

rhVEGF₁₆₅ 在中国仓鼠卵巢细胞中的稳定表达、纯化及其生物学活性

张甘良, 张海峰, 粘伟红, 孙九如

嘉和生物药业有限公司, 上海 201203

摘要: 利用哺乳动物细胞表达系统, 稳定表达和纯化高生物学活性的人重组血管内皮生长因子 (VEGF₁₆₅) 蛋白。将 VEGF₁₆₅ 克隆于表达载体 pCDNA4.0, 与 T-GS 载体共同转染 CHO-S (中国仓鼠卵巢细胞) 细胞, MSX (Methionine sulphoximine) 加压筛选高表达细胞株, 5 L 发酵罐培养, 细胞培养上清液通过三步纯化得到 rhVEGF₁₆₅ 蛋白, 通过 Western blotting、Biacore 和人脐静脉内皮细胞增殖实验等对表达蛋白的特异性、亲和力及生物学活性等进行检测。所建立的细胞株其 rhVEGF₁₆₅ 蛋白表达量约 50 mg/L, 纯化后纯度达到 90% 以上, 细胞活性 EC₅₀ 为 1.94 ng/mL。成功筛选到高表达 rhVEGF₁₆₅ 的 CHO 细胞株, 纯化得到高活性、高亲和力的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白。

关键词: 血管内皮生长因子 (VEGF₁₆₅), 中国仓鼠卵巢细胞, 重组蛋白稳定表达, 生物反应器, rhVEGF₁₆₅ 蛋白纯化

Stable expression of rhVEGF₁₆₅ in Chinese hamster ovary cells

Ganliang Zhang, Haifeng Zhang, Weihong Nian, and Jiuru Sun

Genor Biopharma Co. Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: We established a stable Chinese hamster ovary (CHO-S) cell line for recombinant human VEGF₁₆₅-expressing. We co-transfected GS-expression vector and rhVEGF₁₆₅ expression plasmid into CHO-S cells, and selected the highest VEGF₁₆₅-expressing clone as the working cell line to express VEGF₁₆₅ protein. After 7-day fed-batch culture in a 5 L bioreactor and 3 steps chromatographic purification, we got the rhVEGF₁₆₅ protein for series of binding and biological activity examination. The production was over 50 mg/L. The purified rhVEGF₁₆₅ protein was functionally active with a half-maximal Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) growth-enhancing effect concentration of 1.94 ng/mL. It was slightly better than commercially available *Escherichia coli* expressing rhVEGF₁₆₅. So we expressed successfully rhVEGF₁₆₅ protein in high-level and obtained the fully active rhVEGF₁₆₅ protein in large quantity.

Keywords: rhVEGF₁₆₅, Chinese hamster ovary (CHO) cell, stable expression, bioreactor process, rhVEGF₁₆₅ purification

血管内皮生长因子家族 (Vascular endothelial growth factor family, VEGF) 是一类能够介导血管再生的家族蛋白, 目前已经发现该家族蛋白有 7 种结构相类似的糖蛋白: VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F 以及胎盘生长因子 (PLGF)^[1]。在这些蛋白中, VEGF-A 与血管增生的关系最为紧密, 因此被用作治疗血管增生的靶点^[2-3]。VEGF-A 亚型有 7 种, 分子量在 34~42 kDa 之间, 分别是: VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₄₈、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆^[4], 这些亚型是由 mRNA 不同的剪切引起的。在人体中 VEGF₁₆₅ 是 VEGF-A 的主要亚型, 大多数用于治疗组织缺血的血管再生术主要是重组 VEGF₁₆₅ 蛋白^[5-8]。相关报道如 Fiebich 等^[9]和 Siemeister^[10]等分别在昆虫表达系统和大肠杆菌中表达了具有生物学活性的重组 VEGF₁₆₅, 大肠杆菌表达的 VEGF₁₆₅ 的生物活性和天然结构的 VEGF₁₆₅ 相类似^[11], 也展现了一些临床疗效^[6], 但是为了减少免疫反应, 选用动物细胞表达带有糖基化的 VEGF₁₆₅ 仍然是药物基础研究和疾病治疗的首选。顾洪等在哺乳动物细胞 CHO-K1 中获得具有生物学活性的 VEGF₁₆₅^[12], 曾际斌等在 HeLa 细胞中表达得到 VEGF₁₆₅^[13]。但这些实验结果不易放大生产, 不能满足各种研究和医学治疗的所需。市面上也有商售的 VEGF₁₆₅ (CHO 表达), 但是价格昂贵。

本文将 VEGF₁₆₅cDNA 克隆于表达载体 pCDNA4.0, 与表达 GS 基因的载体共同转染 CHO-S 细胞, 经 MSX 筛选后获得稳定高表达克隆; 应用 5 L 生物反应器进行规模性培养, 培养上清用层析方法, 分离纯化获得高纯度高生物活性的 VEGF₁₆₅ 蛋白, 方法简便、成本低、便于放大生产。

1 材料与方法

1.1 材料

CHO-S 细胞购自 ATCC; 293-VEGF₁₆₅ 载体由军事医学科学院生物工程研究所提供; T4 DNA 连

接酶、蛋白分子量标准 Marker、限制性内切酶等购自 NEB 公司; 胶回收试剂盒、pCDNA4.0 载体购自 Invitrogen; 302 培养基、明胶、胰蛋白酶和 FBS 购自 Gibco 公司; Phenyl sepharose 6 FF-low sub、SP-Sepharose FF、Ni-NTA Sepharose FF 凝胶购自 GE 公司; CCK-8 检测试剂盒购自日本同仁; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、Tris、柠檬酸、柠檬酸三钠、咪唑和 MSX 购自 Sigma 公司; Avastin 购自 Roche 公司; 人胎盘脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC 细胞) 购自上海博升生物科技有限公司。

PCR 仪(杭州朗基科学仪器生物有限公司); 紫外检测仪 (上海琪特有限公司); 摇床 CLIMO-SHAKER 1SFS-X (瑞士科耐 Kuhner 公司)。5 L 细胞培养罐 (Sartorius), Biacore X 100 和 CM5 芯片 (GE)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pCDNA4.0-VEGF₁₆₅ 构建

SP163 是一个内部核糖体进入位点 (IRES), 为了增加目的基因的翻译, 在目的基因的 5'端插入增强子 SP163。由于载体 pCDNA4.0 自带有 SP163 片段, 所以用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切将 pCDNA4.0 内 912~1 196 片段切除, 直接插入 SP163-VEGF₁₆₅。

以 pCDNA4.0 为模板, Primer 1 和 Primer 2 (表 1) 为引物, PCR 扩增得到增强子 SP163 片段; 以实验室自备 293-VEGF₁₆₅ 为模板, VEGF₁₆₅ 基因序列带有 6 个 His 的基因序列。Primer 3 和 Primer 4 (表 1) 为引物, PCR 扩增得到 VEGF₁₆₅ 片段, 然后以 Primer 1 和 Primer 4 (表 1) 为引物, SP163 和 VEGF₁₆₅ 片段为模板, 扩增得到 SP163 和 VEGF₁₆₅ 连接片段, 将此片段连接到 T 载体得到重组质粒, 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切并回收 SP163-VEGF₁₆₅ 片段, 将该片段插入到质粒载体 pCDNA4.0, 构建重组质粒 pCDNA4.0-VEGF₁₆₅-6His, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 中筛选重组子。抽提上述构建的重组质粒, 用于转染 CHO-S 细胞。

表 1 本实验所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer 1	CCGAAGCTTAGCGCAGAGGCTTG
Primer 2	CAGAAAGTTCATGGTTTCGGAGGCCGTC
Primer 3	GCCTCCGAAACCATGAACCTTCTGCTGTCT
Primer 4	CATGAATTCAGCCAGAGGTCGAGGTC

1.2.2 重组质粒转染和表达 rhVEGF₁₆₅ 细胞株的筛选

复苏一株 CHO-S 细胞, 加 GMEM (Glasgow minimum essential medium)+谷胺酰胺培养液并转移至 T25 瓶内, 于 37 °C、5% CO₂ 静置培养 24 h 后转至 spin 瓶培养, 直至细胞数量达到 10⁷ 以上, 用于电转。电转前 1 天更换新鲜 GMEM+谷胺酰胺培养液。电转当日取约 10⁷ 个细胞, 室温下, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清收集细胞, 用 800 μL GMEM 培养基重悬, pCDNA4.0-VEGF₁₆₅ 和 GS (含有 GS 基因片段的 T 载体实验室自备) 质粒分别加 20 μg, 混合, 冰浴 10 min 后电击。电击参数为: 电压 300 V, 电容 900 μF, 电击后迅速放入冰浴, 用移液枪轻轻吹打, 移取 200 μL 的细胞, 用 GMEM+2% dFBS (透析血清) 稀释至 50 mL, 直接分至 5 块 96 孔板, 600 μL 细胞用 GMEM+2% dFBS 稀释至 50 mL, 放置 5 个平皿, 37 °C、5% CO₂ 培养, 隔天后加入含最终浓度为 25 nmol/L 的 MSX 的 GMEM+2% dFBS。

平皿细胞每隔 7 天换含 MSX 的 GMEM+2% dFBS 培养液 1 次, 去除死细胞。20 d 后平皿内长出克隆, 可有限稀释法分板至 96 孔板。96 孔板细胞克隆长出且达到 2/3 孔大小左右, 取培养 3 μL 上清用 Dot blotting 方法检测表达量, 选取高表达的克隆, 依次扩至 24 孔板和 6 孔板, 最后选取一株表达最高, 细胞生长状态最佳的细胞株驯化至 302 培养基, 进行表达。

1.2.3 rhVEGF₁₆₅ 蛋白表达

工程细胞株用 5 L 生物反应器 (Sartorius) 进行培养, 采用 302 无血清培养基, 接种密度

3.0×10⁵ cells/mL, 细胞生长条件是 120 r/min, pH 6.8~7.2, DO 50%, 每天检测葡萄糖含量、细胞数、细胞活力和表达量, 细胞活力降至 90% 以下, 即可收获细胞上清。采用双抗体夹心法 ELISA、SDS-PAGE 和 Western blotting 进行检测。在 ELISA 实验中, 采用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液按照 1:2 000 稀释自制兔抗人 VEGF 多克隆抗血清进行包被, 一抗为购买的 Avastin, 按 1:10 000 稀释, 酶标抗体为羊抗人 IgG-HRP (Calbiochem), 按 1:10 000 稀释, 其余按照标准 ELISA 检测方法进行。在 Western blotting 实验中, 一抗为自制的兔抗人 VEGF 多克隆抗血清, 按 1:500 稀释, 二抗为羊抗兔 IgG-HRP (Calbiochem), 按 1:2 000 稀释, 显色方法为 DAB, 其余按照标准 Western blotting 方法进行。

1.2.4 rhVEGF₁₆₅ 蛋白纯化

细胞培养第 7 天, 活细胞计数降至 90% 以下时收罐, 细胞培养液在 3 000 ×g 条件下离心 30 min, 收集细胞上清, 冰浴, 在搅拌条件下缓慢加入固体 (NH₄)₂SO₄, 使培养液中 (NH₄)₂SO₄ 的终浓度达 1 mol/L, 持续搅拌 2 h 后, 用 0.45 μm 膜 (Millipore) 过滤, 除去颗粒状物质。滤过液过 Phenyl sepharose 6 FF-low sub 凝胶层析柱, 弃去过柱流出液, 凝胶柱用 20 mmol/L PB (pH 7.0) 缓冲液洗脱, 洗脱峰用 0.2 mol/L 柠檬酸调 pH 至 5.0 后用水稀释一倍, 稀释后的洗脱峰过 SP-Sepharose FF 层析柱, 然后用 20 mmol/L 柠檬酸含 100 mmol/L NaCl 缓冲液 (pH 5.0) 充分洗涤, 接着用 20 mmol/L 柠檬酸含 1 mol/L NaCl 缓冲液 (pH 5.0) 洗脱, 收集洗脱峰; 洗脱的蛋白溶液用 1 mol/L Tris 调 pH 至 8.0 后直接过 Ni-Sepharose 6 Fast Flow 凝胶柱, 以 20 mmol/L PB 含 0.15 mol/L NaCl 缓冲液 (pH 8.0) 洗涤 Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶柱, 用含 100、300 mmol/L 咪唑上述缓冲液先后洗脱结合蛋白, 收集含有目的蛋白的样品, 用 PBS 透析去除咪唑。通过还原 SDS-PAGE 和非还原 SDS-PAGE 电泳对纯化结果进行检测。

1.2.5 rhVEGF₁₆₅ 蛋白刺激 HUVEC 细胞增殖活性检测

培养 HUVEC 细胞用的培养皿和 96 孔板均需用 0.4% 的明胶溶液预处理, 以促使细胞更好地贴壁生长。HUVEC 细胞采用 HUVEC 完全培养基进行培养, 当细胞生长至 90% 以上融合度时, 用胰蛋白酶消化, 然后按 1: 4 进行传代。细胞消化后用完全培养基稀释至 $6 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 个/mL, 100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。吸掉 96 孔培养板中的完全培养基, 加不同浓度的 rhVEGF₁₆₅ 样品, 以市售的 VEGF 样品作为阳性参考品, 以样品稀释液作为阴性对照。样品稀释液采用添加 2% FBS 的基础培养基, 按 100 μ L/孔加入。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 72 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2.5 h, 于 450/650 nm 处测吸光值。

1.2.6 Western blotting 和 Biacore 检测与 Avastin 结合活性

rhVEGF₁₆₅ 样品进行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿法进行转膜, Western blotting 所用的一抗是 Avastin (稀释倍数 1: 2 000), 二抗羊抗人 IgG/FC-HRP (Bethyl), 稀释比例为 1: 2 000, 用 DAB 显色, 其余条件按照常规 Western blotting 检测方法进行。

使用 GE 的 Biacore 仪器进行亲和力检测。将 rhVEGF₁₆₅ 偶联到 CM5 芯片上, 作为固定相, 以 Avastin 作为流动相, 检测 rhVEGF₁₆₅ 与 Avastin 的结合、解离常数, 计算亲和力常数, 同时以商品化的大肠杆菌表达的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白作为参考品。

2 结果

2.1 表达载体的构建

pcDNA4-VEGF₁₆₅ 载体主要元件如图 1 所示, 质粒经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后得到 2 个片段。大片段为 pcDNA4.0 骨架, 小片段为 *SP163*-VEGF₁₆₅ 基因, 同时带有编码 6 个 His 的基

因片段。如图 2 所示。*SP163*-VEGF₁₆₅ 插入片段大小在 750 bp 和 1 000 bp 之间。

T-vector 为 TaKaRa 公司提供的载体, 内插有 *GS* 基因表达片段, 用 *SV40* 为启动子, *polyA* 是 *SV40* 具体元件见图 3。*GS* 基因的具体序列信息参照 GenBank(Accession No. 32775)。

2.2 rhVEGF165 表达细胞株的筛选

在 96 孔板克隆形成后用 Dot blotting 测定单克隆的表达量, 如图 4 所示, 每个克隆取 3 μ L 培养上清点膜, 在所点的样品完全渗入硝酸纤维膜后, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h, 然后相继用兔多克隆抗 VEGF 抗血清和 HRP-羊抗兔抗体孵育。挑选信号最强的 5 株细胞株: 1F2、2C8、2D6、3E2、

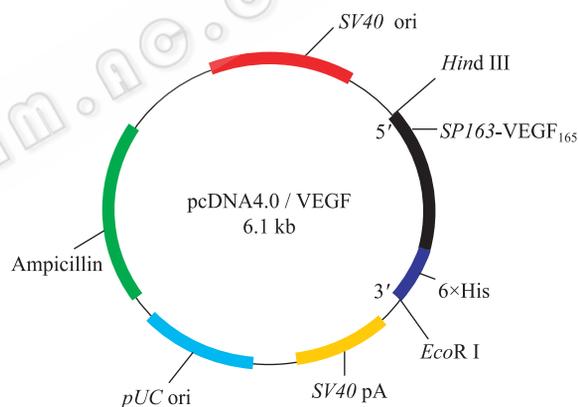


图 1 pcDNA4.0-VEGF₁₆₅ 载体图谱

Fig. 1 Map of pcDNA4.0-VEGF₁₆₅.

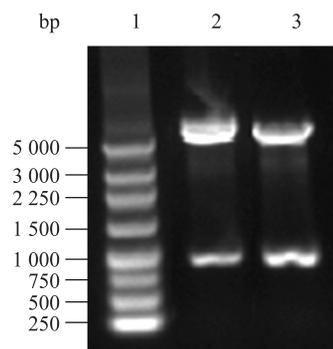


图 2 质粒 pcDNA4-VEGF₁₆₅ 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pcDNA4-VEGF₁₆₅ by enzyme digestion. 1: DNA marker; 2, 3: pcDNA4-VEGF₁₆₅ vector DNA digested with *EcoR* I and *Hind* III.

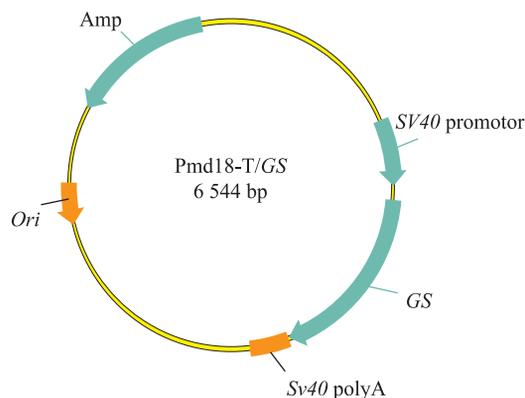


图3 pMD18/GS 载体图谱

Fig. 3 Map of pMD18/GS.

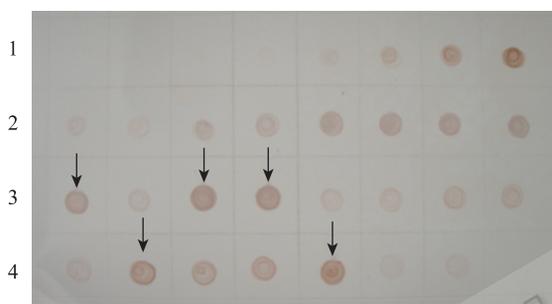


图4 Dot blotting 分析图谱

Fig. 4 Chart of Dot blotting analysis. 1: from left to right: medium control, VEGF 0, 0.02, 0.04, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, and 1.2 μg , respectively. 2-4: samples from 96 well clone cultures, each dot containing 3 μL of medium.

3C9, 分别扩大培养, 在培养过程中, 2D6 细胞株生长速度、密度及表达量高于其他, 最后选定 2D6 作为放大培养的种子细胞。

2.3 rhVEGF₁₆₅ 蛋白表达

2D6 细胞株用 5 L 生物反应器 (Sartorius) 进行培养, 采用 302 无血清培养基, 接种密度 3.0×10^5 cells/mL, 细胞生长条件是: 120 r/min, pH 6.8~7.2, 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 。图 5 为 7 d 内细胞生长状态及表达量的变化, 细胞在第 5 天达到最高密度, 可达到 2.6×10^6 cells/mL, 细胞活力为 95%, 之后开始下降, 到第 7 天, 细胞活力降至 90%, EIISA 检测表达最高。培养时间如果过长, 细胞死亡将会明显增多, 大量细胞内蛋白酶释放, 易导致目的蛋白降解, 因此在培养第 7 天时收罐。

2.4 rhVEGF₁₆₅ 蛋白纯化

细胞培养上清经 3 步柱层析纯化后得到了高纯度的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白, 在 SDS-PAGE 图谱上 (图 6) rhVEGF₁₆₅ 纯度达到 90% 以上。电泳图谱中显示有 2 条条带, 这是因为 VEGF 分子中有几个糖基化位点, CHO 细胞表达的 rhVEGF₁₆₅ 时糖基化位点不同或偶联的糖链的长度不均一所引起的^[14]。

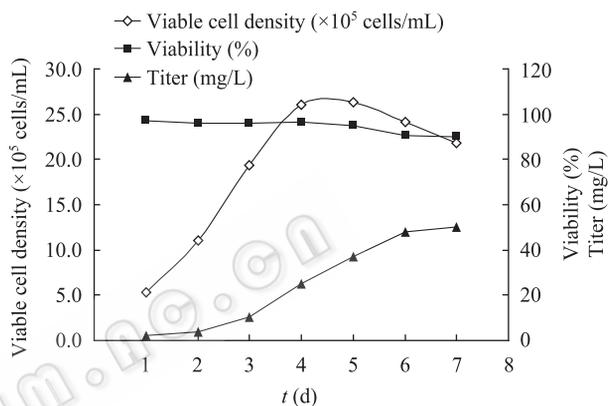


图5 无血清培养 CHO 细胞稳定表达 rhVEGF₁₆₅ (5 L 发酵罐)

Fig. 5 rhVEGF₁₆₅-expressing stable CHO cell line culture in a 5 L bioreactor with serum-free medium.

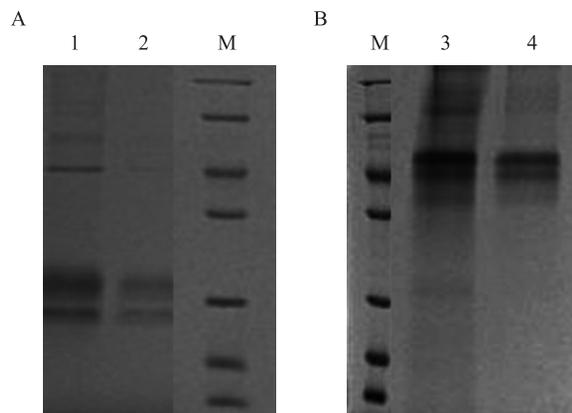


图6 SDS-PAGE 分析纯化的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified rhVEGF₁₆₅ protein. (A) Reducing conditions. 1: SP-Sepharose FF Peak, 2: Ni Sepharose 6 Fast Flow Peak. (B) Non-reducing conditions: 3: SP-Sepharose FF Peak, 4: Ni Sepharose 6 Fast Flow Peak. Molecular weight marker, from top to bottom 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.5 kDa. It was shown to be composed of two protein bands. It maybe correspond to glycosylated and unglycosylated forms. The protein purity was greater than 90%.

2.5 rhVEGF₁₆₅ 蛋白对 HUVEC 细胞增殖活性检测

人胎盘脐静脉内皮细胞的增殖需要 VEGF 作为细胞生长因子来刺激,而且 VEGF 浓度在一定的范围内时,细胞的增殖与 VEGF 的浓度呈现量效关系。根据这个原理,我们检测了 CHO 细胞稳定表达的 rhVEGF₁₆₅ 样品的活性。rhVEGF 浓度从 1 000 ng/mL 开始,做 4 倍梯度稀释,共稀释 9 个梯度,以含 2% FBS 的基础培养基为阴性对照,结果如图 7 所示。CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白比大肠杆菌表达的具有更高的生物学活性。CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白其 EC₅₀ 为 2.29 ng/mL,而大肠杆菌表达的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白的 EC₅₀ 为 4.17 ng/mL。

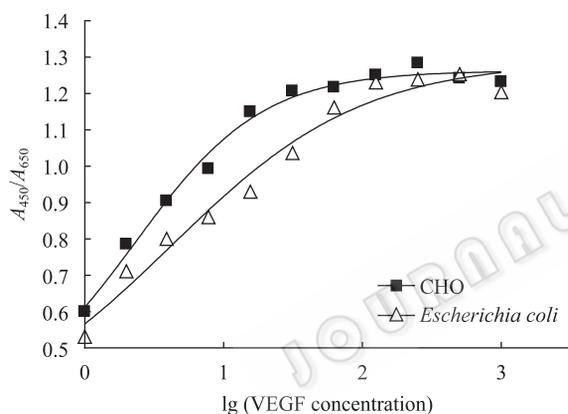


图 7 CHO 与大肠杆菌表达的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白的生物学活性

Fig. 7 Biological activity of rhVEGF₁₆₅ from CHO cell and *E. coli*.

2.6 rhVEGF₁₆₅ 与 Avastin 的结合活性

Roche 公司生产的 Avastin 抗体是一种人源化的抗 VEGF 抗体,轻链可变区与 VEGF₁₆₅ 蛋白特异性结合,阻碍 VEGF 与内皮细胞表面受体 Flt-1 及 KDR 结合,使其不能发挥促进血管内皮细胞增殖以及肿瘤内血管新生,从而阻断对肿瘤生长至关重要的血液、氧气和其他生长必需的营养供应。

在 Western blotting 检测纯化后 rhVEGF₁₆₅ 样品,我们用 Avastin 作为一抗,如图 8 所示,随着 rhVEGF₁₆₅ 由 0.01 μg 逐步增加至 0.25 μg,条带显色

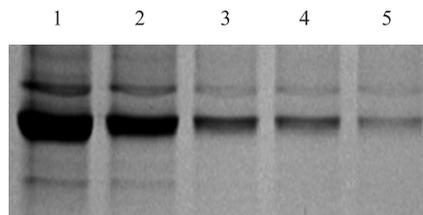


图 8 Western blotting 分析 rhVEGF₁₆₅ 蛋白

Fig. 8 Western blotting analysis of rhVEGF₁₆₅ protein. rhVEGF₁₆₅ were separated by 12% SDS-PAGE under non-reducing conditions and analyzed by a Western blotting analysis. The first antibody is Avastin, the second antibody is HRP-goat antihuman IgG antibody. 1-5: contain 0.25 μg, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 μg rhVEGF₁₆₅ respectively.

逐步增强,表明 CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 能与 Avastin 很好地结合。该实验用免疫化学方法证明了所获得的蛋白是 rhVEGF₁₆₅。

此外,为了检测所获得的 VEGF 具有完全的抗体结合特性,我们进一步采用 Biacore 方法检测 CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 与 Avastin 结合的亲和力,同时,以市售的大肠杆菌表达的 VEGF₁₆₅ 作为参考品。实验使用 CM-chip, CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 或大肠杆菌表达的 rhVEGF₁₆₅ 作为固定相,Avastin 作为流动相,应用不同浓度的 Avastin 来检测 Avastin 与 rhVEGF₁₆₅ 解离常数。CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 所测得 K_d 为 7.256×10^{-11} mol/L,而大肠杆菌表达的 rhVEGF₁₆₅ 与 Avastin 的 K_d 为 1.373×10^{-9} mol/L, Biacore 数据表明 CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 蛋白比市售的原核细胞表达的 VEGF 具有更高的与 Avastin 结合的能力。

3 讨论

VEGF 最早是由 Leunq 等^[15]于 1989 年在牛垂体星状细胞培养液中提纯的蛋白质。它是胚胎发生和创伤愈合过程中启动血管形成的一个高度特异的有丝分裂原,也是一种血管形成和血管通透性诱导因子,在血管发生和形成过程中起着重要的调控作用。肿瘤的生长和转移是一个多步骤的复杂过程,其中肿瘤血管的生成起重要的作用。鉴于其重要的生理

和病理作用,需要大量具有高度生物学活性的 VEGF 供实验室和临床研究。目前常用的是大肠杆菌表达的 VEGF,大肠杆菌体系表达 VEGF,可以获得较高的表达量,比较经济,在 HUVEC 细胞实验中也具有促细胞增殖的活性。但是大肠杆菌表达的 VEGF 有其内在的缺陷,不能对所表达的 VEGF 进行糖基化等翻译后的修饰,生物学活性受到影响。例如在促进 HUVEC 细胞增殖上效果不如真核细胞表达的 VEGF,与 Avastin 的亲合力也较差,在实际应用上有很大的局限性。国内的一些研究机构虽然能用哺乳细胞表达 VEGF,但是表达过低,放大生产时成本过高。同样 Invitrogen 公司的 FreeStyle™ MAX 293 Expression System 能较快速地表达哺乳动物细胞来源的 VEGF,但是表达量也偏低,所用的试剂价格昂贵,无法大规模制备。为了解决 VEGF 的来源,我们选用了 CHO 稳定表达体系。获得高表达克隆后可以大量获得高活性 VEGF 来满足实验室和临床研究的需求。所获得的稳定细胞表达的 VEGF 量比 293-F 细胞瞬时表达的高近 2 个数量级,所需试剂也比 293-F 体系的低廉,因此不失为一种较好的选择。

本研究采用 T-GS 载体和 pCDNA4.0-VEGF₁₆₅ 载体共转 CHO-S 细胞,利用谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 系统,MSX 加压筛选 rhVEGF₁₆₅ 蛋白高表达细胞株。该系统是 20 世纪未发展起来的一种基因筛选扩增系统^[16]。谷氨酰胺合成酶在 ATP 水解提供能量时,利用细胞内的氨和谷氨酸合成谷氨酰胺,在缺乏细胞外谷氨酰胺的培养条件下,加入谷氨酰胺合成酶的抑制物 (Methionine sulphoximine, MSX),可使 GS 基因及与之相连的目的基因扩增,达到提高目的基因表达水平的目的。GS 系统表达水平高,但细胞长期连续培养时,生长状况不佳,有可能高浓度的 MSX 对细胞的长期生长的抑制作用较强。Lee 等^[14]选用 DHFR 系统,MTX 的添加步骤:10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L,筛选周期长。本研究中 MSX 只采用 25 nmol/L 一

个筛选压力,使得克隆出现的时间较短,从而缩短了筛选周期,既得到了较高的蛋白表达水平,又保证了细胞处于较好的生长状态。

本研究采用 5 L 发酵罐培养细胞,三步法纯化得到 rhVEGF₁₆₅ 蛋白,虽然纯化过程相对比较复杂,而且有一定的目的蛋白损失,但最终目的蛋白表达量可达 50 mg/L,比较适合大规模生产。同时纯化得到的重组蛋白能被人源化抗体 Avastin 识别,和 Avastin 的亲合力比大肠杆菌表达的 VEGF 高近 2 个数量级;用 HUVEC 细胞增殖实验测定活性,结果表明 CHO 表达的蛋白具有比市售的大肠杆菌表达的 VEGF₁₆₅ 更高的生物学活性。另外,CHO 表达的 rhVEGF₁₆₅ 在糖基化等方面更接近动物及人体中表达的 rhVEGF₁₆₅,在筛选抗 VEGF 的抗体药物及相关研究中具有更多的优势。

致谢:中国人民解放军军事医学科学院孙志伟教授提供 VEGF cDNA。

REFERENCES

- [1] Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial factors. *Mol Divers*, 2006, 10(4): 515-527.
- [2] Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(12): 1542-1547.
- [3] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*, 2002, 29(6): 10-14.
- [4] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-676.
- [5] Freedman SB. Clinical trials of gene therapy for atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 2002, 13(6): 653-661.
- [6] Henry TD, Annex BH, Mckendall GR, et al. The VIVA trials: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation*, 2003, 107: 1359-1365.
- [7] Kastrop J, Jorgensen E, Rück A, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A₁₆₅ gene therapy in patients with stable severe

- angina pectoris. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(7): 982–988.
- [8] Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*, 1994, 90(5 Pt 2): II228–II234.
- [9] Fiebich BL, Jäger B, Schollmann C, et al. Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells. *Eur J Biochem*, 1993, 211(1/2): 19–26.
- [10] Siemeister G, Schnurr B, Mohrs K, et al. Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 222: 249–255.
- [11] Yang R, Bunting S, Ko A, et al. Substantially attenuated hemodynamic responses to *Escherichia coli*-derived vascular endothelial growth factor given by intravenous infusion compared with bolus injection. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284: 103–110.
- [12] Gu H, Cai ZL, Chen SP, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in mammalian cell. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1999, 20(10): 777–779.
- 顾洪, 蔡在龙, 陈少萍, 等. 血管内皮细胞生长因子在哺乳动物细胞的表达. *第二军医大学学报*, 1999, 20(10): 777–779.
- [13] Zeng JB, Hong M, Zhou JW. Expression of VEGF165 in mammalian cells. *Chin J Immunol*, 2002, 18(3): 165–168.
- 曾际斌, 洪敏, 周家文. 血管内皮生长因子在哺乳动物细胞中的表达. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(3): 165–168.
- [14] Seong-Baek L, Park JS, Lee S, et al. Overproduction of recombinant human VEGF (vascular endothelial growth factor) in Chinese hamster ovary cells. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(1): 183–187.
- [15] Leunq DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, 246(4935): 1306–1309.
- [16] Bebbington CR, 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 maker. *Nat Biotechnol*, 1992, 10(2): 169–175.

JOURNALS.IM.AC.CN