

内皮细胞生长因子的提取纯化和鉴定

何红兵* 陆 青 潘玉先 李留洋 黎梅兰

(第一军医大学附属珠江医院, 广州 510282)

提 要

通过 CM-纤维素 C50, 肝素交联琼脂糖 6B 凝胶及高效液相色谱将内皮细胞生长因子高度纯化。结果表明, 该因子分子量 15 500 道尔顿, 等电点 pH 6.0, 能同时促进人脐静脉内皮细胞及 L 929 成纤维细胞生长。

关键词 内皮细胞, 生长因子, CM 纤维素 C50 离子交换层析, 肝素交联琼脂糖亲和层析, 高效液相层析

内皮细胞是心血管系统的衬里, 在维持机体内环境稳定中, 起到十分重要的作用。将内皮细胞进行体外培养, 是探讨众多生理及病理生理机制的重要手段之一, 为国际广泛采用。但是, 截至 80 年代初, 尚难以将人内皮细胞长期传代培养。自人们发现脑、软骨、视网膜等组织中存在促进内皮细胞生长的活性物质以来, 大量的研究表明, 内皮细胞生长因子 (endothelial cell growth factor, ECGF) 在促进人内皮细胞体外生长中, 起到十分重要的作用^[1-3]。我们经过反复研究, 成功地提取并纯化该因子, 现将结果报道如下。

1 材 料 和 方 法

1.1 细胞的培养

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical cord vein endothelial cell, HUVEC) 按我们报道的方法进行体外培养。小鼠 L 929 成纤维细胞由复旦大学生命科学中心提供。培养体系: 1640 培养基 (美国 Life Technologies 公司) 内加 20% 小牛血清 (广州市国营凤凰农工商联合公司出品, 中山医科大学监制), 200U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素, pH 7.0, 所有细胞均于 5% CO₂, 37℃ 细胞培养箱 (西德 Heraeus B5060EK 型) 培养。每 2—3 d 换液

一次、倒置显微镜 (日本 Olympus TO4 型) 下观察细胞生长情况。

1.2 ECGF 粗品的提取

从屠宰场获取新鲜牛下丘脑及脑垂体。然后按以下步骤提取。将原料去除表面组织及血污后, 4℃ 下制成组织匀浆, 搅拌, 13 800 g 离心 40 min (德国 Hermle ZK 401 型低温高速离心机)。收集上清液, 加入适量抗菌素, 将 pH 值调至中性。搅拌、离心如上, 收集上清液、透析过夜 [0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PB) pH 7.0] 后, 进行纯化。

1.3 CM 纤维素 C50 离子交换层析

将 CM 纤维素 C50 预处理后, 装入层析柱 (直径 2.5 cm 长 60 cm), 0.1 mol/L PB pH 6. 平衡 8—12 h, 将上述粗品加入层析柱内。在核酸蛋白检测仪 (温州市孚华分析仪器厂) 监视下, 分别用含 0.15 mol/L, 0.6 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L PB 洗脱、流速 30 ml/h。收集 0.6 mol/L NaCl 洗脱部分。10 mmol/L Tris-HCl pH 7 透析过夜。

1.4 肝素交联琼脂糖 6B 亲和层析

* 现在通讯地址: Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, General Hospital Wels, A-4600 Wels, Austria

收稿日期: 1991-09-11 修回日期: 1991-11-26

将肝素交联琼脂糖 6 B (Pharmacia LKB 公司) 预处理后, 装入层析柱 (直径 1.0 cm, 长 20 cm) 4℃ 下, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7 平衡 6—8 h 后, 加入上述样品, 在核酸蛋白检测仪监视下, 分别用含 0.6 mol/L 及 1 mol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl 洗脱。流速 30 ml/h。收集 0.6 mol/L NaCl 洗脱部分、蒸馏水透析过夜 (pH 7.0), 真空冷冻干燥。

1.5 高效液相色谱分析

上述样品用 2 ml 0.1 mol/L PB (pH 7.0) 稀释后, 10 000 r/min (上海安亭科学仪器厂 TGL-16 A 型台式离心机) 离心 3 min。将上清液加入岛津 Shimpack Diol-15 型层析柱 (直径 1.0 cm, 长 50 cm)。在核酸蛋白检测仪 (瑞典 LKB 2150 型) 监视下, 用 0.1 mol/L PB (pH 7.0) 洗脱、流速 0.8 ml/min。收集 7—8 min 洗脱部分。蒸馏水透析过夜。真空冷冻干燥。

1.6 生物活性检测

用脐静脉内皮细胞作剂量反应曲线。将内皮细胞以 1×10^4 个细胞每平方厘米的密度接种到 24 孔塑料培养板。不同纯度的 ECGF 经倍比稀释后, 分别加入培养体系中。以不含 ECGF 的培养体系为对照, 培养 3 d 后, 作细胞计数。以细胞数对 ECGF 浓度作剂量反应曲线, 将产生最大反应的 ECGF 半量定为一个活性单位, 同时也用 L 929 成纤维细胞作上述测定。

用脐静脉内皮细胞作生长曲线。将 3—5 代脐静脉内皮细胞以 1×10^4 个细胞每平方厘米的密度接种到塑料培养板内, 将 2 U/ml 不同纯度的 ECGF 分别加入培养体系中; 不加 ECGF 的培养体系为对照。每日计数 2 孔细胞数, 共 7 d。以细胞数对培养时间作生长曲线。

1.7 其它检测方法

ECGF 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 用贺永怀^[4]介绍的方法作银染色, 以测定分子量。标准分子量蛋白从华美生物工程公司购得, 牛血清白蛋白 (66000), 胰旦白酶原 (24000), 溶菌酶 (14300)、

蛋白浓度用 Lowry 氏微量法测定。用美国 Bid-Rad's III 型微量等电聚焦仪测定等电点。

2 结 果

2.1 ECGF 的纯化

如表 1 所示, 经 CM 纤维素 C50 离子交换层析后, ECGF 总活性回收率为 48%, 比活性提高 18 倍; 经肝素交联琼脂糖 6 B 亲和层析及高效液相色谱纯化后, 回收率分别为 47% 及 19%, 比活性提高 1.6×10^4 倍及 1.5×10^5 倍。

表 1 内皮细胞生长因子的纯化¹⁾

步 骤	蛋白回收 (mg)	活性单位 ²⁾ (μg/U)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)
粗制品	19174	88	2.18×10^5	11
CM 纤维素 C50	527	5.03	1.05×10^5	199
肝素琼脂糖凝胶	0.56	0.06	1.02×10^5	1.8×10^5
高效液相色谱	0.025	5.9×10^{-4}	4.23×10^4	1.68×10^6

1) 3.67kg 原料。

2) 活性单位定义为使人脐静脉内皮细胞产生最大效应的内皮细胞生长因子半量。

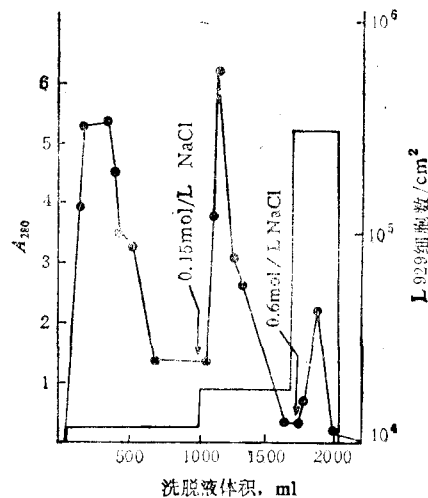


图 1 CM 纤维素 C50 纯化内皮细胞生长因子

2.2 分子量及等电点测定

经高效液相色谱纯化的 ECGF, SDS-PAGE 后银染色为一条明显的蛋白带, 分子量 15500 道尔顿, 等电点 pH 6。

2.3 ECGF 的剂量反应曲线

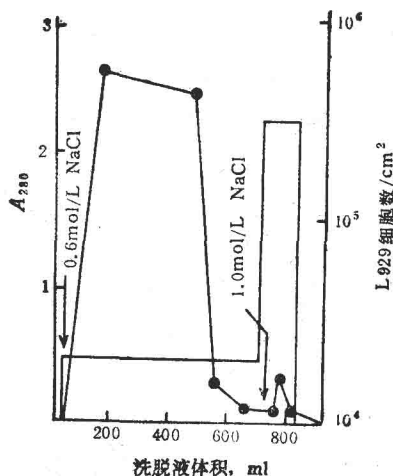


图 2 肝素交联琼脂糖 6B 凝胶纯化内皮细胞生长因子

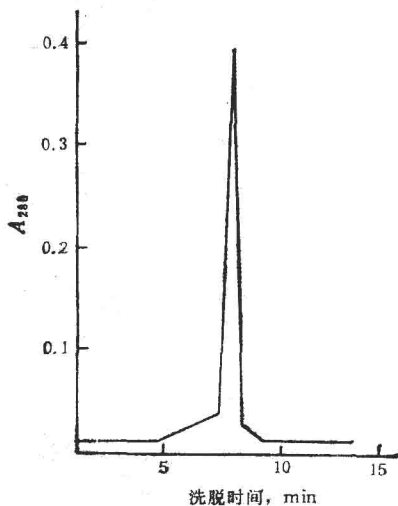


图 3 高效液相色谱纯化内皮细胞生长因子

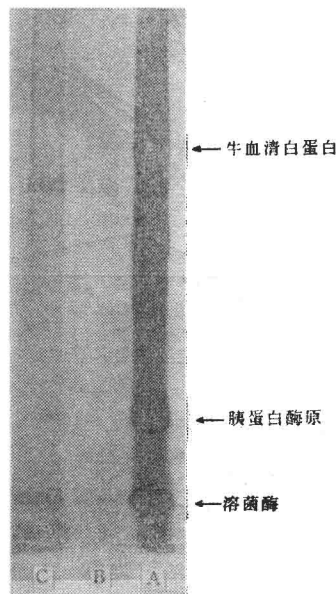


图 4 内皮细胞生长因子 SDS-PAGE 图谱

A. 标准分子量蛋白, B. 高效液相色谱纯化的 ECGF, C. 肝素交联琼脂糖凝胶纯化的 ECGF

在粗品、肝素交联琼脂糖凝胶及高效液相色谱纯化的 ECGF 浓度分别在 $176 \mu\text{g/ml}$, 12 ng/ml , 1.192 ng/ml 以前, 细胞分裂增殖能力随浓度的增加而增强; 在该浓度之后, 则随 ECGF 浓度的增加而降低 (见图 5)。

2.4 ECGF 对人脐静脉内皮细胞生长曲线的影响

用上述不同纯度的 ECGF 培养的人脐静脉内皮细胞生长旺盛, 轮廓分明, 透光度好。第 3—5 日处于对数生长期; 第 3 日后, 细胞接触抑制形成。而未加 ECGF 的细胞生长缓慢, 第

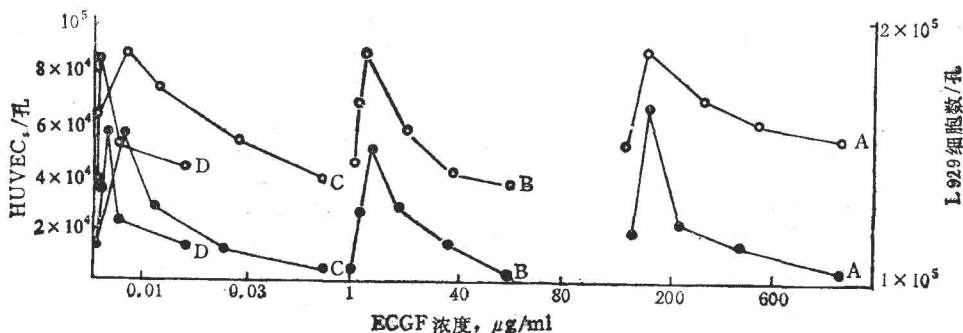


图 5 不同纯度内皮细胞生长因子作用于人脐静脉内皮细胞及 L929 成纤维细胞的剂量反应曲线

A. 粗制品; B. CM-纤维素 C50 纯化的 ECGF; C. 肝素交联琼脂糖凝胶纯化的 ECGF; D. 高效液相色谱纯化的 ECGF

●—● 内皮细胞; ○—○ L929 细胞

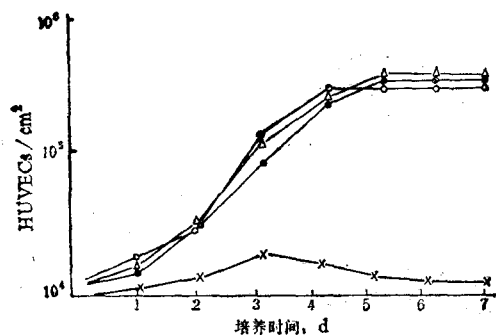


图 6 人脐静脉内皮细胞经不同纯度内皮细胞生长因子作用后的生长曲线

不同纯度的内皮细胞生长因子浓度为 2U/ml。

△—△粗制品；●—●肝素交联琼脂糖凝胶纯化的 ECGF；○—○高效液相色谱纯化的 ECGF；×—×未加 ECGF

3 日后,生长能力逐渐减退,细胞透光度明显降低,细胞圆缩,脱落死亡(见图 6)。

3 讨 论

粗品经 CM 纤维素 C 50 离子交换层析后,可去除 97% 的杂蛋白,而总活性回收率为 48%,可见这是 ECGF 纯化过程中相当重要的步骤。Shing 等^[4]研究发现,来源于软骨肉瘤的 ECGF 对肝素具有显著的亲和力;每个内皮细胞表面可吸附 10^6 个肝素分子,因此认为肝素一端吸附在内皮细胞上,另一端则选择性结合 ECGF,大大地增强后者的作用。因此,便选用肝素亲和层析纯化该因子。Lobb 等^[5]亦有所报道。但我们的结果不尽相同。从 SDS-PAGE 图谱中可以看到,经该步骤后,比活性虽较前一步提高 905 倍,但仍有较多的杂蛋白,且主要集中于 15000 道尔顿以下。这就促使我们寻找进一步纯化方法。

用本文介绍的高效液相色谱分析技术进行 ECGF 纯化,国内外尚无类似报道。我们选用岛津 Shim-pack Diol-15 层析柱,主要利用其分子筛特性而将杂蛋白去除。经用标准分子量蛋白胰蛋白酶原、溶菌酶反复预试验,发现在室温下,用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 洗脱,流速 0.8 ml/min,收集第 7—8 min 的洗脱部份,即可得分子量 15 000—20 000 左右的样品。应用上述条件,成功地将残余蛋白去除,使 ECGF

纯化。比活性较粗制品提高 1.5×10^5 倍,较肝素交联琼脂糖纯化者提高 9.3 倍。

我们的研究证实,ECGF 能够同时促进内皮细胞及成纤维细胞分裂增殖。我们报道了用本实验室制备的 ECGF 将人脐静脉内皮细胞在体外长期传代培养。本文同时证实,成纤维细胞经该因子作用后,增殖能力大大增强。新近的研究表明,ECGF 与酸性成纤维细胞生长因子(acid fibroblast growth factor, aFGF)不仅来源,分子量及等电点相同,其免疫学及受体性质亦相同。因此人们已把这两种生长因子看成同一物质^[3]。

我们的研究同时证实,ECGF 对细胞的作用有一个最适浓度,高于或低于该最适浓度,细胞的增殖能力均会降低。因此,我们将该最适浓度的半量定为一个活性单位。从图 5 中可以看出,对照组中人脐静脉内皮细胞在接种后 3 d,有一定增殖趋势;而 3 d 以后,该趋势逐渐消失。对于这一现象,我们的解释是,所使用的是经 ECGF 传至 3—5 代的人脐静脉内皮细胞,在接种后 3 d 内,细胞膜上的 ECGF 受体有适量的配体与之结合,从而促进细胞增殖;随着培养时间延长,细胞数量增加,ECGF 又得不到相应补充,受体与配体数量失衡,细胞分裂增殖能力随之降低。

有关内皮细胞的研究是目前国际上的一大热门课题。ECGF 的高度纯化,为我们研究该细胞的生物学特性及与之有关的生理、病理生理机制有重要意义。

我们衷心感谢军事医学科学院毒物药物研究所刘昌玲高级实验师、董西建技师在高效液相色谱分析等技术上的悉心指导。

参 考 文 献

- 1 何红兵,仲剑平. 第一军医大学学报, 1990; 10(5): 312
- 2 Shing Y, Folkman J, Sullivan R et al. Science, 1984; 223: 1296
- 3 Strydom DJ, Harper JW, Lobb RR. Biochemistry, 1986; 25(5): 945
- 4 贺永怀,赵薇薇等. 军事医学科学院院刊, 1987; 11(3): 224
- 5 Lobb RR, Fett JW. Biochemistry, 1984; 23(26): 6295