[文章编号] 1671-587X(2024)04-0900-08 DOI:10.13481/j.1671-587X.20240403

血管性血友病因子裂解酶间隔区结构域突变对酶生物学功能的影响

王 萌[1]，吴 昊[2]，李 华[3]，赵艺鸿[1]，金圣宇[1,4]

（1. 延边大学附属医院血液内科，吉林 延吉 133000；2. 浙江省绍兴市人民医院康复医学科，浙江 绍兴 312000；3. 延边大学附属医院体检科，吉林 延吉 133000；4. 延边大学附属医院中心实验室，吉林 延吉 133000）

[摘 要] **目的**：探讨血管性血友病因子裂解酶ADAM金属肽酶含血小板反应蛋白1型13（ADAMTS13）间隔区结构域在血管性血友病因子（vWF）裂解过程中的生物学功能，阐明ADAMTS13在血栓性血小板减少性紫癜（TTP）发病机制中的作用。**方法**：将ADAMTS13间隔区结构域中的氨基酸残基TEDRLPR以点突变技术逐个基因突变（突变体M1～M7），将构建的ADAMTS13与其突变体质粒转染至人胚肾HEK293细胞，稳定表达后提纯重组蛋白。观察野生型和突变型ADAMTS13在变性条件、剪切应力作用和ADAMTS13抗体处理后裂解vWF的能力。**结果**：荧光共振能量转移（FRET）实验，与野生型ADAMTS13比较，ADAMTS13突变体M4（R635A）和突变体M7（R638A）对FRET-vWF73剪切能力降低（$P<0.05$）。变性条件下，野生型ADAMTS13可以将vWF多聚体裂解，与野生型ADAMTS13比较，ADAMTS13突变体M4（R635A）和突变体M7（R638A）的裂解活性明显降低（$P<0.01$）。在体外剪切应力作用下，与野生型ADAMTS13比较，ADAMTS13突变体M4（R635A）和突变体M7（R638A）裂解vWF多聚体的能力明显降低（$P<0.01$）。与野生型ADAMTS13比较，ADAMTS13突变体M4（R635A）和突变体M7（R638A）与vWF之间的结合力差异无统计学意义（$P>0.05$），表明ADAMTS13的C末端与vWF之间存在多个结合位点。ADAMTS13抗体处理可在一定程度上抑制野生型和突变型ADAMTS13裂解vWF的能力。**结论**：间隔区突变后ADAMTS13的活性降低。ADAMTS13突变体M4（R635A）和突变体M7（R638A）可能是ADAMTS13在底物识别时的重要作用位点。

[关键词] 血管性血友病因子裂解酶；ADAM金属肽酶含血小板反应蛋白1型13；间隔区结构域；血管性血友病因子；血栓性血小板减少性紫癜

[中图分类号] R554.6 [文献标志码] A

Effect of ADAMTS13 spacer domain mutations on biological function of enzyme

WANG Meng[1], WU Hao[2], LI Hua[3], ZHAO Yihong[1], JIN Shengyu[1,4]

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Department of Rehabilitation, People's Hospital, Shaoxing City, Zhejiang Province, Shaoxing 312000, China; 3. Department of Physical Examination, Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133000,

[收稿日期] 2023-02-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目（81660026，82060032）；吉林省教育厅“十三五”科研项目［吉教科合字（2016）273号］

[作者简介] 王 萌（1991－），女，吉林省延吉市人，在读硕士研究生，主要从事血液病学基础和临床方面的研究。

[通信作者] 金圣宇，主任医师，硕士研究生导师（E-mail：jinsy11@163.com）

China；4. Central Laboratory，Affiliated Hospital，Yanbian University，Yanji 133000，China）

ABSTRACT　**Objective**：To discuss the biological function of the spacer domain of ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13（ADAMTS13）in the cleaving process of von Willebrand factor（vWF），and to clarify the role of ADAMTS13 in the pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura（TTP）. **Methods**：The point mutation method was introduced sequentially into the amino acid residues TEDRLPR of the ADAMTS13 spacer domain（mutants M1－M7）by site-directed mutagenesis. The constructed ADAMTS13 and its mutants plasmids were transfected into the human embryonic kidney HEK293 cells，and the recombinant proteins were purified after stable expression. The cleavage capabilities of both wild type and mutant ADAMTS13 were observed under denaturation conditions，shear stress，and after treatment with ADAMTS13 antibodies. **Results**：The fluorescence resonance energy transfer（FRET）assay results showed that compared with wild type ADAMTS13，the cleavage abilities of ADAMTS13 mutant M4（R635A）and mutant M7（R638A）on the FRET-vWF73 were decreased（$P<0.05$）. Under denaturation conditions，the wild-type ADAMTS13 could cleave the vWF multimers；compared with wild-type ADAMTS13，the cleavage activities of ADAMTS13 mutant M4（R635A）and mutant M7（R638A）were significantly decreased（$P<0.01$）. Under *in vitro* shear stress，compared with wild type ADAMTS13，the abilities of ADAMTS13 mutant M4（R635A）and mutant M7（R638A）to cleave vWF multimers were significantly decreased（$P<0.01$）. Compared with wild type ADAMTS13，the binding affinity between vWF and ADAMTS13 mutant M4（R635A）and mutant M7（R638A）had no significant difference（$P>0.05$），indicating there were multiple binding sites between C-terminal of ADAMTS13 and vWF. The ADAMTS13 antibodies were able to inhibit the cleavage ability of both wild-type and mutant ADAMTS13 to some extent. **Conclusion**：The activity of ADAMTS13 after spacer domain mutation is decreased. The ADAMTS13 mutant M4（R635A）and mutant M7（R638A）may be the important action sites for ADAMTS13 in substrate recognition.

KEYWORDS　Von Willebrand factor lyase；ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13；Spacer domain；Von Willebrand factor；Thrombotic thrombocytopenic purpura

ADAM金属肽酶含血小板反应蛋白1型13（ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13，ADAMTS13）是一种血管性血友病因子裂解酶。血栓性血小板减少性紫癜（thrombotic thrombocytopenic purpura，TTP）是由ADAMTS13严重缺乏或活性减低（低于正常值10%）引起的罕见且危及生命的血栓性微血管病[1]。TTP可导致微血管病性溶血性贫血、严重血小板减少和播散性微血管富血小板血栓相关的器官缺血[2]。在缺乏ADAMTS13情况下，血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）聚合物未得到充分加工，导致血小板自发黏附，表现为严重的危及生命的微血管血栓形成[3]。

先天性TTP是由ADAMTS13基因中的双等位基因突变引起，需要2个功能丧失突变才可完全灭活ADAMTS13基因产物。而大部分TTP是由ADAMTS13与自身抗体结合并损害其功能引起[4]。在获得性血栓性血小板减少性紫癜（acquired thrombotic thrombocytopenic purpura，aTTP）急性期，ADAMTS13自身抗体通过与间隔结构域结合，将ADAMTS13的构象转变为开放形式[5]。有研究者[6]将急性免疫性血小板减少性紫癜（immune thrombocytopenic purpura，iTTP）患者的免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）纯化，并添加到健康供体的血浆中，此时血浆中ADAMTS13为封闭构象，结果显示：在大多数情况下急性iTTP患者血浆中具有开放性构象的抗ADAMTS13自身抗体，可以诱导正常人血浆中ADAMTS13由封闭形式至开放形式的构象变化，表明ADAMTS13自身抗体的存在和ADAMTS13活性与TTP的发生发展有密切关联。目前治疗TTP主要采用ADAMTS13酶替代疗法（治疗性血浆置换）和免疫抑制剂（通常是类固醇和抗CD20单克隆治疗），以消除抗ADAMTS13抗体并使ADAMTS13活

性正常化[7]。研究[7-9]显示：在aTTP患者中，ADAMTS13抑制性自身抗体最常见的结合位点在间隔区，其次是富含半胱氨酸结构域（cysteine-rich，CysR）。ADAMTS13间隔区结构域对其活性有重要作用[10]。本研究旨在探讨ADAMTS13间隔区结构域突变对其活性的影响，分析ADAMTS13在vWF裂解过程中的生物学功能，为TTP发病机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和菌株 含人ADAMTS13的pcDNA3.1/V5-His-TOPO质粒由美国堪萨斯大学郑兴龙教授馈赠。pcDNA3.1/V5-His-TOPO载体和pSecTag/FRT/V5-His TOPO载体均购于美国Invitrogen公司。HEK293细胞购于美国组织培养库（American Tissue Culture Collection，ATCC），DH5α感受态细胞购于北京康为世纪科技有限公司。大肠杆菌购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 主要实验试剂和仪器 DMEM、OPTI-MEM、0.25%胰酶-EDTA溶液、pen-strep双抗溶液、G418抗生素、PCR纯化试剂盒、Lipofectamine2000和鼠抗V5单克隆抗体购于美国Invitrogen公司，凝胶回收试剂盒购于德国Qiagen公司，小量和中量提取质粒试剂盒购于北京康为世纪科技有限公司，SOC培养基购于青岛海博生物科技有限公司，酪蛋白酸钠购于德国Sigma公司，SeaKem HGT Agarose购于瑞士Lonza公司，Coomassie Blue购于上海碧云天生物技术有限公司，抗人vWF抗体、兔多克隆抗鼠HRP结合抗体购于丹麦Dako Cytomation公司，Puf DNA聚合酶、限制性内切酶和Ni-NTA亲和柱购于美国赛默飞世尔科技公司，Pefabloc购于美国Roche Applied Science科技公司，抗V5 IgG-IR dye800CW和抗ADAMTS13抗体购于英国Abcam公司，Human vWF Pure购于美国BD Biosciences公司，驴抗兔IgG（H+L）二抗购于美国Jackson Immuno Research Laboratories公司，荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）-vWF73购于美国Peptide Institute公司，10×磷酸盐缓冲液（phospate buffered saline，PBS）和胰蛋白酶购于北京索莱宝公司，胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购于美国Gibco公司。快流速Q琼脂糖凝胶（Q-sepharose fast flow，QFF）离子交换柱和Superose6 10/300 GL分子筛购于美国GE公司，核酸和蛋白含量测定仪购于瑞士Tecan公司，基因扩增仪购于英国PerkinElmer公司，PCR漩涡式混合器和二氧化碳培育箱购于美国赛默飞世尔科技公司，Odyssey成像系统购于美国LI-COR科技公司，超净工作台购于意大利BIOAIR公司，倒置显微镜购于日本OLYMPUS公司，BIOCAPT200E型成像系统、电泳仪、半干转印槽、酶标仪和荧光酶标仪购于美国Bio Tek公司，分光光度计购于南京恒瑞分析仪器有限公司，涡旋振荡器购于德国VORTEX公司。

1.3 ADAMTS13突变体质粒制备、蛋白表达和提纯 采用含人ADAMTS13的pcDNA3.1/V5-His-TOPO质粒按照参考文献［11］中的方法进行ADAMTS13点突变，使用PCR纯化试剂盒得到纯化的突变体质粒。将构建好的ADAMTS13及其突变体质粒转染至HEK293细胞中，采用Western blotting法检测野生型和突变型ADAMTS13蛋白表达情况，稳定表达后得到ADAMTS13蛋白。使用G418筛选收集细胞稳定表达的ADAMTS13及其突变体的重组蛋白上清液，经由Q-fast flow离子结合柱、Ni-NTA亲和层析柱和superose 610/300GL分子筛后最终得到纯化的重组蛋白。

1.4 Western blotting法检测野生型和突变型ADAMTS13的相对分子质量 差异分光光度计检测纯化的重组蛋白浓度。采用Western blotting法检测野生型和突变型ADAMTS13，利用Odyssey成像系统显像得到野生型和突变型ADAMTS13相对分子质量。

1.5 FRET实验检测ADAMTS13点突变对FRET-vWF73裂解的影响 将野生型和突变型ADAMTS13分别与FRET-vWF73结合，将不同浓度（0、2、4、8、10和12 μmol·L^{-1}）重组FRET-vWF73（recombination FRET-vWF73，rFRET-vWF73）与野生型和突变型ADAMTS13置于含反应溶液（总体积200 μL）的96孔细胞培养板中孵育。采用荧光微量平板读取器于37 ℃条件下监测荧光产生速率，每5 min 1次，持续60 min。采用Sigma Plot软件将数据整合至Michaelis-Menten方程中，得到动力学常数K_m和K_{cat}。K_m为米氏常数，即酶促反应达最高速度（V_{max}）一半时底物的浓度；K_{cat}为催化常数，表示单位时间内酶分子催化底物转化的次数，［E］为酶的浓度，$K_{cat}=V_{max}/［E］$，反映一个酶促反应的速度。

1.6　检测变性条件下野生型和突变型ADAMTS13对vWF的裂解活性　将vWF（37.5 mg·L^{-1}）分别与野生型和突变型ADAMTS13置于透析膜（0.25 μm）上，将血浆透析膜置于50 μL、pH 8.0的缓冲液中（10 mmol·L^{-1} Tris-HCl，含有1.5 mol·L^{-1}尿素），37 ℃下孵育4 h。1% SeaKem HGT琼脂糖凝胶分离变性蛋白，采用Western blotting法检测vWF裂解产物。将蛋白质转膜，加入抗vWF抗体后，利用Odyssey成像系统（美国LI-COR公司）显像，观察vWF裂解产物分布情况。

1.7　检测剪切应力作用下野生型和突变型ADAMTS13对vWF的裂解活性　为模拟生理条件，观察ADAMTS13的活性，采用微型涡流振荡器合成剪切应力后，分别观察野生型和突变型ADAMTS13对vWF的裂解情况。将vWF（37.5 mg·L^{-1}）与野生型和突变型ADAMTS13分别置于0.2 mL离心管中，然后在振荡器上震荡10 min，离心，加热变性，1%SeaKem HGT琼脂糖凝胶分离后采用Western blotting法检测vWF裂解产物。在变性的条件下，ADAMTS13可将超大型vWF多聚体（unusually large-vWF，UL-vWF）裂解，将原本表现为高相对分子质量（high relative molecular weight，HMW）的部分裂解为低相对分子质量（low relative molecular weight，LMW）的产物。当ADAMTS13裂解UL-vWF时，LMW越多，HMW越少，HMW/LMW比值越小，表明ADAMTS13的裂解活性越强，反之则表明其裂解活性越弱。

1.8　检测野生型和突变型ADAMTS13与vWF的结合力　于96孔细胞培养板中将37.5 mg·L^{-1} vWF孵育1 h后用PBS缓冲液洗涤3次，在20 mmol·L^{-1} Tris-HCl和150 mmol·L^{-1} NaCl中用2.5%BSA封闭，加入10 mmol·L^{-1} EDTA，加入100 μL野生型和突变型ADAMTS13，孵育2 h。PBS缓冲液洗涤3次，然后与过氧化物酶偶联的兔多克隆抗鼠HRP结合抗体共同温育1 h。TBS缓冲液洗涤3次，加入100 μL 3，3′，5，5′-四甲基联苯胺（3，3′，5，5′-tetramethylbenzidine，TMB）避光孵育10 min。加入1.5 mmol·L^{-1} H_2SO_4 50 μL，采用酶标仪检测450 nm波长处吸光度（A）值，实验重复3次。采用GraphPad Prism软件计算B_{max}值和K_d值，并计算B_{max}/K_d比值，表示ADAMTS13与vWF的结合能力。

1.9　Western blotting法检测ADAMTS13抗体处理后vWF产物蛋白表达水平　将vWF（37.5 mg·L^{-1}）以20 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 8.0）稀释后分别与ADAMTS13抗体37 ℃孵育2 h，取5 mmol·L^{-1} $CaCl_2$［内含1×Protein protease inhibitor（EDTA-free）］以20 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 8.0）溶液稀释，与37 ℃活化1 h的野生型和突变型ADAMTS13（终浓度为50 mmol·L^{-1}）混合后置于0.5 mL EP管中（总体系为40 μL），37 ℃反应1 h。加入终浓度为20 mmol·L^{-1} EDTA终止酶切反应。1% SeaKem HGT琼脂糖凝胶分离后，采用Western blotting法检测vWF产物蛋白表达水平。

1.10　统计学分析　采用Sigma Plot 13.0统计软件进行统计学分析。UL-vWF的HMW/LMW比值及ADAMTS13与vWF之间的B_{max}和K_d以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　ADAMTS13突变体质粒的构建　采用定点诱变的方法，以编码人野生型ADAMTS13的pcDNA3.1/V5-His-TOPO为模板。从TTP患者血浆中分离出抗ADAMTS13 IgG自身抗体并找到靶向位点，分别为7个氨基酸残基TEDRLPR（Thr632、Glu633、Asp634、Arg635、Leu636、Pro637和Arg638）。将位于ADAMTS13间隔区结构域中Thr632和Arg638之间的7个氨基酸残基用丙氨酸逐步替换，构建出不同的突变体（M1：T632A；M2：E633A；M3：D634A；M4：R635A；M5：L636A；M6：P637A；M7：R638A）。见图1。

2.2　HEK293细胞中野生型和突变型ADAMTS13蛋白表达情况　将野生型和突变型ADAMTS13质粒成功转染至HEK293细胞，筛选可以稳定表达ADAMTS13的细胞，由琼脂糖凝胶离子交换柱、Ni-NTA亲和柱和Superose6 10/300 GL分子筛纯化后，得到纯化的ADAMTS13，Western blotting法检测结果显示：野生型和突变型ADAMTS13蛋白相对分子质量正确，表达完整。见图2。

2.3　点突变后ADAMTS13对rFRET-vWF73裂解的剪切能力　FRET实验中K_{cat}/K_m比值（L·mol^{-1}·s^{-1}）：野生型ADAMTS13为0.734，突变体M1（T632A）为0.932，突变体M2

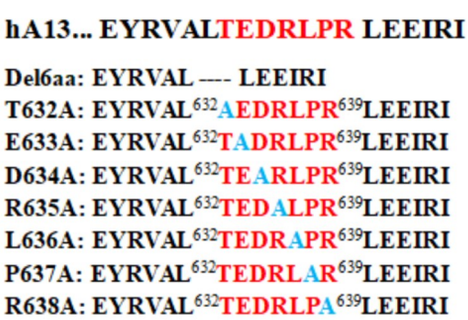
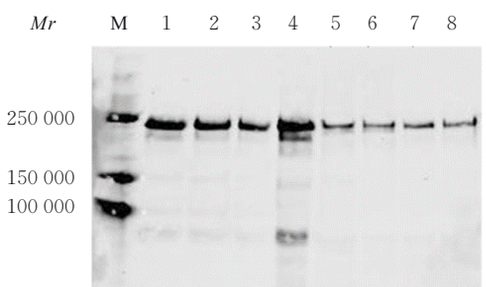


图 1 被丙氨酸逐一取代后间隔区结构域中 7 个氨基酸残基

Fig. 1 Seven amino acid residues in spacer domain after replaced by alanine one by one



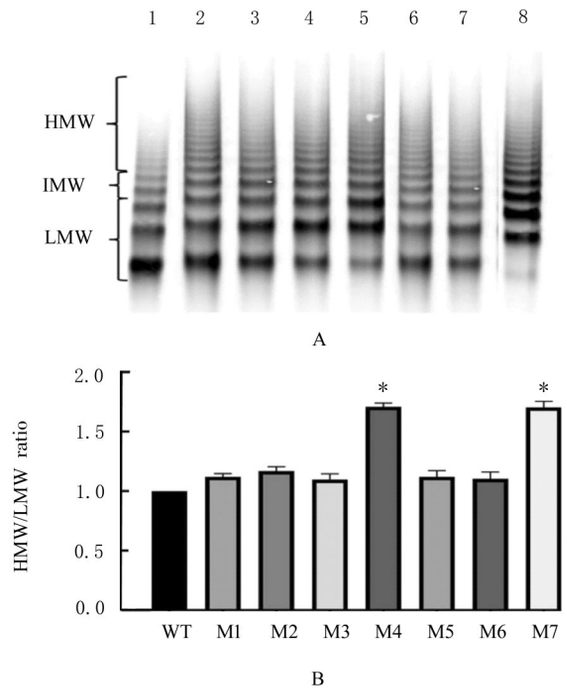
M:Marker; Lane 1: WT (wild type) ADAMTS13; Lane 2:M1 (T632A); Lane 3: M2(E633A); Lane 4: M3(D634A); Lane 5: M4(R635A); Lane 6: M5(L636A); Lane 7: M6 (P637A); Lane 8: M7(R638A).

图 2 Western blotting 法检测野生型和突变型 ADAMTS13 纯化蛋白相对分子质量

Fig. 2 Relative molecular weights of wild type and mutant ADAMTS13 purified proteins detected by Western blotting method

(E633A) 为 0.709，突变体 M3 (D634A) 为 0.464，突变体 M4 (R635A) 为 0.281，突变体 M5 (L636A) 为 0.954，突变体 M6 (P637A) 为 0.927，突变体 M7 (R638A) 为 0.356。与其他突变体比较，突变体 M4 和 M7 在酶切 rFRET-vWF73 时的 K_{cat}/K_m 比值降低，即其剪切能力降低。同等条件下，野生型 ADAMTS13 的 K_{cat}/K_m 比值分别约为突变体 M4 和突变体 M7 的 2.6 倍和 2.0 倍。

2.4 变性条件下 ADAMTS13 点突变后对 vWF 的裂解活性 与野生型 ADAMTS13 比较，突变体 M4 和 M7 裂解 UL-vWF 时的 HMW/LMW 比值明显升高 ($P<0.01$)，其余 ADAMTS13 突变体裂解 UL-vWF 时的 HMW/LMW 比值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 3。



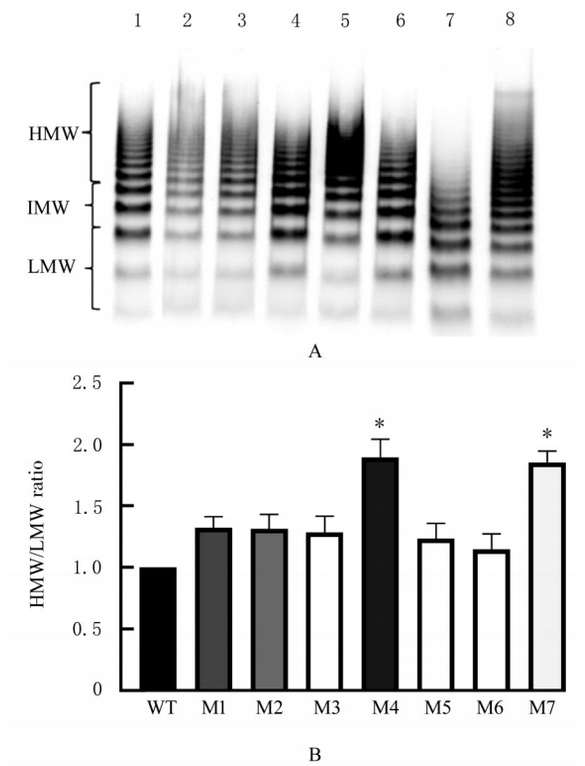
Lane 1: WT (wild type) ADAMTS13; Lane 2: M1 (T632A); Lane 3: M2 (E633A); Lane 4: M3 (D634A); Lane 5: M4 (R635A); Lane 6: M5 (L636A); Lane 7: M6(P637A); Lane 8: M7(R638A). IMW: Intermediate molecular weight. $^*P<0.01$ *vs* WT ADAMTS13.

图 3 Western blotting 法检测变性条件下野生型和突变型 ADAMTS13 裂解 vWF 后蛋白产物表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram(A) and histogram(B) of protein products after wild type and mutant ADAMTS13 cleaving vWF under denaturation conditions detected by Western blotting method

2.5 剪切应力作用下 ADAMTS13 点突变后对 vWF 的裂解能力 在微型涡旋振荡器产生的高剪切应力的作用下，野生型和突变型 ADAMTS13 对 vWF 的裂解能力发生变化。Western blotting 法检测结果显示：与野生型 ADAMTS13 比较，突变型 ADAMTS13 裂解 UL-vWF 的产物减少，突变体 M4 和 M7 的 HMW/LMW 比值明显升高 ($P<0.01$)，表明突变体 M4 和 M7 对 UL-vWF 的裂解能力明显降低。见图 4。

2.6 突变型 ADAMTS13 与 vWF 结合力 与野生型 ADAMTS13 比较，突变型 ADAMTS13 与 vWF 之间的结合力差异无统计学意义 ($P>0.05$)，表明 ADATMS13 的 C 末端与 vWF 之间可能存在多个结合位点 (表 1)，M4 (R635A) 和 M7 (R638A) 位点的突变可以减弱酶切能力但不会影



Lane 1：WT（wild type）ADAMTS13；Lane 2：M1（T632A）；Lane 3：M2（E633A）；Lane 4：M3（D634A）；Lane 5：M4（R635A）；Lane 6：M5（L636A）；Lane 7：M6（P637A）；Lane 8：M7（R638A）.IMW：Intermediate molecular weight.$^{*}P<0.01$ *vs* WT ADAMTS13.

图4　Western blotting法检测剪切应力作用下野生型和突变型ADAMTS13裂解vWF后蛋白产物电泳图（A）和直条图（B）

Fig. 4　Electrophoregram(A) and histogram(B) of protein products after wild type and mutant ADAMTS13 cleaving vWF under shear force detected by Western blotting method

响整体的结合力。

2.7　ADAMTS13抗体作用后野生型和突变型ADAMTS13在剪切应力作用下裂解vWF的能力

加入ADAMTS13抗体后，野生型和突变型ADAMTS13裂解vWF的LMW产物较未加入时减少，表明ADAMTS13抗体一定程度上抑制了野生型和突变型ADAMTS13裂解vWF的能力，提示ADATMS13与vWF之间可能存在多个结合位点，剪切力对于ADAMTS13裂解vWF的过程至关重要。见图5。

3　讨　论

TTP是一种罕见且危及生命的血栓性微血管病，部分急性发作患者经过治疗后可存活，但幸存患者在后期随访中复发的风险仍然很高[12]。ADAMTS13是一种血浆金属蛋白酶，可切割血管性血友病因子，对于正常止血起重要作用[13]。TTP患者的血液中，ADAMTS13活性被抑制或与促进其清除的自身抗体靶向结合，导致可切割UL-vWF具有活性的ADAMTS13<10%[3]。对于ADAMTS13金属蛋白酶结构和功能的研究，是寻找TTP等疾病治疗方法的关键。

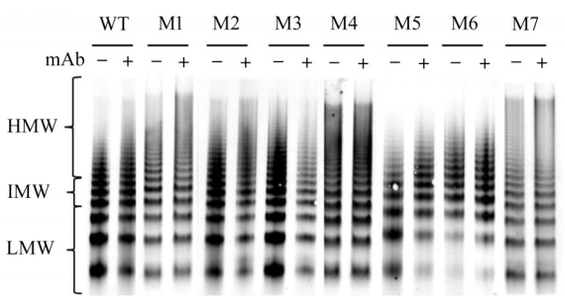
vWF73是可被ADAMTS13裂解的最小片段，且较vWF更加敏感，因此对ADAMTS13及

表1　野生型和突变型ADAMTS13与vWF的结合力

Tab. 1　Binding affinities of wild-type and mutant ADAMTS13 to vWF

ADAMTS13	B_{max}	K_d ($\times10^{-6}$mol^{-1})	B_{max}/K_d ($\times10^{-3}$mol^{-1})
WT	0.66±0.06	13.81±1.20	47.61
M1	0.43±0.06	13.36±1.50	32.01
M2	0.70±0.08	11.25±1.80	61.95
M3	0.56±0.07	14.14±1.90	39.78
M4	0.74±0.09	18.97±1.70	38.79
M5	0.56±0.07	12.93±2.20	43.61
M6	0.52±0.06	12.75±1.90	40.95
M7	0.45±0.05	12.74±1.80	35.19

B_{max}：Maximum binding capacity；K_d：Dissociation constant；WT：wild type ADAMTS13；M1：T632A；M2：E633A；M3：D634A；M4：R635A；M5：L636A；M6：P637A；M7：R638A.



WT：Wild type ADAMTS13；M1：T632A；M2：E633A；M3：D634A；M4：R635A；M5：L636A；M6：P637A；M7：R638A. mAb：ADAMTS13 antibody；IMW：Intermediate molecular weight.

图5　Western blotting法检测ADAMTS13抗体作用后野生型和突变型ADAMTS13在剪切应力作用下裂解vWF蛋白产物电泳图

Fig. 5　Electrophoregram of protein products after wild type and mutant ADAMTS13 cleaving vWF under shearing force after treated with ADAMTS13 antibody detected by Western blotting method

其突变体的研究中，经常使用GST-vWF73-H或FRETS-vWF73[14]。正常情况下，vWF呈球状，其折叠的蛋白构象将一些功能区隐藏，对ADAMTS13的结合裂解敏感度不高。血液中存在高速流动的流体力，可以将折叠成球状的vWF展开成为链状，暴露相关功能结构域，使其可以被ADAMTS13更好地识别并裂解[15]。研究[16]显示：通过涡旋产生的剪切力模拟血液流动状态，在剪切力作用下，Spacer区域缺失的ADAMTS13突变体对vWF的亲和性降低，表明该区域在vWF识别中十分关键。本研究结果显示：静止条件下，将经过变性处理的vWF与野生型和各突变型ADAMTS13作用后，与野生型ADAMTS13比较，M4和M7突变体裂解UL-vWF时的HMW/LMW比值明显升高，表明M4和M7突变体的裂解能力较野生型ADAMTS13受限；在体外剪切应力作用下，与野生型ADAMTS13比较，突变型ADAMTS13对UL-vWF的裂解产物减少，其中突变体M4和M7的HMW/LMW比值明显升高。本研究结果显示：ADATMS13与vWF之间可能存在多个结合位点。本研究结果表明：在变性条件、剪切应力和ADAMTS13抗体存在的情况下，ADAMTS13中的Spacer结构域在与vWF识别并酶切裂解的过程中起重要的作用，突变体M4和突变体M7可能是ADAMTS13与vWF识别结合的重要位点。

目前，相关研究[17-18]对TTP的治疗提出新的方案，如浆细胞靶向治疗（如硼替佐米和达雷木单抗）和输注重组ADAMTS13等。有队列研究[19]证实：TTP患者急性期后监测ADAMTS13活性和自身抗体的水平，可以作为达到缓解和无病随访期间复发的预测变量。研究[20-21]表明：ADAMTS13不仅在TTP的发生发展过程中起重要作用，在动静脉血栓、炎症、血管生成和肿瘤生物学过程中也发挥重要作用。

综上所述，本研究通过体外实验证实了ADAMTS13间隔区突变后的活性降低。ADAMTS13突变体M4和突变体M7可能是ADAMTS13在底物识别时的重要作用位点。因Spacer结构域的研究局限于体外，在体内生理环境下Spacer结构域的作用还有待进一步研究。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

王萌和吴昊参与实验设计和论文撰写，王萌、吴昊和赵艺鸿参与实验操作和数据分析，李华和金圣宇参与研究设计和研究方案制定，金圣宇参与论文最终修订和审校。

[参考文献]

[1] FIDALGO T, MARTINHO P, PINTO C S, et al. Combined study of ADAMTS13 and complement genes in the diagnosis of thrombotic microangiopathies using next-generation sequencing [J]. Res Pract Thromb Haemost, 2017, 1(1): 69-80.

[2] XIE X T, XIAO Y Y, ZHANG Y, et al. Combination regimens containing daratumumab for initial diagnosed acquired thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. J Thromb Thrombolysis, 2023, 55(2): 399-405.

[3] ERCIG B, ARFMAN T, HRDINOVA J, et al. Conformational plasticity of ADAMTS13 in hemostasis and autoimmunity [J]. J Biol Chem, 2021, 297(4): 101132.

[4] TAYLOR A, VENDRAMIN C, OOSTERHOLT S, et al. Pharmacokinetics of plasma infusion in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. J Thromb Haemost, 2019, 17(1): 88-98.

[5] THOMPSON G L, KAVANAGH D. Diagnosis and treatment of thrombotic microangiopathy [J]. Int J Lab Hematol, 2022, 44(Suppl 1): 101-113.

[6] ROOSE E, SCHELPE A S, TELLIER E, et al. Open ADAMTS13, induced by antibodies, is a biomarker for subclinical immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. Blood, 2020, 136(3): 353-361.

[7] SCULLY M. TTP: an open and shut (closed) case [J]. Blood, 2020, 136(3): 265-266.

[8] ZHENG X L, WU H M, SHANG D Z, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. Haematologica, 2010, 95(9): 1555-1562.

[9] THOMAS M R, GROOT R D, SCULLY M A, et al. Pathogenicity of anti-ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. EBioMedicine, 2015, 2(8): 942-952.

[10] WAELE L D, CURIE A, KANGRO K, et al. Anti-cysteine/spacer antibodies that open ADAMTS13 are a common feature in iTTP [J]. Blood Adv, 2021, 5(21): 4480-4484.

[11] JIN S Y, SKIPWITH C G, ZHENG X L. Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the

spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor[J]. Blood, 2010, 115(11): 2300-2310.

[12] XIE X T, XIAO Y Y, ZHANG Y, et al. Combination regimens containing daratumumab for initial diagnosed acquired thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. J Thromb Thrombolysis, 2023, 55(2): 399-405.

[13] HALKIDIS K, ZHENG X L. ADAMTS13 conformations and mechanism of inhibition in immune thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. J Thromb Haemost, 2022, 20(10): 2197-2203.

[14] PLAUTZ W E, RAVAL J S, DYER M R, et al. ADAMTS13: origins, applications, and prospects[J]. Transfusion, 2018, 58(10): 2453-2462.

[15] 吴　昊，李　华，苏　畅，等. 血管性血友病因子裂解酶CysR结构域生物学功能的研究[J]. 中国实验血液学杂志，2021, 29(3): 893-900.

[16] AI J H, SMITH P, WANG S W, et al. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor[J]. J Biol Chem, 2005, 280(33): 29428-29434.

[17] SELVAKUMAR S, LIU A, CHATURVEDI S. Immune thrombotic thrombocytopenic purpura: spotlight on long-term outcomes and survivorship[J]. Front Med, 2023, 10: 1137019.

[18] 彭　一，张　榕. 药物相关血栓性微血管病的发病机制与诊治[J]. 中国实用内科杂志，2023, 43(6): 457-460.

[19] SCHIEPPATI F, RUSSO L, MARCHETTI M, et al. Low levels of ADAMTS-13 with high anti-ADAMTS-13 antibodies during remission of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura highly predict for disease relapse: a multi-institutional study[J]. Am J Hematol, 2020, 95(8): 953-959.

[20] 李树君，金圣宇. 血管性血友病因子裂解酶在血栓性血小板减少性紫癜中的作用研究进展[J]. 延边大学医学学报，2022, 45(1): 55-59.

[21] COLONNE C K, FAVALORO E J, PASALIC L. The intriguing connections between von willebrand factor, ADAMTS13 and cancer[J]. Healthcare, 2022, 10(3): 557.