

凝 血 因 子 VIII

许正平 王恩多

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

人凝血因子 VIII (抗血友病因子) 是凝血内部级联途径 (intrinsic clotting cascade) 中起重要作用的血浆糖蛋白。A 型血友病或称古典血友病是由于不正常的凝血因子 VIII 引起的, 10 万名男性中发病率约为 10—20 人。近十年来, 人们关于凝血因子 VIII, 特别是它的基因和蛋白分子结构方面的知识日益增加。这篇综述总结了人凝血因子 VIII 的结构和基因的分子克隆以及血友病的遗传诊断及治疗方面的新进展。

关键词 凝血因子 VIII, 血友病, 基因克隆

凝血因子 VIII (抗血友病因子, 以下简称 F VIII), 是一种血浆糖蛋白, 在凝血机制的内部途径的级联反应中起着必不可少的作用^[1]。血浆中 F VIII 的含量极少, 1ml 血浆中仅含 100—200ng, 分离纯化 F VIII 极为困难。近年来通过 F VIII 基因的克隆和表达研究, 可以得到足够量的 F VIII, 使人们可以更进一步地了解它的结构和功能, 应用 F VIII 治疗血友病。本文将简单介绍 F VIII 的分子结构、基因克隆及应用的研究近况。

一、F VIII 的结构、功能及合成

(一) 结构与功能

F VIII, Ca^{2+} 及磷脂形成复合物, 与活化的凝血因子 IX。共同作用, 激活凝血因子 X。这是凝血内部途径级联过程中的一步。有活力的 F VIII 以双链离子复合物的形式存在于血浆中, 重链分子量 90—210kD, 轻链分子量 80kD。F VIII 二聚体的稳定性依赖于某些二价金属离子, 如 Mn^{2+} , Ca^{2+} 。除去钙离子会导致 F VIII 不可逆失活^[2]。正如活化的凝血因子 V 一样, 钙离子在 F VIII 的重链与轻链间

起盐桥作用。

1984 年, F VIII 基因在哺乳动物细胞中表达成功, 为我们提供了大量关于 F VIII 蛋白质分子结构方面的信息^[3-8]。细胞内, 首先在核糖体上合成 F VIII 前体, 它是一条含 2351 个氨基酸残基的肽链。其中近 N 端的含 19 个氨基酸的信号肽进入内质网后被水解掉, 生成成熟的 F VIII, 它含 2332 个氨基酸残基, 分子量为 26.5 kD。然后进一步被蛋白水解酶作用生成重链和轻链并释放入血液^[9]。

F VIII 共分六个结构域, 排列顺序为 $\text{A}_1\text{-A}_2\text{-B-A}_3\text{-C}_1\text{-C}_2$ 。重链由 $\text{A}_1\text{-A}_2\text{-B}$ 组成, 轻链由 $\text{A}_3\text{-C}_1\text{-C}_2$ 组成。三个 A 结构域, 每个约含 350 个氨基酸残基, 具有 30% 的同源性。 A_1 与 A_2 之间有一段 36 个氨基酸残基的酸性区, 另外一个酸性区紧接 B 区之后在 A_3 的 N 末端区。两个 C 结构域, 每个约含 150 个氨基酸残基, 有 37% 的同源性。B 结构域含成熟 F VIII 25 个门冬酰胺 N-糖苷化位点的 19 个, 是高度糖苷化的结构域。但 B 结构域仅含 4 个半胱氨酸残基, 而 F VIII 中总半胱氨酸残基为 23 个。有趣的是半胱氨酸出现在三个 A 结构域的相似

位点上,以及两个C结构域的相似位点上。这些半胱氨酸相似排列的意义、链内或链间二硫键的形成情况有待于进一步探讨。F VIII的B链高度糖苷化以及两个疏水区 Ser-308 到 His-334, Ser-630 到 Phe-677 对 F VIII 的分泌和活化有何作用目前也尚不清楚。

F VIII 的A结构域与血浆铜蓝蛋白具有很高的同源性,血浆铜蓝蛋白也有三个相邻的结构域与 F VIII 的A结构域有30%的同源性。血浆铜蓝蛋白中与铜原子结合的有关氨基酸残基是高度保守的,在 F VIII 中也发现这些保守的氨基酸残基,这表明 F VIII 与血浆铜蓝蛋白有相似的金属离子结合的特异性^[10]。F VIII 的C结构域与盘状网柄菌凝集素具有20%的氨基酸同源性,说明C结构域是 F VIII 的磷脂结合部分。然而,活化的 F VIII 的高级结构如何、它是怎样与钙离子、磷脂结合并协同凝血因子 IX_a 发挥作用的,还有待于进一步研究。

F VIII 与凝血过程中另一个因子 V,在结构和功能上非常相似^[11,12]。象 FVIII 一样,因子 V 含与血浆铜蓝蛋白类似的三个重复区,排列顺序类似 F VIII (A₁-A₂-连接区-A₃),连接区也是高度糖苷化的,以二聚体形式发挥作用,成熟的蛋白分子量都大于 300kD (经糖苷化修饰后),氨基酸的组成具有30%的同源性。根据 F VIII、凝血因子 V 及血浆铜蓝蛋白结构及功能上的类似性,可推测它们在进化上有共同的祖先。另外,有人比较了猪 F VIII 与人 F VIII 氨基酸组成排列的同源性^[4],但其来源的 F VIII 提取情况还未见报道。

(二) 合成、加工、分泌

早期采用器官移植术对 F VIII 的合成进行组织定位。随着对 F VIII 基因的认识、特异性探针的使用,发现肝细胞是合成 F VIII 的主要场所。合成的 F VIII 前体在信号肽的引导下穿过粗糙型内质网膜进入内质网腔,19个氨基酸组成的信号肽立即被水解掉,产生成熟的 F VIII,它与 BIP (免疫球蛋白重链结合蛋白)结合在一起,此时肽链上的门冬酰胺位点

被糖苷化成富含甘露糖的寡糖链,具有分泌能力的 F VIII 转入高尔基体,重链上寡糖链被修饰糖苷化成复杂的结构形式。紧接着重链与轻链都进行 O-糖苷化,位于第一酸性区内的酪氨酸和轻链 N-端区的酪氨酸硫酸化。然后成熟的 F VIII 单链 Arg-1648 与 Glu-1649 之间的肽键被水解 (尚未弄清是何种酶的作用),产生双链结构的 F VIII^[12]。

分泌进入血液的 F VIII 与 VW 因子(von Willebrand factor, 简称 VWF)紧密结合,VWF 对 F VIII 起着重要的稳定作用,无 VWF 时,重链和轻链呈解离状态,并很快被降解^[4]。VWF 可促使重链与轻链聚合。正常人体内 F VIII 的半衰期是 12h。进一步分析说明 VWF 是通过其 N-端 1—272 位的肽链与 F VIII 重链及轻链的酸性区以非共价键形式结合的^[9,13]。

F VIII 在血液中经凝血酶或 X_a 进一步作用被活化。但用凝血酶长时间处理或活化蛋白 C 作用, F VIII 的催化活力丧失^[14]。利用 DNA 重组及基因缺失的研究说明 B 结构域(约 95kD)与 F VIII 的生物活性无关^[15]。分子量为 90kD 的重链和分子量为 80kD 的轻链为 F VIII 的活性所必需,单独存在的重链或轻链无活性,加入 Mn²⁺ 或 Ca²⁺ 可使两条单链重组而复活^[2,16]。

凝血酶对 F VIII 水解的第一步是作用于 Arg-740 与 Ser-741 之间的肽键,产生分子量为 90kD 的重链,释放出 B 结构域的肽段。进一步作用的位点是 Arg-372 (第一酸性区与 A₂ 之间)和 Arg-1689 (第二酸性区与 A₃ 之间)。长时间作用,凝血酶或活化蛋白 C 会水解 A₁ 与第一酸性区之间的 Arg-336 处的肽键,释放出含 36 个残基的酸性区,导致 F VIII 失活。综上所述, F VIII 的激活过程伴随着第二酸性区的释放;而 F VIII 的失活是由于第一酸性区的释放。凝血酶的水解位点是 F VIII 上的 Arg-Ser 或 Arg-Ala,而不是 Arg-Gly 之间的肽键。另外在 F VIII 上还有一些同样的 Arg-Ser 或 Arg-Ala 之间的键却不被凝血酶作用,很可

能凝血酶的水解特异性还包括了对肽链的二级结构的识别^[16]。

关于 F VIII 合成的调控机制目前了解甚少。加压素或其类似物能增加正常人和轻度血友病患者体内的 F VIII 含量。但这种作用受蔡异丙仲胺抑制。另外, VWF 可以促使 F VIII 的稳定分泌,对血浆中 F VIII 含量起着调节作用^[17]。

二、F VIII 基因的分子克隆

编码 F VIII 的基因位于人 X 染色体长臂的末端。基因全长 186kb, 约占 X 染色体的 0.1%^[4,5], 由 26 个外显子, 25 个内含子组成。外显子全长有 9kb, 编码区有 7053bp, 其余为 5' 及 3' 端的非编码区。外显子与内含子连接处具有共同顺序 GT—AG。26 个外显子长度由 69bp 到 3106bp 不等, 其中外显子 14(3106bp) 是至今报道的最大的外显子, 编码的蛋白分子量约 100kD, 包括整个的 B 结构域及部分 A₂ 及 A₃ 区。另一个较大的外显子 26 含 1958bp, 但其中 1805bp 是 3' 端非编码区。25 个内含子长度由 207 到 32400bp 不等。

F VIII DNA 的转录起始点, 172 位起的 ATG 是翻译起始密码, 转录起始位点上游—30bp 处有一 GATAAA 结构, 类似于真核生物的 Hogness 盒。但在—70bp 区没有发现 CAT 顺序。3' 端 1805bp 的非编码区含有加 poly A 的信号 AATAAA 和 CATTG, 它们位于加 poly A 位点上游 19bp 处^[5,17]。

1984 年美国的两个生物技术公司 Genetech 和 Genetics Institute 首先报道了人 F VIII 的基因克隆及基因的 cDNA 顺序^[4-6]。他们首先从人血中分离纯化得到 F VIII, 根据它的氨基酸顺序人工合成出一小段寡聚核苷酸片段作为探针, 利用基因行走 (genomic walking) 技术, 从基因库和 cDNA 库中筛选到重叠的基因克隆, 然后把这些克隆在表达载体上重组成连续的 F VIII cDNA, 测定其顺序并转化到哺乳动物细胞中表达, 产生有活性的 F VIII 蛋白。例如, Wood 等构建了人 F VIII 基因的表达

质粒, pSAT.8c1, 用磷酸钙共沉淀法转入苍鼠肾细胞中表达成功。FVIII 基因位于串联的 SV40 早启动子/腺病毒 2 晚启动子与乙型肝炎病毒表面抗原基因 poly A 顺序之间。此外质粒还含有二氢叶酸还原酶的 cDNA, 它通过 SV40 的早启动子转录提供在哺乳动物细胞中筛选的基因标记。得到的 F VIII 生化特性与从血浆中提纯得到的天然 F VIII 完全一样^[6]。目前, 国外已使 F VIII 基因在微生物细胞 (如: 酵母, 枯草杆菌) 中表达得到具有生物活性的 F VIII。

由于 F VIII 分子量大, 在血液中含量低, 对血清中蛋白水解酶极敏感, 易降解, 且与含量很高的多聚体 VWF 紧密结合, 所以纯化困难。此外, 从血制剂中提取的 F VIII 不可避免地会染有某些病毒, 如肝炎病毒、艾滋病毒。因此有必要开展 F VIII 基因工程工作。目前美国 Genetics Institute/Baxter 生产的重组蛋白 F VIII 已在临床第 II 期和第 III 期使用, 可望为 A 型血友病患者提供更安全有效的治疗。

三、血友病的遗传诊断和治疗

血友病是 X 性连锁隐性遗传, 静脉注射 F VIII 可使患者出血停止及凝血时间恢复正常。然而并非所有 A 型血友病都能采用注射 F VIII 的方法治疗, 因为当输入外源 F VIII 后, 有些病人体内会产生抗体反应。因此有必要从 F VIII 的基因结构水平上认识 A 型血友病患者的特征。近年来, 利用重组 DNA 技术对 F VIII 缺陷进行了许多研究^[18,19], 发现不仅 F VIII 基因片段的缺失会导致不同程度的血友病, 而且一个核苷酸的突变也会导致血友病。例如, 有的血友病人是因为 Arg-2209 的密码 CGA 突变成 TGA, 引起无义突变; 有的血友病人则由于 Arg-1689 的密码 CGC 变成 Cys 的密码 TGC, 引起错义突变。点突变的研究证实 CG 二核苷酸是突变的热点, C 常常变为 T。

最近, 国外对血友病人的 F VIII 基因进行了大量的分析工作, 除了前述的点突变和缺失突变外, 最近又发现了两例插入突变型血友病

患者,两例患者都是由于在 F VIII 基因的第 14 个外显子中插入了一段 L₁ 序列^[20](L₁ 序列是人基因组中特异的一类长而散置的重复顺序,总长 6.1 kb,它由富含 A 的 3' 端和两个开放阅读框组成)。

目前,对血友病患者分子水平诊断有两种方法。首先,我们可以用特异的基因探针直接检测突变的基因,根据限制性内切酶的切点数目和片断长短的变化来诊断分析。如上述基因点突变使 Arg-2209 的密码变为 TGA, TaqI 的识别位点消失,用 TaqI 酶切时,患者只产生一个 4.2kb 的 DNA 片段,而正常人会出现 1.4kb 和 2.8kb 两个片段。另外一个分析 F VIII 基因缺陷的方法是采用限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP),可利用与 F VIII 基因串联的其它 DNA 片段进行 RFLP 分析。最近 Kogan 等人采用 PCR 的放大技术成功地对血友病患者 F VIII 基因结构进行了研究,并进行了遗传诊断和产前诊断。随着对 F VIII 研究的深入发展,我们将会得到更多的关于血友病患者分子水平的信息,并为诊断和治疗血友病提供更有效的方法。

参 考 文 献

1 Kane W H, Davie E W. *Blood*, 1988; 71: 539

- 2 Fay P J. *Arch Biochem Biophys*, 1988; 262: 525
- 3 Truett M A, Blacher R, Burke R L *et al.* *DNA (NY)*, 1985; 4: 333
- 4 Toole J J, Knapf J L, Wozney J M *et al.* *Nature*, 1984; 312: 342
- 5 Gitschier J, Wood W I, Goralka T M *et al.* *Nature*, 1984; 312: 326
- 6 Wood W I, Capon D J, Simonsen C C *et al.* *Nature*, 1984; 312: 330
- 7 Eaton D, Rodriguez H, Vehar G A. *Biochemistry*, 1986; 25: 505
- 8 Eaton D L, Hass P E, Riddle L *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 3285
- 9 Kaufman R J, Wasley L C, Dorner A. *J Biol Chem*, 1988; 263: 6352
- 10 Vehar G A, Keyt B, Eaton D *et al.* *Nature*, 1984; 312: 337
- 11 Fars D N, Hewick R M, Knutson G J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 1688
- 12 Wion K L, Kelly D, Summerfield J A *et al.* *Nature*, 1985; 317: 726
- 13 Takahashi Y, Kelafatis M, Girma J P *et al.* *Blood*, 1987; 70: 1679
- 14 Fulcher C A, Gardiner J E, Griffin J H *et al.* *Blood*, 1984; 63: 486
- 15 Pavirani A, Meulien P, Harter H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 145: 234
- 16 Nordfang O, Ezban M. *J Biol Chem*, 1988; 263: 1115
- 17 White G C, Shoemaker C B. *Blood*, 1989; 73: 1
- 18 Yousoufian H, Antonarakis S E, Bell W *et al.* *Am J Hum Genet*, 1988; 42: 718
- 19 Bardoni B. *Hum Genet*, 1988; 79: 86
- 20 Kazazian H H, Wong C, Yousoufian H *et al.* *Nature*, 1987; 332: 165

【本文于1990年4月29日收到,7月6日修回】

(上接第 304 页)

(主要为起始因子 2 和 5) 随硒浓度变化而变化;而 A 部分的吸收峰 II(主要为起始因子 4B) 和 B 部分的吸收峰 II(主要为起始因子 1, 4A, 4C 和 4B) 在本研究的各时期及各组之间均变化不明显。当加硒量为 2.9—7.6 μmol/L 时,核糖体相关蛋白质 A, B 两部分的吸收峰 I 的含量及其蛋白带的数量均随硒量增加而增加,且都比不加硒组要高;但当加硒量大于 7.6 μmol/L 时则出现下降趋势。硒对核糖体相关蛋白质 A, B 两部分吸收峰 I 的上述影响在加硒后第 8 天的表现最明显,但在加硒第 12 天后,上述

变化有所缓和并保持平稳。说明硒对核糖体相关蛋白质的影响有一个显露,明显和平稳的过程。从而也提示,在一定程度内,机体对长期缺硒和过量硒有适应性。由于核糖体相关蛋白质中含有蛋白质合成所必需的各种调节因子,因而在缺硒或硒中毒的条件下,核糖体相关蛋白质的这一变化无疑会直接影响蛋白质的正常合成。本研究还证明,细胞微环境中硒浓度在 5.7—7.6 μmol/L 时,较适合于细胞的生长代谢。

【本文于 1991 年 2 月 21 日收到,4 月 13 日修回】