

· 研究论文 ·

蛋白反式剪接的人/猪嵌合体 BDD-FVIII 及其分泌的改善

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: 本研究采用具有促分泌作用的猪 FVIII 分子的 A1 和 A3 区, 替换人 FVIII 分子的相应结构, 构建人/猪嵌合体 BDD-FVIII (BDD-hpFVIII), 利用 *Ssp* DnaB intein 的蛋白质反式剪接功能, 双载体培养的 COS-7 细胞瞬时共转嵌合体 *BDD-hpFVIII* 基因。免疫印迹法观察了转基因细胞内的蛋白表达和 BDD-hpFVIII 的剪接, 采用 ELISA 和 Coatest 法分别观察了分泌至培养上清液中剪接的嵌合体 BDD-hpFVIII 蛋白和生物活性。结果显示, 基因共转染细胞内可见明显的剪接 BDD-hpFVIII 蛋白, 分泌至上清液的剪接 BDD-hpFVIII 蛋白量为 $(340 \pm 64) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 活性为 $(2.52 \pm 0.32) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显高于双载体共转人 *BDD-FVIII* 基因细胞 [质量浓度为 $(93 \pm 22) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 活性为 $(0.72 \pm 0.13) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$], 提示 intein 介导的双载体共转 *BDD-hpFVIII* 基因可明显促进剪接蛋白的分泌。另外, 分别转 intein 融合 BDD-hpFVIII 重链和轻链基因的细胞混合培养后上清液中仍可检测到剪接的 BDD-hpFVIII 蛋白及其活性, 分别为 $(44 \pm 9) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(0.32 \pm 0.07) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 提示 intein 可进行不依赖细胞机制的 BDD-hpFVIII 剪接。本研究为旨在提高分泌的动物体内应用 intein 的双载体转 *BDD-hpFVIII* 基因奠定了基础。

关键词: 嵌合体 BDD-FVIII; 分泌; 内含肽; 蛋白质反式剪接

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1232-07

Protein *trans*-spliced chimeric human/porcine BDD-FVIII with augmented secretion

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

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

Abstract: This study is to construct a chimeric human/porcine BDD-FVIII (BDD-hpFVIII) containing the substituted porcine A1 and A3 domains which proved to have a pro-secretory function. By exploring *Ssp* DnaB intein's protein *trans*-splicing a dual-vector was adopted to co-transfer the chimeric *BDD-hpFVIII* gene into cultured COS-7 cell to observe the intracellular BDD-hpFVIII splicing by Western blotting and secretion of spliced chimeric BDD-hp FVIII protein and bio-activity using ELISA and Coatest assay, respectively. The data showed that an obvious protein band of spliced BDD-hpFVIII can be seen, and the amount of spliced BDD-hpFVIII protein and bio-activity in the supernatant were up to $(340 \pm 64) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(2.52 \pm 0.32) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ secreted by co-transfected cells which were significantly higher than that of dual-vector-mediated human *BDD-FVIII* gene co-transfection cells [$(93 \pm 22) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(0.72 \pm 0.13) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$]. Furthermore, a spliced BDD-hpFVIII protein and activity can be detected in supernatant from combined cells separately transfected with intein-fused BDD-hpFVIII heavy and light chain genes indicating that intein-mediated BDD-hpFVIII splicing occurs independently of cellular mechanism. It provided evidence for enhancing FVIII secretion in the research of animal models using intein-based dual vector for the delivery of the *BDD-hpFVIII* gene.

Key words: chimeric BDD-FVIII; secretion; intein; protein *trans*-splicing

收稿日期: 2010-04-13.

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y2005D14); 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 (2007[1108]); 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

凝血因子 VIII (FVIII) 是一种分子量较大的血浆糖蛋白, 在内源性凝血级联反应过程中作为活化的因子 IX (FIXa) 的重要辅因子参与因子 X (FX) 的激活, FVIII 质或量的缺陷所导致的 X-连锁遗传性甲型血友病在男性中的发病率为 1/7 500, 占血友病的大部分^[1]。血浆凝血因子浓缩物输注是目前重型甲型血友病患者临床治疗和预防性治疗的有效方法, 对于改善患者的生命质量起到了积极的作用, 但反复输注存在血源性传染病播散的危险和费用高昂的问题, 而且超过 20% 的患者可产生 FVIII 抑制性抗体^[2]。重组 FVIII 蛋白由于 FVIII 产量较低限制了其广泛使用。基于 FVIII 基因转移的基因治疗是作为单基因疾病的甲型血友病的有效治疗途径, 但由于 FVIII mRNA 的不稳定性导致的翻译水平低下、与内质网中分子伴侣蛋白的相互作用等导致的低效分泌使得 FVIII 的表达水平较低, 血浆 FVIII 难以达到持续治疗的水平^[3]。目前, 研究的重点一方面在于提高 FVIII 的表达水平, 为此通过基因工程的方法构建了不同的可改善表达水平的变构体 FVIII; 另一方面, 持续的转基因表达有赖于基因载体, 在已开发的基因载体中, 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体由于可定点整合到宿主基因组, 具有使转基因持续表达的特点以及可感染非分裂细胞和无致病性等优点, 是甲型血友病基因治疗的理想载体, 但 FVIII 的编码基因较大, 难以为 AAV 载体承载。作者最近的研究表明, Intein 的蛋白质反式剪接功能可有效地用于双载体转 FVIII 基因, 而且证明 FVIII 的轻链可顺式促进重链的分泌, 从而提高 FVIII 的表达水平^[4]。作为包埋在宿主蛋白中的多肽, Intein 翻译后通过其自催化作用将两侧宿主蛋白以肽键相连并切除自身, 此作用类似于 RNA 剪接, 被称为蛋白质剪接作用^[5]。为进一步提高 FVIII 的表达水平, 本文以证明具有显著促分泌作用的猪 FVIII 的 A1 和 A3 区分别替换人 FVIII 的相应结构, 构建人/猪嵌合体 BDD-hpFVIII 分子, 观察了 COS-7 细胞双载体转嵌合体 BDD-hpFVIII 基因后的表达、剪接和分泌, 为进一步运用 intein 双载体动物体内转嵌合体 BDD-hpFVIII 基因研究奠定了基础。

材料与方 法

质粒、菌株和细胞 含有 *Ssp DnaB intein* 基因的质粒 pMST 为加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授实验室构建, 本室保存。含有全长人 FVIII 编码 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。含有猪 BDD-FVIII 基因 cDNA 的真核表达质粒 pcDNA5-BDD-pFVIII 由美国埃默里大学 Dong Yun 教授惠赠。含有人 BDD-FVIII 重链、轻链与 *Ssp DnaB intein* 编码序列融合基因表达载体 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 以及人 BDD-FVIII 真核表达载体 pCMV-F8 为作者以前工作中构建^[6]。COS-7 细胞为本室保存。

工具酶及主要试剂 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 和 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。人重组 FVIII 为 BioChain 公司产品, 人 FVIII 的重链 A2 区单克隆抗体 012 为 MyBioSource 公司产品, 人 FVIII 轻链 C2 区单克隆抗体 ESH8 及 HRP 标记的 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。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 为方便比较, 将本室以前构建的含有人源 FVIII 重链和轻链与 *Ssp DnaB intein* 融合基因的表达质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 分别命名为 pCMV-hHCIn 和 pCMV-IchLC。以 pCMV-hHCIn 为模板, 用正向引物 5'-TAG CACCGGTCAGTTGCCAAGAAGCA TCC-3' (含 *Age I* 位点) 和反向引物 5'-ACTAAAGCAGAATCGCAA AGG-3', 反向 PCR 扩增得到含 intein 融合的去 A1 区的人源 FVIII 重链和载体序列的 DNA 片段; 以猪源 FVIII 的 cDNA 为模板, 用正向引物 5'-GCCATCAGG AGATACTACCT-3' 和反向引物 5'-TAGCACCGGTTT TGGATAAAGGGAGACACG-3' (含 *Age I* 位点) PCR 扩增猪源 FVIII 的 A1 区编码序列, *Age I* 酶切两段 PCR 产物后连接, 得到融合 intein 的人/猪嵌合 BDD-hpFVIII 重链表达载体 pCMV-hpHCIn。以 pCMV-IchLC 为模板, 用正向引物 5'-AAGTGTCAGACTCCCCTGG-3' 和反向引物 5'-AGCTCTTAAGAAAGCTGCGGGG CTCT-3' (含 *Afl II* 位点), 反向 PCR 扩增得到含 intein 的去 A3 区的人源 FVIII 轻链和载体序列 DNA 片段; 以猪源 FVIII 的 cDNA 为模板, 用正向引物 5'-AGCT

CTTAAGAGAACCCGACACTATTTTC-3' (含 *Afl* II 位点) 和反向引物 5'-CTTGCTGTACACCAGGAAAG-3' PCR 扩增猪 FVIII 的 A3 区编码序列, *Afl* II 分别酶切两段 PCR 产物后连接, 得到融合 intein 的人/猪嵌合 BDD-hpFVIII 轻链表达载体 pCMV-IchpLC。

细胞培养及基因转染 COS-7 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, 按细胞数 5×10⁵/孔 (于 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 Lipofectamine 2000 脂质体按试剂盒说明书进行转染, 将两种质粒 pCMV-hpHCIn 和 pCMV-IchpLC 各 4 μg 混合, 稀释于 250 μL 的 Opti-MEM 培养液, 与室温放置 5 min 的含脂质体 20 μL 的 Opti-MEM 培养液 250 μL 混合后继续室温放置 20 min, 共转染 COS-7 细胞; 设置两组 COS-7 细胞分别单独转染 pCMV-hpHCIn 和 pCMV-IchpLC, 于转染后 24 h 合并两组细胞继续培养。同时用 pCMV-hHCIn 和 pCMV-IchpLC 共转染以及用 pCMV-F8 单独转染 COS-7 细胞作为对照; 用空载体 pcDNA3.1 转染 COS-7 细胞作为阴性对照 (Mock)。培养 5 h 后换以 2 mL 的新鲜 Opti-MEM 培养液, 继续培养 48 h。收获培养细胞和培养上清液。

Western blotting 观察转基因细胞的基因表达和蛋白质剪接 采用冻融法裂解细胞, 提取转基因细胞总蛋白。使用 Bradford 法进行蛋白定量, 每个样品取 12 μg 总蛋白上样, 用还原性 SDS-PAGE 分离细胞总蛋白, 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, 用 1:1 000 稀释的兔抗人 FVIII 多克隆抗体 37 °C 轻摇孵育 1 h, 再用 HRP-抗兔血清 37 °C 轻摇孵育 1 h, ECL plus 法曝光 X 胶片。

细胞培养上清液中剪接的全长 BDD-FVIII 浓度分析 参照文献[7]用双夹心 ELISA 检测上清液中的全长 BDD-FVIII 蛋白量。将质量浓度为 2 μg·mL⁻¹ 的人 FVIII 重链 A2 区单抗 012 加入 96 孔酶标板 (100 μL/孔), 4 °C 包被过夜; 用洗涤液 (PBS+0.05% Tween 20) 洗板后, 每孔加入封闭液 (PBS+1% BSA+0.05% Tween 20) 200 μL, 37 °C 温育 2 h; 洗板后收集培养上清液和用 Opti-MEM 培养液稀释的标准品 FVIII (300~10 ng·mL⁻¹), 每个样品及标准品设置 3 个复孔 (100 μL/孔), 37 °C 温育 1 h; 洗板后每孔加入 2 μg·mL⁻¹ HRP 轻链 C2 区单抗 HRP-ESH8 100 μL, 37 °C 温育 1 h 后洗板, 加 OPD 溶液后 37 °C 温育 30 min 进行显色, 用 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板。以系列稀释的标准品的浓度和吸收度值绘制标准工作曲线,

根据测得的上清液样品的吸收度值从标准曲线读取 FVIII 浓度值。

细胞培养上清液中 BDD-FVIII 重、轻链浓度分析 参照作者建立的重、轻链特异性 ELISA 检测培养上清液的重链和轻链蛋白浓度^[4]。分别用 2 μg·mL⁻¹ 人 FVIII 重链 A2 区单抗 012 和轻链 C2 区单抗 ESH8 包被酶标板; 洗板、封闭后, 加入上清液样品或标准品 FVIII (100 μL/孔), 每个样品和标准品分设 3 个复孔, 37 °C 温育 1 h; 洗板后每孔加入 2 μg·mL⁻¹ HRP 标记 FVIII 多克隆抗体 100 μL, 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。从标准工作曲线读取重、轻链的浓度值。

生物活性的定量分析 采用 Coatest 发色分析法, 参照文献[8]按试剂盒说明书操作, 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 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 融合 intein 的人/猪嵌合体 FVIII 重链和轻链的构建

人全长 FVIII 的分子内结构域顺序为 A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉大部分 B 结构域 (Δ761~1 639) 后的 FVIII 为 BDD-hFVIII, 相应的猪源大部分 B 结构域缺失型 FVIII 为 BDD-pFVIII。作者以前的工作将 BDD-hFVIII 于 Gln¹⁶⁵⁶-Ser¹⁶⁵⁷ 之间人工断裂为重链和轻链, 分别与 *Ssp* DnaB intein 融合, 构建了融合 intein 的 BDD-hFVIII 重链和轻链, 分别插入真核表达载体 pcDNA3.1(+) 后得到 pCMV-hHCIn 和 pCMV-IchpLC; 本研究将 pCMV-hHCIn 和 pCMV-IchpLC 中的人源 A1 和 A3 区分别替换为猪源分子的相应结构域, 得到一对融合 *Ssp* DnaB intein 的人/猪嵌合体重链 hpHCIn 和轻链 IchpLC 表达载体 pCMV-hpHCIn 和 pCMV-IchpLC。上述 FVIII 的结构见图 1。

2 细胞转基因的表达和蛋白质剪接

细胞总蛋白进行 SDS-PAGE、转膜后用 FVIII 多

克隆抗体进行的 Western blotting 结果 (图 2) 显示, 共转 intein 融合的嵌合体 BDD-hpFVIII 重链和轻链基因 (*hpHCIn+IchpLC*) 的细胞可见一条明显的与转染人 *BDD-hFVIII* 基因阳性对照细胞表达的 BDD-hFVIII 蛋白大小一致的剪接 BDD-hpFVIII 蛋白条带, 由于剪接反应的不完全性, 尚可见到与单独转 intein 融合嵌合体重链基因 (*hpHCIn*) 和轻链基因 (*IchpLC*) 的细胞表达的蛋白大小一致的前体蛋白 (*hpHCIn*, *IchpLC*)。

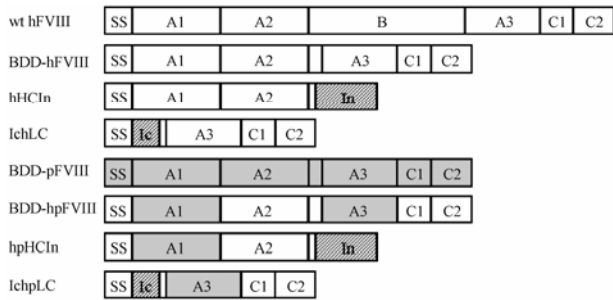


Figure 1 Schematic representation of FVIII constructs. The wild-type human full-length FVIII (wt hFVIII) contains three distinct structural domains including A1-3, B, and C1-2 and organized in the order of A1-A2-B-A3-C1-C2. The human BDD-FVIII (BDD-hFVIII) and porcine BDD-FVIII (BDD-pFVIII) were shown with retention of their small B domains. A pair of *Ssp* DnaB intein-infused human FVIII heavy and light chains termed as *hHCIn* and *IchpLC* were constructed as control. Another pair of *Ssp* DnaB intein-infused human/porcine chimeric heavy and light chains termed as *hpHCIn* and *IchpLC* were produced by replacing the human FVIII A1 and A3 domains with porcine FVIII A1 and A3 domains, respectively. SS: Signal sequence; In: N-terminus of *Ssp* DnaB intein; Ic: C-terminus of *Ssp* DnaB intein

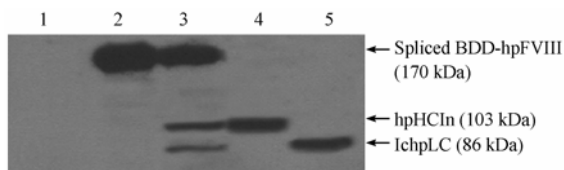


Figure 2 Observation of gene expression and BDD-hpFVIII splicing from gene co-transfected cells by Western blotting. Lane 1: Mock transfection showing no reactive protein band; Lane 2: *BDD-hFVIII* transfection showing a expressed BDD-hFVIII protein band; Lane 3: *hpHCIn* plus *IchpLC* co-transfection showing a spliced BDD-hFVIII protein band with a molecular weight similar to the control (*BDD-hFVIII* transfection) and incompletely spliced protein precursors (*hpHCIn* and *IchpLC*); Lane 4: *hpHCIn* transfection; Lane 5: *IchpLC* transfection

3 细胞培养上清液中剪接形成的全长 BDD-hpFVIII 蛋白浓度

用人重链和轻链单克隆抗体分别为包被抗体和

检测抗体进行的双夹心 ELISA 结果 (图 3) 显示, 人/猪嵌合体 BDD-hpFVIII 重链和轻链共转基因 (*hpHCIn+IchpLC*) 细胞上清液中剪接的 BDD-hpFVIII 浓度为 $(340 \pm 64) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于人源 BDD-hFVIII 重链和轻链共转基因 (*hHCIn+IchpLC*) 细胞的 $(93 \pm 22) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$), 也明显高于转人 *BDD-hFVIII* 基因阳性对照细胞的 $(108 \pm 13) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而后两者间比较, 无明显差别 ($P > 0.05$)。从分别转人/猪嵌合体重链 (*hpHCIn*) 和轻链 (*IchpLC*) 基因细胞合并培养的上清液可检测到剪接 BDD-hpFVIII 蛋白 [$(44 \pm 9) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$], 提示 intein 可进行不依赖于细胞机制的剪接反应, 分泌后的重链和轻链依然可通过剪接反应连接成完整的 BDD-hpFVIII 蛋白; 另外, 作者在 intein 融合断裂 vWF 基因的原核表达研究中, 通过纯化表达的前体融合蛋白体外混合实验直观地观察到 intein 催化的完全不依赖细胞机制的剪接作用^[9]。结果表明, intein 介导的双载体转人/猪嵌合体 *BDD-hpFVIII* 基因相对于转人源 *BDD-hFVIII* 基因, 剪接蛋白的分泌效率明显得到改善。

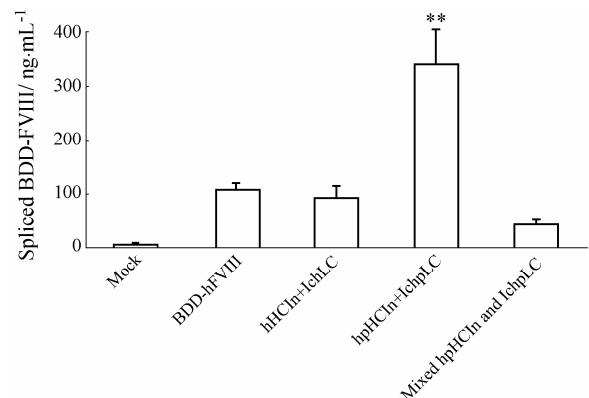


Figure 3 Concentration of spliced BDD-FVIII protein in supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs *hHCIn* and *IchpLC* co-transfection and *BDD-hFVIII* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *hpHCIn* and *IchpLC* genes showing detectable BDD-hpFVIII produced by protein splicing

4 分泌至细胞培养上清液中的重链蛋白浓度

人 FVIII 分泌的低效率性主要是因为其分子重链的 A1 区存在与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合区使其解离需消耗 ATP, 以及分泌过程从内质网转运至高尔基体依赖其分子的糖基化修饰, 作者曾用转基因实验证明重链多肽的分泌效率远低于整体的 BDD-FVIII 蛋白^[4]。重链特异性 ELISA 结果 (图 4) 显示, 转融合 intein 的人源 BDD-hFVIII 重链 (*hHCIn*) 和人/猪嵌合

体 BDD-hpFVIII 重链 (*hpHCIn*) 基因细胞分泌的重链多肽量分别为 $(19 \pm 6) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $(72 \pm 9) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 后者明显增高 ($P < 0.01$), 说明猪源 A1 区具有促进嵌合体重链分泌的作用。与融合 *intein* 的轻链共转基因 (*hHCIn+IchLC*, *hpHCIn+IchpLC*), 重链的分泌量分别达到 $(138 \pm 28) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $(457 \pm 9) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 两者相比有明显差别 ($P < 0.01$), 表明嵌合体轻链比嵌合体重链的促分泌作用更加明显。结合上述分泌的剪接 BDD-FVIII 分析, 剪接蛋白占重链蛋白的 67%~74%, 说明轻链主要以顺式作用的方式促进重链的分泌。

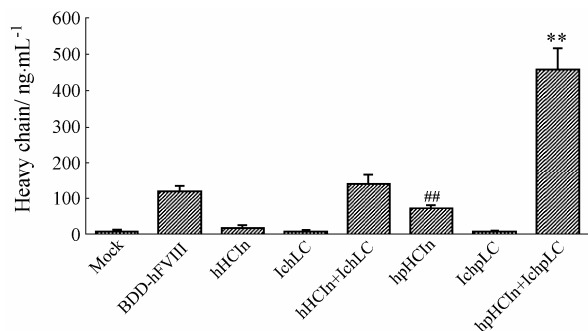


Figure 4 Concentration of the heavy chain in supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs *hHCIn* transfection, ^{**} $P < 0.01$ vs *hHCIn* plus *IchLC* co-transfection and *BDD-hFVIII* transfection

5 分泌至培养上清液中的轻链蛋白浓度

作者以前的研究证明, 人 FVIII 的轻链分泌效率明显高于重链^[4]。为了检测 *intein* 融合的人/猪嵌合体 BDD-hpFVIII 轻链的分泌性, 轻链特异性 ELISA 结果 (图 5) 显示, 融合 *intein* 的嵌合 BDD-hpFVIII 轻链转基因 (*IchpLC*) 细胞的轻链分泌量为 $(556 \pm 79) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于融合 *intein* 的人源 BDD-hFVIII 轻链转基因 (*IchLC*) 细胞的轻链分泌量 [$(268 \pm 46) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$], 表明猪源 FVIII 分子的 A3 区可显著促进嵌合体轻链的分泌。与融合 *intein* 的 BDD-hpFVIII 重链共转基因 (*hpHCIn+IchpLC*) 细胞的轻链分泌量为 $(538 \pm 86) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 与单独转嵌合体轻链基因相比无明显差异, 说明重、轻链的共表达并不能进一步提高轻链多肽的分泌活性。结合 *intein* 融合嵌合体重链转基因细胞的重链分泌量, 表明嵌合体重链的分泌活性仍然不及嵌合体轻链。

6 细胞培养上清液的凝血生物活性

应用生色分析法检测转基因细胞培养上清液的凝血生物活性结果 (图 6) 显示, 人/猪嵌合体 BDD-hpFVIII 重链和轻链共转基因 (*hpHCIn+IchpLC*) 细胞上清液的活性为 $(2.52 \pm 0.32) \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于人

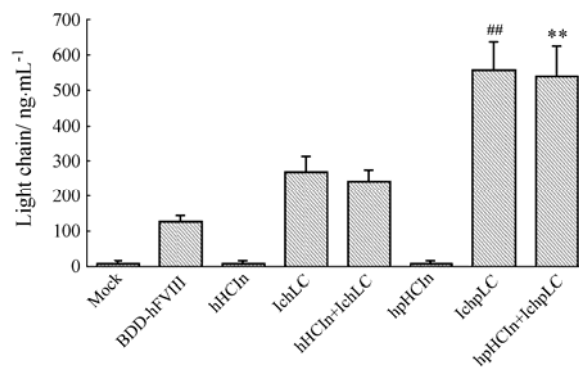


Figure 5 Concentration of light chain in supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs *IchLC* transfection, ^{**} $P < 0.01$ vs *hHCIn* and *IchLC* cotransfection and *BDD-hFVIII* transfection

源 BDD-hFVIII 重链和轻链共转基因 (*hHCIn+IchLC*) 细胞上清液的活性 [$(0.72 \pm 0.13) \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$], 也明显高于转人源 BDD-hFVIII 基因的活性 [$(0.82 \pm 0.12) \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$]. 表明 *intein* 介导的双载体转 BDD-hpFVIII 基因产生的凝血活性明显优于双载体转 BDD-hFVIII 基因。转 BDD-hpFVIII 重链 (*hpHCIn*) 和轻链 (*IchpLC*) 基因细胞合并培养上清液的凝血生物活性为 $(0.32 \pm 0.07) \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结合上述上清液剪接 BDD-hpFVIII 检测结果, 提示 *intein* 可进行不依赖细胞机制的剪接反应产生凝血生物活性。

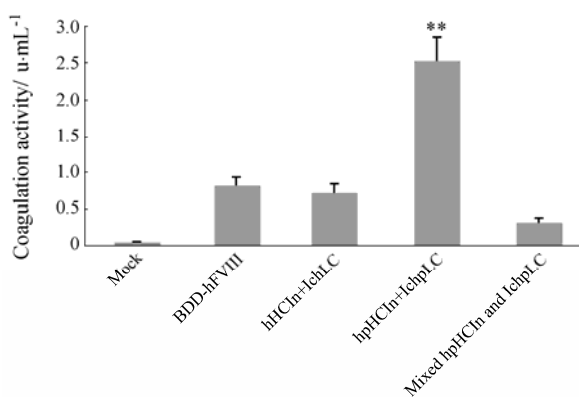


Figure 6 Coagulation activity of supernatants. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs *hHCIn+IchLC* co-transfection and *BDD-hFVIII* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *hpHCIn* and *IchpLC* genes shows detectable coagulation activity

讨论

作为凝血级联反应中的一种辅因子, FVIII 在生理止血中发挥重要作用, 目前治疗由 FVIII 缺陷引起的甲型血友病患者的主要方法为血浆浓缩物和重组 FVIII 蛋白替代疗法^[10]。前者存在费用高、血源性传染病播散以及产生抑制性抗体等不利因素, 后者由

于 FVIII 真核细胞表达水平低限制了其广泛应用。基于 FVIII 基因转移的基因治疗给甲型血友病的治疗带来了希望。在已开发的基因载体中, AAV 的无致病性、可感染非分裂期细胞、介导转基因的持续表达、较少引起宿主免疫反应等特点为基因治疗的理想载体^[11]。但 AAV 载体的容量限制 (~4.7 kb) 使其在运载 FVIII 基因时遇到困难, BDD-FVIII 的大小为 4.5 kb, 加上调控元件后将超过 AAV 载体的限量。

目前采用小的启动子/增强子克服 AAV 容量限制的策略虽有一定效果, 但由于缺乏组织特异性强表达调控元件, 表达水平较低^[11, 12]。运用新的血清型 AAV8 和 AAV9 载体转 BDD-FVIII 基因在实验小鼠取得了较好的肝脏特异性表达, 但尚缺乏大动物实验依据^[13, 14]。基于对 FVIII 合成后细胞内加工为功能性重链和轻链异源二聚体机制的认识, 采用双 AAV 载体分别转 BDD-FVIII 的重链和轻链基因是克服 AAV 容量限制的另一个有效策略^[15, 16]。但一个突出的问题是相对于高分泌水平的轻链多肽, 低效分泌的重链多肽一方面使淤积于细胞内的重链多肽对细胞变得不稳定甚至诱导细胞凋亡^[17], 另一方面分泌的轻链多肽因大部分没有与重链多肽形成功能性异源二聚体, 使其归于“无效分泌”。研究表明, 培养细胞转猪源 BDD-FVIII 基因后, 通过翻译后的分泌效率增强使其表达水平明显高于人源 BDD-FVIII, 进一步研究证明前者的分泌增强主要源自其分子重链的 A1 和轻链的 A3 区^[18, 19]。为改善重链的分泌效率, 作者最近运用 intein 的蛋白质反式剪接技术双载体转 BDD-FVIII 基因证明, 轻链能有效地顺式促进重链多肽的分泌, 而且分泌后的重、轻链可进行不依赖细胞机制的剪接反应^[4, 6]。本研究利用猪 BDD-FVIII 的 A1 和 A3 区对分泌的促进作用, 用其替换人 BDD-FVIII 的 A1 和 A3 区, 构建人/猪嵌合 BDD-hpFVIII 基因, 以 intein 的蛋白质反式剪接技术的双载体培养细胞共转 BDD-hpFVIII 的重链和轻链基因, 结果显示, 培养上清液中 intein 的蛋白质剪接作用连接的全长 BDD-hpFVIII 蛋白量显著高于双载体转人源 BDD-hFVIII 基因后连接的 BDD-hFVIII (3.7 倍), 嵌合重链和轻链的分泌量也明显高于人源 BDD-hFVIII 的重链和轻链, 其中嵌合重链分泌增加 4 倍, 嵌合轻链分泌增加 2 倍, 尽管如此, 嵌合重链的分泌水平仍然低于嵌合轻链 (约为 1/8), 而人源 BDD-hFVIII 重链分泌只有轻链的 1/14, 说明除 A1 区外, 人源 FVIII 重链的其他区域的结构也对其分泌产生影响。研究表明, 人 FVIII 分泌

低效除了重链 A1 区存在与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合的位点外, B 区糖基化修饰有助于其分泌过程从内质网向高尔基体转运, 从而有利于分泌^[20]。细胞培养上清液的凝血活性分析也表明嵌合体重链和轻链共转基因明显高于人源 BDD-hFVIII 重链和轻链共转基因。从分别转嵌合体重链和轻链基因细胞混合培养的细胞上清液中检测到剪接的 BDD-hpFVIII 和凝血活性, 说明分泌至细胞培养上清液的嵌合重、轻链在 intein 的非细胞机制依赖性剪接功能下的连接作用, 与基于翻译后加工形成异源二聚体 FVIII 的双载体转 FVIII 基因对于两者转染同一靶细胞的依赖性相比是明显的优点, 因为实际上基因共转染同一靶细胞的效率并不很高, 研究表明只占总的转染细胞的 26%^[15]。

Intein 的蛋白质剪接功能所具有的精确、高效和无副反应的肽键连接宿主蛋白的特点使其在蛋白质纯化^[21]、多肽环化^[22]以及蛋白质相互作用^[23]等研究中得到应用。Intein 的剪接效率受剪接位点目的蛋白氨基酸组成的影响, 作者利用原核剪接实验测试了 *Ssp DnaB* intein 对不同点断裂 BDD-FVIII 的剪接效率, 证明 Ser¹⁶⁵⁷ 密码子前断裂具有较高的剪接效率 (达 61%)^[24]。由于猪源 FVIII 序列的嵌入, BDD-hpFVIII 可能产生的免疫反应是潜在的不利因素, 但研究表明, 应用 *ex vivo* 转猪源 BDD-pFVIII 基因对存在明显高水平 FVIII 抑制性抗体的血友病小鼠具有明显的治疗效果^[25]。目前应用重组的猪源 BDD-pFVIII 治疗存在抗人 FVIII 抗体的血友病患者已进入 II 期临床试验, 显示出较好的控制出血的疗效^[26]。本文所构建的嵌合体 BDD-hpFVIII 与人 BDD-FVIII 的氨基酸序列尽管同源性高达 89%, 但对于动物体内实验乃至未来的临床应用的可行性需要进一步研究。在本研究的基础上, 作者将进行小鼠体内双载体转基因实验, 以检验体内剪接嵌合体蛋白的表达水平。

致谢: 感谢加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授提供的蛋白质剪接技术帮助。

References

- [1] Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia [J]. *Br J Haematol*, 2008, 140: 479-487.
- [2] Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2004, 32: 239-248.
- [3] Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion [J]. *Blood*,

- 2004, 103: 3412-3419.
- [4] 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.
- [5] Perler FB, Davis EO, Dean GE, et al. Protein splicing elements: inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 1125-1127.
- [6] Zhu FX, Liu ZL, Chi XY, et al. Protein trans-splicing based dual-vector delivering of coagulation factor VIII gene [J]. *Sci Chin C: Life Sci (中国科学 C: 生命科学)*, 2009, 39: 746-754.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Zhu FX, Guo M, Liu ZL, et al. Dual intein-mediated trans-splicing of tri-fragmented von Willebrand factor [J]. *Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报)*, 2010, 26: 157-163.
- [10] Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2004, 30: 239-247.
- [11] Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene [J]. *Thromb Res*, 2006, 118: 627-635.
- [12] Sarkar R, Xiao W, Kazazian HH Jr. A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1: 220-226.
- [13] Lu H, Chen LX, Wang JH, et al. Complete correction of hemophilia A with adeno-associated viral vectors containing a full-size expression cassette [J]. *Hum Gene Ther*, 2008, 19: 648-654.
- [14] Sarkar R, Mucci M, Addya A, 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Doering CB, Denning G, Dooriss K, et al. Directed engineering of a high-expression chimeric transgene as a strategy for gene therapy of hemophilia A [J]. *Mol Ther*, 2009, 17: 1145-1154.
- [19] Doering CB, Healey JF, Parker ET, et al. Identification of porcine coagulation factor VIII domains responsible for high level expression via enhanced secretion [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 6546-6552.
- [20] Pittman DD, Tomkinson KN, Kaufman RJ. Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17329-17337.
- [21] Sharma SS, Chong S, Harcum SW. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli* [J]. *J Biotechnol*, 2006, 125: 48-56.
- [22] Williams NK, Prosselkov P, Liepinsh E, et al. *In vivo* protein cyclization promoted by a circularly permuted *Synechocystis* sp. PCC6803 DnaB mini-intein [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7790-7798.
- [23] Paulmurugan R, Umezawa Y, Gambhir SS. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15608-15613.
- [24] Zhu FX, Liu ZL, Qu HG. *Ssp* DnaB intein-mediated ligation of heavy and light chains of coagulation factor VIII in *Escherichia coli* [J]. *Chin J Biotech (生物工程学报)*, 2009, 25: 1101-1106.
- [25] Doering CB, Gangadharan B, Dukart HZ, et al. Hematopoietic stem cells encoding porcine factor VIII induce pro-coagulant activity in hemophilia A mice with pre-existing factor VIII immunity [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 1093-1099.
- [26] Mahlangu J, Andreeva TA, MacFarlane D, et al. A phase II open-label study evaluating hemostatic activity, pharmacokinetics and safety of recombinant porcine factor VIII (OBI-1) in hemophilia A patients with alloantibody inhibitors directed against human FVIII [ASH Annual Meeting Abstracts] [J]. *Blood*, 2007, 110: abstract 783.