

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-02-0104-04

导向药物转化生长因子 α -Saporin 对增殖平滑肌细胞生长的抑制作用

杨 军¹, 余细勇, 唐其东, 林曙光

(广东省心血管病研究所, 广东省广州市 510080; 1. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 转化生长因子 α ; Saporin; 肌, 平滑, 血管; 细胞, 培养; 生长抑制剂

[摘要] 为证实生物导向药物对平滑肌细胞增殖的作用, 用 SPDP 化学联结法合成了转化生长因子 α -Saporin, 通过 MTS 比色法观察了转化生长因子 α -Saporin 对培养中的增殖平滑肌细胞的细胞毒性作用, 并用氘标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入法进一步探讨了转化生长因子 α -Saporin 对平滑肌细胞的 DNA 合成的影响以及过量转化生长因子 α 对转化生长因子 α -Saporin 的受体竞争抑制作用。结果发现, 联结后的转化生长因子 α -Saporin 可明显抑制平滑肌细胞的增殖, 而 Saporin 的抑制作用却很弱。转化生长因子 α -Saporin 对培养的平滑肌细胞 氘标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入量有明显抑制作用, 与对照组比较氘标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入量降低了 39.1% ($P = 0.0017$), 而在加入表皮生长因子受体的配体转化生长因子 α 后可明显竞争抑制转化生长因子 α -Saporin 对平滑肌细胞增殖的细胞毒性作用。实验结果提示: 转化生长因子 α -saporin 通过表皮生长因子受体介导已具有较 Saporin 明显增强的细胞毒性作用, 本实验为转化生长因子 α -saporin 在经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的临床防治中的应用的研究提供初步的实验依据。

[中图分类号] R977

[文献标识码] A

Cytotoxic Effects of Transforming Growth Factor- α Conjugated with Cytotoxin Saporin on proliferating vascular smooth muscle cells

YANG Jun¹, YU Xi-Yong, TANG Qi-Dong, and LIN Shu-Guang

(Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou, 510080. 1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

MeSH Transforming Growth Factor alpha; Saporin; Muscle, Smooth, Vascular; Cells, Cultured; Growth Inhibitors**ABSTRACT** **Aim** To testify the inhibitory effects of transforming growth factor- α conjugated with cytotoxin saporin on proliferating vascular smooth muscle cells. **Methods** Conjugation of saporin to TGF α was accomplished after derivatization of saporin and TGF α with N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate and final purification of the conjugate was achieved within Eppendorf Centrifugal Filter Tubes. Biological assay of cytotoxicity was measured by MTS (a colorimetric method). The studies of influence of TGF α -Saporin on values of Thymidine incorporation into SMCs were measured by ^3H -thymidine uptake and receptor competition studies of TGF α -Saporin are measured by adding excess TGF α in SMCs exposed for TGF α -Saporin. **Results**Biological assay of cytotoxicity assays testified TGF α -Saporin conjugate could inhibit specially proliferation of SMCs in culture.

The absorbances measured by MTS of the group treated by TGF α -Saporin (10^{-7} mol/L) reduced to 60% compared with the control group ($P = 0.0003$). However, the absorbances of the group treated by saporin (10^{-3} mol/L) only reduced to 40% of the control group. The values of thymidine of TGF α -Saporin group (10^{-9} mol/L) in comparison significantly decreased to 60.9% of the control group ($P < 0.05$), suggesting that cellular DNA synthesis obviously decreased as TGF α -Saporin was added. Saporin did not affect cellular DNA synthesis at 10^{-3} mol/L. But excess TGF α (10^{-7} mol/L) added in SMCs exposed for TGF α -Saporin (10^{-9} mol/L) can completely blocked the inhibitory effects of TGF α -Saporin so that ^3H -thymidine uptake in the group was similar compared with the blank control group. **Conclusions** TGF α -Saporin possesses the more effective cytotoxicity.

[作者简介] 杨 军, 男, 1972 年 4 月 9 日出生, 湘潭人, 1994 年 6 月毕业于衡阳医学院, 获学士学位, 2000 年 7 月毕业于广东省血管病研究所, 获硕士学位, 现在南华大学附属第一医院工作。林曙光, 男, 研究员, 研究生博士生导师, 广东省人民医院院长, 广东省心血管病研究所所长, 余细勇, 男, 副研究员, 广东省心血管病研究所, 中心实验室主任, 硕士研究生导师。唐其东, 男, 助理研究员, 广东省心血管病研究所中心实验室秘书, 现在美国。

经皮腔内冠状动脉成形(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)技术在冠心病临床治疗上得到十分迅速的普及和发展,但如何降低 PTCA 术后高达 30%~50% 再狭窄发生率,目前仍是临床上未能解决的难题。近年来利用生长因子导向治疗 PTCA 术后再狭窄的有关研究已引起人们广泛的关注。本实验通过 SPDP 化学联结法将转化生长因子(transforming growth factor- α , TGF- α)和植物毒素蛋白 Saporin 进行联结、提纯,并通过体外实验鉴定和证实了联结后的转化生长因子 α -Saporin 明显增强的细胞毒性以及高度的受体亲和性,为进一步的实验研究和临床应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 转化生长因子 α 与 Saporin 的联结与提纯

转化生长因子 α 和 Saporin 分别从 GIBCO 和 Sigma 试剂公司购得。实验中采用稍加改进的 SPDP 化学联结法^[1,2]对转化生长因子 α 和 Saporin 进行了联结,并将联结后的反应平衡物用 4 mL Eppendorf 离心过滤管(10 kDa)以 6 000 g 离心洗脱、提纯浓缩后,-30℃保存备用。包含联结物的粗提纯物用 SDS 电泳后作染色分析,以考马斯亮兰 G250(CBG)蛋白定量法进行定量测定。

1.2 平滑肌细胞的培养

平滑肌细胞的原代培养采用 Chamley-Lampbell 酶消化法。培养细胞来自新西兰白兔胸主动脉中层。用镊子剥离外膜,用棉球拭除内膜后将留下的中膜剪成约 1 mm² 的碎片,置于 0.25% 胰蛋白酶中消化,将收集的细胞重新悬浮在 DMEM 培养基(含 20% FBS, 100 kIU/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素)置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,融合后传代。

1.3 转化生长因子 α -Saporin 对增殖平滑肌细胞的生长的影响 MTS 比色法观察

传代平滑肌细胞重悬后计数,调整细胞密度为 1×10^8 个/L,接种于 96 孔培养板(直径 6.4 mm),以含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养 24 h,使细胞生长进入增殖期,然后换成含转化生长因子 α -Saporin (10^{-7} mol/L)、Saporin (10^{-3} mol/L)及空白的 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 100 μ L,共分 3 组,每组种植 20 孔,培养 36 h 后加 20 μ L 的 MTS 染色液,孵化 4 h 后在 490 nm 处测定光吸收值。

1.4 转化生长因子 α -Saporin 对增殖平滑肌细胞 DNA 合成的影响及其受体竞争抑制实验

细胞接种步骤基本同上,将细胞分 4 组培养 24

h 后,任取两组换上加有转化生长因子 α -Saporin 的 DMEM 培养基(已含 10% 胎牛血清),培养基中转化生长因子 α -Saporin 终浓度为 10^{-9} mol/L,实验组另加入过量的转化生长因子 α (终浓度为 10^{-7} mol/L),使其浓度高出转化生长因子 α -Saporin 100 倍,同时以含 10^{-3} mol/L 的 saporin 的 DMEM 培养基一组作为 Saporin 组,以只加 DMEM 培养基一组作为空白对照组,培养 48 h 后弃去培养基,每孔加入氚标胸腺脱氧嘧啶核苷使终浓度为 1 mCi/L,继续培养 48 h 用 Hanks 液洗两次,以 0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞置在液体闪烁计数仪(LKB1209, RACKBETA)上测定细胞氚标胸腺脱氧嘧啶核苷放射活度。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组资料之间的比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异界限。

2 结果

2.1 转化生长因子 α 与 Saporin 的联结与提纯

蛋白定量测定得出转化生长因子 α -Saporin 联结物的蛋白浓度为 44.7 mg/L,经 Eppendorf 离心过滤管初步提纯后分子质量 10 kDa 以下的杂质少于 5%~10%,SDS 电泳显示获取的转化生长因子 α -Saporin 联结物中主要为转化生长因子 α -Saporin 和少量难以分离的残余的未联结的 Saporin,但为了以后的研究中表达方便,我们即近似地将这一浓度作为转化生长因子 α -Saporin 的浓度。

2.2 转化生长因子 α -Saporin 对增殖平滑肌细胞生长的影响

MTS 比色法测定(图 1, Figure 1)发现,转化生长因子 α -Saporin 组、saporin 组和空白对照组测定的光吸收均值分别为 0.1285 ± 0.0615 、 0.1918 ± 0.1410 、 0.3218 ± 0.2157 , TGF α -Saporin(10^{-7} mol/L)组的平滑肌细胞的生长受到明显抑制,与空白对照组比较,差异非常显著($P = 0.0003$),细胞增殖抑制率达到 60%,而 Saporin 浓度在 10^{-3} mol/L 的浓度下也能轻度抑制平滑肌细胞的增殖,但细胞增殖抑制率只有 40%,与 TGF α -Saporin 组比较已有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 转化生长因子 α -Saporin 对增殖平滑肌细胞 DNA 合成的影响及其受体竞争抑制实验

氚标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入实验中四组培养平滑肌细胞氚标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入量分别为 1004.5 ± 322.0 、 669.2 ± 174.1 、 1099.7 ± 255.2 和 1113.5 ± 388.9 (图 2, Figure 2)。结果发现,浓度为

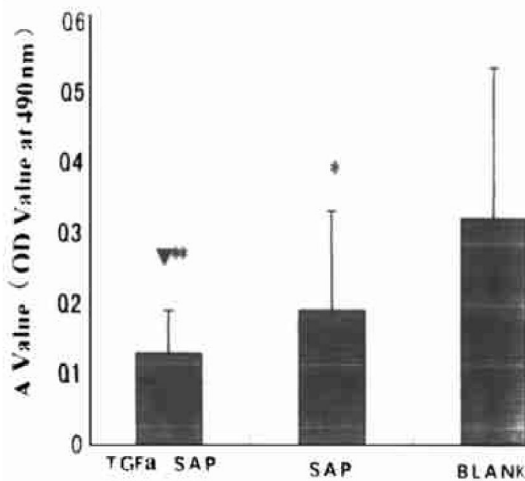


图1. 转化生长因子 α Saporin组、Saporin组和对照组MTS光吸收值的比较

Figure 1. Absorbance measured by MTS of TGF α - Saporin group (10^{-7} mol/L) and saporin group (10^{-4} mol/L) are compared with blank control group. (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ compared with blank control group; $P < 0.05$ compared with saporin group)

10^{-9} mol/L 的 TGF α - Saporin 对培养的平滑肌细胞 DNA 合成有明显抑制作用, 与空白对照组比较氙标胸腺脱氧核苷掺入量降低了 39.1% ($P = 0.0017$), 而 saporin 在浓度增高到 10^{-3} mol/L 时都不能抑制平滑肌细胞 DNA 合成(与空白对照组比较 $P = 0.1$), TGF α - Saporin 组(10^{-9} mol/L) 与之比较存在显著性差异($P = 0.039$)。而在加入过量表皮生长因子(epidermal growth factors, EGF)受体的配体转化生长因子 α 后, TGF α - Saporin 抑制平滑肌细胞 DNA 合成的作用即被转化生长因子 α 明显地竞争抑制, 与对照组比较氙标胸腺脱氧核苷掺入量已无明显降低, 两组之间无显著性差异($P = 0.229$)。故高度提示在 TGF α - Saporin 抑制平滑肌细胞的 DNA 合成作用是通过 EGF 受体介导的。

3 讨论

近年来研究发现, 内膜损伤后, 一些表型改变的中层平滑肌细胞向内膜迁移, 并不断增殖和分泌大量的细胞间质, 正是导致内膜过度增生和再狭窄形成的根本原因。而生长因子, 作为一种环境与细胞之间的信号传递因子在这一过程中起着十分关键的作用^[3]。

转化生长因子 α (TGF α) 是多肽生长因子表皮生长因子家族中的一种, 与表皮生长因子的结构和功能都十分相似, 但多存在于胚胎组织和肿瘤组织中,

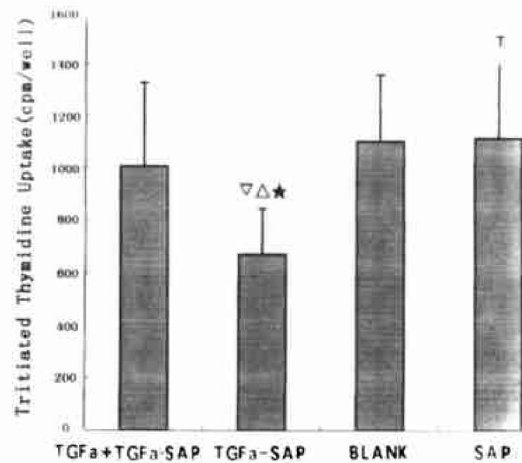


图2. 转化生长因子 α Saporin组、转化生长因子 α 加转化生长因子 α Saporin组、Saporin组和对照组氙标胸腺嘧啶掺入量的比较

Figure 2. Tritiated thymidine uptake of TGF α - Saporin group and TGF α + TGF α - Saporin group are compared with blank control group. ($P < 0.05$ compared with blank control group; Δ , $P < 0.05$ compared with TGF α + TGF α - Saporin group; \star $P < 0.05$ compared with saporin group)

是器官发育和肿瘤形成过程中一种重要的促分裂因子, 能促使进入分裂前的感受态的细胞进一步发展而向 S 期过渡, 转化细胞产生这些因子后即可有力地刺激其自主性生长(成熟细胞分泌的表皮生长因子则无这种作用)^[3-5], 同时细胞表面的表皮生长因子受体也会有明显上调, 从而形成刺激细胞增殖并降低对外源性生长因子需求的自分泌环。

平滑肌细胞在表型转化后也同样伴随着表皮生长因子受体基因表达的大量增加, 从而使细胞表面的表皮生长因子受体数量也明显上调(为未增生细胞的 10 倍)^[6,7], 这成为表型改变后平滑肌细胞的一个主要特征。在表型改变后, 细胞表面的表皮生长因子受体功能也会发生了很大变化, 使转化生长因子 α 更易于竞争性取代表皮生长因子而与表皮生长因子受体结合。而正常的平滑肌细胞和内皮细胞虽也可和转化生长因子 α 结合, 但由于受到受体数量和亲和力的影响, 另一方面在局部表皮生长因子选择性的保护下, 表达较少表皮生长因子受体的正常细胞与转化生长因子 α 结合率远远低于增殖的靶细胞^[8,9]。

本实验中我们采用 SPDP 化学联结的方法^[1,2], 利用转化生长因子 α 作为导向因子与一种新型细胞毒素 Saporin 进行了联结, 合成了生物导向药物转化生长因子 α - Saporin。由于 Saporin 是从植物皂草种子中提取出来的一种半毒素, 故在细胞外对完整的真核生物细胞不具毒性^[2]。而当转化生长因子 α 与

毒素蛋白 Saporin 化学联结后, 联结后的转化生长因子 α - Saporin 即能以转化生长因子 α 为导向因子, 通过表皮生长因子受体将 Saporin 特异性地转运到表型改变的平滑肌细胞内, 从而特异性地杀死表型转化后不断增殖的平滑肌细胞。

实验中我们发现, 转化生长因子 α - Saporin (10^{-7} mol/L) 可明显抑制增殖平滑肌细胞的生长, 使细胞增殖抑制率达到了 60%, 而浓度高出一万倍的 Saporin 也可轻度抑制平滑肌细胞的增殖, 但与转化生长因子 α - Saporin 组相比较仍有显著性差异。在氚标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入实验中, 我们也同样发现浓度为 10^{-9} mol/L 的转化生长因子 α - Saporin 对增殖平滑肌细胞的 DNA 合成有明显抑制作用, 与空白对照组相比氚标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入量降低了 39.14%, 而 Saporin 在浓度增高到 10^{-3} mol/L 时都不能有效抑制增殖平滑肌细胞的 DNA 合成, 与转化生长因子 α - Saporin 组比较存在显著性差异。由于 Saporin 必须在细胞内活化后才具备 Saporin 的细胞毒性^[2], 故实验中可见到 Saporin 在细胞外本身的细胞毒性作用很弱, 而转化生长因子 α - Saporin 由于可通过转化生长因子 α 与表皮生长因子受体结合进入细胞内, 故在实验中表现出明显增强的细胞毒作用。

通过转化生长因子 α - Saporin 受体结合的竞争抑制实验可看到: 加入过量配体转化生长因子 α 后, 转化生长因子 α - Saporin 细胞毒性作用即被明显地竞争抑制, 与空白对照组相比氚标胸腺脱氧嘧啶核苷的掺入量已无明显降低, 两组之间的差异无统计学意义。这充分提示转化生长因子 α - Saporin 抑制平滑肌细胞 DNA 合成是通过表皮生长因子受体介导的, 由于转化生长因子 α 可与转化生长因子 α - Saporin 竞争细胞表面的表皮生长因子受体, 故能明显抑制转化生长因子 α - Saporin 对增殖平滑肌细胞的细胞毒性作用^[6]。

近年来, 生长因子导向治疗研究为经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄开辟了一个崭新的领域^[9,10]。本实验在国内外首次联结合成了生物导向药物转化生长因子 α - Saporin, 对其化学特性和生物

特性进行了初步地鉴定, 证实联结后的转化生长因子 α - Saporin 已具有了较 Saporin 明显增强的细胞毒性作用, 而这一特性正是通过我们联结的导向因子——转化生长因子 α 与表皮生长因子受体结合介导而实现的。

参考文献

- [1] Salvatore Siena, Lappi DA, Marco Bregni, et al. Synthesis and characterization of an antihuman T-lymphocyte saporin immunotoxin (OKT1-saporin) with in vivo stability into nonhuman primates [J]. *Blood*, 1988, **72**: 756- 765
- [2] Blakey DC, Skilleter DN, Price RJ, et al. Comparison of the pharmacokinetics and hepatotoxic effects of Saporin and ricin A₂ chain immunotoxins on murine liver parenchymal cells [J]. *Cancer Res*, 1988, **48**: 7 072- 078
- [3] Bernstein LR, Antencades H, Zetter BR. Migration of cultured vascular cells in response to plasma and platelet-derived factors [J]. *J Cell Sci*, 1982, **56**: 71- 82
- [4] Epstein SE, Siegall CB, Sadatoshi Biro, et al. Cytotoxic effects of a recombinant chimeric toxin on rapidly proliferating vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 1991, **84**: 778- 787
- [5] Pickering JG, Dov Gal, Patricia Bacha, et al. Inhibition of injury induced intimal thickening in the rat carotid artery by a recombinant cytotoxin specific for epidermal growth factor receptor [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1991, **21**: 178A
- [6] Epstein CE, Siegall CB, Sadatoshi Biro, et al. Cytotoxic effects of a recombinant chimeric toxin on rapidly proliferating vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 1991, **84**: 778- 787
- [7] Altis J, Thoma s AC, Alex Agrotis, et al. Expression of growth factor receptors on arterial smooth muscle cells: Dependency on cell phenotype and serum factors [J]. *Atherosclerosis*, 1995, **118**: 77- 87
- [8] Kirk J, Camichael J, Stratford IJ, et al. Selective toxicity of TGF- α PE40 to EGFR positive cells: Selective protection of low EGFR cells expressing EGF [J]. *Br J Cancer*, 1994, **69**: 988- 994
- [9] Pastore CJ, Isner JM, Bacha PA, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted cytotoxin inhibits neointimal hyperplasia in vivo [J]. *Circ Res*, 1995, **77**: 519- 529
- [10] Andrew Farb, Lee SJ, Min DH, et al. Vascular smooth muscle cell cytotoxicity and sustained inhibition of neointimal formation by fibroblast growth factor 2- Saporin fusion protein [J]. *Circ Res*, 1997, **80**: 542- 550

(此文 2001- 02- 20 收到, 2001- 05- 22 修回)

(此文编辑 胡必利)