

血酶的底物浓度增大, 酶切效率就自然提高了. c. 枸橼酸酐对 Arg 残基修饰后, 导致修饰后 Arg 更易被蛋白酶水解. 深入对此进行研究将有助于了解蛋白质与蛋白酶之间的互作用. 在应用研究上, 由于已有大量基因工程产品应用限制性蛋白酶水解策略进行生产, 因而本文结果的应用有可能大量节约凝血酶等蛋白酶, 并提高蛋白质回收率.

综上所述, 由于枸橼酸酐微量修饰有助于重组蛋白的变性、复性, 增高了修饰蛋白凝血酶的敏感性, 去修饰后蛋白质的生物活性不受影响, 因而微量枸橼酸酐修饰是进行重组蛋白纯化的十分有用的方法.

参 考 文 献

- 1 Kun Liang Guan, Dixon K. *Analytical Biochemistry*, 1991; **192**: 262
- 2 马大龙 狄春辉, 庞建等. *高技术通讯*, 1991; **11**: 26
- 3 周宝宏 马大龙, 狄春辉等. *中国免疫学杂志*, 1993; **9** (3): 147
- 4 马大龙, 张颖妹, 宋泉声等. *中华微生物和免疫学杂志*, 1995; **15** (3): 168
- 5 Dixon H B F, Perham R N. *Biochem J*, 1968; **109**: 312
- 6 Kitamura T, Tange T, Terasawa T. *J Cell Physiol*, 1989; **140**: 323
- 7 冯岚, 马大龙, 狄春辉等. *生物化学杂志*, 1993; **9** (3): 337
- 8 Habeeb A F S A, Atassi M Z. *Biochemistry*, 1970; **9**: 4939
- 9 Singhal R P, Atassi M Z. *Biochemistry*, 1971; **10**: 1756

Citraconic Anhydride Modification on the Recombinant Protein Expressed in *E. coli*.
Feng Dan, Yuan Yong, Zhang Yingmei, Feng Lan, Fan Hui, Di Chunhui, Song Quansheng, Ma Dalong (Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The solubility of the protein can be increased by citraconic anhydride (CT) modification. According to this principle, the effects of the CT modification on the fusion protein using rhGM-CSF as a model which contain thrombin cleavage sites have been studied. The result demonstrated that the process of denature and renature in the modified protein was much easier than that in unmodified counterpart. In addition the modified protein is more sensitive to thrombin digestion, one percent amount of thrombin was enough to achieve the complete digestion. The modification by CT did not effect the bioactivity of rhGM-CSF. A new way was paved in the purification of recombinant protein by CT modification method.

Key words citraconic anhydride, GM-CSF, thrombin, protein modification

氧化修饰脂蛋白刺激人动脉平滑肌 细胞 DNA 合成*

汪浩川 刘秉文¹⁾ 付明德

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

摘要 动脉平滑肌细胞 (SMC) 是动脉粥样硬化 (As) 斑块中的主要细胞, 它的增殖在 As 的形成过程中极为重要. 在建立人主动脉 SMC 体外培养法的基础上, 通过³H-TdR 掺入实验观察了人低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 及高密度脂蛋白 (HDL) 和相应的氧化修饰型脂蛋白对培养

*国家教委博士点科学基金及纽约中华医学基金部分资助课题. ¹⁾通讯联系人.

收稿日期: 1996-01-10, 修回日期: 1996-09-16

人 SMC DNA 合成的影响。结果发现, HDL 对³H-TdR 掺入 SMC DNA 无影响 ($P > 0.05$); LDL 和 VLDL ³H-TdR 掺入量明显增加 ($P < 0.05$); OX-LDL、OX-VLDL 及 OX-HDL 均使³H-TdR 掺入 DNA 显著增加 ($P < 0.01$), 结果表明, LDL 和 OX-LDL、OX-VLDL 及 OX-HDL 均能刺激 SMC DNA 合成, 促进 SMC 增殖。

关键词 人动脉平滑肌细胞, 脂蛋白, 氧化修饰脂蛋白, 细胞增殖, DNA 合成, 动脉粥样硬化

动脉平滑肌细胞的增殖在动脉粥样硬化的形成进程中发挥重要作用^[1-3]。研究脂蛋白和氧化修饰脂蛋白对 SMC 增殖的影响对探讨 As 发病机制有重要意义。1989 年 Burden 报道^[4], 将低浓度的 LDL 加入 SMC 培养液, 可诱发 SMC 细胞增殖, DNA 合成增加。迄今尚未见氧化修饰脂蛋白 (OX-LDL、OX-VLDL 及 OX-HDL) 对培养人动脉 SMC DNA 合成影响的报道。我们在建立人主动脉 SMC 体外培养方法^[5-6]的基础上, 对 LDL、VLDL 及 HDL 和相应的氧化修饰脂蛋白对培养人 SMC DNA 合成的影响进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

人主动脉平滑肌细胞第 25~30 代, 本室自行培养。DMEM 培养基 (Gibco), 新生小牛血清 (成都市华西生化制品厂), Hepes (Merck)、谷氨酰胺、丙酮酸钠、胰岛素 (Sigma), 青霉素、链霉素、庆大霉素 (华北制药厂)。CO₂ 孵箱 (Quene, USA), 24 孔培养板、大号培养板 (Gibco) 公司。³H-TdR (北京原子能研究所)。

1.2 方法

1.2.1 脂蛋白、无脂血清 (LDPS) 及氧化修饰脂蛋白的制备: 按本室^[7]建立的一次性密度梯度超速离心法分离纯化 VLDL、LDL 及 HDL。蛋白质浓度按 Markwell 等法^[8]测定。脂蛋白的氧化修饰按 CuSO₄ 法进行, 取 LDL、VLDL 和 HDL 溶液 1 ml, 加入 1 mmol/L CuSO₄ 灭菌溶液使 Cu²⁺ 的最终浓度为 10 μmol/L, 置 37℃ 保温 24 h。

1.2.2 人主动脉平滑肌细胞的培养: 按本室建立的方法^[5]。

1.2.3 ³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 掺入 DNA 实验^[9]: 按传代法制备 SMC 细胞悬液, 细胞密度为 4×10^4 个/ml。接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 细胞密度为 2×10^4 /cm², 用 DMEM 完全培养液, 置 CO₂ 孵箱培养 48 h。吸去培养液用 PBS 洗涤细胞后, 加入无血清培养液, 继续培养 24 h。分别将 LDL、VLDL、HDL 及 OX-LDL、OX-VLDL 和 OX-HDL 加入每孔的培养液中, 每个样品均加 6 孔, 脂蛋白中蛋白质含量为 25 μg/孔。留下 6 孔不加脂蛋白为对照。然后每孔加入 11.1×10^4 Bq ³H-TdR 标记物, 混匀, 继续培养 24 h。吸去培养液, 用预冷的 Tris-HCl, pH 7.4 溶液洗涤细胞三次。然后, 每孔加 1 ml 0.1 mol/L NaOH 溶液, 室温放置 1 h, 裂解细胞。每孔取 0.4 ml 用于细胞蛋白质浓度测定。制膜后在液体闪烁计数器计数。³H-TdR 掺入 DNA 量用每 μg 细胞蛋白质的放射性计数值表示。用 *t* 检验处理各组数据。重复实验 2~3 次。

2 结 果

2.1 天然和氧化修饰脂蛋白电泳鉴定

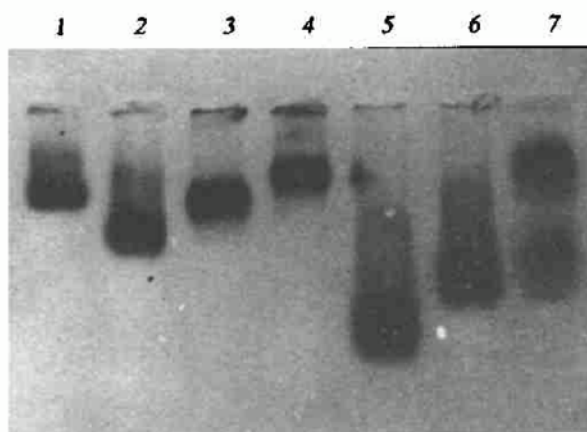


图 1 天然和氧化修饰脂蛋白琼脂糖凝胶电泳
1: VLDL; 2: OX-VLDL; 3: OX-LDL; 4: LDL;
5: OX-HDL; 6: HDL; 7: 正常人血清。

HDL、VLDL 和 LDL 电泳位置分别与正常人血清的 α 脂蛋白, 前 β 脂蛋白和 β 脂蛋白相对应. 而 OX-HDL、OX-VLDL 及 OX-LDL 因所含负电荷增多, 其电泳迁移率均较相应天然脂蛋白大. 结果表明, 本实验所用脂蛋白及

氧化修饰脂蛋白均符合要求 (图 1).

2.2 脂蛋白对 SMC DNA 合成的影响

天然和氧化修饰脂蛋白对培养人动脉 SMC DNA 合成的影响见表 1 和图 2.

表 1 天然及氧化修饰脂蛋白对培养人 SMC DNA 合成的影响¹⁾

序号	对照	LDL	OX-LDL	VLDL	OX-VLDL	HDL	OX-HDL	LDL-HDL	LDL-OX-HDL
1	198	425	893	411	821	311	551	411	1904
2	220	493	920	545	734	344	633	484	872
3	392	792	792	397	862	212	492	612	850
4	232	385	1207	608	933	403	821	681	1002
5	252	514	980	318	921	321	612	393	921
6	284	491	1024	491	985	192	581	323	1308
$\bar{x} \pm s$	263 ± 70	517 ± 143	969 ± 141	462 ± 106	876 ± 90	297 ± 81	615 ± 112	484 ± 138	1143 ± 409
$P^2)$		<0.05	<0.01	<0.05	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01
P		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01	

¹⁾ H^3 -TdR 掺入 DNA 量, 以每 μg 细胞蛋白质的放射性计数值表示. ²⁾ P : 与对照组比较.

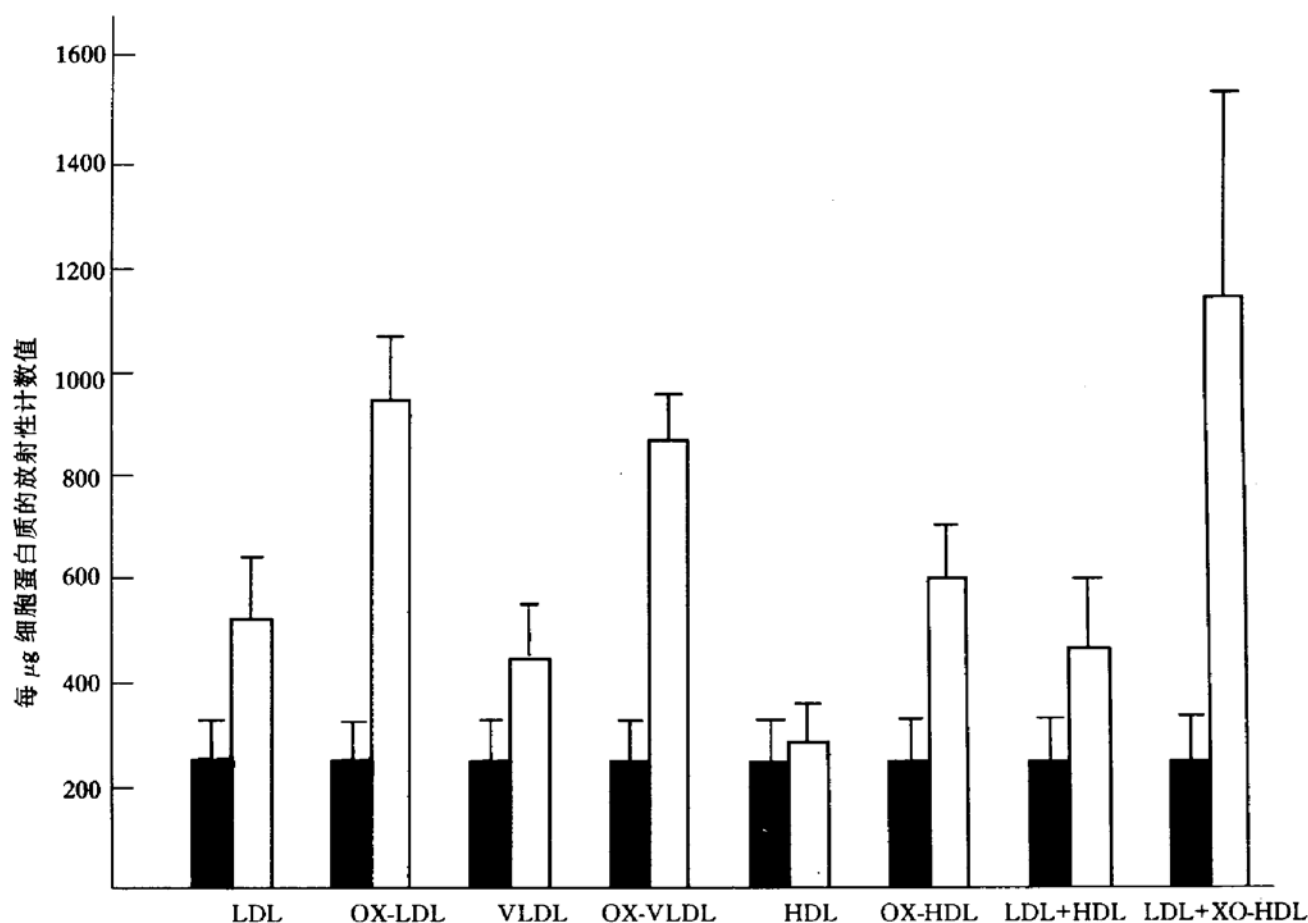


图 2 天然及氧化修饰脂蛋白对培养人 SMC DNA 合成的影响

■: 对照组; □: 脂蛋白组.

由表 1、图 2 可见, HDL 对³H-TdR 掺入 SMC DNA 量无影响, 对照组每 μg 细胞蛋白质的放射性计数值为 263 ± 70 , 加 HDL 组为 297 ± 81 , 两组无显著差异, $P > 0.05$. 而 LDL 及 VLDL 均可显著刺激³H-TdR 掺入 SMC DNA (263 ± 70 对 517 ± 143 及 263 ± 70 对 462 ± 106 , $P < 0.05$), 表明 LDL 及 VLDL 均可促进 SMC DNA 合成, 刺激 SMC 增殖. 天然脂蛋白经氧化修饰后, 不仅 OX-LDL, 而且 OX-VLDL 及 OX-HDL 均显著刺激 SMC DNA 合成, ³H-TdR 掺入量分别较对照组增加 2.68、2.33 及 1.34 倍, P 值均 < 0.01 , 表明 LDL、VLDL 甚至 HDL 经氧化修饰后均刺激 SMC DNA 合成, 且其刺激作用均较相应天然脂蛋白大, 与天然 LDL、VLDL 及 HDL 脂蛋白组比较, 氧化修饰脂蛋白分别增加 87%、89% 及 107% ($P < 0.01$). LDL + HDL 组的³H-TdR 掺入量略低于 LDL 组, 提示天然 HDL 对 LDL 刺激 SMC DNA 合成可能具有抑制作用. LDL + OX-HDL 组³H-TdR 的掺入量则稍多于 LDL 组与 OX-HDL 组之和, 提示 OX-HDL 与 LDL 在促进 SMC 合成 DNA 上可能具有协同作用.

3 讨 论

3.1 天然脂蛋白与 SMC 增殖

脂蛋白与 As 形成的关系一直是人们关注的课题. Burden 等^[4] 1989 年报道, 低浓度 LDL 对培养 SMC c-myc 和 c-fos 原癌基因表达具明显促进作用, 并使 SMC 合成 DNA 增加, 细胞增殖. 我们的研究表明, 低浓度 LDL 及 VLDL (25 mg/L) 与人 SMC 培养 24 h 显著刺激 SMC DNA 合成增加 ($P < 0.05$) 我们所得结果与文献报道一致, 表明 LDL 的致动脉粥样硬化作用可能与刺激动脉壁 SMC 增殖有关. 值得提出的是, 天然的 VLDL 和 LDL 一样, 也具有促进培养 SMC DNA 合成的作用, 这表明 VLDL 亦具有致 As 作用. 这或可解释我们以往观察到的成都地区冠心病及脑动脉粥样硬化患者血脂升高不是以胆固醇升高为主,

而是以 TG (VLDL) 升高为主要表现^[10,11] 的原因. 关于血浆 VLDL 升高与 As 关系的研究, 近来已引起国际上广泛关注^[13]. 此外, 本研究还发现, 天然 HDL 与 LDL 和 VLDL 不同, 对³H-TdR 掺入培养 SMC 无影响. 表明 HDL 不能刺激动脉 SMC 的增殖. 这与大量流行病学调查及实验研究结果表明, HDL 具有抗动脉粥样硬化作用^[12] 相符.

3.2 氧化修饰脂蛋白与 SMC 增殖

Steinberg 等^[14] 的研究表明, 氧化修饰 LDL 与 As 的形成关系密切, 且其致 As 作用比天然 LDL 更强. 但尚未见氧化修饰脂蛋白对 SMC DNA 合成影响的报道. 我们的研究结果表明, 天然脂蛋白 (LDL、VLDL 及 HDL) 氧化修饰后可显著刺激³H-TdR 掺入培养人动脉 SMC DNA, 促进 SMC 增殖 ($P < 0.01$), 且其对 SMC 的作用较相应的天然脂蛋白明显增强 ($P < 0.01$). 应特别指出的是, 天然 HDL 对 SMC DNA 合成本无影响, 然而经过氧化修饰后, 即具较强的致 As 作用. 近年的研究表明, 在某些情况下, 如高脂血症、超氧负离子 (O_2^-) 等存在的情况下, 活体内可有 OX-LDL 的形成. 根据我们的研究, 我们推测在活体内不仅有 OX-LDL 的形成, 而且也可能有 OX-VLDL 及 OX-HDL 的形成. 这二种氧化修饰脂蛋白和 OX-LDL 一样具有致 As 的作用. 因此, 我们认为在研究 As 发病机制时, 不仅应注意 OX-LDL 的作用, 而且也应注意 OX-VLDL 及 OX-HDL 的作用.

参 考 文 献

- 1 Ross R. New Engl J Med, 1986; 314 (7): 488
- 2 Ross R. Nature, 1993; 362 (4): 801
- 3 汪浩川, 刘秉文. 生理科学进展, 1994; 25 (1): 48
- 4 Burden T S, Resink T G, Hahn A W A *et al.* J Biol Chem, 1989; 264 (12): 12582
- 5 汪浩川, 刘秉文, 付明德. 华西医科大学学报, 1995; 26 (1): 105
- 6 汪浩川, 刘秉文. 中华病理学杂志, 1995; 24 (3): 185
- 7 张林华, 刘秉文. 生物化学与生物物理学报, 1989; 21 (3): 257

(下转第 557 页, Continued on page 557)

- 3 Bowenkamp K E, Hoffman A F, Gerhardt G A *et al.* J Comp Neurol, 1995; **355** (4): 479
- 4 Beck K D, Valverde J, Alexi T *et al.* Nature, 1995; **373**: 339
- 5 Oppenheim R W, Houenou L J, Johnson J E *et al.* Nature, 1995; **373**: 344
- 6 Yan Q, Matheson C, Lopez O T. Nature, 1995; **373**: 341

Cloning of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene and Purification of Expressed Product. Chen Yan, Zhang Ying, Li Jinzhao, Deng Wei, Xia Lingchao, Qiu Rong (*Institute*

of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China).

Abstract The coding sequence of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was amplified from human genomic DNA by PCR method. Recombinant GDNF was expressed in *E. coli* and purified.

Key words glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), PCR method, coding sequence, expression, purification

(上接第 547 页, Continued from page 547)

- 8 Markwell M K, Haas S M, Bieber L L *et al.* Anal Biochem, 1987; **87** (2): 206
- 9 Oikaw S, Hori S, Sanc R *et al.* Atherosclerosis, 1987; **64** (1): 7
- 10 刘秉文, 吴兆锋, 张荣爵等. 中华医学杂志, 1982; **62** (9): 531
- 11 刘秉文, 邵美珍, 袁鸿江等. 华西医科大学学报, 1989; **20** (2): 119
- 12 Gotto Jr A M. Am J Cardio, 1992; **70** (Suppl): 19H
- 13 刘秉文, 曾成林. 中国动脉硬化杂志, 1994; **2** (1): 44
- 14 Steinberg D, paratharathy S, Carew T E *et al.* New Engl J Med, 1989; **320** (14): 915

Oxidization-Modified Lipoproteins Stimulate DNA Synthesis of Cultured Human Arterial SMC. Wang Haochuan, Liu Bingwen, Fu Mingde (*Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

Abstract The arterial smooth muscle cells (SMC) are the predominant type of cells within atherosclerotic (As) lesions, and their proliferation plays an important role in the process of As

genesis. On the basis of the establishment of primary culture and sub-culture method for human arterial SMC, the effects of LDL, VLDL, HDL, OX-LDL, OX-VLDL, OX-HDL on DNA synthesis of cultured human arterial SMC were observed. Results are as follows: (1) HDL had no stimulating effect on ^3H -TdR incorporation into DNA of SMC ($P > 0.05$); (2) LDL and VLDL showed the obvious stimulating effects ($P < 0.05$); (3) OX-LDL, OX-VLDL and OX-HDL increased significantly ^3H -TdR incorporation into SMC DNA, respectively ($P < 0.01$). These results suggest that the atherogenic roles of LDL, VLDL, OX-LDL, OX-VLDL, OX-HDL are closely related to their stimulating effects on DNA synthesis and the proliferation of the arterial SMCs.

Key words arterial smooth muscle cell, native lipoprotein, oxidization-modified VLDL, LDL, HDL, cell proliferation, DNA synthesis, atherosclerosis