

## 研究报告

## 重组人胶质细胞源性神经营养因子的生物学活性研究

王金惠 王嘉玺\* 丁爱石 刘 红

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 从人星形胶质细胞瘤 BT-325 细胞中克隆胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) cDNA 序列, 以大肠杆菌作为表达系统, GDNF 蛋白在大肠杆菌 JM103 中获得了高效表达; 表达产物经纯化、复性后, 以 8 日龄鸡胚背根节 (DRG)、14 日龄胎鼠脊髓前角运动神经元以及新生大鼠大脑皮层胶质细胞作为实验材料, 研究了 GDNF 的生物学活性, 结果表明: rhGDNF 可有效地促进 DRG 突起的生长, rhGDNF 对体外培养的运动神经元表现出明显的促突起生长作用, 并可显著提高体外培养运动神经元的存活率, rhGDNF 对体外培养的胶质细胞具有促增殖作用。

**关键词** 胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)、高效表达、运动神经元、胶质细胞、生物学活性

**学科分类号** R392-33, Q78

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

细胞株和细菌菌株: 人星形胶质细胞瘤细胞 BT-325, 购自首都医科大学天坛医院神经外科研究所, *E. coli* JM103 和表达载体 pBV220 为本室保存, pGEM-T Easy 载体为 Promega 公司产品。实验动物: 8 日龄鸡胚购自中国农业科学院畜牧研究所, 孕 14 日 Wistar 大鼠和新生 2 天的 Wistar 大鼠购自军事医学科学院及北京医科大学动物中心, 神经元无血清培养液及 N<sub>3</sub> 成分购自 GIBCO 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 GDNF cDNA 序列的分离和表达载体的构建:** 按改良的酚-SDS 一步法<sup>[1]</sup>提取 BT-325 细胞总 RNA, 根据文献报道<sup>[2]</sup>的胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) cDNA 序列设计上游引物: 5'-AAATGTCACCAGATAAACA-3' 和下游引物: 5'-CGGGATCCTTAGATACATCCACACCT-3', 在下游引物中引入 *Bam*H I 酶切位点, 以 RT-PCR 获得 GDNF cDNA 片段后克隆至 pGEM-TEasy 载体中, 自动序列分析仪进行序列分析, 将测序正确的片段与表达载体 pBV220 在多克隆位点 *Eco*R I 和 *Bam*H I 之间以一平一粘方式连接, 构建表达载体 pBV-GDNF。

**1.2.2 GDNF 在大肠杆菌中的表达及蛋白质印迹:**

将构建的表达载体 pBV-GDNF 转化大肠杆菌感受态细胞 JM103, 分别取 JM103/pBV-GDNF 和 JM103/pBV220 接种于 5ml LB 培养基中, 30℃ 过夜活化, 次日以 3% 比例将活化菌接种于 M9CA 培养基中, 30℃ 摇至对数生长期, 将菌直接转入 42℃ 水浴摇床, 200 r/min 转速, 诱导目的蛋白 GDNF 在 *E. coli* 中的表达。诱导表达 4 h 后 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min 收菌, 将收取的细菌重悬于无菌水中, 以超声波破碎细菌, 分别收取上清及沉淀, 行 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 分析目的蛋白 GDNF 在 *E. coli* JM103 中的表达。并用蛋白质印迹方法鉴定目的蛋白表达, 蛋白质印迹方法参照文献进行<sup>[3]</sup>。

**1.2.3 rhGDNF 的纯化和复性:** 收集大批诱导表达 GDNF 的细菌, 超声破碎, 离心收集包涵体, 包涵体先经低浓度尿素洗涤, 再溶于 8 mol/L 尿素。选用 Sephacryl 200 (S-200) 为填料, 对目的蛋白进行分离纯化。层析柱先用至少 2 倍柱体积的平衡液 (8 mol/L 尿素、20 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>、10 mmol/L DTT) 平衡, 洗脱时流速为 0.5 ml/min, 用自动收集器分管收集洗脱液, SDS-PAGE 鉴定各管组分。纯化

\* 通讯联系人。

Tel: 010-66931322, E-mail: wangjx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-12-28, 接受日期: 2001-03-20

后的蛋白质在以连四硫酸钠和半胱氨酸组成的氧化还原体系中复性(复性缓冲液为: 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2 mmol/L Cys、0.2 mmol/L 连四硫酸钠, pH 8.3、15% PEG300), 同时加入促复性试剂 PEG300, 以透析的方法逐步去除尿素。

**1.2.4** rhGDNF 对 8 日龄鸡胚背根节突起生长的影响: 在体视镜下, 从鸡胚腹侧剪开皮肤, 剖除内脏, 暴露脊髓, 可看到脊髓两侧的圆形背根神经节, 用小尖镊一个个小心摘下, 种植于涂有多聚赖氨酸并用 Hank's 液平衡好的 24 孔细胞培养板或培养瓶培养, 每瓶种 1~2 个节; 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  下贴壁 1 h, 然后加入无血清培养基 DMEM, 分别以 50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$  三个浓度加入 rhGDNF, 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  条件下继续培养 24 h, 倒置显微镜下观察神经突起的生长情况。阳性对照组加入 10  $\mu\text{g/L}$  的 NGF, 阴性对照组加入 PBS。

**1.2.5** rhGDNF 对体外培养胎鼠脊髓前角运动神经元突起生长的作用: 断头处死孕 14 d 的 Wistar 大鼠, 在无菌环境下打开腹腔, 剖出胎鼠, 在体视镜下从背侧剪开皮肤, 取出整条脊髓, 解剖刀切取腹侧部分, 将组织块剪碎, 以 0.125% 胰酶在 37℃ 消化 30 min; 收集细胞悬液, 按  $10^5$  个/ml 细胞数将细胞接种于涂有多聚赖氨酸的培养皿, 以含 1%  $\text{N}_3$  成分的神经元无血清培养液进行培养, 实验组分别加入 5  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$  和 500  $\mu\text{g/L}$  的 rhGDNF, 阴性对照组加入相同体积的 PBS, 36℃, 10%  $\text{CO}_2$  条件下培养 16 h, 倒置显微镜下计数各组突起细胞数。

**1.2.6** rhGDNF 对培养 E14 大鼠脊髓前角运动神经元存活率的影响: 同上法分离 E14 大鼠脊髓前角运动神经元细胞, 以相同条件接种细胞, 在接种细胞的同时加入 10  $\mu\text{g/L}$  rhGDNF, 每次换液之后补加。在细胞培养过程中, 每周换液两次, 每次换液量为原液的一半, 在神经元培养的第 5~7 天(视胶质细胞生长状况而定)以 3 mg/L 浓度加一次阿糖胞苷, 抑制胶质细胞的生长。分别计算培养 3 d、7 d、14 d 及 21 d 时运动神经元存活率。

**1.2.7** rhGDNF 对体外培养运动神经元细胞大小的影响: 以 CIAMS 图像分析软件分别对培养第 7、14、21 天的运动神经元细胞面积大小进行分析。实验分 GDNF 组和对照组。以与图像分析系统相连的倒置显微镜下任取一视野, 根据运动神经元细胞的形态特征, 随机选择 30 个运动神经元细胞,

计算每个细胞的面积, 对所得数据进行统计学分析。

**1.2.8** rhGDNF 对大脑皮层胶质细胞的作用: 取新生 2 d 的 Wistar 大鼠, 在无菌条件下剪开脑部皮肤, 剖开软硬脑膜, 剖出大脑皮层, 将组织块剪碎, 以 0.25% 的胰酶在 37℃ 消化 30 min; 收集细胞悬液, 按  $1 \times 10^5$  个/ml 将细胞接种于涂有多聚赖氨酸的培养皿中, 培养条件为含 10% FCS、2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.6% 葡萄糖的 DMEM, 于 36℃, 10%  $\text{CO}_2$  条件下培养, 每 3 天换液一次。传代 2 次后胶质细胞已得到大量增殖, 神经元细胞由于不能得到足够的营养, 绝大部分已死亡。此时收取细胞, 并调整细胞数为  $1.2 \times 10^5$  个/ml, 以无血清培养基(2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.6% 葡萄糖的 DMEM)接种细胞, 接种细胞的同时加入不同浓度的 rhGDNF(浓度分别为 10  $\mu\text{g/L}$ 、50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$ 、500  $\mu\text{g/L}$ ), 于 36℃, 10%  $\text{CO}_2$  条件下培养 48 h 后, 加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 稀释液(5 g/L MTT 于 pH 7.4 的 PBS 中)继续培养 4 h; 加入 10% SDS-0.01 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100  $\mu\text{l}$ /孔), 36℃ 过夜培养, 酶联检测仪测定  $A_{570}$ 。

## 2 结 果

### 2.1 GDNF cDNA 的获得和表达载体构建

实验选用人星形胶质细胞瘤细胞株 BT-325, 从中提取细胞总 RNA, 经 RT-PCR 反应后, 琼脂糖凝胶电泳分析得到了与目的片段大小一致的特异扩增条带, RT-PCR 结果如图 1 所示。序列分析结果表明, RT-PCR 所得片段与文献报道的 GDNF cDNA 序列完全一致, 并以 pBV220 作为载体, 构建了表达载体 pBV-GDNF。

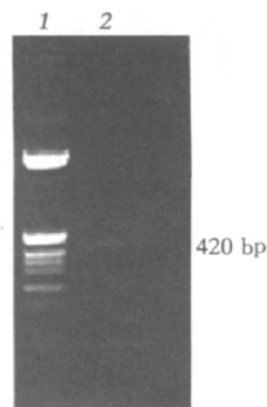


Fig. 1 Amplification of human GDNF gene by RT-PCR

1: DNA marker (pBR322 DNA/*Hinf*I); 2: RT-PCR product.

## 2.2 GDNF 的表达及其蛋白质印迹

实验选用大肠杆菌 JM103 作为宿主菌, SDS-PAGE 分析表明目的蛋白在 JM103 中表达量可达全菌总蛋白的 25%, 以 GDNF 多克隆抗体与 JM103/pBV-GDNF 诱导裂解液进行蛋白质印迹实验结果表明, 大肠杆菌中获得表达的外源蛋白可与此抗体特异性结合, 如图 2 所示。

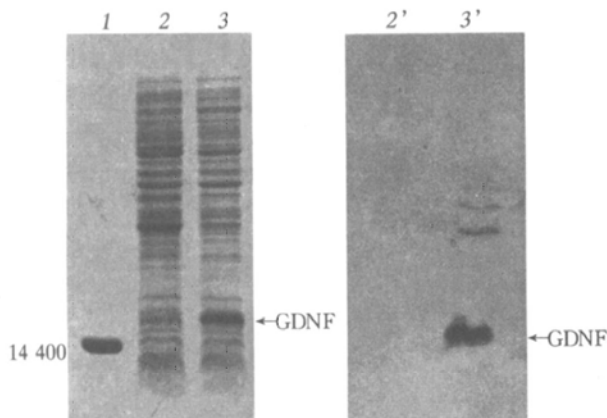


Fig. 2 Identification of rhGDNF by Western blot

1: protein molecular mass standard; 2: JM103/pBV220; 3: JM103/pBV-GDNF; 2': Western blot of JM103/pBV220; 3': Western blot of JM103/pBV-GDNF.

## 2.3 rhGDNF 蛋白的纯化和复性

GDNF 在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在, 收取菌体经裂解离心及包涵体洗涤后, 纯度可达 78%。然后以 8 mol/L 尿素溶解包涵体, 选用 Sephacryl 200 (S-200) 作为填料利用凝胶过滤层析对目的蛋白进行进一步的纯化, 纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 经银染电泳凝胶上除了目的蛋白带不存在其他的杂带, 经薄层扫描, 目的蛋白的纯度可达到 95% 以上, 结果如图 3 所示。

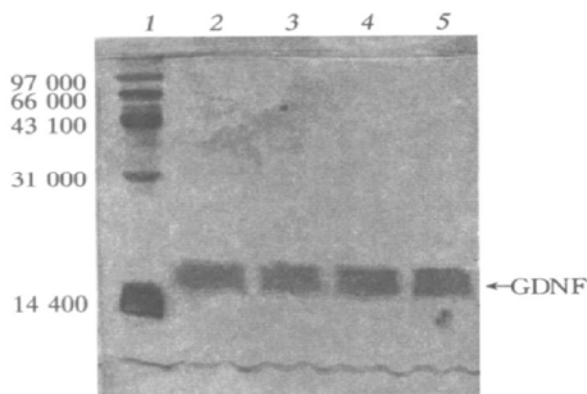


Fig. 3 SDS PAGE of the purified rhGDNF

1: protein molecular mass standard; 2~5: purified rhGDNF.

## 2.4 rhGDNF 对鸡胚背根节的作用

实验以 8 日龄鸡胚背根节组织作为材料, 分别以 50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$  三种浓度在鸡胚背根节培养液中加入纯化复性的 rhGDNF, 培养 24 h 后观察神经元细胞突起生长状态。结果表明, 三种浓度下 rhGDNF 均能促进 E8 鸡胚整体背根节生长出大量突起, 阴性对照组在背根节组织周围仅有少量成纤维细胞迁移出来, 结果如图 4 所示。

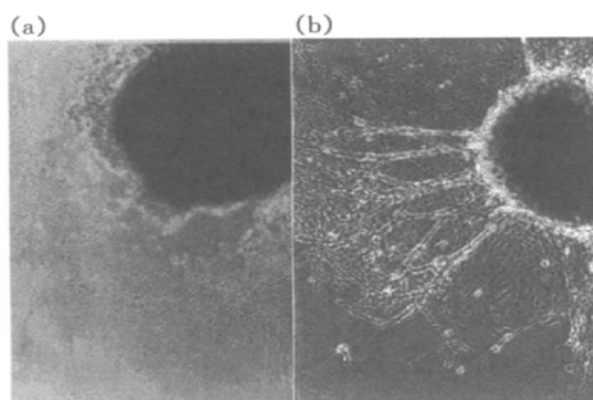


Fig. 4 Neurite outgrowth of E8 chick dorsal root ganglion explant promoted by rhGDNF

(a) negative control; (b) rhGDNF group.

## 2.5 rhGDNF 对运动神经元的作用

运动神经元体外培养 16 h 后固定细胞, 倒置显微镜下观察, 结果显示 rhGDNF 组的运动神经元与对照组相比, 突起细胞数明显增加。实验结果表明, rhGDNF 可显著提高体外培养 3 d、7 d、14 d 和 21 d 运动神经元细胞的存活率。利用图像分析软件对 rhGDNF 组和阴性对照组细胞进行了分析, 计算两组细胞面积的变化, 结果表明, rhGDNF 作用组的细胞面积较对照组有明显增加。

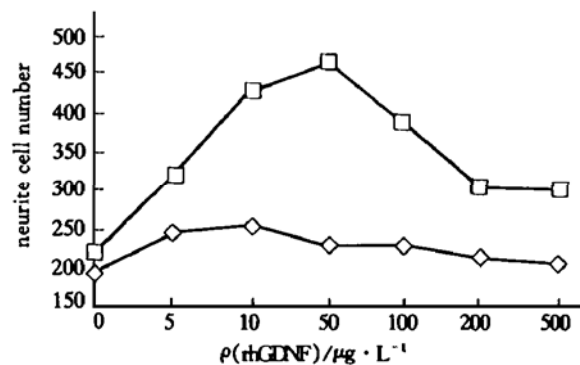


Fig. 5 Neurite outgrowth of E14 rat motor neuron promoted by rhGDNF

◇ — ◇: control; □ — □: rhGDNF.

( $P < 0.05$ ), 表明 rhGDNF 对运动神经元细胞生长状态有着明显的影响作用. 结果如图 5~7 所示.

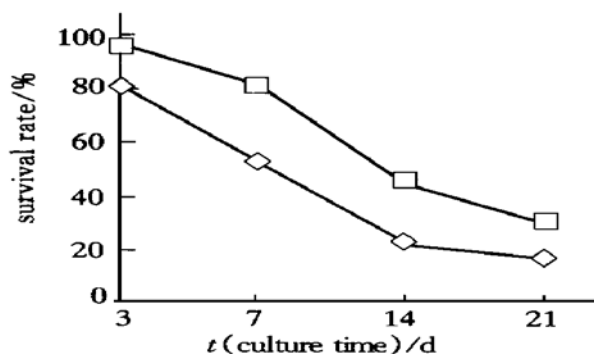


Fig. 6 Effect of rhGDNF on motor neuron survival

◇—◇: control; □—□: rhGDNF.

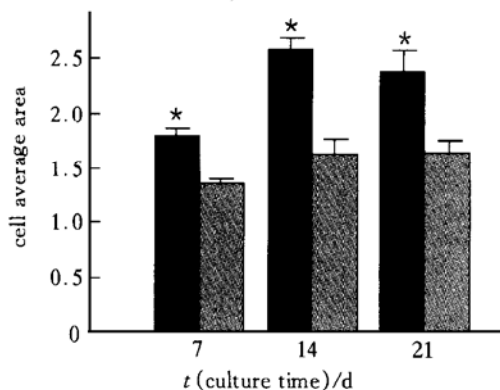


Fig. 7 Effect of rhGDNF on motor neuron area

\* rhGDNF group compared with control ( $P < 0.01$ ,  $n = 30$ )

■: rhGDNF group; ▨: control.

## 2.6 rhGDNF 对大脑皮层胶质细胞的作用

实验以新生 2 天的大鼠大脑皮层胶质细胞为材料, 以 MTT 法初步探讨了 rhGDNF 对大鼠胶质细胞生长的影响, 结果表明, rhGDNF 可促进胶质细胞的增殖, 与对照组相比, 细胞数目有明显的增加 ( $P < 0.05$ ). 结果如图 8 所示.

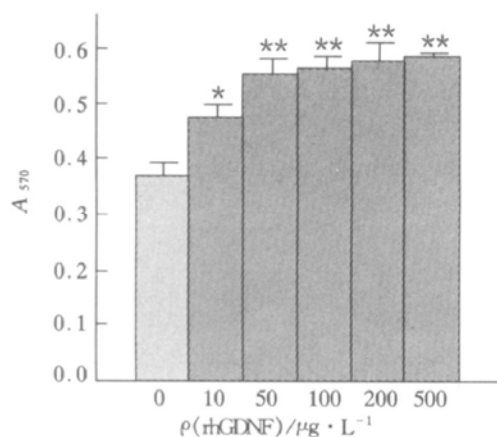


Fig. 8 Effect of rhGDNF on glial cell proliferation

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; compared with control;  $n = 8$

□: control; ■: rhGDNF.

## 3 讨 论

胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 对多种神经元细胞都具有神经营养作用, 尤其是对多巴胺能和运动神经元的作用比较特异, 认为它是对治疗神经退行性疾病, 如帕金森氏症及脊髓侧索硬化症具有潜在作用的一种药物<sup>[4]</sup>. 为了更深入地研究其结构与功能, 必须获得大量的 GDNF, 但是机体本身所产生的 GDNF 量非常低, 通过基因工程是获得大量 GDNF 最主要的方法. 本研究以 RT-PCR 的方法从人星形胶质细胞瘤细胞中获得 GDNF 的 cDNA 序列, 选用大肠杆菌作为表达系统, 使 GDNF 在宿主菌 JM103 中获得了高效表达, 目的蛋白可占全菌总蛋白的 25% 以上, 与国内外报道相比, 本实验获得的表达水平是比较高的. 目的蛋白在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在. GDNF 分子中富含半胱氨酸残基, 其活性形式的同源二聚体中含有 7 对二硫键, 其中有三对链内和一对链间二硫键, 形成的包涵体比较紧密, 纯化时通过洗涤包涵体, 其纯度即可达到 78%, 再经分子筛纯化后, 纯度可达 95% 以上. 在大肠杆菌获得的表达 GDNF 是没有活性的, 需要通过复性才可获得有生物学活性的蛋白质, 由于此分子的结构特点, 复性的难度比较大, 本实验通过反复摸索, 在以连四硫酸钠和半胱氨酸组成的复性体系中, 加入促复性试剂 PEG300, 在 5℃ 下进行 48 h 的复性, 去除变性剂时采用了逐步去除的方法. 从纯化后 GDNF 的 SDS-PAGE 图中发现, 纯化后单亚基分子较纯化前稍小 (由于在样品制备中加入了还原剂 DTT, 故 SDS-PAGE 时出现的分子仍在单亚基位置), 有学者认为 rhGDNF 纯化过程中有一定程度的降解, 并用质谱分析表明会出现少 20 个左右的氨基酸的单体, 本实验未对此做进一步的分析. 对获得的重组 GDNF 以 8 日龄鸡胚背根节作为材料, 经过活性测定, 结果表明, 本实验获得的 rhGDNF 具有较好的生物学活性, 在 50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L 下都可显著地促进背根神经节突起的生长, 本研究的 rhGDNF 活性与国内外相关文献报道相似<sup>[5]</sup>. 实验进一步选用 14 日龄胎鼠前角运动神经元作为材料, 探讨了重组因子对其作用, 结果表明, 对体外培养 16 h 的运动神经元, rhGDNF 可显著地促进其突起的生长; 对体外长期培养的运动神经元 (培养 3、7、14 及 21 d), 可显著提高其存活率 (与对照相比  $P < 0.05$ ). 图像分析结果表

明, rhGDNF 作用组的细胞面积较对照组有明显增加 ( $P < 0.05$ ), 与对照组细胞相比, rhGDNF 组细胞的突起明显增多, 相互之间连接成网状, 胞体饱满, 细胞折光性好, 表明 rhGDNF 可明显改善运动神经元的生长状态.

胶质细胞分泌表达 GDNF, 目前对于 GDNF 的促神经元生长的作用展开了较为广泛的研究, 而其对胶质细胞的作用未见报道. 本实验以新生 2 天的大鼠大脑皮层胶质细胞作为实验材料, 以 MTT 法初步探讨了 rhGDNF 对大鼠胶质细胞生长的影响. 在大脑皮层细胞培养的最初, 主要是以神经元为主, 但随着培养时间的延长, 由于未加入促神经元生长的神经营养因子, 胶质细胞的增殖速度很快, 培养 5 d 左右, 神经元即出现大量的死亡, 经过两次传代培养, 胶质细胞的纯度即可达到 95% 以上, 此时以无血清培养, 采用 MTT 法探讨 rhGDNF 对胶质细胞的影响. 结果表明, rhGDNF 可以促进胶质细胞的增殖, 与对照组相比, 细胞数

目有明显的增加 ( $P < 0.05$ ). 本研究的结果表明胶质细胞分泌的 GDNF 不仅可促进神经元的生长和分化, 对于胶质细胞自身同样有促进增殖的作用.

### 参 考 文 献

- 1 Duan J, Cai X, Zhou L, *et al.* Single step method of total RNA isolation by SDS/phenol extraction from cultured cells. *Analytical Biochemistry*, 1997, **251**: 291~ 292
- 2 Lin L F, Doherty D H, Lile J D, *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, **260** (5111): 1130~ 1132
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 888~ 898
- 4 Bowenkamp K E, Lapchak P A, Hoffer B J, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses motor impairment in 16~ 17 month old rats. *Neurosci Lett*, 1996, **211** (2): 81~ 84
- 5 Trupp M, Ryden M, Jornvall H, *et al.* Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol*, 1995, **130** (1): 137~ 148

## Study on the Biological Activity of Recombinant Human Glial Cell-derived Neurotrophic Factor

WANG Jir-Hui, WANG Jia-Xi\*, DING Ai-Shi, LIU Hong

(Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract** The cDNA encoding glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) was isolated from the human astrocytoma cell BT-325. GDNF was efficiently expressed in *E. coli*. The recombinant protein was purified. The renaturation occurred in the presence of sodium tetrathionate system. In order to study the biological activity of the recombinant protein, the effects of rhGDNF on the dorsal root ganglion (DRG) of chicken embryo (8 d), motor neurons of rat embryo (14 d) spinal cord and glial cell were explored. The results show that rhGDNF promotes the growth of neurite of DRG, increases the number of survival motor neurons cultured for 3 d, 7 d, 14 d and 21 d, respectively, and promotes glial cell proliferation.

**Key words** glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), highly expression, motor neuron, glial cell, biological activity

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66931322, E-mail: wangjx@nic.bmi.ac.cn

Received: December 28, 2000 Accepted: March 20, 2001