

# 重组人 p75NTR169 - Fc 抗酶裂嵌合体在大肠杆菌中的表达、纯化及活性鉴定

景丽玲 王 欣 陈 虹 张俊文

**摘 要** **目的** 制备重组人 p75NTR169 - Fc 融合蛋白,其是一种潜在的抗凋亡和止痛的候选药物。**方法** (1)应用 PCR 法,以本组保存的 pUC12 - NGFR 和人肝 cDNA 为模板,扩增出 p75NTR(1 ~ 169 氨基酸),IgG Fc(216 ~ 433 氨基酸)基因顺序,再按照重叠 PCR 的原则和方法,将两组扩增产物混合变性、复性后再扩增,得到“p75NTR(1 ~ 169) - IgG Fc(216 ~ 433)”融合基因,缩写为 p75NTR169 - Fc。(2)应用 DNA 重组技术将 p75NTR169 - Fc 融合 DNA 片段经 Nco I、EcoR I 酶切插入到 pET28a(+)原核表达载体中,获得 pET28a - p75NTR169 - Fc 重组质粒。(3)利用 pET28a(+)/BL21(DE3)原核表达系统诱导表达目的蛋白,经 protein A 亲和层析纯化,得到纯度约 96% 的 p75NTR169 - Fc 重组蛋白质。(4)用 MTT 方法,以 PC12 细胞检验不同剂量重组蛋白抗  $\beta$ -淀粉样肽(A $\beta$ 25 ~ 35)细胞毒的作用。**结果** (1)成功构建了 pET28a - p75NTR169 - Fc /BL21(DE3)表达系统,其高效表达可溶性重组蛋白。实验表明:该重组蛋白 p75NTR169 - Fc 稳定性好,不再被蛋白酶降解,为单一条带。亲和层析纯化后,分子质量均一。(2)p75NTR169 - Fc 与 p75NTR 竞争结合 A $\beta$ (25 ~ 35),拮抗 A $\beta$ (25 ~ 35)对 PC12 的细胞毒作用。**结论** 重组人抗酶裂嵌合体蛋白 p75NTR169 - Fc 具有生物学活性,在临床治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)上具有应用前景,系针对神经退行性疾病的新的候选药物。

**关键词** p75NTR169 - Fc p75NTR  $\beta$ -淀粉样肽(A $\beta$ )

**Purification and Functional Study of the E. coli Expressed Chimeric, Protease - Resisting, Recombinant Human Protein p75NTR169 - Fc.**

Jing Liling, Wang Xin, Chen Hong, Zhang Junwen. Institute of Basic Medical Sciences, National Laboratory of Medical Molecular Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

**Abstract Objective** To express a chimeric protein p75NTR169 - Fc which may be a new type of drug and has the function of anti - apoptosis and pain relief potentially. **Methods** (1)PCR was used to amplify the gene of p75NTR(1 - 169) and Fc(216 - 433) using pUC12 - NGFR and human liver cDNA as templates and to join them together by overlapping PCR to get the fusion gene of p75NTR(1 - 169) - Fc(216 - 433), abbreviated as p75NTR169 - Fc. (2)In order to obtain the recombinant vector pET28a - p75NTR169 - Fc, the DNA fragment of p75NTR169 - Fc was cleaved by the enzymes Nco I and EcoR I and then inserted into pET28a(+) vector. (3)The recombinant protein p75NTR169 - Fc was expressed in prokaryotic expression system of pET28a(+)/BL21(DE3) and purified by protein A affinity chromatography. (4)The protection effects of different doses of recombinant protein p75NTR169 - Fc on PC12 cells from the cytotoxicity induced by A $\beta$ (25 - 35) were investigated by MTT method. **Results** (1)Recombinant protein p75NTR169 - Fc was expressed with a efficient soluble manner in the prokaryotic expression system of pET28a(+)/BL21(DE3) and showed stability to protease. (2)p75NTR169 - Fc could protect PC12 cells from the cytotoxicity induced by A $\beta$ (25 - 35). **Conclusion** The recombinant human p75NTR169 - Fc is successfully expressed in E. coli BL21(DE3) and its purity can reach to 96% by protein A affinity chromatography and it is a new anti - protease protein with biological activities and may be a new drug candidate for application in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

**Key words** p75NTR169 - Fc;p75NTR; $\beta$ -amyloid(A $\beta$ )

p75NTR(neurotrophins receptor, p75)属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,最初被认定是神经营养素(neurotrophins, NTs)的“通用”受体,但随着对其研究

的深入,发现 p75NTR 可以和不同的配体,如 proNGF、 $\beta$ -淀粉样肽(beta amyloid, A $\beta$ )以及和共受体,如 Trk, NgR 及 Sortilin 等结合,不仅介导神经元的存活、分化、轴突的生长,还可以介导神经元的死亡<sup>[1-3]</sup>。p75NTR 与 sortilin 作为 proNGF(proneurotrophins)的受体介导细胞死亡<sup>[4]</sup>。近年来在神经退行性疾病的研究中,p75NTR 作为 A $\beta$  的受体越来越

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者:王欣,电子信箱:sw1610@sina.com

引起关注<sup>[5-7]</sup>。在神经退行性疾病动物模型中,上调 p75NTR 的水平,导致更多的神经元凋亡。海马和大脑皮质的胆碱能神经元丢失是 AD 发病的早期特点,而这些神经元都是高表达 p75NTR 的<sup>[8]</sup>。将 A $\beta$  作用于从 p75NTR 基因敲除小鼠分离得到的海马神经元,与 A $\beta$  作用于富含 p75NTR 的海马神经元相比, A $\beta$  不能引起 p75NTR 基因敲除的海马神经元的凋亡却能引起富含 p75NTR 的海马神经元的凋亡<sup>[5]</sup>。因此, p75NTR 已成为研究治疗神经退行性疾病如阿尔茨海默病等的一个热点。

研究显示, p75NTR 是通过胞外区结构域和配体结合,胞内区结构域激活介体 (mediators) 而发挥效应<sup>[9-11]</sup>。笔者曾经用毕赤酵母成功的表达过 p75NTR194 - Fc 重组蛋白,但发现该重组蛋白的纯化产物中大部分为其蛋白酶降解产物,氨基端氨基酸顺序测定证实:蛋白酶切位点位于 p75NTR 170 位氨基酸。因此,本研究中,我们重新表达了由 p75NTR 胞外区 1 ~ 169 位氨基酸构成的 p75NTR169 与人 IgG Fc 融合的重组蛋白。该重组蛋白特点为:①保留了 p75NTR 配体结合区,删除掉蛋白酶解位点,将不再有因为酶裂产生的低分子质量 p75NTR - Fc 融合蛋白;②融合人 IgG Fc 片段后将延长重组蛋白半衰期并方便蛋白纯化。重组蛋白 p75NTR169 - Fc 的生物活性实验研究显示:该重组蛋白能够抵抗 A $\beta$  (25 - 35) 对 PC12 的细胞毒作用,抑制由 NGF 刺激引起 PC12 细胞轴突的生长,具有同 NGF 抗体相同的效果。

### 材料与方法

1. 材料:大鼠 PC12 嗜铬细胞瘤细胞系,购自北京协和医学院细胞中心,培养液为含有 5% 马血清及 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 (Hyclone 公司产品)。大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ ,用于质粒的扩增和转化;大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 是 pET 系列质粒表达的宿主菌,质粒 pET - 28a(+) 系蛋白表达载体,均由本室保存。A $\beta$  (25 ~ 35) 购自 Sigma 公司;纯化基质 HiTrap rProtein A FF 购自 GE 公司;神经生长因子 NGF 为 R&D 公司产品;兔源多克隆抗 p75NTR 抗体购自 ABCAM 公司;兔源多克隆抗 NGF 抗体购自 Santa Cruze 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。所有引物及基因测序由北京奥科生物有限公司完成。

2. 方法:(1) p75NTR169 的胞外区、IgG 重链铰链区和 Fc 区结构域基因的扩增和拼接:参考 Gene Bank 中已知的 p75NTR 全序列,用软件 Oligo 分析后设计如下一对引物:上游引物:5' - TATACCATGG GCAAGGAGGCATGCCCCACAG - 3' (含 Nco I 识别位点);下游引物:5' - tgg gca tgt gtg agt ttt gtc

TGT AAT CCA ACG GCC AGG - 3' (小写字母示 IgG 铰链区顺序,大写字母示 p75NTR 顺序)。免疫球蛋白 IgG 重链恒定区 Fc 的 DNA 片段 (216 ~ 443) 顺序源自文献 (Capon. D. et al. Nature, 1986, 337:525 ~ 531),其上游引物 P216:5' - GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA C - 3',下游引物 P433:5' - TC-GAATTC TCATTTACCCGGAGACAGGGAG - 3' (含 EcoR I 识别位点)。以本组保存的 pUC12 - NGFR 和人肝 cDNA 为模板,用上述引物分别扩增出 p75NTR (1 ~ 169), Fc (216 ~ 433) 基因顺序,再按照重叠 PCR 的原则和方法,将两组扩增产物混合变性、复性后再扩增,得到 p75NTR (1 ~ 169) - Fc (216 ~ 433) 融合基因,缩写为 p75NTR169 - Fc (图 1)。(2) 原核表达质粒 pET28a - p75NTR169 - Fc 的构建:将上述融合基因 p75NTR169 - Fc 经 Nco I、EcoR I 酶切和回收,与经 Nco I、EcoR I 酶切的载体 pET28a(+) ,在 T4 DNA 连接酶作用下连接,连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,挑选阳性克隆、重组质粒酶切鉴定,测定克隆片段核苷酸序列。(3) 重组蛋白 p75NTR169 - Fc 表达、纯化、超滤、除菌及定量:重组质粒转化宿主表达菌 BL21 (DE3),涂铺于含有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上,37℃ 倒置培养过夜。挑选单菌落接种于含有卡那霉素的 2ml LB 培养基中,37℃,250r/min 振荡培养过夜,按 1:100 的比例接种到含卡那霉素的新 LB 培养基中,37℃,250r/min 振荡培养 2h,至 OD<sub>600</sub> 在 0.5 ~ 1.0 之间,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,于不同温度诱导表达 12 ~ 18h。8000r/min 离心 10min 收集菌体,加入细菌裂解液,超声破碎,12000r/min 离心 15min,收集上清和沉淀,SDS - PAGE 凝胶电泳及 Western blotting 检测。利用 AKTA 层析系统以 protein A 亲和层析柱纯化样品,全程低温操作以防止蛋白降解。上样前,上清需经 0.45 $\mu$ m 微孔膜过滤。亲和层析操作:用结合缓冲液 (20mmol/L PBS, pH 7.0) 以 1ml/min 的流速平衡亲和柱;将过滤后的上清样品以 0.6ml/min 的流速上样,再用结合缓冲液以 1ml/min 清洗,直至基线,然后用洗脱缓冲液 (0.1mol/L glycine - HCl, pH2.5) 洗脱,收集洗脱峰,收集管中预先加入 1mol/L, pH9.0 Tris - HCl 80 ~ 100 $\mu$ l/ml。将纯化后的样品倒入超滤管中,4℃ 离心 30min,转速不超过 6000r/min,将蛋白样品压缩至约 5ml,加入 PBS 离心,重复 2 ~ 3 次,逐步更换缓冲液。0.22 $\mu$ m 微孔膜过滤除菌,BCA 方法定量,小量分装, - 80℃ 保存。(4) 重组蛋白 p75NTR169 - Fc 基于细胞的功能实验:1) 重组蛋白 p75NTR169 - Fc 干预  $\beta$  - 淀粉样肽 A $\beta$  (25 ~ 35) 对 PC12 细胞毒的作用:以 100 $\mu$ l, 约  $1 \times 10^4$  细胞/孔将 PC12 细胞接种在 96 孔板中培养,细胞贴壁后分别进行如下分组处理,A 组:24h 后,以 1:10 体积加入终浓度为 10 $\mu$ mol/L、5 $\mu$ mol/L、1 $\mu$ mol/L A $\beta$  (25 ~ 35) 作用细胞 24h,不含 A $\beta$  (25 ~ 35) 的为对照组;B 组:24h 后,以 1:10 体积加入 p75NTR169 - Fc 融合蛋白,终浓度为 1.2 $\mu$ mol/L、0.9 $\mu$ mol/L、0.6 $\mu$ mol/L、0.3 $\mu$ mol/L、0.1 $\mu$ mol/L、0 $\mu$ mol/L;C 组:24h 后,以 1:10 体积加入终浓度 5 $\mu$ mol/L A $\beta$  (25 ~ 35) 与不同浓度的 p75NTR169 - Fc (分别为 0、0.1、0.3、0.6、0.9、1.2 $\mu$ mol/L)。每组设 5 个平

行孔,24h后进行MTT检测。2)p75NTR169-Fc重组蛋白阻止NGF引起的PC12细胞分化:以100微升/孔,约 $5 \times 10^3$ 细胞/孔接种PC12细胞于96孔板中培养。细胞贴壁约24h后,以1:10体积加入终浓度50ng/ml的NGF与不同浓度的NGF抗体或p75NTR169-Fc(分别为0、12.5、50、100ng/ml),设100ng/ml的p75NTR169-Fc及正常培养的PC12细胞为对照组,每组3个平行孔。48h后每组随机选取视野拍照。(5) $A\beta$ (25~35)的准备:1mg的 $A\beta$ (25~35)用高压灭菌的去离子水溶解配成终浓度200 $\mu$ mol/L, -20℃存放。使用前在37℃温育24h。

3. 统计学方法:采用SPSS 18.0统计软件进行单因素方差分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 结 果

1. 重组蛋白基因的获得、在原核中的诱导表达及亲和纯化:p75NTR包括胞外区(extracellular domain, ECD)、茎区、跨膜区(transmembrane, TM)、胞内区(intracellular domain, ICD)4区(图1A),p75NTR194-Fc含有170位氨基酸的蛋白酶裂位点(图1B),而p75NTR169-Fc保留了完整胞外区和部分茎区的共169个氨基酸,是由人IgG的铰链区链接Fc段融合而成,该重组蛋白不含有p75NTR 170位氨基酸以后顺序(图1C)。

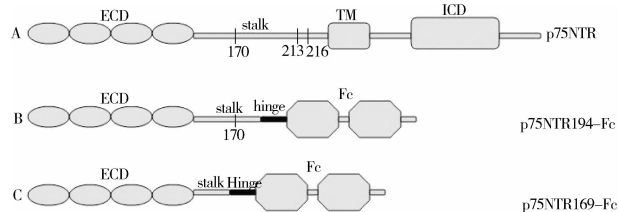


图1 抗酶裂嵌合体p75NTR169-Fc的设计

A. p75NTR全长胞外区、茎区、跨膜区、胞内区结构域示意图,茎区酶切位点用竖条标示;170位酶切位点由本实验室鉴定,213/216位由Zampieri N等<sup>[12]</sup>鉴定;B. p75NTR194-Fc含有170位酶切位点,包括胞外区、部分茎区、铰链区连接IgG Fc;C. p75NTR169-Fc不含酶切位点

按照重叠PCR的原则和方法,将两组扩增产物混合变性、复性后再扩增,得到预期大小(1188bp)p75NTR169-Fc融合基因,如图2A。融合基因插入到表达载体pET28a(+)后,重组质粒经酶切及DNA测序证实片段的大小、碱基序列和读码框正确。表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),经IPTG诱导表达后,SDS-PAGE电泳,发现在约50kDa大小处有一特异表达条带,见图2B。为进一步验证箭头所指条带为p75NTR169-Fc重组蛋白。经anti-IgG抗体及anti-p75NTR抗体进行Western blotting鉴定,50kDa

特异条带确实为重组蛋白,见图2C。从图2B可见,蛋白的可溶性表达在25℃及37℃没有明显差异,所以在以后试验中,我们选择室温条件(约25℃)诱导表达。诱导表达的细菌裂解上清液经protein A亲和层析柱纯化,将分步收集到的蛋白进行SDS-PAGE电泳,银染鉴定,如图2D,可见纯化后杂蛋白较少,凝胶扫描纯度分析所得产品纯度可达到96%。

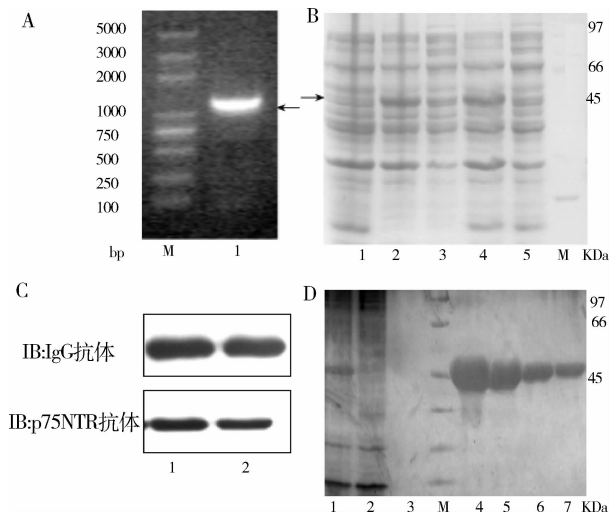


图2 重组蛋白基因的获得、在原核中的诱导表达、

### Western blotting 鉴定及亲和纯化

A. PCR扩增p75NTR169-Fc, M. DNA标志物, 1. p75NTR169-Fc cDNA片段(1188bp); B. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析在37℃和25℃由1mmol/L IPTG诱导表达的p75NTR169-Fc重组蛋白, M. protein标志物; 1. 未经诱导的全菌裂解液, 2、3. 分别示37℃由1mmol/L IPTG诱导表达的全菌和上清, 4、5. 分别示25℃由1mmol/L IPTG诱导表达的全菌和上清; C. 用IgG抗体和p75NTR抗体Western blotting鉴定p75NTR169-Fc重组蛋白, 1. 全菌裂解液作为抗原, 2. 上清作为抗原; D. 银染鉴定protein A亲和纯化后的p75NTR169-Fc重组蛋白, 1. 上清, 2. 上样后流出液, 3. 结合缓冲液洗柱后流出液, 4~7. 经洗脱后收集的重组蛋白p75NTR169-Fc

2. p75NTR169-Fc重组蛋白抑制 $A\beta$ (25~35)寡聚肽对PC12的细胞毒作用:根据文献报道, $A\beta$ 通过p75NTR促进细胞的凋亡<sup>[-5~8]</sup>。本研究中,我们通过MTT检测 $A\beta$ (25~35)寡聚肽对PC12的细胞毒性,发现PC12暴露于10 $\mu$ mol/L和5 $\mu$ mol/L $A\beta$ (25~35)24h后,细胞活性显著下降,与不加 $A\beta$ (25~35)的对照组相比, $A\beta$ (25~35)引起的细胞凋亡有显著性差异(10 $\mu$ mol/L, 5 $\mu$ mol/L;  $P < 0.05$ ),如图3A;单加0.1~1.2 $\mu$ mol/L的p75NTR169-Fc重组蛋白对PC12细胞活性没有明显的影响( $P > 0.05$ ),如图3B;如加入5 $\mu$ mol/L的 $A\beta$ (25~35),同时又加入不同浓度的p75NTR169-Fc,与只加5 $\mu$ mol/L $A\beta$

(25 ~ 35) 的对照组相比,0.6 $\mu$ mol/L 至 1.2 $\mu$ mol/L p75NTR169 - Fc 均能抑制 A $\beta$ (25 ~ 35) 引起的细胞凋亡,具有统计学意义( $P < 0.05$ ),如图 3C。每组实验重复 3 次以上,证明 p75NTR169 - Fc 对 A $\beta$ (25 ~ 35) 寡聚肽引起的 PC12 细胞毒性有抑制作用。

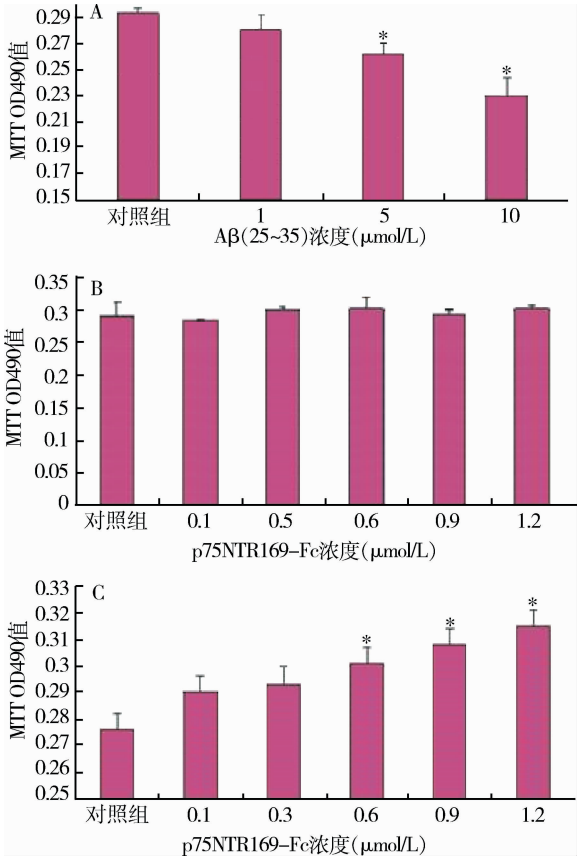


图 3 p75NTR169 - Fc 重组蛋白抑制 A $\beta$ (25 ~ 35) 寡聚肽对 PC12 细胞的毒性作用

A. 不同剂量 A $\beta$ (25 ~ 35) 对 PC12 的细胞毒作用;B. 单加 p75NTR169 - Fc 对 PC12 细胞活性没有显著影响;C. p75NTR169 - Fc 重组蛋白抑制 A $\beta$ (25 ~ 35) 寡聚肽对 PC12 细胞的毒性作用。与对照组比较,\*  $P < 0.05$  有显著性差异

3. p75NTR169 - Fc 重组蛋白能够中和 NGF 引起的 PC12 细胞分化:NGF 与 p75NTR 及 TrkA 结合可以促进细胞的分化,NGF 抗体与 NGF 结合阻止其与受体相互作用。PC12 细胞易分化,表现为细胞从圆形的半贴壁变为多边形或锥形的贴壁细胞,实验中,与只加培养基的对照组相比(图 4B 或图 4C),加入 NGF 可以明显的引起 PC12 细胞体积变大并产生神经突起,长度可以达到细胞直径的 3 倍,如图 4A;加入 NGF 与不同浓度的 NGF 抗体后,可以观察到 NGF 引起的 PC12 细胞分化受到不同程度的抑制,如图 4D ~ F;加入 NGF 与不同浓度的重组蛋白

p75NTR169 - Fc 后,也可以观察到 NGF 引起的 PC12 细胞分化受到明显的抑制,如图 4G ~ I。

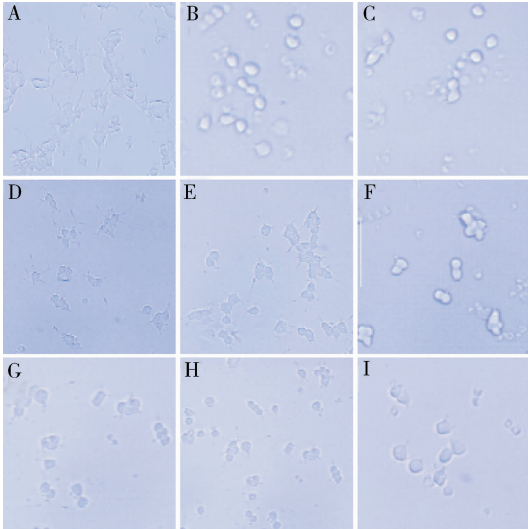


图 4 p75NTR169 - Fc 重组蛋白对 NGF 引起的 PC12 细胞分化的影响 (  $\times 100, 48h$  )

A. 50ng/ml NGF 作用的 PC12 细胞组;B. 正常培养的 PC12 细胞组;C. 100ng/ml p75NTR169 - Fc 作用的 PC12 细胞组;D ~ F. 50ng/ml NGF 与不同浓度 NGF 抗体(12.5、50、100ng/ml)作用的 PC12 细胞组;G ~ I. 50ng/ml NGF 与不同浓度 p75NTR169 - Fc (12.5、50、100ng/ml)作用的 PC12 细胞组

讨 论

$\beta$  - 淀粉样肽[ A $\beta$ (40 ~ 42) ] 是一种神经毒性多肽,在 AD 病变中起到了主导作用<sup>[13]</sup>。它的低聚物是 A $\beta$  最强毒性形式,导致 AD 患者突触传导中神经元死亡、神经炎性病变和功能障碍<sup>[14]</sup>。脑中 A $\beta$  的水平,是通过淀粉样前体蛋白( APP) 分解产生的,正常生理状态下,新产生的 A $\beta$  与经过酶降解和运输清除掉的 A $\beta$  维持在一个动态平衡水平<sup>[15]</sup>。在神经退行性疾病的细胞研究模型中,上调或通过配体激活 p75NTR 都可以导致神经元的死亡<sup>[8]</sup>。A $\beta$  与 p75NTR 结合后,其胞内区激活下游信号分子如 JNK, NF -  $\kappa$ B 等以及介导 tau 蛋白磷酸化,最终介导细胞死亡<sup>[1]</sup>。基于上述主要理论,我们设计并在原核系统中成功的表达了重组蛋白 p75NTR169 - Fc,期望其类似 p75NTR 游离受体的活性能够结合 A $\beta$  并抵抗其毒性作用,为 AD 治疗开辟新途径。

重组人抗酶裂嵌合体蛋白 p75NTR169 - Fc 保留了 p75NTR 完整的胞外区和茎部 9 个氨基酸,去掉了易受蛋白酶攻击的部分,使其不再被蛋白酶降解而提高了重组蛋白的稳定性,我们之前表达的重组蛋白 p75NTR194 - Fc 稳定性差,极易被蛋白酶降解<sup>[16]</sup>;在 p75NTR169 - Fc 羧基端融合了 IgG 的 Fc 段,方便了

蛋白纯化。在重组 DNA 设计时,通过合理使用质粒本身的酶切位点,目的蛋白不带有任意标签。经凝胶扫描纯度分析显示终产品纯度可达 96%,为研究其活性提供了保证。此外 Fc 段蛋白的融合也为延长重组蛋白的半衰期提供了可能性。

A $\beta$ (25~35)保留了 A $\beta$  全长的毒性,常用于 A $\beta$  的毒性研究。我们通过 MTT 法研究 A $\beta$ (25~35)对 p75NTR 阳性的 PC12 的细胞毒作用,表明 10  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L A $\beta$ (25~35)作用 24h 可以明显杀伤 PC12 细胞。而重组蛋白 p75NTR169-Fc 可以有效地抑制 A $\beta$ (25~35)引起的细胞毒性。有趣的是,在本研究中,重组蛋白 p75NTR169-Fc 的浓度 600nmol/L 比 5  $\mu$ mol/L A $\beta$ (25~35)低近 10 倍的情况下,仍可有效地与 p75NTR 竞争,可能与该重组蛋白氨基端的 p75NTR 的胞外区(ECD)对 A $\beta$  的高亲和力结合有关。

为了更好地研究重组蛋白 p75NTR169-Fc 与配基结合的生物学活性,我们通过 PC12 细胞轴突生长实验,发现重组蛋白可以抑制 NGF 引起的轴突生长。根据文献报道,p75NTR 与 trkA 受体介导 NGF 引起的轴突生长和突触连接<sup>[2]</sup>。在我们的实验中,50ng/ml 的 NGF 刺激 PC12 细胞轴突生长;同时加入 NGF 与 NGF 抗体或者重组蛋白 p75NTR169-Fc,与只加 NGF 相比,神经轴突明显变短、数量变少,随着 NGF 抗体或者重组蛋白 p75NTR169-Fc 剂量的增加,抑制轴突生长的程度更加明显。毋庸置疑,NGF 抗体是通过竞争游离的 NGF,而减少 NGF 与受体相互作用的机会,而重组蛋白 p75NTR169-Fc 保留了和配体结合的胞外结构域,理论上讲,其可以和 NGF 结合,但由于其不含传递细胞外信号的跨膜区和胞内结构域,所以重组蛋白 p75NTR169-Fc 和 p75NTR 竞争结合 NGF,而不能发挥刺激轴突生长的功能。proNGF 是 NGF 未经蛋白酶切割的前体,也是 NGF 在 AD 中存在的主要形式。有研究表明,proNGF 通过 p75NTR 抑制神经轴突的生长。p75NTR169-Fc 作为新型重组蛋白,与 p75NTR 竞争结合配体,有望在 AD 的治疗中,除了结合 A $\beta$  也能结合 proNGF 而发挥一箭双雕的作用。

针对 p75NTR 为药物靶点的研究,不少研究者做了很多的工作,如 Yaar M 等合成的 NGF  $\beta$  发夹环类似物可以和 A $\beta$  竞争结合 p75NTR,从而保护神经元免受 A $\beta$  介导的毒性作用,而我们构建的重组蛋白 p75NTR169-Fc 与 p75NTR 竞争结合 A $\beta$ ,同样是为了保护神经元免受 A $\beta$  的毒性作用。尽管该工作还

有待更深一步的研究,但重组人抗酶裂嵌合体蛋白 p75NTR169-Fc 是一个有生物活性的新型抗凋亡蛋白,有可能为阿尔茨海默病等神经退行性疾病的治疗开辟了又一途径。

### 参考文献

- 1 Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor[J]. *Prog Neurobiol*,2002, 67(3):203-233
- 2 Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease[J]. *Prog Neurobiol*,2005, 77(3):201-214
- 3 Chao MV. The p75 neurotrophin receptor[J]. *J Neurobiol*,1994, 25(11):1373-1385
- 4 Nykjaer A, Lee R, Teng KK, *et al.* Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death[J]. *Nature*,2004, 427(6977):843-848
- 5 Sothibundhu A, Sykes AM, Fox B, *et al.* Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor[J]. *J Neurosci*,2008, 28(15):3941-3946
- 6 Costantini C, Rossi F, Formaggio E, *et al.* Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death[J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 25(2):141-156
- 7 Yaar M, Zhai S, Pilch PF, *et al.* Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease[J]. *J Clin Invest*,1997, 100(9):2333-2340
- 8 Wu CK, Thal L, Pizzo D, *et al.* Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease[J]. *Exp Neurol*, 2005, 195(2):484-496
- 9 Coulson EJ, Reid K, Baca M, *et al.* The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling[J]. *Prog Brain Res*,2004, 146:41-62
- 10 Coulson EJ, Reid K, Baca M, *et al.* Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death[J]. *J Biol Chem*,2000, 275(39):30537-30545
- 11 Welcher AA, Bitler CM, Radeke MJ, *et al.* Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991, 88(1):159-163
- 12 Zampieri N, Xu CF, Neubert TA, *et al.* Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains[J]. *J Biol Chem*,2005, 280(15):14563-14571
- 13 Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration:cause or effect? [J]. *J Clin Invest*,2004, 114(1):23-27
- 14 Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, *et al.* In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity[J]. *Brain Res*,1991, 563(1-2):311-314
- 15 Roger N, Rosenberg MD. Translational research on the way to effective therapy for Alzheimer disease[J]. *Arch Gen Psychiatry*,2005, 62(11):1186-1192
- 16 周素芳,王欣,陈虹,等. p75NTR-Fc 融合蛋白在毕赤酵母中的表达、鉴定和活性分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(5):604-609

(收稿:2011-07-11)

(修回:2011-07-22)