

平滑肌细胞源性纤维母细胞生长因子的纯化及生物学特性*

瞿智玲 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

Purification of the Smooth Muscle Cell Derived Fibroblast Growth Factor and Its Biological Properties

QU Zhi-Ling and DENG Zhong-Duan

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

To investigate whether smooth muscle cell (SMC) derived fibroblast growth factor (FGF) plays a role in atherogenesis, this growth factor was purified, and some of its biological and biochemical properties were determined.

Methods The rabbit aortic SMC were cultured using a substrate attached explant method. The SMC at the 3rd~5th passage which grew well were collected and sonicated. The sonicated was centrifuged at $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and the FGF was extracted. The chemotactic activity of the extract for rabbit peripheral blood monocytes (MC) was assayed by using modified Boyden chamber. Subsequently, the extract was loaded on a column of heparin-Sepharose and a gradient elution was performed. The effect of the eluate fractions on DNA synthesis of NIH 3T3 fibroblasts was assayed by using ^3H -thymidine (^3H -TdR) incorporation into DNA of the cells. To determine the molecular weight and reactivity to anti-bFGF polyclonal antibody, NaDodSO₄-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immunoblotting and an image processing system were used.

Results The FGF extract was significantly chemotactic for MC. The fractions eluted in $1.4 \sim 1.6\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl from the heparin Sepharose were mitogenic for 3T3 cells, and the ^3H -TdR incorporation values were 2~3 times as much as the control. The purified molecule had a molecular weight of about 18.4 kDa as determined by SDS-PAGE. Immunoblot analysis showed that this purified protein was positively immunoreactive to an anti-bFGF polyclonal antibody.

Conclusions The purified protein from the present experiment is bFGF. It suggests that the SMC which have migrated in the intima may release bFGF when injured. Basic FGF may play a role in atherogenesis through inducing cell migration and proliferation.

KEY WORDS Growth factor, fibroblast; Smooth muscle cell; Chromatography, affinity; Electrophoresis, polyacrylamide gel; Atherosclerosis

摘要 将培养的兔主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)超声粉碎,用肝素亲和层析法纯化细胞内的纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)。结果显示,SMC超声粉碎提取物对兔血单核细胞有趋化活性。经肝素亲和层析,被 $1.4 \sim 1.6\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl洗脱下来的组分对NIH 3T3细胞有明显促有丝分裂活性。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳证明该组分的分子量约为18.4 kDa。免疫杂交分析证明该组分与抗碱性FGF多克隆抗体结合,说明本实验纯化所得的蛋白质为碱性FGF。提示,迁入内膜的SMC在其受损伤时,可释放出碱性FGF,通过引起细胞的迁移和增殖,在动脉粥样硬化的发生发展中起一定作用。

关键词 生长因子,纤维母细胞;平滑肌细胞;亲和层析;电泳,聚丙烯酰胺凝胶;动脉粥样硬化

* 国家八·五科技攻关课题“血管壁内皮细胞、平滑肌细胞和蛋白聚糖间的相互关系在动脉粥样硬化斑块形成及消退中的作用”(85-915-03-04)的一部分。

已知血液中单核细胞(monocyte, MC)迁

入动脉内膜与动脉中膜 SMC 迁入内膜并增殖在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块的发生和发展中起重要作用^[1]。MC 和 SMC 的迁移并增殖受到动脉壁内细胞产生的趋化因子、生长因子及其它细胞因子的影响。在诸多生长因子中, FGF 是否参与 As 斑块的发生和发展, 不太清楚。已知 FGF 有碱性(bFGF, 分子量 16~18.5 kDa)和酸性(aFGF, 分子量 16.7 kDa)两种, 二者的分子结构中均无信号肽, 均非分泌性蛋白质^[2]。然而, 在体内, bFGF 可与内皮下细胞外基质及基底膜中的肝素样分子(硫酸乙酰肝素)结合, 当细胞外基质或基底膜被蛋白水解酶水解时, 便可释出有活性的 FGF 硫酸乙酰肝素复合物而发挥其生物学功能。而且, 内皮细胞受损伤后亦可释放出 FGF^[3]。本文的目的是将培养的动脉 SMC 超声粉碎, 试图从其中纯化 FGF, 并检测其生物学功能, 以阐明其在 As 发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 平滑肌细胞的培养和收集

用贴法培养 SMC^[4]。取 4~6 周龄幼兔胸主动脉, 剥取动脉中膜的内中 2/3 层, 切成 1 mm² 小块, 接种于培养瓶内, 培养基为含 10% 胎牛血清 (Gibco 公司) 的 M199 (Sigma 公司)。4~6 天可见细胞从植块边缘长出, 14~16 天长满瓶底, 用 0.1% 胰蛋白酶 (Difco 公司) 消化传代。选生长状态良好的第 4~5 代 SMC, D-Hanks 液漂洗 2~3 次, 用自制的硅橡胶细胞刮刮取细胞, 收集于一定量的 D-Hanks 缓冲液中, -20℃ 保存备用。

1.2 纤维母细胞生长因子的提取

用超声破碎机破碎细胞 (4℃)。破碎时, 细胞悬液中加入苯甲磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 50 mmol · L⁻¹), 以抑制细胞内丝氨酸类蛋白水解酶。高速离心 (10 000 r · min⁻¹, 4℃) 30 min, 以去除膜结构和其它细胞结构物质, 所得上清即为 FGF 提取物, -20℃ 保存备用。

1.3 纤维母细胞生长因子的纯化

参照 Moscatelli 等^[5]的方法, 将 FGF 提取物用肝素结合琼脂糖 (GL-6B) 层析柱进行亲和层析: 称取 2.5 g 肝素结合琼脂糖 (pharmacia), 溶于 10 ml 水中, 仔细装入 100 mm × 10 mm 层析柱内, 用含 0.1 mol · L⁻¹

NaCl 的 Tris HCl (pH 7.0) 缓冲液冲洗 4 h, 以除去防腐剂。然后将 FGF 提取物缓慢加入上述层析柱内, 用 LKB 柱层析系统进行层析。先用含 0.1 mol · L⁻¹ NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱 30 min, 洗去非肝素结合蛋白, 并收集之。然后进行梯度洗脱, 洗脱液为 Tris-HCl (pH 7.0) 含 0.1~3.0 mol · L⁻¹ NaCl, 洗脱速度为 1.4 ml · min⁻¹。将洗脱物归并为 29 个组分, 并用 0.89% NaCl 进行透析, 透析袋截留分子量为 10 000 Dalton。

1.4 纤维母细胞生长因子的生物学特性鉴定

1.4.1 对兔血单核细胞的趋化试验 兔血 MC 的分离和鉴定按我们曾报道的方法进行^[6]。简言之, 用淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂) 100 ml, 加入 60% 泛影葡胺 (上海信谊药厂) 3.5 ml, 用以分离兔血单个核细胞。经附壁和纯化后得 MC。0.4% 台盼蓝拒染试验, 细胞存活率大于 90%。趋化试验用改良的 Boyden 小室进行^[7]。分 4 组 (Table 1), 上室除化学促动组外, 均用无血清 DME/F12 培养液 (Sigma 公司) 制成 MC 悬液。各组下室组分不同。①阳性对照组: 下室为活化血清, 含 CS, 对 MC 有很强的趋化活性; ②随机移动组即阴性对照组: 下室为无血清培养基, 不含趋化物; ③趋化运动组: 下室为 FGF 提取物, 以检测其是否具有趋化活性; ④化学促动组: 上下室均为 FGF 提取物, 以检测上下室无 FGF 提取物的浓度梯度时 MC 的迁移, 即该物质是否有化学促动作用。小室经温育 90 min 后, 取出滤膜, Harris 苏木素染色, 在高倍显微镜下检测各组 MC 的迁移距离。每膜随机检测 5 个视野, 每组各两张膜共 10 个视野读数。算出平均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$), 进行多组均数两两比较的方差分析^[7]。

1.4.2 致有丝分裂活性试验 用 NIH 3T3 纤维母细胞 (武汉大学生物系提供) 进行。培养基用含 10% 小牛血清的 M199 (Sigma 公司)。待细胞长满后, 用 0.1% 胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液, 用无血清 DME/F12 混合培养基 (Sigma 公司) 调细胞密度为 $1.2 \times 10^5 \cdot L^{-1}$, 分种于 3 个 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 200 μ l。培养 24 h 后, 吸出 100 μ l, 换以等量新鲜培养液。每 8 孔为一组, 共 30 组, 并每孔加入相应的层析洗脱物组分 20 μ l (对照组不加)。培养 20 h 后, 加入氘-胸腺嘧啶核苷 (³H-thymidine, ³H-TdR; 中国科学院原子能研究所), 终浓度为每孔 1.0 μ Ci。继续培养 4 h 后, 吸去培养基, D-Hanks 缓冲液洗 2~3 次, 每孔加入 0.1 mol · L⁻¹ NaCl 200 μ l, 使细胞溶解, 继将其吸入盛有 7 ml 闪烁液的闪烁杯中, 避光 24 h, 液体闪烁计数器测定其放射活度。

Table 1. Grouping in chemotactic assay using modified Boyden chamber.

| Group | liquids of minocyte suspension in upper well | experiment liquids in lower well |
|---------------------|--|----------------------------------|
| (1)positive control | DME/F12 | activated serum |
| (2)random migration | DME/F12 | DME/F12 |
| (3)chemotaxis | DME/F12 | DME/F12 containing FGF extract |
| (4)chemokinesis | DME/F12 containing FGF extract | DME/F12 containing FGF extract |

1.4.3 分子量测定 用 NaDodSO₄-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行,以检测具有强致有丝分裂活性洗脱物的分子量。分子量标准品为:溶菌酶(lysozyme)14.3 kDa、 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin)18.4 kDa、胰蛋白酶原(trypsinogen)24.0 kDa。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(0.025 mol·L⁻¹ Tris, 0.192 mol·L⁻¹ 甘氨酸, 0.1% SDS)。2x 样本缓冲液含 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.0)、0.4% SDS、20%甘油、20% β -巯基乙醇和 0.04% 溴酚蓝。电泳在 20 mA 稳流状态下进行,直至溴酚蓝到达凝胶的另一端时停止。取出凝胶,双蒸水洗,放于 Coomassie 亮蓝 R250 染液中染 4 h 或更长,于冰醋酸-甲醇混合液(1:9)中脱色,至蛋白带清晰为止。量出标准品和样本及溴酚蓝的迁移距离,计算出样本中蛋白质的分子量。

1.4.4 免疫杂交分析 将原浓度样本和稀释一倍的样本用狭缝点样器点于硝酸纤维素膜上,对照组以 PBS 代替。风干后,加入抗 bFGF 多克隆抗体(1:25)。二抗用抗小鼠 IgG (1:100)。最后加酶标 SP (1:100),DAB/H₂O₂ 显色。用 TJTY 300 型图像处理系统测定样本的积分光密度值。

2 结果

2.1 纤维母细胞生长因子提取物对兔血单核细胞的趋化试验

实验重复 3 次,共得 30 个读数。各组的 MC 移动距离见 Table 2。从 Table 2 所示,趋化运动组和阳性对照组的 MC 移动距离均明显大于随机移动组和化学促动组,经统计学处理,差异有极显著性意义($P < 0.01$)。随机移动组的 MC 移动距离与化学促动组接近,阳性对照组的 MC 移动距离虽略大于趋化运动组,经统计学处理,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2 层析洗脱物对 NIH 3T3 纤维母细胞的致有丝分裂试验

将 29 个层析洗脱物组分分加入培养的

Table 2. Monocyte migration distance induced by FGF extract ($\bar{x} \pm s$, μm).

| Group | n | migration distance |
|---------------------|----|--------------------|
| (1)positive control | 30 | 100.23 \pm 10.62 |
| (2)random migration | 30 | 68.47 \pm 17.99 |
| (3)chemotaxis | 30 | 89.00 \pm 15.36 |
| (4)chemokinesis | 30 | 73.33 \pm 17.06 |

NIH 3T3 细胞中,并加入 ³H-TdR,经液体闪烁计数器检测各组的放射活度,结果见 Figure 1。可见组分 23 和 24 有明显促进 ³H-TdR 掺入 NIH 3T3 细胞 DNA 现象,二者被含有 1.4~1.6 mol·L⁻¹ NaCl 的洗脱液洗脱下来。

2.3 分子量测定

将具有明显致有丝分裂活性的组分 23 和 24 进行 SDS-PAGE,凝胶经 Coomassie 亮蓝 R250 染色后,显示出明显条带,其迁移距离与分子量标准品 β 乳球蛋白相当,即这两个组分的分子量约为 18.4 kDa (Figure 2)。

2.4 免疫杂交分析

将上述具有明显致有丝分裂活性的组分 23 和 24 用狭缝点样器点于硝酸纤维素膜上,加入抗 bFGF 多克隆抗体,经 DAB/H₂O₂ 显色后,用图像处理系统检测,依稀释度显示出不同的光密度值(Table 3)。由于这两个组分能与 bFGF 抗体结合,说明该组分为 bFGF。

Table 3. Immunoblot analysis of the fraction 23~24.

| Groups | values of integral optical density |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| fraction 23~24 | 146.98 |
| 1-fold dilution of fraction 23~24 | 82.58 |
| control | 0 |

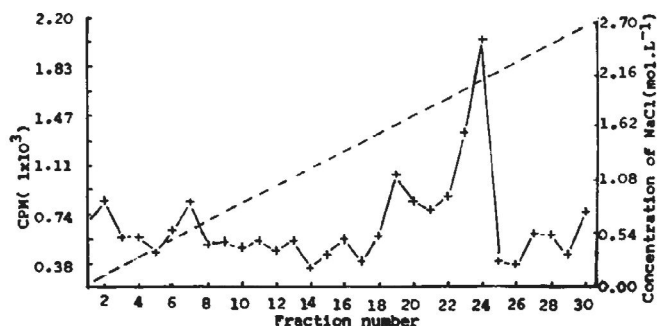


Figure 1. Stimulation of DNA synthesis in NIH 3T3 cells by the fractions from heparin affinity chromatography. Cells were treated with 30 fractions, respectively, incubated for 20 h, and then pulsed with 1.0 μCi of ^3H -TdR/well (96-well plate) for 4 h. Incorporation of radioactivity was determined by scintillation counting. The figure showed that fraction 23~24 revealed a strong stimulation of DNA synthesis (^3H -TdR incorporation).

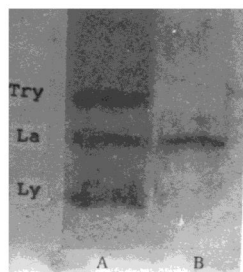


Figure 2. SDS-PAGE of pools from 1.4~1.6 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl eluate (fraction 23~24). Fraction 23~24 (lane B) had a molecular weight approximately of 18.4 kDa. Molecular weight markers (lane A; lysozyme, Ly 14.3 kDa; β -lactoglobulin, La 18.4 kDa; trypsinogen, Try 24 kDa). Coomassie brilliant blue stained.

3 讨论

已知 FGF 与肝素有强亲和性^[2], 由于 FGF 无信号肽, 正常情况下不能从细胞分泌出来。本实验将培养的 SMC 超声粉碎, 以提取细胞内 FGF。经肝素亲和层析取得了 NIH 3T3 细胞

有强的刺激其 DNA 合成 (^3H -TdR 掺入) 的组分 (组分 23 和 24)。将该组分进行免疫杂交分析, 证明其能与抗 bFGF 多克隆抗体结合。而且, 经 SDS-PAGE 显示其分子量约 18.4 kDa。这些生物学特性与文献报道的 bFGF 基本一致^[1], 因此我们认为, 本实验纯化所得这些组分为 bFGF。

FGF 是一种多功能性因子。它能刺激许多细胞增殖^[3], 包括纤维母细胞、角膜内皮细胞、血管内皮细胞、血管 SMC、颗粒膜细胞、软骨细胞、骨母细胞、肌母细胞、胶质细胞和大鼠神经元前体细胞等。另一方面, FGF 也是一种趋化因子, 可引起内皮细胞、纤维母细胞和星形细胞的迁移。本实验结果表明, SMC 源性 FGF 能引起 NIH 3T3 细胞增殖, 并能引起血液单核细胞的迁移。FGF 的致有丝分裂和趋化特性, 以及其可能有调节神经元分化的作用, 提示其在胚胎发育中可能起重要作用。

SMC 源性 FGF 在 As 发生中起何作用? 这是一个值得探讨的问题。在胎纹形成时, 病灶中含有大量的巨噬细胞源性泡沫细胞和不等量的合成型 SMC^[1]。作者曾报道在兔和鸽的实验性 As 斑块中亦含有巨噬细胞源性和 SMC 源性两种泡沫细胞^[9-10]。随着斑块的进展, 从中膜穿

过内弹性膜窗孔进入内皮下间隙的 SMC 不断增殖,并产生细胞外基质(胶原、弹性蛋白及蛋白多糖),逐渐形成纤维帽。然而,进入动脉内膜的低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白及其被动脉壁内皮细胞修饰的氧化低密度脂蛋白及氧化极低密度脂蛋白若超过了巨噬细胞清道夫受体的清除能力时,便导致这两种氧化脂蛋白的堆积,而这些微粒均为细胞毒性,可引起内皮细胞、SMC、巨噬细胞的损伤甚至死亡^[1]。这时,FGF 便可从上述受损伤的细胞内释放出来,可引起血液单核细胞继续迁入内膜和 SMC 增殖。所以,我们认为 SMC 源性 FGF 在 As 病变的发展中起着一定的作用。

参考文献

- Schwartz CJ, Valente AF, Sprague EA, et al. The pathogenesis of atherosclerosis: An overview. *Clin Cardiol*, 1991, 14 (Suppl 1): 1~16.
- Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, et al. Regulation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 1990, 10(6): 966~990.
- Klagsbrun M, Edelman ER. Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors. Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1989, 9(3): 269~278.
- 朱闻宏,邓仲端,徐增绶, et al. 兔动脉平滑肌细胞培养产生单核细胞趋化因子的观察. *中华医学杂志*, 1991, 71(9): 505~508.
- Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83 (7): 2 091~95.
- 朱闻宏,邓仲端.兔血单核细胞的分离方法. *中国病理生理杂志*, 1992, 8 (4): 405.
- 阮秋蓉,邓仲端.氧化低密度和极低密度脂蛋白对单核细胞的趋化性研究. *中国动脉硬化杂志*, 1994, 2 (2-3): 77~80.
- Lobb RR, Harper JW. Purification of heparin-binding growth factors. *Anal Biochem*, 1986, 154 (1): 1~14.
- 邓仲端.动脉粥样硬化斑块中泡沫细胞的超微结构研究. *中华病理学杂志*, 1985, 14(1): 19~21.
- 邓仲端,徐增绶,李丽珠, et al. 家鸽实验性冠状动脉粥样硬化的超微结构观察. *中国循环杂志*, 1989, 4(4): 361~363.

名词术语的汉英对照及缩写

干扰素诱导蛋白
心率变异
生长调节蛋白
巨噬细胞炎性蛋白
巨噬细胞源性泡沫细胞
谷胱甘肽
过氧化物酶
血管紧张素
纤维蛋白溶酶原
纤维母细胞生长因子
抗氧化酶
抗利尿激素
抗生长激素
抗载脂蛋白
脂蛋白脂酶
粘附分子

interferon-induced protein, IIP
heart rate variability, HRV
growth-regulated protein, GRP
macrophage inflammatory protein, MIP
macrophage-derived foam cell, MDFO
glutathione, GSH
peroxidase, POA
angiotensin, At
plasminogen, Pg
fibroblast growth factor, FGF
antioxidizing enzyme, AOE
antidiuretic hormone, ADH
antigrowth hormone, AGH
antiapolipoprotein, AALP
lipoprotein lipase, LPL
adhesion molecule, AM

(胡必利编写)