

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.052

重组中华仓鼠卵巢细胞培养过程控制的研究进展*

孙浩明^{1,2} 张广发¹ 姚文¹ 杨栋² 孙文靖^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室 黑龙江 哈尔滨 150081; 2 哈药集团生物工程有限公司 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要: 中华仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary Cells, CHO)是科研及生产中用于蛋白表达的常用体系。与大肠杆菌相比, CHO 获得高表达的细胞株所需时间更长, 蛋白产量更低。因此, 大规模培养细胞所需的成本较高, 培养条件也不易掌握。但该体系产生的蛋白纯度高, 因而被广泛用于工业生产中。本文对 CHO 细胞的培养方式、pH 值测定、渗透压、溶氧及培养液成分的选择等多方面条件进行综述, 为优化中华仓鼠卵巢细胞培养的策略及具体方法提供理论依据。

关键词: 中华仓鼠卵巢细胞; 蛋白表达; 培养条件; 优化条件

中图分类号: R-33; Q813 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2017)10-1997-04

Control of Training Process in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells*

SUN Hao-ming^{1,2}, ZHANG Guang-fa¹, YAO Wen¹, YANG Dong², SUN Wen-jing^{1Δ}

(1 Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 Harbin Pharmaceutical Group Bioengineering Co., Ltd, Harbin, Heilongjiang, 150025, China)

ABSTRACT: Chinese hamster ovary cells (CHO) are the system for protein expression which have been commonly used in the scientific researches and productions. Compared with the *E. coli*, the CHO time required to obtain a high expression of cell line is longer, and the protein production is lower. When it goes to large-scale cell culture, not only does it need a high cost but also becomes difficult to grasp the conditions. However, this system can produce higher purity protein, which is widely applied in the industrial production. In this paper, the important issues of CHO cell culture process are to be reviewed. Optimization strategies and specific methods such as training methods, pH, osmolality, dissolved oxygen and broth ingredients are to be discussed.

Key words: Chinese hamster ovary cells; Protein expression; Culturing conditions; Optimization

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1997-04

前言

中华仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary Cells, CHO)表达系统是目前常用的哺乳动物表达系统。与其它系统相比, CHO 具有以下优点: ① CHO 细胞对蛋白有准确的加工、修饰功能, 因此其表达的蛋白质的生物学活性更接近于天然蛋白; ② CHO 细胞耐受剪切力和渗透压的能力相对较强, 可根据培养要求选择可贴壁培养或悬浮培养的方式; ③ 整合外源基因后的细胞稳定, 重组基因能高效扩增和表达; ④ 表达的目的蛋白可由细胞内运输到细胞外, 并且 CHO 细胞只表达少量的内源蛋白, 有利于目的蛋白的提取。

不能忽视的问题是, 在科研与生产实践中, 由于 CHO 细胞培养条件相对复杂多变, 且培养体系易被其它微生物污染, 导致培养成本高, 在一定程度上影响了其应用。因此, 在实际的生产过程中, 要尽可能选择适当的培养方式, 有效地控制培养条件, 以提高其蛋白表达效率、降低生产成本。本文根据基因重组常规流程, 对 CHO 细胞培养过程可能存在的影响因素及其注意事项给予综述。

1 培养方式的选择

CHO 细胞主要有贴壁培养和悬浮培养两种培养方式, 如何选择应根据实际需求而定、综合对比: 如需长时间培养, 建议采用贴壁培养的方式, 使细胞处于较好的生长环境中; 如蛋白表达量较高且培养周期短, 则考虑更为简便的悬浮培养方式。

1.1 贴壁培养

贴壁培养前期扩增操作比较复杂容易污染, 但后期表达阶段贴壁培养却有明显优势。细胞贴附于载体上, 可采用灌注培养的方式, 这种方式能够保证细胞生长环境稳定, 降低氨、乳酸等代谢废物浓度, 利于细胞长时间存活, 延长表达时间; 细胞活率提高, 上清液中细胞碎片、核酸、杂蛋白含量少。

1.2 悬浮培养

悬浮培养中的细胞扩增过程相对简单, 传代方式也更加灵活, 易获得较高的培养密度。但后期蛋白表达由于代谢产物不能及时排出培养环境, 易导致细胞死亡、破碎, 上清液杂质多, 纯化过程难度大。有研究证明, 氨可以干扰细胞内糖酵解过程中关键酶的生物学活性^[1]。培养体系内当氨浓度增加时, 两个原

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31271347)

作者简介: 孙浩明(1984-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤遗传学, 电话: 13766860176, E-mail: sunnyday1984.love@163.com

Δ 通讯作者: 孙文靖, E-mail: sunwj@ems.hrbmu.edu.cn

(收稿日期: 2015-05-10 接受日期: 2015-05-31)

因导致 CHO 细胞对营养成分的利用情况发生了改变: ① 细胞为了适应培养体系内过高的氨浓度增加自身对营养成分的需求量提高了; ② 由于细胞内营养成分代谢途径的改变导致营养成分的利用率下降。因此, 高氨环境时细胞对营养物质的消耗增加^[2]。与此同时氨浓度增加会使细胞质的 pH 降低, 进而导致磷酸果糖激酶失活, 严重影响糖酵解过程能量的利用^[3]。综上类似氨等代谢废物累积, 会产生对细胞代谢不利的影响。

2 培养环境 pH 的优化

CHO 细胞生长最适 pH 在 7.2~7.4 之间, 细胞扩增阶段 pH 可在此范围内调节。培养液 pH 的改变对 CHO 细胞表达促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 有明显影响^[4], 培养体系 pH 处于 6.9~7.10 时, CHO 细胞难以长时间维持生存状态, 表现为营养代谢水平降低, 蛋白收获时间减少, EPO 的表达总量减少, 蛋白收率只有 3.3%。培养体系 pH 处于 7.30~7.50 时, 细胞能够长时间维持正常代谢状态, 收获 EPO 的时间延长, 但 EPO 的产量低, 仅 4988 IU/mL 且蛋白糖基化程度及唾液酸化程度低。因此, 高 pH 也不利于细胞表达 EPO。pH 7.10~7.25 时, EPO 表达量可达 10388 IU/mL。1 mol EPO 含唾液酸 11.5 mol, 纯化收率达 17.9%^[5]。上游基因构建与下游培养过程控制^[6], 两者都能影响蛋白糖基化程度。细胞经过增殖阶段进入蛋白收获期后, 可适当调节培养体系的 pH 值, 调节培养体系的 pH 要注意两个方面: ① 保证细胞能够在此条件下长时间存活, 争取足够的表达时间; ② 有利于细胞表达蛋白质, 判断的依据在于目的蛋白的表达量和修饰程度能够达到较为理想的指标。

3 培养环境内氨基酸含量的调节

适当向培养环境中补加所需的氨基酸, 有利于增加蛋白表达量。但有些氨基酸在培养过程中含量反而会增加^[7]。因此, 对于培养体系氨基酸含量的优化应有针对性, 根据实际消耗量来确定补加氨基酸的种类和数量。特别要注意的是, 消耗速度快的氨基酸是细胞增殖或目的蛋白表达的限制性底物, 消耗速度慢的氨基酸并不能减缓细胞增值速度, 同时也不会使蛋白产量减少。批式培养表达白介素融合蛋白的 CHO 细胞, 培养过程流加葡萄糖 (碳源) 和谷氨酰胺 (氮源), 实验中检测到谷氨酸、天冬酰胺等四种氨基酸消耗速度快, 丙氨酸随培养时间增加, 其含量不断增加, 其余氨基酸消耗速度相对缓慢。针对培养液氨基酸及葡萄糖的消耗情况, 适时补加消耗较快的氨基酸和浓缩的葡萄糖溶液, 最终细胞增值后密度提高了 50%, 同时蛋白表达量增加 60%, 细胞培养时间增加 44%^[2]。

4 培养体系渗透压的控制

调节培养液氨基酸含量时, 应密切监测培养液的渗透压变化, 避免其波动过大对细胞造成不良影响。培养环境的渗透压是细胞体外培养的关键控制条件, 细胞培养环境渗透压过高或过低会导致细胞发生胀裂或皱缩现象, 导致细胞死亡。培养液渗透压与多种电解质相关, 与 NaCl 的关联性最为密切。控制培养液的胶体渗透压及离子渗透压的平衡来维持培养体系渗透压的稳定, 这样不但可以维持细胞的张力, 对细胞代谢调节也有重要影响。细胞质和细胞外离子浓度差异过大会影响其它营

养物质跨膜输送过程, 导致其不能正常摄取营养物质。培养液渗透压在 260~320 mmol/L 时, 适于多种细胞生长。建议将培养液渗透压控制在 260~270 mmol/L, 以便后期加入其它成分时有足够的调节空间。如需补加的氨基酸应使用高浓度溶液, 避免稀释效应导致其它成分含量不足; 当培养液渗透压偏高时, 以正常渗透压的培养液调节。细胞培养的后期即蛋白表达期, 常需要补充氨基酸, 致最终环境渗透压偏高, 可适当降低初始培养液的渗透压, 此外, 培养后期可适当加入含磷酸根的无机盐调节细胞内渗透压, 提高细胞对高渗透环境的耐受, 延长收获时间。

5 溶氧 (Dissolved oxygen, DO) 的控制

溶氧不仅能够影响细胞增值速度, 对细胞内营养物质代谢也有重要影响, 不同研究结果表明细胞培养过程最适 DO 范围从 8%~100%。培养环境 DO 大于 100% 时会导致细胞膜受损, 严重时影响 DNA 结构, 从而使细胞死亡^[8]。DO 过低时会影响细胞能量物质的利用, 代谢情况的改变使细胞蛋白表达水平降低, 甚至凋亡。利用多孔微载体培养贴壁细胞的研究过程中, 将培养液 DO 值控制在 20%, 细胞长满时载体中心 DO 大于 10%^[9]。当 DO 处于 20%~40% 之间时, 蛋白表达量、培养液营养成分消耗情况无较大变化, 通过糖酵解途径生成乳酸的葡萄糖仅占葡萄糖消耗总量的 12.5%。然而当 DO 下降至 7%~9% 时, 蛋白表达量降低 20%, 同时葡萄糖酵解产生的乳酸增加了约 20%, 营养成分的利用率显著下降。上述结果表明使用多孔微载体培养细胞, 培养液 DO 控制不宜低于 20%, 这样才能使细胞有效利用培养液中的营养成分^[10]。

生产过程中 DO 的控制应尽量稳定在 50%~60%, 避免过大的波动影响细胞生长状态。一般反应器培养细胞会选择搅拌的方式使培养液 DO 均一, 搅拌时转速不宜太快, 尤其是悬浮培养过程中搅拌桨直接接触细胞悬液, 对细胞造成的剪切力会破坏细胞结构^[11]。利用 CHO 细胞表达组织型纤溶酶原激活物 (Tissue-type plasminogen activator, t-PA) 的培养过程中, 低剪切力可使 t-PA 产量达到最大^[12]。连续悬浮杂交瘤细胞培养, 当转速增加到 120 r/min 时, 搅拌强度却引起了细胞密度和活性的明显下降, 平均密度稀释率降为 0.338 d⁻¹, 已小于稀释速率, 表明此时的机械搅拌强度已对生长在无血清培养液中的细胞产生了伤害作用。向培养液中添加抗氧化剂或 Pluronic F68 等保护剂增加培养液粘度, 提高培养液胶体渗透压可减轻细胞的剪切损伤。通气量的大小要适当, 气泡越小, 越有利于氧气溶于培养液。泡沫过多时可向培养体系内加入适量消泡剂。选择类似 WAVE 摇袋式系统进行培养则不需要考虑搅拌对细胞的伤害, 但需控制泡沫的产生。

6 培养温度的控制

当培养温度低于 37℃ 时, 细胞的生长状态、营养代谢水平及蛋白质表达均产生较大变化^[13]。增值速度随温度的降低而减缓, 当温度降至 30℃ 时, 细胞生长停止。温度较低时, 虽然细胞增值速度受到抑制, 但培养时间却明显延长。采用低温培养的方式降低了细胞代谢水平, 营养物质的消耗速度明显减慢, 因此其利用效率也得到提高, 代谢产生的副产物减少, 培养环境

中有害副产物浓度降低。利用 CHO 重组细胞表达抗体融合蛋白的研究表明, 降温可使目的蛋白的比生成速率明显增加, 当温度降低至 30℃ 时蛋白比生成速率达到峰值^[14]。

温度的控制应考虑培养目的, 较大幅度的温度变化对细胞生长有严重影响, 如果对温度进行控制, 可采取逐步降温方式。当细胞密度达到预期目标时, 逐步降温至蛋白比生成速率较高的温度。

7 葡萄糖和谷氨酰胺

一般认为, CHO 工程细胞具有肿瘤细胞特点, 细胞内糖酵解途径调节作用发生变异, 乳酸生成速率随葡萄糖浓度升高而加快, 导致培养体系内乳酸累积量增加^[15]。乳酸的积累会降低培养体系的 pH, 同时使渗透压升高, 导致细胞增殖速度减缓、影响目的蛋白的表达。但其本身并不会影响细胞代谢和蛋白表达, 调节培养体系渗透压可消除其危害。培养体系葡萄糖含量与 CHO 细胞表达 EPO 蛋白量有关, 葡萄糖含量在 8.9~17.9 mmol/L 时 EPO 产量随其浓度的下降而下降; 葡萄糖含量在 17.9~49.6 mmol/L 时 EPO 浓度随其浓度的下降而增加^[16]。由此可见葡萄糖在培养中存在最适浓度, 在最适浓度下蛋白表达量会达到峰值, 在培养过程中可以进行梯度实验, 确定细胞蛋白表达最高时的最适葡萄糖值。

谷氨酰胺和葡萄糖是细胞代谢过程中产生能量的关键底物^[17]。葡萄糖转化可以生成谷氨酰胺, 但在整个培养过程中, 谷氨酰胺的总量经常不足, 所以应将其作为重要的参数进行监控, 及时向培养体系内补充谷氨酰胺。谷氨酰胺浓度为 4.97 mmol/L 时, 适宜 CHO 细胞的批次培养, 此时细胞代谢旺盛能有效利用碳源(葡萄糖)和氮源(谷氨酰胺), 并且产物浓度最高。虽然增加或减少谷氨酰胺起始浓度对细胞增殖倍数、最大活细胞密度均无显著影响, 但过高的谷氨酰胺起始浓度(7.91 mmol/L)会抑制内皮抑制素生成, 并且使底物的利用率下降, 在规模化培养过程中, 建议将谷氨酰胺浓度维持在 4.97 mmol/L 左右^[18]。

许多研究结果表明, 在细胞培养过程中, 谷氨酰胺可取代葡萄糖为细胞生存提供能量, 而葡萄糖却不能取代谷氨酰胺的作用^[19]。

8 促表达成分及调控成分

8.1 氨甲喋呤(Methotrexate, MTX)

为提高蛋白表达量, 将二氢叶酸还原酶的基因和目的基因整合到同一载体内, 共同转染至二氢叶酸还原酶缺陷型 CHO 细胞内, 不含目的基因的细胞自然死亡, 从而保证目的蛋白的表达, 这是一种行之有效的表达策略^[20,21]。MTX 是二氢叶酸还原酶其竞争抑制底物^[22], 培养体系内含有高浓度 MTX 的情况下, 二氢叶酸还原酶基因和目的基因的拷贝同时增加, 从而实现目的蛋白的高表达^[23]。由于 MTX 毒性较强, 对于食品、药品生产应在后续工艺中有效去除 MTX, 并建立相应检测方法。

在 CHO-EPO 细胞的培养过程中, 加入 0.5 nmol/L MTX, 细胞形态有明显变化, 但增殖速度没有下降; 培养液中 MTX 浓度为 1~2 nmol/L 时, 细胞增殖速度随 MTX 浓度增加而降低; MTX 浓度增加至 3 nmol/L 时, 细胞生长明显减慢, 死细胞数量增加, 培养三天后 40% 细胞死亡, 多次传代后细胞适应

MTX 浓度后, 细胞活率逐渐提高, 细胞增殖速度缓慢; MTX 浓度增加至 4~5 nmol/L 时, 细胞 90% 以上死亡, 建议用此浓度进行细胞筛选得到表达量较高的细胞株。

8.2 丁酸钠

丁酸钠能够使 DNA 结构发生变化, 从而加速 mRNA 的合成, 提高蛋白表达量^[24]。丁酸钠可以提高 CHO 细胞的蛋白表达量, 提高程度与表达产物有关, 目前研究结果表明丁酸钠可提高 t-PA、EPO、人血小板生成素、凝血因子 VIII 因子等的表达水平, 同时可以有效减少培乳酸的产生和累积, 提高葡萄糖的利用率^[25]。

Andrew^[26]等研究人员利用丁酸钠处理重组 CHO 细胞, 结果表明丁酸钠不仅增加了 VIII 因子的转录, 同时提高了相关 mRNA 的转录。Palermo^[27]等学者使用滚瓶工艺, 在蛋白表达阶段加入丁酸钠使多种 t-PA 类似物的表达量增加了 2~9 倍; 丁酸钠减缓了细胞的增殖速度, 延长了蛋白收获的时间^[28]。相关实验研究如下: 前三天在 1 mmol/L 的丁酸钠中, 总细胞密度由原来的 6.4×10^5 cells/mL 上升为 10.2×10^5 cells/mL, 但是细胞存活率由 98% 下降到 85%, CHO 细胞密度由原来的 6.3×10^5 cells/mL 上升为 8.7×10^5 cells/mL, 提高并不明显; 在 2 mmol/L 的丁酸钠中, 总细胞密度由原来的 6.4×10^5 cells/mL 上升为 10.0×10^5 cells/mL, 存活率由 98% 下降到 56%, 活细胞密度由原来的 6.3×10^5 cells/mL 下降到 5.6×10^5 cells/mL。死细胞随培养液的更新排出培养体系, 因此细胞活率有所回升。综合看来, 丁酸钠的添加导致了细胞存死亡, 细胞活率比正常培养时低。细胞在添加丁酸钠的第 3 天后停止生长, 丁酸钠的加入延长了细胞贴壁存活时间, 争取了更多的蛋白收获时间。

应充分认识到, 促表达成分及调控成分的合理应用也存在诸多限制: 一方面使蛋白表达更加高效并延长有效表达时间, 一方面可能伴随其它毒性产物, 对培养细胞造成过快消耗, 或为下游产物的提纯带来挑战。黄酮类物质对 CHO 细胞有较大的伤害^[29]。从积极的角度考虑: 如果能恰当的对此类物质予以使用, 可能会显著地降低生产成本。

9 小结与展望

目前许多蛋白产品都利用 CHO 细胞表达^[30], 提高产物表达量一般通过两个途径实现: ① 通过优化上游基因结构, 构建高表达载体可提高蛋白产量; ② 通过优化下游细胞培养策略让生产工作事半功倍, 本文以对主要培养条件的控制进行了综述。

需要强调的是, 细胞状态与产物表达并不是完全相关, 细胞状态达到最好的培养条件未必利于蛋白的表达。不仅培养液条件会影响细胞状态, 接种密度不同也会影响细胞状态^[31], 不同细胞株与不同的目的蛋白都可能对培养结果产生重大影响; 应根据实际需求与条件, 对 CHO 细胞培养过程再进一步优化: 如向培养体系内加入转铁蛋白、IGF(胰岛素样生长因子)等物质也可提高细胞活力^[32]。对于规模化生产, 优化方法要考虑可操作性, 便于控制。

对特定细胞株要有针对性的进行优化, 并结合 Elisa、Western blot 等方法予以检测证实, 通过持续改进才可能获得理想的培养方法。随着生物技术的不断发展, 细胞培养控制必定会更具针对性, 无论培养方式如何变化, 首先应考虑产品安全性, 将质量安全作为必要的前提条件来考虑。

参考文献(References)

- [1] McQueen A, Bailey J. Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35(11): 1067-1077
- [2] Tang ZH, Ying YB, Jiang HY, et al. Effects of Ammonia on Cell Metabolism in the Culture of Recombinant CHO Cells [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 15(1): 35-39
- [3] Fan Y, Jimenez Del Val I, Müller C, et al. Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(3): 521-535
- [4] Li PF, Wang K, Du L, et al. Protective effect of kojic acid on Chinese hamster ovary cells from radiation damage [C]. *Chinese Environmental Mutagen Society risk assessment of professional committee of the Sixteenth National Academic Symposium*, 2014: 343-348
- [5] Wu YY, Sheng GY, Zhang DP, et al. Effects of Ammonia on Cell Metabolism in the Culture of Recombinant CHO Cells [J]. *International Medicine & Health Guidance News*, 2012, 18(15): 2184-2186
- [6] Wang JJ, Zheng C, Ding N, et al. Effect of increased O-GlcNAcylation on the hyperphosphorylation induced by overexpression of mutant tau protein on CHO-K1 cells [J]. *Shandong Medical Journal*, 2013, 53(2): 25-28
- [7] Akasaka N, Ishii Y, Hidese R, et al. Enhanced production of branched-chain amino acids by *Gluconacetobacter europaeus* with a specific regional deletion in a leucine responsive regulator [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118(6): 607
- [8] Siedler S, Bringer S, Polen T, et al. NADPH-dependent reductive biotransformation with *Escherichia coli* and its *pfkA* deletion mutant: influence on global gene expression and role of oxygen supply [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(10): 2067-2075
- [9] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23): 10771
- [10] Zhu LK. The research on oxygen supply with bubbles and remote control in animal cells bioreactor [D]. Harbin Institute of Technology, 2011
- [11] Pfister C, Bozsak C, Wolf P, et al. Cell shape-dependent shear stress on adherent cells in a micro-physiologic system as revealed by FEM [J]. *Physiol Meas*, 2015, 36(5): 955-966
- [12] Senger RS, Karim MN. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(4): 1199-1209
- [13] Vergara M, Becerra S, Berrios J, et al. Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93865
- [14] Wang C, Zhao L, Liu X, et al. Effects of temperature on Physiological characteristics and Antibody expression of Recombinant CHO Cells [C]. *The sixth national chemical and Biochemical Engineering Annual Meeting*, 2010: 1-8
- [15] Ha TK, Lee GM. Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture [J]. *J Biotechnol*, 2014, 20(180): 23-29
- [16] Bai Y. Improvement of recombinant human EPO cell culture and purification process [D]. Hebei Medical University, 2014
- [17] Reizter LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells [J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(8): 2669-2676
- [18] Zhou J, Zhang Y, Wang W, et al. The Effect of Glutamine on the Growth, Metabolism and Endostatin Production of Microencapsulated rCHO Cells [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(1): 162-166
- [19] Ozturk SS, Palsson BO. Growth, metabolic and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 1. Analysis of data from controlled batch reactors [J]. *Biotechnol Prog*, 1991, 7(6): 471-490
- [20] Noguchi C, Araki Y, Miki D, et al. Fusion of the Dhfr/Mtx and IR/MAR gene amplification methods produces a rapid and efficient method for stable recombinant protein production [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52990
- [21] Pallavicini MG, DeTeresa PS, Rosette C, et al. Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(1): 401
- [22] Gandor C, Leist C, Fiechter A, et al. Amplification and expression of recombinant genes in serum-independent Chinese hamster ovary cells [J]. *FEBS Lett*, 1995, 377(3): 290
- [23] Zettleissl G, Wirth M, Hauser H J, et al. Isolation of overproducing recombinant mammalian cells by a fast and simple selection procedure [J]. *Gene*, 1988, 73(2): 419
- [24] Iqbal Parker M, Haan J B, Gevers W. DNA hypermethylation in sodium butyrate-treated WI-38 fibroblasts [J]. *J Bio Chem*, 1986, 261(6): 2786-2790
- [25] Syngiridis K, Bekatorou A, Kandyli P, et al. Favouring butyrate production for a new generation biofuel by acidogenic glucose fermentation using cells immobilised on γ -alumina [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 161: 118-123
- [26] Andrew JD, Louise CW, Randal JK. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated CHO cells [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(34): 20602-20607
- [27] Palermo DP, DeGraaf ME, Marotti KR, et al. Production of analytical quantities of recombinant proteins in CHO cells using butyrate to elevate gene expression [J]. *J Biotechnol*, 1991, 19(1): 35-48
- [28] Zhou L, Sun XM, Zhang YX, et al. Effect of Butyrate on Cell Growth and Expression of EPO in Recombinant CHO Cells [J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 2001, 27(3): 310-312, 319
- [29] Liu T, Sun J, Guo C, et al. Comparison of Early Damage of CHO Cells in the Presence of Different Flavonoid Monomers [J]. *Food Science*, 2014, 35(11): 223-228
- [30] Yuan WM, Ma FL, Zhang S, et al. The expression of interferon- λ 1 in CHO cell [J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2013, 27(3): 190-192
- [31] Guan Y, Yao JH, Gao Q, et al. Effect of CHO Cell Initial Seeding Density on the Results of Cytotoxicity Test [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2012, 29(9): 43-46
- [32] Yu JF, Chen HP, Gou XN, et al. Optimization and Substitution of Key Components for Suspension Culture of Chinese Hamster Ovary (CHO DG44) Cells in Serum Free Medium [J]. *Journal of Nanchang University-Engineering & Technology*, 2013, 35(2): 125-129, 175