表达 HSA/IL2 的重组 CHO 细胞的无血清培养基优化研究

缪亚娜[1]，熊文典[1]，万爱妮[2]，张晶晶[1]，蔡燕飞[1]，陈 蕴[1]，金 坚[*1]
(1. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122)

摘要： 优化适合重组 CHO 细胞生长及表达人血清白蛋白与白介素 2(HSA/IL2)的低成本无血清悬浮培养基。以无血清悬浮培养基 M1 为基础，考察了 3 种不同质量浓度(1.0、2.5、5.0、10.0 g/L)的蛋白水解物(酵母提取物(YE)、大豆蛋白胨(Soy)及胰蛋白胨(Tyr))对 CHO 细胞生长、细胞周期、细胞凋亡及 HSA/IL2 融合蛋白表达的影响。5 g/L 的 YE 促进细胞生长，提高 HSA/IL2 表达量的效果最佳。流加培养过程中，在含 5.0 g/L YE 的培养基中 CHO 细胞密度可达 9.95×10^6 cells/mL，HSA/IL2 表达量提高至 104.06 mg/L，分别是对照组的 1.42 倍和 1.51 倍。细胞对数生长期时，YE 可以提高细胞周期进展而利于细胞生长；细胞表达期时，YE 可以提高细胞 G1 期比例，延长细胞表达期时间而利于 HSA/IL2 表达。

关键词： CHO 细胞；培养基优化；蛋白水解物；细胞周期
中图分类号：Q 813.1　**文章编号：**1673-1689(2019)06-0095-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.013

Optimization of Serum-Free Medium for Culturing Recombined CHO Expressing HSA/IL2

MIAO Yana[1]，*XIONG Wendian*[1]，*WAN Aini*[2]，*ZHANG Jingjing*[1]，*CAI Yanfei*[1]，*CHEN Yun*[1]，*JIN Jian*[*1]
(1. School of Pharmaceutics Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To optimize a serum-free medium for high cell density of CHO cells expressing HSA/IL2. CHO expressing HSA/IL2 cells were cultured in M1 medium supplemented with three kinds of hydrolysate [yeast extract (YE), soytone (Soy) and tryptone (Tyr)] and different concentrations [1.0, 2.5, 5.0, 10.0 g/L] to evaluate the effects of additives on cell density, cell viability, cell cycle, apoptosis and protein expression level. M1 medium supplemented with 5.0 g/L YE could significantly promote cell growth and enhance the expression level of HSA/IL2. The maximum viable cell density was 9.95×10^6 cells/ml and the expression level of HSA/IL2 reached 104.06 mg/L, respectively, which represent an increase of 42% and 51% in comparison with the control group. In

收稿日期： 2016-12-06
基金项目： 国家 863 计划项目(2014AA021003)。
***通信作者：** 金 坚(1960—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事分子药理和蛋白质药物药代动力学等研究。
E-mail：jinjian31@163.com
引用本文： 缪亚娜，熊文典，万爱妮，等. 表达 HSA/IL2 的重组 CHO 细胞的无血清培养基优化研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：95-101.

addition,YE affected cell cycle in different cell culture phases. In logarithmic growth phase,YE could increase the percent of S phase for cell growth;In the stationary phase,YE could increase the percent of G1 phase for enhancing protein expression.

Keywords: CHO cell,medium optimization,hydrolysate,cell cycle

白介素是一种由人白细胞分泌的调节细胞生长和分化的细胞因子[1]。近 20 年,IL2 在治疗肿瘤、黑色素瘤、肾炎[2]、肝炎以及免疫缺陷性疾病[3]中取得显著效果。但由于 IL2 相对分子质量小,体内半衰期短[4]以及具有一定的免疫源性甚至会引起过敏反应等因素,IL2 的药物利用率低, 患者需频繁注射,限制了 IL2 的应用。HSA 融合技术实现了各种人源药物蛋白质分子与 HSA 蛋白质的融合表达[5-6]。雷建勇等[7]构建 pPIC9K-HAS/IL2 质粒,并电转入毕赤酵母, 纯化得到 HAS/IL2 融合蛋白不仅蛋白活性好,而且有效延长蛋白质半衰期至 12.34 h。后期研究中发现,毕赤酵母表达 HSA 融合蛋白时存在蛋白质降解、产物不均一和过度糖基化等现象,这些不利因素限制了毕赤酵母表达 IL-2 融合蛋白的应用。中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cells, CHO Cells)不仅具有重组基因高效表达能力,而且可精确转录翻译、折叠蛋白质,并能保证蛋白质的充分糖基化[8],成为重组糖基化蛋白生产的首选体系。卢慧惠等[9]构建 pMH3-HAS-IL2 质粒,并电转入 CHO 细胞,筛选出表达 HSA/IL2 的 CHO 细胞株,经摇瓶流加培养及纯化获得活性较好的 HSA/IL2 融合蛋白, 解决了融合蛋白的降解和糖基化等问题。但 CHO 细胞培养仍有问题急需解决, 如细胞生长密度低(最高生长密度仅为 6.0×10^6 cells/mL)、HSA/IL2 表达量低(仅为 53 mg/L)等。

悬浮培养是哺乳动物细胞大规模培养研究和应用的重要模式和首要选择[10]。传统的培养基通常按一定比例加入血清或者组织提取物,然而细胞只能在无血清或含血清替代物的培养基中才能实现悬浮状态。随着对动物细胞培养技术研究的深入和药品安全性标准的提高,基于细胞和产品特性的无血清培养技术的研究受到关注[11]。目前,虽然无血清培养基的开发取得一定的成果,但因细胞株的个性化问题,商业化的无血清培养基仍不能满足特定细胞株的高密度生长和产物高表达需求。因而,优化适合特定细胞株生长和表达的低成本无血清培养基成为细胞大规模培养的关键问题之一。蛋白质水解物不仅含有多肽物质,而且含有氨基酸、糖类、脂类、矿物质和维生素等多种营养物质[12],对细胞生长代谢、凋亡及产物表达等生命活动产生特殊的调控作用。培养基中添加蛋白质水解物还是一种快捷而有效的培养基优化方法,可快速获得较好的培养基配方,显著缩短培养基优化时间,降低优化成本,因而被广泛应用于动物细胞培养领域

本文中评估了 3 种蛋白质水解物, 分别为:胰蛋白胨 (动物水解物)、酵母提取物 (微生物水解物)、大豆蛋白胨(植物水解物),作为培养基添加剂对 CHO 细胞生长、细胞活率、目的蛋白 HSA/IL2 表达、细胞周期及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株

表达 HSA-IL2 融合蛋白的 CHO-S 细胞株由本实验室前期构建。

1.2 主要试剂

酵母提取物(YE)、大豆蛋白胨(Soytone)及胰蛋白胨(Tyrtone),均购自上海生工生物有限公司;M1 为无血清悬浮培养基、M1 及补料培养基 Feed 3,均购自苏州康聚生物有限公司。

1.3 细胞培养

分批培养: 将细胞以 2×10^6 cells/mL 的密度接种于 150 mL 摇瓶,培养体积 30 mL,置于 37 ℃、100 r/min 的摇床中培养。

流加培养: 将细胞以 2×10^6 cells/mL 的密度接种于 250 mL 摇瓶,培养体积 50 mL。细胞培养至第 3 天时流加补料培养基 Feed 3, 并维持葡萄糖质量浓度为 2~3 g/L。第 4 天,培养温度降至 34 ℃,细胞活率在 80%时结束培养。

1.4 分析方法

1.4.1 *细胞密度及活力的检测* 细胞自动计数仪,美国 Nexcelom Cellometer 公司产品,采用台盼蓝染色法,测定细胞密度及活率并绘制细胞生长及活率

曲线。

1.4.2 融合蛋白质量浓度测定 尿微量白蛋白测定试剂盒,购自上海名典生物有限公司。

1.4.3 细胞周期测定 取 5×10^5 个活细胞,4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 冰乙醇,–20 ℃冰箱保存过夜。离心收集细胞,加入溴化乙锭(PI),使用流式分析仪进行分析。

流式分析仪,购自 BD 公司。

1.4.4 细胞凋亡测定 FITC Annexin V 凋亡测定试剂盒,购自 BD 公司,用于检测细胞凋亡。

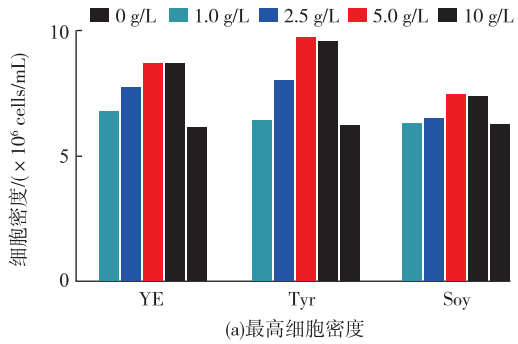
1.4.5 渗透压测定 渗透压测定仪,购于天津天河仪器有限公司,测定培养基渗透压。

1.4.6 氨基酸分离测定 Agilent–1260 型高效液相仪分析氨基酸种类浓度;柱型:Venusil AA,5 um,4.6×250 mm。18 种常见氨基酸标品,购自美国 Wako 公司。

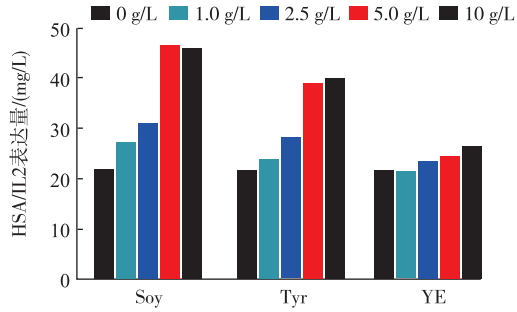
2 结果与讨论

2.1 分批培养筛选最优水解物质量浓度

不同种类及不同质量浓度的水解物对细胞生长及产物表达有较大影响[13]。为了研究不同水解物对 CHO 细胞生长及 HSA/IL2 表达的影响,以 M1 为对照组(0 g/L 组),3 种水解物(Soy、Tyr、YE)及其不同终质量浓度(1.0、2.5、5.0、10.0 g/L)为实验组。结果显示,与 0 g/L 组相比,3 种水解物均可提高细胞密度;Soy 组和低质量浓度 YE、Tyr 组(1.0、2.5 g/L)提高细胞密度(图 1(a))和 HSA/IL2 表达量(图 1(b))作用不明显;高质量浓度 YE、Tyr 组(5.0、10.0 g/L)提高细胞密度和 HSA/IL2 表达量作用明显且结果相近;5.0 g/L YE 组提高 HSA/IL2 表达量作用最好。



(a)最高细胞密度



(b)目的蛋白HSA/IL2表达量

图 1 不同水解物及其质量浓度对细胞密度及目的蛋白表达量影响

Fig. 1 Effects of hydrolysate concentration on cell density and HSA/IL2 production

为了对比不同水解物及其不同质量浓度对细胞密度和 HSA/IL2 表达量的作用差异,以 C_{max}/C_0(添加不同质量浓度水解物组最高细胞密度与对照组最高细胞密度比值)和 M_{max}/M_0(添加不同质量浓度水解物组最高目的蛋白表达量与对照组最高目的蛋白表达量比值)为指标,比值越大,提高细胞密度或 HSA/IL2 表达量作用越明显,以此确定水解物最优质量浓度。

表 1 YE 组 C_{max}/C_0、M_{max}/M_0 比值

Table 1 C_{max}/C_0、M_{max}/M_0 of YE group

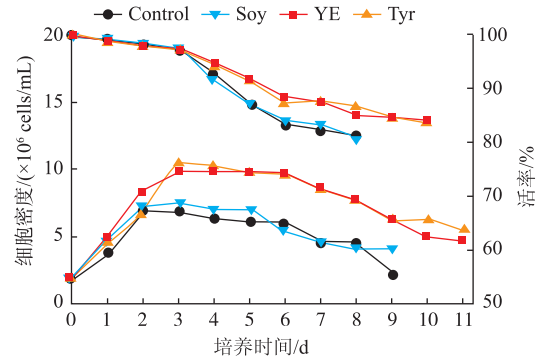
组别	最高细胞密度/10^6 cells/mL	C_{max}/C_0	最高蛋白表达量/(mg/L)	M_{max}/M_0
1.0 g/L	6.8	1.09	27.4	1.27
2.5 g/L	7.72	1.24	30.9	1.43
5.0 g/L	9.95	1.40	46.5	2.15
10.0 g/L	8.50	1.39	45.9	2.12

如表 1 所示(YE 组为例),5.0 g/L 组的 C_{max}/C_0 及 M_{max}/M_0 最大,分别为 1.4 和 2.15,说明 5.0 g/L YE 提高细胞密度和 HSA/IL2 表达量作用最明显。因此选择 5.0 g/L YE 为最优添加质量浓度,并进行流加培养实验。(Tyr 和 Soy 组最优水解物质量浓度均为 5.0 g/L)

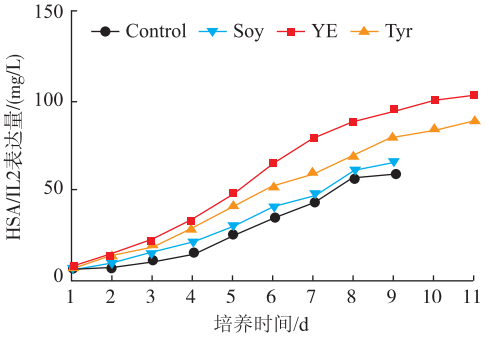
2.2 流加培养过程中水解物对细胞生长及目的蛋白表达的影响

流加培养是以分批培养为基础,依据细胞代谢情况补加补料培养基。流加培养一方面可以有效解决营养限制和毒副产物积累问题,另一方面可以延长细胞生长及表达目的蛋白时间[14]。范里等[15]采用两阶段动态流加培养方式大幅度延长细胞合成抗

体融合蛋白的维持时间,提高生产效率。本研究室前期通过优化温度条件，确定了 1.3 节中流加培养方式并取得较好结果。因此,采用该流加培养方式进一步研究 3 种蛋白质水解物对细胞生长及 HSA/IL2 表达的作用。以 M1 为对照组(Control 组),5.0 g/L 的 YE、Tyr、Soy 为实验组。如图 2(a)所示,Soy 组细胞密度及活率略高于 Control 组，培养时间为 9 d;YE 组、Tyr 组细胞培养时间为 11 d,YE 组、Tyr 组细胞密度和活率变化趋势相近；第 4 天开始,YE 组、Tyr 组细胞密度高于 Control 组、Soy 组;4~11 d,YE 组、Tyr 组细胞密度及活率持续高于 Control 组、Soy 组。结果表明,含 5.0 g/L YE 或 Tyr 的 M1 培养基,提高细胞密度及活率作用明显,并且能够延长细胞培养时间。



(a)细胞生长曲线和活率曲线



(b)目的蛋白HSA/IL2表达量

图 2　流加培养时不同水解物对细胞密度及 HSA/IL2 表达量影响

Fig. 2　Fed-batch culture using M1supplemented with 5 g/L of different hydrolasates

如图 2(b)所示,与 Control 组相比,YE 组 HSA/IL2 表达量最高，其次为 Tyr 组;Soy 组 HSA/IL2 表达量略高于 Control 组。以上结果表明：培养基 M1 中添加 3 种水解物(YE、Tyr、Soy)时,YE 提高细胞密度、活率和 HSA/IL2 表达量作用最明显。

不同的蛋白质水解物对细胞生长及产物作用差异显著,赵丽丽等[16]将不同水解物进行混合,细胞生长密度和目的产物增加显著。本研究中将 3 种水解物按一定比例混合后,细胞密度和 HAS/IL2 表达量未出现显著提高。由此说明,优化培养基时不仅需要筛选合适的添加组分，而且需要均衡营养物质。

2.3　酵母提取物 YE 促进 CHO 细胞生长及 HSA/IL2 表达机理的初步探究

为了探究蛋白质水解物 YE 促进 CHO 细胞生长和 HSA/IL2 表达的原因,对培养基渗透压、YE 中氨基酸种类、细胞周期、细胞凋亡等指标进行检测。

2.3.1　渗透压影响　研究报道[17-18]蛋白质水解物的渗透压、剪切力保护剂作用及抗凋亡的特性可改善细胞的生长状况,因此对含不同水解物的培养基渗透压进行检测并分析(表 2)。

表 2　含不同水解物的培养基渗透压值

Table 2　Osmolalities of M1 medium supplemented with different hydrolysates

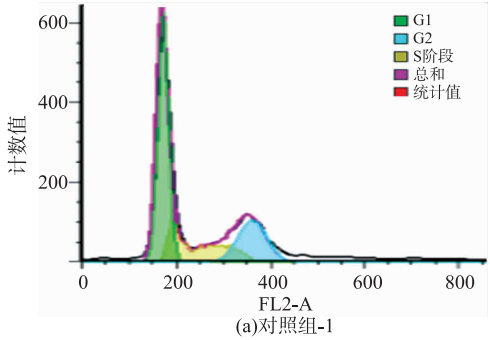
组别	渗透压/(mOsmol/kg)	与初始培养基渗透压差值
Soy	326	10
Tyr	334	18
YE	341	25

表 2 所示，添加 3 种蛋白质水解物均增加 M1 培养基渗透压;含 YE 的培养基渗透压增加明显,为 341 mOsmol/kg,高出 M1 培养基 25 mOsmol/kg。然而,Sung 等[19]以 NaCl 为对照组,同等渗透压时细胞表达蛋白产量增加，但促进细胞生长作用不明显。由此推断，添加 YE 虽然可以改变培养基的渗透压环境,对 HSA/IL2 表达也有影响但非主要原因。

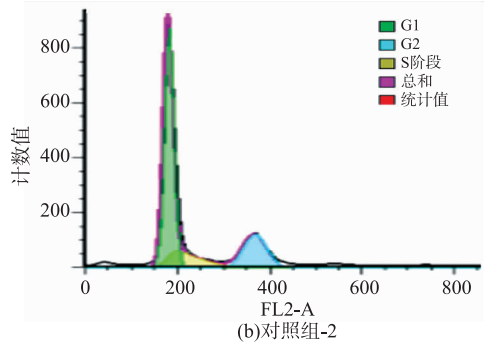
2.3.2　氨基酸影响　蛋白质水解物含有丰富肽类物质,其中氨基酸不仅用于细胞合成蛋白质、核酸和酯类等物质,同时也用于代谢产生能量。不同种类的水解物因来源不同,其氨基酸组成可能存在差异。本研究中利用高效液相分离技术,测定了 3 种蛋白质水解物中游离氨基酸的种类和相对含量。结果表明:Tyr 和 Soy 中氨基酸种类少,YE 中氨基酸种类最多,除共有的几种氨基酸外(L-Cys、L-Ile、L-Phe)，还包括相对含量较高的氨基酸有:L-Asp、L-Arg、L-Thr、L-Lys 等。相比 Tyr 和 Soy,YE 含丰富氨基酸可能是其促进细胞生长及表达 HSA/IL2 作用

最明显的原因之一。Franek F 等[17-18]认为蛋白水解物不仅为动物细胞生长提供氨基酸,还是特殊活性肽段的重要来源,这些肽段具有促进细胞增殖,提高细胞活力、增加产物表达等功能。YE 中可能也存在某类活性肽段发挥重要作用,需要进一步的研究发现。

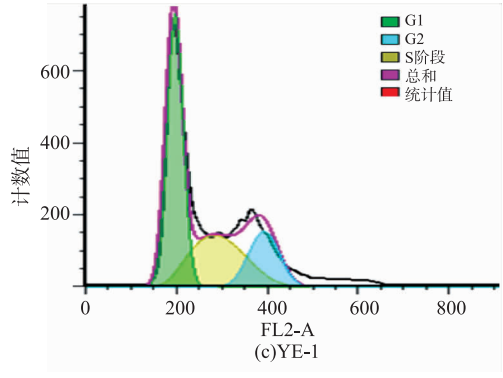
2.3.3 YE 对细胞周期、细胞凋亡的影响 蛋白质水解物会影响细胞周期分布,影响细胞增殖[20]。为了研究不同培养时期,YE 对细胞周期分布的影响,选择第 2 天(对数生长期)、第 5 天(表达期)的细胞做细胞周期分析,以 M1 培养的细胞为对照组,分别标记为 Control-1、Control-2 组;含 5.0 g/L YE 的 M1 培养细胞为实验组(YE 组),分别标记为 YE-1、YE-2。



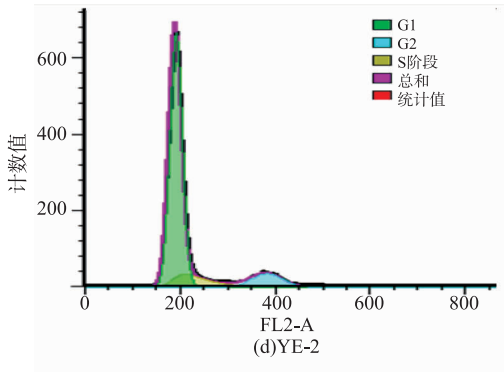
(a)对照组-1



(b)对照组-2



(c)YE-1



(d)YE-2

(a、b) 为对照组分别在 2、5 d 时细胞周期分布图;(c、d)为 YE 组分别在 2、5 d 时细胞周期分布图

图 3 YE 对不同时期细胞的周期分布影响

Fig. 3 Effects of YE on cell cycle in different periods

表 3 YE 作用下细胞周期分布情况

Table 3 Phases of cell cycle with YE

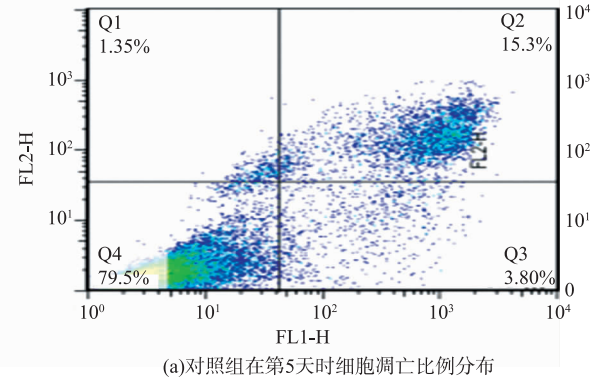
细胞周期	G1 期	S 期
Control-1	46.55	20.48
YE-1	47.4	30.33
Control-2	58.52	13.86
YE-2	76.16	11.79

如表 3 所示:Control-1、YE-1 2 组细胞 G1 期比例无明显差异,分别为 46.55%和 47.4%,但 YE-1 组细胞 S 期比例明显高于 Control-1 组,由 Control-1 组的 20.48%提高至 30.33%。此结果表明,细胞对数生长期时,5.0 g/L YE 可以提高细胞 S 期比例而几乎不影响细胞 G1 期比例,利于细胞生长;在 YE 组中,YE-2 细胞 G1 期比例明显高于 Control-2 组,由 Control-2 组的 58.12%提高至 76.16%。此结果表明,细胞表达期时,M1 培养基含 5.0 g/L 的 YE 时可以明显提高细胞 G1 期比例而几乎不影响细胞 S 期比例,延长细胞表达期时间,利于细胞表达 HSA/IL2。

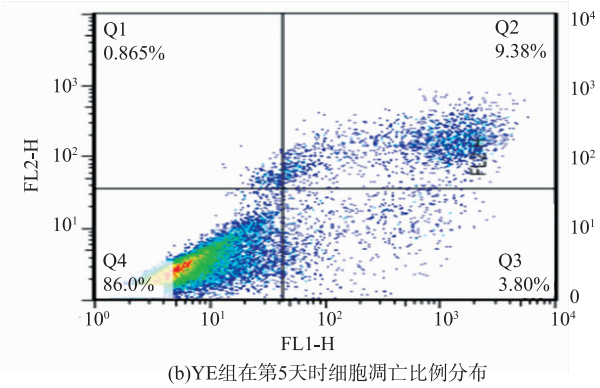
随着细胞培养时间的延长,细胞凋亡或坏死比例随之增高。蛋白质水解物可以抑制细胞凋亡的现象[21]。为了探究 YE 对细胞凋亡的影响,选择第 5 天细胞,以 M1 培养的细胞为对照组(Control),含 5.0 g/L YE 的 M1 培养细胞为实验组(YE 组)。

图 4 为 YE 对细胞凋亡影响图,如图所示,Control 组细胞凋亡率为 19.17%,YE 组细胞凋亡率为 13.18%,比 Control 组降低了 5.99%。此外,YE 组正常细胞比率(Q4)明显高于 Control 组,由 79.65 提高至 86.0%,与图 2(a)中细胞高活率结果一致。结

果表明,M1 培养基含 5.0 g/L 的 YE 时不仅可以提高细胞活率,而且可以降低细胞凋亡率,延长细胞培养时间。



(a)对照组在第5天时细胞凋亡比例分布



(b)YE组在第5天时细胞凋亡比例分布

图 4　YE 对细胞凋亡的影响

Fig. 4　Effects of YE on cell apoptosis

3 结　语

许多研究发现蛋白质水解物可以促进哺乳动物细胞生产单克隆抗体、重组蛋白等生物制品[11],降低细胞培养的成本,利于动物细胞工业化大规模培养。培养基中添加适宜质量浓度的蛋白质水解物在动物细胞培养、抗体及单克隆抗体生产、疫苗制备等生物技术领域具有广阔的应用前景。

本文中研究了 3 种水解物 (Tyr、Soy、YE)对 CHO 细胞密度、细胞活率、目的蛋白 HSA/IL2 表达、细胞周期及细胞凋亡的影响。结果表明:(1)M1 培养基中含不同质量浓度(1.0、2.5、5.0、10.0 g/L)的蛋白质水解物时,5.0 g/L 蛋白水解物(YE、Soy、Tyr)促进细胞生长及表达 HSA/IL2 作用明显;(2) 在 3 种水解物(YE、Soy、Tyr)中,5.0 g/L 的 YE 提高细胞密度、活率及表达 HSA/IL2 作用最明显;(3)YE 促进细胞生长及 HSA/IL2 表达作用明显的原因可能是它含有丰富的氨基酸种类,并且可以提高培养基渗透压;(4) 细胞生长期时,YE 可以提高细胞 S 期比例而有利于细胞生长;细胞表达期时,YE 可以提高细胞 G1 期比例而有利于细胞表达 HSA/IL2;(5)YE 不仅可以提高细胞活率,而且可以降低细胞凋亡率,延长细胞培养时间。本研究为蛋白质水解物在培养基优化中的应用提供了参考。

参考文献:

[1] SHEN Yehua,GENG Xindu. The recent progress in the upstream studies on the culture with CHO cell[J]. **China Biotechnology**, 2000,20(4):23-25.(in Chinese)

[2] LEI Kaijian,DU Yiping,JIA Yuming,et al. The effect of CIK cells combined with IL-2 on the treatment of renal cell carcinoma [J]. **Journal of Zunyi Medical University**,2005,28(1):67-68.(in Chinese)

[3] PAU A K,TAVEL J A. Therapeutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients[J]. **Current Opinion in Pharmacology**,2002, 2(4):433-439.

[4] CHEN Hongmei,BAI Xuefan,HUANG Changxing,et al. Construction and expression of eukaryotic expression vector bearing fusion gene of human IL-2/Fc cDNA gene and Fc gene[J]. **Journal of Medical Postgraduates**,2004,17(1):12-14.(in Chinese)

[5] CUI Yansheng,JIANG Yueshui,GAO Hao,et al. Expression of HSA-VNP fusion protein in Pichia pastoris[J]. **Industrial Micro biology**,2014,44(3):49-52.(in Chinese)

[6] LI Junyi,PENG Lin,TANG Cunduo,et al. Expression of intact (1-34)-HAS fusion protein in *Pichia pastoris* and activity of expressed product[J]. **Chinese Journal of Biologicals**,2013,26(4):515-520.(in Chinese)

[7] LEI J,GUAN B,LI B,et al. Expression,purification and characterization of recombinant human interleukin-2-serum albumin

(rhIL-2-HSA) fusion protein in Pichia pastoris[J]. **Protein Expression and Purification**,2012,84(1):154-160.

[8] HU Xianwen,CHEN HuiPeng,TANG Zhongming,et al. Comparison of biotechnological drugs among the united states,the european union and China[J]. **China Biotechnology**,2005,25(2):82-94.(in Chinese)

[9] 卢慧惠. 人白介素 -2 和人血清白蛋白融合蛋白在中国仓鼠卵巢细胞中的表达[D]. 无锡:江南大学,2015.

[10] JAGSCHIES G. Where is biopharmaceutical manufacturing heading[J]. **Biopharm Int**,2008,21(10):72-88.

[11] KEEN M J,RAPSON N T. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line[J]. **Cytotechnology**,1995,17(3):153-163.

[12] 李勇,蔡木易. 肽营养学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2007.

[13] KIM S H,LEE G M. Development of serum-free medium,supplement with hydrolysates for the prodution of herapeutic antibodies in CHO cell culture using design of experiments[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2009,83(4):639-648.

[14] ZHANG H F,WANG H B,LIU M,et al. Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody[J]. **Cytotechnology**,2013,65(3):363-378.

[15] 范里. GS-CHO 细胞无血清培养过程的开发与优化[D]. 华东理工大学,2010.

[16] ZHAO Lili,LIU Zhong,CHENG Fanliang,et al. Preparation of serum-free medium for culture of recombinant CHO cells[J]. **Chinese Journal of Biologicals**,2014,27(7):910-913.(in Chinese)

[17] FRANEK F,KATINGER H. Specific effects of synthenic oligo-peptides on cultured animal cells[J]. **Biotechnology Progress**,2001,18(1):155-158.

[18] FRANEK F,ECKSCHLAGER T,KATINGER H. Enhancement of monoclonal antibody producyion by lysine-containing peptides[J]. **Biotechnol Progress**,2003,19(1):169-174.

[19] SUNG Y H,LIM S W,CHUNG J Y,et al. Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2004,63(5):527-536.

[20] BARE G,CHARLIER H,NIJS L D,et al. Effects of a rice protein hydrolasate on growth of CHO cells and production of human-γ in a setum-free medium [M]. In:Linder-Olsson E,etal,eds.Kluwer,Dord-recht:Animal cell technology:From target to market,2001:217-219.

[21] BURTEAU C C,VERHOEYE F R,MOLS J F,et al. Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-γ -producing CHO cell line[J]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology–Animal**,2003,39(7):291-296.