

基础研究

心肌营养素 1/破伤风毒素重链 C 端片段融合蛋白的构建及其靶向大鼠嗜铬细胞瘤细胞的研究

张 伟¹, 张正丰¹, 周 跃¹, 蔚 芃², 蒋 成², 陈 超²

(1 第三军医大学附属新桥医院骨科 400037 重庆市; 2 川北医学院附属医院骨科 637007 四川省南充市)

【摘要】目的:探讨心肌营养素 1(cardiotrophin 1, CT1)/破伤风毒素重链 C 端片段(tetanus toxin C fragment, TTC)(CT1/TTC)融合蛋白的构建及其对大鼠嗜铬细胞瘤(pheochromocytoma, PC12)细胞的靶向性。**方法:**采用聚合酶链式反应(PCR)、T-A 克隆等分子生物学方法构建 CT1/TTC 融合蛋白。体外培养 PC12 细胞, 并将 CT1/TTC 融合蛋白与 PC12 细胞共培养, 红色荧光免疫组化染色后在激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白能否在 TTC 的靶向作用下进入 PC12 细胞。**结果:**成功构建了 CT1/TTC 融合蛋白, 测序显示融合基因序列正确, 免疫组化染色结果显示融合蛋白能够进入 PC12 细胞, 并发出红色荧光。**结论:**采用 PCR 和 T-A 克隆等分子生物学方法能成功构建 CT1/TTC 融合蛋白, 并且 TTC 能够将 CT1 靶向进入 PC12 细胞。

【关键词】 心肌营养素; 破伤风毒素重链 C 端片段; 大鼠嗜铬细胞瘤细胞; 融合蛋白

中图分类号: Q813.1, TQ936 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-02-0138-04

Study of construction of cardiotrophin 1/tetanus toxin C fragment fusion protein and its affinity to pheochromocytoma cells/ZHANG Wei, ZHANG Zhengfeng, ZHOU Yue, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(2): 138~141

【Abstract】 objective: To construct the fusion protein of cardiotrophin 1(CT1)/tetanus toxin C fragment(TTC)(CT1/TTC) and study the target of CT1/TTC fusion protein to pheochromocytoma (PC12) cells. **Method:** The CT1/TTC fusion protein was constructed by molecular biology approaches, such as PCR, T-A cloning and so on. PC12 cells was cultured in vitro, and co-cultured with CT1/TTC fusion protein, immunohistochemistry after fluorescent-labeling with tetramethylrhodamine isothiocyanate-phalloidin, the affinity of CT1/TTC fusion protein to PC12 cells were observed by confocal laser microscope. **Result:** The CT1/TTC fusion protein was constructed successfully, which was identified by restriction enzyme digestion assay and DNA sequencing, the immunohistochemistry outcome showed the fusion protein can enter the PC12 cells under confocal laser microscope. **Conclusion:** The CT1/TTC fusion protein is constructed successfully and CT1/TTC fusion protein can target to PC12 cells by TTC.

【Key words】 Cardiotrophin; Tetanus toxin C fragment; Pheochromocytoma cells; Fusion protein

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

心肌营养素 1(cardiotrophin 1, CT1)能长时间支持运动神经元(包括脊髓和脑运动神经元)、多巴胺神经元和交感神经元的存活。但 CT1 没有特异性, 广泛作用于身体各脏器^[1]。破伤风毒素重链的 C 端片段(tetanus toxin C fragment, TTC)能与神经特异结合并逆行运输, 没有神经毒性^[2]。本

研究拟构建 CT1/TTC 融合蛋白, 并将其与大鼠嗜铬细胞瘤(pheochromocytoma, PC12)细胞共培养, 观察 CT1/TTC 融合蛋白能否靶向进入 PC12 细胞。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞

pET-CT1: 包含小鼠 CT-1 1-606(法国 Bordet 教授惠赠); PGEX-4T3: 谷胱甘肽 S 转移酶标签的融合蛋白的原核表达载体(美国 Russell 教授

基金项目: 国家自然科学基金(30472008)资助

第一作者简介: 男(1978-), 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 脊柱脊髓损伤修复(现工作单位为川北医学院附属医院骨科)

电话: (081)72262080 E-mail: seeyou1998@163.com

通讯作者: 张正丰

惠赠);大肠杆菌 DH5 α (为本室保存),破伤风梭菌 C.Tetani64008 菌株(第三军医大学微生物教研室保存);高分化型大鼠 PC12 细胞(上海细胞生物所)。

1.2 主要试剂

BamH I, Sal I, Not I 内切酶, T4 连接酶 (NEB);Takara LA Tag, T 载体, 质粒抽提试剂盒, 凝胶回收试剂盒 (Takara);B-PER 裂解液 (Pierce);CT-1 抗体 (Santa);免疫组化试剂盒 (北京中山公司)。

1.3 聚合酶链式反应(PCR)引物

引物自行设计,上海生工生物工程技术服务有限公司合成, P1:5'-CGTGGATCCCATGAGCCAGAGGGAGGGA-3' (小鼠的 CT1 基因序列:19-37, 基因库:u18366), 下划线为 BamH I 酶切位点; P2:5'-CGAGTGCACGGCGACGCCCTGGC-3' (小鼠的 CT1 基因序列:613-628), 下划线为 Sal I 酶切位点, 产物大小为 606bp; P3:5'-CGGCTCGACTATTCTAAAAATCTGGA-3' (破伤风毒素基因序列:2908-2924, 基因库:X06214), 下划线为 Sal I 酶切位点; P4:5'-TTGCGGC-CGCTTTAATCATTGTCCATCC-3' (破伤风毒素基因序列:4252-4270), 下划线为 Not I 酶切位点, 产物大小 1356bp。

1.4 pGEX-4T3-CT1/TTC 的构建

以 pET 质粒为模板, P1、P2 为引物, 进行 PCR 扩增 CT1, 条件:94℃变性 40s, 61℃退火 50s, 72℃延伸 90s, 共 30 个循环^[3], PCR 产物与 pMD18T 质粒 (T-A 克隆载体) 连接, 连接产物转化到 DH5 α 大肠杆菌, 在含 3-溴-4-3-碘- β -D-吡喃糖苷/异丙基- β -D-硫代半乳糖苷/氨苄青霉素钠 (X-Gal/IPTG/AMP) 的肉汤 (LB) 琼脂糖培养基上培养过夜, 然后挑取白色菌落, 将细菌接种到 LB 培养基中过夜培养, 离心收集细菌, 用质粒抽提试剂盒提取质粒, BamH I、Sal I 酶切鉴定, 将得到的质粒命名为 pMD18T-CT1。

取产毒破伤风梭菌 C.Tetani64008 菌株冻干粉少许, 以 0.01mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris.Cl) (pH 7.4) 50 μ l 溶解, 加入 0.5 mol/L KOH 50 μ l, 96℃煮 10min, 加入 0.5mol/L Tris.Cl (pH 6.5) 100 μ l, 12000 转/min 离心 10min, 取上清 15 μ l 作 PCR 模板^[4]。以 P3、P4 为引物, 进行 PCR 扩增 TTC, 条件:94℃变性 40s, 55℃退火 60s, 72℃

延伸 60s, 共 30 个循环^[5], PCR 产物与 pMD18T 连接, 连接产物转化到 DH5 α , 在含 X-Gal/IPTG/AMP 的 LB 琼脂糖培养基上培养, 挑取白色菌落, 将细菌接种到 LB 培养基中过夜培养, 离心收集细菌, 用质粒抽提试剂盒提取质粒, Sal I, Not I 酶切鉴定, 将得到的质粒命名为 pMD18T-TTC。

将 pMD18T-CT1、pGEX-4T3 质粒 BamH I、Sal I 酶切, 回收 CT1 及 pGEX-4T3 酶切片并连接, 得到 pGEX-CT1, 然后将该表达质粒转化入 DH5 α 大肠杆菌, 挑取菌落, 细菌培养, 质粒提取, 酶切鉴定, 命名为 pGEX-CT1。再将 pMD18T-TTC、pGEX-CT1 质粒 Sal I、Not I 酶切, 回收 TTC、pGEX-CT1 酶切片, 并连接, 得到 pGEX-CT1/TTC, 将质粒转化 DH5 α 大肠杆菌, 细菌培养, 质粒提取, 酶切鉴定, 命名为 pGEX-CT1/TTC。

1.5 pGEX-CT1/TTC 在大肠杆菌中的表达及检测

挑取过夜培养的大肠杆菌单菌落 (包含 pGEX-CT1/TTC 表达质粒) 接种于 LB 培养基中, 37℃振荡培养至 A600=0.5, 加入 IPTG 至 1mmol/L, 29℃, 32℃, 37℃继续振荡培养, 分别诱导 5h, 取出 1ml 菌液离心并收集菌体, 在收集的菌体中加入 50 μ l 水和 50 μ l 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 悬浮后煮沸 5min, 另取 5ml 菌液离心, 菌体 B-PER 裂解离心提取细菌蛋白, 上清为可溶性蛋白, 在可溶性蛋白中加等量的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 12% 硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白成分及大小。

1.6 CT1/TTC 融合蛋白的纯化

挑取过夜培养的大肠杆菌单菌落 (包含 pGEX-CT1/TTC 表达质粒) 接种于 5ml 含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基中, 37℃过夜培养。取 5ml 培养物接种到 500ml 含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基中, 在 1L 摇瓶中于 37℃振荡培养至对数中期 (A550=0.5~1.0), 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 温度调节为 32℃, 继续培养 5h。于 4℃以 5000 转/min (5500 转/min Sorvall GSA 转头) 离心 15min 收集大肠杆菌。菌体 B-PER 裂解离心提取菌体蛋白, 收集上清, 谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 蛋白纯化系统纯化融合蛋白, SDS-PAGE 蛋白电泳分析融合蛋白。

1.7 培养大鼠 PC12 高分化型细胞株

用改良 Eagle 培养基(DMEM,高糖培养基)培养 PC12 高分化型细胞株,按 2×10^5 个/ml 细胞悬液的密度传代接种到 24 孔培养板上,37℃、5% CO₂、饱和湿度培养,2~3d 换液 1 次。每天在倒置光学显微镜下观察细胞形态及贴壁情况。

1.9 验证 CT1/TTC 融合蛋白与 PC12 细胞的亲和性

待 PC12 细胞密度达到载玻片 70% 左右,加入纯化并过滤除菌的融合蛋白,并且使蛋白浓度达到 5μg/ml,37℃ 培养 2h,然后用吸管吸出培养液及融合蛋白。洗涤固定细胞后行红色荧光免疫组化染色(标记荧光素为四甲基异硫氰酸罗达明,镜下为红色荧光),激光共聚焦显微镜观察。镜下细胞呈红色表示融合蛋白粘附并进入细胞。

2 结果

2.1 表达载体 pGEX-CT1/TTC 的构建

CT1 的 PCR 产物为 606bp,无其他杂带,PCR 产物大小与目的条带一致。PCR 产物与 pMD18T 连接后转化的大肠杆菌在含有 X-Gal/IPTG/AMP 的琼脂糖培养基上培养,大约有 300 个单克隆生长,白:蓝比约为 4:1。白色克隆的 PCR 产物大小为 606bp,与第 1 次 PCR 产物一致。pMD18T-CT1 酶切大小也与 PCR 产物一致。同样方法构建并鉴定 pMD18T-TTC。将 pGEX-CT1/TTC 分别行 'BamH I、Sal I', 'Sal I、Not I' 及 'BamH I、Not I' 酶切,片段大小与 CT1 和 TTC 及 CT1/TTC 相同,PCR 产物大小也与 CT1、TTC 相同,原核表达载体 pGEX-CT1/TTC 构建成功(图 1)。

2.2 pGEX-CT1/TTC 在大肠杆菌中的表达

含有 pGEX-CT1/TTC 原核表达载体的大肠杆菌在 29℃、32℃、37℃ 振荡培养,IPTG 诱导 5h 后收集菌体 SDS-PAGE 分析显示在 100KD 附近出现条带。在 32℃ 时表达最高(图 2),占菌体总蛋白的 10% 左右。

2.3 CT1/TTC 融合蛋白的纯化

SDS-PAGE 蛋白电泳示纯化后蛋白大小为 100KD,与 CT1/TTC 的理论值大小一致,说明 CT1/TTC 融合蛋白纯化成功(图 3)。

2.4 培养大鼠 PC12 细胞

传代培养 2d 的 PC12 细胞在 100 倍倒置光学显微镜下直接观察示细胞呈长梭形,突触较长,贴壁生长(图 4,后插页 II)。

2.5 验证 CT1/TTC 融合蛋白与 PC12 细胞的亲和性

免疫组化结果显示 CT1/TTC 融合蛋白能快速粘附 PC12 细胞并进入此细胞(图 5,后插页 II),提示构建的融合蛋白在 TTC 功能域的介导下能粘附并进入 PC12 细胞。

3 讨论

CT1 是 1995 年由 Pennica 等发现的一种细胞因子,由 201 个氨基酸组成,能够刺激体外新生大鼠心肌的生长。与白血病抑制因子(LIF)、睫状神经生长因子(CNTF)、肿瘤抑制素 M(OSM)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-11(IL-11)一样有类似的生物学活性和受体亚基,同属于 IL-6 家族。与其他 IL-6 家族成员一样,CT1 与白血病抑制因子 β(LIFβ)、信号传导蛋白(gp130)受体结合,激活细胞内受体相关的酪氨酸激酶(JAK),传

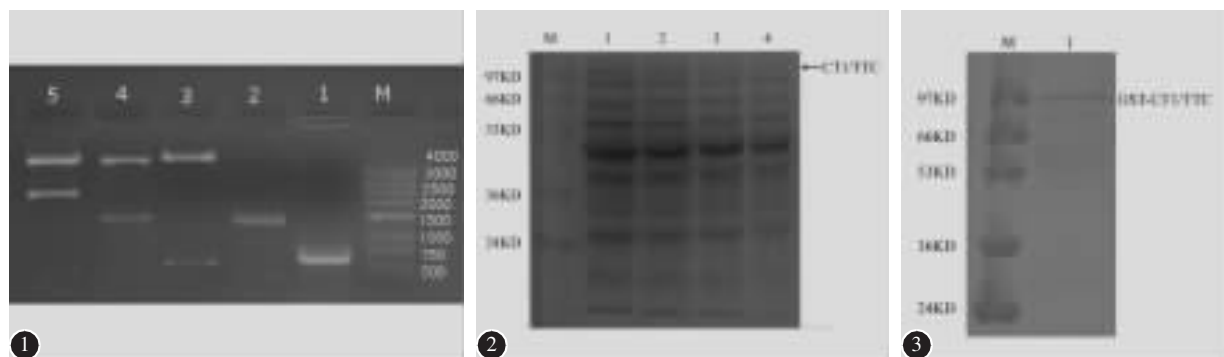


图 1 pGEX-CT1/TTC 的酶切和 PCR 鉴定电泳图[M:DNA 分子量标准(4000bp),1:心肌营养素 1(CT1),2:破伤风外毒素 C 片段(TTC),3:pMD18T-CT1 酶切片段,4:pMD18T-TTC 酶切片段,5:pGEX-CT1/TTC 酶切片段] 图 2 pGEX-CT1/TTC 表达蛋白电泳图[M:蛋白分子量标准(97KD),1:表达温度 32℃,2:表达温度 37℃,3:表达温度 29℃,4:对照组] 图 3 纯化的 GST-CT1/TTC 蛋白电泳图[M:蛋白分子量标准(97KD),1:GST-CT1/TTC]

导胞内信号。由于与 CNTF 的同源性, CT1 对神经系统的作用越来越引起人们的注意。CT1 能长时间地支持运动神经元(包括脊髓和脑运动神经元)、多巴胺神经元和交感神经元的存活。有报道用 CT1 基因治疗大鼠进行性运动神经元病、脊髓侧束硬化(ALS)的动物实验,取得了较好效果^[6-8]。

破伤风毒素(tetanus toxin, TeNT)是由破伤风杆菌产生的抑制脊髓运动神经元递质释放的神经毒素,它可特异地与神经元末梢结合并内在化,逆行运输至神经元,并可跨神经元间迁移。TeNT 蛋白分子量为 150kDa, 由一个重链和一个轻链组成,重链介导与神经末梢结合,轻链产生神经毒性。TTC 是重链的 C 端片段,由 451 个氨基酸组成,能与神经特异结合并逆行运输而没有神经毒性^[2]。TTC 有两个功能域,一个在 N 端,另外一个在 C 端。CT1/TTC 与细胞的结合则是靠 TTC 的 C 端功能域与 PC12 细胞表面的神经节苷酯 GD1b、GT1b 受体结合,并囊泡内在化进入细胞^[9]。因而, TTC 可作为靶向神经元并逆行运输的非毒性分子。

我们假想,如果将 CT1 与 TTC 进行融合, CT1/TTC 与神经元特异性结合,这种无毒性融合蛋白既可促进神经元存活和轴突再生,又克服了 CT1 对其他细胞的非特异性作用;同时,这种融合蛋白不但可在脊髓损伤局部用药,也可在脊髓特异传导束的肌肉支配区和蛛网膜下腔反复用药。

PC12 细胞株源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,是经辐射大鼠肾上腺髓质瘤而移植出的一种肿瘤细胞,经过连续单层培养获得。其重要生物学特征之一是经神经生长因子(NGF)处理的细胞将停止增殖,生长出神经突起,具有电兴奋性并有许多与神经细胞分化有关的组织成分改变,具有神经元的各种生物学特性,因此国际上通常将其作为研究神经元的模型^[10]。故本研究选用 PC12 细胞来验证 CT-1/TTC 融合蛋白对神经细胞的亲和性。结果表明,本研究构建的融合蛋白能够特异地作用于 PC12 细胞。

TTC 融合蛋白的优点在于可特异性地作用于运动神经元,而且能有效突破血脑屏障,给药方

便,经周围肌肉、损伤区、蛛网膜下腔注射即可,通过外周神经及神经触突可直接转运到中枢神经系统^[11]。事实上,还有许多其他治疗性的细胞因子可以和 TTC 进行融合,比如抗凋亡蛋白(Bcl-2)等,这些研究将最终对脊髓损伤后特异脊髓传导束的修复提供一种新的特异因子给药方式。

4 参考文献

1. Pennica D, Swanson TA, Shaw KJ, et al. Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization [J]. Cytokine, 1996, 8 (12): 183-189.
2. Francis JW, Bastia E, Matthews C. Tetanus toxin fragment C as a vector to enhance delivery of proteins to the CNS [J]. Brain Res, 2004, 10(11): 7-13.
3. Mistumoto H, Klinkosz B, Pioro EP, et al. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in a mouse motor neuron disease [J]. Muscle Nerve, 2001, 24(6): 769-777.
4. 王慧, 苗俊, 侯晓军, 等. 破伤风毒素保护性抗原在毕氏酵母中的分泌表达 [J]. 生命科学研究, 2004, 8(1): 32-35.
5. Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, et al. Cardiotrophin-1, a muscle derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons [J]. J Neurosci, 2001, 21(4): 1283-1291.
6. Haase G, Kennel P, Pettmann B, et al. Therapeutic benefit of ciliary neurotrophic factor in progressive motor neuronopathy depends on the route of delivery [J]. Ann Neurol, 1999, 45(7): 296-304.
7. Schiavo G, Matteoti M, Montecucco C. Neurotoxins affecting Neuroexocytosis [J]. Physiol Rev, 2000, 80(9): 717-726.
8. 张正丰, 廖维宏. 心肌营养素-1 的研究进展 [J]. 国外医学生理病理科学分册, 2002, 22(1): 104-106.
9. Francis JW, Figueiredo D, Vander Spek JC. A survival motor neuron: tetanus toxin fragment C fusion protein for the targeted delivery of SMN protein to neurons [J]. Brain Res, 2004, 11(1): 7-13.
10. 郑志弘, 林玲编著. 神经细胞培养理论与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 144-147.
11. Coen L, Osta R, Maury M, et al. Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 94 (3): 9400-9405.

(收稿日期: 2007-09-19 修回日期: 2007-12-27)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)