

内含肽介导三段 vWF 基因真核细胞转移的翻译后连接及其功能性多聚体形成*

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, 烟台 264025)

摘要 vWF(von Willebrand factor)是一种超大分子质量的血浆多聚体糖蛋白, 在血栓形成和生理凝血过程中发挥重要作用, 其质和/或量的缺陷导致血管性血友病(VWD), 由于 VWD 为单基因病, 且 vWF 为分泌性蛋白, 基于基因转移的基因治疗无需特异的靶器官, 因此 VWD 特别适合于基因治疗, 但 vWF 基因过大(8.4 kb), 难以为多数病毒载体特别是优点较多的腺相关病毒(AAV)载体承载. 运用内含肽(intein)的蛋白质反式剪接功能, 研究了三重载体真核细胞共转断裂 3 段的 vWF 基因, 以期通过转基因翻译后的蛋白质剪接作用形成完整的功能性 vWF 蛋白. 将 vWF 的 cDNA 于满足剪接所需的保守性氨基酸 Cys¹⁰⁹⁹、Ser²⁰⁰⁴ 的密码子前断裂为 3 段, 分别与 2 种不同的内含肽即 *Ssp* DnaE 内含肽和 *Ssp* DnaB 内含肽编码序列融合, 构建到真核表达载体 pcDNA3.1(+), 得到 3 个分别融合内含肽的 vWF 片段基因真核表达载体, 共转染培养的 293 细胞, 通过瞬时表达, 电泳观察培养上清中的 vWF 多聚体形态, 分析 vWF 蛋白量和凝血 VIII 因子(FVIII)结合力; 通过共转 FVIII 基因, 分析了培养上清中的 FVIII 蛋白量及生物活性. 结果显示, 通过内含肽的蛋白质反式剪接作用, 共转内含肽融合的三片段 vWF 基因细胞上清, 表现与正常人血浆和转 vWF 基因阳性对照细胞相似的 vWF 多聚体模式和 FVIII 结合力, 而且可明显提高转 FVIII 基因后表达的 FVIII 蛋白的分泌量和活性, 提示剪接 vWF 蛋白的 FVIII 载体功能的恢复. 结果表明, 内含肽可作为一种有效的技术手段进行三重载体共转断裂的 vWF 基因, 为进一步基于内含肽的三重 AAV 转断裂 vWF 基因应用于 VWD 基因治疗研究、克服 AAV 的容量限制提供了依据.

关键词 内含肽, 蛋白质反式剪接, von Willebrand 因子, 转基因, 多聚体化, FVIII 载体

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00399

von Willebrand 因子(vWF)是一种血浆黏附糖蛋白, 以超分子质量多聚体形式存在, 通过介导血小板黏附于受损血管和作为血浆中凝血 VIII 因子(FVIII)的载体参与起始血栓形成和凝血过程^[1]. 该因子具有多结构域的分子形式, 即 D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK, 主要由巨核细胞和内皮细胞合成, 前者合成的 vWF 储存于血小板的 α 颗粒, 受调节释放. 后者合成的 vWF 一部分释放入血和内皮下基质, 一部分储存于 Weibel-palade 小体^[2]. vWF 的异常导致人类多种形式且最为常见的遗传性出血性疾病, 即血管性血友病(von Willebrand disease, VWD)^[3]. 目前对于该病的治疗主要是通过促进内皮细胞从 Weibel-palade 小体释放内源性 vWF 或血浆源性 vWF 浓缩物补充、替代缺陷或异常功能的 vWF. 由于 VWD 为单基因缺陷性遗传病, 且 vWF 为分泌性蛋白, 不需要特异的

靶器官和靶组织, 特别适合于体细胞基因治疗. 但 vWF 的 cDNA 较大(8.4 kb), 难以为病毒载体特别是基因治疗中颇受青睐的腺相关病毒(AAV)载体所承载, 甚至难以为两个 AAV 载体携带, 是运用 AAV 载体的 VWD 基因治疗的限制因素. 内含肽(intein)的蛋白质反式剪接功能为克服病毒载体的容量限制提供了一种策略. 内含肽是包埋于蛋白质前体中的多肽序列, 在蛋白质成熟过程中通过自催化作用被切除, 同时伴随两侧宿主蛋白质以肽键相连

* 山东省自然科学基金(ZR2010CM061), 烟台市科技发展计划(2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金(20071108)和鲁东大学学科建设经费资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

收稿日期: 2010-08-03, 接受日期: 2010-09-14

成具有生物学功能的成熟蛋白质^[4]。已发现的内含肽分子间同源性较低,但在剪接部位存在保守的氨基酸,即N端的Cys或Ser、C端的Asn以及与之相连的宿主蛋白的第一个残基Cys、Ser或Thr,通过保守氨基酸之间的不需要细胞机制参与和能量消耗的分子内反应完成剪接,与RNA剪接发生于转录后水平相比,蛋白质剪接发生于翻译后水平。相对于发生于分子内的顺式剪接,断裂的内含肽亦可进行分子间的反式剪接,*Ssp* DnaE内含肽是第一个发现的天然存在的反式剪接内含肽^[5]。我们最近利用一种人工断裂的*Ssp* DnaB内含肽的蛋白质剪接功能,在培养的哺乳动物细胞中证明,分别表达的凝血VIII因子(FVIII)重、轻链可有效剪接形成共价连接的功能性FVIII蛋白^[6]。另有人用该内含肽实现了Duchenne肌营养不良蛋白(DMD)在模型小鼠中的剪接和功能恢复^[7]。

考虑到8.4 kb长的vWF基因难以为2个AAV载体携带,为了探讨利用蛋白质剪接技术的三载体真核细胞转vWF基因,本文在我们以前进行的原核三片段vWF剪接实验基础上^[8],将截成3段的vWF的基因分别与*Ssp* DnaE内含肽和*Ssp* DnaB内含肽融合,构建3个真核表达载体,体外培养的293细胞共转基因,观察了培养上清中vWF多聚体的形成和作为FVIII载体功能的恢复情况,为进一步运用蛋白质剪接技术的三重AAV载体转移vWF基因进行VWD基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

含有*Ssp* DnaB内含肽、*Ssp* DnaE内含肽编码序列的质粒pMST、C-214为加拿大Dalhousie大学Paul Liu教授实验室构建,本室保存。含有人vWF cDNA的质粒pSVH-vWF由美国Washington大学医学院Sadler教授惠赠;含有人BDD-FVIII cDNA的真核表达质粒pCMV-F8(骨架为pcDNA3.1)由本实验室构建并保存;pcDNA3.1(+)购自Invitrogen公司。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连接酶试剂盒购自New England Biolabs公司;高保真*Pfu* Turbo DNA聚合酶为Stratagene公司产品;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;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;HRP-羊抗兔二抗、HRP-山羊抗小鼠二抗、ECL plus Western Blotting Detection试剂盒购自Amersham Pharmacia Biotech (GE)公司;人FVIII重链单克隆抗体ESH5、HRP标记的轻链单克隆抗体HRP-ESH8购自American Diagnostica公司;人重组FVIII为BioChain公司产品;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 Bioproducts公司;PVDF转印膜(Immobilon-P, 0.45 μm)为Millipore公司产品。

1.3 内含肽融合表达载体的构建

以质粒pSVHvWF1为模板,用*Pfu* Turbo DNA聚合酶、引物P1和P2进行PCR扩增含vWF的N段(Met¹~Ala¹⁰⁹⁸)编码序列N,以质粒C-214为模板,用引物P3和P4进行PCR扩增*Ssp* DnaE内含肽N端123个氨基酸的编码序列En,分别用*Nhe* I/*Sph* I和*Sph* I/*Xho* I酶切上述PCR产物,与*Nhe* I/*Xho* I酶切线性化载体pcDNA3.1(+)经T4 DNA连接酶连接,得到vWF的N段与*Ssp* DnaE内含肽N端融合基因表达质粒pCMV-NEn。以pSVHvWF1为模板,用引物P5、P6扩增vWF的信号肽编码序列,用引物P9、P10扩增vWF的M段(Cys¹⁰⁹⁹~Lys²⁰⁰³)编码序列M,用引物P7、P8从C-214扩增*Ssp* DnaE内含肽C端36个氨基酸的编码序列Ec,用引物P11、P12从质粒pMST扩增*Ssp* DnaB内含肽N端106个氨基酸的编码序列Bn,分别以*Nhe* I/*Nla* III、*Mfe* I/*Pci* I、*Nla* III/*Mfe* I、*Pci* I/*Xho* I酶切上述PCR产物,与*Nhe* I/*Xho* I酶切线性化pcDNA3.1(+)经连接,得到vWF的信号肽、*Ssp* DnaE内含肽C端、vWF的M段与*Ssp* DnaB内含肽N端的融合基因表达质粒pCMV-EcMbN。以pSVHvWF1为模板,用引物P5、P13扩增vWF的信号肽编码序列,用引物P16、P17扩增vWF的C段(Ser²⁰⁰⁴~Lys²⁸¹³)的编码序列C,用引物P14、P15从pMST扩增*Ssp* DnaB内含肽C端48个氨基酸的编码序列Bc,分别以*Nhe* I/*Nla* III、*Bsr* G I/*Xho* I、*Tsp* 45 I/*Bsr* G I酶切上述PCR产物,与*Nhe* I/*Xho* I酶切线性化的pcDNA3.1(+)连接,得到vWF的信号肽、*Ssp* DnaB内含肽C端与vWF的C段基因的融合表达质粒pCMV-BcC。另

外构建 3 个不含内含肽的三片段 vWF 真核表达载体 pCMV-N、pCMV-M 和 pCMV-C。将 pSVHvWF1 中的 vWF cDNA 用 *EcoR* I 切下插入到 pcDNA3.1(+)

的 *EcoR* I 位点, 得到 vWF 的真核表达质粒 pCMV-vWF。构建所用引物及序列见表 1。

Table 1 Primers used for vector construction

Primers	Sequence(5'→3')	Endonuclease site
P1	CTAGCTAGCATGATTCCTGCCAGATTTGCCG	<i>Nhe</i> I
P2	ACATGCATGCGCAGTCCCAATGGACTC	<i>Sph</i> I
P3	ACATGCATGCTCAGTTTGGCACCGAAAT	<i>Sph</i> I
P4	CCGCTCGAGTTATTTAATTGTCCAGCGTCAAG	<i>Xho</i> I
P5	CTAGCTAGCATGATTCCTGCCAGATTTGCCG	<i>Nhe</i> I
P6	CTACATGCAAAGGGTCCCTGGCAAAATGA	<i>Nla</i> III
P7	CTACATGGTTAAAGTTATCGGTCGTCG 3'	<i>Nla</i> III
P8	GTCACAATTGGCGCGCATCGCCCCATT	<i>Mfe</i> I
P9	GTCACAATTGCTTCTGCGACACCATTGCTG	<i>Mfe</i> I
P10	TGCAACATGTCATGCAGCCCTGCCTTGCTC	<i>Pci</i> I
P11	TGCAACATGTTGCATCAGTGGAGATAGTTTGATC	<i>Pci</i> I
P12	CCGCTCGAGTTACAATTGTAAAGAGGAGCTTTCTAG	<i>Xho</i> I
P13	TCAGGTGACCAAAGGGTCCCTGGCTTTTTGA	<i>Tsp</i> 45 I
P14	TCAGGTACCAGAAATAGAAAAGTTGTCTC	<i>Tsp</i> 45 I
P15	CAGTTGTACAATGATGTCATTGGCGACAAAG	<i>Bsr</i> G I
P16	CAGTTGTACATAACTCCATCGAGGTGAAGCACAGTG	<i>Bsr</i> G I
P17	5'CCGCTCGAGTCACTTGCTGCACTTCTGGG	<i>Xho</i> I

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 脂质体试剂盒按说明书进行转染。将 3 种含内含肽的质粒 pCMV-NEn、pCMV-EcMBn 和 pCMV-BcC 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 20 μl Lipofectamine 2000 脂质体的 250 μl Opti-MEM 培养液混合后室温放置 20 min, 共转染 293 细胞。用 pCMV-VWF 转染 293 细胞作为阳性对照, 用空载体 pcDNA3.1 转染 293 细胞作为阴性对照(Mock)。用无内含肽的质粒 pCMV-N、pCMV-M 和 pCMV-C 共转染 293 细胞作为无剪接对照。为了观察 vWF 表达对 FVIII 分泌及活性的影响, 将 pCMV-NEn、pCMV-EcMBn、pCMV-BcC 以及 pCMV-F8 按 1:1:1:1 比率各 4 μg 转染 293 细胞, 用 pCMV-F8 转染、用 pCMV-F8 和 pCMV-VWF 共转染以及用 pCMV-F8 和不含内含肽的三段 vWF 基

因共转染作为对照。转基因细胞于培养箱内培养 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。

1.5 培养上清中的 vWF 多聚体分析

参照文献[9]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 mmol/L Tris, 200 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇, 4% SDS)中将蛋白质转移至 PVDF 膜。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。

1.6 培养上清中 vWF 浓度的检测

参照文献[10]用夹心 ELISA 检测培养上清中的 vWF 抗原量。用浓度为 10 mg/L 的 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℃ 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加入样品孔, 每个样品设 6 个复孔, 每孔加 100 μ l. 用 1:8 000 稀释的 HRP 标记 vWF 多克隆抗体 (P 0226) 作为探测抗体, 测得样品的吸光值. 用正常人血浆作为标准品, 设 vWF 含量为 100%, 样品 vWF 含量用与标准品比较的百分值表示.

1.7 培养上清中 vWF 结合 FVIII 能力的测定

参照文献[11]的方法进行. 用 PBS 稀释的浓度为 3 mg/L 的兔抗人 vWF 多克隆抗体 (A 0082) 4℃ 每孔加 100 μ l 包被酶标板, 4℃ 孵育过夜后洗板, 每孔用 200 μ l PBS-1%BSA 室温封闭 1 h 后洗板, 标准对照每孔加 100 μ l 用 PBS-0.1% BSA 稀释成 5% 的正常人血浆, 实验组每孔加 100 μ l 用 PBS-0.1% BSA 稀释成 5% 的细胞培养上清, 37℃ 孵育 1 h 后洗板, 每孔加入 400 mmol/L 的 CaCl₂ 室温孵育 30 min 以去除与 vWF 结合的 FVIII, 然后从浓度 500 μ g/L 开始, 每孔加 100 μ l 用 PBS-0.1% BSA 倍比稀释的人重组 FVIII 标准品, 室温孵育 1 h. 为探测结合的 FVIII, 洗板后每孔加 100 μ l 浓度为 2 mg/L 的 FVIII 重链单克隆抗体 ESH5, 37℃ 孵育 1 h, 加 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗, 37℃ 温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液显色, 用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板. 每个样品平行设置 6 个复孔. 实验组 vWF 结合 FVIII 的能力以正常人血浆结合能力的百分比表示.

1.8 培养上清中 FVIII 含量和活性的定量分析

参照文献[12]用双夹心 ELISA 检测上清中的 BDD-FVIII 含量, 用浓度为 2 mg/L 的重链单抗 ESH5 包被酶标板, 洗板后每孔用 200 μ l 封闭液 (PBS + 1% BSA + 0.05% Tween 20) 37℃ 封闭, 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 μ g/L), 每个样品及每个稀释度的标准品分别平行重复加样 6 个孔, 每孔 100 μ l, 37℃ 温育 1 h. 洗板后每孔加入 100 μ l 浓度为 2 mg/L 的 HRP 标记轻链单抗 HRP-ESH8, 37℃ 温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液 37℃ 显色, 用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板. 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 BDD-FVIII 浓度.

参照文献[13]用 Coatest 发色分析试剂盒按说明书操作分析上清的 FVIII 生物活性. 以正常人血浆 (FVIII 活性为 1.0 U/ml) 为标准品, 用 Opti-MEM

培养液稀释, 序列反应后 405 nm 处读取吸光值, 以稀释百分比为横坐标、吸光值为纵坐标分别绘制标准曲线, 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 U/ml 换算为上清的 FVIII 生物活性.

1.9 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 样本均数比较采用 *t* 检验; 多样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 重组表达载体的构建

将 vWF 的 cDNA 于 Cys¹⁰⁹⁹、Ser²⁰⁰⁴ 密码子前断裂为三段 (N、M、C), 分别与 *Ssp* DnaE 内含肽的 N 端 (En)、C 端 (Ec) 和 *Ssp* DnaB 内含肽的 N 端 (Bn)、C 端 (Bc) 编码序列融合, 并在每段融合基因的 5' 端加上 vWF 的信号肽编码序列, 所构建的重组真核表达载体 pCMV-NEn、pCMV-EcMbN 和 pCMV-BcC 的示意图如图 1 所示.

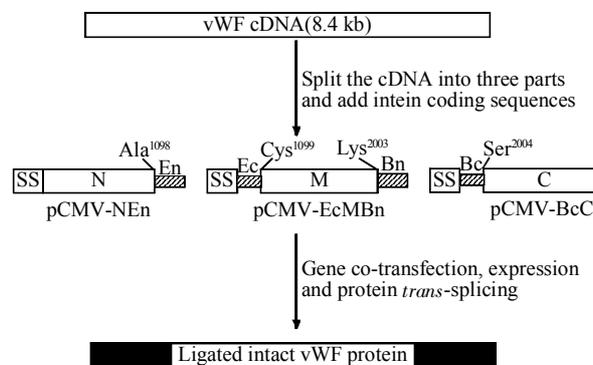


Fig. 1 An illustration of vector construction and protein trans-splicing
SS: Signal sequence of vWF.

2.2 培养上清中的 vWF 多聚体分析结果

用内含肽融合三段 vWF 基因共转染 293 细胞后, 分析培养上清显示共转染细胞具有与野生型 vWF 基因转染 (阳性对照) 和正常人血浆相似的 vWF 多聚物模式, Mock 转染和无内含肽融合三段 vWF 基因共转染细胞未见 vWF 多聚物形成, 如图 2 所示, 表明三重载体共转三段 vWF 基因表达后在 2 种内含肽的反式剪接作用下产生的完整单体 vWF 蛋白可加工成多聚体分泌至培养上清.

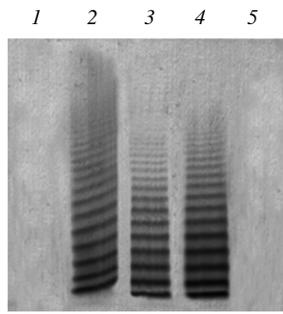


Fig. 2 Multimer analysis of transgene expressed vWF in supernatants after gene co-delivery

Normal plasma or culture supernatants were electrophoresed on SDS/2% agarose gel followed by detection of vWF by HRP-conjugated antibody against human vWF. 1: The mock-transfected control; 2: Normal human plasma; 3: vWF gene-transfected positive control; 4: Intein-fused tri-fragments of vWF genes co-transfection; 5: Tri-fragments of vWF genes co-transfection.

2.3 培养上清中的 vWF 浓度检测

融合内含肽的三段 vWF 基因共转染 293 细胞后, ELISA 检测分泌到培养上清中的 vWF 抗原量, 结果显示(图 3), 共转基因细胞上清的 vWF 抗原水平为(219 ± 36)%, 转野生型 vWF 基因的细胞上清为(240 ± 32)%, 无内含肽融合的三段 vWF 基因共转染细胞上清为(248 ± 23)%, 三者之间抗原量无明显差异, 但均明显高于正常血浆的 vWF 抗原水平。

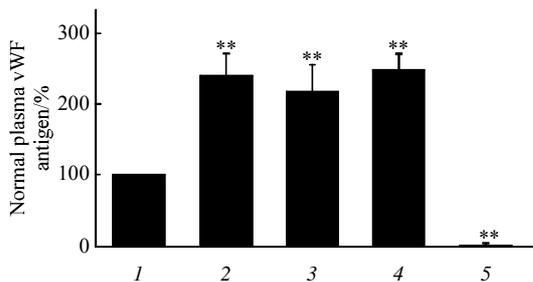


Fig. 3 Transgene expressed vWF antigen levels in supernatants after gene co-transfection

Normal human plasma was used as a vWF reference (100%). Data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $**P < 0.01$ vs normal human plasma. 1: Normal plasma; 2: vWF; 3: Intein ligated vWF; 4: vWF fragments; 5: Mock.

2.4 培养上清中 vWF 结合 FVIII 能力的测定

vWF 通过与 FVIII 非共价结合达到稳定后者的作用, 分析转基因细胞分泌的 vWF 与 FVIII 的结合力, 结果显示(图 4), 共转内含肽融合的三段 vWF 基因

细胞分泌的 vWF 和 FVIII 的结合力为(91 ± 4)%, 与正常血浆(设为 100%)和转野生型 vWF 基因对照细胞(94 ± 5)%相似, 而无内含肽融合的三段 vWF 共转基因细胞培养上清和 Mock 转染细胞均检测不到 FVIII 结合力, 表明内含肽剪接形成的 vWF 具有明显的 FVIII 结合能力, 显示其作为 FVIII 蛋白载体功能的恢复。

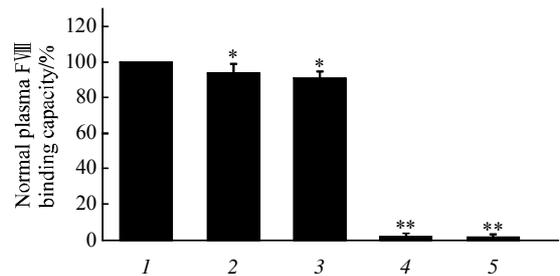


Fig. 4 Capacity of transgene expressed vWF to bind FVIII after gene co-transfection

Normal human plasma was used as a vWF reference (100%). Data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $*P > 0.05$ vs normal human plasma, $**P < 0.01$ vs normal human plasma. 1: Normal plasma; 2: vWF; 3: Intein ligated vWF; 4: vWF fragments; 5: Mock.

2.5 培养上清中 FVIII 抗原和活性的定量分析

作为 FVIII 的载体蛋白, vWF 与 FVIII 的结合可保护 FVIII 免受蛋白水解酶快速降解、稳定其活性, vWF 的功能缺陷导致继发性 FVIII 功能缺陷, 引起与典型的甲型血友病类似的自发性出血^[4]. vWF 正常功能的发挥, 有赖于多聚体的形成, 利用 BDD-FVIII 与融合内含肽的三段 vWF 基因共转染 293 细胞显示(图 5), 分泌至培养上清的 BDD-FVIII 抗原量为(270 ± 25) μg/L, 与作为对照的 BDD-FVIII + vWF 共转染细胞(285 ± 32) μg/L 相近($P > 0.05$), 明显高于单独转 BDD-FVIII 基因的细胞(123 ± 20) μg/L 和 BDD-FVIII 与无内含肽融合的三段 vWF 基因共转染细胞(112 ± 17) μg/L ($P < 0.01$), 而后两者相比 $P > 0.05$. 相应地, 细胞培养上清中的 FVIII 生物活性分析显示(图 6), 内含肽剪接的 vWF 可显著提高 BDD-FVIII 转基因后分泌产生的 FVIII 活性(2.20 ± 0.24) U/ml, 与对照 vWF 转基因接近(2.32 ± 0.14) U/ml, 而明显高于单独转 BDD-FVIII 基因细胞(1.37 ± 0.26) U/ml 和无内含肽融合的三段 vWF 转基因细胞(1.23 ± 0.12) U/ml, $P < 0.01$, 而后两者相比 $P > 0.05$, Mock 转染对照细胞基本检测不到 FVIII 和活性。

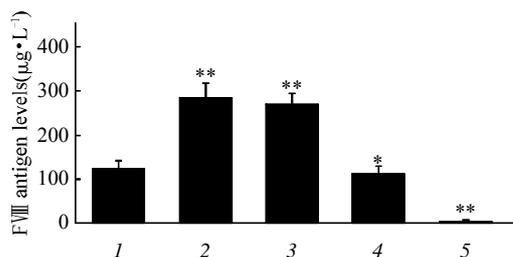


Fig. 5 Quantitative analysis of secreted BDD-FVIII antigen levels in supernatants by ELISA

The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $**P < 0.01$ vs BDD-FVIII transfection, $*P > 0.05$ vs BDD-FVIII transfection. 1: BDD-FVIII; 2: BDD-FVIII+vWF; 3: BDD-FVIII+Intein ligated vWF; 4: BDD-FVIII+vWF fragments; 5: Mock.

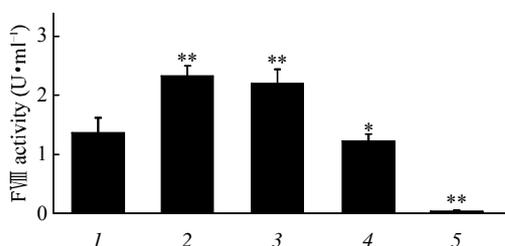


Fig. 6 Biological activity of FVIII in supernatants by Coatest assay

The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $**P < 0.01$ vs BDD-FVIII transfection, $*P > 0.05$ vs BDD-FVIII transfection. 1: BDD-FVIII; 2: BDD-FVIII+vWF; 3: BDD-FVIII+Intein ligated vWF; 4: BDD-FVIII+vWF fragments; 5: Mock.

3 讨 论

本研究在我们以前原核 vWF 剪接实验的基础上^[8], 进一步在体外培养的哺乳动物细胞中, 用基因工程方法将人 vWF 基因分成 3 段, 与两种不同的内含肽, 即 *Ssp DnaE* 内含肽和 *Ssp DnaB* 内含肽融合, 构建 3 个真核表达载体, 共转染细胞后表达的 3 段 vWF 多肽通过蛋白质剪接作用共价连接成完整的 vWF 分子, 再进一步加工成分子质量不均一的多聚体蛋白分泌到上清, 通过 FVIII 结合实验证明其 FVIII 载体功能的恢复, 并通过 FVIII 基因共转染实验证明具有促进 FVIII 蛋白分泌和提高其活性的功能。主要发现于原核生物和单细胞真核生物中某些宿主蛋白中的内含肽, 迄今已发现 100 多种, 不同的内含肽分子间同源性较低。随着对蛋白质剪接作用的分子机制基本阐明, 因其非同寻常的催化蛋白质酰胺键断裂和形成的作用, 内含肽的蛋白质剪接功能已被开发为一项新的生物技术得到有效应用,

如蛋白质纯化、标记、蛋白质芯片制备、体内蛋白质功能的翻译后控制等^[15]。

蛋白质剪接分为发生于分子内的顺式(*cis*)和发生于分子间的反式(*trans*)两种形式。本文利用内含肽的蛋白质反式剪接功能, 其中 *Ssp DnaE* 内含肽是天然存在的反式作用内含肽, 而 *Ssp DnaB* 内含肽是顺式作用内含肽。研究表明, 将顺式剪接作用的 *Ssp DnaB* 内含肽人工断裂后也具有高效的反式剪接功能^[16]。我们最近利用人工断裂的 *Ssp DnaB* 内含肽表明可高效实现对 CFTR(一种氯离子通道蛋白)和 FVIII 的反式剪接^[17, 6]。尽管蛋白质剪接的信息包含在内含肽分子之中, 但剪接的效率在不同的内含肽和非天然宿主蛋白高低不一, 说明剪接位点上下游宿主蛋白的残基组成对剪接反应的影响。为了提高剪接效率, 有时在剪接部位增加多个与所用内含肽的天然宿主蛋白相同的残基, 由于这些额外残基保留在剪接的蛋白质中, 对蛋白质功能的影响和 / 或抗原性改变都是潜在的不利因素^[18]。因此对于特定目的蛋白的剪接, 为避免额外残基的引入, 需要测试不同的断裂点, 以寻找效率较高的剪接位点和内含肽的组合。我们在原核剪接实验中通过比较不同的 vWF 断裂点, 证明 Cys¹⁰⁹⁹、Ser²⁰⁰⁴ 前断裂的 vWF 与本文所选用的 2 种内含肽的组合具有较高的剪接效率, 而且 2 种内含肽不会发生交叉反应^[8], 保证了剪接反应形成与天然 vWF 一级结构一致的剪接产物。

vWF 在巨核细胞和内皮细胞中先合成前 vWF 单链前体(pre-pro-vWF), 由含 22 个氨基酸信号肽的 2 813 个氨基酸组成, 在细胞内加工、分泌过程中切除 22 个氨基酸的信号肽和 741 个氨基酸的前肽(propeptide), 形成由 2 050 个氨基酸组成的单链成熟 vWF, 进一步加工成分子质量不均一的功能性多聚物。vWF 缺陷引起的 VWD 有多种类型, 包括量的缺陷所致的 1 型、3 型和质的缺陷所致的 2 型, 其中 3 型 VWD 最为严重, 是由合成缺陷导致 vWF 水平的绝对低下^[19]。相对于现有的基于血浆源性 vWF 的蛋白补充和采用 Desmopressin 促进 vWF 释放入血为主的疗法, 基因治疗被认为是 VWD 治疗的最佳方法。有人运用慢病毒携带 vWF 基因小鼠模型实验证明, 慢病毒主要感染肝细胞, 但由于所采用的启动子 / 增强子为 CMV, 导致在肝细胞中 vWF 表达水平快速下降^[20]。最近有报道, 通过用流体动力学方法小鼠注射肝细胞特异性的 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶启动子调控的 vWF 表达质粒, 可观

观察到肝细胞持续高水平的 vWF 表达, 使 VWD 小鼠血栓形成的能力得到恢复, 表明肝细胞异位表达的 vWF 具有与内皮细胞和巨核细胞表达的 vWF 同样的功能^[21]。AAV 载体可定点整合宿主基因组、无致病性以及较少引起宿主免疫反应而且静脉注射后主要感染肝细胞的特点, 是 VWD 基因治疗的理想载体, 但 AAV 载体的基因包装限量约为 4.0 kb, vWF 的 cDNA 长达 8.4 kb, 加上基因表达调控序列, 如此大的基因不能为单个甚至难以为 2 个 AAV 载体所承载, 是 VWD 基因治疗运用 AAV 载体的最大障碍。内含肽的蛋白质反式剪接功能提供了一个解决 AAV 容量限制的策略, 采用三重载体共转分成 3 段的 vWF 基因, 每个载体都留有充分的空间可供选择使用旨在提高组织特异性表达的启动子/增强子序列。尽管 3 个载体共转染同一靶细胞的效率、表达的水平以及内含肽剪接效率等因素影响三片段 vWF 转基因后全长 vWF 及由此形成功能性多聚体化的效率, 但对于 VWD 的治疗来说也许是一个优点, 因为只要 vWF 达到正常血浆水平 (10 mg/L) 的 5% 就可达到治疗功效, 过高的 vWF 血浆水平反而可能引起高凝血状态^[22-23]。因此, 本文的研究结果为运用内含肽反式剪接技术的三重 AAV 载体转运 vWF 基因提供了实验依据。

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

参 考 文 献

- [1] Haberichter S L. VWF and FVIII: the origins of a great friendship. *Blood*, 2009, **113**(13): 2873-2874
- [2] Giblin J P, Hewlett L J, Hannah M J. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, 2008, **112**(4): 957-964
- [3] Sadler J E. New concepts in von willebrand disease. *Annu Rev Med*, 2005, **56**: 173-191
- [4] Saleh L, Perler F B. Protein splicing in *cis* and in *trans*. *Chem Rec*, 2006, **6**(4): 183-193
- [5] Wu H, Hu Z, Liu X Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(16): 9226-9231
- [6] Zhu F X, Liu Z L, Chi X Y, et al. Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci Chin Life Sci*, 2010, **53**(6): 683-689
- [7] Li J, Sun W C, Wang B, et al. Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated *in vivo* gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(9): 958-964
- [8] 朱甫祥, 郭 猛, 刘泽隆, 等. 双 intein 介导三片段 vWF 的反式剪接. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, **26**(2): 157-163
Zhu F X, Guo M, Liu Z L, et al. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, **26**(2): 157-163
- [9] Haberichter S L, Merricks E P, Fahs S A, et al. Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood*, 2005, **105**(1): 145-152
- [10] Lankhof H, van Hoesel M, Schiphorst M E, et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost*, 1996, **75**(6): 950-958
- [11] De Meyer S F, Vanhoelbeke K, Chuah M K, et al. Phenotypic correction of vonWillebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vectors expressing vonWillebrand factor. *Blood*, 2006, **107**(12): 4728-4736
- [12] Sinn P L, Goreham-Voss J D, Arias A C, et al. Enhanced gene expression conferred by stepwise modification of a nonprimate lentiviral vector. *Hum Gene Ther*, 2007, **18**(12): 1244-1252
- [13] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia Amice with canine F VIII using anAAV 8 serotype. *Blood*, 2004, **103**(4): 1253-1260
- [14] Sadler J E. Von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1991, **266**(34): 22777-22780
- [15] Cheriyan M, Perler F B. Protein splicing: a versatile tool for drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(11): 899-907
- [16] Wu H, Xu M Q, Liu X Q. Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1387**(1-2): 422-432
- [17] 朱甫祥, 刘泽隆, 屈慧鹤, 等. 内含肽介导的氯离子通道蛋白 CFTR 的反式剪接. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, **25**(9): 844-848
Zhu F X, Liu Z L, Qu H G, et al. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, **25**(9): 844-848
- [18] Chen L X, Zhu F X, Li J, et al. 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
- [19] De Meyer S F, Deckmyn H, Vanhoelbeke K. von Willebrand factor to the rescue. *Blood*, 2009, **113**(21): 5049-5057
- [20] Lenting P J, de Groot P G, De Meyer S F, et al. Correction of the bleeding time in von Willebrand factor (vWF)-deficient mice using murine vWF. *Blood*, 2007, **109**(5): 2267-2268
- [21] De Meyer S F, Vandeputte N, Pareyn I, et al. Restoration of plasma von Willebrand factor deficiency is sufficient to correct thrombus formation after gene therapy for severe von Willebrand disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**(9): 1621-1626
- [22] Ahnstrom J, Berntorp E, Lindvall K, et al. A 6-year follow-up of dosing, coagulation factor levels and bleedings in relation to joint status in the prophylactic treatment of haemophilia. *Haemophilia*, 2004, **10**(6): 689-697
- [23] Pergolizzi R G, Jin G, Chan D, et al. Correction of a murine model of von Willebrand disease by gene transfer. *Blood*, 2006, **108**(3): 862-869

Post-translational Ligation and Functional Multimerization of von Willebrand Factor After Intein-mediated Tri-fragmental Gene Delivery in Eukaryotic Cell*

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 von Willebrand factor (vWF) is a huge multimeric plasma glycoprotein with important functions involved in thrombosis and hemostasis. Its qualitative and/or quantitative abnormalities result in a bleeding disorder termed von Willebrand disease (VWD). Gene therapy is favorable for treatment of VWD because this disease is monogenic and the vWF is a secretory protein making non-specific targeting organ required for gene delivery. But the vWF gene is hardly packaged in most existing viral vectors especially the desired adeno-associated virus (AAV) vectors for its oversized cDNA in size (8.4 kb). The intein-mediated protein *trans*-splicing was explored to co-transfer split three fragmented vWF gene into eukaryotic cells by a ternary-vector system and the functional vWF protein was expected to be formed posttranslationally by protein *trans*-splicing. The vWF cDNA was broken into three fragments before codons of Cys¹⁰⁹⁹ and Ser²⁰⁰⁴ which required for protein splicing and then fused with *Ssp* DnaE and *Ssp* DnaB inteins respectively. A group of three eukaryotic expression vectors were produced by inserting these three fusion genes into pcDNA3.1(+) respectively. By transient co-transfection of 293 cells with these three vectors the conditioned culture supernatant was observed for vWF multimer pattern by electrophoresis, analyzed for vWF antigen and binding capacity of coagulation factor VIII (FVIII) quantitatively. With FVIII gene co-transfection, the antigen and activity of FVIII in the culture supernatant were measured. The data showed that with intein-mediated protein *trans*-splicing after translation the culture supernatant from cells co-transfected with intein-fused three fragmented vWF genes displayed a vWF multimer pattern and FVIII binding capacity similar to normal human plasma and cells of vWF gene transfected positive control, and the FVIII secretion and activity were increased dramatically in FVIII gene co-transfected cells indicating the functional recovery of spliced vWF as a FVIII carrier. It suggests that inteins could be used as a powerful means for tri-fragmental co-delivery of the vWF gene and may be valuable for application of intein-based ternary AAV vector in split vWF gene delivery in gene therapy for VWD to overcome the packaging limitation of AAV vectors.

Key words intein, protein *trans*-splicing, von Willebrand factor, gene delivery, multimer, factor VIII carrier

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00399

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City (2008152), The Scientific Research Foundation for The Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (20071108) and The Discipline Construction Funds of Ludong University.

**Corresponding author.

Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

Received: August 3, 2010 Accepted: September 14, 2010