

人红细胞生成素(EPO)工程细胞建立及特性分析

徐秀英 陈琳 卢柏松 黄培堂 邓继先

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 构建了 EPO 真核表达质粒,成功地实现了其在 CHO-dhfr⁻ 细胞中的表达,所得到的 EPO 工程细胞株的形态与 CHO-dhfr⁻ 细胞相似,细胞株小瓶静止培养时最高表达水平为 $2 \sim 3 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}/24\text{h}$,而且细胞表达稳定,连续传代三个月和反复冻存复苏三次,细胞表达水平无明显下降。经过对细胞的一系列特性分析表明,该细胞株无支原体、真菌及细菌污染,无致瘤性,形态正常,染色体畸变率与出发株相当。

关键词 红细胞生成素 工程细胞株 特性分析

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种糖蛋白,它是红细胞发育成熟过程中的一种最重要的调节因子,它在治疗肾衰引起的贫血中,显示明显的疗效和很小的副作用;在纠正恶性肿瘤相关贫血、艾滋病引起的贫血和化疗引起的贫血等方面,也显示乐观的前景;还可在手术前作为自体输血,从而避免感染血源性疾病等等。因此 EPO 是很有前途的一种细胞因子。

EPO 存在于胎肝及成年人的肾脏中,但含量很少,提取、纯化困难。国外 1985 年成功地分离到 EPO 基因,1985 年美国 FDA 批准重组 EPO(rEPO)作为治疗肾性贫血的药物,我国近年才开始研究 rEPO。对于必须长期依赖 EPO 生存的肾衰病人来说,难以支付进口 rEPO 的巨额费用,因此研究 rEPO 已迫在眉睫。我们在实现了 EPO cDNA 在中国仓鼠卵巢细胞中的稳定高效表达基础上,对该细胞株进行全面鉴定,包括细胞形态,表达水平,细胞株稳定性,致瘤性,遗传特性及是否被污染等。检查结果表明该细胞株为性能优良的工程细胞株。

1 材料和方法

1.1 CHO-dhfr⁻ 细胞

为二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)缺陷型中国仓鼠卵巢细胞,Chasin 通过两步突变法建立^[1]。人宫颈癌细胞(Hela 细胞):由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供。裸鼠: BALB/C Nu, 4 周龄,购自中国医学科学院肿瘤研究所,动物合格证号“京动字 8910M045”,按三级动物饲养。EPO-ELISA 试剂盒:购自 Boehringer

Mannheim 公司。支原体检测试剂盒:购自本院微生物流行病学研究所病毒室。EPO 标准品为 Boehringer Mannheim 公司产品。血清为浙江杭州四季清生物工程材料研究所生产的无支原体特级小牛血清。DMEM 培养基:购自 GIBCO 公司,(含碳酸氢钠)。其它试剂均为分析纯。仪器:组织培养成套仪器荧光显微镜。

1.2 工程细胞 C₂ 构建

将 200 μg 真核表达质粒与 200 μg 鲑鱼精 DNA 用电击法导入 CHO-dhfr⁻ 细胞,经氨甲喋呤加压筛选,获得高表达细胞株 C,该株经亚克隆后,获得其中一株高表达细胞系 C₂^[2]。

1.3 工程细胞表达产物的纯化

细胞无血清培养上清经柱层析纯化获得^[3]。

1.4 污染检查

检查细菌和真菌采用培养法,分别使用无抗菌素的 LB 肉汤和改良马丁肉汤。待细胞生长至平层,弃大部分上清而留下约 1ml,再将整瓶细胞于 -20 冻存过夜,然后用自来水冲洗细胞瓶外壁至细胞培养液融化,细胞脱落。将细胞悬液 0.5ml 接种于 5ml 无抗菌素的 LB 肉汤管中,37 培养 5 天,观察肉汤管有无浑浊以检定有无细菌污染。将细胞悬液接种于改良马丁肉汤中,于 25 培养 15 天以检定有无真菌污染。上述检查同时设阴、阳性对照。

细胞支原体检测用广谱抗支原体单克隆抗体荧光法^[4],即将受检细胞与支原体对照细胞按 $40 \times 10^4/\text{ml}$ 细胞浓度制成悬液,加在镀膜玻片孔内,置于密闭湿盒中,37 5%CO₂ 培养箱中培养 6~8h。PBS 洗细胞,用冷丙酮 -20 固定 30min 后,加入抗

支原体单抗及对照抗体,4 放置过夜。蒸馏水清洗,加荧光抗体 37 培养 30min,荧光显微镜观察。

1.5 细胞表达水平用 ELISA 夹心法测定

首先包被抗 EPO 单克隆抗体,接着加待测含 EPO 的样品及 EPO 标准品,然后加入酶标抗 EPO 多克隆抗体,最后加底物显色,测定 OD 值。

1.6 细胞株的稳定性

细胞置液氮冻存 3 个月以上,体外连续传代 6 个月,再测定细胞表达水平。

1.7 致瘤试验

1.7.1 提取 C₂ 工程细胞 DNA

1.7.2 30 只 4 周龄裸鼠分为 6 组,每组 5 只。第一组皮下接种 1×10^6 细胞/0.2ml/只的 HeLa 细胞作为阳性对照;第二组皮下接种 1×10^7 细胞/0.2ml/只的 CHO-dhfr⁻ 细胞作为阴性对照;第三组皮下接种 1×10^7 细胞/0.2ml/只的工程细胞 C₂ 细胞;第四组皮下接种 300 μ g/0.2ml/只 C₂ 工程细胞产物纯品;第五组注射 150 μ g/0.2ml/只 DNA;第六组接种 C₂ 细胞破碎物 1.4×10^7 细胞/0.2ml/只。

1.7.3 裸鼠按照三级动物无菌喂养,观察 30 天

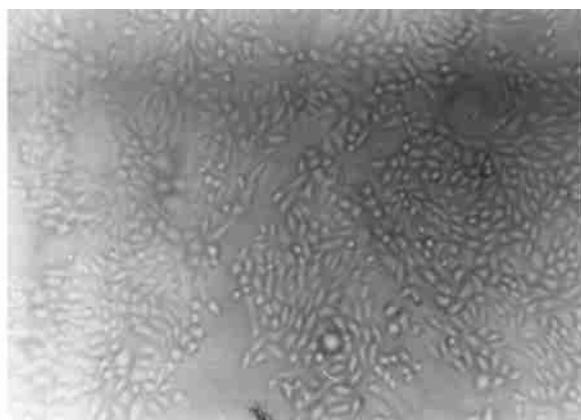


图 1 CHO-dhfr⁻ 细胞形态

1.8 遗传特性分析^[5]

对工程细胞株进行染色体计数及分析染色体畸变类型。在细胞分裂中期,胞体呈圆形,染色体集中在赤道板上,形态清晰。此时,易进行染色体研究,我们利用秋水仙素破坏纺锤丝以阻抑细胞于分裂中期,可截获更多的中期分裂相以便进行染色体分析,步骤如下:

将 CHO-dhfr⁻ 细胞和工程细胞单层培养至指数生长期,分别加秋水仙素至终浓度 0.1 μ g/ml,继续于 37 培养 6~12h,收集分裂相细胞,用 0.075 mol/L KCl 37 低渗处理 20min,离心收集细胞。细胞用甲醇与冰醋酸混和液(3:1)固定 3 次,每次于 37 固定 20min。最后涂片,玻片用 Giemsa 染色,显微镜下观察分析。

2 实验结果

2.1 工程细胞株的形态和生长特征

工程细胞株 C₂ 体外传代数为 129 代,其形态与转化前的亲代细胞无明显差别,仍为多角形,似类上皮细胞(图 1,图 2)。

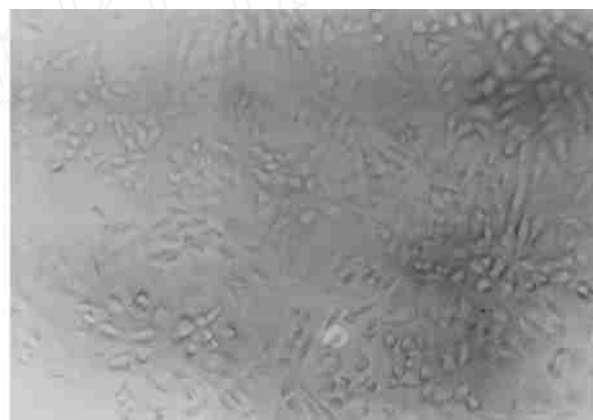


图 2 工程细胞株 C₂ 的形态

2.2 工程细胞株的表达水平

细胞株 C₂ 在加压至 MTX 浓度为 5×10^{-7} mol/L,细胞总代数为 129 代时,表达水平达 2~3 μ g/10⁶ Cells/24h。

由于工程细胞株转入了 dhfr 基因,因此在不含甘氨酸、次黄嘌呤和胸苷的 DMEM 选择培养基中仍能正常生长。

2.3 遗传特性

用秋水仙素截获中期分裂相细胞进行染色体分析,观察分析结果可见,CHO-dhfr⁻ 细胞和工程细胞均存在各种类型的畸变细胞,包括裂隙、断片、异着

丝粒、四倍体等,CHO-dhfr⁻ 细胞畸变率约 6%,工程细胞 C₂ 株畸变率为 8%(表 1,图 3,图 4)。

2.4 细菌、真菌、支原体检测

取 C₂ 细胞悬液于 LB 培养基和改良马丁肉汤中培养,未见细菌和真菌污染。

用广谱抗支原体单抗免疫荧光法检测细胞支原体,结果显示:阳性对照细胞株的细胞膜上呈现明亮荧光,而工程细胞株和阴性对照细胞的细胞膜上均未看到荧光,说明工程细胞无支原体污染。

2.5 细胞株的稳定性

用体外连续传代、液氮冻融及撤掉 MTX 的方

法检验细胞株的稳定性。C₂ 细胞株经体外培养 6 个月后的 C₂ 细胞复苏,与冻存前的表达水平比较没有下降(见表 2)。

表 1 细胞株的染色体检查

Cell Line	Chromosome count	Cell count	Distortion cells count	Distortion type			Distortion rate(%)
				crack	different kinetochore	four amphiploids	
C ₂	20	100	8	3	2	3	8
CHO-dhfr ⁻	20	100	6	5	2	1	6

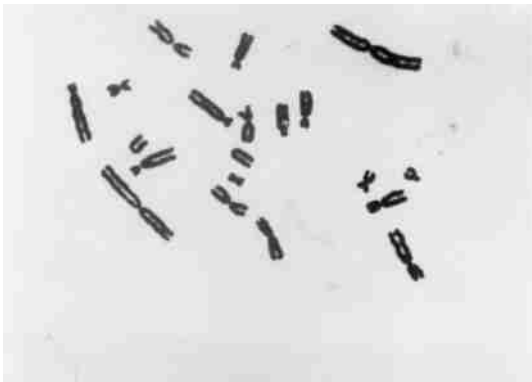


图 3 CHO-dhfr⁻ 细胞染色体



图 4 工程细胞 C₂ 染色体

表 2 C₂ 细胞冻存 6 个月后表达水平与未冻存细胞比较

Sample	Dilution	Value of OD ₄₉₂	Count of cells(×10 ⁶)	Concentration of protein(ng/ ml)
Super-suspension before freezing	1000	0.77	2	1500
Super-suspension after freezing	1000	0.73	2	1500
Standard	1	0.26	-	0.5

C₂ 细胞撤掉 MTX 压力半个月后,表达水平与未撤掉压力的细胞比较无明显下降。

2.6 C₂ 细胞的均一性

为检测所得细胞株的细胞均一性,我们对 C₂ 细胞进行了亚克隆,ELISA 测定了各亚克隆在 96 孔板中 24 小时上清的 OD 值,结果见表 3。

由于各孔中细胞数接近,各亚克隆都有表达,而且 OD 值比较接近,可见 C₂ 细胞株基本为均一细胞组成。

2.7 工程细胞株致癌性试验

将工程细胞株、细胞匀浆、细胞 DNA 以及从细胞分泌物纯化的 EPO 等受检样品接种裸鼠,观察 30 天,结果与阴性对照 CHO-dhfr⁻ 细胞同,裸鼠均未见生瘤,而阳性对照组裸鼠 100 %生瘤(表 4)。

表 3 C₂ 各亚克隆 ELISA 结果

subclones	OD
C ₂₁	0.60
C ₂₂	0.58
C ₂₃	0.67
C ₂₄	0.69
C ₂₅	0.61
C ₂₆	0.61
C ₂₉	0.55
C ₂₁₀	0.59
C ₂₁₁	0.69

注:样品 200 倍稀释,1ng/ml 标准品 OD 值为 0.32

表 4 工程细胞及其产物的致瘤性试验

sample	dosage	rate of tumor
HeLa cells	10 ⁶ 细胞/ 0. 2ml/ 只	5/ 5
CHO-dhfr ⁻ cells	10 ⁷ 细胞/ 0. 2ml/ 只	0/ 5
C ₂ cells	10 ⁷ 细胞/ 0. 2ml/ 只	0/ 5
Purified EPO products	300μg/ 0. 2ml/ 只	0/ 5
C ₂ cell DNA	150μg/ 0. 2ml/ 只	0/ 5
Broken C ₂ cells	1. 4 ×10 ⁷ 细胞/ 0. 2ml/ 只	0/ 5

以上结果表明,我们构建的工程细胞株及其产物无致瘤性,是安全的。

我们构建了 EPO 真核表达质粒,成功地实现了其在 CHO 细胞中的表达,表达产物具有与天然 EPO 相同的生物活性和免疫原性。所得到的细胞株小瓶静止培养时最高表达水平为 2 ~ 3μg/ 10⁶ cells/ 24h,而且细胞表达稳定,连续传代和冻存后复苏的细胞表达水平无明显下降。

经过对细胞的一系列特性分析表明,该细胞株形态正常,无支原体及细菌、真菌污染,染色体畸变率在可接受范围,细胞及其产物无致瘤性。

综上所述,该工程细胞株为性能优良的工程细胞株。

参考文献

- [1] Chasin U. G. , Chasin L. A. et al , Proc. Natl. Acad. Sci. ,1980 , 77 (7) :4216 - 4220.
- [2] 卢柏松,徐秀英,陈琳等,生物工程学报,1996,12(3):1 - 4.
- [3] 李琳,邓继先,卢建申等,用三步法纯化重组人促红细胞生长素,军事医学科学院院刊,1996,20(4):236 - 239.
- [4] 杨保安,孟玲珍,朱曼等,抗支原体单克隆抗体试剂盒的研制和应用,军事医学科学院院刊,1993,17(1):36 - 38.
- [5] 鄂征主编,组织培养技术,北京,人民卫生出版社,1982, 236 - 239.

The Analysis of Biological Characteristics for the Erythropoietin Engineering Cell Lines

Xu Xiuying Chen Lin et al.

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract rhEPO cell line has been constructed. The expression level of serum-free culture for EPO cell line is 2 ~ 3μg/ 10⁶ cells/ 24h. The cell line is bequeathed for three months in vitro and revived after freezing three months, the expression level is stable. The cell line hasn't been contaminated by mycoplasma. The assay of tumorigenesis shows that the cells, cellular DNA and purificatory products don't form tumor in nude mice. The cellular morphology and chromosomal number is normal.

Key words Erythropoietin, Engineering cell line, Characteristic analysis

2000 年全国生物技术研究与发展研讨会

为促进我国生物技术的交流,促进生物工程产业化,在中国生物工程学会的支持下,于 2000 年 8 月 8 日在云南省昆明市举办“2000 年全国生物技术研究与发展研讨会”,现将有关事项通知如下:

支持单位:中国生物工程学会

主办单位:生物工程进展杂志社、生物学杂志社、安徽省生物工程学会。

报名地点:安徽省合肥市霍邱路 6 号科技大楼生物学杂志社。

电 话:0551 - 2673629,传真:0551 - 2626620,邮编:230061。

会议内容:基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程等生物工程及相关领域的研究报告、学术交流,生物技术和生命科学在二十一世纪面临的机遇与挑战,生物技术产业发展研讨等。

参加对象:生物学界的专家、学者以及从事教学、科研人员和农、林、牧、副、渔、医药、环保、海洋等领域研究开发及管理人员,并诚挚欢迎有关企业、投资公司、地方领导积极参加。

出席会议者,食宿由会议统一安排,费用自理。会务费 500 元。

有论文参会者请将论文(请保留底稿)寄至生物学杂志编辑部,论文择优在国家级期刊《生物工程进展》(中国生物工程学会会刊)、《生物学杂志》上发表。