

平滑肌细胞源性纤维母细胞生长因子的纯化

瞿智玲 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

动脉中膜平滑肌细胞(SMC)迁入内膜和增生在动脉粥样硬化斑块的发生和发展中起着重要作用。SMC在受到动脉壁内的细胞(如内皮细胞及巨噬细胞)所分泌的趋化因子和生长因子的作用后,迁移进入内膜并增生,SMC亦可通过旁分泌和自分泌形式产生生产因子包括血小板源性生长因子(PDGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)等。因此,SMC一旦迁入内膜便可不断地增生。已知FGF有碱性(bFGF,分子量16~18.5 kD)和酸性(aFGF,分子量16.7 kD)两种,两者分子中均无信号肽,表明均非分泌性蛋白质,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,便可释放出有活性的FGF-硫酸乙酰肝素复合物而发挥其生物学功能。因此,SMC源性FGF在动脉粥样硬化的发生、发展中具有一定作用。本文的目的是从培养的动脉SMC中纯化FGF,并检测其生物学功能。

方法 用贴块法培养兔主动脉中膜SMC,培养基用含10%胎牛血清的M199,待传至4—5代,收集细胞。经超声粉碎后,用肝素—琼脂糖CL-6B柱进行亲和层析。洗脱物用³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入细胞DNA法检测其对NIH 3T3纤维母细胞的DNA合成,然后将具有明显促NIH 3T3纤维母细胞增殖活性的组分浓缩,用SDS聚丙烯

烯酰胺凝胶电泳检测其分子量。及 slotblot 分析法测定 bFGF, 简述如下: 用狭缝杂交点样器将不同浓度 bFGF 点于硝酸纤维素膜上, 风干后, 加入抗 bFGF 多克隆抗体 (1 : 25)。二抗用羊抗小鼠 IgG (1 : 100)。然后加酶标 SP (1 : 100)。DAB/H₂O₂ 显色。用图像分析仪检测各样本的积分光度值。

结果 SMC 超声粉碎物经肝素-琼脂糖 CL-6B 柱层析, 被 $1.4 \sim 1.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱下来的组分对 3T3 细胞有明显的促有丝分裂活性, 其 ³H-TdR 掺入量为对照组的 2~3 倍, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 该组分的分子量约为 18 KD。slotblot 分析结果证明该组分与 bFGF 多克隆抗体呈阳性反应, 经 DAB 显色呈棕色, 而且, 将样本原液作 1/2 稀释, 经图像分析仪测得其积分光密度分别为 146.978、82.586, 而对照样本 (不含抗原) 积分光密度为 0, 这说明该组分为 bFGF。

结论 本实验纯化所得的蛋白质的生化性状与文献上报道的 bFGF 一致, 说明培养的 SMC 能产生 bFGF, 由于 SMC 表面含有 bFGF 的受体, 因此, SMC 源性 bFGF 在迁入动脉内膜的 SMC 增生中具有一定作用。