مقاله علمی پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٦، شماره ١، بهار ١٣٩٤، ١٠٦-٩٧

افزایش تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در سلول‌های CHO از طریق کنترل شرایط کشت سلولی

زهرا سادات عقیلی M.Sc.[1]، سید حمید زرکش اصفهانی Ph.D.[2*]

۱- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه زیست فناوری، اصفهان، ایران
۲- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

چکیده

هدف: هدف این مطالعه افزایش تولید هورمون رشد انسانی توسط اضافه کردن ترکیبات شیمیایی به محیط کشت فاقد سرم سلول‌های CHO و بررسی خواص hGH تولید شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، تاثیر تیمارهای مختلف شامل غلظت‌های مختلف گلیسرول، DMSO، NaBu و ZnSO4 در سلول‌های CHO مورد بررسی قرار گرفت و تولید GH به‌روش الایزا سنجیده شد.سلول‌ها به هر چاهک یک پلیت ۱۲ خانه حاوی DMEM-F12 و ۱۰FBS درصد اضافه شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی دور ریخته شد و با محیط فاقد سرم جایگزین شد و با غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی تیمار شدند وتولید rhGH با استفاده از الایزا، دات بلات و وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: در این گزارش، در غلظت‌های ۱ درصد دی‌متیل سولفوکساید، ۰/۵ درصد گلیسرول، در غلظت ۱ میلی‌مولار سدیم بوتیرات و ۵۰ میکرو مولارسولفات روی در سلول‌های CHO افزایش بیان rhGH مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که کنترل شرایط کشت سلولی به توسعه یک فرآیند صنعتی و در مقیاس وسیع برای تولید rhGH کمک می‌کند.

واژگان کلیدی: سلول تخمدان همستر چینی (CHO)، هورمون رشد انسانی نوترکیب (rhGH)، محیط فاقد سرم

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

به‌علت توانایی سلول‌های پستانداران در تولید پروتئین‌هایی با کیفیت بالا و با ویژگی‌های بیوشیمیایی شبیه به‌شکل طبیعی پروتئین، امروزه تعداد زیادی از پروتئین‌های درمانی نوترکیب در سلول‌های پستانداران تولید می‌شوند. با وجود این‌که امروزه تعداد زیادی از رده‌های سلولی در دسترس هستند اما نزدیک به ۷۰ درصد از پروتئین‌های درمانی نوترکیب در سلول‌های تخمدان همستر چینی Chinese Hamster Ovary cell (CHO) تولید می‌شوند. سلول‌های CHO دارای ویژگی‌هایی هستند که آن‌ها را به یک رده مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی با کاربرد بالینی تبدیل می‌کند. این سلول‌ها دارای توانایی کشت به‌صورت سوسپانسیون به جای کشت چسبنده هستند که این‌حالت، کشت سلولی در مقیاس وسیع و استفاده از بیوراکتورها را امکان پذیر می‌کند. این سلول‌ها دارای این قابلیت می‌باشند که به‌منظور ورود آسان DNA خارجی و بیان مقدار زیادی از پروتئین خارجی به آسانی دستخوش اصلاحات ژنتیکی قرارگیرند، این سلول‌ها قابلیت تولید پروتئین به‌صورت گلیکوزیله و انجام اصلاحات پس از ترجمه‌ای که برای فعالیت زیستی پروتئین لازم است را دارا می‌باشند؛ ایمن بودن محصول، ویژگی کلیدی دیگری است که باید در انتخاب میزبان سلولی در نظر گرفته شود. سلول میزبان نباید به عوامل نابجای بیماری‌زا که نهایتا ممکن است به انسان منتقل شود، اجازه رشد و تکثیر دهد. اثبات شده است که سلول‌های CHO، میزبان‌های ایمن برای تولید مواد دارویی هستند. درمطالعه‌ای مشخص شد که ۴۴ ویروس بیماری‌زای انسان که از جمله ویروس نقص ایمنی اکتسابی (*Human Immunodeficiency Virus*) HIV، آنفلونزا، پولیو، هرپس و سرخک قابلیت همانندسازی در این رده سلولی را ندارند (۱). سرم مخلوط بسیار پیچیده‌ای حاوی تعداد زیادی از ترکیبات شناخته شده شامل فاکتورهای رشد، پروتئین‌های حامل، عناصر ضروری، هورمون‌ها و غیره می‌باشد که برای تکثیر و تمایز سلول‌ها ضروری است. متداول‌ترین سرمی که در محیط کشت سلولی استفاده می‌شود سرم جنین گاوی یا FBS (Fetal Bovine Serum) است زیرا غنی‌تر بوده و حاوی ایمونوگلوبولین‌های کمتری نسبت به سایر سرم‌ها می‌باشد. با این وجود استفاده از سرم به‌علت ملاحضات اخلاقی، علمی، ایمنی و اقتصادی معایبی نیز دارد. که از آن جمله می‌توان به آسیب به جنین‌های گاوی، آلودگی‌های ویروسی، هزینه بالا، مداخله در خالص سازی محصولات نوترکیب را می‌توان نام برد. لذا سعی بر این است که به‌جای سرم از محیط فاقد سرم برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده شود (۲).

هورمون رشد یکی از پروتئین‌های درمانی است که امروزه مورد توجه محققین قرار گرفته است. هورمون رشد انسانی (hGH) که با نام سوماتوتروپین نیز شناخته می‌شود، یک هورمون پروتئینی است که توسط سلول‌های سوماتوتروپیک غده هیپوفیز پیشین ساخته و ترشح می‌شود (۳). هورمون رشد انسانی دارای نقش کلیدی در رشد سوماتیک کودکان و در متابولیسم بزرگسالان است که تاثیر خود را از طریق اثر بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدها اعمال می‌کند (۴). hGH یک زنجیره پلی‌پپتیدی منفرد با ۱۹۱ اسیدآمینه است و دارای دو باند دی سولفیدی است که یک باند بین سیستئین شماره ۵۳ و سیستئین ۱۶۵ است که باعث تشکیل یک لوپ بزرگ در مولکول می‌شود. و باند دیگر بین سیستئین شماره ۱۸۲ و سیستئین ۱۸۹ است که یک لوپ کوچک نزدیک به انتهای کربوکسیلیک ایجاد می‌کند (۵). کاربرد هورمون رشد در درمان بیماری‌هایی از قبیل کمبود هورمون رشد GHD در کودکان و در بزرگسالان (۴ و ۶ و ۷)، سندرم ترنر (۸)، سندرم پرادرویلی (۹)، سندرم‌های دیس‌مورفیک مثل سندرم راسل‌سیلور (۹ و ۱۰) و سندرم نونان (۱۱) و سندرم داون (۱۲)، آرتریت روماتوئید جوانان (۱۳)، نارسایی مزمن کلیه CRF (Chronic Renal Falure) (۱۴)، دیسپلازی اسکلتی (۱۵)، فیبروز کیستیک (۱۶)، کوتاهی قد به‌واسطه استروئید (۱۷)، بیماری التهاب روده (۱۸)، معکوس کردن عوارض جانبی کهولت سن (۱۹) و استفاده توسط ورزشکاران (۲۰) و غیره گزارش شده است.

تولید پروتئین به فاز چرخه سلولی و بیان چندین ژن که به‌مقدار زیادی در فاز G1 بیان می‌شوند از قبیل آن‌هایی که در تکامل ریبوزوم نقش دارند و ژن‌هایی که در ترجمه پروتئین درگیرند بستگی دارد. سلول‌هایی که در انتهای فاز G1 چرخه سلولی متوقف می‌شوند از نظر متابولیکی فعال‌ترند و اندازه بزرگتری نسبت به سلول‌هایی که در این فاز نیستند دارند. به دلایل ذکر شده، فاز G1 چرخه سلولی زمان ایده‌آل برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب در نظر گرفته می‌شود و وقفه در فاز G1 باعث افزایش قابلیت تولید پروتئین در تعدادی از رده‌های سلولی از قبیل CHO و هیبریدوما می‌شود (۲۱). سلول‌های CHO به‌طور گسترده‌ای برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌کار می‌روند. با

Archive of SID

www.SID.ir

این وجود میزان تولید در مقایسه با میزبان‌های پروکاریوتی پایین است. استراتژی‌های گوناگونی در این سلول‌ها برای افزایش میزان تولید به‌کار گرفته شده از قبیل تنظیم دمای کشت، اضافه کردن مواد شیمیایی و مهندسی بیوراکتور (۲۲). از جمله ترکیبات شیمیایی که برای متوقف کردن چرخه سلولی به‌کار می‌رود می‌توان به دی‌متیل‌سولفوکساید و سدیم بوتیرات اشاره کرد (۲۳).

DMSO و گلیسرول ترکیباتی هستند که باعث می‌شوند پروتئین در پیکربندی طبیعی خود پایدار شود و می‌توانند با تاثیر بر فلدینگ پروتئین به‌عنوان چاپرون‌های شیمیایی عمل کنند. همچنین DMSO باعث توقف رشد سلول، جلوگیری از آپوپتوزیس و افزایش تمایز فنوتیپی می‌شود؛ و طبیعت قطبی آن باعث می‌شود بدون این‌که آسیب مهمی به غشای سلول وارد کند وارد سلول شود (۲۴). DMSO باعث توقف چرخه سلولی در فاز G1 می‌شود (۲۲) و با سست کردن واکنش‌های غیرقطبی بین هیستون و کروماتین، سنتز RNA را توسط RNAPol افزایش می‌دهد (۲۵). گلسیرول به‌طور گسترده‌ای در صنعت داروسازی و بیوتکنولوژی به‌عنوان پایدارکننده پروتئین به‌کار می‌رود. گلیسرول به‌عنوان اسمولیت (Osmolyte) می‌تواند باندهای هیدروژنی تشکیل داده و یک لایه‌ی آبی در اطراف مولکول‌های پروتئین تشکیل می‌دهد و باعث افزایش کشش سطحی و ویسکوزیته محلول شده و در نتیجه از تشکیل تجمعات پروتئینی جلوگیری می‌کند. گلیسرول همچنین به‌عنوان چاپرون شیمیایی عمل کرده و تاخوردگی صحیح پروتئین را بهبود می‌بخشد و باعث افزایش سنتز پروتئین می‌شود (۲۵). سدیم بوتیرات، نمک سدیم اسید بوتیریک است که به‌طور گسترده‌ای در کشت سلول‌های CHO نوترکیب به‌منظور افزایش بیان پروتئین خارجی به‌کار می‌رود. یکی از واضح‌ترین تغییراتی که توسط سدیم بوتیرات ایجاد می‌شود استیلاسیون هیستون - داستیلاز است که نتیجه این امر افزایش رونویسی و افزایش بیان پروتئین خارجی است. سدیم بوتیرات همچنین باعث مهار رشد سلول و القای آپوپتوزیس می‌شود. روی به‌عنوان متوقف کننده آپوپتوز در سلول‌های انسانی شناخته می‌شود و پایداری mRNA را افزایش می‌دهد. روی یا توسط تغییر ساختار دوم mRNA و یا توسط افزایش اتصال پروتئین‌های پایدارکننده به آن، باعث افزایش پایداری mRNA می‌شود. همچنین روی به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم، یک یا بیشتر ریبونوکلئازهای مسئول تجزیه mRNA های ناپایدار را مهار می‌کند (۲۶).

در مجموع، افزایش بیان پروتئین می‌تواند به‌طور قابل توجهی باعث کاهش هزینه و زمان در تولید پروتئین‌های درمانی شود. به‌همین منظور و با توجه به اهمیت این هورمون در زمینه پزشکی و زیست فناوری بهینه سازی تولید هورمون رشد در سلول‌های CHO حائز اهمیت است. با توجه به نقش گسترده و اهمیت فیزیولوژیک هورمون رشد و اینکه کشور ما هنوز از نظر دارا بودن این هورمون وابسته می‌باشد و با توجه به اینکه تولید این هورمون جزء اولویت‌های درجه یک وزارت بهداشت قرار گرفته است، به‌نظر می‌رسد نیازمند تلاش گسترده در جهت رفع نیازهای ملی و رسیدن به پایه‌های اساسی علمی و عملی در زمینه تولید محصول و تجاری سازی آن به‌منظور اهداف درمانی و بیوتکنولوژیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی: در این مطالعه تجربی به‌منظور تولید و بهینه سازی هورمون رشد انسانی، پلازمید pSeqTag حاوی ژن hGH تحت کنترل پروموتور سایتومگالوویروس (CMV) به‌صورت پایدار به داخل سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) ترانسفکت شده و کلون پایدار از سلول‌های تولید کننده rhGH توسط اضافه کردن آنتی بیوتیک جنتیسین به محیط کشت سلولی انتخاب شدند. به منظور رشد سلول‌ها، از محیط Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Hams F12 (DMEM/Ham's F12) (از شرکت GIBCO، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum) (از شرکت GIBCO، آمریکا)، ۱ درصد مخلوط آنتی بیوتیک پنی-سیلین-استرپتومایسین (Sigma، آمریکا) استفاده شد؛ و بعد از رشد سلول‌ها به‌منظور برطرف کردن مداخلات سرم در فرآیندهای پایین دستی از قبیل خالص‌سازی، از محیط فاقد سرم SFM (Serum Free Media) حاوی گلوتامکس (Sigma، آمریکا) ، پلورونیک (Pluronic-F68) (Sigma، آمریکا) و سدیم بی‌کربنات (Merck، آلمان) استفاده شد.

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در سلول‌های CHO: بعد از انتخاب کلون پایدار از سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلازمید حاوی ژن GH توسط اضافه کردن آنتی‌بیوتیک جنتیسین (Sigma، آمریکا) با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت سلول‌ها، به‌منظور تولید GH، این سلول‌ها در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

سرم در فلاسک کشت سلولی (25 cm2 T flask) و در شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت قرار داده شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها به‌منظور بررسی تولید GH برداشت شد. به‌منظور اثبات تولید GH توسط این سلول‌ها، سلول‌های طبیعی CHO که با این پلازمید ترانسفکت نشده‌اند، به‌عنوان کنترل منفی در شرایط کاملا مشابه با سلول‌های ترانسفکت شده، کشت داده شدند و محیط رویی این سلول‌ها نیز برای آنالیزهای بعدی برداشت شد.

بهینه‌سازی تولید rhGH در سلول‌های CHO در محیط فاقد سرم: این آزمایش در پلیت کشت سلولی ۱۲ خانه و با تکرار سه تایی انجام شد. برای انجام این آزمایش بعد از شمارش سلول‌ها، به هر چاهک Cell/ml ۱×۱۰۵ حاوی محیط کشت DMEM/Ham's F12 و ۱۰ درصد سرم اضافه شد و به‌صورت شبانه در انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حاوی رطوبت قرار داده شد تا سلول‌ها در این شرایط رشد کرده و به تراکم ۸۰ درصد برسند؛ سپس محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و پس از دو بار شستشو با فسفات بافر نمکی (PBS) (CMG، ایران) به‌صورت جداگانه و باتکرار سه تایی محیط SFM حاوی مواد افزاینده گلیسرول و دی‌متیل-سولفوکساید (DMSO) (Sigma، آمریکا) با غلظت‌های ۰ تا ۲ درصد، سدیم بوتیرات با غلظت ۰ تا ۴۰۰ میکرومول (Sigma، آمریکا) و سولفات روی (Merck، آلمان) با غلظت۰ تا ۴۰۰ میکرومول به محیط کشت اضافه و به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از سپری شدن این زمان محیط رویی سلول‌ها برداشت شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

انجام دات بلات به‌منظور بررسی نسبی میزان rhGH: دات بلات (Dot Blot) یک تست سریع برای بررسی میزان نسبی پروتئین در نمونه می‌باشد. در این تحقیق به‌منظور بررسی اولیه تولید هورمون رشد در سلول‌های CHO تست دات بلات انجام شد. برای این منظور محیط کشت رویی سلول‌ها برداشت شد و از طریق لیوفیلیزاسیون نمونه‌ها غلیظ شدند و همراه با غلظت‌های مختلف نمونه‌های کنترل مثبت به‌صورت لکه‌های دایره‌ای کوچک هر کدام به مقدار ۳ میکرولیتر روی غشای نیتروسلولز قرار داده شدند. بعد از لکه گذاری نمونه‌ی مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی روی کاغذ نیتروسلولز، برای انجام تست دات بلات مراحل زیر به‌ترتیب طی شد:

قرار دادن کاغذ نیتروسلولز در محلول بلاکینگ حاوی PBS و Skim Milk به‌منظور بلوکه کردن سطح کاغذ نیتروسلولز، شستشوی کاغذ نیتروسلولز توسط محلول حاوی PBS و Tween 20؛ انکوباسیون در محلول حاوی Skim Milk و آنتی بادی ضد هورمون رشد انسانی (10A7 anti- GH Antibody)؛ تکرار مرحله شستشو، انکوباسیون در محلول حاوی Skim Milk و آنتی بادی Anti-IgG کونژوگه با HRP (sheep anti-mouse IgG1 HRP)، تکرار مرحله شستشو؛ پوشاندن سطح کاغذ نیتروسلولز توسط محلول ECL (CMG، ایران)، بررسی بیان GH توسط فیلم رادیولوژی در اتاق تاریک.

نمونه‌ی کنترل مثبت شامل رقت‌های مختلف از هورمون رشد تجاری بوده و به‌عنوان کنترل منفی PBS بارگذاری شد. نتیجه تست دات بلات در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی غلظت rhGH تولید شده به‌روش الایزا: به‌منظور بررسی تولید هورمون رشد انسانی در سلول‌های CHO از روش اختصاصی ساندویچ الایزا استفاده شد. برای این منظور به‌هر چاهک پلیت ۹۶ خانه الایزا آنتی بادی اولیه ضد GH اضافه شد و پلیت الایزا یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سه بار شستشو با بافر PBS-T پلیت به‌صورت شبانه بلاکه شد و مجددا پس از ۳ مرتبه شستشو با بافر PBS-T غلظت‌های استاندارد با استفاده از هورمون رشد تجاری در PBS تهیه شدند و همراه با نمونه‌های پروتئین به‌صورت دوتایی به چاهک‌ها اضافه و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس آنتی‌بادی ثانویه ضد GH نشاندار با بیوتین به‌هر چاهک اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و سه مرحله شستشو با بافر PBS-T، HRP-Streptavidin به‌هر چاهک اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر TMB به هر چاهک اضافه و زمانی‌که تغییر رنگ مناسبی ایجاد شد، محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک 1N) به هر چاهک اضافه و جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

تعیین وزن مولکولی rhGH تولید شده به کمک روش وسترن بلات: ایمونوبلاتینگ یا وسترن بلاتینگ روشی دو مرحله ای است که طی آن ابتدا باندهای پروتئینی جدا شده به‌وسیله الکتروفورز از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که غالبا از جنس نیتروسلولز می‌باشد انتقال می‌یابند و در مرحله دوم توسط آنتی بادی اختصاصی، پروتئین مورد نظر شناسایی

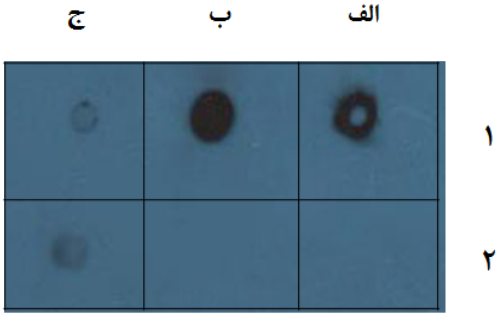
Archive of SID
www.SID.ir

می‌شود. در این مرحله با استفاده از کیت وسترن بلاتینگ (شرکت CMG، ایران) وسترن بلات انجام شد و وزن مولکولی و خلوص rhGH تولید شده مورد بررسی قرار گرفت و با نمونه تجاری آن مورد مقایسه قرار گرفت.

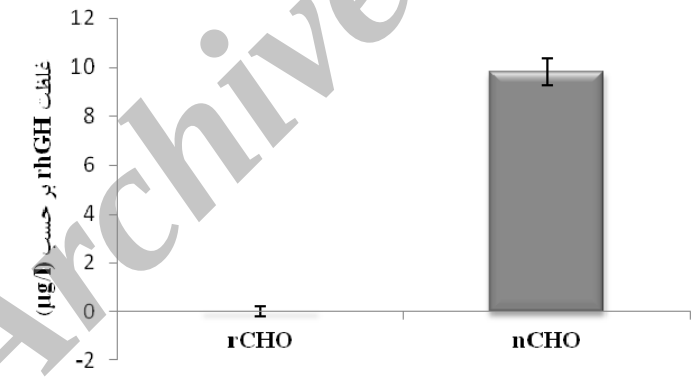
قبل از انجام وسترن بلاتینگ، ۴۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی سلول‌های CHO توسط همین حجم از بافر نمونه (sample buffer) رقیق شد. سپس نمونه‌ها به ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد منتقل شدند. پروتئین‌ها روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد جدا شده سپس به‌مدت ۹۰ دقیقه در ۴۰ ولت توسط بافر ترانسفر به غشای نیتروسلولز منتقل شدند. بقیه مراحل همانند آزمایش تست بلات انجام گرفت.

نتایج

به‌منظور اثبات تولید هورمون رشد انسانی توسط سلول‌های CHO ابتدا تولید rhGH از طریق مقایسه با حالت کنترل منفی (سلول‌های CHO ترانسفکت نشده) از طریق دات بلات (شکل ۱) و تست الایزا (نمودار ۱) بررسی و اثبات گردید. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود نتایج الایزا نشان‌دهنده تولید rhGH در سلول‌های CHO و عدم تولید آن در سلول‌های ترانسفکت نشده می‌باشد.



شکل ۱: تصویر دات بلات به‌منظور بررسی اولیه تولید rhGH در سلول‌های CHO، تصویر دات بلات نمونه‌های کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه مجهول؛ الف۱: استاندارد (غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر)؛ ب۱: استاندارد (غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)؛ ج۱: استاندارد (غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)؛ الف۲: استاندارد (غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر)؛ ب۲: محیط رویی سلول‌های nCHO (non-transfected CHO) به‌عنوان کنترل منفی؛ ج۲: محیط رویی سلول‌های rCHO (recombinant CHO) ترانسفکت شده با ژن هورمون رشد انسانی.



rCHO: recombinant CHO cells
nCHO: native CHO cells (Non-transfected)

نمودار ۱: بررسی تولید rhGH از طریق مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده به روش الایزا: مقایسه غلظت rhGH در محیط کشت سلول‌های rCHO و nCHO به‌روش الایزا: نشان دهنده‌ی عدم وجود rhGH در محیط کشت سلول ترانسفورم نشده nCHO و تولید این هورمون در سلول‌های ترانسفکت شده‌ی rCHO است.
Error bar نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.

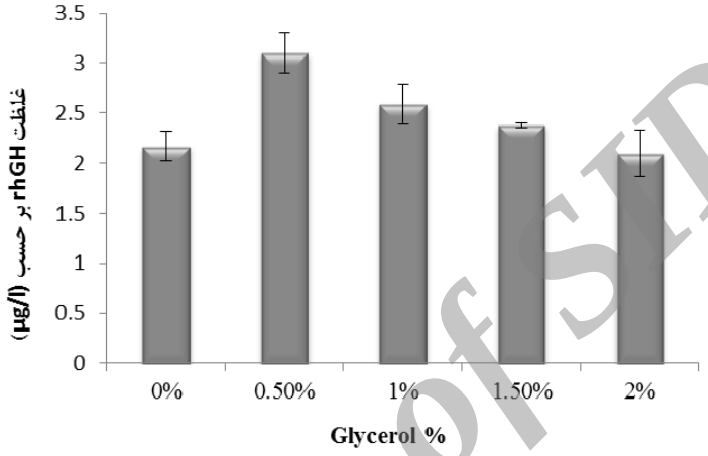
تست دات بلات: به‌منظور یک بررسی اولیه برای تولید GH در سلول‌های CHO تست دات بلات انجام شد، نمونه‌های کنترل مثبت شامل رقت‌های مختلفی از هورمون رشد تجاری است که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، دقت این آزمایش تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از غلظت نمونه‌های کنترل مثبت را تشخیص می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده تولید GH در محیط رویی سلول‌های CHO نیز توسط تست دات بلات تائید شد.

Archive of SID

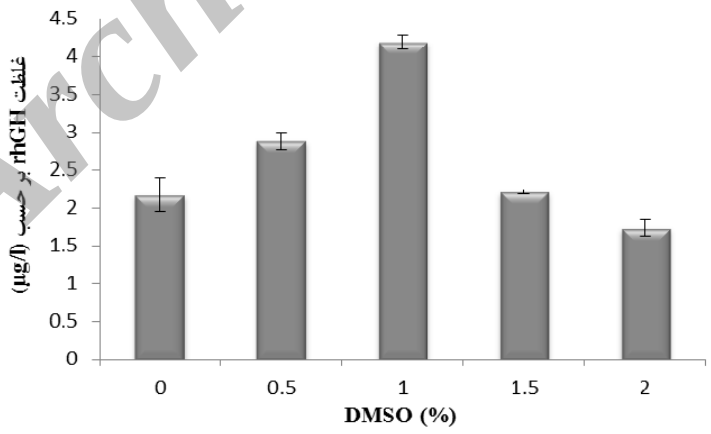
www.SID.ir

سپس به‌منظور بررسی بهینه‌سازی تولید hGH با افزودن ترکیبات شیمیایی، میزان hGH تولید شده در محیط رویی این سلول‌ها از طریق سنجش با الایزا بررسی شد. همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول بر تولید rhGH توسط سلول‌های CHO نشان‌دهنده تاثیر مثبت گلیسرول بر روند تولید است که غلظت ۰,۵ درصد موثرترین غلظت بر تولید rhGH شناخته شد. نمودار ۳ نشان دهنده تاثیر DMSO بر تولید rhGH را نشان می‌دهد که DMSO نیز در غلظت ۱ درصد با تاثیر مثبت بر روند تولید باعث افزایش دوبرابری در تولید rhGH گردید. نتایج الایزای تاثیر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر تولید rhGH در سلول‌های CHO تاثیر مثبت این ماده بر روند تولید را اثبات کرد و غلظت ۵۰ میکرومول به عنوان موثرترین غلظت نشان داده شد (نمودار ۴).

همچنین سدیم بوتیرات نیز در غلظت ۱ میلی‌مول باعث افزایش در تولید rhGH نسبت به حالت کنترل گردید (نمودار۵).



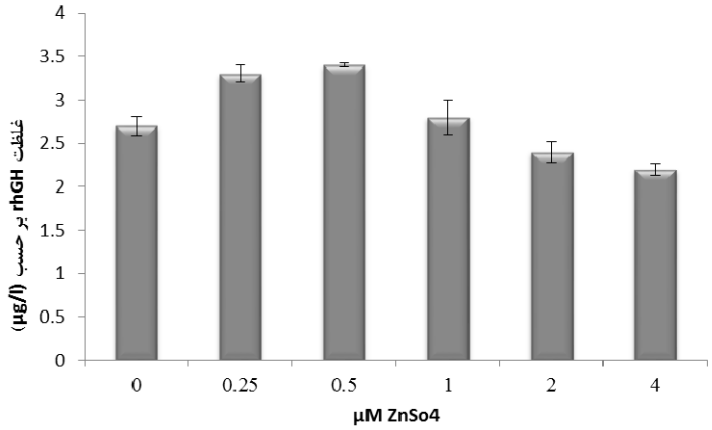
نمودار ۲: مقاسیه میزان GH تولید شده در غلظت های مختلف گلیسرول به‌روش الایزا: نمودار بررسی اثر گلیسرول بر میزان تولید rhGH توسط سلول‌های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۰/۵ درصد به‌عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH. Error bar نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.



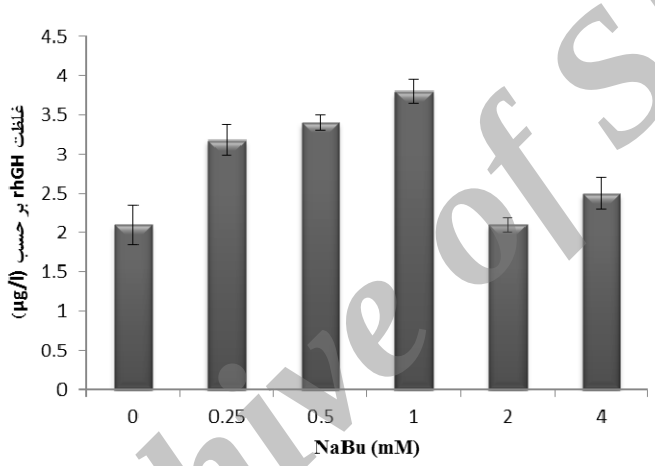
نمودار ۳: مقاسیه میزان GH تولید شده در غلظت های مختلف DMSO به‌روش الایزا: نمودار بررسی اثر گلیسرول بر میزان تولید rhGH توسط سلول‌های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۱ درصد به‌عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH. Error bar نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

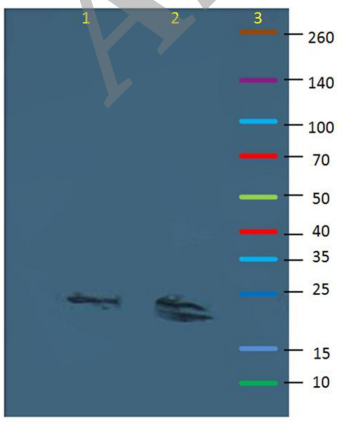


نمودار ۴: مقایسه میزان GH تولید شده در غلظت‌های مختلف سولفات روی به‌روش الایزا: نمودار بررسی تاثیر سولفات روی بر میزان تولید rhGH توسط سلول‌های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۵۰ میکرومول به‌عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH Error bar نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.



نمودار ۵: مقایسه میزان GH تولید شده در غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات به‌روش الایزا: نمودار بررسی تاثیر سولفات روی بر میزان تولید rhGH توسط سلول‌های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۱ میلی‌مول به‌عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH Error bar نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد، نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.

تست وسترن بلات: پس از بررسی کمی میزان rhGH در نمونه‌هایی که به‌طور نسبی خالص سازی و تغلیظ شده بودند، به‌منظور بررسی وزن مولکولی rhGH تولید شده، تست وسترن بلات انجام شد. الکتروفورز پروتئین در ژل ۱۲ درصد انجام و برای این تکنیک از آنتی بادی ضد GH استفاده شد. با توجه به اینکه وزن مولکولی هورمون رشد ۲۲ کیلودالتون است، همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است هورمون رشد نوترکیب تولید شده بین دو نشانگر ۱۵ و ۲۵ کیلودالتون قرار گرفته است که نشان می‌دهد وزن مولکولی هورمون رشد تولید شده صحیح است.



شکل ۲: نتایج حاصل از وسترن بلات به منظور تعیین وزن مولکولی rhGHتولید شده، وسترن بلات نمونه‌های GH تجاری و rhGH تولید شده: ۱) مارکر پروتئینی، ۲) هورمون رشد تجاری، ۳) نمونه rhGH تولید شده.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

هورمون رشد انسانی یک پروتئین ترشحی تک رشته‌ای است که از سلول‌های غده هیپوفیز همه مهره‌داران ترشح می‌شود و نقش مهمی در رشد ایفا می‌کند. به‌علت فعالیت‌های زیستی مهم و متنوع هورمون رشد، این هورمون دارای کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی و بیوتکنولوژی می‌باشد. رده سلولی پستانداران به‌خاطر توانایی در ایجاد فلدینگ و اصلاحات پس از ترجمه ضروری برای فعالیت زیستی درون سلول، اغلب به‌عنوان سیستم نوترکیب برای تولید مواد دارویی استفاده می‌شوند. زمانی‌که یک پروتئین در سلول‌های پستانداران بیان می‌شود در مقایسه با زمانی‌که در سایر میزبان‌ها از جمله باکتری‌ها، گیاهان و مخمر بیان می‌شود کیفیت و اثر بهتری دارد. با این وجود بهره‌وری اختصاصی این سلول‌ها در مقایسه با سیستم‌های تولید در میزبان‌های پروکاریوتی پایین باقی مانده است. به همین منظور و برای غلبه بر این مشکل روش‌های مختلفی برای بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب در سلول‌های پستانداران که دارای کاربرد قابل توجهی در تولید و ساخت پلی پپتیدهای درمانی هستند در نظر گرفته شده است. افزایش بیان پروتئین می‌تواند به‌طور قابل توجهی باعث کاهش هزینه و زمان تولید پروتئین‌های نوترکیب شود. سلول‌هایCHO سیستم ارجح برای تولید پروتئین‌های نوترکیب برای استفاده درمانی در مقیاس وسیع هستند زیرا این سلول‌ها به‌سرعت رشد می‌کنند، به آسانی ترانسفکت می‌شوند و می‌توانند اصلاحات پیچیده پس ازترجمه مورد نیاز برای فعالیت زیستی را انجام دهند. همچنین این سلول‌ها برای تولید داروهای نوترکیب ایمن هستند و به همین دلیل قابل اعتمادند. در این تحقیق هدف بهینه سازی تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب به‌کمک سلول‌های CHO می‌باشد که به این منظور سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلازمید حاوی ژن هورمون رشد کشت داده می‌شود و در شرایط مختلف به‌منظور افزایش سطح تولید، تولید هورمون رشد را القا می‌کنیم تا در صورت به‌دست آوردن مقدار بهینه، مقدمه ای برای تولید در مقیاس صنعتی فراهم شود. به این دلیل که GH از سلول‌های CHO به محیط کشت سلولی ترشح می‌شود، ابتدا تولید هورمون رشد در سلول‌های ترانسفکت شده از طریق بررسی محیط رویی این سلول‌ها با سلول‌های کنترل (ترانسفکت نشده) توسط تکنیک الایزا و دات بلات اثبات شد. مقادیر بسیار ناچیز هورمون رشد در محیط کشت سلول‌های فاقد پلازمید به‌دلیل وجود سرم در محیط کشت است، به این دلیل که سرم مخلوط بسیار پیچیده‌ای حاوی مواد مختلف از جمله فاکتورهای رشد، پروتئین‌های حامل، عناصر ضروری و هورمون‌ها مثل هورمون رشد و غیره است. سرم برای نگه‌داری، تکثیر و تمایز سلول‌های انسانی و حیوانی در محیط کشت لازم است؛ ولی با این وجود استفاده از سرم به چندین دلیل چالش برانگیز است که از آن جمله می‌توان به هزینه بالا، مداخله در خالص سازی محصولات نوترکیب و امکان آلودگی‌های ویروسی اشاره کرد. به همین دلیل در این تحقیق سعی بر این بوده است که پروتئین نوترکیب در محیط فاقد سرم تولید شود.

محققان تاثیر سرم، گلیسرول و دما را بر میزان تولید rhGH بررسی کردند و مشخص گردید گلیسرول ۱ درصد، سرم ۱۰ درصد و دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد سطوح مناسب برای افزایش میزان تولید پروتئین هستند (۲۷). در پژوهشی دیگر تاثیر DMSO بر بیان ژن‌های خارجی در سلول‌های CHO نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد غلظت ۱ درصد DMSO، باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود. همچنین در این پژوهش تاثیر هم‌زمان پنتانوئیک اسید (۱ mM) و DMSO (۱ درصد) بر تولید پروتئین فیوژن CH0 -NTHU-108 تعیین شد و مشاهده شد میزان بیان ۲/۸ برابر افزایش یافت در حالی‌که در حضور هر یک از این دو ماده به تنهایی، میزان بیان ۱/۶ برابر افزایش می‌یافت (۲۸). Rodrigues و همکارانش (۳۱) تاثیر DMSO، گلیسرول، سدیم بوتیرات و دما را بر میزان تولید اینترفرون بتا توسط سلول‌های CHO بررسی کردند؛ در این آزمایش مشخص شد دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با بیشترین تاثیر باعث افزایش ۴ برابری در میزان تولید می‌شود، DMSO میزان تولید را ۲ برابر، سدیم بوتیرات افزایش ۳ برابری و گلیسرول میزان تولید را ۰/۸۵ برابر افزایش می‌دهد (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر میزان سرم محیط کشت، سدیم بوتیرات و سولفات روی بر میزان تولید اینترفرون بتا بررسی شد و مشخص شد حضور هر یک از این ترکیبات را ۲ تا ۸ برابر افزایش می‌دهد اما زمانی‌که این ترکیبات به‌صورت هم‌زمان به محیط کشت افزوده می‌شوند میزان تولید افزایش بیشتری خواهد داشت (۳۰). Rodrigues و همکارانش (۳۱) تاثیر سدیم بوتیرات را بر میزان تولید پرولاکتین انسانی نوترکیب در سلول‌های CHO بررسی نمودند و مشاهده کردند در غلظت ۱ درصد از این ترکیب تولید افزایش خواهد یافت. Liu و Chen (۳۲) مشاهده کردند در غلظت ۱ درصد این ماده تولید M-CSF

www.SID.ir
Archive of SID

نوترکیب در سلول‌های CHO افزایش خواهد یافت.

DMSO و سدیم بوتیرات باعث توقف رشد سلول در فاز G1 و افزایش رونویسی و بیان پروتئین خارجی می‌شوند. گلیسرول نیز به‌عنوان چاپرون شیمیایی عمل کرده و فلدینگ صحیح پروتئین را بهبود می‌بخشد و باعث افزایش سنتز پروتئین می‌شود. روی به‌عنوان متوقف کننده آپوپتوزیس در سلول‌های انسانی شناخته می‌شود و پایداری mRNA را افزایش می‌دهد و از این طریق تولید پروتئین افزایش می‌یابد. به این دلیل که فاز G1 چرخه سلولی زمان ایده‌آل برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب در نظر گرفته می‌شود، ابتدا سلول‌ها به محیط حاوی سرم اضافه می‌شوند و پس از این‌که سلول‌ها به تراکم ۸۰ درصد رسیدند بهترین زمان برای افزودن ترکیبات شیمیایی و جایگزین کردن محیط فاقد سرم است. در این مطالعه همانطور که انتظار می‌رفت با افزودن این ترکیبات شیمیایی به محیط کشت بیان پروتئین افزایش و تا حدود دو برابر حالت کنترل رسید.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از بهینه سازی تولید rhGH در CHO نشان دهنده‌ی این مطلب بود که همه‌ی فاکتورهای انتخاب شده تاثیر مثبت بر میزان تولید rhGH داشتند. فاکتور گلیسرول در غلظت ۰/۵ درصد بیشترین تاثیر بر میزان تولید را داشت و موثرترین غلظت برای فاکتورهای DMSO، سدیم بوتیرات و سولفات روی به ترتیب ۱ درصد، ۱میلی‌مولار و ۵۰ میکرومولار بود. بیشترین میزان تولید مربوط به فاکتور DMSO است که این فاکتور میزان تولید rhGH را حدود ۲ برابر نسبت به حالت کنترل افزایش داده است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر نتیجه قسمتی از طرح پژوهشی با شماره ۹۰/۲۶۵۶۶۰ مصوب کمیته زیست فناوری دانشگاه اصفهان می‌باشد. مولفین از حمایت‌های کمیته زیست فناوری، گروه زیست‌شناسی و دانشگاه اصفهان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting.Chemical Engineering Progress. 2007; 103: 40-48.

2. Ferruzza S, Rossi C, Sambuy Y, Scarino ML. Serum-reduced and serum-free media for differentiation of Caco-2 cells. ALTEX. 2013; 30: 159-68.

3. Zhan X, Giorgianni F, Desiderio DM. Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. Proteomics. 2005; 5(5): 1228-41.

4. Vance ML, Mauras N. Growth hormone therapy in adults and children. N Engl J Med. 1999; 341(16): 1206-16.

5. Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD, Goodman HM. Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science. 1979; 167(10): 602-7.

6. de Boer H, Blok GJ, Voerman B, de Vries P, et al. The optimal growth hormone replacement dose in adults, derived from bioimpedance analysis. J ClinEndocrinolMetab. 1995; 80: 2069-76.

7. Finkelstein BS, Imperiale TF, Speroff T, Marrero U, et al. Effect of growth homrone therapy on height in children with idiopathic short stature: a meta-analysis. Arch PediartAdolesc Med. 2002; 156: 230-40.

8. Sybert VP. Adult height in Turner syndrome with and without androgen therapy. J Pediatr. 1984; 104: 365-9.

9. Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Allen DB. Benefits of long-term GH therapy in Prader-Willi syndrome: a 4-year study. J ClinEndocrinolMetab. 2002; 87(4): 1581-5.

10. Rizzo V, Traggiai C, Stanhope R. Growth hormone treatment does not alter lowers limb asymmetry in children with Russell-Silver syndrome. Horm Res. 2001; 156(3-4): 114-6.

11. MacFarlane CE, Brown DC, Johnston LB, Patton MA, et al. Growth hormone therapy and growth in children with Noonan's syndrome: results of 3 year's follow-up. J ClinEndocrinolMetab. 2001; 86: 1953-6.

12. Anneren G, Sara VR, Hall K, Tuvemo T. Growth and somatomedin responses to growth hormone in Down's syndrome. Arch Dis Child. 1986; 61(1): 48-52.

13. Simon D, Prieur A, Czernichow P. Treatment of juvenile rheumatoid arthritis with growth hormone. Horm Res. 2000; 53(3): 82-6.

14. Koch VH, Lippe BM, Nelson PA, Boechat MI, et al. Accelerated growth after recombinant human

Archive of SID

www.SID.ir

growth hormone treatment of children with chronic renal failure. J Pediatr. 1989; 115(3): 365-71.

15. Bridges NA, Hindmarsh PC, Brook CG. Growth of children with hypochondroplasia treated with growth hormone for up tothree years. Horm Res. 1991; 36: 56-60.

16. Hardin DS, Sy JP. Effects of growth hormone treatment in children with cystic fibrosis: the National Cooperatve Growth Study experience. J Pediatr. 1997; 131: S65-9.

17. Key LL Jr, Gross AJ. Response to growth hormone in children with chondrodysplasia. J Pediatr. 1996; 128: S 14-7.

18. Henker J. Therapy with recombinant growth hormone in children with Crohn disease and growth failure. Eur J Pediatr. 1996; 155(12): 1066-7.

19. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. N Engl J Med. 1990; 323(1): 1-6.

20. Rickert VI, Pawlak-Morello C, Sheppard V, Jay MS. Human growth hormone: a new substance of abuse among adolescents. ClinPediatr. 1992; 31:723-6.

21. Kumar N, Gammell P, Clynes M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture: A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. Cytotechnology. 2007; 53(1-3):33-46.

22. Liu CH, Chen LH. Enhanced recombinant M-CSF production in CHO cells by glycerol addition: model and validation. Cytotechnology. 2007; 54:89-96.

23. Reddy P. Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells. BiotechnolBioeng. 2008; 100:1193-204.

24. Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, Butler M. Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions. BiotechnolProg. 2005; 21:22-30.

25. Ling WL, Deng L, Lepore J, Cutler C, et al. Improvement of monoclonal antibody production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide. BiotechnolProg. 2008; 19:158-62.

26. Zuqueli R, Prieto C, Etcheverrigaray M, Kratje R. Effect of sodium butyrate and zinc sulphate supplementation on recombinant human IFN-β production by mammalian cell culture. Latin American Applied Research. 2006; 36: 321-7.

27. Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M. The effect of different media composition and temperatures on the production of recombinant human growth hormone by CHO cells. Research in Pharmaceutical Sciences . 2013; 8(3): 211-217.

28. Liu C-H, Chu M-C, Hwang S-M. Enhanced expression of various exogenous genes in recombinant Chinese hamster ovary cells in presence of dimethyl sulfoxide. Biotechnology Letters. 2001; 23(20): 1641-1645.

29. Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, Butler M. Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnology* Progress. 2005; 21: 22-30.

30. Zuqueli R, Prieto C, Etcheverrigaray M, Kratje R. Effect of sodium butyrate and zinc sulphate supplementation on recombinant human IFN-β production by mammalian cell culture Latin American applied research. 2006; 36: 321-327.

31. Rodrigues Goulart H, Arthuso Fdos S, Capone MV, de Oliveira TL, et al. Enhancement of human prolactin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. J Biomed Biotechnology. 2010; 405872.

32. Liu CH, Chen LH. Enhanced recombinant M-CSF production in CHO cells by glycerol addition: model and validation. Cytotechnology. 2007; 54: 89-96.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2015; 6(1): 97-106

Enhanced Production of Human Growth Hormone in CHO Cells through the Control of Culture Conditions

Aghili ZS, MSc. [1], Zarkesh-Esfahani SH, Ph.D. [2*]

1. Department of Biotechnology, Faculty of advanced Sciences and technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

Received: 30 Jan. 2014 Accepted: 30 Sep. 2014

Abstract

Aim: The purpose of this study was enhancement of hGH synthesis by chemical components addition to Serum-Free CHO cells culture and investigate the characteristics of produced hGH.

Material and Method: The effects of different treatments including various concentrations of glycerol, DMSO, NaBu and ZnSO4 in CHO cells were investigated and the GH production was assessed using ELISA method. Cells are seeded into each well of a 12 well plate containing DMEM-F12 and 10% FBS. After 24 hours, media was aspirated and replaced with SFM and treatment with different concentrations of chemicals and rhGH production was assessed using ELISA, dot blotting and western blotting.

Results: Concentrations of 1%DMSO, 0.5% Glycerol, 1mM NaBu and 50 μM ZnSO4 were caused to elevate the expression of rhGH in the CHO cells.

Conclusion: These findings indicate that control of culture aid to development of an efficient large-scale and industrial process for the production of rhGH.

Keywords: Chinese hamster ovary (CHO) cell, Human growth hormone (hGH), Serum Free Media

Archive of SID

www.SID.ir