

用基因工程制备牛碱性纤维细胞生长因子

Produce Cattle bFGF by Genetic Engineering Techniques

于肇英

(中国康复研究中心基础医学研究所所长,教授)

再生(regeneration)原来是动物的一种天生能力,低等动物的再生能力高于高等动物。如把一条蚯蚓切在两段,过几天,缺头的那一端会长出一个新头,缺尾的那一端会长出一条新尾,结果变成了两条蚯蚓。某些两栖类动物,尤其是有尾两栖类动物,如蝾螈,具有很强的使失去的肢体再生的能力。科学家们的研究发现,细胞受到伤害后会释放出某些化学物质,以刺激邻近细胞发生分裂,实现再生。这种物质,被称为细胞生长因子。能使神经细胞再生的叫做神经营养因子(neurotrophic factor),其中主要的有成纤维细胞生长因子、神经生长因子(NGF)、表皮生长因子、胰岛素样生长因子等。1986年,发现神经生长因子的两位科学家获得了诺贝尔医学生理学奖。

成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor, FGF)分为碱性(bFGF)与酸性(aFGF)两种。碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)是一种分子量16k道尔顿的肝素结合蛋白,是1974年Gospodarowicz从牛的垂体中分离纯化出来的碱性多肽细胞生长因子,等电点为9.6。最初,发现bFGF能引起BALB/c 3T3成纤维细胞的增殖与表型转化,以后则发现它是对包括血管内皮细胞在内的绝大多数来自中胚叶及神经外胚叶的细胞均具有刺激增殖活性的一种生长因子。它广泛存在于人类和动物的多种正常及肿瘤组织中。现在已有大量研究表明,bFGF具有广泛的生理作用,并越益显示出促使多种细胞繁殖、再生的强大威力。

bFGF的生理作用包括:

1. **神经营养作用** 在无血清培养中发现bFGF与aFGF像NGF一样,对胎鼠与新生大鼠的许多脑区的神经元有维持生存和促进生长的作用。这些脑区包括海马、嗅脑、额、顶、枕叶皮层、纹状体、隔区和丘脑。bFGF对这些不同脑区的作用

效果有高有低,对海马、嗅脑、顶叶皮层仅需1 pmol/l(10~20pg/ml)bFGF就能达到半最大效应,而对纹状体就需3 pmol/l bFGF才能起作用。bFGF除能维持小脑颗粒细胞外,还对早期胎鼠的成纤维细胞的分裂增殖有刺激作用。对间质细胞来说,aFGF的作用较弱,在与bFGF共存情况下,作用会加强。FGF的神经营养作用还明显地表现在促进中枢神经系统创伤后的修复与减少细胞死亡方面。若将从内侧隔区与Broca氏斜嗅束核投射到海马结构的这条胆碱能神经通路切断,bFGF也和NGF一样,能明显地使内侧隔区与斜嗅束核的神经元死亡数减少,而且对年轻和老年大鼠都有作用。还有人将bFGF用于切断的视神经与坐骨神经实验上,同样地观察到bFGF能保护相当一部分的神经元免于死亡。由于这种神经营养作用,国外不少学者认为bFGF对许多神经系统损伤与疾病,尤其是脑与脊髓损伤、阿尔茨海默(Alzheimer)氏病、帕金森(Parkinson)氏病、糖尿病性神经病变,以及脑卒中的临床应用将会有广阔的前景。

2. **肢体的再生** 某些两栖类动物,尤其是有尾两栖类,具有使失去附肢再生的能力。早在上世纪,就有人认为肢体的再生依赖于神经。后来Singer用实验证实,在成年蝾螈截肢后,造成去神经支配(denervation)或者在其断肢部位芽基形成前造成去神经支配,就能阻断肢体的再生。该研究结果表明神经支配对于芽基的形成至关重要。目前虽对这种神经营养过程的分子机制所知甚少,但知道这种过程受神经分泌物所调控,与神经冲动和神经递质有关。芽基细胞起源于去分化的成肌细胞或软骨细胞,bFGF对这两种细胞是很强的分裂原。注入微量bFGF即可促使去神经支配的蝾螈芽基细胞的分裂活动恢复。有人报道用0.1ng/ml浓度的bFGF就能维持离体培养的蝾螈三头肌肌胆碱酯酶的活性。若将蛙断肢,然后给予微

量的bFGF可促进再生肢体的形成。

3. 促创伤愈合及软、硬组织修复 从细胞水平看,bFGF存在于吞噬细胞中。当细胞受损伤后,bFGF就被释放出来,对促进创伤愈合起重要作用。在机体内bFGF能促进所有与创伤愈合有关的细胞迅速增殖,包括毛细血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、成肌细胞,甚至软骨细胞。同时,由于FGF能刺激成纤维细胞与成肌细胞的合成功能,所以它能促进肉芽组织的形成。在创伤情况下,bFGF对骨与软骨的生长也有促进作用。因而,bFGF对一般软组织损伤和难愈性软组织损伤如褥疮、烧伤、血管阻塞后或放疗、化疗后形成的软组织溃疡,以及骨折修复均有明显促进修复效应。同时,bFGF对脑损伤的修复也有重要意义。在实验性大鼠脑损伤后第一小时内,在脑创伤腔内就能发现有比周围脑组织中高13倍的aFGF存在,无疑这么高的aFGF与伤后胶质细胞增生、神经元继发死亡的阻止、轴突生芽以及血管新生等自我修复功能是密切相关的。最近还有报告称培养的牛主动脉内皮细胞受到毒物损伤后,bFGF将迅速释放出来,不仅能刺激内皮细胞新生,也能支持其他中胚叶细胞增生,所以FGF从各方面来看是一种强力的促创伤愈合因子。

4. 促血管新生 血管新生是一个包括毛细血管基底膜的降解、内皮细胞的迁移和增殖、修饰细胞外胶原蛋白基质的酶的合成以及小管腔形成等的复杂过程。现已证明,FGF在体外实验上对所有上述过程均有促进作用。譬如,bFGF对内皮细胞来说是一种强的趋化(chemotactic)因子和分裂原,它刺激内皮细胞产生胶原酶和血纤维蛋白溶解酶原激活因子(plasminogen activator),这些都是能使基底膜降解的蛋白酶。同时,bFGF还能诱导内皮细胞迁移突入细胞外三维胶原基质,并形成象毛细血管那样的小管腔。许多实验表明,FGF对许多正常组织如角膜、鸡胚绒毛尿囊膜、视网膜、黄体、肾上腺以及肾脏的血管新生有很强的促进作用。由于bFGF明显的促血管新生作用,所以,对组织移植手术及各种创伤愈合均有明显的促进作用。

5. 晶体的再生与眼科治疗方面的应用 人们早已知道晶体的再生依赖于来自视网膜的一种刺激。在器官培养的实验中发现,晶体的再生必须依赖于视网膜或垂体的存在,而在视网膜与垂体中含量最丰富的细胞生长因子当首推bFGF。从视网膜中提取的bFGF粗制品,可诱使活体上的晶体再生。在离体试验中,无论从视网膜还是从垂体提取的bFGF均是培养中的晶体上皮细胞和虹膜细胞的强力的分裂原。可以认为FGF促进晶体再生的作用是肯定的。

由于眼球缺乏丰富的血供,因而愈合缓慢,bFGF能加速眼部手术创伤愈合,延长角膜移植供体的保存时间,将来很可能被用来刺激视网膜细胞再生,为视网膜疾病提供有效的治疗。

6. 促进毛发再生 毛发的再生必然伴有毛囊的微血管再生,而bFGF是一种强有力的促血管新生的因子。已有实验表明,如将兔耳局部的毛剃去,然后在该区域注入bFGF,数日后即可观察到该部位不仅微血管大量新生,而且毛也迅速生长。

总之,bFGF在机体内作用多向,是一种可引起多种生物效应的基本调节因子。bFGF可作为多种细胞的分裂原应用于发育生物学、神经科学等众多生物科学的基础研究。在临床医学上,bFGF可广泛应用于创伤修复,神经细胞再生、晶体再生等诸多方面。如果把精心设计的组织移植与神经营养因子的应用结合起来,无疑将会对脑和脊髓功能损害的恢复起巨大的促进作用。可以预料,随着bFGF众多功用的被揭示,其需求量将迅猛上升。

但由于FGF在动物器官内的含量极微,故用常规生化方法提纯bFGF,生产率极低,来源也受到限制。从600头牛的脑垂体中,只能提取150 μ g bFGF。目前国际市场的价格,每微克高达260~340美元,比黄金贵一千万倍。用生化提取方法制备的bFGF,美国Sigma公司的价格每微克是260美元,日本东洋纺公司为350美元。

由于分子生物学技术的飞跃发展,编码bFGF的基因序列已被阐明。若用基因工程的方法生产bFGF,即将bFGF的基因导入大肠杆菌,从大量培养的大肠杆菌中提取bFGF,生产率将大为提高,极大地促进bFGF在基础研究(如受体研究,单克隆抗体等)中,特别是在临床各科中的应用,其经济及社会效益将十分可观。

中国康复研究中心基础医学研究所是1989年1月组建起来的国内第一个以研究中枢神经再生为中心的研究所。凭20多年神经外科医生的经验,笔者深知,神经外科的手术刀不能根本解决瘫痪的问题,只有用最新的分子生物学手段,从研究神经再生入手,并与临床结合,瘫痪病人最终才有希望站起来。

经过不懈的努力,1990年春天,我们从天然牛垂体中提取出bFGF,解决了国内不能生产,需耗费外汇进口的难题,价格仅为国际市场的1/10。进一步,我们又利用已有的材料(牛bFGF的cDNA,质粒载体,大肠杆菌菌种)以及技术条件(重组DNA技术,DNA顺序分析技术及蛋白纯化技术),将编码牛bFGF的基因组装入表达载体,

(下转第24页)

都控制在日本人手里,以致造成工业化基础不扎实,技术难以创新,大企业集团人员流动率极高,每年高达33%,不利于人才培养。

针对上述问题,南朝鲜当局自80年代以来采取了一系列措施,主要有:

第一,积极扶植中、小企业。由于以往过份偏重大企业的发展,而忽略中、小企业,使得南朝鲜每年要多花60亿美元去进口那些中、小企业完全能生产的物资。因此,自80年代以来,南朝鲜当局开始重视中、小企业的发展,并在金融、税收等方面提供优惠。同时,为进一步提高中、小企业的竞争力,当局还颁布了《公平交易法》,其核心在于禁止大企业集团之间的相互投资,而对其所属企业的投资不得超过其本身资本总额的40%,等等。此外1986年又制定了《中、小企业创业补助法》,并鼓励中、小企业朝技术密集型方向发展。第六个五年计划亦明确规定,中、小企业在生产方面的比重应由1984年的34.6%提高到1991年的44%。

第二,整顿企业,提高素质。80年代初,南朝鲜当局宣布了一项《强化企业素质对策》,责令26家最大的企业集团整顿下属的631个企业。其结果,仅在一年中就关闭了102家经营不善的企业,占总数的16%。同时还规定26家大企业集团在1982年4月前,清理非业务及非经营者所有的不动产,以促使各个企业集团的自有资本比率达到国际标准。

第三,通过立法打破垄断。为了打破大企业集团了团一统天下的局面,南朝鲜当局于1980年发布

了《关于限制垄断及公正交易法》。1984年修改了《商事法》,对大企业集团相互之间的控股比率等作了规定。同时,还通过进一步实施《禁止独占垄断法》、《银行法》、《促进企业法》等有关法律,以及将产业分为中、小企业型和大企业型的方式,以削弱大企业集团的垄断。

此外,大企业集团本身亦在积极进行调整,培养人才,引进和开发新技术。目前大企业集团一方面通过与外商合作的方式,加快引进先进技术的步伐,如与美日两国在汽车和电子业等方面积极进行技术合作;另一方面大力投资开发新技术,各企业集团都拥有自己的研究所,用高薪吸引海外学人回来服务,如“金星”集团的金星半导体公司几年前就在汉城设立了南朝鲜第一家半导体设计中心,它既是设计中心,又是人才培训中心。再如,在政府的号召下,各大企业集团都在积极支持发展本土的科技教育,希望到2000年南朝鲜自己培养出来的科学家人数增至15万,或达到1万人口有30名科学家的比率(即达到先进工业国目前的水平),并希望在本世纪末能够召回2 000名定居国外的科技人才。

总而言之,目前南朝鲜的大企业集团正在向管理现代化和高科技领域发展,尽管还存在不少问题,但它们始终是南朝鲜经济发展的主要支柱,在南朝鲜振兴经济的过程中起着十分重要的作用。

(责任编辑 肖庆山)

(上接第34页)

再将载体导入大肠杆菌,从大肠杆菌中提取和纯化出的产物经鉴定具有bFGF的生物学活性。将导入大肠杆菌的那段基因用内切酶切割下来,进行DNA分析,其DNA序列与bFGF基因序列完全一致。以上研究结果表明,我们已掌握了应用基因工程手段大量生产生物体内含量级微少的bFGF的技术奥秘。

目前西德Boehringer Mannheim公司已利用大肠杆菌表达并纯化出牛及人的bFGF,但其售价仍极昂贵。重组牛bFGF,每微克售价为16.8美元;重组人bFGF,每微克售价为21.4美元。由于bFGF售价太高,因而大大限制了国内外,特别是国内一些用户的使用,严重阻碍其科研及临床应用的开展。从科研角度上看,我们填补了国内空白,站到

了国际该研究领域的前沿;从经济效益来看,如能组织投资与打通销路,将会带来至少每年几十万美元的效益。

最近,中国康复研究中心附属博爱医院用我们生产的bFGF作主要成份制成乳剂,试疗难治愈性褥疮5例,已得到意外的良好疗效。另外几家医院也正在探索用我们提供的bFGF治疗周围神经疾患及其他疾患。

这项研究成果已通过鉴定。我们已将它以很低的价格转让给珠海东大企业(集团)公司,为的是让高技术成果尽快转化为生产力,造福国家,也为了使我们尽快投入更深入的研究,早日实现让瘫痪病人站起来的目标。

(责任编辑 冷远猷)