

改造中国仓鼠卵巢细胞

来大志 齐连权 于长明 王海涛 陈 薇*

(北京微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘 要 与原核细胞、酵母细胞以及昆虫细胞相比,中国仓鼠卵巢细胞(CHO)作为宿主细胞表达的外源蛋白最接近其天然构象,因而 CHO 细胞表达系统是生物工程制药最为理想的表达系统。但这种系统也存在诸多缺点。如在大规模培养中 CHO 细胞会面临着对无血清培养基的适应性差、细胞无限度增殖以及细胞凋亡等很多难题。所以除了在培养基、培养条件和表达载体方面下功夫优化该系统外,对 CHO 细胞本身进行改造已成为优化 CHO 表达系统的另一热点。

关键词 CHO 细胞,改造,大规模培养,细胞凋亡,细胞黏附,细胞周期

中图分类号 Q813 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)04-0415-05

中国仓鼠卵巢细胞(CHO)是目前最成功的生物制品表达宿主细胞^[1]。工业化规模生产生物制品需要对 CHO 细胞进行大规模培养。有血清培养基由于受成本昂贵,批次间存在差异,有污染病毒等有害物质的可能以及供应渠道不畅等多种因素的限制,加之血清的存在会给下游纯化工作带来困难,使有血清培养基在工业规模的细胞培养中,已让位于无血清培养基(Serum-free medium, SFM)或无蛋白培养基(Protein-free medium, PFM)。由于没有血清提供生长刺激因子、黏附因子、扩展因子以及其它细胞生长存活的必需成分,用 SFM 或 PFM 培养 CHO 细胞会面临巨大挑战,如细胞活力差,贴壁性差,分泌外源蛋白的能力差等。尤其在大规模培养的后期,随着营养的耗尽和有害代谢产物的积累,细胞活力难以维持,极易发生细胞凋亡而使生产提前终止。为了优化细胞大规模培养工艺,生物反应器设计者努力增加反应器在线监控各种参数的能力,如溶解氧、pH 值、渗透压、二氧化碳分压,葡萄糖和谷氨酰胺等营养物质的含量以及乳酸和氨等代谢废物的含量等,从而为给细胞培养创造一个良好的环境提供指导作用。此外,表达不同蛋白的 CHO 细胞株对 SFM 或 PFM 的适应性各不相同。对每一个细胞株均需设计与之相应的 SFM 或 PFM,劳动量大,周期长,且不能保证一定有效。因此,单从优化细胞培养环境入手,很难有效解决 CHO 细胞大规模培养所面临的各种困难。1991 年 James E. Bailey 提出了“代谢工程”的概念,即通过 DNA 重组技术,改变细胞某一酶系功能、物质转运功能或调控功能,从而提高细胞相应活性^[2]。此后,通过代谢工程,各国科学家对 CHO 细胞做了许多改构研究,并取得了可喜的成果,下面对此做一简要介

绍。

1 改造 CHO 细胞,促进其贴壁性

CHO 细胞是兼性贴壁细胞。既可以贴壁生长,也可以悬浮生长。SFM 或 PFM 中培养的 CHO 细胞,由于无黏附因子的存在,细胞往往以悬浮方式生长。若加入黏附因子,如纤粘连蛋白(Fibronectin)、层粘连蛋白(Laminin)、胶原(Collagen)、玻表粘连蛋白(Vitronectin)等可以使细胞重新贴壁。在大规模细胞培养中,尽管有时应用悬浮培养方式,但实际上贴壁培养方式应用得更多。因为贴壁培养具有显而易见的优点,贴壁培养比悬浮培养的细胞可以达到更大密度,从而单位体积产量更大,连续灌流培养过程中,贴壁培养的细胞不会被洗脱,贴壁培养的细胞容易与培养基分离,表达的生物活性物质易于回收。尤其在工程细胞株的克隆选择方面,贴壁培养细胞更具优势。因为悬浮培养的细胞很难操作,换液、洗涤均不方便,很难用传统方法分离出单细胞克隆。现最常用的解决方法是在有血清贴壁培养的情况下筛选高表达细胞株,带血清大规模培养,在培养过程中,逐渐降低加入生物反应器中灌流培养基中血清含量,直至完全无血清。然而,驯化细胞对无血清培养基的适应是一个长期的过程,很难在短时间内实现。这种在生产过程中血清“断奶”的方法常常伴有细胞活力的丧失、目的蛋白表达量降低、细胞凋亡并导致生产终止。因此,设计能在 SFM 或 PFM 中贴壁生长的 CHO 宿主细胞,并在 SFM 或 PFM 中完成基因转染和高表达细胞株的筛选,是解决上述问题的最好方法。研究发现,纯化的玻表粘连蛋白(Vitronectin)单一成分就可以介导

CHO 细胞在 SFM 中的贴壁和扩展^[3]。与其它黏附因子相比, Vitronectin 结构简单, 分子量相对较小, 仅 1.4 kb, 容易克隆和操作其基因。Gandor 等将在 MMTV 启动子控制下的人 Vitronectin 基因导入了 CHO 细胞, 使其获得了在 PFM 中贴壁生长和扩展的能力。并且在完全无血清的情况下, 选择出了多株表达有 Luciferase 的单克隆细胞株^[4], 为解决上述困难开辟了一条新路。

2 改造 CHO 细胞, 增强抗细胞凋亡活性

在大规模细胞培养中, 细胞死亡是维持细胞高活性和高密度的最大障碍。理论上讲, 防止或延长细胞死亡, 可以极大提高生物反应器生产重组蛋白的产量。这种细胞死亡已被证明是由细胞凋亡(Apoptosis)引起的, 而不是以前所认为的坏死(Necrosis)^[5, 6]。细胞凋亡由一系列基因精确地调控, 是多细胞生物发育和维持稳态所必需的生理现象。已知凋亡的最终执行者是 Caspase 家族, 它们均为半胱氨酸蛋白酶, 各识别一个 4 氨基酸序列, 并在识别序列 C 端天冬氨酸残基处将底物切断。Caspase 含有可被自身识别的序列, 可以切割活化自身而导致信号放大, 并作用于下游 Caspase 成员, 从而形成 Caspase 家族的级联放大, 最终作用于效应蛋白, 引起细胞凋亡^[7]。细胞凋亡存在两种信号通路, 如图 1 所示。

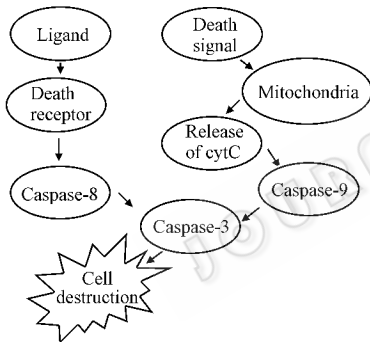


图 1 细胞凋亡的两种信号通路

Fig. 1 Two pathways of apoptosis

One pathway of apoptosis is extrinsic. Some ligands bind "death receptors", and activate Caspase-8. The other pathway is intrinsic. Some kinds of "death pressures" make the permeability of mitochondria increase, which leads to the release of cytochrome C and the activation of Caspase-9. Both Caspase-8 and Caspase-9 can activate Caspase-3 and break down some peculiar substrates and ultimately lead to the apoptosis of cells

理论上讲, 阻断任何一个凋亡信号传递步骤, 均可抑制凋亡的发生。Bcl-2 基因是目前最为有效的抗凋亡基因, 在多种细胞系中均表现出很强的抗凋亡活性(表 1)。该基因定位于线粒体上, 其功能是维持线粒体膜的完整性, 阻止线粒体膜整合蛋白的释放, 尤其是细胞色素 C (Cyt C) 的释放, 从而阻断 caspase-9 的激活, 最终表现出凋亡抑制活性^[25]。最近资料显示, Bcl-2 基因转染的 CHO 细胞, 在丁酸钠(可引起凋亡)的存在下, 细胞培养时间显著延长, 而分泌抗体的产量是原来的 3 倍^[8]。

表 1 转染 Bcl-2 基因表现出抗凋亡活性的细胞系

Table 1 Cell-lines that showed anti-apoptosis activity after transfection of Bcl-2 cDNA

Host cells	References
CHO	8 - 12
Hybridoma	13 - 19
S9	20
293	21
HL-60	22
NS0 myeloma	23
Burkitt lymphoma	24

3 改造 CHO 细胞, 使其可在 PFM 中自分泌生长

如前所述, 无血清培养基由于自身诸多优点, 已取代有血清培养基用于重组蛋白的大规模表达。然而美中不足的是, 无血清培养基所必需的两种(仅仅两种)蛋白成分即胰岛素和转铁蛋白都是动物来源的, 实际上这种无血清培养基并没有消除血清带来的安全隐患。因此, 能否利用 CHO 细胞自身分泌表达以上两种成分并促进自身生长, 即自分泌生长, 引起了澳大利亚一个研究组的兴趣。经过试验, 他们发现 CHO 表达的胰岛素很难形成天然的含有两对二硫键的双链结构, 即便通过在胰岛素分子中引入一个 Furin(前激素转移酶)识别位点, 也没能产生足够的成熟胰岛素供 CHO 细胞生长。而用胰岛素样生长因子(IGF-1)代替胰岛素, 则获得了大量的表达。他们在表达 IGF-1 的同时也表达了转铁蛋白, 这种共表达 IGF-1 和转铁蛋白基因的 CHO 细胞在无蛋白培养基中生长良好, 他们称之为“超级 CHO”^[26]。IGF-1 的促细胞分裂活性与胰岛素相似, 有人认为胰岛素正是结合到 IGF-1 受体才发挥其促有丝分裂活性的。所以 IGF-1 完全可以替代胰岛素作为无血清培养基的成分。但细胞的无限增殖并不总是有利的, 养分的消耗和代谢废物的积累必然导致细胞凋亡。为了控制细胞的增殖, Sunstrom 等在“超级 CHO”的基础上构建了“超级 CHO⁺”, 意为可控的“超级 CHO”。他们将乳糖操纵子序列置于 IGF-1 基因上游, 而乳糖操纵子的阻遏蛋白基因则另置于金属硫蛋白启动子之后。在细胞培养前期, IGF-1 可以不断分泌而促使细胞增殖, 当目的产物达到最高峰时, 便在培养基中加入金属离子, 激活金属硫蛋白启动子表达阻遏蛋白, 从而阻止 IGF-1 的表达, 使细胞停止分裂增殖^[27]。这种可控的自分泌生长细胞, 无疑会使大规模细胞培养变得更为容易操作。

4 改造 CHO 细胞, 减少有害代谢物的产生

乳酸和氨是哺乳动物细胞生长过程中产生的两种主要代谢废物。它们的积累对细胞的生长有很大的负面影响, 并最终影响到目的蛋白的产量^[28]。减少这两种代谢产物的积

累,是大规模细胞培养工艺优化的一个重要努力方向。

乳酸在哺乳动物细胞中是糖不完全氧化的产物。在氧气不足的情况下,糖酵解产生的 NADH 不能被及时氧化,从而阻碍了糖酵解的顺利进行,造成 ATP 产生不足。此时乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)被激活,将糖酵解产生的丙酮酸和 NADH 反应生成乳酸和 NAD⁺,从而保证了糖酵解的顺利进行。但在培养的哺乳动物细胞中,即使氧十分充足,也会产生乳酸^[29]。乳酸对细胞培养的负面影响不仅仅在于使培养基 pH 值降低。即使通过添加碱性物质使 pH 值维持稳定,细胞生长和重组蛋白表达仍会受到影响。限制培养基中葡萄糖的含量是减少乳酸产生最常用的方法,但葡萄糖含量过低造成细胞营养不足也会抑制细胞的生长。这种方法需要对糖的消耗速率、乳酸的产率以及目的蛋白的表达量等一系列参数进行综合考虑才能发挥作用。现在生物反应器的溶氧在线控制技术十分成熟,细胞几乎不会受到缺氧的威胁,那么乳酸脱氢酶似乎不是必需的。因此,利用现在已经十分成熟的基因打靶技术将乳酸脱氢酶基因从细胞中敲除似乎是一个很好的解决办法。Chen 等在杂交瘤细胞中进行了尝试。尽管他们可能仅敲除了一条 LDH-A 等位基因,仍使乳酸的产生大为减少,而细胞的培养周期则大为延长,单克隆抗体的产量也大为增加^[30]。

另一个代谢废物氨主要由谷氨酰胺和天冬酰胺产生。限制培养基中谷氨酰胺的含量也是防止氨过量产生的一个重要方法。谷氨酰胺为细胞生存所必需,但细胞自身可以通过谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)将氨和谷氨酸合成谷氨酰胺。硫胺甲硫氨酸(Methionine sulphoxamine, MSX)是谷氨酰胺合成酶的抑制剂,在无谷氨酰胺的培养基中,MSX 可以作为扩增 GS 基因的选择药物,所以 MSX-GS 能够作为一种基因共扩增系统。应用这种扩增系统的宿主细胞必须利用氨合成谷氨酰胺,所以氨的产量极大减少。同时培养基中不必添加谷氨酰胺,给培养基的保存带来极大方便,因为谷氨酰胺容易分解。Bebbington 等将 GS-MSX 系统应用于骨髓瘤细胞,结果氨的产量明显减少,抗体产量也显著提高^[31]。

目前为止还没有敲除 CHO 细胞 LDH 基因的报道。GS 系统应用于 CHO 细胞虽有报道^[32],但没有阐述是否有利于细胞的生存。我们认为去除 CHO LDH 基因和应用 GS-MSX 扩增系统,值得被代谢废物问题困扰的细胞培养专家一试。

5 改造 CHO 细胞,控制其增殖速率

细胞在大规模培养初期,目的蛋白的表达和细胞的增殖速率呈正相关,即细胞增殖越快,目的蛋白表达量越高。但当反应器中细胞的密度达到饱和后,细胞继续增殖会导致营养和氧的大量消耗以及乳酸、氨等有毒代谢产物的大量积累,细胞逐渐凋亡,重组蛋白表达量逐渐降低。此时若要维持细胞活力,就必须加大培养基灌流速度以加快营养的补给和废物的去除。此举虽可暂时延长生产时间,但增加了生产成本,重组蛋白被极大稀释也会给下游纯化带来困难。而且

反应器中细胞密度不能无限增大,细胞活力的持续下降和目的蛋白产量持续降低最终会使生产提前终止。为解决以上问题,在生物反应器中细胞密度达到理想值时,控制细胞增殖速率就成为大规模细胞培养能否成功的关键。在早期杂交瘤细胞的培养研究中,细胞分裂抑制主要通过限制必需营养成分或在培养基中加入 DNA 合成抑制剂以及加入基因组毒性物质而实现的^[33,34]。但这种方法干扰细胞正常代谢,影响细胞活力,无法长时间培养。1993 年, Jenkins 等利用一个温度敏感的 CHO 细胞系建立了温控型生长抑制表达系统。该系统在温度升至 39℃ 时可获得生长抑制,总外源蛋白产率有所提高。但是长时间暴露于较高温度下,细胞活力迅速降低,生产周期仍难以达到理想的程度^[35]。

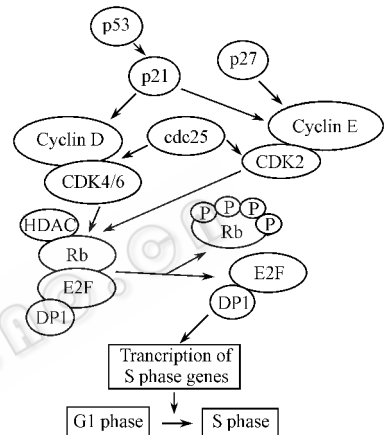


图 2 细胞周期 G1/S 检查点

Fig. 2 G1/S check-point in cell-cycle

In G1 phase, the expression of Cyclin D and Cyclin E increases. They bind with corresponding cyclin-dependent kinase (CDK) and are phosphorylated by CDC25 and thus activated. The activated complex of Cyclin D-CDK4/6 and Cyclin E-CDK2 phosphorylate the complex of Rb-HDAC and make it dissociate from the transcription activation complex DP1-E2F, and make it activated. Thus a series of S phase genes are transcribed and the cell cycle progress through the G1/S check-point.^[36-38] In the figure: →: Promote; ⊥: Inhibition

已知细胞周期由 4 个时相即 G1 期、S 期、G2 期和 M 期组成。在细胞周期的进展中,存在几个关键的“检查点”(Check point),它们决定细胞周期是否继续。若细胞无法通过检查点,要么停止生长,要么凋亡。就我们关心的生长抑制方面,在 G1/S 检查点较易实现。该检查点由一系列基因精确地调控着,如图 2 所示。这种调控机制为我们从基因层面控制细胞的增殖提供了可能。Fussenegger 等利用诱导型 P_{hcmv}*-1 启动子在 CHO 细胞中分别表达了 3 种 G1/S 抑制蛋白,即 p21、p27 和 p53175p。其中 p21 基因和 CCAAT/增强子结合蛋白 α 共表达,而 p53175 是 p53 的突变体,与野生型 p53 不同,它仅抑制细胞增殖,而不促使细胞凋亡。当细胞生长到一定密度时,撤去培养基中的四环素,诱导上述基因表达,结果表明,转染上述基因的细胞均获得了生长抑制,其中转染了 p21 的细胞系报告蛋白 SEAP 的单位产量增加了 10~15

倍,而转染了 p27 的细胞系 SEAP 产量则增加了 30 倍^[39-41]。

6 总 结

综上所述,CHO 细胞改造总的目标是在无蛋白培养条件下,增强细胞活力,延长大规模培养时间即生产周期,提高目的蛋白产量和降低成本。以上几个方面的改造部分地达到了上述目标。本课题组综合上述各方面进展,利用 GS 作为选择标记的三顺反子表达载体内源表达 Igf-1, Bcl-2 和 VTN 基因,使表达人 β -干扰素的 CHO 细胞株获得了在简单无蛋白培养基中生长的能力、抗凋亡能力和贴壁能力(资料已投寄)。利用核酶可控降解 Cyclin E 以对细胞周期进行调控的研究正在进行。将来随着对细胞周期、细胞凋亡、信号转导以及外源蛋白表达机制等各方面机理的认识不断深入,相信必将为 CHO 细胞的改构提供更为广阔的天地,从而为生物工程制药作出应有的贡献。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Rolf G W, Wolfgang N, Kristina K *et al.* Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Drug Res*, 1998, **48** :870 ~ 880
- [2] Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252** :1668 ~ 1675
- [3] Danilov Y, Juliano R. (Arg-Gly-Asp)_n-Albumin conjugates as model substratum for integrin-mediated cell adhesion. *Exp Cell Res*, 1989, **182** :186 ~ 196
- [4] Gandor C, Zang-Gandor M, Flor P *et al.* Conditionally adherent growth of serum-independent CHO cells for automated drug screening and biopharmaceutical production. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **65** :523 ~ 528
- [5] Singh R P, Al-Rubeai M, Gregory C D *et al.* Cell death in bioreactor: a role for apoptosis. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44** :720 ~ 726
- [6] Moore A, Donahue C J, Hooley J *et al.* Apoptosis in CHO cell batch cultures: examination by flow cytometry. *Cytotechnol*, 1995, **17** :1 ~ 11
- [7] Goyal L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell*, 2001, **104** :805 ~ 808
- [8] Kim N S, Lee G M. Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **71** :184 ~ 193
- [9] Tey B T, Singh R P, Piredda L *et al.* Influence of Bcl- on cell death during the cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody. *Biotechnol Bioeng* 2000, **68** :31 ~ 43
- [10] Goswami J, Sinskey A J, Stephanopoulos G N *et al.* Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biochnol Bioeng*, 1999, **62** :632 ~ 640
- [11] Fussenegger M, Fassnacht D, Schwartz R *et al.* Regulated overexpression of the survival factor bcl-2 in CHO cells increases viable cell density in batch culture and decreased DNA release in extended fixed-bed cultivation. *Cytotechnol*, 2000, **32** :45 ~ 61
- [12] Mastrangelo A J, Hardwick J M, Zou S *et al.* Part II. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **67** :555 ~ 564.
- [13] Fassnacht D, Rossing S, Singh R P *et al.* Influence of bcl-2 on antibody productivity in high cell density perfusion cultures of hybridoma. *Cytotechnol*, 1999, **30** :95 ~ 106
- [14] Goswami J, Sinskey A J, Steller H *et al.* Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62** :632 ~ 640
- [15] Itoh Y, Ueda H, Suzuki E. Overexpression of bcl-2, apoptosis suppressing gene: prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **48** :118 ~ 122
- [16] Simpson N H, Milner A E, Al-Rubeai M. Prevention of hybridoma cell death by bcl-2 during suboptimal culture conditions. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **54** :1 ~ 16
- [17] Simpson N H, Singh R P, Perani A *et al.* In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acids leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of bcl-2 gene. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59** :90 ~ 98
- [18] Terada S, Itoh Y, Ueda H *et al.* Characterization and fed-batch culture of hybridoma overexpressing apoptosis suppressing gene bcl-2. *Cytotechnol*, 1997, **24** :135 ~ 141
- [19] Terada S, Komatsu T, Fujita T *et al.* Co-expression of bcl-2 and bag-1, apoptosis suppressing genes, prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Cytotechnol*, 1999, **31** :141 ~ 149
- [20] Mitchell-logan C, Murhammer D W. Bcl-2 expression in *Spodoptera frugiperda* Sf9 and *Trichoplusia ni* BT-Tn-5B1-4 insect cell: effect on recombinant protein expression and cell viability. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56** :380 ~ 388
- [21] Uhlmann E J, Subramanian T, Vater CA *et al.* A potent cell death activity associated with transient high level expression of Bcl-2. *J Biol Chem*, 1998, **273** (28) :17926 ~ 17932
- [22] Zhang M, Zhang H Q, Xue S B. Effect of bcl-2 and caspase-3 on calcium distribution in apoptosis of HL-60 cells. *Cell Res* 2000, **10** :213 ~ 220
- [23] Tey B T, Singh R P, Piredda L *et al.* Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures. *J Biotechnol*, 2000, **79** :147 ~ 159
- [24] Singh R P, Emery A N, Al-Rubeai M. Enhanced of survivability of mammalian cells by overexpression of the apoptosis-suppressor gene bcl-2. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52** :166 ~ 175
- [25] Hunt A, Evan G. Till death us do part. *Science* 2001, **293** :1784 ~ 1785
- [26] Pak S C O, Hunt S M N, Bridges M W *et al.* Super-CHO—A cell line capable of autocrine growth for fully defined protein free conditions. *Cytotechnol*, 1996, **22** :139 ~ 46
- [27] Suntrom N A, Sugiyono, Hunt S *et al.* Regulated autocrine growth of CHO cells. *Cytotechnol*, 2000, **34** :39 ~ 46
- [28] Hassell T, Gleave S, Butler M *et al.* Growth inhibition in animal cell culture: the effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, **30** :29

- [29] Hu W S , Dodge T C , Frame K K *et al.* Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Devel Biol Stand* , 1987 , **66** :279 ~ 290
- [30] Chen K , Liu Q , Xie L *et al.* Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* 2001 **72** :35 ~ 61
- [31] Bebington C R , Renner G , Thomson S *et al.* High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Bio/Technol* , 1992 , **10** :169 ~ 175
- [32] Cockett M I , Bebbington C R , Yarranton G T. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/Technol* , 1990 , **8** :662 ~ 667
- [33] Al-Rubeai M , Emery A N , Chalder S J *et al.* Specific monoclonal antibody productivity and the cell-cycle comparisons of batch , continuous and perfusion cultures. *Cytotechnol* , 1992 , **9** :85 ~ 97
- [34] Suzuki E , Ollis D F. Enhanced antibody production at slowed growth rates : experimental demonstration and a simple structured model. *Biotechnol Prog* , 1990 , **6** :231 ~ 236
- [35] Jenkins N , Hovey A. Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovary cell synthesizing a recombinant protein. *Biotechnol Bioeng* , 1993 , **42** :1029 ~ 1036
- [36] Nakayama K I , Hatakeyama S , Nakayama K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27^{kip1} . *Biochem Biophys Res Commu* , 2001 **282** :853 ~ 860
- [37] Walter J , Johnson P. Mechanism of cyclin-dependent kinase regulation : structures of Cdk s , their cyclin activators and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* , 1999 **287** :821 ~ 828
- [38] Bartek J , Ludas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS lett* , 2001 **490** :117 ~ 122
- [39] Fussenegger M , Mazur X , Bailey J E. A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* , 1997 **55** :927 ~ 939
- [40] Mazur X , Fussenegger M , Renner W A *et al.* Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Biotechnol Prog* , 1998 **14** :705 ~ 713
- [41] Fussenegger M , Schlatter S , Datwyler D *et al.* Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Nat Biotechnol* , 1998 **16** :468 ~ 472

Modification of Chinese Hamster Ovary Cells

LAI Da-Zhi QI Lian-Quan YU Chang-Ming WANG Hai-Tao CHEN Wei*

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology , Beijing 100071 , China)

Abstract Chinese hamster ovary cells(CHO) are preferable to prokaryotic , yeast or insect cells as hosts for biopharmaceutical production due to the products are more similar to their natural conformation. However , CHO cells confront tremendous difficulties when cultured in large scale such as mal-adaptation to serum-free medium , apoptosis and over-growth without limitation. So in addition to optimizing CHO system in respect of medium , environment and expression vector , modification of CHO cells themselves has drawn more and more attention. Here the main progress in CHO-modification is reviewed.

Key words CHO cells , large-scale culture , apoptosis , cell-adhesion , cell cycle