

从无血清连续培养细胞株大量提纯组织型纤溶酶原激活剂

王结义 王龙生 宋家桢 陈幼妹 宋后燕

(上海医科大学生生化教研室, 上海)

人黑色素瘤细胞无血清连续培养, 并运用高效诱导剂, 从而快速、大量地获得了含组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 水平较高的培养液。经免疫亲和层析、Sephadex G-150 凝胶过滤, 培养液中 t-PA 得以快速有效地纯化。纯化 t-PA 为单链形式, 分子量 67kd, 比活性达 186,667IU/mg。从 1L 培养液中可得 0.36mg t-PA。以 WHO 标准 t-PA 抗体作免疫鉴定, 纯化 t-PA 与标准 t-PA 免疫性相同。单链 t-PA 经纤溶酶作用转变为由重链 (35kd) 和轻链 (31kd) 组成的双链 t-PA。纯化的人黑色素瘤细胞 t-PA 已成功地用于溶解家兔动脉血栓。

关键词 t-PA; 人黑色素瘤细胞; 连续无血清培养; 免疫亲和层析; 溶解家兔血栓

急性心肌梗塞等血栓性疾病严重威胁人类健康, 用组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 溶血栓治疗这类疾病受到了广泛重视, 并且取得了重大突破^[1-3]。t-PA 与纤维蛋白有高亲和力并且在纤维蛋白辅助下高效激活纤溶酶原, 所以 t-PA 能特异地激活血栓中纤溶酶原生成纤溶酶, 导致血栓溶解。t-PA 不激活血流中纤溶酶原, 因而避免了应用尿激酶 (UK) 或链激酶 (SK) 时引起的“全身性纤溶状态”及内出血等严重副反应^[1-3]。

人和动物组织中 t-PA 含量极少, 但某些培养的细胞株能产生较多的 t-PA^[4,5]。我们建立了无血清连续培养人黑色素瘤细胞技术, 并快速大量地纯化了培养液中 t-PA。

材料和方 法

(一) 试剂

Eagle 培养基 (日水制药株式会社),

蛋白酶抑制剂 (aprotinin, Boehringer Mannheim)、纤溶酶 (Kabi Vitrum), WHO 标准 t-PA (83/517) 及 t-PA 抗体 (NIBSAC), 兔抗人 UK 及 t-PA 抗血清 (本室制备)。

(二) 细胞培养

Bowes 人黑色素瘤细胞 (Dr. Rifken 惠赠)^[6] 用 Eagle 培养液在大圆瓶中转动培养, 培养中尚含 0.06% 谷氨酰胺、青霉素 100u/ml, 链霉素 100u/ml 及 10% 小牛血清。每平方米表面加培液 2.5L, 待细胞长满单层, 移去培液, 用 pH 7.4 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液生理盐水 (PBS) 洗细胞二次, 换以含诱导剂的无血清培液。以后每三天收获并更换培液一次, 连续培养。

(三) 免疫亲和柱

按我们报道的方法^[7] 从猪心组织中提纯 t-PA。200μg 纯化猪心 t-PA 与福氏完全佐剂免疫家兔, 每隔两周再以 100μg

本文于 1987 年 6 月 19 日收到,

-tPA 加强免疫两次,获得了免疫双扩散效价为1:32的抗血清。分离抗t-PA IgG,与 Sepharose 4B 交联制成特异免疫亲和层析柱。

(四) t-PA活性的测定

采用纤维蛋白溶解圈法测定 t-PA 活性^[7],以WHO标准品t-PA作标准。作抗体抑制t-PA活性测定时,在板中混入一定量的抗t-PA或抗UK IgG。

(五) 蛋白质定量

用考马斯亮兰 G-250结合法,以牛血清白蛋白作标准品^[8]。

(六) 双链t-PA的制备

取纤溶酶10mg,与2ml溴化氰活化的 Sepharose 4B 交联制备纤溶酶-Sepharose 4B。取1ml t-PA溶液(约100 μ g)加至纤溶酶-Sepharose 4B中,25 $^{\circ}$ C反应2h后,滤去纤溶酶-Sepharose 4B。

(七) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参照Laemmli方法^[9],用8%分离胶和4%浓缩胶。样品以巯基乙醇还原,银染色观察结果。

(八) 提纯步骤

1. 细胞培养:无血清连续培养人黑色素瘤细胞获得的培液,加入蛋白酶抑制剂 aprotinin 至 50kIU/ml、Tween-80至 0.01%后,抽滤。

2. 免疫亲和层析:2L培液以40ml/h速率过兔抗猪心t-PA IgG-Sepharose 4B柱(2.0 \times 20.0cm),以0.1mol/L pH7.4 PBS、0.25mol/L KSCN、25kIU/ml aprotinin、0.01% Tween-80(平衡液)洗脱未吸附蛋白后,用含3.0mol/L KSCN的平衡液洗脱t-PA。收集t-PA活性高峰部分,对高渗液浓缩。

3. Sephadex G-150 凝胶过滤: Sephadex G-150 柱(2.5 \times 80.0cm)以1.0

mol/L NH₄HCO₃、0.01% Tween-80平衡,加入经免疫亲和层析后的t-PA样品,用平衡液洗脱。收集t-PA活性高峰,冷冻干燥。

结 果

(一) 人黑色素瘤细胞的培养

人黑色素瘤细胞能合成分泌t-PA,而且受很多因素的影响。细胞正常培养至长满单层后,换以含诱导剂的无血清培液,细胞产生 t-PA 的水平显著升高。正常培养时(诱导前)细胞培液中 t-PA 活性为30—40IU/ml,无血清诱导培养后培液中 t-PA活性达 100IU/ml 以上。细胞用无血清培养可连续进行,每3天收获更换培液。更换3次后,用含5%小牛血清的培液培养3—4天,以补充营养和扩增细胞,然后再继续无血清连续培养(图1)。这样细胞可连续培养两个月以上,从而快速、大量地获得了 t-PA 含量高的细胞培液。

(二) 人黑色素瘤细胞t-PA的提纯

从5000ml细胞培液中提纯 t-PA 的结果列于表1。细胞培液过兔抗猪心 t-PA IgG-Sepharose 4B猪心t-PA IgG-Sepharose 4B柱,其中t-PA被全部吸附。用平衡液洗去未吸附蛋白,再以含3.0mol/L KSCN的平衡液有效地洗脱了t-PA(图2)。这一步t-PA回收率达81%,纯化倍数为18。免疫亲和层析后的t-PA样品再经 Sephadex G-150 凝胶过滤,有三个洗脱蛋白峰,中间的小峰与t-PA活性高峰重叠(图3)。收集活性高峰部分为纯化 t-PA。最终t-PA的回收率为71%,纯化93倍。纯化t-PA的比活性达到 186667 IU/mg,与国外文献报道结果^[10,11]一致。

(三) 人黑色素瘤细胞t-PA的鉴定

纯化的人黑色素瘤细胞 t-PA用SDS-

表 1 从5.0L人黑色素瘤细胞培养液中提纯 t-PA
Table 1 Purification of t-PA from 5.0 L conditioned medium of human melanoma cell line

	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (IU)	比活性 Specific activity (IU/mg)	得率 Yield (%)	纯化倍数 Purification factor
细胞培养 Conditioned medium	240.0	480000	2000		
IgG-sepharose 4B	10.8	390000	36111	81	18
Sephadex G-150	1.8	336000	186667	70	93

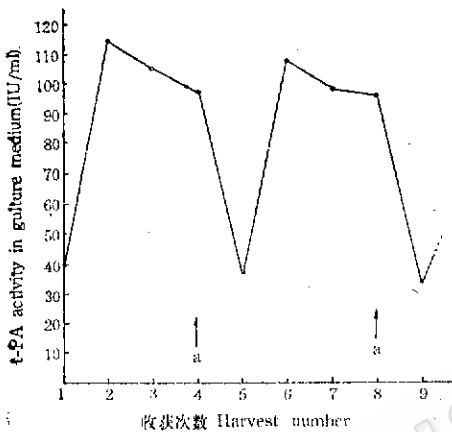


图 1 人黑色素瘤细胞正常培养至长满单层, 再用含诱导剂的无血清培养基连续培养。每 3 天收获更换培养液一次, 每收获 3 次后用含 5% 血清的培养液扩增细胞和补充营养

Fig. 1 Human melanoma cells were grown to confluency with normal medium and then cultured with serum free medium containing certain inducer for t-PA. The medium was harvested every 3 days. The cells were treated with 5% serum as indicated

a: 5% 血清处理 5% serum treatment

PAGE 鉴定, 仅呈现分子量为 67kd 的条带 (图版 I-1a), 表明我们纯化的产品为单链 t-PA。经纤溶酶作用后, 单链 t-PA 转变为双链 t-PA, SDS-PAGE 呈分子量为 35kd 和 31kd 的两条带 (图版 I-1d), 它们分别为 t-PA 分子的重链和轻链。

免疫双扩散及免疫电泳 (图版 I-2 和-3) 表明我们纯化的人黑色素瘤细胞 t-PA 与 WHO 标准 t-PA 抗体反应呈单一沉淀线, 此沉淀线和 Boehringer 公司标准

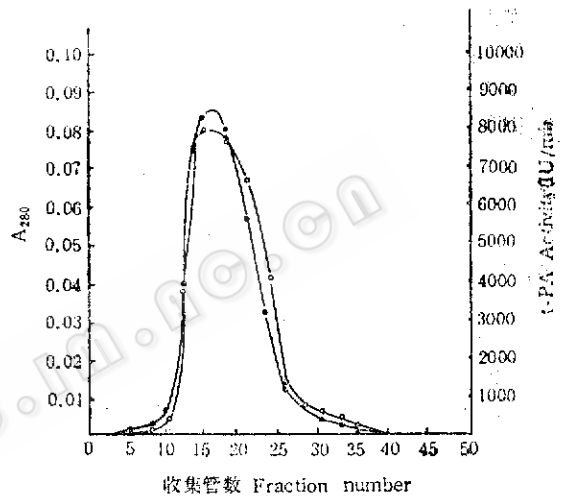


图 2 免疫亲和层析

Fig. 2 Immunoaffinity chromatography
● A280 ○ t-PA 活性 t-PA activity

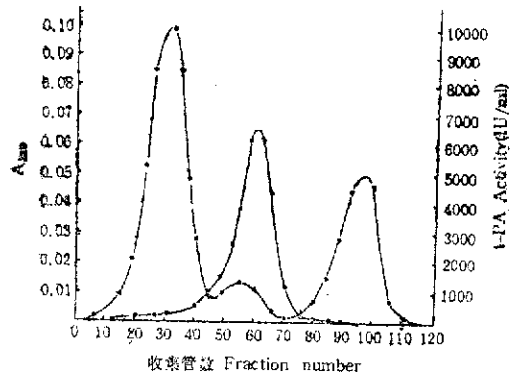


图 3 Sephadex G-150 凝胶过滤
Fig. 3 Gel filtration on sephadex G-150

● A280 ○ t-PA 活性 t-PA activity

t-PA与WHO标准t-PA抗体的免疫沉淀线完全融合、部位一致。这些结果证实我们纯化的t-PA的纯度和免疫性与国外标准品相同。

用纤维蛋白板溶圈法测t-PA活性时,在板中混入抗UK IgG或抗t-PA IgG,研究它们对t-PA活性的抑制,结果总结于图4。t-PA抗体能特异地抑制t-PA活性,但UK抗体不能抑制t-PA活性。

另外,我们制备的兔抗猪心t-PA抗体及抗人黑色素瘤细胞抗体与国外t-PA产品及我们的免疫反应也完全相同。

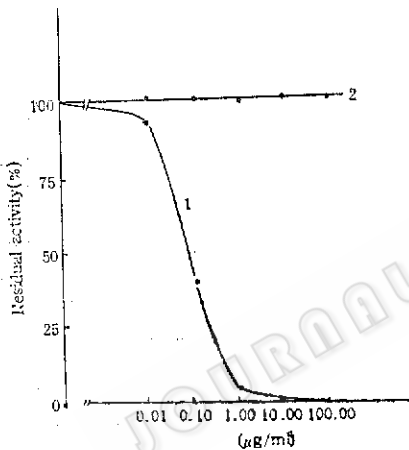


图4 t-PA活性的免疫淬灭

Fig. 4 Immunological quenching of t-PA activity

1. 抗人t-PA IgG Anti human t-PA IgG
2. 抗人UK IgG Anti human UK IgG

讨 论

t-PA作为特异性的溶血栓药物愈来愈受到重视。药用性t-PA有两个主要来源,即用重组DNA技术生产^[12]或从人黑色素瘤细胞株的培养中提纯^[10,11]。

人t-PA与猪心t-PA免疫性相同,因此我们用纯化的猪心组织t-PA^[7]制备了

高效价t-PA抗体,建立免疫亲和层析等方法提纯人黑色素瘤细胞产生的t-PA。同时又建立了大体积连续无血清培养人黑色素瘤细胞技术,并且运用合适的t-PA诱导剂以提高细胞合成分泌t-PA的速率,因而能快速、大量地获得t-PA含量高的培养液用于纯化t-PA。这就使得大量、经济地纯化人黑色素瘤细胞t-PA快速、易行。

天然t-PA为单链形式,但它易受纤溶酶等作用转变为双链形式。然而,单链t-PA的溶血栓效能及特异性都比双链t-PA高^[13]。因此我们在提纯猪心组织及人黑色素瘤细胞t-PA过程中,都应用了蛋白酶抑制剂aprotinin,得到了单链形式t-PA(图版I-1a)。如果不用aprotinin,得到的t-PA经SDS-PAGE鉴定呈三条带,67kd的单链t-PA染色带很淡,35kd和31kd的两条带深,后二者分别为t-PA分子的重链(A链)和轻链(B链)(图版I-1c)。单链t-PA经纤溶酶作用,转变成双链t-PA(图版I-1d)。

我们用纯化的人黑色素瘤细胞t-PA 3000IU灌注家兔股动脉,成功地溶解了实验性髂动脉血栓(图版I-4)。若用生理盐水,家兔髂动脉血栓未见溶解(文章待发表)。

应用纯化的t-PA作参考标准,建立了高灵敏度测定人血浆t-PA的含量和活性以及纤溶酶原抑制物(PAI)的活性的方法,研究心肌梗塞病人血浆t-PA、PAI的变化。此外,我们正在研究t-PA分子结构与功能的关系,为改进t-PA分子结构,增强其溶解血栓的效用提供理论和实践依据,以使用蛋白质工程的方法生产大量药用新型t-PA。

参 考 文 献

- [1] Verstraete, M, et al.: *Lancet*, 1:842, 1985.
[2] Verstraete, M, et al.: *Lancet*, 2:965, 1985.
[3] Collen, D, et al.: *Circulation*, 75:511, 1986.
[4] Ossowski, L, et al.: *Cell*, 16:929, 1979.
[5] Martin, O, et al.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 142:402, 1982.
[6] Rifkin, D, B, et al.: *J. Exp. Med.*, 139:1317, 1974.
[7] 王结义等: 上海医科大学学报, 14 (3):179, 1987.
[8] Brandford, M, M, et al.: *Anal Biochem.*, 72:248, 1976.
[9] Laemmli, U, K, et al.: *Nature*, 227:680, 1970.
[10] Wallen, P, et al.: *Eur. J. Biochem.*, 132:681, 1983.
[11] Kruithof, E, K, O, et al.: *Biochem. J.* 226:631, 1985.
[12] Pennica, D, et al.: *Nature*, 301:214, 1983.
[13] Klausner, K, et al.: *Biotechnology*, 4:706, 1986.

LARGE SCALE PURIFICATION OF TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR FROM CONTINUOUS SERUM-FREE CELL LINE

Wang Jieyi Wang Longshen Song Jiayi Chen Yuomei Song Houyan
(Department of Biochemistry, Shanghai Medical University, Shanghai)

Human melanoma cells were continuously cultured with serum free medium containing certain inducer for t-PA. Large amounts of media with high level of t-PA was obtained. After immunoaffinity chromatography and gel filtration, the t-PA in conditioned medium was rapidly purified. Purified human melanoma t-PA is in single chain form with a molecular weight of 67kd and specific activity of 186,667 IU/mg. A yield of 0.36mg t-PA could be obtained from 1.0 liter conditioned medium. The immunological reactions between WHO standard anti t-PA IgG and purified melanoma t-PA or standard t-PA indicated that the immunity and purity of the two antigens were identical. After treating with plasmin, the 67kd single chain t-PA was converted into double chain t-PA composed of A chain (35kd) and B chain (31kd). Treatment of thrombolysis of experimental thrombi in rabbit with purified human melanoma t-PA was succeeded.

Key words

t-PA; human melanoma cell line; continuous serum-culture; immunoaffinity chromatography; thrombolysis in rabbit



1. SDS-PAGE, 还原条件下进行, 银染色观察结果

SDS-PAGE of purified t-PA. Electrophoresis was performed on reducing condition, with silver staining

- a. 纯化t-PA (纯化过程中应用了aprotinin) Purified t-PA (using aprotinin during purification); b. 标准分子量蛋白 Proteins with standard molecular weight; c. 纯化t-PA (纯化过程中未用aprotinin) Purified t-PA (no aprotinin during purification); d. 单链t-PA 经纤溶酶消化后 Single chain t-PA treated with plasmin

2. 免疫双扩散 Double immunodiffusion

①②③: 纯化的t-PA Purified melanoma t-PA; ④⑤⑥: Boehringer Mannheim公司标准t-PA Standard t-PA from Boehringer Mannheim GmbH

0: WHO标准抗t-PA IgG WHO standard anti t-PA IgG

3. 免疫电泳 Immunoelectrophoresis

a. 纯化的t-PA Purified melanoma t-PA; b. Boehringer Mannheim 公司标准t-PA Standard t-PA from Boehringer Mannheim GmbH; c. WHO标准抗t-PA IgG WHO standard anti t-PA IgG

4. 纯化的人黑色素瘤细胞t-PA用于动物模型作溶血栓治疗 Thrombolytic therapy with purified human melanoma t-PA in animal model of thrombosis

a. 家兔左侧髂动脉血栓栓塞 Thrombosis on the left iliac artery of rabbit; b. 用t-PA后, 家兔左侧髂动脉血栓溶解 Thrombolysis on the left iliac artery of rabbit after perfusion of human melanoma t-PA