

脱氧萎镰菌醇通过下调 GRP78 提高双链转 FVIII 基因 细胞分泌重链和生物活性

朱甫祥*, 杨树德, 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: 双链转凝血 VIII 因子 (FVIII) 基因是克服 AAV 载体容量限制的有效方法, 但重链分泌的低效率带来链不平衡性。本文旨在用脱氧萎镰菌醇 (deoxynivalenol, DON) 降解内质网分子伴侣蛋白 GRP78, 通过减少重链与 GRP78 的结合提高重链分泌, 改善双链转 FVIII 基因的功效。用 DON 处理双链共转基因细胞, 观察了双链转 FVIII 基因 293 细胞分泌的重链和 FVIII 活性。结果显示, 用 $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ DON 处理细胞 3 h 后, GRP78 蛋白水平明显降低, 细胞的生长不受明显影响; 单独转 FVIII 重链基因的 DON 处理细胞分泌的重链量 [$(59 \pm 11) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$] 明显高于对照细胞 [$(15 \pm 4) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$], 双链共转基因时重链的分泌量进一步增加, 为 $(146 \pm 34) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 活性达到 $(0.66 \pm 0.15) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于双链转基因对照细胞 [分别为 $(76 \pm 17) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $(0.35 \pm 0.09) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$]。结果表明, DON 可通过下调 GRP78 改善重链的分泌性, 提高双链转 FVIII 基因的功效, 为进一步动物体内双 AAV 载体转 FVIII 基因提供了实验依据。

关键词: 凝血 VIII 因子; 双链转基因; 脱氧萎镰菌醇; 重链分泌

中图分类号: Q51; R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1457-05

Enhancing effect of deoxynivalenol-mediated GRP78 down-regulation on heavy chain secretion and bioactivity of two-chain FVIII gene co-transfected cells

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

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

Abstract: Although two chain transferring separately could be used to overcome the volume limitation of adeno-associated virus vectors (AAV) in coagulation factor VIII (FVIII) gene delivery, it leads to chain imbalance for inefficient heavy chain secretion. In this study we aimed to improve the efficacy of two chain strategy in FVIII gene delivery through the degradation of glucose-regulated protein 78 (GRP78) known as a protein chaperone in endoplasmic reticulum (ER) by deoxynivalenol (DON) to decrease GRP78-bound FVIII heavy chain. By treating the two-chain gene transduced 293 cells with DON, the heavy chain (HC) secretion and FVIII bioactivity were observed. Data showed that 293 cells after three hours post-treatment with DON at a concentration of $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ resulted in obvious decrease the level of GRP78 but no effect on the cell proliferation. The HC secreted from DON-treated cells transfected with HC gene alone was $59 \pm 11 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, higher than that secreted by control cells ($15 \pm 4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), and the HC secretion was further increasing to $146 \pm 34 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ in light chain (LC) gene co-transfected cells with an activity measured up to $0.66 \pm 0.15 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, also greater than control cells ($76 \pm 17 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $0.35 \pm 0.09 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Taken together, these data

收稿日期: 2011-07-01.

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); 鲁东大学学科建设经费资助项目.

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

suggest that DON-mediated GRP78 down-regulation could improve the efficacy of two-chain FVIII gene transferring by facilitating HC secretion, providing an experimental basis for *in vivo* dual-AAV application in FVIII gene delivery.

Key words: coagulation factor VIII; two-chain gene transferring; deoxynivalenol; heavy chain secretion

凝血因子 VIII (coagulation factor VIII, FVIII) 缺陷导致的甲型血友病占血友病患者总数的 80%~85%, 基因治疗被认为是甲型血友病的根治疗法^[1,2]。持续、稳定的 FVIII 表达是基因治疗成功的关键, 在已开发的基因载体中, 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体由于具有非致病性、复制缺陷和介导转基因稳定表达等特点, 是基因治疗的理想载体。但 AAV 载体的主要缺陷是其包装容量的限制 (4.7 kb), 难于运载较大的 FVIII 基因^[3]。双载体分别转 FVIII 的重链和轻链基因是克服 AAV 载体容量限制的一种有效方法, 但功效有赖于靶细胞共转染双链基因的效率, 且由于重链分泌低效性所致的过量无功能轻链具有潜在产生抑制性抗体的可能^[4]。研究表明, FVIII 分泌低效的原因主要是由于分子的重链与内质网腔中分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 的结合^[5]。作者最近的研究显示, 通过重链的 L303E/F309S 点突变抑制其与 GRP78 的结合可提高细胞内经蛋白质剪接的 FVIII 分泌^[6]。

脱氧萎镰菌醇 (deoxynivalenol, DON) 是一种在谷类食品中由镰刀霉菌产生的单端孢霉烯毒枝菌素, 其结构如图 1 所示^[7]。DON 具有多种生物活性, 有研究表明, DON 可通过诱导 GRP78 的降解下调细胞内 GRP78 水平^[8]。为观察 GRP78 下调对双载体转 B 区缺失型 FVIII (BDD-FVIII) 后重链分泌和转基因功效的影响, 本研究用 DON 处理双载体转基因细胞, 表明可明显提高重链的分泌和活性。

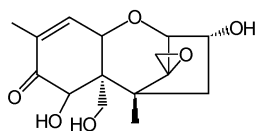


Figure 1 Chemical structure of deoxynivalenol (DON)

材料与方

质粒和细胞 BDD-FVIII 的真核表达质粒载体 pCMV-F8 由本室构建并保存。含有 BDD-FVIII 重链、轻链与 split *Ssp* DnaB 蛋白内含子的融合基因表达质粒 pCMV-HCIntN、pCMV-IntCLC 为作者以前工作中构建^[9]。293 细胞购自中国科学院细胞库。

工具酶和主要试剂 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; DNA 连接酶试剂盒购自 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 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司。DON、山羊抗人 GRP78 多克隆抗体和兔抗山羊 HRP-二抗购自 Santa Cruz 生物技术公司。重组 FVIII 为 BioChain 公司产品; FVIII 的重链单克隆抗体 ESH5 和 FVIII 轻链单克隆抗体 ESH8 购自 American Diagnostica 公司; HRP 标记的兔抗人 FVIII 多克隆抗体购自 Novus 公司; 羊抗兔 HRP-二抗和 ECL plus Western Blotting Detection 试剂盒购自 GE 公司。正常人参比血浆为 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。

BDD-FVIII 重链和轻链重组表达质粒的构建 以 BDD-FVIII 重链和轻链与 split *Ssp* DnaB 蛋白内含子融合基因表达质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 为模板, 用引物对 5'-CCGTTTAAACCCGCTGATC AG-3' (正向)、5'-CTGAAGAGTAGTACGAGTTATT TC-3' (反向) 和 5'-TCAGATCAAGAGGAAATTGAC TATG-3' (正向)、5'-ACTAAAGCAGAATCGCAAAA GGC-3' (反向) 以及 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶反向 PCR 扩增得到线性化 DNA 片段, 分别自连接环化后为去掉蛋白内含子编码序列的 BDD-FVIII 重链和轻链表达载体 pCMV-HC 和 pCMV-LC。

细胞培养、基因转染和 DON 处理 293 细胞于 5% CO₂、37 °C, 在细胞培养箱中用含 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, 按细胞数 5×10⁵/孔用 DMEM 培养液 2 mL 将细胞转接于 6 孔培养板, 待细胞生长融合至 80% 以上时, 用脂质体 Lipofectamine 2000 按试剂盒说明书进行基因转染, 将表达载体 pCMV-HC 和 pCMV-LC 各 6 μg 混合转染 293 细胞; 另设 pCMV-HC 和 pCMV-LC 单独转染 293 细胞。用空载体 pcDNA3.1 和 pCMV-F8 分别转染细胞作为阴性对照 (Mock) 和 BDD-FVIII 表达对照。培养箱内温育 5 h 后换以 2 mL 的新鲜 Opti-MEM 培养液, 并加终质量浓度为

500 ng·mL⁻¹ 的 DON, 继续培养 48 h, 收集培养上清液用于 FVIII 的分泌和活性分析; 以上各组另设平行的不加 DON 处理组。为观察 DON 处理对 GRP78 表达的影响, 设置两组, 一组为对照, 用正常 DMEM 培养, 另一组在培养液中加终质量浓度为 500 ng·mL⁻¹ 的 DON, 培养 3 h 后, 收集细胞用于检测 GRP78 蛋白水平。

Western blotting 观察 DON 处理细胞对 GRP78 表达的影响 用冻融法裂解细胞, 提取细胞总蛋白。用 Bradford 法进行蛋白定量, 每个样品取 12 μg 的总蛋白上样; 用还原性 SDS-PAGE 分离蛋白, 半干电转系统将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h。

检测 GRP78 表达用 1:1 000 稀释的山羊抗人 GRP78 多抗 37 °C 反应 1 h, 然后用 HRP-抗山羊 IgG 37 °C 反应 1 h; ECL plus 法曝光 X 光胶片探测印迹信号。

MTT 法检测细胞生长情况 为检测 DON 处理对 293 细胞生长状况的影响, 分正常对照培养和 DON 处理组 (培养液中加终质量浓度为 500 ng·mL⁻¹ 的 DON), 将处于对数生长期的 293 细胞用胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液, 以细胞数 5×10^4 /孔接种于 96 孔培养板中, 每组设 6 个复孔。参考文献^[10]进行 MTT 实验, 分别于 12、24、36、48 和 72 h, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g·L⁻¹, 溶于 pH 7.4 的 PBS 中, 0.22 μm 滤膜除菌) 15 μL, 继续孵育 4 h, 小心吸弃培养液, 加入 DMSO 150 μL, 振荡溶解紫色结晶物, 酶联免疫检测仪上测定各孔 490 nm 波长处的吸收度 (*A*) 值。用各组 *A* 值的平均值表示细胞增殖情况, 绘制细胞生长曲线。

ELISA 定量分析细胞培养上清液中重链和轻链多肽 按照作者以前建立的链特异性 ELISA 分别检测培养上清液中重链和轻链多肽的浓度^[11]。用 FVIII 重链单抗 ESH5 或轻链单抗 ESH8 包被酶标板, 洗板后加封闭液 37 °C 封闭 2 h, 洗板后加细胞上清液样品和标准品 FVIII, 37 °C 温育 1 h, 洗板后加 HRP 标记 FVIII 多抗, 37 °C 温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液 37 °C 温育 30 min 进行显色, 用 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板。建立标准曲线, 从标准曲线分别读取重链和轻链多肽的浓度。

细胞培养上清液中凝血生物活性分析 用 Coatest 发色分析法, 参考文献^[12]按试剂盒说明书操作分析细胞培养上清液的 FVIII 生物活性。用 Opti-MEM 培养液稀释正常人参比血浆 (FVIII 活性

为 1.0 U·mL⁻¹) 成系列浓度, 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、吸收度值为纵坐标分别绘制标准曲线, 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, 换算为上清液的 FVIII 生物活性。

统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验。

结果

1 BDD-FVIII 重链和轻链基因表达载体的构建

FVIII 的分子结构为 A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉 B 区的 Ile761~Asn1639 为 BDD-FVIII, 将 BDD-FVIII 于 Ser1657 前断裂为重链 (HC) 和轻链 (LC), 分别插入到真核表达质粒 pcDNA3.1 (+), 构建一对重链和轻链表达载体 pCMV-HC 和 pCMV-LC, 为使 LC 具有分泌性, 在其氨基端加上 FVIII 的信号肽序列。本研究所用到的几种 FVIII 结构如 2 所示。

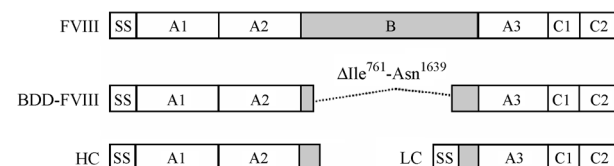


Figure 2 Schematic illustration of FVIII, BDD-FVIII and its heavy and light chains. SS: Signal sequence of FVIII

2 DON 对细胞 GRP78 表达水平和细胞增殖能力的影响

用 500 ng·mL⁻¹ DON 处理 293 细胞 3 h 后所提取的细胞总蛋白进行 Western blotting 检测显示 (图 3A),

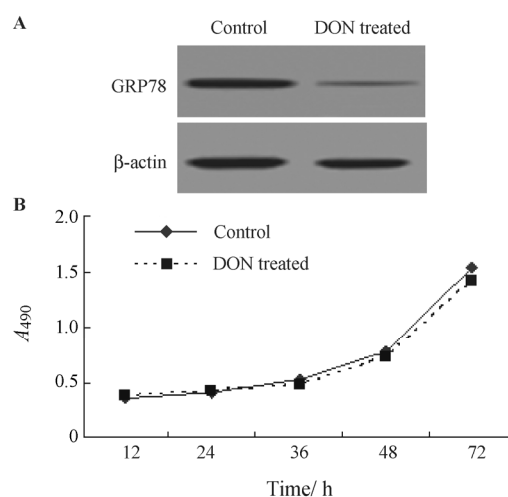


Figure 3 Effect of DON (500 ng·mL⁻¹) on cellular GRP78 levels and cell proliferation. A: Observation of intracellular GRP78 levels by Western blotting; B: Cell growth curve (MTT assay)

相对于对照细胞, DON 处理可明显降低细胞的 GRP78 蛋白水平。通过测定细胞生长曲线显示, DON 处理细胞与对照细胞的生长曲线几乎重叠 (图 3B), 表明 DON 对细胞的增殖没有明显的影响。

3 DON 提高细胞对重链的分泌和改善重、轻链比率不均衡性

重链特异性 ELISA 结果显示 (图 4) 转 BDD-FVIII 基因细胞的 HC 分泌性, DON 处理后细胞的分泌量为 $(198 \pm 37) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显高于未经 DON 处理细胞的 $(135 \pm 28) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明 GRP78 水平降低对整体 BDD-FVIII 分子的促分泌效应。单独转重链 (HC) 基因细胞经 DON 处理后的 HC 分泌量为 $(59 \pm 11) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显高于对照组的 $(15 \pm 4) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 与轻链 (LC) 双载体共转基因细胞经 DON 处理后的 HC 分泌量为 $(146 \pm 34) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 显著高于未经 DON 处理组的 $(76 \pm 17) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明 DON 可提高重链 HC 的分泌量, 共转 HC 和 LC 基因细胞的 HC 分泌量进一步提高, 提示 LC 可反式促进 HC 的分泌。

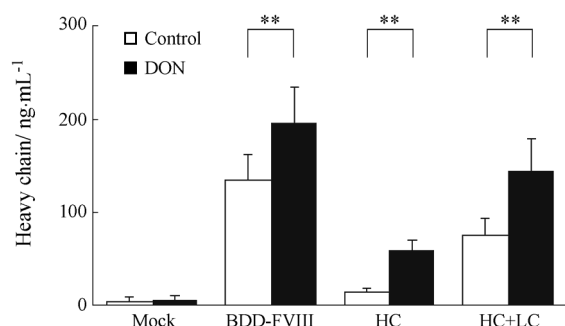


Figure 4 Effect of DON on heavy chain secretion. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.05$

LC 特异性 ELISA 结果显示 (图 5), DON 处理的单独转 LC 基因细胞、与 HC 共转基因细胞的 LC 分泌量分别为 (238 ± 43) 和 $(265 \pm 52) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 两者间比较, 无显著性差异, 而且与未经 DON 处理细胞的 LC 分泌量 [分别为 (269 ± 41) 和 $(247 \pm 32) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$] 相比, 无显著性差异, 提示 LC 的分泌性明显较 HC 高, 与 GRP78 主要与 FVIII 的 HC 结合影响分泌相一致, DON 主要影响 HC 分泌而对 LC 分泌无影响。关于转 BDD-FVIII 基因细胞的 LC 分泌量, 因 LC 与 HC 等比率分泌, DON 对 HC 分泌的促进作用也使 LC 分泌与之等比率提高, 分别为 (204 ± 39) 和 $(146 \pm 27) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

由于 DON 对 HC 分泌的促进作用, 共转 HC 和 LC 基因细胞分泌的 HC 与 LC 比率为 1 : 1.8, 而未经

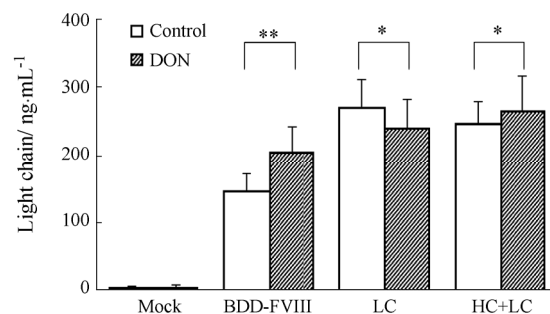


Figure 5 Effect of DON on light chain secretion. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$

DON 处理细胞为 1 : 3.3, 链分泌的不均衡性得到较大程度的缓解。

4 DON 提高双载体转基因细胞分泌的 FVIII 凝血生物活性

双载体共转 HC 和 LC 基因细胞经 DON 处理后, 其培养上清液用 Coatest 生色法分析 FVIII 凝血生物活性为 $(0.66 \pm 0.15) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显高于未经 DON 处理的共转基因细胞 $[(0.35 \pm 0.09) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 。转 BDD-FVIII 基因细胞经 DON 处理后分泌的 FVIII 生物活性 $[(1.22 \pm 0.26) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 也明显高于未经 DON 处理细胞 $[(0.85 \pm 0.18) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 。如果以转 BDD-FVIII 的 HC 分泌量全部贡献于凝血活性 (即 100%) 计算, DON 处理的共转基因细胞所分泌的 HC 中 72% 贡献于凝血活性, 与未用 DON 处理的转基因对照细胞相近 (73%)。结果如图 6 所示。

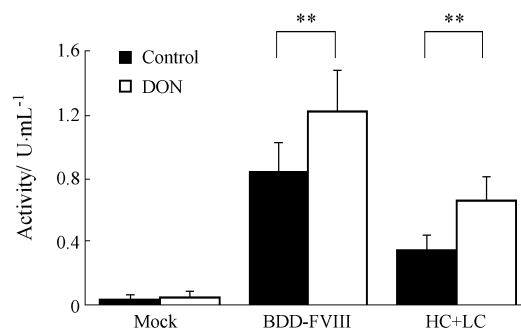


Figure 6 Effect of DON on secreted bioactivity by dual-vector BDD-FVIII gene co-transduced cell. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.05$

讨论

细胞内新合成 FVIII 在分泌过程中于高尔基体断裂为重链和轻链, 以异源二聚体的形式分泌出胞^[13]。建立在此基础上的双载体转 FVIII 基因为克服 AAV 载体容量限制提供了依据, 在甲型血友病基因治疗研究中得到应用。但 FVIII 分泌的生物学过程颇为复杂, 与分子结构相似的凝血因子 V (FV) 相比, 分泌

效率明显低下^[14]。影响 FVIII 低效分泌的重要分子机制在于其重链区存在与 GRP78 结合的位点, 其释放依赖细胞内高浓度的 ATP^[5]。双载体转 FVIII 基因中重链分泌的显著低下, 不仅影响转基因的功效, 而且过多分泌的无功能轻链多肽有引起机体免疫反应之虞, 另外, 淤积胞内的重链多肽形成对细胞的压力甚至可诱导细胞凋亡^[15]。

作为一种内质网应激蛋白, GRP78 表达水平可在细胞生理应激状态下诱导升高, 与错误折叠或未糖基化的蛋白结合, 抑制它们的分泌, 在非应激状态下 GRP78 呈组成型表达^[16]。Dorner 等^[17]用反义核酸技术抑制 GRP78 表达显示可显著促进 CHO 细胞表达异源 t-PA 的分泌, 且证明 GRP78 下调不改变细胞表型, 不影响细胞生长, 表明组成型 GRP78 表达并非细胞功能必须。DON 作为一种单端孢霉烯毒枝菌素, 最近有研究表明可通过细胞自噬途径介导 GRP78 蛋白降解, 但不影响巨噬细胞的生长^[8]。本研究采用 DON 处理 293 细胞, 结果显示, GRP78 蛋白水平明显下降, 但并未完全消失, 维持在较低水平, DON 对 293 细胞的生长也无明显影响, 提示对该细胞无毒性作用, 与上述文献报道一致。双载体 293 细胞转 BDD-FVIII 基因后用 DON 处理细胞显示, 重链的分泌性明显改善, 是未用 DON 处理细胞的 2 倍, 而对轻链的分泌性无影响, 分泌的重链与轻链比率的不均衡性得到缓解。比较细胞单独转重链基因结果可以看出, 重链分泌性有一定程度增加, 但不如共转基因细胞显著, 说明轻链可促进重链的分泌, 类似于作者用蛋白质剪接技术获得的双载体转基因^[11, 18]。相应地, DON 可明显提高双载体转基因细胞分泌的 VIII 凝血活性。

References

- [1] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias—from royal genes to gene therapy [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1773–1779.
- [2] Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EG. Prospects for gene therapy of haemophilia [J]. *Haemophilia*, 2004, 10: 309–318.
- [3] Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7: 2101–2112.
- [4] Sarkar R, Mucci M, Addya S, et al. Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17: 427–439.
- [5] 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.
- [6] Zhu FX, Yang SD, Liu ZL, et al. The effect of a secretion-enhanced heavy chain on improving intein-based dual-vector co-delivery of a full-length factor VIII gene [J]. *Chin Sci Bull*, 2011, 56: 158–163.
- [7] Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2005, 8: 39–69.
- [8] Shi Y, Porter K, Parameswaran N, et al. Role of GRP78/BiP degradation and ER stress in deoxynivalenol-induced interleukin-6 upregulation in the macrophage [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 109: 247–255.
- [9] 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.
- [10] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55–63.
- [11] Chen LX, Zhu FX, Li J, 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.
- [12] 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.
- [13] Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cell [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 6352–6362.
- [14] Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders [J]. *Blood*, 1988, 71: 539–555.
- [15] 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.
- [16] Lee AS. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells [J]. *Trends Biochem Sci*, 1987, 12: 20–23.
- [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] Zhu FX, Liu ZL, Miao J, et al. Glycosylation and L303E/F309S mutations improve intein-mediated splicing of the split coagulation factor VIII [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1361–1366.