

A1 区替换提高人 BDD-FVIII 重链的分泌并缓解其与轻链共转基因细胞链分泌的不均衡性

朱甫祥* 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 双载体转凝血 VIII 因子基因(*FVIII*)可有效克服腺相关病毒(AAV)载体容量限制, 但 *FVIII* 重链分泌的低效性导致重、轻链分泌的不均衡。重链分泌的低效性源自其 A1 区存在与内质网蛋白质分子伴侣结合的位点。本文在我们最近运用蛋白质剪接的双载体共转 B 区缺失型 *FVIII* (BDD-*FVIII*)重链和轻链基因研究的基础上, 将重链的 A1 区替换为猪 *FVIII* 的 A1 区, 用融合蛋白内含子的重链和轻链转基因实验, 定量分析了重链的分泌及其对共转重链和轻链基因细胞分泌剪接 BDD-*FVIII* 蛋白和活性的影响。结果显示, 变构体重链单独转基因时其分泌得到明显改善, 达到 89 ± 12 ng/ml, 明显高于人 BDD-*FVIII* 重链的分泌(25 ± 9 ng/ml); 该变构体重链与轻链共转基因细胞分泌的剪接变构体 BDD-*FVIII* 和活性分别为 219 ± 51 ng/ml 和 1.47 ± 0.22 U/ml, 明显高于剪接的人 BDD-*FVIII* 的分泌量和活性(116 ± 32 ng/ml 和 0.8 ± 0.11 U/ml)。单独变构体重链和轻链转基因细胞合并培养后, 其培养上清中检测到剪接的变构体 BDD-*FVIII* 和活性, 分别为 38 ± 7 ng/ml 和 0.22 ± 0.05 U/ml, 提示为不依赖细胞机制的蛋白质剪接所产生。结果表明, A1 区替换后重链分泌的增强, 可促进基于蛋白质剪接技术的双载体共转重链和轻链基因细胞分泌的剪接 BDD-*FVIII* 水平和活性, 并可缓解链分泌的不均衡性, 为动物体内应用双 AAV 载体共转 BDD-*FVIII* 重链和轻链基因研究奠定了实验基础。

关键词 凝血 VIII 因子; 变构体重链; 分泌; 蛋白内含子; 蛋白质剪接

基因治疗是甲型血友病的理想疗法。腺相关病毒(AAV)载体因具有定点整合宿主基因组、介导目的基因持续表达并可感染非分裂细胞、无致病性等优点, 使其在基因治疗中被广泛采用, 但 *FVIII* 基因较大, 其 cDNA 为 7 Kb, 超过了 AAV 的 4.7 Kb 的容量上限, 即使大小为 4.7 Kb 的 B 区缺失型 *FVIII*(BDD-*FVIII*), 加上基因表达调控元件后仍难以为其转运^[1]。双载体共转 *FVIII* 基因是克服 AAV 容量限制的一种策略, 其机理是共表达的重链和轻链多肽翻译后加工成功能性异源二聚体分泌入血发挥凝血功能^[2,3]。本室最近运用蛋白内含子(intein)的蛋白质反式剪接功能进行双载体转 BDD-*FVIII* 基因表明, 翻译后的重链和轻链在蛋白质剪接作用下, 可共价连接形成具凝血活性的 BDD-*FVIII* 蛋白, 并且显示 BDD-*FVIII* 的剪接可不依赖细胞机制^[4]。与前者依赖细胞机制产生功能性异源二聚体 BDD-*FVIII* 的双载体转基因相比, 后者具有明显优势, 但二者均出现由于重链分泌低下导致链分泌的不均衡性。因此提高重链的分泌效率将有助于提高双载体转 *FVIII* 基因的功效。研究表明,

生理性的 *FVIII* 合成后在分泌过程中其重链的 A1 区与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合、其释放依赖细胞内高浓度的 ATP, 是导致 *FVIII* 分泌低下的重要原因^[5,6], 有人将人 BDD-*FVIII* 的重链 A1 区和轻链 A3 区替换为猪 BDD-*FVIII* 分子的相应区域, 分泌有明显提高^[7,8]。为提高重链的分泌性, 本工作将人 BDD-*FVIII* 重链的 A1 区替换为猪的 BDD-*FVIII* A1 区, 运用双载体技术向 HEK292 细胞共转变构体 BDD-*FVIII* 基因, 观察到共转基因细胞出现明显增强的重链分泌, 链分泌的不均衡性问题得到缓解, 而且共转基因细胞的培养上清中剪接的 BDD-*FVIII* 蛋白和生物活性也有显著提高, 为进一步动物体内双 AAV 载体转基因研究提供了实验依据。

收稿日期: 2010-07-19 接受日期: 2010-09-29

山东省自然科学基金(No.ZR2010CM061), 烟台市科技计划项目(No.2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金项目(No.2007[1108])和鲁东大学科研基金项目(No.LZ20083305)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0535-6693825, Fax: 0535-6697626, E-mail: fuxiangmail@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌株和细胞

含有 *Ssp DnaB* 蛋白内含子基因的质粒 pMST 为加拿大 Dalhousie 大学医学院 Liu Paul 教授实验室构建和提供^[9]。含有人全长 FVIII 编码 cDNA 的质粒 pXX-FVIII 由美国 Pittsburgh 大学分子遗传与生物化学系基因治疗中心 Xiao Xiao 教授实验室构建。猪 BDD-FVIII 真核表达质粒 pcDNA5-BDD-pFVIII 由美国埃默里大学 Linda Dong 教授惠赠。人 BDD-FVIII 重链、轻链分别与 *Ssp DnaB* 蛋白内含子融合基因的真核表达载体 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC, 以及人 BDD-FVIII 真核表达载体 pCMV-F8 为我们以前工作中构建^[4]。HEK293 细胞为本室保存, 于 5% CO₂、37℃ 培养箱用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养。

1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶试剂盒产自 New England Biolabs 公司; 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。人重组 FVIII 为 BioChain 公司产品, 人 FVIII 的重链 A2 区单克隆抗体 012 为 MyBioSource 公司产品, 人 FVIII 轻链单克隆抗体 ESH8 及 HRP 标记的 ESH8 购自 American Diagnostica 公司; HRP 标记的兔抗人 FVIII 多克隆抗体购自 Novus 公司。人正常参比血浆为 George King Biomedical 公司产品。COATEST SP FVIII 试剂盒购自 Chromogenix 公司。

1.3 真核重组表达质粒的构建

以本室以前工作所构建的 pCMV-HCIntN 为模板^[4], 用引物 5'-TAG CAC CGG TCA GTT GCC AAG AAG CAT CC-3' (下划线为 Age I 位点) 和 5'-ACT AAA GCA GAA TCG CAA AAG G-3', PCR 扩增得到去 A1 区的重链与蛋白内含子融合基因和载体骨架大片段 DNA; 用引物 5'-GCC ATC AGG AGA TAC TAC CT-3' 和 5'-TAG CAC CGG TTT TGG ATA AAG GGA GAC ACG-3' (下划线为 Age I 位点) 从猪 FVIII 的 cDNA 扩增 A1 区编码 DNA 片段, 用 Age I 酶切上述 PCR 产物后连接, 得到 A1 区替换的变构体 BDD-FVIII 重链与蛋白内含子融合基因表达载体 pCMV-VHCIntN。

1.4 细胞培养及基因转染

转染前一天, 用胰蛋白酶消化分散 HEK293 细胞, 按每孔 5×10^5 个细胞接种到 6 孔培养板, 待细胞生长

融合超过 80% 时, 用脂质体 Lipofectamine2000 按试剂盒说明书操作, 取 5 μg 的 pCMV-VHCIntN 和 pCMV-IntCLC, 混合、稀释于 250 μl 的 Opti-MEM 培养液, 与室温放置 5 min 的含 20 μl 脂质体的 250 μl Opti-MEM 培养液混合、继续室温放置 20 min, 逐滴加入细胞培养孔转染细胞; 同时用 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 共转染细胞作为对照组; 设置 pCMV-F8 单独转染细胞作为 BDD-FVIII 蛋白表达对照; 为观察不依赖细胞机制的 BDD-FVIII 剪接, 设置两组单独转染 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的细胞, 培养 24 h 后合并两组细胞继续培养。用空载体 pcDNA3.1 转染细胞作为阴性对照 (Mock)。上述转染细胞培养 5 h 后换以 2 ml 的新鲜 Opti-MEM 培养液, 继续培养 48 h, 收获培养上清。

1.5 细胞培养上清中重链、轻链和剪接 BDD-FVIII 的定量分析

参照本室以前建立的重、轻链特异性 ELISA 检测培养上清的重链和轻链浓度^[10]。参照文献^[11]用双夹心 ELISA 定量检测上清中剪接的全长 BDD-FVIII。

1.6 生物活性的定量分析

参照文献^[12]用 Coatest 发色分析法按试剂盒说明书操作分析细胞上清的 FVIII 生物活性。

1.7 实验结果的统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 *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 蛋白内含子融合基因表达载体的构建

去除人 FVIII 分子 B 区的 Ile⁷⁶¹~Asn¹⁶³⁹ 得到 BDD-FVIII, 将其 cDNA 插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+) 得到 BDD-FVIII 表达质粒 pCMV-F8; 于 BDD-FVIII 的 Gln¹⁶⁵⁶-Ser¹⁶⁵⁷ 间将其断裂为重链和轻链, 分别将重链和轻链的编码 DNA 与 *Ssp DnaB* 蛋白内含子的 N 端和 C 端编码 DNA 融合, 插入真核表达载体 pcDNA 3.1(+), 得到重链和轻链与蛋白内含子融合的融合基因表达载体 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC; 将 pCMV-HCIntN 中的 A1 区替换为猪 FVIII 的 A1 区, 得到变构体重链与蛋白内含子融合基因表达载体 pCMV-VHCIntN。构建的质粒载体结构如图 1 所示。

2.2 细胞培养上清中分泌的重链、轻链以及剪接的 BDD-FVIII

细胞培养上清的重链定量分析结果显示 (图 2),

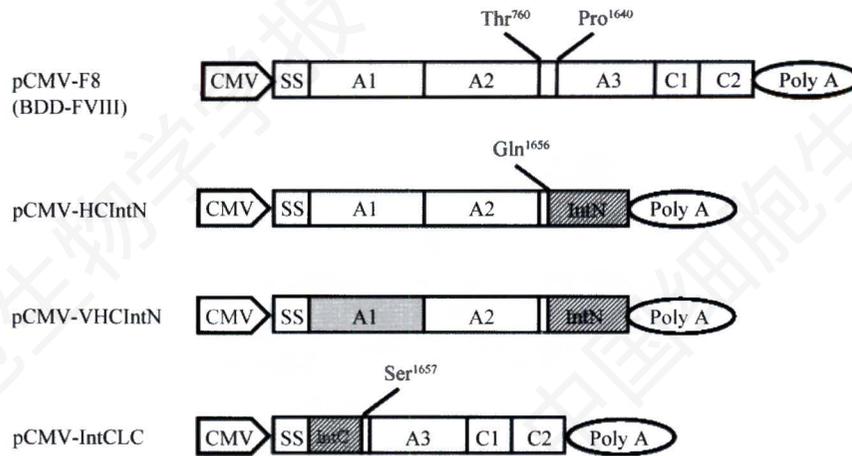


Fig. 1 Schematic representation of constructed plasmid vectors

The human BDD-FVIII was produced from full-length FVIII by deleting a large part of the B domain from Ile⁷⁶¹ to Asn¹⁶³⁹ and inserted into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) to construct a plasmid vector pCMV-F8 expressing BDD-FVIII driven by CMV promoter/enhancer. The intein-fused heavy chain (HC) and light chain (LC) expression vectors pCMV-HCIntN and pCMV-IntCLC were constructed by splicing the BDD-FVIII before Ser¹⁶⁵⁷, fusing to N-terminus (IntN) and C-terminus (IntC) of *Ssp* DnaB intein and cloning to pcDNA3.1(+) respectively. The vector expressing the intein-fused variant heavy chain (VHC) pCMV-VHCIntN was derived from pCMV-HCIntN by substituting the A1-domain with porcine FVIII A1-domain. SS: signal sequence of human FVIII.

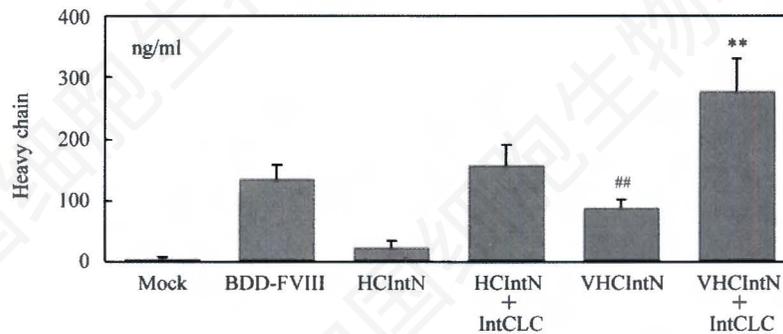


Fig. 2 Amount of secreted heavy chain

The data are represented as the mean \pm SD. $n=3$ in each group, # $P<0.01$ vs *HCIntN* transfection, ** $P<0.01$ vs *HCIntN* plus *IntCLC* co-transfection and *BDD-FVIII* transfection.

单独转 *VHCIntN* 基因细胞的变构体重链浓度为 89 ± 12 ng/ml, 明显高于人 BDD-FVIII 重链(HCIntN)的分泌(25 ± 9 ng/ml), 说明 A1 区替换可显著促进人 BDD-FVIII 重链的分泌。与轻链共转基因结果显示, 变构体重链和人 BDD-FVIII 重链的分泌量均显著增加, 分别为 278 ± 52 ng/ml 和 159 ± 32 ng/ml, 但前者明显高于后者, 表明轻链对重链分泌有促进作用, 而且对变构体重链的促分泌作用更显著。

细胞培养上清中轻链定量分析结果显示(图 3), *IntCLC* 单独转基因时轻链的分泌量为 340 ± 49 ng/ml, 与 *VHCIntN* 或与 *HCIntN* 共转基因时轻链分泌量分别为 381 ± 72 ng/ml 和 359 ± 63 ng/ml, 三者相似, 但均明

显高于单独转 *BDD-FVIII* 基因时的轻链分泌量(151 ± 32 ng/ml)。表明轻链的分泌不受重链的影响。结合上述重链分析结果可以看出, 变构体重链与轻链分泌的比率为 1:1.4, 而人 BDD-FVIII 重链与轻链分泌的比率为 1:2.3, 表明重链分泌性的提高可缓解共转基因时链分泌的不均衡性。

细胞培养上清中剪接 BDD-FVIII 定量分析结果显示(图 4), 轻链与变构体重链和与人 BDD-FVIII 重链共转基因时分泌的剪接 BDD-FVIII 分别为 219 ± 51 ng/ml 和 116 ± 32 ng/ml, 前者显著高于后者, 也显著高于单独转人 *BDD-FVIII* 基因时 BDD-FVIII 的分泌(127 ± 33 ng/ml)。分别转轻链和重链基因的细胞合并

培养后,其培养上清中剪接变构体 BDD-FVIII 为 38 ± 7 ng/ml,提示为不依赖细胞机制的蛋白质剪接产生。结果表明,A1区替换通过重链自身分泌性的提高,可促进共转重链和轻链基因时剪接 BDD-FVIII 的分泌。

2.3 细胞上清中的凝血生物活性

转基因细胞培养上清的凝血生物活性分析结果显示(图 5),轻链与变构体重链和与人 BDD-FVIII 重

链共转基因时的活性分别为 1.47 ± 0.22 U/ml 和 0.8 ± 0.11 U/ml,前者显著高于后者,也明显高于转 BDD-FVIII 基因对照(0.96 ± 0.15 U/ml)。分别转变构体重链和轻链基因的细胞合并培养后,其培养上清的凝血生物活性为 0.22 ± 0.05 U/ml,结合上述剪接 BDD-FVIII 定量分析结果,提示为不依赖细胞机制剪接的 BDD-FVIII 所产生。结果表明,A1区替换重链分泌性的改

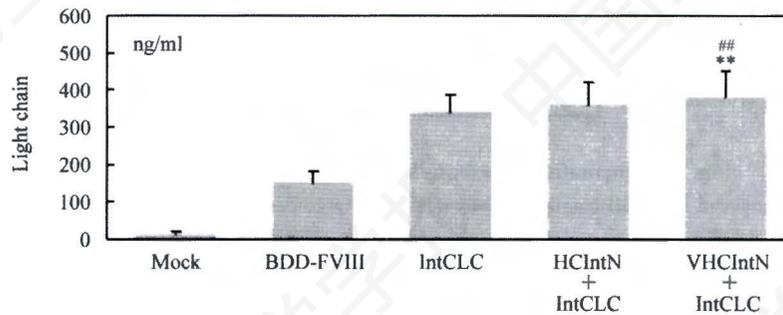


Fig.3 Amount of secreted light chain

The data are represented as the mean \pm SD. $n=3$ in each group, $**P>0.05$ vs *IntCLC* transfection and *HCIntN* plus *IntCLC* co-transfection, $**P<0.01$ vs *BDD-FVIII* transfection.

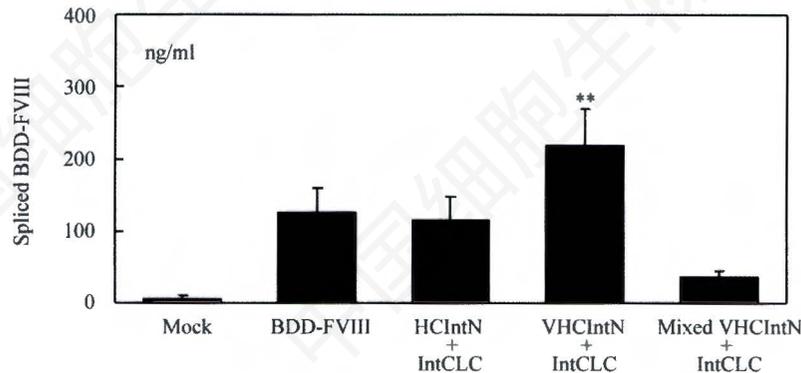


Fig.4 Amount of secreted BDD-FVIII spliced by intein-mediated protein splicing

The data are represented as the mean \pm SD. $n=3$ in each group, $**P<0.01$ vs *HCIntN* and *IntCLC* co-transfection and *BDD-FVIII* transfection.

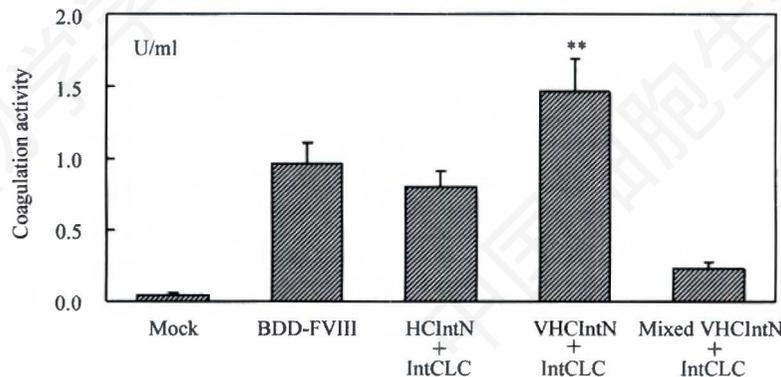


Fig.5 Coagulation activity of the culture supernatants

The data are represented as the mean \pm SD. $n=3$ in each group, $**P<0.01$ vs *HCIntN+IntCLC* co-transfection and *BDD-FVIII* transfection.

善,可提高共转重链和轻链基因细胞分泌的 FVIII 生物活性。

3 讨论

蛋白内含子为包埋于一些原核生物和单细胞真核生物宿主蛋白前体中的多肽,在宿主蛋白的成熟过程中通过其催化的蛋白质剪接反应被切除,两侧的宿主蛋白以肽键相连^[13]。蛋白质剪接具有精确、高效、无需消耗能量、细胞内外均可进行和无副反应等特点,使其作为一种新的生物技术在蛋白质标记、多肽环化以及生物传感器等研究中得到应用^[14~16]。蛋白质剪接分为分子内的顺式剪接和分子间的反式剪接两种形式,研究表明,具有顺式剪接作用的蛋白内含子断裂后也可进行分子间的反式剪接^[9]。

我们最近运用 *Ssp DnaB* 蛋白内含子的反式剪接功能进行的双载体共转 BDD-FVIII 重链和轻链基因表明,通过翻译后剪接可形成具有生物活性的 BDD-FVIII 蛋白^[4]。但重链的低分泌性产生的链分泌不均衡性^[12],使过多的重链淤积于胞内,使细胞变得不稳定,甚至可诱导细胞凋亡^[17]。因此,提高重链的分泌是双载体转 *BDD-FVIII* 基因需要解决的关键问题之一。研究表明,人 FVIII 分泌低下的主要原因为其重链 A1 区存在与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合位点,使其分泌过程中从 BiP 释放需要消耗 ATP。突变实验揭示, A1 区的某些氨基酸突变如 L303E/F309S 可促进 FVIII 分泌^[15,6]。Dooriss 等^[18]通过比较发现,猪 BDD-FVIII 的分泌性远较人源 BDD-FVIII 高。该实验室用替换实验表明,猪 BDD-FVIII 分子的重链 A1 区和轻链 A3 区可明显促进人/猪杂合体 BDD-FVIII 的分泌^[7]。本文将人 BDD-FVIII 分子的重链 A1 区替换成猪 FVIII 重链的 A1 区,证明变构体重链本身的分泌性有明显改善,与轻链共转基因时,其分泌量大幅提升,轻链与重链的分泌比率为 1.4:1,而人 BDD-FVIII 重链与轻链共转基因细胞分泌的轻链与重链比率为 2.3:1,表明前者共转基因链分泌的不均衡性有明显缓解;而且所分泌的剪接变构体 BDD-FVIII 和由其产生的生物活性也明显高于共转人 BDD-FVIII 的重链和轻链基因,提示: A1 区替换可提高基于蛋白质剪接的双载体共转 BDD-FVIII 重链和轻链基因的实际功效。

考虑到轻链分泌的高效性,本文只将重链的 A1 区进行替换,以提高重链的分泌。我们曾将重链的 A1 区和轻链的 A3 区均替换为猪 FVIII 的相应区域,通

过共转基因表明,链分泌的不均衡性也可得到缓解,但过多分泌的轻链对凝血活性没有贡献,而且增加了剪接 BDD-FVIII 分子的异源性(待发表资料)。本文的实验结果为进一步在动物体内提高重链的分泌性、运用双 AAV 载体共转 BDD-FVIII 的重链和轻链基因实验研究奠定了基础。

致谢:感谢加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授提供的蛋白质剪接技术帮助。

参考文献(References)

- 1 Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia. *Br J Haematol* 2008; 140(5): 479-87.
- 2 Scallan CD, Liu T, Parker AE, Patarroyo-White SL, Chen H, Jiang H, *et al.* Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood* 2003; 102(12): 3919-26.
- 3 Burton M, Nakai H, Colosi P, Cunningham J, Mitchell R, Couto L. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12725-30.
- 4 Zhu FX, Liu ZL, Chi XY, Qu HG. Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci Chin Life Sci* 2010; 53(6): 683-9.
- 5 Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, Kucab P, Cunningham MA, Kaufman RJ, *et al.* Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood* 2004; 103(9): 3412-9.
- 6 Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 1997; 272(39): 24121-4.
- 7 Doering CB, Denning G, Dooriss K, Gangadharan B, Johnston JM, Kerstann KW, *et al.* Directed engineering of a high-expression chimeric transgene as a strategy for gene therapy of hemophilia A. *Mol Ther* 2009; 17(7): 1145-54.
- 8 Doering CB, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. Identification of porcine coagulation factor VIII domains responsible for high level expression via enhanced secretion. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 6546-52.
- 9 Wu H, Xu MQ, Liu XQ. Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial *dnaB* intein. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1387(1-2): 422-32.
- 10 Chen LX, Zhu FX, Li J, Lu H, Jiang HY, Sarkar R, *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): 1856-62.
- 11 Gnatenko DV, Saenko EL, Jesty J, Cao LX, Hearing P, Bahou WF. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy. *Br J Haematol* 1999; 104(1): 27-36.
- 12 Sarkar R, Tetreault R, Gao GP, Wang LL, Bell P, Chandler R, *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII

- using an AAV 8 serotype. *Blood* 2004; 103(4): 1253-60.
- 13 Cheriyian M, Perler FB. Protein splicing: A versatile tool for drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(11): 899-907.
- 14 Volkmann G, Liu XQ. Protein C-terminal labeling and biotinylation using synthetic peptide and split-intein. *PLoS ONE* 2009; 4(12): e8381.
- 15 Volkmann G, Murphy PW, Rowland EE, Cronan JE Jr, Liu XQ, Blouin C, *et al.* Intein-mediated cyclization of bacterial acyl carrier protein stabilizes its folded conformation but does not abolish function. *J Biol Chem* 2010; 285(12): 8605-14.
- 16 Kanno A, Ozawa T, Umezawa Y. Intein-mediated reporter gene assay for detecting protein-protein interactions in living mammalian cells. *Anal Chem* 2006; 78(2): 556-60.
- 17 Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006; 124(3): 587-99.
- 18 Dooriss KL, Denning G, Gangadharan B, Javazon EH, McCarty DA, Spencer HT, *et al.* Comparison of factor VIII transgenes bioengineered for improved expression in gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther* 2009; 20(5): 465-78.

Substitution of A1 Domain Enhances Secretion of Human BDD-FVIII Heavy Chain and Relieves Chain Imbalance Secreted by the Heavy and Light Chain Co-transgenic Cells

Fu-Xiang Zhu*, Ze-Long Liu, Jing Miao, Hui-Ge Qu, Xiao-Yan Chi
(Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract Dual-vector delivery of coagulation factor VIII (*FVIII*) gene is an alternative strategy to overcome package limitation of adeno-associated virus (AAV) vectors, but the main drawback is chain imbalance due to the inefficient secretion of the heavy chain. It demonstrated that the inefficient heavy chain secretion is caused by binding of its A1 domain to chaperon protein of ER. Our recent work showed that protein splicing could be used for a dual-vector co-delivery of a B-domain-deleted *FVIII* (BDD-*FVIII*) heavy and light chain genes. Currently, we observed the secretion of A1 domain substituted human BDD-*FVIII* heavy chain by A1-domain of porcine *FVIII* and its effect on secretion of spliced BDD-*FVIII* and corresponding activity by co-transfection of an intein-fused heavy and light chain genes. The results showed that the secretion of variant heavy chain by itself displays an obvious enhancement in terms of secretion compared to the wild-type heavy chain (89±12 ng/ml vs 25±9 ng/ml). The amount of spliced variant BDD-*FVIII* and activity in the culture supernatants of heavy and light chain co-transgenic cells were 219±51 ng/ml and 1.47±0.22 U/ml, respectively, higher than those of human BDD-*FVIII* heavy and light chain co-transgenic cells (116±32 ng/ml and 0.8±0.11 U/ml). The spliced variant BDD-*FVIII* and activity were also detected in the culture supernatant of combined cells separately transfected with variant heavy and light chain genes (38±7 ng/ml and 0.22±0.05 U/ml) indicating the cellular mechanism-independent protein splicing. It suggests that enhanced secretion of the A1-domain substituted heavy chain could improve secretion of spliced BDD-*FVIII* and activity and relieve the chain imbalance secreted by the heavy and light chain co-transgenic cells with a protein splicing-based dual-vector. It provided evidence for ongoing research for an *in vivo* BDD-*FVIII* heavy and light genes co-transfer by a dual-AAV vector in animal models.

Key words coagulation factor VIII; variant heavy chain; secretion; intein; protein splicing

Received: July 19, 2010 Accepted: September 29, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province(No.ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City(No.2008152), the Scientific Research Foundation from Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars(No.2007[1108]) and the Scientific Research Foundation of Ludong University(No.LZ20083305)

*Corresponding author. Tel: 86-535-6693825, Fax: 86-535-6697626, E-mail: fuxiangmail@163.com