

LINGO-1-Fc 蛋白对低钾诱导小脑颗粒神经元凋亡的保护作用*

赵湘辉¹⁾ 金卫林^{2)**} MI Sha³⁾ 鞠 躬^{1,2)**}

¹⁾第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032; ²⁾上海交通大学神经科学研究所, 上海 200240;

³⁾Department of Discovery Biology, Biogen Idec, Inc., 14 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, USA)

摘要 髓鞘抑制因子 Nogo-A、MAG 和 OMgp 通过共同的受体信号复合物 NgR/p75^{NTR} (或者 TROY) 发挥对中枢神经纤维再生的抑制作用. 新近克隆的跨膜蛋白 LINGO-1 是该信号途径的另一个重要组成成分和调节分子. LINGO-1 特异表达于中枢神经系统, 神经元上的 LINGO-1 被证明参与调节中枢神经再生的抑制信号, 而少突胶质细胞表达的 LINGO-1 分子参与负调节少突胶质细胞的髓鞘化过程. 为探讨 LINGO-1 分子在神经元凋亡过程中的作用, 利用包含 LINGO-1 分子胞外段 LRR 和 IgC2 结构域的 Fc 融合蛋白作为功能性拮抗剂, 研究 LINGO-1 对低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用. 利用成熟的 Hoechst 标记凋亡细胞的方法, 观察到经 LINGO-1-Fc 蛋白预处理 2 h 能够显著阻止小脑颗粒神经元的凋亡. 仅包括 LRR 结构域的 GST-LINGO-1 与 LINGO-1-Fc 蛋白, 虽同样具有与颗粒神经元的结合活性, 但是 GST-LINGO-1 不能有效地阻止低钾诱导的细胞凋亡. 这些结果提示, LINGO-1-Fc 蛋白能够阻止低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡, 并且这种作用可能是 IgC2 结构域依赖的.

关键词 LINGO-1, 小脑颗粒神经元, 凋亡, 保护作用

学科分类号 Q78

髓鞘来源的抑制因子 Nogo-A、MAG 和 OMgp 被认为是阻碍中枢神经纤维再生的重要因素^[1,2], 这三种抑制分子利用共同的受体复合物——NgR 和神经营养因子低亲和性受体 p75^{NTR} 或肿瘤坏死因子受体 TROY 发挥对神经元突起生长的抑制作用^[3~8]. 最新的研究发现, 神经元中的 Nogo-NgR 信号系统还需要 LINGO-1 的参与^[9].

新克隆的跨膜蛋白——LINGO-1 (LRR and Ig domain containing, Nogo receptor interacting protein) 特异表达于中枢神经系统, 由 614 个氨基酸残基组成, 胞外段具有 LRR 和 IgC2 结构域^[9,10]. 神经元中表达的 LINGO-1 参与调节中枢神经再生的抑制信号^[9], 少突胶质细胞表达的 LINGO-1 分子则参与负调节少突胶质细胞的髓鞘化过程^[11].

Mi 等^[9]在研究抑制因子对体外培养的小脑颗粒神经元突起生长影响时, 利用缺失胞浆段的 LINGO-1-Fc 蛋白 (包括 LRR 和 Ig 结构域) 作为功能性拮抗剂证明, 外源加入可溶性的 LINGO-1-Fc 蛋白可以拮抗髓鞘抑制分子的作用并显著抑制

RhoA 的活性; 少突胶质细胞培养物中加入 LINGO-1-Fc 蛋白, 可以有效地拮抗内源 LINGO-1 分子的分化抑制作用^[11]. LINGO-1-Fc 的拮抗作用推测可能是通过干扰 LINGO-1 与 NgR 或者 LINGO-1 与 p75^{NTR}、TROY 之间的结合, 并影响 RhoA 分子的活性而发挥的.

本研究着重观察 LINGO-1 分子在神经元存活、凋亡等方面的潜在作用, 即利用低钾诱导小脑颗粒神经元凋亡的模型, 观察加入 LINGO-1-Fc 融合蛋白对诱导凋亡细胞的保护作用. 结果表明, 诱导凋亡前先以 LINGO-1-Fc 蛋白预处理细胞 2 h 可以促

*国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研基金资助项目 (30218003), 国家重点基础研究发展计划资助项目 (973) (2003CB515300).

** 共同通讯联系人.

鞠躬, Tel: 029-84774557, Fax: 029-83246270

E-mail: jugong@fmmu.edu.cn

金卫林, Tel: 021-54749287, Fax: 021-54749270

E-mail: weilinjin@yahoo.com

收稿日期: 2005-11-08, 接受日期: 2005-12-28

进神经元的存活, 且这种保护作用可能是 IgC2 结构域依赖的.

1 材料和方法

1.1 材料

细胞培养用 DMEM、胎牛血清 FBS、Neurobasal medium 和 B27 添加剂等均为 GIBCO 公司产品; 抗 NgR 兔多抗 AB5615^[12] 购自 Chemicon 公司; 抗 TROY 山羊多抗购自 Santa Cruz 公司; 神经营养因子受体 p75^{NTR} 的抗体购自 Sigma 公司; 抗 Ig 融合蛋白 Fc 段单克隆抗体由第四军医大学免疫学教研室惠赠; 抗 GST 标签的单克隆抗体由第四军医大学神经科学研究所自行制备^[13]; 荧光二抗 Donkey-anti-rabbit-FITC, Donkey-anti-mouse-Texas Red 和 Donkey-anti-goat-FITC 购自 Molecular Probes 公司; Hoechst33342 购自 Sigma 公司; 动物由第四军医大学实验动物中心提供.

1.2 实验方法

1.2.1 LINGO-1 融合蛋白的表达纯化. CHO 细胞表达的 LINGO-1-Fc 蛋白(包括人 LINGO-1 分子第 1~532 个氨基酸残基组成的胞外 LRR 结构域和 IgC2 结构域, 融合有人 IgG1 的 Fc 段)利用 Fc 标签, 经 Protein-A 柱亲和层析获得纯化的蛋白质^[9]. 大肠杆菌 BL21(DE3)表达的 GST-LINGO-1 蛋白(GST 标签的羧基端融合了人 LINGO-1 分子第 34~415 个氨基酸残基组成的胞外 LRR 结构域)主要以可溶形式存在, 超声裂菌后的上清部分经谷胱甘肽亲和层析柱纯化. 表达纯化方法参考文献[13]进行.

1.2.2 小脑颗粒神经元的原代培养. 参照 Moreno-Flores 等的方法^[14]. 具体步骤如下: 7~8 天的 SD 大鼠仔鼠经低温麻醉后以 75%酒精消毒, 无菌条件下取出小脑放入 D-Hank's 平衡液中, 在解剖显微镜下仔细去除脑膜, 剪成 1 mm³ 大小的组织块, 加入 0.25%胰酶-0.04% EDTA 消化液, 入 37℃孵箱温育 15 min, 其间摇晃一次. 随后用滴管吸出组织转移到装有预冷 DMEM-10% FBS-25 mmol/L KCl 完全培养液的离心管内, 终止消化作用 5 min. 吸出组织转移到另一支含完全培养液的离心管中, 用火焰抛光的细口径滴管吹打数次, 200 目筛网过滤, 制成单细胞悬液. 800 r/min 离心 5 min, 收获的细胞用上述完全培养液吹散, 以 3×10⁵ 个/cm² 的密度接种入多聚赖氨酸 (25 mg/L)

处理过的 24 孔板中, 入孵箱培养. 先以含血清培养液接种以促进细胞贴壁, 5~6 h 后换为 Neurobasal-B27-25 mmol/L KCl 完全培养液. 第 4 天半量换液, 第 7 天进行实验. 上述方法培养的小脑颗粒神经元纯度达到 95%以上.

1.2.3 LINGO-1-Fc 和 GST-LINGO-1 融合蛋白与小脑颗粒神经元的结合实验. 小脑颗粒神经元以 10⁵ 个/cm² 的密度接种于干热灭菌并经多聚赖氨酸 (100 mg/L)处理的玻片上, 培养第 2 天进行实验. 主要采用活细胞和固定细胞两种结合实验. 活细胞结合实验的方法具体如下: 培养物中加入终浓度为 4 mg/L 的 LINGO-1-Fc 蛋白、Fc 蛋白或 50 mg/L 的 GST-LINGO-1 蛋白、GST 蛋白, 37℃孵育 30 min. 然后以 PBS 快速洗涤细胞 2 次, 冰甲醇-20℃固定 10 min, 再以 4%多聚甲醛 4℃固定 5 min. PBS 充分洗涤后, 以 1:200 的 anti-Fc 或 1:2 000 的 anti-GST 一抗作用 1 h, 1:400 的荧光二抗室温避光作用 1 h, 甘油封片. 固定细胞结合实验具体如下: 上述相同方法固定的细胞, PBS 洗涤后分别滴加 4 mg/L 的 LINGO-Fc 蛋白、Fc 蛋白或 50 mg/L 的 GST-LINGO-1 蛋白、GST 蛋白, 室温孵育 1 h. PBS 洗涤 2 次, 然后同上依次入一抗、二抗, 甘油封片. OLYMPUS 激光共聚焦显微镜 40×物镜进行图像分析.

1.2.4 LINGO-1-Fc 蛋白对低钾诱导凋亡小脑颗粒神经元的保护作用. 培养第 7 天的的小脑颗粒神经元随机分为 4 组: 完全培养液培养的正常细胞, Neurobasal-B27 培养的低钾诱导凋亡细胞, 去钾同时加入 LINGO-1-Fc 或 Fc 蛋白培养, 去钾前先以含 LINGO-1-Fc 或 Fc 蛋白的完全培养液预处理细胞 2 h, 再换为含 LINGO-1-Fc 蛋白的 Neurobasal-B27 培养液继续培养. 蛋白质设 10 mg/L、4 mg/L 和 1 mg/L 3 种浓度, 每种浓度设 2~3 个重复处理孔. 8 h 后以 Hoechst33342 (终浓度为 10 mg/L) 标记细胞核, 37℃作用 10 min, 4%多聚甲醛固定细胞, PBS 洗涤, 以 OLYMPUS 激光共聚焦显微镜 10×物镜进行图像分析.

1.2.5 GST-LINGO-1 蛋白对小脑颗粒神经元的作用. 按照上述相同的分组方法处理细胞, 设 100 mg/L、50 mg/L、10 mg/L 和 4 mg/L 4 种蛋白质浓度, 以相同浓度的 GST 蛋白作对照, 其他过程同上.

1.2.6 凋亡细胞计数及数据分析. 处理的细胞经 Hoechst 标记后, 细胞核发生明显固缩的为凋亡细

胞. 每个处理孔随机选取 3 个视野, 细胞计数达到 1 000~2 000 个/孔. 每种浓度的处理结果为 2~3 个重复处理孔的平均, 计数结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 计算, 全部实验重复 3 次. 数据分析以统计软件 SPSS 进行 Mann-Whitney U test 分析完成.

1.2.7 几种 LINGO-1 结合相关分子在小脑颗粒神经元的表达. 参照上文方法得到固定的细胞爬片, PBS 洗涤后, 以 10% 正常驴血清室温封闭 1 h, 分别以 1:500 的 anti-NgR、1:1 000 的 anti-p75^{NTR} 和 1:100 的 anti-TROY 作用 1 h, 1:400 的荧光二抗避光作用 1 h, 甘油封片, OLYMPUS 激光共聚焦显微镜 40× 物镜进行图像分析.

2 实验结果

2.1 LINGO-1 融合蛋白的表达与纯化

纯化的 LINGO-1-Fc 蛋白和 GST- LINGO-1 蛋白 SDS-PAGE 表观蛋白质分子质量分别为 90 ku 和 70 ku, 与预期大小相符 (图 1).

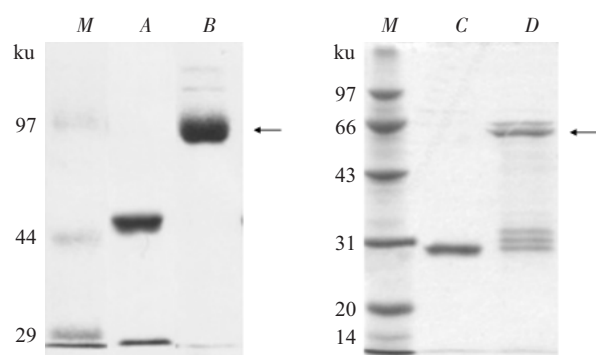


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression products of purified recombinant protein LINGO-1-Fc and GST-LINGO-1

M: Protein marker; A: The purified protein Fc; B: The purified protein LINGO-1-Fc; C: The purified protein GST; D: The purified protein GST- LINGO-1.

2.2 LINGO-1-Fc 和 GST-LINGO-1 蛋白与小脑颗粒神经元的结合

固定后的颗粒神经元分别经 LINGO-1-Fc 和 GST-LINGO-1 融合蛋白孵育, 再以间接免疫荧光化学法染色, 观察到 2 种蛋白质的免疫反应物着色模式相近: 神经元胞膜上有较强的特异性着色, 部分细胞突起也有着色; 对照蛋白孵育后未见特异着色 (图 2). 2 种 LINGO-1 融合蛋白与培养的颗粒神经元孵育 30 min, 在活细胞结合实验条件下, 都

没有明显的免疫阳性反应物 (结果未显示).

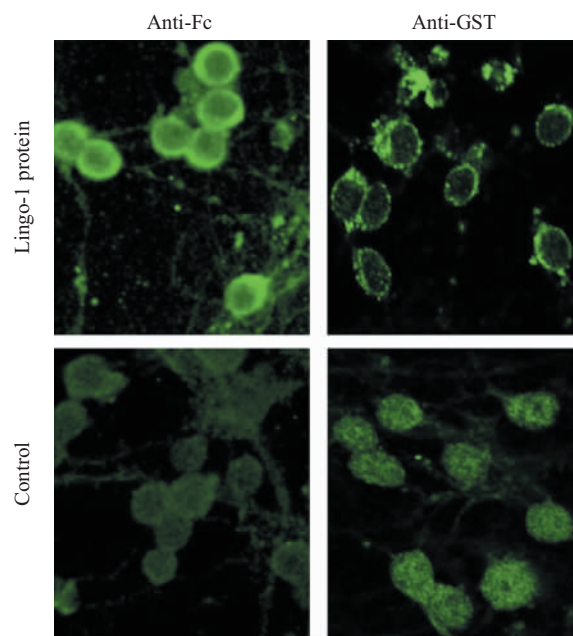


Fig. 2 LINGO-1 fusion protein binds to fixed CGN cultures

After incubation with LINGO-1-Fc or GST- LINGO-1, CGNs are subjected to indirect immunofluorescence assay using Fc or GST tag antibody. No specific binding of control protein to CGNs is observed under the same condition. (800×)

2.3 LINGO-1-Fc 对小脑颗粒神经元凋亡的保护作用

正常去极化培养条件下的小脑颗粒神经元自然凋亡率不到 20%, 低钾处理 8 h 凋亡细胞的比率占到 40% 左右 (图 3). 同正常细胞相比, 凋亡的细胞核发生显著固缩, Hoechst 染色呈现亮蓝色 (图 4).

在低钾诱导细胞凋亡同时加入蛋白质, 8 h 后 3 种浓度的 LINGO-1-Fc 和 Fc 蛋白均没有表现出凋亡保护作用, 凋亡率与诱导凋亡组没有统计学差异. 而蛋白质预处理 2 h 后, 低钾诱导细胞凋亡同时加入蛋白质, 8 h 后 LINGO-1-Fc 表现出浓度依赖的凋亡保护作用, 其中 10 mg/L 和 4 mg/L 的蛋白质保护作用较 1 mg/L 明显 (图 3a).

2.4 GST-LINGO-1 蛋白对颗粒神经元凋亡没有保护作用

在同 LINGO-1-Fc 相似的 2 种处理方法下, 100 mg/L、50 mg/L、10 mg/L 和 4 mg/L 4 种浓度的 GST- LINGO-1 和对照 GST 蛋白均没有表现出凋亡保护作用, 凋亡率与诱导凋亡组没有显著的统计学差异 (图 3b).

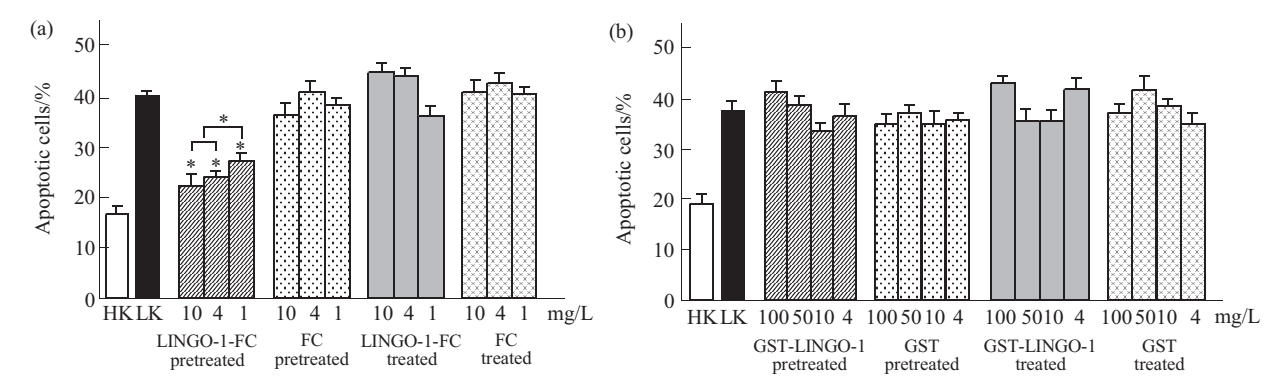


Fig. 3 Diagram analysis of apoptosis ratio of CGNs in different treatments

The percentage of fragmented nuclei was evaluated in each condition by counting cells in three randomly chosen fields with a 10×objective. Results are ($\bar{x} \pm s$) of counting of 3 independent experiments. * indicates a statistic difference with $P < 0.01$ compared to HK or LK where indicated. (a) Pretreatment with LINGO-1-Fc protein prevents apoptosis of CGNs, which is concentration dependent. (b) GST- LINGO-1 protein doesn't prevent the potassium withdraw induced apoptotic process of CGNs in whatever way.

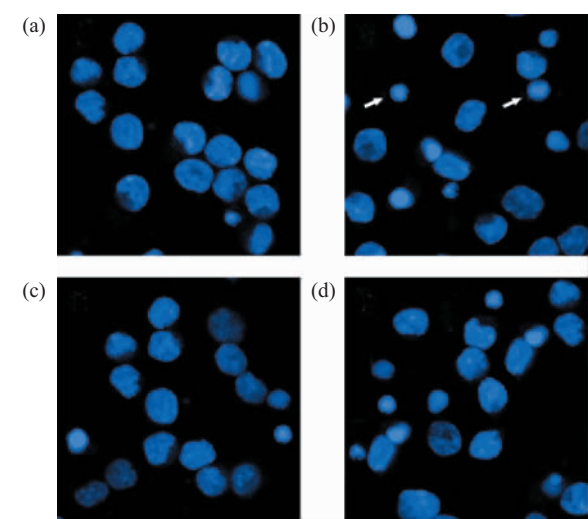


Fig. 4 Pretreatment with LINGO-1-Fc protein prevents low-potassium induced apoptosis of cerebellar granule neurons

CGNs cultured for 7 days *in vitro* were maintained for 8 h in HK (25mmol/L KCl) medium (a) or switched to LK (5 mmol/L KCl) medium (b). Apoptotic cells were monitored by chromatin condensation using Hoechst 33342. Neurons were pre-treated with LINGO-1-Fc or Fc protein for 2 h, and switched to LK medium in the presence of LINGO-1-Fc (c) or Fc protein (d) for another 8 h. (600×)

2.5 小脑颗粒神经元表达 LINGO-1 蛋白结合相关分子——NgR、p75^{NTR} 和 TROY

经冰甲醇固定的细胞，突起保存完好(图 5a)，NgR、p75^{NTR} 和 TROY 分子的免疫阳性物主要分布于细胞膜，部分细胞的突起也有着色(图 5)。

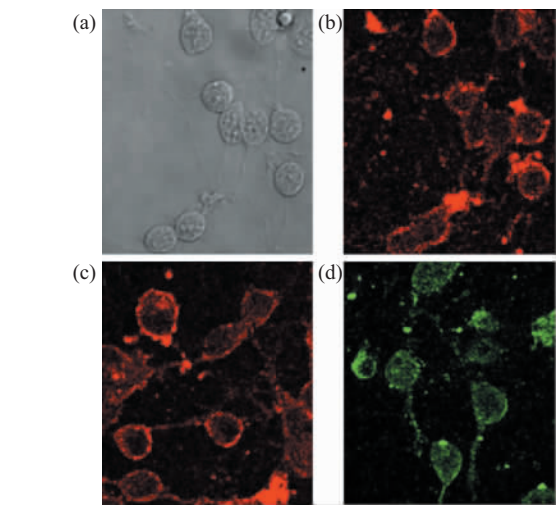


Fig. 5 Immunofluorescence assay of NgR, p75 and TROY in CGN cultures

(a) The DIC picture shows the neuronal processes fixed by cold methanol. NgR(b), p75(c) and TROY(d) expressed in CGN cultures were analysis by immunofluorescence assay, and the immunoreactive matter localizes mainly in the membrane and processes of CGNs.(800×)

3 讨 论

本实验中利用 Fc 和 GST 融合蛋白表达技术分别获得 LINGO-1-Fc 和 GST- LINGO-1 重组蛋白. 原核表达的 GST-LINGO-1 以包涵体和可溶两种形式存在 (结果未显示). 我们利用谷胱甘肽亲和层析柱纯化可溶表达的 GST-LINGO-1 部分，纯化的 GST-LINGO-1 蛋白除出现 70 ku 条带外，电泳可见高于对应 GST 处的条带可能是表达、纯化过程

中产生的部分降解蛋白质, 针对这种降解, 我们试图改变表达温度、纯化过程中添加蛋白酶抑制剂等条件, 都改观不大. 结合 NgR、Slit 等带有 LRR 结构域的蛋白质都难以以可溶形式表达的结果(未发表实验), 我们推测 GST-LINGO-1 蛋白可能很不稳定, 容易降解. 而正是它的易降解, 可能造成了它的可溶表达, 而目的蛋白氨基端融合的 GST 标签使得原核表达纯化中获得更多的 GST-LINGO-1 的截短体蛋白. 我们的剂量结合实验证明有降解的 GST-LINGO-1 蛋白仍然保持活性.

低钾诱导小脑颗粒神经元凋亡是一种常见的体外研究神经元凋亡的模型. 成熟颗粒神经元的存活依赖于培养液中的高钾环境: 细胞在高 KCl 刺激下会导致 Ca^{2+} 内流, 并活化 Ca^{2+} /钙调素依赖的蛋白激酶、蛋白激酶 B/Akt 和 RAS/MEK/MAPK 激酶级联反应, 通过转录调节或非转录依赖的方式促进颗粒细胞存活^[15~17]. 当培养液由高 KCl (通常是 25~30 mmol/L) 换为低 KCl (基本培养液中含 5 mmol/L KCl) 时, 细胞会逐渐发生凋亡. 我们的实验采用神经元专用培养液 Neurobasal-B27, 在这种培养条件下, 神经元的纯度达到 95% 以上, 且由 Neurobasal-B27-25mmol/L KCl 换为 Neurobasal-B27 培养时, 可以有效地诱导凋亡. 颗粒神经元胞核较大, Hoechst 标记核的方法便于观察凋亡情况下核形态的变化, 我们利用这种方法观察到与他人实验相似的凋亡率^[18], 说明实验系统是可靠的. 预实验中神经元经低钾处理 8 h, 凋亡率达到 40% 左右, 而随着诱导时间的延长, 部分死细胞开始脱落, 影响了计数结果的准确. 所以对于我们的研究方法, 选择 8 h 作为观察凋亡保护作用的时间点.

LINGO-1 分子属于 LRR 蛋白家族, 胞外段具有 LRR 结构域和 IgC2 结构域, 胞内段有一酪氨酸磷酸化位点, 利用这些结构特点构建缺失突变体是研究 LINGO-1 功能的有力工具. 我们使用的两种胞外段 LINGO-1 融合蛋白结构上区别主要在于是否具有 IgC2 结构域, 而固定条件下两种蛋白质对细胞都具有结合活性, 这提示 LINGO-1 分子与相关配基的结合(至少是对颗粒细胞表面的膜分子的结合)可能是 LRR 结构域依赖的. 但是在保护作用方面, 两种蛋白质却表现出不同的效应: LINGO-1-Fc 蛋白预处理细胞一定时间后可促进低钾诱导凋亡的颗粒神经元存活, 而 GST-LINGO-1 并没有明显的凋亡保护作用. 虽然从亲和力方面考虑原核表达蛋白的效应浓度会高于真核蛋白, 但当

加大了蛋白质量, 在 100 mg/L 的浓度下仍未见 GST-LINGO-1 的凋亡保护作用. 所以我们推测 LINGO-1-Fc 蛋白的保护作用很可能需要 Ig 结构域来协助完成. 具有配基结合活性的 LINGO-1-Fc 蛋白可能是作为 LINGO-1 的竞争性抑制分子, 抑制了表达于神经元的 LINGO-1 分子与其配基的相互结合, 而促进颗粒神经元存活的. 这种推测可以与我们在活细胞状态下做 LINGO-1 蛋白结合实验没有得到阳性结果而相互印证: 活细胞状态下, 可能是 LINGO-1 蛋白的结合位点被某些蛋白质分子占据或者受到空间构象影响而导致结合实验失败. 尽管我们将该方法已经成功应用于 Nogo-A, Nogo-66 及 NgR 等抗体的活细胞结合实验(未发表的实验).

几种 LINGO-1 相关的结合分子——NgR、p75^{NTR}、TROY 在小脑颗粒神经元中都有明确的表达^[2, 3, 6~8], 而作为同时具有 LRR 结构域和 IgC2 结构域的蛋白质, LINGO-1 又存在自身分子间相互结合、作用的可能. 我们观察到上述几种蛋白质在体外培养的颗粒神经元中表达主要分布在胞膜和部分细胞突起, 这与其膜受体功能相吻合, 而且与固定条件下两种 LINGO-1 蛋白与细胞的结合反应结果也是类似的. 虽然对于 LINGO-1-Fc 蛋白发挥保护作用的机制还不清楚, 但值得注意的是: 除了作为几种髓鞘抑制因子的受体, p75^{NTR} 还是多种营养因子的受体, 主要参与促进神经细胞的存活/凋亡、分化等过程^[9]; 另一方面, 肿瘤坏死因子受体 TROY 分子不但具有通过活化细胞内 JNK 途径而诱导非 Caspase 激酶依赖的细胞凋亡活性, 在过表达的情况下还可以活化 NF- κ B^[20, 21]. 或许神经元的 LINGO-1 分子是作为这些分子多种功能和信号调节之间的杠杆而发挥功能的. 除此之外, Rho GTP 酶对于颗粒神经元的存活也非常重要, 去极化培养条件下抑制 Rho GTP 酶的活性, 特别是 Rac/Cdc42 的活性, 会促进小脑颗粒神经元凋亡^[22]. 前面提到, LINGO-1-Fc 蛋白作用于小脑颗粒神经元可以抑制 Rho A 的活性, 而这三种 Rho GTP 酶之间存在复杂的相互调节关系, 那么经 LINGO-1-Fc 蛋白预处理很可能是通过改变细胞内 Rho GTP 酶活性状态而发挥凋亡保护作用的.

神经系统受到损伤后, 在一定时间内保持一定数量细胞的存活对于后来的再生修复显得非常重要. 从凋亡保护和拮抗髓鞘抑制分子活性两方面考虑, LINGO-1-Fc 蛋白在治疗中枢神经损伤方面很好的应用前景, 有望成为一种新的治疗中枢神

经损伤的候选药物。

参 考 文 献

- 1 He Z, Koprivica V. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci*, 2004, **27**: 341~368
- 2 Wang K C, Koprivica V, Kim J A, *et al.* Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 2002, **417** (6892): 941~944
- 3 Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, *et al.* Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 2002, **35** (2): 283~290
- 4 Liu B, Fournier A, Grandpre T, *et al.* Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*, 2002, **297** (5584): 1190~1193
- 5 Wang K C, Kim J A, Sivasankaran R, *et al.* p75 interacts with the Nogo receptor as a coreceptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 2002, **420** (6911): 74~78
- 6 Wong S, Henley J, Kanning K, *et al.* A p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, 2002, **5** (12): 1302~1308
- 7 Park J, Yiu G, Kaneko S, *et al.* A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*, 2005, **45** (3): 345~351
- 8 Shao Z, Browning J L, Lee X, *et al.* TAJ/TROY, an Orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*, 2005, **45** (3): 353~359
- 9 Mi S, Lee X, Shao Z, *et al.* LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 2004, **7**(3): 221~228
- 10 Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, *et al.* LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci*, 2003, **18** (12): 3167~3182
- 11 Mi S, Miller R H, Lee X. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*, 2005, **8** (6): 745~751
- 12 孙 芳, 金卫林, 赵湘辉, 等. 针对 Nogo-66 受体分子的不同抗体反应性比较. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, **21** (2): 193~195
- 13 金卫林, 廖柏松, 鞠 躬. 大鼠 Notch1 胞质段的克隆及其表达. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 362~366
- 14 Jin W L, Liao B S, Ju G. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(3): 362~366
- 15 Moreno-Flores M, Martin-Aparicio E, Martin-Bermejo M, *et al.* Semaphorin 3C preserves survival and induces neurogenesis of cerebellar granule neurons in culture. *J Neurochem*, 2003, **87**(4): 879~890
- 16 Bonni A, Brunet A, West A E, *et al.* Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription dependent and independent mechanisms. *Science*, 1999, **286** (5443): 1358~1362
- 17 Yano S, Tokumitsu H, Soderling T R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 1998, **396** (6711): 584~587
- 18 See V, Boutillier A L, Bito H, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *FASEB J*, 2001, **15** (1): 134~144
- 19 Courtney M, Åkerman K, Coffey E. Neurotrophins protect cultured cerebellar granule neurons against the early phase of cell death by a two-component mechanism. *J Neurosci*, 1997, **17** (11): 4201~4211
- 20 Chao M V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4** (4): 299~309
- 21 Kojima T, Morikawa Y, Copeland N G. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem*, 2000, **275** (27): 20742~20747
- 22 Eby M T, Jasmin A, Kumar A, *et al.* TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *J Biol Chem*, 2000, **275** (20): 15336~15342
- 23 Linseman D A, Laessig T, Meintzer M K, *et al.* An essential role for Rac/Cdc42 GTPases in cerebellar granule neuron survival. *J Biol Chem*, 2001, **276** (42): 39123~39131

LINGO-1-Fc Fusion Protein Prevents Apoptosis of Cerebellar Granule Neurons Induced by Low-potassium*

ZHAO Xiang-Hui¹⁾, JIN Wei-Lin^{2)**}, MI Sha³⁾, JU Gong^{1,2)**}

¹⁾Institute of Neuroscience, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

²⁾Institute of Neuroscience, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

³⁾Department of Discovery Biology, Biogen Idec, Inc., 14 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, USA)

Abstract Three myelin proteins, Nogo-A, MAG and OMgp, transduce their neurite-outgrowth inhibitory signal through a common receptor complex: NgR/ p75^{NTR} (or TROY). Recently, LINGO-1 is identified as another essential component and regulator for the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. LINGO-1 is restricted to

express in CNS, neuronal LINGO-1 is shown to be involved in the signal transduction from three myelin proteins, and Lingo-1 in oligodendrocyte negatively regulates the differentiation and myelination of oligodendrocyte. To investigate the potential activity of LINGO-1 in neuronal apoptosis, LINGO-1-Fc fusion protein including the extracellular LRR and IgC2 domain, was used as functional antagonist to study its protective effect on low-potassium induced apoptosis of cerebellar granule neurons (CGNs). In judgement of the apoptotic nuclei stained by Hoechst, LINGO-1-Fc pretreatment for 2 h significantly prevents apoptosis of CGNs. Although GST-LINGO-1 protein, including the LRR domain, binds to the CGN cultures in the same way with LINGO-1-Fc, it doesn't prevent the apoptosis of CGNs. These results indicate that LINGO-1-Fc fusion protein prevents low-potassium induced apoptosis of cerebellar granule neurons in certain conditions and this activity is probably IgC2 domain dependent.

Key words LINGO-1, cerebellar granule neurons, apoptosis, protective effect

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (NSFC)/Research Grants Council (RGC) Joint Research Scheme (30218003) and National Basic Research Program of China (2003CB515300).

**Co-corresponding author .

JU Gong, Tel: 86-29-84774557, Fax: 86-29-83246270, E-mail: jugong@fmmu.edu.cn

JIN Wei-Lin, Tel: 86-21-54749287, Fax: 86-21-54749270, E-mail: weilinjin@yahoo.com

Received: November 8, 2005 Accepted: December 28, 2005