

中国仓鼠卵巢细胞表观遗传调控研究进展

杨露露^{1,2#}, 张淼^{1,2#}, 张玺^{1,2}, 王小引^{2,3}, 王天云^{2,3}, 贾岩龙^{1,2*}

1 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003

2 河南省重组药物蛋白表达系统国际联合实验室, 河南 新乡 453003

3 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003

杨露露, 张淼, 张玺, 王小引, 王天云, 贾岩龙. 中国仓鼠卵巢细胞表观遗传调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 149-158.

YANG Lulu, ZHANG Miao, ZHANG Xi, WANG Xiaoyin, WANG Tianyun, JIA Yanlong. Advances in epigenetic regulation of Chinese hamster ovary cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 149-158.

摘要: 中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞因其具有可悬浮培养及进行蛋白质糖基化等翻译后修饰等优势, 在生物制药重组蛋白生产方面具有不可替代的重要作用。但转基因沉默、表观遗传修饰等影响基因表达调控, 造成 CHO 细胞表达稳定性降低而导致重组蛋白产量下降。本文对 CHO 细胞中表观遗传修饰包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA 的作用研究, 以及对基因表达调控的影响进行了综述。

关键词: 中国仓鼠卵巢细胞; 表观遗传调控; DNA 甲基化; 组蛋白修饰; microRNA (miRNA)

Advances in epigenetic regulation of Chinese hamster ovary cells

YANG Lulu^{1,2#}, ZHANG Miao^{1,2#}, ZHANG Xi^{1,2}, WANG Xiaoyin^{2,3}, WANG Tianyun^{2,3}, JIA Yanlong^{1,2*}

1 School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

2 Henan International Joint Laboratory of Recombinant Pharmaceutical Protein Expression System, Xinxiang 453003, Henan, China

3 School of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

Abstract: Chinese hamster ovary (CHO) cells play an irreplaceable role in biopharmaceuticals

资助项目: 国家自然科学基金(32071468); 河南省高等学校重点科研项目(22A310009)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071468) and the Key Scientific Research Projects in Universities of Henan Province (22A310009).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: yanlongjia@xxmu.edu.cn

Received: 2022-06-10; Accepted: 2022-08-26; Published online: 2022-10-21

because the cells can be adapted to grow in suspension cultures and are capable of producing high quality biologics exhibiting human-like post-translational modifications. However, gene expression regulation such as transgene silencing and epigenetic modifications may reduce the recombinant protein production due to the decrease of expression stability of CHO cells. This paper summarized the role of epigenetic modifications in CHO cells, including DNA methylation, histone modification and miRNA, as well as their effects on gene expression regulation.

Keywords: Chinese hamster ovary (CHO) cells; epigenetic regulation; DNA methylation; histone modification; microRNA (miRNA)

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞来源于中国仓鼠(*Cricetulus griseus*),是生物制药工业生产重组蛋白(抗体)药物的首选表达系统^[1]。CHO 细胞是一种永生细胞系,最初由美国科罗拉多大学学者 PUCK 从一只成年雌性中国仓鼠卵巢中分离建株,后来陆续由研究人员筛选出多种不同表型的 CHO 细胞株,如 DUKX-B11、DG-44 和 CHO-K1 等^[2]。超过 70% 批准上市的重组药物蛋白是在 CHO 细胞中进行表达生产的,与其他表达系统相比 CHO 细胞具有以下明显优势:(1) 目的蛋白易于表达并被分泌至胞外;(2) 具有准确的翻译后修饰功能,表达的外源重组蛋白与天然蛋白生物学特性及理化性质相似;(3) 可在无蛋白、无动物源培养基中进行高密度的悬浮培养,利于工业化生产;(4) 自身分泌的内源性蛋白较少,利于重组蛋白的分离和纯化^[3]。CHO 细胞最显著的特征是其适应性,使得细胞能够在各种培养条件下生长增殖并高效表达重组蛋白。利用 CHO 细胞生产重组药物蛋白时保持细胞的稳定高效表达至关重要,但目前长期传代培养过程中仍存在重组蛋白表达失稳、甚至表达显著下降的问题,且其发生的分子机制尚未阐明。研究认为,由于基因拷贝数丢失、基因沉默等因素对基因表达调控的影响,是造成 CHO 细胞表达的不稳定性(异质性)进而导致重组蛋白产量下降的重要

原因^[4-5]。有趣的是,在哺乳动物细胞中,多个转基因拷贝的串联重复序列比单拷贝转基因更容易发生 DNA 甲基化和基因沉默^[6]。这表明,表观遗传调控很可能对重组蛋白表达具有重要影响。

表观遗传学(epigenetics)是研究在各种因素的影响下,DNA 序列不发生变化时,基因的表达出现可遗传变化的一门学科^[7],主要通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 microRNA (miRNA) 等相互作用的机制来实现。CHO 细胞的全基因表达模式的变化可能受到表观遗传调控的影响^[8],而且表型的多样化与表观遗传变化有着更为紧密的联系^[9]。就表观遗传调控方面的作用而言,重组 CHO 细胞的生产可变性可归因于表观遗传介导的目的基因表达载体启动子的不稳定性,如 DNA 甲基化是启动子不稳定的一个促成因素^[10]。另一方面,组蛋白修饰而非 DNA 甲基化与重组 CHO 细胞的生产不稳定性有关^[11]。此外,miRNA 作为一种内源性非编码小 RNA,几乎调节所有与重组蛋白表达相关的重要细胞过程(如增殖、代谢、细胞死亡、转录和蛋白质翻译修饰),可以极大地促进 CHO 细胞工程的发展。因此,本文主要对 CHO 细胞中表观遗传修饰包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA 的作用研究以及对基因表达调控的影响进行综述,以期有助于阐明影响重组蛋白表

达的表观遗传学分子机制,并最终建立新型高效稳定表达的 CHO 细胞表达系统。

1 DNA 甲基化

1.1 DNA 甲基化及其调控作用

DNA 甲基化(DNA methylation)是在 DNA 的胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)二核苷酸中 C 上添加甲基,从而抑制基因的表达或引发基因沉默。催化这一过程的酶称之为 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT),主要有 4 种: DNMT1 和从头甲基转移酶 DNMT3A、DNMT3B 以及 DNMT3L^[12]。DNA 甲基化修饰反应主要发生在 CpG 岛二核苷酸胞嘧啶的 5 号碳原子(C5)上, CpG 岛是基因中 C 和 G 大量存在的二核苷酸重复序列,可以对基因表达产生显著的调节作用^[13];基因启动子中 CpG 岛密度越高,其 DNA 甲基化程度越高对其转录水平的抑制就越强^[14]。

DNA 甲基化可以通过多种方式调控基因表达: (1) 发生甲基化的 DNA 与转录因子结合发生障碍,从而抑制转录过程而干扰基因表达。(2) 甲基 CpG 结合蛋白对基因表达的抑制或沉默。甲基 CpG 结合蛋白是特异性转录抑制物,并以蛋白复合体的形式发挥作用。(3) DNA 甲基化引起染色质结构改变,抑制基因表达。另外, DNA 甲基化会阻止转录因子的进入从而诱导染色质失活,抑制染色质活化^[15]。

1.2 DNA 甲基化对 CHO 细胞的影响

在利用哺乳动物细胞进行重组蛋白的工业化生产中,最重要的问题之一是细胞系表达不稳定的现象,即生产细胞系特异性生产力(specific productivity, qP)的损失。在所有重组 CHO 细胞系^[16]以及使用谷氨酰胺合成酶(GS)^[17]和二氢叶酸还原酶(DHFR)基因表达系统^[18]中,随着传代过程皆观察到细胞 qP 失稳

的现象。在随机整合过程中,由于转基因拷贝数的细胞间差异和转基因整合位点的表观遗传特性,产生了具有广泛 qP 差异的异质细胞池(cell pools),但细胞系这种重组蛋白表达不稳定的潜在原因(遗传和环境因素)以及确切的分子机制尚仍未阐明。

在 CHO 细胞增殖和传代过程中,除了重组蛋白基因拷贝丢失外,表观遗传中的 DNA 甲基化导致驱动目的基因转录的人类巨细胞病毒主要即刻早期启动子和增强子(human cytomegalovirus major immediate early promoter/enhancer, hCMV-MIE),转录沉默也是 CHO 细胞产生一系列不稳定因素的重要原因^[19]。CMV 启动子的从头甲基化导致 CHO 细胞中转基因表达减少,这些沉默事件通常伴随着 CG 二核苷酸的启动子甲基化^[20]和组蛋白抑制修饰的积累^[21]。CpG 被 DNMT 甲基化的过程通过破坏转录因子的结合直接抑制转录激活从而沉默基因^[22],甲基化的 CpG 位点还可以相互作用并招募抑制基因表达的蛋白质^[23]。Chusainow 等的研究表明,CHO DG44 衍生的细胞系在传代过程中失去生产力,是由于 DNA 甲基化导致了转录沉默的发生^[24]。Mariati 等也发现 CHO 细胞系中 CMV 启动子区域 CpG 位点高甲基化率增加与长期培养的生产率下降之间存在相关性^[25]。研究证实,通过减少启动子中的 CpG 岛而使转基因对甲基化不敏感有利于重组蛋白的高效和持续表达^[26-27]。例如,利用 DNA 甲基化抑制剂处理 CHO 细胞能够部分增加重组蛋白的表达量^[28]。本团队建立的 DNMT3A 缺陷型 CHO 细胞系能够显著提高由 CMV 启动子驱动的重组目的蛋白的长期表达稳定性,并降低启动子区域 CpG 岛的甲基化率^[29]。与 DNA 甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理相比, DNMT3A 缺陷型 CHO 细胞系表现出更好地提

高重组蛋白表达水平和维持其表达稳定性的能力^[30]。因此,深入研究 DNA 甲基化对转基因表达的影响及其机制将有助于筛选获得高产稳产的重组 CHO 细胞系。

延长因子-1 α (elongation factor, EF-1 α)是一个高表达的管家基因^[31]。人类真核翻译延长因子 1 α 1 (human eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, eEF1 α 1)启动子也常作为 CHO 细胞中抗体表达载体的一部分。对 eEF1 α 1 上的 DNA 甲基化和染色质修饰的研究发现, DNA 甲基化影响基因的高水平表达^[32]。从 CHO 细胞中分离的中国仓鼠 EF-1 α (Chinese hamster EF-1 α , CHEF1 α)启动子和侧翼表达增强元件已被用来驱动异源蛋白在 CHO 细胞中的表达^[33]。CHEF1 作为管家基因,表观遗传调控可能与 CMV 启动子调控存在显著差异。PATEL 等指出, CHEF1 亚硫酸氢盐测序数据显示,在所有分析的克隆和亚克隆中,目的基因 CpG 岛存在差异甲基化。高度不稳定的亚克隆显示出最高水平的甲基化,在稳定性研究过程中甲基化水平增加,通常伴随着生产力的下降,这些甲基化数据表明目的基因甲基化和基因沉默(qP 丢失)之间可能存在相关性^[34],因此关于基因表达载体的重新设计从而降低甲基化已成为人们关注的焦点。

2 组蛋白修饰

2.1 组蛋白修饰及其调控作用

组蛋白是一类小分子碱性蛋白质,主要分为 5 种: H1、H2A、H2B、H3、H4。组蛋白 N 端的翻译后修饰(posttranslational modification, PTM)包括甲基化、乙酰化、泛素化和磷酸化^[35-36],这些修饰会影响染色质的构型、转录过程和其他以染色质为基础的生理过程。

组蛋白甲基化由组蛋白甲基转移酶(histone

methyltransferase, HMT)催化,通常发生于赖氨酸和精氨酸残基上,可分为单甲基化、双甲基化和三甲基化(分别为 me1、me2 和 me3)。组蛋白甲基化的位点不同、甲基化程度不同,可表现出不同的效应^[37],去甲基化由组蛋白去甲基酶(histone demethylases, HDM)调控。组蛋白乙酰化通过在组蛋白尾部赖氨酸中加入乙酰基改变染色质纤维,从而增加 DNA 的可及性进而促进转录^[38],主要由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)调控^[39],分别介导组蛋白的高乙酰化和低乙酰化。核心组蛋白尾部赖氨酸残基的高乙酰化促进有利于转录的染色质改变,而组蛋白的低乙酰化促进基因沉默或抑制^[40]。泛素化修饰是真核生物细胞内重要的翻译后修饰类型,对细胞维持正常生命活动具有重要意义,分为单泛素化修饰和多聚泛素化修饰。泛素化修饰广泛参与 DNA 复制转录、细胞周期与凋亡等诸多生理过程^[41]。组蛋白磷酸化通过蛋白质磷酸激酶将 ATP 的磷酸基转移到组蛋白特定氨基酸上,磷酸化参与广泛的细胞过程,包括基因表达、细胞周期调节等,可影响染色质的结构和功能^[42]。

2.2 组蛋白修饰对 CHO 细胞的影响

在转基因表达建立在基因扩增基础上的 CHO 细胞克隆中,通常认为在多拷贝整合中转基因的 DNA 甲基化与表达缺失有关。然而,在 CHO-K1 细胞的随机染色体位点研究了 100 多个带有单拷贝转基因的克隆鉴定出高度的克隆间异质性和克隆内异质性后发现,这些表达的改变以及表达的完全丧失与 DNA 甲基化的调节无关,而组蛋白修饰是造成异质性的原因^[11]。在大多数细胞克隆中,克隆生成早期阶段的表观遗传沉默是由组蛋白修饰控制的。组蛋白赖氨酸甲基化的显著位点 H3K4、H3K9、H3K27、

H3K36、H3K79 和 H4K20 在染色体上的位置和功能不同。甲基化的 H3K4 (H3K4me2/3)是活性染色质的特征,在活性基因的转录起始位点(transcription start sites, TSSs)上特别富集^[43],在 CHO 细胞的转基因 TSSs 周围维持 20 代以上的 H3K4 三甲基化(转录活性染色质的标志)水平后,可以延长抗体的高产期^[44]; H3K27me3 通常被视为转录抑制的标志,然而最近的一项全基因组芯片测序研究发现了不同的 H3K27me3 富集模式,并产生了不同的调控结果^[45]。CpG 甲基化可引起连锁基因的稳态转录抑制,然而在许多情况下,无活性 CpG 启动子与 H3K27me3 相关,而非 DNA 甲基化; H3K9me3 是组成型异染色质的组成标记^[46],在维持 DNA 甲基化方面发挥重要作用。H3K9me3 和 H3K27me3 存在于沉默基因的启动子区域,从头 DNA 甲基化需要先沉积 H3K9me3 或 H3K27me3,并且只有 H3K27me3 预先标记的启动子导致长期抑制^[47]。本团队在 CHO 细胞中利用 shRNA 敲低 H3K9 甲基化相关的组蛋白甲基转移酶基因的表达则可以显著增加多种重组目的蛋白的表达水平(结果未发表)。

组蛋白的乙酰化与激活转录的基因有关,组蛋白 3 的 4、9、14、18、23 和 27 位以及组蛋白 4 的 5、8、12 和 16 位赖氨酸残基是乙酰化的主要部位。组蛋白乙酰化程度可由组蛋白乙酰化抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)调节。通过使用 HDACi 丁酸钠(VPA)和丙戊酸(NaB)处理可以增加 CHO 克隆中的转基因表达^[48]。hCMV-MIE 附近的 H3 高度乙酰化的细胞系与其他细胞系相比,不易发生转基因沉默。当 CHO 细胞 CMV 启动子区域呈现高乙酰化时,细胞表现出更高的生产稳定性。Veith 等^[32]的研究发现,在长期培养过程中重组 CHO 细胞系具有不同的整合位点和转基因拷

贝数,每个 CHO 细胞系都显示出与重组 mRNA 表达相关的表观遗传特征或染色质标记,重组蛋白 mRNA 表达最高的细胞系以组蛋白修饰 H3K9ac 的富集为显著标志。有报道称,当 HDAC5 (组蛋白去乙酰酶)被特异的 miRNA 下调时,组蛋白 H3 的乙酰化水平增加,CHO 细胞的重组蛋白表达量也随之提高^[49]。在 CHO 细胞中除了 hCMV-MIE 以外,其他类型的强启动子也常用于重组基因的表达,如 SV40 早期启动子(simian vacuolating virus 40 early promoter, SV40E)和 CHO EF1 α 基因启动子,然而这些启动子在 CHO 中也表现出了重组基因表达的显著不稳定性。例如,在一个不稳定的 CHO 细胞系中,SV40E 处存在组蛋白 H3 的低乙酰化^[50],因此这些研究表明,启动子组蛋白 H3 的乙酰化可能不仅是维持稳定生产力的因素之一,而且也是活性启动子的标志^[51]。芯片分析显示,整合在不稳定富集 CpG 克隆染色体上的载体富含 5-甲基胞嘧啶和 H3K9 三甲基化,缺失 H3K9 乙酰化。与 DNMT 抑制剂相比,使用 HDACi 处理不稳定克隆也能显著改善重组蛋白的表达,并且单独阻止 CpG 甲基化并不能阻止基因逐渐沉默,因为组蛋白修饰的发生仍旧抑制重组基因的表达。

总之,组蛋白修饰通过 2 种主要机制发挥作用:第一种是直接影响染色质整体结构的修饰,第二种涉及修饰调节效应器分子的结合。同时,组蛋白修饰同样与其他 DNA 过程的调控有关,如 DNA 修复、复制和重组。为了使基因表达与发育或生理功能需要保持一致,表观遗传调节因子通过短期内的组蛋白修饰发挥核心作用,这些修饰导致染色质构象发生变化,从而改变染色质的可及性控制基因转录,激活或抑制转录^[52]。此外,转录和转录后基因调控与其他因子相互作用的非编码 RNA 迅速增加,充

当染色质修饰物的信号、诱饵、引导和支架。这些复杂的转录动态共同导致了确定的基因表达模式、蛋白质组和代谢物图谱，这些图谱决定了表型和细胞存活。

3 miRNA 对 CHO 细胞的影响

CHO 细胞改造主要分为：基因工程，通过使用强大的启动子或增强子来生产重组蛋白^[53]；基因组编辑，是一种可以在基因组水平上对 DNA 序列进行改造的基因工程技术^[54]，虽然基于 TALEN、ZFN 和 CRISPER/Cas9 的基因组编辑技术效果良好^[55]，然而在单个基因的操作不足以获得所需表型的细胞，而需要编辑数个基因来获得具有改进表型的细胞的情况下，通过使用 miRNA 对宿主细胞进行修饰愈发引起关注。

宿主细胞中 miRNA 的上调或下调可以通过调节细胞过程，如细胞凋亡、细胞周期、组蛋白甲基化、细胞生长等，改变重组 CHO 细胞的生产力水平^[56]。对已知的 miRNA 进行研究、微阵列和 miRNA 文库筛选是筛选合适 miRNA 的方法。二代测序(next generation sequencing, NGS)^[57]和 RNA-Seq 是寻找工程工业细胞候选 miRNA 的另一策略^[58]。

目前已有多项研究表明，miRNA 可对细胞通路进行转录后调控进而改善 CHO 细胞生产稳定性。如 Hernández Bort 等通过研究 CHOK1 细胞系的 miRNA 图谱，发现超过 100 个 miRNA 在不同生长阶段存在差异性表达^[59]。此外，Klanert 等报道了 12 种 miRNA 能积极调节多种 CHO 细胞系的生长^[60]。还有研究检测到 CHO 基因组中许多未知的 miRNA 对重组蛋白生产的积极影响，如 miR-18b-3p、miR-521-1-3p、miR-3667-5p 和 miR-3939-3p，其中 miRNA-574-3p 的稳定过表达表明，重组蛋白产量可平均增

加 30%–40%^[61]。2 042 个 miRNA 模拟物的初始筛选显示，1 015 个 miRNA 可增强 CHO 的特异性 EPO 生产力，370 个 miRNA 具有更高的容积 EPO 生产力^[62]。

通过使用 miRNA 的细胞工程策略可以改善重组蛋白的生产。在使用 VPA 处理产生单克隆抗体的 CHO 细胞系后，导致蛋白质聚集增加和 N-糖基化受损，这种糖基化变化在抗体生产过程中很重要，因为抗体 Fc 部分的半乳糖基化决定了效应器功能和药代动力学。而 miR-2861 诱导的 HDAC5 (II 类 HDAC)抑制与 VPA 对 HDAC 活性的整体抑制相比，miRNA 介导的 HDAC5 表达下调显著增加了 CHO 细胞中的容积抗体产量，且不会对细胞生长及产品质量产生负面影响，结果表明 miR-2861 介导的 HDAC 抑制优于非特异性抑制和 siRNA 介导的 HDAC5 敲除^[49]。

miRNA 可以从增殖、凋亡、转录后水平、翻译水平和细胞代谢等方面影响 CHO 细胞重组蛋白的表达。单个 miRNA 在不增加细胞翻译负担的前提下，可结合多个靶基因从而调节不同的代谢途径。并且当调节不同的有益于抗体产生的代谢通路时，可能会产生叠加效应；而当代谢途径利弊参半时，则会削弱对于重组蛋白生产的积极影响。本团队研究聚焦于探寻多个 miRNA 联合过表达对 CHO 细胞重组蛋白产量和质量的影响，进而深度挖掘 miRNA 对 CHO 细胞表达重组蛋白的影响及其作用机制^[63]。以往的研究结果有助于我们理解 miRNA 的生物发生及其在 CHO 细胞中的调控机制，这对于 miRNA 成功应用于 CHO 细胞系工程，提高细胞特异性生产力，改善重组蛋白质量具有重要意义。

4 总结与展望

生物制药产业发展潜力巨大，CHO 细胞

因其对重组蛋白正确折叠和糖基化、可悬浮培养以及不易传播人类病毒等特性而成为目前应用最为广泛的哺乳动物细胞表达系统和生物制药研发、生产的重要平台,因此利用 CHO 细胞生产重组药物蛋白时保持细胞的稳定高效表达至关重要。表观遗传学因其 DNA 序列不发生变化而影响基因的表达,从而影响 CHO 细胞的稳定性,继而影响重组蛋白的表达,代表了基因与环境之间复杂相互作用的另一层面,可能为理解 CHO 细胞表达失稳提供新的概念框架。表观遗传调控几乎存在于 CHO 细胞生长增殖的全过程,并且现有研究表明某些特定的表观遗传修饰有助于增强细胞特异性生产力及维持细胞表达稳定性。从多方面深层次了解表观遗传调控方式及相互作用,通过调节 CHO 细胞内的表观调控维持细胞特异性生产力及稳定性,发掘其影响 CHO 细胞稳定性的深层次分子机制进而建立工程化 CHO 细胞,有助于提高重组蛋白的表达,降低生物制药生产成本。因此从表观遗传调控角度阐明 CHO 细胞重组蛋白表达异质性的分子作用机制对于建立高效稳定的表达系统具有重要的理论意义和应用前景。同时,新技术的涌现如分析表观遗传变化的高通量和高敏感度芯片、优化的数据库以及分析大型数据集的计算能力,都是实现这些目标的有力工具。表观遗传学有望为我们深刻理解 CHO 细胞表达系统的稳定性及其调控机制作出重大贡献。

REFERENCES

- [1] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks 2018[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(12): 1136-1145.
- [2] BLAS M, FRANCKY A, JAMNIKAR U, GASER D, BAEBLER Š, BLEJEC A, GRUDEN K. Transcriptomic variation between different Chinese hamster ovary cell lines[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(9): 1737-1745.
- [3] RITACCO FV, WU YQ, KHETAN A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: history, key components, and optimization strategies[J]. *Biotechnology Progress*, 2018, 34(6): 1407-1426.
- [4] SHEN CC, LIN MW, NGUYEN BKT, CHANG CW, SHIH JR, NGUYEN MTT, CHANG YH, HU YC. CRISPR-Cas13d for gene knockdown and engineering of CHO cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(10): 2808-2818.
- [5] HASTINGS PJ, LUPSKI JR, ROSENBERG SM, IRA G. Mechanisms of change in gene copy number[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(8): 551-564.
- [6] LI SZ, TOLLEFSBOL TO. DNA methylation methods: global DNA methylation and methylomic analyses[J]. *Methods*, 2021, 187: 28-43.
- [7] GARCIA-MARTINEZ L, ZHANG YS, NAKATA Y, CHAN HL, MOREY L. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1786.
- [8] WEINGUNY M, KLANERT G, EISENHUT P, LEE I, TIMP W, BORTH N. Subcloning induces changes in the DNA-methylation pattern of outgrowing Chinese hamster ovary cell colonies[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(6): e2000350.
- [9] HERNANDEZ I, DHIMAN H, KLANERT G, JADHAV V, AUER N, HANSCHO M, BAUMANN M, ESTEVE-CODINA A, DABAD M, GÓMEZ J, ALIOTO T, MERKEL A, RAINERI E, HEATH S, RICO D, BORTH N. Epigenetic regulation of gene expression in Chinese *Hamster* Ovary cells in response to the changing environment of a batch culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(3): 677-692.
- [10] WEINGUNY M, EISENHUT P, KLANERT G, VIRGOLINI N, MARX N, JONSSON A, IVANSSON D, LÖVGREN A, BORTH N. Random epigenetic modulation of CHO cells by repeated knockdown of DNA methyltransferases increases population diversity and enables sorting of cells with higher production capacities[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(11): 3435-3447.
- [11] SPENCER S, GUGLIOTTA A, KOENITZER J, HAUSER H, WIRTH D. Stability of single copy transgene expression in CHOK1 cells is affected by histone modifications but not by DNA methylation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 195: 15-29.
- [12] 陈奇娜, 王斌, 郭庆, 王静, 黄伟, 王霄, 纪华. 甲

- 基化酶 DNMT3B 基因敲除的 CHO-K1 细胞系构建[J]. 昆明学院学报, 2021, 43(6): 114-119.
- CHEN QN, WANG B, GUO Q, WANG J, HUANG W, WANG X, JI H. Construction of CHO-K1 cell line with *DNMT3B* gene knockout[J]. Journal of Kunming University, 2021, 43(6): 114-119 (in Chinese).
- [13] BIRD A. The dinucleotide CG as a genomic signalling module[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 409(1): 47-53.
- [14] SCHÜBELER D. Function and information content of DNA methylation[J]. Nature, 2015, 517(7534): 321-326.
- [15] MOORE LD, LE T, FAN GP. DNA methylation and its basic function[J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1): 23-38.
- [16] DAHODWALA H, LEE KH. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 60: 128-137.
- [17] BARNES LM, BENTLEY CM, DICKSON AJ. Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant NS0 myeloma cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 85(2): 115-121.
- [18] FANN CH, GUIRGIS F, CHEN G, LAO MS, PIRET JM. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(2): 204-212.
- [19] KIM M, O'CALLAGHAN PM, DROMS KA, JAMES DC. A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(10): 2434-2446.
- [20] MARX N, DHIMAN H, SCHMIEDER V, FREIRE CM, NGUYEN LN, KLANERT G, BORTH N. Enhanced targeted DNA methylation of the CMV and endogenous promoters with dCas9-DNMT3A3L entails distinct subsequent histone modification changes in CHO cells[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 268-282.
- [21] MORITZ B, WOLTERING L, BECKER PB, GÖPFERT U. High levels of histone H3 acetylation at the CMV promoter are predictive of stable expression in Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology Progress, 2016, 32(3): 776-786.
- [22] HUGHES AL, KELLEY JR, KLOSE RJ. Understanding the interplay between CpG island-associated gene promoters and H3K4 methylation[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Gene Regulatory Mechanisms, 2020, 1863(8): 194567.
- [23] JURKOWSKA RZ, JURKOWSKI TP, JELTSCH A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases[J]. ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2011, 12(2): 206-222.
- [24] CHUSAINOW J, YANG YS, YEO JHM, TOH PC, ASVADI P, WONG NSC, YAP MGS. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer?[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(4): 1182-1196.
- [25] MARIATI, YEO JHM, KOH EYC, HO SCL, YANG YS. Insertion of core CpG island element into human CMV promoter for enhancing recombinant protein expression stability in CHO cells[J]. Biotechnology Progress, 2014, 30(3): 523-534.
- [26] HISANO M, OHTA H, NISHIMUNE Y, NOZAKI M. Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, *Tact1/Actl7b*, represses its expression in somatic cells[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(16): 4797-4804.
- [27] DALLE B, RUBIN JE, ALKAN O, SUKONNIK T, PASCERI P, YAO SY, PAWLIUK R, LEBOULCH P, ELLIS J. eGFP reporter genes silence LCR β -globin transgene expression via CpG dinucleotides[J]. Molecular Therapy, 2005, 11(4): 591-599.
- [28] YANG YS, MARIATI, CHUSAINOW J, YAP MGS. DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 147(3/4): 180-185.
- [29] JIA YL, GUO X, LU JT, WANG XY, QIU LL, WANG TY. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout for DNA methyltransferase *Dnmt3a* in CHO cells displays enhanced transgenic expression and long-term stability[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(9): 4106-4116.
- [30] WANG XY, YI DD, WANG TY, WU YF, CHAI YR, XU DH, ZHAO CP, SONG C. Enhancing expression level and stability of transgene mediated by episomal vector via buffering DNA methyltransferase in transfected CHO cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(9): 15661-15670.
- [31] WARRINGTON JA, NAIR A, MAHADEVAPPA M, TSYGANSKAYA M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes[J]. Physiological

- Genomics, 2000, 2(3): 143-147.
- [32] VEITH N, ZIEHR H, MACLEOD RAF, REAMON-BUETTNER SM. Mechanisms underlying epigenetic and transcriptional heterogeneity in Chinese hamster ovary (CHO) cell lines[J]. BMC Biotechnology, 2016, 16: 6.
- [33] RUNNING DEER J, ALLISON DS. High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene[J]. Biotechnology Progress, 2004, 20(3): 880-889.
- [34] PATEL NA, ANDERSON CR, TERKILDSEN SE, DAVIS RC, PACK LD, BHARGAVA S, CLARKE HRG. Antibody expression stability in CHO clonally derived cell lines and their subclones: role of methylation in phenotypic and epigenetic heterogeneity[J]. Biotechnology Progress, 2018, 34(3): 635-649.
- [35] HUANG H, LIN S, GARCIA BA, ZHAO YM. Quantitative proteomic analysis of histone modifications[J]. Chemical Reviews, 2015, 115(6): 2376-2418.
- [36] ZHAO Q, RANK G, TAN YT, LI HT, MORITZ RL, SIMPSON RJ, CERRUTI L, CURTIS DJ, PATEL DJ, ALLIS CD, CUNNINGHAM JM, JANE SM. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2009, 16(3): 304-311.
- [37] LI YL, CHEN X, LU C. The interplay between DNA and histone methylation: molecular mechanisms and disease implications[J]. EMBO Reports, 2021, 22(5): e51803.
- [38] SHVEDUNOVA M, AKHTAR A. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(5): 329-349.
- [39] POZIELLO A, NEBBIOSO A, STUNNENBERG HG, MARTENS JHA, CARAFA V, ALTUCCI L. Recent insights into Histone Acetyltransferase-1: biological function and involvement in pathogenesis[J]. Epigenetics, 2021, 16(8): 838-850.
- [40] 陈立伟, 胡承. 组蛋白乙酰化与糖尿病[J]. 中华糖尿病杂志, 2020, 12(12): 1053-1057.
- CHEN LW, HU C Histone acetylation and diabetes[J]. Chinese Journal of Diabetes, 2020, 12(12): 1053-1057 (in Chinese).
- [41] SHAID S, BRANDTS CH, SERVE H, DIKIC I. Ubiquitination and selective autophagy[J]. Cell Death & Differentiation, 2013, 20(1): 21-30.
- [42] M KHALIL A, WAHLESTEDT C. Epigenetic mechanisms of gene regulation during mammalian spermatogenesis[J]. Epigenetics, 2008, 3(1): 21-27.
- [43] RUTHENBURG AJ, ALLIS CD, WYSOCKA J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark[J]. Molecular Cell, 2007, 25(1): 15-30.
- [44] MATSUYAMA R, YAMANO N, KAWAMURA N, OMASA T. Lengthening of high-yield production levels of monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells by downregulation of breast cancer 1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(3): 382-389.
- [45] YOUNG MD, WILLSON TA, WAKEFIELD MJ, TROUNSON E, HILTON DJ, BLEWITT ME, OSHLACK A, MAJEWSKI IJ. ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(17): 7415-7427.
- [46] DAWSON MA, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy[J]. Cell, 2012, 150(1): 12-27.
- [47] O'GEEN H, BATES SL, CARTER SS, NISSON KA, HALMAI J, FINK KD, RHIE SK, FARNHAM PJ, SEGAL DJ. Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner[J]. Epigenetics & Chromatin, 2019, 12(1): 1-20.
- [48] MARIANI MR, CARPANETO EM, ULIVI M, ALLFREY VG, BOFFA LC. Correlation between butyrate-induced histone hyperacetylation turn-over and *c-myc* expression[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 86(2): 167-171.
- [49] FISCHER S, PAUL AJ, WAGNER A, MATHIAS S, GEISS M, SCHANDOCK F, DOMNOWSKI M, ZIMMERMANN J, HANDRICK R, HESSE F, OTTE K. MiR-2861 as novel HDAC5 inhibitor in CHO cells enhances productivity while maintaining product quality[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(10): 2142-2153.
- [50] PAREDES V, PARK JS, JEONG Y, YOON J, BAEK K. Unstable expression of recombinant antibody during long-term culture of CHO cells is accompanied by histone H3 hypoacetylation[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(7): 987-993.

- [51] WANG ZB, ZANG CZ, ROSENFELD JA, SCHONES DE, BARSKI A, CUDDAPAH S, CUI KR, ROH TY, PENG WQ, ZHANG MQ, ZHAO KJ. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome[J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(7): 897-903.
- [52] LAN F, SHI Y. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52(4): 311-322.
- [53] FISCHER S, HANDRICK R, OTTE K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1878-1896.
- [54] DOUDNA JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229-236.
- [55] AMANN T, SCHMIEDER V, FAUSTRUP KILDEGAARD H, BORTH N, ANDERSEN MR. Genetic engineering approaches to improve posttranslational modification of biopharmaceuticals in different production platforms[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(10): 2778-2796.
- [56] AMADI IM, AGRAWAL V, CHRISTIANSON T, BARDLIVING C, SHAMLOU P, LEBOWITZ JH. Inhibition of endogenous miR-23a/miR-377 in CHO cells enhances difficult-to-express recombinant lysosomal sulfatase activity[J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(3): e2974.
- [57] 么欣彤, 孙善月, 刘雅晴, 石乐明, 郑媛婷. 一种高通量自动化血浆 miRNA 文库构建方法及其跨批次性能评估[J]. *复旦学报(医学版)*, 2022, 49(3): 425-434. YAO XT, SUN SY, LIU YQ, SHI LM, ZHENG YT. A high-throughput and automated method for plasma microRNA library preparation and evaluation of its cross-batch performance[J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2022, 49(3): 425-434 (in Chinese).
- [58] INWOOD S, ABAANDOU L, BETENBAUGH M, SHILOACH J. Improved protein expression in HEK293 cells by over-expressing miR-22 and knocking-out its target gene, *HIPK1*[J]. *New Biotechnology*, 2020, 54: 28-33.
- [59] HERNÁNDEZ BORT JA, HACKL M, HÖFLMAYER H, JADHAV V, HARREITHER E, KUMAR N, ERNST W, GRILLARI J, BORTH N. Dynamic mRNA and miRNA profiling of CHO-K1 suspension cell cultures[J]. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(4): 500-515.
- [60] KLANERT G, JADHAV V, SHANMUKAM V, DIENDORFER A, KARBIENER M, SCHEIDELER M, BORT JH, GRILLARI J, HACKL M, BORTH N. A signature of 12 microRNAs is robustly associated with growth rate in a variety of CHO cell lines[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 235: 150-161.
- [61] LOH WP, LOO B, ZHOU LH, ZHANG PQ, LEE DY, YANG YS, LAM KP. Overexpression of microRNAs enhances recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(9): 1140-1151.
- [62] ŠVAB Ž, BRAGA L, GUARNACCIA C, LABIK I, HERZOG J, BARALLE M, GIACCA M, SKOKO N. High throughput miRNA screening identifies miR-574-3p hyperproductive effect in CHO cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1125.
- [63] LIU HN, DONG WH, LIN Y, ZHANG ZH, WANG TY. The effect of microRNA on the production of recombinant protein in CHO cells and its mechanism[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 832065.

(本文责编 郝丽芳)