

成纤维细胞生长因子基础 与应用研究

主编 李校堃 龚守良

Basic and Applied Researches
on Fibroblast
Growth Factor

 吉林大学出版社

成纤维细胞生长因子基础 与应用研究

主要内容

主 编 李校堃 龚守良
副主编 黄亚东 洪 岸 肖 健
编 委 (按姓氏笔画排序)
吕文天 李校堃 苏志坚 吴晓萍
肖业臣 肖 健 洪 岸 黄亚东
黄志锋 龚守良 蔡 露

吉林大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

成纤维细胞生长因子基础与应用研究/李校堃, 龚守良主编. — 长春: 吉林大学出版社, 2007.9

ISBN 978-7-5601-3689-9

I. 成… II. ①李…②龚 III. 人体细胞学 IV.R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 145929 号

内容提要

为满足一些科研人员开展成纤维细胞生长因子(FGFs)研究的需要,本书汇集了暨南大学医药生物技术开发中心等院校 1996 ~ 2007 年间发表在国内外期刊的 116 篇有关 FGFs 及其改构体的基础与应用研究论文,其中主要包括 FGFs 综述、FGFs 及其改构体对细胞增殖和凋亡作用、FGFs 表达和纯化、FGFs 对神经的保护和治疗作用、FGFs 对皮肤及创伤修复作用、FGFs 对心肾的保护和治疗作用、FGFs 对其他疾病的治疗作用、FGFs 改构体表达和纯化及 FGFs 改构体对细胞损伤的保护作用等方面的内容。

本书可作为进行 FGFs 基础和应用研究的科研人员、临床医师和高等院校教师、研究生的参考书。

书 名: 成纤维细胞生长因子基础与应用研究

编著者: 李校堃 龚守良 主编

责任编辑、责任校对: 李国宏

吉林大学出版社出版、发行

开本: 787×1092 毫米 1/16

印张: 38.25 字数: 1000 千字

ISBN 978-7-5601-3689-9

封面设计: 张沐沉

吉林大学印刷厂 印刷

2007 年 9 月 第 1 版

2007 年 9 月 第 1 次印刷

定价: 80.00 元

版权所有 翻印必究

社址: 长春市明德路 421 号 邮编: 130021

发行部电话: 0431-88499826

网址: <http://jlup.jlu.edu.cn>

E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

序

《成纤维细胞生长因子基础与应用研究》著作经过编著者们的不懈努力,就要与广大读者见面了。主编请我为本书作序,几经推敲,写下斯言,献予读者,不妥之处,请予斧正。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)最早是由 Gospodarowicz(1974)从牛脑组织浸出液中提取的。目前,在人类是由至少 23 个成员组成的家族,称为 FGFs 家族,他们来源于中胚层和神经外胚层的多种类型细胞,在结构上和信号传递分子方面有类似之处,具有广泛的生物学活性和多种生理功能,是当今研究的热点之一。在临床上,FGFs 曾用于创伤修复和治疗心脑血管疾病、神经系统疾病等,具有广泛的应用前景。

本书全面系统地汇集和归纳了 1996 ~ 2007 年间发表的 100 多篇有关 FGFs 及其改构体的基础与应用研究论文,这是以李校堃教授为首的团队经过 10 余年的不懈努力获得的丰硕成果,特别是在 FGFs 家族基因工程药物方面做出了突出的贡献,完成了 2 个一类新药的研制,取得了骄人成绩。

编写《成纤维细胞生长因子基础与应用研究》这样的著作,需要全面反映当代的科研成果和水平。本书的主编李校堃教授和龚守良教授在组织编写和审稿、定稿等方面作了大量的工作,许多科研人员参与了编写工作或为本书的编写提供了帮助和支持,付出了辛勤的劳动。因此,本书的出版可以说是集体智慧的结晶。

本书的出版,可向我国的科研工作者以及广大读者介绍 FGFs 的基本知识和临床的应用情况;在临床、教学和科研工作中都具有一定的参考价值。

侯云德(院士)

2007 年 8 月 14 日于北京

前 言

《成纤维细胞生长因子基础与应用研究》一书经过编著者和出版社编辑人员半年的共同努力,就要与读者见面了。本书的出版集中反映了我们近十余年来开展成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)基础与应用研究领域的丰硕成果,这里凝集着参与此项研究的所有研究者的艰辛和智慧,值得庆贺。

FGFs 又称肝素结合因子,是一多基因家族,各成员之间具有一定的序列同源性和结构相似性。在人体许多组织内,具有广泛的生物学活性。其中,研究较多的酸性 FGF(aFGF)和碱性 FGF(bFGF)在体内主要发挥促分裂效应及非促分裂效应,参与一系列重要的生理和病理过程,在临床上对某些疾病的治疗具有潜在的效果。

全书汇集了 1996 ~ 2007 年间发表在国内外期刊的 116 篇有关 FGFs 及其改构体的基础与应用研究论文,其中主要包括 FGFs 综述、FGFs 及其改构体对细胞增殖和凋亡作用、FGFs 表达和纯化、FGFs 对神经的保护和治疗作用、FGFs 对皮肤及创伤修复作用、FGFs 对心肾的保护和治疗作用、FGFs 对其他疾病的治疗作用、FGFs 改构体表达和纯化及 FGFs 改构体对细胞损伤的保护作用等方面的内容。因此,本书可为从事 FGFs 及其改构体的基础与应用研究的科研人员提供有实用价值的参考书,并达到与同行交流的目的,使同行从中真正有所裨益,这也是编写本书的宗旨。

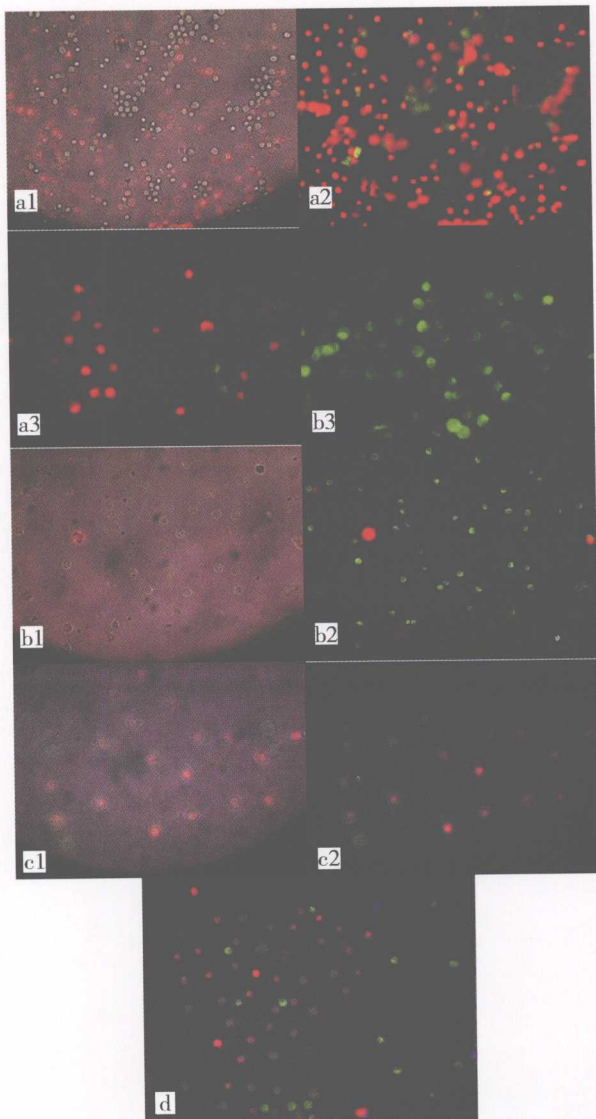
为了达到上述宗旨,我们竭尽所能在尊重原文风格的基础上,统一了全书的格式,认真校阅并修改了一些错误和疏漏之处,在英文论文中补加了中文摘要,并附有前言和书后结语。

本书由侯云德院士作序,对我们是莫大的鼓舞和鞭策,在此表示衷心的感谢;同时,非常感谢林剑教授和傅小兵教授给予的无私关心和大力帮助。

由于编写本书的时间较为仓促,加之编者水平所限,书中的缺点和疏漏在所难免,恳请读者批评、指正。

主 编

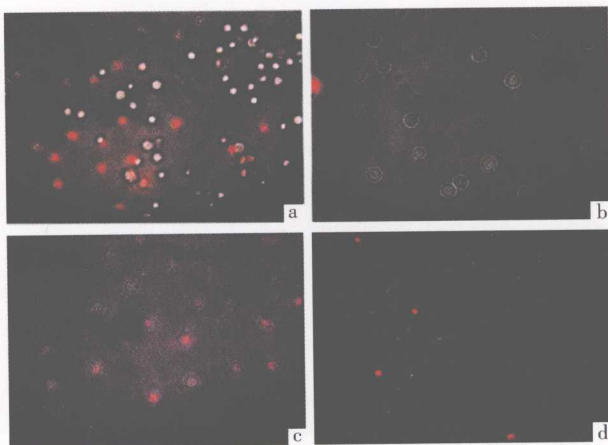
二〇〇七年八月



彩图一(见 134 页)

Fig. 17 Pictures of NIH3T3 cells incubated with PI and Rh123 under fluorescence microscope $\times 20$ for a, b and c pictures, $\times 10$ for d picture

- a. Cells in state of necrosis or certain state of cells in which the mitochondria do not work anymore, stained with PI wholly; a1. Absence of fluorescence, a2. Presence of fluorescence, a3. Amplified picture
- b. Cells in state of normality, stained with Rh123 wholly; b1. Absence of fluorescence, b2. Presence of fluorescence, b3. Amplified picture
- c. Cells in state of apoptosis, stained with both PI and Rh123; c1. Absence of fluorescence, c2. Presence of fluorescence, c3. Amplified picture
- d. Three kinds of above-mentioned cells

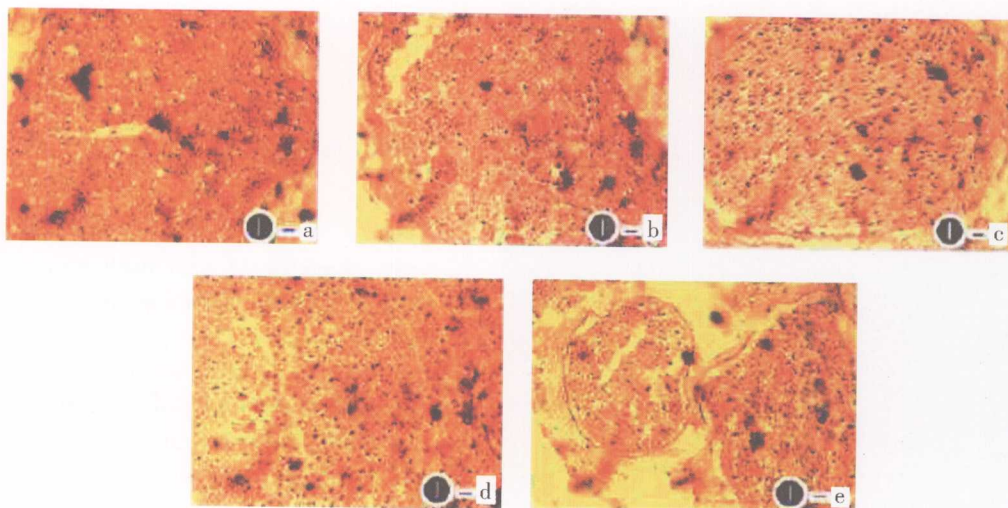


彩图二(见 143 页)

Fig. 1 The photographs of NIH3T3 cells after combined with PI and Rh123

($\times 20$ for photo a, b and c; $\times 10$ for photo d)

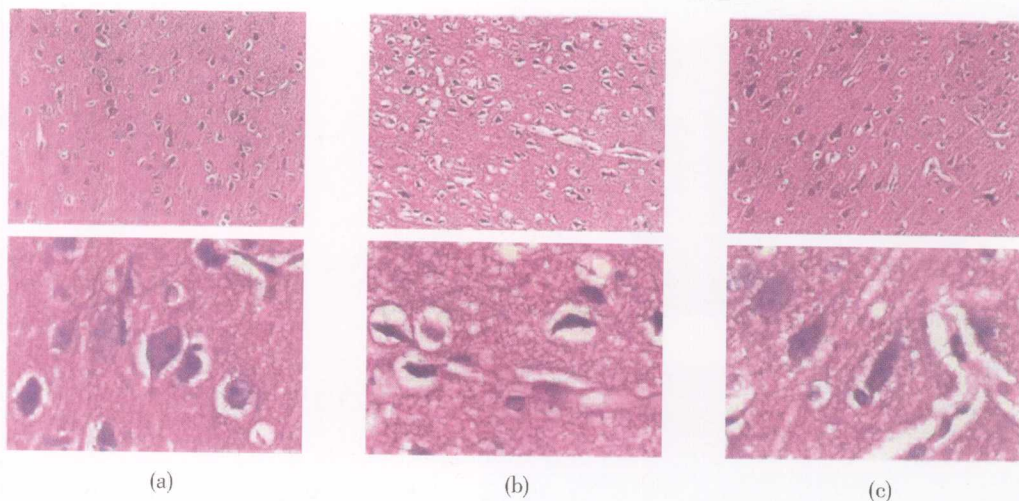
- a: Combined with PI whole fully;
- b: Combined with Rh123 whole fully;
- c: Combined with both PI and Rh123;
- d: Picture shown all the three kinds of cells



彩图三(见 261 页)

图 1 各组大鼠坐骨神经损伤后第 5 周横切片显微镜下观察结果($\times 40$)

a:生理盐水组;b:胶原海绵组;c:人碱性成纤维细胞生长因子组;
d:人碱性成纤维细胞生长因子缓释海绵组;e:假手术组

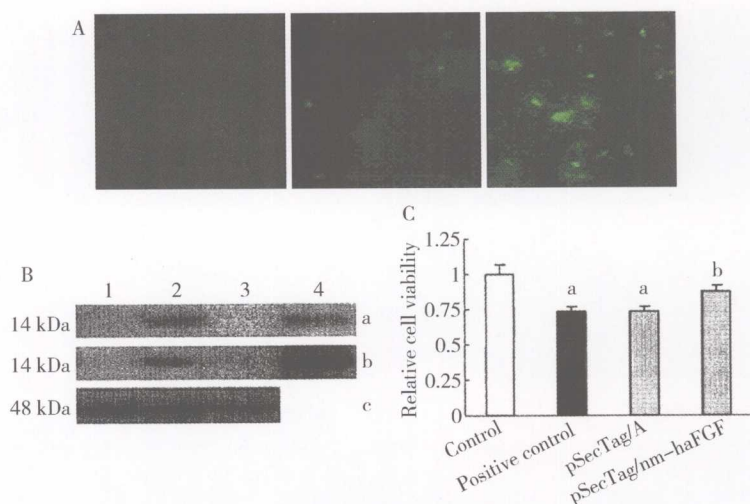


彩图四(见 267 页)

Fig. 3 Cerebral histopathologica changes in 3 groups

Stained with HE; upper, magnification of $\times 100$; lower, magnification of $\times 400$

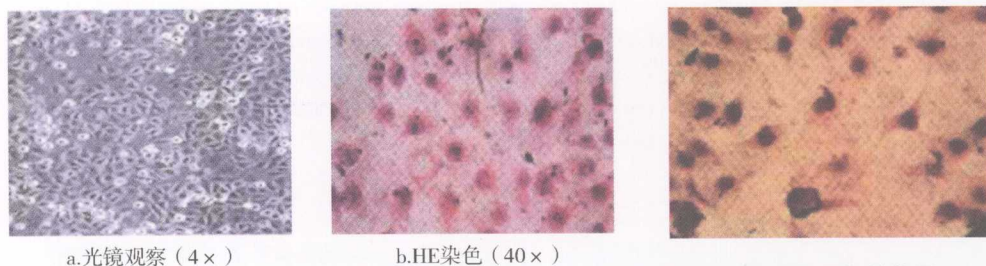
(a) In group A, the neurons had normal sizes, clear contour and axons, intact organelles; (b) In group B, the neurons were shrunken and deeply stained, had unclear structures of organelles and significantly increased gap around neurons and microvessels; (c) In group C, the neurons had nearly normal sizes, slightly blurry contour and organelles, less increased gap around neurons and microvessels



彩图五(见 368 页)

Fig. 1 Genetically overexpressing nm-haFGF in cultured cardiomyocytes and protective effect on H_2O_2 cytotoxicity

Primary neonatal cardiomyocytes transfected with the nm-haFGF gene were cultured for 4 h, and fluorescent staining (A) was performed for control cells (a), pSecTag/A-transfected cells (b), and pSecTag/nm-haFGF transfected cells (c). Cellular proteins collected from cultured cardiomyocytes (Row a, Panel B) and secreted proteins collected from the culture medium (Row b, Panel B) were examined for FGF by Western blot analysis (B). Since there was undetectable actin in the culture medium, Row c represents actin expression in total cellular proteins (Row a). Lanes 1, 2, and 3: Cell lysates from control, pSecTag/nm-haFGF-transfected, and pSecTag/A-transfected cardiomyocytes. Lane 4: Positive control (nm-haFGF). After exposure to $70 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 for 4 h, the cellular viability of cultured cardiomyocytes was evaluated by MTT assay (C). In Panel C, positive control indicates the group of cardiomyocytes exposed to $70 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 for 4 h without transfection. Data were obtained from three separate experiments with duplicate samples ($n = 6$) and were presented as mean $\pm$ SD. ^a $P < 0.05$ versus control. ^b $P < 0.05$ versus positive control



彩图六
(见 377 页)

图 1 HEC 的形态

图 2 HECVII因子相关抗原 SABC (40 $\times$)

彩图七
(见 496 页)

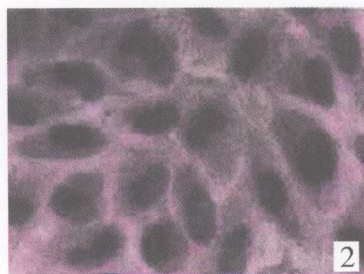
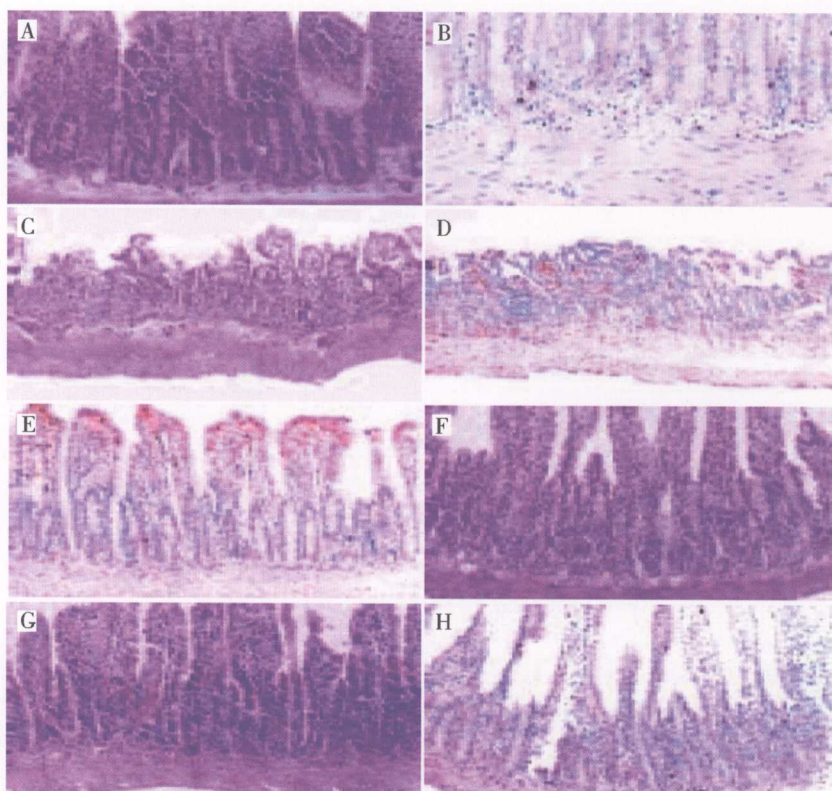


Fig. 2 Corneal endothelial cell dyed by HE ($\times 400$)



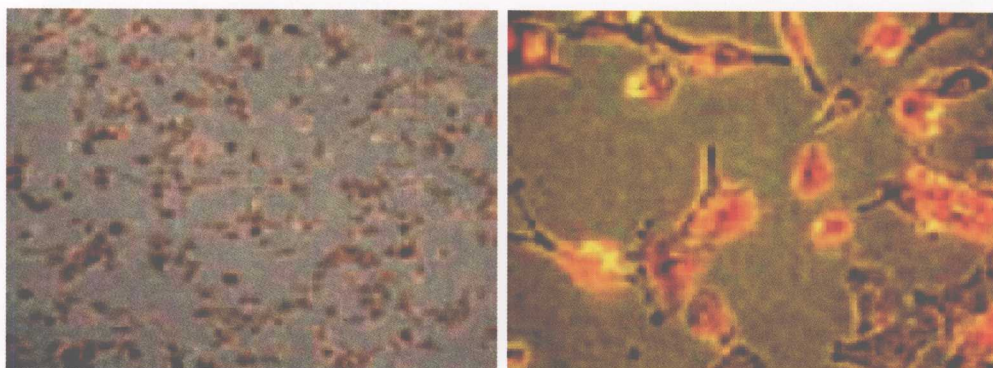
Fig. 3 Identification of endothelial cells by immunocytochemistry assay ($\times 400$)



彩图八(见 540 页)

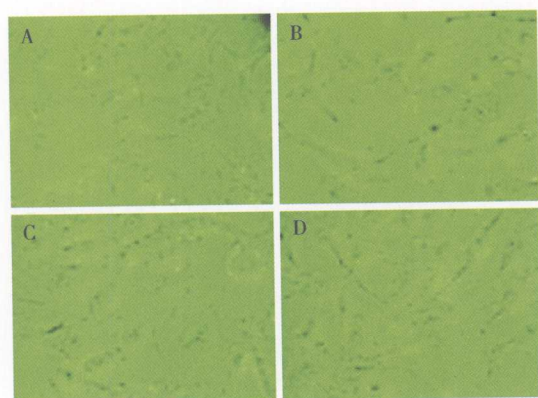
Fig. 4 Morphological examination and immunohistochemical detection and quantification of apoptosis based on the labeling of DNA strand breaks (Roche Applied Science, Germany)

A: Marked epithelial separation from the basement, subepithelial edema, haemorrhage, erosion;
 B: Immunohistochemical detection and quantification of apoptosis in normal epithelium entericum;
 C: Necrosis in I/R plus saline control group; E and G: Tissue damage reduction in both aFGF and aFGF28-154 treated groups;
 D: Increased number of apoptotic cells in epithelium entericum in rats treated with saline; F and H: Significant reduction of apoptotic cells in epithelium entericum in rats treated with both aFGF and aFGF28-154



彩图九(见 550 页)

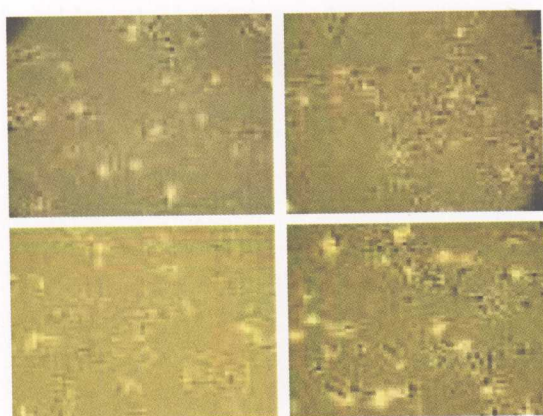
Fig.1 Cardiac myocytes identified by immunocytochemical assay



彩图十(见 550 页)

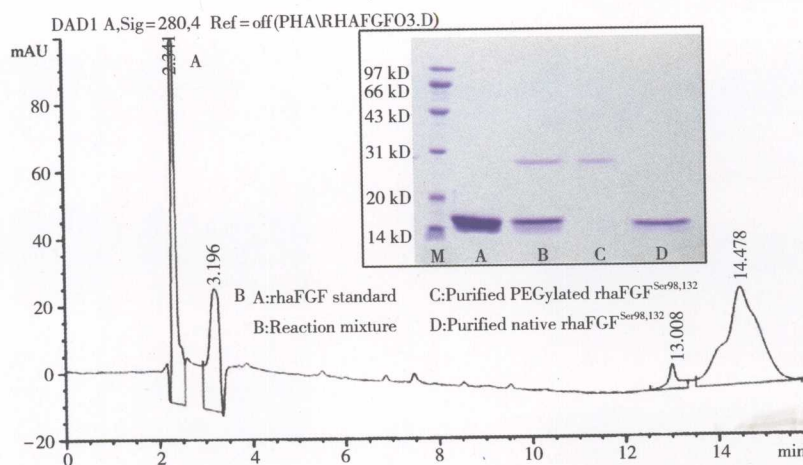
Fig. 2 Cellular morphological change of cardiomyocytes after exposure to different concentrations of hydrogen peroxide for 4 h

A: Normal control group(magnification $\times 200$);
B: cardiomyocytes exposure to 1.25 mmol/L H_2O_2 (magnification $\times 200$);
C: cardiomyocytes exposure to 2.5 mmol/L H_2O_2 (magnification $\times 200$);
D: cardiomyocytes exposure to 5 mmol/L H_2O_2 (magnification $\times 200$).



彩图十一(见 551 页)

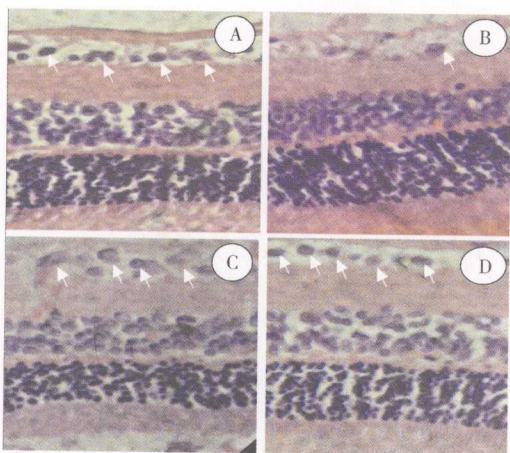
Fig. 4 Anti-apoptosis effect of nm-haFGF on cardiomyocytes injured by H_2O_2



彩图十二(见 577 页)

Fig. 3 HPLC chromatography and SDS-PAGE analysis (inset) of HPLC purified PEGylated rhaFGF^{Ser98,132} and the native rhaFGF^{Ser98,132}

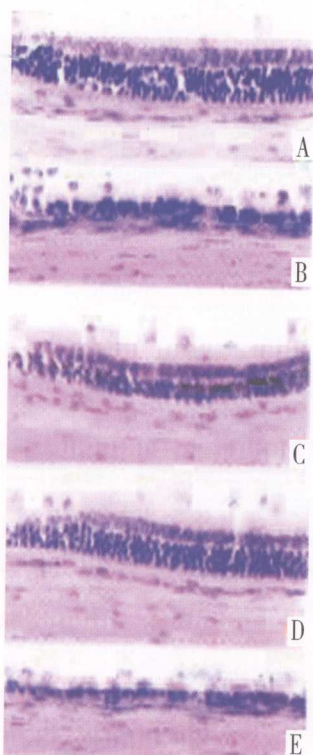
In the panel of inset, lane M, A, B, C and D indicate the molecular makers, rhaFGF standard, reaction mixture (including PEGylated rhaFGF^{Ser98,132}, non-PEGylated native rhaFGF^{Ser98,132}, and 5 kDa PEG), purified PEGylated rhaFGF^{Ser98,132}, and purified native rhaFGF^{Ser98,132}.



彩图十三(见 580 页)

Fig. 6 Retinal morphological changes

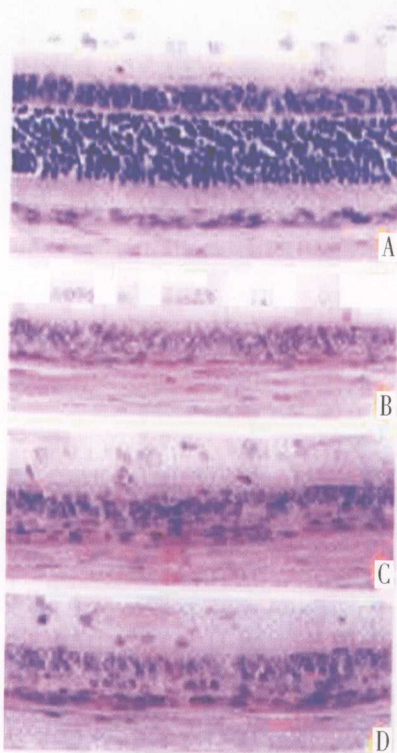
Retinal morphological changes were examined at 48 h after I/R in control (A), vehicle (saline)-treated I/R group as positive control (B), native rhaFGF^{98,132}-treated I/R group (C), and PEGylated rhaFGF^{98,132}-treated I/R group (D). Original magnification of these images were taken at $\times 400$. Arrows indicate RGCs. Quantitative analysis of RGCs in different groups was given in the panel (E). Data in the panel (E) were obtained from counting five random fields in each of the two slides from each rat and six rats for each group. ^a $P < 0.05$ vs control; ^b $P < 0.05$ vs saline-treated I/R group (I/R)



彩图十四(见 594 页)

Fig. 1 Protective effect of nmhaFGF by intravitreal injection on peripheral retina after N-methyl-N-nitrosourea (MNU) treatment for 7 d in rats (HE $\times 400$)

A: Normal control; B: Model control; C: nmhaFGF 1.25 μg ; D: nmhaFGF 2.5 μg ; E: nmhaFGF 5 μg



彩图十五(见 594 页)

Fig.2 Protective effect of nmhaFGF by intravitreal injection on central retina after MNU treatment for 7 d in rats (HE $\times 400$)

A: Normal control; B: Model control; C: nmhaFGF 1.25 μg ; D: nmhaFGF 2.5 μg

目 录

开篇 FGFs 开发和应用

外用重组成纤维细胞生长因子(rFGF)临床等方面的开发和应用 1

生长因子的新面孔 —— 国家十五重大科技攻关项目概览 3

第 1 篇 FGFs 综述

酸性成纤维细胞生长因子的生物学特性 6

Biochemical characteristics of human acid fibroblast growth factor on mitogenesis 11

人 FGF-1 对免疫系统的影响 29

碱性成纤维细胞生长因子对骨髓间质干细胞的作用 34

酸性成纤维细胞生长因子非促分裂活性的研究进展 40

FGF-1 及其突变体的研究进展 47

酸性成纤维细胞生长因子的神经保护作用 54

成纤维细胞生长因子应用于冠心病治疗的研究现状 58

成纤维细胞生长因子(FGF)对角膜病治疗研究进展 65

第 2 篇 FGFs 及其改构体对细胞增殖、凋亡作用及其他

Effects of basic fibroblast growth factor on radiation-induced proliferation inhibition and apoptosis in thymocytes and splenocytes 69

碱性成纤维细胞生长因子对小鼠脾脏细胞凋亡的抑制作用 76

碱性成纤维细胞生长因子对辐射诱导的小鼠胸腺细胞凋亡的抑制作用 81

EGF、bFGF 和 TGF- β 1 对培养鸡角膜缘上皮细胞增殖性的影响 85

非促分裂酸性成纤维细胞生长因子抑制由放线菌素 D 诱导的 Balb/c 3T3 细胞的凋亡 89

FGF-1 改构体对小鼠脾细胞增殖与凋亡的影响 93

改构酸性成纤维细胞生长因子对小鼠胸腺细胞凋亡的影响 100

nmhaFGF 对人乳腺癌细胞增殖的影响及相关机制 106

haFGF 突变体促细胞增殖活性降低及其机制 112

haFGF 和 nmhaFGF 过表达对乳腺肿瘤细胞增殖及 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的影响 117

Knocked-out nuclear translocation sequence does not lost completely mitogenic activity of aFGF 125

人类重组酸性成纤维细胞生长因子对细胞增殖和凋亡的影响 140

aFGF 核转位序列的敲除后蛋白结构稳定性及促分裂活性的变化 146

核转位序列敲除的人类 aFGF 对 NIH3T3 细胞的促分裂活性及其机制 151

人类重组酸性成纤维细胞生长因子对新生大鼠生长发育的影响 157

人类重组型酸性成纤维细胞生长因子促分裂效应及其信号转导途径的推测 162

非促有丝分裂型人酸性成纤维细胞生长因子的受体结合特性及对 MAPK 信号通路

的影响·····	168
第3篇 FGFs 表达、纯化及其他	
人酸性成纤维细胞生长因子的高效表达·····	173
aFGF 荧光分子探针基因的合成及其表达·····	178
人酸性成纤维细胞生长因子 cDNA 的表达·····	184
抗菌肽和人酸性成纤维细胞生长因子融合蛋白在毕赤酵母中的表达及其活性 鉴定·····	189
一种抗菌肽和 aFGF 融合蛋白的构建和表达·····	196
含 aFGF 基因的植物表达载体的构建及其对根瘤农杆菌的转化·····	203
表达酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)工程菌的培养及 aFGF 的纯化·····	208
噬菌体展示技术筛选 bFGF 模拟短肽·····	211
碱性成纤维细胞生长因子生物活性的 ELISA 检测·····	217
重组人酸性成纤维细胞生长因子的稳定性研究·····	222
细胞活能 bFGF 稳定性的研究·····	226
重组碱性成纤维细胞生长因子的生化分析·····	228
第4篇 FGFs 对神经的保护和治疗作用	
细胞生长肽(bFGF)能促进神经再生与修复·····	229
碱性成纤维细胞生长因子治疗脑梗死的应用研究·····	230
基因重组碱性成纤维细胞生长因子对大鼠视网膜神经节细胞的影响·····	233
重组牛碱性成纤维细胞生长因子治疗视神经损伤的药理学研究·····	237
碱性成纤维生长因子对大鼠视神经损伤的保护作用·····	241
bFGF 生物海绵对脊髓损伤神经保护作用的研究·····	245
基因重组碱性成纤维细胞生长因子对大鼠脊髓损伤神经保护作用·····	250
碱性成纤维细胞生长因子在大鼠坐骨神经损伤修复中的作用·····	254
人碱性成纤维细胞生长因子缓释海绵促进大鼠外周神经损伤的修复·····	258
Basic fibroblast growth factor alleviates brain injury following global ischemia reperfusion in rabbits·····	264
碱性成纤维细胞生长因子对兔全脑缺血再灌注损伤的保护作用·····	273
碱性成纤维细胞生长因子对脑创伤后机体免疫功能的影响·····	278
碱性成纤维细胞生长因子对兔全脑缺血再灌注后血清炎症因子的影响·····	279
碱性成纤维细胞生长因子保护兔全脑缺血再灌流损伤的研究·····	283
酸性成纤维细胞生长因子修复脑血管病后神经细胞损伤机制·····	288
第5篇 FGFs 对皮肤及创伤修复作用	
Ischemia and reperfusion impair the gene expression of endogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) in rat skeletal muscle·····	292
基因重组 bFGF 的药效学研究·····	302
细胞活能 bFGF 在整形美容的实验研究及临床应用·····	305
bFGF 促进大鼠创伤修复的实验研究·····	308
碱性成纤维细胞生长因子促创面修复的实验研究·····	310
基因重组碱性成纤维细胞生长因子治疗慢性创面效果观察·····	312

碱性成纤维细胞生长因子促进小型猪创面修复的剂量与效应关系研究·····	314
基因重组牛碱性成纤维细胞生长因子促进创面愈合的临床研究·····	318
重组牛碱性成纤维细胞生长因子治疗Ⅱ度烧伤的临床疗效·····	323
bFGF 与皮肤创面修复过程中瘢痕形成的关系研究·····	326
碱性成纤维细胞生长因子治疗创伤性疾病 485 例·····	328
重组人酸性成纤维细胞生长因子皮肤用药的药代动力学·····	330
重组人酸性成纤维细胞生长因子的生殖毒性·····	335
重组人酸性成纤维细胞生长因子的遗传毒性·····	339
重组人酸性成纤维细胞生长因子促进创伤愈合的研究·····	343
重组人酸性成纤维细胞生长因子Ⅰ期临床研究·····	347
重组人酸性成纤维细胞生长因子皮肤用药的长期毒性研究·····	351
重组人酸性成纤维细胞生长因子促进大鼠烫伤愈合的研究·····	357
FGF/胶原蛋白复合海绵的皮内刺激试验和短期肌肉植入试验·····	361
第 6 篇 FGFs 对心肾的保护和治疗作用	
Cardiovascular protection of nonmitogenic human acidic fibroblast growth factor from oxidative damage in vitro and in vivo·····	365
酸性成纤维细胞生长因子对人脐静脉血管内皮细胞一氧化氮生成的影响·····	376
重组人酸性成纤维生长因子对离体小鼠胸主动脉的弱缩血管作用及其机制·····	380
aFGF 对离体大鼠缺氧/再灌损伤心脏的保护作用·····	383
酸性成纤维细胞生长因子对颈动脉窦损伤的保护及量效关系的探讨·····	388
碱性成纤维细胞生长因子对大鼠动脉血栓形成的影响·····	392
bFGF 对庆大霉素及缺血性肾损伤的保护作用·····	395
碱性成纤维细胞生长因子对庆大霉素肾毒性防治研究中细胞超微结构的影响·····	401
碱性成纤维细胞生长因子对庆大霉素肾毒性治疗作用的形态学研究·····	406
酸性成纤维细胞生长因子对大鼠肾缺血再灌流损伤的保护作用·····	410
酸性成纤维细胞生长因子对顺铂肾损害保护作用的实验研究·····	415
第 7 篇 FGFs 对其他疾病的治疗作用	
应用 bFGF 胶原缓释海绵修复髓室底穿孔的疗效·····	420
bFGF 胶原缓释海绵在根尖诱导成形术中的应用·····	424
bFGF 胶原蛋白海绵对宫颈糜烂的治疗作用·····	428
重组人酸性成纤维细胞生长因子复方喷剂治疗宫颈糜烂的临床研究·····	430
第 8 篇 FGFs 改构体表达、纯化及其他	
Site-directed chemical modification of recombinant human aFGF mutant with polyethylene glycol·····	434
Site-directed PEGylation of human basic fibroblast growth factor·····	438
In vitro characteristics of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres incorporating gelatin particles loading basic fibroblast growth factor·····	444
减少寡聚体形成的重组人碱性成纤维细胞生长因子的改造·····	454
Expression and purification of basic fibroblast growth factor mutant with reduced mitogenic activity·····	460

Expression and purification of a hbFGF lacking nuclear localization signal	465
Purification and modification by polyethylene glycol of a new human basic fibroblast growth factor mutant-hbFGF ^{Ser25,87,92}	470
High-level expression and purification of a nonmitogenic form of human acidic fibroblast growth factor in Escherichia coli	477
Expression and activity identification of shortened human acidic fibroblast growth factor	483
酸性成纤维细胞生长因子在培养的乳鼠心肌细胞中分泌表达及其意义	488
改构 aFGF 在角膜内皮细胞中的分泌表达及意义	494
人酸性成纤维细胞生长因子突变体表达与修饰	499
抗菌肽 AD 与 haFGF 融合基因的合成及其表达	504
一种新型天蚕素杂合肽 AD 和 aFGF 突变体融合蛋白 S 的构建及表达	509
人碱性成纤维细胞生长因子突变体的高效表达	515
重组人碱性成纤维细胞生长因子突变体[Ser ^{69,87}]的表达、纯化及其稳定性研究	520
重组人酸性成纤维细胞生长因子改构体发酵的补料-分批策略研究	527
第 9 篇 FGFs 改构体对细胞损伤的保护作用	
Enhanced anti-apoptosis and gut epithelium protection function of acidic fibroblast growth factor after cancelling of its mitogenic activity	534
Protective effects of non-mitogenic human acidic fibroblast growth factor on hydrogen peroxide-induced damage to cardiomyocytes in vitro	546
改构体 aFGF 对颈动脉窦损伤的保护作用	555
改构型酸性成纤维细胞生长因子对离体大鼠缺氧再灌注心脏的保护作用	559
非促分裂型 haFGF 对 H ₂ O ₂ 损伤心肌细胞的保护作用研究	564
maFGF 及 aFGF 对培养大鼠心肌缺氧/复氧后细胞凋亡的影响	571
Enhanced protection of modified human acidic fibroblast growth factor with polyethylene glycol against ischemia/reperfusion-induced retinal damage in rats	572
改构型酸性成纤维细胞生长因子对大鼠肾缺血/再灌注损伤的保护作用	587
非促分裂 haFGF 对 MNU 所致大鼠视网膜损伤的保护作用	592
nmhaFGF 对 SD 大鼠缺血再灌注视网膜 SOD、MDA、NO 的影响	597
结语篇 感谢与期望	600