

引用格式:刘立苹,喻长远,许立达.过表达蛋白合成与分泌相关蛋白提高 CHO 细胞 anti-hLAG3 产量[J].北京化工大学学报(自然科学版),2021,48(1):41-48.

LIU LiPing, YU ChangYuan, XU LiDa. Enhancement of anti-hLAG3 production in CHO cells by overexpression of proteins involved in protein biosynthesis and secretion[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2021, 48(1):41-48.

过表达蛋白合成与分泌相关蛋白提高 CHO 细胞 anti-hLAG3 产量

刘立苹 喻长远 许立达*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要:对比研究了过表达蛋白合成与分泌途径中的 20 种蛋白对瞬时表达细胞(ExpiCHO-S 细胞)表达 anti-hLAG3 产量的影响,考察了转录因子 XBP1s 对 ExpiCHO-S 细胞生长、抗体产量和抗体亲和力的影响。结果表明,当所研究蛋白的表达质粒与 anti-hLAG3 质粒以 1:4 的质量比共转染时, XBP1s 能够使抗体产量提高约 30%, GADD34、NFKB1z、CERT、C/EBP α 和 mTOR 的过表达则会明显降低抗体产量,其他 14 种蛋白对抗体产量的影响较小。随着 XBP1s 共转染比例的增加,其对 anti-hLAG3 生产的促进作用增强,当共转染比例提高到 60% 时,相对于共转染比例为 60% 的 EGFP,可使转染后 168 h 的抗体产量提高到 2.1 倍。此外, XBP1s 的过表达对活细胞密度和细胞活率以及抗体亲和力的影响均较小。以上结果表明 XBP1s 可作为细胞工程的一个有效靶标用于提高 CHO 细胞重组蛋白的生产性能。

关键词: XBP1s; CHO 细胞; 细胞工程; 瞬时表达; anti-hLAG3

中图分类号: R979.5; Q812 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2021.01.006

引言

自 1982 年礼来公司推出重组人胰岛素以来,生物制药在市场扩展和技术方面取得了很大进展^[1]。随着人们对治疗性蛋白市场需求的不断增加,对重组蛋白生产宿主生产能力的要求也越来越高。中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞作为最常用的哺乳动物细胞生产宿主,相比于其他细胞类型具有以下几个关键优势:1)能够在化学成分清晰的无血清培养基中高密度生长;2)不易传播人类病毒;3)能够对表达的重组蛋白进行与人类相似的翻译后修饰;4)容易产生工程化细胞克隆,该细胞克隆可对目的基因进行高效且稳定的表达^[2]。虽然

具有上述优势,但是 CHO 细胞在生长能力和蛋白表达能力方面仍有待提高。

大部分治疗性蛋白为分泌型蛋白,如单克隆抗体、干扰素 γ 、促红细胞生成素等^[3]。由于内质网在分泌途径中起着至关重要的作用,因此,不少学者研究了内质网蛋白和重组蛋白产生之间的相互关系。例如, Ku 等^[3]分别在 CHO 细胞和小鼠骨髓瘤细胞 NS0 中过表达 X 盒结合蛋白 1 的剪切形式(spliced form of X-box binding protein 1, XBP1s),研究该蛋白对这 2 种细胞分泌单克隆抗体、干扰素 γ 和促红细胞生成素的影响,结果表明,当合成重组蛋白的量超过了宿主细胞的分泌能力时, XBP1s 能够显著提高重组蛋白的产量。除了 XBP1s 外,免疫球蛋白重链结合蛋白质(immunoglobulin heavy chain binding protein, BiP)、转录激活因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)^[4]、真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)^[5]、转录激活因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)^[6]、生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 34(growth arrest and DNA dam-

收稿日期:2020-06-15

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09721001)

第一作者:女,1990 年生,博士

*通信联系人

E-mail: xuld@mail.buct.edu.cn

age inducible protein 34, GADD34)^[7]等也都在内质网的未折叠蛋白反应(UPR)中发挥重要作用。除了上述蛋白,其他一些蛋白质,如钙连蛋白(calnexin, CNX)^[8]、钙网蛋白(calreticulin, CRT)^[8]、蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)^[9]、信号识别颗粒14(signal recognition particle 14, SRP14)^[10]等也都被报道能够促进细胞的重组蛋白合成或分泌。

瞬时表达系统相对于稳定表达系统具有快速高效的优点,尤其适用于候选重组蛋白的初期研发。ExpiCHO-S细胞是一株能够适应高密度培养的悬浮细胞,被广泛用于重组蛋白的瞬时表达。LAG3(lymphocyte activation gene 3)为淋巴细胞激活基因,是一个潜在的肿瘤免疫治疗靶点。但目前用ExpiCHO-S细胞瞬时表达 anti-hLAG3 的水平较低,为了提高该抗体的表达水平,研究了过表达蛋白合成与分泌相关蛋白对 ExpiCHO-S 细胞生长和 anti-hLAG3 生产的影响,为该细胞的工程化改造提供依据,同时也为其他重组蛋白生产细胞的工程化改造提供借鉴。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

ExpiCHO-S 细胞购于 Thermo Fisher Scientific 公司;LAG3-Relatlimab-IgG4 由本实验室合成;pCAG-Hygro 载体、pCAG-Hygro-IRES2-EGFP 载体、大肠埃希菌(*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, 络合培养基为 Gibco OptiPRO SFM, 细胞转染所用试剂为 ExpiFectamine CHO 试剂,均购于 Thermo Fisher Scientific 公司;台盼蓝购于美国 Amresco 公司。

恒温震荡培养箱(ISF1-X 型,瑞士 Adolf Kuhner 公司),流式细胞仪(BD LSRFortessa 型,美国 BD 公司),实时荧光定量 PCR 仪(qRT-PCR)(ABI PRISM 7000 型,美国 ABI 公司),细胞计数仪(Countstar 型,上海睿钰生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 重组表达质粒构建

human XBP1s、human ATF6c、CHO ATF4、human E2F1、Bovine eIF2 α 、CHO GADD34、CHO NFKB1 ζ 、human C/EBP α 、human BiP、CHO CRT、CHO CNX、CHO PDI、CHO ERP57、human SLY1、human vAMP8、

human SRP14、human Munc18c、human SNAP-23、human CERT 和 human mTOR 共 20 种蛋白的基因序列由其氨基酸序列(www.uniprot.org/)经密码子优化后由北京擎科生物科技有限公司合成,随后由本实验室构建表达载体,连接载体时所用的酶切位点为 *Nhe*I 和 *Bam*H I,引物信息如表 1 所示。表达载体构建完成后通过基因测序验证其是否连接正确。

为检测上述蛋白的表达载体在细胞中的转染效率,在这些蛋白的基因后连接增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因作为报告基因,之间用 IRES2 连接,重组表达质粒图谱见图 1。

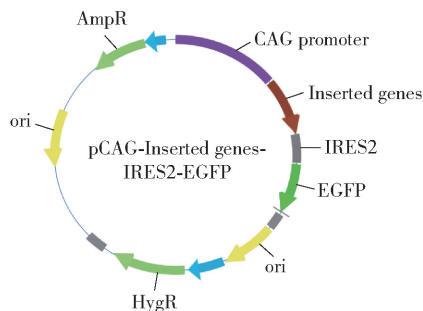


图 1 重组表达质粒图谱

Fig. 1 Recombinant expression plasmid map

1.2.2 细胞转染

于 24 孔深孔板中每孔接种 6×10^6 个/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,轻柔混匀后加入 8 μ L ExpiFectamine CHO 试剂,再次轻柔混匀,立即加入准备好的细胞悬液中。在 2 μ g 质粒 DNA 中,LAG3-Relatlimab-IgG4 质粒轻重链(1:1,质量比)共 1.6 μ g,蛋白合成与分泌相关蛋白的质粒为 0.4 μ g。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、8% CO $_2$ 、200 r/min 的恒温震荡培养箱中培养。在转染后 18~22 h 内加入 15 μ L Enhancer 和 600 μ L Feed。

1.2.3 转染效率测定

取 30 μ L 转染后培养 72 h 的细胞悬液,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,用无菌的磷酸盐缓冲液(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 pCAG-Hygro 载体和 anti-hLAG3 轻重链的 ExpiCHO-S 细胞,以及转染了 pCAG-Hygro-IRES2-EGFP 载体和 anti-hLAG3 轻重链的 ExpiCHO-S 细胞,并分别记为 Null 和 EGFP。各基因的表达载体

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'-3')
<i>XBPIs</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGCTGCTGGCCGC
<i>XBPIs</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCACACGGAGATCAGCTG
<i>ATF6c</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGGCGAGCCCCGCTG
<i>ATF6c</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCACAGCAGATGTCCTCCTCTG
<i>ATF4</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGACCGAGATGAGCTTCCT
<i>ATF4</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTACGGAACTCTCTTCTTCC
<i>E2F1</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGCCCTGGCCGGAGC
<i>E2F1</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCAAAAGTCCAGGGGGGTCAG
<i>eIF2α</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCCCGGACTGTCCTGCAG
<i>eIF2α</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCAGTCCTCTGCCTTTTGCCCTC
<i>GADD34</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGCCCCGAGCCCAAGACC
<i>GADD34</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTACCCCCGCTCCCTCCCA
<i>NFKB1z</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGATCCTGGACAAGCTGC
<i>NFKB1z</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCAGTAGGGGGGAGCCCTCT
<i>C/EBPα</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGAGTCGGCCGACTTCTA
<i>C/EBPα</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTCACGCGCACTTGCCCATGG
<i>BiP</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGAAACTCTCCCTGGTGCCCGCAT
<i>BiP</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCCTACAACATCATCTTTTCTGCT
<i>CRT</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGCTGTCCTGTGCC
<i>CRT</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCACAGTCCTCCTTGCCCTG
<i>CNX</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGAGGGGAAGTGCTGC
<i>CNX</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCACTCCCTCCTGGGCTTC
<i>PDI</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGTCCCGGTCCCTG
<i>PDI</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCACAGTTCGTCTTTCACGGCT
<i>ERP57</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCGCTTCAGCTGCCTAGC
<i>ERP57</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTAGAGGTCTCTTTGTGCCT
<i>SLY1</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGCCGTGGAGGAGATCCG
<i>SLY1</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCAGGCATCGTTGTTGGAG
<i>vAMP8</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGAGGAAGCCAGTGAAGG
<i>vAMP8</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTAAGAGAAGGCACCACTGG
<i>SRP14</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTGCTGCTGGAGTCC
<i>SRP14</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCACTGGGCTGCGGTAGCG
<i>Munc18c</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGCGCCGCCGGTGCCAGA
<i>Munc18c</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTATTCATCTTTAATTAAGG
<i>SNAP-23</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGGATAATCTGTCATCAGA
<i>SNAP-23</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTAGCTGTCAATGAGTTTCT
<i>CERT</i>	F: TTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGTCCGACAACCAGTCTCTG
<i>CERT</i>	R: CCACACTGGACTAGTGGATCCTCAGAACAGAAATTGGCTTCC
<i>mTOR</i>	F: ATTTTGGCAAAGAATTGCTAGCGCCACCATGCTTGAACCGGACCTGC
<i>mTOR</i>	R: TCCACCACACTGGACTAGTGGATCCTTACCAGAAAGGCACCAAGC

在细胞中的转染效率采用 FlowJo 7.6 分析,根据阴性对照细胞画门,再应用到所有处理细胞上,即可得到各基因的转染效率。

1.2.4 qRT-PCR 测定 *XBPIs* 转录水平

从瞬时转染后培养 48 h 的 ExpiCHO-S 细胞中

提取总 RNA,随后反转录得到 cDNA。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)作为内参进行 qRT-PCR 分析。所用试剂盒为 Power SYBR® Green PCR Master Mix Kit (美国 ABI 公司)。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *XBPIs* 的 mRNA 相对含量。引物序列如表 2 所示。

表2 qRT-PCR 所用引物
Table 2 Primers used in qRT-PCR

引物	序列(5'-3')
<i>GAPDH</i>	F:ACGGATTTGGCCGTATTGGA
<i>GAPDH</i>	R:GCCTTGACTGTGCCTTTGAA
<i>XBPIs</i>	F:ATGGTGGTGGTGGCAGCC
<i>XBPIs</i>	R:TCATTAATGGCTTCCAGCTTGG

1.2.5 活细胞密度及细胞活率检测

吸取 20 μL 细胞悬液,加入 20 μL 1 g/L 台盼蓝,混匀,用细胞计数仪测定活细胞密度和细胞活率。

1.2.6 抗体产量及亲和力检测

用 Biacore 8K 生物分子相互作用分析系统(美国 GE 公司)分析细胞上清中 anti-hLAG3 抗体的产量,检测芯片为 Protein-A,缓冲液为 pH 7.4 的 HBS-EP 溶液,再生液为 pH 2.0 的 Glycine 溶液。

Anti-hLAG3 与 hLAG3 间的亲和力测定同样采用 Biacore 8K 分析系统。使用 Protein-A 芯片在流速为 10 μL/min 的条件下,捕获上清中的 anti-hLAG3,并对 anti-hLAG3 与 25.00、12.50、6.25、3.12、1.56、0.78 nmol/L 和 0 nmol/L 浓度的 hLAG3 蛋白进行动力学检测,流速为 30 μL/min,结合和解离时间分别为 180 s 和 600 s。使用 Biacore 8K Insight Evaluation Software 软件进行数据的拟合分析,得到结合常数 K_a 和解离常数 K_d 。通过式(1)计算平衡解离常数 K_D 。

$$K_D = K_d / K_a \tag{1}$$

所有数据的测量均不少于 3 个平行,结果以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 过表达蛋白合成与分泌相关蛋白对 ExpiCHO-S 细胞的抗体产量和转染效率的影响

哺乳动物细胞的蛋白合成和分泌能力能够直接影响重组蛋白的产量。因此,通过过表达蛋白合成与分泌途径中的关键蛋白有望提高细胞的重组蛋白产量。将参与蛋白合成与分泌的 20 种蛋白的基因与 anti-hLAG3 的抗体质粒共转入 ExpiCHO-S 细胞中,检测转染后 72 h 培养物上清中抗体产量的变化。仅转染了 pCAG-Hygro-IRES2-EGFP 载体和 anti-hLAG3 轻重链的细胞上清中抗体的产量为 24.21 μg/mL。为了更直观地体现各蛋白对 ExpiCHO-S 细胞生产 anti-hLAG3 的影响,将转染

了各蛋白表达载体的细胞上清的抗体产量用相对产量(C_r)表示(式(2))。

$$C_r = C_m / 24.21 \times 100\% \tag{2}$$

式中, C_m 为实测产量(μg/mL)。

如图 2 所示,相比于 EGFP 组,过表达 XBPIs 后能够使细胞的抗体产量提高 30.56%。而过表达 GADD34、NFKB1z、CERT、C/EBPα 和 mTOR 后能够使抗体产量降低到 87.18%~71.21%。其他 14 种蛋白对 ExpiCHO-S 细胞的抗体产量的影响则较小(抗体产量的变化率 < 10%)。分析这些蛋白的表达载体在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率发现,不同基因在细胞中的转染效率差异较大,并且不同基因的转染效率的差异与这些基因对细胞抗体产量影响的差异没有明显相关性。

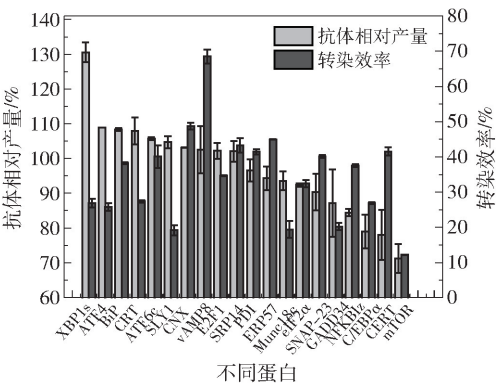


图2 过表达蛋白合成与分泌相关蛋白对 ExpiCHO-S 细胞的抗体相对产量和转染效率的影响

Fig. 2 Effect of overexpression of proteins related to protein biosynthesis and secretion on relative antibody production and transfection efficiency of ExpiCHO-S cells

2.2 过表达 XBPIs、ATF4 和 BiP 对细胞活率和活细胞密度的影响

为了进一步研究蛋白合成与分泌相关蛋白对 ExpiCHO-S 细胞生长的影响,选取对细胞抗体产量促进作用较明显的 3 种蛋白,即 XBPIs、ATF4 和 BiP,研究其对 ExpiCHO-S 细胞的细胞活率和活细胞密度的影响。

如图 3(a) 所示,在对照组(Null 和 EGFP 组)中,转染后 24 h 细胞活率有轻微降低,48 h 左右时细胞活率恢复,随后又开始降低,但在稳定后期细胞活率仍然维持在较高水平(> 90%)。与对照组相比,过表达 XBPIs 和 BiP 对细胞活率的影响均较小,细胞培养至 216 h 时细胞活率仍大于 90%;过表达 ATF4 在转染后前 192 h 对细胞活率的影响也较

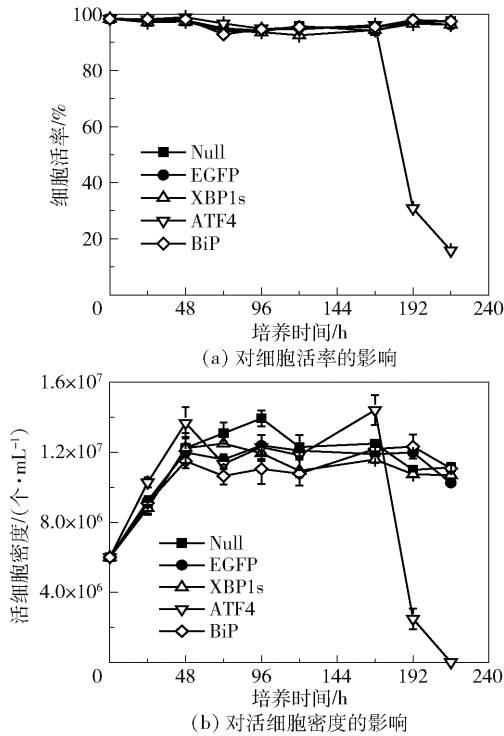


图 3 过表达 XBP1s、ATF4 和 BiP 对细胞活率和活细胞密度的影响

Fig. 3 Effects of XBP1s, ATF4 and BiP overexpression on cell viability and viable cell density

小,但当继续培养到 192 h 时,细胞活率急剧降低至 30.8%,比其他组细胞提前进入衰老期。

同样考察了过表达上述蛋白后对 ExpiCHO-S 活细胞密度的影响,如图 3(b) 所示,细胞转染后前 48 h 活细胞密度增长迅速,随后细胞生长逐渐进入稳定期,168 h 后由于营养物质的缺乏细胞逐渐进入衰老期。与对照组相比,过表达 XBP1s 和 BiP 对活细胞密度的影响较小。而过表达 ATF4 虽然能够轻微提高 ExpiCHO-S 细胞在指数期的活细胞密度(转染 48 h 后的细胞密度由 EGFP 组的 1.20×10^7 个/mL 提高到 1.37×10^7 个/mL),但可能由于营养消耗较快,转染后 192 h 时活细胞密度即急剧降低,比对照组提前进入衰老期。Gulis 等^[11]在 CHO 细胞中过表达 XBP1s,发现其在提高 IgG 产量的同时,会降低活细胞密度。Pybus 等^[12]在研究过表达 BiP 对 4 种难表达单克隆抗体的影响时也发现 10% BiP 在提高抗体表达量的同时,会轻微降低活细胞密度。而在本研究中,过表达 XBP1s 和 BiP 对 ExpiCHO-S 细胞的活细胞密度和细胞活率的影响均较小;过表达 ATF4 虽然在细胞培养前期能够轻微提高活细胞密度,但会使细胞提前进入衰老期。表明 ExpiCHO-S

细胞受蛋白的影响会随过表达蛋白种类的变化而不同。

2.3 过表达 XBP1s、ATF4 和 BiP 对转染效率和抗体产量的影响

如图 4(a) 所示,转染后 72 h, XBP1s、ATF4 和 BiP 的表达载体在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率分别为 26.9%、25.8% 和 38.2%。在 168 h 之前,随着培养时间的延长,转染效率逐渐降低。分析 3 种蛋白的过表达对抗体产量的影响发现(图 4(b)), XBP1s 能够明显提高 ExpiCHO-S 细胞的抗体产量,相比于对照组(EGFP 组),使 216 h 时的抗体产量提高了 27.4%。而在抗体生产的整个过程中,过表达 ATF4 和 BiP 对 anti-hLAG3 产量的影响均较小。

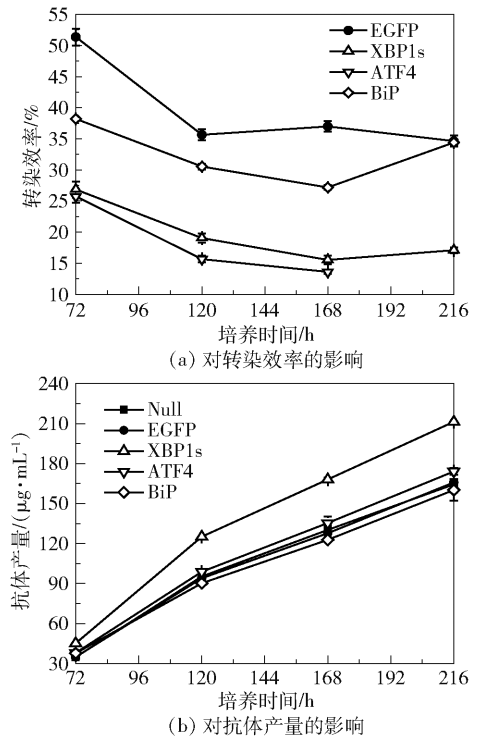


图 4 过表达 XBP1s、ATF4 和 BiP 对转染效率和抗体产量的影响

Fig. 4 Effects of XBP1s, ATF4 and BiP overexpression on transfection efficiency and antibody production

XBP1s 是内质网 UPR 中肌醇需求酶 1 (IRE1)/XBP1 信号通路的关键因子,能够诱导分子伴侣和内质网蛋白降解途径中相关蛋白的表达。因此, XBP1s 能够通过协助未折叠蛋白进行折叠并使未折叠蛋白降解而缓解内质网压力^[6]。在现有文献中, XBP1s 对哺乳动物细胞分泌重组蛋白的影响的争议较大。例如, Tigges 等^[13]研究了过表达人源 XBP1s 对 CHO-K1 细胞分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 和分

泌型 α 淀粉酶(SAMY)的影响。结果发现,XBP1s 能够使 SEAP 和 SAMY 的产量分别提高到 6 倍和 4 倍,其介导的产量增加与产物的转录水平无关,而是通过克服分泌系统的分泌瓶颈实现产量的增加。此外,该研究还发现 XBP1s 对人源细胞系,包括 HEK-293、HeLa 和 HT-1080 细胞的异源蛋白生产无影响,并且其只能增加分泌型蛋白的产量。而 Ku 等^[3]研究发现,过表达鼠源 XBP1s 对稳定表达单克隆抗体、干扰素 γ 和促红细胞生成素的 CHO 细胞的重组蛋白表达均没有显著影响,进一步研究发现只有当重组蛋白的产量达到细胞分泌上限时,过表达 XBP1s 才能够通过提高细胞分泌能力而提高蛋白产量;反之,蛋白产量则主要受转录及翻译水平调控。而在本研究中,XBP1s 能够明显提高 ExpiCHO-S 细胞瞬时表达 anti-hLAG3 的产量,表明 XBP1s 对重组蛋白产量的提高可能不受蛋白来源和分泌瓶颈的限制。

ATF4 属于转录激活因子/环状 AMP 响应元件结合蛋白(ATF/CREB)家族的碱性亮氨酸拉链转录因子,具有共有结合位点 cAMP 响应元件^[14]。ATF4 由包括缺氧/低氧、内质网应激、氨基酸剥夺和氧化应激在内的应激信号诱导。ATF4 可增强 UPR 靶基因集,包括 GADD34 和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的表达。ATF4 也被 UPR 翻译上调。Ohya 等^[6]发现,在 CHO 细胞中过表达 ATF4 能够使培养液中抗凝血酶 III 的产量提高 66.7%。而在本研究中,ATF4 对 anti-hLAG3 产量的影响较小,其原因还有待进一步研究。

BiP,也称为 GRP78,是一种内质网驻留蛋白,能够与许多不完全折叠和未组装的蛋白结合。对于许多分泌或膜结合蛋白,其与 BiP 的结合是瞬时的;而对于折叠错误、糖基化不当或其他分泌不足的蛋白质,其与 BiP 的结合可以更稳定。Pybus 等^[12]发现,在 CHO 细胞中过表达 BiP 能够提高难表达 mAb 的比生产率,但同时也会降低细胞生长速率。Dorner 等^[15]则发现降低内源性 BiP 的表达量能够提高异源蛋白的分泌。在本研究中,BiP 对 ExpiCHO-S 细胞抗体生产的影响则较小。

2.4 XBP1s 共转染比例对转染效率、XBP1s 转录水平和抗体产量的影响

通过调整瞬时转染过程中 XBP1s 表达质粒和 anti-hLAG3 表达质粒的转染比例,研究不同 XBP1s 共转染比例(以 XBP1s 表达质粒占总转染质粒的质

量分数表示,下同)对 ExpiCHO-S 细胞表达重组抗体的影响,结果见图 5。

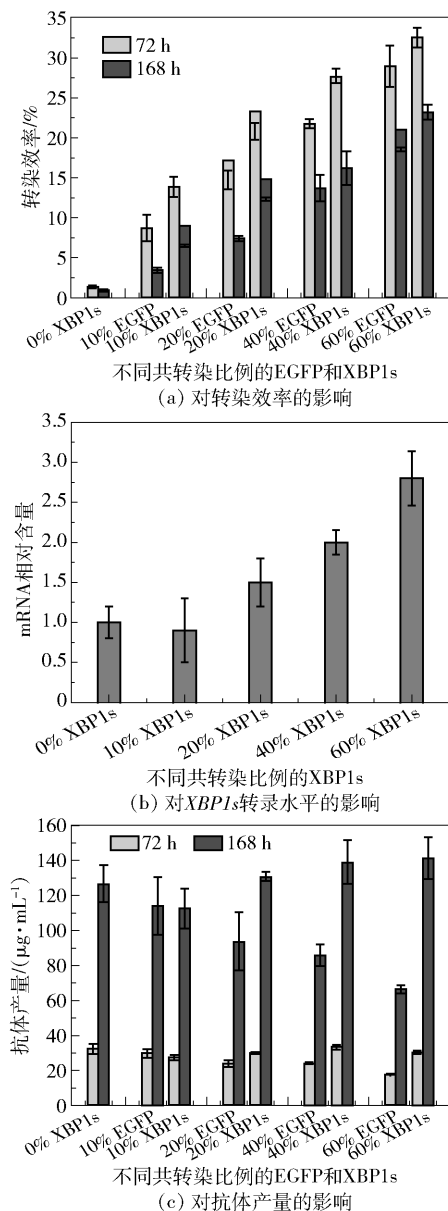


图5 XBP1s 共转染比例对转染效率、XBP1s 转录水平和抗体产量的影响

Fig. 5 Effect of XBP1s co-transfection ratio on transfection efficiency, XBP1s transcription level and antibody production

如图 5(a) 所示,随着转染过程中 XBP1s 表达质粒比例的增加,其在 ExpiCHO-S 细胞中的转染效率逐渐增加。并且在同一比例下,随着培养时间延长,XBP1s 的转染效率降低。具体地,当 XBP1s 的共转染比例由 10% 提高到 60% 时,转染后 72 h 时的转染效率由 13.85% 提高到 32.6%。通过 qRT-PCR 分析不同共转染比例的 XBP1s 在细胞中的转录水平发现

(图 5(b)),当 XBP1s 共转染比例 $\geq 20\%$ 时,随着共转染比例的增加,其在细胞中的转录水平也增加,并且相对于 XBP1s 共转染比例为 0%时,能够使 XBP1s 转录水平提高到 1.5~2.8 倍。

测定不同共转染比例的 XBP1s 对抗体产量的影响发现(图 5(c)),随着 XBP1s 转染比例的提高,相对于相同共转染比例的 EGFP,XBP1s 对细胞抗体生产的促进作用也逐渐增强。除 10% XBP1s 会轻微降低 anti-hLAG3 的抗体产量外,20%的 XBP1s 能够使 anti-hLAG3 在 168 h 时的抗体产量提高 39.6%,当 XBP1s 的共转染比例提高到 60%时,在 168 h 时的抗体产量提高到 2.1 倍,由共转染 60% EGFP 时的 66.7 $\mu\text{g/mL}$ 提高到 141.5 $\mu\text{g/mL}$ 。上述结果表明 XBP1s 在促进 CHO 细胞重组抗体生产方面有很大潜力。

2.5 过表达 XBP1s 对 anti-hLAG3 亲和力的影响

为进一步研究过表达 XBP1s 对 anti-hLAG3 抗体质量的影响,测定了 XBP1s 共转染比例为 60%时,anti-hLAG3 对 hLAG3 的亲和力变化。如表 3 所示,相比于对照药 Relatlimab,过表达 XBP1s 后 anti-hLAG3 对 hLAG3 的 K_D 值变化较小(8.40×10^{-11} vs. 9.99×10^{-11} mol/L),表明过表达 XBP1s 对 anti-hLAG3 的亲和力基本无影响。

表 3 过表达 XBP1s 对 anti-hLAG3 与 hLAG3 的亲和力的影响

Table 3 Effect of XBP1s overexpression on the affinity of anti-hLAG3 to hLAG3			
样品	$K_a/$ $10^6 (\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1})$	$K_d/$ 10^{-4} s^{-1}	$K_D/$ $10^{-11} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
Relatlimab	6.53 \pm 0.51	6.52 \pm 0.10	9.99 \pm 0.35
anti-hLAG3	7.79 \pm 0.65	6.55 \pm 0.07	8.40 \pm 0.37

3 结论

(1)对比研究了过表达 20 种参与调控蛋白合成与分泌途径的蛋白对 ExpiCHO-S 细胞表达抗体 anti-hLAG3 产量的影响,发现过表达 XBP1s 能够明显提高抗体产量。

(2)提高 XBP1s 的共转染比例能够增强其对 anti-hLAG3 表达的促进作用,当 XBP1s 的共转染比例提高到 60%时,相对于相同共转染比例的 EGFP,168 h 时的抗体产量可以提高到 2.1 倍。

(3)XBP1s 的过表达对细胞生长及抗体的亲和

力影响均较小。通过构建稳定过表达 XBP1s 的细胞株有望进一步提高该蛋白对抗体产量的促进作用。总的来说,XBP1s 有望用于提高 CHO 细胞的重组蛋白生产力。

参考文献：

[1] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(10): 992-1000.

[2] TRILL J J, SHATZMAN A R, GANGULY S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1995, 6(5): 553-560.

[3] KU S C Y, NG D T W, YAP M G S, et al. Effects of overexpression of X-Box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 99(1): 155-164.

[4] LEE K, TIRASOPHON W, SHEN X H, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response[J]. Genes & Development, 2002, 16(4): 452-466.

[5] UNDERHILL M F, COLEY C, BIRCH J R, et al. Engineering mRNA translation initiation to enhance transient gene expression in Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(1): 121-129.

[6] OHYA T, HAYASHI T, KIYAMA E, et al. Improved production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 100(2): 317-324.

[7] OMASA T, TAKAMI T, OHYA T, et al. Overexpression of GADD34 enhances production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(6): 568-573.

[8] CHUNG J Y, LIM S W, HONG Y J, et al. Effect of doxycycline-regulated calnexin and calreticulin expression on specific thrombopoietin productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 85(5): 539-546.

[9] MOHAN C, PARK S H, CHUNG J Y, et al. Effect of doxycycline-regulated protein disulfide isomerase expression on the specific productivity of recombinant CHO cells: thrombopoietin and antibody [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 98(3): 611-615.

[10] LE FOURN V, GIROD P A, BUCETA M, et al. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and

- improve therapeutic protein secretion[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 21: 91–102.
- [11] GULIS G, SIMI K C R, DE TOLEDO R R, et al. Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein[J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14(1):26.
- [12] PYBUS L P, DEAN G, WEST N R, et al. Model-directed engineering of “difficult-to-express” monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(2): 372–385.
- [13] TIGGES M, FUSSENEGGER M. Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8: 264–272.
- [14] AMERI K, HARRIS A L. Activating transcription factor 4[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40:14–21.
- [15] DORNER A J, KRANE M G, KAUFMAN R J. Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1988, 8(10): 4063–4070.

Enhancement of anti-hLAG3 production in CHO cells by overexpression of proteins involved in protein biosynthesis and secretion

LIU LiPing YU ChangYuan XU LiDa*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The effects of overexpression of 20 proteins involved in protein biosynthesis and secretion pathways on the anti-hLAG3 titer in the transient expression cells (ExpiCHO-S) have been compared. The effects of transcription factor XBP1s on cell growth, antibody titer, and antibody affinity were specifically studied. The results showed that when plasmids of the studied proteins and anti-hLAG3 were co-transfected with a mass ratio of 1:4, the presence of XBP1s increased the antibody production by about 30%. Furthermore, overexpression of GADD34, NFKB1z, CERT, C/EBP α and mTOR obviously reduced antibody production. The other 14 proteins had little impact on antibody production. In addition, the promotion effect of XBP1s on anti-hLAG3 production increased as the transfection ratio of XBP1s increased. When the transfection ratio of XBP1s was increased to 60%, the antibody production at 168 h after transfection was increased to 2.1-fold when compared with a 60% transfection ratio of EGFP. The overexpression of XBP1s had little effect on viable cell density and viability, or the affinity of antibodies. The results indicated that XBP1s can be used as an effective target for cell engineering to improve the recombinant protein production performance of CHO cells.

Key words: XBP1s; CHO cells; cell engineering; transient expression; anti-hLAG3

(责任编辑:于少云)