

量为 1000U/kg, 腹膜内注射, 结果显示, 肝素促进 HGF 水平升高, 峰值在给药后 60、120min 后开始下降, 并且在肝硬化和正常鼠都促进了未结扎肝叶的再生, 提高了肝硬化大鼠的存活率。

然而, 香港 Li 等^[6]用 70% 肝切除大鼠观察发现肝素对肝再生无明显影响, 并不能促进肝功能恢复。土耳其学者 Yuceturk 等^[7]研究指出肝素不利于肝切除术后肝再生, 肝素组肝切除术后血清补体活性 (CH₅₀) 水平明显低于不给予肝素组, 阐述了肝素通过抑制补体 C1, 抑制补体参与的炎症级联反应, 肝再生也是一种炎症反应, 从这个角度上说肝素抑制了肝的再生。本实验初步结果显示肝素可促进大鼠 50% 肝切除术后肝再生, 进一步的肝素剂量分层, 不同给药方式和机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 Kunio M, Toshikazu N. Heparin functions as a hepatotrophic factor by inducing production of hepatocyte growth factor[J]. Biochemical and biophysical research communications, 1996, 227: 455 - 461

- 2 Moreno E, Meneu J, Calle A, *et al.* Modulation of hepatocyte growth factor plasma levels in relation to the dose of exogenous heparin administered: an experimental studying rats [J]. Transplantation Proceedings, 2005, 37: 3943 - 3947
- 3 Teizo N, Shigeki A, Masayuki I, *et al.* Heparin accelerates liver regeneration following portal branch ligation in normal and cirrhotic rats with increased plasma hepatocyte growth factor levels [J]. Journal of Hepatology, 2002, 37: 87 - 92
- 4 Xu X, Jha AK, Jia X, *et al.* Heparin - decorated, hyaluronic acid - based hydrogel particles for the controlled release of bone morphogenetic protein 2 [J]. Acta Biomater, 2011, 7(4): 1508 - 1514
- 5 Go DP, Gras SL, Connor AJ, *et al.* Multilayered microspheres for the controlled release of growth factors in tissue engineering [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(5): 1494 - 1503
- 6 Li Y, Wang HY, Chi HC. Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 1999, 5(4): 305 - 307
- 7 Yuceturk H, Yagmurdu MC, Haberal M, *et al.* Role of Heparin on TNF - α and IL - 6 levels in liver regeneration after partial hepatic resection [J]. European Surgical Research, 2007, 39: 216 - 221

(收稿: 2011 - 05 - 24)

TrkA 与 snapin 蛋白的直接相互作用

王 岚 崔迎彬 马晓骊 陈 虹 王 欣 黄秉仁

摘 要 **目的** 确认 TrkA 与 snapin 蛋白间的直接相互作用。**方法** 采用 DNA 重组技术, 构建增强型荧光蛋白表达载体 pECFP - TrkAICD (TrkA 膜内区) 和 pEYFP - snapin, 共转染 HEK 293T 细胞后以激光扫描共聚焦显微镜观察并进行荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 分析。**结果** 成功构建了 snapin 和 TrkA 的重组质粒, 共转染细胞后激光扫描共聚焦显微镜分析表明两种蛋白分布在细胞质同一层面, 荧光共振能量转移 (FRET) 分析表明能量转移效率 > 5%, 与对照相比有显著区别 ($P < 0.05$)。**结论** 激光扫描共聚焦及 FRET 实验结果都证明了 TrkA 膜内区与 snapin 两个蛋白之间存在着直接的相互作用。

关键词 TrkA snapin 激光扫描共聚焦 荧光共振能量转移 蛋白质相互作用

Direct Interaction between TrkA and Snapin. Wang Lan, Cui Yingbin, Ma Xiaoli, Chen Hong, Wang Xin, Huang Bingren. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To prove the presence of the direct interaction between TrkA and snapin. **Methods** By using DNA recombinant technique, the plasmids, pECFP - TrkAICD and pEYFP - snapin were constructed for expressing fused enhanced cyan fluorescent protein - TrkAICD and fused enhanced yellow fluorescent protein - snapin. After co - transfection of HEK 293 cell with these two plasmids, the study was performed with confocal laser scanning microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET). **Results** It was successful to construct the fused fluorescent protein - expressing plasmids related with TrkAICD and snapin. After co - transfection of cells with them, confocal laser scanning microscopy analysis showed that these two protein were contributed to the same faultage in the cytoplasm. Fluorescence resonance energy transfer analysis showed that the energy transfer efficiency > 5%, and it was significant to com-

pare with negative control, with the $P < 0.05$. **Conclusion** Confocal laser scanning microscopy analysis and fluorescence resonance energy transfer analysis prove respectively that there is a direct interaction between TrkA and snapin.

Key words TrkA; snapin; Confocal laser scanning; Fluorescence resonance energy transfer; Proteins interaction

神经递质在神经元的增殖、分化、凋亡、存活等生命过程中起着非常重要的作用,其中神经生长因子(NGF)功能的发挥主要靠 Trk 受体家族和 p75^{NTR} 两种膜受体的存在。其中 TrkA 受体的稳定可以增强 NGF 诱导的神经突触的生长^[1]。Trk 家族受体是 1 种酪氨酸激酶受体,包括 TrkA、TrkB、TrkC,其膜内区的酪氨酸被磷酸化后,可以被其他信号分子识别,为信号的传导提供有关蛋白的募集位点,进而调节 PLC- γ 途径、PI₃K 途径、MAPK 等信号转导途径^[2]。

Snapin 蛋白最初是在神经细胞中作为与 SNARE 复合物中的 SNAP-25 结合蛋白被发现的,在神经细胞中表达量丰富,研究发现 snapin 主要分布在突触囊泡膜上^[3]。后又有研究表明其在非神经细胞质中也有表达。snapin 分子质量约为 15kDa,由 136 个氨基酸组成;其二级结构大部分为 α -螺旋^[4],N-末端有 1 个疏水区(1~20aa),C-末端含有由两个螺旋区 H1 和 H2 形成的卷曲螺旋(coiled-coil),该螺旋结构域在许多种属的囊泡融合蛋白中高度保守。人们发现 snapin 蛋白功能的发挥主要通过卷曲螺旋与其他蛋白相互作用来实现。snapin 在细胞内的囊泡运输过程中,调节囊泡锚定和神经递质释放之间的 1 个步骤,降低逆反应^[5],另外也有研究发现 snapin 能促进突触囊泡的融合^[6]。

已有实验证明 snapin 可以与肝细胞生长因子的受体 Met 相互作用^[7],由于 TrkA 与 MET 相比具有 37% 的同源性,所以我们推测 TrkA 可能也与 snapin 相互作用进而参与神经递质的传递过程。本研究应用激光扫描共聚焦显微镜、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)实验确认了 TrkA 与 snapin 蛋白间的直接相互作用。

材料与方 法

1. 主要材料:人脑 cDNA 文库由本实验室保存;pGEM-T Easy Vector 为 Promega 公司产品;Tag 酶、dNTP 和内切酶为 TaRaKa 公司产品;PCR 引物由上海生工生物技术公司合成;HEK 293T 细胞、pEYFP-N1、pECFP-N1、大肠杆菌 DH5 α 均为本实验室保存;细胞培养所用的 DMEM 培养基为美国 GIBCO 公司产品,胎牛血清为四季青公司产品,转染试剂购自 Vigorous 公司。其他化学试剂均为进口分装或国产分析纯产

品。

2. 实验涉及的引物及表达载体的构建:引物由上海生工公司合成,根据 GeneBank 中人的 TrkA 蛋白的基因序列设计并合成其膜内区的上游引物:5'-CGGAATTCGGGCCACCAT-GAACAAATGTGGACGGAGAAAC-3',膜内区的下游引物:5'-CGGGATCCCGGCCAGGACATCCAGGTAGACAGGAG-3',引物分别含 EcoRI 或 BamHI 酶切位点,以实验室先前构建好的 pCMV-HA-TrkAICD 为模板,扩增 TrkA 蛋白膜内区(ICD)片段并克隆至真核细胞表达载体 pECFP-N1,进行酶切鉴定并测序证实无误。根据 GeneBank 中人的 snapin 蛋白的基因序列设计并合成其上游引物:5'-CGGAATTCGGGCCACCATGGCGGGGGCTGTTCCGCCG-3',下游引物:5'-CGGGATCCCGTTTGCCTGGGAGCCAGGG-3',引物分别含 EcoRI 或 BamHI 酶切位点,以人脑 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增,将扩增得到的 snapin 目的条带回收、克隆到真核细胞表达载体 pEYFP-N1,进行酶切鉴定并测序证实无误。

3. 激光扫描共聚焦及荧光共振能量转移(FRET)实验:将 HEK 293T 细胞接种到含有盖玻片的 6 孔板中,让细胞爬片。约 24h 后,共转染 pECFP-N1-TrkAICD 和 pEYFP-N1-snapin 质粒至爬片的 293T 细胞中,24h 后,倒掉培养基并用 PBS 轻洗两遍细胞。加入 4% 多聚甲醛固定液室温固定 10min 后 PBS 洗细胞 3 遍,取出盖玻片,沥干水分。盖在滴有防淬灭甘油(10 μ l)的载玻片上,指甲油封边,室温晾干。激光共聚焦显微镜下观看细胞。找到共表达的细胞后,选取其定位的区域,激光淬灭黄色荧光部分,时间为 20s,再查看该区域蓝色荧光蛋白的荧光强度。计算荧光共振能量转移效率,在本实验中,青色荧光蛋白为供体(donor),黄色荧光蛋白为受体(acceptor),计算公式为:FRET_{Eff} = $\frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}}$ for all $D_{post} > D_{pre}$ 。

结 果

1. TrkAICD 及 snapin 片段的扩增及荧光表达载体的构建及酶切鉴定:PCR 扩增出如图 1A 所示片段,TrkA 膜内区及 snapin 片段大小与理论值基本一致。它们被 EcoRI 和 BamHI 双酶切后分别克隆入被同样酶切后的增强型青色荧光蛋白表达载体(pECFP-N1)及增强型黄色荧光蛋白表达载体(pEYFP-N1)后获得了重组质粒 pECFP-N1-TrkAICD、pEYFP-N1-snapin。将重组质粒分别以 EcoRI 及 BamHI 酶切后获得的克隆片段分子质量正确(图 1B、C),核苷酸顺序测定证实克隆基因正确、读码框架无误。

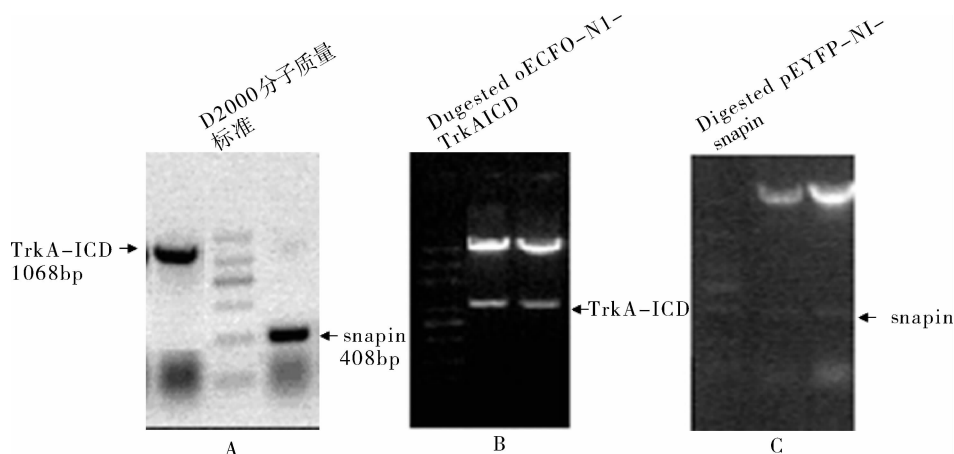


图 1 TrkA-ICD 和 snapin 的 PCR 扩增及其它们重组克隆的酶切鉴定

A. TrkA-ICD(左)和 snapin(右)的 PCR 扩增片段的 2% 琼脂糖凝胶电泳及 EB 染色;B. 重组质粒 pECFP-N1-TrkAICD 的 EcoR I 及 BamH I 双酶切;C. 重组质粒 pEYFP-N1-snapin 的 EcoR I 及 BamH I 双酶切

2. 激光扫描共聚焦实验: 本实验中, 共转染 pECFP-N1 + pEYFP-N1 至 HEK 293T 细胞, 24h 后固定制片, 作为对照组。实验组则是共转染 pECFP-N1-TrkAICD + pEYFP-N1-snapin 至 HEK 293T 细胞, 24h 后固定制片。在激光共聚焦显微镜观察时, 发现青色荧光蛋白融合的 TrkAICD 和黄色荧光蛋白融合的 snapin 在同一激光层切面的同一位置上表达, 经图像合成后该位置变成绿色, 表明 snapin 和 TrkA 可以共同存在于细胞的同一位置, 存在着直接的相互作用(图 2)。

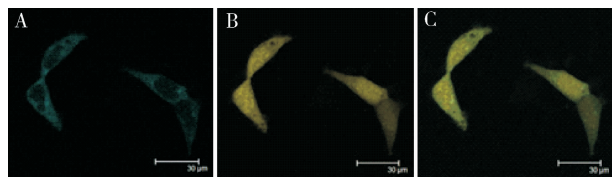


图 2 共转染 HEK293 细胞的激光共聚焦显微镜观察图像

A. 共转染 HEK293 细胞中融合的青色荧光蛋白 TrkAICD-ECFP 图像;B. 共转染 HEK293 细胞中融合黄色荧光蛋白 snapin-EYFP 图像;C. 青色荧光蛋白 TrkAICD-ECFP 与黄色荧光蛋白 snapin-EYFP 的重叠

3. 荧光共振能量转移(FRET): 采用光漂白的方法^[8], 淬灭青色荧光的不同区域, 测算能量转移及转移效率, 同时计算出对照组的能量转移及转移效率, 两组转移效率的平均值进行比较, 结果差异显著, 在对照组能量转移效率不到 1% 的情况下, 实验组转移效率约 25%, 说明供体 TrkA 与受体 snapin 之间存在着明确的能量转移, 也就说明两者之间存在着直接的

相互作用(图 3)。

讨 论

本实验中构建了 pECFP-N1-TrkAICD 和 pEYFP-N1-snapin 这一对真核表达载体, 空载体作为对照。激光共聚焦显微镜下观察, snapin 和 TrkAICD 在细胞质中共表达。在共表达的区域选择不同区域, 淬灭荧光受体 EYFP-snapin, 这时受体的能量减少, 而供体的能量会有所增加, 根据公式计算出供体和受体之间能量转移效率, 进行统计学分析, 结果实验组的能量转移效率远远大于对照组的能量转移效率。这一结果又有力地证明了 snapin 和 TrkA 之间的相互作用。在本实验中, 我们还发现 snapin 蛋白在细胞核内也有表达, 而这在目前文献中尚未见报道, 这一现象提示我们 snapin 蛋白是否与细胞核内的某些反应机制相关联, 有待深入研究。

目前国内外对于 snapin 功能的研究取得了很大的进展, 在已发现的 snapin 功能中, 几乎所有功能的行使都是通过调节 snapin 的磷酸化来实现的, 而且也已有研究证明 snapin 是 PKA(蛋白激酶 A)、CK1δ(酪蛋白激酶 1)的底物^[9,10]。这些研究成果给我们这个课题的研究提供了一定的思路和线索, 因为 TrkA 具有酪氨酸激酶的活性, 它是否也是通过磷酸化 snapin 来影响 snapin 功能的行使, 同时 snapin 又会有哪些新的功能会被我们研究发现, 是值得我们思考 and 研究的。相信这一系列谜团揭开之后, 会对囊泡运输及神经递质的释放机制能有一个更深刻的了解和认识。

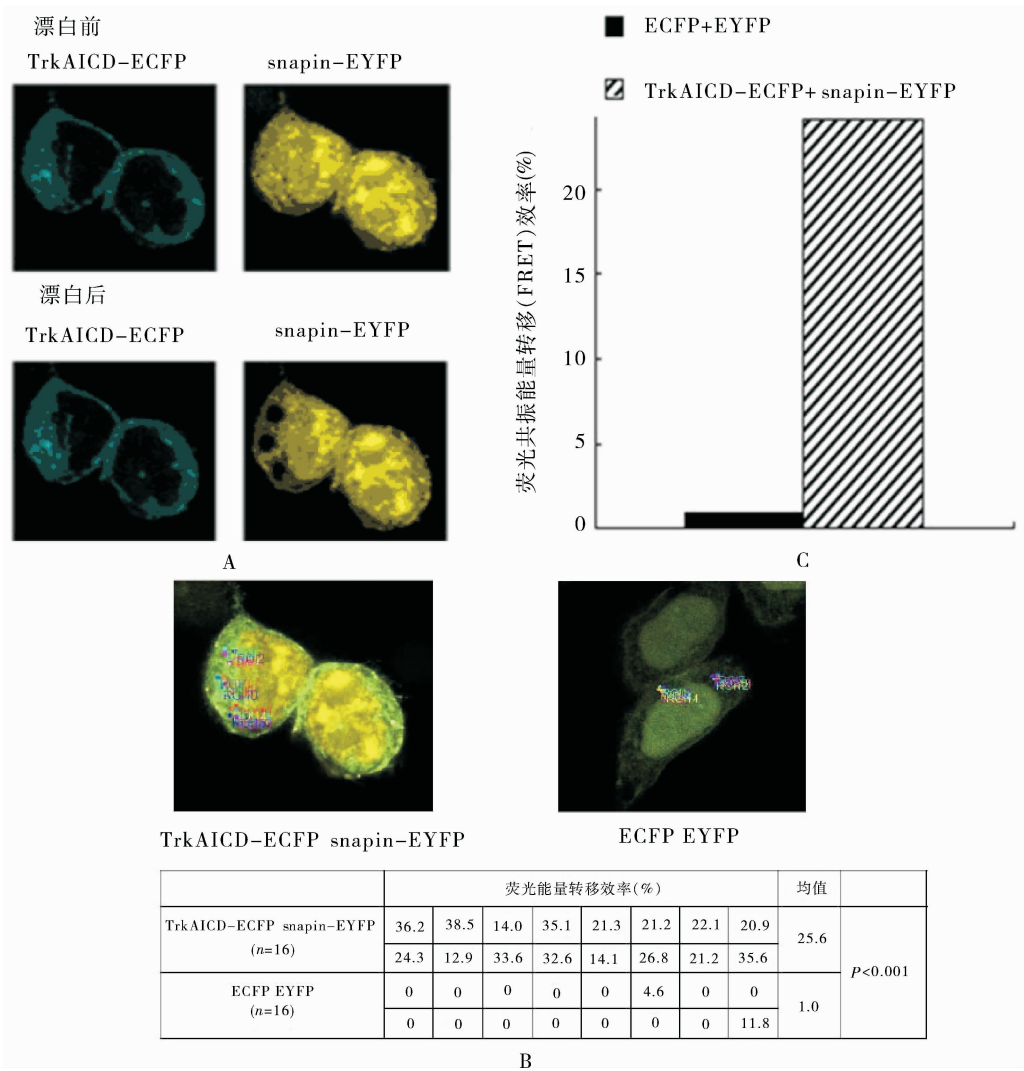


图3 荧光共振能量转移(FRET)实验及其效率

A. 荧光共振能量转移实验漂白前后的供体 TrkAICD - ECFP 和受体 snapin - EYFP;B. 实验组与对照组的在不同区域在光漂白后的能量转移效率值;C. 荧光共振能量转移实验中对照组与实验组的能量转移效率比较图(样本量 $n = 16$)

参考文献

1 Song EJ, Yoo YS. Nerve growth factor - induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors[J]. BMB reports, 2011, 44(3):182 - 186

2 Alfa RW, Tuszyński MH, Blesch A. Novel inducible tyrosine kinase receptor to regulate signal transduction and neurite out growth[J]. Neurosci Res, 2009, 87, 2624 - 2631

3 Ilardi JM, Mochida S, Sheng ZH. Snapin: a SNARE - associated protein implicated in synaptic transmission[J]. Nat Neurosci, 1999, 2(2):119 - 124

4 Gowthaman R, Silvester AJ, Saranya K, et al. Modeling of the potential coiled - coil structure of snapin protein and its interaction with SNARE complex[J]. Bioinformation, 2006, 1(7):269 - 275

5 Tian JH, Wu ZX, Unzicker M, et al. The Role of snapin in neurosecretion: snapin knock - out mice exhibit impaired calcium - dependent exocytosis of large dense - core vesicles in chromaffin cells[J]. J Neuroscience, 2005, 25(45):10546 - 10555

6 Pan PY, Tian JH, Sheng ZH. Neuron Snapin facilitates the synchronization of synaptic vesicle fusion[J]. 2009, 61(3):412 - 424

7 Schaaf CP, Benzing J, Schmitt T, et al. Novel interaction partners of the TPR/MET tyrosine kinase[J]. FASEB, 2004, 19(2):267 - 269

8 Wang Y, Tang Y, Teng L, et al. Association of β - arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll - like receptor - interleukin 1 receptor signaling[J]. Nature immunology, 2006, 7(2):139 - 147

9 Chheda MG, Ashery U, Thakur P, et al. Phosphorylation of snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(4):331 - 338

10 Wolffa S, Stotera M, Giamasa G, et al. Casein kinase 1 delta (CK1delta) interacts with the SNARE associated protein snapin[J]. FEBS Letters, 2006, 580:6477 - 6484

(收稿:2011 - 04 - 27)
(修回:2011 - 05 - 05)