

## 平滑肌细胞源性生长因子的部分纯化\*

杨仕林<sup>①</sup> 邓仲端 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

## Partial Purification of Smooth Muscle Cell-derived Growth Factor

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

YANG Shi-Lin, DENG Zhong-Duan and QU Zhi-Ling  
(Department of Pathology, Tongji Medical University,  
Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT** To purify a smooth muscle cell derived growth factor, the serum free medium conditioned by cultured rabbit aortic smooth muscle cells (SMC-CM) was collected.

**Methods** The SMC-CM was 5.8 fold concentrated by ultrafiltration using Millipore Ultrafiltration System with a molecular weight cut off at 10 kDa, and then was purified by heparin affinity chromatography using a column of heparin-Sepharose CL-6B. Incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) into cell DNA was used to measure the mitogenic activity of the fractions from chromatography for NIH 3T3 fibroblasts. The molecular weight and the iso-electric point of these fractions were determined by NaDodSO<sub>4</sub>-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and iso-electric focusing, respectively.

**Results** The protein eluted in 1.0~1.6 mol·L<sup>-1</sup> NaCl from the heparin-sepharose was mitogenic for 3T3 cells, and this protein had a molecular weight of 23.0~26.9 kDa and iso-electric point of about 4.6.

**Conclusions** The fact that the above-mentioned biochemical properties differed from that of PDGF, IGF and FGF suggests that this mitogenic protein may be a separate growth factor.

**摘要** 本文用超滤和肝素亲和层析法对培养的兔主动脉平滑肌细胞的无血清条件培养基进行纯化。用<sup>3</sup>H-TdR 掺入细胞DNA法检测层析所得各组分对NIH 3T3 纤维母细胞的致有丝分裂活性。用NaDodSO<sub>4</sub>-聚丙烯酰胺凝胶电泳及等电聚焦电泳检测其分子量及等电点。结果表明,该条件培养基经肝素亲和层析,被1.0~1.6 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱下来的蛋白质成分对3T3 细胞有致有丝分裂活性,其分子量范围为23.0~26.9 kDa,等电点约为4.6。这些生物化学特性不同于PDGF、IGF及FGF,提示这种致有丝分裂蛋白质可能是一种独立的生长因子。

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

已知动脉中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)迁入内皮下间隙,这些细胞以及原来已存在于内膜的SMC增殖在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块的形成和进展中起重要的作用<sup>[1]</sup>。SMC的增殖受血小板、内皮细胞、巨噬细胞产生的多种生长因子的影响,包括血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、内皮素、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)等<sup>[2]</sup>。SMC亦可通过旁分泌和自分泌方式分泌多种生长因子。因此,在没有外源性有丝分裂原存在的条件下,SMC仍能分裂增殖,这在As的发生中具有重要意义。本文采用肝素亲和层析法对SMC条件培养基进行纯化,以了解

\* 卫生部科学基金资助项目:巨噬细胞和平滑肌细胞源性生长因子的纯化及其生物学和生物化学性质(0655-101号)

① 现在通讯地址:广州军区武汉总医院心脏内科,武汉 430070

SMC 是否产生肝素亲和性生长因子,并检测其某些生物学及生物化学特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 平滑肌细胞培养

采用过去报道的贴块法<sup>[3]</sup>进行。兹简述如下,在无菌条件下,将4~6周龄的日本大白兔的胸主动脉中膜内层分离,切成1 mm<sup>2</sup>小块,接种于培养瓶中,培养基为含10%胎牛血清的M199培养基(Gibco公司)。待细胞生长融合后,以0.1%胰蛋白酶消化传代。

### 1.2 条件培养基的收集

收集4~6代生长良好的SMC的培养基。方法是,弃去原培养基,用D-Hanks缓冲液洗涤细胞,然后加入无血清DME/F<sub>12</sub>混合培养基,继续培养48 h,收集之,即为SMC条件培养基(SMC conditioned medium, SMC-CM)。过滤除菌, -20℃保存。

### 1.3 浓缩和冻干

用Millipore超滤系统对SMC-CM进行超滤浓缩,浓缩5.8倍,截留分子量为10 kDa,环境温度为10℃。然后将其进行冷冻干燥,备用。

### 1.4 肝素亲和层析

将冻干的SMC-CM溶于10 ml 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl Tris-HCl缓冲液中,然后装入已用上述缓冲液平衡的肝素结合琼脂糖(heparin-Sepharose)CL-6B层析柱(100×10 mm)<sup>[4]</sup>,并用上述缓冲液20 ml洗脱之,以洗下不与肝素结合的组分。然后以0.1~3.0 mol·L<sup>-1</sup> NaCl Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)进行梯度洗脱,洗脱速度为1 ml·min<sup>-1</sup>,洗脱物容积120 ml,共30个组分。

### 1.5 促有丝分裂试验

采用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-thymidine, <sup>3</sup>H-TdR)掺入细胞DNA法进行<sup>[5]</sup>。

**1.5.1 SMC-CM的促有丝分裂试验** 将NIH 3T3细胞及SMC经酶消化后分别接种于24孔和96孔细胞培养板,每孔分别接种细胞 $3 \times 10^4$ 和 $1.5 \times 10^4$ 个。细胞在无血清DME/F<sub>12</sub>混合培养基培养(3T3细胞培养24 h, SMC培养30 h),接着用D-Hanks缓冲液洗涤细胞,加入SMC-CM继续培养(3T3细胞培养20 h, SMC培养10 h)后,加入<sup>3</sup>H-TdR,使每孔终浓度分别为1 μCi/孔(24孔培养板)和0.5 μCi/孔(96孔培养板),3T3细胞继续培养6 h, SMC培养20 h,继以0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH溶解细胞,用FJ-2007 G型液体闪烁计数器测定其放射活度。

**1.5.2 洗脱物对3T3细胞的促有丝分裂试验** 方

法与上述相同。每一组分为一组,连对照组及非肝素结合组分共32组,每组设3个观察孔。

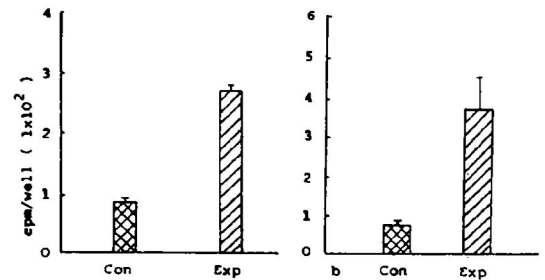
### 1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳

将浓缩的SMC-CM进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE),凝胶浓度为15%;将对3T3细胞有促有丝分裂活性的组分进行NaDodSO<sub>4</sub>-PAGE(SDS-PAGE),凝胶浓度为5%<sup>[6]</sup>,以确定这些组分中致有丝分裂原的分子量。同时将此组分进行等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF),凝胶浓度为7.5%。SDS-PAGE中,已知分子量标准为溶菌酶(lysozyme MW 14.3 kDa)、胰蛋白酶原(trypsinogen MW 24.0 kDa);IEF中,ampholine的pH范围为3.6~9.3,已知等电点(isoelectric point, pI)标准为碳酸酐酶(carbonic anhydrase pI 6.6)、乳酸脱氢酶(L-lactic dehydrogenase pI 8.3, 8.4)。凝胶均采用银染色<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 条件培养基的促有丝分裂活性

<sup>3</sup>H-TdR掺入3T3细胞及SMC DNA试验表明,SMC-CM能刺激3T3细胞及SMC的DNA合成,<sup>3</sup>H-TdR掺入量分别是对照组的3倍和5倍(Figure 1)。



**Figure 1. The effects of SMC-CM on DNA synthesis of 3T3 cells and SMC.**

a: 3T3 cells cultured in SMC-CM (Exp) and DME/F<sub>12</sub> mixture medium (Control) in 24 well tissue culture plates were pulsed with <sup>3</sup>H-TdR (final concentration 1.0 μCi/well) for 6 h. b: SMC cultured in SMC-CM (Exp) and DME/F<sub>12</sub> mixture medium (control) in 96 well tissue culture plates were pulsed with <sup>3</sup>H-TdR (final concentration 0.5 μCi/well) for 20 h.

### 2.2 条件培养基的聚丙烯酰胺凝胶电泳

超滤后,分子量小于10 kDa的成份被除去,截留的SMC-CM经PAGE及银染色,可见

8 条蛋白质电泳带,说明在 SMC-CM 中分子量大于 10 kDa 的蛋白质成份有 8 种(Figure 2)。



Figure 2. PAGE of SMC-CM. Eight bands of protein on the silver stained gel were revealed (MW above 10 000).

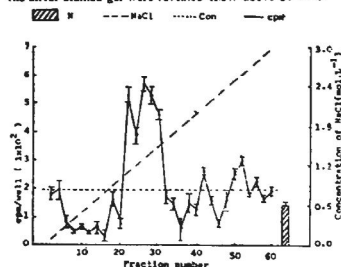


Figure 3. Heparin affinity chromatography of SMC-CM. A 100×10 mm column of heparin-sepharose CL-6B was equilibrated with 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl in Tris-HCl buffer (pH 7.0). 10 ml concentrated SMC-CM was loaded on the column. Eluted in a 0.1~3.0 mol·L<sup>-1</sup> linear gradient of NaCl in Tris-HCl buffer (pH 7.0). Fractions (120 ml) were collected at 1 ml·min<sup>-1</sup> at 10 °C and subjected to bioassay (N, non-heparin combining proteins; NaCl, concentration of NaCl in eluate; Con: control)

### 2.3 层析组分的促有丝分裂活性

经柱层析后,将所得各组分组用<sup>3</sup>H-TdR 掺入法进行促细胞有丝分裂活性试验。结果显示,经 1.0~1.6 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱下来的组分有明显促进 3T3 细胞的有丝分裂活性(Figure 3),而 0.4~0.8 mol·L<sup>-1</sup>, 1.8 mol·L<sup>-1</sup>和 2.3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的洗脱物的试验结果,<sup>3</sup>H-TdR 掺入量却低于对照组,非肝素结合组分不促进

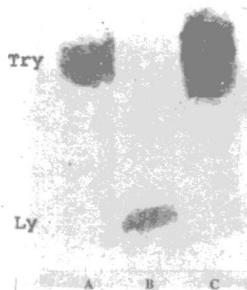


Figure 4. SDS-PAGE of the fractions which stimulated DNA synthesis of NIH 3T3 cells.

The concentration of polyacrylamide gels was 5 %. MW markers were trypsinogen (Try, lane A), MW 24.0 kDa and lysozyme (LY, lane B), MW 14.3 kDa. A single band of protein on the silver stained gel was revealed (lane C) which had a MW of about 23.0~26.9 kDa.



Figure 5. IEF of the fractions which stimulated DNA synthesis of NIH 3T3 cells.

The concentration of polyacrylamide gels was 7.5 %. The gel was stained with silver. The pI markers were carbonic anhydrase Ⅱ (Ca, lane A) pI 6.6 and L-lactic dehydrogenase (Ld, lane B) pI 8.3, 8.4. A single band was revealed at the point which pI was 4.6 (lane C).

细胞 DNA 合成,亦无抑制作用。

## 2.4 分子量和等电点

将具有促 3T3 细胞有丝分裂活性的层析组分进行 SDS-PAGE 及 IEF, 测试结果显示, 该蛋白质为单一条带, 其分子量范围为 23.0~26.9 kDa, 等电点为 4.6 (Figure 4 and 5)。

## 3 讨论

已知体外培养的 SMC 可通过自分泌和(或)旁分泌方式合成及分泌多种生长因子, 如 PDGF、IGF、FGF 等<sup>[8]</sup>。本实验中, <sup>3</sup>H-TdR 掺入试验显示, SMC-CM 内含有促 3T3 细胞和 SMC 增生因子的存在。SMC-CM 经超滤浓缩, 除去分子量小于 10 kDa 的成分后, 经 PAGE 证明, SMC-CM 中尚含有 8 种蛋白质成分, 其生物化学及生物学性质需进一步研究。

肝素结合琼脂糖 CL-6B 柱层析所得的 30 个组分中, 对 3T3 细胞具有促有丝分裂活性的组分经 SDS-PAGE 和 IEF 测试结果显示, 这些成分的分子量范围在 23.0~26.9 kDa 之间, 等电点约为 4.6。

已知 PDGF、IGF 和 FGF 均与肝素有亲和性<sup>[9,10]</sup>, 它们的分子量分别为 30 kDa (PDGF), 7.5 kDa (IGF)、16.0~18.0 kDa (FGF, 来自小牛脑垂体)或 22.0~25.0 kDa (FGF、来自豚鼠及大鼠脑), 等电点分别为 10.5 (PDGF)、6.15 (IGF-1)、6.5 (IGF-II)、5 (aFGF)、9.6 (bFGF)。PDGF 及 FGF 与肝素结合后可被不同浓度的 NaCl 洗脱下来<sup>[11]</sup>, 其洗脱浓度分别为 0.45~0.55 mol·L<sup>-1</sup> (PDGF)、1.0 mol·L<sup>-1</sup> (aFGF) 及 1.5 mol·L<sup>-1</sup> (bFGF)。然而, 在本实验, SMC-CM 中促细胞有丝分裂成分的洗脱浓度却为 1.0~1.6 mol·L<sup>-1</sup>。虽然本实验纯化所得的物质在分子量和等电点方面与来自豚鼠和大鼠脑的 bFGF 有些相似, 但 FGF 的结构中无保守的信号肽序列, 不是分泌性蛋白质。所以, 在 SMC-CM 一般不含有 FGF。而其它生长因子的分子量和等电点均与本实验纯化所得的不同, 因此, 可以认为, 本实验纯化所得的蛋白质可能是一种独立的生长因子。

Morisaki 报道<sup>[12]</sup>, SMC 能分泌一种生物化

学、免疫学及生物学上均不同于 PDGF、EGF、IGF 及 FGF 的生长因子, 称之为平滑肌细胞源性生长因子 (smooth muscle cell derived growth factor, SDGF)。但作者未对其进行纯化, 是否与我们纯化所得的促细胞有丝分裂因子为同一物尚待进一步研究。

非肝素结合组分不刺激 3T3 细胞 DNA 合成的事实说明, 此种蛋白质无促有丝分裂作用。

再者, 被浓度为 0.4~0.8 mol·L<sup>-1</sup>、1.8 mol·L<sup>-1</sup> 和 2.3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱下来的组分对 3T3 细胞的 DNA 合成有抑制作用, 其机制未明, 是否其中含有某种抑制物, 如某种细胞因子, 仍需进一步研究。

## 参考文献

- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, et al. The pathogenesis of atherosclerosis: An overview. *Clin Cardiol*, 1991, 14(suppl 1): 1~16.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 326(6423): 801~809.
- 朱阎宏, 王珩, 邓仲端. 培养的动脉粥样硬化兔动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化因子. *中国循环杂志*, 1991, 6(3): 216~218.
- Moscattelli 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.
- Dempsey EC, Stenmark KR, Mcmurtry IF, et al. Insulin-like growth factor I and protein C activation stimulate pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through separate but synergistic pathways. *J Cell Physiol*, 1990, 144(1): 159~165.
- Davies GE, Stark GR. Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 66(3): 651~656.
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1980, 105(2): 361~365.
- Sarzani R, Brecher P, Chobanian AV. Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest*, 1989, 83(4): 1 404~408.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*, 1987, 235(4 787): 442~447.
- Sjolund M, Hedin U, Sejersens T, et al. Arterial smooth

- muscle cells express platelet derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen and bind exogenous PDGF in a phenotype-and growth statedependent manner. *J Cell Biol*, 1988, **106**(2): 403~413.
- 11 Shing Y, Folkman J, Sullivan R, et al. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell

- growth factor. *Science*, 1984, **223**(4 642): 296~1 299.
- 12 Morisaki N, Koyama N, Moris S, et al. Effects of smooth muscle cell derived growth factor (SDGF) in combination with other growth factors on smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1989, **78**(1): 61~67.

(本文 1995-10-01 收到)

## 中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会 第四届会员代表大会暨学术交流会纪要

中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会第四届会员代表大会暨学术交流会,于 8 月 4 日~8 日在湖南省张家界市召开。到会代表共 92 人,代表 35 个单位。专业委员会副主任委员,衡阳医学院院长杨永宗教授主持会议并致开幕词。主任委员蔡海江教授对四年来的工作进行了回顾,认为第三届委员会的工作是有成绩的,不仅与国际动脉粥样硬化化学会建立了联系,扩大了交流,还筹备出版《中国动脉硬化杂志》,至今已出版 6 期,达到了扩大影响、交流信息的目的,各界反映良好。这主要是由于杨永宗院长为首的衡阳医学院同道们的辛勤劳动和努力争取得来的,为此,大会对衡阳医学院同道表示衷心的感谢。此外,上届委员会还积极支持了第一军医大学陈缓教授筹办“自由基损伤”学术交流会等。这些工作都大大推动了我国动脉粥样硬化研究学术水平的提高。

大会共收到专题讲座 18 篇,论文摘要 115 篇,已汇编成册。有 10 位专家在大会上作专题报告,有 28 位同道在会上进行了工作交流。从交流的内容水平看,研究方法更加先进、科学,研究深度有所提高,研究方向更加明确。余铭鹏教授和蔡海江教授在会上报告的动脉粥样硬化研究的新进展和新思路,给到会同道很大启发。在工作交流中,衡阳医学院心血管病研究所杨和平副教授的“平滑肌细胞增殖的基因调控系列研究”、南京医科大学陈琪副教授对“氧化型低密度脂蛋白上 4 羟壬醛抗原决定簇的研究”以及华西医科大学载脂蛋白研究室张祖辉副教授的“脂蛋白(a)异构体的分析研究”等,均有很高的水平,在方法学上也有一定的难度。另外北京老年医学研究所黎健副研究员介绍的有关基因治疗的研究方法,对推动这方面工作的开展有很好的启示。解放军总医院韦立新教授以大量的尸解材料,用形态学观察方法,研究 PTCA 后

再狭窄的机制,有力地证明了形态学研究的方法还是大有作为的。这次大会交流的材料中还有不少高水平的内容不一一列举。从交流的工作来看,许多精品大多出自中青年研究人员之手,充分体现了我国科技兴旺发达,后继有人。

大会选举了第四届委员会委员。以上届委员会酝酿候选人,会员大会投票,选出 13 位同志组成第四届委员会(名单附后)。这次改选,部分老委员主动要求免去委员候选人提名,使更多的中青年优秀同志入选,新的委员会充实了新鲜血液,体现了年轻化。

总之,这次大会是成功的,完成了预定目标,形成了新核心。今后在新的委员会领导下学会的工作一定会搞得更好。

大会在上届副主任委员徐也鲁教授小结后胜利闭幕。

委员会决定在无特殊情况下,下届会议在 1998 年与脂蛋白学术会议同时在杭州举行,以后会议改为三年一届。

这次会议由衡阳医学院筹备和组织,在会务、生活等方面安排周到,付出了辛勤劳动,使会议顺利进行,圆满结束。在此,致以诚挚的谢意!

### 中国病理生理学会第四届动脉粥样硬化专业委员会名单

主任委员	蔡海江
副主任委员	杨永宗
秘书	陈琪 涂玉林
委员	邓仲端 楼定安 汪钟 王宗立
	吴满平 黄士通 刘德文 胡维诚
	韦立新