

极具潜力的重组药用蛋白的毛状根表达系统研究

潘学武^{1,2}, 董妍玲², 韩晓红¹

(1. 武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415; 2. 武汉生物工程学院 生物技术系, 湖北 武汉 430415)

摘要:对植物表达系统产生重组药用蛋白进行了简单的介绍, 重点论述了利用发根农杆菌诱导的毛状根培养系统表达重组药用蛋白的研究及应用情况。

关键词:毛状根; 重组药用蛋白; 植物表达系统

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)07-0196-03

迅速发展的基因重组药物, 2007 年已占据总药物市场份额的 10% 左右。2010 年, 该类药物的全球市场销售额高达 1 000 亿美元^[1]。生产成本低、表达效率低下已成为该类药物市场巨大需求短缺的首要原因, 因此, 建立高活性、低成本、安全性高的大规模药用蛋白生产表达系统已成为各国政府及生物制药企业竞相投入研究的重中之重。自从第 1 个具有生物活性的单克隆抗体成功在转基因烟草中表达之后^[2], 植物这一潜力巨大的真核表达系统, 继酵母和哺乳动物之后, 迅速成为研究热点^[1,3-4]。毛状根培养物, 作为植物表达系统之一, 在生产重组蛋白方面具有独特的优势, 现就这方面的现状和近年来取得的进展进行综述与分析。

1 植物表达重组药用蛋白

1989 年, 单克隆抗体在烟草中的成功表达, 标志着以植物作为生物反应器生产重组药用蛋白的“分子农业”(Molecular farming)的诞生^[2]。转基因植物药物与其它生物技术药物相比, 具有以下优势^[5], 一是生物活性高, 植物为真核生物, 与动物一样, 可对外源蛋白进行正确的加工与修饰; 二是经济性高, 同数量的蛋白表达生产成本, 用植物表达生产的是微生物表达生产的 2%~10%, 动物的 0.1%, 同时, 植物蛋白可贮存在特定器官(如种子、块茎)中, 无需冷冻等措施; 再者, 无论是作为可食性疫苗, 还是作为植物组织细胞的贮存蛋白, 都不需要复杂的分离纯化技术, 下游加工成本低; 三是规模化技术成熟, 无论是野外种植, 还是植物离体培养, 均可以扩大到相应的规模; 四是安全性高, 大多数植物不受人

类病原菌感染, 表达的蛋白污染风险极低; 五是遗传稳定, 外源基因作为植物基因组的一部分, 通过有性杂交或无性繁殖, 性状可稳定遗传给后代。因此, 近 20 a 来, 用植物生物反应器生产重组药用蛋白取得了可喜的进步, 其中烟草细胞表达生产的新城疫病毒 HN 糖蛋白作为疫苗已获得美国农业部的批准上市, 红花表达生产的胰岛素已进入 III 期临床, 烟草细胞表达的乙肝病毒抗体已应用于乙肝疫苗的纯化^[1]。

2 毛状根培养系统表达重组蛋白的优势

重组蛋白植物生产系统, 可以选择野外转基因栽培植株, 也可以是植物组织培养物。相比前者, 植物组织培养具有其独特的优势^[6]: 生长迅速, 生物量倍增时间可短到 1 d; 产品质量更稳定, 在生物反应器中培养可以人为控制, 不受自然条件的干扰; 转基因安全性高, 生产在人工控制中进行, 转基因产品不会扩散到自然界中; 分离纯化成本低, 分泌性蛋白可直接分泌到培养液中, 而非分泌性蛋白从培养细胞中提取, 成本远低于从野外植株中提取等等。通过发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 感染植物诱导并建立毛状根培养物 (Hairy root), 是良好植物组织培养系统。发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) 属于根瘤菌科 (Rhizobiaceae) 农杆菌属 (*Agrobacterium*) 的革兰氏阴性菌, 能感染绝大多数被子植物和个别裸子植物, 将其所含的 Ri 质粒上的一段 DNA (T-DNA) 转移并整合到植物基因组中, 诱发被感染植物的受伤部位长出毛状根。相比植物细胞培养, 毛状根具有生长非常迅速, 无需添加外源激素, 生物合成能力强和遗传性稳定等优点^[7]。尤为重要的是, Ri 质粒可以作为植物转化的有效载体, 表现为: 转化的毛状根属于单克隆, 可避免形成嵌合体; Ri 质粒可作为中间载体; Ri 质粒与 Ti 质粒可共同构建双元载体, 拓展其二者的应用范围; Ri 质粒可诱导生成毛状根并由其再生成植株^[2,7]。因此利用转基因毛状根表达重组蛋白具有巨大的工业生产潜力, 已开始被研究者所采用。

第一作者简介:潘学武(1975-), 男, 湖北恩施人, 博士, 讲师, 现主要从事植物细胞工程等研究工作。

责任作者:董妍玲(1977-), 女, 山东德州人, 博士, 副教授, 现主要从事基因工程的教学与科研工作。

基金项目:湖北省教育厅科学研究资助项目(B20114606); 武汉市教育局科学研究资助项目(2010084)。

收稿日期:2012-02-01

3 毛状根培养系统表达的重组药用蛋白

利用植物毛状根做“生产车间”来生产具有医用价值的重组蛋白,主要有抗体、疫苗和其它药用蛋白等。

3.1 抗体类药物

抗体为免疫球蛋白(Ig),每种抗体可以与相应的抗原特异性结合,从而有效地清除机体内的微生物、寄生虫等异物,是高等生物发挥体液免疫的主要物质。1997年 Wongsamuth 等^[8]利用烟草的毛状根表达了识别变异链球菌细胞表面抗原的鼠源单克隆抗体(IgG1 类抗体),摇瓶培养中单克隆抗体表达量可达到总可溶性蛋白的 1.8%,有 14%的抗体可以分泌到培养基中去,气升式生物反应器中培养可使抗体总量高出在摇瓶中培养的 1.7 倍,增加硝酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、凝胶可以增加抗体的产量并促进重组蛋白向细胞外分泌。随后的研究表明,抗体在烟草毛状根中的绝对表达量是该抗体同样在烟草悬浮培养细胞中表达量的 6.5 倍,加入枯草杆菌抗生素虽然对阻止抗体的降解效果不明显,但可以使毛状根生长速率提高 53%^[9]。同时,相对于转基因烟草悬浮培养细胞和冠瘿碱组织,转基因毛状根长期培养性质稳定,添加布雷菲德菌素 A 减少抗体的胞外分泌可以提高抗体产量增加 1.7 倍,采用羟基磷灰石大孔树脂作原位吸附可使抗体的滴度增加 20%~30%,溶氧对生长和抗体产量影响极显著,150%的空气饱和度可使毛状根生物量增加 57%,抗体产量几乎增长 1 倍(99%)^[10]。在 14D9 抗体蛋白(IgG1 类抗体)的 C 端连接有内质网保留蛋白 KDEL 的融合蛋白基因,在烟草毛状根中成功表达,14D9 抗体的表达量比仅表达该抗体蛋白基因的毛状根高出 2.5 倍,证明抗体从内质网转运出后可发生部分降解,加入二甲亚砜、聚乙烯吡咯烷酮和凝胶可分别使抗体量增加 2.4~9.8、3.2 和 1.4 倍^[11]。

3.2 抗原与疫苗

抗原是指能够刺激机体产生特异性免疫应答,并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结合,发生特异性反应的物质。无毒或者减毒的抗原可以作为疫苗进行人工主动免疫,从而有效预防特定疾病。单独的绿色荧光蛋白(GFP)不能作为老鼠的免疫原,而烟草毛状根表达的蓖麻毒素 B 蛋白与绿色荧光蛋白的融合蛋白,可以诱导老鼠的免疫反应,由此可以利用转基因毛状根生产蓖麻毒素 B 蛋白作为佐剂使用^[12]。利用植物 *Phyllanthus amarus* 毛状根表达乙肝病毒表面抗原的效果远好于用其不定根表达的效果,毛状根无需添加激素,4 周内生物量增加约 900 倍,而不定根添加必要的激素生物量只增加约 330 倍,同时,表达乙肝病毒表面抗原的毛状根初提物,其免疫强度也高于该抗原在转基因植物 *P. amarus* 普通植株中表达产生的效果^[13]。乙肝病毒表面抗原在马铃薯中表达也获得成功,马铃薯毛状根

中的抗原含量为干重的 97.1 ng/g,而在普通转基因马铃薯再生植株中抗原含量仅为干重的 19.11 ng/g,毛状根的生物量倍增时间为 2.32 d^[14]。编码大肠杆菌热不稳定毒素 B 亚单位蛋白的基因可在 3 种不同的茄科植物(烟草、番茄和矮牵牛)的毛状根中表达,可喜的是,毛状根再生植株中该蛋白的生物活性与毛状根培养物中一样^[15]。

3.3 其它药用蛋白

乙酰胆碱酯酶(AChE)在生物神经传导中起重要作用,诱导轴突生长和突触形成,同时参与细胞迁移、粘附和凋亡,促进造血细胞形成等多种免疫反应。人源 AChE 基因在烟草毛状根中成功表达,AChE 的含量可达总可溶性蛋白的 3.3%,比表达 AChE 基因的普通转基因植株高出 3 倍多^[16]。白细胞介素 12(IL-12)作为一种很重要的佐剂和抗癌制剂,在临床上广泛使用。Liu J 等^[17]在烟草毛状根中成功表达了具有完全生物活性的鼠源 IL-12,通过摇瓶培养、雾化生物反应器和气升式生物反应器培养的比较表明,摇瓶培养中 IL-12 产量最高,IL-12 产量在雾化生物反应器中比在气升式生物反应器中培养高 49.5%,而且重组蛋白可分泌到培养基中^[18]。人表皮生长因子(hEGF)广泛应用于促进多种手术后伤口的愈合,或作为高档化妆品的添加剂。烟草毛状根中过量表达有活性的 hEGF,蛋白含量可达干重的 2 μg/g,总产量为每天 15.9 μg/L^[19]。人胸腺素 α1(hTα1)是一种强力的免疫增强剂,利用黄芪毛状根表达 hTα1 获得成功,转基因毛状根抽提物上清液中 hTα1 含量可达 140 mg/L^[20]。人组织中去纤维蛋白溶酶原激活剂(t-PA)临床上广泛用于治疗冠心病、心肌梗塞和缺血性中风等严重疾病。根据密码子用法数据(Codon Usage Database)合成的 t-PA 基因成功在甜瓜(Oriental melon)毛状根中表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)证实重组 t-PA 最高含量为 798 ng/mg,WPM 培养基最适合转基因甜瓜毛状根生长,比在 White 培养基中生长快出 5.8 倍^[21]。

4 问题及展望

由制药巨头辉瑞与以色列 Protalix 公司利用胡萝卜细胞表达培养生产的葡糖脑苷脂酶(Glucocerebrosidase),已获得临床批准用于治疗戈谢病(Gaucher disease),这促使“分子农业”从野外植物栽培方式向可控制的室内培养系统转变^[22]。作为可控制的室内培养系统之一的转基因毛状根,表达的药用蛋白种类多,包括单克隆抗体、疫苗、细胞因子等多种蛋白药物,重组蛋白活性高,表达量可高于其它植物表达系统^[10,13-14,16]。添加相应的抑制剂可防止重组蛋白降解^[9],或者采用融合蛋白表达防止目标蛋白在细胞内降解^[11]等措施提高蛋白表达量。转基因毛状根在培养过程中生长良好^[9-10,13-14],可采用优化培养基^[21]、改变溶氧^[10]等措施提高目标蛋白产量。

部分重组蛋白可分泌到培养基中^[8,18],或采用原位吸附或者渗透释放^[10-11]等技术让重组蛋白释放到培养基中去,降低下游加工成本。尽管毛状根培养产生重组药用蛋白取得了很大的进展,但相比较野外栽培转基因植物和植物细胞培养产生重组药用蛋白而言,还处于探索阶段。一系列的问题,如重组蛋白表达的基因调控、蛋白的糖基化改造、临床安全性评价、工业放大规模等都有待于更加深入研究。一个好的药物蛋白表达系统,必须具备以下几个条件^[5]:一是表达的蛋白具有正确的活性结构与构象;二是具有良好的表达生产能力;三是便于贮存;四是安全和经济;五是下游加工成本低。完全具备这些条件的表达系统几乎不存在,但由于在极高的生长速率,培养质量的稳定性,良好的安全性和经济性等方面具有明显优势,因此,毛状根培养系统将是转基因植物培养系统产生药用蛋白的良好选择。

参考文献

- [1] Obembe O O, Popoola J O, Leelavathi S, et al. Advances in plant molecular farming [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29: 210-222.
- [2] Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants [J]. *Nature*, 1989, 342: 76-78.
- [3] Paul M, Ma J K. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2011, 58: 58-67.
- [4] Zhou M L, Zhu X M, Shao J R, et al. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90: 1229-1239.
- [5] Desai P N, Shrivastava N, Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28: 427-435.
- [6] Xu J F, Ge X M, Dolan M C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29: 278-299.
- [7] Chandra S, Chandra R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2011, 10: 371-395.
- [8] Wongsamuth R, Doran P M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 54: 401-415.
- [9] Sharp J M, Doran P M. Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy roots and cell suspensions [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 1999(4): 253-258.
- [10] Sharp J M, Doran P M. Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures [J]. *Biotechnology Progress*, 2001, 17: 979-992.
- [11] Martínez C, Petrucci S, Giulietti A M, et al. Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2005(8): 170-176.
- [12] Medina-Bolivar F, Wright R, Funk V, et al. A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 997-1005.
- [13] Bhattacharyya R, Bhattacharya B. Development of a potent *in vitro* source of *Phyllanthus amarus* roots with pronounced activity against surface antigen of the hepatitis B virus [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2004, 40: 504-508.
- [14] Sunil Kumar G B, Ganapathi T R, Srinivas L, et al. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 918-925.
- [15] Guzman G D, Walmsley A M, Webster D E, et al. Hairy roots cultures from different *Solanaceous* species have varying capacities to produce E. coli B-subunit heat-labile toxin antigen [M]. *Biotechnology Letters*, 2012.
- [16] Woods R R, Geyer B C, Mor T S. Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase [J]. *BMC Biotechnology*, 2008, 23: 95-102.
- [17] Liu J, Dolan M C, Reidy M, et al. Expression of bioactive single-chain murine IL-12 in transgenic plants [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2008, 28: 381-392.
- [18] Liu C, Towler M J, Medrano G, et al. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102: 1074-1086.
- [19] Parsons J, Wirth S, Dominguez M, et al. Production of human epidermal growth factor (hEGF) by *in vitro* cultures of *Nicotiana tabacum*: effect of tissue differentiation and sodium nitroprusside addition [J]. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 2010(6): 131-138.
- [20] 范伟全, 包晓群, 韩树海, 等. 重组人胸腺素 $\alpha 1$ 基因在黄芩毛状根中的表达 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30: 1393-1395.
- [21] Kim S R, Sim J S, Ajappala H, et al. Expression and large-scale production of the biochemically active human tissue-plasminogen activator in hairy roots of Oriental melon (*Cucumis melo*) [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(1): 106-111.
- [22] Hunter P. A new era for plant biotechnology [J]. *EMBO reports*, 2011, 12: 504-507.

Study on the Expression System of Hairy Roots of Potential Recombinant Pharmaceutical Proteins

PAN Xue-wu^{1,2}, DONG Yan-ling², HAN Xiao-hong¹

(1. Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415; 2. Department of Biotechnology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: Plant expression system for the production of recombinant pharmaceutical proteins was introduced, the focal point of which was the production of recombinant pharmaceutical proteins expressed by hairy root cultures induced by *Agrobacterium rhizogenes* and the application of this expression system

Key words: hairy roots; recombinant pharmaceutical proteins; plant expression system