

胶质细胞源性神经营养因子(Δ N39)-R9 神经营养活性和透过血脑屏障的研究*

崔敏¹⁾ 潘新²⁾ 王丽梅^{3)**}

(¹⁾山东大学医学院生理研究所, 济南 250012; (²⁾山东大学齐鲁医院骨外科, 济南 250012;

(³⁾中国海洋大学医学院海洋药物研究所, 青岛 266003)

摘要 为了研究胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)在中枢神经系统疾病中的治疗应用, 运用基因突变、蛋白质融合表达和蛋白质纯化技术获得分子质量较小的 GDNF(Δ N39)活性片段. 将 HIV-1 Tat 蛋白转导区 (protein transduction domain, PTD) 的 9 个碱性氨基酸⁴⁹RKKRRQRRR⁵⁷模拟物 9 个精氨酸(R9)与 GDNF(Δ N39)活性片段融合表达, 获得纯度达 95%以上的 GDNF(Δ N39)-R9 融合蛋白. 将 GDNF、GDNF(Δ N39)、GDNF(Δ N39)-R9 分别加入原代培养的中脑多巴胺能神经元和转染 GDNF 受体 GFR α 1 和 Ret 的 PC12 细胞中, 观察它们的神经营养活性和毒性. 运用脑微血管内皮细胞株 B-Endo 3, 观察 GDNF(Δ N39)-R9 蛋白穿越血管内皮细胞膜的功能; 运用脑血管内皮细胞和 Matrigel 铺板模拟血脑屏障, Transwell 法检测 Tat-GDNF(Δ N39)蛋白穿越脑血管内皮细胞和外周胶质膜的能力. 结果显示: GDNF(Δ N39)-R9 蛋白具有类似 GDNF 的神经营养活性, 促进原代培养的中脑多巴胺能神经元和稳定表达 GFR α 1 和 Ret 受体的 PC12-GFR α 1-Ret 细胞株的存活, 没有显示毒性, 并且能很好地穿过脑微血管内皮细胞层和模拟的血脑屏障.

关键词 胶质细胞源性神经营养因子(GDNF), 融合蛋白, 脑微血管内皮细胞(B-Endo 3), 蛋白质转运, 血脑屏障

学科分类号 Q73

胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)是目前发现的功能最强的促多巴胺能神经元和促运动神经元存活及损伤修复的神经营养因子, 极有希望用于帕金森病和脊髓侧索硬化症的神经退行性疾病的治疗^[1]. 但 GDNF 不能透过由毛细血管内皮细胞, 细胞间的紧密连接以及毛细血管基膜和外周胶质膜组成的血脑屏障^[2], 极大地限制了 GDNF 在临床治疗中的应用和功能发挥. 多年来, 神经科学家们已尝试了多种方法将 GDNF 导入中枢神经系统内以期治疗中枢神经损伤疾病, 如脊髓蛛网膜下腔埋管法、脑内微注射法、腺病毒或逆转录病毒载体基因移植法^[3]等, 但这些方法均没有从根本上解决 GDNF 在临床治疗应用中的难题. 脊髓蛛网膜下腔埋管法和脑内微注射法均对病人损伤大且操作不方便, 易引起蛛网膜下腔或脑内出血; 腺病毒或逆转录病毒载体基因移植法似乎是一个应用前景较好的方法, 它能持续不断地分泌神经营养因子, 但实验中发现, 它较易引起动物的免疫反应^[4].

人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)基因组编码的

核转录因子蛋白 Tat 由 86~102 个氨基酸残基组成, 包括 N 端激活区、半胱氨酸富集区、中心区和碱性氨基酸富集区 (49~57, RKKRRQRRR)^[5]. 大量实验证明, Tat 蛋白可介导多种大分子物质穿过细胞膜进入细胞内, 并可介导某些大分子蛋白质通过血脑屏障^[6]. 后来研究发现, Tat 蛋白介导大分子物质进入细胞内主要是靠碱性氨基酸区起作用, 所以, 碱性氨基酸区也被称为蛋白质转导域 (protein transduction domain, PTD). 有关 Tat-PTD 介导生物大分子进入细胞内并透过血脑屏障的研究逐渐成为神经科学家们研究的热点. 已有实验证明, Tat-PTD 可介导多种蛋白质进入细胞内或脑组织, 如 Cdk 抑制因子 p27Kip1、p16INK4a、Caspase 3 和 β -半乳糖肝转移酶等^[7]. 又有研究发现, 用 9 个精氨酸替代 Tat-PTD 可使转导活性增强 20 倍^[8].

*国家自然科学基金资助项目(30572171), 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2003CB716400).

** 通讯联系人.

Tel: 0531-88382561, E-mail: chromeffin@hotmail.com

收稿日期: 2006-05-08, 接受日期: 2006-06-22

众所周知, 分子质量越小越易透过血脑屏障, 所以在本实验中, 在保证 GDNF 生物活性的前提下, 我们表达去掉 N 端 39 个氨基酸残基中较小的活性片段 GDNF(ΔN39), 并将转导活性更高的 9 个精氨酸残基与其进行融合表达, 获得高纯度的 GDNF(ΔN39)-9R 融合蛋白. 在原代培养的中脑多巴胺神经元和脊髓运动神经元中, 观察 GDNF(ΔN39)-9R 的神经营养活性和毒性. 运用脑微血管内皮细胞株, 观察 GDNF(ΔN39)-R9 蛋白穿越血管内皮细胞膜的功能; 运用脑血管内皮细胞和 Matrigel 铺板模拟血脑屏障, Transwell 法检测 Tat-GDNF(ΔN39)蛋白穿越脑血管内皮细胞和外周胶质膜的能力. 结果显示, GDNF(ΔN39)-R9 蛋白具有类似 GDNF 的神经营养活性, 促进原代培养的脊髓运动神经元和 PC12-GFRα1-Ret 细胞株的存活和突起生长, 并且能很好地穿过脑微血管内皮细胞层和模拟的血脑屏障. 这些结果为下一步的动物实验和将来的临床应用奠定了良好的研究基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒、细胞和动物. 大肠杆菌 TG1、BL21, 表达质粒 pET28(a+), pET28(a+)-GDNF, 稳定转染 GFRα1 及 Ret 的细胞株 PC12-GFRα1-Ret 由第二军医大学神经生物学教研室惠赠; pET28(a+)-GDNF(ΔN39), pET28(a+)-GDNF(ΔN39)-R9 由山东大学医学院构建; 脑微血管内皮细胞 (B-Endo 3) 购自 ATCC 公司.

1.1.2 试剂. Pyrobest DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品, 质粒抽提、胶回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品, 异丙基 β-D- 硫代半乳糖苷酶 (IPTG)、Ni²⁺-NTA 蛋白纯化试剂盒为 Sigma 公司产品, DMEM, 胎牛血清等细胞培养液为 Gibco 公司产品; 胰蛋白酶溶液 Trypsin、HEPES 缓冲液为 Sigma 公司产品, Matrigel 和 Transwell 为 BD 公司产品; anti-hGDNF、IgG-FITC、anti-TH 抗体为 Santa Cruz 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 蛋白质表达、纯化和复性. 将 pET28(a+)-GDNF、pET28(a+)-GDNF(ΔN39)、pET28(a+)-GDNF(ΔN39)-R9 质粒分别转化入大肠杆菌 BL21 中, 接种单菌落至 3 ml LB 培养液, 37℃ 培养过夜, 按 2% 的比例转接于 LB 培养液中 (含 50 mg/L

的卡那霉素), 37℃ 培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 1.0$, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 诱导 3~5 h, 离心收集菌体, 行 SDS-PAGE, 分析 GDNF 表达情况, 薄层扫描检测其表达量. 诱导表达菌经超声破碎后, 收集包涵体, 用洗涤缓冲液 (1×结合缓冲液+2 mol/L 尿素) 洗涤. 500 ml 菌液制备的包涵体溶于 20 ml 溶解缓冲液 (1×结合缓冲液+6 mol/L 尿素 pH 9.8). 由于 GDNF 的 N 端融合了 6×His, 所以表达产物以 Ni²⁺-NTA 树脂来纯化. 溶解的蛋白质上预先以 3 倍柱体积 (CV) 溶解缓冲液平衡的 Ni²⁺-NTA 柱后, 先以 10 倍柱体积溶解缓冲液洗涤, 再分别以 10 倍柱体积的 NTA-pH 6.5 缓冲液 (1×结合缓冲液+6 mol/L 尿素 pH 6.50) 和 NTA-pH 5.80 缓冲液 (1×结合缓冲液+6 mol/L 尿素 pH 5.80) 洗脱杂蛋白. 直接在 Ni²⁺-NTA 柱上复性^[3], 先用 10 倍柱体积缓冲液 A (4 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 2 mmol/L GSH, pH 8.0) 和 10 倍柱体积缓冲液 B (2 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 2 mmol/L GSH, 0.2 mmol/L GSSG pH 8.0) 洗涤, 再用 10 倍柱体积缓冲液 C (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 2 mmol/L GSH, 0.5 mmol/L GSSG pH 8.0) 洗涤. 最后用洗脱缓冲液 (300 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0) 洗脱目的蛋白. 纯化的蛋白质经浓度测定后, -70℃ 保存.

1.2.2 重组蛋白生物功能检测.

a. 检测重组蛋白对原代培养中脑多巴胺能神经元的作用: 取昆明种小鼠胚胎 (E11~E14), 无菌解剖取出中脑, 剪成约 1 mm³ 的小块, 置于 0.125% 的胰酶中消化 30 min, 5% CO₂ - 95% 空气, 37℃. 然后用巴氏吸管将组织吸入装有 2 ml Trypsin 抑制剂 (100 mg/L, Sigma 公司) 的试管中, 终止胰酶的作用, 室温放置 10 min. 取出组织块移入 DMEM-10% FCS (胎牛血清 -10% 马血清) 培养液中轻轻漂洗 2 次, 然后再置入 2~3 ml 上述培养液中, 用火焰刨光的玻璃吸管轻柔冲打成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10⁵ 个/ml, 以 0.1 ml/孔种入预先涂有 poly-L-lysine (Sigma 公司) 的 96 孔培养板中, 调整细胞密度为 2×10⁵ 个/ml, 以 0.5 ml/孔种入预先涂有 poly-L-lysine 的 24 孔培养板中, 5% CO₂ - 95% 空气, 37℃ 培养 3 天后换为含 2% B27 的无血清培养基 (Gibco BRL), 以抑制神经胶质细胞生长及排除血清成分对神经元生长的影响, 同时实验组加入 GDNF 及其突变体, 对照组加入等量牛血清白蛋白 (BSA). 继续培养至第 14 天, 观察多巴

胺能神经元的形态, 并进行酪氨酸羟化酶 (TH) 免疫细胞化学染色. 并通过 FDA 染色法观察重组蛋白对原代培养中脑多巴胺能神经元存活的影响. 将 GDNF 组细胞存活率作为 100%, 其他组与 GDNF 组的比值即为存活率.

b. 检测重组蛋白对 PC12-GFR α 1-Ret 细胞突起生长的影响: 5×10^3 PC12-GFR α 1-Ret 细胞接种到已用 Poly-L-lysine 包被好的 24 孔板中, 加 2 ml 含 5% 胎牛血清和 5% 马血清 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37℃ 培养. 待细胞贴壁后, 加入 100 μ g/L GDNF 及 GDNF 各突变体. 7 天后通过计数 PC12-GFR α 1-Ret 细胞突起生长情况来判断分化程度, 突起长度至少大于细胞体直径的 2 倍作为分化的指标. 阴性对照组加入牛血清白蛋白至 100 μ g/L. 每次计数 10 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 至少重复 3 遍^[9].

1.2.3 免疫细胞荧光激光共聚焦显微镜检测. 脑血管内皮细胞 B-Endo3 不含有内源性的 GDNF 和 GFR α 受体, 而脑血管内皮细胞又是血脑屏障的组成成分之一, 我们首先用脑血管内皮细胞 B-Endo3 来检测 GDNF(Δ N39)-R9 是否能穿过细胞膜进入细胞中. 将 5×10^4 B-Endo3 细胞接种到 24 孔培养板中, 加 2 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37℃ 培养. 待细胞贴壁后, 加入 100 μ g/L GDNF, GDNF(Δ N39) 和 GDNF(Δ N39)-R9, 培养 2 h, 1×PBS 洗 3 遍, 4% 福尔马林室温固定 25 min 后, 再与 1% Triton X-100 共孵育 30 min. 1×PBS 轻轻洗 3 × 5 min. 加一抗 (anti-GDNF 1 : 100), 4℃ 静止过夜. 1 × PBS 洗 3 × 5 min, 加 FITC 标记的二抗 (1 : 100), 37℃ 孵育 40 min. 1 × PBS 洗 3 × 5 min, 激光共聚焦显微镜 (Zeiss, S100 microscope) 下观察并拍照.

1.2.4 蛋白质印迹检测. 将 2×10^5 B-Endo3 细胞接种到 4 孔培养板中, 加 8 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37℃ 培养. 待细胞贴壁达 90% 融合度时, 加入 100 μ g/L GDNF, GDNF(Δ N39) 和 GDNF(Δ N39)-R9 孵育 1 h, 1×PBS 洗 3 遍, 裂解细胞 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaF, 0.02% NaN₃, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L PMSF), 蛋白质定量后, 每孔加样 15 μ g 蛋白质, 15% SDS-PAGE, 转膜后封闭, 加一抗 (anti-GDNF 1 : 1 000), 4℃ 静止过夜. 1 × TBST 洗 3 × 5 min, 加 HRP 标记的二抗 (1 : 2500), 室温 1 h. TBST 洗 3 × 15 min, ECL 发光试剂孵育 30 s, 暗室中压片曝光.

1.2.5 Transwell 检测. 将在 4℃ 溶解的 Matrigel 用预冷的 pipettes 混均匀, 取 50 μ l 5 mg/L Matrigel 加入预冷的 Transwell 小室中, 37℃ 放置 30 min. 将 200 μ l B-Endo3 细胞 (2×10^5) 接种到铺有 Matrigel 的上室中, 下室加入 500 μ l 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37℃ 培养. 待细胞贴壁达 100% 融合度时, 加入 100 μ g/L GDNF、GDNF(Δ N39) 和 GDNF(Δ N39)-R9 孵育 24 h 后, 收集下室培养液, 用抗 -GDNF 的抗体做免疫共沉淀, 然后做蛋白质印迹, 检测 GDNF、GDNF(Δ N39) 和 GDNF(Δ N39)-R9 是否透过模拟的血管内皮和基底膜.

2 结 果

2.1 蛋白质的表达、纯化和复性

pET28(a+)-GDNF、pET28(a+)-GDNF(Δ N39)、pET28(a+)-GDNF(Δ N39)-R9 质粒分别转化入大肠

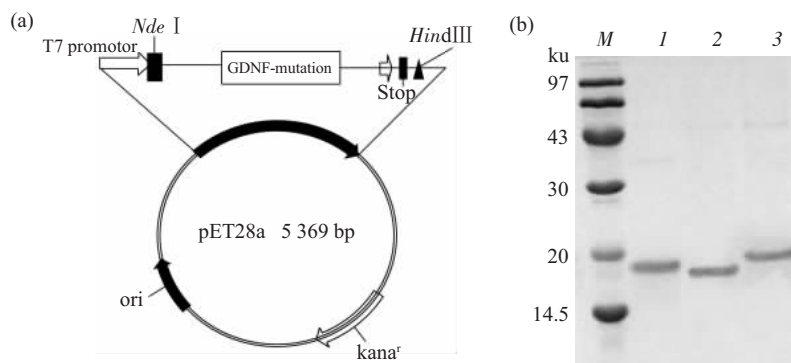


Fig. 1 Schematic representation of bacterial expression vector: pET28 (a+) -GDNF-mutants (a) and SDS-PAGE of purified GDNF and GDNF mutants (b)

M: Molecular mass marker, 1: GDNF(Δ N39)-R9, 2: GDNF(Δ N39), 3: GDNF.

杆菌 BL21 中, 经 IPTG 诱导后, 在分子质量 17 ku、15.6 ku 和 16 ku 处有明显的蛋白质表达条带, 大小与 GDNF 分子质量的理论计算值一致, 凝胶自动扫描分析表明, 表达产物占全菌总蛋白的 31.5%、30%和 32%. 表达菌经超声破碎后, 发现表达产物以包涵体形式存在. 包涵体经洗涤、溶解、纯化并复性后, 经 SDS-PAGE 分析, 在 17 ku、15.6 ku 和 16 ku 处除特异条带外, 基本无其他条带, 薄层扫描结果可见纯度达 95 % 以上 (图 1).

2.2 重组蛋白的生物功能

2.2.1 对原代培养中脑多巴胺能神经元的作用. 取胎鼠中脑多巴胺能神经元做原代培养, 在培养第 3 天换用含 2% B27 的无血清培养基, 以抑制神经胶质细胞的生长及排除血清成分对神经元生长的影响. 体外培养的多巴胺能神经元在培养 5~10 天要经历一个自然死亡的过程. 我们在培养第 14 天, 镜下观察多巴胺能神经元并进行 TH 免疫细胞化学染色, 发现对照组中多数神经元已萎缩、死亡. 而实验组 GDNF 100 μ g/L, GDNF(Δ N39) 100 μ g/L 和 GDNF(Δ N39)-R9 100 μ g/L 均能使多巴胺能神经元保留突起, 胞体饱满, 未出现核偏位、核萎缩等神经元衰老死亡迹象, 甚至在个别细胞轴突上还能见到生长锥, 表明细胞生长状态良好 (图 2). 说明表达的重组蛋白 GDNF、GDNF (Δ N39) 和 GDNF (Δ N39)-R9 均具有神经营养活性, 均能促进多巴胺能神经元的存活, 三者之间没有明显差异, 统计学相差不显著 ($P > 0.05$, 图 3).

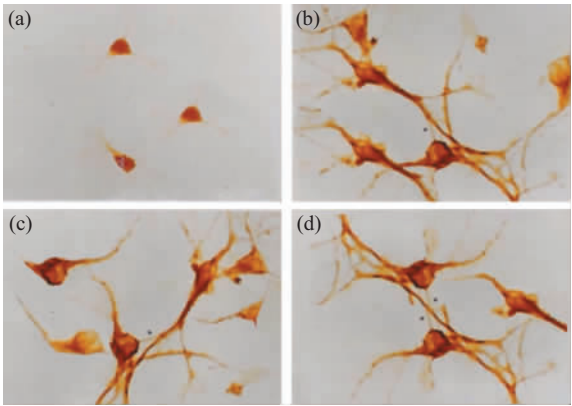


Fig. 2 Mesencephalic dopaminergic neurons from newborn rat after 14 days culture stained with TH immunohistochemistry ($\times 60$)
(a) Control(BSA); (b) GDNF (100 μ g/L); (c) GDNF(Δ N39) (100 μ g/L); (d) GDNF(Δ N39)-R9 (100 μ g/L).

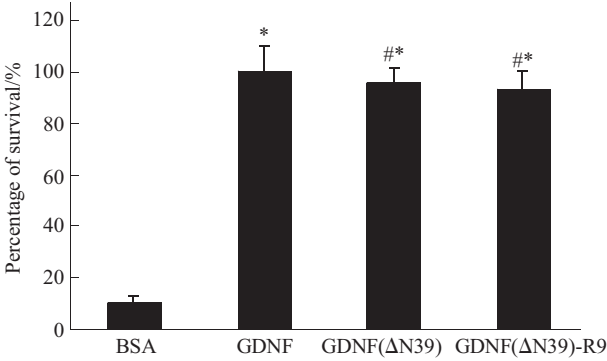


Fig. 3 The statistics of effects of GDNF and mutants on mesencephalic dopaminergic neurons survival
 $*P < 0.01$ vs BSA; $\#P > 0.05$ vs GDNF.

2.2.2 对 PC12-GFR α 1-Ret 细胞突起生长的影响. 将 5×10^3 双转染 GFR α 1 和 Ret cDNA 的 PC12-GFR α 1-Ret 细胞接种到已用 Poly-L-lysine 包被好的 24 孔板中, 加 2 ml 含 5%胎牛血清和 5%马血清的

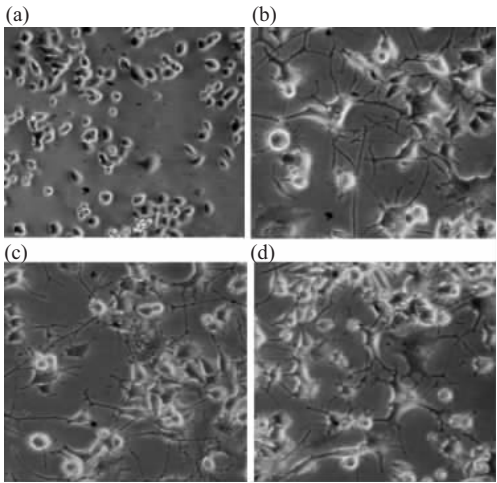


Fig. 4 Neurite outgrowth of PC12-GFR α 1-Ret cells
(a) Negative group (PBS); (b) GDNF (100 μ g/L); (c) GDNF(Δ N39) (100 μ g/L); (d) GDNF(Δ N39)-R9 (100 μ g/L).

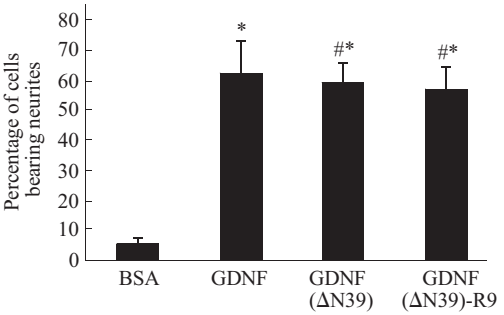


Fig. 5 The statistics of effects of GDNF and mutants on PC12-GFR α 1-Ret cells neurite outgrowth
 $*P < 0.01$ vs BSA; $\#P > 0.05$ vs GDNF.

DMEM培养基, 5% CO₂, 37℃培养. 待细胞贴壁后, 加入 100 μg/L GDNF、GDNF(ΔN39)和 GDNF(ΔN39)-R9, 对照组加入 BSA. 7 天后, GDNF, GDNF(ΔN39) 和 GDNF(ΔN39)-R9 均能促进 PC12-GFRα1-Ret 工程细胞明显的突起生长, 三者之间没有明显的差异, 表明重组蛋白 GDNF、GDNF(ΔN39)和 GDNF(ΔN39)-R9 均具有神经营养活性(图 4 和图 5).

2.2.3 GDNF(ΔN39)-R9 穿越细胞膜检测. 将 100 μg/L GDNF, GDNF(ΔN39)和 GDNF(ΔN39)-R9 与 B-Endo3 细胞共孵育 2 h, 用免疫细胞荧光染色

和蛋白质印迹两种方法检测 GDNF(ΔN39)-R9 是否穿越细胞膜. 结果显示: 与 GDNF(ΔN39)-R9 共孵育的细胞, 免疫荧光检测显示有明亮的绿色(图 6), 蛋白质印迹检测有明显的特异性条带, 且分子质量与原核表达的 GDNF(ΔN39)-R9 阳性对照一致(图 6). 而与 GDNF 和 GDNF(ΔN39)共孵育的细胞, 免疫细胞荧光检测没有荧光着色(图 6), 蛋白质印迹检测没有明显的特异性条带出现(图 7). 此结果表明: 融合 9 个精氨酸(R9)的重组蛋白 GDNF(ΔN39)-R9 可穿越细胞膜, 而 GDNF 和 GDNF(ΔN39)则不能.

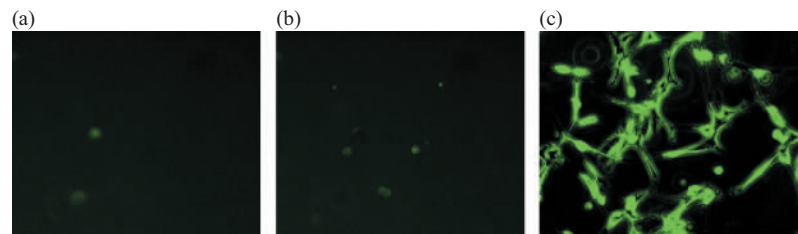


Fig. 6 Immunofluorescence cell staining of B-Endo3 cells for transmembrane assay

(a) B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF. (b) B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF(ΔN39). (c) GDNF B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF(ΔN39)-R9.

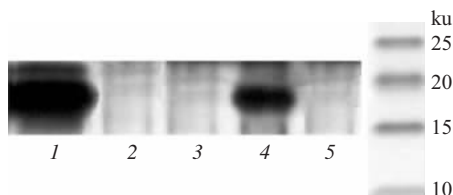


Fig. 7 Western blot analysis of GDNF and its mutant proteins in B-Endo3 cells

After incubating with GDNF and its mutant proteins, B-Endo3 cell lysates were analyzed by Western blot with anti-GDNF antibody. 1: GDNF(ΔN39)-R9 positive control (protein expressed in *E.coli*); 2: B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF; 3: B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF(ΔN39); 4: GDNF B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF(ΔN39)-R9; 5: Protein molecular mass marker.

2.2.4 Transwell 检测. 将 200 μl B-Endo3 细胞 (2×10⁵) 接种到铺有 Matrigel 的上室中, 下室加入 500 μl 10%胎牛血清的 DMEM 培养基. 待细胞贴壁达 100%融合度时, 加入 100 μg/L GDNF、GDNF(ΔN39)和 GDNF(ΔN39)-R9 孵育 24 h 后, 收集下室培养液, 用抗 -GDNF 的抗体做免疫共沉淀, 行蛋白质印迹检测. 结果显示: 与 GDNF(ΔN39)-R9 孵育后的下室培养液中有明显的特异条带, 且分子质

量与原核表达的 GDNF(ΔN39)-R9 阳性对照一致(图 8). 而与 GDNF 和 GDNF(ΔN39)共孵育的细胞, 下室培养液中没有明显的特异性条带(图 8). 融合 9 个精氨酸(R9)的重组蛋白 GDNF(ΔN39)-R9 可透过模拟的血管内皮和基底膜, 而 GDNF 和 GDNF(ΔN39)则不能.

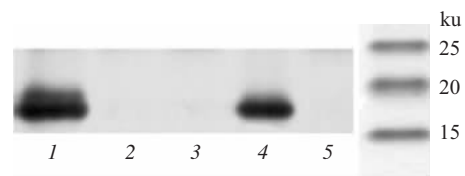


Fig. 8 Immunoprecipitation/Western blot analysis of GDNF and its mutant proteins across Matrigel model by transwell

1: GDNF(ΔN39)-R9 positive control (protein expressed in *E.coli*); 2: B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF; 3: B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF(ΔN39); 4: B-Endo3 incubated with 100 μg/L GDNF(ΔN39)-R9; 5: Protein molecular mass marker.

3 讨 论

随着科学技术的进步, 许多具有治疗潜能的神经营养因子引起神经科学家越来越多的关注. 不能透过血脑屏障到达其作用的靶组织极大地限制了它

们在临床中的应用, 因此, 许多科学工作者致力于如何使蛋白质透过血脑屏障的研究. 众所周知, 蛋白质穿越细胞膜不仅与分子质量大小有关, 还与其生化特性有关. 1988 年, Frankel 等^[10]发现, HIV-TAT 蛋白能够透过细胞膜; 1994 年, Fawell 等^[11]发现, 与 TAT 融合的异源蛋白也可通过细胞膜; 2003 年, Ülkan 等^[12]发现, 静脉注射与 TAT 全长融合的 GDNG TAT-GDNF 蛋白, 可明显保护大鼠缺血模型小鼠神经元损伤, 明显减少 caspase-3 免疫阳性和具有 DNA 断裂特点的细胞. 近年来, Schwarze 等^[13]发现, 腹腔注射与 TAT 蛋白穿膜区 (PTD) 融合分子质量为 120 ku 的 β -半乳糖水解酶, 可在许多组织包括脑组织中发现该酶的活性. TAT 蛋白的 PTD 区含有 9 个氨基酸残基 49~57(RKKRRQRRR), 几乎全部由碱性氨基酸组成, 带有大量正电荷. 后来, Choi 等专门研究了 HIV-TAT PTD 的穿膜能力, 做了一系列有关 PTD 缺失突变体与绿色荧光蛋白(GFP)的融合蛋白, 荧光显微镜下检测其穿膜能力^[14]. 结果发现, PTD 的 9 个氨基酸残基是维持其高效穿膜能力所必需的, 随着氨基酸残基的缺失, 其穿膜能力逐渐下降. Wender 等^[15]研究发现, 用 9 个精氨酸替代 Tat-PTD 可使转导活性增强 20 倍.

GDNF 是具有高效的促多巴胺能神经元和运动神经元存活的神经营养因子. 在急性脑缺血、缺氧的模型大鼠脑中, GDNF mRNA 明显升高. GDNF 可明显保护培养的中脑神经元和胶质细胞的氧化应激反应^[15], 可明显减少大鼠或小鼠大脑局部缺血缺氧所造成的神经元损伤, 并且明显改善巴金森氏病模型动物的临床症状^[16]. 近年来研究发现, GDNF 促进神经元存活可通过多种机制: 在凋亡诱导的大鼠中脑神经元中, GDNF 可明显上调抗凋亡因子 Bcl-2 和 Bcl-X_L 水平, 减弱 caspase 通路活性^[17]. GDNF 可显著上调谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性以保护神经元的氧化损伤^[18]. 坐骨神经损伤后, GDNF 促脊髓运动神经元存活的机制与 GDNF 调节凋亡蛋白 X-linked 抑制因子和神经元凋亡蛋白信号通路密切相关^[19]. 在脑缺血所致的脑损伤中, GDNF 还通过调节 Ret 受体酪氨酸激酶通路发挥神经元保护能^[20].

GDNF 具有多种神经元保护功能和重要临床应用潜能, 但 GDNF 不能透过血脑屏障, 极大地限制了它在临床中的应用. 在本实验中, 我们试图寻找具有高效穿膜能力而又无毒或低毒性的 GDNF-

融合蛋白. 根据分子质量与穿膜能力关系原理, 我们构建了缺失 N 端 39 个氨基酸残基的 GDNF 缩短蛋白; 为进一步提高融合蛋白的穿膜能力, 在 Wender 等研究的基础上, 在其 C 端融合 9 个精氨酸 (GDNF (ΔN39)-R9). 我们的实验结果证实: GDNF(ΔN39)-R9 融合蛋白具有和野生型 GDNF 同样的促多巴胺能神经元 (图 2 和图 3) 和促 PC12-GFR α 1-Ret 细胞突起生长的生物学功能 (图 4 和图 5), 并且没有明显的细胞毒性. 在此基础上, 我们用组成血脑屏障的成分之一脑血管内皮细胞和模拟血脑屏障的 Transwell 方法, 在两种水平上进一步研究 GDNF(ΔN39)-R9 融合蛋白的穿膜能力. 结果显示, GDNF(ΔN39)-R9 融合蛋白与对照相比, 可很好地穿过脑血管内皮细胞 B-Endo3 细胞膜进入细胞质中 (图 6 和图 7), 并且可从 Transwell 上室穿过模拟的血脑屏障进入下室中 (图 8).

在本实验中, 我们第一次构建了 GDNF(ΔN39)-R9 新型融合蛋白, 用中脑多巴胺能神经元原代培养和转染 GDNF 受体 GFR α 1 和 Ret 基因的 PC12 细胞株, 证明了其具有与野生型 GDNF 同样的神经营养活性. 并且用体外模拟血脑屏障的 Transwell 方法, 证明了其具有高效的穿过血脑屏障的能力. 具有高生物学活性和高穿透细胞膜能力的 GDNF (ΔN39)-R9 新型融合蛋白, 将为进一步的动物体内试验奠定良好的试验和物质基础.

参考文献

- Hayashi A K. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res*, 1997, **776** (1~2): 230~234
- Albeck D S, Hoffer B J, Quissell D, *et al.* A non-invasive transport system for GDNF across the blood-brain barrier. *Neuroreport*, 1997, **8** (9~10): 2293~2298
- Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, *et al.* Expression of Ret receptor tyrosine kinase after transient forebrain ischemia is modulated by glial cell line-derived neurotrophic factor in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 2002, **318** (1): 1~4
- Zhang W R, Hayashi T, Iwai M, *et al.* Time dependent amelioration against ischemic brain damage by glial cell line-derived neurotrophic factor after middle cerebral artery occlusion in rat. *Brain Res*, 2001, **903** (1~2): 253~256
- Vive's E, Brodin P, Lebleus B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997, **272** (25): 16010~16017
- Ho A, Schwarze R, Mermelstein S J, *et al.* Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and

- in vivo*. Cancer Res, 2001, **15**;61 (2): 474~477
- 7 Kilic E, Dietz G P H, Hermann D M, *et al.* Intravenous TAT-Bcl-XL is protective when delivered before middle cerebral artery occlusion in mice. Ann Neurol, 2002, **52** (5): 617~622
 - 8 Wender P A, Mitchell D J, Pattabiraman K, *et al.* The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97** (24): 13003~13008
 - 9 Wang L M, Zhang Q, Zhu W, *et al.* Identification of the key amino acids of GFR α 1 involved in its biological function. J Biol Chem, 2004, **279** (1): 109~116
 - 10 Frankel A D, Pabo C O. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. Cell, 1988, **55** (6): 1189~1193
 - 11 Fawell S, Seery J, Daikh Y, *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (2): 664~668
 - 12 Ülkan K, Ertugrul K, Gunnar P H D, *et al.* Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. Stroke, 2003, **34** (5): 1304~1310
 - 13 Schwarze S R, Ho A, Vocero-Akbani B A, *et al.* *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science, 1999, **285** (5433): 1569~1572
 - 14 Park J, Ryu J, Kim K A, *et al.* Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. J Gen Virol, 2002, **83** (Pt5): 1173~1181
 - 15 Ikeda T, Xia X Y, Xia Y X, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia/hypoxia-induced brain injury in neonatal rat. Acta Neuropathol, 2000, **100** (2): 161~167
 - 16 Kordower J H, Emborg M E, Bloch J, *et al.* Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. Science, 2000, **290** (5492): 767~773
 - 17 Sawada H, Ibi M, Kihara T, *et al.* Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. J Neurochem, 2000, **74** (3): 1175~1184
 - 18 Chao C C, Lee E H. Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation. Neuropharmacology, 1999, **38** (6): 913~916
 - 19 Perrelet D, Ferri A, Liston P, *et al.* IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons *in vivo*. Nat Cell Biol, 2002, **4** (2): 175~179
 - 20 Naughton C K, Jain S, Strickland A M, *et al.* Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. Biol Reprod, 2006, **74** (2): 314~321

Analysis of GDNF (Δ N39) -R9 Fusion Protein Delivery Across The Cellular Membrane, Blood Brain Barrier and Biological Function*

Cui Min¹⁾, Pan Xin²⁾, Wan Li-Mei^{3)**}

¹⁾Institute of Physiology, Medical Schoole of Shandong University, Jinan 250012, China;

²⁾Department of Surgery, Shandong-Qilu Hospital, Jinan 250014, China;

³⁾Department of Pharmacology, Marine Drug and Food Institute, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract In order to study the application of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in clinic, gene mutation, fusion protein expression in *E.coli* and purification methods have been used to obtain the fragments of GDNF, GDNF(Δ N39), GDNF(Δ N39)-R9. Using primary cultured dopaminergic neurons and PC12 cells with transfected with GFR α 1 and Ret to observe their biological function and cytotoxicity. Using B-Endo3 cells and Transwell method to analyze their delivery across the cellular membrane and blood brain barrier. The results show that GDNF(Δ N39)-R9 has the same neurotrophic function with wild GDNF and nearly no cytotoxicity to dopaminergic neurons and PC12-GFR α 1-Ret cells and can get through effectually the cellular membrane and simulacrum of blood brain barrier with matrigel and B-Endo3.

Key words GDNF, fusion protein, B-Endo 3 cells, protein delivery, blood brain barrier

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30572171) and National Basic Research Programm of China (2003CB716400).

**Corresponding author . Tel: 86-531-88382561, E-mail: chromeffin@hotmail.com

Received: May 8, 2006 Accepted: June 22, 2006