

vWF 促进 intein 剪接的 BDD-FVIII 的分泌和活性

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: vWF 是由巨核细胞和血管内皮细胞合成的糖蛋白, 其主要功能之一为凝血 VIII 因子 (FVIII) 的载体, 防止后者被血浆酶降解。作者最近的工作证明 intein 可应用于双载体转移 B 结构域缺失型 FVIII (BDD-FVIII) 基因, 通过翻译后的蛋白质反式剪接形成完整的功能性 BDD-FVIII 蛋白。为了研究 vWF 对于 intein 连接的 BDD-FVIII 分泌和活性的影响, 通过 intein 融合的 BDD-FVIII 重、轻链基因和 vWF 基因共转染培养的 293 细胞, 采用 ELISA 观察了分泌至培养上清液中的由 intein 剪接的全长 BDD-FVIII 抗原量, 并用 Coatest 检测了其产生的活性。结果显示, vWF 基因共转染细胞上清液中, 全长 BDD-FVIII 抗原量为 $(235 \pm 21) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 活性为 $(1.98 \pm 0.2) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显高于未转染 vWF 的细胞 $[(110 \pm 18) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(1.10 \pm 0.15) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 也明显高于单独转染 BDD-FVIII 基因的对照细胞 $[(131 \pm 25) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(1.22 \pm 0.18) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 表明 vWF 基因共转染可显著改善双载体转 BDD-FVIII 基因后 intein 剪接的 BDD-FVIII 蛋白的分泌和生物活性。为基于蛋白质剪接的断裂 BDD-FVIII 基因转移的甲型血友病基因治疗研究中, 应用 vWF 基因共转移以提高治疗的功效提供了依据。

关键词: von Willebrand 因子; 凝血 VIII 因子; 共转染; 分泌; intein; 蛋白质反式剪接作用

中图分类号: Q7; R55

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 05-0595-06

vWF improves secretion and activity of intein spliced BDD-FVIII

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: As synthesized by vascular endothelial cells and megakaryocytes, the von Willebrand factor (vWF) plays an important hemostatic role in the binding to and stabilizing blood coagulation factor VIII (FVIII) and preventing its enzymatic degradation. Our recent work demonstrated intein can efficiently ligate BDD-FVIII (B-domain deleted FVIII) posttranslationally by protein *trans*-splicing after transfer of split BDD-FVIII gene by a dual-vector system. In this study we investigated the effect of vWF on secretion and activity of intein-ligated BDD-FVIII. We observed the levels of full-length BDD-FVIII antigen secreted into culture supernatant by ELISA and their activity by Coatest assay after transfection of cultured 293 cells with intein-fused BDD-FVIII heavy- and light-chain genes simultaneously with the vWF gene co-transfected. The data showed that the amount of full-length BDD-FVIII protein and their bioactivity in vWF gene co-transfected cell supernatant were $235 \pm 21 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.98 \pm 0.2 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, greater than that of non-vWF co-transfected cell ($110 \pm 18 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.10 \pm 0.15 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$) or just BDD-FVIII gene transfected control cell ($131 \pm 25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.22 \pm 0.18 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$) indicating the benefit of vWF gene co-transfection in the secretion and activity of intein-spliced BDD-FVIII protein. It provided evidence that vWF gene co-transfer may be useful to improve efficacy of gene therapy for hemophilia A in protein splicing-based split FVIII gene transfer.

收稿日期: 2009-12-22.

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 (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

Key words: von Willebrand factor; coagulation factor VIII; co-transfection; secretion; intein; protein *trans*-splicing

甲型血友病基因治疗中运用 AAV 载体的凝血 VIII 因子 (FVIII) 基因转移受 AAV 载体的容量限制, 在已有的解决 AAV 载体容量限制的策略中, intein 的蛋白质反式剪接技术可作为一个行之有效的备选方案。Intein 是包埋在蛋白质前体中的小肽序列, 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。迄今发现的 100 多种 intein 主要存在于原核生物和单细胞真核生物, 主要为发生于同一分子内的顺式剪接, 但也发现有天然存在的发生于分子间的反式剪接 intein 如 *Ssp* DnaE intein^[1], 而且人工断裂的顺式剪接的 intein 也可进行反式剪接^[2]。Intein 的高效、精确和非细胞机制依赖性的蛋白质剪接作用特点使其成为蛋白质工程和药物开发如体内多肽的连接、多肽环化、蛋白质纯化、生物传感器及基因治疗等的有力工具^[3, 4]。最近作者运用 *Ssp* DnaB intein 的蛋白质反式剪接进行的双载体真核细胞转 BDD-FVIII (B 结构域大部分缺失的功能性 FVIII, B-domain deleted FVIII) 基因研究表明^[5], 通过翻译后的蛋白质剪接作用可有效连接 BDD-FVIII 蛋白并产生凝血生物活性。作者还用体外培养细胞进行的 intein 对氯离子通道蛋白 CFTR 的剪接实验表明, 剪接产生的 CFTR 蛋白具有与野生型 CFTR 一致的氯离子通道功能^[6]。由于双载体共转染同一细胞的不均衡性、表达水平存在的差异、蛋白分子间相互作用的不完全性以及非天然宿主蛋白对所选用的 intein 剪接反应的影响, 仍然能观察到未被剪接的前体蛋白。vWF 作为主要由巨核细胞和内皮细胞合成和分泌的一种血浆多聚体超分子蛋白, 其主要功能之一为与血浆中的 FVIII 结合, 具有 FVIII 的分子伴侣功能, 防止其快速降解、细胞摄取以及活化的血小板和与内皮细胞表面的结合, 在游离状态下, FVIII 的半衰期从 12 h 缩短到 1~2 h^[7]。vWF 分子包含复杂的多结构域即 D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3=D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK, 新合成的 vWF 前体分子经翻译后的加工, 包括信号肽和前肽的水解切除、糖基化修饰、硫化形成功能性多聚体^[8]。本文采用 BDD-FVIII 基因, 于其分子的 Ser¹⁶⁵⁷ 密码子前断裂为两部分, 分别与 *Ssp* DnaB intein 融合后构建一对真核表达载体, 与 vWF 基因共转染 293 细胞, 探索 vWF 表达对 intein 连接的 BDD-FVIII 分泌和生物活性的影

响, 旨在为提高基于 intein 的 BDD-FVIII 基因转移的效率以及进一步的体内甲型血友病动物模型的基因治疗研究提供依据。

材料与方法

质粒、菌株和细胞 含有人 vWF cDNA 的真核表达质粒 pSVHvWF1 由美国华盛顿大学 Sadler 教授惠赠。含有 *Ssp* DnaB intein 编码序列的质粒 pMST 和含有全长人 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。含有人 BDD-FVIII cDNA 的真核表达质粒 pCMV-F8 由本实验室构建并保存。pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。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 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。兔抗人 vWF 多克隆抗体 (A 0082) 和 HRP 标记的兔抗人 vWF 多克隆抗体 (P 0226) 购自 Dako 公司。人重组 FVIII 为 BioChain 公司产品, 人 FVIII 重链单克隆抗体 ESH5 和 HRP 标记的轻链抗体 ESH8 购自 American Diagnostica 公司; 羊抗兔 HRP-二抗和 ECL plus Western Blotting Detection 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech (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。SeaKem High Gelling Temperature (HGT) 琼脂糖购自 FMC Bio-products 公司。其他试剂均为分析纯。

真核重组表达质粒的构建 用 *EcoR* I 酶切质粒 pSVHvWF1, 得到 8.4 kb 的人 vWF 的 cDNA, 与 *EcoR* I 酶切后线性化真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 连接, 得到 vWF 的真核表达载体 pCMV-vWF。含有人 BDD-FVIII cDNA 的真核表达质粒 pCMV-F8 由本实验室以前构建并保存; 融合 *Ssp* DnaB intein 的断裂 BDD-FVIII 真核表达质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的构建参考文献[1], 所选的 BDD-FVIII 断裂点位于

其 B 结构域的 Ser¹⁶⁵⁷ 密码子前。

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 5×10^5 个细胞于 2 mL 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 3 种质粒 pCMV-vWF、pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 按 1 : 1 : 1 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 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混合蛋白酶抑制剂 40 μL 。

培养上清液中的 vWF 浓度检测 参考文献[9] 用夹心 ELISA 检测培养上清液中的 vWF 抗原量。用 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vWF 多克隆抗体 (A 0082) 每孔 4 °C 过夜包被酶标板, 洗板后用含 1% BSA 的封闭液 37 °C 封闭 2 h, 洗板后将用 Opti-MEM 培养液按 1 : 40 稀释的细胞培养上清液加入样品孔, 每个样品设 3 个孔, 每孔加 100 μL 。用 1 : 8 000 稀释的 HRP 标记 vWF 多克隆抗体 (P 0226) 作为探测抗体, 测得样品的吸收度值。用正常人血浆作为标准品, 设置为 100%, 样品 vWF 含量用与标准品比较的百分比表示。

培养上清液中的 vWF 多聚体分析 参考文献[10]的方法进行。用 SeaKem HGT (P) 琼脂糖制备 SDS-琼脂糖凝胶, 浓缩胶为 0.8% 琼脂糖, 分离胶为 2% 琼脂糖和 0.1% SDS, 将经 PBS 透析、冻干浓缩的培养上清液重溶于 PBS, 与上样缓冲液混合后上样, 用 Laemmli 缓冲液 4 °C 在 40 V 电压下电泳 16 h。然后 30 V 电压下 30 min 继之 60 V 电压 2.5 h, 在转膜缓冲液 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸, 20% 甲醇, 4% SDS) 中将蛋白转移至 PVDF 转印膜 (Immobilon-P, 0.45 μm , Milipore 公司产品)。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后用 1 : 4 000 稀释的兔抗人 vWF 一抗 (A 0082) 室温下轻摇反应 1 h, 洗膜后用 1 : 4 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗室温轻摇反应 2 h, ECL 法进行曝光。

细胞培养上清液中剪接的 BDD-FVIII 浓度及生物活性的定量分析 参考文献[11]用双夹心 ELISA

检测上清液中的全长 BDD-FVIII 蛋白量, 将以 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 稀释的重链特异性单抗 ESH5 每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板, 4 °C 包被过夜, 用洗涤液 (PBS/0.05% Tween 20) 洗板 3 次, 每孔用封闭液 (PBS+1% BSA + 0.05% Tween 20) 200 μL , 37 °C 温育 2 h, 洗板 3 次后, 将收集的培养上清液和用 Opti-MEM 培养液稀释的标准品 FVIII (浓度范围为 300~10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每个样品及每个稀释度的标准品分别平行重复加样 3 个孔, 每孔 100 μL , 37 °C 温育 1 h, 洗板后每孔加入 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRP 100 μL 标记轻链单抗 HRP-ESH8, 37 °C 温育 1 h 后洗板 10 次, 加反应底物 OPD 溶液 37 °C 温育 30 min 进行显色, 用 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 BDD-FVIII 浓度。

参考文献[12]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 $\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$), 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 $\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 换算为上清液的 FVIII 生物活性。

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

结果

1 真核表达载体的构建

将 pSVHvWF1 中的 vWF 插入到 pcDNA3.1 (+) 得到 pCMV-vWF; 将 BDD-FVIII 插入到 pcDNA3.1 (+) 得到 pCMV-F8; 选择与 *Ssp* DnaB intein 天然宿主蛋白相同的 Ser¹⁶⁵⁷ 前将 BDD-FVIII 的 cDNA 断裂成重链和轻链两部分, 分别与 *Ssp* DnaB intein 的 N 端 (IntN) 和 C 端 (IntC) 融合构建到真核表达载体 pcDNA3.1 (+), 得到一对含信号肽并融合内含肽的 BDD-FVIII 的重链和轻链基因的表质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC。表达载体示意图见图 1。

2 细胞培养上清液中 vWF 蛋白浓度

设定正常人血浆中的 vWF 含量为 100%, 用 vWF 多克隆抗体进行的 ELISA 检测结果显示, 单独转 vWF 基因与 vWF、HCIntN 和 IntCLC 基因共转染 293 细胞培养上清液中分泌的 vWF 抗原量分别为 (225 $\pm$ 24)%

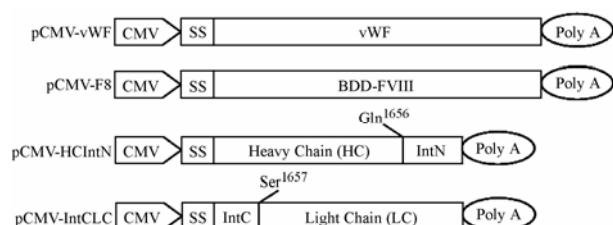


Figure 1 Schematic representation of recombinant eukaryotic expression vectors. Both vWF and BDD-FVIII expression are driven by the CMV promoter/enhancer. The BDD-FVIII gene is broken before Ser¹⁶⁵⁷ into heavy and light chains (HC and LC) and fused with N-part (IntN) and C-part (IntC) of *Ssp* DnaB intein, respectively. For secretion required a signal sequence (SS) of factor VIII is added before IntC. These two fused genes are inserted into two separate pcDNA3.1 vectors under the control of CMV promoter/enhancer and followed by a poly A signal

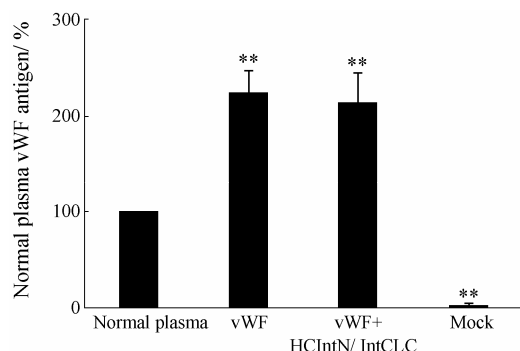


Figure 2 Transgene expressed vWF antigen levels in supernatants after gene co-transfection. Normal human plasma was used as a vWF reference (100%). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal plasma group

和 $(215 \pm 31)\%$ ，两者之间 vWF 抗原量无明显差异，明显高于正常血浆中的 vWF 抗原水平 ($P < 0.01$)，如图 2 所示。

3 细胞培养上清液中的 vWF 多聚体分析结果

用 pCMV-vWF 转染 293 细胞以及用 pCMV-vWF、pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 共转染 293 细胞后，对培养上清液进行的 vWF 多聚体形成分析显示出和正常人血浆相似的 vWF 多聚物条带模式，Mock 转染未见 vWF 多聚物形成，如图 3 所示。表明单独和与 intein 融合的 FVIII 重链、轻链共转 vWF 基因后，细胞均能合成、分泌多聚体 vWF 蛋白。

4 细胞培养上清液中剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白浓度

用 ELISA 检测的培养上清液中的全长 BDD-FVIII 蛋白含量结果如图 4 所示，vWF、HCIntN 和 IntCLC 基因共转染 293 细胞培养上清液的 BDD-FVIII 蛋白浓度为 $(235 \pm 21) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，明显高于 ($P < 0.01$) 单独转 BDD-FVIII 基因的细胞 [$(131 \pm 25) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$] 和

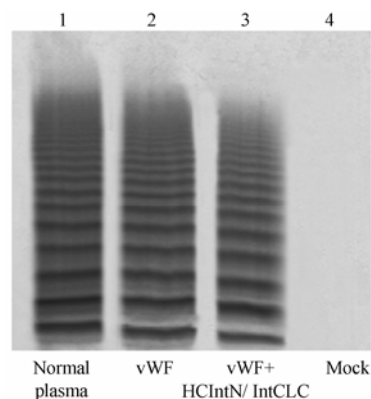


Figure 3 Multimer analysis of transgene expressed vWF in supernatants after gene co-transfer. Normal plasma or culture supernatants were electrophoresed on SDS/2% agarose gel followed by detection of vWF by HRP-conjugated antibody against human vWF. Lane 1: Normal human plasma; Lane 2: vWF gene-transfected positive control; Lane 3: HCIntN, IntCLC and vWF cotransfection; Lane 4: The mock-transfected control

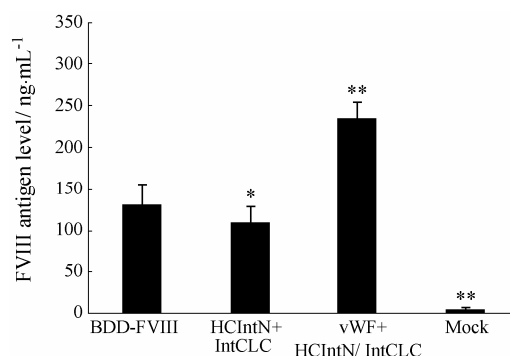


Figure 4 Quantitative analysis of secreted BDD-FVIII antigen in supernatants by ELISA. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs BDD-FVIII transfection and HCIntN+IntCLC cotransfection groups; * $P > 0.05$ vs BDD-FVIII transfection group

HCIntN、IntCLC 基因共转染细胞 [$(110 \pm 18) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$]，而后两者间比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，Mock 转染细胞培养上清液未检测到 BDD-FVIII 蛋白。结果表明，vWF 基因共转染所表达的 vWF 可明显促进 intein 剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白的分泌。

5 分泌至细胞培养上清液的 BDD-FVIII 生物活性

Coatest 生色分析结果如图 5 所示，vWF、HCIntN 和 IntCLC 共转染的细胞培养上清液的 FVIII 生物活性为 $(1.98 \pm 0.2) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，明显高于单独转 BDD-FVIII 基因的细胞 [$(1.22 \pm 0.18) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$] 和 HCIntN、IntCLC 两者共转染细胞 [$(1.10 \pm 0.15) \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$]，差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)，而后两者相比，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，Mock 转染细胞培养上清液未检测到 FVIII 活性。结果表明，vWF 基因共转染可明显提高细胞培养上清液中 intein 剪接的 BDD-FVIII 的生物活性。

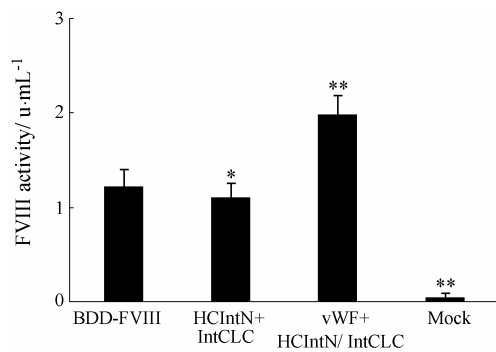


Figure 5 Biological activity of FVIII in supernatants by Coa-test assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs BDD-FVIII transfection and HCIntN + IntCLC cotransfection group; * $P > 0.05$ vs BDD-FVIII transfection group

讨论

FVIII 是凝血级联反应的一种重要辅因子, 在生理止血中辅助 IX 因子对 X 因子的激活, 引起一系列的凝血因子活化反应, 最终通过形成的纤维蛋白吸附活化的血小板产生凝血块。由 FVIII 缺陷引起的甲型血友病占血友病患者的大多数 (80%), 血浆浓缩物和重组 FVIII 蛋白替代是目前治疗甲型血友病的主要方法^[13]。基因治疗是作为单基因遗传病的甲型血友病的理想疗法。AAV 的无致病性、可感染非分裂期细胞、较少引起宿主免疫反应以及可定点整合到宿主基因组进行长期稳定表达等特点为基因治疗的理想载体, 但 FVIII 基因超过 AAV 载体的容量限制, 即使是采用 BDD-FVIII, 加上基因表达调控元件, 仍难以为 AAV 承载。目前文献报道克服 AAV 容量限制的策略主要包括基于表达后形成异源二聚体 FVIII 的双 AAV 载体^[14]和基于 DNA 反式剪接的双 AAV 载体^[15]转 FVIII 基因, 但异源二聚体和 DNA 反式剪接效率较低, 而且依赖于两个载体共转染同一细胞, 而实际上共转染的效率并不很高, 研究表明只占总的转染细胞的 26%^[16]。作者最近的研究表明, 利用 intein 的蛋白质反式剪接功能的双载体 BDD-FVIII 基因转移具有蛋白质剪接的高效、准确以及剪接机制的非细胞机制依赖性, 细胞内外皆可剪接, 因此不同的细胞表达的两部分融合 intein 的 BDD-FVIII 蛋白分泌后仍能进行剪接反应形成功能性 BDD-FVIII 蛋白^[5]。由于反式剪接发生于分子间, 剪接的效率仍不完全, 可观察到未被剪接的前体蛋白。本文利用 vWF 对 FVIII 的稳定作用, 同时进行 vWF 基因共转移, 表明可明显提高细胞分泌至培养上清液中蛋白质剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白量及其生物活性。vWF 分子的 D'和 D3 结构域含有与 FVIII 进行非共价结合的区域, 通

过结合达到稳定 FVIII 活性的作用^[17]。FVIII 虽然与凝血系统中的 V 因子 (FV) 具有相似的结构域组成 (A1-A2-B-A3-C1-C2), 而且两者的 A 和 C 结构域的氨基酸有 40% 的同源性, 但前者的分泌效率明显低于后者^[18], 研究表明 FVIII 在加工、分泌过程中与内质网腔中的蛋白质分子伴侣 BiP 相结合影响其分泌^[19], 而 BiP 的表达受内质网中未折叠的蛋白或未组装的蛋白亚单位的诱导^[20]。研究证明 FVIII 基因的表达也可诱导 BiP 的表达, 从而抑制 FVIII 的分泌^[21]。有人通过 vWF 基因与 FVIII 基因共转染哺乳动物细胞, 显示 vWF 可促进 FVIII 的分泌活性^[22]。需要指出的是, intein 的剪接效率受剪接位点处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到 61%^[23], 而且由于蛋白质剪接的非细胞机制依赖性, 在真核细胞中该断裂点也被证明具有较高的剪接效率^[5]。本研究证明 vWF 亦可以促进蛋白质剪接的 BDD-FVIII 的分泌和活性, 为基于 intein 的蛋白质剪接功能的双 AAV 载体转运 BDD-FVIII 基因, 利用 vWF 提高血浆中的 BDD-FVIII 浓度和活性, 进一步动物实验改善甲型血友病基因治疗效果奠定了基础。

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] Wu H, Hu Z, Liu XQ. Protein *trans*-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:9226-9231.
- [2] Wu H, Xu MQ, Liu XQ. Protein *trans*-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387:422-432.
- [3] Gimble FS. Putting protein splicing to work [J]. *Chem Biol*, 1998, 5: R251-R256.
- [4] Cheriyan M, Perler FB. Protein splicing: a versatile tool for drug discovery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61:899-907.
- [5] 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.
- [6] Zhu FX, Liu ZL, Qu HG, et al. Post-translational ligation and function of dual-vector transferred split CFTR gene [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 60-65.
- [7] De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willebrand factor to the rescue [J]. *Blood*, 2009, 113: 5049-5057.

- [8] De Meyer SF, De Maeyer B, Deckmyn H, et al. Von Willebrand factor: drug and drug target [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2009, 9: 9–20.
- [9] Lankhof H, van Hoeij M, Schiphorst ME, et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III [J]. Thromb Haemost, 1996, 75: 950–958.
- [10] Haberichter SL, Merricks EP, Fahs SA, et al. Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells [J]. Blood, 2005, 105: 145–152.
- [11] 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.
- [12] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using anAAV 8 serotype [J]. Blood, 2004, 103: 1253–1260.
- [13] Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy [J]. Semin Thromb Hemost, 2004, 30: 239–247.
- [14] Mah C, Sarkar R, Zolotukhin I, et al. Dual vectors expressing murine factor VIII result in sustained correction of hemophilia A mice [J]. Hum Gene Ther, 2003, 14: 143–152.
- [15] Lai Y, Yue Y, Liu M, et al. Efficient *in vivo* gene expression by *trans*-splicing adeno-associated viral vectors [J]. Nat Biotech, 2005, 23: 1435–1439.
- [16] 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.
- [17] Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells [J]. J Biol Chem, 1986, 263: 6352–6362.
- [18] 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.
- [19] Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells [J]. EMBO J, 1992, 4: 1563–1571.
- [20] Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, et al. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins [J]. Nature, 1988, 332: 462–464.
- [21] Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 20602–20607.
- [22] Chen C, Fang XD, Zhu J, et al. The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines [J]. Thromb Res, 1999, 95: 105–115.
- [23] 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.