

OMgp LRR181~228: OMgp 神经突起生长抑制功能的主要结构域

樊拥军¹ 许健¹ 李龙^{1,2} 张朝政² 万旺军¹ 于涟^{1,2*}

(¹ 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027;

² 浙江大学动物科学学院预防兽医研究所, 杭州 310029)

摘要 OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) 可以通过与 MAG、nogo-66 等神经再生抑制因子竞争结合同一受体 NgR 而诱使生长锥溃变和抑制神经突起的生长。以前的研究表明, 在 OMgp 与 NgR 结合抑制神经突起生长的过程中, OMgp 的亮氨酸富含重复序列 (LRR) 是必需的。为进一步了解 OMgp LRR 在神经突起生长中的作用及其结构与功能之间的关系, 采用 PCR-定点突变法对 OMgp LRR 结构域分段删除, 表达了删除不同基因片段后的 OMgp LRR 蛋白, 通过对表达有 NgR 的 CHO 细胞 (NgR-CHO) 的黏附实验和对原代培养神经细胞的抑制实验对其功能进行了研究。结果显示, 分别删除了 OMgp 25~56、57~133、134~180 位氨基酸的 OMgp LRR 蛋白仍具有结合 NgR-CHO 和抑制原代培养的神经元突起生长的作用; 而删除了第 181~228 位氨基酸的 OMgp LRR 蛋白则失去了对原代培养神经元的生长抑制作用, 但仍然具有结合 NgR 的能力。表明 OMgp181~228 在 OMgp 的功能中具有重要的意义。删除了第 181~228 位氨基酸的 OMgp LRR 蛋白可望作为 OMgp 的竞争性抑制剂, 用于中枢神经系统损伤后神经再生的治疗。

关键词 OMgp; NgR; 神经再生

OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) 是一种 GPI 连接的糖蛋白, 属于 LR 家族成员。主要存在于少突胶质细胞和髓鞘上。最新研究表明, OMgp 具有抑制神经突起生长以及诱使生长锥溃变的功能^[1], 此功能可能是通过与另外两种神经生长抑制因子 MAG (myelin-associated glycoprotein) 和 nogo-66 竞争结合同一个受体 NgR (nogo-66 receptor), 通过同一途径抑制神经突起的生长。Wang 等^[1] 人的研究结果表明, OMgp 亮氨酸富含重复序列 (leucine-rich repeat, LRR) 结构域可与 NgR 结合、抑制神经突起的生长, 而不具有 LRR 的 OMgp 蛋白则丧失了此种功能。我们此前的研究结果则证明, 仅含有部分 LRR 的 OMgp 蛋白片段也能够抑制神经突起的生长^[2]。

为进一步了解 OMgp 结构与功能之间的关系, 本文采用 PCR-定点突变法对 OMgp 基因 LRR 结构域分段删除, 对删除了不同基因片断后的 OMgp LRR 蛋白在神经突起生长抑制中的功能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

S-D 大鼠 (孕 15~18 天) 由浙江大学医学院实验动物中心提供。大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3)、NgR-CHO 细胞系、载体 pGEX-4T-1 和兔抗 NgR 多克隆抗体为本室保存。ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit 为 Stratagene 公司产品。抗 GST 抗体、抗 β -tubulin 抗体、PI-PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C) 为 Sigma 公司产品。谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析柱、FluoroLink Cy2 标记的羊抗鼠 IgG、FluoroLink Cy3 标记的羊抗兔 IgG 为 Pharmacia 公司产品。DMEM/F12 培养液和 N2 添加剂为 Invitrogen 公司产品。其他未注明的试剂均为国产。引物合成和 DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2 基因分段删除的 OMgp LRR 片段原核表达

表1 PCR-定点突变法分段删除 OMgp 基因所用引物及反应条件

| 引物 | 序列 | 退火温度(°C) |
|--------|---------------------------------------|----------|
| mut 1s | 上游 5'-attatacatttaaacctgtcttataacc-3' | 56.9 |
| | 下游 5'-gcataagatgccaggcgtgagaaa-3' | |
| mut 2s | 上游 5'-atgctgaaaagggtgttctcattaa-3' | 59.2 |
| | 下游 5'-gttctctgcagtcagggtgtaa-3' | |
| mut 3s | 上游 5'-caaatcctccaggacattaata-3' | 58.1 |
| | 下游 5'-attcttagaacaacccaggtatttaag-3' | |
| mut 4s | 上游 5'-tgtgaccataaacaacattacttac-3' | 58.1 |
| | 下游 5'-gttcagtgagttattagacaggtc-3' | |

载体的构建

以含有小鼠 OMgp cDNA 的质粒 pBSK-OMgp 为模板(本室保存),设计 4 对 5' 端磷酸化的引物(见表 1)。按照说明,以 ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit 分别进行 PCR 反应。PCR 产物经限制性内切酶 *DpnI* 和 DNA 聚合酶 *Pfu* 作用后以 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化 XL1-Blue 感受态细胞。挑取克隆进行鉴定。阳性克隆分别命名为 mut1s、mut2s、mut3s 和 mut4s。合成一对引物,上游引物(P1): 5'-GGGAATTCATTTGTCCTCTCCAGTGTACATGC-3', 下游引物(P2): 5'-AACGTCGACTCATGAC-CACCTGTTATTAT-3'。以 mut1s、mut2s 和 mut3s 阳性克隆为模板进行 PCR 反应。另外合成一条引物(P3): 5'-ACGGTCGACTTATGTCAG-TGAGTTATTAGACAG-3'。引物 P1/P3 以 mut4s 为模板进行 PCR。P1 引物 5' 端和 P2、P3 引物 5' 端分别带有限制性内切酶 *EcoRI* 和 *SalI* 酶切位点。P2、P3 引物加入终止密码子 TGA。反应产物经 *EcoRI/SalI* 酶切后,与原核表达载体 pGEX-4T-1 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。挑取阳性克隆,抽取质粒后进行测序。4 种质粒分别命名为 pGEX-mu1s、pGEX-mu2s、pGEX-mu3s 和 pGEX-mu4s。

1.3 基因分段删除的 OMgp LRR 蛋白片段的融合表达

重组菌的培养、诱导、裂解按文献[3]介绍的方法进行。将测序正确的 pGEX-mu1s、pGEX-mu2s、pGEX-mu3s 和 pGEX-mu4s 阳性克隆转化大肠杆菌 BL21 进行蛋白质表达。按 1:1000 比例接种阳性克隆于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,培养至对数期后,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L。在 30 °C 诱导 3~5 h 后离心收集细菌。以超声裂解仪裂解细菌,收集裂解液上清液,用谷胱甘肽琼脂

糖凝胶纯化 GST-OMgp 融合蛋白。收集蛋白质进行 SDS-PAGE。蛋白质分别命名为 OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s 和 OMmu4s。蛋白质定量采用 Lowry's 法进行。

1.4 基因分段删除的 OMgp LRR 蛋白片段的鉴定

用 Western 印迹对表达的蛋白质进行鉴定。将 OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s 和 OMmu4s 走 SDS-PAGE 胶,然后转移到硝酸纤维素膜上,与抗 GST 的抗体反应。抗体使用浓度为 1:5000。

1.5 OMgp LRR 蛋白片段与 NgR-CHO 细胞的黏附实验

按文献[4]的方法,将溶于甲醇的硝化纤维素液均匀地铺在 3.5 cm 直径的 6 孔组织培养板,在无菌橱中风干。待干燥后取 GST 融合蛋白 OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s 及 OMmu4s 各 1 μ l(调蛋白质浓度为 0.1 mg/ml)点在培养板中,以 GST 蛋白为阴性对照,同时以含有全长 OMgp LRR 的 OM1s 为阳性蛋白对照。每组做 3 个复孔。另外一组为 PI-PLC 处理 (0.06 u/ml, 37 °C 温育 2 h) 过的 NgR-CHO 细胞。2 h 后以 Hank's 液轻轻漂洗。随后每孔加入 2 ml 表达有 NgR 的 CHO 细胞(NgR-CHO, 1 \times 10⁶ 个/ml)或 PI-PLC 处理过的 NgR-CHO 细胞。将培养板置 37 °C 培养箱中培养 12 h 以上。以 Hank's 液轻轻漂洗数次,以 2.5% 戊二醛固定后考马斯亮蓝染色观察结果。黏附的细胞计数后,以 SPSS 统计学软件进行统计学处理, Dunnett *t* 检验检验各组与对照组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.6 OMgp LRR 蛋白片段对原代培养神经细胞的抑制实验^[5]

培养的神经细胞取材于孕 15~18 天的 S-D 大鼠胚胎。在解剖显微镜下取出胎鼠海马,将海马在无钙镁的 Hank's 平衡盐溶液中切碎,加 0.125% 的胰蛋白酶溶液于 37 °C 消化 10 min 后,用吸管反复吹打使成单细胞悬液。用胎牛血清终止胰蛋白酶的作用,以 DMEM/F12 培养液洗涤细胞两次。用孔径为 100 μ m 的网筛过滤。1000 r/min 离心 5 min 后计数细胞。

用多聚左旋赖氨酸(5 mg/L)于 37 °C 处理 3.5 cm 直径的培养板 2 h。无菌去离子水漂洗后,在无菌橱中干燥。每孔中点 1 μ l 蛋白质(蛋白质浓度为 0.1mg/ml)。将培养板放入 37 °C 培养箱中,使蛋白质沉淀于培养板上。PBS 洗涤后,加入 2 ml 分离的神经元悬液(2 \times 10⁶ 个/孔),在神经元培养液中

(DMEM/F12 和 N2 添加剂)培养 48 h, 2.5% 戊二醛固定, 考马斯亮蓝染色观察结果。

2 结果

2.1 基因分段删除的 OMgp LRR 蛋白片段原核表达载体的构建

采用 PCR-定点突变法分段删除了 OMgp N 端及 LRR 结构域的不同基因片段(图 1)。OMgp N 端和 LRR 区共 684bp, 编码 228 个氨基酸。PCR(图 2)、

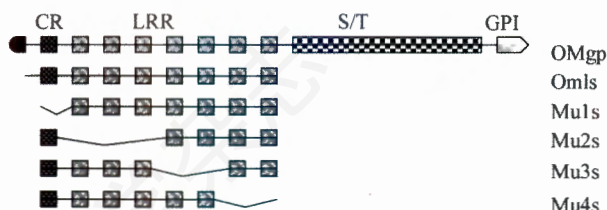


图 1 OMgp LRR 结构域基因删除示意图

CR: cysteine-rich motif; LRR: leucine-rich repeat; S/T: serine/threonine repeat; GPI: glycosylphosphatidylinositol.

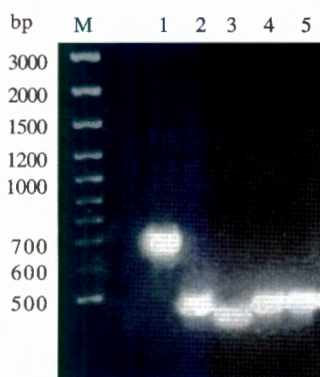


图 2 PCR 鉴定部分基因删除的 OMgp 原核表达载体

M: marker; 1: OM1s; 2: mut1s; 3: mut2s; 4: mut3s; 5: mut4s.

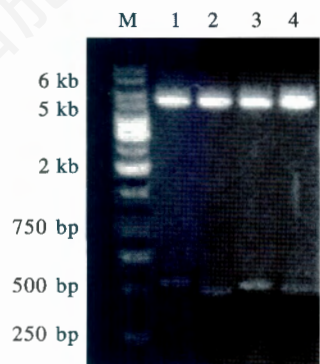


图 3 EcoRI/SalI 酶切鉴定部分基因删除的 OMgp 原核表达载体

M: marker; 1: pGEX-mu1s; 2: pGEX-mu2s; 3: pGEX-mu3s; 4: pGEX-mu4s.

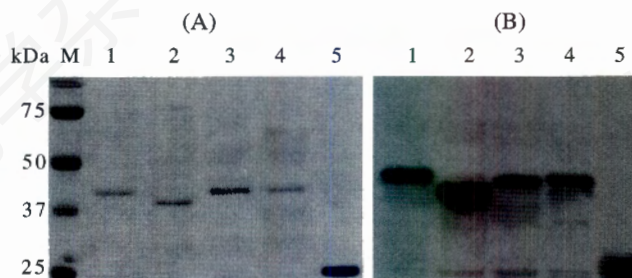


图 4 不同 OMgp 蛋白片段的 SDS-PAGE(A)和 Western 印迹(B)
M: marker; 1: OMmu1s; 2: OMmu2s; 3: OMmu3s; 4: OMmu4s; 5: GST 蛋白。

酶切鉴定(图 3)和测序结果表明, pGEX-mu1s 删除了 OMgp N 端和 LRR 区中编码第 25~56 位氨基酸(CR)的密码子, pGEX-mu2s 删除了编码第 57~133 位氨基酸(LRR57-133aa)的密码子, pGEX-mu3s 删除了编码第 134~180 位氨基酸(LRR134~180aa)的密码子, pGEX-mu4s 删除了编码第 181~228 位氨基酸(LRR181~228aa)的密码子。删除的序列与预期一致。无错误碱基掺入及密码缺失发生。

2.2 融合蛋白的表达与鉴定

未经基因删除的 OMgp N 端与 LRR(OM1s)的 GST 融合蛋白的分子量为 49 kDa, 基因删除后的 OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s 和 OMmu4s 的预期分子量分别为 45kDa、40kDa、44kDa 和 43kDa。表达的蛋白质纯化后进行 SDS-PAGE, 在相应的位置有清晰条带出现。使用抗 GST 的单克隆抗体进行免疫印迹(Western 印迹), 证实为 GST 融合蛋白(图 4)。

2.3 NgR-CHO 与 OMgp LRR 蛋白片段的黏附实验

NgR 基因转染 CHO 细胞形成的 NgR-CHO 细胞表面表达有 NgR 蛋白(免疫荧光染色呈红色, 图 5s), 可以和 OMgp 蛋白发生黏附。以 OM1s 蛋白(含有 OMgp N 端和全长 LRR 结构域)为阳性对照, GST 蛋白为阴性对照, 将 NgR-CHO 细胞培养在含有 OM1s、OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s、OMmu4s 以及 GST 蛋白(图 5a~5f)的培养板内, 结果发现 NgR-CHO 能很快黏附在 OM1s、OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s 和 Ommu4s 蛋白上。12 h 后对黏附细胞计数进行统计学比较, 结果表明, OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s、OMmu4s 组与对照的 GST 组比较有显著性差异($P < 0.01$), 与 OM1s 组比较无显著性差异($P > 0.05$)。使用 PI-PLC 处理后的 NgR-CHO 细胞(PI-PLC 处理后, 大部分细胞表面

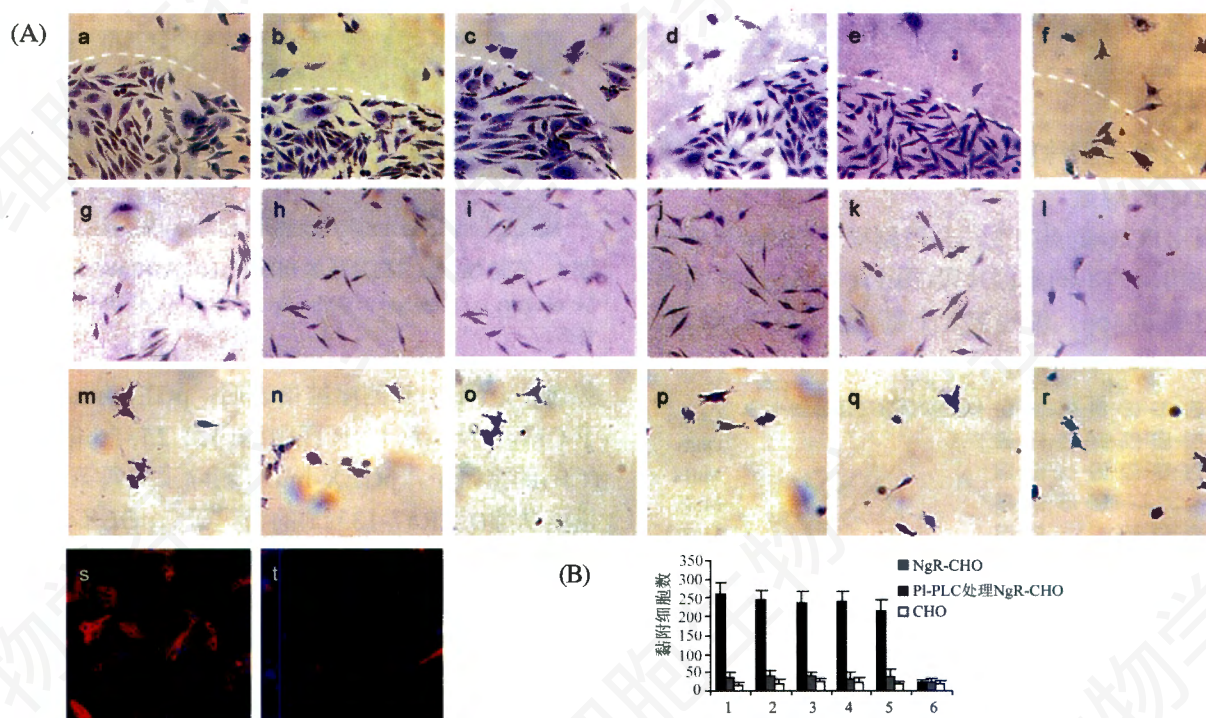


图5 不同OMgp蛋白片段与NgR-CHO细胞的黏附结果($\times 400$)

(A) NgR-CHO(a~f)、PI-PLC处理的NgR-CHO(g~l)和CHO细胞(m~r)培养在点有OM1s(a, g, m)、OMmu1s(b, h, n)、OMmu2s(c, i, o)、OMmu3s(d, j, p)、OMmu4s(e, k, q)和GST蛋白(f, l, r)的培养板内, 12 h后观察结果。图a~f中的虚线示蛋白质与非蛋白质区界限。图g~r则为细胞生长在蛋白质区内。(s)使用抗NgR抗体进行荧光染色的NgR-CHO细胞。(t)使用抗NgR抗体进行荧光染色的PI-PLC处理的NgR-CHO细胞。细胞核以DAPI标记(蓝色)。

(B) 黏附在不同OMgp蛋白片段的NgR-CHO、PI-PLC处理的NgR-CHO和CHO细胞的计数。1: om1s; 2: OMmu1s; 3: OMmu2s; 4: OMmu3s; 5: OMmu4s; 6: GST。

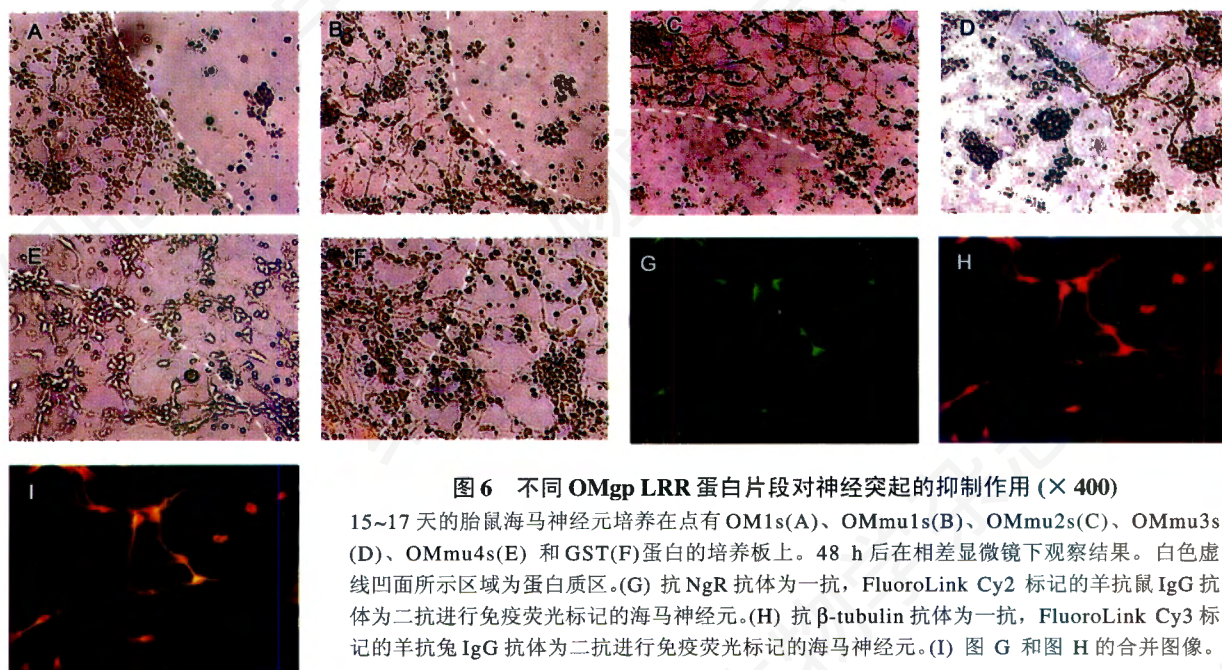


图6 不同OMgp LRR蛋白片段对神经突起的抑制作用($\times 400$)

15~17天的胎鼠海马神经元培养在点有OM1s(A)、OMmu1s(B)、OMmu2s(C)、OMmu3s(D)、OMmu4s(E)和GST(F)蛋白的培养板上。48 h后在相差显微镜下观察结果。白色虚线凹面所示区域为蛋白质区。(G)抗NgR抗体为一抗, FluoroLink Cy2标记的羊抗鼠IgG抗体为二抗进行免疫荧光标记的海马神经元。(H)抗 β -tubulin抗体为一抗, FluoroLink Cy3标记的羊抗兔IgG抗体为二抗进行免疫荧光标记的海马神经元。(I)图G和图H的合并图像。

的 NgR 被剪切掉, 见图 5t) 与各组蛋白质作用(图 5g~5l), 则大部分细胞不能黏附在 OMgp 蛋白上, 证实此黏附现象是 NgR 特异性的。

2.4 OMgp 对神经突起生长的抑制实验

OMgp 的 LRR 可以通过与表达在海马神经元上的 NgR 相互作用诱使生长锥的溃变和神经突起的生长抑制。OM1s 含有全长的 LRR, 对神经元的抑制作用明显。在不含 OM1s 蛋白的区域内, 神经元突起相互接触形成网络; 在含有 OM1s 蛋白的区域内, 生长在培养板上的神经元数量明显减少, 且少有突起伸出(图 6A)。OMmu1s、OMmu2s、OMmu3s 对神经元的抑制作用与 OM1s 相比无明显差异(图 6B、C、D), 神经突起在蛋白质区边缘受到抑制而无法长入蛋白质区内。而删除了第 181~228 位氨基酸的 OMmu4s 则不能抑制神经突起的生长, 神经元生长在蛋白质区内(图 6E), 与 GST 对照组相比无明显差异(图 6F)。

3 讨论

对神经抑制分子 nogo-66、MAG、OMgp 及其作用受体 NgR 的研究发现, nogo-66、MAG、OMgp 相互竞争与 NgR 的结合。研究表明, 三者之间并没有序列同源性, 推测它们可能共同使用 NgR 上的同一个活性位点或者其结合部位有部分重叠^[6]。因而对其中任一神经抑制分子的研究同样有助于对其他抑制分子的了解。

以前的研究表明, 在 OMgp 与 NgR 结合及抑制神经突起生长的过程中, OMgp 的 LRR 结构域是必须的。我们此前的研究结果表明, OMgp 的 N 端和 LRR 结构域蛋白片段几乎具有结合 NgR 及抑制神经突起生长的全部功能。仅含有部分 LRR 的 OMgp 蛋白也能够抑制神经突起的生长^[2]。这表明, 在 OMgp 与 NgR 结合及抑制神经突起生长的过程中, 可能全长的 LRR 并不是必须的。OMgp N 端的富含半胱氨酸重复序列删除后(OMmu1s), 对 NgR-CHO 细胞的黏附数量并没有显著变化, 对海马神经元的生长抑制作用也没有明显不同。删除了 LRR57~133aa(OMmu2s)和 134~180aa(OMmu3s)的 OMgp 也仍然具有较强的结合 NgR-CHO 和抑制神经

元突起生长的功能。而删除了 LRR181~228aa 后(OMmu4s), OMgp 虽然仍能结合 NgR-CHO 细胞, 但却失去了对海马神经元的生长抑制作用。结果提示, 在 OMgp 与 NgR 的作用过程中, OMgp 的多个亮氨酸富含重复序列都可以介导 OMgp 与 NgR 的结合, 对 OMgp 蛋白的功能起辅助作用。Alyson 等^[7]使用同样的方法对 NgR 的 LRR 进行分段删除, 结果发现 NgR 的功能需要完整的 LRR 结构域, 删除任何 LRR 重复序列的 NgR 都不再能与 Nogo 蛋白结合。而对其他含有 LRR 的受体的研究表明, 同样的删除不会干扰剩余的重复序列的功能^[8], 表明多个 LRR 直接参与了与配体的结合。我们推测在 OMgp LRR 与 NgR LRR 的作用过程中, OMgp 多个 LRR 都直接参与了与 NgR LRR 的结合。但 NgR 是 GPI 连结的蛋白, 自身缺少跨膜和胞内结构域, 因而其抑制性信号的转导需要一个伴侣分子。Kevin 等^[9]发现, p75 和 NgR 形成复合体, 将来自 Nogo、MAG、OMgp 的抑制信号传递到胞内, 但对它们之间的结合方式还不清楚。OMgp 如何和 NgR/p75 作用, 将抑制性信号传递到细胞内, 这一受体复合物是否还有其他未知蛋白质参与目前都难以确定, 但我们的结果表明, 在 OMgp 传递神经生长抑制性信号时, LRR181~228aa 具有不可取代的作用, 是 OMgp 神经突起生长抑制功能中最主要的功能结构域。

删除了第 181~228 氨基酸残基的 LRR 不具有抑制神经生长的作用, 但却能和细胞表面 NgR 结合, 有可能作为天然的 OMgp 的竞争抑制剂, 干扰 OMgp 对再生神经元的生长抑制作用, 是一种潜在的中枢神经系统损伤后神经再生的促进剂。

感谢新加坡中央医院肖志成博士和新加坡国立大学 Alan Lee 博士对本研究提供的帮助。

参考文献 (References)

- [1] Wang KC *et al. Nature*, 2002, **417**: 941
- [2] 樊拥军等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 290
- [3] GST Gene Fusion System Handbook, Amersham Biosciences, 2002, 26
- [4] Lagenaur C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 7753
- [5] Xiao ZC *et al. Eur J Neurosci*, 1996, **8**: 766
- [6] Domeniconi M *et al. Neuron*, 2002, **35**: 283
- [7] Fournier AE *et al. J Neurosci*, 2002, **22**: 8876
- [8] Song YS *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 3426
- [9] Wang KC *et al. Nature*, 2002, **420**: 74

OMgp LRR181–228: The Predominant Domain of OMgp in Neurite Outgrowth Inhibition

Yong-Jun Fan¹, Jian Xu¹, Long Li^{1,2}, Chao-Zheng Zhang², Wang-Jun Wan¹, Lian Yu^{1,2*}

(¹College of Biomedical Engineering and Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; ²College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Several observations suggest that the leucine-rich repeats (LRR) domain of oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) may play an important role in inhibition of neurite outgrowth and axonal regeneration after brain injury. To better understand structure-function relationships for the OMgp LRR domain and its effects in neurite regeneration, distinct OMgp leucine-rich repeat were deleted by PCR based site-directed mutagenesis. The gene deleted OMgp LRR fragments were expressed with GST protein and the expressed proteins were used to culture with NgR-expressing CHO and hippocampal neurons. Results show that the deletion of OMgp amino acid residues 25–56, 57–133, 134–180 did not interrupt its effects in binding NgR-expressing CHO and inhibiting hippocampal neurons growth. But the fragment deleted amino acid residues 181–228 can only bind with NgR-expressing CHO and lost the effect of neurite outgrowth inhibition. Results suggest that the OMgp amino acid 181–228 is the predominant domain in neurite outgrowth inhibition of OMgp. The OMgp LRR fragment without amino acid residues 181–228 may be a potent reagent for encouraging regeneration in the adult central nervous system following injury.

Key words OMgp; NgR; axonal regeneration

Received: February 16, 2004 Accepted: March 26, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971894, E-mail: yulian@zju.edu.cn