

## 研究快报

## 胶质细胞源神经营养因子基因克隆及产物纯化\*

陈 燕 张 瑛 李金照 邓 巍 夏另朝 邱 蓉

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 用 PCR 方法从人基因组 DNA 中扩增出胶质细胞源神经营养因子 (GDNF) 的编码序列, 使它在 *E. coli* 中表达并纯化了重组 GDNF.

**关键词** 胶质细胞源神经营养因子, PCR 方法, 编码序列, 表达, 纯化

自 1993 年 Lin 等<sup>[1]</sup>将胶质细胞源神经营养因子 (GDNF) 纯化及基因克隆以来, 对其功能的研究成为一个热点. 研究表明, GDNF 不仅对巴金森氏病鼠退化的中脑腹侧多巴胺能神经元有助存活, 促分化, 促进代谢活性等功能, 同时对受 6-OHDA 及神经毒 MPTP 损伤的黑质纹状体的多巴胺能神经元有保护及修复再生的作用<sup>[2,3]</sup>, 甚至黑质多巴胺能神经元通向纹状体的纤维素 (内侧端脑索) 被切断后, 加入 GDNF 能使绝大多数该类神经元免于死亡<sup>[4]</sup>. GDNF 对黑质多巴胺能神经元损伤的修复作用受到世人的注目. 同时, GDNF 对运动神经元亦有助存活, 促分化及促进代谢活性的功能. 无论对胚胎期或出生后损伤的运动神经元都有显著的修复作用. 鸡胚在运动神经元程序性死亡期间, 加入 GDNF 可以阻止多数神经元的死亡. 初生鼠切断坐骨神经, 若加入 GDNF 可以免除脊髓运动神经元的大量死亡. GDNF 对多巴胺能神经元及运动神经元的效用要远高于同类功能的其他神经营养因子<sup>[5,6]</sup>. 重组 GDNF 的问世使得其结构与功能的研究成为可能, 它不仅给退行性神经疾病的治疗带来希望, 同时也可使人们对神经系统特别是中枢神经系统的损伤修复得到本质的认识.

为此, 在国内我们首次克隆了人 GDNF 编码序列, 并表达和纯化了重组 GDNF. 采用 PCR 方法从人染色体基因组中扩增 GDNF 编

码序列. 引物按人 GDNF 基因片段 II 的序列设计, 并在 5' 引物末端加有 Nde I 位点, 3' 引物末端加有 BamH I 位点. 扩增产物经 BamH I 酶切, 克隆到 BamH I -Sma I 酶切的 pUC18 中, 测序确认插入片段序列正确. 用 Nde I 和 BamH I 酶从重组质粒中切出 GDNF 编码序列, 并克隆到 Nde I -BamH I 酶切的 pET3a 表达载体中. 在 *E. coli* BL21 (DE3) 菌中受 T7 启动子控制表达成熟的 GDNF 蛋白. 表达产物以包涵体形式存在. 从重组菌中制备包涵体, 并溶解于含 8 mol/L 尿素的磷酸缓冲液中, 经强阳离子树脂层析分离, 得到复性后的 GDNF, 它是由二硫键连接起来的两个单体, 分子质量为 30 ku, 经 15% SDS-PAGE 制备电泳纯化, 得到纯净的 rhGDNF. 每升重组菌液可最终纯化得 10 mg rhGDNF.

rhGDNF 纯化成功为其结构与功能的研究, 为探讨神经系统损伤与修复机理以及探索对神经退行性疾病的治疗提供良好的基础.

## 参 考 文 献

- 1 Lin H L, Doherty D H, Lile J D *et al.* Science, 1993; **260**: 1130
- 2 Tomac A, Lindqvist E, Lin H L *et al.* Nature, 1995; **373**: 335

\* 中国科学院视觉信息加工开放研究实验室资助.

收稿日期: 1996-09-26, 修回日期: 1996-10-27

- 3 Bowenkamp K E, Hoffman A F, Gerhardt G A *et al.* J Comp Neurol, 1995; **355** (4): 479
- 4 Beck K D, Valverde J, Alexi T *et al.* Nature, 1995; **373**: 339
- 5 Oppenheim R W, Houenou L J, Johnson J E *et al.* Nature, 1995; **373**: 344
- 6 Yan Q, Matheson C, Lopez O T. Nature, 1995; **373**: 341

**Cloning of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene and Purification of Expressed Product.** Chen Yan, Zhang Ying, Li Jinzhao, Deng Wei, Xia Lingchao, Qiu Rong (*Institute*

*of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

**Abstract** The coding sequence of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was amplified from human genomic DNA by PCR method. Recombinant GDNF was expressed in *E. coli* and purified.

**Key words** glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), PCR method, coding sequence, expression, purification

(上接第 547 页, Continued from page 547)

- 8 Markwell M K, Haas S M, Bieber L L *et al.* Anal Biochem, 1987; **87** (2): 206
- 9 Oikaw S, Hori S, Sanc R *et al.* Atherosclerosis, 1987; **64** (1): 7
- 10 刘秉文, 吴兆锋, 张荣爵等. 中华医学杂志, 1982; **62** (9): 531
- 11 刘秉文, 邵美珍, 袁鸿江等. 华西医科大学学报, 1989; **20** (2): 119
- 12 Gotto Jr A M. Am J Cardio, 1992; **70** (Suppl): 19H
- 13 刘秉文, 曾成林. 中国动脉硬化杂志, 1994; **2** (1): 44
- 14 Steinberg D, paratharathy S, Carew T E *et al.* New Engl J Med, 1989; **320** (14): 915

**Oxidization-Modified Lipoproteins Stimulate DNA Synthesis of Cultured Human Arterial SMC.** Wang Haochuan, Liu Bingwen, Fu Mingde (*Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

**Abstract** The arterial smooth muscle cells (SMC) are the predominant type of cells within atherosclerotic (As) lesions, and their proliferation plays an important role in the process of As

genesis. On the basis of the establishment of primary culture and sub-culture method for human arterial SMC, the effects of LDL, VLDL, HDL, OX-LDL, OX-VLDL, OX-HDL on DNA synthesis of cultured human arterial SMC were observed. Results are as follows: (1) HDL had no stimulating effect on  $^3\text{H}$ -TdR incorporation into DNA of SMC ( $P > 0.05$ ); (2) LDL and VLDL showed the obvious stimulating effects ( $P < 0.05$ ); (3) OX-LDL, OX-VLDL and OX-HDL increased significantly  $^3\text{H}$ -TdR incorporation into SMC DNA, respectively ( $P < 0.01$ ). These results suggest that the atherogenic roles of LDL, VLDL, OX-LDL, OX-VLDL, OX-HDL are closely related to their stimulating effects on DNA synthesis and the proliferation of the arterial SMCs.

**Key words** arterial smooth muscle cell, native lipoprotein, oxidization-modified VLDL, LDL, HDL, cell proliferation, DNA synthesis, atherosclerosis