

胶质细胞源性神经营养因子受体 $\alpha 1$ 基因的克隆表达及其活性研究*

王丽梅¹⁾ 陈哲宇^{1)**} 朱伟¹⁾ 张磬²⁾ 黄爱军¹⁾ 路长林¹⁾ 何成¹⁾

(¹⁾第二军医大学神经生物学教研室, 上海 200433; ²⁾中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 为了获得重组胶质细胞源性神经营养因子受体 $\alpha 1$ (glial cell line-derived neurotrophic factor receptor $\alpha 1$, GFR $\alpha 1$) 并研究其生物学活性, 从新生 4 天的 SD 大鼠海马组织中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 方法, 扩增出 GFR $\alpha 1$ cDNA. 将 GFR $\alpha 1$ cDNA 克隆至含 T7 启动子的质粒 pET-28a (+) 中, 构建表达质粒 pET-GFR $\alpha 1$, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得表达菌株 BLGFR $\alpha 1$. 表达菌株经 1 mmol/L IPTG 诱导 3~5 h 后, GFR $\alpha 1$ 蛋白表达, 并形成包涵体. 凝胶自动扫描分析表明, GFR $\alpha 1$ 表达量占全菌总蛋白的 21.5%, 用 Ni²⁺-NTA 树脂纯化和复性后, 纯度达 90% 以上, 复性的重组 GFR $\alpha 1$ 蛋白可显著介导 GDNF 促 PC12 细胞的存活和分化作用.

关键词 胶质细胞源性神经营养因子受体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$), RT-PCR, 基因表达, PC12 细胞

学科分类号 Q73

胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 对多巴胺能神经元和运动神经元有强效促存活和损伤保护作用, 极有希望用于帕金森病和脊髓侧索硬化症等神经退行性疾病的治疗^[1]. GDNF 的神经营养作用主要是通过两类受体亚基介导, 即胶质细胞源性神经营养因子受体 α (GFR α) 亚基和 RET (rearranged during transfection) 亚基, 且这三种分子在细胞膜上可以形成三聚体复合物^[2,3]. GFR $\alpha 1$ 受体与 GDNF 有高亲和力^[4], 目前认为 GDNF 是通过膜表面的 GFR $\alpha 1$ 受体介导与 RET 蛋白结合, 引起 RET 二聚化及酪氨酸残基位点发生自磷酸化, 而后进一步激活 MAPK、PI3K、PLC γ 等信号途径^[5], 从而激活信息在胞内的传导. 结构分析表明 GFR $\alpha 1$ 含 464 个氨基酸残基, N 端有长约 24 个氨基酸残基的分泌信号肽, C 端有长约 20~23 个氨基酸残基的疏水区. GFR $\alpha 1$ 靠其 C 端的三个小氨基酸残基 (Ala, Ser 和 Ser) 形成的糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 结合位点锚定于细胞膜外表面^[2]. 但 GDNF、GFR $\alpha 1$ 和 RET 三者相互作用的分子机制仍不明确^[6]. 阐明 GFR $\alpha 1$ 分子中与 GDNF 相互作用的结构域, 不仅可以深入认识 GDNF 神经营养作用的分子机制, 也为设计具有神经营养作用的小分子多肽提供靶标. 获得重组 GFR $\alpha 1$ 是开展 GFR $\alpha 1$ 结构和功能研究的前提和基础, 本实验的目的是获得有活性的重组 GFR $\alpha 1$ 蛋白.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和细胞: 大肠杆菌 TG1、BL21

(DE3)、pBluescriptSK (+) 质粒、表达质粒 pET-28a (+)、PC12 细胞均由本实验室保存.

1.1.2 试剂: RNA 抽提试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品. RT-PCR 试剂盒为 Qiagen 公司产品. 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 Viogene 公司产品, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷酶 (IPTG)、荧光素乙酰乙酸盐 (FDA) 为 Calbiochem 公司产品, Ni²⁺-NTA 柱为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR

总 RNA 的提取: 取新生 4 d 的 SD 大鼠海马组织约 150 mg, 参考 RNA 抽提试剂盒手册提取总 RNA. cDNA 的合成: 参考 RT-PCR 试剂盒实验手册进行. PCR 扩增: 引物设计参考 GenBank (AJ002072) 发表的序列及表达载体 pET-28a (+) 多克隆位点, 应用 DNASTAR 软件设计, 由上海生工公司合成.

上游引物: 5' gccatagttcctagccactctgtacttcgcg 3';
Nde I

下游引物: 5' gggaattcctacgacgtttctgccaacgatac 3'.
EcoR I

* 国家自然科学基金 (30000048), 上海市青年科技启明星计划 (01QB14001), 国家教育部优秀青年教师资助计划及国家重点基础研究“973” (1999054005) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-25070294-8701, E-mail: chengzyk@online.sh.cn

收稿日期: 2002-03-19, 接受日期: 2002-04-30

取逆转录产物 2.0 μl 为模板, 按常规 PCR 反应条件, 先将样品于 94℃ 变性 5 min, 加入 2.5 U Pyrobest DNA 聚合酶, 按下列参数循环 35 次: 94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 最后一个循环后, 72℃ 延伸 10 min.

1.2.2 cDNA 序列测定及表达载体的构建

将 RT-PCR 产物与 pBSK (+) 质粒连接, 转化大肠杆菌 TG1, 抽提质粒, 酶切鉴定并测序后, 用 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切, 胶回收后与先经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切的表达载体 pET-28a (+) 相连接, 构建 T7 启动子控制下的 pET-GFRα1 表达质粒 (图 1).

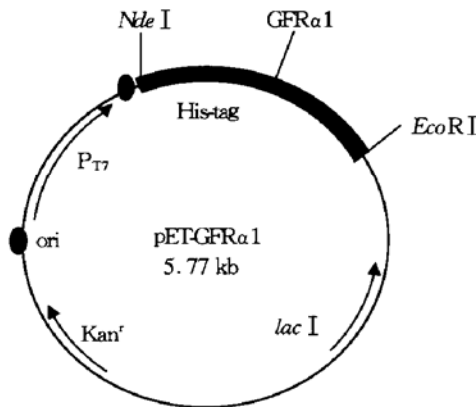


Fig. 1 Schematic representation of the pET-GFRα1 expression vector

The GFRα1 gene was ligated into pET-28a (+) expression vector utilizing *Nde* I and *Eco*R I restriction site.

1.2.3 GFRα1 的表达、纯化和复性

将 pET28α-GFRα1 表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 接种单菌落至 3 ml LB 培养液, 37℃ 培养过夜, 2% 转接于 LB 培养液中 (含 50 mg/L 卡那霉素), 37℃ 培养至 0.6 < *A*₆₀₀ < 1.0, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 诱导 3~5 h, 离心收集菌体, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 薄层扫描检测 GFRα1 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 (2 mol/L 尿素, 10% 甘油, 1% Triton X-100, 0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L 巯基乙醇, pH 8.20) 洗涤. 500 ml 菌液制备的包涵体溶于 20 ml 溶解缓冲液 (6 mol/L 尿素, 10% 甘油, 1% Triton X-100, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 11.20). 由于 GFRα1 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 (3CV) 结合缓冲液平衡的 Ni²⁺-NTA 柱后, 先以

10 CV 结合缓冲液洗涤, 再分别以 10 CV 的 NTA-pH 6.5 缓冲液 (6 mol/L 尿素, 10% 甘油, 1% TritonX-100, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 6.50) 和 NTA-pH 5.80 缓冲液 (6 mol/L 尿素, 10% 甘油, 1% TritonX-100, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 5.80) 洗脱杂蛋白. 直接在 Ni²⁺-NTA 柱上复性^[7], 先用 10 CV 的复性缓冲液 A (6 mol/L 尿素, 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 8.0) 洗涤, 再用 15 CV 的复性缓冲液 B (1 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 8.0) 洗涤, 最后用洗脱缓冲液 (500 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0) 洗脱目的蛋白. 纯化的 GFRα1 经蛋白质浓度测定后, -70℃ 保存.

1.2.4 重组 GFRα1 的活性测定

利用 GFRα1 能介导 GDNF 促 PC12 细胞的存活和分化来检测其活性^[5]. PC12 细胞培养在事先用 poly-L-lysine 包被好的细胞培养瓶中, 培养基为 DMEM 含 5% 胎牛血清和 5% 马血清, 37℃, 5% CO₂ 培养, 每周更换培养基 2 次.

细胞分化检测^[5]: 5 × 10³ PC12 细胞接种到已用 poly-L-lysine 包被好的 24 孔板中, 每孔加完全培养基 2 ml, 待细胞贴壁后, 加入 50 μg/L GDNF^[8] 及不同浓度的 GFRα1, 7 d 后通过计数 PC12 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 2 倍作为分化的指标. 将只加 50 μg/L GDNF 组作为对照. 每次计数 10 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 至少重复 3 遍.

细胞存活检测^[5]: 5 × 10³ PC12 细胞接种到已用 poly-L-lysine 包被好的 24 孔板中, 每孔加完全培养基 2 ml, 待细胞贴壁后, 吸去完全培养基, 每孔加无血清培养基 2 ml, 并加入 GDNF 50 μg/L 及不同浓度的 GFRα1, 培养 48 h 后, 重悬细胞, 加入 10 μg/L FDA 染色^[9], 5 min 后在计数板上计数活细胞. 活细胞在荧光显微镜下成明亮的绿色. 将只加 50 μg/L GDNF 组作为对照. 每孔计数 3 次, 将对照组细胞存活率作为 100%, 将处理组和对照组比值作为处理组细胞存活率.

2 结 果

2.1 GFRα1 cDNA 的获得

SD 大鼠海马组织总 RNA, 经甲醛变性电泳, 紫外检测仪下可见完好的 28 S, 18 S rRNA, 表明

提取的总 RNA 无降解. RT-PCR 扩增得到大小约 1.4 kb 的特异条带, 与 GFR α 1 分子质量的理论计算值一致 (图 2). 酶切鉴定及测序后, 表明扩增的 GFR α 1 cDNA 与文献报道序列一致.

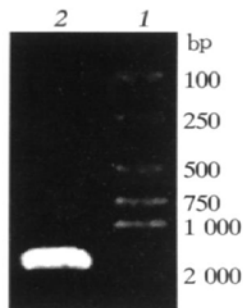


Fig. 2 Analysis of PCR product by 1% agarose gel electrophoresis

1: DNA marker; 2: amplified rat GFR α 1 cDNA.

2.2 GFR α 1 的诱导表达、纯化及复性

由图 3 可看出: 经 IPTG 诱导后, 在分子质量 51 ku 处有明显的蛋白质表达条带, 大小与 GFR α 1 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 21.5%. 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 51 ku 处除 GFR α 1 特异条带外, 基本无其他条带, 薄层扫描结果可见纯度达 90% 以上.

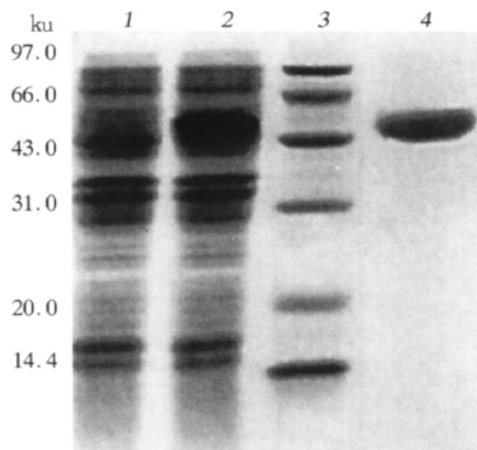


Fig. 3 Analysis of overexpression and purification of rat GFR α 1 in BL21 (DE3)

1: bacterial total proteins before induction; 2: bacterial total proteins after 5 h of induction; 3: protein molecular mass marker; 4: purified GFR α 1 protein.

2.3 GFR α 1 活性检测

在完全培养基中, 加入 50 μ g/L GDNF 和不同浓度的 GFR α 1, 培养 7 d 后, 0.1 mg/L GFR α 1+

50 μ g/L GDNF 诱导 PC12 细胞分化的作用和对对照组相比即有显著性差异 ($P < 0.05$). 100 mg/L GFR α 1+ 50 μ g/L GDNF 诱导 PC12 细胞分化作用达最大 ($P < 0.001$) (图 4). 在无血清的培养基中, PC12 细胞很快死亡, 加入 50 μ g/L GDNF 和不同浓度 GFR α 1, 培养 48 h 后, PC12 细胞存活率明显提高. 0.01 μ g/L GFR α 1+ 50 μ g/L GDNF 促 PC12 细胞存活作用和对对照组相比即有明显差异 ($P < 0.05$), 100 mg/L GFR α 1+ 50 μ g/L GDNF 促 PC12 细胞存活作用达最大 ($P < 0.001$).

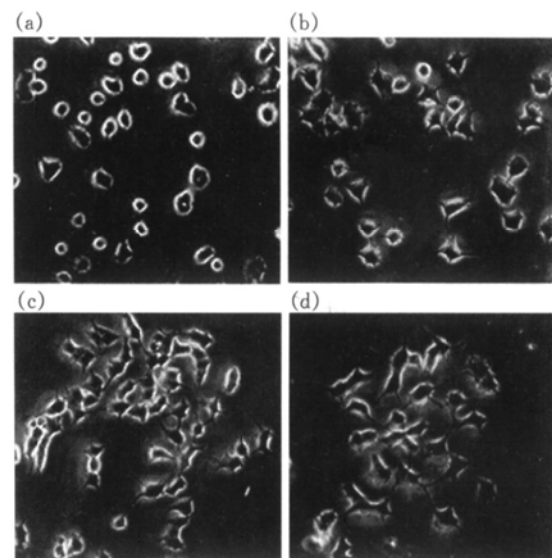


Fig. 4 Photograph of PC12 cells neurite outgrowth induced by 50 μ g/L GDNF + different concentration of GFR α 1 (a) control; (b), (c), (d): GFR α 1 at concentration of 1.0 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L respectively.

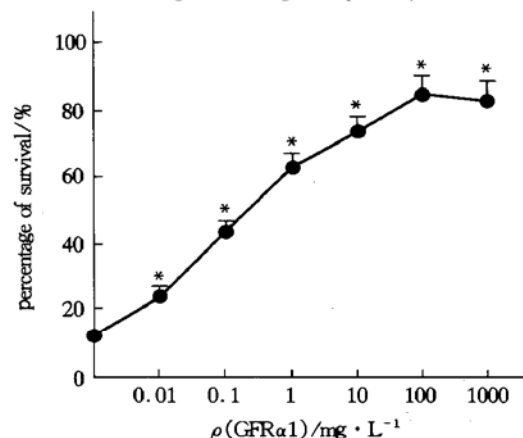


Fig. 5 The ability of 50 μ g/L GDNF+ different concentration of GFR α 1 to promote the survival of serum deprived PC12 cells

Values are the $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments performed in duplicate culture wells. Three fields were examined from each well. Asterisks indicate significant difference from control (medium containing serum) treated cells ($P < 0.05$).

3 讨 论

GFR α 1 在胚胎及成年大鼠神经系统中有着广泛的分布^[2]. 我们用新生 4 天 SD 大鼠海马作为组织来源, 用 RT-PCR 方法成功获得 GFR α 1 cDNA, 这说明在大鼠海马组织中也有 GFR α 1 mRNA 表达, 与 Sarabi 等^[10]报道一致. 将 GFR α 1 cDNA 克隆至 pET28a (+) 质粒, 构建表达载体, 在原核细胞大肠杆菌 BL21 中获得表达, 表达蛋白以包涵体形式存在. 这可能与 GFR α 1 分子质量较大, 蛋白质高级结构复杂有关. 由于 GFR α 1 的 N 端融合了 6 \times His, 所以表达产物用 Ni²⁺-NTA 柱来纯化. 在蛋白质复性过程中我们发现, 传统的透析复性法耗时长 (至少要 24 h), 步骤繁琐 (要多次更换透析液), 不能完全除去变性剂, 损失量较大, 复性效率较低. 传统的稀释复性法也有透析复性法的诸多缺点, 且大体积稀释样品给后来的浓缩带来不便. 经过摸索, 我们改进了复性方法, 直接在 Ni²⁺-NTA 柱上进行复性. 柱上复性法与传统的透析或稀释复性法相比有许多优点^[7, 11]: 可缩短复性时间, 简化复性步骤, 改善复性环境, 提高复性效率. 其原理是: a. 融合在 N 端或 C 端的 His 与固相的金属 Ni²⁺ 有很强的亲和力, 且这种强亲和力在不同的化学条件下均很稳定^[7], 即变性液和复性液对此亲和力影响不大; b. 融合寡聚 His 的蛋白质分散、均匀、高效、牢固地与 Ni²⁺-NTA 柱结合, 使含一定比例的还原型半胱氨酸和氧化型半胱氨酸的复性液比传统的透析法更迅速、更彻底地取代变性剂, 利于变性蛋白质处于理想的复性环境中, 从而使复性液均匀地、高效地与变性蛋白质作用, 大大缩短复性时间, 提高复性效率. 但此方法的应用仍有一定局限性, 它一般适用于非变性条件下在热力学和动力学方面比较稳定的蛋白质^[7, 12].

据报道, GFR α 1 在体内的存在形式有两种, 一种是靠 GPI 键锚在细胞膜外表面, 另一种是以可溶性形式分布在细胞外液中^[2, 13]. 传统认为: 靠 GPI 键锚在细胞膜外表面的 GFR α 1 在介导 GDNF 神经营养活性中起主要作用^[6], 但可溶性 GFR α 1 的作用越来越受到重视^[13, 14]. Treanor 等早在 1996 年就报道: 用磷脂酰肌醇磷脂酶 C (PIPLC, 一种能特异切开 GPI 键的酶) 处理了多种对 GDNF 有依赖性的神经元, 发现处理后的神经元即使在饱和浓度的 GDNF 中成活率也下降了近 90%. 在 PIPLC 处理过的运动神经元培养液中,

只有同时加入 GDNF 和 GFR α 1, 才能恢复 GDNF 的营养作用^[2]. 体内某些细胞 (如坐骨神经的雪旺氏细胞) 可分泌可溶性 GFR α 1. 坐骨神经损伤后, 在损伤点附近雪旺氏细胞中 GDNF 和 GFR α 1 的表达急剧升高, 这利于损伤神经的修复^[12], 内源性的可溶性 GFR α 1 也促使 GDNF 移向损伤端, 帮助损伤神经再生^[15]. 这主要是因为可溶性 GFR α 1 可与细胞外的 GDNF 结合^[2, 3, 13, 14], 二者复合物作为 α -RET 的配体传向远处表达 α -Ret 的细胞, 异位激活 α -RET, 从而介导 GDNF 的神经营养作用. 这些均说明可溶性 GFR α 1 在介导 GDNF 的神经营养活性中起重要作用. 用本实验获得的重组 GFR α 1 与 GDNF 蛋白 (50 μ g/L) 一起处理无血清培养基培养的 PC12 细胞, 0.1 mg/L GFR α 1 即可明显介导 GDNF 促 PC12 细胞的存活和分化的作用, 100 mg/L 时作用最明显. 这进一步证明可溶性 GFR α 1 能介导 GDNF 的神经营养活性.

本试验成功获得了有活性的重组 GFR α 1 蛋白, 为深入研究 GFR α 1 的生物学功能奠定了良好的基础. GFR α 1 分子中参与和 GDNF 结合的关键位点的研究正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Lapchak P A, Miller P J, Jiao S, *et al.* Biology of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): implications for the use of GDNF to treat Parkinson's disease. *Neurodegeneration*, 1996, **5** (3): 197~ 205
- 2 Jing S, Wen D, Yu Y, *et al.* GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR α -a, a novel receptor for GDNF. *Cell*, 1996, **85** (7): 1113~ 1124
- 3 Treanor J J, Goodman L, de Sauvage F, *et al.* Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*, 1996, **382** (6586): 80~ 83
- 4 Scott R P, Ibanez C F. Determinants of ligand binding specificity in the glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor α s. *J Biochem*, 2001, **276** (2): 1450~ 1458
- 5 CHEN ZY, CHAI Y F, CAO L, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induced differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in PC12 cells. *Neuroscience*, 2001, **104** (2): 593~ 598
- 6 Malu G T, Robert H B, Jeffrey M, *et al.* GFR-Mediated localization of Ret to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron*, 2000, **25** (3): 611~ 623
- 7 Zouhar J, Nanak E, Brzobohaty B. Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside specific β -glucosidase. *Protein Expr Purif*, 1999, **17** (1): 153~ 162
- 8 陈哲宇, 路长林, 吴祥甫. 人重组 GDNF 及其生物学活性研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (2): 207~ 210
Chen Z Y, Lu C L, Wu X F. *Acta Biochim Biophys Sinica*, 1999, **31** (2): 207~ 210

- 9 Masaaki M, Yoshihiko M, Yuka N, *et al.* Establishment of fluorescein diacetate and ethidium bromide (FDAEB) assay for quality assessment of isolated islets. *Cell Transplantation*, 2000, **9** (5): 681~ 686
- 10 Sarabi A, Hoffer B J, Olson L, *et al.* GFR alpha 1 is expressed in parvalbumin GABAergic neurons in the hippocampus. *Brain Res*, 2000, **22**: 877 (2): 262~ 270
- 11 Franken K L, Hiemstra H S, van Meijgaarolen K E, *et al.* Purification of his tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif*, 2000, **18** (1): 95~ 99
- 12 Richter W, Hermsdorf I, LiLie H, *et al.* Refolding, purification, and characterization of human recombinant PDE4A constructs expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2000, **19** (3): 375~ 383
- 13 Jing S Q, Wen D Z, Yu Y B. GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell*, 1996, **85** (7): 1113~ 1124
- 14 Paratcha G, Ledda F, Baars L, *et al.* Released GFR α 1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation *via* a novel mechanism of recruitment of c ret to lipid rafts. *Neuron*, 2001, **29** (1): 171~ 184
- 15 Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, *et al.* Complementary and overlapping expression of GDNF, c ret proto-oncogene, and gdnf receptor alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci*, 1997, **17** (10): 3554~ 3567

Cloning, Expression and Biological Activity Analysis of Rat GFR α 1 Gene*

WANG Li-Mei¹⁾, CHEN Zhe-Yu^{1)**}, ZHU Wei¹⁾, ZHANG Qing²⁾,

HUANG Ai-Jun¹⁾, LU Chang-Lin¹⁾, HE Cheng¹⁾

¹⁾ Department of Neurobiology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²⁾ Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract To obtain recombinant glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1 (GFR α 1) and study its biological activity, the cDNA encoding the mature rat GFR α 1 was isolated using RT-PCR with total RNA extracted from newborn SD-rat hippocampus tissue. The expression plasmid pET-GFR α 1 was constructed by inserting GFR α 1 cDNA into plasmid pET-28a (+) containing T7 promoter and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). An expression strain BL GFR α 1 was selected. SDS-PAGE analysis revealed that the rat GFR α 1 protein was highly expressed and accumulated up to 21.5% of the total bacterial proteins in the form of inclusion body after the induction. By Ni²⁺ chelation affinity chromatography, up to 90% GFR α 1 protein was purified. Purified and refolded GFR α 1 protein could significantly mediate the ability of GDNF to promote the survival and induce the differentiation of PC12 cells.

Key words glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1 gene (GFR α 1), RT-PCR, gene expression, PC12 cell

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30000048), Shanghai Youth Science and Technology Phosphor Grant (01QB14001) and the National Basic Research Program of China (G 1999054005).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070294-8701, E-mail: chengzyk@online.sh.cn

Received: March 19, 2002 Accepted: April 30, 2002