

형질전환 Chinese Hamster Ovary 세포에서 Albumin-erythropoietin의 생산시 Silkworm Gland Hydrolysate의 효과

최민호¹, 차현명¹, 김선미², 최용수^{2*}, 김동일^{1*}

Effects of Silkworm Gland Hydrolysate on Albumin-erythropoietin Production in Transgenic Chinese Hamster Ovary Cells

Min-Ho Choi¹, Hyun-Myoung Cha¹, Sun-Mi Kim², Yong-Soo Choi^{2*}, and Dong-Il Kim^{1*}

접수: 2013년 2월 15일 / 게재승인: 2013년 3월 12일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: To date, various strategies have been studied to increase specific productivity in Chinese hamster ovary (CHO) cell cultures. Also, albumin-fusion platform is being applied to other important bioactive peptides with short half-lives. Here, we investigated the effects of silkworm gland hydrolysate (SGH) on the production of albumin-erythropoietin (Alb-EPO) in transgenic CHO cells. The viable cell density of CHO cells was increased by 13% in the medium containing 1 mg/mL SGH higher than in the control medium without SGH. In addition, the production of Alb-EPO was also 1.26-fold enhanced by reducing the early apoptosis of CHO cells. In conclusion, SGH could be used as a useful supplement for the enhancement of recombinant protein production.

Keywords: Albumin-EPO, Apoptosis, CHO cell, Silkworm Gland Hydrolysate

1. 서론

Erythropoietin (EPO)는 혈액세포의 생성을 촉진하는 조혈 호르몬으로 주로 신장에서 생성되고 골수의 줄기세포를 적혈구로 분화시키는 인자이며 erythropoiesis를 조절하는 주된 cytokine이다 [1]. Human EPO (hEPO)는 분자량이 약 30~34 kDa이며 구조적으로 아스파라긴의 3개의 N-linked 형태 carbohydrates와 세린에 1개의 O-linked oligosaccharide chain을 포함하고 있다. EPO는 당쇄가 전체 분자량의 약 40% 정도이며, 특히 N-linked 당쇄는 EPO의 생체 내 활성 및 안정성에 매우 중요한 역할을 한다. hEPO는 post-translational modification (PTM)의 glycosylation 과정 때문에 대장균에서는 제조가 불가능하며 재조합 동물세포에서 생산할 경우에만 인체에서와 같은 형태의 단백질이 만들어진다는 것이 밝혀졌다 [2].

1957년 chinese hamster의 난소로부터 상피 세포주를 만들면서 개발된 chinese hamster ovary (CHO) 세포주는 치료용 단백질 생산에 주로 사용되고 있다. CHO 세포가 널리 사용되는 이유는 첫째, doubling time이 12시간 정도로 증식이 빠르며 높은 클로닝 효율을 지니고, 둘째, 단순하며 안정적인 핵형을 가지는 특징이 있으며 [3], 셋째, 목적 유전자만을 증폭하여 목적 단백질을 높게 발현 시킬 수 있는 dihydrofolate reductase (DHFR) 시스템을 가지고 있으며, 넷째, 부유 세포로 쉽게 변화하여 단위 면적당 생산성을 높이기 쉬운 이점을 가진다 [4,5]. 마지막으로 단백질에 부가되는 당쇄의 합성이나 특성이 생체 내에서의 특성과 유사하여 인체에 존재하는 천연 단백질과 유사한 단백질을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 이로 인해 대부분의 동물세포를 이용한 재조합 단백질

¹인하대학교 공과대학 생물공학과
¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

²차의과학대학교 생명과학대학 바이오공학과
²Department of Applied Bioscience, CHA University, Seongnam 463-836, Korea
Tel: +82-31-725-8358, Fax: +82-31-725-8359
e-mail: yschoi@cha.ac.kr

생산은 CHO 세포를 이용하고 있다.

CHO 세포를 이용하여 목적 단백질 생산시, 세포의 증식에 따라 발생하는 유해한 부산물의 축적 또는 배지 내 특정 성분의 고갈 등의 이유로 배양 후 일정시간이 경과하면 세포의 생존율이 급격히 떨어진다. 이를 해결하기 위한 많은 연구가 진행되었다. Constantinou *et al.*은 CHO 세포 배양에서 배양 온도와 용존산소, pH, 삼투압과 같은 배양 조건의 변화를 통해 배양을 최적화하여 단백질의 생산성이 증가됨을 확인하였고, Fike는 배양 과정에서 생기는 젖산 (lactic acid), 암모니아 (ammonia)와 같은 부산물을 제거하여 세포 생존도를 높이는 방법을 연구하였다. 그리고 Arden *et al.*은 배지에 glucose, glutamine과 같은 기본 영양소를 추가적으로 넣는 방법과 세포사멸 억제제를 첨가하는 방법을 사용하여, 목적 단백질의 생산을 증가시키고자 하였다. 최근까지도 CHO 세포를 배양하여 목적 단백질을 생산할 때 세포의 증식과 단백질의 생산성 측면에서 더 긍정적인 영향을 미치도록 하는 연구가 지속되고 있는 상황이다.

누에 유래된 단백질은 동물세포 배양에서 세포의 증식을 향상시키고 사멸을 억제하는 효과가 우수한 것으로 보고되었다 [8]. 기존의 누에 유래 물질 중에 대표적인 세리신과 피브로인이 있는데, 실크 가공 과정에서 광택과 감촉을 향상시키기 위해 세리신은 정련과정에서 제거되고 피브로인은 고온, 고압을 이용하거나 유독성 물질을 처리하여 얻어진다 [9]. 그러나 본 연구에서 사용한 SGH는 상온에서 유기용매를 사용하지 않은 공정으로 통하여 얻어진 물질이다. Hwang *et al.*의 연구 결과를 바탕으로 제조된 SGH의 특성을 분석한 결과 필수 아미노산 성분을 모두 함유함과 동시에 세포에 대해 독성이 없이 증식효과가 있는 것이 증명되었고 항산화 능력도 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 제조 방법이 용이하여 대량 생산에 적합하고 안전한 SGH가 CHO 세포의 배양에 미치는 긍정적인 효과를 확인하고자 하였다. Alb-EPO를 생산하는 형질전환 CHO 세포 배양에서 SGH를 각 농도 별로 처리하여 세포의 성장과 생산성에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 CHO 세포에서 apoptosis를 저해하는 물질과 비교하여 SGH가 세포의 사멸을 억제하는 효과를 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주 및 세포배양

EPO와 albumin이 융합된 유전자와 DHFR 유전자가 같이 coding되어 있는 vector를 이용하여 DHFR deficient CHO 세포주인 DUKX-B11 (ATCC CRL-9096, Manassas, VA)에 도입하여 Alb-EPO를 생산하는 형질전환 CHO 세포주를 확립하였다 (Fig. 1) [10]. Alb-EPO를 생산하는 형질전환 CHO 세포주는 MTX를 이용한 유전자 증폭법을 사용하여 고발현주를 선별하였다 [11]. 125 mL Erlenmeyer flask에 20 mL의 ProCHO5 (Lonza, Verviers, Belgium) 배지를 분주한 후 3 ×

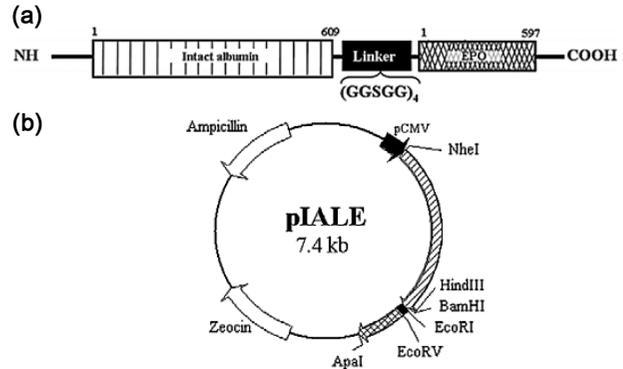


Fig. 1. Schematic diagram of the Alb-EPO. (a) EPO linked with intact albumin by linker (GGSGGG)₄. (b) Alb-EPO gene was injected into pcDNA 3.1/Zeo(+) between the Nhe 1 site and the Apa 1 site.

10⁵ cells/mL와 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 첨가하였다. 세포 배양은 orbital shaker에서 100 rpm으로, 5% CO₂가 공급되는 37°C humidified CO₂ incubator (SANYO Electric Co. Ltd., Osaka, Japan)에서 유지하였다.

2.2. 누에 실샘 가수분해물의 제조

누에 (백옥잠)를 급속 동결 건조한 후 실샘을 분리하여 얻은 분말을 증류수와 혼합하여 교반하였다. 원심분리를 하여 상등액만 분리한 후 1 M NaOH를 첨가하여 상온에서 가수분해하였다. 인산으로 중화시킨 후 탈염하고 동결 건조를 통해 최종 SGH를 제조하였다 [9]. 분말 상태의 SGH를 증류수로 희석하여 1,300 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액만 얻어 0.22 μm filter로 여과하여 배지에 첨가하였다.

2.3. 세포 수 및 생존도 측정

배양에서 얻은 세포를 trypan blue (Sigma-Aldrich) dye를 이용하여 염색을 실시한 후 현미경을 통해 hemocytometer를 사용하여 세포의 수와 생존도를 확인하였다.

2.4. 배지 내 Alb-EPO의 정량분석

배양액 내의 Alb-EPO의 정량분석을 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 사용하였다. Goat anti-human albumin antibody (Abcam Inc., Cambridge, CA, USA)와 peroxidase-labeled goat anti-human albumin (Abcam)을 각각 1차, 2차 항체로 사용하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 발색반응을 위한 기질로는 ABTS peroxidase substrate를 사용하였다. 발색정도는 405 nm에서 흡광도를 측정하였고 표준 물질로는 human serum albumin protein (Abcam)을 사용하였다.

2.5. 세포 주기 분석

Alb-EPO를 생산하는 형질전환된 CHO 세포의 세포 주기 분석을 위해 배양한 세포를 30% PBS와 70% 에탄올이 포함된 수용액으로 반응시켜 세포막을 용해하였다. 1,300 rpm에서

5분간 원심분리를 통해 세포를 수거하여 1 mL PBS와 5 μ L RNase (Qiagen, Hilden, Germany)를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. Propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) 10 μ L를 첨가하여 15분간 암반응시킨 후 FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.6. 세포사멸 분석

첨가 물질에 의한 Alb-EPO를 생산하는 CHO 세포의 사멸을 확인하기 위해 배양 후 얻은 세포에 Annexin V FITC assay kit (Cayman Chemical Company, MI, USA)를 사용하여 Annexin V FITC/propidium iodide staining solution으로 상온에서 10분간 암반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 FACSCalibur (Becton Dickinson)로 분석하고 CellQuest software (Becton Dickinson, NJ, USA)를 이용하여 apoptosis와 necrosis의 정량적인 수치를 측정하였다.

2.7 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 평균값 \pm 평균의 표준오차로 환산한 후, 통계처리는 Sigmaplot (Systat Software Inc., CA, USA)을 이용하여 t-test를 진행하였다. 평균값의 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. CHO 세포 증식능 및 Alb-EPO 생산성 비교

SGH가 CHO 세포 배양에서 세포의 증식과 Alb-EPO 단백질의 생산성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 SGH의 최적 농도를 결정하는 실험을 하였다. SGH는 0.5, 0.75, 1, 1.25 mg/mL의 농도로 첨가하였다. 배양시간 변화에 따른 Alb-EPO의 생산을 확인하기 위해 viable cell density (VCD)와 생존도를 측정하였으며 세포의 생존도가 유지되며 생산성이 증가되는 시점인 배양 4일차에 SGH를 첨가하였다.

배양 5일차에 대조군의 경우 배양 5일차에 최대 VCD가 3.4×10^6 cells/mL에 도달하였다 (Fig. 2(a)). 이는 보통의 fusion protein에서 나타나는 양상으로, 비교적 짧은 세포주기를 나타낸다 [11]. SGH를 각각의 농도로 처리한 결과, VCD는 1 mg/mL 농도에서 3.9×10^6 cells/mL로 제일 높게 배양되는 것을 확인하였다. 특히 배양 7일차에 대조군의 1.4×10^6 cells/mL에 비해 1 mg/mL SGH를 첨가할 경우 2.15×10^6 cells/mL로 1.5배 증가하였다. 뿐만 아니라, 배양 7일차에 대조군의 생존도는 26.8%를 나타내었지만, 1 mg/mL SGH 처리한 실험군은 42.4%의 생존도를 나타내었다 (Fig. 2(b)).

SGH 첨가에 따른 Alb-EPO 생산량의 변화를 확인하기 위해 ELISA 분석 후 Alb을 기준으로 하여 EPO의 생산량을 측정하였다. 대조군의 최대 생산량은 배양 6일차에 38.7 mg/L를 나타냈다. 반면, SGH를 0.75 mg/mL과 1 mg/mL 농도로 첨가한 경우, 배양 6일차에 Alb-EPO의 최고 생산량은 48.8 mg/L로, 대조군에 비해 1.26배 증가하였다 (Fig. 3).

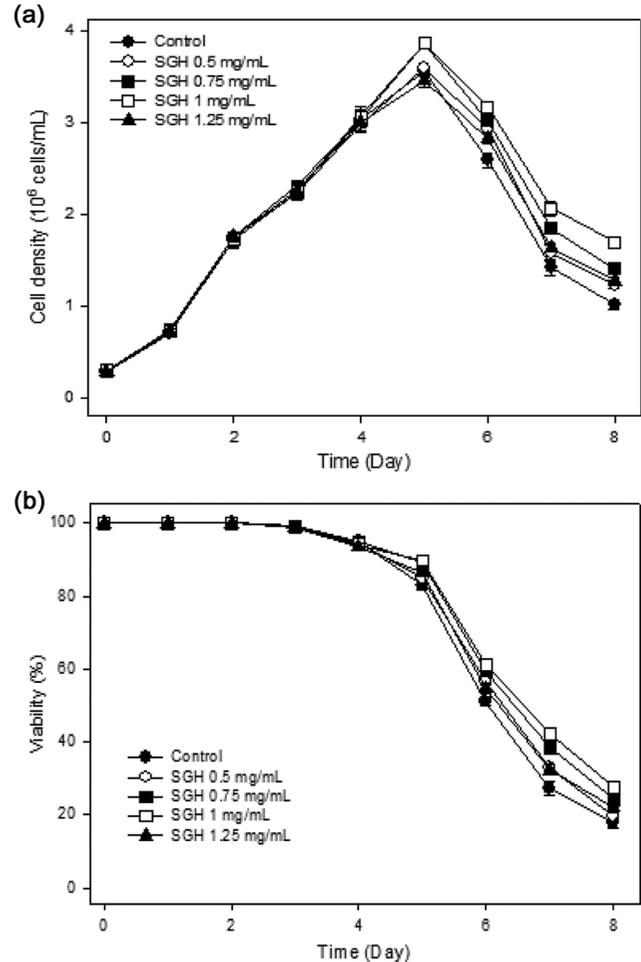


Fig. 2. Effect on (a) viable cell density and (b) viability in different concentration of SGH.

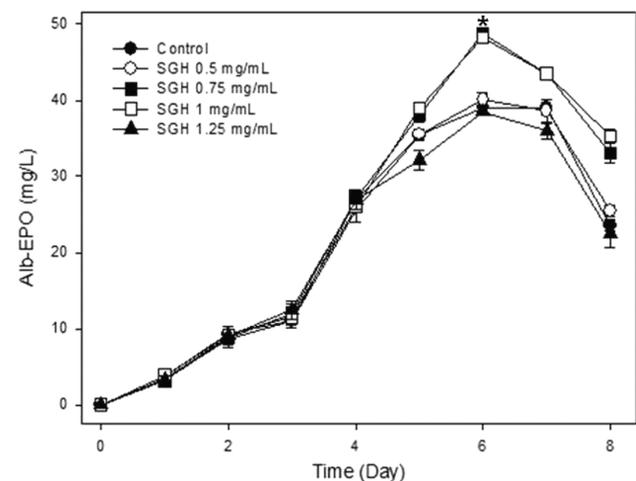


Fig. 3. Alb-EPO production in different concentration of SGH. Student's *t*-tests were performed with each concentration group compared to the control group ($*P < 0.05$).

따라서 세포의 증식과 목적 단백질의 생산량은 1 mg/mL SGH에서 가장 효과가 있음을 알 수 있었다.

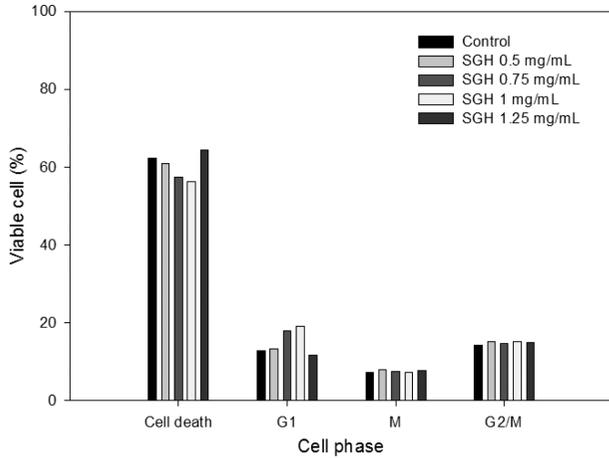


Fig. 4. The comparison of cell cycle in different concentration of SGH at day 6.

3.2. SGH 농도에 따른 세포 주기의 변화

SGH 첨가에 따라 세포의 생존도에 많은 차이가 발생하는 배양 6일 차에 CHO 세포의 주기를 확인하였다. 세포사멸 (apoptosis)이 일어나는 정도는 대조군에서 62.4% 일어난 반면 1 mg/mL SGH를 첨가한 경우에는 세포사멸이 56.2%로 가장 적게 일어나는 것을 확인하였다 (Fig. 4). CHO 세포 주기 중 G1기가 차지하는 비율은 대조군에서는 12.7%를 보였으며 가장 높은 비율을 차지하는 것은 1 mg/mL SGH를 첨가한 배양에서 19.1%를 보였다. 배양 중에 세포는 G1기에서 단백질을 생산하게 된다 [12]. 따라서 1 mg/mL SGH를 첨가한 실험군 세포에서 G1기의 비율이 높아지는 결과를 통하여 Alb-EPO의 생산량이 대조군보다 높게 나타나는 원인을 추측할 수 있었다.

3.3. SGH의 세포사멸 억제 및 생산량 증대 효과

누에로부터 유래된 단백질은 apoptosis를 저해하는 것에 효과적인 것으로 보고되었다 [13,14]. 누에의 실샘에서 얻은 SGH의 apoptosis의 효과를 확인하기 위하여 세포의 apoptosis를 저해하는 것으로 보고된 2.5 mM dextran sulfate [15]와 8 mM N-acetylcystein (NAC) [16], 그리고 실험군으로 1 mg/mL SGH를 첨가하여 세포 증식과 세포사멸 억제 효과를 비교하였다. 아무 것도 첨가하지 않은 음성 대조군에서 VCD는 최대 3.94×10^6 cells/mL를 나타낸 반면 SGH (4.4×10^6 cells/mL), dextran sulfate (4.27×10^6 cells/mL) 그리고 8 mM NAC (4.17×10^6 cells/mL)를 첨가한 경우 모두 대조군 보다 세포 VCD가 높게 나타났다 (Fig. 5(a)). CHO 세포의 생존도는 대조군에서와 각 물질들을 첨가했을 때 모두 배양 5일-6일차 사이에 세포사멸이 가장 많이 일어났으며 큰 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 5(b)). 결론적으로 1 mg/mL SGH를 첨가한 경우 VCD와 생존도 모두 높게 유지되고 있음을 확인할 수 있었다.

CHO 세포 배양을 통해 생산되는 Alb-EPO 단백질의 생산량은 대조군에서 최대 생산량이 배양 7일차에 35.7 mg/L 생

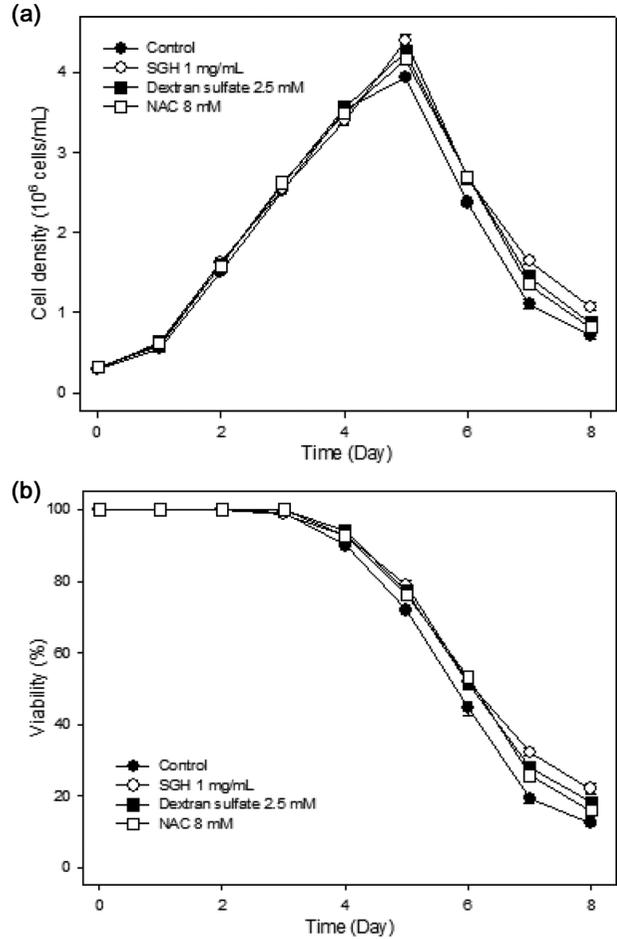


Fig. 5. Effect of SGH and anti-apoptotic agent on (a) viable cell density and (b) viability. Cells were initially cultivated without anti-apoptotic agents (control, ●) for 4 days and then cultivated in the medium containing 1 mg/mL SGH (○), 2.5 mM dextran sulfate (■), and 8 mM NAC (□), respectively.

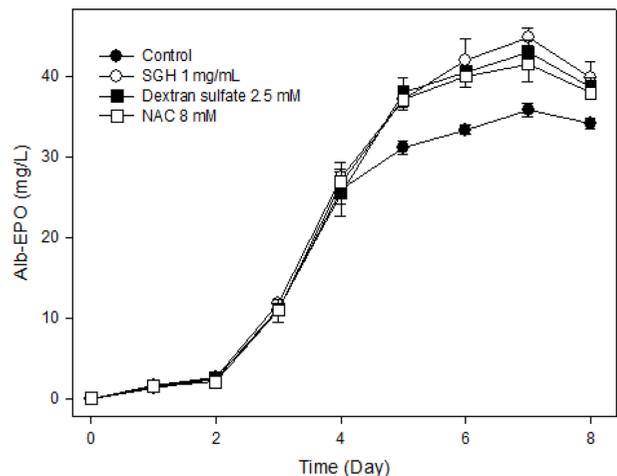


Fig. 6. The comparison of various anti-apoptotic agents on Alb-EPO production. Cells were initially cultivated without anti-apoptotic agents (control, ●) for 4 days and then cultivated in the medium containing 1 mg/mL SGH (○), 2.5 mM dextran sulfate (■), and 8 mM NAC (□), respectively.

산되었다. 각 물질들을 첨가한 경우, 최대 Alb-EPO 생산량은 SGH (45.0 mg/L), dextran sulfate (43.1 mg/L), 8 mM NAC (41.1 mg/L) 순으로 SGH를 첨가하였을 때 단백질의 생산이 가장 많이 된 것을 확인하였다 (Fig. 6).

결론적으로, SGH는 세포사멸 억제제와 비교하여 생존도가 높게 유지되며 목적 단백질의 생산량 증대에 효과적임을 확인할 수 있었다.

3.4. 세포사멸 분석

세포배양 중 SGH의 첨가는 외부 자극에 의한 ROS 생성을 억제할 뿐만 아니라 ROS를 매개로한 세포사멸을 억제함으로써 세포사멸 억제 효과를 가지는 것으로 확인하였다 (data not shown). 배양 중 세포의 사멸을 확인하기 위해 apoptosis/necrosis 분석을 하였다. 각각의 물질을 첨가한 후 배양 5, 6일 차 세포를 회수하여 viable 세포와 early-apoptosis, late-apoptosis 그리고 necrosis가 일어나는 세포의 정량적인 분석을 수행하였다.

배양 5일 차에서부터 apoptosis의 비율은 대조군에 비해서 첨가물을 넣어주었을 때 감소되는 것을 확인했고, 배양 6일

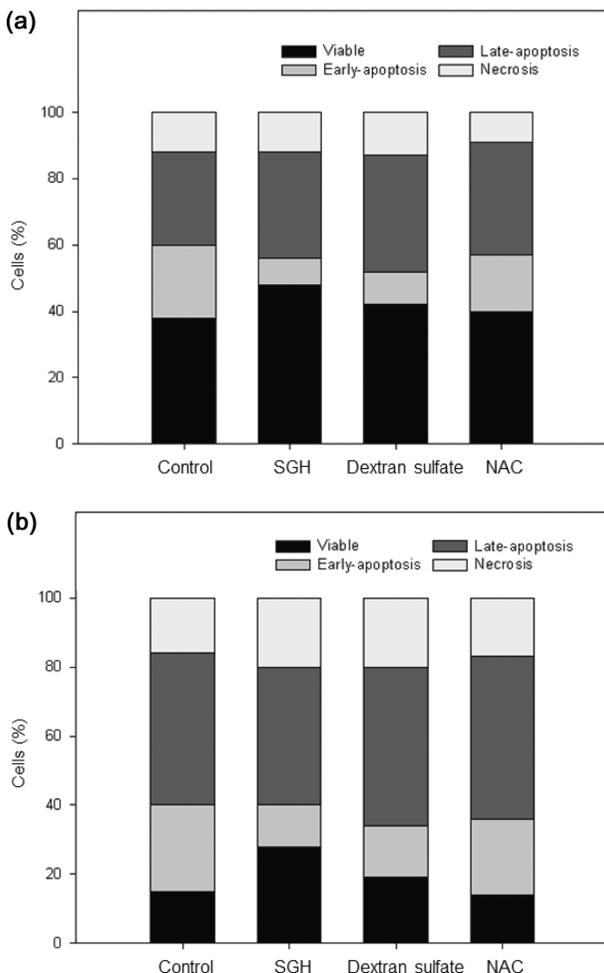


Fig. 7. The ratio of cell death, early-apoptosis, late-apoptosis and necrosis in different anti-apoptotic agents at (a) day5 and (b) day 6.

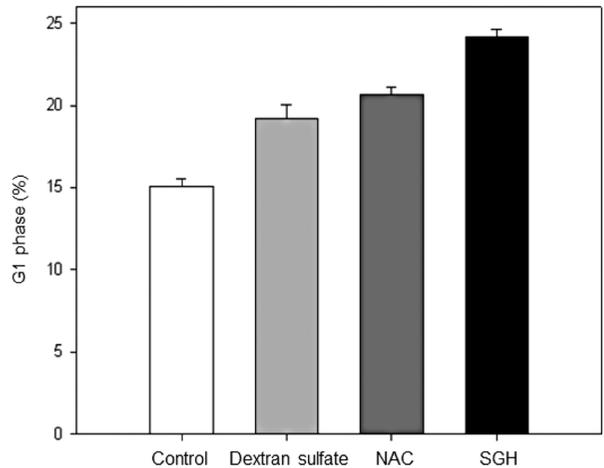


Fig. 8. G1 phase of the cell cycle at day 6. When SGH was added to the media, ratio of G1 phase was higher than the other agents.

차에 음성 대조군에서는 early-apoptosis 25%와 late-apoptosis 44%를 보였으며 necrosis는 17%였다. SGH를 첨가한 경우에는 early-apoptosis 12%와 late-apoptosis 40%로 apoptosis가 가장 적게 일어났으며 necrosis는 19% 발생하였다. Dextran sulfate에서는 early-apoptosis 15%와 late-apoptosis 46%로 음성 대조군보다는 apoptosis가 덜 일어났으며 necrosis는 19%로 대조군보다 다소 높은 수치를 보였다. 마지막으로 NAC를 첨가한 경우에는 early-apoptosis 22%와 late-apoptosis 47%로 대조군과 같은 수치였고 necrosis도 18%로 대조군과 비슷한 비율을 나타냈다 (Fig. 7). 이처럼 세포의 사멸을 분석한 결과로 SGH를 첨가하였을 때 apoptosis의 비율이 가장 낮았다. 추가적인 분석으로 배양 6일차의 세포 주기는 SGH를 첨가하였을 때 G1기의 세포가 가장 많은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 이 결과는 앞서 언급한 것과 같이 SGH의 첨가로 세포의 사멸이 저해되어 G1기의 세포 비율이 높아졌고 결과적으로 단백질의 생산성 증대에 기여하는 것으로 추측할 수 있다.

4. 결론

CHO 세포의 회분식 배양시 배양 5일에서 6일차 사이에 세포의 사멸이 급격하게 일어나는 것을 확인하였다. 이러한 세포의 생존도를 높이고, Alb-EPO의 생산성 증대를 위해 배양 4일차에 SGH를 첨가하여 배양하였다. 그 결과 SGH에 최적 첨가 농도인 1 mg/mL에서 세포에 VCD는 3.9×10^6 cells/mL 까지 성장을 하였고 대조군 대비 최대 1.5배 높게 성장하였으며, 단백질 생산량은 48.8 mg/L로 대조군의 비해 1.26배 증가하였다.

누에에서 유래된 단백질은 apoptosis를 저해하는 것으로 밝혀졌다. 이와 관련하여 SGH는 누에의 실샘에서 얻은 것으로 항산화 능력과 영양분으로 사용이 검증되어 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포사멸 억제제인

dextran sulfate와 NAC를 함께 첨가하여 비교 실험을 하였다. 각 물질들을 첨가한 배양에서도 SGH를 첨가한 배양 세포가 최대 VCD와 Alb-EPO 단백질도 최고의 생산량을 보였다. 또한 세포의 사멸을 정량적으로 분석하여 SGH를 첨가한 경우에 necrosis가 일어난 정도는 대조군과 각 물질들을 첨가한 배양에서 비슷한 비율로 일어났지만 apoptosis가 가장 적게 일어나서 세포의 높은 생존도를 확인하였다. 이로 인해 G1기의 세포의 비율이 높은 것을 확인하였고 결과적으로 단백질의 생산량에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

본 연구를 통해서 Alb-EPO를 생산하는 형질전환된 CHO 세포의 배양에서 생존도와 생산성에 대한 SGH의 긍정적인 효과를 확인하였으며, early-apoptosis 억제 효과를 통하여 G1기의 세포 비율이 증가하였고 VCD 및 목적 단백질의 생산량 증대에 매우 효과적임을 증명하였다. 따라서 향후 SGH는 재조합 단백질 대량 생산을 위한 첨가물로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사

본 연구는 지식경제부 바이오특성화대학원 운영사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Brinks, V., A. Hawe, A. H. H. Basmeleh, L. Joachin-Rodriguez, R. Haselberg, G. W. Somsen, W. Jiskoot, and H. Schellekens (2011) Quality of original and biosimilar epoetin products. *Pharm. Res.* 28: 386-393.
- Constantinou, A., C. Chen, and M. P. Deonarain (2010) Modulating the pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *Biotechnol. Lett.* 32: 609-622.
- Weikert, S., D. Papac, J. Briggs, D. Cowfer, S. Tom, M. Gawlitzeck, J. Lofgren, S. Mehta, V. Chisholm, N. Modi, S. Eppler, K. Carroll, S. Chamow, D. Peers, P. Berman, and L. Krummen (1999) Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* 17: 1116-1121.
- Flintoff, W. F., M. K. Weber, C. R. Nagainis, A. K. Essani, D. Robertson, and W. Salsler (1982) Overproduction of dihydrofolate reductase and gene amplification in methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 2: 275-285.
- Jenkins, N., L. Murphy, and R. Tyther (2008) Post-translational modifications of recombinant proteins: Significance for biopharmaceuticals. *Mol. Biotechnol.* 39: 113-118.
- Fike, R. (2010) Nutrient supplementation strategies for biopharmaceutical production, part 3: Scaling strategies for rapid nutrient supplement prototyping. *Bioprocess International.* 8: 24-31.
- Arden, N., and M. J. Betenbaugh (2004) Life and death in mammalian cell culture: Strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* 22: 174-180.
- Kim, E. J., H. J. Park, and T. H. Park (2003) Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silk worm hemolymph. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 523-528.
- Hwang, J. W., H. S. Lee, H. J. Kim, and Y. S. Choi (2012) Manufacture and characterization of silk worm gland hydrolysate. *J. Seric. Entomol. Sci.* 50: 76.
- Joung, C. H., J. Y. Shin, J. K. Koo, J. J. Lim, J. S. Wang, S. J. Lee, H. K. Tan, S. L. Kim, and S. M. Lim (2009) Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr. Purif.* 68: 137-145.
- Yoon, S. K., and Y. H. Ahn (2007) Effect of glycine betaine on follicle-stimulating hormone production by chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 22: 109-113.
- Sunley, K., and M. Butler (2010) Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol. Adv.* 28: 385-394.
- Terada, S., T. Nishimura, M. Sasaki, H. Yamada, and M. Miki (2003) Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology* 40: 3-12.
- Takahashi, M., K. Tsujimoto, H. Yamada, H. Takagi, and S. Nakamori (2003) The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture. *Biotechnol. Lett.* 25: 1805-1809.
- Jing, Y., S. E. Egan, Y. Qian, M. C. Borys, N. R. Abu-Absi, and Z. J. Li (2011) Dextran sulfate inhibits staurosporine-induced apoptosis in Chinese hamster ovary (CHO) cells: Involvement of the mitochondrial pathway. *Process Biochem.* 46: 427-432.
- Han, K. O., K. S. Moon, J. Yang, C. Y. Ho, S. A. Ji, M. L. Jong, T. K. Ji, U. Y. Ji, and H. B. Tae (2005) Effect of N-acetylcystein on butyrate-treated chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon- β -1a. *Biotechnol. Prog.* 21: 1154-1164.