

氨基酸序列突变对 TFPI 生物半衰期和生物活性的影响*

余波¹⁾ 罗师平¹⁾ 宋丽萍¹⁾ 冷希岗^{1)**} 赵明辉²⁾ 牛惠生²⁾

¹⁾ 中国医学科学院 生物医学工程研究所, 天津生物材料重点实验室, 天津 300192;
中国协和医科大学

²⁾ 中国医学科学院 放射医学研究所, 天津 300192)
中国协和医科大学

摘要 通过对个别氨基酸突变的研究, 获得了保持良好生物活性的长半衰期组织因子途径抑制因子 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 重组蛋白的有效途径. 采用定点诱变和基因重组技术, 首先在 TFPI cDNA 特定位点形成一个位点的沉默突变, 以提高 TFPI 在毕赤酵母细胞内的表达量, 此 cDNA 称为 mTFPI. 在此基础上, 通过系列位点突变, 形成 3 个羧基端突变体: m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI. 将上述 4 种 TFPI cDNA 与表达质粒 pPic9 连接, 转染大肠杆菌, 通过 PCR 和 DNA 测序确认重组质粒, 转染酵母细胞 GS115, 甲醇诱导表达重组蛋白. 采用层析方法纯化 TFPI 重组蛋白, 用 ¹²⁵I 标记重组蛋白, 静脉注射给药, 比较四者在 SD 大鼠体内血浆代谢清除速度. 用底物显色法测定重组蛋白抑制凝血因子 Xa(Fxa) 的活性, 比较各株 TFPI 重组蛋白突变体在体内、体外对 FXa 的抑制作用及肝素对各株 TFPI 重组蛋白功能的影响. 结果显示, 相比野生型 TFPI 重组蛋白(mTFPI)而言, 3 株羧基端突变体 m₀TFPI、m₁TFPI、m₂TFPI 在 SD 大鼠体内血浆代谢清除时间均有不同程度延长, 其生物代谢半衰期分别是 mTFPI 的 1.5 倍、1.9 倍和大于 2 倍, 与 m-TFPI 相比, 3 个 rTFPI 突变体在体内、体外抑制 FXa 的作用无明显减弱, 与肝素的结合能力及协同能力也无明显减弱. 结果表明, m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI 在生物半衰期得到明显延长的同时, 仍保持良好的抑制 Fxa 的生物活性.

关键词 组织因子途径抑制因子(TFPI), 基因突变, 血浆清除

学科分类号 Q81

组织因子途径抑制因子(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)是外源性凝血途径的主要抑制物, 它直接抑制 FXa 的活性, 并且以一种依赖于 FXa 的方式反馈性抑制 FV II a/F III 复合物, 对凝血过程起重要的调节作用. 成熟 TFPI 蛋白由 276 个氨基酸组成, 其中包括 18 个半胱氨酸, 3 个潜在的 N- 连接糖基化位点. 蛋白质结构依次包括富集负电荷的氨基端, 三个库尼型结构域及富集正电荷的羧基端. 其中第二个库尼型结构域结合并抑制凝血因子 Xa, 而第一个库尼型结构域结合并抑制凝血因子 V II a/F III 复合体, 其羧基端及第三个库尼型结构域为肝素及血管内皮细胞的结合位点^[1~3].

循环系统中 75% 的 TFPI 与血管内皮细胞结合, 20% 与载脂蛋白结合(主要为 LDL), 2.5% 存在于血小板中, 另有 2.5% 为游离 TFPI. 静脉注射肝素可以使结合于内皮细胞及血小板的 TFPI 释放入血, 从而使血浆 TFPI 水平提高数倍. Dahm 等^[4]的

研究表明, 血浆 TFPI 水平降低可诱发深静脉血栓形成. Hembrough 等^[5]最近的研究表明, TFPI 与极低密度脂蛋白(VLDL)结合在体外可抑制血管内皮细胞增生, 在体内具有抗肿瘤活性. Kopp 等^[6]发现 TFPI 可抑制单核细胞的趋化效应从而抑制血管再狭窄. 上述研究证明 TFPI 具有较高的药用价值.

TFPI 在血循环中被迅速清除, 致使大剂量的给药和高昂的费用限制了 TFPI 在临床上的应用和治疗效果^[7~9]. 研究显示, TFPI 从血循环中快速清除主要与 LRP 和 HSPGs 两大受体系统有关. LRP 通过其含有酸性和碱性氨基酸残基的 II 和 IV 配体结合位点, 与配体发生电荷依赖性受体 - 配体静电吸引作用. HSPGs 在细胞表面通过硫酸乙酰肝素(HS)侧链上带负电荷的硫酸基团与蛋白质上带正电荷的

*天津市应用基础研究重点资助项目(033801611).

** 通讯联系人. Tel/Fax: 022-87891191, E-mail: lengxg@bme.org.cn

收稿日期: 2006-09-06, 接受日期: 2006-10-09

碱性氨基酸残基发生静电吸引作用, 将其结合并内吞入细胞. TFPI K3 结构域和 C 端富含带正电荷的碱性氨基酸, 与细胞表面 LRP 的酸性氨基酸和(或) HSPGs 的 HS 侧链硫基结合而被细胞内吞清除^[10~12]. 研究证明, 删除羧基端碱性氨基酸的 TFPI 与细胞表面结合能力减弱, 在体内代谢时间延长, 但其抗凝血活性明显减弱^[8,13]. 现有研究表明, TFPI 与肝素的亲和力远远高于其与 LPR 或 HSPG 的亲和力. 为此我们提出通过不同程度地减弱 TFPI 羧基端正电荷性, 以期在保持 TFPI 生物学特性基本不变的前提下延长其生物半衰期的基本设想. 通过分子模拟实验发现, TFPI 的 241, 254, 260 和 261 残基是 4 个关键的电荷吸引作用位点^[9], 因此我们围绕这些位点进行了定点突变.

1 材 料

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶等购自大连宝生物公司; 快流速琼脂糖凝胶 Q (Q-Sepharose Fast Flow)、肝素琼脂糖凝胶 CL-6B (Heparin Sepharose CL-6B) 和葡聚糖 G-75 (Sephadex G-75) 分别购自 Pharmacia Biotech 和 Tosoh Corporation; DNA 分子质量标准及蛋白质分子质量标准购自北京鼎国生物技术公司; 凝血因子 Xa (Factor Xa), S-2222 及毕赤酵母表达系统分别购自 Sigma 和 Invitrogen 公司; pPic9 和 mTFPI-pPic9 转化的 GS115 重组菌为本实验室构建. 引物合成及 DNA 测序委托上海生工生物技术公司完成.

2 方 法

2.1 表达 TFPI 重组蛋白羧基端突变体的重组酵母菌的构建

2.1.1 突变体表达质粒的构建. 构建 3 个含有 TFPI 羧基端突变的表达载体. 用大引物 PCR 定点诱变技术, 以 mTFPI-pPic9 (本实验室构建的编码野生型 TFPI 的重组质粒) 质粒为模板, 经 2 次 PCR 扩增将 TFPI 羧基端部分 cDNA 定点诱变. 突变引物分别为(下划线部分为突变位点): M₀, 5' aaa gga ggc cta att gat gac gat gac aaa aga aag aag cag aga 3'; M₁, 5' gga ggc cta att aaa acc gcc gcg gcg gcg gcc gcg cag aga gtg aaa ata gc 3'; M₂, 5' gga ggc cta att aaa acc agc tcg agc tcg agc tcg cag aga gtg aaa ata gct 3'; 3' Aox, 5' gac tgg ttc caa ttg aca agc 3'; 5' Aox, 5' gca aat ggc att ctg aca tcc 3'. 第一轮 PCR 扩增的引物分别由各个突变引物与 3' Aox 组对, 第二轮

PCR 扩增用 5' Aox 引物与第一轮扩增片段作为引物. 最终产物通过 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点与质粒 pPic9 连接重组, 转化大肠杆菌细胞, 通过限制性酶切图谱分析筛选重组体并进行 DNA 测序最后确定.

2.1.2 重组酵母菌的转化、筛选与鉴定.

根据 Invitrogen 公司提供的 PEG1000 转化法制备酵母感受态细胞. 将上述重组质粒 DNA 分别用 *Sal* I 酶切线性化后转化酵母宿主菌 GS115. 同时转化质粒 pPic9 作为空白对照.

挑取转化子接种于 10 ml YPD 培养基中 30℃ 摇床培养 18 h, 然后用玻璃珠裂解法提取酵母基因组 DNA (方法详见《精编分子生物学实验指南》). 取 5 μl 酵母基因组 DNA 作为模板, 以通用引物 5' Aox 和 3' Aox 作为正、反引物进行 PCR 反应. 根据扩增片段的大小来判断表达质粒是否插入酵母宿主细胞的基因 DNA 中.

2.2 重组蛋白分析

接种经 PCR 验证的酵母转化子于 10 ml YPD 培养基中, 30℃ 摇床培养 18 h. 取此菌液按 1:100 接种于 BMGY 培养基中 30℃ 摇床培养至 A₆₀₀ ≈ 3, 离心收集细胞然后重悬于 3 倍 BMGY 体积的 BMMY 培养基中继续培养, 加 100% 的甲醇至终浓度为 0.5%. 36 h 后, 获取上清进行进一步实验.

2.2.1 生物活性测定. 根据 Sandset 建立的底物显色法, 测定重组蛋白的生物活性, 方法如下: 将 FXa 用 TBSA (0.5% BSA, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8) 配成 2 nmol/L 的溶液, 细胞培养上清用 TBSA 稀释 100 倍. 所需的试剂(FXa, S-2222, 样品等)于 37℃ 预热 5 min. 取 100 μl 上述稀释的培养上清与 100 μl 2 nmol/L FXa 混合后于 37℃ 反应 30 min, 加入 20 μl 1 mmol/L S-2222, 混匀后于 37℃ 反应 15 min. 加入 200 μl 冰醋酸终止反应, 取 300 μl 反应液用酶标仪测定 A₄₀₅ 值. 每次测定均设阳性对照组 (以 100 μl 无菌水代替 FXa, 其余同样品组)、阴性对照 (以质粒 pPic9 转化子培养上清代替样品, 其余同样品组) 计算样品对 FXa 的抑制率. 公式如下: 抑制率 = [(A₄₀₅ 阴性对照 - A₄₀₅ 样品) / (A₄₀₅ 阴性对照 - A₄₀₅ 阳性对照)] × 100%. 以 1 ml 血浆 TFPI 活性为 1 单位 (U).

2.2.2 SDS-PAGE 分析. 将培养上清用超滤管 (Amicon Ultra PL-10, 10 000 NMWL) 浓缩 100 倍, 取 10 μl 与上样缓冲液混合, 用 12% 的凝胶进行电泳, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色. 经 DGL 2000

凝胶成像系统扫描后, 以 100 ng BSA 作为定量标准, 用 Molecule Analysis 软件进行定量分析.

2.3 重组蛋白的分离与纯化

培养上清用超滤管浓缩后, 上样于经结合缓冲液 A (10 mmol/L Tris pH 7.6) 平衡的 DEAE-Sephrose Fast Flow 进行层析, 依次用结合缓冲液 A、50 mmol/L NaCl 和 800 mmol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱, 收集具有生物活性的洗脱峰. 用结合缓冲液 B (10 mmol Tris pH 7.4) 透析平衡后, 上样于经缓冲液 B 平衡的 Heparin-sepharose CL-6B 柱进行层析, 依次用结合缓冲液 B、0.3 mol/L NaCl、0.4 mol/L NaCl、及 0.8 mol/L NaCl 进行梯度洗脱. 收集具有 TFPI 活性的洗脱峰, 经透析后进行冷冻干燥将其浓缩至 1 ml, 上样于 Sephadex G-75 柱, 用结合缓冲液 B 洗脱, 收集 TFPI 活性峰, 冷冻干燥, 取少量进行 SDS-PAGE 分析.

2.4 TFPI 重组蛋白体内半衰期的测定

2.4.1 代谢半衰期.

采用氯胺 T 法以 ^{125}I 标记上述纯化的 TFPI 重组蛋白, 纯化后备用.

将 24 只 SD 大鼠(180~220 g) 随机分为 4 组, 每组 6 只. 以 125 $\mu\text{g/kg}$ 的给药剂量(以免给药剂量^[7]按体表面积折算) 将 0.75~1.0 ml ^{125}I -mTFPI、 ^{125}I -m₀TFPI、 ^{125}I -m₁TFPI 和 ^{125}I -m₂TFPI, 分别注射入 SD 大鼠尾静脉. 注射后 0.5、1、2、4、6、8 和 10 min 从眼眶静脉丛取血. 血样(200~300 μl)离心(1 000 g, 15 min)得血浆, 取血浆 100 μl 进行 ^{125}I 放射性计数, 确定 TFPI 重组蛋白在血浆中代谢情况.

2.4.2 生物活性半衰期.

以上述剂量将 TFPI 重组蛋白静脉注射入 SD 大鼠体内, 不同时间取血浆, 采用 S-2222 底物显示法测定 TFPI 活性. 活性测定方法和活性计算同前述, 阴性对照以正常血浆代替样品.

统计学处理. 取 3~6 个数据平均值记为结果, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS10.0 统计软件, 运用方差分析对各组间差异进行显著性检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性.

2.4.3 重组蛋白与肝素结合力的测定. 将重组蛋白上样于 Heparin-Sepharose 层析柱, 分别用不同浓度的 NaCl 溶液洗脱, 收集各组分洗脱液, 透析后用于活性测定以确定洗脱峰值.

2.4.4 肝素对各 TFPI 重组蛋白生物活性的影响. 在

不同浓度肝素 (0.05 U/ml、0.10 U/ml、0.25 U/ml 和 0.5 U/ml) 存在下, 观察各 TFPI 重组蛋白对 FXa 的抑制活性. 测定 TFPI 活性方法同前述.

3 结 果

3.1 基因定点突变和酵母重组菌的鉴定

DNA 测序结果显示, 在 TFPI cDNA 成功引入了预定突变, 并与 pPic9 质粒正确连接(数据未显示). GS115 菌株重组质粒经 PCR 扩增, 3 个 TFPI 突变体与 mTFPI 均于 1.3 kb 处出现特异性条带(图 1), 证明各 TFPI 突变体重组质粒与 GS115 酵母菌株实现了同源重组.

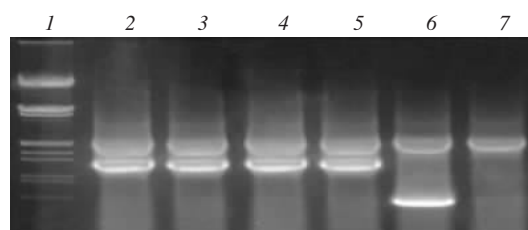


Fig. 1 Confirmation of transformants by PCR

1: Standard molecular mass marker; 2: mTFPI-pPic9-GS115; 3: m₀TFPI-pPic9-GS115; 4: m₁TFPI-pPic9-GS115; 5: m₂TFPI-pPic9-GS115; 6: pPic9-GS115; 7: GS115.

3.2 rTFPI 蛋白表达和纯化鉴定

通过电泳分析可以看出, 含有 4 种不同 TFPI-pPic9 重组质粒的酵母细胞中均在 42 ku 附近出现蛋白质条带, 而仅转化 pPic9 质粒的酵母细胞在此处未见相应条带出现(图 2). 经过纯化后, 得到了纯度满意的 TFPI 重组蛋白(图 3).

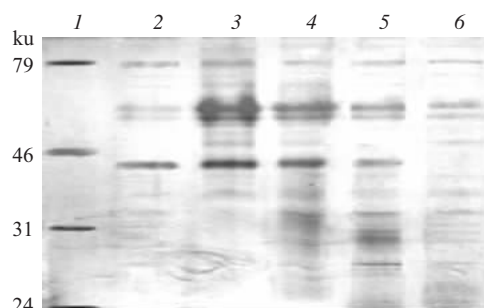


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant TFPI

1: Molecular mass marker; 2: mTFPI; 3: m₀TFPI; 4: m₁TFPI; 5: m₂TFPI; 6: pPic9.

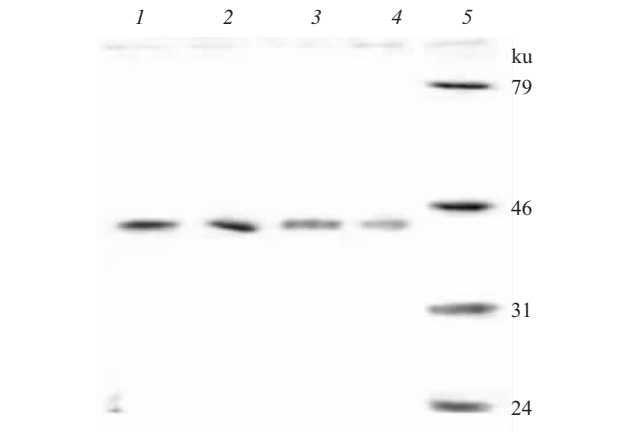


Fig. 3 SDS-PAGE of purified rTFPI proteins
1: mTFPI; 2: m₀TFPI; 3: m₁TFPI; 4: m₂TFPI; 5: Molecular mass marker.

3.3 ¹²⁵I-rTFPI 在大鼠体内血浆代谢

将注射后 0.5 min 时各 TFPI 重组蛋白血浆含量记为 100%. 如表 1 所示, 随时间的迁移, 各 TFPI 重组蛋白在 SD 大鼠血浆中含量逐渐减少. 其中 mTFPI 下降最快, m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI 3 种突变体在血浆中的清除速度均较 mTFPI 慢. 10 min 时, m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI 3 种突变体在血浆中的代谢含量分别约为 71%、78%、83%, 分别比 mTFPI 的含量 (59%) 多 12%、19%和 24%, 存在显著差异, $P<0.05$.

Table 1 Plasma clearance of ¹²⁵ I-rTFPI in mice				
t/min	mTFPI/%	m ₀ TFPI/%	m ₁ TFPI/%	m ₂ TFPI/%
0.5	100	100	100	100
1.0	93.47 ± 1.96	94.80 ± 1.13	96.40 ± 2.33	95.79 ± 4.44
2.0	87.71 ± 4.58	91.18 ± 0.79	93.81 ± 2.56	92.86 ± 2.84
4.0	83.74 ± 3.80	85.36 ± 4.01	89.54 ± 3.28	87.90 ± 4.93
6.0	75.54 ± 4.78	83.84 ± 6.63	83.54 ± 7.34	85.53 ± 4.93
8.0	64.72 ± 5.77	77.71 ± 8.65	83.03 ± 2.86	83.44 ± 5.27
10.0	59.06 ± 3.54	71.14 ± 3.04	77.99 ± 2.53	82.95 ± 5.36

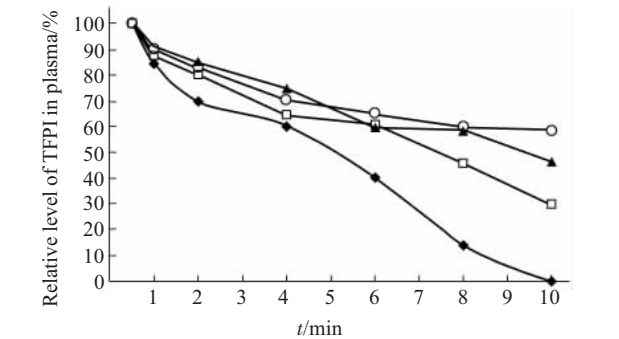


Fig. 4 Plasma relative clearance of rTFPI in 10 min
◆—◆: mTFPI; □—□: m₀TFPI; ▲—▲: m₁TFPI; ○—○: m₂TFPI.

3.4 TFPI 在体内的活性衰减

mTFPI 对 FXa 的抑制活性由 0.5 min 的 100% 下降至 10 min 时的 52%左右. 而 m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI 的活性则分别下降至 65%、68%和 75% 左右, 且下降趋势与各 TFPI 重组蛋白在 SD 大鼠血浆中代谢含量逐渐减少的趋势相似 (表 2). 说明 mTFPI、m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI 在 SD 大鼠体内对 FXa 活性的抑制作用, 随各 TFPI 重组蛋白在 SD 大鼠血浆中代谢含量的减少而下降.

从 0.5 min 至 10 min, 各 TFPI 重组蛋白在 SD 大鼠体内的活性 / 代谢含量均保持在 90%以上, 未出现明显下降. 说明各 TFPI 重组蛋白在体内代谢过程中仍保持良好活性.

Table 2 Decrease of FXa-inhibiting activity of rTFPI *in vivo*

t/min	mTFPI/%	m ₀ TFPI/%	m ₁ TFPI/%	m ₂ TFPI/%
0.5	100	100	100	100
1.0	92.55 ± 3.08	93.49 ± 1.55	93.14 ± 2.66	93.50 ± 0.24
2.0	81.95 ± 2.31	85.24 ± 0.73	86.79 ± 1.99	88.59 ± 1.85
4.0	75.30 ± 3.02	80.89 ± 1.62	85.19 ± 2.68	82.22 ± 1.66
6.0	67.74 ± 3.55	73.48 ± 1.27	77.51 ± 2.20	80.64 ± 1.18
8.0	57.81 ± 3.74	68.38 ± 1.71	72.12 ± 1.58	77.23 ± 1.17
10.0	52.56 ± 4.25	65.52 ± 3.10	67.73 ± 1.51	75.39 ± 1.65

3.5 肝素对 TFPI 活性的影响

实验结果显示, 各株 TFPI 重组蛋白抑制 FXa 的活性无明显差异, 在肝素存在 (0.1 U/ml) 时, TFPI 重组蛋白抑制 FXa 的活性明显增强 (图 5), 并且这种作用随肝素剂量增加逐渐增强 (图 6), 但各株蛋白质之间无明显区别.

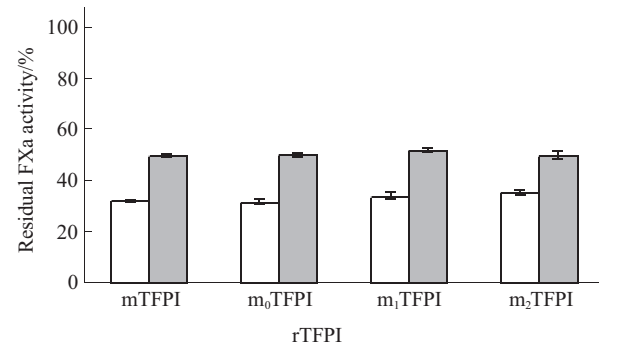


Fig. 5 Effect of heparin on the FXa inhibiting activity of rTFPI
□: Presence of heparin; ■: Absence of heparin.

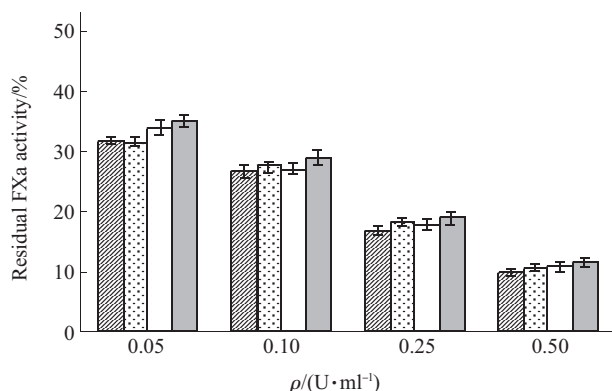


Fig. 6 The FXa inhibiting activity of rTFPI in the presence of heparin at different concentrations

▨: mTFPI; ▤: m₀TFPI; □: m₁TFPI; ■: m₂TFPI.

3.6 各重组蛋白与肝素结合力的比较

各 TFPI 重组蛋白经 Heparin-Sepharose CL-6B 层析后活性洗脱峰均出现在用 800 mmol/L NaCl 进

行洗脱时(表 3), 说明与 mTFPI 相比, 各 TFPI 突变体与肝素柱的结合能力未出现明显减弱 ($P > 0.05$).

4 讨 论

经研究发现 TFPI 羧基端 254~261 残基是碱性氨基酸(正电荷分布)最密集区域(表 2). 为减少该区正电荷, 我们将 3 个突变体(m₀TFPI、m₁TFPI 和 m₂TFPI)羧基端 254~261 的碱性氨基酸突变为酸性或中性. 发现其在大鼠体内代谢速度均比 mTFPI 减慢. 分子模拟实验发现, TFPI 的 241, 254, 260 和 261 残基是 4 个关键的电荷吸引作用位点^[9]. 本实验也证明了 254~261 残基在电荷吸引作用中的重要作用及其对体内代谢速度的影响, 且 256~261 残基的作用似乎更明显.

Table 3 Comparison of the heparin binding affinity of different rTFPI

c(NaCl)/mmol·L ⁻¹	Before washing	200	400	600	700	750	800	850	900
mTFPI	0.214	0.432	0.438	0.442	0.431	0.391	0.296	0.387	0.434
m ₀ TFPI	0.231	0.455	0.452	0.437	0.440	0.399	0.299	0.389	0.441
m ₁ TFPI	0.220	0.438	0.431	0.441	0.426	0.405	0.305	0.383	0.437
m ₂ TFPI	0.218	0.451	0.447	0.441	0.429	0.397	0.289	0.390	0.448

Table 4 The influence of mutations of TFPI₂₅₄₋₂₆₁ peptide

TFPI	Sequence	Charge	Relative half-life
mTFPI	KTKRKRRK	+0+++++	5 min
m ₀ TFPI	DDDDKRRK	-----+	7.5 min
m ₁ TFPI	KTAAAAAA	+0000000	9.5 min
m ₂ TFPI	KTSSSSSS	+0000000	>10 min

K: Lysine; T: Threonine; R: Arginine; D: Aspartate; A: Alanine; S: Serine;+: Positive; 0: Neutral; -: Negative

羧基端正电荷对 TFPI 生物功能的正常发挥具有重要作用, 除了抗凝血活性以外, TFPI 抑制血管平滑肌细胞增生和肿瘤细胞生长的活性也依赖于其羧基端的存在. TFPI K3 结构域和羧基端的碱性氨基酸虽不直接抑制 FXa, 但却是 TFPI 抑制 FXa 及其在 TF 诱发的外源性凝血中发挥抗凝血功能所必需的^[1,2]. 与全长 TFPI 相比, 缺失羧基端的 TFPI 对 TF/FV II a 复合物的抑制能力不变, 但抑制 FXa 及 FXa 诱发的凝血作用均减弱^[3]. 因此在延长 TFPI 的血浆清除时间的同时, 最好保留其羧基端.

鉴于 TFPI 羧基端碱性氨基酸对其抑制 FXa 的活性关系密切, 本文研究了突变对其 FXa 抑制活性的影响作用, 我们的结果显示 3 个 rTFPI 突变体抑制 FXa 的作用无明显减弱. 因此可以推测其对 TF/FV II a 复合物和 TF 诱发的外源性凝血的抑制作用也无明显变化.

通过 K3 结构域和羧基端 HBS-2、HBS-1 肝素结合位点^[14~16], 肝素与 TFPI 结合并提高其抑制 FXa 的活性. 我们通过测试与 Heparin-Sepharose 结合后的 TFPI 被洗脱下来所需的盐浓度, 可以了解 TFPI 与肝素的亲和力. 我们的结果显示, 上述 4 种 rTFPI 均在 NaCl 浓度为 800 nmol/L 时被洗脱下来, 提示突变体与肝素的结合能力未受影响. 肝素的存在明显提高了各羧基端突变体抑制 FXa 的活性, 并与野生型 TFPI 无明显差异. 再次证明各 rTFPI 突变体与肝素的结合力未有明显改变.

有研究表明, 人工合成 TFPI 羧基端的 254~265 氨基酸是有效结合肝素的最小序列单位, 改变 Arg257 和 Arg259 对 TFPI 结合肝素的影响最大^[16].

但由于人工合成的肽段与全长 TFPI 构造不同, 全长 TFPI 的 K3 结构域也参与肝素的结合作用, 可能是导致这种差异存在的主要原因.

我们的研究结果表明, 3 个羧基端正电荷减弱的 rTFPI 突变体在体内代谢时间得到不同程度的延长, 且其 FXa 抑制活性及其与肝素的结合能力未有明显改变. 因此我们认为, 通过基因突变的方法减弱 rTFPI 羧基端正电荷性, 以期延缓 rTFPI 在体内的清除速度是可行的, 这为 TFPI 在临床上的应用研究提供了一种思路与方法. 此外, 体内存在的某些酶类如人白细胞弹性酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶及基质金属蛋白酶等^[17,18], 可以通过多个位点酶切并灭活 TFPI, 从而加速其体内代谢. 如果适当替换某些氨基酸, 将减少蛋白酶的消化作用并极大地延长 TFPI 在体内的代谢. 再配合聚乙二醇修饰、微球控释和二氧化碳超临界涂层等技术修饰 TFPI 分子, 有可能得到更好的效果. 作为延长 TFPI 代谢, 制备 TFPI 长效制剂的新思路和新方法, 这些研究都蕴含着巨大的价值.

参 考 文 献

- 1 Bajaj M S, Birktoft J J, Steer S A, *et al.* Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 2001, **86** (4): 957~972
- 2 Ho G Y, Narita M, George J, *et al.* Recombinant full-length tissue factor pathway inhibitor fails to bind to the cell surface: implications for catabolism *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2000, **95** (6): 1973~1978
- 3 Wesselschmidt R, Likert K, Girard T, *et al.* Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa. *Blood*, 1992, **79** (8): 2004~2010
- 4 Dahm A, Van Hylchama Vlieg A, Bendz B, *et al.* Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood*, 2003, **101** (11): 4387~4392
- 5 Hembrough T A, Ruiz J F, Swerdlow B M, *et al.* Identification and characterization of a very low density lipoprotein receptor-binding peptide from tissue factor pathway inhibitor that has anti-tumor and antiangiogenic activity. *Blood*, 2004, **103** (9): 3374~3380
- 6 Kopp C W, Holzenbein T, Steiner S, *et al.* Inhibition of restenosis by tissue factor pathway inhibitor: *in vivo* and *in vitro* evidence for suppressed monocyte chemoattraction and reduced gelatinolytic activity. *Blood*, 2004, **103** (5): 1653~1661
- 7 Palmier M O, Hall L J, Reisch C M, *et al.* Clearance of recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in rabbits. *Thromb Haemost*, 1992, **68** (1): 33~36
- 8 Warshawsky I, Bu G, Mast A, *et al.* The carboxy terminus of tissue factor pathway inhibitor is required for interacting with hepatoma cell *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest*, 1995, **95** (4): 1773~1781
- 9 Bai H, Ma D, Zhang Y G, *et al.* Molecular design and characterization of recombinant long half-life mutants of human tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 2005, **93** (6): 1055~1060
- 10 Narita M, Bu G, Olins G M, *et al.* Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue factor pathway inhibitor *in vivo*. *J Biol Chem*, 1995, **270** (42): 24800~24804
- 11 Warshawsky I, Broze G J Jr, Schwartz A L, *et al.* The low density lipoprotein receptor-related protein mediates the cellular degradation of tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (14): 6664~6668
- 12 Ho G, Broze G J Jr, Schwartz A L. Role of heparan sulfate proteoglycans in the uptake and degradation of tissue factor pathway inhibitor-coagulation factor Xa complexes. *J Biol Chem*, 1997, **272** (27): 16838~16844
- 13 Holst J, Lindblad B, Westerlund G, *et al.* Pharmacokinetics and delayed experimental anti-thrombotic effect of two domain non-glycosylated tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res*, 1996, **81** (4): 461~470
- 14 Orlando R A, Exner M, Czekay R P, *et al.* Identification of the second cluster of ligand-binding repeats in megalin as a site for receptor-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (6): 2368~2373
- 15 Mine S, Yamazaki T, Miyata T, *et al.* Structural mechanism for heparin-binding of the third kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*, 2002, **41** (1): 78~85
- 16 Ye Z, Takano R, Hayashi K, *et al.* Structural requirements of human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and heparin for TFPI-heparin interaction. *Thromb Res*, 1998, **89** (6): 263~270
- 17 Ohkura N, Enjyoji K, Kamikubo Y, *et al.* A novel degradation pathway of tissue factor pathway inhibitor: incorporation into fibrin clot and degradation by thrombin. *Blood*, 1997, **90** (5): 1883~1892
- 18 Petersen L C, Bjorn S E, Nordfang O. Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 1992, **67** (5): 537~541

Decreasing the Clearance Rate of Tissue Factor Pathway Inhibitor From Plasma by Selectively Mutating The Amino Acid Residues in Its C-Terminal Region*

YU Bo¹⁾, LUO Shi-Ping¹⁾, SONG Li-Ping¹⁾, LENG Xi-Gang^{1)**}, ZHAO Ming-Hui²⁾, NIU Hui-Sheng²⁾

¹⁾*Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,*

Tianjin Key Laboratory of Biomedical Materials, Tianjin 300192, China;

²⁾*Institute of Radiomedicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)*

Abstract Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) plays a vitally important role in the blood coagulation system. Recent studies showed that TFPI could also inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells. Studies has suggested that TFPI may find wide applications for the therapy of various diseases such as sepsis, DIC, vascular stenosis, atherosclerosis, and myocardial infarction, etc. However, the rapid clearance of TFPI from the circulation remains to be one of major drawbacks to its clinical application. The aim of the present study is to prolong the half-life of recombinant TFPI while maintaining its biological activities by reducing the interaction between TFPI and cell surface, which is mediated by the negative charges on the membrane of the cells and the positive charge on the molecule of TFPI. For this purpose, three rTFPI mutants, m₀TFPI, m₁TFPI, and m₂TFPI, were generated by introducing mutations in the DNA sequences coding for the C-terminal amino acid sequences. The clearance rate of the experimental group (three rTFPI mutants) and the control group (wild-type TFPI, namely mTFPI) in rats was investigated. The inhibitory function on FXa and the heparin binding capacity of the TFPI mutants were also studied. It was shown that at 10 min after intravenous injection, (59.06 ± 13.54) % of the injected mTFPI remained in the circulation, while (71.14 ± 13.04) % of the m₀TFPI, (77.99 ± 2.53) % of the m₁TFPI, and (82.95 ± 11.36) % of the m₂TFPI were still in the circulation. The relative half-life of m₀TFPI, m₁TFPI and m₂TFPI were prolonged 0.5, 0.9, and more than 1 times respectively in comparison with that of mTFPI, while their FXa inhibiting activity and heparin-binding capacity were little changed.

Key words tissue factor pathway inhibitor(TFPI), gene mutation, plasma clearance

*This work was supported by a grant from The Key Project of Tianjin Natural Sciences Foundation (033801611).

**Corresponding author . Tel/Fax: 86-22-87891191, E-mail: lengxg@bme.org.cn

Received: September 6, 2006 Accepted: October 9, 2006