

· 生物化学 ·

基因重组神经营养蛋白 - 3 的生物学活性*

季爱民 舒斯云 李明¹ 秦建强² 邹恒琴 张忠义(广州 510282 第一军医大学附属珠江医院;¹ 广州 510515 第一军医大学热带病研究室;² 广州 510515 第一军医大学解剖学教研室)

摘要 目的:测定 NT - 3cDNA/CHO 细胞表达的基因重组 NT - 3 的生物学活性。方法:体外培养 8 日龄鸡胚背根神经节(DRG),加入条件培养基,测量背根节神经突起生长的长度。结果:NT - 3cDNA/CHO 细胞培养 48h 后的无血清条件培养基 1:24 稀释后即能促进 DRG 神经突起的生长;随着其中 NT - 3 浓度增加,神经突起长度也逐渐延长,有明显的量效关系;DRG 培养 48h 长出的神经突起与 24h 相比,明显长而致密;NT - 3 生物活性的 EC₅₀ 值为 16.7ng/ml;NT - 3 浓度为 125ng/ml 时,神经突起的长度达到最大值;NT - 3cDNA/CHO 细胞培养 72h 的条件培养基中 NT - 3 的活性高于培养 48h 的条件培养基;NT - 3 单克隆抗体 3W3 的浓度为 0.5μg/ml 即能抑制 NT - 3 的生物活性;抗体浓度为 1μg/ml 时,NT - 3 的生物活性降低一半。结论:基因重组 NT - 3 有较高的生物活性。

关键词 基因重组神经营养蛋白 - 3;生物活性

Neurotrophic activity of recombinant neurotrophin - 3

Ji Aimin(Ji AM), Shu Siyun(Shu SY), Li Ming(Li M), et al(Zhujiang Hospital, Guangzhou 510282)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To perform the biological assays of recombinant Neurotrophin - 3(NT - 3) expressed by NT - 3cDNA/CHO cells. **METHOD:**Dorsal root ganglia(DRG) of 8 day chicken embryo were cultured in vitro. The length of fiber outgrowth of DRG stimulated by the rNT - 3 in the conditioned medium(CM) was measured. **RESULTS:**After culturing of NT - 3cDNA/CHO cells for 48h, the no FCS CM was collected. The CM in 1:24 dilution could stimulate the fiber outgrowth of DRG. With the increase of the NT - 3 concentrations in the CM, the length of fiber was gradually extended, which was a definite dose dependency. The fiber outgrowth was much longer and denser in culture for 48hs than that in culture 24hs. A half - maximal concentration of the biological activity(EC₅₀) of the recombinant protein was approximately 16.7ng/ml; the fiber outgrowth reached a maximal length when NT - 3 was at 125ng/ml. The biological activity of NT - 3 in the CM of NT - 3cDNA/CHO cells culturing for 72hs was much higher than that for 48hs. The neurotrophic activity of the rNT - 3 could be neutralized by MoAb 3W3 at a concentration of as low as 0.5μg/ml and reached a half - maximal level at 1μg/ml. **CONCLUSION:**The rNT - 3 has high bioactivity.

KEY WORDS recombinant neurotrophin - 3, bioactivity

神经营养因子类为结构与功能相关的多肽因子家族,控制着中枢神经系统(CNS)和外周神经系统(PNS)神经元的发育,生存及功能维持^[1]。其家族成员包括神经生长因子(Nerve growth factor,简称 NGF),脑源性神经营养因子(Brain - derived neurotrophic factor,简称 BDNF),神经营养蛋白 - 3(Neurotrophin - 3,简称 NT - 3),神经营养蛋白 - 4/5(Neurotrophin - 4/5,简称 NT - 4/5),神经营养蛋白 - 6(Neurotrophin - 6,简称 NT - 6)等^[2]。NT - 3 mRNA 几乎表达于大鼠中枢神经系统所

有区域;在外周组织如心脏、肺、肌肉、皮肤、肠、肾、脾及胸腺中均有高水平表达。在外周神经系统,NT - 3 能促进背根神经节,结状神经节及交感神经节神经元及中枢神经系统中胆碱能神经元,多巴胺神经元的生存及突起生长。初步的临床研究结果表明 NT - 3 可:①逆转老年间隙性记忆损伤^[3];②治疗运动神经元疾病^[4,5];③治疗中枢神经系统创伤引起的神经元损

* 广东省自然科学基金资助课题部分内容(960364)

伤^[6]。

为了获得大量基因重组 NT-3, 研究其广泛深入的生物功能, 克服原核表达系统和低等真核生物酵母表达系统不能进行翻译后的正确修饰, 得不到近天然生物活性目的蛋白的缺点, 我们建立了能稳定表达基因重组 NT-3 的中国仓鼠卵巢细胞系 (NT-3cDNA/CHO); 对该工程细胞的表达产物进行了鉴定, 证明基因重组 NT-3 获得了表达 (另文述)。为了研究表达产物的生物活性, 本文收集了不同时间 NT-3cDNA/CHO 细胞的无血清培养液, 为条件培养基, 体外培养鸡胚背根神经节, 从神经节神经突起的长度来评判基因重组 NT-3 的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 条件培养基的准备

NT-3cDNA/CHO 单克隆细胞 (本实验室建立), 每瓶接种 1×10^6 细胞, 加入含 10% 小牛血清 (FCS, 杭州市四季青生物工程材料研究所) 的 DMEM 培养基 (Sigma 产品), 5h 后细胞贴壁, 倒掉培养液, 用无钙、镁离子的 Hanks 液洗涤数次, 换成 DMEM:F12 (Sigma 产品) 无血清基础培养液, 收集 48h 及 72h 后的培养液; 分别用基础培养液 (无 FCS) 按 1:24, 1:14, 1:9, 1:4, 1:1, 1:0 稀释。

用无血清基础培养液稀释 NT-3 对照品 (CHO 细胞表达, 日本 Takeya Komiya 博士赠, Takeda Chemical Industries 公司), 使浓度为 50 和 100ng/ml; 其它对照品有 5% 脑活素注射液 (Cerebrolysin, CBL, 市售, 奥地利产); 25 及 250ng/ml 的基因重组碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF, 市售, 国产); 转染空白表达载体的 CHO 单克隆细胞的无血清条件培养液为阴性对照。

NT-3cDNA/CHO 细胞培养 48h 后收集的无血清培养液, 用基础培养液按 1:4 稀释后, 再稀释基因重组 NT-3 的单克隆抗体 3W3 (日本 Takeya Komiya 博士赠, Takeda Chemical Industries 公司), 抗体浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 和 4.0 μ g/ml。

1.2 双位 EIA 法测定条件培养基中 NT-3 的浓度

建立标准曲线: 用 0.1 M 碳酸钠缓冲液 (pH9.6) 稀释 3W3 单克隆抗体, 其浓度为 0.5 μ g/ml; 48 孔酶联板每孔中加入 100 μ l 该溶液, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育; 用 PBS 洗板 3 次; 加入含 25% 脱脂奶粉的 PBS 封闭, 室温放置 4h; 洗板 3 次; 用 PBS+10% 脱脂奶粉稀释 NT-3 标准品, 使成系列浓度为 0, 10, 100, 200, 500, 800 和 1000ng/ml, 酶联板每孔中加入 100 μ l 样品, 4 $^{\circ}$ C 孵化 4h; PBS 洗板 3 次, 加入用 PBS 稀释的 5 μ g/ml 的 3W3 100 μ l, 室温孵化过夜; 洗板后, 加入用 PBS 按 1:400 稀释的羊抗鼠

-HRP (华美生物工程公司) 100 μ l, 室温孵化 4h, 洗涤后加入 100 μ l 含邻苯二胺的反应底物, 492nm 处测定吸收度。

测定样品中 NT-3 含量: 单克隆细胞株的无血清培养液, 经充分透析后进行测定, 步骤同标准曲线。

1.3 NT-3 的生物学活性测定

参考 Ebendal 等人^[7]的方法, 取 8 日龄鸡胚腰段 DRG (L1-L5), 用手术刀和镊子去除背根节外膜及其残根, 立即放入正常培养基中; 用吸管吸取一枚鸡胚 DRG, 种植于一张预先涂有鼠尾胶的生长基质盖片上, 每张盖片加样品 1ml, 放进 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 24 和 48h, 观察拍摄各个 DRG 神经突起生长情况。参考薛庆善的方法^[8], 从底片上直接测量每个 DRG 突起生长的长度, 计算平均值。具体测法是, 将刻有八等份放射线的透明胶片迭加在所摄 DRG 底片上, 八等份线的中点与 DRG 的中心重合, 分别沿八等份线自 DRG 植块边缘测量神经突起的长度, 求出平均值并除以放大倍数, 得出各 DRG 神经突起的实际平均长度, 然后求出同组各 DRG 之均值。

2 结果

2.1 稀释的 NT-3 系列浓度经 4 次重复测定, 结果呈典型的 NT-3 剂量反应曲线, 线性方程: $A = 0.00108c - 0.0166$, $r = 0.986$, $P < 0.01$ 。收集 NT-3cDNA/CHO 细胞培养 48h 后的无血清培养液, 经测定其中 NT-3 的含量为 250ng/ml; 培养 72h 后无血清培养液中 NT-3 的含量为 320ng/ml。

2.2 不同稀释度培养液中 NT-3 的生物活性: 样品组, 阳性对照组及阴性对照组各培养存活 6 个背根神经节; DRG 培养 24 及 48h 后, 观察神经突起生长状况, 拍摄各个 DRG 神经突起的照片。

经测量计算发现, 阴性对照组无神经突起生长; 阳性对照组神经元突起生长良好; 样品组中各稀释度培养液都能促进 DRG 神经突起的生长, 明确表明神经细胞神经突起的生长是在神经生长因子作用下进行的; 培养液 1:24 稀释后即有神经突起生长, 随着其中 NT-3 浓度增加, 神经突起长度也逐渐增加, 有明显的量效关系: DRG 培养 48h 长出的神经突起与 24h 相比, 明显长而致密, 可见神经组织有足够神经营养因子营养时, 其突起长度随时间延长而增加, 结果见表 1 和图 1。

2.3 NT-3cDNA/CHO 细胞培养不同时间后 NT-3 的活性变化: NT-3cDNA/CHO 细胞用无血清基础培养液培养 48 和 72h 后, 收集培养液, 再用基础培养液按 1:24, 1:14, 1:9, 1:4, 1:1, 1:0 稀释后, 每个鸡胚背根神经节中加入 1ml; 空白载体/CHO 细胞相同培养时间的

表 1 rNT-3 促进 DRG 神经突起生长的平均长度 (X ± s, μm)

NT-3 (ng/ml)	0	10	16.7	25	50	125	250
24h	0	210 ± 10	230 ± 12	260 ± 16	305 ± 20	460 ± 24	442 ± 24
48h	0	307 ± 15	332 ± 22	367 ± 23	421 ± 27	580 ± 32	568 ± 30

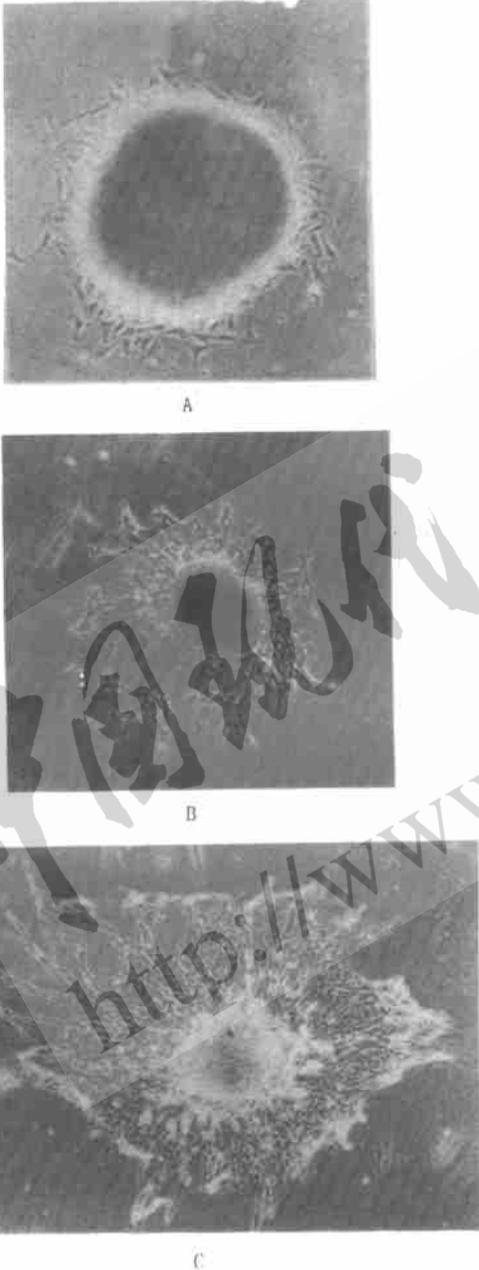


图 1 rNT-3 可促进 DRG 神经突起的生长
A- 阴性对照组 (300 ×); B- NT-3cDNA/CHO 细胞培养 24h 后的条件培养基 (150 ×); C- NT-3cDNA/CHO 细胞培养 48h 后的条件培养基 (150 ×)

无血清培养液为阴性对照,背根神经节培养 24h 后,阴性对照组神经节无明显突起生长;而样品组各神经节有明显神经突起生长,测定各突起的长度,求出平均值,结果见图 2,说明 NT-3cDNA/CHO 细胞培养 72h 的培养液中 NT-3 的活性明显高于培养 48h 培养液中 NT-3 的活性。

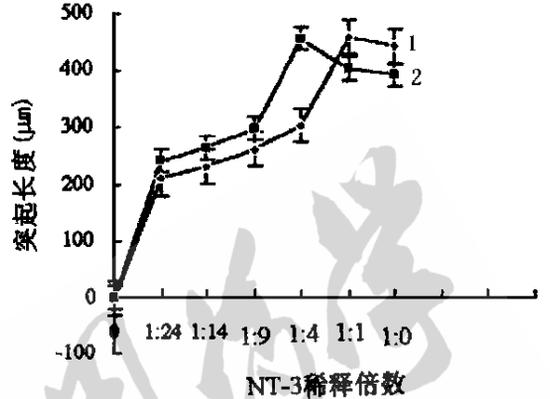


图 2 NT-3cDNA/CHO 细胞培养不同时间后 rNT-3 的生物活性
1- 48h; 2- 72h

2.4 比较 NT-3cDNA/CHO 细胞培养液中 NT-3 的活性:进一步观察不同实验组间 DRG 培养 24 和 48h 神经突起生长情况,发现 bFGF 组及阴性对照组无突起生长,NT-3 对照组组及 5% 脑活素组与样品组一样,DRG 神经突起生长较为一致;NT-3cDNA/CHO 细胞培养 48h 后的培养液 1:1 稀释为样品组的神经突起,平均长度略长于 100ng/ml 的 NT-3 对照组,长于 5% 脑活素组,具体结果见图 3。由此可见我们得到的基因重组 NT-3 的生物活性与 NT-3 对照品基本相同,而高于 5% 脑活素。

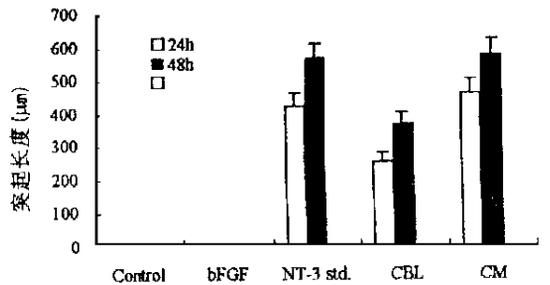


图 3 不同样品促进 DRG 神经突起生长
CBL:脑活素

2.5 NT-3 单克隆抗体可中和 NT-3 的生物活性:各样品培养液中加入 3 W3 单克隆抗体后,DRG 培养 24h,测定神经突起的长度,见图 4。结果可知 3 W3 可明显降低 rNT-3 的生物活性,3 W3 抗体浓度为 0.5 μg/ml 时即可抑制 NT-3 的生物活性,抗体浓度为 1.0 μg/ml

时,NT-3的生物活性降低约一半。

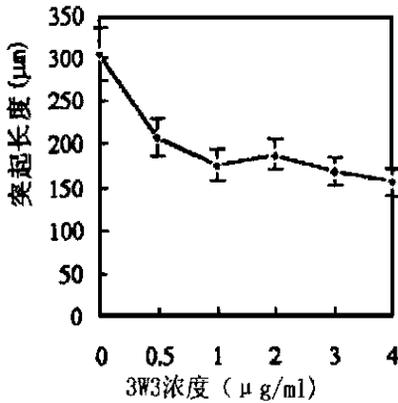


图4 MoAb 3W3可中和RNT-3的生物活性

3 讨论

基因工程获得重组蛋白的目的是为了得到有生物学活性的产物,因此仅仅得到基因重组NT-3是不够的,还必须研究其对神经细胞的生物活性作用。

我们在以前的工作中构建了含NT-3cDNA/CHO的真核表达载体,转染CHO细胞后获得了能稳定表达NT-3的细胞株,对表达产物进行了鉴定,但产物是否具有生物活性尚不清楚。体外神经细胞的培养是一种应用广泛的实验室技术,它具有容易控制,对处理因素干扰小,实验结果稳定,观察指标易于选择和敏感等优点,使该方法成为研究神经营养因子生物活性和功能的最常用的手段之一^[9]。因此本文分离了8日龄鸡胚背根神经节进行了体外培养,加入NT-3cDNA/CHO阳性细胞株的培养液,用背根神经节神经突起生长的程度来衡量表达产物的生物活性,既是对所表达蛋白有效性的验证,也是为进一步的研究表达产物的其它生物功能摸索和建立实验方法。

本文以鸡胚背根神经节在体外培养环境中的神经突起生长变化,测定并计算神经突起长度的平均值,研究NT-3cDNA/CHO细胞表达的NT-3的生物活性。研究结果表明,NT-3cDNA/CHO细胞表达的基因重组NT-3生物活性的EC₅₀值约为16.7ng/ml。Iwane等人^[10]报导的结果为15ng/ml,这可能是我们采用了类似的表达宿主细胞,表达产物有相同的翻译后修饰,因而生物活性相近。Rosenthal等人^[11]及Gotz等人^[12]报导的EC₅₀值分别为8及0.025ng/ml,这些差异可能是由于与我们所分离的神经节的时间不同及一些实验技术上的差别引起的。当Rosenthal等人取10日龄鸡胚DRG时,EC₅₀值在8~15ng/ml间,而Gotz等人的实验结果为何如此低,则不很清楚。

NT-3cDNA/CHO表达的基因重组NT-3在

125ng/ml时,神经突起的长度达到最大值,与文献报导结果相近。但与同浓度NGF促进DRG神经突起值相比,约为其一半,可能是由于二者作用的主要靶神经元不同,或二者作用于神经元发育的不同阶段。NT-3的EC₅₀值约为NGF值的100倍,可能是此阶段NGF效应神经元比NT-3的效应神经元更多^[10]。

本研究得出的结论是,我们获得的基因重组NT-3,与NT-3标准品及脑活素一样,具有促进背根神经节神经突起生长的作用,这种作用可被其特异性抗体中和,说明所得到的基因重组NT-3具有明显的生物活性,达到了在哺乳动物细胞中表达高生物活性NT-3的目的,为进一步研究其生物功能提供了理论依据,实验方法和实验材料。

致谢:日本Takeda Chemical Industries Corp.的Dr. Takeya Komiya提供基因重组NT-3对照品及其单克隆抗体。

参考文献

- 1 Thoenen H, Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev*, 1980, 60: 1284.
- 2 Gotz R, Koster R, Winkler C, et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 1994, 372 (6503): 266.
- 3 Fischer W, Sirevaag A, Wiegand SJ, et al. Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophin-3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(18): 8607.
- 4 Kato AC, Lindsay RM. Overlapping and additive effects of neurotrophins and CNTF on cultured human spinal cord neurons. *Exp Neurol*, 1994, 130(2): 196.
- 5 Hefti F. Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J Neurobiol*, 1994, 25(11): 1418.
- 6 Moccchetti I, Wrathall JR. Neurotrophic factors in central system trauma. *J Neurotrauma*, 1995, 12(5): 853.
- 7 Ebendal T, Jacobson CO. Tissue explants affecting extension and orientation of axons in cultured chick embryo ganglia. *Exp Cell Res*, 1977, 105(2): 379.
- 8 薛庆善,肖渝平,冯武鸣.同心圆测试格在形态计量分析中的应用. *四川解剖学杂志*, 1995, 3(2): 65.
- 9 Bard YA, Edgar D, Thoenen H. New neurotrophic factors. *Ann Rev Physiol*, 1983, 45: 601.
- 10 Iwane M, Watanabe T, Shintani A, et al. Purification and characterization of biologically active recombinant human neurotrophin-3 produced by expression of a chimera gene in Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol*,

1994 ,41: 225 .

- 11 Rosenthal A ,Goeddel DV ,Nguyen T ,*et al* .Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor .
Neuron ,1990 ,4: 767 .

- 12 Gotz R ,Koster R ,Winkler C ,*et al* .Production and characterization of recombinant mouse neurotrophin - 3 .Eur J Biochem ,1992 ,204: 745 .

收稿日期 :1998 - 06 - 23