

细胞生长调节因子

吴克复 编著



Q28
WK.F

科学出版社

内 容 简 介

本书是以 R. Baserga 等编著的《组织生长因子》和日本组织培养学会编的《细胞生长因子》二书为主要参考资料, 加上近年来的有关文献资料及编著者的工作结果编写而成。全书共分五章, 较系统地论述了细胞生长因子, 并对生长因子与肿瘤的关系, 以及作为细胞生长因子研究的实际应用的一个方面的无血清培养也作了介绍。同时还讨论了日益受到重视的细胞生长抑制因子。可供细胞生物学、分子生物学、发育生物学、肿瘤学和细胞培养的研究工作者及高等院校有关专业的师生阅读。对临床、畜牧、兽医等方面的工作者也很有参考价值。

细胞生长调节因子

吴克复 编著

责任编辑 姜梦兰

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1988 年 9 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1988 年 9 月第一次印刷 印张: 4 1/2

印数: 0001—2,580 字数: 95,000

ISBN 7-03-000530-9/Q·99

定价: 2.30 元

序 言

细胞生长因子具有对细胞生长和分化的调节作用,是近代生物学和医学研究的一个重要领域。国外对生长调节因子的研究已有三十余年的历史,有些生长因子的提纯、化学结构和生物学效应已研究得比较清楚;有的还在继续寻找和研究。1986年度的诺贝尔医学和生理学奖金授予研究生长因子的两位杰出科学家 Levi-Montalcini 和 S. Cohen,表明对于细胞生长调节因子的研究已经达到了相当高的水平,具有重大的理论意义和实用价值,引起了国际学术界的重视。

细胞生长调节因子的研究有助于阐明胚胎发育、组织和器官发生等生物学基本问题,并对肿瘤、创伤愈合、血管硬化等医学基本理论问题的研究有应用价值;在畜牧业生产和临床实践方面也将展现美好的前景。

有关细胞生长调节因子的文献很多,国内这方面的研究还少,有关书籍也缺乏。作者收集有关资料和自己工作中的结果,编写成《细胞生长调节因子》一书,对十几种生长因子和抑制因子作较系统的阐述,并介绍了目前细胞生长调节因子的研究动向。对从事细胞生长调节因子的医学、生物学,尤其是肿瘤、内分泌、畜牧等方面的研究和教学人员是一本很好的参考读物。

陈文杰

中国医学科学院
血液学研究所

前 言

多细胞生物不是细胞的简单堆砌，而是形成了一个细胞间相互依赖、相互制约的整体。有人称它为“细胞社会”。Virchow 称机体为“细胞王国”。总之，成了一个高度复杂的系统。除了有结构和功能上分化了的细胞组成的组织、器官外，还有各种调控系统。生物学的发展已经阐明了许多不同水平的机体调控系统，如神经系统和内分泌系统。现代生物学已进入分子和细胞生物学时代。三十多年来生物学和化学工作者研究了许多有调控作用的物质，并力图从分子和细胞水平阐明其机制。这些物质大多是蛋白质或多肽，称细胞生长调节因子。因为它们主要对细胞的生长、繁殖和分化起调控作用。对它们的深入研究，有助于阐明胚胎发育、组织和器官发生、肿瘤、创伤愈合等基本生物学问题和重大的医学基本理论问题。它们在工农业生产和临床实践方面的应用也有着广阔的前景。

目前细胞生长调节因子的研究是个十分活跃的领域，进展迅速。1986 年度的诺贝尔医学奖就是授予神经生长因子 (NGF) 和上皮生长因子 (EGF) 的主要研究者 Levi-Montalcini, R. 和 Cohen, S.。他们的贡献不仅在于发现和阐明了这两类生长因子，更重要的是开拓了细胞生长调节因子这一研究领域。

最近肿瘤免疫疗法再度兴起，比十年前的免疫疗法有了更深、更广泛的内容和含意，统称为生物反应调节剂 (biological response modifiers, BRM) (见附表 3)。不到一年时间就召开了两次国际会议讨论 BRM，肯定了已能应用于临床

的一些 BRM 的治疗效果,展望了应用前景,前途是乐观的。作为 BRM 重要组成部分的细胞生长调节因子,在临床治疗中的应用不仅限于治疗肿瘤,还可以期望对于其他疾病的治疗和阐明中医药的调理机制等方面也作出应有的贡献。

这本小册子以 Baserga, R. 等编著的“组织生长因子”和日本组织培养学会编的“细胞成长因子”二书为主要参考资料,加上收集到的有关资料和本人的工作结果,奉献给读者。希望对有机会涉及此领域的读者能起到抛砖引玉的作用。

承薛社普、潘琼婧两位教授认真审阅原稿,热情支持、鼓励,提出宝贵意见;杨崇礼教授关怀并帮助收集资料;尤盛国副教授对肿瘤基因及其产物方面提供宝贵意见;陈文杰所长在百忙中抽时间评阅本书并写序言,谨致谢意!

笔者才疏学浅,错误之处难免,恳请读者批评指正。

目 录

前言	(vii)
第一章 引论	(1)
第一节 细胞生长因子的定义和研究现状	(1)
第二节 细胞生长与繁殖	(4)
第三节 细胞生长因子测定中的方法学问题	(7)
一、因子作用的特异性	(7)
二、细胞培养系统的选择	(9)
三、细胞生长因子作用效应指标的选择	(10)
四、对细胞生长因子体外作用的评价	(12)
第二章 细胞生长刺激因子	(13)
第一节 神经生长因子	(13)
一、NGF 分子的多形性	(14)
二、NGF 酶原及其酶的性质	(17)
三、NGF 的分布	(18)
四、NGF 的生物学活性	(18)
五、NGF 的作用机制	(20)
六、NGF 的测定	(20)
第二节 上皮生长因子	(22)
一、EGF 的理化性质	(22)
二、EGF 的分布及生物学作用	(25)
三、EGF 受体及其作用机制	(28)
第三节 成纤维细胞生长因子	(30)
一、FGF 的生物学作用	(31)
二、FGF 的制备及理化性质	(33)
三、FGF 的测定	(34)
四、脑 FGF 和酸性 FGF	(35)

第四节	血小板产生的生长因子	(36)
一、	PDGF 的性质	(37)
二、	PDGF 的生物学作用	(38)
三、	PDGF 的受体及作用机制	(40)
四、	PDGF 的制备和测定	(42)
五、	血小板碱性蛋白 (PBP)	(43)
六、	结缔组织活性多肽 (CTAP-III)	(44)
第五节	生长调节素	(44)
一、	Sm 的理化性质	(45)
二、	Sm 的体外作用	(46)
三、	Sm 的体内作用	(47)
四、	Sm 的作用机制	(48)
五、	Sm 的测定	(49)
第六节	糖皮质激素对细胞繁殖的调节	(49)
第七节	具有生长因子活性的蛋白酶类	(52)
一、	蛋白酶类刺激的 DNA 合成和细胞分裂	(53)
二、	蛋白酶对其他生长因子作用的影响	(54)
三、	其他生长因子的蛋白酶活性	(55)
四、	蛋白酶刺激细胞增殖的机制	(55)
第八节	软骨细胞的生长因子	(56)
第九节	内皮细胞生长因子和内皮细胞产生的生长因子	(58)
第十节	眼产生的生长因子	(60)
第十一节	肾生长因子	(60)
第十二节	肝细胞生长因子	(61)
第十三节	其他组织产生的生长因子	(62)
第十四节	刺激造血细胞的生长因子	(63)
一、	集落刺激因子	(63)
二、	血小板生成素	(67)
三、	红细胞生成素 (Ep) 和红系爆式集落促进活性 (BPA)	(68)

四、淋巴细胞生长因子	(69)
第三章 细胞生长抑制因子	(79)
小引	(79)
第一节 自身负反馈调节因子	(81)
第二节 近程负反馈调节因子	(85)
第三节 远程负反馈调节因子	(91)
第四章 肿瘤细胞产生的生长调节因子	(94)
小引	(94)
第一节 肿瘤细胞产生的生长因子	(94)
一、转化生长因子	(94)
二、肿瘤血管发生因子	(96)
三、其他肿瘤细胞产生的生长因子	(98)
四、白血病细胞产生的生长调节因子	(99)
第二节 肿瘤基因和生长因子	(101)
第三节 肿瘤细胞的自身调节机制	(102)
第五章 无血清培养	(105)
第一节 非转化细胞的生长要求	(106)
第二节 无血清培养的发展	(110)
第三节 简易无血清培养的探讨	(114)
附录	(117)
支原体污染对细胞培养的影响	(117)
附表 I 细胞生长因子一览表	(120)
附表 II 肿瘤基因及其产物一览表	(124)
附表 III 生物反应调节剂 (BRM)	(126)
参考文献	(127)

第一章 引 论

第一节 细胞生长因子的定义和研究现状

“生长因子”(growth factor)一词原指对微生物、植物、家畜等有明显刺激生长作用的微量物质。有人称为生长激素。后来“生长因子”一词被沿用到细胞培养中,按1976年由Gospodarowicz^[57]下的定义:细胞生长因子是指在体内和体外对动物细胞的生长有促进作用的物质,它们不是营养成分。

现在普遍使用的细胞生长因子的含意较十年前有了扩大,实际上也包括了负性细胞生长因子(negative growth factor),即细胞生长抑制因子,所以本书用细胞生长调节因子一词来表达现在广义的细胞生长因子(为简便,以下简称生长因子)。近年来的研究证明许多生长因子是有特异性受体的。看来在定义上还应加上“在靶细胞上有特异性受体”,以区别于微量的营养物质。

自从 Sato (1976)^[139] 开始用无血清培养研究激素以来,无血清培养得到迅速发展,推动了生长因子的研究。现在激素、细胞间基质、结合蛋白(载体蛋白)和典型的生长因子之间已经没有清晰的界限。所谓典型的生长因子,也即本书讨论的对象,是目前多数作者承认的生长因子,它们大多数还只有体外实验的结果,其体内意义则有待深入研究。其中有些甚至尚未分离提纯,因为大多数生长因子量微、活性高,要作化学提纯是相当困难的。

Todoaro^[162] 从小鼠肉瘤病毒转化的细胞产生自身增殖的

TGF(SGF), 与其 EGF 受体结合 (TGF- β 与 EGF 有共同受体, 详见 TGF 节), 提出自身激素学说。至今该学说已被广泛接受, 将激素和生长因子的概念统一了起来, 推动了生长因子研究的进展。经典的激素 (endocrine), 分泌它的细胞与其靶细胞相距很远, 要通过血液循环才能运到 (图 H, a), 故称为远程激素, 实际上有些生长因子的生成细胞与靶细胞也相距很远, 也属这一类。

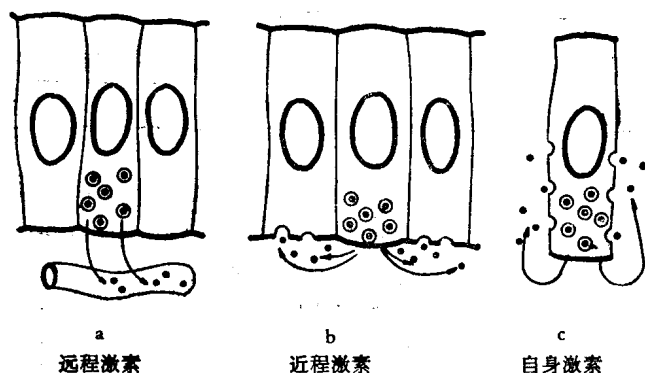


图 1-1 激素概念的扩展(引自[180])

有些生长因子的生成细胞与靶细胞相离很近, 不需通过血流即可起作用(图 1-1, b), 称为近程激素 (paracrine)。

细胞产生的因子作用于自身的相应受体, 反馈调节其生长增殖, 称为自身激素 (autocrine) (图 1-1, c)。这种自身激素也可以是负反馈, 即自我抑制(详见第四章)。

对生长因子作用机制的研究揭示了不同因子可通过不同途径调控细胞生长繁殖。目前报道的生长因子均为蛋白质或多肽。但是, 有许多经典的激素是非蛋白质类的。随着研究工作的深入, 可能会发现许多非蛋白质类的生长因子。

目前对于生长因子的研究, 除寻找新的生长因子外, 主要

有下述五方面^[100]。

1. 分子的类比。从中找出分子结构、组成与生物活性的关系。例如对胰岛素→胰岛素前体→[IGF-I]→[IGF-II]→松弛素的研究。

2. 作用机制的研究：i 受体——内在化——进入调节机制；ii 蛋白激酶的激活——膜蛋白的磷酸化；iii 与病毒转化细胞产物的竞争。

3. 在细胞周期中的作用点的研究：i PDGF, FGF 和 Ca^{++} 与细胞增殖能力的关系；ii 生长调节素对各细胞周期期间连接的作用，有的生长因子（如 PDGF）的主要作用之一就是阻止细胞进入 G_0 期；iii 生长因子与细胞老化的关系。

4. 作用的细胞特异性研究：i 相对的非特异性——EGF, FGF, PDGF, IGF；ii 高度特异性——造血因子；iii 种属特异性。

5. 对分化的作用：i 诱导分化——EP 等；ii 抑制分化——EGF 对角质细胞。

可见生长因子的研究涉及了分子生物学和细胞生物学的许多领域和方法。需要多学科的合作。吸取有关学科的成就和新方法，才能迅速突破。我国在生长因子研究方面已开展了一些工作，与国际水平相比尚有距离，有待赶上。

无血清培养是生长因子研究在方法方面的基础，也是实际应用的结果。目前国内许多单位已开展这方面的课题。估计会找出适合我国国情的无血清培养液，为疫苗生产和科研服务。

生长因子的检测应用于临床，能辅助有关疾病的诊断。尤其是肿瘤细胞产生的生长因子的检测作为癌症早期诊断的方法，是值得探索和研究的方

应用生长因子治疗疾病，由于遗传工程的发展已有实现

可能,但离真正应用尚有较大距离,需研究解决许多问题。

在畜牧业上应用生长因子是有广阔前景的,例如用 EGF 增加羊毛产量等。

第二节 细胞生长与繁殖

细胞生长调节因子的研究主要是通过组织培养进行的。本书所述内容,除特别指出的外,均系由组织培养实验所得的结果。对常用的术语先作下述定义。

正常细胞仅指与健康的整体动物体内没有任何差别的细胞。如鉴定过的二倍体细胞株。

转化细胞指表现有恶性性质的细胞。常用的指标有:移植到裸鼠或免疫抑制动物体内的成瘤率;接触性抑制的丧失;或突破接触抑制的约束而重叠多层生长和能在琼脂中生长等。

非转化细胞是指没有明显恶性性质的细胞。实际上是指正常细胞和转化细胞之间的中间过渡型。它也包括已出现染色体异常,但仍无转化细胞性状的细胞系,例如小鼠 3T3 细胞系是非整倍体的,能持续生长繁殖,但仍有接触性抑制和贴壁生长依赖性质。一经接触肿瘤病毒即可转化。正常 3T3 细胞接种裸鼠皮下不形成肿瘤;若先将 3T3 细胞接触小玻璃珠再接种动物即可形成瘤块。现在清楚,这是因为正常细胞转化为恶性细胞(转化细胞),需要同时至少有两个肿瘤基因插入细胞基因组^[9]。能长期持续传代的(称“不死”的,immortalized)细胞培养若仅有一个肿瘤基因,则不表现转化性质的主要性质,再转染一个或多个肿瘤基因即可能完全恶化,呈恶性细胞的表型。

严格讲来,我们实验室中常用的细胞培养,除经鉴定的正常二倍体细胞株和肿瘤细胞系外,不呈现明显转化性状的细胞培养物属于非转化细胞之列。许多生长因子的性质是经过非转化细胞的实验体系研究出来的。本节所指的细胞生存和生长要求也主要由非转化细胞研究出来的。

细胞存活能力指维持细胞代谢和结构的完整,不涉及细胞增殖活动。

存活需求是指能维持细胞充分活力的最低标准的环境状态。一般认为非转化细胞的存活需求比生长需求低得多。在存活需求环境中细胞完全静止不进入细胞周期。存活需求随不同细胞而异。可维持的时间也不同。例如成纤维细胞在仅含葡萄糖和少数盐类的 Hank 氏液中可存活数天,成熟粒细胞在血细胞保存液中连一天也不能存活。

生长需求含意甚广。泛指对细胞繁殖有积极效应的任何环境条件。除营养物和调节细胞生长的各种因子外,还包括环境的理化因素,如温度、表面性质、pH 值、离子强度、渗透压及各因素间的定量平衡关系。

营养物严格限于能进入细胞而被利用于生物合成或能量代谢的物质,包括起催化作用的化学物质(构成酶、辅酶或辅基的物质)。

繁殖与增殖是同义词。主要强调细胞数目的增加,当然也伴有质量和体积的变化。

细胞生长通常是指培养细胞总的质量和体积的增加,可以伴有细胞数的增加;也可以表示细胞大小(体积和质量)的增加而无细胞数的变化。

细胞周期,繁殖旺盛的细胞反复进入四个时期:有丝分裂期(M)、间期 1(G_1)、DNA 合成期(S)和间期 2(G_2)。环境条件的变化不利于细胞繁殖时,细胞转入静止的 G_0 样

时期,称 G_0 期(休止期)。

分裂素专指能刺激静止细胞离开 G_0 期进入细胞周期的物质。虽然分裂素的原意是刺激有丝分裂,但实际上是用 DNA 的合成来衡量对分裂素的反应,而不是用细胞分裂数。分裂素引起的是短期反应,不考虑对长期培养细胞的影响。

关于细胞生长繁殖过程的一般规律,早在 1971 年 Mitchison 就酵母细胞的生长繁殖提出如下假设: 细胞生长必需得到两个信号: 细胞大小倍增的讯号和 DNA 复制的讯号。1976 年 Baserga 将此假设推广到哺乳动物细胞。进一步归纳为下述三点。

1. 生长细胞体积倍增。当细胞从一个细胞周期进入下一个细胞周期时必须倍增其体积, 否则细胞随着分裂次数的增加体积将越来越小,甚至消失。事实上,由 G_0 期至 M 期细胞体积确是逐渐增大的。利用这一事实可制备同步化的细胞。rRNA 的合成可用作细胞增大的指标。

2. 生长细胞复制 DNA (确切说是遗传物质)。细胞进入细胞周期后的生长繁殖过程必须有 DNA 复制,也有蛋白质的含量变化。所以 DNA 合成可以作为细胞增殖的指标(下详)。

表 1-1 血清和 DNA 病毒对细胞 RNA 和 DNA 的效应^[6]

	对正常细胞		细胞 RNA 的 积累	对 G_0 期变异细胞 (在不适宜温度)	
	rRNA 合成	DNA 合成		RNA 合成	DNA 合成
血清生长因子	+	+	+	+	-
PDGF	+	-	+	未测	未测
SV40-T 抗原	+	+	+	未测	+
腺病毒 2 型	-	+	-	-	+

3. 细胞体积倍增和 DNA 复制可以单独进行,也可以同时发生。这个假设可以用实验证实: Ross 等^[6]的工作说明,细胞进入 S 期至少需要有两个信号启动它。第一个信号来自 PDGF, 它使细胞准备启动 DNA 的合成(但还不能进入 S 期),第二个信号来自去掉血小板的血浆,它的作用是在 PDGF 参与下使细胞进入 S 期。亦即细胞并不是很轻易地能进入 DNA 合成期的。表 1-1 给出的资料说明 rRNA (细胞增大指标)的合成和 DNA 合成(细胞增殖指标)是可以分别地,在有些情况下也可以同时进行的。

对于细胞的正常生长繁殖需要有两类信号:一个使细胞体积倍增,一个使 DNA 复制。PDGF 仅给第一类信号;腺病毒仅给第二类信号;SV40T 抗原则两类信号都给;而去血小板血浆加上 PDGF 诱生的细胞因子(产物)可给出使 DNA 复制的信号。

第三节 细胞生长因子测定中的方法学问题

细胞生长因子是微量的高活性物质,主要用细胞培养测定活性,因此,必须认真考虑一些方法学问题。抑制因子之所以发展较为缓慢,主要原因之一就是缺乏特异的检测方法。

一、因子作用的特异性

细胞培养体系本身就是个十分敏感的系统。细胞生长调节因子活性的指标,最常用的还是细胞数和 DNA 合成(通常用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率为指标)。要得到准确的结果,首先必须保证细胞培养体系的完美无缺。

非转化细胞的正常生长需求可归纳如下。

1. 维持合适的生理环境,包括温度、主要的无机盐离子的浓度、pH、渗透压、缓冲容量、氧化还原势、氧和二氧化碳分压都要在生理范围内。

2. 供给足够的生物合成、能量代谢和生物催化所需的所有营养物,包括微量元素。

3. 容器表面性质要适宜于细胞附着和分布,对于细胞没有毒性。

4. 在传代过程中设法将细胞损伤减少到最低限度,并加某些物质中和细胞分散剂的作用或消除其作用。

5. 要用激素、微量元素和脂质的适当载体,以便恰当地供给这些成分而无毒性。

6. 要适当的细胞附着因子(仅限于贴壁细胞)。

7. 要有适量的细胞生长调节因子。

8. 所有营养物、离子、激素和生长调节因子之间的精细的量的平衡。

9. 培液的各种成分与培养环境之间的复杂调节性相互作用,这种作用的合适与否对细胞培养的质量有很大影响。

在发达国家细胞培养所需的所有器皿、培液、血清均已商品化,即全部工业化生产。只要严格按照操作规程,不难做到上述要求。但是,就我国目前实验条件而言,必须有意识地注意达到上述要求。否则,实验往往失败在细胞培养未达到所需的要求上。

在排除了细胞培养条件造成的非特异性影响后,还必须排除细胞代谢产物的影响。例如氨和乳酸对许多细胞有抑制生长的作用。在实验系统中出现生长抑制现象时,可用增加更换新鲜培养液(例如每日换液一次)次数的办法排除代谢产物的作用。

在实际工作中支原体污染和细菌溶原状态是用传代细胞

作实验系统时常见的问题,它们可以给实验造成假象,干扰实验结果(详见附录)。

目前我国市售的小牛血清质量不够稳定,是影响实验结果的主要因素,必须注意。可采用分装保存,一个实验用同批血清。当然,深入研究细胞生长因子应尽量采取无血清培养,以去除未知因素对因子的干扰。

二、细胞培养系统的选择

研究或检测细胞生长调节因子必须选择敏感的靶细胞,还要选择合适的培养系统。要考虑下述几个方面。

1. 用原代培养还是用细胞株(系)? 原代培养的优点在于接近体内条件,但是细胞成分复杂,需要分离靶细胞而很难做到十分纯净。细胞株(系)则反之,优点是细胞成分纯净,缺点是与体内细胞有所不同,只能作为实验模型。大多数情况下,可用细胞株(系)进行研究或检测,有些试验还要求具有特殊性状的细胞系作靶细胞。如用依赖某种因子的细胞系检测某种因子当然是比较理想的。在没有合适的细胞株(系)时,只能用原代细胞作靶细胞。

2. 用长期培养还是短期培养? 要确证一个因子的细胞生长调节作用,理应经过多个细胞周期来证实。所以用长期培养较好。但是,细胞产物对因子可能产生什么影响,营养因素相对缺乏对因子的作用可能产生什么影响? 都应想到。所以从研究工作出发,长期培养和短期培养都应考虑,根据情况设计实验。若为常规检测因子,则长期培养费时费工,在不影响结果的前提下,力争用短期培养。我们在工作中采用培养 1—3 天后再加 $^3\text{H-TdR}$ 作掺入率测定的方法,结果较好。许多实验室采用此方案,因为这种方案的结果与长期培养的结果基本一致。只有十分重要的实验才用长期培养来核实。