

G-蛋白 Rab3a 对神经生长抑制因子 (GIF) 抑制神经元细胞生长作用的影响*

庞立岩 茹炳根**

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 为了深入研究 Rab3a 和神经生长抑制因子 (GIF) 的相互作用, 在大鼠海马神经元细胞原代培养体系中, 用 MTT 还原法定量研究了 Rab3a 对 GIF 神经生长活性的影响, 发现 Rab3a 可以替代脑提取物而使 GIF 发挥神经生长抑制活性. 接着又利用多克隆抗体方法研究了 GIF 与 Rab3a 的相互作用, 结果说明 Rab3a 是 GIF 发挥神经生长抑制活性所必需的蛋白质, 并且它们的相互作用受空间位置的因素影响较大. 在随后对它们相互作用的机理和可能的生物学意义进行了讨论.

关键词 Rab3a, GIF, 相互作用, 大鼠海马神经元细胞培养, MTT 还原测定法

学科分类号 Q74

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知障碍和记忆能力损害为主的中枢神经系统退行性疾病, 其病理特征为神经元和突触选择性的丢失^[1]. 尽管目前还无法确定 AD 的病因, 但是许多证据表明, 神经生长抑制因子(growth inhibitory factor, GIF)含量的下降会造成神经细胞轴突与树突的过度生长, 由于人脑中的营养水平无法支持这种过度生长, 使得神经细胞的生长处于流产状态, 就会导致脑中大量神经元细胞失活, 这可能是形成 AD 的主要因素之一. GIF 主要分布于脑部中枢神经系统, 在 Alzheimer's 症脑提取物的存在下, 对培养的神经元细胞具有特异的生长抑制活性. 值得注意的是, 单独的 GIF 或单独的脑提取物均不具有生长抑制活性, 这表明, GIF 可能是与脑提取物中的其他因子协同作用而发挥其抑制功能的^[2~5].

本实验室的康巧华博士^[6]用酵母双杂交方法发现 GIF 与 G 蛋白 Rab3a 之间存在特异的相互作用. Rab 是一类与细胞分泌紧密相关的小分子单亚基 G 蛋白超家族(superfamily), 目前在哺乳动物中发现了 50 多个成员. 其中 Rab3 亚家族(subfamily)由 Rab3a、Rab3b、Rab3c 及 Rab3d 4 个成员组成. Rab3a 由 220 个氨基酸组成, 是极其重要的功能性蛋白质, 主要分布于神经细胞中, 调控神经递质释放. 在突触前神经元细胞中, Rab3a 与 Rabphilin-3、Rim 和 Noc2 等效应子蛋白结合, 以一种 Ca^{2+} 依赖形式调控神经递质的释放^[7~10]. 而在胰岛细胞中, Rab3a 与效应子蛋白 Rim 结合则调控胰岛素的释

放^[11]. 由于 Rab3a 在调控神经递质释放过程中起着关键作用, 近年来, 对它的研究日益受到人们的重视.

目前对 Rab3a 和 GIF 之间关系的研究都停留在用酵母双杂交和免疫共沉淀等鉴定方法的水平上, 未能对它们相互作用的生物学意义与作用机制深入说明. 本研究运用大鼠海马神经细胞培养体系和 MTT 还原法测定 Rab3a 和 GIF 蛋白对神经细胞生长的影响, 从细胞水平研究了 GIF 和 Rab3a 相互作用的生物学功能.

在后续的研究中, 我们利用制备的 GIF 和 Rab3a 多克隆抗体在神经细胞培养体系中分别屏蔽 GIF 和 Rab3a, 用 MTT 还原法测定神经细胞的生长与存活率, 进一步研究了 Rab3a 蛋白在 GIF 抑制神经细胞生长过程中的生物学地位, 并对 GIF 和 Rab3a 的相互作用机理进行了讨论.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、Neurobasal 培养基、B₂₇ 无血清添加剂购自美国 Gibco/BRL 公司; 胎牛血清、马血清购自美国 HyClone 公司; MTT、阿糖胞苷

*国家自然科学基金资助项目(30450009).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62756969, Fax: 010-62751842

E-mail: rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2005-05-17, 接受日期: 2005-09-28

(cytosine arabinoside Ara-C) 购自美国 Sigma 公司。

Wistar 大鼠购自北京维通利达公司; AD 病人脑由北京解放军总医院提供; 人 GIF 蛋白, 人 Rab3a 蛋白由本实验室制备并保存。

1.2 AD 病人脑提取物 (brain extract, BE) 的制备

称取 AD 病人脑组织, 加入 5 倍体积预冷的 PBS, 匀浆后于 4℃, 22 000 g 离心 30 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装成小管后于 -20℃ 保存^[12]。

1.3 GIF 和 Rab3a 多克隆抗体的制备

用常规方法免疫动物, 制备兔抗人 GIF, 兔抗人 Rab3a 的抗血清, 抗体用亲和层析法纯化^[13]。

1.4 大鼠海马神经元细胞的培养

1.4.1 新生大鼠大脑的剥离. 将新生一天以内的 Wistar 大鼠浸没在 75% 的酒精中致死, 迅速断头。用眼科剪将头皮剪开, 露出颅骨顶部, 用眼科镊轻轻剥离头盖骨, 露出完整的大脑。用眼科镊取出脑, 放入盛有 Hank's 液 (无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 的培养皿中, 去除残留的小脑、脑桥等部分, 分开大脑两半球, 用解剖镊小心地分离出两侧海马。

1.4.2 脑组织块的消化. 将分离的海马组织转移到盛有 0.5% 胰蛋白酶的青霉素瓶中, 用眼科镊剪成 1 mm^3 的小块, 37℃ 温育消化 30 min, 至大部分组织块颜色由粉变白, 悬浮起来为止。

1.4.3 细胞的计数. 将消化好的大脑组织块转移至 15 ml 离心管中, 加入 10 ml 接种培养基, 终止胰蛋白酶的作用。用尖头滴管反复吹打, 将细胞打散, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸去上清, 加入适量培养基将细胞沉淀吹起, 显微镜下计数, 根据计数结果加入适量培养基使接种细胞密度约为 $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 个 /ml。

1.4.4 神经细胞的培养. 将配好的细胞悬液加入到 96 孔培养板中, 每孔加入 200 μl 细胞悬液, 37℃, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 细胞贴壁后换用无血清培养基 (B_{27} supplemented neurobasal medium)。培养 72 h 后半量换液, 换成含 4 mg/L 阿糖胞苷的无血清培养基, 再培养 48 h 后更换全部培养基以终止阿糖胞苷的作用, 以后每三天更换一半无血清培养基即可。

1.5 MTT 标准曲线的测定

MTT 还原测定法的原理为: 活细胞线粒体中存在与 NADP 相关的还原酶, 可以将黄色的 MTT 还原为蓝紫色的 Formazan, 它不溶于水而溶于乙醇或 DMSO。

在一系列不同神经元细胞数的培养孔中每孔加入 50 μl MTT 贮液 (含 0.5% MTT 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液), 设对照样 (即不含细胞的培养液加 MTT 贮液)。培养 4 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 100 μl 无水乙醇, 待染料完全溶解后, 用酶标仪测定 570 nm 的吸光度 (每一组样品设 4 组平行值并计算均值)。

1.6 Rab3a 对 GIF 神经细胞生长抑制活性的影响

在大鼠海马神经元细胞培养体系中加入不同浓度 GIF (加入终浓度为 0.1~30 mg/L) 和 Rab3a (加入终浓度为 0.1~30 mg/L), 并设脑提取物空白和加入组 (加入终浓度为 240 mg/L), 共培养 3~5 天, MTT 还原法测定其抑制曲线 (每一组样品设 4 组平行值并计算均值)。

1.7 GIF 与 Rab3a 的抗体对 GIF 神经细胞生长抑制活性的影响

在神经细胞培养体系中加入一定浓度的 GIF (2 mg/L) 和 AD 脑提取物 (240 mg/L), 然后分别加入按不同比例稀释的 GIF 和 Rab3a 的多克隆抗体 (1:100 至 1:3 200), 用 MTT 还原法分别测定神经细胞生长抑制曲线, 观测抗体对 GIF 神经细胞生长抑制活性的影响 (每一组样品设 4 组平行值并计算均值)。

2 结 果

2.1 MTT 标准曲线的测定

不同神经元细胞数的 MTT 还原法测定结果见图 1。

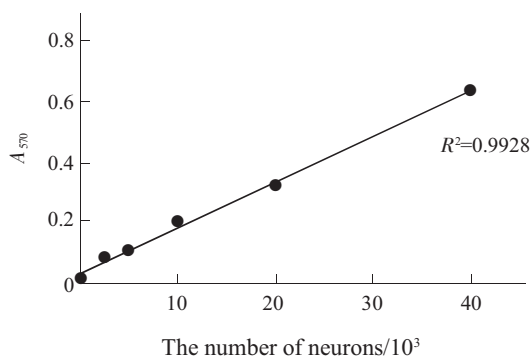


Fig. 1 Absorbance at 570nm dependence on the number of hippocampus neurons by the MTT reduction assay

图 1 显示, 在神经细胞数为 $2.5 \times 10^3 \sim 4 \times 10^4$ /孔时, 570 nm 处的吸光度与细胞数成正比, 这表明 MTT 还原法可以准确地量化活神经元细胞的数目。

2.2 GIF 抑制曲线的测定

在神经元细胞培养体系中, 加入不同浓度的人 GIF 蛋白(0.1~30 mg/L), 并加入 AD 病人脑提取物 (240 mg/L), 同时设空白对照组 (即不加入 GIF, 只加入 AD 病人脑提取物组), 用 MTT 法测定, 观察 GIF 浓度与神经元细胞生长抑制的关系, 测定结果见图 2.

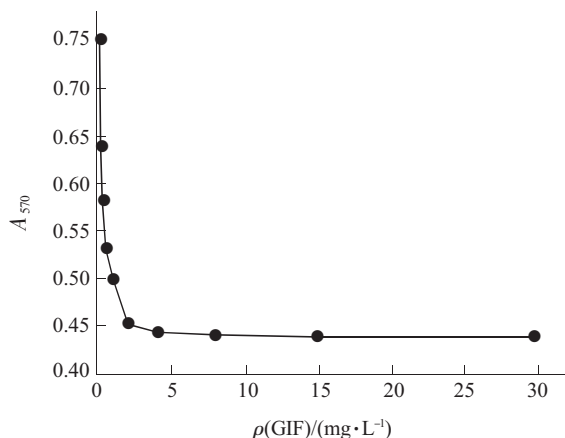


Fig. 2 Absorbance at 570 nm dependence on the concentration of GIF in hippocampus neurons culture system by the MTT reduction assay with 240mg/L AD brain extract added.

图 2 显示, 不同浓度的 GIF 蛋白(0.1~30 mg/L)在 AD 脑提取物的存在下均可以明显抑制神经元细胞的生长. 并且随着 GIF 浓度的增大, 细胞存活率逐渐降低, 在 GIF 浓度达到一定水平(2 mg/L)时, 生长抑制效果达到一个平台, 说明此时神经元细胞已经对 GIF 浓度的上升不敏感. 由此我们在后续的实验中固定 GIF 的浓度为 2 mg/L.

2.3 Rab3a 对 GIF 神经生长抑制活性的影响

在神经元细胞培养体系中, 加入不同浓度的 Rab3a 蛋白 (0.1~30 mg/L) 和一定浓度的 GIF (2 mg/L), 不加入 AD 病人脑提取物, 用 MTT 法测定, 观察 Rab3a 浓度对 GIF 神经生长抑制活性的影响, 测定结果见图 3.

图 3 显示, 不同浓度的 Rab3a 蛋白 (0.1~30 mg/L) 可以与 GIF 作用, 在不依赖 AD 脑提取物存在的条件下明显抑制神经元细胞的生长. 并且随着 Rab3a 浓度的增大, GIF 的抑制活性逐渐增强, 细胞存活率逐渐降低, 在 Rab3a 浓度达到一定水平 (8 mg/L) 时, 生长抑制效果达到一个平台, 说明此时神经元细胞已经对 Rab3a 浓度的上升不敏感.

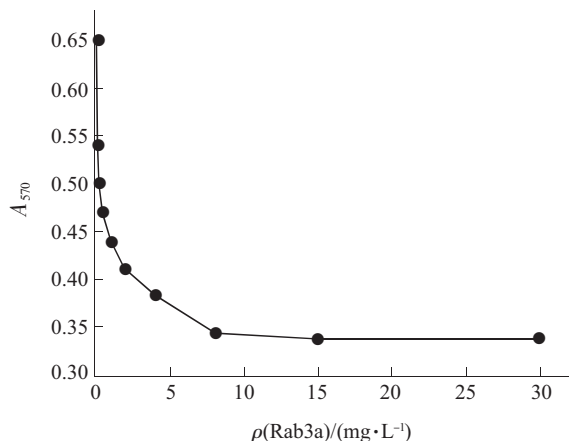


Fig. 3 Absorbance at 570 nm dependence on the concentration of Rab3a in hippocampus neurons culture system by the MTT reduction assay with 2mg/L GIF added.

2.4 GIF 的多克隆抗体对其神经生长抑制活性的影响

在神经细胞培养体系中加入一定浓度的 GIF (2 mg/L)和 AD 脑提取物 (240 mg/L), 然后分别加入按不同比例稀释的 GIF 多克隆抗体(1:100 至 1: 3 200), 同时设对照组 (即未加入抗体组和未加入 GIF 与 AD 脑提取物组) 用 MTT 还原法测定神经细胞生长抑制曲线, 结果见图 4(抗体浓度用稀释倍数的倒数表示).

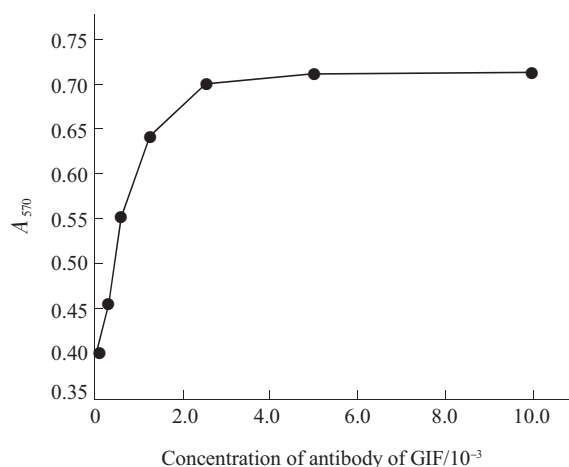


Fig. 4 Absorbance at 570 nm dependence on the concentration of antibody of GIF in hippocampus neurons culture system by the MTT reduction assay with 2 mg/L GIF and 240 mg/L AD brain extract added.

图 4 显示, 随着 GIF 抗体浓度的增大, 神经细胞存活率逐渐上升, 即表明 GIF 的抑制活性逐渐降

低,最后在抗体浓度足够大时, GIF 几乎表现不出其抑制神经细胞生长的活性(未加 GIF 的对照组 A_{570} 为 0.715, 图 4 中未示出).

2.5 Rab3a 的多克隆抗体对 GIF 神经生长抑制活性的影响

在神经细胞培养体系中加入一定浓度的 GIF (2 mg/L) 和 AD 脑提取物 (240 mg/L), 然后分别加入按不同比例稀释的 Rab3a 多克隆抗体 (1:100 至 1:3 200), 同时设对照组 (即未加入抗体组和未加入 GIF 与 AD 脑提取物组) 用 MTT 还原法测定神经细胞生长抑制曲线, 结果见图 5 (抗体浓度用稀释倍数的倒数表示).

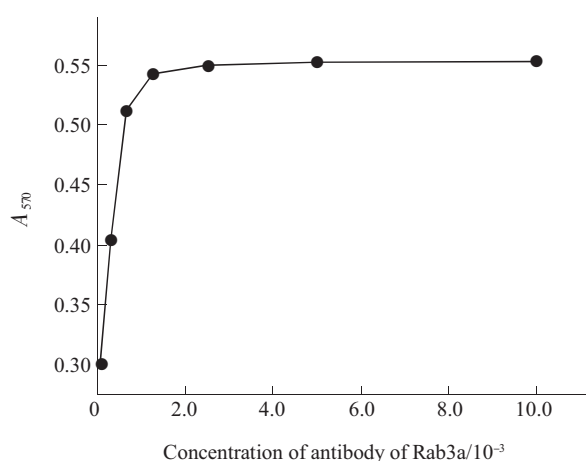


Fig. 5 Absorbance at 570 nm dependence on the concentration of antibody of Rab3a in neurons culture system by the MTT reduction assay with 2 mg/L GIF and 240 mg/L AD brain extract added.

图 5 显示, 随着 Rab3a 抗体浓度的增大, 神经细胞存活率逐渐上升, 即表明 GIF 的抑制活性逐渐降低, 最后在抗体浓度足够大时, GIF 几乎表现不出其抑制神经细胞生长的活性(未加 GIF 的对照组 A_{570} 为 0.553, 图 5 中未示出).

3 讨 论

本实验中采用大鼠海马神经元细胞作为试验对象, 是由于大鼠与人的 GIF 和 Rab3a 蛋白在氨基酸序列上有 90% 以上的同源性^[4]. 而以 AD 病人脑提取物作为 GIF 抑制神经细胞生长的相互作用物, 是因为在 AD 病人脑提取物中 GIF 的含量很低, 不会影响试验结果. 本实验中使用的 AD 病人脑提取物用蛋白质印迹方法检测, 结果显示 GIF 的含量极低, 而 Rab3a 的含量与正常人脑中相近^[4].

本研究首次运用大鼠海马神经细胞培养体系和 MTT 还原法测定 Rab3a 和 GIF 蛋白对神经细胞生长的影响, 图 2 与图 3 的结果显示, Rab3a 蛋白可以与 GIF 作用, 在不依赖 AD 脑提取物存在的条件下明显抑制神经元细胞的生长. 也就是说 Rab3a 可以替代 AD 脑提取物在神经细胞培养体系中协助 GIF 完成其神经生长抑制功能, 这说明 Rab3a 是 GIF 在人脑中重要的作用因子, 它对 GIF 实现其生物活性有着至关重要的作用.

抗原与抗体之间的结合作用有特异性、可逆性和按比例结合等几个特点, 抗原 - 抗体的结合力一般通过疏水相互作用来实现, 其结合力大小也因抗原与抗体的不同而有差异.

从 GIF 抗体试验的结果可看出(图 4), 在 GIF 的抗体浓度足够大时, GIF 难以表现其生物活性, 这说明 GIF 与其抗体之间的结合作用, 比它与其相互作用因子(如 Rab3a)之间的作用要强, 并且, 抗体与 GIF 的结合在很大程度上阻碍了 GIF 与其相互作用因子(如 Rab3a)的结合, 在抗体浓度较低时, 有部分游离的 GIF 可以抑制神经细胞的生长, 在抗体浓度足够大时, 几乎所有的 GIF 均被抗体所结合而无法结合其他因子, 剩余游离的 GIF 已经不足以发挥其神经生长抑制活性.

而 Rab3a 抗体试验的结果(图 5)更具有启发意义, 在 Rab3a 的抗体浓度足够大时, 可以几乎完全地抑制 GIF 的生物活性, Rab3a 的抗体能与 Rab3a 结合而不与 GIF 结合, 而抗体与 Rab3a 的结合能够抑制 GIF 的生物活性, 说明 Rab3a 与其抗体之间的结合作用, 比它与 GIF 之间的相互作用要强, 并且, 抗体与 Rab3a 的结合在很大程度上阻碍了 Rab3a 与 GIF 的结合, 在抗体浓度较低时, 有部分游离的 Rab3a 可以与 GIF 结合而抑制神经细胞的生长, 在抗体浓度足够大时, 几乎所有的 Rab3a 均被抗体所结合而无法结合 GIF, 剩余游离的 Rab3a 已经不足以发挥 GIF 的神经生长抑制活性. 而此时 AD 脑提取物中的其他蛋白质也不足以支持 GIF 的生长抑制活性, 由此可以得出一个新的结论: Rab3a 是 GIF 在发挥其神经生长抑制活性过程中最重要的相互作用因子, GIF 的神经生长抑制功能的发挥极大地依赖于它与 Rab3a 的相互作用.

GIF 和 Rab3a 的抗体都可以阻碍 GIF 和 Rab3a 的结合, 这说明 GIF 和 Rab3a 的相互作用很大程度上取决于他们的空间位置因素. 1995 年, Uchida 等^[9]和 Sewell 等^[15]几乎同时证明 GIF β 结构域可以

独立地在体外的细胞培养体系中发挥抑制活性. 这说明 GIF 与 Rab3a 的结合位点应该位于其 β 结构域上. 而本实验室的前期研究发现, GIF 的抗原决定簇在其 α 结构域上, 即 GIF 与其抗体的结合位点是位于其 α 结构域上, 这暗示着 GIF α 结构域的结构与构象特点可以影响其 β 结构域的结合特性. 本实验室的季清洲等^[16]通过金属硫蛋白家族内结构域拼接的方法研究发现, GIF α 结构域的存在对其 β 结构域的神经生长抑制活性有很重要的意义, 这也说明 GIF 空间构象的完整性对其生物学功能的发挥有很重要的作用.

由以上的事实我们可以对 GIF 与 Rab3a 的相互作用机理与其空间因素的关系作出一些推测: GIF 的 β 结构域有插入的 Thr5 以及 CPCP 区, CPCP 区可能形成 sticky arms, 伸出蛋白质表面, 并以可逆而快速的方式结合其他蛋白质因子, 引发或抑制进一步的级联反应, 并最终发挥抑制神经元生长的功能^[15]. 而 GIF α 结构域的某些位点虽然不能直接与 Rab3a 结合, 但起了吸引 Rab3a 蛋白和辅助结合的作用. 在 GIF 抗体存在的条件下, 由于抗体分子的分子质量和体积都比 GIF 大得多 (IgG 抗体的分子质量一般为 160 ku, 而 GIF 的分子质量仅为 7 ku) 抗体与 GIF α 结构域上的抗原决定簇结合的同时, 也在空间上屏蔽了 GIF β 结构域的活性位点(可能是 CPCP 区), 或者改变了 GIF 的构象. 从而阻止了 GIF 与 Rab3a 的结合.

而当 Rab3a 抗体加入培养体系后, 也由于抗体分子的分子质量和体积都比 Rab3a 大得多 (Rab3a 的分子质量约为 22 ku), 所以抗体在与 Rab3a 的抗原决定簇结合时, 可能空间上屏蔽了 Rab3a 与 GIF 结合的位点, 或者改变了 Rab3a 的构象, 也在空间上阻碍了 Rab3a 与 GIF 的结合.

在细胞培养体系中分别加入 GIF 与 Rab3a 的抗体, 所测得的神经生长抑制曲线十分相似, 这说明 GIF 的抗体与 Rab3a 的抗体在阻碍二者相互作用过程中的机理也是相似的.

参 考 文 献

- 1 Metal N. Alzheimer's Disease and Related Disorders. Oxford: Pergamon Press, 1993. 3~14
- 2 Uchida Y, Takio K, Titani K, *et al.* The Growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 1991, **7** (2): 337~347
- 3 Erickson J C, Sewell A K, Jensen L T, *et al.* Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein-III (GIF). *Brain Res*, 1994, **649** (1-2): 297~304
- 4 Sewell A K, Jensen L T, Erickson J C, *et al.* Bioactivity of metallothionein-3 correlates with its novel β domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry*, 1995, **34** (14): 4740~4747
- 5 Uchida Y, Ihara Y. The N-terminal portion of growth inhibitory factor is sufficient for biological activity. *J Biol Chem*, 1995, **270** (7): 3365~3369
- 6 康巧华, 陈巧林, 任宏伟, 等. 生长抑制因子(GIF)与 G 蛋白 Rab3a 直接相互作用. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (6): 880~884
Kang Q H, Chen Q L, Ren H W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 880~884
- 7 Geppert M, Goda Y, Stevens C F, *et al.* The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*, 1997, **387** (6635): 810~814
- 8 Chou J H, Jahn R. Binding of Rab3A to synaptic vesicles. *J Biol Chem*, 2000, **275** (13): 9433~9440
- 9 Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, *et al.* Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 1997, **388** (6642): 593~598
- 10 Haynes L P, Evans G J O, Morgan A, *et al.* A direct inhibitory role for the Rab3 specific effector, Noc2, in Ca^{2+} -regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem*, 2000, **305** (6): 89~97
- 11 Iezzi M. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion, *Eur J Biochem*, 1999, **259** (10): 3~17
- 12 Erickson J C, Sewell A K, Jensen L T, *et al.* Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein-III (GIF). *Brain Res*, 1994, **649** (2): 297~304
- 13 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 384~397
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y, *et al.* *Methods and Technologies of Biochemistry Experiments*. 2nd. Beijing: Higher Education Press, 1997. 384~397
- 14 季清洲. 神经生长抑制因子的性质与功能研究. 北京: 北京大学生命科学学院: [学位论文]. 2002
Ji Q Z. *Researches on characteristics and functions of neuronal growth inhibitory factor*. Beijing: Life Science College, Peking University: [Thesis]. 2002
- 15 Sewell A K, Jensen L T, Erickson J C, *et al.* Bioactivity of metallothionein-3 correlates with its novel β domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry*, 1995, **34**: 4740~4747
- 16 季清洲, 康巧华, 周研妍, 等. 神经生长抑制因子的功能结构域双体研究. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34** (2): 248~252
Ji Q Z, Kang Q H, Zhou Y Q, *et al.* *Acta Biochem Biophys Chin*, 2002, **34** (2): 248~252

The Influence of G-Protein Rab3a on The Activity of The Neuronal Inhibitory Factor (GIF) *

PANG Li-Yan, RU Bing-Gen**

*(The National Key Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,
College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)*

Abstract MTT reduction assay was used for the quantitative detection of the inhibitory activity of GIF in the rat hippocampal nerve cell culture system. Evaluation of the influence of presence of Rab3a on the inhibitory activity of GIF indicated that Rab3a is enough to support the inhibitory activity of GIF instead of AD brain extract. Subsequently, the influence of antibody of GIF or Rab3a on the interaction between GIF and Rab3a was examined. The results indicated that Rab3a was most important to the inhibitory activity of GIF, and the interaction between GIF and Rab3a deeply depend on the spatial conditions. The mechanism and significance of the interaction between GIF and Rab3a are discussed.

Key words Rab3a, neuronal growth inhibitory factor (GIF), interaction, rat hippocampal nerve cell culture system, MTT reduction assay

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30450009).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62756969, Fax: 86-10-62751842, E-mail: rulab@pku.edu.cn

Received: May 17, 2005 Accepted: September 28, 2005