

HEK293F 细胞瞬时表达 PDGFR- β /Fc 蛋白的条件优化*

洪坡, 袁凤媚, 黄嘉慧, 刘东晨, 张途, 谢秋玲
(暨南大学生命科学技术学院//广东省生物工程药物重点实验室//
基因工程药物国家工程研究中心, 广东 广州 510632)

摘要: 为优化 HEK293F 细胞瞬时转染条件, 提高 PDGFR- β 的蛋白表达量, 采用聚乙烯亚胺 (Polyetherimide, PEI) 为转染试剂, 将质粒 pXLG-PDGFR- β /Fc 与 PEI 混匀聚合后加入到细胞悬液, 37 °C, $\varphi = 6\%$ CO₂, 180 r/min 悬浮振荡培养, 培养 7 d 后收集样品, ELISA 检测 PDGFR- β 蛋白的浓度。对细胞密度、DNA 浓度和 m (DNA) : m (PEI)、聚合时间以及添加物 (丙戊酸钠、葡萄糖和蛋白胨) 进行优化。结果显示, HEK293F 细胞瞬时转染的最佳条件为: 细胞密度 4×10^6 cells/mL、DNA 浓度 $2.0 \mu\text{g}/10^6$ cells、 m (DNA) : m (PEI) 为 1 : 2、聚合时间 5 min。同时, 48 h 内添加 3 mmol/L 丙戊酸钠, 第 3 天补加葡萄糖和 1 g/L 的蛋白胨 TN1 可使 PDGFR- β /Fc 的蛋白表达量明显提高。实验表明, 经过对 HEK293F 细胞瞬时表达 PDGFR- β 的转染条件的优化, 蛋白表达量可达 55 mg/L, 为更大规模瞬时转染生产 PDGFR- β /Fc 蛋白奠定了基础。

关键词: PDGFR- β /Fc; HEK293F 细胞; 瞬时表达

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2015) 05-0096-06

Condition Optimization of PDGFR- β /Fc Transient Expression in HEK293F Cells

HONG Po, YUAN Fengmei, HUANG Jiahui, LIU Dongchen, ZHANG Tu, XIE Qiuling
(College of Life Science and Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of
Bioengineering Medicine, National Engineering Research Center of Genetic Medicine,
Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To optimize the conditions for transient transfection in HEK293F cells and improve the production of PDGFR- β , DNA (pXLG-PDGFR- β) and PEI were separately diluted in ultra-pure water, mixed together, and incubated at room temperature. The PEI-DNA complex was then added to the cells, and the culture was incubated at 37 °C with 6% CO₂ with agitation at 180 r/min, then incubated for 7 days. The PDGFR- β /Fc concentration in the culture medium was determined by sandwich ELISA. The conditions including cell density, DNA concentration and ratio of DNA to PEI, as well as other effectors such as adding of VPA and peptone were optimized. The results showed that transient gene expression yields of PDGFR- β /Fc can be maximized under following conditions: 4×10^6 cells/mL, $2.0 \mu\text{g}/10^6$ cells DNA, 1:2 ratio of DNA and PEI and polymerize 5 minutes. The productivity can be further increased with adding of 3 mmol/L VPA, glucose and 1 g/L TN1. The experiment showed that when the conditions for transient transfection of HEK293F cells were optimized, the PDGFR- β /Fc yields up to 55 mg/L were achieved at the conditions, which laid a foundation of PDGFR- β /Fc expression for larger scales transfection.

* 收稿日期: 2015-03-11

基金项目: 广东省战略性新兴产业核心技术攻关资助项目 (2012A080800008); 广东省重大科技专项资助项目 (2012A080202014)

作者简介: 洪坡 (1989 年生), 男; 研究方向: 基因工程药物; 通讯作者: 谢秋玲; E-mail: txql@jnu.edu.cn

tion in HEK293F cells.

Key words: PDGFR- β /Fc; HEK293F cells; transient gene expression

过去 10 年中, 瞬时基因表达系统快速生产复杂治疗性蛋白技术得到了广泛应用^[1], 瞬时基因表达 (Transient gene expression, TGE) 是一种使用动物细胞悬浮培养技术快速生产毫克级至克级重组蛋白的方法, 目前最常用的细胞株是 CHO 细胞和 HEK 293 细胞, 这两种细胞可适应无血清悬浮培养^[2]。HEK293 细胞凭借其易转染、高表达、天然人糖基化修饰、允许蛋白正确折叠和相关翻译后修饰等优点使用最为广泛^[3-4]。聚乙烯亚胺 (PEI) 是一种在小规模到大规模蛋白表达中广泛使用的转染试剂, 它具有高效性和经济性等优点^[2,4-5]。PEI 是一种阳离子聚合物, 可与 DNA 结合凝聚成带正电荷的纳米颗粒, 颗粒与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖黏合, 并通过胞吞作用进入细胞, 从而促进细胞对 DNA 的摄取^[6-7]。线型和支化的 25 000 PEI 是使用最为广泛的聚合物, 其中线型 PEI 转染效率更高、毒性更小, 常被用于悬浮培养的 HEK293 细胞的转染^[8-10]。

血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 具有诱导肿瘤中淋巴管生成和促进肿瘤淋巴转移的功能, 是潜在的治疗肿瘤分子靶标^[11]。可溶性血小板源性生长因子受体 (sPDGFR) 可与细胞膜表面的 PDGFR 竞争性结合 PDGF, 从而阻断 PDGF 的生物学效应, 有望用于肿瘤的治疗^[12-13]。PDGFR 主要包含两种结构相似的受体亚型 PDGFR- α 和 PDGFR- β 。PDGFR 的 β 链膜外区与人 IgG Fc 片段的重组型可溶性融合蛋白 sPDGFR- β /Fc 受体作为一种新型的 PDGF 拮抗剂, 具有很好的应用前景。

本实验用 PEI 介导 PDGFR- β /Fc 质粒转染 HEK293F 细胞, 影响转染效率和蛋白表达的因素有活细胞接种密度、DNA 浓度、PEI 浓度、DNA 与 PEI 聚合时间以及添加物^[14], 本实验对上述因素进行优化。

1 材料和方法

1.1 质粒和细胞株

HEK293F 细胞由南开大学惠赠, pXLG-PDGFR- β /Fc 为本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器

无内毒素质粒抽提试剂盒 (NucleoBond Xtro Maxi Plus) 购自德国 MN 公司; PEI 购自 Poly-

sciences 公司; EX-CELL[®] 293 无血清培养基购自美国 SIGMA 公司; RPMI1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司; Goat anti-Human IgG (Fc)、Goat pAb to Hu IgG (AP) 购自 Abcam 公司; 蛋白胨购自 Organotechnie 公司; TubeSpin 一次性生物反应器购自 TPP 公司; ACCU-CHEK[®] 血糖仪购自 Roche 公司; 酶标仪购自 Thermo 公司。

1.3 细胞培养

HEK293F 细胞接种于含 10 mL EX-CELL[®] 293 无血清培养基 (含 6 mmol/L 谷氨酰胺) 的 50 mL TubeSpin 管中, 置于 37 °C, $\varphi = 6\%$ CO₂, 180 r/min 恒温震荡培养箱中培养, 培养密度控制在 0.5×10^6 cells/mL 至 4×10^6 cells/mL 范围内。在转染前 1 d, 将细胞离心 (1 000 r/min, 5 min), 新鲜培养基重悬至 2×10^6 cells/mL。

1.4 质粒制备

用无内毒素质粒抽提试剂盒抽提质粒, 经琼脂糖凝胶电泳验证。NanoDrop2000 测定质粒 DNA 浓度和纯度, $A_{260/280}$ 在 1.8 ~ 1.9, $A_{260/230}$ 应大于 2.0。

1.5 转染

转染前用血球计数板对细胞计数, 细胞活率需在 95% 以上。将实验所需细胞量的细胞悬液离心 (1 000 r/min, 5 min), 一定量 RPMI1640 培养基于 50 mL TubeSpin 管中重悬。同时, 按实验组设置, 将一定量的质粒 DNA 和 PEI 溶液混匀聚合。将 DNA 与 PEI 聚合溶液加入细胞悬液混匀, 置于恒温震荡培养箱中培养。每隔 24 h 收样检测目的蛋白质量浓度。

1.6 葡萄糖质量浓度测定

采用 ACCU-CHEK[®] 血糖仪测定。

1.7 PDGFR- β /Fc 蛋白质量浓度测定

采用 ELISA 方法测定。以羊抗人 IgG-Fc 包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜。按一定梯度稀释 IgG 标准品和培养液上清样品, 加入孔中 37 °C 孵育 1 h, 扣干、洗板后加入 $w = 0.5\%$ BSA 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG, 37 °C 孵育 1 h。加显色液孵育 15 min, 405 nm 波长下酶标仪检测 A 值。通过标准曲线计算 PDGFR- β 蛋白质量浓度。每孔做 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 HEK293F 细胞瞬时转染基本条件的优化

PEI 介导的瞬时转染方法中, 影响瞬时转染条

件的基本因素有细胞接种活细胞密度、质粒 DNA 浓度、PEI 浓度、DNA 与 PEI 的聚合时间。本实验中, 细胞接种密度设定 2×10^6 cells/mL 和 4×10^6 cells/mL 两个水平, DNA 浓度设定 $1.5 \mu\text{g}/10^6$ cells

和 $2.0 \mu\text{g}/10^6$ cells 两个水平, DNA:PEI 设定为 1:2、1:3、1:4 三个水平, 聚合时间设定为 5、10、15 min 3 个水平。本实验根据表一进行单因素实验对上述条件进行优化, 每组实验重复 3 次。

表 1 HEK293F 细胞瞬时转染基本条件的优化

Table 1 The primary condition optimization of PDGFR- β /Fc expression for transient gene expression in HEK293F cells

VCD/ ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	DNA/ ($10^{-6} \mu\text{g} \cdot$ cells $^{-1}$)	$m(\text{DNA}):$ 聚合时间/ $m(\text{PEI})$ min	$\rho(\text{蛋白})/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ($x \pm s$)	VCD/ ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	DNA/ (10^{-6} $\mu\text{g} \cdot \text{cells}^{-1}$)	$m(\text{DNA}):$ 聚合时间/ $m(\text{PEI})$ min	$\rho(\text{蛋白})/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ($x \pm s$)		
2	1.5	1:2	5	6.8 ± 0.23	4	1.5	1:2	5	10.2 ± 0.23
2	1.5	1:3	5	9.5 ± 0.24	4	1.5	1:3	5	9.8 ± 0.24
2	1.5	1:4	5	4.2 ± 0.17	4	1.5	1:4	5	7.5 ± 0.17
2	1.5	1:2	10	6.4 ± 0.13	4	1.5	1:2	10	8.8 ± 0.13
2	1.5	1:3	10	7.5 ± 0.08	4	1.5	1:3	10	6.4 ± 1.04
2	1.5	1:4	10	4.4 ± 0.1	4	1.5	1:4	10	4.8 ± 0.05
2	1.5	1:2	15	4.0 ± 0.5	4	1.5	1:2	15	3.8 ± 0.53
2	1.5	1:3	15	3.6 ± 0.19	4	1.5	1:3	15	2.1 ± 0.3
2	1.5	1:4	15	1.7 ± 0.4	4	1.5	1:4	15	2.5 ± 0.3
2	2.0	1:2	5	10.9 ± 0.23	4	2.0	1:2	5	15.6 ± 0.64
2	2.0	1:3	5	8.2 ± 0.24	4	2.0	1:3	5	11.4 ± 0.33
2	2.0	1:4	5	7.5 ± 0.17	4	2.0	1:4	5	7.4 ± 0.6
2	2.0	1:2	10	9.80 ± 0.13	4	2.0	1:2	10	11.7 ± 0.3
2	2.0	1:3	10	6.1 ± 0.28	4	2.0	1:3	10	7.5 ± 0.21
2	2.0	1:4	10	4.8 ± 0.1	4	2.0	1:4	10	4.8 ± 0.1
2	2.0	1:2	15	3.1 ± 0.5	4	2.0	1:2	15	2.1 ± 0.25
2	2.0	1:3	15	1.9 ± 0.59	4	2.0	1:3	15	2.4 ± 0.32
2	2.0	1:4	15	1.4 ± 0.4	4	2.0	1:4	15	2.0 ± 0.4

结果显示 (表 1), 当细胞接种密度为 2×10^6 cells/mL 时, DNA 浓度增加, 蛋白表达量略有增加, 这是因为受到细胞密度的限制, 细胞对质粒 DNA 的摄入已达到峰值。当细胞接种密度为 4×10^6 cells/mL 时, 增大 DNA 浓度, 蛋白表达量明显增加。增大 PEI 与 DNA 的比例, 蛋白表达量相对稍低, 细胞计数结果显示, 增大 PEI 的浓度, 细胞毒性增加, 细胞活率相对低。增加 DNA 与 PEI 聚合时间, 蛋白表达量降低。经过组合优化, HEK293F 细胞瞬时表达 PDGFR- β 融合蛋白最佳条件是细胞接种密度 4×10^6 cells/mL、DNA 浓度 $2.0 \mu\text{g}/10^6$ cells、DNA/PEI 比例 1:2、聚合时间 5 min, 蛋白表达量可达 15.6 mg/L。

2.2 HEK293 细胞瞬时转染其它条件的优化

2.2.1 添加 VPA 浓度及添加时间的优化 在前述优化的基本条件下, 本实验先对 VPA 添加浓度进行优化, VPA 添加浓度为 2、3、4、5 mmol/L, 细

胞转染后 24 h 添加。然后对 VPA 的添加时间进行优化, VPA 添加时间为转染后 0、24、48 h, 探索添加时间的影响。每组实验重复 3 次。

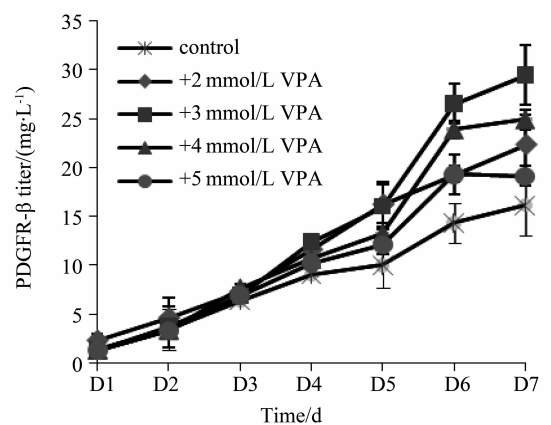


图 1 添加不同浓度 VPA 对 PDGFR- β 表达的影响

Fig. 1 Optimization of VPA concentration

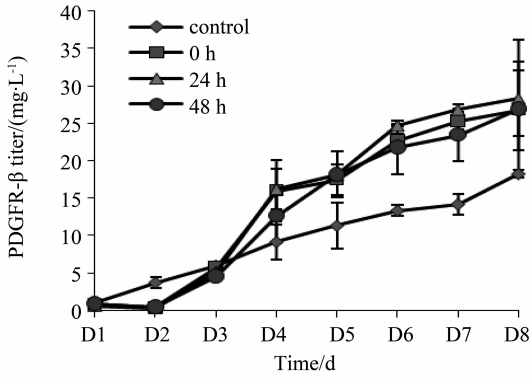


图 2 不同时间添加 VPA 对 PDGFR-β 表达的影响
Fig. 2 Optimization of time for adding VPA

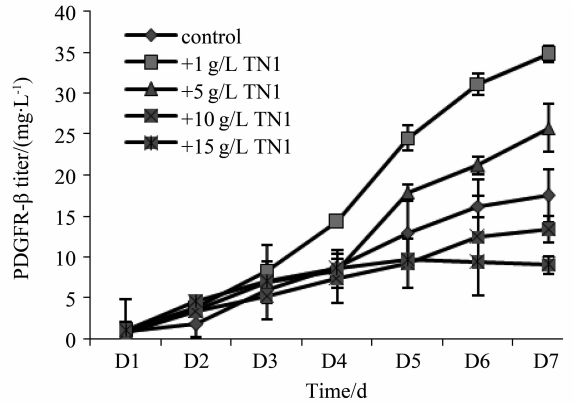


图 4 不同质量浓度 TN1 对 PDGFR-β/Fc 表达的影响
Fig. 4 The effect of concentrations of TN1

不同浓度的 VPA 对细胞表达 PDGFR-β 蛋白均有促进作用 (图 1), 在 3 ~ 4 mmol/L 的 VPA 的效果最好。在添加 3 mmol/L VPA 时, PDGFR-β 蛋白表达量最高 (30 mg/L), 约为对照组的 2 倍。细胞瞬时转染后, 在 48 h 内的不同时间添加 VPA, 蛋白表达量相近 (约 28 mg/L), 表明转染后 48 h 内的不同时间添加 VPA 对蛋白表达影响不大 (图 2)。

2. 2. 2 添加碳氮源对细胞表达 PDGFR-β/Fc 蛋白的影响

添加不同种类蛋白胨, 细胞蛋白表达量均有提高 (图 3), 其由高到低依次为 TN1 > MN1 > SA2SC > ER2 > WE1 > SA3SC。添加 TN1 蛋白表达量最高, 约为 35 mg/L, 较对照组提高 2 倍以上。

添加不同质量浓度的蛋白胨 (TN1) 对细胞蛋白表达有明显影响 (图 4), 在 1 g/L 到 15 g/L 质量浓度范围内, 随着蛋白胨质量浓度的增加, 蛋白表达量下降。添加 1 g/L 和 5 g/L 质量浓度时, 均能促进蛋白表达量, 当添加质量浓度超过 10 g/L, 蛋白表达量反而较对照组低, 细胞计数显示细胞活率相对较低, 可能高质量浓度蛋白胨的添加增大了培养液渗透压, 不利于细胞生长。因此, 添加的蛋白胨质量浓度需要有一个合适的范围, 本实验当蛋白胨质量浓度为 1 g/L 时, 蛋白表达量最高, 达到 35 mg/L。

1) 添加不同种类蛋白胨及其质量浓度的优化

本实验选取 6 种蛋白胨进行筛选, 分别为 Tryptone N1 (胰蛋白胨, TN1)、Casein peptone E1 (酪蛋白胨, CE1)、Meat peptone N1 (肉蛋白胨, MN1)、Wheat peptone E1 (小麦蛋白胨, WE1)、Soy peptone A3SC (大豆蛋白胨, SA3SC)、Soy peptone A2SC (大豆蛋白胨 SA2SC)。在最优的基本条件下, HEK293F 细胞转染后第 3 天添加葡萄糖和蛋白胨, 葡萄糖终质量浓度为 4 mg/L, 蛋白胨终质量浓度为 1 g/L。

2) 添加葡萄糖和蛋白胨对细胞表达 PDGFR-β/Fc 蛋白的影响

HEK293F 细胞转染后, 第 3 天后葡萄糖低于 2 mg/L (图 5), 故在第 3 天补充葡萄糖和蛋白胨, 葡萄糖终质量浓度为 4 mg/L, 蛋白胨 (Tryptone N1) 终质量浓度为 1 g/L。

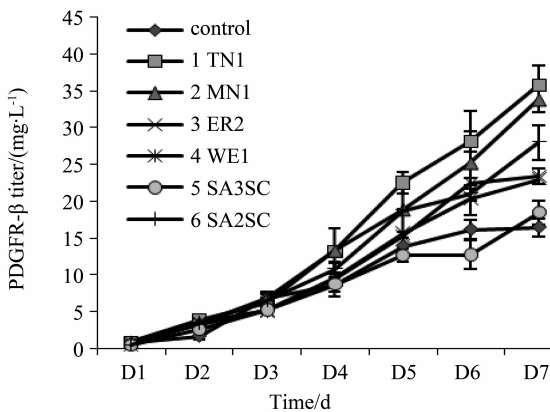


图 3 添加不同蛋白胨对 PDGFR-β/Fc 表达的影响
Fig. 3 The effect of adding different peptone

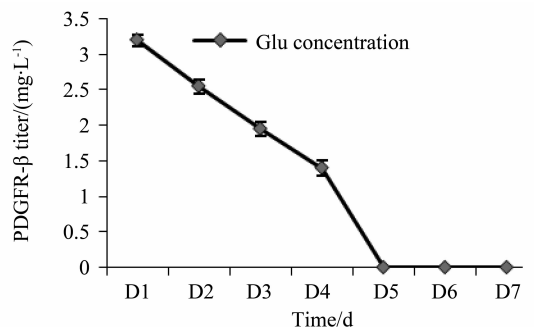


图 5 HEK293F 细胞转染后培养基中葡萄糖含量
Fig. 5 The concentration of glucose after transfection

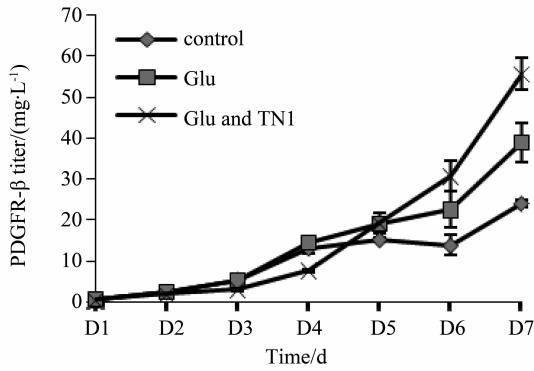


图 6 添加葡萄糖和蛋白胨对 PDGFR- β 表达的影响

Fig. 6 The effect of adding glucose and peptone

图 6 结果表明, 添加葡萄糖对细胞表达蛋白有促进作用, 同时补加葡萄糖和蛋白胨, 蛋白表达量明显增加, 达到 55 mg/L, 是对照组的 2 倍以上。

综上所述, 以细胞接种密度 4×10^6 cells/mL、DNA 浓度 $2.0 \mu\text{g}/10^6$ cells、DNA/PEI 比例 1:2、聚合时间 5 min 条件转染后, 48 h 内补加 3 mmol/L VPA、第 3 天添加 1 g/L 的 TN1, 当葡萄糖浓度低于 2 mg/L 时补至 4 mg/L, 可使 PDGFR- β /Fc 融合蛋白的表达量明显提高。

3 讨论

瞬时基因表达技术在重组药物蛋白研发中已得到广泛应用, 不但用于快速生产蛋白进行成药性评价, 还用于大规模生产重组蛋白。目前, PEI 介导的瞬时转染表达单克隆抗体可以达到 1 g/L 以上的产量^[15]。

细胞密度、DNA 浓度和 DNA:PEI 比例是影响细胞生长和蛋白表达的关键因素。一定范围内, 增大细胞起始密度和 DNA 量可提高蛋白表达量。但是, 细胞密度增加, 细胞生长周期缩短; DNA 量增加, PEI 的量也相应增加, 但是 PEI 对细胞有很大的毒性, 导致细胞活率明显下降, 所以寻找 DNA 密度、DNA 量、PEI 浓度 3 个因素的最适水平至关重要。本实验对 3 个因素水平进行优化, 明显提高了蛋白表达量。

丙戊酸钠是临床上常用的抗癫痫药物, 在有效治疗浓度时表现出很强的抑制组蛋白去乙酰化酶的活性^[16]。VPA 通过抑制组蛋白去乙酰基酶 (histone deacetylases, HDACs) 活性或表达, 可诱导 HEK293F 细胞发生 G0/G1 期阻滞, 细胞处于 G1 期的特点是物质代谢活跃, 迅速合成 RNA 和蛋白质, 细胞体积显著增大。但是 VPA 抑制细胞增殖作用与添加浓度相关, 适当的浓度能使全部细胞处

于 G1 期, 大量合成蛋白质; 超量使细胞生长受到过度抑制, 细胞死亡^[17-18]。本实验结果表明, 添加 3 mmol/L VPA 抑制细胞生长和提高蛋白表达量效果最好, 48 h 内不同时间添加 VPA 对提高细胞蛋白表达量没有显著差异。

近几年有文献表明, 细胞转染后不同时间添加不同种类的蛋白胨对细胞蛋白表达有明显差异。细胞瞬时转染时, 在细胞悬液中添加 DNA 与 PEI 后, 立刻加入蛋白胨, 细胞转染终止, 转染效率下降, 这与蛋白胨中某些成分阻止了 DNA/PEI 复合物接触细胞表面, 或影响细胞对复合物的胞吞作用有关。细胞转染后, 适当的时间添加一定量的蛋白胨除了为细胞补充氮源, 还具有刺激细胞内基因表达蛋白的作用^[19]。本实验对 6 种蛋白胨进行筛选, 探索最佳添加浓度, 取得了良好效果。

综上所述, 本实验对活细胞接种密度、DNA 浓度、PEI 浓度、DNA 与 PEI 聚合时间以及添加 VPA、蛋白胨进行了优化, 为大规模瞬时转染生产 PDGFR- β /Fc 蛋白奠定了基础, 也对 HEK293 细胞瞬时转染方法具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] GEISSE S, VOEDISCH B. Transient expression technologies: past, present, and future [M] // Therapeutic proteins. New York: Humana Press, 2012: 203–219.
- [2] BALDI L, HACKER D L, ADAM M, et al. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(5): 677–684.
- [3] VINK T, OUDSHOORN D M, ROZA M, et al. A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies [J]. Methods, 2014, 65(1): 5–10.
- [4] PHAM P L, KAMEN A, DUROCHER Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein [J]. Molecular Biotechnology, 2006, 34(2): 225–237.
- [5] GEISSE S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches [J]. Protein Expression and Purification, 2009, 64(2): 99–107.
- [6] PARIS S, BURLACU A, DUROCHER Y. Opposing roles of syndecan-1 and syndecan-2 in polyethyleneimine-mediated gene delivery [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(12): 7697–7704.
- [7] KHALIL I A, KOGURE K, AKITA H, et al. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonvi-

- ral gene delivery [J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58(1): 32–45.
- [8] DUROCHER Y, PERRET S, KAMEN A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(2): e9.
- [9] LIU C, DALBY B, CHEN W, et al. Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells [J]. *Molecular Biotechnology*, 2008, 39(2): 141–153.
- [10] SCHLAEGER E J, CHRISTENSEN K. Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture [J]. *Cytotechnology*, 1999, 30(1/2/3): 71–83.
- [11] YANG S Y, XU G M. Expression of PDGF and its receptor as well as their relationship to proliferating activity and apoptosis of meningiomas in human meningiomas [J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2001, 8(4): 49–53.
- [12] KURATSU J I, SETO H, KOCHI M, et al. Expression of PDGF, PDGF-receptor, EGF-receptor and sex hormone receptors on meningioma [J]. *Acta Neurochirurgica*, 1994, 131(3/4): 289–293.
- [13] FIGARELLA-BRANGER D, VAGNER-CAPODANO A M, BOUILLOT P, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) and receptor (PDGFR) expression in human meningiomas: correlations with clinicopathological features and cytogenetic analysis [J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1994, 20(5): 439–447.
- [14] RAJENDRA Y, KISELJAK D, BALDI L, et al. A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 153(1): 22–26.
- [15] BALDI L, HACKER D L, MEERSCHMAN C, et al. Large-scale transfection of mammalian cells [M] // *Protein expression in Mammalian cells*. New York: Humana Press, 2012: 13–26.
- [16] FIEGL H, ELMASRY K. Cancer diagnosis, risk assessment and prediction of therapeutic response by means of DNA methylation markers [J]. *Disease Markers*, 2007, 23(1): 89–96.
- [17] PHIEL C J, ZHANG F, HUANG E Y, et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36734–36741.
- [18] GOTTLICHER M, MINUCCI S, ZHU P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells [J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(24): 6969–6978.
- [19] PHAM P L, PERRET S, CASS B, et al. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 90(3): 332–344.