

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

زهرا سادات عقیلی^۱، M.Sc.، سید حمید زرکش اصفهانی^{۲*} Ph.D.

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 پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۹

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 به روش الیزا سنجیده شد. سلول‌ها به هر چاهک یک پلیت ۱۲ خانه حاوی DMEM-F12 و FBS ۱۰ 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 و تولید rhGH با استفاده از الیزا، 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 مولار سولفات 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 نو ترکیب (rhGH)، محیط فاقد سرم

مقدمه

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 اسیدآمینو است و دارای دو باند دی‌سولفیدی است که یک باند بین سیستمین شماره ۵۳ و سیستمین ۱۶۵ است که باعث تشکیل یک لوپ بزرگ در مولکول می‌شود. و باند دیگر بین سیستمین شماره ۱۸۲ و سیستمین 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 (Chronic Renal Failure) (۱۴)، دیسپلازی اسکلتی (۱۵)، فیروز 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

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 این که 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 چسبیده 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 نهایتاً ممکن است به انسان منتقل شود، اجازه رشد و تکثیر دهد. اثبات شده است که سلول‌های CHO، میزبان‌های ایمن برای تولید مواد دارویی هستند. در مطالعه‌ای مشخص شد که ۴۴ ویروس بیماری‌زای انسان که از جمله ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV (Human Immunodeficiency Virus)، 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 ملاحظات اخلاقی، علمی، ایمنی و اقتصادی معایبی نیز دارد. که از آن جمله می‌توان به آسیب به جنین‌های گاوی، آلودگی‌های ویروسی، هزینه بالا، مداخله در

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 سلول های 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 خالص سازی، 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 نو ترکیب در سلول های CHO.

بعد از انتخاب کلون پایدار از سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلازمید حاوی ژن GH توسط اضافه کردن آنتی بیوتیک جنتیسین (Sigma، آمریکا) با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به محیط کشت سلول‌ها، به‌منظور تولید GH، این سلول‌ها در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰ درصد

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 این که 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). گلیسرول 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 نو ترکیب 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 ریبونوکلازهای مسئول تجزیه mRNA های ناپایدار را مهار می‌کند (۲۶).

قرار دادن کاغذ نیتروسلولوز در محلول بلاکینگ حاوی PBS و Skim Milk به منظور بلوکه کردن سطح کاغذ نیتروسلولوز، شستشوی کاغذ نیتروسلولوز 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) و آنتی بادی HRP (IgG1)، تکرار مرحله شستشو؛ پوشاندن سطح کاغذ نیتروسلولوز 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 به عنوان کنترل منفی PBS بارگذاری شد. نتیجه تست دات بلات در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی غلظت rhGH تولید شده به روش الایزا: به منظور بررسی تولید هورمون رشد انسانی در سلول‌های CHO از روش اختصاصی ساندویچ الایزا استفاده شد. برای این منظور به هر 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 به صورت شبانه بلاکه شد و مجدداً 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 به صورت دوتایی به چاهک‌ها اضافه و به مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس آنتی‌بادی ثانویه ضد GH نشاندار با بیوتین به هر چاهک اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و سه مرحله شستشو با بافر PBS-T، HRP-Streptavidin به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر TMB به هر چاهک اضافه و زمانی که 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 مرحله‌ای است که طی آن ابتدا باندهای پروتئینی جدا شده به وسیله الکتروفورز از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که غالباً از جنس نیتروسلولوز می‌باشد انتقال می‌یابند و در مرحله دوم توسط آنتی بادی اختصاصی، پروتئین مورد نظر شناسایی

سرم در فلاسک کشت سلولی (25 cm² T flask) و در شرایط ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت قرار داده شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها به منظور بررسی تولید GH برداشت شد. به منظور اثبات تولید GH توسط این سلول‌ها، سلول‌های طبیعی CHO که با این پلازمید ترانسفکت نشده‌اند، به عنوان کنترل منفی در شرایط کاملاً 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

فازد 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 ۱×۱۰^۵ Cell/ml حاوی محیط کشت DMEM/Ham's F12 و ۱۰ درصد سرم اضافه شد و به صورت شبانه در انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی‌اکسید 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) به صورت جداگانه و با تکرار 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 غلظت ۰ تا ۴۰۰ میکرومول به محیط کشت اضافه و به مدت 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.

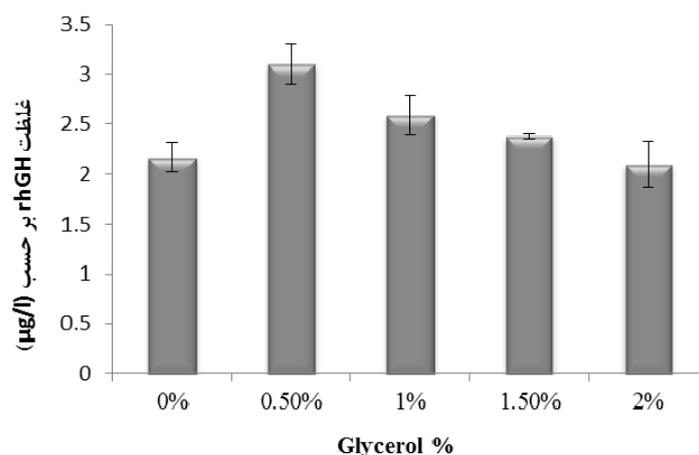
انجام دات بلات به منظور بررسی نسبی میزان rhGH: دات

بلات (Dot Blot) یک تست سریع برای بررسی میزان نسبی پروتئین در نمونه می‌باشد. در این تحقیق به منظور 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 به صورت لکه‌های دایره‌ای کوچک هر کدام به مقدار ۳ میکرولیتر روی غشای نیتروسلولوز قرار داده شدند. بعد از لکه گذاری نمونه‌ی مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی روی کاغذ نیتروسلولوز، برای انجام تست دات بلات مراحل زیر به ترتیب طی شد:

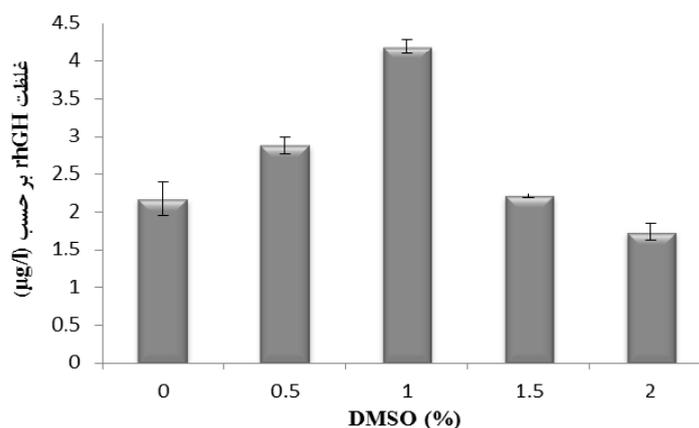
که DMSO نیز در غلظت ۱ درصد با تاثیر مثبت بر روند تولید باعث افزایش دوبرابری در تولید rhGH گردید. نتایج الایزای تاثیر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر تولید rhGH در سلول‌های CHO تاثیر مثبت این ماده بر روند تولید را اثبات کرد و غلظت ۵۰ میکرومول به عنوان موثرترین غلظت نشان داده شد (نمودار ۴).

همچنین سدیم بوتیرات نیز در غلظت ۱ میلی‌مول باعث افزایش در تولید rhGH نسبت به حالت کنترل گردید (نمودار ۵).

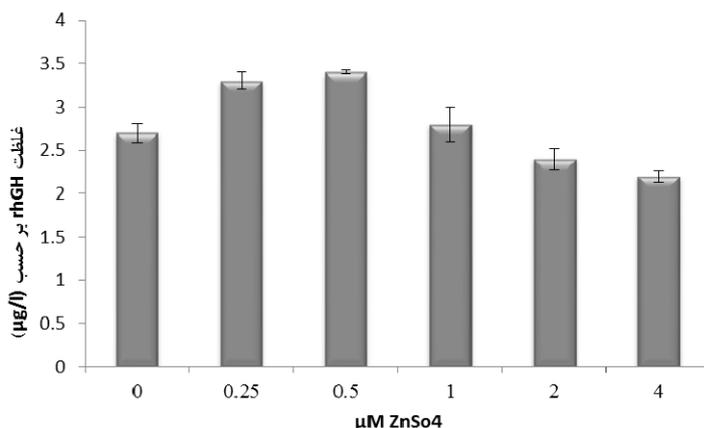
سپس به منظور بررسی بهینه‌سازی تولید hGH با افزودن ترکیبات شیمیایی، میزان hGH تولید شده در محیط رویی این سلول‌ها از طریق سنجش با الایزا بررسی شد. همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول بر تولید rhGH توسط سلول‌های CHO نشان‌دهنده تاثیر مثبت گلیسرول بر روند تولید است که غلظت ۰٫۵ درصد موثرترین غلظت بر تولید rhGH شناخته شد. نمودار ۳ نشان‌دهنده تاثیر DMSO بر تولید rhGH را نشان می‌دهد



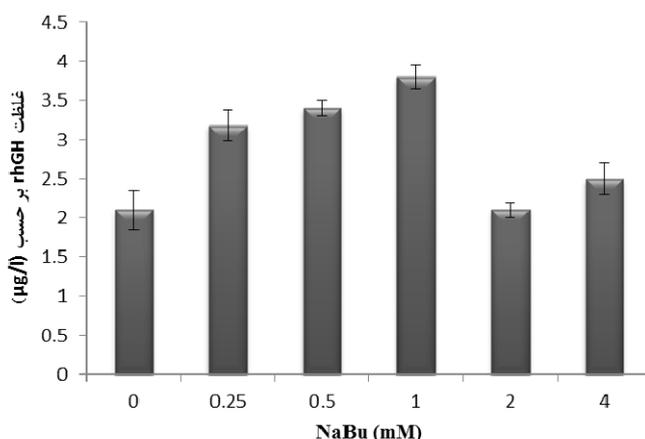
نمودار ۲: مقایسه میزان GH تولید شده در غلظت‌های مختلف گلیسرول به روش الایزا: نمودار بررسی اثر گلیسرول بر میزان تولید rhGH توسط سلول‌های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۰٫۵ درصد به عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH. Error bar نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.



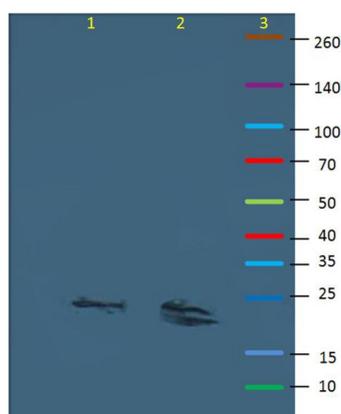
نمودار ۳: مقایسه میزان GH تولید شده در غلظت‌های مختلف DMSO به روش الایزا: نمودار بررسی اثر گلیسرول بر میزان تولید rhGH توسط سلول‌های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۱ درصد به عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH. Error bar نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می‌باشد.



نمودار ۴: مقایسه میزان GH تولید شده در غلظت های مختلف سولفات روی به روش الیزا: نمودار بررسی تاثیر سولفات روی بر میزان تولید rhGH توسط سلول های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۵۰ میکرومول به عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH. Error bar نشان دهنده انحراف معیار می باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می باشد.



نمودار ۵: مقایسه میزان GH تولید شده در غلظت های مختلف سدیم بوتیرات به روش الیزا: نمودار بررسی تاثیر سولفات روی بر میزان تولید rhGH توسط سلول های rCHO در محیط SFM و مشخص شدن غلظت ۱ میلی مول به عنوان موثرترین غلظت بر میزان تولید rhGH. Error bar نشان دهنده انحراف معیار می باشد. نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر آزمایش می باشد.



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

تست وسترن بلات: پس از بررسی کمی میزان rhGH در نمونه هایی که به طور نسبی خالص سازی و تغلیظ شده بودند، به منظور 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، همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است هورمون رشد نو ترکیب تولید شده بین دو نشانگر ۱۵ و ۲۵ کیلودالتون قرار گرفته است که نشان می دهد وزن مولکولی هورمون رشد تولید شده صحیح است.

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. به علت 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 نو ترکیب برای تولید مواد دارویی استفاده می‌شوند. زمانی که یک پروتئین در سلول‌های پستانداران بیان می‌شود در مقایسه با زمانی که 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 بهینه‌سازی تولید پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب شود. سلول‌های CHO سیستم ارجح برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب برای استفاده درمانی در مقیاس وسیع هستند زیرا این سلول‌ها به سرعت رشد می‌کنند، به آسانی ترانسفکت می‌شوند و می‌توانند اصلاحات پیچیده پس از ترجمه مورد نیاز برای فعالیت زیستی را انجام دهند. همچنین این سلول‌ها برای تولید داروهای نو ترکیب ایمن هستند و به همین دلیل قابل اعتمادند. در این تحقیق هدف بهینه‌سازی تولید هورمون رشد انسانی نو ترکیب به کمک سلول‌های CHO می‌باشد که به این منظور سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلازمید حاوی ژن هورمون رشد کشت داده می‌شود و در شرایط مختلف به منظور افزایش سطح تولید، تولید هورمون رشد را القا می‌کنیم تا در صورت به دست 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 به دلیل 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 نو ترکیب و امکان آلودگی‌های ویروسی اشاره کرد. به همین دلیل در این تحقیق سعی بر این بوده است که پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد غلظت ۱ درصد DMSO، باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود. همچنین در این پژوهش تاثیر هم‌زمان پنتانوتیک اسید (۱ mM) و DMSO (۱ درصد) بر تولید پروتئین فیوزن CH0-NTHU-108 تعیین شد و مشاهده شد میزان بیان ۲/۸ برابر افزایش یافت در حالی که 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 زمانی که این ترکیبات به صورت 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 نو ترکیب 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

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 hormone therapy on height in children with idiopathic short stature: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc 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 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

نو ترکیب 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 نو ترکیب در نظر گرفته می‌شود، ابتدا سلول‌ها به محیط حاوی سرم اضافه می‌شوند و پس از این که 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 دهنده 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، ۱ میلی‌مولار 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

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 to three years. *Horm Res.* 1991; 36: 56-60.

16. Hardin DS, Sy JP. Effects of growth hormone treatment in children with cystic fibrosis: the National Cooperative 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. *Clin Pediatr.* 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.

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