

# 批次和流加培养中国仓鼠卵巢工程细胞的细胞周期相关基因转录谱分析

刘兴茂\*, 叶玲玲\*, 刘红, 李世崇, 王启伟, 吴本传, 陈昭烈

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

**摘要:** 以表达人重组尿激酶原中国仓鼠卵巢 (CHO) 工程细胞系 11G-S 为研究对象, 运用基因芯片技术比较了 CHO 工程细胞在批次及流加培养不同生长阶段基因表达水平的差异, 在此基础上采用 Genmapp 软件, 同时结合已知的细胞周期信号通路图, 着重分析了批次及流加培养 CHO 工程细胞的细胞周期调控基因转录谱差异。在基因芯片涉及的 19 191 个目标基因中, 批次和流加培养不同生长阶段 CHO 工程细胞的下调表达的基因数量多于上调表达基因数目; 两种培养模式下的基因差异表达有着明显的不同, 尤其是在细胞生长的衰退期, 流加培养 CHO 工程细胞中下调表达的基因数量明显多于批次培养。有关调控细胞周期关键基因的转录谱分析表明, CHO 工程细胞主要是通过下调表达 CDKs、Cyclin 及 CKI 家族中的 *Cdk6*、*Cdk2*、*Cdc2a*、*Ccne1*、*Ccne2* 基因及上调表达 *Smad4* 基因, 来达到调控细胞增殖及维持自身活力的目的。

**关键词:** 中国仓鼠卵巢工程细胞, 细胞培养, 细胞周期, 基因, 转录谱

## Analysis of the transcriptional profiling of cell cycle regulatory networks of recombinant Chinese hamster ovary cells in batch and fed-batch cultures

Xingmao Liu\*, Lingling Ye\*, Hong Liu, Shichong Li, Qiwei Wang, Benchuan Wu, and Zhaolie Chen

*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*

**Abstract:** In the light of Chinese hamster ovary (CHO) cell line 11G-S expressing human recombinant pro-urokinase, the differences of gene expression levels of the cells in different growth phases in both batch and fed-batch cultures were revealed by using gene chip technology. Then, based on the known cell cycle regulatory networks, the transcriptional profiling of the cell cycle regulatory networks of the cells in batch and fed-batch cultures was analyzed by using Genmapp software. Among the

**Received:** October 25, 2010; **Accepted:** January 21, 2011

**Supported by:** National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2009ZX09503-011).

**Corresponding author:** Zhaolie Chen. E-mail: chenlz23@sina.com

\*These author contributed equally to this study.

“重大新药创制”科技重大专项资助课题 (No. 2009ZX09503-011) 资助。

approximate 19 191 target genes in gene chip, the number of down-regulated genes was more than those of up-regulated genes of the cells in both batch and fed-batch cultures. The number of down-regulated genes of the cells in the recession phase in fed-batch culture was much more than that of the cells in batch culture. Comparative transcriptional analysis of the key cell cycle regulatory genes of the cells in both culture modes indicated that the cell proliferation and cell viability of the cells in both batch and fed-batch cultures were mainly regulated through down-regulating *Cdk6*, *Cdk2*, *Cdc2a*, *Ccne1*, *Ccne2* genes of CDKs, Cyclin and CKI family and up-regulating *Smad4* gene.

**Keywords:** recombinant CHO cells, cell culture, cell cycle, gene, transcriptional profiling

应用全基因表达谱芯片考察哺乳动物细胞在培养过程中的基因表达谱, 不仅可以反映调控细胞生长、代谢、增殖、凋亡的相关信号通路的关键基因表达状态, 而且可以揭示细胞生长代谢动力学变化的内在原因, 为细胞培养过程的优化控制提供理论依据<sup>[1-4]</sup>。近年来, 随着基因组学和蛋白组学研究的拓展和深入, DNA 芯片技术及蛋白组芯片技术越来越广泛地用于考察哺乳动物细胞自身及其在不同细胞培养工艺条件下的基因表达差异<sup>[5-8]</sup>。

批次培养和流加培养是哺乳动物细胞大规模培养技术体系中的两种最为常用的操作模式<sup>[9-10]</sup>。批次培养和流加培养过程中营养成分耗竭和代谢产物积累等环境因素的变化, 必将影响到细胞周期调控基因的表达, 进而对培养细胞的生长密度和细胞表达产物的生产效率产生负面影响<sup>[11]</sup>。基于此, 本研究以表达人重组尿激酶原 CHO 工程细胞系 11G-S 为研究对象, 试图运用基因芯片技术揭示 CHO 工程细胞在批次培养及流加培养不同生长阶段参与细胞周期调控相关基因的表达谱及调控细胞增殖相关信号通路的关键基因的表达状态, 为探寻进一步提高细胞生长密度和细胞表达产物生产效率的可能途径提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株

表达人重组尿激酶原 CHO 工程细胞系 11G-S (由军事医学科学院生物工程研究所构建、保藏)。

#### 1.1.2 培养基

CHO 工程细胞批次培养和流加培养所用无血清培养基为添加了胰岛素、腐胺、转铁蛋白、微量元素、Pluronic F-68 及硫酸葡聚糖等成分的 DMEM/F12 (1:1, V/V)<sup>[12]</sup>。流加培养基为由葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素、维生素、无血清添加成分、无机盐及次黄嘌呤等组成的混合液。

#### 1.1.3 基因芯片

CHO 工程细胞基因表达水平分析采用安捷伦公司 (Agilent Technologies) 的小鼠全基因组表达谱芯片小鼠全基因组芯片 (Whole mouse genome microarray kit), 其性能参数见表 1。

#### 1.1.4 基因芯片分析样品

选取细胞接种时、无血清悬浮批次培养和流加培养的不同生长阶段的 CHO 工程细胞用作基因分析样品, 样品的选取和说明见表 2。

表 1 Agilent 小鼠全基因组表达谱芯片

Table 1 Specifications of Agilent whole mouse genome microarray kit

Product No.	Design ID	Array format	Genes coverage	Database source
G4122F	14868	4×44K	43379	UCSC mRNA known genes, National Institute on Aging, Genbank, Unigene, Refseq, RIKEN

表 2 用于基因芯片分析的样品

Table 2 Samples for comparative transcriptional analysis by gene chip

Sample No.	Sampling time	Sample volume	Sample ID
1	Inoculation	$\geq 10^7$ cells/mL	Control
2	3 d after inoculation	$\geq 10^7$ cells/mL	Logarithm growth phase of the cells for both batch and fed-batch cultures
3	7 d in fed-batch culture	$\geq 10^7$ cells/mL	Plateau phase of the cells in fed-batch culture
4	9 d in fed-batch culture	$\geq 10^7$ cells/mL	Recession phase of the cells in fed-batch culture
5	5 d in batch culture	$\geq 10^7$ cells/mL	Plateau phase of the cells in batch culture
6	7 d in batch culture	$\geq 10^7$ cells/mL	Recession phase of the cells in batch culture

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

CHO 工程细胞以  $3 \times 10^5$  cells/mL 接种于 100 mL 三角瓶内, 培养体积 35 mL, 培养时加入含有 5 mmol/L 谷氨酰胺、0.1% (W/V) Pluronic F-68 及 25  $\mu$ g/mL 硫酸葡聚糖的无血清培养基, 37  $^{\circ}$ C、90 r/min 悬浮培养。流加培养于接种后 72 h, 每 24 h 加入 3 mL 流加培养基。

### 1.2.2 细胞周期的检测

分别于 CHO 工程细胞批次培养 24、72、120、168 h 和流加培养 72、120、168、216 h 各取细胞约  $1 \times 10^6$  个, 用 75% 的冰乙醇固定 1 h,  $-20^{\circ}$ C 保存。流式细胞仪分析前先用 PBS 洗涤细胞, 加入 0.2 mL RNase A, 37  $^{\circ}$ C 水浴消化 30 min, 再加入 0.3 mL 碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 置暗处染色 20 min, 用流式细胞仪 (BD FACSCalibur, USA) 检测细胞周期。

### 1.2.3 样品 RNA 抽提、基因芯片杂交及分析

取约  $1 \times 10^7$  个细胞加入 1.5 mL EP 管中, 采用 Trizol 试剂盒提取 RNA。采用苯酚/氯仿层相分离法纯化总 RNA, 将提取的 RNA 保存于  $-70^{\circ}$ C 超低温冷柜保存。用 Nanodrop 分光光度计测定 RNA 在 260、280 及 230 nm 的吸收值, 以计算浓度并评估纯度。同时, 用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 的纯度及完整性。

用 cy3 荧光标记 RNA 样品, 然后利用等量的探针进行杂交, 杂交条件为 42  $^{\circ}$ C、16 h, 55  $^{\circ}$ C 洗片。采用 Agilent 扫描仪对芯片进行扫描, 读取数据, 分辨

率为 5  $\mu$ m、光电耦合装置 (Photoelectric multiplication tube, PMT) 电压 100%, 采用 Gene spring 软件进行标定处理分析, 并将样品与对比值取以 2 为底的对数, 所得数值大于或等于 1 作为基因上调的筛选标准, 所得数值小于或等于 -1 作为基因下调的筛选标准。

### 1.2.4 数据分析

根据测得的基因数据, 首先将标准化的目标基因数据导入 Genemapp 软件中, 并设定标准以界定上调或下调基因差异表达的程度, 运用已知有关小鼠细胞周期及信号通路图, 找出显著差异表达的基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 CHO 工程细胞批次和流加培养时的生长周期分布

图 1 所示为 CHO 工程细胞无血清批次培养和流加培养过程中的活细胞密度变化。培养的前 3 天, 无血清批次培养和流加培养的 CHO 工程细胞处于相同的培养条件, 细胞处于对数生长期, 活细胞密度呈现相同快速增加态势。批次培养 CHO 工程细胞于第 4 天达到  $41.5 \times 10^5$  cells/mL 的最大活细胞密度, 随后活细胞密度呈现下降趋势, 培养 10 d 后的活细胞密度减低至  $18.4 \times 10^5$  cells/mL; 流加培养 CHO 工程细胞的快速生长期持续至第 5 天, 于第 6 天达到  $78.1 \times 10^5$  cells/mL 的最大活细胞密度, 随后活细胞密度呈现下降趋势, 培养 10 d 后的活细胞密度减低至  $50.4 \times 10^5$  cells/mL (图 1)。

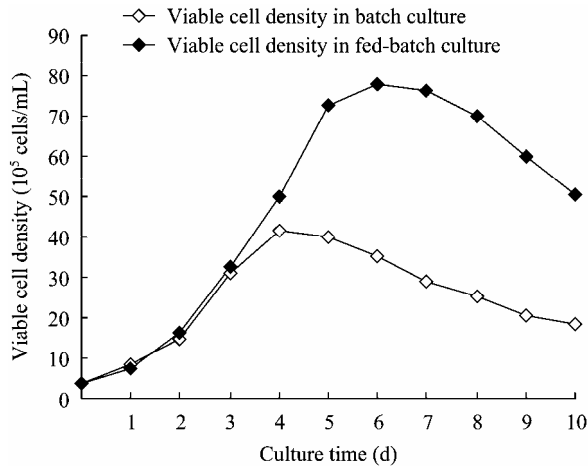


图 1 CHO 工程细胞在批次和流加培养过程中的活细胞密度变化

Fig. 1 Profile of viable cell density of the CHO cells in both batch and fed-batch cultures.

依照 CHO 工程细胞无血清批次培养和流加培养过程中的活细胞密度变化, 选取批次培养 24、72、120 和 168 h 分别代表 CHO 工程细胞批次培养的对数生长早期、对数生长晚期、平台期和衰退期; 选取流加培养 72、120、168 和 216 h 分别代表 CHO 工程细胞流加培养的对数生长中期、对数生长晚期、平台期和衰退期。批次培养的 CHO 工程细胞随培养时间延长, G1 期所占细胞比例明显升高 (图 2A); 流加培养的 CHO 工程细胞处于 G2 期的细胞比例随培养时间延长明显升高 (图 2B)。批次培养和流加培养的 CHO 工程细胞中, 处于 S 期的细胞比例均随培养进程呈现逐步下降的趋势 (图 2A, B)。CHO 工程细胞无血清批次培养和流加培养过程中的细胞周期分布变化与其各自的活细胞密度变化基本一致。

## 2.2 CHO 工程细胞样品的 RNA 的质量鉴定

图 3 为各 CHO 工程细胞样品经 RNA 抽提处理后的变性琼脂糖凝胶电泳结果, 各泳道均可见明亮的 28S 和 18S 核糖体 RNA 区带以及稍显暗淡和弥散 tRNA 和 5S 核糖体 RNA 区带, 表明各细胞样品 RNA 抽提成功。表 3 为各提取 RNA 样品的紫外分光光度计检测结果,  $OD_{260}/OD_{280}$  比值介于 1.8 到 2.0 之间,

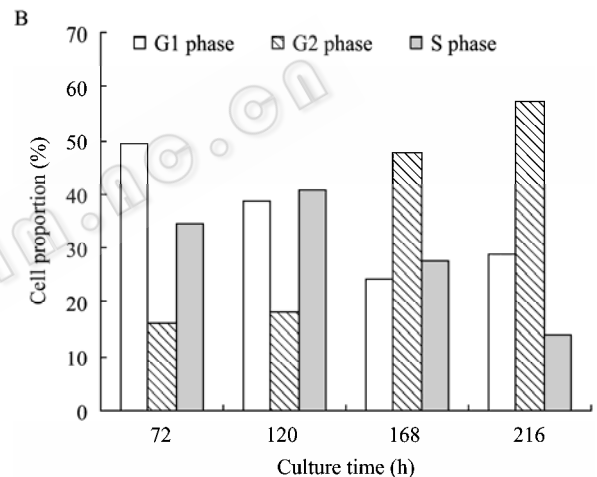
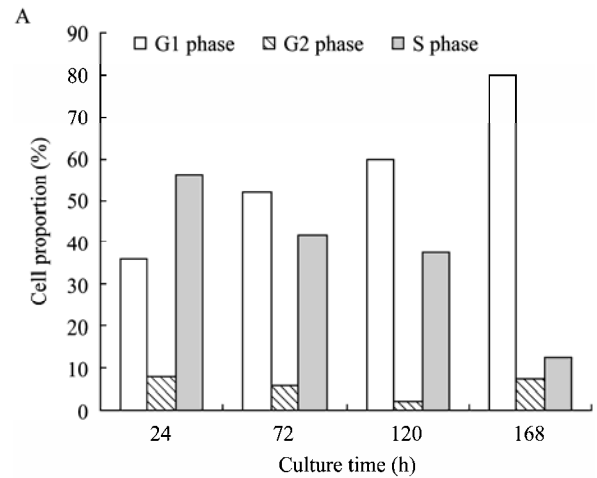


图 2 CHO 工程细胞批次培养 (A) 和流加培养 (B) 过程中不同生长阶段的细胞周期分析

Fig. 2 Cell cycle analysis of the CHO cells in different growth phase in both batch (A) and fed-batch (B) cultures.

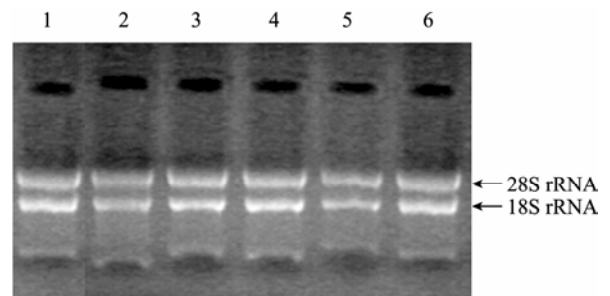


图 3 总 RNA 样品的变性琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Total RNA analysis of the CHO cells by denatured agarose electrophoresis. 1-6: total RNA of sample 1 to 6 respectively.

$OD_{260}/OD_{280}$  比值大于 1.8, 表明提取的总 RNA 样品质量完好。

### 2.3 基因芯片实验数据分析

基因芯片实验数据来自于 CHO 工程细胞批次培养及流加培养对数生长期、平台期及衰退期 3 个阶段的样品, 以培养起始接种的细胞作为对照, 其他样品的每个基因标准化值与之相比, 所得数值取以 2 为底的对数。图 4A、B 分别为 CHO 工程细胞在两种培养模式下比值大于 1 或小于 -1 及大于 2 或小于 -2 的基因上调及下调表达的差异状况。在基因芯片分析涉及的 19 191 个目标基因中, 有差异表达

的基因较多。总体而言, 下调表达的基因数量多于上调表达基因数目, 且上调表达基因其比值大多介于 1 和 2 之间, 下调表达基因其比值大多介于 -2 和 -1 之间。在细胞生长的对数期及平台期, 上调及下调表达的基因数目虽有差异, 但总体上处于相对平衡的状态, 说明细胞在较好的培养环境中, 其细胞正负调控基因的表达相对平衡; 在细胞生长的衰退期, 下调表达的基因数目明显多于上调表达的数目, 特别是显著下调表达的基因所占的比例显著升高, 说明随着培养环境的恶化, 细胞更多是以下调表达基因的方式, 来适应不断变化的培养环境及维持自

表 3 用紫外吸光法测定 RNA 浓度和纯度

Table 3 Concentration and purity of the total RNA from the CHO cells determined by ultraviolet absorption

Sample No.	$OD_{260/280}$ ratio	$OD_{260/230}$ ratio	Concentration (ng/ $\mu$ L)	Volume ( $\mu$ L)	Quantity (ng)
1	2.00	2.21	1 221.65	15	18 324.75
2	2.04	2.21	2 262.88	20	45 257.60
3	2.01	2.25	2 571.41	20	51 428.20
4	2.00	2.26	2 597.35	20	51 947.00
5	1.99	2.18	1 028.26	15	15 423.90
6	1.95	2.24	1 438.07	15	21 571.05

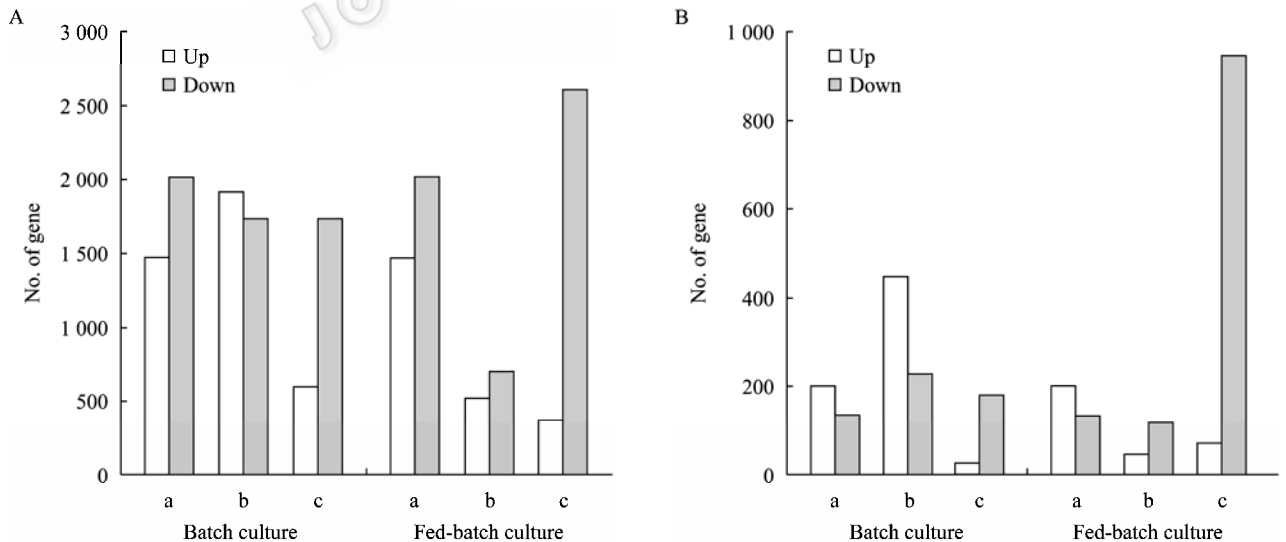


图 4 细胞无血清批培养及流加培养的基因表达差异

Fig. 4 Number of differentially regulated genes of both batch and fed-batch cultures at different cell growth phases using two different significance criteria: fold change  $\geq 1$  (A) or 2 (B) at  $P$ -value  $\leq 0.05$ . a: logarithm growth phase; b: plateau phase; c: recession phase of the cells.

身的活力。对比两种培养模式的差异表达基因的方式及数量也有着明显的差异,特别是在流加培养的衰退期,下调表达的基因数量明显多于批次培养的衰退期,提示在流加培养模式下,随着培养体系中营养物质、有毒代谢废物累积及渗透压的提高,细胞对环境的应激调控强度远远高于细胞在批次培养模式下由于少数营养物质缺乏所产生的应激调控。

#### 2.4 两种培养模式下与细胞周期相关基因表达的差异

CHO 工程细胞在批次培养和流加培养过程中,细胞周期调控基因虽然呈现基本相同的以下调表达为主的转录谱,但流加培养过程中参与细胞周期调控的上调表达基因仅为 *Smad4*,明显少于批次培养 CHO 工程细胞中的上调基因(图 5)。

在涉及细胞周期的 86 个主要基因中,批次培养对数期生长期细胞的差异表达基因包括, G1 期上调表达的 *Hdac7a* 基因及下调表达的 *Tfdp1*、*Ccne2*、*Hdac5*、*E2f5* 基因; S 期上调表达的 *Orc11* 及下调表达的 *Orc5l* 基因。细胞生长进入平台期时,有差异表达的基因明显增多,主要有 G1 期上调表达的 *Gsk3b*、*Ccnd2*、*Tfjp1*、*Hdac7a* 基因及下调表达的 *Ccne1*、*Ccne2*、*Cdk6*、*Hdac5*、*E2f5* 基因; S 期上调表达 *Trp53*、*Orc11*、*Orc21*、*Mcm2* 基因及下调表达的 *Orc5l*、*Ywhag*、*Cdc45l*、*Pcna*, M 期的基因 *Esp11*。当细胞生长进入衰退期后,上调表达的基因明显减少,上调表达的基因主要有 G1 期的 *Smad4* 及 *Hdac7a* 基因;下调表达因与平台期相比没有太大的差异,下调表达的基因主要包括 G1 期的基因 *Ccne1*、*Ccne2*、*Cdk2*、*Hdac5* 及 *E2f5*; S 期的 *Ywhag*、*Pcna*、*Cdk2*、*Cdc45l*、*Orc4l* 及 *Orc5l* 基因; G2 期的 *Cdc2a* 基因和 M 期的 *Esp11* 基因。*Hdac7a* 基因在 CHO 细胞批次培养的各阶段均上调表达, *Ccne2*、*Orc5l*、*Hdac5* 及 *E2f5* 在批次培养的各阶段均下调表达, *Ywhag*、*Pcna*、*Ccne1*、*Cdc45l* 及 *Esp11* 在批次培养的平台期及衰退期均下调表达。

细胞在流加培养模式下的流加培养阶段差异表达的基因以下调表达为主,且与批次培养模式下细

胞的平台期及衰退期差异表达的基因大体相近,上调表达的基因仅有 *Smad4* 基因。在流加培养的平台期,下调表达的基因主要有 G1 期的 *Ccne1* 及 *E2f1*, S 期的 *Ywhag*, G2 期 *Cdc2a* 及 *Plk1*, M 期的 *Esp11*; 当细胞生长进入衰退期后,差异表达的基因明显增加,并且基本上都为下调表达,仅有 G1 期的基因 *Smad4* 上调表达。下调表达的基因包括 G1 期的基因 *Ccne1*、*Ccne2*、*Hdac5*、*Tfdp1*、*Hdac7a* 及 *E2f1*, S 期的基因 *Ywhag*、*Ccnh*、*Orc5l*、*Cdc45l* 及 *Cdc7*, G2 期的基因 *Mad21l*、*Cdc2a* 及 *Plk1*, M 期的基因 *Esp11*。

### 3 讨论

细胞周期进程的实现在于有赖于各级调控因子对细胞周期精确而严密的调控。这些调控因子的核心是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (Cyclin dependent kinases, CDKs) 及其正、负性调控因子——细胞周期蛋白 (Cyclin) 和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂 (CDI)<sup>[13-14]</sup>。CDKs 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,可在特定的细胞周期被激活,之后磷酸化相应的底物,从而引起后续事件的发生。Cyclin 作为蛋白激酶复合体的调节亚基,对 CDKs 起着正性调节作用。在高等真核细胞中, Cyclin 分为 A、B、C、D、E 和 H 六类。它们分别在细胞周期的不同时相中合成、积累,并与相应的 CDKs 结合,激活 CDKs 的蛋白激酶活,从而调节细胞周期进程。同时 CDKs 的活性也可以被细胞周期抑制蛋白 (Cell cycle inhibitory proteins, CKIs) 所抑制。

从依照细胞周期调控的信号通路图分析,批次培养对数期生长期的 CHO 工程细胞,仅 Cyclin E2 发生了下调表达,其他基因表达均没有明显差异。随着细胞生长进入平台期及衰退期, CDKs、Cyclin 家族中的相应基因的数目在细胞的 G1、S 及 G2 期下调表达明显增加,主要有基因 *Cdk6*、*Cdk2*、*Cdc2a*、*Ccne1* 及 *Ccne2*,且细胞在衰退期下调表达基因多于平台期。同时 TGF2 $\beta$  信号转导途径的中心分子 *Smad4* 在批次培养 CHO 工程细胞的衰退期上

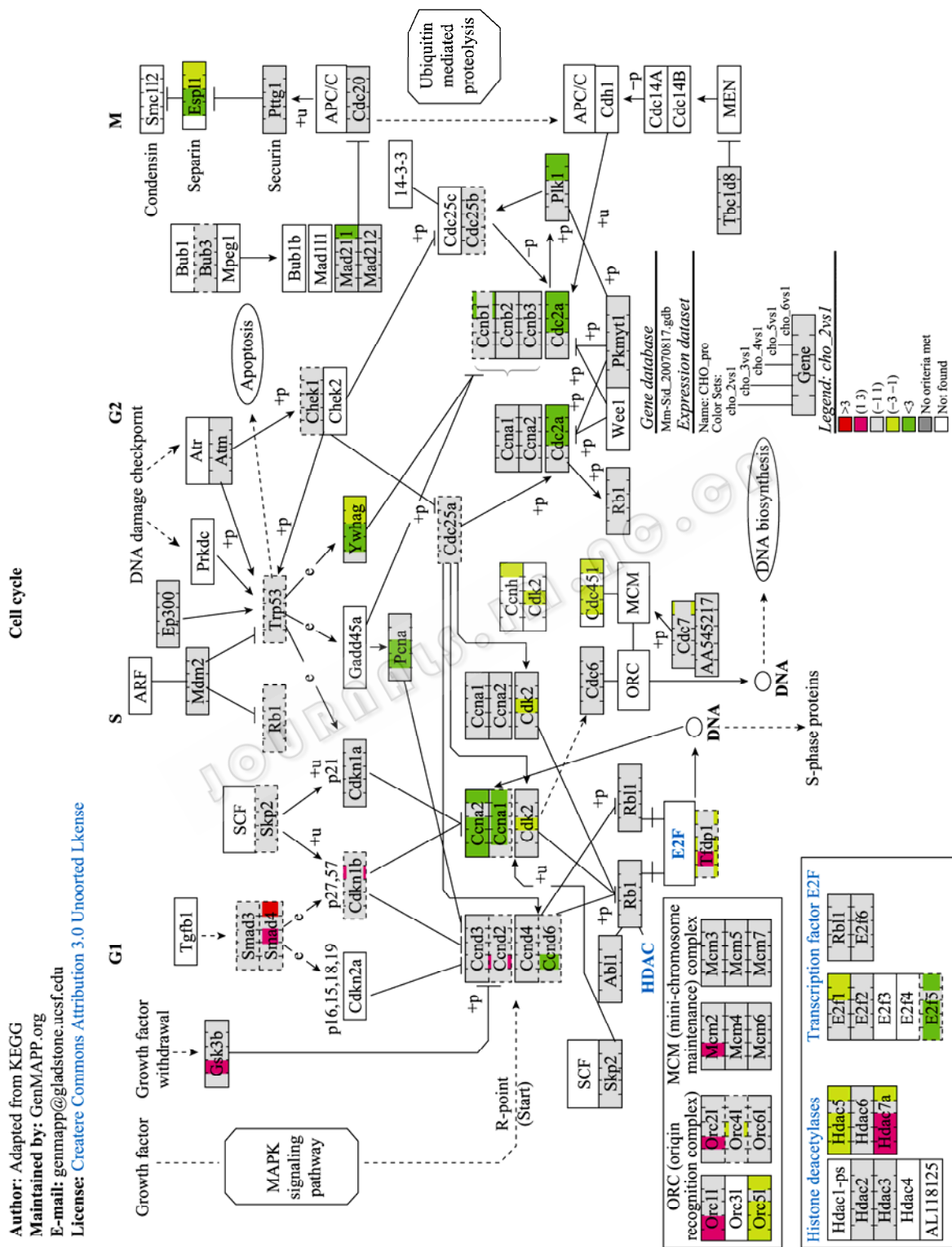


图 5 批次和流加培养中细胞的细胞周期相关基因转录谱

Fig. 5 Transcriptional profiling of cell cycle regulatory networks of cells in batch and fed-batch cultures.

调表达。研究表明, *Smad4* 的失活是引起细胞生长抑制丧失的一个重要原因<sup>[15]</sup>。批次培养 CHO 工程细胞在衰退期通过上调表达 *Smad4* 进一步抑制了细胞的生长。反映在细胞周期分布上, CHO 工程细胞在对数期 G1 期细胞所占的比例较低, S 期细胞所占的比例较高, 细胞可以快速增殖; 在进入培养的平台期及衰退期后, G1 期细胞所占的比例不断升高, S 期细胞所占的比例却逐渐降低, 大多数细胞停滞于 G1 期, 细胞生长缓慢或停止。

流加培养 CHO 工程细胞在细胞生长的平台期及衰退期, CDKs、Cyclin 及 CKI 家族中的相应基因在 G1、S 及 G2 期下调表达基因的数量逐渐增加, 且衰退期下调表达的基因多于平台期。与批次培养平台期及衰退期 CHO 工程细胞下调表达的基因数目相比, 流加培养相应阶段 CHO 工程细胞下调表达的基因少于批次培养。同时 *Smad4* 在培养衰退期也发生了上调表达, 且强度高于批次培养。表明由于导致 CHO 工程细胞在批次培养及流加培养模式下增殖减缓的原因不同, 因此在细胞周期调控基因的表达也有所差异。反映在细胞周期分布上, CHO 工程细胞在流加培养过程中, G1 期细胞所占的比例呈现出先降后升的变化趋势, S 期细胞所占的比例呈现出先升后降的变化趋势。

本研究获得的批次培养和流加培养 CHO 工程细胞的细胞周期调控基因表达谱提示, CHO 工程细胞在批次培养和流加培养过程中, 主要是通过下调表达 *CDKs*、*Cyclin* 及 CKI 家族中的 *Cdk6*、*Cdk2*、*Cdc2a*、*Ccne1*、*Ccne2* 基因及上调表达 *Smad4* 基因, 实现细胞增殖的调控。

## REFERENCES

- [1] Griffin TJ, Seth G, Xie H, et al. Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(9): 401–408.
- [2] Kantardjieff A, Nissom PM, Chuah SH, et al. Developing genomic platforms for Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 1028–1035.
- [3] Charaniya S, Karypis G, Hu WS. Mining transcriptome data for function-trait relationship of hyper productivity of recombinant antibody. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(6): 1654–1669.
- [4] Yee JC, Gerdtzen ZP, Hu WS. Comparative transcriptome analysis to unveil genes affecting recombinant protein productivity in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(1): 246–263.
- [5] Lee YY, Wong KTK, Nissom PM, et al. Transcriptional profiling of batch and fed-batch protein-free 293-HEK cultures. *Metab Eng*, 2007, 9(1): 52–67.
- [6] Wong DC, Wong KTK, Lee YY, et al. Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(2): 373–382.
- [7] Yee JC, de Leon Gatti M, Philp RJ, et al. Genomic and proteomic exploration of CHO and hybridoma cells under sodium butyrate treatment. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(5): 1186–1204.
- [8] djieff AK, Jacob NM, Yee JC, et al. Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *J Biotechnol*, 2010, 145(2): 143–159.
- [9] Merten OW. Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. *Cytotechnology*, 2006, 50(1/3): 1–7.
- [10] Whitford WG. Fed-batch mammalian cell culture in bioproduction. *BioProcess International*, 2006, 4: 30–40.
- [11] Wlaschin KF, Hu WS. Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, 2006, 101: 43–74.
- [12] Liu XM, Liu H, Ye LL, et al. Serum-free medium for suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary (11G-S) cells. *Chin J Biotech*, 2010, 26(8): 1116–1122. 刘兴茂, 刘红, 叶玲玲, 等. CHO 工程细胞 (11G-S) 悬浮培养的无血清培养基的设计. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1116–1122.
- [13] Loyer P, Trembley JH, Katona R, et al. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal*, 2005, 17(9): 1033–1051.
- [14] Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13: 261–291.
- [15] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 2002, 296(5573): 1646–1647.