

개량된 방법에 의한 사람혈소판으로부터 TGF- β 1의 분리

¹신충건 · ¹김상국 · ¹문병조 · ²김평현 · ²전계택 · ³남상욱 · 김장환 · †이종원
¹경북대학교 자연과학대학 생화학과, ²강원대학교 자연과학대학 생명과학부, ³사범대학 과학교육학부,
대구효성카톨릭대학교 의과대학 생화학교실
(접수 : 1998. 3. 1., 게재승인 : 1999. 2. 1.)

Purification of TGF- β 1 from Human Platelets by an Improved Method

Zhong-Jian Shen¹, Sang Kook Kim¹, Byung Jo Moon¹, Pyeung-Hyeun Kim², Gie-Taek Chun², Sang-Uk Nham¹,
Jang-Hwan Kim, and Jongwon Lee†

¹Dept of Biochemistry, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 2-701 Korea

²Division of Life Sciences, College of Natural Sciences.

³Science Education, College of Education, Kangwon National University, Chunchon 200-701 Korea

Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung, 3056-6 Daemyung 4-Dong, Nam-Gu,
Taegu 705-034, Korea

(Received - 1998 3. 1., Accepted : 1999. 2. 1.)

Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) has potentials to be used as a new therapeutic agent. However, studies with TGF- β 1 were hindered by its high cost. In this study, we developed an improved method to purify TGF- β 1 from human platelets, for which four purification steps were used: platelet extraction, gel filtration, cation exchange chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography. After a final step of purification, a pure protein with a molecular weight of 25,000 corresponding to the commercially available TGF- β 1 was obtained, which were confirmed by silver staining and Western blotting after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It was confirmed by the inhibitory effects of TGF- β 1 on a mink lung epithelial cell line that the purified TGF- β 1 had its biological activity, whose activity is slightly higher than that of the commercially available TGF- β 1. About 3.7 μ g of the purified TGF- β 1 was obtained from 10 units of concentrated human platelets, the final yield of which is about 21%.

Key Words : transforming growth factor β 1, chromatography, purification, human platelet

서 론

최근 세포의 성장과 분화를 조절하는 폴리펩티드인자들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중에서 transforming growth factor- β (TGF- β)는 여러가지 기능을 가지는 cytokine으로서 세포의 성장, 분화, 배태발육 및 조직복구 (tissue repair) 등에 참여하는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 TGF- β 는 TGF- β 1, - β 2, - β 3, - β 4, - β 5 등 5가지 isoform으로 이루어져 있다(1). 이 중에서도 TGF- β 1은 세포의 종류에 따라 그 작용이 달라지는 것으로 알려져 있어 이를 의학적으로 이용하기 위한 연구가 시도되고 있다. 예를 들면, 섬유아세포 (fibroblast) 등에 대해서는 세포막에 있는 type II 수용체와 결합하여 세포

질에 있는 serine/threonine kinase를 활성화시킴으로써 그 성장을 촉진하는 성질(2-3)을 가져 이를 상처등의 치유촉진에 이용하고자 하는 연구가 시도되고 있다(4-7). 한편, 상피세포(8-9)나 조혈세포 (hematopoietic cell)(10)등에 대해서는 세포주기 중의 G₁/S 전이물 가역적으로 차단하여(11-12) 이의 증식을 강력하게 억제하므로 이를 암(13-17) 및 면역질환(18)등의 치료에 이용하고자 하는 연구도 시도되고 있다. 체내의 혈소판등에 풍부하게 존재하고 있는 TGF- β 1이 세포로부터 처음 만들어질 때는 그 활성을 나타내지 않는 잠재형 (latent form)으로 존재하다가 아미노말단부위가 떨어져 나가면서 각각의 subunit가 이황화결합 (disulfide bond)으로 연결된 분자량 약 25,000의 동종이중체 (homodimer)로 된 활성형으로 바뀌게 된다(19). 그러나, 잠재형이 *in vivo*에서 활성화되는 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않으나 *in vitro*에서는 산성조건으로 쉽게 활성화시킬 수 있다 (20). 본 연구에서는 이렇게 알려진 사실들을 이용하여 사람혈소판으로부터 활성화된 TGF- β 1을 이미 보고된 Van den 등(21)의 방법을 개량하여 경제적으로 정제하는 방법을 개발하였다.

† Corresponding Author · Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung, 3056-6 Daemyung 4-Dong, Nam-Gu, Taegu 705-034, Korea
Tel : 053-650-4471, Fax : 053-621-4106
e-mail : leejw@cuth.cataegu.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 장비

농축사람혈소판은 대한적십자 혈액원 (대구, 대한민국)으로부터, RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), protein molecular weight marker 및 상업용 순제품 TGF- β 1 (이하 TGF- β 1 표준품으로 명명)은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)로부터, Sephacryl S-100, CM-Sepharose, Phast Gel, Phast Gel SDS buffer strip, Phast Gel Silver Kit 및 Nitrocellulose membrane (0.2 μ m)은 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) 으로부터, acetonitrile은 Merck (Darmstadt, Germany)로부터, Spectra/Por Dialysis Membrane (MWCO: 1000)은 Spectrum (Houston, TX, USA) 으로부터, ultrafiltration system인 Centricon은 Amicon (Beverly, MA) 으로부터, microplate는 Nunclon (Naperville, IL, USA) 으로부터, Rabbit anti-TGF- β 1 monoclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.로부터, Goat anti-rabbit IgG(whole molecule)-peroxidase conjugate는 Sigma로부터, ECL (enhanced chemiluminescent)은 Amersham LIFE SCIENCE로부터 각각 구매하여 사용하였다. 기타 일반 시약들은 시중에서 판매하는 특급시약을 사용하였다. 한편, 장비로 사용된 Dounce homogenizer는 Pyrex (UK) 제품을, chromatography system (GradiFrac System)은 Pharmacia (Uppsala, Sweden) 제품을, HPLC system (D-600)은 Hitachi (Tokyo, Japan) 제품을, 역상 HPLC column (Hi-Pore RP318, 250 \times 4.6mm)은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 제품을, microplate reader (Bio-Kinetic Reader)는 Bio-Tek Instrument (Winooski, VT, USA) 제품을 각각 사용하였다.

혈소판의 추출

농축혈소판 10단위를 1,700 \times g에서 30분 동안 원심분리하여 혈소판을 침전시켜 pellet을 얻었다. 이것에 phosphate-buffered saline (PBS)을 넣어 녹인 다음 23% sucrose 밀도구배로 200 \times g에서 10분 동안 다시 원심분리하여 오염되어 있는 소량의 적혈구를 제거하고 PBS-EDTA (6mM)로 세 번 씻어 남아있는 혈장단백질을 제거하였다. 원심분리하여 얻은 혈소판은 -80 $^{\circ}$ C에서 24시간 저장한 후 다음과 같이 단백질의 추출이 이루어졌다. 먼저, 단백질분해효소 억제제 (aprotinin 1 μ g/ml; leupeptin 0.5 μ g/ml; phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1mM))가 섞여 있는 산/에탄올 혼합물 (에탄올 79.2%, 농축염산 1.6% 및 물 19.2% (v/v))을 혈소판 wet g당 5mL씩 첨가한 다음 Dounce 균질화기로 혈소판을 충분히 부수었다. 이것을 4 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 방치한 다음 100,000 \times g에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액을 희석된 NH₄OH로 pH 3.0까지 조절한 다음 2배 부피의 0 $^{\circ}$ C 에탄올과 4배 부피의 ethylene ether를 차례로 첨가하여 용액 진부를 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 두었다가 12,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이렇게 얻은 침전물을 적은 양 (2mL-5mL)의 1M 초산에 녹인 다음 4 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 방치한 후 100,000 \times g에서 1시간동안 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하였다. 이 때 얻은 상층액이 TGF- β 1이 들어있는 혈소판 추출물로서 그 일부는 분석용으로 사용되고 나머지는 다음 단계의 분리에 사용되었다. 이 과정에 대한 개략도는 Figure 1과 같다.

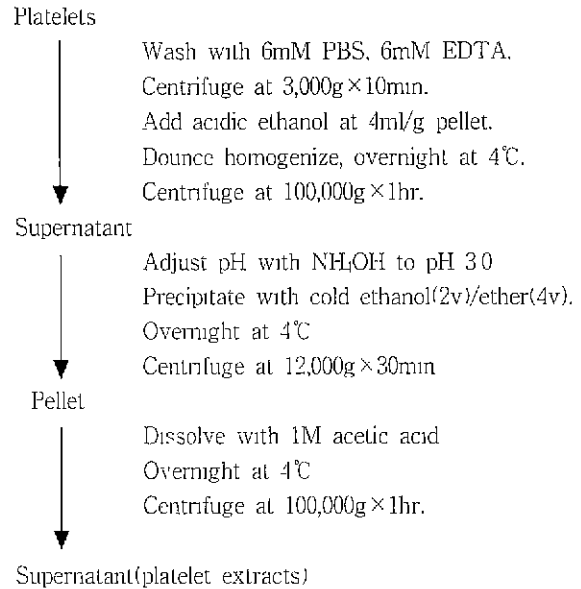


Figure 1. Flow chart for the extraction of human platelets.

젤여과 크로마토그래피

혈소판추출물로부터 얻은 추출물은 Centricon을 이용하여 2mL까지 농축하여 1M 초산용액 (pH 2.4)으로 미리 평형이 이루어진 Sephacryl-100 column (16 \times 100cm)에 주입한 다음, 1M 초산용액으로 4 $^{\circ}$ C에서 12mL/hr 속도로 천천히 용출시켜 그 용출액을 한 튜브당 3mL씩 받았다. 이들 분획들 중 TGF- β 1의 활성이 높으면서도 함량이 많은 분획을 생물활성분석 및 전기영동을 이용하여 확인한 다음 이 분획들을 모아서 냉동건조하였다. 이 중 일부는 SDS-PAGE, 정량 및 Western blot에 사용되고 그 나머지는 다음 단계인 양이온교환 크로마토그래피로 더욱 정제되었다.

양이온교환 크로마토그래피

젤여과 크로마토그래피로 부분정제된 TGF- β 1을 2mL의 1M 초산용액에 녹여 1M 초산용액으로 미리 평형이 이루어진 CM-Sepharose column (1 \times 10cm)에 주입한 다음 용출액의 280nm에서의 흡광도값 (OD)이 0.04이하 될 때까지 평형액으로 불순 단백질을 용출시켰다. 이어서 1M 초산용액에 섞인 초산암모늄 농도구배 (0-2M)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 48mL/hr로 용출시켜 그 용출액을 한 튜브당 3mL씩 받았다. 이들 분획들 중 TGF- β 1 활성이 높으면서도 함량이 많은 분획을 생물활성분석 및 전기영동을 이용하여 확인한 다음 0.2M 초산용액에 투석하여 초산암모늄염을 없애고 냉동건조하였다. 이 중 일부는 SDS-PAGE, 정량 및 Western blot에 사용되고, 나머지는 다음 단계인 역상 HPLC 크로마토그래피로 더욱 정제되었다.

역상 HPLC 크로마토그래피

양이온교환 크로마토그래피로 부분정제된 TGF- β 1 활성분획을 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)(pH 2.2)에 녹여 0.1% TFA로 미리 평형이 이루어진 역상 (reverse phase) HPLC column인 Hi-Pore RP318 (250 \times 4.6mm)에 주입한 다음, 0.1% TFA가 섞인 acetonitrile 선형농도 구배 (0-100%)를 이용하여

60mL/hr로 용출시켰다. 이 중에서 peak들의 분획을 받아 TGF- β 1 활성분석, 전기영동 및 Western blot를 시행하였다.

TGF- β 1의 생물학적 활성측정

TGF- β 1의 활성은 TGF- β 1이 munk lung epithelial cell line인 Mv1Lu (ATCC CCL-64)의 성장을 저해하는 성질을 이용하여 다음과 같은 두 가지 방법, 즉 세포를 직접 염색하는 방법과 isotope를 이용한 thymidine incorporation법에 의해 측정되었다. 염색법에 의한 활성의 측정은 다음과 같이 이루어졌다: 100 μ L당 1×10^4 개의 세포가 들어있는 배양액을 96-well microplate에 넣은 2시간 후 TGF- β 1 표준품 또는 시료를 넣어 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 이 때 시료인 경우에는 모아진 용출액 0.3-0.5mL를 취하여 냉동건조한 다음 20 μ L의 50mM 무균 초산나트륨 용액 (pH 4.0)에 녹인 것을 사용하였다. 배양이 끝난 후 배양상청을 제거하고, PBS에 섞인 5% formaldehyde를 well당 200 μ L씩 넣어 30분 동안 세포를 고정시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 여기에서 0.5% methylene blue (50 mL의 에탄올과 20 mL의 PBS에 녹임)용액을 100 μ L씩 넣어 30분동안 염색한 다음 증류수로 4회 세척하였다. 여기에 33% 초산용액을 200 μ L씩 각 well마다 넣어 염색된 세포를 녹였다. 이 때 생긴 색의 흡광도를 microplate reader를 이용하여 630nm에서 읽었다. 성장저해활성은 다음 식에 의해 계산하였다. 이 식에서 0.4는 처음 넣은 세포 수에 해당한 OD값을 가리킨다. Growth inhibition (%) = $[1 - (\text{sample OD} - 0.4) / (\text{blank OD} - 0.4)] \times 100\%$. 한편, thymidine incorporation법에 의한 활성의 측정은 다음과 같이 이루어졌다. well 당 1×10^3 (in 5% FBS + RPMI-1640 complete media)개의 Mv1Lu cell을 96well plate에 심은 후 TGF- β 1 표준품 또는 여러 농도의 시료를 넣고 5% CO₂가 들어있는 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 최종농도가 5 μ Ci/mL되게 ³H-thymidine 50 μ l를 각 well에 넣고 6시간동안 기다렸다. 세포는 0.05%의 trypsin으로 처리한 후 cell harvester (IH-110, Inotech, Dottikon, Switzerland)로 얻었다. 세포가 걸러진 membrane을 80°C dry oven에서 1시간 동안 건조시킨 후, tube에 넣고 liquid scintillation cocktail (Sigma, USA)을 1mL씩 첨가하였다. ³H-thymidine의 방사능 세기는 liquid scintillation counter (Wallac 1410, Pharmacia, Finland)로 측정하였다.

TGF- β 1의 순도 측정

각 분리단계에서 TGF- β 1의 분리정도는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE (12.5% acrylamide 농도)를 이용하여 분리한 다음, Phast Gel Silver Kit를 이용한 은염색으로 확인하였다.

TGF- β 1의 Western blot assay

최종 분리된 순수한 TGF- β 1 및 각 분리단계에서의 활성분획들의 항원성을 조사하기 위하여 Rabbit anti-human TGF- β 1 monoclonal antibody를 이용하여 Western blot을 실시하였다. 먼저 비환원조건하에서 SDS-PAGE를 행한 다음 겔에서 분리된 단백질들을 Nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 5% Nonfat-dry milk로 2시간 30분 동안 membrane background를 blocking하여 4°C에서 TGF- β 1의 단일항체 (1:1500 dilution)와 12시간 반응시켰다. 다음, TBS-T로 nitrocellulose membrane

을 3번 씻은 후 anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate와 1시간 30분 실온에서 반응시켰다. 이 때 ECL kit와의 반응에서 나온 형광을 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

Sandwich ELISA를 이용한 TGF- β 1의 정량

각 단계에서 얻은 TGF- β 1의 절대량은 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) 회사에서 판매하는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (TGF- β 1 경량용 Quantikine)를 이용하여 다음과 같이 얻어졌다. 이미 capture antibody로 coating된 microtiter plate에 well당 200 μ L의 TGF- β 1 표준품이나 시료를 넣은 다음 3시간 동안 실온에 방치하였다. 다음에 이 well로부터 액체들을 제거한 다음 400 μ L의 wash buffer로 세 번 씻고 여기에서 200 μ L의 TGF- β 1 Conjugate를 넣어 1.5시간 동안 실온에서 방치하였다. 이것을 다시 400 μ L의 Wash Buffer로 세 번 씻은 다음 200 μ L의 Substrate Solution을 넣고 20분 실온에 방치하였다. 여기에서 50 μ L의 Stop Solution을 각 well마다 넣은 30분 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 배양액 속의 TGF- β 1 농도를 계산하였다.

결 과

혈소판으로부터 단백질의 추출

혈소판 10단위를 부수어 산/에탄올 혼합물로 추출한 다음 1M 초산에 용해시킨 단백질 혼합물을 얻었다 (Figure 5, lane 1). 여기에 들어있는 TGF- β 1의 양은 ELISA법으로 측정된 결과 10단위당 약 18 μ g이었다 (Table 1).

겔여과 크로마토그래피를 이용한 TGF- β 1의 정제

추출물을 단백질 분자량의 크기에 따라 분리되는 Sephacryl-100 column에 적용한 결과 여러개의 peak가 나타났다 (Figure 2A). 이 때 각 분획에 대한 TGF- β 1 활성을 염색법으로 측정한 결과 주요 활성분획은 많은 양의 불순단백질들이 나타나는 peak들을 벗어난 저분자 지점인 분획 105-124범위에서 나타났다. 이렇게 TGF- β 1활성이 나타나는 분획들에서 TGF- β 1이 분리된 정도를 알아보기 위하여 각 분획분획에 대하여 비환원 조건하에서 SDS-PAGE를 행한 다음 은염색을 행하였다. 이 결과 분획 106-111에서 TGF- β 1의 band가 진하게 관찰되어 (Figure 2B) 이 분획들을 모아 일부는 분석에 쓰고, 나머지 부분은 다음 분리 단계인 양이온교환 크로마토그래피에 사용하였다. 그 외 고분자물질이 나오는 지점인 분획 42 근처에서도 약간의 활성이 관찰되어, 그 활성물질들을 모아 Western blot을 한 결과 33Kd 근처에서 한 band가 나타났다 (Figure 6, lane 5).

양이온교환 크로마토그래피를 이용한 TGF- β 1의 정제

겔여과 크로마토그래피로부터 부분정제된 TGF- β 1을 단백질 분자들이 가지는 전하의 양에 따라 분리되는 CM-Sepharose column에 주입하여 0-2M 초산암모늄 농도구배로 용출시켜 Figure 3에서와 같은 결과를 얻었다. 이렇게 하여 나타난 여러개의 peak들 중 TGF- β 1활성은 초산암모늄농도 1.1-1.6M인 분획 48-60사이에서 관찰되었다 (Figure 3A). 이들 활성분획들 중 TGF- β 1이 정제된 정도를 알아보기 위하여 각 활성분획에 대한

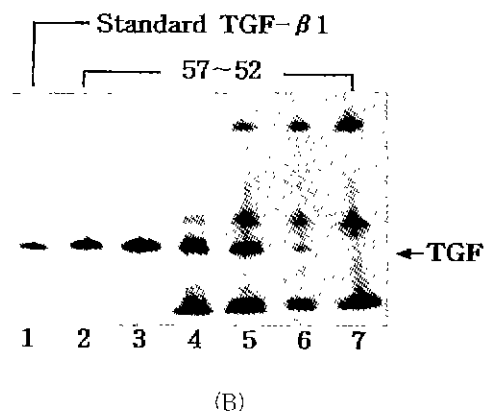
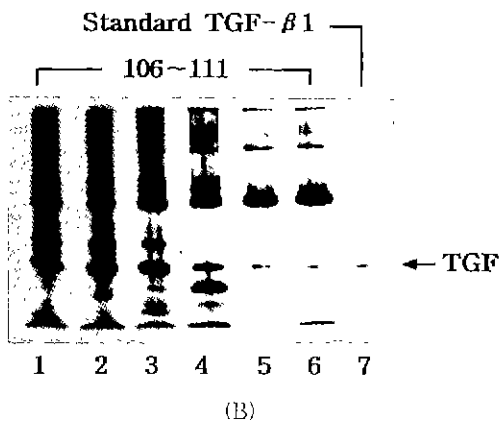
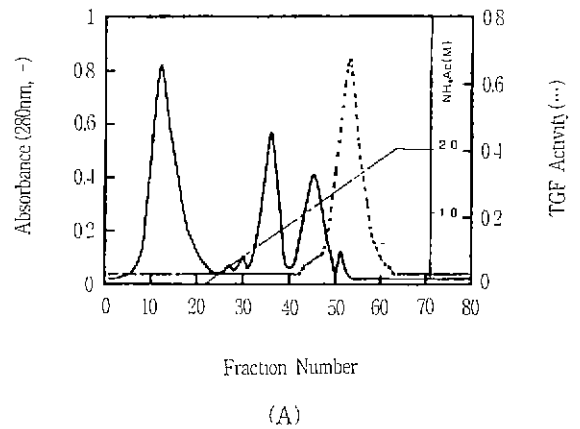
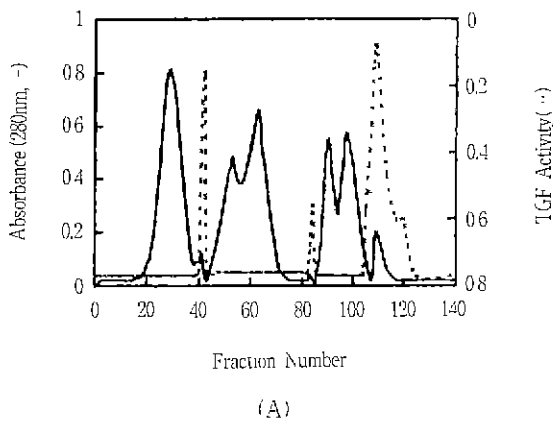


Figure 2 Gel filtration chromatography of crude platelet extract. The platelet extract was dissolved in 2mL of 1M acetic acid and loaded into a Sephacryl-100 column equilibrated with 1M acetic acid. The column was eluted with 1M acetic acid at a flow rate of 12mL/hr. Fractions(3mL) were collected, and the biological activity and purity of TGF-β1 of each fraction were checked (A) Absorbance at 280nm(-) and TGF-β1 activity(· ·). (B) Silver-stained SDS-PAGE of 0.3mL aliquots from selected column fractions with TGF-β1 activity.

Figure 3 Cation exchange chromatography of eluant from gel filtration chromatography. Samples from Sephacryl-100 column were loaded into a CM-sepharose column equilibrated with 1M acetic acid. The column was eluted with a linear gradient of 0~2M NH₄Ac(---) in 1M acetic acid at a flow rate of 48mL/hr. Fractions were collected, and the biological activity and purity of TGF-β1 of each fraction were checked (A) Absorbance at 280nm(-) and TGF-β1 activity(· ·). (B) Silver-stained SDS-PAGE of 0.5mL aliquots from selected column fractions with TGF-β1 activity.

여 변환된 조건하에서 SDS-PAGE를 행한 후 은염색을 하였다 (Figure 3B). 그 결과 양이온교환 크로마토그래피를 거치고 난 후에는 거의 모든 불순단백질들이 제거되었으며 (Figure 3B), 특히 분획 56과 57에서는 매우 순수한 TGF-β1이 얻어졌다 (Figure 3B, lane 2, 3). TGF-β1의 band가 뚜렷하게 관찰되는 분획 54-57들을 모아 일부분은 분석에 쓰고 나머지는 다음분리 단계인 역상 HPLC에 사용하였다.

역상 HPLC를 이용한 TGF-β1의 정제

양이온교환 크로마토그래피에서 얻은 주요 활성분획들을 모아 농축한 다음 분자의 극성차이에 의해 분리되는 역상 HPLC column에 주입하여 0-100% acetonitrile 농도구배로 용출한 결과 잘 분리된 여러 개의 작은 peak들과 두개의 큰 peak가 관찰되었다 (Figure 4A). 주요 peak들에 대해 TGF-β1 활성을 조사한

결과 활성을 띤 TGF-β1은 소수성 영역인 그래피의 뒷부분에서 제일 큰 peak (RT 31.2min)로 용출되었다. 이 peak는 TGF-β1 표준품과 일치한 위치 (Figure 4B, RT31.6min)에서 나타났으며 그 peak에 대해 변환된 조건하에서 SDS-PAGE를 행한 후 은염색을 행한 결과 역시 TGF-β1 표준품과 일치하는 위치 (25Kd)에서 한 개의 band가 뚜렷하게 관찰되었다 (Figure 5, lane 5).

각 정제단계에서의 분리능 및 수율

추출에서부터 역상 HPLC에 이르는 과정에서의 분리능을 알아보기 위해 각 단계에서 얻어진 분획들을 SDS-PAGE를 행한 후 은염색을 행하여 비교하였다 (Figure 5). 두 차례의 상압칼럼 (겔여과 및 양이온교환 크로마토그래피)을 거치는 과정에서 대부분의 불순단백질들이 제거되었다 (Figure 5, lane 2, 3) 한편, 각 단계에서 얻어지는 수율을 알기 위해 각 단계마다에서 얻어지는

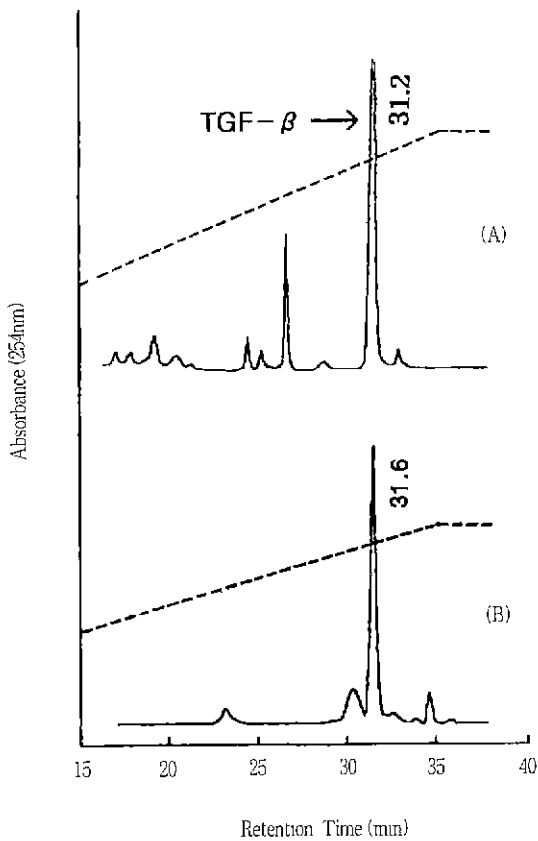


Figure 4. Reverse phase HPLC chromatography of eluant from cation exchange chromatography. Samples from CM-sepharose column were loaded to a Hi-Pore column with C18-alkyl side chains equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (pH 2.2). The column was eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile with 0.1% TFA at a flow rate of 60mL/hr. Each peak was collected, and the biological activity and purity of TGF-β1 of each peak were checked. Absorbance at 280nm(-) and linear gradient(··) were plotted. (A) Samples from CM-sepharose. (B) Purchased standard TGF-β1.

전체 TGF-β1의 양을 ELISA로 측정하였다 (Table 1) 농축사람혈소판 10단위를 추출한 결과 약 18μg의 TGF-β1이 얻어졌으며, 이것을 3차례의 크로마토그래피를 거쳐 분리한 결과 약 37μg (16.8μg/mL)의 순수 TGF-β1이 얻어져 최종 수율은 약 21%였다. 한편, 추출에서 역상 HPLC에 이르는 각 분리단계에서의 수율은 각 단계마다 약 53-65%였다.

Table 1. Summary of purification of human TGF-β1 from Human Platelets.

Purification Step	Recovery (μg)	Yield(%)	
		Step	Overall
Extraction	18	100	100
Sephacryl-100	9.5	53	53
CM-Sephacryl	5.7	60	32
RP-HPLC	3.7	65	21

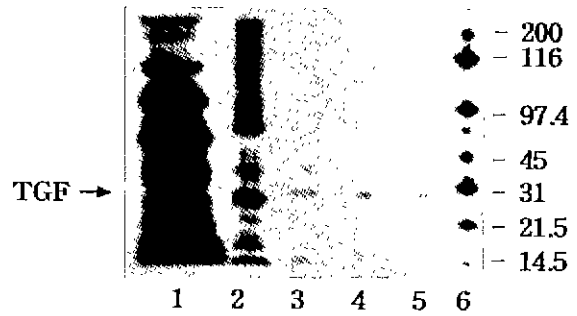


Figure 5. Silver-stained SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of samples from each purification step. Samples from each purification step were checked with SDS PAGE(12.5% gel) under non-reducing condition. Lane 1: platelet extract. Lane 2: eluant from gel filtration chromatography (Fractions 106-111 of figure 2A) Lane 3: eluant from cation exchange chromatography (Fractions 54-57 of figure 3A) Lane 4: Purchased standard TGF-β1 Lane 5: purified TGF-β1 from reverse HPLC. Lane 6: low molecular weight marker

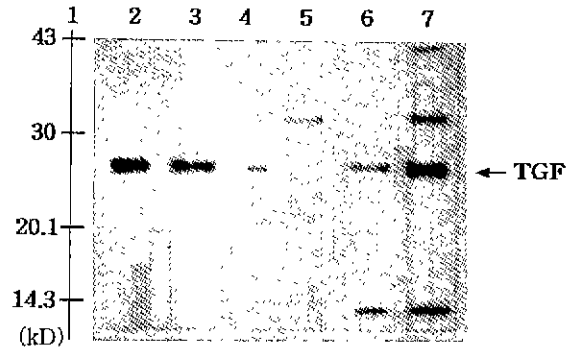


Figure 6. Western blot analysis of samples from each purification step under non-reducing conditions. Lane 1: Positions of the molecular weight markers Lane 2: purchased standard TGF-β1. Lane 3: purified TGF-β1 from the final step of HPLC. Lane 4: eluant from cation exchange chromatography. Lane 5: high molecular weight range fraction with TGF-β1 activity from gel filtration chromatography (Fraction 42 of figure 2A) Lane 6: eluant from gel filtration chromatography (Fractions 106-111 of figure 2A) Lane 7: platelet extract.

각 정제단계에서의 TGF-β1의 항원성 및 안정성

혈소판추출, 겔여과, 양이온교환 크로마토그래피 및 역상 HPLC등의 4단계 분리과정에서 TGF-β1은 시중 그 생물활성을 유지하였으며 Western blot assay를 통하여 그 항원성도 조사해 본 결과 (Figure 6) 최종 정제된 TGF-β1 (Figure 6, lane 3)은 구비된 TGF-β1 표준품 (Figure 6, lane 2)과 일치하게 분자량이 25Kd의 위치에서 한 개의 band로 나타났다. 최종정제된 TGF-β1은 혈소판추출 (Figure 6, lane 7), 겔여과 (Lane 6) 및 양이온교환 (Lane 4) 크로마토그래피를 거치면서 혈소판에 존재하는 TGF-β1이 순수하게 청제되어 생긴 것임을 알 수 있다. 한편, 혈소판추출에서는 25Kd 이외에도 약 33Kd 과 125Kd 근처에서도 TGF-β1 항체와 결합할 수 있는 band

들이 관찰되었으며 (Figure 6, lane 7), 이 중 12.5Kd 근처의 것은 겔여과 크로마토그래피에서의 eluant에서도 나타났으며 (Lane 6), 33Kd은 고분자물질이 나오는 분획 42 근처에 나타났 다 (Lane 5).

정제된 TGF- β 1의 생물학적 활성측정

최종적으로 얻어진 정제된 TGF- β 1의 생물활성을 확인하기 위하여 전체 TGF- β 1의 양을 Sandwich-ELISA (kit)로 갠 다음 같은 양의 TGF- β 1 표준품 (1ng)과 비교하였다. 이를 위해 *mink lung epithelial cell line*인 MV1Lu (ATCC CCL-64)에 대하여 성장저해 실험을 하여 그 억제되는 정도를 비교하였다. 그 결과 정제된 TGF- β 1과 TGF- β 1 순수품은 각각 72%와 65%의 성장저해를 나타내었다 (Data not shown). 또한, ^3H -thymidine incorporation 실험을 통하여 정제된 TGF- β 1에 의한 *mink lung epithelial cell*의 DNA의 합성율이 구매된 TGF- β 1 표준품에 비해 낮은 것으로 나타났다 (Figure 7). 이러한 두 가지 실험 모두로부터 정제된 TGF- β 1이 구매된 TGF- β 1 표준품에 비해 세포에 대한 성장저해 활성이 높은 것으로 확인 되었다.

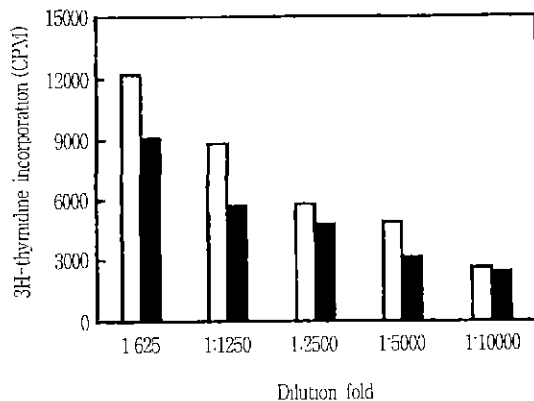


Figure 7. TGF- β 1 bioassay measured by ^3H -thymidine uptake using MV1LU cell line. Various concentration of samples (white bars) or purchased standard TGF- β 1 (black bars) were added to the each well of microtiter plate seed with MV1LU cells. The cells were incubated (37°C, 5% CO_2) for 24hrs at the final concentration of $5\mu\text{Ci/mL}$ ^3H -thymidine, followed by further 6hrs of incubation. Cells were then harvested, and 1mL of liquid scintillation cocktail were added to each well. Intensity of ^3H -thymidine was read by liquid scintillation counter.

고 찰

TGF- β 1을 분리하기 위해서는 여러 분리정제 단계를 거치게 된다. 본 연구에서는 Van den 등의 방법 (21)을 개량하여 혈소판에서 단백질을 추출한 뒤, 겔여과와 양이온교환 크로마토그래피 단계에서 분리능이 높은 Sephacryl-100 및 CM-Sephacryl을 사용하여 초기단계에서 대량의 불순단백질을 제거하였으며 분리의 마지막 단계에서는 역상 HPLC를 이용하여 TGF- β 1의

순도를 높였다. 이러한 방법은 다음과 같은 몇가지 점에서 기존의 방법과 차이를 나타내었다: 먼저, 기존에 이미 알려진 분리과정(22-25)에서는 일반적으로 겔여과 크로마토그래피 단계에서는 요소, 이온교환 크로마토그래피 단계에서는 염농도 구배를 각각 사용하여 용출시켰다. 하지만, 이를 이용하는 경우에는 분리된 TGF- β 1을 분석하기 위해 반드시 모든 column 분획들을 산성 용액에 투석하여 활성화시키는 과정이 필요하게 되어 그 과정이 복잡하였으며 또한 분리과정에서 유효성분이 많이 유실되는 문제가 발생하였다. 하지만 본 연구에서는 용출액으로 초산을 이용하므로 TGF- β 1이 분리과정에서 항상 활성을 나타내어 앞에서 나타난 문제점들을 해결할 수 있었다. 한편, Van den 등의 방법(21)에서는 겔여과 단계와 이온교환 단계에서 Bio-Gel P100과 Bio-Sil TSK CM-2-SW HPLC column을 사용하였는데 이 경우에는 활성분획들이 매우 넓게 퍼져 나올 뿐만 아니라 많은 양의 불순단백질과 함께 용출되어 나오는 등 분리능이 낮게 나타났다. 본 연구에서는 여러 가지 주어진 겔타입 중에서 분리능이 높으면서도 값이 저렴한 상압컬럼 (Sephacryl-100, CM-sepharose)을 선정하여 실험한 결과 활성분획은 불순단백질들의 용출분획에서 멀리 떨어진 지점에서 나타나 그 다음 단계인 역상 HPLC에서의 순수분리를 쉽게 하였다 (Figure 2A and Figure 3A). 이는 겔여과 및 이온교환 크로마토그래피 단계에서는 비싼 장비가 필요한 HPLC 컬럼을 사용하지 않고서도 실험실에서와 같이 상압컬럼만 이용하여도 최종 수율 (21%)은 저하시키지 않으면서도 경제적으로 대량분리가 가능하다는 것을 나타낸다. 그런데, Sephacryl-100을 사용한 겔여과 단계에서는 주요 활성분획 (분획 105-124) 이외에도 분획 42 및 83 부근에서도 소량의 TGF- β 1 활성이 나타났다 (Figure 2A). 이것의 심질을 밝히기 위해 특히 분획 42에 대해 Western blot assay를 행하여 그 항원성을 조사하여 본 결과 33Kd 부근에서 하나의 band로 나타났다 (Figure 6, lane 5). 이러한 band는 혈소판추출 단계에서도 관찰되었다 (Figure 6, lane 7). 이는 혈소판의 산-에탄올 추출과정에서 완전하게 활성화되지 않은 잠재형 TGF- β 1이거나 또는 활성화되었더라도 이 것이 다시 어떤 작은 분자량을 가진 친화성 단백질과 결합한 TGF- β 1이라고 사료된다. 한편, 혈소판 추출액과 겔여과 단계에서 얻은 분획 106-111에서는 12.5Kd 부근에서도 TGF- β 1 항체와 결합할 수 있는 단백질이 관찰되었다 (Figure 6, lane 6, 7). 이는 동종이중체로 구성되어 있는 TGF- β 1가 두개의 subunit로 분리되어 나타난 것으로 사료된다. 그러나, 이러한 불순물들도 최종단계인 역상 HPLC를 거치고 나면 완전히 제거되었다 (Figure 6, lane 3). 또한, Sandwich-ELISA 및 두 가지 bioassay 방법 (Inhibition assay와 ^3H -thymidine incorporation assay)을 통해 *in vitro*에서의 TGF- β 1의 생물학적 활성을 조사한 결과 최종정제된 TGF- β 1가 제조함 DNA 기술을 이용하여 만들어진 구매된 TGF- β 1 순수품보다 활성이 높은 것으로 나타났다 (Figure 7). 이로부터 본 연구에서는 TGF- β 1의 활성에 손상을 적게 주는 분리정제 조건이 사용되었음을 나타낸다. 이러한 분리정제 과정을 거치고 나면 약 $3.7\mu\text{g}$ 의 순수한 TGF- β 1이 10단위의 사람 혈소판으로부터 얻어졌으며 이 때의 최종수율은 약 21%이었다 (Table 1). 이는 Roberts 등(26)이 소의 신장으로부터 얻은 TGF- β 1의 수율 (10%)이나 Assouan 등(22)이 사람혈소판으로부터 얻은 수율 (5%)에 비해 훨씬 높은 수율이며, 파발현된 세포(27)로부터 얻은 수율 (26%)과 비슷하였다. 따라서, 본 연구

에서 사용된 분리정제 방법은 기존에 이용된 방법들보다 경제적 이면서도 보다 높은 효율로 활성을 가진 TGF- β 1을 정제하는 방법으로 이용될 수 있다. 이와 같은 분리정제 방법은 혈소판으로부터 뿐만아니라 TGF- β 1이 과발현된 배양배지로부터 TGF- β 1을 분리정제하는 데에서도 효과적으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

요 약

Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)은 여러 가지 생물학적 활성을 가지는 관례로 의학적 치료제로서 사용될 가능성이 크다. 본 연구에서는 혈소판추출, 젤여과, 양이온교환 크로마토그래피 및 역상 HPLC등 네 단계의 정제과정으로 이루어져 있는 정제공정을 이용하여 TGF- β 1을 값싸고 효율적으로 정제하였다. 이 과정을 거쳐 최종적으로 얻어진 TGF- β 1은 비환원 조건하에서 SDS-PAGE를 행한 결과 구매된 TGF- β 1 표준품과 일치한 위치에서 한 개의 band가 관찰되어 순수하다는 것을 확인하였으며 또한 이 것이 Western blot를 통하여 TGF- β 1 항체와 결합하는 것으로부터 TGF- β 1임을 확인하였다. 또한, mink lung epithelial cell line을 이용한 성장저해 실험을 통해 정제된 TGF- β 1이 구매된 TGF- β 1 표준품보다 조금 높은 활성을 가지는 것을 확인하였다. 최종적으로 농축혈소판 10단위로부터 약 3.7 μ g의 정제된 TGF- β 1이 얻어져 그 최종수율은 약 21%였다.

감 사

본 연구는 96년도 보건과학기술연구개발사업의 지원 (과제번호 : HMP-96-D-1-0011)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Roberts, A.B., and Sporn, M.B (1993), Physiological Action and Clinical Applications of TGF- β , *Growth Factors* 8, 1-9.
2. Zhao Y, and Young S.L.(1996), Requirement of TGF- β type II Receptor for TGF- β -induced Proliferation and Growth Inhibition, *J-Biol-Chem.* 271, 2369-72.
3. Franzen L and Dahlquist D.(1994), The Effect of TGF- β on Fibroblast Cell Proliferation in Intact Connective Tissue *in vitro*, *In-Vitro-Cell-Dev-Biol-Anim* 30A, 460-3
4. Mustoe T.A.(1987), Transforming Growth Factor β Induces Accelerated Healing of Incisional Wounds in Rats, *Science.* 237, 1333-1336.
5. Nall A.V., Brownlee R.E., Colvin C.P., Schultz G., Fen D., Cassisi N.J., Nguyen T., and Kalra A.(1996), TGF β 1 Improves Wound Healing and Random Flap Survival in Normal and Irradiated Rats, *Arch-Otolaryngol-Head-Neck-Surg.* 122, 171-7.
6. Cromack D.T., Porras R.B., Purdy J.A, Pierce G.F., and Mustoe T.A.(1993), Acceleration of Tissue Repair by TGF β 1. Identification of *in vivo* Mechanism of Action with Radiotherapy-induced Specific Healing Deficits, *Surgery* 113, 36-42.
7. Beck L.S., Chen T.L., Hirabayashi S.E., Deguzman L., Lee W.P., McFarridge L.L., Xu Y., Bates R.L., and Ammann A.J.(1990), Accelerated Healing of Ulcer Wounds in the Rabbit Ear by Recombinant Human Transforming Growth Factor- β 1, *Growth Factors.* 2, 273-82
8. Tucker R.F., Shipley G.D., Moses H.L., and Holley R. W.(1984), Growth Inhibitor from BSC-1 Cells Closely Related to Type β Transforming Growth Factor, *Science* (Washington DC) 226, 705-707.
9. Shipley G.D., Pittelknow M.R., Wille J.J.J., Scott R.E., and Moses H.L.(1986), Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type β transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium, *Cancer Res.* 46, 2068-2071
10. Sing G.K., Keller J.R., Ellingsworth L.R., and Rusconi F.W.(1988), Transforming Growth Factor β Selectively Inhibits Normal and Leukemic Human Bone Marrow Cell Growth *in vitro*, *Blood.* 72, 1504
11. Pietenpol J.A., Stein R.W., Moran E., Yaciuk P., Schlegel R., Lvons R.M., Pittelkow M.R., Munger K., Howley P.M. and Moses H.L.(1990), TGF- β 1 inhibition of *c-myc* transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming protein with pRB binding domains, *Cell* 61, 777-785
12. Laiho M., DeCaprio J.A., Ludlow J.W., Livingston D.M., and Massague J.(1990), Growth Inhibitor from BSC-1 Cells Closely Related to Type beta Transforming Growth Factor, *Cell.* 62, 175-185.
13. Twardzik D.R.(1989), Inhibition and Promotion of Differentiated-Like Phenotype of a Human Lung Carcinoma in Athymic Mice by Natural and Recombinant Forms of TGF- β , *Natl. Cancer Inst* 81, 1182-1185.
14. Mullauer L., Brasl-Kraupp B., Bursch W., Schulte-Hermann R.(1996), TGF- β 1-induced Cell Death in Preneoplastic Foci of Rat Liver and Sensitization by the Antiestrogen Tamoxifen, *Hepatology.* 23, 840-7
15. Yamamoto M., Maehara Y., Sakaguchi Y., Kusumoto T., Ichiyoshi Y., and Sugimachi K (1996), TGF- β 1 Induces Apoptosis in Gastric Cancer Cells through a p53-independent Pathway, *Cancer.* 77(8 Suppl), 1628-33
16. Perry R.R., Kang Y., and Greaves B.R.(1995), Relationship between Tamoxifen-induced TGF β 1 Expression, Cytostasis and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells, *Br-J-Cancer.* 72, 1441-6.
17. Lotem J., and Sachs L.(1992), Hematopoietic Cytokines Inhibit Apoptosis Induced by TGF β 1 and Cancer Chemotherapy Compounds in Myeloid Leukemic Cells, *Blood.* 80, 1750-7.

18. Mckael V., Gu Z., Wainberg M.A., and Hiscott J.(1995), Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Multiplication by TGF β 1 and AZT in HIV-1-infected Myeloid Cells. *J-Interferon-Cytokine-Res* 15, 849-55
19. Miyazono K., Ichijo H, and Heldin C (1993), Transforming Growth Factor β : Latent Forms, Binding Proteins and Receptors, *Growth Factors*. 8, 11-22
20. Lawrence D.A., Picher R and Jullien P.(1985), Conversion of High Molecular Weight Latent beta-Transforming Growth Factor from Chicken Embryo Fibroblasts into a Low Molecular Weight Active β -Transforming Growth Factor under Acidic conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 133, 1026-1034.
21. Van den E.R.A J.M, Koornneef L. and Van zoelen E J J.(1988). A New Method for High Yield Purification of Type beta Transforming Growth Factor from Human Platelets, *Biochim Biophys Res. Comm* 157, 16-23.
22. Assoian R.K, Komoriya A., Mevers C A, Miller D.M, and Sporn M.B.(1983), Transforming Growth Factor- β in Human Platelets: Identification of a Major Storage Site, Purification and Characterization, *J. Biol Chem* 258, 7155-7160.
23. Cheifetz S, Weatherbee J A, Tsang M L S, Anderson J.K, Mole J E, Lucas R, and Massague J.(1987), The Transforming Growth Factor System, a Complex Pattern of Cross-Reactive Ligands and Receptors, *Cell*. 48, 409-415
24. Percher R., Jullien P., and Lawrence D A.(1986), The Transforming Growth factor is Stored in Human Blood Platelets as a Latent High Molecular Weight Complex, *Biochim Biophys Res. Comm*, 136, 30-37.
25. Wakefield L.M., Smith D.M, Flanders K.C., and Sporn M.B.(1987), Latent Transforming Growth Factor β from Human Platelets, *J Biol Chem*, 263, 7646-7654
26. Roberts A B, Anzano M.A, Mevers C.A., Wideman J., Blacher R., Pan Y C.E., Stein S, Lehrman R., Smith J M, Lamb J.C, and Sporn M.B (1983), Purification and Properties of a Type beta Transforming Growth Factor from Bovine Kidney, *Biochem*. 22, 5692-5698.
27. Bourdrel L (1993). Recombinant Human Transforming Growth Factor β 1: Expression by Chinese Hamster Ovary Cells, Isolation, and Characterization. *Protein Expression and Purification* 4, 130-140.