体）	loxP（34 bp）	在两个loxP位点间介导同向或反向的位点特异性重组（可删除、倒位或交换DNA片段）	通常用于构建“着陆垫（landing pad）”细胞系后进行重组酶介导的盒交式（recombinase-mediated cassette exchange，RMCE），可实现重复插入表达盒的精准替换	操作成熟，重组效率高，适用于平台细胞株中可控基因的插入或迭代	需预先引入loxP位点；位点构建复杂；重复使用可能造成遗留序列积累	已广泛用于CHO-K1及CHO-S衍生细胞中构建稳定表达平台	[96]
Flp/FRT系统	Flp重组酶（来源于酿酒酵母2μ质粒）	FRT（34~48 bp）	与Cre/loxP机制类似，催化两个FRT位点间的DNA片段的特异性重组	常用于RMCE系统；可使用FRT异源变体来防止串扰，提高位点专一性	精度高，适用于稳定重复整合、多位点调控研究；适合多拷贝插入平台构建	FRT需要预置于基因组中，重组效率较Cre略低，操作流程相对烦琐	应用于多种CHO表达系统，包括抗体、多肽与融合蛋白表达	[97]
φC31 Integrase系统	φC31整合酶（来源于链霉菌噬菌体）	attB与attP（34~39 bp）	媒介attB和attP位点之间发生不可逆的整合反应，形成attL与attR，不再反向重组	可实现GOI的单拷贝定点整合，或利用基因组中的伪attP位点整合	不依赖同源臂，整合效率高，适合快速生成表达稳定的细胞系	插入位点依赖于伪attP位点的可用性，存在基因组背景差异性问题	应用于CHO-S和CHO-DG44中，通过TARGATT™平台进行快速细胞株开发	[98]
CRISPR-Cas9系统	Cas9核酸酶+single guide RNA（sgRNA）	靶位点邻近的原间隔序列邻近基序序列+左右同源臂	利用Cas9诱导的双链断裂结合供体模板介导同源重组修复（homology directed repair，HDR）进行精确插入	可实现单拷贝、特定位点、序列可控的精准整合，适合构建表达均一、高质量的细胞株	极高的特异性与可设计性，适合构建高性能平台细胞系，支持多基因插入与序列编辑	HDR效率依赖细胞周期与模板设计，插入效率低于转座子或整合酶系统，需配套筛选系统	应用于构建CHO-K1、CHO-S细胞株，用于抗体等重组蛋白表达	[99]

表8 常用转染方法的特性及适用性分析

Table 8 Comparison of common transfection methods: applications, advantages and limitations

方法	原理	适用范围	优点	局限
聚乙烯亚胺转染	阳离子聚合物与DNA形成复合物进入细胞	大规模瞬时转染；中等表达需求；工艺放大	成本低；可用于悬浮细胞，操作简便	转染效率略低
脂质体转染	阳离子脂质与DNA形成脂质体融合进细胞	小规模实验室研究；高表达验证；高通量报告筛选	转染效率高；重复性好	成本高，不适用于大规模生产
电转染	脉冲电流打开细胞膜孔隙，引导DNA进入	稳定细胞株构建前转染；难转染的CHO亚型	高效率；适用于多种细胞类型	操作需设备；可能引起细胞损伤
病毒转导	病毒将目标基因递送入宿主	稳定表达细胞株构建；shRNA/CRISPR长期表达；高效整合目标序列	稳定性好；表达持久	构建周期长；安全性/法规受限

表9　提高转染效率的关键策略

Table 9　Key strategies for enhancing transfection efficiency

优化要素	优化措施	效果	文献来源
细胞状态	细胞密度处于对数生长期，细胞存活率>95%	细胞保持高活力，促进细胞内吞转染复合物	［100］
添加辅助药物	TBK1抑制剂（BX795）	抑制外源DNA自噬降解，从而显著提升转染效率	［101］
	Caspase抑制剂（Q-VD-Oph）	有效抑制Caspase活性，保护细胞存活，GFP 阳性率提升至>90%	［102］
共表达辅助质粒	共表达核糖核苷二磷酸激酶（NDPK）和 EB 病毒核抗原1（Epstein-Barr virus nuclear antigen-1，EBNA1）	质粒 DNA 通过核孔复合物向细胞核的转运增强；延长了质粒在细胞中的存在时间	［103］
	共表达蛋白质二硫键异构酶（PDI）与X框结合蛋白1（XBP-1）	蛋白产量提高89%	［104］
新型转染剂	细胞穿透肽（cell-penetrating peptide， CPP）	增强膜融合与胞吞效率，报告蛋白表达显著高于PEI（p<0.01）	［105］
物理辅助手段	质粒DNA 72℃加热30 min	加热处理的质粒 DNA 的转染效率高于未处理的质粒 DNA（p<0.05）	［106］
	平板离心（200g，5 min）	增加复合物与细胞接触，提高转染率；PEI-DNA 转染效率显著提升（p<0.01）	［107］

3.4　小结

长期表达稳定性优化策略的选择应与目标产物类型及生产周期相匹配。对于快速验证性研究或中试阶段生产，可采用PEI-辅助药物转染结合载体增强子元件与启动子优化等策略，以在较短时间内获得高水平瞬时表达，缩短开发周期并提高工艺灵活性。而在商业化长期生产体系中，则应优先选择电转结合STI或TI策略，以显著提升表达一致性、遗传稳定性及批次间可重复性。从整体上看，表达稳定性的提升不应仅依赖单一优化手段，而需在DNA结构、染色质状态与基因组位点三个层面实现多维协同设计，构建具有长期转录活性维持能力的“持久激活型”表达环境。未来，CHO表达系统的稳定性提升将依托“精准整合+表观调控”的协同模式展开，通过结合基因组、转录组与表观组学数据，辅以机器学习与系统生物学建模，可建立候选安全港位点评价体系，实现对最佳整合区域的预测与筛选。

4　总结与展望

CHO 细胞表达系统的优化始终是生物制药生产领域的核心研究方向。经过数十年发展，已形成涵盖分子构建、培养工艺、细胞株工程和基因整合策略的多维度优化体系，实现了对表达水平、稳定性和产品质量的持续提升。然而，针对高密度培养的代谢负担、糖基化均一性及长期表达衰减等问题，未来的优化方向亟需跨学科技术的深度融合。

随着基因编辑、合成生物学和AI的不断进步，CHO表达系统有望在效率、质量控制和持续性方面实现突破。首先，基因编辑技术将推动CHO表达系统从单点改造走向系统层面的网络调控。通过CRISPR/Cas同时靶向多个代谢通路和表观遗传调控元件，缓解高密度培养中的代谢负担，提高细胞活力和单位产量，优化糖基化酶，以定制化蛋白质糖基化谱系，满足不同生物制剂的功能需求。构建兼具代谢优化、糖基化可控及抗凋亡特性的CHO细胞系。同时，安全港位点与“即插即用”整合策略将显著缩短细胞株开发周期，促进标准化平台建设，降低批次差异并加速工业化转化。

其次，合成生物学为CHO表达系统的革新提供了系统性框架。通过构建人工基因回路、模块化生物部件和智能响应网络，可以实现对细胞行为的可编程调控，以适应复杂工业化需求。具体而言，合成生物学可设计动态感应-响应系统，将基于CHO内源调控序列的合成启动子与代谢传感器相结合，使细胞在面临代谢应激或营养耗竭时，抑制生长并优先分配资源至外源基因表达，避免传统系统的表达衰减。此外，通过引入生长抑制开关或重定向葡萄糖通量至三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle，TCA），降低乳酸等副产物的积累。这些策略有助于显著提升单位细胞产量、蛋白分泌效率和整体工艺的稳定性，为CHO细胞在生物制药领域的应用开辟新的可能。

最后，AI的数字化功能将在CHO表达优化中扮演核心角色。通过机器学习和深度学习模型整合多组学数据，实现预测性和指导性设计。AI能加

速分子元件的筛选与优化，从海量序列中预测Kozak序列、信号肽及密码子偏好，提高CHO表达效率，避免传统高通量筛选的耗时。同时，AI可模拟代谢路径和工艺参数优化，预测最佳培养策略，实现流加（fed-batch）或灌流（perfusion）培养的闭环调控，减少代谢废物积累并提升产量一致性。此外，在高密度培养中，AI还能通过计算机视觉和时序数据分析，监控细胞形态和生长动态，早期识别应激信号并调整参数。实现从实验室优化到符合《药品生产质量管理规范》（Good Manufacturing Practice of Medical Products，GMP）的规模化生产的无缝衔接。未来的连续生产体系将高度依赖这种AI驱动的动态优化，实现真正意义上的“智能化生物工厂”。

综上所述，CHO表达系统的未来发展趋势是“基因编辑-合成生物学-人工智能”三位一体的融合应用。这种跨学科创新不仅有助于在理论层面深化对细胞调控机制的理解，也将在产业化层面推动成本控制与监管合规，从而保障大规模生产的稳定性。可以预见，下一代CHO平台将成为高效、稳定、可定制化生产复杂生物制剂的核心引擎，为精准医疗和个性化生物制药提供强有力的支撑。

参 考 文 献

[1] Sanchez-Martinez Z V, Alpuche-Lazcano S P, Stuible M, *et al*. CHO cells for virus-like particle and subunit vaccine manufacturing. Vaccine, 2024, **42**(10): 2530-2542

[2] Tu B, Lin Z, Moore J, *et al*. Recombinant antibody-producing stable CHOK1 pool stability study. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2024, **43**(4): 119-126

[3] Ying B, Kawabe Y, Zheng F, *et al*. High-level production of scFv-fc antibody using an artificial promoter system with transcriptional positive feedback loop of transactivator in CHO cells. Cells, 2023, **12**(22): 2638

[4] 张艳丽, 吴元元, 姬鼎悝, 等 . 表达 Exendin-4-Fc 融合蛋白的 CHO 细胞培养基筛选 . 微生物学免疫学进展, 2025, **53**(3): 55-60
Zhang Y L, Wu Y Y, Ji D K, *et al*. Prog Microbiol Immunol, 2025, **53**(3): 55-60

[5] Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. Drug Discov Today Technol, 2020, 38: 25-34

[6] Pereira S, Kildegaard H F, Andersen M R. Impact of CHO metabolism on cell growth and protein production: an overview of toxic and inhibiting metabolites and nutrients. Biotechnol J, 2018, **13**(3): e1700499

[7] Wang Q, Yin B, Chung C Y, *et al*. Glycoengineering of CHO cells to improve product quality. Methods Mol Biol, 2017, 1603: 25-44

[8] Lam C, Sargon A, Diaz C, *et al*. Strategies to improve CHO cell culture performance: Targeted deletion of amino acid catabolism and apoptosis genes paired with growth inhibitor supplementation. Biotechnol Prog, 2024, **40**(5): e3471

[9] Zhu Z, Chen X, Li W, *et al*. Understanding the effect of temperature downshift on CHO cell growth, antibody titer and product quality by intracellular metabolite profiling and *in vivo* monitoring of redox state. Biotechnol Prog, 2023, **39**(4): e3352

[10] Lee A P, Kok Y J, Lakshmanan M, *et al*. Multi-omics profiling of a CHO cell culture system unravels the effect of culture pH on cell growth, antibody titer, and product quality. Biotechnol Bioeng, 2021, **118**(11): 4305-4316

[11] Hippach M B, Schwartz I, Pei J, *et al*. Fluctuations in dissolved oxygen concentration during a CHO cell culture process affects monoclonal antibody productivity and the sulfhydryl-drug conjugation process. Biotechnol Prog, 2018, **34**(6): 1427-1437

[12] Alhuthali S, Kotidis P, Kontoravdi C. Osmolality effects on CHO cell growth, cell volume, antibody productivity and glycosylation. Int J Mol Sci, 2021, **22**(7): 3290

[13] Luo Y, Vappiani J, Orzechowski K, *et al*. Metabolic rewiring revealed by cell-specific rate analyses from nontargeted exometabolomics during simultaneous consumption of glucose and lactic acid in a CHO fed-batch process. J Biotechnol, 2022, 359: 161-175

[14] Coulet M, Kepp O, Kroemer G, *et al*. Metabolic profiling of CHO cells during the production of biotherapeutics. Cells, 2022, **11**(12): 1929

[15] Li W, Fan Z, Lin Y, *et al*. Serum-free medium for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells. Front Bioeng Biotechnol, 2021, **9**: 646363

[16] Li W F, Fan Z L, Wang X Y, *et al*. Combination of sodium butyrate and decitabine promotes transgene expression in CHO cells *via* apoptosis inhibition. N Biotechnol, 2022, 69: 8-17

[17] Lim J H, Cha H M, Han H J, *et al*. Evaluating the impact of suramin additive on CHO cells producing Fc-fusion protein. Biotechnol Lett, 2019, **41**(11): 1255-1263

[18] Ha T K, Hansen A H, Kol S, *et al*. Baicalein reduces oxidative stress in CHO cell cultures and improves recombinant antibody productivity. Biotechnol J, 2018, **13**(3): e1700425

[19] Aki Y, Katsumata Y, Kakihara H, *et al*. 4- (2, 5-Dimethyl-1H-pyrrol-1-yl) -N- (2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl) benzamide improves monoclonal antibody production in a Chinese hamster ovary cell culture. PLoS One, 2021, **16**(4): e0250416

[20] Kido M, Idogaki H, Nishikawa K, *et al*. Violacein improves recombinant IgG production by controlling the cell cycle of Chinese hamster ovary cells. Cytotechnology, 2021, **73**(3): 319-332

[21] Toronjo-Urquiza L, Acosta-Martin A E, James D C, *et al*. The use of catechins in Chinese hamster ovary cell media for the improvement of monoclonal antibody yields and a reduction of acidic species. Biotechnol Prog, 2020, **36**(4): e2980

[22] Yang W C, Lu J, Nguyen N B, *et al*. Addition of valproic acid to

CHO cell fed-batch cultures improves monoclonal antibody titers. Mol Biotechnol, 2014, **56**(5): 421-428

[23] Han M M, Wang H T, Zhang H J, *et al*. A novel dual-epigenetic inhibitor enhances recombinant monoclonal antibody expression in CHO cells. Appl Microbiol Biotechnol, 2024, **108**(1): 467

[24] Kim D, Yoon C, Lee G M. Small molecule epigenetic modulators for enhancing recombinant antibody production in CHO cell cultures. Biotechnol Bioeng, 2022, **119**(3): 820-831

[25] Du Z, Treiber D, McCarter J D, *et al*. Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. Biotechnol Bioeng, 2015, **112**(1): 141-155

[26] Verhagen N, Teleki A, Heinrich C, *et al*. S-adenosylmethionine and methylthioadenosine boost cellular productivities of antibody forming Chinese hamster ovary cells. Biotechnol Bioeng, 2020, **117**(11): 3239-3247

[27] Bulté D B, Palomares L A, Parra C G, *et al*. Overexpression of the mitochondrial pyruvate carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. Biotechnol Bioeng, 2020, **117**(9): 2633-2647

[28] Tan J G L, Lee Y Y, Wang T, *et al*. Heat shock protein 27 overexpression in CHO cells modulates apoptosis pathways and delays activation of caspases to improve recombinant monoclonal antibody titre in fed-batch bioreactors. Biotechnol J, 2015, **10**(5): 790-800

[29] Tsunoda Y, Yamano-Adachi N, Koga Y, *et al*. Sar1A overexpression in Chinese hamster ovary cells and its effects on antibody productivity and secretion. J Biosci Bioeng, 2024, **138**(2): 171-180

[30] Hashemi N, Tabatabaee S H, Shams F, *et al*. Overexpression of SIRT6 alleviates apoptosis and enhances cell viability and monoclonal antibody expression in CHO-K1 cells. Mol Biol Rep, 2023, **50**(7): 6019-6027

[31] Cui Z M, Feng Y Y, Gao Y P, *et al*. Overexpression of YTHDF3 increases the specific productivity of the recombinant protein in CHO cells by promoting the translation process. Biotechnol J, 2024, **19**(4): e2400078

[32] Roshanmehr F, Abdoli S, Bazi Z, *et al*. Enhancing the productivity and proliferation of CHO-K1 cells by oncoprotein YAP (Yes-associated protein). Appl Microbiol Biotechnol, 2024, **108**(1): 285

[33] Romand S, Jostock T, Fornaro M, *et al*. Improving expression of recombinant human IGF-1 using IGF-1R knockout CHO cell lines. Biotechnol Bioeng, 2016, **113**(5): 1094-1101

[34] Rives D, Peak C, Blenner M A. RNASeq highlights ATF6 pathway regulators for CHO cell engineering with different impacts of ATF6β and WFS1 knockdown on fed-batch production of IgG(1). Sci Rep, 2024, **14**(1): 14141

[35] Gao Y P, Lu J T, Zhang H J, *et al*. MAT2A knockdown enhances recombinant protein expression in transgenic CHO cells through regulation of cell cycle. Biotechnol Bioeng, 2025, **122**(6): 1461-1471

[36] Zhang J, Du C, Pan Y, *et al*. Optimization of a novel expression system for recombinant protein production in CHO cells. Sci Rep, 2024, **14**(1): 24913

[37] MacDonald M A, Nöbel M, Martínez V S, *et al*. Engineering death resistance in CHO cells for improved perfusion culture. MAbs, 2022, **14**(1): 2083465

[38] Croset A, Delafosse L, Gaudry J P, *et al*. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. J Biotechnol, 2012, **161**(3): 336-348

[39] Wright H L, Evans C, Jackson P J, *et al*. Glycoprofile comparison of the SARS-CoV-2 spike proteins expressed in CHO and HEK cell lines. Mol Biotechnol, 2025, **67**(9): 3737-3752

[40] Glinšek K, Kramer L, Krajnc A, *et al*. Coupling CRISPR interference with FACS enrichment: new approach in glycoengineering of CHO cell lines for therapeutic glycoprotein production. Biotechnol J, 2022, **17**(7): e2100499

[41] Koyuturk I, Kedia S, Robotham A, *et al*. High-level production of wild-type and oxidation-resistant recombinant alpha-1-antitrypsin in glycoengineered CHO cells. Biotechnol Bioeng, 2022, **119**(9): 2331-2344

[42] Amann T, Hansen A H, Kol S, *et al*. Glyco-engineered CHO cell lines producing alpha-1-antitrypsin and C1 esterase inhibitor with fully humanized N-glycosylation profiles. Metab Eng, 2019, 52: 143-152

[43] Zhang L, Schwarz H, Wang M, *et al*. Control of IgG glycosylation in CHO cell perfusion cultures by GReBA mathematical model supported by a novel targeted feed, TAFE. Metab Eng, 2021, 65: 135-145

[44] Hossler P, Khattak S F, Li Z J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. Glycobiology, 2009, **19**(9): 936-949

[45] Reddy J V, Raudenbush K, Papoutsakis E T, *et al*. Cell-culture process optimization *via* model-based predictions of metabolism and protein glycosylation. Biotechnol Adv, 2023, **67**: 108179

[46] Yang Q, Chen H, Ou C, *et al*. Evaluation of two chemoenzymatic glycan remodeling approaches to generate site-specific antibody-drug conjugates. Antibodies (Basel), 2023, **12**(4): 71

[47] Hsu Y P, Verma D, Sun S, *et al*. Successive remodeling of IgG glycans using a solid-phase enzymatic platform. Commun Biol, 2022, **5**(1): 328

[48] Katoh T, Yamamoto K. Innovative preparation of biopharmaceuticals using transglycosylation activity of microbial endoglycosidases. J Appl Glycosci, 2021, **68**(1): 1-9

[49] Poulain A, Perret S, Malenfant F, *et al*. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. J Biotechnol, 2017, 255: 16-27

[50] Carswell S, Alwine J C. Efficiency of utilization of the Simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences. Mol Cell Biol, 1989, **9**(10): 4248-4258

[51] Dou Y, Lin Y, Wang T Y, *et al*. The CAG promoter maintains high-level transgene expression in HEK293 cells. FEBS Open Bio, 2021, **11**(1): 95-104

[52] Wang X, Xu Z, Tian Z, *et al*. The EF-1α promoter maintains high-

level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. J Cell Mol Med, 2017, **21**(11): 3044-3054

[53] Moritz B, Becker P B, Göpfert U. CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. Sci Rep, 2015, **5**: 16952

[54] Xu T T, Wang Y F, Yuan J J, *et al*. Optimization of the intron sequences combined with the CMV promoter increases recombinant protein expression in CHO cells. Sci Rep, 2025, **15**(1): 3732

[55] Brown A J, Sweeney B, Mainwaring D O, *et al*. NF-κB, *CRE* and *YY1* elements are key functional regulators of CMV promoter-driven transient gene expression in CHO cells. Biotechnol J, 2015, **10**(7): 1019-1028

[56] Dahodwala H, Amenyah S D, Nicoletti S, *et al*. Evaluation of site-specific methylation of the CMV promoter and its role in CHO cell productivity of a recombinant monoclonal antibody. Antib Ther, 2022, **5**(2): 121-129

[57] Marx N, Dhiman H, Schmieder V, *et al*. Enhanced targeted DNA methylation of the CMV and endogenous promoters with dCas9-DNMT3A3L entails distinct subsequent histone modification changes in CHO cells. Metab Eng, 2021, 66: 268-282

[58] Tossolini I, Gugliotta A, López Díaz F, *et al*. Screening of CHO-K1 endogenous promoters for expressing recombinant proteins in mammalian cell cultures. Plasmid, 2022, **119**/120: 102620

[59] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res, 1987, **15**(20): 8125-8148

[60] Li Z M, Lin Y, Luo C H, *et al*. Optimization of extended Kozak elements enhances recombinant proteins expression in CHO cells. J Biotechnol, 2024, 392: 96-102

[61] Blanco N, Williams A J, Tang D, *et al*. Tailoring translational strength using Kozak sequence variants improves bispecific antibody assembly and reduces product-related impurities in CHO cells. Biotechnol Bioeng, 2020, **117**(7): 1946-1960

[62] Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, *et al*. A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications. Eur J Cell Biol, 2018, **97**(6): 422-441

[63] Srila W, Oli D, Yamabhai M. Codon and signal peptide optimization to enhance therapeutic antibody production from CHO cells. Methods Mol Biol, 2025, 2853: 33-48

[64] 方琪, 罗烨, 梁彤彤, 等. 不同信号肽对猪瘟 E0 蛋白在 HEK-293F 细胞中分泌表达的影响及 E0-ELISA 方法的建立. 中国兽医科学, 2024, **54**(9): 1195-1201
Fang Q, Luo Y, Liang T T, *et al*. Chin Vet Sci, 2024, **54**(9): 1195-1201

[65] Park J H, Lee H M, Jin E J, *et al*. Development of an *in vitro* screening system for synthetic signal peptide in mammalian cell-based protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, **106**(9/10): 3571-3582

[66] O'Neill P, Mistry R K, Brown A J, *et al*. Protein-specific signal peptides for mammalian vector engineering. ACS Synth Biol, 2023, **12**(8): 2339-2352

[67] Guo H, Sun J, Li X, *et al*. Positive charge in the n-region of the signal peptide contributes to efficient post-translational translocation of small secretory preproteins. J Biol Chem, 2018, **293**(6): 1899-1907

[68] Inouye S, Soberon X, Franceschini T, *et al*. Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, **79**(11): 3438-3441

[69] Choo K H, Ranganathan S. Flanking signal and mature peptide residues influence signal peptide cleavage. BMC Bioinformatics, 2008, **9**(Suppl 12): S15

[70] Kuhn A, Wickner W. Conserved residues of the leader peptide are essential for cleavage by leader peptidase. J Biol Chem, 1985, **260**(29): 15914-15918

[71] Schorr S, Nguyen D, Haßdenteufel S, *et al*. Identification of signal peptide features for substrate specificity in human Sec62/Sec63-dependent ER protein import. FEBS J, 2020, **287**(21): 4612-4640

[72] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. Trends Biotechnol, 2004, **22**(7): 346-353

[73] Goulet D R, Yan Y, Agrawal P, *et al*. Codon optimization using a recurrent neural network. J Comput Biol, 2023, **30**(1): 70-81

[74] 张春玲, 王瑞阳, 钱忠辉, 等. 密码子优化和信号肽对猪圆环病毒 ORF2 基因在毕赤酵母表达中的影响. 上海农业学报, 2024, **40**(4): 81-85
Zhang C L, Wang R Y, Qian Z H, *et al*. Acta Agric Shanghai, 2024, **40**(4): 81-85

[75] Dong R, Chu Z, Yu F, *et al*. Contriving multi-epitope subunit of vaccine for COVID-19: immunoinformatics approaches. Front Immunol, 2020, **11**: 1784

[76] Demissie E A, Park S Y, Moon J H, *et al*. Comparative analysis of codon optimization tools: advancing toward a multi-criteria framework for synthetic gene design. J Microbiol Biotechnol, 2025, **35**: e2411066

[77] Zaib S, Rana N, Areeba, *et al*. Designing multi-epitope monkeypox virus-specific vaccine using immunoinformatics approach. J Infect Public Health, 2023, **16**(1): 107-116

[78] Holcomb D D, Alexaki A, Katneni U, *et al*. The Kazusa codon usage database, CoCoPUTs, and the value of up-to-date codon usage statistics. Infect Genet Evol, 2019, 73: 266-268

[79] Zhu F, Qin R, Ma S, *et al*. Designing a multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa via* integrating reverse vaccinology with immunoinformatics approaches. Sci Rep, 2025, **15**(1): 10425

[80] Wright G, Rodriguez A, Li J, *et al*. CHARMING: harmonizing synonymous codon usage to replicate a desired codon usage pattern. Protein Sci, 2022, **31**(1): 221-231

[81] Wang X Y, Du Q J, Zhang W L, *et al*. Enhanced transgene expression by optimization of poly a in transfected CHO cells. Front Bioeng Biotechnol, 2022, **10**: 722722

[82] Omelina E S, Letiagina A E, Boldyreva L V, *et al*. Slight variations in the sequence downstream of the polyadenylation signal

significantly increase transgene expression in HEK293T and CHO cells. Int J Mol Sci, 2022, **23**(24): 15485

[83] Guo X, Wang C, Wang T Y. Chromatin-modifying elements for recombinant protein production in mammalian cell systems. Crit Rev Biotechnol, 2020, **40**(7): 1035-1043

[84] Zhang J, Wang L, Zhang X, *et al*. Matrix attachment regions enhance transgene expression by manipulating position-dependent effects in stably transfected CHO-K1 cells. Biochem Cell Biol, 2024, **102**(6): 526-534

[85] Zhang J, Zhang J, Cheng S, *et al*. Enhanced transgene expression using two β-globin MARs flanking expression cassettes in stably transfected CHO-K1 cells. 3 Biotech, 2019, **9**(11): 435

[86] Zhang J H, Zhang J H, Wang X Y, *et al*. Distance effect characteristic of the matrix attachment region increases recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells. Biotechnol Lett, 2020, **42**(2): 187-196

[87] Doan C C, Le T L, Ho N Q C, *et al*. Effects of ubiquitous chromatin opening element (UCOE) on recombinant anti-TNFα antibody production and expression stability in CHO-DG44 cells. Cytotechnology, 2022, **74**(1): 31-49

[88] Sizer R E, Ingram R M, White R J. Barriers composed of tRNA genes can complement the benefits of a ubiquitous chromatin opening element to enhance transgene expression. Biotechnol J, 2025, **20**(2): e202400455

[89] Sizer R E, Ingram R M, Swan C, *et al*. Use of tRNA gene barriers improves stability of transgene expression in CHO cells. Biotechnol J, 2024, **19**(8): e2400196

[90] Li Q, Yan R F, Yang Y X, *et al*. Stabilizing and anti-repressor elements effectively increases transgene expression in transfected CHO cells. Front Bioeng Biotechnol, 2022, **10**: 840600

[91] Yang Z, Wang X, Luo S, *et al*. Efficient production of recombinant human FVII in CHO cells using the piggyBac transposon system. Protein Expr Purif, 2025, **229**: 106666

[92] Balasubramanian S, Rajendra Y, Baldi L, *et al*. Comparison of three transposons for the generation of highly productive recombinant CHO cell pools and cell lines. Biotechnol Bioeng, 2016, **113**(6): 1234-1243

[93] Yamaguchi K, Ogawa R, Tsukahara M, *et al*. Production of multi-subunit proteins in CHO cells by transposase-mediated integration of subunit-splitting vectors. Sci Rep, 2025, **15**(1): 18512

[94] Hilliard W, & Lee K H. Systematic identification of safe harbor regions in the CHO genome through a comprehensive epigenome analysis. Biotechnol Bioeng, 2021, **118**(2): 659-675

[95] Tasan I, Eres I, Wei C, *et al*. Identification of loci with high transgene expression in CHO cells. ACS Synth Biol, 2025, **14**(6): 1948-1962

[96] Kim J, Lee Y H, Kuk M U, *et al*. Cre/lox-based RMCE for site-specific integration in CHO cells. Biotechnol Bioprocess Eng, 2021, **26**(5): 795-803

[97] Hua J, Wei Y, Zhang Y, *et al*. Adaptation process of engineered cell line FCHO/IL-24 stably secreted rhIL-24 in serum-free suspension culture. Protein Expr Purif, 2022, **199**: 106154

[98] Chen-Tsai R Y. Integrase-mediated targeted transgenics through pronuclear microinjection. Methods Mol Biol, 2020, 2066: 35-46

[99] Hamaker N K, Lee K H. High-efficiency and multilocus targeted integration in CHO cells using CRISPR-mediated donor nicking and DNA repair inhibitors. Biotechnol Bioeng, 2023, **120**(9): 2419-2440

[100] Rajendra Y. PEI-mediated transient gene expression in CHO cells. Methods Mol Biol, 2018, 1850: 33-42

[101] Tsuchiya M, Kong W, Hiraoka Y, *et al*. TBK1 inhibitors enhance transfection efficiency by suppressing p62/SQSTM1 phosphorylation. Genes Cells, 2023, **28**(1): 68-77

[102] Yoshida T, Yamasaki K, Tadagaki K. Caspase inhibition improves viability and efficiency of liposomal transfection. Sci Rep, 2023, **13**(1): 21868

[103] Budge J D, Young R J, Smales C M. Engineering of Chinese hamster ovary cells with NDPK-A to enhance DNA nuclear delivery combined with EBNA1 plasmid maintenance gives improved exogenous transient reporter, MAb and SARS-CoV-2 spike protein expression. Front Bioeng Biotechnol, 2021, **9**: 679448

[104] Zhang X, Wang Y, Yi D, *et al*. Synergistic promotion of transient transgene expression in CHO cells by PDI/XBP-1s co-transfection and mild hypothermia. Bioprocess Biosyst Eng, 2024, **47**(4): 557-565

[105] Porosk L, Nebogatova J, Härk H H, *et al*. Predicting transiently expressed protein yields: comparison of transfection methods in CHO and HEK293. Pharmaceutics, 2022, **14**(9): 1949

[106] Milani A, Bolhassani A, Rouhollah F, *et al*. Which one of the thermal approaches (heating DNA or cells) enhances the gene expression in mammalian cells . Biotechnol Lett, 2021, **43**(10): 1955-1966

[107] Yang S, Zhang Q, Zhuang Y, *et al*. Plate centrifugation enhances the efficiency of polyethylenimine-based transfection and lentiviral infection. J Virol Methods, 2024, **330**: 115039

Strategic Optimization of CHO Cell Expression Platforms for Biopharmaceutical Manufacturing*

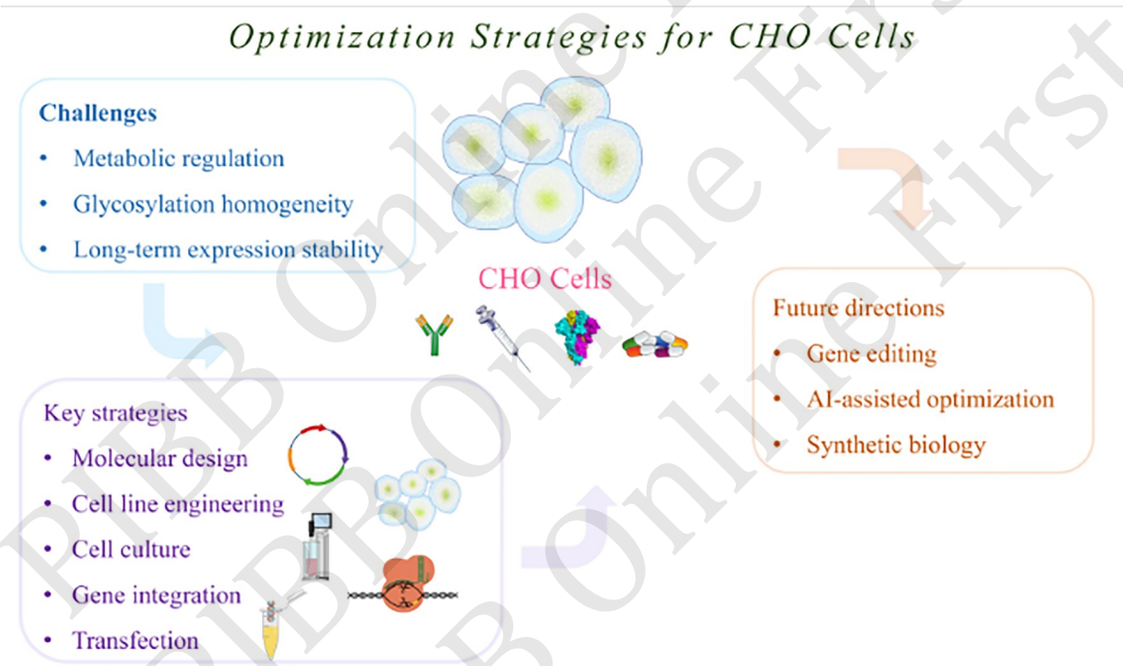
ZHANG Rui-Ming[1)], LI Meng-Lin[1)], ZHU Hong-Wei[1,2,3)**], ZHANG Xin-Xiao[1,2,3)**]

([1)]*School of Life Sciences, Ludong University, Yantai* 264025, China;

[2)]*Yantai Key Laboratory of Animal Pathogenetic Microbiology and Immunology, School of Life Sciences, Ludong University, Yantai* 264025, China;

[3)]*Collaborative Innovation Center for the Pet Infectious Diseases and Public Health in the Middle and Lower Stream Regions of the Yellow River, School of Life Sciences, Ludong University, Yantai* 264025, China)

Graphical abstract



Abstract　Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most established and versatile mammalian expression system for the large-scale production of recombinant therapeutic proteins, owing to their genetic stability, adaptability to serum-free suspension culture, and ability to perform human-like post-translational modifications. More than 70% of biologics approved by the U.S. Food and Drug Administration rely on CHO-based production platforms, underscoring their central role in modern biopharmaceutical manufacturing. Despite these advantages, CHO systems continue to face three persistent bottlenecks that limit their potential for high-yield, reproducible, and cost-efficient production: excessive metabolic burden during high-density culture, heterogeneity of glycosylation patterns, and progressive loss of long-term expression stability. This review provides an integrated analysis of recent advances addressing these challenges and proposes a forward-looking framework for constructing intelligent and sustainable CHO cell factories. In terms of metabolic regulation, excessive lactate and ammonia accumulation disrupts energy balance and reduces recombinant protein synthesis efficiency. Optimization of culture parameters such as temperature, pH, dissolved oxygen, osmolarity, and glucose feeding can effectively alleviate metabolic stress, while supplementation with modulators including sodium butyrate,

baicalein, and S-adenosylmethionine promotes specific productivity (qP) by modulating apoptosis and chromatin structure. Furthermore, genetic engineering strategies—such as overexpression of *MPC1*/*2*, *HSP27*, and *SIRT6* or knockout of *Bax*, *Apaf1*, and *IGF-1R*—have demonstrated significant improvements in cell viability and product yield. The combination of multi-omics metabolic modeling with artificial intelligence (AI)-based prediction offers new opportunities for building self-regulating CHO systems capable of dynamic adaptation to environmental stress. Regarding glycosylation uniformity, which determines therapeutic efficacy and immunogenicity, gene editing-based glycoengineering (e. g., *FUT8* knockdown or *ST6Gal1* overexpression) has enabled the humanization of CHO glycan profiles, minimizing non-human sugar residues and enhancing drug stability. Process-level strategies such as galactose or manganese co-feeding and fine control of temperature or osmolarity further allow rational regulation of glycosyltransferase activity. Additionally, *in vitro* chemoenzymatic remodeling provides a complementary route to construct human-type glycans with defined structures, though industrial applications remain constrained by cost and scalability. The integration of model-driven process design and AI feedback control is expected to enable real-time prediction and correction of glycosylation deviations, ensuring batch-to-batch consistency in continuous biomanufacturing. Long-term expression stability, another critical challenge, is often impaired by promoter silencing, chromatin condensation, and random genomic integration. Molecular optimization—such as the use of improved promoters (CMV, EF-1α, or CHO endogenous promoters), Kozak and signal peptide refinement, and incorporation of chromatin-opening elements (UCOE, MAR, STAR)—helps maintain durable transcriptional activity, while site-specific integration systems including Cre/loxP, Flp/FRT, φC31, and CRISPR/Cas9 can enable single-copy, position-independent gene insertion at genomic safe-harbor loci, ensuring stable, predictable expression. Collectively, this review highlights a paradigm shift in CHO system optimization driven by the convergence of genome editing, synthetic biology, and artificial intelligence. The transition from empirical optimization to rational, data-driven design will facilitate the development of programmable CHO platforms capable of autonomous regulation of metabolic flux, glycosylation fidelity, and transcriptional activity. Such intelligent cell factories are expected to accelerate the transformation from laboratory-scale research to industrial-scale, high-consistency, and economically sustainable biopharmaceutical manufacturing, thereby supporting the next generation of efficient and customizable biologics manufacturing.

Key words　CHO cell expression system, metabolic burden, glycosylation modification, expression stability, optimization strategies

DOI：10.3724/j.pibb.2025.0365　　**CSTR**：32369.14.pibb.20250365

* This work was supported by a grant from the Universities-Industry Collaboration Program funded by the Bureau of Education of Yantai City, China (2022).

** Corresponding author.
ZHU Hong-Wei. Tel：86-535-6010257，E-mail：hwzhu@ldu.edu.cn
ZHANG Xin-Xiao. Tel：86-535-6673485，E-mail：zhangxingxiao@ldu.edu.cn

Received：August 3，2025　Accepted：October 21，2025