

CTGF 与 FGF 在促成纤维细胞增殖过程中的基因反应差异

王 炯 董承红 王丽春 孙 明 李琦涵

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所 昆明 650118)

人结缔组织生长因子(Connective Tissue Growth Factor, CTGF)是一种以细胞早期基因产物形式产生的细胞因子,它的生物学活性与成纤维细胞生长因子(FGF)很类似,主要表现为促成纤维细胞、结缔组织基质、血管内皮细胞等结缔组织成分的功能和加速它们的生长增殖,因而在创伤修复方面具有潜在的应用意义^[1]。并且,在一些研究中发现其可以作为某些作用广泛的细胞因子如 TGF- β 、PDGF 刺激血管内皮细胞、成纤维细胞,并使其增殖的具有较强特异性的中介信号因子^[2,3]。因此,CTGF 的信号传递方式及是否类似于 FGF、是否通过特定膜受体对相应靶细胞发挥其生物学活性均具有探索意义,我们利用基因反应差异显示技术对 CTGF 和 bFGF 作用细胞后所产生的基因应答反应作了初步比较,同时对 CTGF 信号传递过程中细胞内相应成分的磷酸化反应特性进行了分析。

材料与方法

1. CTGF、bFGF 及 KMB-17 细胞

CTGF 源自本实验室克隆及原核表达并复性纯化的产物,其纯度已高于 90%^[4];bFGF(东大制药公司产品)由珠海东大制药公司惠赠;CTGF、bFGF 均稀释于无血清 DMEM,4℃ 保存。KMB-17 细胞由本实验室保存,其为来源于正常人胚肺的成纤维细胞,生长于 DMEM-5% 小牛血清培养液中。

2. CTGF、bFGF 对 KMB-17 细胞的生物学活性作用
用无血清 DMEM 培养液倍比稀释的 CTGF(浓度

从 30 μ g/ml 始)、bFGF(浓度从 1000 μ g/ml 始)作用于生长状态良好 KMB-17 细胞(细胞浓度为 1×10^6 /ml)48h 后,采用改良的 MTT(Sigma 公司产品)法^[5]检测细胞增殖情况。

3. CTGF、bFGF 刺激 KMB-17 细胞后 mRNA 的提取

采用无血清 DMEM 稀释的 CTGF(终浓度为 2.0 μ g/ml)、bFGF(终浓度为 30 μ g/ml)分别加入 KMB-17 细胞中,并设细胞对照,两种细胞因子组分别培养 1 和 2 小时后,刮取的细胞经 PBS 洗两次,用 Quickprep Micro mRNA 提取试剂盒(Pharmacia 公司产品)提取细胞的 mRNA, -20℃ 冻存备用。

4. 原癌基因反应的差异显示

合成 4 个原癌基因片段引物,序列如下(生工公司合成):

c-fos: 5'-CGAAACGGATTGGCGGTGCTACTACAAGAGC-3'

c-myc: 5'-CCTCGCGGCACTCGCTCTTCGACGTCGTGCC-3'

mos: 5'-TCCAGCCCTCAAGCTCTGGTCCGACTGGTTG-3'

c-src: 5'-TTGTGGGACGTCGTCGACCACCGGATGATGA-3'

以提取的细胞 mRNA 经快速第一链合成试剂盒(Pharmacia 公司产品)合成的单链 cDNA 并作为模板,引物一个分别为上述引物,另一个为随机引物 N₁₀(购于上海生工公司);94℃ 变性 4min 后,94℃ 50s, 54℃ 50s, 72℃ 50s, 共 35 个循环,72℃ 延长 10min,进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析^[5]。

5. 蛋白磷酸化特性分析

CTGF 刺激的 KMB-17 细胞(终浓度为 2.0 μ g/ml)及无 CTGF 刺激的细胞对照(细胞数均为 10^7 /瓶),

本文 2000 年 7 月 12 日收到,10 月 31 日接受。

国家新药开发与应用基金(项目编号 96-901-05-134)、卫生部面上基金(项目编号 983-2-003)资助。

培养于不含磷的 DMEM 培养基,同时掺入³²P 标记的无机磷酸,终浓度为 0.5mci/ml,分别 37℃ 培养 15min、1h、2h、2.5h 后,去除培养液,刮下细胞并用 PBS 洗三次,用含 2% NP40 的 RSE (10mmol/L Tris. HCl、10mmol/L NaCl、1.5mmol/L MgCl₂)裂解液 1ml 裂解细胞,1 000rpm 5min 离心,取此上清液 20 μ l,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,干胶后放射自显影,以分析 CTGF 刺激的 KMB -17 细胞后蛋白磷酸化反应。

取以上 CTGF 刺激不同时间、并标记³²P 的细胞裂解液上清,每组 5 μ l,与抗磷酸酪氨酸的抗体(50mg/ml) 2 μ l(Pharmingen 公司产品)在 PBS 条件下(终体积为 30 μ l),37℃ 作用 1 小时后,加入 3 μ l 体积的 10% (v/v) 金黄色葡萄球菌悬液,4℃ 1h,经 RIPA 缓冲液 (50mmol/L Tris. cl、150mmol/L Nacl、1% NP-40、0.5% 去氧胆酸、0.1% SDS)50 μ l/次离心洗涤三次后,用 SDS 样品缓冲液悬液,100℃ 沸水浴 3min 后离心,取上清进行 12% SDS-PAGE 电泳,干胶后进行放射自显影。

结 果

一、CTGF、bFGF 对 KMB-17 细胞促增殖作用

使用改良的 MTT 法检测 CTGF、bFGF 作用于 KMB-17 细胞后细胞的增殖反应结果见图 1,CTGF 和 FGF 对 KMB-17 细胞有明显促

生长作用,并表现出典型的剂量活性依赖效应:在较高浓度时对细胞生长有一定的抑制作用,一定浓度范围内可诱导细胞增殖;此结果表明两者在促进成纤维细胞增殖作用中无明显的差异。

二、CTGF、FGF 作用后 KMB-17 细胞基因反应的差异

为了解 CTGF 和 FGF 刺激成纤维细胞生长的机理,我们设计了特异性基因反应差异分析方法,利用一段长达 30bp 的原癌基因特异性引物和一段随机引物,以分析该类原癌基因在受到 CTGF 或 FGF 刺激时原癌基因的表达差异。其中,30bp 的特异引物和 54℃ 的退火温度,能保证同类原癌基因得到特异扩增,而随机引物则能反映该类基因反应的差异。对细胞对照、CTGF 和 bFGF 组刺激 1 和 2 小时后分离的细胞 mRNA 进行这种特异性的差异显示 PCR 扩增^[5],结果表明各组细胞原癌基因的表达有所差异。以细胞增殖密切相关的 *fos*、*myc* 基因特异性片段为引物所进行的原癌基因 mRNA 差异显示结果表明在培养 1 小时后,FGF 可以刺激细胞内 *fos* 类基因的表达(见图

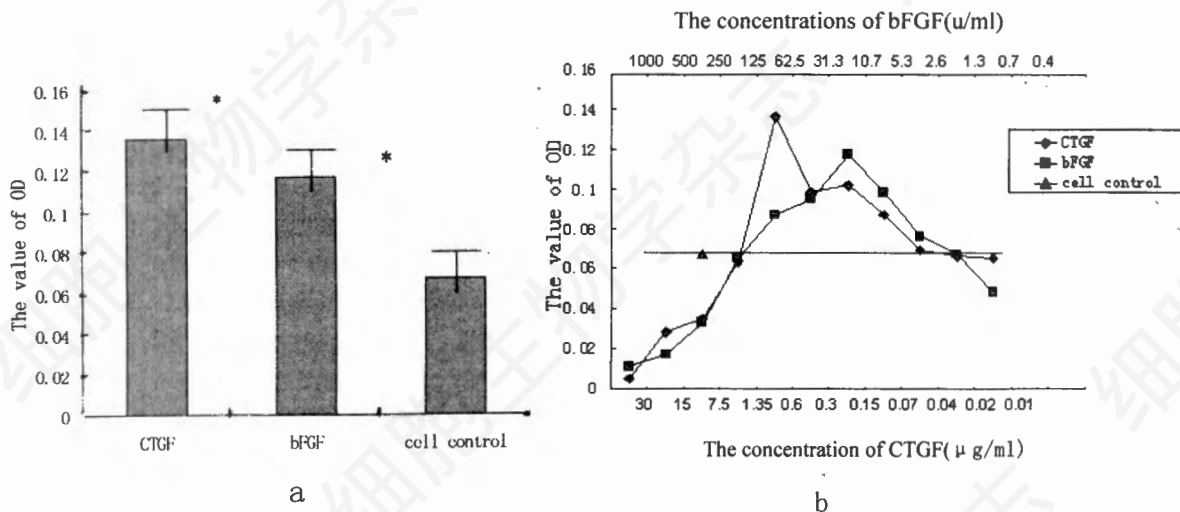


图 1 CTGF 和 bFGF 在体外诱导 KMB -17 细胞的增殖反应

a. CTGF(1.35 μ g/ml)和 bFGF(6.25u/ml)诱导 KMB -17 细胞的增殖反应(* P<0.01)。

b. 不同浓度的 CTGF 和 bFGF 诱导 KMB -17 细胞的增殖反应。

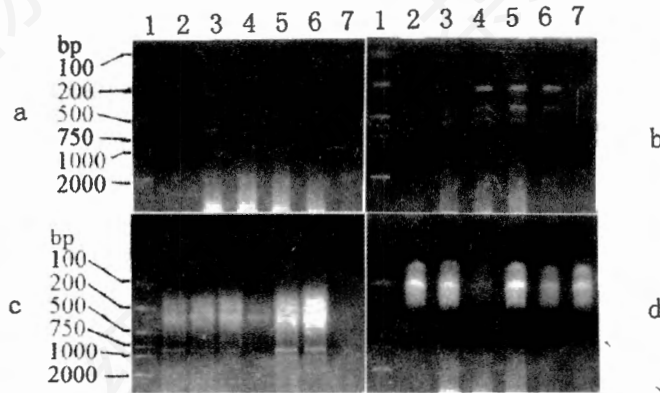


图 2 CTGF、bFGF 诱导的早期基因反应(采用原癌基因特异性引物进行的 mRNA 差异显示)

a. c-fos 引物; b. c-myc 引物; c. src 引物; d. c-mos 引物。

1. DNA 分子量 mark; 2. 1h 细胞对照; 3. bFGF 作用 1h; 4. CTGF 作用 1h; 5. 2h 细胞对照; 6. bFGF 作用 2h; 7. CTGF 作用 2h。

2a), 在刺激 2 小时后表达消失; 而 CTGF 刺激细胞 1 小时后诱导 myc 类基因表达(见图 2b), 随着培养时间的延长, bFGF 刺激的细胞中也出现与细胞对照相同的 myc 类基因的表达, 而此时 CTGF 所诱导的 myc 类基因表达有减弱的倾向。

与信号传递功能密切相关的 src、mos 类基因的表达通过该方法也表现出明显的差异: 培养 2 小时后, 在空白细胞内的 src 类基因表达减弱时(见图 2c), bFGF 和 CTGF 可诱导该类基因的表达, 这意味着具有酪氨酸蛋白激酶活性的 src 基因产物在 CTGF 和 FGF 诱导细胞增殖的信号传递过程中具有重要作用。与本结果相似, Karlsson 等人^[6]已证实 bFGF 的信号传递是由 src 编码的含有 SH2 结构域蛋白分子执行的。另外, 当 FGF 作用于细胞后, 对产物具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性的 mos 基因反应无明显的影响(见图 2d), 而 CTGF 在早期可抑制其表达, 随后此抑制作用消失, 该结果表明 CTGF 与 FGF 作用于细胞后, 对 mos 类基因的反应刺激有所差异, 但与细胞对照中持续的 mos 类基因表达相比较, 意味着该基因反应在 FGF 和 CTGF 细胞内的信号传递并无明显的意义。

三、磷酸化蛋白的免疫沉淀分析

为进一步明确 CTGF 作用于细胞后是否亦能导致蛋白磷酸化及其磷酸化蛋白的特性,

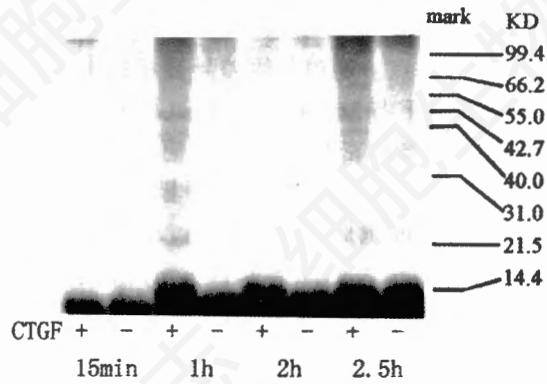


图 3 在 P^{32} 标记的无机磷酸培养液中, CTGF 刺激细胞 15 分钟至 2.5 小时后, 细胞组分经 12% PAGE-SDS 电泳后放射自显影结果

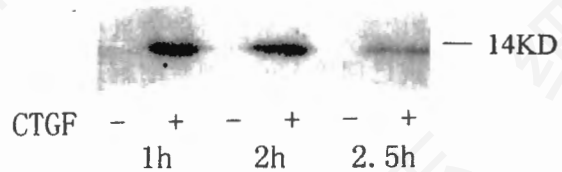


图 4 CTGF 刺激细胞后的各组分与抗磷酸酪氨酸单克隆抗体结合后进行的免疫沉淀分析

我们在 CTGF 刺激细胞的培养液中加入³²P 无机磷标记,并在 37℃ 培养不同时间后,将其细胞裂解液上清,经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后加以对比分析,发现 CTGF 刺激细胞 1h 后出现一个特异性磷酸化蛋白条带,分子量约为 14KD(见图 3);此蛋白带在培养 2.5h 后和细胞对照组即无明显差别,但经抗磷酸酪氨酸抗体的免疫沉淀实验结果分析表明(见图 4),该特异性 14KD 分子是可以被抗磷酸酪氨酸抗体特异识别的酪氨酸磷酸化蛋白,而细胞对照组及 CTGF 刺激 2.5h 后出现的磷酸化蛋白则可能是其它类型的磷酸化蛋白。

讨 论

CTGF 作为血管内皮细胞受到创伤信号或其他一些细胞因子刺激后所产生的早期基因产物^[1],具有和 bFGF 相似的生物学活性,对成纤维细胞 KMB-17 株促增殖的生物学活性分析已证实了这一点。通过基因差异显示技术对由 CTGF 和 bFGF 导致的细胞增殖过程的分析表明,细胞内与增殖密切相关的原癌基因 *fos* 在 bFGF 刺激细胞 1 小时后表达明显增强;而在 CTGF 作用于细胞后的同时间内,却诱导另一种与增殖密切相关的原癌基因 *c-myc* 的表达;而在通常细胞增殖过程中,两者均在细胞得到增殖信号的早期即出现高表达^[7];此结果提示这两个因子可能是通过诱导不同的基因反应来实现相同的生物学活性的。此外,有关资料表明^[8]bFGF 可诱导大鼠成骨细胞系在 30min 内既出现 *c-fos* mRNA 的表达,这也支持了本实验的结果。*src* 基因是一类表达非受体类并具有酪氨酸激酶活性的蛋白的原癌基因,其产物存在于胞质或胞膜,是细胞信号传递过程中的重要成分^[9],现已明确 bFGF 刺激细胞是通过 *src* 同源序列 2(SH2)蛋白的表达,从而导致细胞内相应成分的酪氨酸蛋白磷酸化来实现其信号传导的^[6,8]。与此结论一致,本实验结果表明 bFGF 刺激细胞后,可诱导 *src* 类基因的表达;同时,CTGF 也可诱导其表达,提示 CTGF

的信号传递可能与酪氨酸蛋白激酶有关,在本实验中的免疫沉淀结果进一步证实了 CTGF 的信号传递过程亦与细胞中相应成分的酪氨酸蛋白磷酸化有关,此 14KD 的蛋白在 CTGF 刺激细胞后短时间(1h 左右)内出现酪氨酸磷酸化,随后逐渐减弱,提示 CTGF 对细胞的影响亦可能同样通过某种蛋白的酪氨酸磷酸化过程来实现,该蛋白在 CTGF 信号传递中的作用、意义,以及其自身的性质,尚待进一步研究。

摘 要

结缔组织生长因子(CTGF)是某些内皮细胞即刻早期基因反应产物,其与 FGF 具有类似的促进成纤维细胞(KMB-17)增殖的功能;在此促增殖过程中 CTGF 和 FGF 所诱导的基因反应有所差异,CTGF 诱导细胞表达 *c-myc*,而 FGF 促进 *c-fos* 表达增加;此外两种因子均诱导与酪氨酸磷酸化过程密切相关的 *src* 基因表达,免疫沉淀证实 CTGF 结合细胞表面受体后可诱导细胞内相应蛋白的酪氨酸磷酸化。

关键词:CTGF FGF 成纤维细胞 基因反应 酪氨酸蛋白磷酸化

参 考 文 献

- [1] Bork P., 1993, *FEBS*, **327**:123-130.
- [2] Grotendorst GR., 1997, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **8**:171-179.
- [3] Kothapalli D., et al., 1997, *Cell Growth Differ.*, **8**:61-68.
- [4] 李琦涵等, 1999, 中国生物化学与分子生物学杂志, **15**:832-836.
- [5] 戴建新等, 1995, 生物技术通讯, **6**:21-24.
- [6] Karlsson T., et al., 1998, *Cell Growth Differ.*, **9**:757-788.
- [7] Gonda TJ., et al., 1991, *Nature*, **310**:249-245.
- [8] Hurley MM., et al., 1996, *J. Bone Miner Res.*, **11**:1256-1263.
- [9] Dynlacht B., 1997, *Nature*, **389**:149-150.
- [10] Megeney LA., et al., 1998, *Dev. Genet.*, **19**:139-145.

THE DIFFERENT GENE RESPONSE IN THE PROCEDURE OF FIBROBLAST PROLIFERATION INDUCED BY CTGF AND FGF

WANG Jiong DONG Cheng Hong WANG Li Chun SUN Ming LI Qi Han*
(Institute of Medical Biology, Peijing Union Medical Collage,
Chinese Academy of Medical Science, Kun ming 650118, China)

ABSTRACT

Connective Tissue Growth Factor(CTGF) is a product of immediately early gene, which has the similar effect of stimulating fibroblast proliferation as FGF, but CTGF and FGF have different gene response in this process, CTGF induced cell expression of c-myc oncogene, FGF stimulated c-fos oncogene expression; on the other hand CTGF and FGF both can induce src gene expression and the result of the immunological precipitation with anti-phosphotyrosine antibody suggested that tyrosine phosphorylation of a protein in KMB-17 perhaps is related with the signal transduction of CTGF.

Key words: CTGF FGF Fibroblast Gene response Tyrosine phosphorylation

蛋白聚糖和溶血磷脂酸对不同细胞周期 心脏成纤维细胞生长的影响

何兰杰* 丛祥凤 常文静 陈曦**

(中国医学科学院 中国协和医科大学 阜外心血管病医院 北京 100037)

心肌肥厚是高血压、冠心病等多种心血管疾病发展过程中共同的病理生理改变,是多种因素相互作用的结果。心脏成纤维细胞的增殖是心肌肥厚的重要因素之一,研究一些生物活性物质对心脏成纤维细胞增殖的调节作用,对控制心肌肥厚的发生和发展有重要的价值。

蛋白聚糖(PGs)是血管壁内皮细胞和平滑肌细胞合成并分泌的活性物质,除作为细胞基质的重要成分外,还是许多生长因子的受体或亚受体^[1,2],参与血管壁、神经、肿瘤组织中多种细胞的生长调节^[3-6],但PGs对心脏细胞生长的影响还未见报道。溶血磷脂酸(LPA)是近年来发现的一种十分活跃的脂质信号分子,在神经组织和心血管系统中有多种生物学功能^[7,8],然而它在心脏组织中的作用,还缺乏认识。本文通过观察这两种生物活性物质对培养的处于不同细胞周期的乳鼠心脏成纤维细胞生长的影响,同时分析PGs和LPA对成纤维细胞生长的调节作用,为探讨它们在心肌肥厚发病机理中的作用和临床防治提供新的思路。

材料与方法

1. 主要试剂

DMEM培养粉(Gibco),胎牛血清(天津血研所),胰蛋白酶(Sigma),LPA(Sigma),³H-TdR(中科院原子能所),牛主动脉PGs(本室提取),其他试剂均为北京化工厂分析纯试剂。

2. 动物

1-3天SD乳鼠(北京医科大学动物部提供)。

3. 含牛主动脉PGs细胞培养液的制备

按文献^[5]制备。

4. 乳鼠心脏成纤维细胞的培养

参照文献^[9],取1-3天的SD乳鼠心脏,差速贴壁法获取心脏成纤维细胞,37℃、5%CO₂培养箱中培养细胞。当细胞生长至次汇合状态,以不同浓度的血清继续培养细胞不同的时间,流式细胞术鉴定细胞所处的细胞周期。

本文2000年10月30日收到,2001年3月19日接受。

本研究受北京市自然科学基金(7982031)资助。

*宁夏医学院附属医院心内科。

**项目负责人。