

· 研究论文 ·

引入糖基化位点和 L303E/F309S 突变促进 intein 介导的 断裂凝血 VIII 因子剪接

朱甫祥*, 刘泽隆, 缪 静, 屈慧鸽, 迟晓艳

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 作者最近证明 intein 的蛋白质剪接技术可用于双载体转 B 区缺失型 FVIII (*BDD-FVIII*) 基因, 在此基础上, 本研究将具有促 FVIII 分泌作用的 L303E/F309S 双突变和 B 结构域糖基化位点引入 *BDD-FVIII* 重链, 观察重链变体对 intein 剪接的 *BDD-FVIII* 蛋白分泌和活性的影响。用分别融合 *Ssp DnaB* intein 的重链变体 (*DMN6HCIntN*) 和轻链 (*IntCLC*) 基因共转染培养的 293 细胞, 用 ELISA 分析分泌至培养上清液中的剪接 *BDD-FVIII* 蛋白量, 并用发色法检测培养上清液的凝血生物活性。结果显示, *DMN6HCIntN* 和 *IntCLC* 共转基因细胞上清液中剪接 *BDD-FVIII* 的浓度为 $(149 \pm 23) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 活性为 $(1.12 \pm 0.14) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显高于 intein 融合的野生型重链 (*HCIntN*) 与轻链 (*IntCLC*) 共转基因细胞 [$(99 \pm 14) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(0.77 \pm 0.13) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$], 提示重链变体能明显促进剪接 *BDD-FVIII* 蛋白的分泌和活性; 另外, 还检测到不依赖细胞机制的 *BDD-FVIII* 剪接。本研究为进一步动物体内双 AAV 载体转 *BDD-FVIII* 基因研究提供了依据。

关键词: 凝血 VIII 因子; 重链变体; 分泌; intein; 蛋白质剪接

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 11-1361-06

Glycosylation and L303E/F309S mutations improve intein-mediated splicing of the split coagulation factor VIII

ZHU Fu-xiang*, LIU Ze-long, MIAO Jing, QU Hui-ge, CHI Xiao-yan

(Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: We recently demonstrated that an intein-mediated protein splicing can be used to transfer B-domain-deleted FVIII (*BDD-FVIII*) gene by a dual-vector. In this study, we observed the effect of a variant heavy chain with six potential glycosylation sites of B domain and L303E/F309S mutations in its A1 domain, which were proven to be beneficial for FVIII secretion, on secretion of spliced *BDD-FVIII*. By transient co-transfection of cultured 293 cells with intein-fused variant heavy chain (*DMN6HCIntN*) and light chain (*IntCLC*) genes, the culture supernatant was analyzed quantitatively by ELISA for secreted spliced *BDD-FVIII* antigen and by a chromogenic assay for bioactivity. The data showed that the amount of spliced *BDD-FVIII* protein and coagulation activity in culture supernatant from *DMN6HCIntN* plus *IntCLC* co-transfected cells were up to $(149 \pm 23) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(1.12 \pm 0.14) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively greater than that of intein-fused wild type heavy (*HCIntN*) and light chain (*IntCLC*) co-transfected cells [$(99 \pm 14) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(0.77 \pm 0.13) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$] indicating that the variant heavy chain is able to improve the secretion of spliced *BDD-FVIII* and activity.

收稿日期: 2010-04-26.

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2010CM061); 烟台市科技计划项目 (2008152); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (20071108); 鲁东大学科研基金项目 (LZ20083305).

*通讯作者 Tel: 86-535-6693825, Fax: 86-535-6697626, E-mail: fuxiangmail@163.com

A cellular mechanism-independent BDD-FVIII splicing was also observed. It provided evidence for ongoing animal experiment using intein-mediated dual-AAV vector technology for delivery of the *BDD-FVIII* genes.

Key words: coagulation factor VIII; variant heavy chain; secretion; intein; protein splicing

甲型血友病占血友病的 80%，是由 FVIII 质或量的缺陷导致的 X 染色体连锁遗传性出血性疾病，由于属于单基因病、FVIII 的分泌性特点使转基因表达无需特定的靶细胞等，基因治疗是其理想的疗法^[1]。但相对于具有相似结构和大小的另一个凝血因子 FV 的高效分泌性，FVIII 的分泌非常低效，影响转基因的表达水平和疗效^[2]。另外，FVIII 的基因较大，难以有众多优点的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体转运^[3]。目前解决 AAV 容量限制的策略之一是采用双载体分别转运 FVIII 的重链和轻链基因，由翻译后的重链和轻链多肽分泌过程中形成功能性异源二聚体出胞发挥凝血活性^[4, 5]，但重链多肽的分泌效率远低于轻链多肽，导致链不均衡性问题，不仅使分泌的功能性二聚体水平降低，过多的重链多肽淤积于细胞会使细胞不稳定，甚至会诱导凋亡^[6]。作者最近运用 intein 的蛋白质反式剪接技术进行的双载体共转 B 区缺失型 FVIII (BDD-FVIII) 的重链和轻链基因研究证明，轻链不仅可顺式促进重链多肽的分泌，而且 intein 催化剪接反应可由细胞分泌的 intein 融合重链和轻链前体多肽在培养上清液中进行，表明其不依赖细胞机制^[7, 8]。Intein 是包埋在蛋白质前体中的多肽序列，翻译后通过其自催化作用在蛋白质水平将其自身切除并伴随两侧宿主蛋白以肽键相连，此作用类似于 RNA 剪接被称为蛋白质剪接作用^[9]。Intein 蛋白质剪接的高效、精确、肽键无缝连接以及不依赖细胞机制等特点，使其作为一种有力工具在蛋白质工程和药物开发如体内外多肽的连接、多肽环化、蛋白质纯化、生物传感器及基因治疗等研究中得到应用^[10, 11]。研究表明，干扰 FVIII 与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合的重链 A1 区点突变 L303E/F309S 可将 FVIII 的分泌性提高 3 倍^[12]；B 区的糖基化可通过促进 FVIII 分泌过程由内质网向高尔基体的转运促进 FVIII 分泌^[13]。本研究将 B 区 6 个糖基化位点和 A1 区 L303E/F309S 突变引入 BDD-FVIII 的重链，用双载体共转融合 intein 的重链变体和轻链基因至培养的 293 细胞，考察剪接 BDD-FVIII 蛋白分泌量和活性，为进一步运用 intein 的双 AAV 动物体内转基因研究提供实验依据。

材料与amp;方法

质粒、菌株和细胞 含有 *Ssp* DnaB intein 基因的质粒 pMST 和含有全长 FVIII cDNA 的质粒 pXX-FVIII 于美国 Pittsburgh 大学分子遗传与生物化学系基因治疗中心 Xiao Xiao 教授实验室构建，本室保存。含有 BDD-FVIII cDNA 的真核表达质粒 pCMV-F8 由本实验室构建并保存。BDD-FVIII 重链、轻链与 *Ssp* DnaB intein 融合表达载体 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 为作者以前的工作构建^[8]。大肠杆菌菌株 DH5 α 为本室保存，293 细胞购自中国科学院细胞库。

工具酶和主要试剂 限制性内切酶、DNA 连接酶试剂盒、DNA 分子量标准产自 New England Biolabs 公司；Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit 及 Spin Miniprep Kit 均为 Qiagen 公司产品。DMEM 和 Opti-MEM 培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂盒均购自 Invitrogen 公司，胎牛血清购自 Hyclone 公司。重组 FVIII 为 BioChain 公司产品；FVIII 的重链单克隆抗体 ESH-5，FVIII 轻链单克隆抗体 ESH8 及 HRP 标记的 ESH8 均购自 American Diagnostica 公司；HRP 标记的兔抗人 FVIII 多克隆抗体购自 Novus 公司。人正常参比血浆为 George King Biomedical 公司产品。FVIII 活性检测的 COATEST SP FVIII 试剂盒购自 Chromogenix 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

真核重组表达质粒的构建 以本室以前构建的含有 BDD-FVIII 重链和 *Ssp* DnaB intein 融合基因的表达质粒 pCMV-HCIntN 为模板，用 5'-CCACCAGTC TTGAAACGC-3' 和 5'-ATTCACCGGTGGCATTAA TTGCTTTTG-3' (含 *Age* I 位点) 引物对，通过反向 PCR 扩增得到 pCMV-HCIntN 的线性化 DNA 大片段；以 pXX-FVIII 为模板，用 5'-ATTCACCGGTATTCCA GAAAATGACATA-3' (含 *Age* I 位点) 和 5'-TGACGA TACATTTTTTCCCC-3' 引物对，PCR 扩增 FVIII B 区 N 端 761~966 氨基酸的编码序列，以 *Age* I 分别酶切上述 PCR 产物后用 T4 DNA 连接酶连接，得到含有 B 区 6 个 N-糖基化位点的 226 氨基酸的融合 intein 的 BDD-FVIII 重链表达载体 pCMV-N6HCIntN。以 pCMV-N6HCIntN 为模板，用 5'-AGGACAGTTTCTA CTGTTTTG-3' 和 5'-TCGTCCATCAAGAGTGTTTG-3' 引物对，通过反向 PCR 扩增引入 Leu303 \rightarrow Glu

(L303E) 突变, 将线性化 pCMV-HCIntN 自连接后成为含 L303E 的载体 pCMV-L303EN6HCIntN; 再以 pCMV-L303EN6HCIntN 为模板, 用 5'-TTGTCATA TCTCTTCCCACC-3' 和 5'-GACAGTAGAACTGTC CTTC-3' 引物对反向 PCR 扩增, 引入 Phe309 → Ser (F309S) 突变, 将得到的线性化产物自连接, 得到融合 intein 的含 6 个糖基化位点和双突变 (L303E/F309S) 的重链表达质粒 pCMV-DMN6HCIntN; 与以前构建的含有 BDD-FVIII 轻链和 *Ssp* DnaB intein 融合基因的表达式质粒 pCMV-IntCLC 成为一对载体。

细胞培养及基因转染 293 细胞于 5% CO₂, 37 °C 培养箱, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养。转染前一天用胰蛋白酶消化分散细胞, 按每孔 5×10⁵ 个细胞于 2 mL 的 DMEM 培养液将细胞转接于 6 孔培养板, 待细胞生长融合至 80% 以上时, 用 Lipofectamine 2000 脂质体按试剂盒说明书进行转染, 将两种质粒 pCMV-DMN6HCIntN 和 pCMV-IntCLC 按等比率 (各 4 μg) 混合稀释于 250 μL 的 Opti-MEM 培养液, 与室温放置 5 min 的含 20 μL 脂质体的 250 μL 的 Opti-MEM 培养液混合后继续室温放置 20 min, 共转染 293 细胞。同时用 pCMV-F8 转染 293 细胞、用 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 共转染 293 细胞作为对照, 并用空载体 pcDNA3.1 转染 293 细胞作为阴性对照 (Mock)。培养箱内温育 5 h 后换以 2 mL 的新鲜 Opti-MEM 培养液, 继续培养 48 h, 收集培养上清液, 并在收集的上清液中加入 40 μL 的混合蛋白酶抑制剂。为观察 intein 在培养上清液中的剪接反应, 按上法分别单独用 pCMV-DMN6HCIntN 和 pCMV-IntCLC 转染 293 细胞, 培养 24 h 后合并两组细胞继续培养 48 h, 收集上清液, 并在收集的上清液中加入 40 μL 的混合蛋白酶抑制剂。

细胞培养上清液中分泌的重、轻链多肽和剪接 BDD-FVIII 蛋白定量分析 按照作者以前建立的重、轻链特异性 ELISA, 检测培养上清液的重链和轻链蛋白浓度^[7]。

参照文献[14], 用双夹心 ELISA 检测上清液中的全长 BDD-FVIII 蛋白量。

细胞培养上清液中剪接 BDD-FVIII 蛋白产生的生物活性分析 参照文献[15]用 Coatest 发色分析试剂盒, 按照试剂盒说明书操作分析上清液的 FVIII 生物活性。以正常人参比血浆 (FVIII 活性为 1.0 u·mL⁻¹), 用 Opti-MEM 培养液配成低浓度范围 (1%~20%) 和高浓度范围 (20%~150%) 两种浓度系列, 序列反应后于 405 nm 处读取吸收度值, 以稀释百分比为横坐

标、405 nm 吸收度值为纵坐标分别绘制低量程和高量程标准曲线, 由培养上清液样品测得的吸收度值从标准曲线读出相应的百分比值, 以 100% 为 1.0 u·mL⁻¹ 换算为上清液的 FVIII 生物活性。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student's *t*-test 进行组间比较和统计学分析。

结果

1 含糖基化位点和 L303E/F309S 突变的 BDD-FVIII 重链的构建

wt FVIII 的分子结构为 SS-A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉大部分 B 结构域 ($\Delta 761 \sim 1639$) 后成为 BDD-FVIII。作者以前的工作将 BDD-FVIII 于 Gln¹⁶⁵⁶-Ser¹⁶⁵⁷ 之间断裂为重链和轻链, 分别与 *Ssp* DnaB intein 融合, 构建了融合 intein 的重链 (HCIntN) 和轻链 (IntCLC), 将它们分别插入真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 后得到 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC^[8]; 首先将通过 PCR 扩增得到含有 6 个糖基化位点的 B 区 226 个氨基酸的编码序列插入到 HCIntN, 得到融合 intein 的含有 6 个糖基化位点的重链 (N6HCIntN) 基因, 再通过 PCR 法将 N6HCIntN 中重链 A1 区的 Leu303 和 Phe309 分别突变为 Glu 和 Ser, 得到融合 intein 的含糖基化和 L303E/F309S 突变的 BDD-FVIII 重链变体 DMN6HCIntN。上述 FVIII 的结构示意图见图 1。

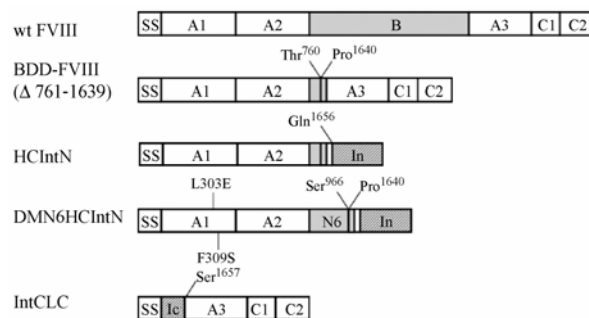


Figure 1 Schematic representation of FVIII constructs. The wild-type human full-length FVIII (wt FVIII) contains three distinct structural domains including A1-3, B, and C1-2 defined by internal sequence homology and organized in the order of SS-A1-A2-B-A3-C1-C2. The BDD-FVIII was produced by deleting amino acids of B-domain from 761-1639 with a small B-domain retention. A pair of intein-contained heavy and light chains termed HCIntN and IntCLC were constructed previously by splitting BDD-FVIII before Ser¹⁶⁵⁷ to heavy and light chains and fusing N- and C-terminus (In, Ic) of *Ssp* DnaB intein to them. To produce intein-fused BDD-FVIII heavy chain with six glycosylation sites and L303E/F309S mutation (DMN6HCIntN), an intermediate heavy chain with six glycosylation sites (N6HCIntN) was constructed first and then L303E/F309S mutations were made. SS: Signal sequence of FVIII

2 转基因细胞分泌的重链、轻链多肽以及剪接的 BDD-FVIII 蛋白浓度

为观察糖基化和双突变引入对 intein 融合重链多肽 (DMN6HCIntN) 分泌的影响, 以 FVIII 重链特异性抗体为包被抗体和以 FVIII 多克隆抗体为检测抗体的 ELISA 结果显示, 细胞单独转 *DMN6HCIntN* 基因后分泌至培养上清液中的重链多肽为 $(39 \pm 12) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于单独转 intein 融合野生型重链 (*HCIntN*) 基因细胞的重链多肽分泌 $[(16 \pm 9) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}]$ ($P < 0.05$), 表明糖基化和双突变可促进重链分泌。共转融合 intein 的轻链 (*IntCLC*) 基因结果显示, 重链多肽的分泌大幅增加到 $(218 \pm 31) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于共转 *HCIntN* 基因后重链多肽的分泌量 $[(138 \pm 17) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}]$, 也明显高于转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞的重链多肽分泌 $[(125 \pm 18) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}]$, 由于 intein 介导轻链与重链的共价连接, 表明轻链以顺式作用的方式明显促进重链变体的分泌 (图 2)。

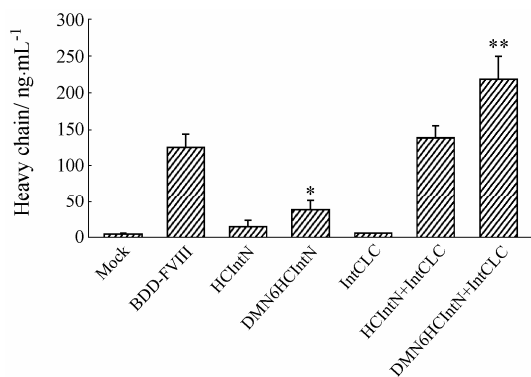


Figure 2 Heavy chain peptide levels in supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs *HCIntN* transfection; ** $P < 0.01$ vs *HCIntN* and *IntCLC* cotransfection and *BDD-FVIII* transfection

作者以前的研究证明, BDD-FVIII 的轻链多肽分泌效率明显高于重链多肽^[7]。为了观察 *IntCLC* 与 *DMN6HCIntN* 共转基因对轻链多肽分泌的影响, 以轻链特异性抗体为包被抗体和以 FVIII 多克隆抗体为检测抗体的 ELISA 结果 (图 3) 显示, 共转 *DMN6HCIntN* 基因细胞的轻链多肽分泌量为 $(298 \pm 53) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 共转 *HCIntN* 基因细胞的轻链多肽分泌量为 $(263 \pm 69) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 单独转 *IntCLC* 基因细胞的轻链多肽分泌量为 $(289 \pm 52) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 三者之间无明显差别 ($P > 0.05$), 但均明显高于转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞的轻链多肽分泌量 $[(112 \pm 17) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}]$, 说明重链变体对轻链的分泌无明显影响, 但分开的轻链分泌明显高于完整的 BDD-FVIII 分子的轻链分泌, 因为 BDD-FVIII

分子中轻链和重链的等比率关系, 提示受重链分泌低效的影响, 轻链的分泌也随之降低。从共转基因细胞分泌的轻、重链比率可以看出, 共转 *DMN6HCIntN* 和 *IntCLC* 细胞为 1.4, 而共转 *HCIntN* 和 *IntCLC* 细胞为 1.9, 表明轻重链比率失衡问题进一步得到缓解。

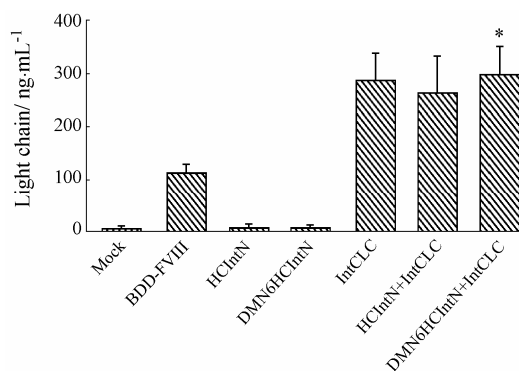


Figure 3 Light chain peptide levels in supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$ vs *HCIntN* and *IntCLC* cotransfection and *IntCLC* transfection but $P < 0.01$ vs *BDD-FVIII* transfection

生理性 FVIII 功能的发挥有赖于其重链和轻链异源二聚体的形成, 为观察 intein 对重链变体和轻链剪接产生的 BDD-FVIII 蛋白分泌量, 分别用 FVIII 重链单抗和轻链单抗为包被抗体和检测抗体进行的双夹心 ELISA 结果 (图 4) 显示, 共转 *DMN6HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞上清液中剪接的 BDD-FVIII 蛋白量为 $(149 \pm 23) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于共转 *HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞上清液的 BDD-FVIII 蛋白量 $[(99 \pm 14) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}]$, 与转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞上清液

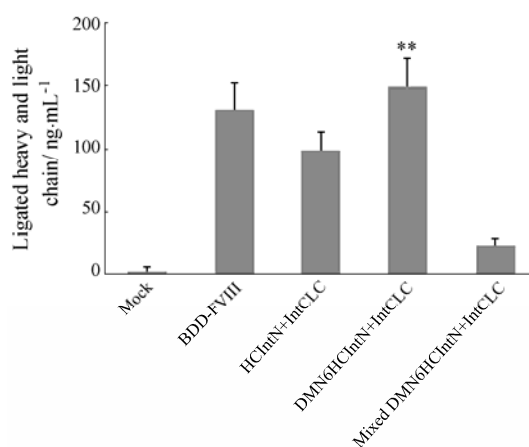


Figure 4 Levels of ligated BDD-FVIII protein produced by protein trans-splicing. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.05$ vs *HCIntN* and *IntCLC* cotransfection, and $P > 0.05$ vs *BDD-FVIII* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *DMN6HCIntN* and *IntCLC* genes shows detectable BDD-FVIII ligated

的 BDD-FVIII 蛋白量相近 $[(131 \pm 21) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 表明重链变体可明显提高培养上清液中 intein 剪接的 BDD-FVIII 蛋白分泌量。另外, 从分别转 *DMN6HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞混合培养后的上清液中检测到一定量的剪接 BDD-FVIII 蛋白 $[(23 \pm 5) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 此为分泌后的重链和轻链在培养上清液中剪接形成, 表明 intein 不依赖细胞机制剪接对 BDD-FVIII 重链变体和轻链的连接作用。

3 转基因细胞培养上清液的凝血生物活性

应用 Coatest 发色分析法检测培养上清液的凝血生物活性结果显示, 共转 *DMN6HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞上清液的凝血生物活性为 $(1.12 \pm 0.14) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 由分泌的经 intein 剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白产生, 明显高于共转 *HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞培养上清液的活性 $[(0.77 \pm 0.13) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}]$ ($P < 0.05$), 与转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞培养上清液的活性 $[(0.92 \pm 0.12) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 相近。结合上述剪接的 BDD-FVIII 蛋白水平实验结果表明, 重链变体具有增加 intein 介导其与轻链剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白量、提高凝血活性的作用。另外, 从单独转 *DMN6HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞合并培养后上清液检测到一定水平的凝血活性 $[(0.19 \pm 0.06) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 表明 intein 不依赖细胞机制的剪接反应对于凝血活性的贡献 (图 5)。

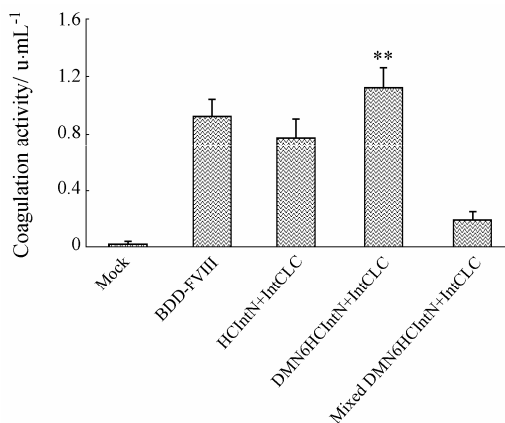


Figure 5 Coagulation activity derived from ligated BDD-FVIII in supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.05$ vs *HCIntN+IntCLC* cotransfection and $P > 0.05$ vs *BDD-FVIII* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *DMN6HCIntN* and *IntCLC* genes shows detectable coagulation activity

讨论

FVIII 的低效分泌不仅影响重组 FVIII 产品在甲型血友病患者治疗中的广泛使用, 也对基于转 FVIII 基因的基因治疗不利。研究表明, 新合成的 FVIII 在

分泌过程中与存在于内质网内的分子伴侣蛋白 BiP 结合, FVIII 从 BiP 释放依赖于细胞内高浓度的 ATP, 这是影响 FVIII 低效分泌的机制之一^[16]。用反义技术下调 BiP 的表达促进 FVIII 的分泌^[17], 而 BiP 的过表达对 FVIII 的分泌具抑制作用^[18]。另外, FVIII 分子 B 区的糖基化修饰可通过与内质网和高尔基体间具有结合甘露糖的凝集素功能的分子伴侣蛋白 LMAN1 相互作用, 易化促进 FVIII 从内质网至高尔基体的转运^[13, 19]。有研究表明, 将 B 区的糖基化修饰位点引入 BDD-FVIII 可显著提高其分泌效率^[20]。在甲型血友病的基因治疗研究中, 过大的 FVIII 基因难以以为可使转基因长期表达的载体 AAV 转运, 在致力于克服 AAV 容量限制中发展起来的分别转运 FVIII 重链和轻链基因的双载体技术, 为重链多肽分泌低效产生的链不平衡性问题所困扰, 轻链分泌量是重链的 10~100 倍, 而且转基因的功效取决于双链基因共感染同一靶细胞的效率^[4, 5]。作者在前期运用 intein 蛋白质剪接功能发展的双载体转 *BDD-FVIII* 基因表明, 重链的分泌效率在轻链的顺式作用下明显改善, 而且因为 intein 剪接反应的非细胞机制依赖特点使双链基因无需共感染同一靶细胞, 不同细胞合成的重链和轻链分泌后依然可剪接成 BDD-FVIII, 产生凝血活性。为进一步提高重链多肽的分泌和 intein 双载体转 *BDD-FVIII* 基因的功效, 本研究将 BDD-FVIII 重链的 A1 区进行双突变 (L303E/F309S), 并引入 B 区糖基化位点, 用 intein 的蛋白质剪接技术进行双载体转 *BDD-FVIII* 基因结果表明, 单独转基因后的重链多肽分泌明显改善, 是野生型重链分泌量的 2.5 倍, 与轻链基因共转染后重链的分泌量增加近 6 倍, 培养上清液中的剪接 BDD-FVIII 和凝血生物活性有明显提高, 而且轻、重链分泌量的比率由 1.9 降低到 1.4, 使链不平衡问题得到进一步缓解; 同时表现出 intein 不依赖细胞机制的蛋白质剪接活性, 可催化分泌后的重链和轻链多肽剪接形成 BDD-FVIII, 产生相应的活性, 表明糖基化双突变的重链明显改善基于 intein 的双载体转 *BDD-FVIII* 基因的功效。值得注意的是, 糖基化位点和重链突变所带来的抗原性改变, 需要进一步的动物体内实验来检测。由于糖基化位点序列是全长 FVIII 分子本身的一部分, 而点突变带来的抗原性改变的可能性较小, 在 Miao 等^[20]的小鼠体内转 F309S 突变和 B 区包括 6 个糖基化位点的 226 个氨基酸的 *BDD-FVIII* 基因研究中, 并未关注抗体的产生。最近作者用生理条件下可结合 FVIII、具有其载体功能的 vWF 共表达实验表明, 经 intein 剪接的 BDD-FVIII

的分泌性也有明显提高, 但 vWF 的血小板黏附功能使过表达的该血浆蛋白存在潜在的致血栓副作用^[21]。

致谢: 感谢加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授提供的 *Ssp* DnaB intein 基因以及所提供的技术帮助。

References

- [1] Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia [J]. *Br J Haematol*, 2008, 140: 479–487.
- [2] Kaufman RJ. Genetic engineering of factor VIII [J]. *Nature*, 1989, 342: 207–208.
- [3] Wu J, Zhao W, Zhong L, et al. Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18: 171–182.
- [4] Scallan CD, Liu T, Parker AE, et al. Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII [J]. *Blood*, 2003, 102: 3919–3926.
- [5] Burton M, Nakai H, Colosi P, et al. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 12725–12730.
- [6] Zhang K, Shen X, Wu J, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response [J]. *Cell*, 2006, 124: 587–599.
- [7] Chen LX, Zhu FX, Li JJ, et al. The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 1856–1862.
- [8] Zhu FX, Liu ZL, Chi XY, et al. Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 683–689.
- [9] Perler FB. The ins and outs of gene expression control [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 824–826.
- [10] Gimble FS. Putting protein splicing to work [J]. *Chem Biol*, 1998, 5: R251–R256.
- [11] Cheriyan M, Perler FB. Protein splicing: a versatile tool for drug discovery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 899–907.
- [12] Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, et al. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 24121–24124.
- [13] Cunningham MA, Pipe SW, Zhang B, et al. LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1: 2360–2367.
- [14] Gnatenko DV, Saenko EL, Jesty J, et al. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy [J]. *Br J Haematol*, 1999, 104: 27–36.
- [15] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype [J]. *Blood*, 2004, 103: 1253–1260.
- [16] Nichols WC, Ginsburg D. From the ER to the Golgi: insights from the study of combined factors V and VIII deficiency [J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64: 1493–1498.
- [17] Dorner AJ, Krane MG, Kaufman RJ. Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8: 4063–4070.
- [18] Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, et al. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 4327–4334.
- [19] Moussalli M, Pipe SW, Hauri HP, et al. Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 32539–32542.
- [20] Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion [J]. *Blood*, 2004, 103: 3412–3419.
- [21] Zhu FX, Yang SD, Liu ZL, et al. vWF improves secretion and activity of intein spliced BDD-FVIII [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 595–600.