

albumin may be quenched by nonradiative energy transfer. In terms of Förster type dipole-dipole nonradiative energy transfer the distance between the Trp-214 and the bound Cu^{2+} in the first copper-binding site was calculated and found to be about 1.20nm.

Key words Fluorescence Quenching, Human Serum Albumin, Metal Ions

大鼠软骨 II 型胶原体外胶原原纤维的形成

付志厚* 张矢远

(西安医科大学骨病研究所, 西安 710061)

提 要

建立了 II 型胶原的提取和纯化方法, 观察大鼠软骨 II 型胶原体外胶原原纤维形成的动力学、胶原原纤维的稳定性和超微结构。结果表明, II 型胶原静止期、增长期分别为 15、120min, 增长期凝胶化速率 0.0060, 凝胶可复性 13.58%, 胶原原纤维呈典型的具有 64nm 周期横纹的自然纤维结构, 但纤维直径较体内增长。这些对研究体内胶原原纤维的形成过程及调节机制具有重要意义。

关键词 原纤维形成, II 型胶原, 软骨

软骨胶原约占软骨湿重的 20—30%, 是软骨基质的主要有机成分。目前发现软骨含有 5 种不同基因类型的胶原, 即 II、VI、IX、X 和 XI 型胶原, 其中 II 型胶原约占 80—90%^[1]。II、IX、XI 型胶原原纤维以 8:1:1 的比例共同构成软骨胶原纤维网, 在三维空间内充分容纳水合的蛋白多糖, 使软骨组织既能承受负荷又具有韧性, 胶原的结构和微构型对维持软骨组织的结构完整和正常功能起重要作用^[2]。

前胶原由软骨细胞合成后, 被分泌到细胞外间质, 经内切肽酶水解去除伸直端前肽, 生成原胶原。原胶原分子 1/4 交错排列, 聚合成具有 64nm 周期横纹的胶原原纤维。体内调节胶原原纤维形成的因素有: (a.) 翻译后修饰, 如胶原的糖化、交联和前肽的去除。(b.) 胶原与其它基质大分子的交互作用, 如与蛋白多糖、纤维连接素和细胞成分 6 μ -16 的交互作用^[3,4]。

体内胶原原纤维的形成是一个复杂的过程, 其机理目前尚不明了。原胶原分子在体外生理条件下可自动聚合成自然纤维, 从而为研究胶原原纤维的形成过程和调节机制提供了良

好的体外模型。有关体外 I 型胶原原纤维形成的研究已有较多的报道^[5,6], 而 II 型胶原原纤维形成的研究国内尚未见报道。软骨含有多种有机成分, 且 II 型胶原可溶性低, 因而软骨 II 型胶原的提取和纯化较其它类型的间质胶原困难, 给研究工作带来不便。本文建立了 II 型胶原的提取和纯化方法, 并观察了大鼠软骨 II 型胶原体外胶原原纤维形成的动力学、胶原原纤维的稳定性及其超微结构。从而为研究 II 型胶原的生理学和病理学提供实验资料。

1 材料与 方法

1.1 II 型胶原的提取和纯化

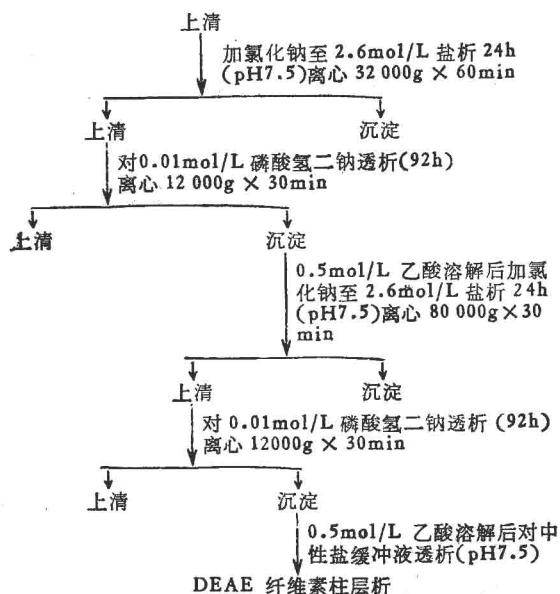
取 2 个半月月龄的 SD 大鼠 12 只, 雌雄各半, 处死, 分离肋软骨及剑突, 将 4 只大鼠软骨随机合并, 称重, 放液氮中备用。

备用样品在 4℃ (以下操作同) 用预冷的 10mmol/L EDTA 溶液将软骨组织匀浆, 12 000

* 现在济南军区总医院骨科工作, 济南 250031。

收稿日期: 1990-11-14 修回日期: 1991-10-04

g 离心 30min, 留沉淀, 用 10 倍体积的 4mol/L 盐酸胍(pH7.5)搅拌 24h, 12 000g 离心 30min, 留沉淀, 加 10 倍体积的 0.5mol/L 乙酸、1/50 胃蛋白酶(酶: 软骨湿重 W/W), 搅拌 48h, 12 000g 离心 30min, 留上清, 然后按以下操作流程进行。



DEAE-纤维素柱层析按 Miller 法^[7]进行。将含胶原蛋白的各管洗脱液合并后, 依次对 0.1 mol/L 乙酸、蒸馏水透析脱盐, 浓缩, 冷冻干燥。

1.2 II 型胶原的鉴定

1.2.1 SDS-PAGE 电泳 参照 Miller 法^[7]进行垂直平板电泳, 采用不连续缓冲系统。将含 0.4% 纯化后的胶原样品缓冲液, 依次取 300 μ l 于 4 个试管中: A. 胶原酶管: 加 0.01% 细菌性胶原酶溶液(酶: 胶原 = 1:10 IU/ μ g)。B. 胰蛋白酶管: 加 0.005% 胰蛋白酶溶液(酶: 胶原 = 1:100W/W)。C. 试剂空白管: 仅加缓冲液。D. DTT 管加二巯基苏糖醇至 0.05 mol/L。置 37℃ 水浴中, 反应 18h, 变性后电泳。

1.2.2 氨基酸分析 称取胶原, 加 6mol/L 盐酸, 110℃ 水解 22h, 取水解液, 用 121-MB 型氨基酸分析仪测定氨基酸含量。

1.3 体外 II 型胶原原纤维的形成

参照 Kujier 法^[8]进行, 胶原浓度为 0.1%,

置 37℃ 恒温, 测 400nm 处光密度, 绘制凝胶化曲线, 计算增长期凝胶化速率 ($\Delta A/\Delta t$)。

1.3.1 凝胶可复性的测定 测定凝胶形成完全时(48h)的光密度, 再移入 4℃ 冰箱中, 放置 48h, 测定光密度。按下式计算凝胶可复性: 凝胶可复性(%)

$$= \frac{A(37^\circ\text{C}, 48\text{h}) - A(4^\circ\text{C}, 48\text{h})}{A(37^\circ\text{C}, 48\text{h})} \times 100\%$$

1.3.2 胶原原纤维的电镜观察 当凝胶形成完全后, 滴加于铜网上, 用 1.0% 磷钨酸负染色 10min, 用 JEM-100SX 透射电镜观察胶原原纤维的结构。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 电泳结果

电泳结果见图 2。由图 1 可见 C 呈一条蛋白区带, A 蛋白区带消失, B 和 D 与 C 相同, 蛋白区带无变化。

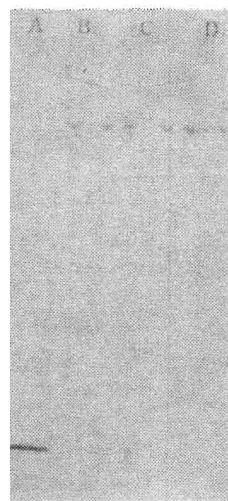


图 1 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of type II Collagen

A: 加细菌性胶原酶; B: 加胰蛋白酶; C: 加缓冲液; D: 加 DTT

A: digested by bacterial collagenase

B: digested by trypsin

C: added with buffer

D: incubated with DTT

2.2 II 型胶原氨基酸含量

结果见表 1。

2.3 体外 II 型胶原原纤维的形成

表 1 II 型胶原氨基酸含量(残基数/1 000 残基 $n = 3$)Table 1 Amino acid composition of type II collagen (Residues/1 000, $n = 3$)

氨基酸名称 Amino acid	大鼠胶原 Collagen from the rat	鸡胶原 Collagen from the chicken ^[9]
天门冬氨酸 Aspartic acid	70(66—73)	44
苏氨酸 Threonine	21(16—24)	25
丝氨酸 Serine	26(25—27)	26
谷氨酸 Glutamic acid	75(68—80)	85
脯氨酸 Proline	98(91—106)	113
甘氨酸 Glycine	315(304—327)	336
丙氨酸 Alanine	125(105—136)	105
缬氨酸 Valine	10(7—12)	19
异亮氨酸 Isoleucine	9(8—10)	7.6
亮氨酸 Leucine	21(19—23)	25
苯丙氨酸 Phenylalanine	9(7—10)	14
赖氨酸 Lysine	17(13—19)	16
组氨酸 Histidine	2(2—3)	2.3
精氨酸 Arginine	41(31—43)	49
羟脯氨酸 Hydroxyproline	95(92—99)	100
羟赖氨酸 Hydroxylysine	66(26—103)	22
酪氨酸 Tyrosine	微量 trace	1.5
蛋氨酸 Methionine	微量 trace	11
合计 Total	1 000	1 001.4

根据浊度变化将凝胶化曲线见(图 2)分为三期:(A)静止期:浊度无增高。(B)增长期:浊度呈直线增高。(C)平台期:浊度增长减慢。

由图 2 可知,大鼠 II 型胶原静止期为 15

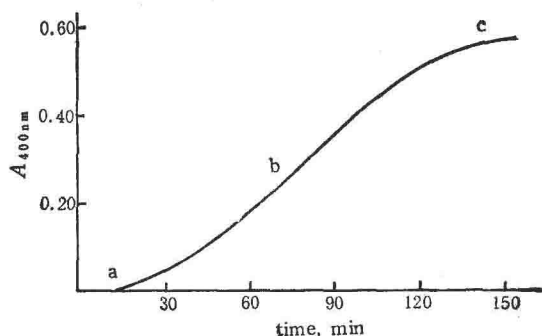
图 2 II 型胶原凝胶化曲线 ($n = 3$)

Fig. 2 Gelatinization curve of type II collagen
A 为静止期; B 为增长期; C 为平台期
A: Lag phase; B: Growth phase; C: Plateau phase

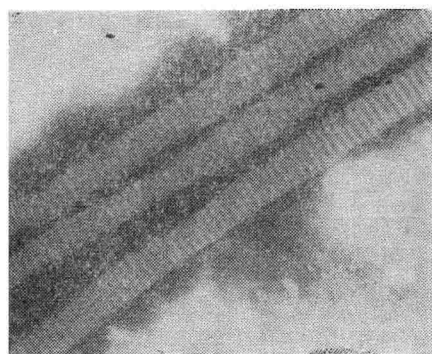


图 3 II 型胶原原纤维的超微结构

Fig. 3 Electron micrograph of fibrils formed in vitro

胶原原纤维呈典型的具有 64nm 周期横纹的自然纤维结构 $\times 20\ 000$

Collagen type II fibrils with typical banding pattern staggered by 64nm, especially for the native fibrils $\times 20\ 000$

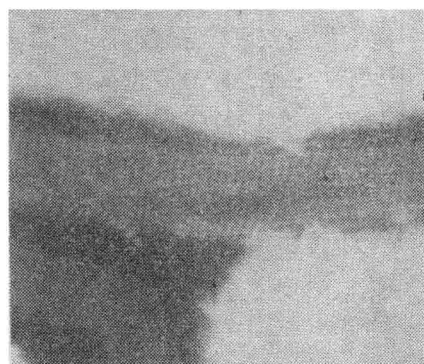


图 4 II 型胶原原纤维的超微结构

Fig. 4 Electron micrograph of fibrils formed in vitro

胶原原纤维横纹清晰,直径达 610nm $\times 20\ 000$

Collagen type II fibrils with clearly banding pattern, 610nm in diameter $\times 20\ 000$

min, 增长期为 120min, 增长期凝胶化速率 0.0060。

大鼠 II 型胶原凝胶可复性为 13.58%。体外形成的 II 型胶原原纤维的直径为 250—610 nm, 其中 251—300nm 的纤维占 62.5%, 平均直径 328nm, 呈典型的具有 64nm 周期横纹的自然纤维结构(见图 3 和图 4)。

3 讨 论

3.1 软骨 II 型胶原的提取和纯化方法

软骨胶原可溶性低, 文献报道在实验前 1—2 周用 β -氨基丙烯酸酯致动物山黧豆中毒, 以抑制胶原交联键的形成, 提高胶原的可溶性^[7]。本文采用限制性胃蛋白酶降解法, 去除部分伸直端尾肽, 螺旋结构不受影响, 既增高胶原的提取量又缩短了实验周期。

软骨蛋白多糖与胶原通过静电引力有交互作用, 影响胶原的可溶性, 并在 II 型胶原提取过程中污染胶原。Miller 等报道可用偏碱性的 Tris 盐酸缓冲液 (pH7.8—8.0) 或盐酸胍去除软骨蛋白多糖^[7]。本文采用盐酸胍去除软骨蛋白多糖后, 再用 DEAE-纤维素柱层析去除提取胶原中的蛋白多糖, 这样可充分地去除非胶原蛋白的污染。

自 70 年代末, 软骨微量胶原 (miner collagen) 相继被发现。除 I 型胶原外, 软骨微量胶原的存在也是影响 II 型胶原纯度的主要原因。本文用选择性盐析和低离子强度的磷酸氢二钠溶液透析, 将 II 型胶原与其它类型的胶原分离, 纯化后的 II 型胶原其电泳图谱及氨基酸残基含量与文献报道^[9-11]相符, 提示 II 型胶原的纯度高。本文 II 型胶原的纯化方法虽较柱层析法^[7]繁琐, 但在无 II 型胶原标准品的条件下, 是一种可靠、实用的方法。

3.2 II 型胶原体外胶原原纤维的形成

原胶原分子在生理条件下, 即 pH 中性、温度 37℃、离子强度 0.225I, 可自动聚合成自然纤维, 其步骤和特点^[12,13]是: a. 开始 (initiation) 胶原单体聚合成结构未明的多聚体, 浊度无增高, 该阶段呈温度依赖性, 但呈浓度非依赖

性。b. 线性增长 (linear growth) 多聚体聚合成直径小于 8nm, 长度大于 1500nm 的丝状原纤维 (Filaments), 浊度无增高, 呈温度非依赖性。c. 侧方增长 (Lateral growth) 丝状原纤维侧方聚合成胶原原纤维, 浊度呈直线增高。该阶段对温度呈依赖性, $T_{\frac{1}{2}}$ 与胶原浓度呈反比。d. 共价交联 (cross-linking) 原胶原分子间形成稳定的共价交联, 当共价交联形成后, 已增高的浊度是非可逆性的。Piez 认为 II 型胶原原纤维的形成过程与 I 型胶原相似^[12], 但体外与体内胶原原纤维的形成过程可能不尽完全相同^[13]。

本文应用 0.05% 胶原浓度时, 在体外 37℃ 下不易形成凝胶, 与牛 II 型胶原^[14]不同, 可能与材料来源或胶原的提取和纯化过程不同有关。Piez 报道 I 型胶原在体外 26℃ 下也可形成凝胶^[13]。本文观察到 II 型胶原在体外 26℃ 下不能形成凝胶, 与文献报道^[14]相符。增长期凝胶化速率是观察体外胶原原纤维形成速度的指标, 本文测得大鼠 II 型胶原凝胶化速率为 0.0060。凝胶化曲线静止期是丝状原纤维形成阶段, 而增长期是胶原原纤维形成阶段^[13]。本文大鼠 II 型胶原静止期和增长期与牛 II 型胶原相近, 但与 I 型胶原^[14]不同, 可能与胶原分子螺旋区结构不同有关。

凝胶可复性是反映体外形成的胶原原纤维稳定性的指标。若纤维稳定性降低, 凝胶可复性则增高。文献报道 I 型胶原需 24h, 原纤维形成完全, 而 II 型胶原则需 48h^[8], 故 II 型胶原凝胶可复性的测定及计算方法与 I 型胶原不同。目前国内外尚未见报道。

软骨新合成的胶原原纤维直径细小, 无横纹或有小于 64nm 周期的横纹, 随着胶原原纤维的成熟, 直径增大, 呈典型的 64nm 周期横纹^[15]。体内 II 型胶原原纤维的平均直径 25—50nm^[16]。本文体外形成的 II 型胶原原纤维呈典型的具有 64nm 周期横纹的自然纤维结构, 但纤维直径较体内增大, 与 Bruns 等报道的鸡软骨 II 型胶原的结果^[17]一致。Miller 等认为这与用限制性胃蛋白酶降解法提取的 II 型胶

原, 伸展端尾肽不完整或缺乏蛋白多糖和微量胶原对原纤维直径的调节有关^[7], 而 Birk 等则认为与体外应用于胶原原纤维形成的液体条件或样品制作成电镜的处理技术有关^[14]。

参 考 文 献

- 1 Mayne R. *Arthritis Rheum*, 1989; 32(2): 241
- 2 Mendler M, Reese L R, Staut P *et al. J Cell Biol*, 1989; 108(1): 191
- 3 Hulmes D J. *Coll Relat Res*, 1983; 3(4): 317
- 4 McDonald J A. *Ann Rev Cell Biol*, 1988; 4(1): 183
- 5 Trelstad R L, Birk DE, Silver FH. *J Invest Dermatol*, 1982; 79: 109s
- 6 Lien Y H, Robert S, Stern P. *Science*, 1984; 225(4669): 1489
- 7 Miller E J, Rhodes R K. In: Canningham I W *et al.* eds, *Methods in enzymolgy*. New York: Academic Press, 1982: 33
- 8 Kujier R, Stadt R J, Koning M H *et al. Connect Tissue Res*, 1988; 17(1): 83
- 9 Trelstad R L, Kang A H, Igarashi S *et al. Biochemistry*, 1970; 9(12): 4993
- 10 Reginato A M, Shapiro I M, Lash J W *et al. J Biol Chem*, 1988; 263(20): 9938
- 11 Miller E J. *Mol Biol Chem*, 1976; 13(3): 165
- 12 Piez K A. In: Prockop D J *et al* eds, *Gene families of collagens and other proteins*. New York: Elsevier North Holland Inc, 1980: 143
- 13 Piez K A. *Connect Tissue Res*, 1982; 10(1): 25
- 14 Birk D E, Silver F H. *Arch Biochem Biophys*, 1984; 235(2): 178
- 15 Dearden J D, Lashen P J, Muller H G *et al. Cell Tissue Res*, 1974; 152: 305
- 16 Hay E D. *J Cell Biol*, 1981; 91: 205s
- 17 Brans R R, Trelstad R L, Gross J. *Science*, 1973; 181(4096): 269

FIBRILLOGENESIS *IN VITRO* OF TYPE II COLLAGEN OF CARTILAGE FROM THE RAT

Fu Zhihou Zhang Shiyuan

(Institute of Endemic Bone Disease, Xian Medical University, Xian 710061)

ABSTRACT

The extraction and purification methods of type II collagen from the rat cartilage were established. Kinetics of fibrillogenesis, stability and ultrastructure of fibrils of type II collagen of cartilage from rats were investigated *in vitro* in this paper. The results indicated that the lag phase and growth phase were 15 and 120 min respectively, gelatinization rate in growth phase was 0.0060, gelatin reversibility was 13.58%, and collagen fibrils showed typically banding pattern staggered by 64nm, especially for the native fibrils, but the diameters of these fibrils were larger than those *in vivo*. These data are of importance for studying the formation and regulation mechanism of collagen fibrils *in vivo*.

Key words Fibrillogenesis, Collagen type II, Cartilage