

半衰期延长获得 PAI-1 抗性的 t-PA 突变体的构建、表达及特性分析

刘士辉 黄培堂 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘要 用基因重组及定位突变技术成功地构建了 t-PA 的 K1 区缺失突变体 t-PA Δ delK1、PAI-1 结合位点缺失突变体 t-PA del (296—302) 及两者的组合突变体 t-PA del (K1, 296—302), 并在 COS-7 细胞中实现三者的暂时性表达, 在 CHO 细胞中实现了 t-PA del (K1, 296—302) 的稳定性表达。对表达产物的生物学特性分析表明, t-PA del (296—302) 及 t-PA del (K1, 296—302) 获得了 PAI-1 抗性, 因时 t-PA del (K1, 296—302) 在大鼠体内的半衰期延长约 5 倍, 而与纤维蛋白的亲合力只略有下降。因此, 此组合突变体有可能成为优于野生 t-PA 的新型溶栓剂候选株。

关键词 组织型纤溶酶原激活剂, 突变体, 半衰期, PAI-1

组织型纤溶酶原激活剂 (Tissue-type plasminogen activator, t-PA) 是血液内纤溶系统的生理性激活剂。由于 t-PA 与血栓基质纤维蛋白有较强的特异亲和力, 能在血栓局部高效的激活纤溶系统, 因此是一种高效特异的溶血栓药物^[1]。但 t-PA 在血中半衰期甚短 (1—5 分钟), 且血浆中的纤溶酶原激活剂抑制剂 I (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 可快速抑制其活性。因此临床溶栓治疗时需大量静脉滴注以维持有效浓度, 这样同时增加了系统性纤溶引起出血的危险。因此研制半衰期延长, 抗 PAI-1 抑制的新型 t-PA 受到关注。

为了探索 t-PA K1 区是否含有影响 t-PA 半衰期的决定基, 本研究用分子剪裁技术剪除 t-PA 的 K1 区, 构建 K1 区缺失的突变体 t-PA delK1。已有报道 t-PA 的 Lys296-His-Arg-Arg-Ser-Pro-Gly302 及 Arg304 为 t-PA 的 PAI-1 结合位点^[2], 为了获得具有 PAI-1 抗性的突变体, 本文用定点突变技术缺失 Lys296-Gly302 七个氨基酸残基, 构建突变体 t-PA del (296-302)。为了将上述两种突变体的特性融于一体, 本文用基因重组技术进一步构建两者的组合突变体 t-PA del (K1, 296-302), 并在 COS-7 及 CHO 细胞中进行表达研究, 对表达产物的特性进行分析。

1 材料与方 法

1.1 材料

核酸工具酶购自华美、Biolab 及 Boehringer-Mannheim 等公司, 定点突变试剂盒及 DNA 序列分析试剂盒购自 Promega 公司。牛纤维蛋白原 (含纤溶酶原)、牛凝血酶、牛纤溶酶原购自中国药品生物制品检定所。t-PA 活性定量参照英国国家生物标准与对照研

究所提供的第二次国际标准 t-PA (标号 86/670). S-2251 购自 Sigma 公司。纤维蛋白降解产物 (Stimutator) 购自 Boehringer-Mannheim 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 定点突变、序列分析及 DNA 操作技术

寡核苷酸诱导的定点突变技术及 DNA 序列分析参见 Promega 公司产品说明书。其它 DNA 操作技术见文献〔3〕有关章节。

1.3 t-PA 突变体在真核细胞中的表达

突变体在 COS-7 细胞中的暂时性表达采用的是 DEAE-Dextran 转染方法, 详见文献〔3〕有关章节。突变体在 CHO 细胞中的表达采用了电击转染方法, 然后筛选 CHO-dhfr^r 克隆, 并用浓度逐渐提高的 MTX 扩增外源基因以提高表达水平。

1.4 t-PA 的测定

1.4.1 纤维蛋白琼脂糖平板法 (FAPA): 见文献〔4〕。

1.4.2 间接显色法 (Indirect chromogenic assay): 以纤溶酶的特异性底物 S-2251 的产色效应来定量 t-PA 活性, 详见文献〔5〕。

1.5 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析

t-PA 突变体样品 (0.1—1.0IU) 与等体积的 2 倍上样缓冲液 (4%SDS、20%甘油和 0.2%溴酚蓝) 混匀, 30℃置 2 小时, 上样, 在恒流 10mA 下进行 SDS-PAGE。电泳完毕后, 取下胶块在 2.5%Triton X-100 中轻摇振荡 1 小时以去除 SDS, 然后在胶上铺一层纤维蛋白琼脂糖凝胶 (含纤溶酶原), 置湿盒中在 37℃过夜后观察凝胶上溶带的位置, 根据溶带的位置可比较突变体分子量大小。

1.6 t-PA 突变体 PAI-1 抗性鉴定

本文以含 12u/ml PAI-1 的心肌梗塞病人血浆为 PAI-1 的替代物, 对 t-PA 突变体的 PAI-1 抗性进行鉴定。1 个单位的 PAI-1 为 37℃下 10 分钟内抑制 1 个国际单位 t-PA 的量。将 t-PA 突变体或野生 t-PA 加至经 4 倍稀释的血浆中 (稀释后含 PAI-1 3u/ml) 使 t-PA 突变体或野生 t-PA 终浓度为 3IU/ml, 立即在 37℃下准确作用 10 分钟, 然后按文献〔6〕测定 t-PA 的剩余活性。

1.7 t-PA 突变体与纤维蛋白亲和力分析

方法参见文献〔7〕。

1.8 t-PA 突变体在大鼠体内的半衰期测定

t-PA 及 t-PA 突变体表达上清经 EG20 000 浓缩后, 置 4℃透析 48 小时, 再冷冻抽干浓缩至 5 000IU/ml。

雌性 Wister 大白鼠用戊巴比妥钠 (30mg/kg) 腹腔麻醉后, 切开颈部分离一侧颈静脉并做颈静脉插管。然后由尾静脉注入约 5 000IU 的 t-PA 突变体或同系统表达的野生 t-PA。在给药后 0—30 分钟内 (0、1、3、5、10、15、30 分钟) 分别从颈静脉采集血样 0.5ml (用 1/10 体积 0.13mol/L 枸橼酸钠抗凝), 立即加入 1/2 体积的 1mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH3.9), 离心 (2 000g, 20 秒) 收集血浆, 经适当稀释后用产色底物 (S-2251) 法测定血浆中 t-PA 活性随时间的变化, 绘制药时曲线, 求出半衰期 (T_{1/2}) 及曲线下面积。

2 结 果

2.1 t-PA 突变体 cDNA 的构建

2.1.1 K1 区缺失突变体 t-PA delK1 cDNA 的构建: t-PA K1 区由 Thr88—Gly176 共 89 个氨基酸残基组成, 由 cDNA 第 451 至 717 共 267 个核苷酸残基编码。在 t-PA K1 区 cDNA 两端, 即 452—456 (CCAGG) 和 710—714 (CTGAG) 恰为 BstNI 及 DdeI 切点,

本文拟用此两种酶将编码 K1 区 cDNA 序列切除, 但由于 t-PA cDNA 上含多个 BstNI 及 DdeI 切点, 所以只能用分段酶切的策略来进行。具体过程见图 1。当 K1 区 cDNA 切除后 BstNI 及 DdeI 两断端的序列见图 1。为了连接后不引起移码突变, 首先用 dC 和 dT 对 DdeI 端部分补平, 然后用绿豆核酸酶 (Mung bean nuclease) 消平了两端各突出的一个 3' dT, 得到 454—711 共 258bp (编码 88—174 位共 86 个氨基酸残基) 被切除的质粒 pLK。序列分析证实了缺失与设计一致, 见图版 I-a。

2.1.2 PAI-1 结合位点去除突变体 t-PA del (296—302) cDNA 的构建: 为去除 Lys296—Gly302 七个氨基酸残基, 合成了如下突变寡核苷酸片段: 5' GC-CATCTTTGCCGAGCGGTTCCTGT3'。

并用寡核苷酸诱导的定点突变技术缺失了 Lys296—Gly302 七个氨基酸残基的编码序列, 其正确性得到了序列分析的证实, 结果见图版 I-b。经进一步组装得到了完整的 t-PA del (296—302) cDNA 编码序列。

2.1.3 组合突变体 t-PA del (K1, 296—302) cDNA 的构建: 为将上述两突变体的特性融于一体, 运用 DNA 重组技术进一步构建出两者的组合突变体 cDNA, 即 t-PA del (K1, 296—302)。

2.2 t-PA 突变体在 COS-7 细胞中的表达及表达产物特性分析

2.2.1 t-PA 突变体在 COS-7 细胞中的暂时性表达: 本文分别将 t-PA del K1、t-PA del (296—302) 及 t-PA del (K1, 296

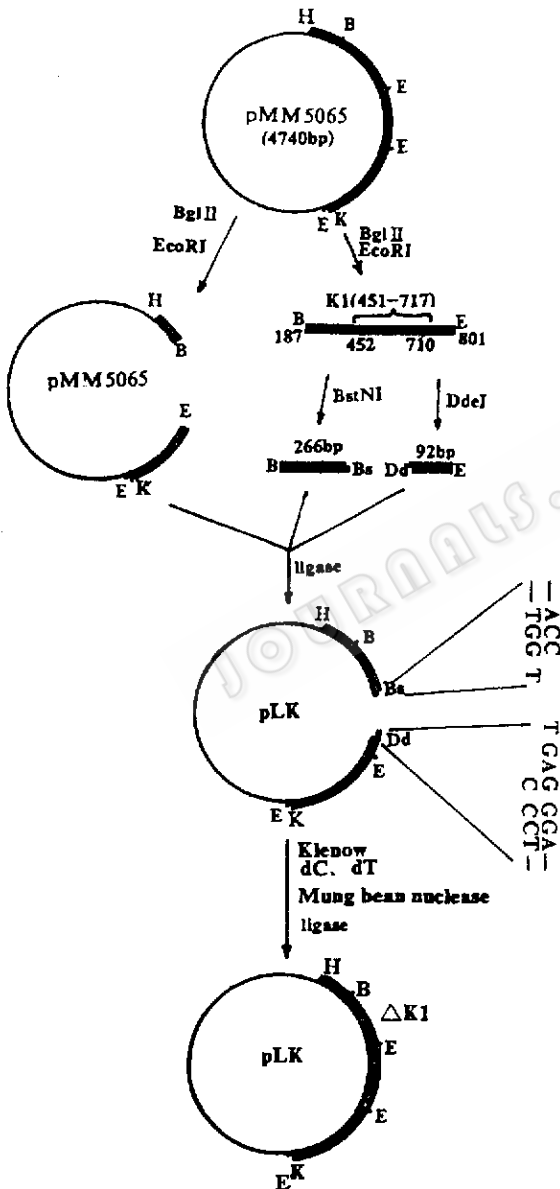


图 1 t-PA del K1 cDNA 的构建

Fig. 1 Construction of t-PA del K1 cDNA

-302) cDNA 序列组入了真核细胞表达载体 pCDSI, 构建了上述 3 种突变体的真核细胞表达质粒, 见图 2, 表达质粒有如下特点: 1. 外源基因由其上游的腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP) 和 SV40 早期增强子 (SV40 early enhancer) 序列控制转录; 2. 选择标志基因为鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因, 其转录由其上游的 SV40 早期启动子 (SV40 early promoter) 及增强子控制。用上述 3 种突变体的表达质粒以 DEAE-Dextran 方法分别转染了 COS-7 细胞, 并在 COS-7 细胞中实现了暂时表达, 转染后 48 小时表达水平最高, 结果见表 1, 图版 I-c。

表 1 转染 48 小时后 COS-7 细胞培养上清中 t-PA 突变体的活性

Table 1 t-PA mutant activities in the culture media of the transfected COS-7 cells at 48h after the transfection

Mutants	FAPA (IU/ml)	Indirect chromogenic assay (IU/ml)
t-PA delK1	203	180
t-PA del (296-302)	135	117
t-PA del (K1, 296-302)	45	42

可见两种方法测得的结果具有良好的相关性。

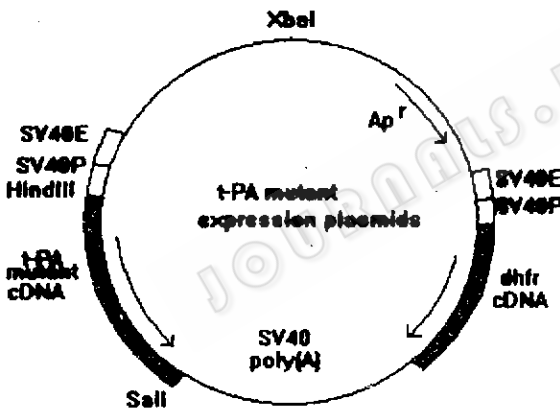


图 2 t-PA 突变体真核细胞表达质粒示意图

Fig. 2 Schematic representation of t-PA mutant eukaryotic expression plasmids.

2.2.2 t-PA 突变体酶活性抗体中和实验: 本文所表达的 3 种 t-PA 突变体的酶活性均可被经 1:100 稀释的 t-PA 特异性抗体抑制, 见图版 I-c, 证明 t-PA 突变体的酶活性是 t-PA 特异性的。

2.2.3 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析: 结果见图版 I-d, 突变体分子大小顺序与预想一致。t-PA del (296-302) 与野生 t-PA 类似, 而 K1 区缺失突变体 t-PA del K1 及组合突变体 t-PA del (K1, 296-302) 分子量小于野生 t-PA, 这是因缺失 K1 区使分子量减小的缘故。

2.2.4 t-PA 突变体 PAI-1 抗性鉴定: PAI-1 是血浆中 t-PA 的快速抑制剂, 与

t-PA 结合的速率常数是 $10^7 \text{ mol L}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 使 t-PA 失活的半衰期短于 1 分钟, 而血浆中 t-PA 的其它抑制剂如 α_2 ——抗纤溶酶、 α_2 ——巨球蛋白等使 t-PA 失活的半衰期为 90—120 分钟^(8,9), 因此认为血浆在 10 分钟内对 t-PA 活性的抑制是由 PAI-1 引起的, 本文以含 PAI-1 12u/ml 的心梗病人血浆为 PAI-1 的替代物, 对本文所表达的突变体及标准 t-PA 进行了 PAI-1 抗性鉴定, 结果显示 t-PA del (296-302)、t-PA del (K1, 296-302) 在 10 分钟内活性均不受抑制, 而同等量的标准 t-PA 及 t-PA delK1 的活性则被完全抑制, 从而证明突变体 t-PA del (296-302) 及 t-PA del (K1, 296-302), 获得了 PAI-1 抗性。

2.3 t-PA del (K1, 296-302) 在 CHO 细胞中的表达及表达产物特性分析

2.3.1 t-PA del (K1, 296-302) 在 CHO 细胞中的表达: 用 t-PA del (K1, 296-302) 表达质粒以电击介导法转染了 CHO-dhfr⁻ 细胞, 然后通过筛选 CHO-dhfr⁻ 克隆及逐渐升高 MTX 浓度扩增外源基因, 得到数株表达 t-PA del (K1, 296-302) 的细胞株, 最高表达水平达 435IU/10⁶ 细胞/24h (FAPA 法测定)。目前正在继续加压提高表达水平。

2.3.2 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析: 结果见图版 I-d, 显示 t-PA del (K1, 296-302) 分子量略小于野生 t-PA (去除 K1 区使分子量减小的缘故), 与预想一致。

2.3.3 t-PA del (K1, 296-302) 与纤维蛋白的亲合力: t-PA del (K1, 296-302), 同系统表达的野生 t-PA 及标准 UK 与纤维蛋白的亲合力曲线见图 3。可见 t-PA del (K1, 296-302) 与纤维蛋白仍有亲和力, 但与野生 t-PA 比略有降低, 而 UK 与纤维蛋白无亲和力 (阴性对照)。

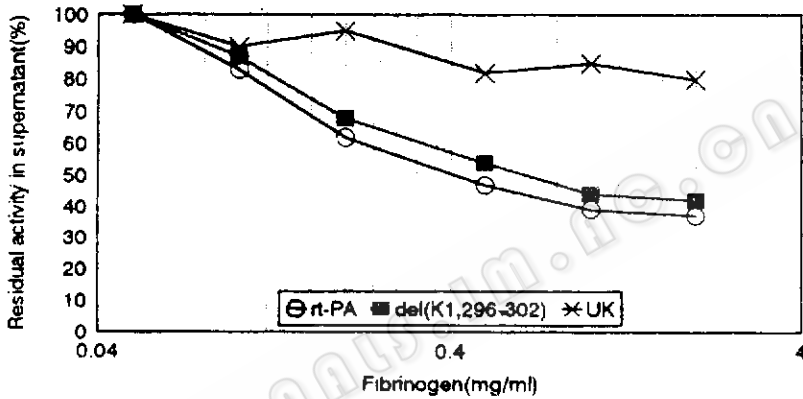


图 3 t-PA 突变体及野生 t-PA 与纤维蛋白的结合曲线

Fig. 3 Binding of native t-PA and t-PA mutants to fibrin

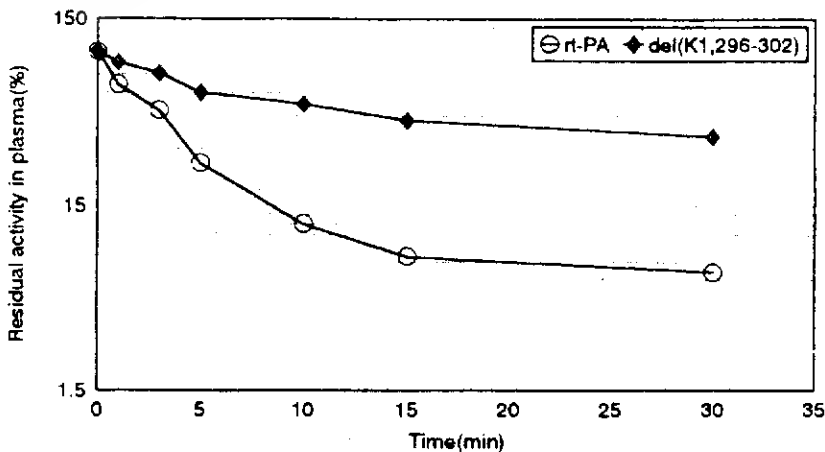


图 4 t-PA 突变体及野生 t-PA 在大鼠血浆中的清除

Fig. 4 *In vivo* clearance of t-PA del (K1, 296-302) and native t-PA from rat plasma

2.3.4 t-PA 突变体在大鼠体内的半衰期: 突变体 t-PA del (K1, 296-302) 及同系统

表达的野生 t-PA 在大鼠血浆内的药时曲线如图 4。按 Simpson 法则^[10]求得给药后 0—30 分钟内 t-PA 突变体与野生 t-PA 药时曲线下面积的比值为 4.3, 按一室开放模型求得的半衰期值野生 t-PA 为 1.7 分钟, t-PA del (K1, 296—302) 为 9.5 分钟, 可见此突变体半衰期有约 5 倍延长。

3 讨 论

肝细胞上存在两种 t-PA 受体介导 t-PA 在血浆内被快速清除。起次要作用的位于肝内皮细胞上的寡聚甘露糖链的受体, 通过识别 Asn117 位上的寡聚甘露糖链起作用; 起主要作用的受体存在于肝实质细胞上, 通过识别 t-PA A 链某空间构型起作用。本文构建的组合突变体, t-PA del (K1, 296—302) 在大鼠血浆内半衰期有较大程度延长, 这可能因为 K1 区去除后引起 t-PA A 链各相对独立的功能区 (F、E 及 K2 区) 空间构型及排列有一定程度变化, 影响了肝细胞受体对 A 链某空间构型 (如 F 区与 E 区间的连接区^[11]) 的识别。由于 F 区、E 区^[1]及本文证明的 K1 区缺失均可延长 t-PA 在血中的半衰期, 这提示 t-PA 在体内的快速清除有赖于 A 链三维构型的完整性。随 K1 区的去除, K1 区上 Asn117 位上的糖链亦被消除, 这对 t-PA del (K1, 296—302) 的半衰期的延长可能有一定程度贡献, 但非主要贡献, 因本室曾证明 Asn117 位糖链清除的 t-PA 突变体半衰期仅延长 1 倍。

PAI-1 是血浆中 t-PA 的主要抑制剂, 但由于治疗注入血中 t-PA 的量远高于 PAI-1 的水平, 因此 PAI-1 对 t-PA 半衰期无明显影响^[12], 但在需溶栓治疗的血栓病人中 (如急性心肌梗塞), PAI-1 水平常升高^[13], 这是栓塞血管灌流后再栓塞的重要原因之一^[14]。因此本文构建的具有 PAI-1 抗性的 t-PA 突变体对于 PAI-1 水平升高的血栓病人的治疗, 尤其是对起始溶栓治疗后的低剂量维持滴注预防再栓塞十分有利。

t-PA del (K1, 296—302) 与纤维蛋白亲和力略有下降, 这可能是因为 K1 区去除后引起 t-PA 整个 A 链空间构型发生一定程度变化而影响了 F 区和 K2 区与纤维蛋白的亲合。

t-PA del (K1, 296—302) 有可能成为优于野生 t-PA 的新型溶栓剂候选株。

参 考 文 献

- [1] 刘士辉等. 医药卫生科技进展. 北京: 人民军医出版社, 1992, 35—42.
- [2] Madison *et al.* Nature, 339: 721, 1989.
- [3] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [4] 韩素文等. 军事医学科学院院刊, 1987, 11 (2): 101.
- [5] Verheijen J H *et al.* Thromb Haemost, 1982, 48: 266.
- [6] Chmiewska J *et al.* Chin Chem, 1986, 32: 482.
- [7] Johannessen M *et al.* Thromb Haemost, 1990, 63: 564.
- [8] Kruithof E K O *et al.* Blood 1984, 64: 907.
- [9] Chmiewska J *et al.* Thromb Res 1983, 31: 427.
- [10] 金有豫, 罗兰译. 药理学计算手册, 北京: 科学出版社, 1985, pp. 51—53.
- [11] Ahem T J *et al.* J Biol Chem, 1990, 265: 5540.
- [12] Li X K *et al.* Blood, 1992, 79: 417.
- [13] Almer L O *et al.* Thromb Res., 1987, 47: 335.
- [14] Hamsten A *et al.* Lancet, 1987, 2: 3.

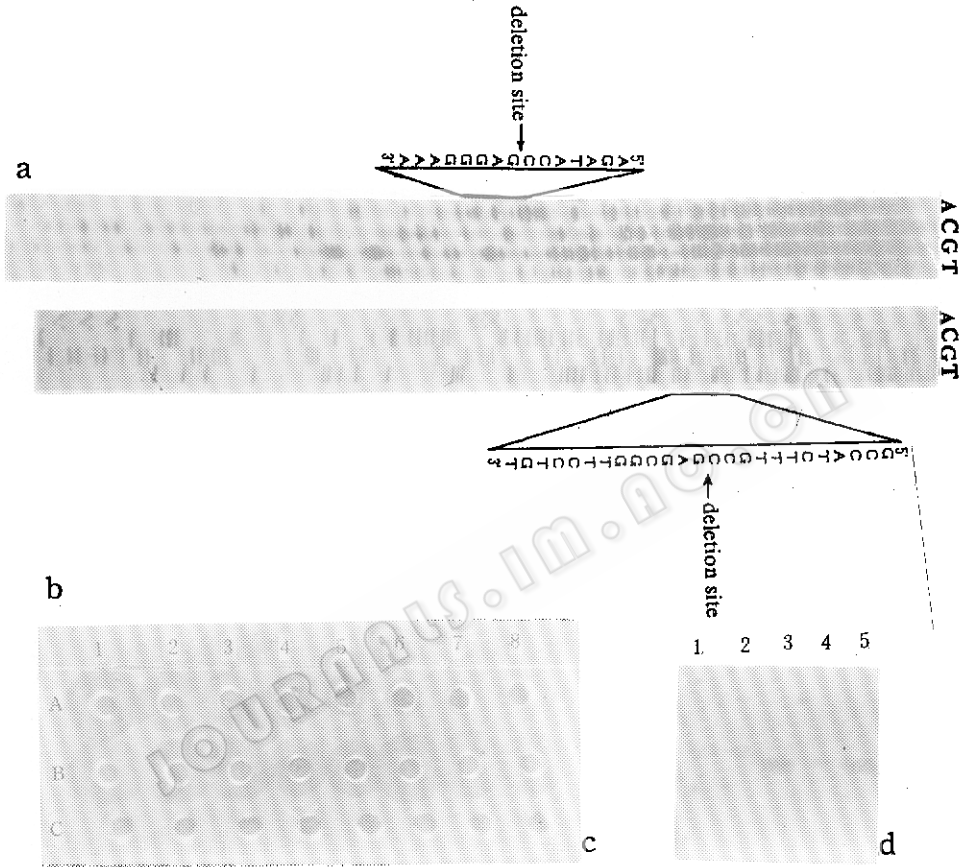
Construction, Expression and Characterization of t-PA Mutants with Increased Plasma Half-life and Resistance to Inhibition by PAI-1

Liu Shihui Huang Peitang Huang Cuifen

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850)

Abstract In this paper, three t-PA mutants, t-PA del K1 (with deletion of K1 domain), t-PA del (296—302) (with deletion of PAI-1 binding site and their combination mutant t-PA del (K1, 296—302), were constructed by DNA recombination and site-directed mutagenesis techniques. Then the three t-PA mutants were transiently expressed in COS-7 cells, and the combination mutant t-PA del (K1296—302) was stably expressed in CHO cells. The biological analyses of the expression products demonstrated that t-PA del (296—302) and t-PA del (K1, 296—302) had obtained the resistance to inhibition by PAI-1. In addition, the half-life of t-PA del (K1, 296—302) in rat plasma was increased 5 times while the mutant affinity for fibrin was just a little affected. Therefore, it was reasonable to consider that the mutant t-PA del (K1, 296—302) may become a potent candidate of new thrombolytic agent.

Key words Tissue-type plasminogen activator, mutant, plasma half-life, PAI-1



- DNA sequence analysis indicated the DNA sequence coding for K1 domain (nucleotides 454 to 711) was correctly deleted.
- DNA sequence analysis indicated the DNA sequence coding for PAI-1 binding site (nucleotides 1075 to 1095) was correctly deleted.
- Measurement of t-PA mutant activities in the culture media of the transfected COS-7 cells at 48h after transfection.
 - A1 to A8: a series of 1 : 2 dilutions of standard t-PA from 170u/ml to 170×2^{-8} u/ml.
 - B1, B2 and B4: delK1, del (296-302) and del (K1, 296-302).
 - C1, C2 and C4: the activities of B1, B2 and B4 were inhibited by a monoclonal antibody against t-PA
- Analyses of t-PA mutants by SDS-PAGE fibrin autography technique.
 - Lane 1 standard t-PA.
 - Lane 2: del (296-302) produced by transfected COS-7 cells.
 - Lane 3: delK1 produced by transfected COS-7 cells.
 - Lane 4: del (K1, 296-302) produced by transfected COS-7 cells
 - Lane 5: del (K1, 296-302) produced by transfected CHO cells.