

• 组织工程与细胞培养 •

代谢相关酶过表达对 CHO 细胞瞬时表达 anti-hLAG3 的影响

刘立苹, 杨昭, 沈宗毅, 喻长远

北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

刘立苹, 杨昭, 沈宗毅, 等. 代谢相关酶过表达对 CHO 细胞瞬时表达 anti-hLAG3 的影响. 生物工程学报, 2021, 37(1): 312-320.

Liu LP, Yang Z, Shen ZY, et al. Impact of metabolic enzymes overexpression on transient expression of anti-hLAG3 by CHO cells. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 312-320.

摘要: 为提高 CHO 细胞重组蛋白表达量, 对比研究了过表达代谢相关酶丙酮酸羧化酶 (PYC2)、苹果酸酶 II (MDH2)、丙氨酸转氨酶 I (ALT1)、鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC)、氨基甲酰磷酸合成酶 I (CPS I) 和代谢相关蛋白牛磺酸转运蛋白 (TAUT) 及透明颤菌血红蛋白 (VHb) 对 ExpiCHO-S 瞬时表达 anti-hLAG3 的影响。结果表明, 过表达上述 7 种蛋白均能不同程度提高抗体产量。其中, 过表达 OTC、CPSI、MDH2 和 PYC2 分别能够使 ExpiCHO-S 抗体产量提高 29.2%、27.6%、24.1% 和 20.3%。并且, 过表达 OTC 和 MDH2 能够明显提高细胞培养初期的抗体生产速率, 提前 4 d 达到与对照组相近的抗体产量。过表达 OTC 和 MDH2 对 anti-hLAG3 对抗原的亲和力基本无影响。大多数情况下, 7 种蛋白对细胞生长基本无影响。此外, 过表达 MDH2 和 ALT1 同样能够提高 H293T 细胞的抗体产量。总的来说, 代谢相关蛋白的过表达可以应用于瞬时表达系统, 提高哺乳动物细胞的抗体产量。

关键词: 代谢相关酶, CHO 细胞, 瞬时表达, anti-hLAG3, 细胞工程

Impact of metabolic enzymes overexpression on transient expression of anti-hLAG3 by CHO cells

Liping Liu, Zhao Yang, Zongyi Shen, and Changyuan Yu

College of Life Science and Technology, Beijing University of Technology, Beijing 100029, China

Abstract: To enhance recombinant protein production by CHO cells, We compared the impact of overexpression of metabolic enzymes, namely pyruvate carboxylase 2 (PYC2), malate dehydrogenase II (MDH2), alanine aminotransferase I (ALT1), ornithine transcarbamylase (OTC), carbamoyl phosphate synthetase I (CPS I), and metabolism related proteins, namely taurine transporter (TAUT) and Vitreoscilla hemoglobin (VHb), on transient expression of anti-hLAG3 by

Received: May 3, 2020; **Accepted:** July 10, 2020

Supported by: National Science and Technology Major Project during the 13th Five-Year Plan Period (No. 2019ZX09721001-007).

Corresponding author: Changyuan Yu. Tel: +86-10-64807433; E-mail: yucy@mail.buct.edu.cn

国家“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2019ZX09721001-007) 资助。

网络出版时间: 2020-11-02

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201030.1120.001.html>

ExpiCHO-S. Overexpression of these 7 proteins could differentially enhance antibody production. OTC, CPSI, MDH2, and PYC2 overexpression could improve antibody titer by 29.2%, 27.6%, 24.1%, and 20.3%, respectively. Specifically, OTC and MDH2 could obviously improve early-stage antibody production rate and the culture period was shortened by 4 days compared with that of the control. In addition, OTC and MDH2 had little impact on the affinity of anti-hLAG3. In most cases, overexpression of these proteins had little impact on the cell growth of ExpiCHO-S. MDH2 and ALT1 overexpression in H293T cells could also improve antibody production. Overall, overexpression of enzymes involved in cellular metabolism is an effective tool to improve antibody production in transient expression system.

Keywords: metabolic enzymes, CHO cells, transient expression, anti-hLAG3, cell engineering

随着人们对治疗性蛋白的需求不断提升,哺乳动物细胞的蛋白表达水平也亟待进一步提高。传统的蛋白表达方式为稳定基因表达,需要经历单克隆稳定细胞株的筛选过程,耗时耗力。由于大部分的候选重组蛋白只用于初期的研究而不能进入临床研究,因此需要更快速高效的表达方式。与传统的稳定表达方式相比,瞬时基因表达能够实现在数天内达到 g/L 级的产量,因而成为快速筛选高质量重组蛋白的表达方式的优选^[1]。

中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 作为最常用于表达治疗性蛋白的宿主细胞,与其他哺乳动物表达系统相比,具有如下突出优点: 1) 对重组蛋白进行的翻译后修饰与人类蛋白更相似; 2) 更安全因而更有可能获得监管机构对该细胞平台生产的新型治疗性蛋白的批准^[2]。虽然 CHO 细胞能够快速摄取培养基中的底物,如碳、氮源,但其对这些底物的代谢效率通常较低。并且在培养过程中会积累一些代谢中间物或代谢副产物,从而影响细胞的生长、产量以及重组蛋白的质量^[3]。为进一步提高 CHO 细胞的重组蛋白产量和质量,研究人员试图利用代谢工程方法改善 CHO 细胞的代谢。如, Fogolín 等通过在 CHO 细胞中过表达丙酮酸羧化酶 (Pyruvate carboxylase 2, PYC2), 降低了其在低温条件下乳酸的产量并提高了重组蛋白的产量^[4]。此外, Karengera 等研究了在 HEK293 细胞中过表达 PYC2 对治疗性蛋白干扰素 $\alpha 2b$ 质量的影响,发现由于过表达 PYC2 减少

了代谢副产物的产生,因而能够提升干扰素 $\alpha 2b$ 的质量^[5]。过表达苹果酸酶 II (Malate dehydrogenase II, MDH2) 也能够改善 CHO 细胞的代谢,提高胞内 ATP 和 NADH 的浓度,并提高活细胞数量^[6]。除了 PYC2 和 MDH2, 过表达丙氨酸转氨酶 1 (Alanine aminotransferase I, ALT1)、鸟氨酸转氨甲酰酶 (Ornithine transcarbamylase, OTC)、牛磺酸转运蛋白 (Taurine transporter, TAUT)、透明颤菌血红蛋白 (Vitreoscilla hemoglobin, VHb) 和氨基甲酰磷酸合成酶 I (Carbamoyl phosphate synthetase I, CPS I) 等也都被报道能够改善 CHO 细胞的代谢^[7-12]。

LAG3 (Lymphocyte activation gene 3, CD223) 为淋巴细胞激活基因,主要表达于激活型 T 细胞、NK 细胞、B 细胞以及浆细胞样 DC 细胞,是免疫负调节因子^[13]。LAG3 的表达与特异性 T 细胞的免疫负调节功能相关,抑制 LAG3 分子功能可以增强特异性 CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤作用,是一个潜在的肿瘤免疫治疗靶点。ExpiCHO-S 是一株商品化的悬浮细胞,能够实现瞬时表达 g/L 级浓度的重组蛋白,但其表达 anti-hLAG3 的表达量却较低,只能达到 0.1–0.2 g/L^[14]。为进一步提高 anti-hLAG3 的瞬时表达水平,本文通过过表达代谢相关蛋白,探究这些蛋白对 ExpiCHO-S 细胞生长和抗体表达的影响。此外,为了研究过表达这些代谢相关蛋白对抗体表达的影响是否在不同种细胞间存在差异,也探究了部分蛋白的过表达对 H293T 细胞生产抗体的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种、细胞、载体及培养基

ExpiCHO-S 细胞购于 Thermo Fisher Scientific; H293T 细胞为本实验室保存; LAG3-Relatlimab-IgG4 由本实验室合成; pCAG-Hygro 载体、pCAG-Hygro-IRES2-EGFP 载体、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 由本实验室保存。ExpiCHO-S 细胞培养及表达所用培养基为 ExpiCHO Expression Medium, 转染培养基为 Opti-MEM; H293T 细胞培养及表达所用培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM, 转染培养基为无血清 DMEM, 上述培养基均购于 Thermo Fisher Scientific。

1.2 重组表达质粒构建

Mouse MDH2、mouse ALT1、mouse TAUT、yeast PYC2、Vitreoscilla VHb、mouse CPS I 和 mouse OTC 蛋白的基因序列为其氨基酸序列 (www.uniprot.org/) 经密码子优化后由北京擎科新业生物技术有限公司合成, 具体见表 1。随后由本实验室构建其表达载体, 连接载体时所用到的酶切位点为 *Nhe* I 和 *Bam*H I, 引物信息见表 2。为检测上述蛋白在细胞中的表达情况, 在这些蛋

表 1 代谢相关酶氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequences of metabolic enzymes

Protein	Accession No.
Mouse MDH2	NP_032643.2
Mouse ALT1	NP_877957.1
Mouse TAUT	NP_033346.2
Yeast PYC2	NP_009777.1
Vitreoscilla VHb	WP_019959060.1
Mouse CPSI	NP_001074278.1
Mouse OTC	NP_032795.1

白的基因后连接 *EGFP* 作为报告基因, 之间用 IRES2 连接。

1.3 细胞转染

ExpiCHO-S 细胞的转染: 于 24 孔深孔板中每孔接种 6×10^6 cells/mL 的 ExpiCHO-S 细胞 2.5 mL。取 1.5 mL 无菌离心管, 加入 192 μ L Gibco OptiPRO SFM, 然后加入 2 μ g 质粒 DNA, 轻柔混匀后加 8 μ L ExpiFectamine CHO Reagent, 再次轻柔混匀, 立即加入准备好的细胞悬液中。LAG3-Relatlimab-IgG4 质粒 (轻重链比例为 1 : 1) 占质粒总质量的 80%。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、8% CO $_2$ 、200 r/min 的恒温振荡培养箱中培养。在转染后 18–22 h 内加入 15 μ L 增强剂和 600 μ L 补料。

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'–3')
MDH2-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGTCCGCTCTCGCCCCG
MDH2-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCACTTCATGTTCTTGACAA
ALT1-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGCCTCACAAAGGAATGA
ALT1-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCAGGAGTACTCATGAGTGA
TAUT-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGCCACCAAGGAGAAGCT
TAUT-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCACATCATGGTTTCCACGA
PYC2-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGTCCTCCTCCAAGAAGCT
PYC2-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCACTTCTTCTGGGAGGGGG
VHb-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGGACCAGCAGACCAT
VHb-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCATTCCACGGCCTGGGCGT
CPSI-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGACCCGGATCTTGACCGC
CPSI-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCAGGCAGCCTTGCCGGCGG
OTC-F	ATTTTGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGTCTAATTTGAGGAT
OTC-R	TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCAAACTTTGGCTTCTGGA

H293T 细胞的转染：在转染前一天于 6 孔板中每孔接种 1×10^6 cells/mL 的 H293T 细胞 1 mL。转染当天，取 1.5 mL 无菌离心管，加入 190 μ L 无血清 DMEM，再加入 2.5 μ g 质粒 DNA，轻柔混匀后加 7.5 μ L 1 mg/mL 的聚乙烯亚胺，再次轻柔混匀，静置 15 min 后将 DNA 复合物加入前一天准备的细胞中，将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的恒温培养箱中静置培养，24 h 后吸弃上清液并加入新鲜的含 10% FBS 的 DMEM。

1.4 流式细胞仪检测代谢相关酶在 ExpiCHO-S 细胞中的表达

取 30 μ L 转染后第 3 天的细胞悬液，300 \times g 离心 5 min 后弃上清，用无菌 PBS 洗涤 2 次，再用 50 μ L PBS 重悬细胞，用流式细胞仪检测 EGFP 的表达情况。阴性对照细胞为转染了空载体和 anti-hLAG3 轻重链的 ExpiCHO-S 细胞。

1.5 细胞密度及活率的检测

H293T 细胞在计数前吸弃上清，加入 10 mL 无菌 PBS 轻柔洗涤，再加入 2 mL 胰酶消化 1 min，最后加入 5 mL 含 10% FBS 的 DMEM，用移液管轻柔吹打，混匀，取 20 μ L 细胞悬液，加入 20 μ L 0.1% 台盼蓝，混匀，用细胞计数仪计数。ExpiCHO-S 细胞直接吸取 20 μ L 细胞悬液，加入 20 μ L 0.1% 台盼蓝，混匀，计数。

1.6 抗体浓度及亲和力检测

用 Biacore 8K 分析细胞上清中 anti-hLAG3 的浓度，检测芯片为 Series S Sensor Chip Protein-A，缓冲液为 pH 7.4 的 HBS-EP+ 溶液，再生液为 pH 2.0 的甘氨酸溶液。

Anti-hLAG3 与 hLAG3 间的亲和力测定同样采用 Biacore 8K。使用 Protein A 芯片在流速为 10 μ L/min 条件下，捕获上清中的 anti-hLAG3，并与 25、12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25 和 0 nmol/L 浓度的 hLAG3 蛋白进行动力学检测，流速为 30 μ L/min，结合和解离时间分别为 180 s 和 600 s。数据的拟合分析使用 Biacore 8K Insight

Evaluation Software 软件。得到结合常数 K_a 和解离常数 K_d ，最后通过计算得到平衡解离常数 $K_D = K_d / K_a$ 。

2 结果与分析

2.1 过表达代谢相关酶对 ExpiCHO-S 细胞活率和密度的影响

如图 1A 所示，在对照组和实验组中，转染后细胞活率均逐渐降低，由转染前的 98.57% 下降到第 3 天时的 84.06%–97.82%。随后细胞活率逐渐恢复，到第 7 天可能由于营养物质缺乏，细胞开始衰亡。由图中可以看出，过表达 OTC、MDH2、ALT1、TAUT、PYC2 和 CPSI 对 ExpiCHO-S 细胞活率的影响均较小，而过表达 VHb 则会明显降低细胞活率。除了可能会影响细胞活率外，过表达代

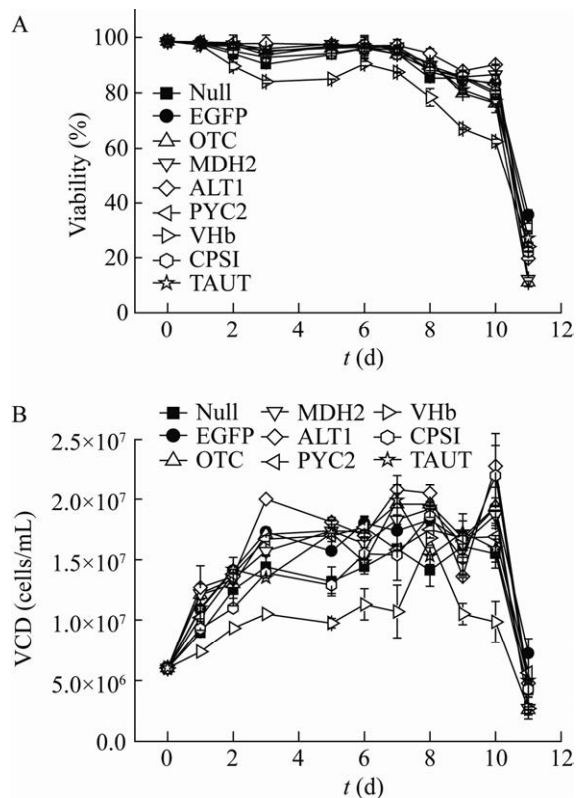


图 1 过表达代谢相关蛋白对 ExpiCHO-S 细胞密度和活率的影响

Fig. 1 Impact of metabolic proteins overexpression on the viability and viable cell density (VCD) of ExpiCHO-S cells.

谢相关酶也可能对细胞密度产生影响。如图 1B 所示, ExpiCHO-S 细胞密度在转染后的第 1 天增长较快, 随后增长速度减慢, 并在第 3 天后维持相对稳定。在第 3 天时, 对照组 (仅过表达 EGFP) 的细胞密度为 1.73×10^7 cells/mL, 过表达 ALT1 能够轻微提高 ExpiCHO-S 的细胞密度 (2.00×10^7 cells/mL), 过表达 OTC、MDH2、PYC2、TAUT 和 CPSI 对 ExpiCHO-S 的细胞密度基本无影响, 而过表达 VHb 则同样会明显降低 ExpiCHO-S 的细胞密度。总的来说, 过表达 ALT1 能够提高 ExpiCHO-S 的活细胞密度, 而过表达 VHb 能够降低 ExpiCHO-S 的细胞活率和细胞密度。过表达 OTC、MDH2、TAUT、PYC2 和 CPSI 对 ExpiCHO-S 细胞的活率和密度影响均较小。

2.2 过表达代谢相关酶对 ExpiCHO-S 抗体产量的影响

首先分析了上述 7 种蛋白表达质粒在 ExpiCHO-S 细胞中的转染情况。如图 2A 所示, 转染后第 3 天, 这些基因在细胞中的转染效率为 16.2%–45.8%, 随着培养时间延长, 转染效率逐渐降低 (图 2B)。其中, OTC、MDH2 和 VHb 三种蛋白表达质粒在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率最高, 在第 3 天时的转染效率分别为 44.5%、45.1% 和 45.8%, 到培养的第 7 天时, 转染效率分别逐渐降低到 39.4%、39.6% 和 39%。其次为 CPS I 和 ALT1 表达质粒, 其转染效率在第 3 天时分别为 41.6% 和 36.2%, 随着培养时间延长, 两种质粒的转染效率分别降低到第 7 天的 34.2% 和 28.1%。TAUT 和 PYC2 表达质粒在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率均较低, 第 3 天时的转染效率只有 20.3% 和 16.2%, 到第 7 天时, 转染效率更降低到 16.4% 和 12.4%。

进一步分析过表达上述 7 种蛋白对 ExpiCHO-S 细胞抗体分泌的影响发现, 上述 7 种蛋白均能不同程度提高细胞的抗体产量 (提高 10%–29.2%)。如图 2C, 两个对照组 (null 和 EGFP) 的抗体滴度相

差较小, 其中过表达 EGFP 后 ExpiCHO-S 细胞的抗体滴度由第 3 天的 $21.58 \mu\text{g/mL}$ 增加到第 9 天的 $79.55 \mu\text{g/mL}$ 。具体的, 过表达 OTC、CPS I、MDH2 和 PYC2 分别能够使抗体产量提高 29.2%、27.6%、24.1% 和 20.3%。有趣的是, 在第 5 天时, 相比于对照 ($43.33 \mu\text{g/mL}$), 过表达 OTC 和 MDH2 能够使抗体滴度分别提高 70.7% 和 65.1%。由于对照组和处理组的抗体滴度在第 3 天时差异不大, 因此表明过表达 OTC 和 MDH2 能够提高 ExpiCHO-S 培养前期的抗体生产速率。有趣的是, 过表达 OTC 和 MDH2 后 ExpiCHO-S 在第 5 天时的抗体滴度 ($73.98 \mu\text{g/mL}$ 和 $71.56 \mu\text{g/mL}$) 与对照组在第 9 天时的抗体滴度 ($79.55 \mu\text{g/mL}$) 相近, 表明过表达 OTC 和 MDH2 能够使培养时间缩短 4 d。另一方面, 虽然过表达 CPS I 没有明显提高 ExpiCHO-S 细胞培养前期的抗体生产速率, 但在整个培养过程中抗体的生产速率基本保持不变, 在细胞培养的中后期没有出现明显降低。除上述两种蛋白, 过表达 ALT1 也能够明显提高 ExpiCHO-S 细胞在第 5 天时的抗体滴度, 由对照组的 $43.33 \mu\text{g/mL}$ 提高到 $66.86 \mu\text{g/mL}$ 。然而, 随着培养时间延长, 抗体生产速度明显降低, 到第 9 天时的抗体滴度为 $91.39 \mu\text{g/mL}$, 相比于对照仅提高了 14.9%。过表达 TAUT 和 VHb 也能够轻微提高 ExpiCHO-S 细胞的抗体产量, 相比于对照分别提高 10% 和 13.7%。由此可见, 过表达不同蛋白对 ExpiCHO-S 细胞的抗体生产速率的影响不同。

综上, 上述 7 种代谢相关酶表达质粒在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率高低顺序为 MDH2>VHb>OTC>CPS I>ALT1>TAUT>PYC2, 对细胞抗体产量的影响强弱顺序为 OTC>CPS I>MDH2>PYC2>ALT1>VHb>TAUT。由此可以看出, 对于 7 种不同蛋白, 其表达质粒在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率与其对细胞抗体产量的影响没有很强的相关性。

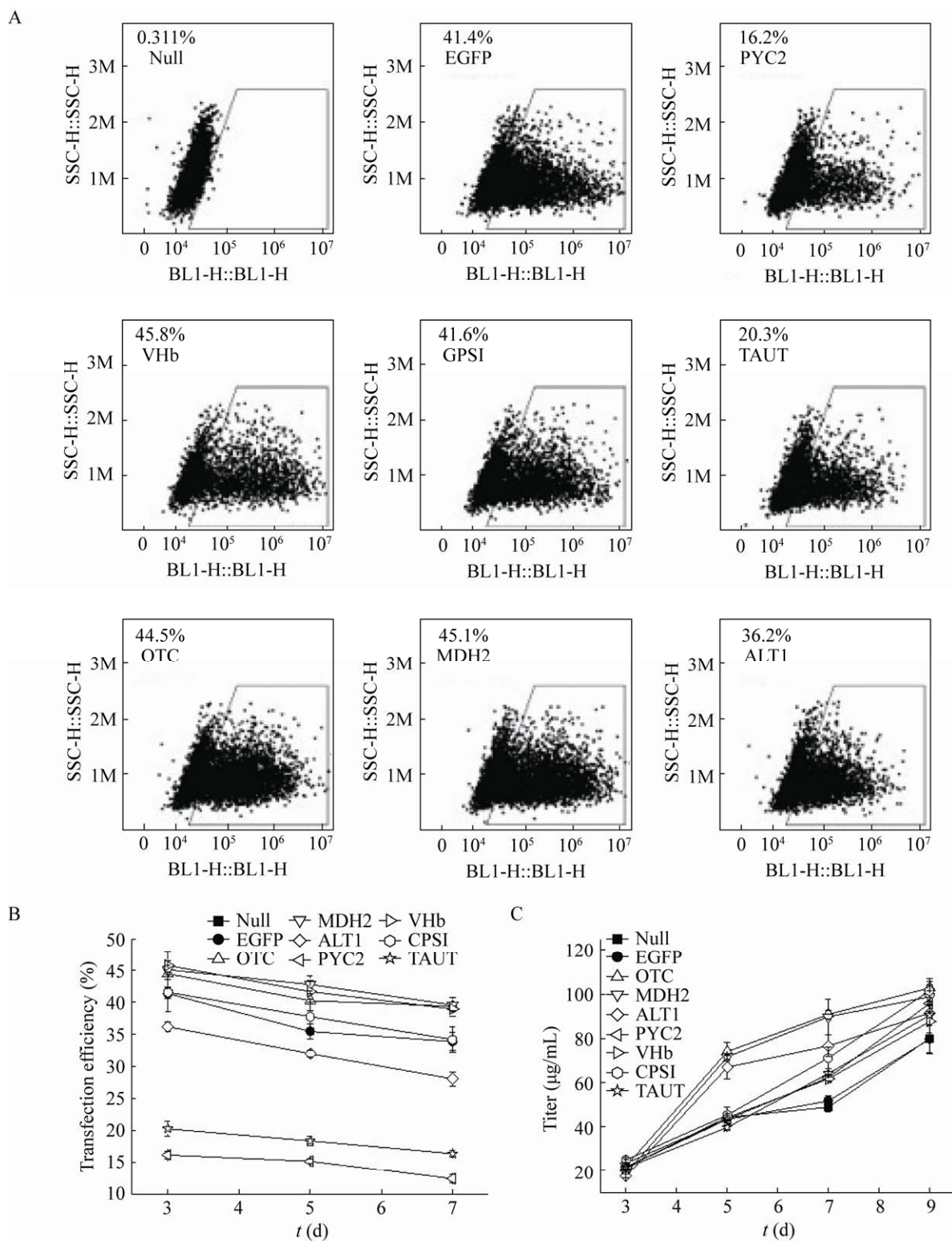


图 2 代谢相关酶对抗体产量的影响及其表达质粒在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率

Fig. 2 Impact of metabolic enzymes on antibody titer and the transfection efficiency of their expression plasmids in ExpiCHO-S cells.

2.3 过表达 OTC 和 MDH2 对 ExpiCHO-S 表达抗体亲和力的影响

除了会影响抗体的产量外,在 ExpiCHO-S 细胞中过表达代谢相关蛋白也可能会对抗体的质量产生影响。如表 3 所示,过表达 OTC 和 MDH2 后,ExpiCHO-S 细胞表达的 anti-hLAG3 对抗原的亲和力 K_D 与对照药与抗原的亲和力间的差异极小,表明过表达 OTC 和 MDH2 对 ExpiCHO-S 细胞产抗体的亲和力基本无影响。

2.4 过表达 MDH2 和 ALT1 对 H293T 细胞抗体产量的影响

为了验证代谢相关蛋白对其他类型哺乳动物细胞抗体分泌的影响,选用另一种细胞 H293T 细胞,研究这些蛋白对其抗体分泌的影响。所选蛋白为 MDH2 和 ALT1,表达的抗体同上。转染后第 3 天测定培养上清中的抗体含量并消化细胞测定细胞密度和活率,结果如表 4 所示。与对照相比,过表达 MDH2 和 ALT1 能够轻微提高 H293T 细胞的细胞活率和密度,并且抗体产量相比于对照 (21.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别提高 80.4% 和 11.1%,表明过表达 MDH2 和 ALT1 同样能够提高 H293T 细胞的抗体产量。

3 讨论

在哺乳动物细胞培养过程中通常会产生副产物乳酸,乳酸会抑制细胞生长和重组蛋白的表达^[3,15]。Fogolín 等在表达重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 的 CHO 细胞中过表达 PYC2,发现其能够降低细胞的生长速度同时减少 65% 的乳酸产生并最终使重组蛋白的产量提

高 2 倍^[4]。本研究中,在 ExpiCHO-S 细胞中过表达 PYC2 虽然对细胞生长的影响不大,但也能够提高细胞的抗体产量,由于 PYC2 能够连接糖酵解与三羧酸循环,推测 PYC2 的过表达能够提高葡萄糖的代谢效率,降低副产物如乳酸等的产生^[16]。除 PYC2 外,过表达 VHb 也被证明能够降低乳酸产生。Juárez 等研究了在 CHO-K1 细胞中过表达 VHb 对细胞代谢和生长的影响,发现过表达 VHb 可以提高细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的比生长速率并降低单个细胞的乳酸产量。用荧光显微镜观察发现 VHb 分布在胞质和细胞器上,推测其能够充当氧运载体,促进有氧代谢^[9]。在本研究中,虽然过表达 VHb 会轻微降低细胞的活率和密度,但其能轻微提高 ExpiCHO-S 的抗体产量。推测可能是由于 CHO-K1 为贴壁细胞,培养过程为静态,而 ExpiCHO-S 为悬浮细胞,培养过程为振荡培养,两种细胞的溶氧不同,VHb 可能通过其他方式影响细胞的抗体产量,但具体原因还有待进一步研究。

除乳酸外,在细胞培养过程中通常也会积累副产物氨,降低重组蛋白的产量和质量^[17]。Kim 等通过同时过表达尿素循环中的前两个酶 CPS I 和 OTC,减少了培养液中氨的积累,因而增加了细胞的生长速度,并提高了 EPO 的产量和质量^[8]。此外,Tabuchi 等在 CHO 细胞中过表达牛磺酸转运蛋白 (Taurine transporter, TAUT),发现其能够通过促进谷氨酰胺的消耗提高 CHO 细胞单克隆抗体的滴度,并减少副产物乳酸和氨的生成^[12]。随后该研究团队进一步在过表达 TAUT 的 CHO 细胞中共过表达 ALT1,发现过表达 ALT1 后细胞产生的副产物丙氨酸能够被转化为丙酮酸和谷氨

表 3 过表达 OTC 和 MDH2 对 anti-hLAG3 亲和力的影响

Table 3 Overexpression of OTC and MDH2 on the affinity and binding capacity of anti-hLAG3 expressed by ExpiCHO-S cells

Sample	K_a (1/(mol·s))	K_d (1/s)	K_D (mol)
Relatlimab	6.53E+06±0.51E+06	6.52E-04±0.10E-04	9.99E-11±0.35E-11
OTC+anti-hLAG3	8.01E+06±0.74E+06	6.57E-04±0.06E-04	8.20E-11±0.27E-11
MDH2+anti-hLAG3	7.20E+06±0.33E+06	6.03E-04±0.42E-04	8.38E-11±0.52E-11

表4 过表达MDH2和ALT1对H293T细胞anti-hLAG3产量的影响

Table 4 Overexpression of MDH2 and ALT1 on the anti-hLAG3 production of H293T cells

Sample	Viability (%)	VCD (cells/mL)	Titer ($\mu\text{g/mL}$)
Null	87.61 \pm 1.2	3.40 $\times 10^6 \pm 2.40 \times 10^5$	28.13 \pm 0.84
EGFP	84.25 \pm 0.7	2.92 $\times 10^6 \pm 3.60 \times 10^5$	21.22 \pm 1.30
MDH2	89.37 \pm 0.4	3.60 $\times 10^6 \pm 2.10 \times 10^5$	38.29 \pm 1.78
ALT1	85.46 \pm 1.4	3.20 $\times 10^6 \pm 1.80 \times 10^5$	23.58 \pm 0.66

酸, 后两者再进入 TCA 循环, 因而能够促进细胞的生长和抗体的产生^[7]。在本研究中, 分别过表达 OTC 和 CPS I 对 ExpiCHO-S 细胞生长的影响均不大, 但能够使抗体产量分别提高 29.2% 和 27.6%。由于这两种酶是尿素循环中的前两个酶, 因而其过表达可能能够加快氨的代谢, 减少氨的积累。同样, 分别过表达 TAUT 和 ALT1 也能够轻微提高 ExpiCHO-S 细胞的抗体产量, 相比于对照分别提高 10% 和 13.7%, 推测是由于 TAUT 能够促进细胞对氨基酸以及代谢物质的吸收利用, 而 ALT1 也能够催化丙氨酸的转化, 因而优化了细胞的代谢过程, 降低培养液中氨的积累。

除常见的代谢副产物乳酸和氨外, Chong 等用代谢组学分析 CHO 细胞的胞外代谢物发现苹果酸盐聚集严重, 进一步研究发现是由于细胞将培养基中的天冬氨酸转化为苹果酸盐, 但由于细胞中 MDH2 的不足, 导致苹果酸盐积累^[6]。在线粒体中, MDH2 转化苹果酸盐为草酰乙酸, 从而为细胞提供能量和还原力。在细胞中过表达 MDH2 能有效降低苹果酸盐的积累, 提高细胞中 ATP 和 NADH 的水平, 并使活细胞密度增加。有趣的是, 在本研究中, 虽然过表达 MDH2 对 ExpiCHO-S 细胞密度和活率的影响不大, 但能够明显提高 ExpiCHO-S 细胞的抗体产量。此外, 在 H293T 细胞中过表达 MDH2 能够轻微促进该细胞的生长, 同时也能大幅提高 anti-hLAG3 的产量。因此推测 MDH2 的过表达同样能够促进 ExpiCHO-S 和 H293T 细胞中苹果酸盐的聚集, 具

体原因还有待进一步试验验证。

本文首次较系统地探讨了细胞代谢相关蛋白对瞬时表达细胞 ExpiCHO-S 的细胞生长、抗体滴度和抗体质量的影响。过表达 OTC、CPSI、MDH2、PYC2、ALT1、VHb 和 TAUT 均能不同程度提高细胞的抗体滴度。此外, 过表达两种或以上蛋白组合有望进一步提高 CHO 细胞的重组蛋白生产能力。本研究表明可以利用细胞工程提高瞬时表达系统的重组蛋白生产能力。

REFERENCES

- [1] Gutiérrez-Granados S, Cervera L, Kamen AA, et al. Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38(6): 918-940.
- [2] Estes S, Melville M. Mammalian cell line developments in speed and efficiency//Zhou W, Kantardjieff A. *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013, 139: 11-33.
- [3] Pereira S, Kildegaard HF, Andersen MR. Impact of CHO metabolism on cell growth and protein production: an overview of toxic and inhibiting metabolites and nutrients. *Biotechnol J*, 2018, 13(3): 1700499.
- [4] Fogolín MB, Wagner R, Etcheverrigaray M, et al. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J Biotechnol*, 2004, 109(1/2): 179-191.
- [5] Karengera E, Robotham A, Kelly J, et al. Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant glycoprotein quality. *J Biotechnol*, 2017, 242: 73-82.
- [6] Chong WPK, Reddy SG, Yusufi FNK, et al. Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: Overexpression of malate dehydrogenase II. *J Biotechnol*, 2010, 147(2): 116-121.
- [7] Tabuchi H, Sugiyama T. Cooverexpression of alanine aminotransferase 1 in Chinese hamster ovary cells overexpressing taurine transporter

- further stimulates metabolism and enhances product yield. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(8): 2208-2215.
- [8] Kim NY, Lee YJ, Kim HJ, et al. Enhancement of erythropoietin production from Chinese hamster ovary (CHO) cells by introduction of the urea cycle enzymes, carbamoyl phosphate synthetase 1 and ornithine transcarbamylase. *J Microbiol Biotechnol*, 2004, 14(4): 844-851.
- [9] Juárez M, González-De la Rosa CH, Memún E, et al. Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells. *Biotechnol J*, 2017, 12(3): 1600438.
- [10] Park HS, Kim IH, Kim IY, et al. Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary *dhfr*-cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media. *J Biotechnol*, 2000, 81(2/3): 129-140.
- [11] Pendse GJ, Bailey JE. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen activator productivity in recombinant chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(11): 1367-1370.
- [12] Tabuchi H, Sugiyama T, Tanaka S, et al. Overexpression of taurine transporter in chinese hamster ovary cells can enhance cell viability and product yield, while promoting glutamine consumption. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(6): 998-1003.
- [13] Workman CJ, Vignali DAA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 2005, 174(2): 688-695.
- [14] Jain NK, Barkowski-Clark S, Altman R, et al. A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Prot Express Purif*, 2017, 134: 38-46.
- [15] Hartley F, Walker T, Chung V, et al. Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(8): 1890-1903.
- [16] Kim SH, Lee GM. Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(3): 659-665.
- [17] Ozturk SS, Riley MR, Palsson BO. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39(4): 418-431.

(本文责编 陈宏宇)