

研究报告

重组 EpoAB-NGF 模拟肽的神经营养功能*

潘勇昭 陈虹 王欣 马晓骊 黄秉仁**

(中国医学科学院 北京协和医学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室 北京 100005)

摘要 目的:研究重组融合蛋白红细胞生成素 AB 肽-神经生长因子模拟肽(EpoAB-NGF9 和 EpoAB-NGF12)的神经营养作用。方法:构建 pET-42a-EpoAB-NGF9/12 原核表达质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3),以 IPTG 诱导表达,亲和层析纯化重组蛋白,显微镜观察 PC12 细胞诱导分化,流式细胞仪检测凋亡细胞。结果:大肠杆菌表达的重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 分子量约为 30kDa,抗 GST 抗体免疫印迹反应呈阳性。融合蛋白可以诱导 PC12 细胞分化,促进轴突生长。R2L1 细胞去血清培养,凋亡细胞占 $(31.7 \pm 0.60)\%$,去血清后加入融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12,细胞凋亡率分别为 $(25.2 \pm 3.52)\%$ 、 $(25.7 \pm 1.46)\%$,呈现一定程度的抑制细胞凋亡的活性。结论:重组 EpoAB-NGF 模拟肽融合蛋白具有与 NGF 类似的神经营养作用。

关键词 EpoAB-NGF 模拟肽 原核表达 神经营养

中图分类号 Q786

红细胞生成素(erythropoietin, Epo)最先作为一个促进红细胞生成的生长因子被确认,后来发现 Epo 和它的受体 EpoR 广泛存在于脑皮层和脊髓等中枢神经系统,对神经系统的急、慢性损伤有着不依赖于其红细胞生成作用的营养保护作用^[1-2]。经过结构域及序列分析,已将 Epo 的神经保护作用定位在其氨基酸顺序中一个由 17 个氨基酸组成的肽段上,称作 EpoAB 肽(AEHCSLNENITVPDTKV),其还有通透血脑屏障的作用^[3-4]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)可通过结合靶细胞膜上的高/低亲和力受体(Trk/p75^{NTR})调控神经元的存活、增殖、分化、突触生长和凋亡等生命过程,有较好的临床应用前景^[5-6]。前期工作中构建了表达 p75^{NTR}的 R2L1 凋亡细胞模型^[7],并利用该细胞模型和噬菌体展示文库筛选出了 2 个可以和 p75^{NTR}结合并有抗凋亡作用的 9 肽和 12 肽,即 NGF 模拟肽(NGF9 和 NGF12)^[8]。在原核细胞中表达重组 EpoAB-NGF 模拟肽融合蛋白,亲和层析纯化得到重组蛋白,并通过刺

激 PC12 细胞轴突生长及抑制 R2L1 细胞去血清凋亡实验,对融合蛋白的神经营养作用进行了初步验证,为深入研究该融合的模拟多肽对中枢神经系统的作用的动物模型实验打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pUC18- α -factor-EGF-EpoAB-NGF9、pUC18- α -factor-EGF-EpoAB-NGF12 质粒、pET-42a 表达载体、PC12 细胞、R2L1 细胞、大肠杆菌 DH5 α 及 BL21(DE3)菌株由本实验室保存;PCR 试剂购自天根生物有限公司,pTA2 载体为 Toyobo 公司产品,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司,DNA Marker、蛋白质分子量标准购于北京全式金生物技术有限公司;谷胱甘肽-琼脂糖介质为 GE Healthcare 产品,超滤离心管购于 Millipore 公司,蛋白浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司;兔抗 GST 标签多克隆抗体由本室制备,小鼠抗 His 标签单克隆抗体由本所细胞生物室提供,HRP 标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司;DMEM 培养基、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品,胎牛血清

收稿日期:2010-09-06 修回日期:2010-10-19

* 国家自然科学基金资助项目(30571065)

** 通讯作者,电子信箱:huangbr@public.bta.net.cn

购自北京元亨圣马生物技术有限公司、马血清为 Hyclone 公司产品,神经生长因子 NGF 为 R&D 公司产品, EpoAB(17aa)肽由上海华大天源生物技术有限公司合成并纯化。扩增 EpoAB-NGF 模拟肽的引物由 Invitrogen 公司合成:带有 *Spe* I 的酶切位点的上游引物 P1 序列为 5'-CACTAGTTTGGTTCCAAGAGGTTCTGC-3',带有 *Hind* III 酶切位点、终止密码子 TAA 及 His 标签序列的下游引物 P2、P3 序列分别为:5'-GAAGCTTTT AGTGATGGTGATGGTGATGACACATTGGATGCATTG-3',5'-GAAGCTTTTACTGATGGTGATGGTGATGAGCTG GCCATGGAATTC-3'。

1.2 方法

1.2.1 重组 EpoAB-NGF 模拟肽原核表达载体构建 分别以本室构建的 pUC18- α -factor-EGF-EpoAB-NGF9、pUC18- α -factor-EGF-EpoAB-NGF12 质粒为模板,以引物 P1、P2 扩增 EpoAB-NGF9 片段,以引物 P1、P3 扩增 EpoAB-NGF12 片段;PCR 扩增产物分别克隆至 pTA2 载体,再用 *Spe* I/*Hind* III 双酶切,酶切片段与 *Spe* I/*Hind* III 处理后的 pET-42a 表达载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,重组质粒以 *Spe* I/*Hind* III 双酶切鉴定得到阳性克隆,测序确证。

1.2.2 重组 EpoAB-NGF 模拟肽的诱导表达 测序正确的 pET-42a-EpoAB-NGF9、pET-42a-EpoAB-NGF12 表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。在 LB 液体培养基中培养,测 OD₆₀₀ 至 0.5~0.6 时用 1 mmol/L IPTG 诱导表达 3 h,并用未转化质粒的 BL21 菌株和转化 pET-42a 空载体的 BL21(DE3)菌株做诱导表达对照,各菌取样后用 12% SDS-PAGE 分析,即同时取全菌组分、周质组分、超声破碎后离心上清、超声破碎后离心沉淀样品进行重组蛋白的表达和可溶性分析。

1.2.3 重组 EpoAB-NGF 模拟肽的纯化 离心收集诱导表达的菌体,超声波破碎后,取上清用谷胱甘肽-琼脂糖介质柱层析纯化。平衡缓冲液为 PBS(pH 7.4),洗脱缓冲液为 10mmol/L 谷胱甘肽,50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)。亲和层析得到的目的蛋白用 12% SDS-PAGE 检测蛋白质纯度,用 10kDa 的超滤离心管进行换液透析溶于 PBS(pH 7.4)中,BCA 法测定蛋白质浓度,分装后 -20℃ 冻存备用。

1.2.4 重组 EpoAB-NGF 模拟肽的 Western 印迹鉴定 取纯化的目的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分离,电转至 NC 膜,5% 脱脂奶粉预杂交封闭。加入 1:500 稀释兔抗 GST 标签多克隆抗体或 1:2 000 稀释小鼠抗 His

标签单克隆抗体,4℃ 杂交过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10min;加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG,室温杂交 2 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,化学发光法进行显色。

1.2.5 刺激 PC12 细胞轴突生长实验 将 PC12 细胞(大鼠嗜铬细胞瘤细胞系)以 2×10^5 个细胞/孔接种于 12 孔板内,用含 10% 马血清、5% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基在 37℃、5% CO₂ 培养 24~72h 使细胞贴壁;小心弃除培养基,换成含 0.5% 胎牛血清、1% 马血清的 DMEM 培养基,并在各孔中分别加入终浓度为 100 ng/ml NGF,100 ng/ml EpoAB,1 μ g/ml GST 对照蛋白,1 μ g/ml GST-EpoAB-NGF9,1 μ g/ml GST-EpoAB-NGF12,留 1 孔作培养基空白对照,继续培养 72 h 后,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色后镜检观察细胞形态。

1.2.6 抑制 R2L1 细胞去血清凋亡实验 将 R2L1 细胞(表达 p75^{NTR} 的小鼠神经细胞系)以 2×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板内,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 培养 24 h 以上使细胞贴壁;弃除培养基,PBS 小心洗涤细胞,换成无血清的 DMEM 培养基,并在各孔分别加入 100 ng/ml NGF,100 ng/ml EpoAB,1 μ g/ml GST 对照蛋白,1 μ g/ml GST-EpoAB-NGF9,1 μ g/ml GST-EpoAB-NGF12,另有含 10% 胎牛血清及去血清培养基的对照孔,继续培养 12 h 或 24 h,胰酶消化收集细胞,-20℃ 透化 12 h 以上,RNase 消化,PI 染色,2 h 内用流式细胞仪分析检测凋亡细胞。采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 pET-42a-EpoAB-NGF9/12 重组质粒的鉴定

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,在 100~250bp 之间得到了特异性扩增片断,与预期片段大小相符,EpoAB-NGF9/EpoAB-NGF12 分别为 148 bp 和 167bp。按照实验方法所述将目的基因片段分别克隆至 pET-42a 表达载体,提取重组质粒进行 *Spe* I/*Hind* III 双酶切鉴定,插入片段约为 150 bp,DNA 测序结果显示序列正确。

2.2 重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 的表达、纯化和鉴定

重组质粒 pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 分别在大肠杆菌中用 IPTG 诱导表达,电泳检测结果显示诱导表达的融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/NGF12 的分子量约为 30kDa(图 1),与设计相符。

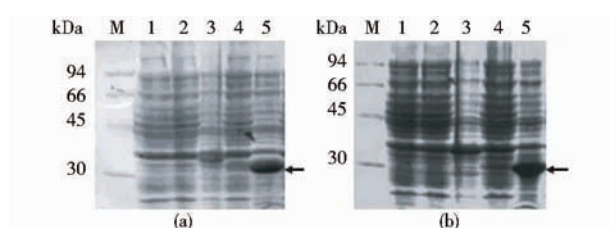


图1 重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 的原核表达

Fig.1 Expression of recombinant GST-EpoAB-NGF9/12 fusion proteins in *E. coli*

(a) Protein profile of cell lysates from *E. coli* transformed with pET-42a-EpoAB-NGF9 (b) Protein profile of cell lysates from *E. coli* transformed with pET-42a-EpoAB-NGF12; M: Protein molecular weight marker; 1: *E. coli* BL21 (DE3); 2: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a uninduced; 3: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a induced with IPTG; 4: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 uninduced; 5: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 induced with IPTG; Arrows indicate 30kDa band corresponding to GST-EpoAB-NGF9/NGF12

对大肠杆菌中表达的融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/NGF12 进行可溶性表达的分析,结果显示,2 个融合蛋白在超声破碎后离心上清中的可溶性蛋白表达量均达到约 50% 以上(图 2)。

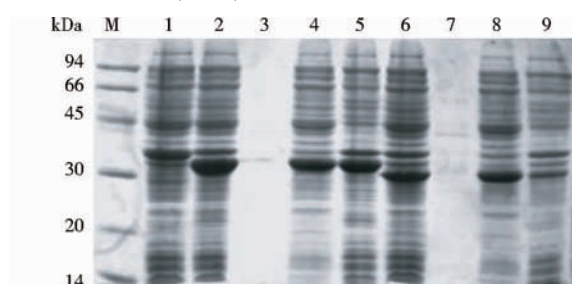


图2 重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/NGF12

表达的可溶性分析

Fig.2 SDS-PAGE showing the protein profiles of different components of cell lysate from *E. coli* transformed with plasmids

M: Protein marker; 1: Whole cell lysate from *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a induced with IPTG; 2, 6: Whole cell lysate from induced *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 respectively; 3, 7: Periplasmic extracts from induced *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 respectively; 4, 8: The soluble fractions (supernatants) from induced *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 respectively; 5, 9: Insoluble fractions from induced *E. coli* BL21 (DE3)/pET-42a-EpoAB-NGF9/NGF12 respectively

用谷胱甘肽-琼脂糖介质亲和层析纯化可溶性表达的 GST-EpoAB-NGF9/NGF12 融合蛋白,经 SDS-PAGE 鉴定显示获得的融合蛋白纯度可达到 90% 左右(图 3a、图 3b)。鉴于重组蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 的两端分别带有 GST 和 6xHis 标签,故采用抗标签抗体对纯化的重组蛋白进行 Western 印迹鉴定,化学发光呈阳性反应,表明纯化得到的 GST-EpoAB-NGF9/12 融合蛋白为结构完整的特异性表达蛋白(图 3c)。

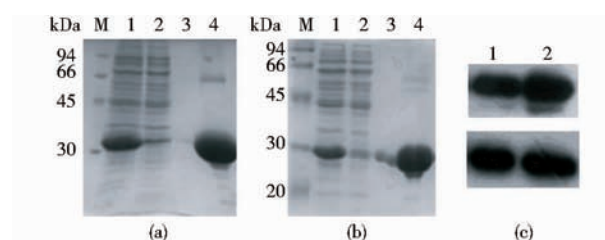


图3 亲和层析纯化重组融合蛋白

GST-EpoAB-NGF9/NGF12 的鉴定

Fig.3 Identification of recombinant fusion protein GST-EpoAB-NGF9/NGF12 purified by affinity chromatography

(a) Protein profile of GST-EpoAB-NGF9 (b) Protein profile of GST-EpoAB-NGF12; M: Protein Marker; 1: Supernatant of cell lysate; 2: Unbound fraction; 3: Wash solution; 4: Elution fraction using glutathione (c) Western blot analysis of purified recombinant proteins of GST-EpoAB-NGF9/12; above: Identification with anti-GST tag antibody; below: Identification with anti-His tag antibody; 1: Recombinant protein of GST-EpoAB-NGF9; 2: Recombinant protein of GST-EpoAB-NGF12

2.3 重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 可以诱导 PC12 细胞轴突生长

降低 DMEM 培养基中马血清(1%)和胎牛血清(0.5%)的含量,可以诱导 PC12 细胞的分化,表现为细胞从圆形、半贴壁细胞变为多边形或锥形的贴壁细胞(图 4a)。PC12 细胞在 NGF 的诱导下可以分化成类神经元细胞,除了神经树突样突起外,还有明显的神经轴突呈星形辐射状生长,神经突起的长度可超过细胞直径(图 4b)。用重组表达的带有 NGF 模拟肽的融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12(图 4e、图 4f)刺激 PC12 细胞,可以呈现类似 NGF 样的作用,诱使细胞分化成辐射状伸展。而合成的 EpoAB 肽(图 4c)和 GST 蛋白(图 4d)对照则与单纯降低血清含量相似,部分 PC12 细胞可产生很短的类似神经树突样突起,且以单方向伸展为主。比较各刺激物对 PC12 细胞轴突样分化的影响,排序依

次为: NGF > GST-EpoAB-NGF9 > GST-EpoAB-NGF12 > EpoAB > GST > 降低血清含量。

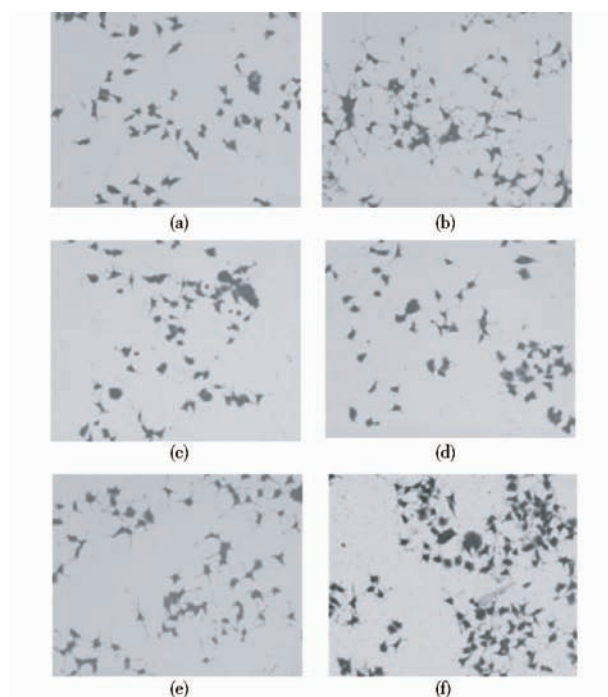


图4 诱导 PC12 细胞轴突生长实验

Fig. 4 The experiment of induce neuritis outgrowth in PC12 cells

(a) Medium alone (b) NGF (c) EpoAB (d) GST
(e) GST-EpoAB-NGF9 (f) GST-EpoAB-NGF12

2.4 重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 可以部分抑制 R2L1 细胞的去血清凋亡

R2L1 细胞去血清培养后,细胞逐渐收缩变圆,发生凋亡。在进行的 3 次独立实验中,统计分析比较不同处理组的细胞凋亡率。在培养 12 h 后,正常培养组凋亡细胞占 $(10.3 \pm 0.93)\%$,去血清培养组为 $(31.7 \pm 0.60)\%$,去血清后加入 NGF 培养为 $(24.2 \pm 6.95)\%$,表明 NGF 对 R2L1 细胞去血清培养诱导凋亡有一定的保护作用。GST 对照组为 $(32.2 \pm 0.60)\%$,与去血清培养组相当;EpoAB 组、GST-EpoAB-NGF9 组、GST-EpoAB-NGF12 组的细胞凋亡率依次为 $(24.7 \pm 11.06)\%$ 、 $(25.2 \pm 3.52)\%$ 、 $(25.7 \pm 1.46)\%$ (图 5),表现出一定程度的抑制细胞凋亡活性。采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,单因素方差分析显示, $F = 4.064$, $P = 0.014$ (< 0.05),提示各组间的细胞凋亡率存在显著性差异,进一步比较显示,组间差异主要存在于正常培养组和去血清凋亡组间, $P = 0.000$,其它各组间细胞凋亡率的差异均未达到具显著性意义的水平。

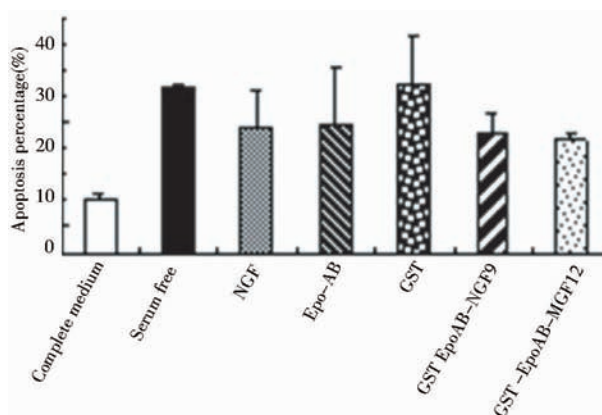


图5 抑制 R2L1 细胞去血清凋亡实验

Fig. 5 Inhibition of apoptotic cell death induced by serum free medium incubation in R2L1 cell

3 讨论

外源性 Epo 可以用来治疗不同形式的神经损伤,包括缺血性、创伤性、毒性和炎症性脑脊髓损伤,且其短期治疗被证明是安全有效的^[9-11]。但是用 Epo 长期大剂量治疗神经损伤时,则使红细胞压积增大而增加血液粘滞度,并引起血小板凝集,有进一步引起血管血栓形成、高血压、充血性心力衰竭、心肌梗死等副作用的危险^[12-13]。同样,NGF 作为 118 个氨基酸残基组成的蛋白质,不易透过血脑屏障,以及治疗中出现的痛觉过敏等副作用妨碍了其在临床上的进一步应用。因此,构建同时表达仅有神经保护作用而无促红系作用的 EpoAB 和具有 NGF 样生物活性的 NGF 模拟肽的载体,将二者融合表达,使其发挥 NGF 和 Epo 的双重生物活性,具有潜在的临床应用可能。

在前期研究中曾采用毕赤酵母系统对 EpoAB-NGF 模拟肽进行表达,但由于融合蛋白的分子量过小(约 4kDa),重组蛋白不稳定而未获成功。在大肠杆菌系统中利用 GST 标签蛋白与 EpoAB-NGF 模拟肽的融合表达,不仅增加了目的蛋白的可溶性,并且由于 GST 有助于保护重组蛋白免受蛋白酶的降解,提高了重组蛋白的稳定性;而进一步利用亲和层析方法则能便利地获得了重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12。在体外功能实验中,主要基于神经营养因子 NGF 的作用,选用了诱导 PC12 细胞分化及保护 R2L1 细胞去血清凋亡的实验,设置 NGF、GST 蛋白对照。实验结果表明,重组融合蛋白 GST-EpoAB-NGF9/12 确实具有 NGF 样生物活性,但其诱导 PC12 细胞轴突生长的活性低于 NGF;在对 R2L1 细胞去血清诱导凋亡实验中,尽管各组细胞凋

亡率未表现出显著性差异,但是仍可见 NGF、GST-EpoAB-NGF9/12 都表现了一定程度的抑制细胞去血清凋亡的活性。研究的结果为进一步开展体内实验,研究该重组蛋白是否同时具有 EPO-AB 肽的血脑屏障通透性及其神经营养保护作用的多能性奠定了基础。

参考文献

- [1] Maiese K, Li F, Chong Z Z. New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA, 2005, 293(1): 90-95.
- [2] Cervellini I, Bello E, Frapolli R, et al. The neuroprotective effect of erythropoietin in docetaxel-induced peripheral neuropathy causes no reduction of antitumor activity in 13762 adenocarcinoma-bearing rats. Neurotox Res, 2010, 18(2): 151-160.
- [3] Campana W M, Misasi R, O'Brien J S. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. Int J Mol Med, 1998, 1(1): 235-241.
- [4] Nagao M, Wen T C, Okamoto M, et al. In vivo neuroprotective activity of epeptide AB against ischemic damage. Cytotechnology, 2005, 47(1-3): 139-144.
- [5] Cuello A C, Bruno M A, Allard S, et al. Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. J Mol Neurosci, 2010, 40(1-2): 230-235.
- [6] Triaca V, Tirassa P, Aloe L. Presence of nerve growth factor and TrkA expression in the SVZ of EAE rats: evidence for possible functional significance. Exp Neurol, 2005, 191(1): 63-64.
- [7] Huang B R, Gu J J, Ming H, et al. Differential actions of neurotrophins on apoptosis mediated by the low affinity neurotrophin receptor p75^{NTR} in immortalized neuronal cell lines. Neurochem Int, 2000, 36(1): 55-65.
- [8] 高鹏,王欣,陈虹,等. 神经生长因子低亲和力受体(p75^{NTR})模拟配基的筛选. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(6): 769-774.
- [9] Gao P, Wang X, Chen H, et al. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol, 2003, 19(6): 769-774.
- [9] Brines M L, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(19): 10526-10531.
- [10] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med, 2002, 8(8): 495-505.
- [11] Tam J, Diamond J, Maysinger D. Dual-action peptides: a new strategy in the treatment of diabetes-associated neuropathy. Drug Discov Today, 2006, 11(5-6): 254-260.
- [12] Silverberg D S, Wexler D, Blum M, et al. The effect of correction of anaemia in diabetics and non-diabetics with severe resistant congestive heart failure and chronic renal failure by subcutaneous erythropoietin and intravenous iron. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(1): 141-146.
- [13] Teixeira A M, Garrido P, Santos P, et al. Recombinant human erythropoietin treatment protects the cardio-renal axis in a model of moderate chronic renal failure. Ren Fail, 2010, 32(9): 1073-1080.

Preliminary Study on Neurotrophic Activity of Recombinant Peptide Mimics EpoAB-NGF

PAN Yong-zhao CHEN Hong WANG Xin MA Xiao-li HUANG Bing-ren

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Science, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

Abstract Objective: To investigate the neurotrophic activity of recombinant fusion protein epeptide AB-nerve growth factor analog peptide (EpoAB-NGF9/12). Methods: The DNA fragments encoding the sequences of EpoAB-NGF9 and EpoAB-NGF12 polypeptide were amplified by PCR and cloned into the pET-42a prokaryotic expression vector. The recombinant plasmids of pET-42a-EpoAB-NGF9/12 were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and exogenous protein expression was induced by IPTG. Fusion proteins GST-EpoAB-NGF9/12 were purified by affinity chromatography. The biological activities were determined using the experiment of inducing axon outgrowth of PC12 cells and flow cytometry analysis of apoptotic rate in R2L1 cells. Results: Apparent molecular weight of fusion proteins GST-EpoAB-NGF9/12 were approximate 30kDa. Immunoblot analysis showed that the fusion proteins were immunoreactive with anti-GST antibody. Fusion proteins stimulate the differentiation and promote the axon outgrowth in PC12 cells. Cell apoptosis was induced in (31.7 ± 0.60)% of R2L1 control cells by serum free incubation, whereas cell apoptosis rate were in (25.2 ± 3.52)% or (25.7 ± 1.46)% by adding GST-EpoAB-NGF9 or GST-EpoAB-NGF12 into serum free condition respectively. The result indicates that fusion proteins were enabling to prevent cell death in R2L1 cells. Conclusion: These findings in cell biology region suggest that recombinant fusion protein containing Epo-NGF peptide mimics have the neurotrophic effects similar to that of NGF.

Key words EpoAB-NGF peptide mimics Prokaryotic expression Neurotrophic function