

中华眼镜蛇毒神经生长因子的研究*

The Study of Nerve Growth Factor in Chinese Cobra

雷丹青 李晓彪 舒雨雁
Lei Danqing Li Xiaobiao Shu Yuyan

(广西医科大学蛇毒研究所 南宁市滨湖路6号 530021)

(The Snake Venom Research Institute of Guangxi

Medical University, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 采用 CM-Sepharose CL-6B和 Sephosis C8以及 HPLC层析方法,自广西产中华眼镜蛇毒中分离纯化神经生长因子(NGF),此 NGF经 8 d鸡胚背根神经节体外培养证明具有促进神经纤维生长的活性。经 HPLC及聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一组成,经 SDS-PAGE及 HPLC测定分子量分别为 24.1 KD和 24.9 KD,等电聚焦电泳测得 pI为 8.2,氨基酸组分分析表明 NGF含酸性氨基酸较少,通过 125 I 标记 NGF测定出 NGF在生物体内主要分布于肾、肺、及周围神经。

关键词 中华眼镜蛇毒 神经生长因子 电泳 分布

Abstract Nerve growth factor (NGF) was purified from the venom of Chinese Cobra (*Naja naja atra*) by the CM Sepharose CL-6B column chromatography and sephasil C8 reversed-phase chromatography, and then by the HPLC. The purified NGF was shown to be homogeneous in discontinuous PAGE, in SDS-PAGE and in High-pressure Liquid Chromatography (HPLC). In vitro, the greatest outgrowth of the dorsal root ganglia of chicken embryos invoked by NGF at a concentration of 100 ng/mL. The molecular weight was estimated to be about 24.9 KD by HPLC, and to be 24.1 KD by SDS-PAGE. The isoelectric point was about 8.2. Amino acid analysis showed that NGF contained less residues of acidic amino acid. In vivo, the distribution of 125 I-NGF was found to be concentrated in kidney, peripheral nerve, liver and lung.

Key words Chinese Cobra (*Naja naja atra*) venom, NGF, Electrophoresis, distribution

中图法分类号 R595.8; Q959.620.6

神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)是由靶组织产生的一种重要生物活性蛋白,文献表明 NGF的作用比较广泛,它主要作用于神经系统,如交感神经元、感觉神经元和前脑胆碱能神经元并能促进神经元的发育、分化维持其正常功能,减轻和改善神经元的损伤,使其得以修复和再生^[1,2]。NGF最早是在 50年代初 Levi-Montalcini 在小鼠肉瘤中发现的^[1],此后,从小鼠颌下腺仅得到微量的 NGF供科研需要^[3],自从获得诺贝尔奖的 Cohens 从蛇毒中首次分离了 NGF突破了资源关后使 NGF得以开拓性的研究,对蛇毒 NGF的分离、纯化、制备及临床应用

用进入了一个高潮,目前 NGF的研究已成为发育神经学、神经损伤修复和临床神经疾病因学等领域的重要课题

本文从广西眼镜蛇毒中分离纯化了 NGF,并对其理化性质进行了测定,并用 125 I 标记测定 NGF在大鼠体内的分布

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料:中华眼镜蛇毒为广西医科大学蛇毒研究所冻干粉,CM-Sepharose CL-6B, Sephasil C8柱层析填料,TSK G-2000SW柱,标准分子量,Ampholin 为瑞典 Pharmacia-LKB产品,DMEM 培养液为 GIBCO 产品, 125 I-碘化钠为北京电子能研究所提供,乙晴、氯氨 T 等化学试剂为国产分析纯。

1996-08-07收稿, 1996-11-08修回

* 广西科委自然科学基金和区教委资助项目。

1.1.2 仪器: 梯度层析仪和部分收集器、记录仪、电泳仪为 Pharmacia-LKB 产品, HPLC 仪器为 WATERS 公司产品, Fj-2003/01B¹²⁵I 免疫测量仪为国营二六二厂生产, XZ-D 倒置生物显微镜为重庆光学仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 NGF 的分离纯化: 1.0 g 眼镜蛇毒溶于 20 mL 0.05 mol/L NaAC-HAC pH 值 5.0 缓冲液中, 上样于 CM-Sephrose CL-6B 柱, 用上述缓冲液洗脱后, 改用 0.05 mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 经生物活性鉴定, 将具有活性的蛋白峰收集冻干; 再用 0.5% 三氟醋酸溶解, 上样于 Sephasil C 柱, 用 0.5% 三氟醋酸 (含 2% -5% 乙晴) 洗脱, 经生物活性鉴定, 将有活性的蛋白峰收集冻干; 最后用 0.05 mol/L Tris-HCl pH 值 7.0 平衡缓冲液在 TSK G2000 SW 高压液相柱上层析, 得单一峰。

1.2.2 NGF 生物活性鉴定

取孵化 8 d 的鸡胚背根神经节接种在预先涂有鼠尾胶原的 10 mL 玻璃培养瓶中, 37°C 温孵 3 h, 待神经节贴壁后加入含有 NGF 的 DMEM 培养液, 37°C 培养 18 h-24 h, 空白对照培养条件相同, 但培养液中以不含 NGF 的等量 Hank's 液加入^[1,4]。

1.2.3 NGF 的纯度鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5]: 采用 pH 值 2.9 的不连续电泳, 浓缩胶 $C = 3\%$, $T = 3.6\%$; 分离胶 $C = 3\%$, $T = 7.6\%$, 电极缓冲液为 β -丙氨酸-冰醋酸缓冲液 pH 值 4.0, 恒压 110 V, 电泳 4 h, 用考马斯亮兰 R-250 染色。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[6]: 参照 Pharmacia Fine Chemicals 方法^[8], $C = 3\%$, $T = 7.5\%$, 采用 Weber 和 Osborn 的连续 SDS-磷酸盐缓冲系统, 样品分别经还原和非还原处理, 室温下恒压 42 V 电泳 4 h, 用考马斯亮兰 R-250 染色。

1.2.4 NGF 的分子量测定

1.2.4.1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量

方法同上, 加标准蛋白进行电泳。

1.2.4.2 凝胶过滤法测定分子量

方法同 HPLC, 标准蛋白: 磷酸化酶 B 94 000, 牛血清白蛋白 67 000, 肌动蛋白 43 000, 碳酸酐酶 30 000, 烟草花叶病毒外壳蛋白 17 500。

1.2.5 NGF 等电点测定

参照 Pharmacia Fine Chemicals 方法^[6], $C = 3\%$, $T = 6\%$, Ampholin 按 1:1 稀释, 含体积分数 20% 甘油, 板 6.8 cm × 6.8 cm, 正极缓冲液为 1M

H₂PO₄, 负极缓冲液为 1N NaOH, 采用 4°C 循环冷却水系统预电泳 30 min, 功率从 3 W 升至 8 W, 加样后恒功率电泳 1 h 30 min, 用考马斯亮兰 R-250 染色。

1.2.6 氨基酸组成分析

采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪分析测定 NGF 的氨基酸组成^[13]。

1.2.7 NGF 在体内分布的比较

1.2.7.1 ¹²⁵I-NGF 的制备

采用氯胺 T 氧化法, 反应物依次加入如下: ¹²⁵I-Na 1.86 mCi, 溶解于 0.5 mol/L PB pH 值 7.5 的 NGF 93 μ g, 氯胺 T 400 μ g, 反应 5 min 后加入偏重亚硫酸 4 mg 及碘化钾 400 μ g, 反应总体积为 0.34 mL, 终止反应后上 Sephadex G-25 柱 (0.8 cm × 15 cm), 用生理盐水洗脱, 收集 ¹²⁵I-NGF 峰, 测得比放射为 4.8×10^6 cpm/mL^[7,8]。

1.2.7.2 ¹²⁵I-NGF 在大鼠体内分布

大鼠 9 只为一组, 用戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重的剂量麻醉后, 10⁶ cpm 体重经舌下静脉注射 ¹²⁵I-NGF, 2 h 后做主动脉插管, 用生理盐水洗涤, 解剖取各组织标本, 吸干水分, 称重, 测定放射性计数^[8,9]。

3 结果

3.1 分离纯化结果

高效液相 (HPLC) 层析结果见图 1, 测定结果显示洗脱峰具有 NGF 活性。

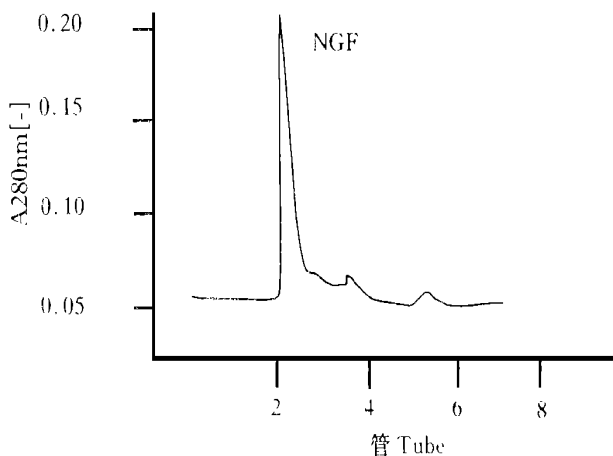


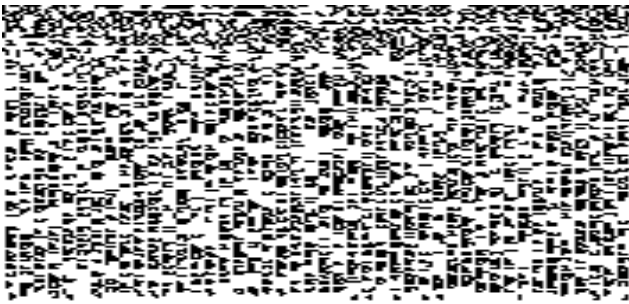
图 1 NGF 在 HPLC: TSK G2000SW 柱上的层析图
Fig. 1 NGF on a HPLC column: TSK G2000 SW (7.5 mm × 600 mm) 流速 30 mL/h; 6 mL 管 (7.5 mm × 600 mm) Flow rate 30 mL/h; Fraction 6 mL/tube

3.2 NGF 生物活性检测

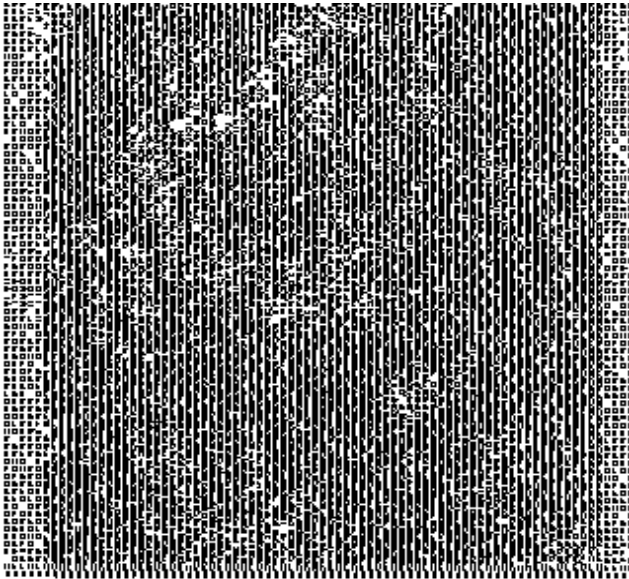
培养结果见图 2

3.3 NGF的纯度鉴定

经 HPLC 纯化后的 NGF 在电泳图谱上呈单一峰, 结果见图 3



A



B

图 2 8 d 鸡胚背根神经节体外生物活性鉴定

Fig. 2 Bioassay in vitro with explanted dorsal root ganglia of 8 d chick embryos

A 对照; B 含 100 ng NGF/mL

A Control; B Contained 100 ng NGF/mL

3.4 NGF理化性质测定

3.4.1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量

经 HPLC 纯化的 NGF 及低分子量标准蛋白用含 2.5% β 巯基乙醇的蛋白处理液加热变性后上样电泳, 以未经 β 巯基乙醇处理的 NGF 作对照, 电泳结果见图 4, 非还原型 NGF 及还原型 NGF 在电泳图谱上均呈单一区带, 说明该 NGF 是由一类亚基组成, 以蛋白质分子量对数及其电泳相对迁移率作图 5, 根据 NGF 的电泳相对迁移率, 查得分子量为 24.0 KD 经回归处理后得回归方程为: $Y = 5.36 - 1.58X$, 相关系数为 0.998, 通过计算求得 NGF 的分子量为 24.1 KD



A

B

图 3 NGF 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上图

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of NGF

A 从 HPLC 洗脱下的 NGF; B 从 Sephosis C8 洗脱下的 NGF.

A NGF from HPLC; B NGF from Sephosis C8



B

A

C

图 4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of NGF

A 低分子量标准; B 还原 NGF; C 非还原.

A Low molecular weight standards; B Reduced NGF; C NGF Non-Reduced NGF

3.5.1 ^{125}I -NGF 的制备

^{125}I 标记的 NGF 与 Na^{125}I 经 Sephadex G-25 柱层析分离, 结果见图 9, 收集的 ^{125}I -NGF 放射性强度为 0.61 mci

3.4.2 凝胶过滤法测定分子量

在 HPLC 系统中采用凝胶过滤法进行分子量测定, 层析结果见图 6 分别用糖精和蓝色葡聚糖测定内外水体积, 根据各物质的洗脱体积计算有效分配系数 (K_{av}), 以标准蛋白的分子量对数值和 K_{av} 值作图 7, 根据纯化的 NGF 的 K_{av} 值可以从图中求得其分子量为 25.1 KD, 同时通过回归处理求得回归方程 $Y = 4.61 - 0.93X$, 相关系数为 0.998, 通过计算求得 NGF 的分子量为 24.9 KD

3.4.3 NGF 等电点测定

采用聚丙烯酰胺凝胶板状电泳测定, 以等电点标准蛋白质的 pI 对其电泳迁移距离作图 8, 从图上查得 NGF 的等电点为 8.2

3.4.4 氨基酸组成分析

氨基酸组成分析结果见表 1

3.5 NGF 在大鼠体内的分布

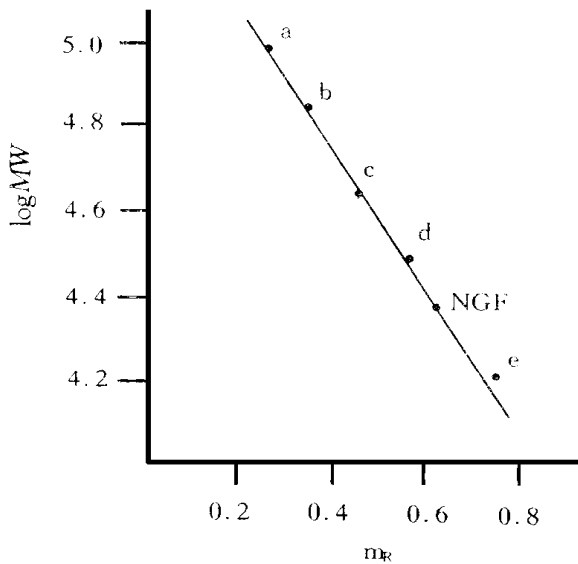


图5 NGF在 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳的分子量测定

Fig. 5 Molecular weight determination of NGF by SDS-PAGE

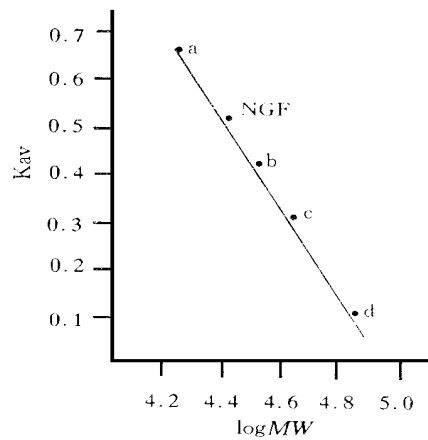


图7 凝胶过滤测定分子量

Fig. 7 Molecular weight determination of NGF by gel filtration chromatography

a 牛血清白蛋白; b 肌动蛋白; c 碳酸酐酶; e 烟草花叶病毒外壳蛋白.

a Albumin MW= 6, 7000D; b Actin MW= 4, 3000D; c Carbonic Anhydrase MW= 3, 0000D; e MTV coat protein MW= 1, 7500D

表1 中华眼睛蛇毒 NGF氨基酸组成分析

Table 1 Amino acid composition of NGF from the venom of *Naja naja atra* Amino acid

氨基酸 Amino acid	<i>Naja naja atra</i> ⁽¹⁴⁾	<i>Naja naja atra</i>	<i>Naja naja atra</i> ⁽¹⁵⁾	<i>cobra</i> ⁽¹⁰⁾
Asp	32	31	30	34
Thr	26	15	21	26
Ser	16	26	15	16
Glu	20	20	20	20
Pro	10	16	7	10
Gly	12	16	12	16
Ala	10	15	9	12
1/2Cys	12	1	6	8
Val	20	9	14	18
Met	4	1	4	2
Ile	12	6	7	12
Leu	6	13	6	8
Tyr	6	9	5	4
Phe	8	6	6	8
Lys	20	14	16	18
Hs	8	4	5	8
Arg	6	11	5	4
Try	6	N. D.*	3	4
Total	234	227	191	230

* 未检出 Not determined.

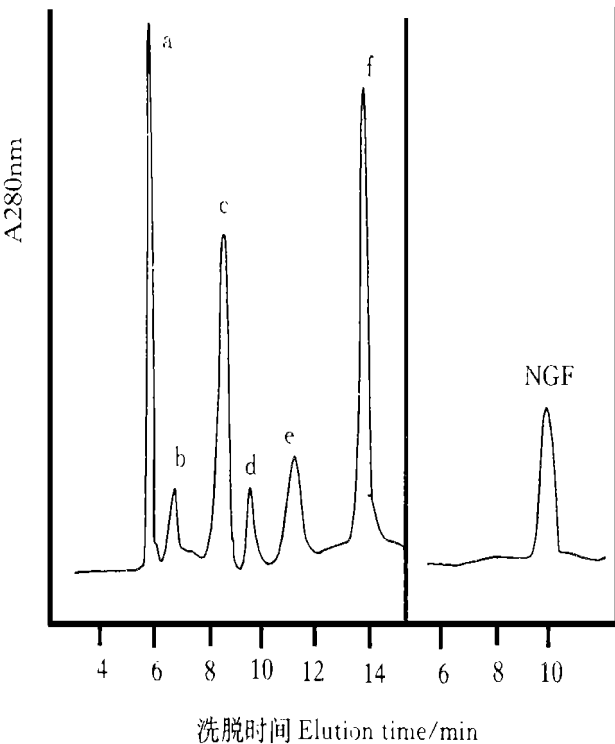


图6 NGF和标准蛋白的 TSK G2000 SW层析图

Fig. 6 Gel filtration chromatography of standard protein and NGF on TSK G2000 SW column by HPLC system

a 蓝色葡聚糖; b 牛血清白蛋白; c 肌动蛋白; d 碳酸酐酶; e (TMV) 烟草花叶病毒外壳蛋白; f 糖精.

a Blue dextran 200Q; b Albumin; c Actin; d Carbonic Anhydrase; e TMV coat Protein; f Saccharin

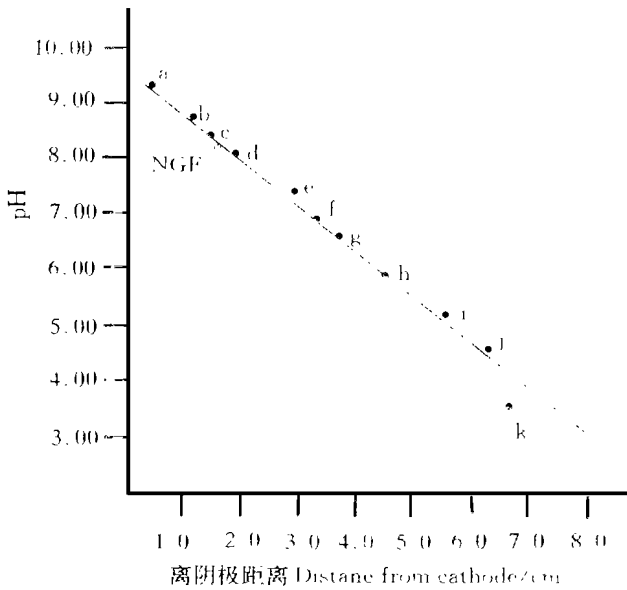


图 8 等电聚胶电泳测定 NGF 等电点

Fig. 8 pI determination of NGF by IEF-PAGE

a 胰蛋白酶原; b 扁豆凝集素碱性蛋白; c 扁豆凝集素中性蛋白; d 扁豆凝集素酸性蛋白; e 马肌红蛋白碱性蛋白; f 马肌红蛋白酸性蛋白; g 人碳酸酐酶; h 牛碳酸酐酶 B; i β -乳球蛋白 A; j 大豆胰蛋白酶抑制蛋白; k 淀粉葡萄糖苷酶.

a trypsinogen pI9.3; b lentil lectin-basic band pI8.65; c lentil lectin-middle band pI8.45; d lentil lectin-acidic band pI8.15; e horse myoglobin-basic band pI7.35; f horse myoglobin-acidic band pI6.85; g human carbonic anhydrase B pI6.55; h bovine carbonic anhydrase B pI5.85; i β -lactoglobulin A pI5.20; j soybean trypsin inhibitor pI4.55; k amyglucosidase pI3.5

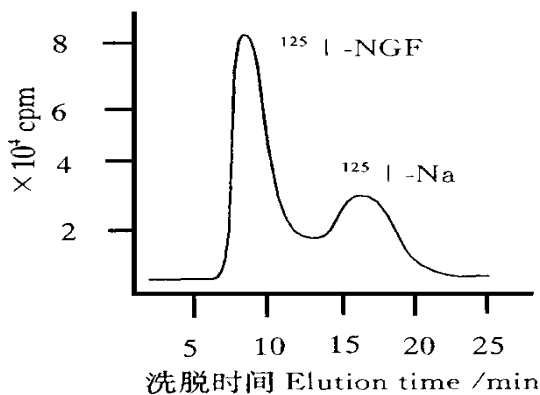


图 9 ^{125}I -NGF 的 Sephadex G-25 图, 流速 0.5 mL/min

Fig. 9 Separation ^{125}I -NGF from ^{125}I -Na by gel filtration chromatography on a column of Sephadex G-25 (0.8 cm \times 15 cm) Flow rate 0.5 mL/min

3.5.2 ^{125}I -NGF 在脏器中的分布

表 2 大鼠舌静脉注射 ^{125}I -NGF 后放射性在脏器中的分布 (10^4 cpm/g) ($\bar{x} \pm S$)

Table 2 IN vivo radiodistribution of ^{125}I -NGF (104 cpm/g)

血	心	肝	肺	肾	脑	肌肉
Blood	Heart	Liver	Lung	Kidney	Brain	Muscle
4.47 \pm 0.64	1.58 \pm 0.35	5.56 \pm 0.17	4.38 \pm 0.72	51.4 \pm 0.41	0.15 \pm 0.07	1.13 \pm 0.33
脊髓	神经	睾丸	嗅球	颌下腺	肾上腺	
Spinal cord	Ganglia	Testis	Olfactory bulb	Submaxillary gland	Adrenal gland	
0.19 \pm 0.01	4.57 \pm 0.28	1.05 \pm 0.08	0.42 \pm 0.10	2.30 \pm 0.17	1.17 \pm 0.12	

从表 2 数据可知, 给药后 2h ^{125}I -NGF 的分布浓度大小依次为: 肾 > 肝 > 神经 > 肺 > 颌下腺 > 心 > 肾上腺 > 睾丸 > 嗅球 > 脊髓 > 前脑

4 讨论

蛇毒是神经生长因子的一个很丰富的来源, 由于蛇毒的成分很复杂, 因此从蛇毒中分离纯化 NGF 相对困难, 目前已从眼镜蛇科、响尾蛇科、蝰科蛇毒中分离出 NGF, 而不同蛇毒的 NGF 的等电点和分子量均不相同, 因此分离提纯的方法也有很大的差异。

本实验是从广西产中华眼镜蛇毒中分离 NGF, 采用 CM-Sephadex CL-6B 柱反相层析柱和 HPLC 层析纯化具有生物活性的 NGF, 此 NGF 在聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上均呈单一区带, 而且在 HPLC 系统中经凝胶过滤得单一峰, 此方法比文献 [10] 报道少过一次柱, 在分离过程中可减少 NGF 的损失。我们分离得到 NGF 在 HPLC 系统中通过凝胶过滤法测定 NGF 的分子量为 24.9KD, 而采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定出 NGF 的分子量为 24.1KD, 与文献 [11] 报道的结果比较接近, 但是在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中却未能测出文献 [11] 中所报道的两个相同亚基的存在, 并且在氨基酸组成分析中发现纯化的 NGF 仅含一个半胱氨酸, 所以在分子内难以形成二硫键, 根据以上实验结果推测, 此 NGF 中不存在两个相同的亚基, 这可能是由于蛇毒的产地不同所致。

NGF 在体内分布的研究表明, ^{125}I -NGF 在脏器中主要分布在肾、外周神经、肝、肺, 脑中的含量较低, 这与 NGF 难以通过血脑屏障是一致的, 但是当患脑部疾病时, 血脑屏障的功能受到损伤或破坏是可以通过血脑屏障达到中枢神经系统的。目前对 NGF 临床应用的研究已成为 NGF 研究领域的一个重要

(下转第 56 页 Continue on page 56)

切相关。年平均温差大，变质岩和第四系松散岩分布的岗地、平原地区，所居住的人群，肝癌的发病率和死亡率高，而在山区所居住的人群，尤其是当土壤中的 Sn 元素含量较高时，肝癌的发病率和死亡率，一般相对较低

致谢

参加调研工作的主要人员还有环境地质研究所的李福生、蔡伟娣、许从德、多超美，江西医学院的刘廷芳、颜世铭，谨此致谢。

参考文献

1 钟肢墀. 癌症的流行与预防. 广州: 科学普及出版社广州分

社, 1987. 96, 94

2 吴沈春. 环境与健康. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 230.

3 四川医学院主编. 卫生统计学. 北京: 人民卫生出版社, 1979. 77.

4 曾昭华等. 江西省肝癌与微量元素. 中国康复医学, 1994, 77.

5 曾昭华等. 江西省肝癌与岩石类型. 农村生态环境, 1994, 10 (4): 34~ 35 40.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 5 页 Continue from page 52)

课题^[12]。对 NGF 体内分布的了解, 可以使我们对 NGF 的疗效以及产生的副作用等方面进行研究以及时把握正确的方向。

参考文献

1 Levi-Montalcini R et al. In vitro experiment on the effects of Mouse Sarcoma 180 and 37 on the Spinal and Sympathetic ganglia of the chick embryo. Cancer Res. 1954, 14 49~ 57.

2 Levi-Montalcini R. The nerve growth factor thirty-five years later. Science, 1987, 237 (4819): 1154.

3 Moble Wc, et al. Biochem. 1976, 15 5543.

4 徐叔云等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991, 538~ 546.

5 何中效等. 电泳. 北京: 科学出版社, 1990, 20~ 25.

6 Pharmacia Fine Chemicals Polyacrylamids Gel Electrophoresis Laboratory techniques. 1982.

7 Green Wood F C et al. The preparation of 131I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity J

Biochem 1963, 89 114~ 8.

8 陈明. ¹²⁵I 标记蝮蛇毒蛋白在小鼠体内的分布. 动物学研究, 1981, 2 (4): 99.

9 韦小敏等. ¹²⁵I 蛇毒溶栓素在大鼠体内分布及排泄研究. 广西医学院学报, 1990, 7 (2): 38~ 40

10 Hogue R. Angeletti Nerve Growth Factor from Cobra Venom. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1970, 65 (3): 668~ 674.

11 郝文学. 血栓与抗栓酶. 沈阳: 沈阳出版社, 1992, 625~ 640.

12 周廷冲主编. 多肽生长因子. 基础与临床, 中国科技出版社, 1992.

13 徐叔云等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991, 538~ 546.

14 雷少波等. 中华眼镜蛇毒神经生长因子的分离纯化及鉴定. 生物化学与生物物理学报, 1989; 21 (2): 115~ 20.

15 柳川. 神经生长因子的研究. 生命科学进展, 1990, 121 (1): 254.

16 王波. 神经生长因子作用机理研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17 (4): 152.

(责任编辑: 蒋汉明)