

含蛋白质转导域的 Ngb 融合蛋白的原核表达、 纯化及其生物学活性的初步研究*

周国钰¹⁾ 周盛年²⁾ 楼之茵¹⁾ 朱灿胜¹⁾ 胡学强^{1)**}

(¹⁾中山大学附属第三医院神经病学科, 广州 510630; ²⁾山东大学齐鲁医院神经内科, 济南 250012)

摘要 以 SD 大鼠脑组织 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术, 将 HIV-1 反式激活蛋白(TAT)中具有蛋白质转导功能的 9 个氨基酸序列, 即蛋白质转导域(PTD)基因与脑红蛋白(Ngb)基因融合, 应用 T-A 克隆技术将融合基因与 pMD19-T simple 载体连接, 经测序正确后克隆至表达载体 pET28b 中, 转化感受态 *E.coli* BL21 (DE3) plysS, 得到的转化子经 IPTG 诱导后获得可溶性表达, 并经蛋白质印迹检测进一步鉴定. 表达产物经 Ni²⁺ 亲和纯化层析、脱盐后在原代培养的大鼠皮质神经元进行生物学活性检测, 结果显示, TAT PTD-Ngb 融合蛋白可以转运入皮质神经元内, 在 48 h 内可检测到其存在, 并能提高缺氧条件下皮质神经元存活率、减少缺氧诱导的皮质神经元的凋亡. 这一结果为进一步研究 TAT PTD-Ngb 的神经保护机制提供了线索, 并可能为神经系统疾病尤其是脑血管疾病、神经系统退行性疾病提供一个新的治疗策略.

关键词 蛋白质转导, 脑红蛋白, 蛋白质治疗

学科分类号 Q816

Burmester 等^[1]于 2000 年首次报道, 在脊椎动物中枢神经系统内广泛存在一种神经系统特异性的携氧球蛋白, 即脑红蛋白(neuroglobin, Ngb). 目前研究推测, Ngb 的功能可能是促进氧向神经元中的线粒体扩散, 或直接介导氧向线粒体的传递^[2], 有助于 ATP 的产生, 从而对正常神经细胞功能的维持起重要作用. 对 Ngb 保护神经元的机制进行深入研究, 将有可能对多种原因导致的缺氧缺血性和神经系统退行性疾病带来全新的治疗方案. 然而如何有效地增加神经元内这种具有保护性作用的蛋白质含量, 将直接关系到其研究价值和应用前景. 蛋白质转导域(protein transduction domain, PTD)是新近发现的一种能高效穿过生物膜的结构域, 并且大量研究证明, 人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)编码的反式激活蛋白(transactivator of transcription, TAT)的蛋白质转导结构域可以快速有效地将与之相连的肽段或蛋白质直接跨膜转运进入各种细胞及组织, 转导效率很高而且对细胞没有损伤^[3,4], 重要的是, PTD 介导的蛋白质甚至可以直接通过血脑屏障进入神经元^[5], 因此该技术对于治疗神经系统疾病具有重要意义. 本实验首次利用 RT-PCR 方法, 将 HIV-1

TAT 中具有高效蛋白质转导功能的 9 个氨基酸 PTD 序列, 即 RKKRRQRRR 融合入 Ngb 5' 端, 构建含有 TAT PTD-Ngb 融合基因的原核表达载体, 诱导表达、鉴定、纯化了 TAT PTD-Ngb 融合蛋白, 并初步研究了其对大鼠皮质神经元的跨膜转导功能及其在对缺氧条件下对皮质神经元的保护和抗凋亡作用, 为进一步研究 Ngb 的功能并将其应用于脑血管病等神经系统疾病的治疗奠定基础, 提供新的思路和治疗方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株. T7 RNA 聚合酶调控的表达质粒 pET28b 及表达 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌 BL21 (DE3) plysS 购自 Novagen 公司; pMD19-T simple 载体购自大连宝生物工程公司; 大肠杆菌 DH5 α 由中山大学药理学教研室胡骏博士赠送.

*广东省教育厅 211 工程专项基金资助项目(4209601).

** 通讯联系人. Tel: 13609007501, Fax: 020-87516822,

E-mail: huxueqiangqm@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-13, 接受日期: 2007-01-22

1.1.2 试剂. Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 合成 cDNA 第一链的逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司; Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶购于大连宝生物工程公司; X-gal、IPTG 购于 AMRESCO 公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收纯化试剂盒及 Ni-NTA 蛋白亲和纯化琼脂购于 QIAGEN 公司; 蛋白质脱盐用 PD-10 column 购自 Amersham 公司; His-Tag 单克隆抗体购于 Cell Signal Technology 公司, HRP 羊抗小鼠二抗购于武汉博士德生物技术有限公司; Ngb 羊多克隆抗体、MAP-2 兔多克隆抗体、FITC 羊抗小鼠二抗、FITC 羊抗兔二抗、驴抗羊二抗购于 SANTA CRUZ 公司; MTT 购自 Sigma 公司; ECL 试剂购自 PIERCE 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素均为 Sigma 公司分装; 细胞培养用 Neurobasal 培养基、B27 等购自 Gibco 公司. 其余常规试剂均为进口或国产分析纯.

1.1.3 PCR 引物. 引物均由上海生工生物技术有限公司合成. 根据 GenBank 中大鼠 Ngb 和 TAT-PTD 基因序列进行引物设计. 融合蛋白 TAT PTD-Ngb 的引物在 Ngb 成熟肽基因序列的 5' 端融合了含有 9 个氨基酸序列基因的 PTD 序列, 即上游引物 P1, 5' CATATGAGGAAGAAGCGGAGACAGC-GACGAAGAGCTAGCATGGAGCGCCTAGAGTC-AGAGCT 3' (含 *Nde* I、*Nhe* I 酶切位点); 下游引物 P2, 5' GAGCTCTACTCCCCGTCCAGCCTCG 3' (含 *Sac* I 酶切位点), 扩增产物片段约 500 bp. 设立的对照 Ngb 基因上游引物 P3, 5' GCTA-GCATGGAGCGCCTAGAGTCAGAGCT 3' (含 *Nhe* I 酶切位点), 下游引物与 TAT PTD-Ngb 下游引物相同, 扩增产物片段约 467 bp.

1.1.4 实验动物. SD 大鼠由中山大学实验动物中心提供.

1.2 融合蛋白基因的克隆

1.2.1 RT-PCR 扩增目的基因. 提取 SD 大鼠脑组织总 RNA, 按逆转录试剂盒说明合成 cDNA 第一条链, 以逆转录产物为模板, 以 P1、P2 扩增 TAT PTD-Ngb 融合基因, P2、P3 扩增 Ngb 基因. 反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s、68℃ 40s、72℃ 1min, 循环 30 次, 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳分析, 并对目标条带切胶回收.

1.2.2 PCR 产物的克隆与测序. PCR 产物经胶回收纯化后与 pMD19-T simple 载体用 T4 DNA 连接酶

16℃ 连接 2 h, 转化 DH5 α 感受态, 涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上, 菌落经蓝白斑筛选, 抽提质粒分别用 *Nde* I/*Sac* I 或 *Nhe* I/*Sac* I 限制性内切酶双酶切鉴定, 选取含目标大小片段的单克隆菌落送上海英骏生物技术有限公司测序.

1.2.3 表达质粒的构建. 用 *Nde* I/*Sac* I 或 *Nhe* I/*Sac* I 限制性内切酶从测序正确的 TA 克隆载体上切下 TAT PTD-Ngb 或 Ngb 基因片段并胶回收, 与同样酶切的含 His-tag 的 pET28b 表达载体 16℃ 连接反应 2 h, 构建表达质粒 pET-PTD-Ngb (简称 pET-PN) 与 pET-Ngb, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上, 挑选菌落、质粒抽提, 经酶切鉴定筛选阳性单克隆并送上海英骏生物技术有限公司测序.

1.3 融合蛋白的表达、纯化与鉴定

1.3.1 蛋白质的可溶性表达、纯化及脱盐. 经测序正确的 pET-PN 与 pET-Ngb 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) *plysS* 感受态, 形成稳定表达菌株, 在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上划单菌落, 挑取单菌落接种于 5 ml LB 培养液中 (含卡那霉素 50 mg/L, 氯霉素 34 mg/L), 37℃ 200 r/min 振摇过夜. 次日按 1:100 的比例接种至 10 ml 上述 LB 培养液中, 37℃ 200 r/min 振摇, 培养约 2~3 h, A 值至 0.6 左右, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 200 r/min 诱导表达 8 h, 离心收集细菌沉淀, 用含 10 mmol/L 咪唑的溶解缓冲液重悬, 超声破碎后离心收集上清, 加入 Ni-NTA 亲和琼脂, 之后分别用含 20 mmol/L, 250 mmol/L 咪唑的缓冲液纯化表达的蛋白质. 纯化的蛋白质经 PD-10 脱盐柱进行脱盐, 溶于含 10% 甘油的 Neurobasal 培养基中, -80℃ 保存备用.

1.3.2 蛋白质印迹分析. 纯化的蛋白质经 SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕把蛋白质转印在硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 抗 His-tag 单克隆抗体或抗 Ngb 多克隆抗体 4℃ 过夜孵育, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 试剂曝光显影定影分析.

1.4 TAT PTD-Ngb 跨膜转导活性检测及其对缺氧条件下皮质神经元的保护

1.4.1 原代皮质神经元的培养与缺氧损伤模型的制备. 取孕 18 天 SD 胎鼠, 无菌条件下分离皮质, 经胰酶消化分散后, 细胞沉淀用含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的解剖液洗涤后离心去上清, 加入含 2% B27 的 Neurobasal 培养基内, 以 0.5×10⁶/ml 的密度种植在

用多聚赖氨酸包被好的 35 mm 培养皿(2 ml/皿)及 96 孔板(150 μ l/孔)中,置于含 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养,每 3~4 天半量换液一次.神经元培养至第 7 天,用神经元特异性标记 MAP-2 进行鉴定,MAP-2 阳性率 >95% 的细胞样本用于实验.为诱导缺氧导致的神经元损伤,将接受过各处理因素的神经元置于一密闭容器中,从进气口通入含 95% N₂、5% CO₂ 的混合气体,约 15 min,测氧仪在出气口处测氧浓度低于 1% 后,则夹闭进气口与出气口,容器置于 37℃ 的培养箱中,培养 24 h 后,将细胞从密闭容器中取出,在上述含 5% CO₂ 37℃ 的培养箱中继续培养 24 h.

1.4.2 TAT PTD 介导的 Ngf 蛋白跨膜转导及其检测. 培养的皮质神经元用 Neurobasal 培养基全量换液,培养基内加入不同终浓度 TAT PTD-Ngf 及 Ngf 融合蛋白(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μ mol/L),37℃ 培养箱内孵育 2 h,吸去培养基, PBS 洗涤,收集、裂解细胞,细胞裂解液进行蛋白质印迹分析,用抗融合蛋白上的 6xHis-tag 单克隆抗体检测进入细胞内的融合蛋白,以纯化的融合蛋白做为阳性对照.同时,为观察进入细胞内 TAT PTD-Ngf,将培养的皮质神经元培养基中加入终浓度 2.0 μ mol/L 的 TAT PTD-Ngf,对照组加入相同终浓度的 Ngf 蛋白,37℃ 培养箱内孵育 2 h,吸去培养基, PBS 迅速洗涤 2 次,4% 多聚甲醛冰上固定 30 min,冷 PBS 洗涤 3 次,正常山羊血清室温封闭 30 min,抗 His-tag 单克隆抗体 4℃ 过夜,冷 PBS 洗涤 3 次, FITC 标记的二抗室温孵育 0.5 h, PBS 洗涤后,抗荧光淬灭剂封片后,荧光显微镜下观察.

1.4.3 TAT PTD-Ngf 细胞内稳定性测定. 培养的皮质神经元如上述步骤加入 2.0 μ mol/L TAT PTD-Ngf,37℃ 培养箱内孵育 2 h 后将培养基吸出,加入新鲜培养基,分别在 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 吸出培养基,冷 PBS 洗涤,收集、裂解细胞,细胞裂解液进行蛋白质印迹分析,用抗融合蛋白上的 6xHis-tag 单克隆抗体检测细胞内的融合蛋白含量,以纯化的融合蛋白作为阳性对照.

1.4.4 缺氧损伤皮质神经元存活率的测定. MTT 法进行细胞存活率测定.神经元分为 10 组,即正常对照组、空白对照组、不同浓度 TAT PTD-Ngf 蛋白及 Ngf 蛋白预处理组(终浓度 0.1、0.5、1.0、2.0 μ mol/L),每组设 6 个平行样,37℃ 培养箱内孵育 2 h,并进行缺氧、复氧后,加入

15 μ l/孔的 5 g/L MTT 磷酸盐缓冲液,继续培养 4 h 后吸出培养基,加入 150 μ l/孔的 100% 二甲基亚砜,轻轻振荡 10 min,待孔内蓝色颗粒完全溶解后,在酶联免疫检测仪上测定光吸收值(波长 490 nm).皮质神经元存活率按以下方法计算:

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{A_{\text{蛋白处理组或空白对照组}}}{A_{\text{正常对照组}}} \times 100\%$$

1.4.5 TAT PTD-Ngf 对缺氧诱导的皮质神经元凋亡的影响. 将培养的皮质神经元加入终浓度 2.0 μ mol/L 的 TAT PTD-Ngf 及 Ngf 蛋白,37℃ 培养箱内孵育 2 h,按上述方法缺氧、复氧后,吸尽培养基,4℃ PBS 洗涤 1 次,加入 4% 多聚甲醛,4℃ 固定 20 min,双蒸水洗 2 次,4℃ 自然晾干后加入 5 mg/L Hoechst33258 染色 10 min,双蒸水洗 2 次,室温晾干后荧光显微镜下观察.

2 结 果

2.1 目的基因的 RT-PCR 扩增产物

从 SD 大鼠脑组织中提取脑组织总 RNA,逆转录后 PCR 扩增,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,得到与预期大小一致的 DNA 片段(500 bp 与 455 bp),经 TA 克隆并测序完全正确(图 1,箭头所示).

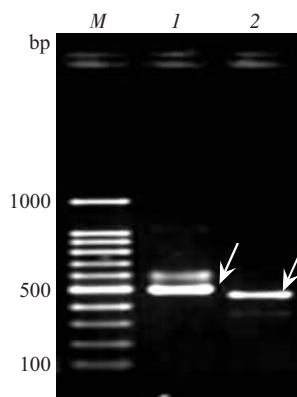


Fig. 1 Analysis of RT-PCR products by agarose gel electrophoresis

M: 100 bp molecular marker; 1: RT-PCR product of TAT PTD-Ngf fused gene (directed by arrow); 2: RT-PCR product of Ngf (directed by arrow).

2.2 重组表达质粒的酶切鉴定

重组表达质粒经 *Nde* I/*Sac* I 或 *Nhe* I/*Sac* I 双酶切后电泳,显示切出与目的基因大小一致的 DNA 片段(图 2),表明克隆载体含有 TAT PTD-Ngf 基因与 Ngf 基因序列.

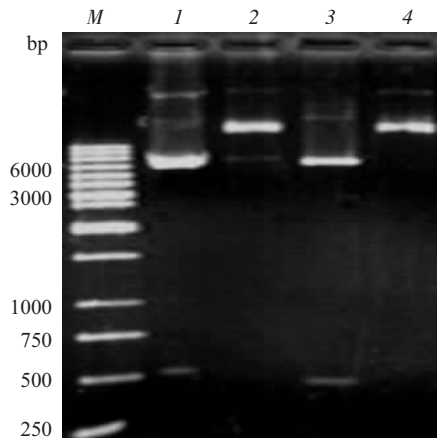


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids pET-PN and pE-Ngb digested by restriction enzymes

M: 1 kb molecular marker; *1*: Recombinant plasmid pET-PN digested by *Nde* I/*Sac* I; *2*: Plasmid pET-PN; *3*: Recombinant plasmid pET-Ngb digested by *Nhe* I/*Sac* I; *4*: Plasmid pET-Ngb.

2.3 融合蛋白的表达与纯化

pET-PN BL21 (DE3)plysS 与 pET-Ngb BL21 (DE3) plysS 重组菌经 IPTG (0.4 mmol/L) 诱导 8 h 后, 表达上清经 SDS-PAGE 分析, 有目标分子质量的新蛋白质条带产生. 表达的 TAT PTD-Ngb (大小约 20.7 ku) 和 Ngb (大小约 19.4 ku) 融合蛋白表观分子质量均与理论值相近. TAT PTD-Ngb 与 Ngb 分别进行 Ni-NTA 树脂亲和纯化, 并行 SDS-PAGE 分析, 凝胶经灰度扫描分析显示, 纯度均在 95% 以上(图 3). 其中每升 *E. coli* 表达液, 可获得 7.7 mg 纯化的 TAT PDT-Ngb, 纯度大于 95%.

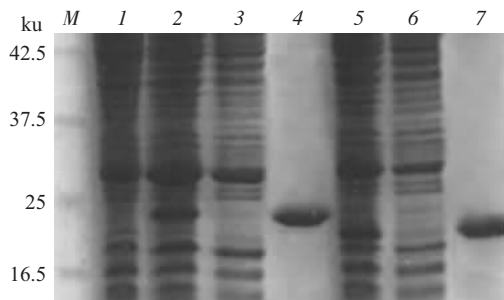


Fig. 3 15% SDS-PAGE analysis of expressed and purified soluble fusion protein

Expression and purification of TAT PTD-Ngb and Ngb in *E. coli* with 0.4 mmol/L IPTG induced 8 h was analyzed by 15% SDS-PAGE gel. *1*: supernatant of bacteria containing expression vector pET28b; *2*: TAT PTD-Ngb; *3*: Flowthrough of TAT PTD-Ngb; *5*: Ngb; *6*: Ngb by Ni^{2+} affinity chromatography; *4, 7*: TAT PTD-Ngb and Ngb.

2.4 蛋白质印迹鉴定

为进一步验证所表达的融合蛋白, 将纯化蛋白质分别用抗 His-tag 单克隆抗体(图 4a)和抗 Ngb 抗

体(图 4b)进行蛋白质印迹鉴定, 结果显示, 融合蛋白分别在 20 ku 上下各显示单一条带, 与预计的目的蛋白分子质量相符.

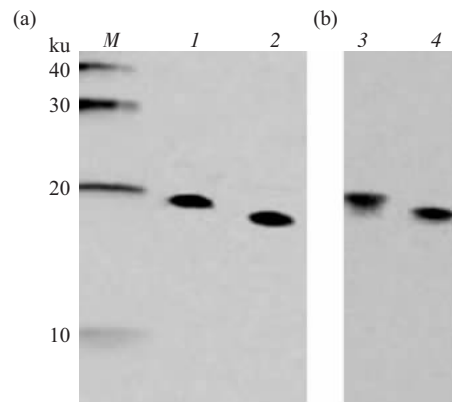


Fig. 4 Identification of purified fusion protein by Western blot with monoclonal anti-his-tag antibody (a) or polyclonal anti-neuroglobin antibody (b)

1: TAT PTD-Ngb; *2*: Ngb; *3*: TAT PTD-Ngb; *4*: Ngb.

2.5 TAT PTD-Ngb 跨膜转导的观察

不同终浓度 TAT PTD-Ngb 融合蛋白及 Ngb 蛋白加入原代培养皮质神经元(MAP-2 鉴定阳性率达 95% 以上, 图 5)培养基内, 蛋白质印迹结果显示,

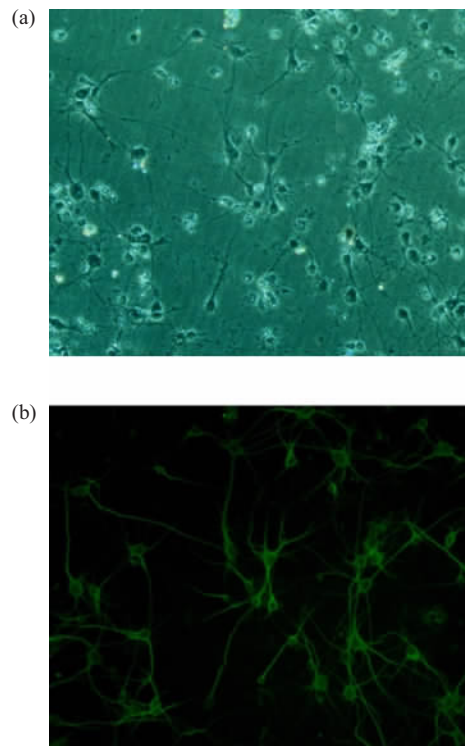


Fig. 5 Identification of primary cultured cortical neurons by MAP-2

(a) Phase contrast image. (b) Immunofluorescent image of MAP-2. (100 \times)

细胞内检测到 TAT PTD-Ngb 融合蛋白, 并且细胞内融合蛋白含量随给予蛋白质浓度的增高而增高(图 6), 但细胞内未检测到 Ngb 蛋白(结果未列出). 同时, 细胞免疫荧光观察发现, 加入 2.0 $\mu\text{mol/L}$ TAT PTD-Ngb 融合蛋白(图 7a)的实验组皮质神经元出现绿色荧光, 而加入 2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ngb (图 7c)的对照组神经元无荧光出现, 结果说明, TAT PTD-Ngb 融合蛋白转导进入原代培养的皮质神经元内.

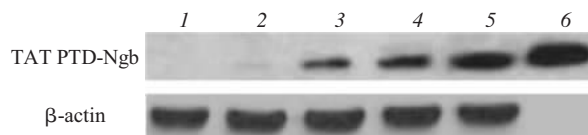


Fig. 6 Dose-dependent transduction of TAT PTD-Ngb into primary cortical neurons

2.0 $\mu\text{mol/L}$ TAT PTD-Ngb was added to the culture media for 2 h. Transduced TAT PTD-Ngb into the neurons was analyzed by Western blot. 1,2,3,4,5: 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$; 6: Control.

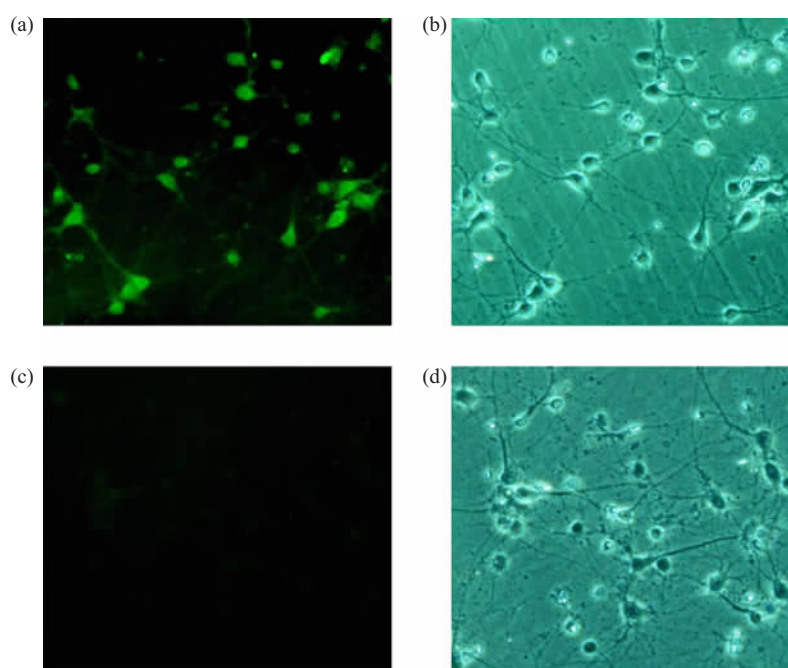


Fig. 7 Transduction of TAT PTD-Ngb into primary cultured cortical neurons

The immunofluorescent activity (using the anti-his-tag antibody) is not detectable in Ngb pre-treated neurons (c) but is visible in neurons after treated with TAT PTD-Ngb for 2 h (a). (b) and (d) are the corresponding phase contrast images of (a) and (c). (200 \times)

2.6 TAT PTD-Ngb 细胞内稳定性

蛋白质印迹分析显示, 细胞内 TAT PTD-Ngb 含量随时间的延长逐渐减少, 灰度扫描显示, 24 h 后细胞内 TAT PTD-Ngb 水平约占最初细胞内 TAT PTD-Ngb 水平的 53%, 48 h 下降为约 6%, 72 h 时融合蛋白在细胞内几乎未检测到(图 8).

2.7 TAT PTD-Ngb 对缺氧损伤皮质神经元的保护

缺氧复氧后, MTT 结果分析显示, TAT PTD-Ngb 蛋白处理组较空白对照组皮质神经元存活率升高, 差异具有显著性, 且随给予 TAT PTD-Ngb 蛋白浓度的增高而升高, 而 Ngb 蛋白组存活率与空白对照组无显著差异(图 9). 说明转导入

神经元内的 TAT PTD-Ngb 融合蛋白对缺氧损伤的皮质神经元具有保护作用, 并具有浓度依赖性.

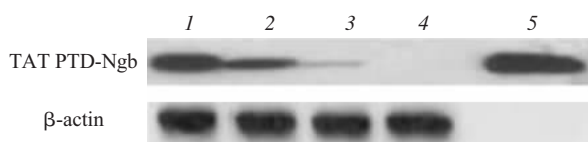


Fig. 8 Stability of transduced TAT PTD-Ngb in cultured cortical neurons

Neurons pretreated with 2 $\mu\text{mol/L}$ TAT PTD-Ngb fusion protein were incubated for various times and fusion protein was identified by Western blot. 1,2,3,4: 0, 24, 48, 72 h; 5: Control.

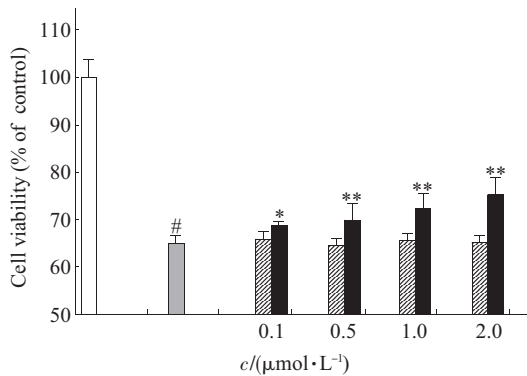


Fig. 9 Protective effect of TAT PTD-Ngb or Ngb on cortical neurons after exposure to hypoxia for 24 h

Cell viability, measured by MTT absorbance, in cultured cortical neurons maintained for 24 h without oxygen under no treatment or after pre-treated with 0.1~2.0 $\mu\text{mol/L}$ TAT PTD-Ngb or Ngb for 2 h, respectively ($n=6$). Each bar represents the $\bar{x}\pm s$, obtained from five experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ respectively, relative to no treatment by t test. #, $P<0.05$ relative to normal control by t test. □: Normal control; ■: No treatment; ▨: Ngb; ■: TAT PTD-Ngb

2.8 TAT PTD-Ngb 降低缺氧诱导的皮质神经元的凋亡

Hoechst 33258 染色显示: 空白对照组(图 10a)及 Ngb 蛋白预处理组(图 10c)皮质神经元核明显凝聚、固缩、变小、碎裂(箭头所示), 呈现凋亡的表现, 光镜下显示细胞突起断裂, 细胞缩小(图 10d, 图 10e); 与之相比, TAT PTD-Ngb 预处理组(图 10c)皮质神经元凋亡明显减少, 细胞突起存在, 细胞形态保留(图 10f). 说明 TAT PTD-Ngb 对缺氧诱导的皮质神经元的凋亡有保护作用.

3 讨 论

Ngb 是新近发现的一种在脊椎动物神经系统和少数内分泌腺体中大量特异性表达的携氧球蛋白, 与肌红蛋白 (myoglobin, Mb) 和血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 在氨基酸上有约 20% 同源性^[9]. 同 Mb 和 Hb 一样, Ngb 与 O_2 有很高的亲和力, 这

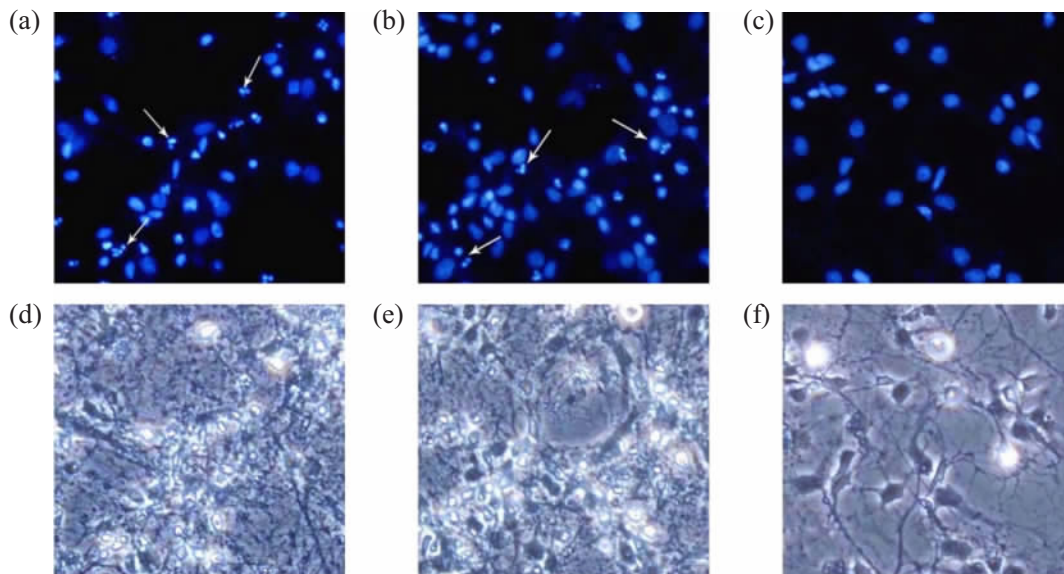


Fig. 10 TAT PTD-Ngb protects against apoptosis induced by hypoxia

In this hypoxic model, untreated control neurons (a) and neurons pretreated with Ngb (b) display small, condensed damaged nuclei reflecting apoptosis. Neurons pretreated with TAT PTD-Ngb (c) display ellipsoid, smoothly and regularly limited morphology of neuronal nuclei. (d), (e) and (f) are the corresponding phase contrast images of (a), (b) and (c). (200 \times)

提示 Ngb 可能对 O_2 的储存, 转运和感应有重要的作用^[1,7-9]. 目前虽然对 Ngb 的基因克隆、晶体结构、携氧动力学热力学特征都有了详细的研究, 但对其功能的研究刚刚起步. 研究显示, 缺氧能够诱导 Ngb 表达, 并可在急性缺血缺氧的情况下迅速地释氧, 从而提高神经细胞的存活率和功能的发挥; 降低 Ngb 表达则会增加组织和细胞的缺氧损伤程

度^[10]. 因此推测, Ngb 可能作为一个神经保护因子而起作用, 可作为内源神经保护因子成为治疗缺血缺氧性脑损伤的研究目标. 然而, 脑红蛋白是怎样保护神经元免受缺氧性损伤的, 即脑红蛋白的作用机制如何? 这一问题却一直未得到回答. 目前对 Ngb 功能推测认为, 首先, Ngb 的组织分布及亚细胞定位表明, Ngb 在对氧大量需求的神经系统中广泛表

达可能与 Ngb 的携氧及氧转运等功能密切相关^[11], 另一方面, Ngb 可能涉及信号转导或与 NO 或 CO 及其形成复合物的毒性相关^[8,12]. 应用表面等离子共振技术和酵母双杂交技术, 有学者观察到, Ngb 作为鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂^[13], 可能通过与神经膜蛋白, 包括 Na⁺, K⁺-ATP 酶^[14]和 flotillin-1^[15], 以及通过与 G 蛋白, 朊蛋白 C 相互作用从而实现对神经元的保护. 最新的研究发现, Ngb 在体内可能通过增加 eNOS 的表达来实现其脑保护作用^[16]. 因此, Ngb 能否以及如何用于神经系统疾病十分值得探讨.

近年的研究证明, HIV-1 TAT 具有独特的跨膜转运方式, 可以引导多种多肽和蛋白质进入目标细胞, 不受细胞类型的限制^[17], 其中具有转导作用的最小序列是富含碱性氨基酸, 具有较多正电荷的多肽片段(TAT 序列中从 49 至 57 的 9 个氨基酸残基) RRRKRQRRR, 即 PTD, 它与 TAT₄₇₋₅₇ 11 个氨基酸的 PTD 序列具有相似的蛋白质转导效率^[18]. TAT PTD 具有广谱的蛋白质转导作用, 转导速度快、效率高, 而且它所引导的蛋白质可以具有很大的分子质量, 能将相对分子质量超过 1 000 ku 的蛋白质转运到大部分哺乳动物细胞内, 而且大的粒子转运入细胞不影响细胞活力和蛋白质活性与功能^[19]. 其介导的细胞内转运过程存在多种机制, 与所携带的分子大小密切相关, 当 TAT 连接的是大分子或颗粒性物质时, 遵循的是一种能量依赖的内吞途径, 随后从释放进入胞浆, 而单独的 TAT 来源的多肽或仅连接有小分子进入细胞则是通过与细胞表面发生静电作用或氢键连接而完成入胞, 此过程为非能量依赖^[20,21]. 与将蛋白质引入细胞的传统方法如蛋白质微注射、穿孔蛋白及脂质体法等相比, Tat PTD 介导的蛋白质转导有着显著的优越性.

本实验以 pET28b 为载体, 首次将 HIV TAT 中具有蛋白质转导功能的最小片段 TAT₄₉₋₅₇ 通过 RT-PCR 的方法融合入 Ngb 的 5' 端, 成功构建了融合蛋白 TAT PTD-Ngb 的原核表达质粒并诱导了蛋白质的表达, 进一步减小了蛋白质转导域对所引导蛋白质的影响. 我们利用 pET28b 上的 6×His-tag 纯化出高纯度的可溶性的 TAT PTD-Ngb 融合蛋白, 纯化后的蛋白质经蛋白质印迹检测, 与特异性抗体具有良好的特异性反应. 我们将一定浓度的经纯化的 TAT PTD-Ngb 融合蛋白与原代培养的皮质神经元共同孵育 2 h 后, 检测到细胞内存在融合蛋白, 且其细胞内含量随加入培养基内融合蛋白终浓

度的增高而升高, 并且融合蛋白在进入神经元后 48 h 内仍能够观察到其存在, 这表明通过 TAT PTD 的介导, Ngb 穿过细胞膜进入细胞内, TAT PTD-Ngb 融合蛋白具有跨膜转导活性并具有一定的稳定性. 同时, 在缺氧情况下, TAT PTD-Ngb 融合蛋白预处理能明显增加缺氧损伤的原代培养皮质神经元的存活率. 在我们观察的有效剂量范围内, 2.0 μmol/L 的 TAT PTD-Ngb 对皮质神经元进行预处理后, 发现 TAT PTD-Ngb 与对照组相比能显著减少缺氧诱导神经元核的固缩、凝聚、碎裂等凋亡的改变, 推测 Ngb 可能是通过减少缺氧导致神经元的凋亡来实现对神经元的保护, 但具体的保护途径和机制有待进一步验证, 并有待于在活体内进行研究.

本实验可溶性 TAT PTD-Ngb 融合蛋白的表达、纯化及其生物学活性和功能的初步研究, 为进一步探讨 Ngb 的神经保护机制奠定了基础, 并且为 Ngb 应用于脑血管疾病及其他神经系统疾病创造了可能性, 为蛋白质转导技术作为一种新颖的分子治疗措施应用于临床提供了实验依据.

参 考 文 献

- 1 Burmester T, Weich B, Reinhardt S, *et al.* Avertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, **407** (6803): 520~523
- 2 Couture M, Burmester T, Hankeln T, *et al.* The heme environment to mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket. *J Biol Chem*, 2001, **276** (39): 36377~36382
- 3 Schwarze S R, Ho A, Vocero-Akbam A, *et al.* *In vivo* protein transduction: Delivery of abiologically active proteinin- to the mouse. *Science*, 1999, **285** (5433): 1569~1572
- 4 Schwarze S R, Dowdy S F. *In vivo* protein transduction: Intracellular delivery of biologically active protein, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, **21** (2): 45~48
- 5 Asoh S, Ohsawa I, Mori T, *et al.* Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (26): 17107~17112
- 6 Dewilde S, Blaxter M, Van Hauwaert M L, *et al.* Globin and globin gene structure of the nerve myoglobin of *Aphrodite aculeate*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (33): 19865~19870
- 7 Couture M, Burmester T, Hankeln T, *et al.* The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket. *J Biol Chem*, 2001, **276** (39): 36377~36382
- 8 Dewilde S, Kiger L, Burmester T, *et al.* Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem*, 2001, **276** (42): 38949~38955
- 9 Trent J T 3rd, Watts R A, Hargrove M S. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem*, 2001, **276** (32): 30106~30110

- 10 Sun Y, Jin K, Mao X O, *et al.* Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (26): 15306~15311
- 11 Schmidt M, Giessel A, Laufs T, *et al.* How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*, 2003, **278** (3): 1932~1935
- 12 Van Doorslaer S, Dewilde S, Kiger L, *et al.* Nitric oxide binding properties of neuroglobin. A characterization by EPR and flash photolysis. *J Biol Chem*, 2003, **278** (7): 4919~4925
- 13 Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*, 2003, **278** (38): 36505~36512
- 14 Xu W L, Wang C L, Liao Z Y, *et al.* Identification of interaction and interaction domains between neuroglobin and Na(+), K(+)-ATPase beta2 subunit. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2003, **35** (9): 823~828
- 15 Wakasugi K, Nakano T, Kitatsuji C, *et al.* Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318** (2): 453~460
- 16 Khan A A, Wang Y M, Sun Y J, *et al.* Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (47): 17944~17948
- 17 Fawell S, Seery J, Daikn Y, *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **9** (2): 664~668
- 18 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** (Pt 5): 1173~1181
- 19 Dodd C H, Hsu H C, Chu W J, *et al.* Normal T-cell response and *in vivo* magnetic resonance imaging of T-cells loaded with HIV transactivator - peptide -derived superparamagnetic nanoparticles. *J Immunol Methods*, 2001, **256** (1~2): 89~105
- 20 Rothbard J B, Jessop T C, Lewis R S, *et al.* Role of membrane potential and hydrogen binding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am Chem Soc*, 2004, **126** (31): 9506~9507
- 21 Shen H, Mai J C, Qiu L, *et al.* Evaluation of peptide-mediated transduction in human CD34⁺ cell. *Hum Gene Ther*, 2004, **15**(4): 415~419

Prokaryotic Expression, Purification of Ngb Fusion Protein Containing Protein Transduction Domain and Its Biologic Activity*

ZHOU Guo-Yu¹⁾, ZHOU Sheng-Nian²⁾, LOU Zhi-Yin¹⁾, ZHU Can-Sheng¹⁾, HU Xue-Qiang^{1)**},

¹⁾Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China;

²⁾Department of Neurology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract The fused gene (TAT PTD-Ngb) which included nine amino acid transactivator of transcription (TAT) protein transduction domain (RKKRRQRRR) of HIV-1 and neuroglobin gene was amplified by RT-PCR from rat brain RNA and cloned into the expression plasmid pET28b. The recombinant plasmid pET-PN was transformed into the *E.coli*. BL21(DE3)plysS, which was induced with IPTG (0.4 mmol/L) to express TAT PTD-Ngb fusion protein. Ni-NTA resin was used to purify the product, which was identified by SDS-PAGE and Western blot subsequently. After being purified and desalted, the biological activity of TAT PTD-Ngb was detected in primary cultured cortical neurons. The results showed that TAT PTD-Ngb could transduced into cortical neurons, increase cell viability under hypoxia and attenuate apoptosis induced by hypoxia. The present study provides a clue for the research of neuroglobin and seems to provide a protein therapy strategy for CNS diseases, especially in cerebrovascular diseases and neurodegenerative diseases.

Key words protein transduction, neuroglobin, protein therapy

*This work was supported by a grant from The Special Funds for 211 Project of Guangdong Department of Education (4209601).

** Corresponding author. Tel: 13609007501, Fax: 020-87516822, E-mail: huxueqiangqm@yahoo.com.cn.

Received: December 13, 2006 Accepted: January 22, 2007