

研究论文

内含肽介导 F309SfVIII 的连接和重链分泌的增强

朱甫祥*, 刘泽隆, 屈慧鸽, 迟晓艳

鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

摘要: 凝血因子 VIII (coagulation factor VIII, fVIII) 是一种分泌性血浆蛋白, 在凝血级联反应中发挥重要作用, 由 fVIII 缺陷导致的甲型血友病是一种最常见的 X- 连锁隐性遗传性出血性疾病, 基因治疗被认为是该病的理想治疗模式, 但在运用最有希望的腺辅助病毒(adeno-associated virus, AAV)载体转 *fVIII* 基因时受到 AAV 的容量限制。本文旨在利用内含肽(intein)的蛋白质反式剪接, 研究双载体真核细胞转具有促分泌作用的 F309S 突变体全长 *fVIII* (F309SfVIII) 基因。内含肽是一种包埋在蛋白质前体中的多肽序列, 其在蛋白质成熟过程中通过蛋白质剪接作用被切除。将 F309SfVIII 的 cDNA 于 B 结构域的 Ser¹²³⁹ 密码子前断裂为重链(heavy chain, HC)和轻链(light chain, LC)两部分, 分别与 *Ssp* DnaB intein 编码序列融合, 插入到 pcDNA3.1, 构建一对质粒表达载体。共转染或分别单独转染 293 细胞, 48 h 后用 Western blot 观察细胞内转基因的表达和 F309SfVIII 的剪接, 用 ELISA 检测培养上清中分泌的 F309SfVIII 蛋白量以及 HC 含量, 用 Coatest 法检测培养上清的 fVIII 生物活性。结果显示, 共转染细胞有明显的完整 F309SfVIII 蛋白条带形成, 细胞培养上清中的 F309SfVIII 蛋白浓度为 (71±9) ng/mL, 所产生的 fVIII 生物活性为 (0.38±0.09) IU/mL, 从单独转染后合并培养的细胞上清仍可检测到 F309SfVIII 蛋白和 fVIII 生物活性, 分别为 (25±6) ng/mL 和 (0.12±0.05) IU/mL, 说明上清中的 F309SfVIII 蛋白由分泌前、后剪接两部分共同形成。共转染细胞培养液上清中的 HC 含量明显高于单独转染融合内含肽和 HC 的细胞培养液上清 [(135±10) ng/mL vs (37±7) ng/mL, $P<0.01$]。以上结果提示内含肽可作为一种技术手段用于双载体系统真核细胞 F309SfVIII 基因转移, 并可改善 F309SfVIII 的分泌, 为体内甲型血友病基因治疗研究中应用 AAV 载体、克服其容量限制转 F309SfVIII 基因提供了一种解决方案。

关键词: 凝血因子 VIII; 分泌; 内含肽; 蛋白质反式剪接**中图分类号:** Q5, Q78

Intein-mediated F309SfVIII ligation with enhanced secretion of its heavy chain

ZHU Fu-Xiang*, LIU Ze-Long, QU Hui-Ge, CHI Xiao-Yan

Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China

Abstract: Coagulation factor VIII (fVIII) is a secretion protein and plays a crucial role in the coagulation cascade. Hemophilia A resulted from deficiency of fVIII is the most common X-linked recessive bleeding disorder. Gene therapy is recognized as an attractive strategy for the eventual cure of this disease. However, the gene therapy is hampered by the big size of *fVIII* gene when using the most promising gene vectors, adeno-associated virus (AAV) vectors. In this study we explored the intein-mediated protein *trans*-splicing to deliver a Phe³⁰⁹→Ser mutant full-length *fVIII* (F309SfVIII) gene by using a dual-vector system. An intein is a protein sequence embedded within a precursor protein and can excise itself through protein splicing. The F309SfVIII is proven to be beneficial to its secretion. The F309SfVIII gene was broken into heavy and light chains before Ser¹²³⁹ in B domain and fused with the coding sequences of *Ssp* DnaB intein respectively to construct a pair of plasmid vectors by inserting them into the pcDNA3.1 vectors. Forty-eight hours after co- or separate transfection of 293 cells, the co-transfected cell lysate showed an obvious ligated F309SfVIII protein band by Western blot with a polyclonal antibody against fVIII. The amounts of secreted F309SfVIII protein in culture supernatants and their bioactivities were (71±9) ng/mL and (0.38±0.09) IU/mL determined by ELISA and Coatest assay respectively. The supernatant from combined cells

Received 2009-08-17 Accepted 2009-10-20

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. Y2005D14), Science and Technology Program of Yantai municipality (No. 2008152), the Scientific Research Foundation of Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars, and the Discipline Construction Funds of Ludong University.

*Corresponding author. Tel: +86-535-6693825; E-mail: fuxiangmail@163.com

with separate transfections also displayed lower levels of F309SfVIII antigen and fVIII activity [(25±6) ng/mL and (0.12±0.05) IU/mL], indicating the F309SfVIII could be formed by splicing both before and after secretion. The content of F309SfVIII heavy chain protein from co-transfected cell supernatant was higher than that of intein-fused heavy chain transfection alone [(135±10) ng/mL vs (37±7) ng/mL, $P<0.01$]. These data demonstrated that intein could be used as a technical strategy in a dual-vector system delivering F309SfVIII gene with improved secretion of fVIII providing an alternative approach to circumvent the packaging limitation of AAV for F309SfVIII gene transfer, which encourages our continuing study in hemophilia A gene therapy *in vivo*.

Key words: coagulation factor VIII; secretion; intein; protein trans-splicing

凝血因子 VIII (coagulation factor VIII, fVIII) 是存在于血浆中的一种分子量较大的糖蛋白, 为凝血系统的一种重要的辅因子, 其基因突变引起的 fVIII 蛋白功能缺陷导致 X-连锁隐性的甲型血友病, 目前对于该病的治疗主要依靠血浆源性 fVIII 浓缩物和/或基因重组 fVIII 蛋白替代疗法。由于该病属于单基因缺陷性疾病, 所以体细胞基因治疗被认为是甲型血友病的理想途径^[1]。在已开发的基因运载体系统中, 腺辅助病毒(adeno-associated virus, AAV)载体由于无致病性、可感染非分裂期细胞等优点在基因治疗研究中被广泛应用。但是 AAV 载体的容量上限为 4.7 kb, fVIII 基因的 cDNA 长达 7 kb, 超过了 AAV 载体的容量上限, 即使是去掉大部分 B 结构域的缩减型功能性 fVIII, 即 BDD-fVIII (B-domain deleted fVIII), 大小为 4.5 kb, 加上基因表达的调控序列, 其仍然难以 AAV 载体承载。目前解决 AAV 容量限制的转 fVIII 基因策略主要包括使用小的启动子/增强子的单个 AAV 载体^[2,3]和采用细胞机制依赖性重、轻链异源二聚体功能蛋白形成的双 AAV 载体分别转移 fVIII 基因^[4,5], 前者的缺点在于表达水平较低, 后者由于重链分泌的效率明显低于轻链, 造成细胞内质网中重链的积聚, 影响细胞的稳定, 甚至可诱导细胞凋亡^[6], 而且非自然加工形成二聚体的效率较低。

内含肽(intein)的蛋白质反式剪接作用为双载体系统的 fVIII 基因转移提供了一种技术策略。内含肽是一种包埋于前体蛋白中的多肽序列, 主要发现于原核生物和单细胞真核生物的某些宿主蛋白, 翻译后通过剪接反应切除自身的同时使两侧的宿主蛋白(N-extein, C-extein)以肽键连接, 形成成熟的、具有生物学活性的蛋白^[7]。蛋白质剪接分为顺式(*cis*)和反式(*trans*)两种, 分别由连续的内含肽和断裂的内含肽介导。内含肽分子间的同源性较低, 剪接反应涉及剪接部位保守氨基酸, 不依赖细胞机制, 也不需要消耗能量^[8]。鉴于对 fVIII 表达、加工和分泌过

程的复杂性和分泌低效分子机制的认识, 本文选用具有明显促进 fVIII 分泌作用的 Phe³⁰⁹→Ser 突变体全长 fVIII (F309SfVIII) 基因^[9], 于其分子中间的 B 结构域满足剪接反应的保守性氨基酸残基 Ser¹²³⁹ 密码子前断裂成重链(HC)和轻链(LC)两部分, 分别与被证明可有效进行蛋白质反式剪接的 Ssp DnaB intein 的 N 端(In)和 C 端(Ic)基因融合, 构建一对真核表达质粒载体, 共转染 293 细胞, 观察细胞内 F309SfVIII 的剪接, 检测培养上清中 F309SfVIII 的生物学活性, 而且还观察了不依赖细胞的 F309SfVIII 剪接产生的 fVIII 活性, 以及内含肽的剪接作用是否可有效促进 F309SfVIII HC 的分泌。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和细胞 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。pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。大肠杆菌菌株 DH5α 为本室保存, 293 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 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, 高保真 Pfu Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、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 重链单克隆抗体 ESH5、HRP-ESH5 和 HRP-ESH8 购自 American Diagnostica 公司, 另一种人 fVIII 重链单克隆抗体 GMA-012 为 Green Mountain 公司产品, 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 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。其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 真核重组表达质粒的构建 以质粒pXX-FVIII为模板, 用高保真 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶、引物 P1 和 P2 扩增 fVIII 编码 cDNA, 经 *Nhe* I/*Xho* I 酶切后连接到经 *Nhe* I/*Xho* I 酶切线性化的 pcDNA3.1 载体, 得到以 CMV 启动子/增强子驱动的质粒 pCMV-fVIII。以 pCMV-fVIII 为模板, 引物 P3 和 P4 进行反向 PCR, 将扩增产物进行自连接, 得到引入 F309S 点突变的含全长 fVIII 编码 cDNA 序列的质粒 pCMV-F309SfVIII。

为满足剪接所需的保守性氨基酸组成的要求, 选择于 B 结构域的 Gly¹²³⁸-Ser¹²³⁹ 间将 fVIII 断裂成 HC 和 LC, 该位点的 Ser 和其前的 Gly 与 *Ssp* DnaB intein 的天然宿主蛋白连接处相同。以质粒 pCMV-F309SfVIII 为模板, 用引物 P5、P6 扩增 fVIII 的 HC (含信号肽共 1 257 个氨基酸) 的编码序列, 以 pMST 为模板, 用引物 P7、P8 扩增 *Ssp* DnaB intein 的 N 端 106 个氨基酸(In)的编码序列, 分别用 *Nhe* I/*Avr* II 和 *Avr* II/*Xba* I 酶切上述 PCR 扩增获得的 HC 和 In, 连接到 *Nhe* I/*Xba* I 酶切的线性化 pcDNA3.1(+)载体, 得到 fVIII 的 HC 和 In 的融合表达载体 pCMV-HIn。合成一对互补的 fVIII 信号肽编码序列的寡核苷酸 P9 和 P10,

用 P11 和 P12 引物自 pMST 扩增 *Ssp* DnaB intein 的 C 端 48 个氨基酸(Ic)的编码序列, 用 P13 和 P14 引物对从质粒 pCMV-F309SfVIII 扩增 fVIII 的 LC (共 1 094 个氨基酸)的编码序列, 分别用 *Nhe* I/*Xho* I 和 *Xho* I/*Not* I 酶切 PCR 扩增产物 Ic 和 LC, 与 P9、P10 退火后的互补双链及 *Nhe* I/ *Not* I 双酶切的 pcDNA3.1(+)载体连接, 得到 fVIII 信号肽、Ic 及 fVIII 的 LC 融合表达载体 pCMV-IcL。酶切及测序鉴定所构建的质粒。所用引物及序列见表 1, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 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 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-HIn 和 pCMV-IcL 按 1:1 比率各 4 μg 混合稀释于 250 μg 的 Opti-MEM 培养液, 与室温放置 5 min 的含 20 μg 脂质体的 250 μg 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 4 μg 的 pCMV-HIn 和 pCMV-IcL 质粒分别转染 293 细胞, 用 4 μg 的 pCMV-F309SfVIII 作为阳性对照和 pcDNA3.1 空白质粒作为阴性对照(Mock)转染 293 细胞。培养箱内温育 5 h 后换以 2 mL 的新鲜 Opti-MEM 培养液, 继续

表 1. 构建载体所用寡核苷酸引物及序列
Table 1. Primers and sequences used in vector construction

Primer	Sequences	Cutting site
P1	5'-CTAGCTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACC-3'	<i>Nhe</i> I
P2	5'-CCGCTCGAGTCAGTAGAGGTCCTGTGCC-3'	<i>Xho</i> I
P3	5'-CTTGTCATATCTCTTCCCACCA-3'	
P4	5'-ACAGTAGAAACTGTCCAAGGT-3'	
P5	5'-CTAGCTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACC-3'	<i>Nhe</i> I
P6	5'-CTAGCCTAGGACATTTTGCCTAGTGCTCAGT-3'	<i>Avr</i> II
P7	5'-CTAGCCTAGGTTGCATCAGTGGAGATAG-3'	<i>Avr</i> II
P8	5'-CTAGTCTAGATCACAATTGTAAAGAGGAGCTTTCT-3'	<i>Xba</i> I
P9	5'-AGCTTGTCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTC TGTGCCTTTTGCATTCTGCTTTT-3'	<i>Hind</i> III
P10	5'-CTAGAAAAGCAGAATCGCAAAGGCACAGAAAGAA GCAGGTGGAGAGCTCTATTTGCATGACA-3'	<i>Nhe</i> I
P11	5'-CTAGCTAGCCCAGAAATAGAAAAGTTGTCTC-3'	<i>Nhe</i> I
P12	5'-CCGCTCGAGTTATGGACAATGATGTCATTG-3'	<i>Xho</i> I
P13	5'-CCGCTCGAGTGACGGGCATATGCTCCA-3'	<i>Xho</i> I
P14	5'-ATAAGAATCGGCGCTCAGTAGAGGTCCTGTGCC-3'	<i>Not</i> I

培养 48 h, 收集培养上清及细胞。为了观察分泌后培养上清的蛋白质剪接, 将分别转染 pCMV-HIn 和 pCMV-IcL 的细胞于转染后 24 h, 吹打悬浮、合并后转移至新培养板, 继续培养 24 h 后, 收集上清。

1.5 Western blot 观察细胞内的蛋白质剪接

将胰蛋白酶消化收集的细胞, 液氮 3 min, 37 °C 3 min 反复冻融 3 次, 提取细胞总蛋白。用 Bradford 法进行蛋白定量, 取 12 µg 总蛋白上样进行还原性 SDS-PAGE, 半干电转法将蛋白印迹至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 用 1:500 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。设置 β -actin 为内参照, 用 1:1 000 稀释的小鼠抗 β -actin 抗体进行检测。

1.6 细胞培养上清中剪接的 fVIII 蛋白浓度及其产生的生物活性检测

参照文献^[10]用双夹心 ELISA 检测上清中的全长 fVIII 蛋白量, 将以 2 µg/mL 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 200 µL 封闭液(PBS + 1% BSA + 0.05% Tween 20), 37 °C 温育 2 h, 洗板 3 次后, 将收集的培养上清和用 Opti-MEM 培养液稀释的标准品 fVIII (浓度范围为 300~10 ng/mL), 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 100 µL 浓度为 2 µg/mL 的 HRP 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 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板。以系列稀释的标准品的浓度和吸光值绘制标准工作曲线, 根据测得的上清样品的吸光值从标准曲线读取 F309SfVIII 浓度。

按照我们以前建立的重链特异性 ELISA 检测培养上清的重链蛋白量^[11]。用浓度为 2 µg/mL 的重链单克隆抗体 GMA-012 包被酶标板, 按上述方法洗板、封闭后, 按每孔 100 µL 加上清样品或标准品 fVIII, 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, 37 °C 温育 1 h, 洗板后每孔加入 100 µL 浓度为 2 µg/mL 的 HRP 标记重链单克隆抗体 (HRP-ESH5), 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 的 H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板。

参照文献^[12]用 Coatest 发色分析法检测上清中由

F309SfVIII 蛋白产生的 fVIII 生物活性。用 Coatest 发色分析试剂盒, 按照试剂盒说明书操作分析上清的 fVIII 生物活性。以正常人参比血浆(fVIII 活性为 1.0 IU/mL), 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 处读取吸光值, 以稀释百分比为横坐标、405 nm 吸光值为纵坐标分别绘制低量程和高量程标准曲线, 由培养上清样品测得的吸光值从标准曲线读出相应的百分比值, 以 100% 为 1.0 IU/mL 换算为上清的 fVIII 生物活性。

1.7 数据处理及统计分析 实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, 用 *t* 检验进行差异显著性检验, *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 断裂 F309SfVIII 基因与内含肽融合真核表达载体的构建

内含肽剪接反应除了其本身剪接位点的保守性氨基酸参与, 还有赖于下游剪接位点的宿主蛋白的保守性氨基酸残基, 即 Ser、Cys 或 Thr, 选择与 *Ssp* DnaB intein 天然宿主蛋白相同的 Ser¹²³⁹ 密码子前将 F309SfVIII cDNA 断裂成重链和轻链两部分。分别与 *Ssp* DnaB intein 的 *In* 和 *Ic* 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 F309SfVIII 的两段基因的表达质粒 pCMV-HIn 和 pCMV-IcL (图 1)。对构建的载体经酶切电泳进行鉴定并通过 DNA 测序确认。

2.2 细胞内蛋白质剪接的 Western blot 结果

细胞总蛋白 Western blot 结果显示 (图 2), 转染 F309SfVIII 的阳性对照的 293 细胞可见明显的预期分子量大小的 F309SfVIII 蛋白条带 (267 kDa), Mock 转染细胞未见 F309SfVIII 蛋白条带, 共转染 HIn 和 IcL 的 293 细胞可见一明显的与阳性对照同样大小的剪接形成的 F309SfVIII 蛋白条带, 显示较高的剪接效率, 同时尚可见未完全剪接的两部分内含肽融合蛋白前体 (HIn 和 IcL)。内参照 β -actin 条带比较均匀, 说明蛋白上样量无明显差异。

2.3 细胞培养上清中剪接形成的 F309SfVIII 和重链蛋白浓度

用 ELISA 检测的培养上清中的全长 F309SfVIII 蛋白含量结果如图 3 所示, Mock 转染、HIn 或 IcL 转染细胞上清均未检测到 F309SfVIII 蛋白。HIn 和 IcL 共转染 293 细胞上清的 F309SfVIII 蛋白浓度为

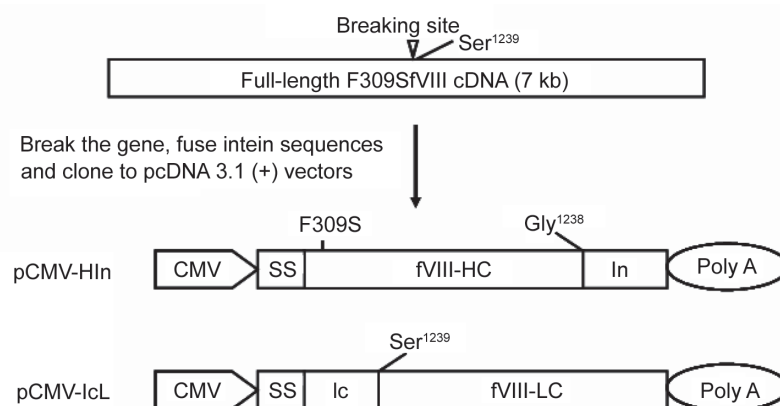


图 1. 断裂 *F309SfVIII* 基因与内含肽融合重组基因结构示意图

Fig. 1. Schematic representation of recombinant plasmid constructs with intein-fused split *F309SfVIII* genes. The full-length *F309SfVIII* gene is broken before Ser¹²³⁹ into heavy (HC) and light chains (LC) and fused with N-part (In) and C-part (Ic) of *Ssp* DnaB intein respectively. For secretion requires a signal sequence (SS) of *F309SfVIII* preceding, the SS is added. 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 tail.

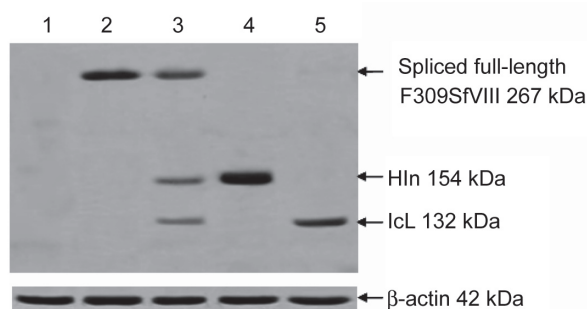


图 2. 细胞内转基因的表达和 *F309SfVIII* 的剪接(Western 印迹)
Fig. 2. Observation of expressions of transgenes and *trans*-splicing of *F309SfVIII* in 293 cells by Western blotting. Lane 1: Mock transfection; lane 2: *F309SfVIII* transfection; lane 3: *HIn* and *IcL* co-transfection; lane 4: *HIn* transfection; lane 5: *IcL* transfection. *HIn*: non-spliced intein-fused heavy chain; *IcL*: non-spliced intein-fused light chain.

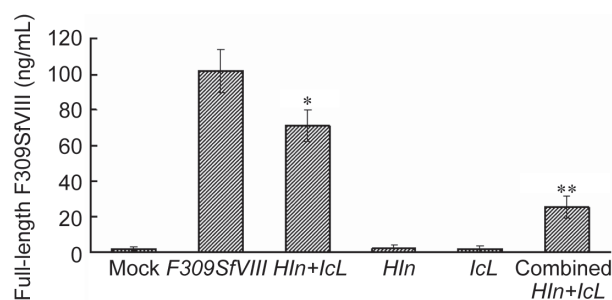


图 3. ELISA 定量分析分泌至培养上清的 *F309SfVIII* 蛋白
Fig. 3. Quantitative analysis of secreted *F309SfVIII* antigen in supernatants by ELISA. The data are represented as the mean $\pm$ SD. $n=3$ in each group, * $P<0.05$ vs *F309SfVIII* transfection, ** $P<0.01$ vs *HIn+IcL* co-transfection and *F309SfVIII* transfection.

(71 $\pm$ 9) ng/mL, 低于阳性对照的 *F309SfVIII* 转染组 (102 $\pm$ 12) ng/mL ($P<0.05$)。分别转染 *HIn* 和 *IcL* 的 293 细胞合并培养后的培养液上清可检测到 *F309SfVIII* 蛋白浓度为 (25 $\pm$ 6) ng/mL, 提示分泌出胞后 *HIn* 和 *IcL* 仍可进行剪接反应生成 *F309SfVIII*, 说明共转染细胞的培养液上清的 *F309SfVIII* 由分泌前和分泌后剪接共同产生。

用两种 *fVIII* 的重链特异性单克隆抗体进行 ELISA 检测的细胞上清中 *F309SfVIII* 重链蛋白含量结果如图 4 所示, *HIn* 和 *IcL* 共转染细胞上清的重链蛋白浓度为 (135 $\pm$ 10) ng/mL, 由剪接后形成全长 *F309SfVIII* 和未剪接的 *HIn* 两部分组成, 高于 *F309SfVIII* 转染的阳性对照 (106 ng/mL $\pm$ 18 ng/mL) ($P<0.05$)。

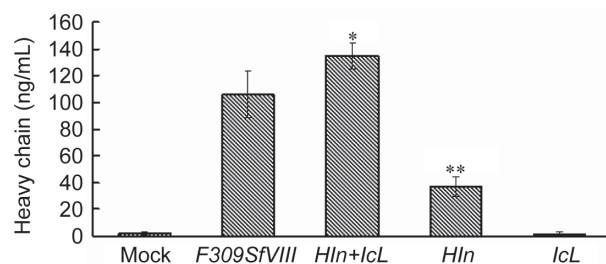


图 4. ELISA 定量分析分泌至培养液上清的 *F309SfVIII* 重链蛋白

Fig. 4. Quantitative analysis of secreted heavy chain antigen of *F309SfVIII* in supernatants by ELISA. The data are represented as the mean $\pm$ SD. $n=3$ in each group, * $P<0.05$ vs *F309SfVIII* transfection, ** $P<0.01$ vs *HIn+IcL* co-transfection and *F309SfVIII* transfection.

HIn 单独转染细胞分泌至上清的重链蛋白含量为 (37 ± 7) ng/mL, 明显低于 *F309SfVIII* 转染、*HIn* 和 *IcL* 共转染细胞 ($P < 0.01$), 提示重链蛋白分泌功能低下。从 *F309SfVIII* 转染细胞培养上清重链蛋白量低于 *HIn* 和 *IcL* 共转染结果, 说明重链本身的分泌不足影响全长 *F309SfVIII* 蛋白的分泌, 轻链蛋白具有显著的顺式促进重链蛋白分泌的作用。

2.4 分泌至细胞上清的 F309SfVIII 生物活性

Coatest 发色分析结果如图 5 所示, Mock 转染、*HIn* 和 *IcL* 分别转染的细胞上清未检测到 F309SfVIII 生物活性。*F309SfVIII* 转染细胞上清的活性为 (0.56 ± 0.12) IU/mL, 高于 *HIn* 和 *IcL* 共转染细胞上清 $(0.38 \text{ IU/mL} \pm 0.09 \text{ IU/mL})$, *HIn* 和 *IcL* 转染细胞合并培养后的上清检测到一定量的 F309SfVIII 活性 $(0.12 \text{ IU/mL} \pm 0.05 \text{ IU/mL})$, 与图 3 的结果一致, 进一步提示 *HIn* 和 *IcL* 分泌后仍可进行剪接反应, 说明内含肽具有非细胞依赖性蛋白质剪接功能。

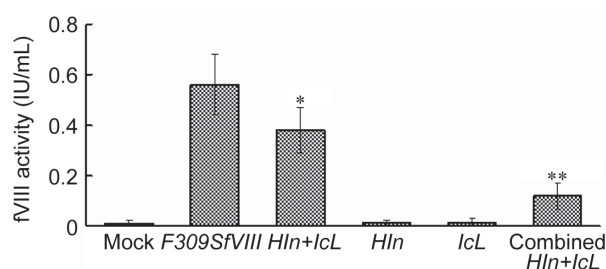


图 5. 细胞培养上清的 F309SfVIII 生物活性 (Coatest 发色分析)

Fig. 5. Biological activity of F309SfVIII in supernatants by chromogenic assay. The data are represented as the mean $\pm$ SD. $n=3$ in each group, * $P < 0.05$ vs F309SfVIII transfection, ** $P < 0.01$ vs HIn + IcL co-transfection and F309SfVIII transfection.

3 讨论

fVIII 作为凝血系统的一种辅助因子, 在生理止血过程中辅助 IX 因子对 X 因子的激活, 从而引起一系列的凝血因子级联活化反应, 导致纤维蛋白形成, 产生凝血块。由 fVIII 缺陷引起的甲型血友病占血友病患者总数的 80%, 目前血浆浓缩物和重组 fVIII 蛋白替代疗法虽有肯定疗效, 但由于需反复给药, 由此带来的高费用、潜在的血源性传染病播散风险以及产生针对 fVIII 的特异性抗体等, 限制了该疗法的广泛应用^[13]。基于正常基因替补的基因疗

法为该病的治疗带来了新的希望。对于 fVIII 基因及蛋白的深入研究揭示, 一方面, 作为一种分泌入血后发挥作用的蛋白, fVIII 虽然与凝血系统中的另一辅助因子——V 因子具有相似的结构域组成 (A1-A2-B-A3-C1-C2) 以及二者的 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^[14]; 另一方面, 较大的 fVIII 基因难以作为基因治疗的优势载体 AAV 所承载。目前甲型血友病基因治疗研究所采用的大都是缩减型 BDD-fVIII 基因、利用小的基因调控序列单个 AAV 载体转基因^[2,3]或双 AAV 载体转 BDD-fVIII 基因^[4,5], 但存在表达效率低、对细胞机制的依赖和 / 或重、轻链分泌的不均衡造成的细胞不稳定性等缺点。本文用内含肽具有的精确性蛋白质剪接作用, 运用双载体转运具有促分泌作用的突变体功能性全长 F309SfVIII 基因, 通过细胞总蛋白分析和细胞上清剪接蛋白量和生物活性的分析结果表明, 内含肽可有效实现双载体对 F309SfVIII 基因的转移, 而且内含肽介导的 F309SfVIII 剪接可明显促进重链蛋白的分泌, 对于重链、轻链蛋白分泌不均衡所带来的细胞内重链蛋白累积对细胞稳定性的不利影响, 起到一个较好的缓解作用。我们最近运用内含肽技术的哺乳动物细胞转 BDD-fVIII 基因还证明, 轻链具有明显地顺式促进重链及全长 BDD-fVIII 蛋白的分泌作用^[11]。最近我们还运用内含肽的蛋白质反式剪接功能在大肠杆菌中证明可有效介导氯离子通道蛋白 CFTR 的反式剪接, 为利用双载体真核细胞转 CFTR 基因研究奠定了基础^[15]。另外, 从分别转染内含肽融合的重链和轻链基因细胞混合后, 仍然可检测到细胞上清中剪接产生 fVIII 生物活性, 说明剪接反应的非细胞依赖性, 相对于基于细胞加工形成异源二聚体功能性 fVIII 蛋白的双载体 fVIII 基因转移对于细胞共转染的要求, 是一个明显的优点, 有研究表明, 在 GFP 和 YFP 基因共转染的试验中, 两种基因共转染的细胞约只占阳性转染细胞的 50%^[5]。

本研究采用的内含肽技术的双载体转基因系统, 不仅为进一步双 AAV 载体转运全长 F309SfVIII 基因的甲型血友病动物模型基因治疗研究奠定了基础, 而且可为其它大基因缺陷性疾病的治疗研究提供借鉴。由于两个载体都有充分的空间, 为选用旨在提高基因表达水平和 / 或组织特异性基因表达的调控序列提供了条件。

* * *

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。

参考文献

- Dooriss KL, Denning G, Gangadharan B, Javazon EH, McCarty DA, Spencer HT, Doering CB. Comparison of factor VIII transgenes bioengineered for improved expression in gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther* 2009; 20(5): 465-478.
- Sarkar R, Xiao W, Kazazian HH Jr. A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 220-226.
- Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, Niimura M, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Mizukami H, Okada T, Naka H, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res* 2006; 118: 627-635.
- Scallan CD, Liu, T, Parker AE, Patarroyo-White SL, Chen H, Jiang H, Vargas J, Nagy D, Powell SK, Wright JF, Sarkar R, Kazazian HH, McClelland A, Couto LB. Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood* 2003; 102: 3919-3926.
- Mah C, Sarkar R, Zolotukhin I, Schleissing M, Xiao X, Kazazian HH, Byrne BJ. Dual vectors expressing murine factor VIII result in sustained correction of hemophilia A mice. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 143-152.
- Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006; 124: 587-599.
- Saleh L, Perler FB. Protein splicing in *cis* and in *trans*. *Chem Rec* 2006; 6(4): 183-193.
- Xu MQ, Perler FB. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J* 1996; 15(19): 5146-5153.
- Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 1997; 272: 24121-24124.
- Gnatenko DV, Saenko EL, Jesty J, Cao LX, Hearing P, Bahou WF. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy. *Br J Haematol* 1999; 104: 27-36.
- Chen LX, Zhu FX, Li J, Lu H, Jiang HY, Sarkar R, Arruda VR, Wang JH, Zhao J, Pierce GF, Ding QL, Wang XF, Wang HL, Pipe SW, Liu XQ, Xiao X, Camire RM, Xiao WD. The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther* 2007; 15(10): 1856-1862.
- Sarkar R, Tetreault R, Gao G, Wang L, Bell P, Chandler R, Wilson JM, Kazazian HH Jr. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood* 2004; 103: 1253-1260.
- Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(2): 239-247.
- Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 1988; 71(3): 539-555.
- Zhu FX (朱甫祥), Liu ZL, Qu HG, Xin XL, Dong HX, Liu XQ. Intein-mediated *trans*-splicing of chloride ion channel CFTR. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报) 2009; 25(9): 844-848 (Chinese, English abstract).