

大鼠 Shh-N 融合蛋白的表达、纯化及功能研究*

孙朝晖 赖燕来 曾文文 郭雅南 左焕琮 谢佐平**

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 为了获得重组 Sonic hedgehog N 端蛋白 (Shh-N) 并研究其功能, 应用 PCR 技术扩增 Shh-N cDNA, 然后克隆至原核表达质粒中, 转化 *E. coli* 后获得表达菌株, 经 1 mmol/L IPTG 诱导高效表达出带有 His-tag 的融合蛋白, 其中大部分为可溶性蛋白, 少量为包涵体. 用 His-tag 特异性结合树脂纯化可溶性融合蛋白, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一区带, 凝胶自动扫描分析表明, Shh-N 的纯度达 85% 以上. 纯化后的 Shh-N 在成纤维生长因子 8 (FGF₈) 的协同作用下, 能诱导神经前体细胞 (NPC) 向酪氨酸羟化酶阳性神经元 (TH⁺) 发育. 在此基础上可以诱导不同类型的人类干细胞定向分化为多巴胺 (DA) 神经元, 从而为临床治疗帕金森病 (PD) 提供充足的供体细胞.

关键词 Shh-N, 重组融合蛋白, 蛋白质纯化, 神经前体细胞, TH 免疫阳性神经元

学科分类号 Q78

在胚胎发育早期, Sonic hedgehog N 端蛋白 (Shh-N) 参与前体细胞定位, 并决定特定部位的神经元表型, 如腹侧中脑多巴胺 (dopamine, DA) 神经元的表型决定^[1]. 腹侧中脑 DA 前体细胞的特异性表型分化依赖于不同方向上的调节机制, 即背-腹轴 (Shh-N) 和前-后轴 (FGF₈) 信号分子的调节作用^[1]. 两者共同作用于成神经前体细胞 (neural progenitor cells, NPC), 诱导一系列 DA 神经元发育相关的基因表达, 使 NPC 分化成 DA 神经元^[2]. 胚胎腹侧中脑的原代 DA 神经元是细胞移植治疗帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的主要供体细胞, 但由于胚胎来源的限制 (一个 PD 病人至少需要 6~7 个胚胎), 这一方法虽有较好疗效, 但并不能得以广泛应用, 获得足够的并能用于移植的 DA 细胞是当务之急. 研究人员进行了各方面的尝试, 希望能在体外将具有自我更新和多分化潜能的干细胞如胚胎/神经干细胞^[3,4] 诱导成表型和功能均能代替胚胎原代 DA 神经元的供体细胞^[5,6], 用于临床治疗 PD. 在众多的研究中, 在神经发生早期对增殖的 NPC 具有诱导作用的发育相关蛋白 Shh-N 备受关注^[7]. 因此, 本文通过克隆 Shh-N 基因, 把它连接到高效原核表达载体上, 获得有生物活性的蛋白质, 然后与成纤维生长因子 8 (FGF₈) 联合应用, 体外诱导 NPC 分化成 DA 前体细胞, 用于临床治疗 PD.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 BL21 (DE3)、质粒 pGEM-T-*Shh-N* 由本室自构建, pET-28a (+) 和 NPC 均由本室保存.

1.1.2 试剂: DNA 片段回收试剂盒购自北京博大生物技术公司, 质粒大提试剂盒购自美国 Promega 公司, 质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷酶 (IPTG) 购自北京鼎国生物技术发展公司, 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TAKARA 生物公司, Ni²⁺-NTA 亲和层析柱购自 QIAGEN 公司.

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成: 引物由上海生工公司合成. 上游引物序列为 5' TT GGATCC ATG TGT GGG CCC GGC AGG GGG TTT; 下游引物序列为 5' AA CTCGAG TCA GCC GCC AGA TTT GGC CGC CA. 下划线处分别为限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 的作用位点.

* 国家自然科学基金资助项目 (30070245).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62788677, E-mail: zuopingx@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2003-04-08, 接受日期: 2003-06-02

1.2.2 表达载体 pET-*Shh-N* 的构建: 取 pGEM-T-*Shh-N* 1 μg , 加入上游和下游引物, 按照文献 [8] 的方法进行 PCR, 扩增产物经测序鉴定后, 将用于 *Shh-N* cDNA 克隆到 pET28a (+) 载体中, 构建 pET-*Shh-N*, 该表达质粒带有 His-tag 标记.

1.2.3 融合蛋白诱导表达、纯化及其检测: 感受态细胞 BL21 的制备及质粒转化按常规 CaCl_2 法. 用含 Kan 的 LB 平皿筛选阳性克隆后接种于含 Kan 的 LB 培养基中, 37°C 摇床培养 6 ~ 8 h, 取活化的菌液接种于含 Kan 的 LB 培养基中, 培养至 A_{600} 为 0.3 ~ 0.4 时, 培养物中加入 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后, 将细胞超声破碎和离心处理后, 上清液用 Ni^{2+} -NTA His-tag 亲和层析法^[9] 纯化可溶性蛋白. 12% SDS-PAGE 分析蛋白质表达与纯化效果. 将 SDS-PAGE 结果转印到硝酸纤维素膜上, 用小鼠源的抗 6 $\times$ His 单克隆抗体和山羊源的抗 *Shh* (N-19) 多克隆抗体进行蛋白质印迹, 具体操作参照文献 [9]. 测定纯化后的总蛋白质浓度, 过滤除菌, 分装后 -70°C 冻存.

1.2.4 融合蛋白的生物学活性检测: 分离 E9.5 ~ 12.5 胚胎大鼠的全脑, 按照本室常规方法^[10] 进行 NPC 增殖培养, 然后参考 Lee 等^[6] 的方法进行细胞诱导和分化, 稍作改动. 将 NPC 分成 6 组, 以不加入 *Shh-N* 和 FGF_8 的培养细胞作为对照组, 实验组中依次加入不同浓度的 *Shh-N* (100 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$) 和 FGF_8 (100 $\mu\text{g/L}$), 在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 6 天. 然后将增殖的 NPC 转移至涂 P-D-赖氨酸的 24 孔板中贴壁培养 9 天后, 进行 DA 神经元特异性标记物-TH 阳性神经元 (tyrosine hydroxylase-immunopositive neurons, TH⁺) 的免疫荧光观察.

2 结 果

2.1 表达质粒的 PCR 检测和酶切鉴定

将 *Shh-N* cDNA 克隆到 pET28a 载体中, 分别进行 PCR 扩增和酶切鉴定. 结果发现, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 得到相应约 500 bp 的 DNA 带 (图 1a). 另外, pET28a-*Shh-N* 重组质粒经 PCR 扩增后得到一条约 500 bp 的 DNA 带, 与 *Shh-N* cDNA 长度一致 (图 1b).

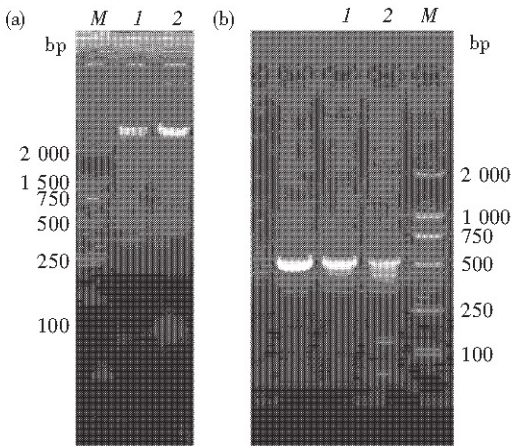


Fig. 1 Enzyme (a) and PCR (b) identification of pET-*Shh-N*
1, 2: pET28a-*Shh-N*; M: DL-2000 DNA marker.

2.2 *Shh-N* 的表达与纯化

将质粒 pET-*Shh-N* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达. SDS-PAGE 结果显示, 在大约 25 ku 处有明显的表达条带. 将菌体超声破碎, 离心后得粗提液和沉淀, 两者均可见到表达产物. 粗提液经 Ni^{2+} His-tag 亲和层析柱纯化后, 约 25 ku 处为单一的条带, 凝胶自动扫描分析表明, *Shh-N* 的纯度达 85% 以上 (图 2). 纯化后的总

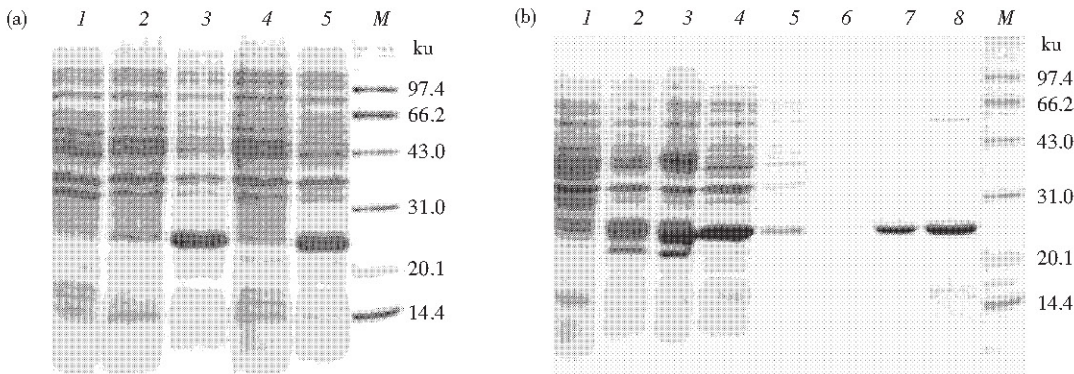


Fig. 2 Expression and purification of *Shh-N*

M: protein molecular mass marker. (a) 1: Non-induced pET28a (+); 2, 4: non-induced pET-*Shh-N*; 3, 5: induced pET-*Shh-N*.
(b) 1: non-induced pET-*Shh-N*; 2: induced pET-*Shh-N*; 3, 4: flow through; 5, 6: wash; 7, 8: elution (purified protein).

蛋白质浓度大约为 5 g/L. 蛋白质印迹结果表明, 表达产物为预期的 His-tag-Shh-N 融合蛋白 (图 3).

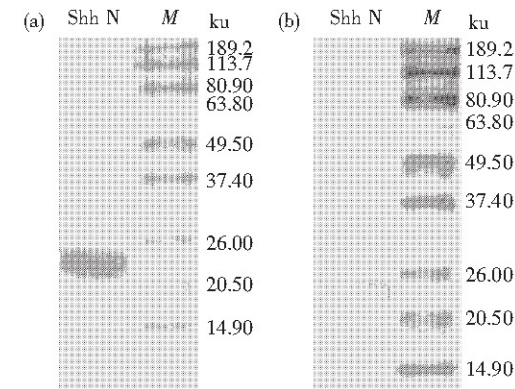


Fig. 3 Western blotting analysis of His-tag fusion protein of Shh-N

(a) mouse monoclonal IgG anti-His as primary antibody.
(b) goat polyclonal IgG anti-Shh (N-19) as primary antibody.

2.3 重组蛋白的生物学活性检测

在 NPC 的诱导阶段, 培养基中分别加入不同浓度的 Shh-N 和 FGF₈ 6 天后, 进行无血清分化培养, 9 天后进行 TH⁺ 计数. 结果发现, 与空白对照组相比, 单独加入 FGF₈ 仅能诱导 TH⁺ 数增加 80%. 与 Shh-N 协同诱导后, 这种作用大大增强. 加入标准 rmShh-N 500 μg/L 与 FGF₈ 共同作用后, TH⁺ 数增加了 4.6 倍. 为了观察本文中经纯化后的 Shh-N 是否具有相似的活性, 在培养基中加入 FGF₈ 的同时, 再分别加入不同浓度纯化后的 Shh-N. 结果发现, 100 μg/L 的 Shh-N 对 TH⁺ 的诱导作用不明显, 500 μg/L 的 Shh-N 对 TH⁺ 虽有诱导作用 ($P < 0.05$), 但比标准 rmShh-N 效果差, 经纯化后的 Shh-N 的浓度增至 1 000 μg/L, 诱导作用明显加强, 与单纯加入 FGF₈ 组相比, 差别有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4a ~ d), 与 500 μg/L rmShh-N 相比, 组间无明显差别 (图 4e).

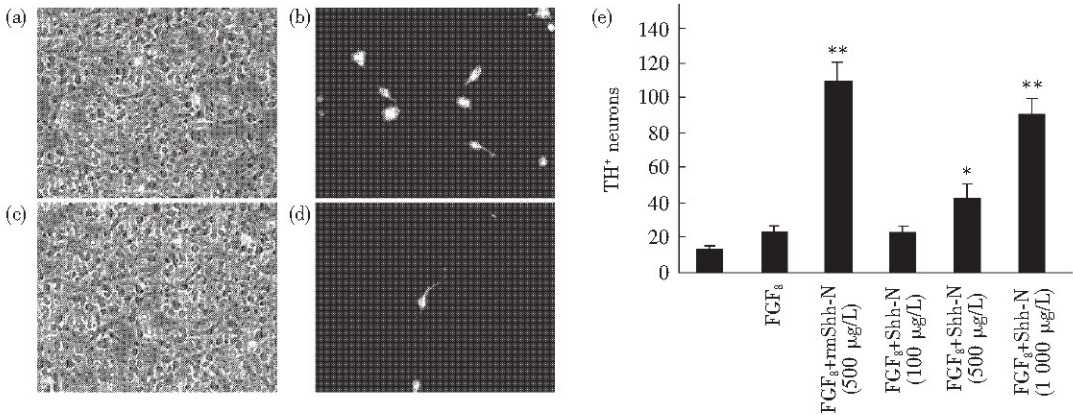


Fig. 4 The roles of Shh-N in the NPC induction into TH⁺

TH⁺ were shown as the phase-contrast (a, c) and fluorescent images (b, d, TH⁺ were in white). More TH⁺ neurons were found (a, b) after being treated with recombinant Shh-N (1 000 μg/L) and FGF₈ cooperatively than that with FGF₈ only (c, d) after induction and differentiation. (e) indicated the dose-dependent effects of Shh-N on NPC induction. Single asterisk indicated $P < 0.05$ and double asterisks represented $P < 0.01$ compared to the group treated with FGF₈ only, respectively.

3 讨 论

Shh 的前体蛋白在胞内生理环境中能通过 C 端的催化作用, 自我剪切形成 N 端蛋白即 Shh-N^[11]. Shh-N 能诱导与发育相关的多种下游基因表达, 起到重要的调节作用^[1]. 本文首先运用原核表达载体系统 PQE-30 对 *Shh-N* 基因表达, 得到约 21 ku 的融合蛋白, 但其表达水平较低, 可溶性蛋白的表达量仅占细胞总蛋白质量的 5% ~ 6%, 表达蛋白经纯化后含量极少, 不能满足研究的需要. 于是将

Shh-N cDNA 克隆至 pET28a (+) 质粒, 构建表达载体, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得高效表达, 表达蛋白大部分为可溶性, 少量以包涵体出现. 这可能与 Shh-N 的分子质量较小, 并且有较高比例的极性氨基酸组成有关. 将表达产物经 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化后, 获得了大小约 25 ku、纯度较高的 Shh-N 融合蛋白, 该蛋白质在利用体外细胞培养系统进行活性检测和进一步研究中更有价值.

研究表明, Shh-N 和 FGF₈ 协同作用^[1,3]后能分别调节 TH 的基因启动子区的区域 (中脑) 特异性

因子, 如 Nurr1^[12] 和亚型 (DA 能神经元) 特异性因子 (同源盒基因相关转录因子), 因此能诱导有丝分裂期 NPC 中 TH 基因的表达, 决定了中脑 DA 能神经元表型. 本文用表达后纯化的重组 Shh-N 蛋白 (1 000 $\mu\text{g/L}$) 和 FGF₈ 协同作用于增殖的 NPC, 分化培养后能显著增加 TH 阳性细胞的数目. 实验中发现, 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 Shh-N 融合蛋白才能达到与 500 $\mu\text{g/L}$ 的标准 rmShh-N 类似的作用, 这可能是因为本室制备的 Shh-N 的纯度约为 85%, 比标准 rmShh-N (97%) 的低, 另外本室获得的 Shh-N 虽与标准 rmShh-N 均带有 His-tag 序列, 便于亲和纯化, 但其分子质量略大, 可能会影响它的生物活性作用. 实验中曾考虑使用 Thrombin 切掉含有 His-tag 的序列, 但 Thrombin 作用后对 Shh-N 活性的影响不大, 鉴于功能研究的主要目的在于检测融合蛋白是否对 NPC 具有诱导活性, 故将纯化后的蛋白质直接用于生物学活性研究, 结果表明融合蛋白能诱导增殖的 NPC 发育成 DA 神经元, 这为本室的深入研究奠定了坚实的基础.

目前应用胚胎中脑原代 DA 神经元治疗 PD 已取得较好的效果, 但供体来源得不到满足, 所以现在将解决方案由原代 DA 神经元转移到干细胞上. 胚胎/神经干细胞具有自我更新和多分化潜能特性^[3,4], 因而能分化成各种类型的神经元如 DA 神经元. 在此基础上, 本室将发展合适的培养系统, 在体外诱导 DA 细胞产生^[5,6], 用于临床神经移植治疗 PD. 本研究的成功不但为深入研究 Shh-N 蛋白的生理功能奠定了基础, 而且它和 FGF₈ 协同作用后, 如何通过激活转录激活因子而决定了腹侧中脑 DA 能神经元的亚型特异性的研究也将被关注.

参 考 文 献

- Hyne M, Rosenthal A. Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol*, 1999, **9** (1): 26 ~ 36
- Britto J, Tannahill D, Keynes R A. Critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci*, 2002, **5** (2): 87 ~ 88
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein J L, *et al*. FGF and shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 1998, **93** (5): 755 ~ 766
- Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*, 2001, **414** (6859): 112 ~ 117
- Kim J H, Auerbach J M, Gomez J R, *et al*. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 2002, **418** (6893): 50 ~ 56
- Lee S H, Lumelsky N, Auerbach J M, *et al*. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotech*, 2000, **18** (6): 675 ~ 679
- Lai K, Kaspar B K, Gage F H, *et al*. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2003, **6** (1): 21 ~ 27
- Marigo V, Roberts D J, Lee S M, *et al*. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. *Genomics*, 1995, **28** (1): 44 ~ 51
- 马歇尔 D R, 门永 J T, 布格斯 R R, 等. 朱厚础等译. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 152 ~ 163
- Marshak D R, Kadonaga J T, Burgess R R, *et al*. translated by Zhu H C, *et al*. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Beijing: Science Press, 1999. 152 ~ 163
- Sun Z H, Lai Y L, Zuo H C, *et al*. Mesencephalic progenitors can differentiate into TH-positive neurons and improve dysfunction in PD rats. *Tsinghua Sci Tech*, 2003, **8** (4): 502 ~ 507
- John J L, Stephen C E, Doris P K, *et al*. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science*, 1994, **266** (5190): 1528 ~ 1537
- Sakurada K, Mikiko O S, Theo D P, *et al*. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, 1999, **126**: 4017 ~ 4026

Cloning, Expression, Purification and Biological Activity Analysis of Rat Sonic Hedgehog N-terminal Genes*

SUN Zhao-Hui, LAI Yan-Lai, ZENG Wen-Wen, GUO Ya-Nan, ZUO Huan-Cong, XIE Zuo-Ping**

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract To obtain recombinant sonic hedgehog N-terminal protein (Shh-N) and study its biological activity, the cDNA encoding the functional rat Shh-N was isolated using PCR. The expression plasmid was constructed by inserting *Shh-N* cDNA into plasmid pET28a (+) and transformed into *E. coli*. Then an expression strain was selected. SDS-PAGE and Western blotting analysis revealed that the rat Shh-N protein was highly expressed in the form of a large quantity of soluble protein and a small amount of inclusion body being induced by the IPTG. After Ni-NTA resin affinity chromatography, the purity of the final Shh-N protein was more than 85%. Purified protein being added to neural progenitor cells during developmental stages could induce the phenotype of tyrosine hydroxylase-immunopositive neurons. Based on this study, sufficient donor cells would be available to treat

Parkinson's disease in clinical therapy via inducing different kinds of stem cells from human being into dopaminergic neurons.

Key words sonic hedgehog N-terminal protein, fusion protein, protein purification, neural progenitor cells, TH⁺ neurons

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070245).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62788677, E-mail: zuopingx@mail.tsinghua.edu.cn

Received: April 8, 2003 Accepted: June 2, 2003

安定结合抑制蛋白 (DBI) 的研究进展

井明艳 孙建义

(浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

1983年, Alessandro等首先从小鼠脑中分离纯化得到一种高度保守的肽类物质, 它能拮抗安定物质——diazepam与脑突触膜相结合, 故称之为安定结合抑制蛋白 (DBI)。此肽的相对分子质量为 10 ku, 含 86 个氨基酸残基, N 端为封闭型, C 端具有高度保守性, 是活性功能的重要组成部分。它可与 CBR (central-type benzodiazepine receptor) 结合, 变构调节 GABA_A 受体的活性。同时, DBI 也可与 PBR (peripheral-type benzodiazepine receptor) 结合, 促进类固醇的合成。DBI 还可影响动物胃肠消化、饮食等, 因此被认为是一种新型的脑肠神经肽。

1 DBI 的分布

DBI 主要分布于哺乳动物的中枢神经系统 and 外周组织中。Bal 等通过放射免疫法测定了 DBI 在鼠中的含量, 发现它以高浓度集中于突触、小脑和黑质中, 以亚当量存在于外周和淋巴组织中。DBI 还以高含量存在于胃肠道中。Yanase 等 (2000 年) 体外杂交实验表明, DBImRNA 可在鼠的胃肠道中高水平表达。

2 DBI 的生物学功能

a. 参与类固醇合成。合成类固醇是在线粒体内进行的, 由胆固醇在细胞色素 P450 侧链切割酶的作用下, 先生成孕烯醇酮, 而后由孕烯醇酮合成类固醇。整个过程分两步来完成: 一是胆固醇由胞质向线粒体内膜转运; 二是细胞色素 P450_{scc} 酶合成类固醇。PBR 是合成类固醇中的一个重要的调控元件, 当与胞浆蛋白 DBI 结合后, 可携带胆固醇进入线粒体。同时, PBR 在维持线粒体膜外的稳定性和预防细胞凋亡等方面也起着重要作用。DBI 是 PBR 的一种内源性配体, 二者特异性结合参与类固醇的合成。一方面, 在激素的诱导下, PBR 的结构和微环境发生改变, 使 PBR 易与 DBI 结合; 另一方面, 激素也可诱导大量的 iDBI (DBI 前体物) 释放, 直接刺激细胞色素 P450_{scc} 酶作用于胆固醇, 从而合成类固醇。

b. 降低性激素水平。DBI 可降低性激素水平, 如雌二醇和睾丸激素, 其作用机理如图 1 所示。Dong 等 (2001 年) 分别给每个雌雄鼠注射 DBI 0.3 ~ 10 nmol, 发现鼠血清中的性激素水平下降, 且降低的程度与 DBI 添加量成正比。

c. DBI 与焦虑。DBI 是一种内源性致焦虑肽, 当给动物注射一定量的 DBI 后, 可增加动物焦虑、恐慌等。其作用机理是: DBI 可竞争性地抑制 BZD 与 GABA_A 受体的特异性结合, 而 BZD 是一种镇静剂, 因此 DBI 可抑制 BZD 活性而

导致机体焦虑。

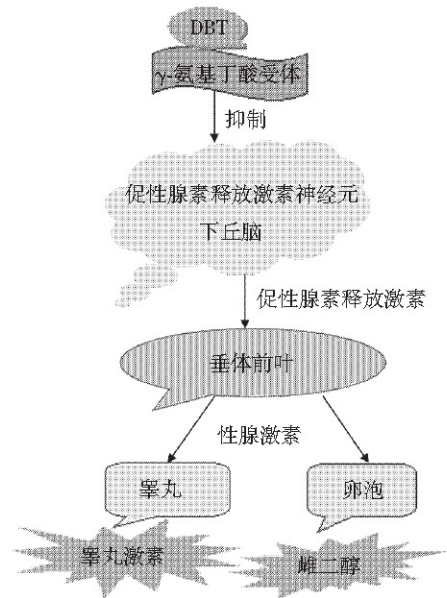


Fig. 1 The interaction between DBI and Hypothalamus-anterior pituitary-gonad axis

图 1 DBI 与下丘脑-垂体前叶-性腺轴间的相互作用

3 影响 DBI 的因素

a. 雄激素。雄激素可促进 DBI 基因的转录。Johannes 等 (1994 年) 的小鼠实验结果表明, 小鼠阉割后, 体内 DBImRNA 水平在 6 天内比对照组下降 1.7 ~ 2.7 倍, 但在阉割后第三天注入雄激素则可使 DBI 基因的转录水平提高 4.2 ~ 7.5 倍 (相对于对照组)。

b. 乙醇。Masashi 等 (1996 年) 报道, 乙醇可以刺激大脑皮层神经元中的 DBI 基因转录。试验发现, 当神经元接触乙醇一定时间, 可使 DBImRNA 水平升高; 若可长期地接触乙醇, 则 DBImRNA 含量会更高。

c. 烟酸。烟酸通过作用于烟酸乙酰胆碱受体来增强 DBI 基因的转录和翻译。Masashi 等 (1996 年) 给老鼠的大脑皮层内注射定量烟酸 (1 mg/kg), 结果发现老鼠大脑内的 DBI 和 DBImRNA 水平均升高, 且与烟酸作用的时间有关。