

重组活性小鼠组织因子及其阻断性 单抗的制备与应用*

裴新辉^{1,2)} 池 珊²⁾ 王尽淘²⁾ 林志新¹⁾ 张雪洪¹⁾ 耿建国^{2)**}

¹⁾ 上海交通大学生命科学与技术学院, 上海 200240;

²⁾ 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子细胞生物学实验室, 上海 200031)

摘要 组织因子是一种位于细胞膜上的糖蛋白, 是外源性凝血过程的关键启动因子, 近年来其在肿瘤细胞迁移等其他过程中的重要作用也已逐渐被揭示. 构建了融合有 His 标签的小鼠组织因子胞外区段重组蛋白基因, 利用昆虫杆状病毒蛋白表达系统成功表达并得到大量可溶性重组小鼠组织因子. 利用血浆凝集实验和鼠尾流血时间实验对此重组小鼠组织因子进行的活性检测表明, 此重组蛋白具有良好的生物活性, 可以引起血浆凝集或缩短鼠尾流血时间. 同时, 利用此重组蛋白为抗原, 制备了小鼠组织因子的小鼠源功能阻断性单克隆抗体, 在血浆凝集实验中证明其对小鼠组织因子的活性有明显抑制作用. 利用此阻断性单抗, 成功地在小鼠深静脉血栓模型中减轻了血栓形成, 证明组织因子在深静脉血栓的病程发展中起重要作用, 这也是组织因子阻断性单抗在此类动物模型中的首次成功应用. 通过此项工作, 成功地建立了大量制备具有良好生物活性的重组小鼠组织因子蛋白的方法, 并进而得到了小鼠组织因子功能阻断性单抗, 为利用各种小鼠动物模型对组织因子在各项生命活动中的作用进行深入研究奠定了良好的基础.

关键词 小鼠组织因子, 昆虫杆状病毒, 昆虫细胞 S₉, 功能阻断性单克隆抗体

学科分类号 Q71, Q46

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00639

组织因子(tissue factor, TF)是一种 47 ku 的膜糖蛋白, 组成性表达于一些血管外组织, 形成一个“止血封套”包围着血管系统. 在循环系统中, 组织因子通常不表达或者表达水平极低, 静息态的单核细胞/巨噬细胞和血管内皮细胞上的组织因子表达量极低或不可测, 而在血栓形成过程中会有显著上调^[1~3]. 组织因子是凝血过程的一个关键启动因子^[4~6], 也是各类血栓疾病中维持高凝状态的一个重要决定因子^[7]. 组织因子发挥生理功能的基本机制是: 与凝血因子 VII/VIIa 形成复合物, 将因子 IX 水解为 IXa, 将 X 活化为 Xa, 从而将前凝血酶源活化成凝血酶, 而凝血酶降解纤维蛋白原为纤维蛋白, 刺激血小板激活并聚集, 导致凝血, 形成血栓, 阻止过度生理出血^[8~10]. 如果这个凝血级联过程受到抑制, 则可能引起凝血的障碍导致血友病^[11]. 除了在血凝血栓中的功能外, 组织因子在肿瘤的生长与转移等生理或病理过程中也发挥着重要作用^[12].

虽然组织因子已被发现很多年, 但对其生物功能的研究和应用仍存在一些难点, 例如全身性敲除组织因子基因会导致小鼠胚胎致死^[13~15], 因此需要

对其进行组织特异或时间特异的基因敲除或突变研究, 以确认其各项生物功能的重要性. 同时, 利用各种小鼠疾病模型进行研究, 很多情况下也需要使用大量具有生物活性的小鼠组织因子蛋白或者其功能阻断性单抗, 用来直接研究组织因子在不同疾病模型发展过程中的作用. 虽然已有报道, 利用重组人组织因子蛋白进行研究^[16], 或用大鼠源功能阻断性单抗抑制小鼠组织因子功能^[17, 18], 但由于人、大鼠与小鼠之间的种属差异所导致的免疫原性等问题, 限制了重组人组织因子蛋白或异源阻断性单抗在各种小鼠模型中的有效应用, 不利于对组织因子生物功能进行系统深入的阐释.

基于此, 在本项研究中, 我们重组构建了小鼠组织因子, 利用昆虫表达系统对其进行了高效表达

* 国家自然科学基金资助项目(30721065, 30623003, 30700409, 30771960, 30630036).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54921351, E-mail: genglab@gmail.com

收稿日期: 2008-10-05, 接受日期: 2008-11-07

及纯化,在体外和体内实验系统中都确认了该重组蛋白的生物活性,成功建立了大量制备具有生物活性的小鼠组织因子的方法和系统.我们还利用此重组蛋白制备了小鼠源功能阻断性单抗,并在体外和体内实验系统中都证明了其对小鼠组织因子活性的有效抑制,为将来进一步深入研究组织因子在慢性血栓或肿瘤的生长和转移等过程中的作用奠定了坚实基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

昆虫杆状病毒表达系统(baculovirus expression system; BaculoGold®)购自 BD Pharmingen 公司.昆虫培养液(包含 IPL-41 insect medium、Pluonic F-68、Yeastolate)购自 Invitrogen 公司.镍金属螯合柱(Talon™ metal affinity chromatography)购自 BD Clontech 公司.磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸购自 Avanti 公司. Protein A 凝胶颗粒购自 GE Healthcare 公司.重组 TNF- α 购自 R&D 公司.小鼠亚型测定试剂盒购自 Sigma 公司. BALB/c, C-57 实验小鼠购自中国科学院上海实验动物中心.上海生工生物技术公司提供 PCR 引物合成及 DNA 测序服务.

1.2 重组蛋白表达质粒的构建

我们构建了小鼠组织因子的胞外区,该片段包括该蛋白质的信号肽以便该蛋白质分泌到细胞培养上清中,同时为了便于纯化,在其 C 端通过 PCR 方法加入了 6 个连续的组氨酸残基.其前置引物跟后置引物分别为: 5' TATAAGGATCCATGGCGA-TCCCTCGTGC GCCC 3'; 5' GAAGTCAGATCTTC-AGTGATGATGATGATGATGTTCTCCAGGAAA-CTCTTCCA 3'.

用该引物从小鼠组织因子 cDNA 质粒中扩增,收集该 DNA 链并用 *Bam*H I /*Bgl* II 双酶切,然后构建入昆虫病毒表达载体 pVL1393.最后经 DNA 测序无误后备用.相关分子生物学实验方法根据《分子克隆实验指南》(第三版)中所述的条件和方法进行.

1.3 重组蛋白的表达纯化及鉴定

构建好的重组小鼠组织因子表达质粒经测序检测确认无误后,根据 BD Pharmingen 公司的杆状病毒表达系统使用手册,制备携带小鼠组织因子基因序列的重组杆状病毒,并在昆虫细胞 S₉ 中进行蛋白表达.具体步骤简述如下:首先将质粒用昆虫杆

状病毒进行包装,并筛选高表达病毒株,然后用一定量的病毒(MOI \approx 2 \times 10⁸/ml)感染 S₉ 昆虫细胞,并用无血清昆虫细胞培养液培养 48 h 并表达重组蛋白.最后收集细胞培养上清,利用重组小鼠组织因子 C 端的连续 6 个 His 与镍金属螯合柱的亲亲和特性将其纯化出来,具体步骤根据 BD Clontech 公司的 Talon™ metal affinity chromatography 使用手册.取 2 μ g 纯化得到的重组小鼠组织因子,于非还原上样缓冲液中煮沸变性,经 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳后用考马斯亮蓝染色法鉴定该蛋白质的纯度.另取 0.5 μ g 重组小鼠组织因子,于非还原上样缓冲液中煮沸变性,经 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白质电转到醋酸纤维素膜(Millipore 公司)上,利用本实验室自制的可识别小鼠组织因子的兔源组织因子多克隆抗体(pAb-TF)进行检测,以进一步确定该重组蛋白是否为目的蛋白.

1.4 血浆的制备

首先抽取健康志愿者全血 10 ml,加入 1 ml ACD 抗凝.室温 200 g 离心 10 min,取上层细胞(含有血小板的血浆),室温 1 400 g 离心 10 min 得到不含血小板的血浆备用.小鼠采取心脏穿刺法采血,在 1 ml 一次性注射器中预装 0.1 ml ACD,然后利用心脏穿刺的方法从健康 BALB/c 小鼠中采取鼠全血约 0.5 ml.进一步分离鼠血浆的方法与分离人血浆的方法一致.用于凝血实验的血浆是人鼠血浆的混合血浆.将人血浆和鼠血浆按照 9:1 的比例混匀,并用于体外血浆凝集实验.

1.5 小鼠组织因子活性标准曲线的制定

采取超声法制备磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸脂质体,具体方法根据 Avanti 公司磷脂使用手册.制备好脂质体后,将脂质体与小鼠组织因子在 4℃ 混匀静置过夜,其中磷脂酰胆碱与小鼠组织因子的摩尔比为 8 700:1.取混合血浆 50 μ l 加入不同浓度的组织因子脂质体混合液 50 μ l 并于 37℃ 孵育 2 min,随即加入 50 μ l 25 mmol/L CaCl₂,用全自动凝血仪(ST-4; Diagnostica Stago)记录血浆凝集时间,每个浓度点重复 5 次并取其凝集时间的平均值.分别采用 1、3、10、30、100 和 300 nmol/L 组织因子脂质体混合液,并分别以 300 nmol/L 组织因子或最大浓度的脂质体为系统阴性对照.最后以组织因子浓度(nmol/L)的对数为 *x* 轴、凝集时间(s)为 *y* 轴做标准曲线.

1.6 小鼠组织因子单克隆抗体的制备

取健康 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 10 只,以

20 μg 纯重组鼠组织因子蛋白作为抗原皮下注射免疫,并用 ELISA 方法检测其血清的抗体效价. 取抗体效价最高的 2 只小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP20 融合,然后用 ELISA 方法筛选单克隆抗体细胞株,并用鼠单克隆抗体亚型试剂盒确定单抗的亚型,具体方法参见文献[19]. 将 1 μg 获得的单抗偶联到 10 μl Protein A 凝集颗粒上,所用的缓冲液为 TBS/T(20 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mol/L NaCl, 0.1% Triton X-100). 然后用它们分别与 1 μg 重组鼠组织因子在该缓冲液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,这些样品用缓冲液彻底清洗以去除未结合的蛋白质. 清洗干净的凝胶颗粒在非还原上样缓冲液中煮沸变性后,用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳予以分离,然后将凝胶中的蛋白质电转到醋酸纤维素膜(Millipore 公司)上,最后用兔源组织因子多克隆抗体(pAb-TF)予以检测.

1.7 流式细胞仪实验

按照文献[20]的方法从 C57 小鼠中分离小鼠腹腔巨噬细胞,并用 DMEM 培养液在细胞培养皿中分别培养. 部分细胞用 1 000 单位的 TNF- α 刺激 4 h 以使得巨噬细胞表达组织因子. 然后用细胞刮刀收集巨噬细胞,用终浓度 1%的多聚甲醛予以固定. 该细胞首先以 1.0×10^6 个对应 2 μg 抗体(T5 或 mouse IgG; mIgG)的比例与抗体充分孵育,然后再与 FITC- 标记的抗鼠二抗孵育,最后用流式细胞仪检测该细胞表面是否有组织因子的表达.

1.8 抗体相对亲和力的测定

我们用 ELISA 法测量了 T5 与 TF 相互结合的相对亲和力. 方法简述如下: 将 1 mg/L 小鼠组织因子按 100 μl /孔铺板,然后用 10% BSA 封闭,分别加入 133、67、33、17 nmol/L 等浓度的 T5,即 T5 从 133 nmol/L 开始以 1 倍量的梯度开始稀释,共稀释 15 个梯度,100 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,用 TBS/T 洗净后,加 HRP- 标记的抗小鼠 IgG 二抗,最后用 TMB 底物显色,磷酸终止反应后读取 A_{450} 值. T5 与小鼠组织因子结合的 A_{450} 值下降至最高值的 50%时,其浓度即为 T5 的解离常数,以 nmol/L 表示.

1.9 小鼠组织因子阻断性单抗的活性鉴定

取 50 μl 小鼠组织因子脂质体混合液(组织因子浓度为 11 nmol/L)分别与 11 nmol/L 小鼠组织因子单抗(T1, T2, T3 和 T5)或小鼠免疫球蛋白(mIgG) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,或以相同的条件与不同浓度的 T5(1.1, 2.2, 5.5 或 11 nmol/L)孵育. 然后根据 1.5

中描述的方法用全自动凝血仪记录血浆凝集时间,每个浓度点重复 5 次,取其凝集时间的平均值,并以此判断这些单抗对组织因子体外活性的影响.

1.10 小鼠鼠尾流血时间实验

取健康 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠,分别尾静脉注射 10 pmol 小鼠组织因子脂质体混合液或等体积的空脂质体,10 min 后将小鼠尾端剪掉 3 mm,并将小鼠尾巴浸入 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中,记时至血流停止. 每个实验组分别有 10 只小鼠.

1.11 小鼠深静脉血栓模型(Deep Vein Thrombosis, DVT)

取健康 7 周龄雄性 C57 小鼠,分别尾静脉注射 25 μg 小鼠组织因子阻断性单抗或其对照抗体(mIgG),10 min 后麻醉小鼠,对其深静脉予以手术结扎. 48 h 后取深静脉血栓,测量其重量和长度,得到重量长度比(mg/mm),并用 Student's *t*-test 予以统计分析. 每个实验组分别有 7 只小鼠.

2 结 果

2.1 重组小鼠组织因子蛋白表达的检测

利用金属螯合柱亲和和层析和分子筛层析进行纯化,每升培养液能纯化得到 4~5 mg 重组小鼠组织因子. 在蛋白质电泳后利用考马斯亮蓝染色法对纯化得到的重组小鼠组织因子进行检测,发现该重组蛋白纯度大于 90%,分子质量约为 33 ku(图 1a). 同时,利用兔源组织因子多克隆抗体对该重组蛋白进行免疫性鉴定(Western blotting),确认其可被抗组织因子多抗所识别,证明所纯化得到的重组蛋白确为重组小鼠组织因子(图 1b).

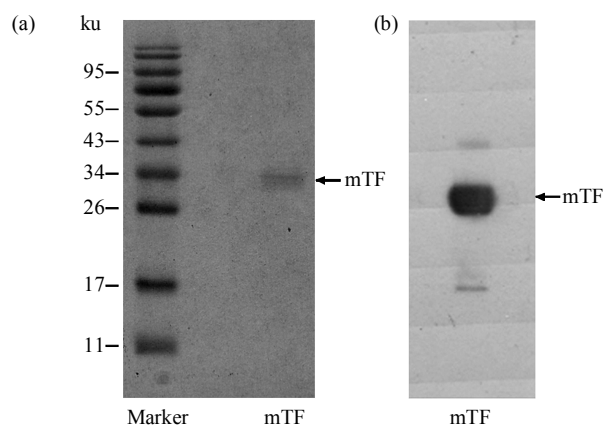


Fig. 1 Identification of purified recombinant mouse tissue factor

(a) 12% non-reducing gel to identify recombinant mouse tissue factor (mTF), Comassie brilliant blue staining. (b) 12% non-reducing gel to identify mTF by Western blot, polyclonal rabbit anti-tissue factor antibodies (pAb-TF) was used.

2.2 重组小鼠组织因子凝血活性的测定

为检测所获得的重组小鼠组织因子是否具有良好的生物活性，我们利用血浆凝集实验在体外水平对此重组蛋白进行了活性检测。由于组织因子发挥生物活性需要结合在细胞膜或磷脂层上，制备了重组小鼠组织因子脂质体混合液，利用 Stago 全自动凝血仪对其进行了凝血活性测定。研究结果显示，此小鼠组织因子脂质体混合液可以有效引起血浆凝集，并且凝集时间与脂质体混合液中重组小鼠组织因子的量(1、3、10、30、100 和 300 nmol/L)成反比，从而得到了小鼠组织因子凝血活性的标准曲线(图 2)。另外，如果仅仅是加入最大量的重组小鼠组织因子蛋白(300 nmol)的凝血时间超过 500 s，而加入最大量的脂质体(脂质体原液)的凝血时间约为 220 s，这更进一步说明组织因子只有结合了脂质体才有活性。

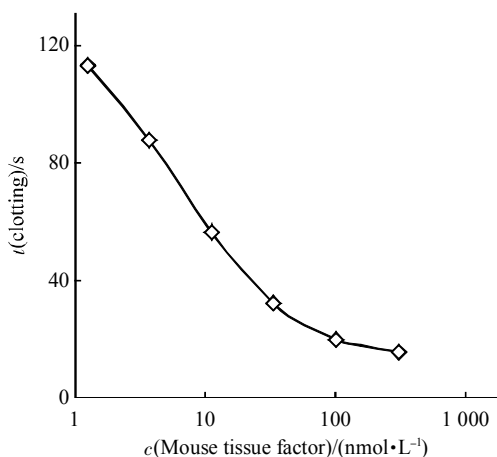


Fig. 2 Standard curve for a typical relipidated mTF preparation

The mTF mole concentration of testing sample was indicated on the x-axis. The clotting time of testing sample was indicated on the y-axis.

2.3 利用小鼠鼠尾流血时间模型确证重组小鼠组织因子的凝血活性

为进一步在体外水平确证所获得的重组小鼠组织因子的生物活性，我们采用了小鼠鼠尾流血时间模型对重组小鼠组织因子进行了生物活性检测。研究结果显示，与注射空脂质体实验组相比，在健康 BALB/c 小鼠尾静脉注射 10 pmol 重组小鼠组织因子脂质体混合液 10 min 之后，把小鼠尾端剪掉 3 mm，将小鼠尾巴浸入 37℃ 生理盐水中并记时至血流停止，鼠尾凝血时间明显缩短(图 3)，从而确证了此重组小鼠组织因子在体内也可发挥良好的生物活性。

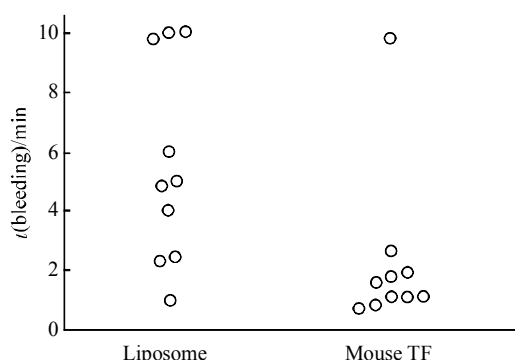


Fig. 3 Mouse tissue factor (mTF) enhancing blood coagulation

10 pmol *i.v.* injected relipidated mTF could enhance blood coagulation in the mouse bleeding time assay, and mice injected with equal amount blank liposome served as controls. 10 mice for each group.

2.4 小鼠组织因子单抗的制备及其亲和力鉴定

虽然目前已有大鼠源的小鼠组织因子阻断性单抗^[17, 18]，但在小鼠体内的免疫原性决定了其应用的局限性。我们以小鼠组织因子为抗原免疫小鼠，最后通过筛选得到该蛋白质的单克隆抗体并检测了其亚型(T1、T2、T3、T5；都为 IgG₁ 亚型)。首先通过免疫共沉淀实验证明，与 mIgG 相比这 4 种单抗都可以免疫沉淀重组小鼠组织因子，说明这些单

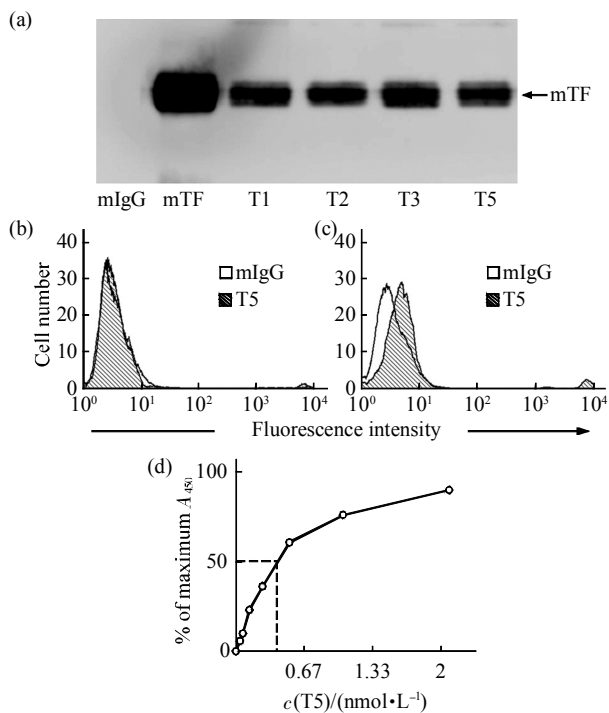


Fig. 4 Characterization of mTF monoclonal antibodies

(a) mTF monoclonal antibodies (T1, T2, T3 and T5) can immunoprecipitate mTF compared to mIgG. pAb-TF was used to identify mTF in Western blot; pure mTF as positive control. (b, c) T5 can identify mTF in TNF- α -stimulated (c) mouse macrophage membrane in FACS assay, compared with resting (b) mouse macrophage. (d) The relative affinity between T5 and mTF.

抗都可识别天然状态的小鼠组织因子蛋白(图 4a)。据文献报道,只有在 TNF- α 或其他细胞因子刺激下巨噬细胞膜表面才会表达组织因子^[1-3],在流式细胞仪实验中,我们发现 T5 不能识别静息态的巨噬细胞(图 4b)但可以识别 TNF- α 刺激过的巨噬细胞(图 4c),这一结果进一步证明了该抗体的特异性。然后我们测量了 T5 与小鼠组织因子的相对亲和力,发现 T5 与小鼠组织因子的结合值下降至原来的 50%时, T5 的浓度约为 0.4 nmol/L,实验结果显示, T5 与小鼠组织因子的解离常数约为鼠 0.4 nmol/L (图 4d)。

2.5 小鼠组织因子阻断性单抗的筛选及其活性鉴定

我们检测了这些抗体是否可以影响鼠组织因子的生物活性。在小鼠组织因子引起的体外血浆凝集实验中发现,如用等摩尔量(11 nmol/L)的抗体(T1、T2、T3 和 T5)与小鼠组织因子预先孵育,都可以部分抑制小鼠组织因子的凝血活性,在这 4 种抗体中 T5 的抑制能力稍强(图 5a)。我们又检测了不同浓度的 T5(1.1、2.2、5.5 或 11 nmol/L)对小鼠组织因子(11 nmol/L)活性的抑制,发现小鼠组织因子活性的丧失与 T5 的量成正比(图 5b),进一步说明 T5 对小鼠组织因子活性的阻断是特异的。

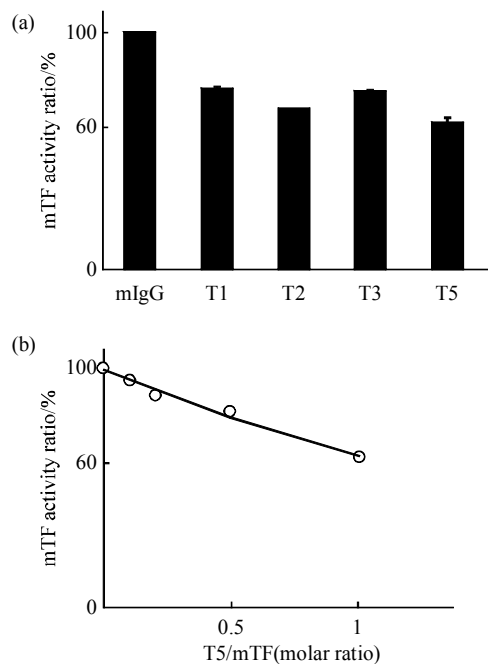


Fig. 5 The function-blocking activity of mTF monoclonal antibodies

(a) Compared to mIgG, mTF monoclonal antibodies can partly inhibit MTF activity in the *in vitro* clotting assay. (b) The function-blocking activity of T5 is dose-dependent.

2.6 小鼠组织因子阻断性单抗可以有效抑制小鼠深静脉血栓形成

在体外血浆凝集实验中证明这些单抗可以有效抑制小鼠组织因子的活性后,我们进一步利用这种单抗在小鼠深静脉血栓形成模型中研究了组织因子在血栓发生中的作用。我们发现,与对照 mIgG 相比,在尾静脉注射小鼠组织因子功能阻断性单抗 T5 约 10 min 之后,对小鼠的深静脉进行手术结扎,48 h 后取出结扎的深静脉进行分析,发现深静脉血栓形成明显减弱(图 6)。此结果证明了组织因子在深静脉血栓发生中的重要性,同时也确证了 T5 在体内实验系统中的成功应用。

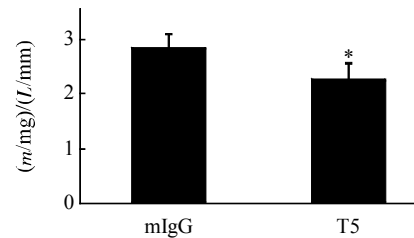


Fig. 6 mTF function-blocking antibody T5 reduces thrombus formation in the murine DVT model

in vivo. Injected 25 μ g T5 could reduce thrombus formation in the murine DVT model, mIgG served as control. 7 mice are used for each group; Student's *t*-test is used for statistical analysis. Error bars present s.e.m.; * $P = 0.014$.

3 讨 论

作为一种细胞表面的糖蛋白,合适的糖基化修饰是组织因子发挥生物活性的重要保障^[21]。我们所制备的重组小鼠组织因子含有 257 个氨基酸,预测分子质量应为 29 ku,但通过 SDS-PAGE 后的考马斯亮蓝染色发现,该重组小鼠组织因子分子质量约为 33 ku(图 1),实际分子质量略大于预测分子质量,说明此重组蛋白在昆虫细胞表达过程中应该已被糖基化修饰,这充分说明了选择昆虫杆状病毒表达系统大量制备有活性的重组组织因子的合理性。

根据已往报道,只有结合在细胞膜脂质层上,组织因子才能正常发挥生物活性,而且通常只有在磷脂酰丝氨酸存在的条件下,组织因子及其复合体的酶活性才能达到最佳状态^[22]。在研究中我们也发现,单纯的重组小鼠组织因子并不能引起血浆凝集,只有与磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸脂质体混合之后,才可以有效引起血凝,说明只有结合在磷脂层表面的组织因子才可有效发挥生物活性。同时,也注意到此重组蛋白并没有跨膜区,但其在蛋白质 C 端有 6 个连续的携带正电荷的组氨酸,而磷

脂酰丝氨酸则携带负电荷, 由此推测, 该分子很可能是通过这种电荷间的相互吸引而结合到脂质体表面, 从而保证了重组小鼠组织因子在没有跨膜区的情况下, 仍然可以与脂质体发生有效混合, 发挥生物功能.

在血浆凝集实验中, 我们证实了所获得的重组小鼠组织因子具有良好的生物活性, 并且得到了其凝血功能的标准曲线, 这对今后在小鼠组织因子凝血功能方面的研究具有良好的指导意义. 在实验动物体内的凝血实验中发现, 健康小鼠注射重组小鼠组织因子脂质体混合物之后, 凝血明显加快, 证明了该重组蛋白可在小鼠体内发挥生物活性, 这就为在其他各种小鼠疾病模型中进行组织因子的介入研究奠定了坚实的基础.

虽然已有国外实验室制备了小鼠阻断性单抗, 但为大鼠来源, 因其在小鼠体内的免疫原性导致其小鼠模型中的应用有很大局限性, 尤其不适于在血栓形成或者肿瘤生长和转移等时间较长的病理过程中进行研究. 我们利用重组小鼠组织因子蛋白免疫小鼠, 成功制备了其功能阻断性单克隆抗体, 并在体外和体内实验系统中都确认了其抑制活性. 在小鼠深静脉血栓模型中, 我们利用阻断性单抗证明了组织因子在该模型中的重要性. 这就为将来在更长期的血栓或其他实验模型中进一步研究组织因子的功能奠定了良好基础. 同时我们也发现, 目前筛选到的4个单抗都有一定的功能阻断活性, 考虑到组织因子相对较小(33 ku), 而抗体则大得多, 所以不能排除这些单抗仅仅是因为空间位阻而抑制了组织因子的活性, 对这些单抗的具体结合表位需要进一步的研究.

综上所述, 我们成功建立了大量制备具有良好生物活性的重组小鼠组织因子的技术和系统, 并成功制备了小鼠组织因子功能阻断性单抗. 在下一步的研究中, 将利用此重组蛋白和阻断性单抗, 对组织因子在凝血和肿瘤等各个方面的生物功能进行更深入的研究. 可以通过控制此重组蛋白或阻断性单抗的注射量, 对组织因子的体内功能进行更精确的分析. 在出血症小鼠模型中, 可以研究需要多少量的小鼠组织因子才能恢复其正常凝血功能, 同时不会引起血栓等后遗症. 我们还可以用它们来精细研究组织因子与肿瘤的生长与转移的关系. 这些研究将对组织因子的生物功能进行更深入的阐释, 并将有力促进相关的凝血、血栓和肿瘤等方面的临床应用.

参 考 文 献

- 1 Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, *et al.* Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF- α signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *FASEB J*, 2001, **15**(1): 230~242
- 2 Osterud B. Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1995, **6**(Suppl 1): S20~25
- 3 Parry G C, Mackman N. Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**(5): 612~621
- 4 Tilley R, Mackman N. Tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2006, **32**(1): 5~10
- 5 Polgar J, Matuskova J, Wagner D D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost*, 2005, **3**(8): 1590~1596
- 6 Del Conde I, Shrimpton C N, Thiagarajan P, *et al.* Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 2005, **106**(5), 1604~1611
- 7 Steffel J, Luscher T F, Tanner F C. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 2006, **113**(5): 722~731
- 8 Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost*, 1997, **78**(1): 747~754
- 9 Key N S, Bach R R. Tissue factor as a therapeutic target. *Thromb Haemost*, 2001, **85**(3): 375~376
- 10 Morrissey J H. Tissue factor: in at the start ... and the finish?. *J Thromb Haemost*, 2003, **1**(5): 878~880
- 11 Hedner U, Ezban M. Tissue factor and factor VII a as therapeutic targets in disorders of hemostasis. *Annu Rev Med*, 2008, **59**: 29~41
- 12 Rickles F R, Patrierno S, Fernandez P M. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*, 2003, **124**(3 Suppl): 58S~68S
- 13 Carmeliet P, Mackman N, Moons L, *et al.* Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 1996, **383** (6595): 73~75
- 14 Bugge T H, Xiao Q, Kombrinck K W, *et al.* Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (13): 6258~6263
- 15 Toomey J R, Kratzer K E, Lasky N M, *et al.* Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*, 1996, **88**(5): 1583~1587
- 16 Paborsky L R, Tate K M, Harris R J, *et al.* Purification of recombinant human tissue factor. *Biochemistry*, 1989, **28** (20): 8072~8077
- 17 Kirchhofer D, Moran P, Bullens S, *et al.* A monoclonal antibody that inhibits mouse tissue factor function. *J Thromb Haemost*, 2005, **3**(5): 1098~1099
- 18 Christoph A, Janice R, Katherine C, *et al.* Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *J Exp Med*, 2007, **204**(7): 1595~1601

- 19 Frederick M A, Roger B, Rober E K, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995. 11.0.3~11.11.4
- 20 Zeichner S L. Isolation and characterization of macrophage phagosomes containing infectious and heat-inactivated Chlamydia psittaci: two phagosomes with different intracellular behaviors. Infect Immun, 1983, **40**(3): 956~966
- 21 Daubie V, Pochet R, Houard S, *et al.* Tissue factor: a mini-review. J Tissue Eng Regen Med, 2007, **1**(3): 161~169
- 22 Dachary-Prigent J, Toti F, Satta N, *et al.* Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin. Semin Thromb Hemost, 1996, **22**(2): 157~164

Generation and Application of Active Recombinant Mouse Tissue Factor and Its Function-blocking Monoclonal Antibody*

PEI Xin-Hui^{1,2}, CHI Shan², WANG Jin-Tao², LIN Zhi-Xin¹, ZHANG Xue-Hong¹, GENG Jian-Guo²**

¹College of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

²Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Tissue factor (TF) is a cell surface glycoprotein playing an important role in the initiation of the blood coagulation cascade. The functions of TF in other physiological or pathological activities, such as tumor cell migration, are also acknowledged gradually in recent years. A recombinant protein of mouse tissue factor (mTF) extracellular part fused with His tag was constructed, and it was expressed and purified successfully in high-level soluble form. This recombinant mTF can effectively initiate plasma clotting *in vitro* and enhance blood coagulation *in vivo*, which prove its biological activity. Using this recombinant mTF as immunogen, a murine monoclonal function-blocking antibody to mTF was also generated, which can inhibit mTF-initiated plasma clotting *in vitro*. And by treating with this function-blocking antibody, the thrombus formation in a murine deep vein thrombosis model was attenuated successfully, which suggests the important role of tissue factor in deep vein thrombosis. In all, with the active mTF recombinant protein and the mTF function-blocking antibody, the functional investigations of TF in murine models of various research areas become more convenient and feasible.

Key words mouse tissue factor, baculovirus expression system, Sf9 cells, function-blocking antibody

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00639

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30721065, 30623003, 30700409, 30771960 and 30630036).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54921351, E-mail: genglab@gmail.com

Received: October 5, 2008 Accepted: November 7, 2008