

The Effect of T-2 Toxin on the Extracellular Matrix and the Enzymes of Mitochondrial Inner Membrane of Cultured Chicken Embryo Chondrocytes

Li Shengguang Sun Shan Wu Lianying Ji Huifen Hong Jie Lin Zhihuan

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

ABSTRACT

The chicken embryo chondrocytes were cultured in the media containing different concentrations of T-2 toxin from *Fusarium tricinctum*, which was similar in structure with that from *Fusarium* species found in grains from Kaschin-Beck disease area. When the concentration of the T-2 toxin rose to 0.01 ppm, the collagen microfibrils in extracellular matrix of chicken embryo chondrocytes were significantly decreased, and the activities of cytochrome c oxidase and H^+ -ATPase of mitochondria were obviously lower than that of the control. The results showed that 0.01 ppm the T-2 toxin induced the changes of structure and function of chicken embryo chondrocytes. The methods reported provided an effective measure to examine if the factor which induced the Kaschin-Beck disease attacked on the target tissue——chondrocytes directly.

Key words T-2 toxin, cultured chicken embryo chondrocyte, extracellular matrix, cytochrome c oxidase, H^+ -ATPase

牛脑成纤维细胞生长因子的分离纯化与鉴定*

薛沿宁 王会信 周廷冲 邵宁生 王 芳

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

新鲜牛脑组织匀浆液经两步硫酸铵沉淀、CM-Sephadex C50 离子交换层析以及肝素-Sepharose 亲和层析, 可得到纯化的酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF 和 bFGF), 分子量分别为 13.2kD 和 15.2—15.8kD. 两种因子均可有效促进 3T3 细胞的 DNA 合成, ED_{50} 分别为 15.8ng/ml 和 0.32ng/ml. 进一步对 aFGF 的等电点及氨基酸组成做了分析.

关键词 成纤维细胞生长因子, 肝素亲和层析, DNA 合成

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是由 Gospodarowicz 等人发现的, 对中层及神经外胚层来源的细胞都有促分裂

活性的多肽生长因子^[1]. 根据等电点的不同,

*国家基金资助课题.

收稿日期: 1992-07-04

修回日期: 1992-11-10

FGF 可分为酸性 (aFGF) 和碱性 (bFGF) 两类. 这两类因子作用的靶细胞基本相同, 但 bFGF 的活性通常大于 aFGF. 两类因子都可与肝素结合, 但 bFGF 与肝素的亲和力强于 aFGF. aFGF 和 bFGF 还都是强的血管生长因子及神经营养因子, 在创伤愈合及神经损伤修复等方面有着广阔的应用前景, 因此 FGF 的研究引起人们极大兴趣.

FGF 存在于大多数哺乳动物组织中, 其中神经组织中 FGF 的含量高于其他组织. 目前, 国外已有许多关于从神经组织中分离纯化 FGF 的报道, 但产量依然较低, 而国内还未见这方面的文献报道. 本文以牛脑为原料, 用肝素亲和层析方法纯化得到电泳纯的 aFGF 和 bFGF, 其中 aFGF 的产率较文献报道有所提高.

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜牛脑购自北京大红门牛羊肉联合加工厂. 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所. CM-Sephadex C50, 肝素-Sephadex CL-6B 为瑞典 Pharmacia 公司产品. DMEM 培养基、细胞微孔培养板为美国 GIBCO 公司产品. ^3H -胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR) 为北京原子能所生产. Balb/c 3T3 成纤维细胞由中国医学科学院肿瘤研究所提供. 两性电解质 (pH 3.5—9.0) 由本院放射医学研究所提供. 等电点标准蛋白购自 Bio-Rad 公司.

1.2 方法

1.2.1 FGF 的纯化方法 参照 Gospodarowicz 的方法^[2], 取 1kg 新鲜牛全脑经匀浆、两步硫酸铵沉淀及 CM-Sephadex C50 离子交换层析, 最后上肝素-Sephadex 亲和层析柱, 依次用 0.8 mol/L, 1 mol/L, 2 mol/L NaCl 洗脱, 收集 1 mol/L 和 2 mol/L NaCl 两个洗脱峰, 分别对 20mmol/L PBS (pH7.2) 透析后用于活性分析、电泳分析及氨基酸组成分析.

1.2.2 FGF 的活性检测方法 传代 Balb/c 3T3 细胞经 0.25% 胰酶消化, 接种到

48 孔培养板, 每孔 2×10^4 细胞. 10h 后换含 0.2% 小牛血清的 DMEM, 继续培养 36h, 加稀释好的 FGF 样品. 12h 后加 ^3H -TdR, 每孔 2 μCi . 再培养 24h 后去掉培养介质, 用生理盐水洗 1 次, 加甲醇固定 2 次, 每次 5min. 用水洗 3 次后加 5% 三氯乙酸洗 2 次, 每次 10min, 再用水洗 3 次后加 0.5mol/L NaOH 溶解细胞. 将溶解液加到滤膜片上, 红外灯下烤干, 加入闪烁液 (0.01% POPOP, 0.4% PPO, 二甲苯) 中于 LKB 2215 液闪仪上计数.

1.2.3 其它 蛋白浓度测定采用 Lowry 法, 以牛血清白蛋白作标准^[3]. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmli 的方法^[4], 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4.5%. 等电聚焦电泳参照 Laas 的方法^[5], 在 LKB 2117 多用电泳仪上进行. 蛋白电泳银染色参照姚志建报导的方法^[6], 氨银溶液用甲胺和氢氧化钠配制. 氨基酸组成分析在日立 835-50 氨基酸自动分析仪上进行, 由国家中医药管理局质量监测站协助完成.

2 结果

2.1 牛脑 FGF 的分离纯化

牛脑匀浆液经 1.51mol/L 和 3.84mol/L 两步硫酸铵沉淀, 在 3.84mol/L 的沉淀组分中观察到强的促分裂活性. 将此组分上 CM-Sephadex C50 柱并经 0.15mol/L 和 0.6mol/L NaCl 洗脱后, 活性峰为 0.6mol/L NaCl 洗脱

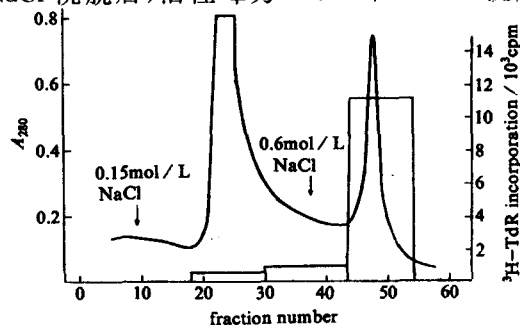


图1 3.84mol/L 硫酸铵沉淀样品的 CM-Sephadex C50 层析图

Fig. 1 Chromatography of 3.84mol/L salt fraction on CM-Sephadex C50

峰(图 1). 将这一活性组分直接上肝素-Sephadex 柱, 分别用 0.8, 1.0 和 2.0mol/L NaCl 洗脱, 可在 1.0mol/L 和 2.0mol/L 洗脱峰中(分别为 aFGF 和 bFGF)获得高活性(图 2).

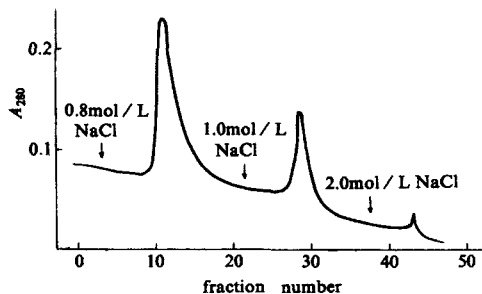


图 2 CM-Sephadex C50 上 0.6mol/L NaCl 洗脱组分的肝素-Sephadex 亲和层析图谱

Fig. 2 Affinity chromatography of 0.6mol/L fraction of CM-Sephadex C50 on heparin-Sephadex

分析各步样品剂量效应曲线可得到近似 S 形的曲线(图 3), 经 logistic 曲线拟合后可求得各步样品的 ED_{50} . 将 ED_{50} 定义为一个活力单位, 则可求得各纯化步骤获得的总活力单位, 活力回收及纯化倍数(表 1).

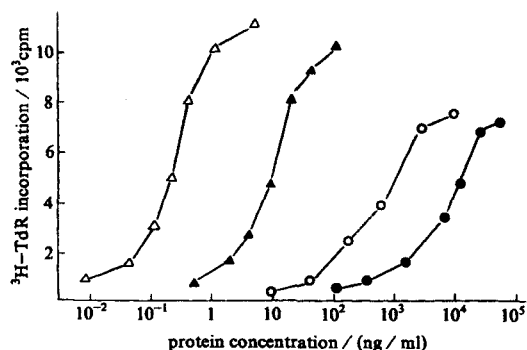


图 3 各纯化步骤样品的促分裂活性

Fig. 3 Mitogenic activities of fractions taken from various purification steps.

- — • : 3.84 mol/L 硫酸铵沉淀样品;
- — • : 0.6 mol/L NaCl 洗脱峰 (CM-Sephadex C50);
- ▲ — ▲ : 1.0 mol/L NaCl 洗脱峰 (肝素-Sephadex);
- △ — △ : 2.0 mol/L NaCl 洗脱峰 (肝素-Sephadex).
- — • : 3.84 mol/L Salt fraction
- — • : CM-Sephadex C50, 0.6 mol/L NaCl fraction
- ▲ — ▲ : heparin-Sephadex, 1.0 mol/L NaCl fraction
- △ — △ : heparin-Sephadex, 2.0 mol/L NaCl fraction

表 1 牛脑 FGF 的分离纯化¹⁾

Table 1 Purification of FGF from bovine brain

纯化步骤	蛋白回收 (mg)	ED_{50} (ng/ml)	总活力 ²⁾ ($U \times 10^5$)	活力回收 (%)	纯化倍数
Purification steps	Total protein		Total activity	Recovery of activity	Purification factor
硫酸铵沉淀 salt fraction	10200	4.8×10^3	21.3	100	1
CM-Sep- hadex C50	560	300	18.7	87.8	16
肝素-Sephadex heparin-Sephadex					
1 mol/L NaCl	1.6	15.8	1.0	4.7	300
2 mol/L NaCl	0.067	0.32	2.1	9.9	15000

1) 以 1kg 牛脑为原料.

Take 1kg bovine brain as starting material

2) 以 ED_{50} 的 FGF 量为 1 个活力单位.

One unit of activity is defined as the quantity of FGF required to give half-maximal stimulation of incorporation of 3H -TdR into DNA in the assay system described.

2.2 牛脑 FGF 的鉴定

经 SDS-PAGE 后的银染色显示, aFGF 为一条带, 分子量 13.2kD; bFGF 为相近的两条带, 分子量约为 15.2kD 和 15.8kD (图 4). 由于 bFGF 含量很低, 难以获取足够量的样品用于鉴定, 因此我们只做 aFGF 的鉴定.

aFGF 等电聚焦电泳扫描显示在 pH5.0—6.0 之间有多条带(图 5), 说明它有酸性等电点. 氨基酸组成分析表明, 大部分氨基酸数目与标准值基本相符(表 2), 但 Glu, Ala, Lys 差别较大, Cys, Met, Tyr 用此方法检测不到.

3 讨 论

肝素亲和层析是简便而有效的纯化 FGF (包括 aFGF 和 bFGF) 的方法. 这种方法对肝素亲和层析填料的质量要求较高, 如果填料的质量差, 则得到的 FGF 纯度也差, 还需要 HPLC 来进一步纯化. 我们曾用自己合成的肝素-Sephadex 4B 亲和柱从牛脑中纯化到 aFGF, 但产率低, 纯度差. 后来采用了 Pharma-

cia 公司生产的肝素-Sepharose CL-6B (lot No. PH09644) 亲和层析填料, 效果很好. 纯化到的 aFGF 和 bFGF 经 SDS-PAGE 后的银染色显示纯度较高, 因此未做进一步的 HPLC 纯化.

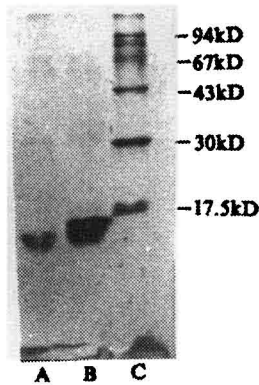


图4 纯化 FGF 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(银染色)

Fig. 4 SDS-PAGE of purified FGF

A: aFGF B: bFGF C: standard Protein(kD)

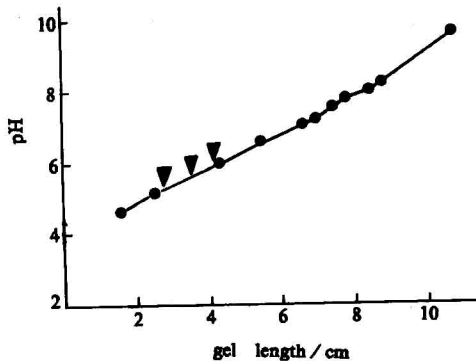


图5 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定 aFGF 的等电点

Fig. 5 Isoelectric point analysis of aFGF on isoelectric focusing gel

- — • : 等电点标准曲线
- ▼: 指示 aFGF 等电点的位置, 示多条带
- — • : pI standard curves
- ▼: indicated the position of aFGF

牛脑中 aFGF 含量较高, 我们从 1kg 牛脑中纯化到 1.6mg aFGF, 比一般文献报导的结果要高^[2,7], 这可能是由于我们注意到了使用新

表2 aFGF 的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of aFGF

氨基酸	测定相对摩尔数	每个分子残基数 ¹⁾
Amino acid	Relative molar quantities	No. of residues per molecule ¹⁾
Asp	11.8	13
Thr	7.3	8
Ser	10.4	9
Glu	19.1	15
Gly	14.3	12
Ala	7.5	4
Cys	—	3
Val	6.6	4
Met	—	1
Ile	5.5	6
Leu	14.9	17
Tyr	—	7
Phe	6.0	6
Lys	8.2	12
His	3.2	5
Arg	5.0	5
Pro	6.2	6

1) 以每分子含 134 氨基酸残基 aFGF 计算得到.

Calculated of a aFGF molecule

鲜牛脑组织. 即取新杀牛的全脑组织, 立即放入 4℃ 冰浴, 4h 内用于纯化. 我们发现如果使用 4℃ 放置时间过长或经冰冻 (-30℃) 保存的牛脑组织纯化 FGF 时, 产率明显降低. 牛脑中 bFGF 含量比 aFGF 低得多, 我们纯化到的 bFGF 只够测定活性及做电泳分析, 未能进一步鉴定.

aFGF 和 bFGF 活力测定采用经典的 ³H-TdR 参入 3T3 细胞 DNA 的分析方法. 这种方法测得的纯化后的 aFGF 和 bFGF 的 ED₅₀ 分别为 15.8ng/ml 和 0.32ng/ml, 这比 Gospadorowicz 等人用内皮细胞增殖活性分析得到的结果 (aFGF: 6ng/ml; bFGF: 0.05ng/ml) 活性低, 可能反映了两种细胞对 FGF 作用的灵敏度差异. 然而, 我们在硫酸铵沉淀一步得到的 FGF 粗品的 ED₅₀ 为 4.8μg/ml, 这比内皮细胞增殖活性分析 (ED₅₀ = 15μg/ml) 的活性高 3 倍, 原因可能是我们在这一步除掉的杂蛋白较多, 比活力也就较高, 这样也导致了以后各步骤的活性回收及纯化倍数就相应降低许多. 另

外,在肝素亲和层析以前各步样品的活性测定包括了aFGF和bFGF两种因子,bFGF虽然含量较低但活性很高,可能占据活性测定的主要成分,由此求得的两种因子的最终纯化倍数还不够准确,特别是对aFGF.

在纯化过程中,由于蛋白酶的作用,两种FGF都存在不同形式的降解,主要表现为不同N端截断形式^[8,9].按上海生化所生产的低分子量标准蛋白计算,我们纯化的aFGF分子量为13.2kD,这是已知文献报导的最小分子量形式的aFGF,它应当由134个氨基酸组成,我们纯化的aFGF的氨基酸组成分析即以此为标准对照.bFGF也存在着明显的降解,在SDS-PAGE中可看到在15.8kD带下面还有一条宽带,分子量约为15.2—15.6kD,这很可能是N端降解引起的.根据文献报道,N端的这种少量缺失对FGF的活性影响不大.

参 考 文 献

- 1 Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L *et al.* Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrinol Rev*, 1987;**8**:95
- 2 Gospodarowicz D. Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. *Methods Enzymology*, 1987; **147**:106
- 3 Lowry O H, Rosebrough N J, Lewis Farr A *et al.* Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; **193**:265
- 4 Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; **227**:680
- 5 Laas T, Olsson I, Soderberg L. High-voltage isoelectric focusing with pharmalyte; field strength and temperature distribution, zone sharpening, isoelectric spectra, and pI determinations. *Anal Biochem*, 1980; **101**:449
- 6 姚志建,张明伟.蛋白质电泳银染显色法.军事医学科学院院刊,1986;**10**:341
- 7 Thomas K A, Rios-Candelore M, Fitzpatrick S. Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; **81**:357
- 8 Gimenez-Gallego G, Rodkey J, Bennett C *et al.* Brain-derived acidic fibroblast growth factor; complete amino acid sequence and homologies. *Science*, 1985;**230**:1385
- 9 Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Presta M *et al.* Multiple forms of an angiogenesis factor; basic fibroblast growth factor. *Biochimie*, 1988;**70**:83

Purification and Characterization of Bovine Fibroblast Growth Factor

Xue Yanning Wang Huixin Zhou Tingchong Shao Ningsheng

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT

Acidic and basic fibroblast growth factor were purified from fresh bovine brain by a combination of differential salt precipitation, ion exchange chromatography and heparin-Sepharose affinity chromatography. Both factors can effectively stimulate the incorporation of ³H-TdR into DNA of 3T3 cell. The apparent molecular masses of aFGF is 13.2 kD and bFGF 15.2—15.8kD. The aFGF has an isoelectric point range of 5.0—6.0 and the amino acid composition consistent with that of standard aFGF.

Key words fibroblast growth factor, heparin affinity chromatography, DNA synthesis