

用基因转染方法转运神经营养因子 (GDNF) 进入脑的体外研究

蒋 晨*, 沢田康文

(九州大学 药学府 临床药学讲座制剂设计学分野, 日本, 福岡, 812 - 8583)

关键词: 血脑屏障; 脑毛细血管内皮细胞; 基因转移

中图分类号: R943.42; R965.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)01 - 0087 - 04

In vitro delivery of gene encoding neurotrophic (GDNF) into brain by gene transfer

JIANG Chen, SAWADA Yasufumi

(Department of Medico-pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812 - 0053, Japan)

Abstract: **Aim** The gene encoding neurotrophic factor was transfected into brain capillary endothelial cells with the aim of delivering the gene product extensively into the brain parenchyma by making use of the secretory function of BCECs. **Methods** Plasmid DNA encoding mouse glial cell-derived neurotrophic factor (*mGDNF* gene) was constructed and prepared. Then, *mGDNF* gene was transfected into cultured mouse brain capillary endothelial cells (BCECs) *in vitro*. The amount of *mGDNF* protein in the transfected cells and secreted from the transfected cells were determined by ELISA. The polarity of the secretion of *mGDNF* protein from BCECs was investigated in a bicameral culture system. **Results** The *mGDNF* protein was detected out not only from the transfected cells but also the cultured media. And *mGDNF* protein was mainly found in the brain side of the culture compartment. **Conclusion** It has been demonstrated that a secretory protein can be successfully delivered into brain parenchyma by utilizing the secretory pathway of BCECs.

Key words: blood-brain barrier; brain capillary endothelial cell; gene transfer

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB), 由脑毛细血管内皮细胞构成, 存在于循环血液和中枢神经系统之间, 起到保持脑内环境相对稳定的作用, 是外来物质向脑内转运的重要屏障。近年, 神经营养因子等生理活性蛋白对帕金森氏病等中枢系统疾病显示了较高的疗效^[1, 2]。但是, 由于 BBB 的存在, 这些蛋白和编码基因都不能通过 BBB 进入脑实质。靶向脑内的基因转运已经成为当今中枢神经系统疾病治疗研究的重要课题。本研究中, 作者首次提出了利用分泌蛋白本身的分泌能, 跨越 BBB 转运治疗

蛋白的方法。为了验证以上途径是否可行, 作者将分泌蛋白基因导入脑毛细血管内皮细胞, 基因在细胞内表达后, 利用分泌蛋白本身所具有的分泌能, 驱动活性蛋白转运进入脑。本研究将小鼠神经胶质细胞来源的神经营养因子 (*mGDNF*) 的基因导入传代脑毛细血管内皮细胞, 对基因产物的分泌以及分泌的方向性进行了探讨, 为脑部疾病基因治疗的制剂开发提供理论基础。

材料与方法

材料 神经营养因子 (*mGDNF*) 的全长 cDNA (*mGDNF*) 由 RIKEN 提供 (Nagoya, Japan)。pIRESneo-vector 质粒购自 Clontech 公司。质粒纯化

收稿日期: 2003-10-26.

* 通讯作者 Tel: 86 - 21 - 54237002, Fax: 86 - 21 - 54237086,

E-mail: jiangchen@shmu.edu.cn

现址: 复旦大学药学院药剂学系, 上海 200032

系统 QIAGEN Plasmid Mega Kits 购自 QIAGEN GmbH 公司。Lipofectamine 购自 GIBCO BRL 公司。GDNF 测定用 ELISA 分析试剂盒购自 Promega 公司。细胞培养液 D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 购自 GIBCO BRL 公司 (NY, USA)。

构建和制备 DNA 质粒 将小鼠神经胶质细胞来源的神经营养因子 (mGDNF) 的全长 DNA (mGDNF, RIKEN, Nagoya, Japan) 重组入 pIRESneo-vector。所得质粒在 DH5 α 大肠杆菌进行扩增, 使用 QIAGEN Plasmid Mega Kits 进行分离和纯化。纯化后的质粒用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在溴化乙锭溶液中染色, 确认质粒纯度。纯化后的质粒稀释后, 于 260 nm 波长, 用紫外分光光度法测定 DNA 的浓度。

细胞培养 传代小鼠脑毛细血管内皮细胞 (MBEC4 细胞) 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 培养箱中培养。培养液为含有 10% 小牛血清、100 u \cdot mL $^{-1}$ 青霉素和 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 链霉素的 D-MEM。

mGDNF 转染和阳性克隆的筛选 MBEC4 细胞在转染 2 d 前以细胞数 2×10^5 培养板 (4 孔)。接种转染使用 Lipofectamine。主要过程为: Lipofectamine (2 μ g) 和质粒 (8 μ g) 分别在细胞培养液 (无血清) 100 μ L 稀释后, 混合, 室温静置 30 min, 所得的混合液, 加到事先洗净的细胞上进行基因转染, 培养 6 h, 除去 Lipofectamine 和质粒混合溶液, 加入培养液, 转染 48 h, 得到 mGDNF 的一过性表达细胞。或者转染 48 h 后, 将细胞梯度稀释后, 在 G418 (Geneticin, Sigma, US) 中进行筛选, 筛选浓度为 400 mg \cdot mL $^{-1}$ 。筛选 3 d 后, 细胞开始死亡, 约 2 周后, 形成阳性细胞克隆。以上所得到的一过性表达细胞和阳性细胞克隆, 用于以下实验。

ELISA 法测定细胞中以及培养液中 mGDNF 的浓度 细胞培养 3 d, 每天更换新鲜培养液。d 3 取培养液后, 收集细胞, 用 GDNF 的 ELISA 分析试剂盒测定所取的培养液以及细胞总蛋白抽提液中 GDNF 的浓度。

测定 GDNF 的极性分泌 将 mGDNF 的一过性表达细胞和阳性克隆接种于 Transwell filters (1 \times 10 5 个细胞 培养板, 1 cm 2 培养面积), 进行培养。培养 3 d 后, 进行 Evans Blue dye 3/牛血清蛋白结合物 (EBA) 的透过性实验, 确认细胞单层是否已经形成了紧密连接。EBA 溶液配制是将 Evans Blue dye 和牛血清蛋白 (M_r 70 000) 在室温混合, 终浓度为 1 mL 培养液中含有 1 mg Evans Blue dye 和 5 mg 牛血

清蛋白。于 37 $^{\circ}$ C 静置 15 min, 得到 EBA 溶液。将配制好的 EBA 溶液加入到 Transwell 一侧的培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 15 min, 从 Transwell 的另一侧取培养液, 用荧光分光光度计进行测定, 激发波长 620 nm, 吸收波长 680 nm, 空白培养液作对照。

细胞单层的紧密连接形成后, EBA 将不能从细胞的一侧向另一侧扩散。EBA 透过性实验完成后, 细胞两侧的培养液换为新鲜的培养液。继续进行 24 h 培养, 取细胞两侧培养液, 进行 GDNF 的 ELISA 检查。取样后细胞单层再次进行 EBA 透过性实验, 以确认实验中细胞单层的不可透过性。

结果和讨论

1 表达 mGDNF 的培养脑毛细血管内皮细胞单层的透过性

细胞单层 EBA 透过性测定: 细胞培养 3 - 4 d 后, 测定的结果表明, 加入 EBA 溶液的相反一侧, 没有检出 EBA, 说明 EBA 不能自由透过细胞单层。由此可以推断细胞单层已经形成了紧密连接, 大分子蛋白不能通过被动扩散通过细胞单层。

2 mGDNF 基因转染细胞来源的基因产物的分泌

细胞以及培养液中 mGDNF 蛋白的含量用 ELISA 法进行测定, 结果见图 1。所有 G418 筛选出的阳性细胞克隆以及一过性转染细胞都检测出有 GDNF 蛋白表达。G418 阳性细胞克隆的细胞内表达水平有较大差异。而且, 一过性转染细胞却表现出高于 G418 阳性细胞克隆的细胞内表达水平。一过性转染细胞中 GDNF 的表达是与转染进入细胞的质粒 DNA 的量相关, 而 G418 阳性细胞克隆的细胞内表达水平是与插入细胞基因组的 GDNF 的 cDNA 的表达相关, 因此造成了这种表达水平上的差异。

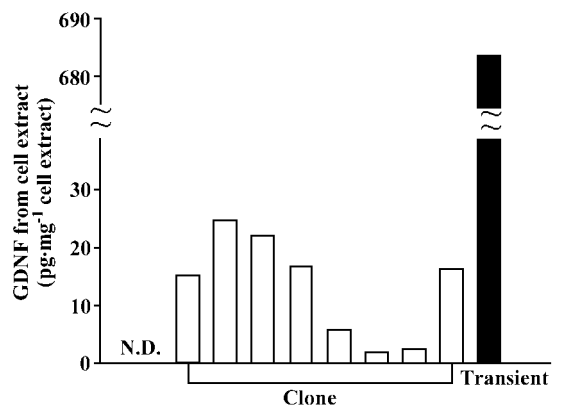


Figure 1 mGDNF concentrations in various stable transfected or transient cell lines of MBEC4 cell after transfected with pIRSneo-mGDNF vector

图 2 显示了 G418 阳性细胞克隆以及一过性转染细胞的细胞培养液中,相对于细胞总蛋白的细胞分泌出的 mGDNF 蛋白量。一过性转染细胞的分泌量随着细胞的培养天数略有增加。随着细胞的不断生长,G418 阳性细胞克隆的分泌量略有下降。图 3 显示了细胞的总分泌量。随着培养天数的增加,培养板中的细胞总蛋白增加,总分泌的 GDNF 的蛋白量也随之增加,但是相对于细胞总蛋白的分泌率却显示减少的趋势。

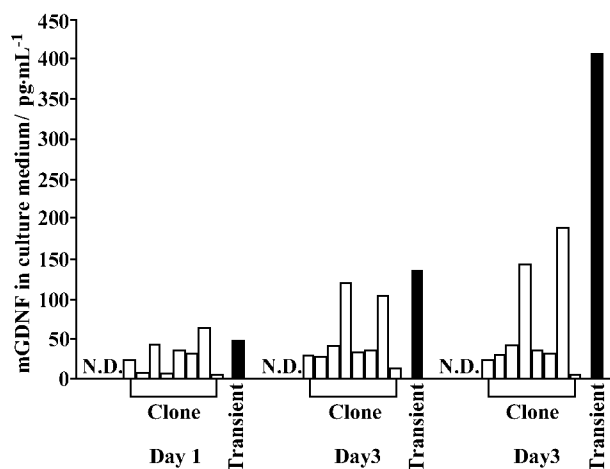
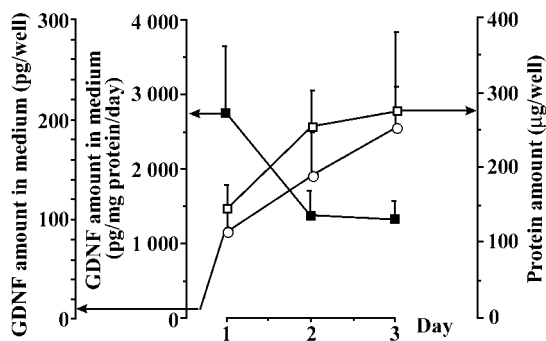


Figure 2 Concentration of mGDNF protein in the medium of stable transfected cell clones and temporary transfected MBEC4 cells. 2×10^5 cells which from cell clones selected by neomycin or transfected with pIRESneo-GDNF vector, and media from these cells were collected 1, 2 and 3 days after plated or transfected and measured by ELISA. In the non-transfected MBEC4 cells, level of mGDNF in cultured medium was not detected



○—○ Total amount of GDNF in cultured medium (pg·well⁻¹); ■—■ GDNF amount in cultured medium (pg·mg⁻¹ cell extract protein); □—□ Total protein amount (μg·well⁻¹)

Figure 3 GDNF secretion and cell culture condition of transfectant-MBEC4 cell lines. Values shown represent the $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$)

在脑毛细血管内皮细胞中没有内源性的 GDNF 的表达,如图 1 和图 2 所示。mGDNF 基因转染后的 MBEC4 细胞,不仅检出了外来基因的表达而且基因产物也可以向细胞外分泌。脑毛细血管内皮细胞形成 BBB,其主要功能是血液与脑之间的生理屏障。最近发现^[3],脑毛细血管内皮细胞在生理或病理条件下,也可以产生分泌蛋白,比如:endothelin-1。另外,已有研究^[4]报道将一段分泌标识序列连接于人纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor-1, FGF-1) 的 DNA 序列,转染大鼠脑毛细血管内皮细胞后,可以驱动本身不具有分泌特性的 FGF-1 蛋白向细胞外分泌。因此,脑毛细血管内皮细胞不仅具有内源性蛋白的分泌途径,而且,可以识别外来基因产物的分泌序列,推动其向细胞外分泌。GDNF 的全长 DNA 应编码一个具有分泌序列的 GDNF 前体^[5]。本研究中所使用的小鼠 GDNF 的全长 cDNA 中也含有 GDNF 的分泌标识序列。Watabe K 等^[6]报道, GDNF 基因转染 COS1 细胞后,细胞可以分泌出与生物体内 GDNF 完全相同的 GDNF 蛋白。同样,在作者的研究结果中,转染后的脑毛细血管内皮细胞不仅表达了 GDNF,而且向细胞外分泌基因产物。因此,作者认为 GDNF 的分泌是由其本身所具有的分泌标识序列所决定,与转染的细胞类型无关。

3 脑毛细血管内皮细胞的 GDNF 的极性分泌

在 Transwell 系统,转染后的细胞形成不可透过性细胞单层,mGDNF 的蛋白主要在细胞单层的基底侧存在,为细胞顶层侧的 5 - 7 倍。与细胞内 GDNF 的表达量相对应,一过性表达细胞的分泌量大于 G418 阳性细胞克隆 (图 4)。

能否将治疗蛋白通过脑毛细血管内皮细胞转运进入脑,一个最为重要的因素是基因产物的分泌方向,是向血管侧还是向脑侧。MBEC4 细胞在形成细胞单层时,它的顶侧为血管侧,基底侧为脑侧,这已经在体外模拟血脑屏障时,被用于药物转运的研究^[7]。本研究中,由 EBA 的透过性实验可知,在细胞单层形成后,大分子不能从细胞一侧以扩散方式进入另一侧。因此,细胞两侧 GDNF 的量反映出细胞分泌出 GDNF 的方向性。实验结果显示,稳定表达克隆和一过性表达细胞中 GDNF 蛋白的分泌都偏向于细胞基底侧,即脑侧的分泌为优势分泌。目前,通过使用一些极性上皮细胞,如 MDCK 细胞 (Madin-Darby canine kidney cells),已经对蛋白向细胞膜的转运机制进行了研究。结果表明上皮细胞内存在某些识别机制,可以识别蛋白上的某一段氨基

酸序列,导致蛋白向上皮细胞的基底膜转移^[8]。然而,脑毛细血管内皮细胞中的蛋白转运机制尚未被探讨。已知脑毛细血管内皮细胞中的一些蛋白只存在于细胞基底膜,比如中性氨基酸转运担体(system-A)^[9],由此可推测脑毛细血管内皮细胞也存在着向细胞基底膜的蛋白转移识别机制,这种机制很可能也推动 GDNF向脑毛细血管内皮细胞基底膜方向的分泌。虽然证实这个推测需要进一步的实验,但是在本研究中,作者认为这种 GDNF的主动分泌方向可以成为基因产物进入脑实质的动力。

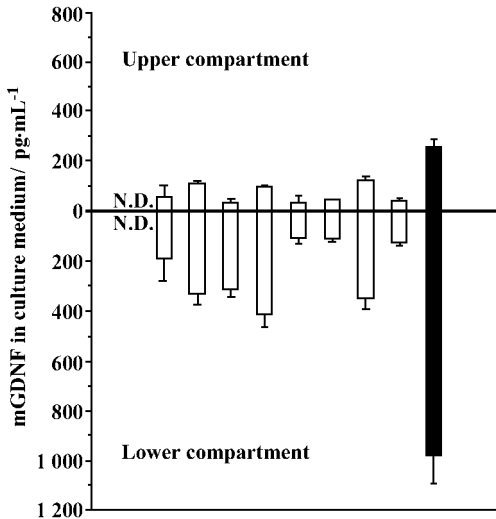


Figure 4 Polarized secretion of GDNF from stable expression GDNF clones of MBEC4 cell transiently transfected MBEC4 cells. Cells were cultured in the transwells. After 3 days incubation, the medium of upper and lower compartments was exchanged by fresh medium. After a further 24 hours incubation, the GDNF in the culture fluids in the upper and lower level of mGDNF in cultured medium was not detected. The values represent the $\bar{x} \pm s$ of quadruplicate determinations

本研究中,作者建立了一种将治疗性分泌蛋白转运进入脑内的新途径。至今为止,脑毛细血管内

皮细胞一直被认为限制外来活性物质进入脑实质的屏障,以上建立的方法,可以利用这个屏障并且跨越这个屏障将外源性治疗蛋白转运进入脑。分泌蛋白在生物体水平上的脑内转运有待进一步探讨。

References:

[1] Mizuho A, Isao D, Susumu T, *et al.* The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats: behavioral and histological studies using two different dosages [J]. *Neurosci Res*, 2000, **36**(2): 319 - 325.

[2] Choi-Lundberg DL, Derek L, Lin Q, *et al.* Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. *Exp Neurol*, 1998, **154**(1): 261 - 275.

[3] Yakubu MA, Leffler CW. Regulation of ET-1 biosynthesis in cerebral microvascular endothelial cells by vasoactive agents and PKC [J]. *Am J Physiol*, 1999, **276**(2): C300 - 305.

[4] Johnston P, Nam M, Hossain MA, *et al.* Delivery of human fibroblast growth factor-1 gene to brain by modified rat brain endothelial cells [J]. *J Neurochem*, 1996, **67**(8): 1643 - 1652.

[5] Lin LF, Doeherty DH, Lile JD, *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, **260**(5): 1130 - 1132.

[6] Watabe K, Ohashi T, Sakamoto T, *et al.* Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. *J Neurosci Res*, 2000, **60**(2): 511 - 519.

[7] Tatsuta T, Naito M, Oh-hara T, *et al.* Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(9): 20383 - 20391.

[8] Bredt DS. Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity [J]. *Cell*, 1998, **94**(3): 691 - 694.

[9] Sanchez del Pino MM, Hawkins RA, Peterson DR. Biochemical discrimination between luminal and abluminal enzyme and transport activities of the blood-brain barrier [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**(5): 14907 - 14912.