

개 혈소판에서 변형성장인자 베타의 분리에 관한 연구

권오경·홍성혁

서울대학교 수의과대학

서론

세포의 성장 및 증식을 조절하는 성장인자에 관한 연구가 최근 활발하게 이루어지고 있다.^{1,2,7)} 암 발생과 관련성에서 시작된 변형성장인자 베타(TGF- β)에 관한 연구가 생물학적으로 유의한 효과가 있는 것으로 알려져 이에 관련된 물질의 분리, 정상 등이 연구되어지고 있다.^{10,12)} 생쥐 육종에서 처음으로 발견된 TGF- β 는 세포의 형질을 변환시키는 특성을 가지고 있으며^{5,9)}, 정상 체조직에서도 발견되는 것으로 보아 조직세포의 성장을 조절하는 인자로 생각되어져 왔다.

Roberts 등⁹⁾은 몇가지 생쥐 종양세포에서 산에 안정된 변형성장인자를 분리하고 그 특성을 서술하였으며 그후 비종양세포에서도 분리가 보고되었다.¹⁰⁾ 생쥐의 각 기관에서¹⁰⁾, 사람의 혈소판에서³⁾ 그리고 소의 신장에서 분리한 보고가 있다.¹³⁾ 혈소판이체의 다른 어떤 조직보다 TGF- β 를 많이 함유한 부위로 알려져 있다.⁶⁾

TGF- β 는 25,000 dalton의 폴리펩타이드로서 disulfide 결합한 12,500 dalton의 subunit 두개로 되어 있다.¹²⁾ 분리방법으로는 겔여과법³⁾과 이온교환 칼럼크로마토그래피법⁴⁾이 보고되어 있다.

본 연구에서는 겔여과법과 이온교환칼럼크로마토그래피법을 이용하여 개의 혈소판에서 TGF- β 의 분리를 시도해 보았다.

재료 및 방법

혈소판 분리: 개의 혈액을 ACD 항응고제가 함유된 채혈백에 채혈하여 냉장상태로 실험실로 운반하였다. 혈소판이 많이 함유된 혈장을 채취하기 위하여 혈액을 1,000 g에서 9분간 원심분리하였다. 혈장을 3,000 g에서 20분간 원심분리하여 혈소판을 채취하였다. HCl로 pH 7.5로 조정 한 Tris buffer(17mM Tris base, 0.15M NaCl, 0.1% glucose)와 citrate buffer(38mM citric acid, 88mM sodium citrate, 2.2% glucose)를 9:1로 희석한 세척액 소량으로 2번 세척하고 충분한 양이 모일 때까지 -40°C에 보관하였다.

Acid/Ethanol 추출: 혈소판 1g에 acid/ethanol(375ml 95% ethanol, 7.5ml concentrated HCl, 33mg phenylmethylsulfonyl fluoride) 4ml씩 첨가하여 blender에 1~2분 동안 균질하게 될 때까지 추출하고 물을 첨가하여 6ml/g 되게 다시 조정하였다. 12시간 정도 4°C에 놓아둔 후 침전된 단백성분을 제거하기 위해 원심분리하였다. 침전물을 제거하고 상층액을 concentrated NH₄OH로 pH 3으로 조정 한 다음, 95% ethanol을 2배 되게 가하고 ethyl ether를 4배 가하였다. 4°C에 12시간 정도 놓아둔 후 원심분리하여 침전물을 채취하였다. 1M acetic acid(0.5ml/g)에 부유시켜 4°C에 휘저으면서 12시간 정도 놓아 두었다. 원심분리하여 침전물을 버리고 상층액(crude TGF- β)을 다음의 실험에 사용하였다.

겔여과법: Assoian 등³⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 1M의 acetic acid로 평형시킨 Sephadex G-75 충전관(2.0×120cm)에 acid/ethanol 처리한 용

※ 이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

액을 시간당 3ml로 여과하였다. 분획을 3ml씩 채취 하였으며 280nm의 흡광도로 용출형대를 알아 보았다.

양이온 교환 칼럼크로마토그래피법 : Cone 등³⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 양이온 교환제 (SP-Toyopeal, Tosoh, Japan)를 충전한 one inch semiprep. Column(Waters Assoc, 미국)을 semiprep. HPLC에서 사전에 0.025M sodium acetate(pH 5.5)로 평형시켜 놓은 후에 acid/ethanol이 처리한 용액을 주입하고 NaCl을 0에서 3M까지 150분간 linear gradient elution 하였다. 분취는 2분마다 하였다.

한외여과법 : 분취한 시료는 Centriprep-10(Amicon, 미국)을 사용하여 농축하고 분자량 10,000 이하의 저분자물을 제거하였다.

NaDodSO₄/Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Laemmli 방법⁸⁾에 준해서 Sodium dodecyl sulfate 12% slab gel을 만들어 전기영동하여 시료의 단백분획상을 알아 보았다. Coomassie brilliant blue R-250 혹은 은염색하여 그 상을 확인하였다.

TGF-β의 활성화 측정 : 5% 우태아혈청을 첨가한 DMEM 배지에 배양시킨 African green monkey의 신장세포를 1% trypsin으로 세척하고 96 well plate에 5×10⁴씩 분주하였다. 분석할 시료를 2배의 배수씩 희석하여 well에 주입한 후 37℃, 5% CO₂ 부란기에 24시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 crystal violet로 5분간 염색하고 세척한 후 건조시켰다. 550nm에서의 흡광도를 측정하여 세포의 밀집도로 세포증식의 정도를 확인하였다. 무첨가 well에서 보다 세포증식이 많이 일어난 것을 TGF-β의 활성이 있는 것으로 판단하였다.

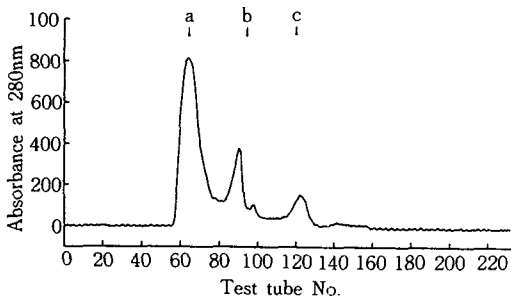


Fig. 1. Gel filtration of the platelet extract.

(a:BSA 66,000 b: α-Chymotrypsinogen 27,000 c:Lysozyme 14,000)

결과 및 고찰

개 혈액 20리터에서 분리한 혈소판은 5.2g였으며 acid/ethanol 처리하여 1M acetic acid 2.5ml에 용해하여 측정된 단백질농도는 1.1mg/ml였다.

Sephadex G-75 겔여과법으로 분취하여 280nm에서 흡광도를 측정된 결과 4개의 peak가 확인되었다(Fig. 1). 64, 90, 98 및 122번째 시험관에서 peak가 인정되었다. 표준마커와 비교하여 볼때 90에서 100번째 사이의 시험관에 분자량 24,000대의 TGF-β가 존재할 것으로 생각되었다. 전기영동상에서 acid/ethanol 처리하여 acetic acid에 용해한 crude TGF-β에는 8개의 확실한 분획을 확인할 수 있었으며 64번째 peak는 표준마커 분자량 66,000, 90번째 peak는 분자량 34,000, 98번째 peak는 분자량 24,000대와 비슷하였다(Fig. 2). 122번째 peak는 전기영동상에서 보이지 않았으며 분자량 20,000대 이하의 것으로 생각되었다. Assoian 등³⁾은 Bio-Gel P60겔여과법으로 2단계 여과를 하여 TGF-β를 분리하였다고 한다. 첫번째 여과는 본 실험의 방법과 유사한 방법이였으며 두번째 여과는 TGF-β분획 이외의 저분자 오염물을 제거하기 위한 것이었다고 하

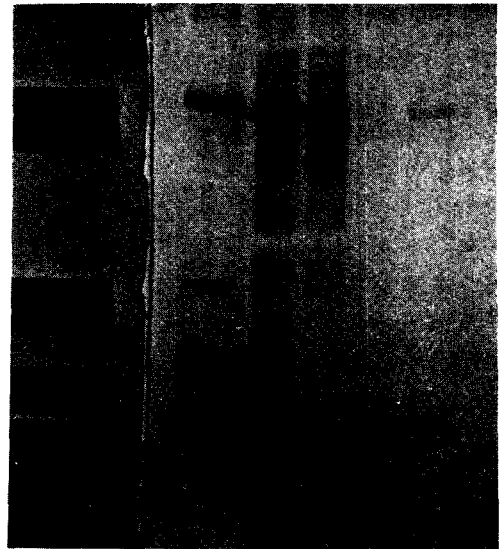


Fig. 2. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the Selected Gel Filtered Fractions.

(From the left; marker, crude TGF-β, peak 1, 2, 3, 4)

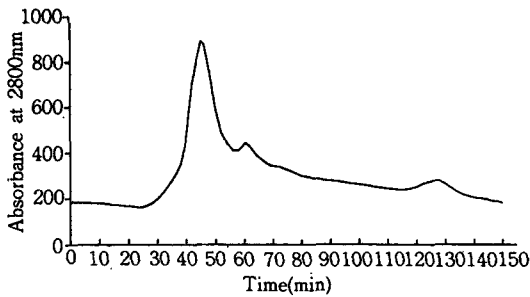


Fig 3. Elution profile of platelet extract on one inch semipreparative HPLC column.

였다. 8M의 urea로 gel을 평형시키면 TGF- β 의 이동이 지연되는 것을 막을 수 있어 저분자 오염물과 분리시킬 수 있다고 하였다. 신장세포를 이용한 TGF- β 의 활성도 측정에서 각 peak 분획중에 98번 시험관에서만이 crude TGF- β 에서 처럼 신장세포의 증식효과가 인정되었다.

Semiprep. HPLC로 150분간 실시한 0에서 3M NaCl까지의 linear gradient elution을 Fig. 3에 표시하였다. 3개의 peak가 인정되었으나 전기영동상에서 분자량 24,000대의 분획을 발견할 수가 없었다. 그러나 TGF- β 의 활성도 측정에서 1.5M NaCl 부근에 신장세포의 증식효과가 인정되었다. 주입한 양이 소량이었기 때문에 은염색에도 확인되지 않고 활성도 측정에서만 확인된 것으로 생각된다. Cone 등¹⁴⁾은 5.5×20cm semiprep. HPLC 칼럼을 사용하여 100~500 units 정도의 혈소판을 처리할 수 있다고 하였다. 본 실험에 사용한 칼럼의 직경보다 2배 정도 큰 칼럼을 사용하였으나 충전제와 용출조건도 동일하였다. 약 1.5M NaCl에서 TGF- β 분획을 확인할 수 있었다고 하였으며 본 실험에서도 비슷한 시간대에 확인할 수 있었다.

결 론

개의 혈소판을 acid/ethanol 처리하여 Sephadex G-75겔 여과와 semi preparative HPLC을 이용한 양이온교환크로마토그래피로 TGF- β 의 분리를 시도하였다.

혈액 20리터에서 분리한 혈소판은 5.2g 이었으며 acid/ethanol 처리하여 1M acetic acid 2.5ml에 용해하여 측정된 단백질농도는 1.1mg/ml이었다. 겔여과에서는 제3번 peak에서 TGF- β 의 분리가 가능하

였으며 양이온교환크로마토그래피에서는 0에서 3M NaCl까지의 linear gradient elution의 1.5M NaCl에서 검출할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Adams, D.M., Hathaway, M., Shaw, J., Burmett, D., Elis, E. and Stran, A.T. : Transforming growth factor- β induces human T lymphocyte migratim *in vitro* : J. Immunol.(1991) 147 : 2 : 609~612.
2. Ammann, A.J., Beck, L.S., DeGuzman, L., Hirayashi, S.E., Lee, W.P., Mcfatridge, L., Naguyen, T., Xu, Y. and Mustoe, T.A. : Transforming growth factor- β . Effect on soft tissue repair. : Ann N.Y. Acad Sci, Supplement.(1990)93 : 124~134.
3. Assoian, R.K., Komoriay, A., Meyers, C.A., Miller, D.M. and Sporn, M.B. : Transforming growth factor- β in humen platelets. : J. Biol. Chem.(1983) 258 : 7155.
4. Cone J.L., Brown, D.R. and Delarco, J.L. : An improved method of purification of transforming gorwth factorss, type β from platelets. : Anal. Biochem.(1988) 168 : 1 : 71~74.
5. Delarco, J.E. and Todaro, G.K. : Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells : Proc. Natl. Acad. Sci. USA.(1978) 75 : 4001.
6. HosGood, G. : Wound healing;The role of platelet-derived grown factor and transforming growth factor β : Vet. Surg.(1993) 22 : 490~495.
7. Klnighton, D.R., Phillipsm, G.D. and Fiegel, V.d. : Wound healing angiogenesis ; indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. : J. Trauma.(1990) 30(12 suppl) : 134~144.
8. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. : Nature.(1970) 227 : 680~685.
9. Roberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L., Sporn, M.B., DeLarco, J.E. and Todaro, G.J. : Transforming growth factors;Isolation of polypeptides from virally and chemically transformed ce-

- lls by acid/ethanol extraction. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(1986) 8 : 4167~4171.
10. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, A.B., Smith, J.M. and Sporn, M.B., : New class of transforming growth factor potentiated by epidermal growth factor; Isolation from non-neoplastic tissues. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA.(1981) 78 : 5339.
 11. Roberts, A.B., Frolik, C.A., Anzano, M.A. and Sporn, M.B. : Transforming growth factor neoplastic and non-neoplastic tissues. : Fed. Proc.(1983) 46 : 2621~2626.
 12. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. and Assoian, R.K. : Transforming growth factor- β ; Biological function and chemical structure. : Science.(1986) 23 : 532~534.
 13. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Shull, J.H., Smith, J.M., Ward, J.M. and Sodek, J. : Polypeptide transforming growth factor isolated from bovine sources and used for wound healing *in vivo*. : Science.(1983) 219 : 1329~1331.

Study on the Purification of Transforming Growth Factor- β in Canine Platelets

Oh-Kyeong, Kweon, D.V.M., Ph.D., Sung-Hyeok Hong, D.V.M.

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

To purify transforming growth factor type beta(TGF- β) in canine platelets, Sephadex G-75 gel filtration and semipreparative HPLC were carried out.

The column of 2.0 \times 120cm was used for gel filtration and one inch semipreparative column filled with SP-Toyopeal for HPLC. Electrophoresis and bioassay using African green monkey kidney cell were used for identification of TGF- β .

Crude TGF- β of 2.75mg was extracted from 5.2g of the platelets by the treatment of acid/ethanol. In gel filtration of crude TGF- β , 4 peaks were observed at the detection of spectrophotometer at 280nm. Electrophoresis and bioassay identified the 3rd peak TGF- β . Linear gradient elution from 0 to 3M NaCl in semipreparative HPLC showed TGF- β at 1.5M NaCl.

Gel filtration was less expensive and useful method for the purification of TGF- β .