

# 肌肉生长抑制素前肽融合蛋白的重组表达及其抗萎缩活性的初步鉴定\*

黄庆生<sup>1</sup> 李琦<sup>1</sup> 杨慧<sup>1</sup> 靳明亮<sup>1</sup> 车速<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**探讨“白蛋白-突变型肌肉生长抑制素前肽”融合蛋白在抗肌萎缩中的作用。

**方法:**首先将肌肉生长抑制素前肽基因第76位天冬氨酸对应的碱基突变为丙氨酸对应的碱基,获得了“突变型肌肉生长抑制素前肽”基因。再将该基因与大鼠白蛋白基因片段连接,克隆至酵母表达载体。利用酵母表达系统,重组表达“白蛋白-突变型肌肉生长抑制素前肽”融合蛋白。纯化的重组蛋白用于尾悬吊大鼠的治疗实验。

**结果:**大鼠经过21天的尾悬吊,后肢骨骼肌发生了明显的萎缩。注射“白蛋白-突变型肌肉生长抑制素前肽”融合蛋白的尾悬吊大鼠,其后肢骨骼肌未发生萎缩。

**结论:**重组表达的“白蛋白-突变型肌肉生长抑制素前肽”

**关键词** 肌肉萎缩;肌肉生长抑制素;肌肉生长抑制素前肽;融合蛋白

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-06-0549-04

**Expression of myostatin propeptide fusion protein and preliminary observation on its activity of preventing muscle atrophy/HUANG Qingsheng, LI Qi, YANG Hui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(6): 549—552**

## Abstract

**Objective:**To investigate the effect of ‘myostatin propeptide-albumin’ fusion protein on preventing muscle atrophy.

**Method:**Aspartate-76 to alanine-76 mutant myostatin propeptide gene was prepared and then linked to rat albumin gene segment. This fusion gene was cloned into yeast expression vector to generate recombinant fusion protein. Expressed fusion protein was purified, then supplied to tail-suspended rats.

**Result:**After 21d of tail suspension, hind limb muscle atrophy could be observed in tail suspension rats, whereas the atrophy could be prevented in the tail suspended rats by injection of ‘myostatin propeptide-albumin segment’.

**Conclusion:**Recombinant fusion protein ‘myostatin propeptide-albumin’ can inhibit muscle disuse atrophy caused by muscle unloading. It may be a potential therapeutic application for muscle disuse atrophy.

**Author's address** School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, 710072

**Key word** muscle atrophy; myostatin; myostatin propeptide; fusion protein

骨骼肌长期处于去负荷状态可导致废用性萎缩。空间失重、衰老或疾病时长期卧床与不运动使骨骼肌长期处于去负荷状态,肌肉功能逐渐退化、萎

缩<sup>[1-3]</sup>。运动锻炼对缓解骨骼肌萎缩具有重要的作用,但因骨骼肌废用过程中的各种特殊原因(如:肢体固定与卧床时无法运动,空间失重条件下不能实

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.06.013

\*基金项目:国家自然科学基金项目(30971425)

1 西北工业大学生命学院/空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室,西安,710072

作者简介:黄庆生,男,博士,副教授;收稿日期:2012-07-02

现有效运动等),仍不可避免发生萎缩。骨骼肌废用性萎缩仍无特异治疗药物,探索生物技术干预手段是实现有效预防和治疗的重要途径之一。

在骨骼肌萎缩过程中,“肌肉生长抑制素”(myostatin, MSTN)起着重要的负调节作用<sup>[4-5]</sup>。MSTN是抑制骨骼肌生长发育的重要因子,由骨骼肌细胞表达后分泌出胞外,作用于自身肌细胞或周围的骨骼肌细胞,抑制肌细胞的生长。正常状态下, MSTN保持低水平的分泌,使骨骼肌生长处于平衡。该基因敲除的动物,肌肉生长失去抑制,表现为全身肌肉发达。长期运动锻炼者,骨骼肌中MSTN分泌减少,肌肉生长不受抑制,表现为肌肉发达。而长期不运动者, MSTN分泌增加,肌肉生长受到抑制,表现为肌肉萎缩<sup>[6-8]</sup>。MSTN全长376个氨基酸,由骨骼肌细胞表达后,在第263位氨基酸处被酶解成两个片段, N端部分称 propeptide(肌肉生长抑制素前肽,简称M前肽), C端片段为MSTN的活性区域,两个C段分子通过二硫键形成一个二聚体并与M前肽以非共价的形式结合, C段与M前肽结合时无生物学活性。当结合在C片段上的M前肽随后被金属蛋白酶在第76位的天门冬氨酸处裂解, M前肽与C段分开,游离出单独的C段二聚体。此时C段就能与骨骼肌细胞上特异的受体结合,表现出抑制肌细胞生长的生物学活性。若M前肽与C段持续结合, C段的活性就会受到抑制。进一步研究发现,若将M前肽第76位的天门冬氨酸突变为丙氨酸后,结合在C段上的M前肽就不能被蛋白酶裂解,使这种“突变型肌肉生长抑制素前肽”(mM前肽)与C段一直以结合形式存在,导致C端处于无活性状态<sup>[9]</sup>。为了使mM前肽在体内更加稳定、半衰期更长, Wolfman等<sup>[9]</sup>将mM前肽与人IgG的Fc段融合后,发现其抗萎缩作用明显提高。白蛋白是构建长效融合蛋白的理想载体,比IgG的Fc段更稳定。本研究在进行融合蛋白工程菌构建后,对重组表达的“白蛋白”-“突变型肌肉生长抑制素前肽”这一融合蛋白的抗萎缩活性进行了初步的验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验中所用的工具酶均购自 TaKaRa 公司;

pPIC9K 酵母表达载体购自 Invitrogen 公司; pPIC9K-大鼠白蛋白载体本室构建(去除信号肽等基因的白蛋白载体);兔抗“肌肉生长抑制素前肽”多克隆抗体由本室制备,制备过程:先参照M前肽的氨基酸序列,合成其中的一小片段(16肽)作为抗原,免疫家兔后,采集血清,经纯化获得抗M前肽的IgG抗体。

### 1.2 RT-PCR 扩增与克隆 M 前肽基因

依据MSTN氨基端35-263氨基酸对应的碱基序列,即M前肽对应的cDNA序列,合成如下的引物:

正链引物 MF1: 5'TA ACTAGT GAAAAAGAGGGG CTGTGTAATGC 3';

负链引物 MR1: 5'TA GCGGCCGC TCATTTGGGTGT GTCTGTTACTTT3';

引物上游引入 Spe I 酶切位点,引物下游引入 Not I 酶切位点和终止密码子。这两个酶切位点用于将M前肽基因克隆至pPIC9K-白蛋白的下游(本实验室已构建好白蛋白基因片段克隆在pPIC9K中的载体)。提取大鼠骨骼肌细胞总RNA,用Oligo dT 逆转录(RT), PCR 扩增M前肽cDNA。扩增的cDNA克隆至pUC-T载体,筛选阳性克隆。

### 1.3 M 前肽基因的突变与克隆

以克隆在pUC-T载体中的M前肽cDNA为模板,把M前肽第76位天冬氨酸所对应的碱基、也就是第226—228的GAT突变为丙氨酸所对应的碱基GCT。突变采用融合PCR的方法进行,即采用分两段扩增M前肽cDNA的方法,在拟突变处设计引物,将突变点引入到合成的引物中,再将两段合在一起作为模板,最后以两端的正负链引物扩增出第226—228位碱基为GCT的mM前肽DNA。具体过程:在拟突变处合成2条引物, DAF引物: 5'ATCAGCAAAGCTGCTATAAGAC3'和 DAR引物: 5'TCT-TATAGCAGCTTTGCTG3'。把GAT突变为GCT引入到引物中。MF1引物与DAR引物配对,扩增M前肽的前半段; DAF引物与MR1引物配对,扩增M前肽的后半段;回收这两个扩增片段。由于这两段基因有部分重叠,以这两段片段为模板,以MF1和MR1为引物,采用融合PCR的方法,扩增出第226—228GAT突变为GCT的突变型M前肽基因,将mM

前肽基因克隆至毕赤酵母表达载体pPIC9K-白蛋白的下游,构建‘pPIC9K-白蛋白-mM前肽’酵母表达载体,筛选阳性克隆,进行序列测定。

**1.4 表达“白蛋白-mM前肽”融合蛋白工程菌的构建与筛选**

“pPIC9K-白蛋白-mM前肽”酵母表达载体,采用常规方法转化毕赤酵母菌-GS115。转化菌先在MD平板上筛选阳性克隆,随后再经过1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml G418不同浓度的筛选,选取具有3mg/ml以上抗性的重组工程菌。

**1.5 “白蛋白-mM前肽”融合蛋白的重组表达**

工程菌株在“贝朗”10L发酵罐上进行发酵培养和甲醇诱导,发酵过程按照常规的分批补料培养进行。发酵液经过固液分离和超滤浓缩后再进行sephadex-G25除盐和G-500分子筛层析,纯化提取发酵液中的“白蛋白-mM前肽”融合蛋白。SDS-PAGE电泳对获得的融合蛋白的纯度与分子量大小进行鉴定。用兔抗M前肽多克隆抗体进行免疫印迹鉴定。

**1.6 尾悬吊大鼠模型与‘白蛋白-mM前肽’融合蛋白的抗萎缩活性实验**

大鼠尾部胶带固定,前肢着地,后肢悬空。悬吊角度成30°,悬挂在可四个方向移动的支架上,持续3周时间。正常大鼠15只,购自第四军医大学实验动物中心,平均体重211g。15只大鼠随机分为3组,每组5只:尾悬吊组、尾悬吊+“白蛋白-mM前肽”融合蛋白实验组、正常饲养组。尾悬吊+“白蛋白-mM前肽”融合蛋白实验组,每2天,经腹腔注射白蛋白-mM前肽’融合蛋白1mg。第21天取各组大鼠分别测量体重,麻醉处死后分别取后肢比目鱼肌,称其重量,以比目鱼肌重量(mg)与大鼠自身体重(g)的比值作为其相对湿重进行比较。

**1.7 统计学分析**

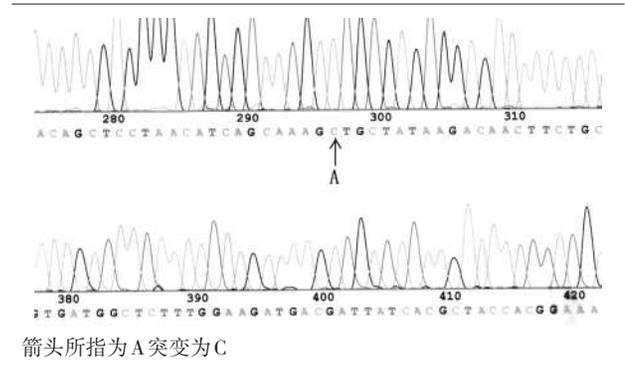
应用t检验进行三组间比目鱼肌相对湿重的比较。

**2 结果**

**2.1 白蛋白-mM前肽融合蛋白基因克隆测序结果**

构建的“pPIC9K-白蛋白-mM前肽”酵母表达载体,DNA序列测定结果证实,克隆的基因序列正确,前肽中的GAT也突变为GCT。测序结果见图1。

图1 mM前肽基因的测序结果



箭头所指为A突变为C

**2.2 重组表达“白蛋白-mM前肽”融合蛋白**

构建的工程菌株经MD平板初筛,再经过1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml G418不同浓度的抗性筛选,获得了一株具有3mg/ml抗性的重组工程菌。将这一克隆菌株,在发酵罐上进行发酵和诱导,收集发酵液上清,超滤浓缩后,经除盐和分子筛层析,获得了初步纯化的“白蛋白-mM前肽”融合蛋白。蛋白经SDS-PAGE电泳,表明表达的融合蛋白相对迁移率与理论推算的融合蛋白分子量相符。采用兔抗M-前肽多克隆抗体对表达产物进行western-blot鉴定,证实表达的融合蛋白中具有M-前肽蛋白。

**2.3 后肢骨骼肌萎缩大鼠模型**

正常饲养21d大鼠比目鱼肌的平均相对湿重为0.46±0.024;尾悬吊21d大鼠比目鱼肌的平均相对湿重为0.35±0.029;两组间的比目鱼肌相对湿重相差显著(t检验,P<0.05)。尾悬吊21d大鼠的比目鱼肌相对湿重比正常对照大鼠的比目鱼肌相对湿重下降了约24%。

**2.4 融合蛋白的抗萎缩实验**

尾悬吊+“白蛋白-mM前肽”融合蛋白实验组,尾悬吊21d后,大鼠比目鱼肌的平均相对湿重为0.43±0.038;与正常对照组相比差异无显著性意义(P>0.05);与尾悬吊组比,比目鱼肌相对湿重差异有显著性意义(P<0.05),表1。

	正常对照组	尾悬吊21d组	尾悬吊21d+“白蛋白-mM前肽”组
相对湿重(mg/g)	0.46 ± 0.024	0.35 ± 0.029 <sup>①</sup>	0.43 ± 0.038 <sup>②</sup>

①与正常对照组比P<0.05;②与正常组比P>0.05;与尾悬吊21d组比P<0.05

### 3 讨论

运动锻炼是对抗肌萎缩的重要方法。在航天领域,宇航员就是采用运动锻炼的办法来克服肌肉萎缩,如每天进行2—3h的运动,包括拉力器、跑台、自行车功量计等。这些方法对于防止肌肉萎缩和肌肉工作能力下降起到了重要的作用。但即便如此,也不能完全解决肌肉萎缩问题。航天员在6个月的飞行中即使采取了运动锻炼等对抗措施仍会使抗重力性骨骼肌发生大约15%—20%的萎缩<sup>[10-11]</sup>。在康复医学领域,运动锻炼已被普遍采用。它在很大程度上对肌肉萎缩起到积极的预防和治疗作用。但是,对于一些体弱、长期卧床或肢体固定的患者,由于受身体状况等因素的影响,自身活动受限,无法实现有效的运动锻炼,最终还是不可避免会导致骨骼肌萎缩的发生。当运动锻炼不能有效克服骨骼肌萎缩时,一种有效的生物技术干预方法就显得十分必要。

实验证明,抑制体内MSTN的活性或降低MSTN的表达量,可促进肌细胞的分裂和繁殖,抵抗骨骼肌的萎缩<sup>[12-13]</sup>。因此,以MSTN为靶标的抗骨骼肌萎缩研究近年来备受关注<sup>[14]</sup>。M前肽,特别是第76位氨基酸突变后的M前肽,具有更强的抗MSTN作用。本研究在此基础上,改用白蛋白片段与mM前肽融合,使mM前肽的稳定性更好,作用时间更持久。在尾悬吊大鼠后肢骨骼肌萎缩模型上应用,初步证实了该蛋白具有一定的抗萎缩活性。构建的工程菌株可为该融合蛋白的生产与制备提供大量均一性好、纯度高的重组蛋白样品,这将为深入研究抗萎缩的药物治疗奠定基础。

### 参考文献

[1] Payne MW, Williams DR, Trudel G. Space flight rehabilitation[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2007,86(7):583—591.  
[2] Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models[J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95: 2185—2201.  
[3] Trappe S, Creer A, Slivka D, et al. Single muscle fiber function with concurrent exercise or nutrition countermeasures

during 60 days of bed rest in women[J]. *J Appl Physiol*, 2007,103(4):1242—1250.  
[4] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98(16): 9306—9311.  
[5] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member [J]. *Nature*, 1997 (387): 83—90.  
[6] Lalani R, Bhasin S, Byhower F, et al. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the Neuro-Lab space shuttle flight[J]. *J Endocrinol*, 2000,167(3):417—428.  
[7] Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25):14938—14943.  
[8] Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, et al. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003, 228(6):706—709.  
[9] Wolfman NW, McPherron AC, Pappano WN, et al. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases[J]. *PNAS*, 2003, 100(26) :15842—15846.  
[10] Trappe S, Costill D, Gallagher PM, et al. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the international space station[J]. *J Appl Physiol*, 2009,106(4): 1159—1168.  
[11] Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres[J]. *J Physiol*, 2010, 588(Pt 18): 3567—3592.  
[12] Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade[J]. *Nature*, 2002, 420:418—421.  
[13] Bogdanovich S, McNally EM, Khurana TS. Myostatin blockade improves function but not histopathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy 2C[J]. *Muscle Nerve*, 2008, 37:308—316.  
[14] Elliott B, Renshaw D, Getting S, et al. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012,205(3):324—340.