

度高, 分离效果好, 但电流也相应增大. 我们选择分离室间隙 1.0 mm、1.5 mm, 储备液稀释 10 倍; 间隙 2.0 mm、3.0 mm, 稀释 7 倍, 分离结果较好.

3.7 实验采取 25℃、21℃、18℃ 三种温度. 温度高, 随着电泳时间的增加, 电极腔中的气泡也有增加. 可采用加大电极缓冲液速度等方法, 缓和对试验结果的影响^[4].

3.8 电泳过程中, 采用样品的不同的进样速度, 得到如下结果: 样品进样速度大, 分离样品的两条带间距小; 样品进样速度小则两条带间距大.

3.9 在相同的流速比 (缓冲液流量: 样品流速) 状态下, 样品浓度大, 分离样品的两条带间距小; 浓度小则两条带间距大.

参 考 文 献

- 1 Rickwood D, Hames B D. Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach. 2nd. Oxford: IRL Press, 1990. 17~ 45
- 2 Hanning K, Heidlich H-G. Free flow electrophoresis: an important preparative and analytical technique for biology, biochemistry and diagnostics. Darmstadt: GIT verlag, 1990. 114~ 118
- 3 McDonnell Douglas Corporation. Electrophoresis Operations in Space. USA, 1986. 1~ 15
- 4 Hidesaburo K, Naoaki I, Shunji N. Bioprocessing in microgravity: free flow electrophoresis of *C. elegans* DNA. Journal of Biotechnology, 1996, 47: 367~ 376

- 5 Hannig K. New aspects in preparative and analytical continuous free flow cell electrophoresis. Electrophoresis, 1982, 3: 235~ 243
- 6 Snyder R S, Rhodes P H, Miller T Y. Polystyrene latex separations by continuous flow electrophoresis on the space shuttle. Separation Science and Technology, 1986, 21 (2): 159~ 185
- 7 Michael J C, Balmann H R, Sanchez V *et al.* Purification of biological molecules by continuous flow electrophoresis in the second international microgravity laboratory. Journal of Biotechnology, 1996, 47: 341~ 352
- 8 李 钦, 李 丽, 钱世钧等 (Li Q, Li L, Qian S J *et al.*). 连续自由流电泳样机的研制. 生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics), 1998, 25 (4): 338~ 340

Application of Continuous Flow Electrophoresis System LI Li, LI Qin, WANG Zhao-jie, YE Jun, QIAN Shi-jun (*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Two types of protein mixture of hemoglobin and cytochrome c were separated successfully with continuous flow electrophoresis. The result that separated samples were inspect using UV and PAGE relates to many parameters such as gap of separation chamber, flowing velocity of sample, flowing velocity of buffer, pH, conductance and power.

Key words separation chamber, cytochrome c, hemoglobin, buffer

钙离子通道 A23187 对血小板聚集和蛋白质磷酸化的影响*

陈日炎 江黎明¹⁾ 覃燕梅 梁念慈

(广东医学院生化教研室, 湛江 524023)

摘要 以 ^{32}P - Na_2HPO_4 标记猪血小板, 在阿斯匹林阻断花生四烯酸代谢, Apyrase 去除分泌的 ADP 情况下, 以 A23187 和 PMA 为血小板激动剂, staurosporine 为 PKC 抑制剂, 研究 Ca^{2+} 和蛋白激酶 C 在血小板聚集中的作用. 结果表明, a. A23187 在 1~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 引起血小板聚集, 相应地, 明显地引起 40 ku、20 ku 蛋白质磷酸化, 且存在剂量和时间效应关系. b. A23187 和 PMA 在血小板聚集和蛋白质磷酸化上都存在着协同效应. c. 1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine 可大部分抑制 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187 诱导的血小板

* 国家自然科学基金资助项目 (39070505). ¹⁾ 广东医学院附属医院中心实验室, 湛江 524001.

收稿日期: 1997-04-10, 修回日期: 1998-01-12

聚集和 20 ku、40 ku 蛋白质磷酸化。结果提示, Ca^{2+} 激活血小板是建立在激活 PKC 的基础上, Ca^{2+} 通过激活 PKC 诱导血小板聚集, 这是 Ca^{2+} 激活血小板的主要途径。

关键词 A23187, PMA, 血小板聚集, 蛋白激酶 C

学科分类号 R91, R341

在血小板的受体激活途径中, 激动剂与血小板膜上的相应受体结合, 激活肌醇磷脂专一的磷脂酶 C 使 PIP_2 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate) 分解为 DG (sn 1, 2-diacylglycerol) 和 IP_3 (inositol 1, 4, 5-triphosphate), DG 和 IP_3 作为第二信使, 分别使蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活和使细胞内贮存的 Ca^{2+} 释放出来, 从而产生细胞效应^[1]。在血小板中 20 ku 和 40 ku 蛋白质是 PKC 最明显的两个底物^[2]。40 ku (47 ku) 也称 pleckstrin; 20 ku 也作为 Ca^{2+} / calmodulin 依赖的肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 的底物, 称作肌球蛋白轻链 (MLC)。钙离子通道 A23187 (calcium ionophore A23187) 可使细胞质膜对钙通透和细胞器内贮存的 Ca^{2+} 释放, 从而升高胞质的钙浓度^[3], PMA 和 DG 有着相似的化学构成, 可以代替 DG 作为 PKC 的激动剂, 它与 DG 不同的是不易代谢转化, 可持久地激活 PKC。尽管前些年人们对不同生理性激活剂引起血小板 PKC 激活和 Ca^{2+} 释放研究较多, 但是人们对 Ca^{2+} 和 PKC 在血小板聚集激活中的作用仍了解不太清楚, Ca^{2+} 和 PKC 激活的协同效应也未十分清楚^[1]。有实验提出 PKC 激活血小板聚集和分泌不是 Ca^{2+} 和 TXB_2 依赖性的^[4]; 也有人认为血小板聚集存在着 Ca^{2+} 依赖途径和蛋白质磷酸化两条途径^[5]。本实验在阿斯匹林阻断花生四烯酸代谢, Apyrase 去除分泌 ADP 情况下, 以 A23187、PMA 和 PKC 抑制剂 staurosporine 为工具药, 研究 Ca^{2+} 和 PKC 在血小板聚集中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

凝血酶、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)、A23187、 PGE_1 、Apyrase、Aspirin、丙烯酰胺 (Acr)、乙二醇-双 (2-氨基乙基

醚)-N, N, N', N'-四乙酸 (EGTA) 均为 Sigma 产品。N, N'-亚甲基双丙烯酰胺, 考马斯亮蓝 R-250 为 Fluka 产品, 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和低分子质量标准蛋白质为上海生物化学研究所产品, ^{32}P - NaH_2PO_4 为中国原子能科学研究院产品, X 光胶片为 AGFA 产品。其余试剂均为市售分析纯。血小板容器均为硅化玻璃或塑料制品。血小板聚集仪为上海科达仪器厂生产的 PPP 自动平衡血小板聚集仪。

1.2 血小板分离和标记

猪血以 1/2 体积 ACD (1.5% 柠檬酸, 2.5% 柠檬酸钠, 2% 葡萄糖) 抗凝, 血小板分离和标记按文献 [2] 进行。

1.3 血小板聚集测定

取悬浮于 Hepes 缓冲液中的血小板悬浮液 0.2 ml, 37℃ 保温 2 min, 加入激动剂或抑制剂, 记录聚集情况。

1.4 血小板 [Ca^{2+}] 的测定

新鲜猪血以 0.15 体积 ACD 抗凝, 150 g 室温离心 10 min, 取富含血小板血浆, 加入 1 mmol/L Aspirin, 37℃ 保温 15 min, 加 2 $\mu\text{mol/L}$ PGE_1 , 沉淀用适量冲洗液 (123 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 葡萄糖, 13 mmol/L 柠檬酸三钠) 洗涤一次, 然后悬浮于 Hepes 缓冲液 (20 mmol/L Hepes, 138 mmol/L NaCl, 2.9 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl_2 , 5 mmol/L 葡萄糖) 中, 另加 0.6 U/ml ADPase, 0.1% BSA, 血小板浓度为 $3 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}/\text{L}$, 加入 Fura-2AM 使终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 37℃ 保温 40 min, 不时缓慢摇动, 然后 800 g 室温离心 10 min, 沉淀以上述 Hepes 缓冲液洗一次, 最后血小板悬浮于含 10 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 或 1 mmol/L EGTA 的 Hepes 缓冲液 (无 BSA) 中制成 $3 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}/\text{L}$ 悬液, 室温静置 30 min 后, 于 Perkin-

Elmer LS50B 上测定 $R_{340/380}$, $[Ca^{2+}]_i$ 由公式 $[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{F_o (R - R_{min})}{F (R_{max} - R)}$ 计算, $K_d = 224 \text{ nmol/L}$, R_{max} 通过当存在 $1 \text{ mmol/L } Ca^{2+}$ 时加入 Triton-100 (0.1%) 破坏细胞来测定, 然后加入 3 mmol/L EGTA 螯合全部 Ca^{2+} , 以测定 R_{min} , F_o 和 F 分别是 1 mmol/L EGTA 和 $1 \text{ mmol/L } Ca^{2+}$ 存在时, $\lambda = 380 \text{ nm}$ 的荧光强度.

1.5 血小板蛋白质磷酸化反应

在 37°C 水浴保温进行, 0.5 ml 标记血小板悬浮液加到 2 ml 塑料离心管中, 加入搅拌子, 搅拌 1 min , 加入血小板激动剂或抑制剂保温 1 min , 加 10% 三氯醋酸 (TCA) 终止反应, $10\,000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ 离心沉淀蛋白质, 以 90% 冷丙酮洗二次, 去除非标记的 $^{32}\text{P}-\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 和 TCA.

1.6 血小板蛋白 SDS-PAGE 与放射自显影

磷酸化反应后的蛋白质样品中加入 0.2 ml 样品缓冲液 [62 mmol/L Tris , 12.5% 甘油 (质量体积比), 0.05% 溴酚蓝, $\text{pH } 6.8$] 在 100°C 水浴 10 min , 每孔上样量为 $40 \mu\text{l}$, 浓缩胶 3% , 分离胶为 10% , 电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色, 真空干燥凝胶. 将干燥的电泳凝胶与 X 光胶片包好, 于 -20°C 冰箱中曝光 $3 \sim 7 \text{ d}$, 冲洗 X 光片, 则得自显影片.

2 结 果

2.1 A23187 诱导的血小板内钙浓度变化

随着 A23187 浓度的增加, 血小板内钙浓度增加 (表 1). 从表 1 可看出, 在有钙 ($10 \mu\text{mol/L}$) 或无钙 (1 mmol/L EGTA) 介质中, A23187 都可以使细胞内钙增加. 当 A23187 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, 在 $10 \mu\text{mol/L } Ca^{2+}$

下, 血小板发生聚集 (图 1), 但在 1 mmol/L EGTA 中, 却不发生聚集; 当 A23187 浓度达 $15 \mu\text{mol/L}$ 时, 无论在有钙或无钙介质中, 血小板都可以发生聚集, 但聚集率下降 $50\% \sim 60\%$ (结果略).

2.2 A23187 诱导血小板聚集和蛋白质磷酸化

A23187 诱导血小板聚集浓度为 $1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$, 聚集发生迅速, 在 2 min 内达最大聚集 (图 1), 在相应的聚集浓度 ($1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$) 范围内, 能明显地诱导 40 ku 和 20 ku 蛋白质磷酸化 (图 2a), 且随着时间增加, 40 ku 蛋白质磷酸化明显增加 (图 3).

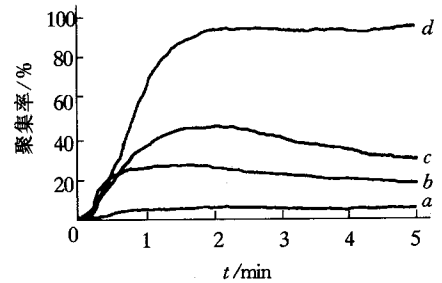


图 1 不同浓度 A23187 诱导的血小板聚集
a : 对照 ; b : $10 \mu\text{mol/L}$; c : $15 \mu\text{mol/L}$; d : $20 \mu\text{mol/L}$.

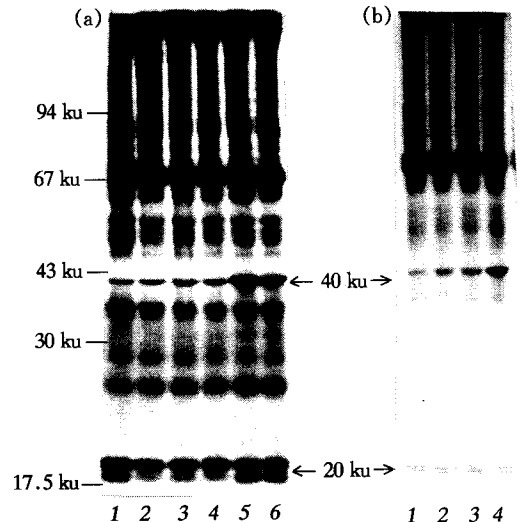


图 2 不同浓度 A23187 诱导的血小板蛋白质磷酸化放射自显影

(a) 剂量效应. 1: 对照; 2: 20 nmol/L ; 3: 200 nmol/L ; 4: $2 \mu\text{mol/L}$; 5: $15 \mu\text{mol/L}$; 6: $20 \mu\text{mol/L}$. (b) 与 PMA 协同效应. 1: 对照; 2: 20 nmol/L PMA ; 3: $5 \mu\text{mol/L A23187}$; 4: $20 \text{ nmol/L PMA} + 5 \mu\text{mol/L A23187}$.

表 1 A23187 在不同外钙条件下诱导的血小板内钙增加

处理	内钙浓度/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	
	$10 \mu\text{mol/L } Ca^{2+}$	1 mmol/L EGTA
对照	102.4 ± 5.6	63.0 ± 6.8
A23187 ($5 \mu\text{mol/L}$)	121.8 ± 5.2	105.5 ± 8.9
A23187 ($10 \mu\text{mol/L}$)	258.3 ± 10.6	192.7 ± 12.1
A23187 ($15 \mu\text{mol/L}$)	984.5 ± 12.8	526.7 ± 10.5

注: $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

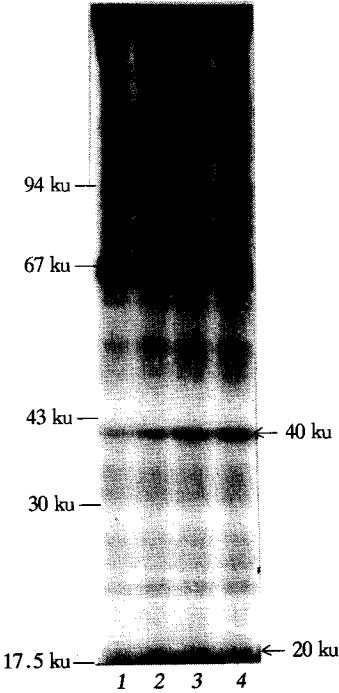


图3 不同时间 A23187 诱导的血小板蛋白质磷酸化放射自显影
10 $\mu\text{mol/L}$ A23187 与血小板作用. 1: 0.5 min; 2: 1 min; 3: 2 min; 4: 5 min.

2.3 A23187 和 PMA 的协同作用

10 $\mu\text{mol/L}$ A23187 和 20 nmol/L PMA 在 5 min 内诱导的血小板最大聚集率分别为 43% 和 40%，当相同浓度的 A23187 和 PMA 同时加入血小板悬液时，聚集率达 96%（图 4），显示 A23187 和 PMA 诱导血小板聚集有协同效应。相应地，在 40 ku 和 20 ku 蛋白质磷酸化上，也存在协同效应（图 2b）。

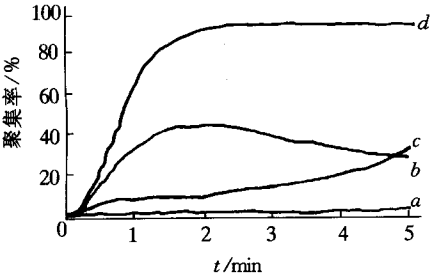


图4 A23187 和 PMA 诱导血小板聚集的协同作用
a: 对照; b: 10 $\mu\text{mol/L}$ A23187; c: 20 nmol/L PMA; d: 10 $\mu\text{mol/L}$ A23187+20 nmol/L PMA.

2.4 Staurosporine 抑制 A23187 诱导的作用

从图 5 可以看出，1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine 可大部分抑制 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187 诱导的血小板聚集，相应地，1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine 可完全抑制 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187 诱导的蛋白质磷酸化（图 6）。

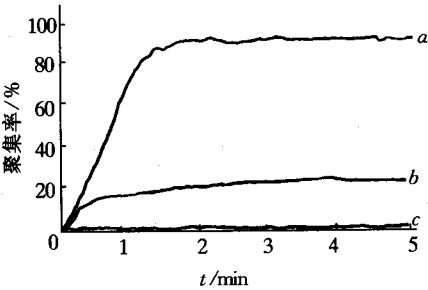


图5 Staurosporine 抑制 A23187 诱导的血小板聚集
a: 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187; b: 1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine + 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187; c: 对照.

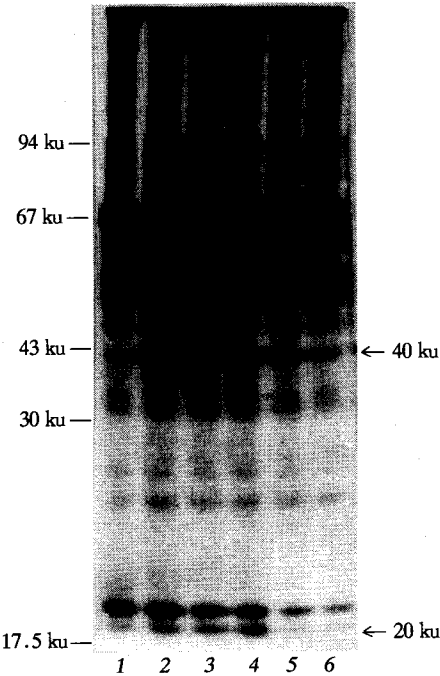


图6 Staurosporine 抑制 A23187 诱导的血小板蛋白质磷酸化放射自显影
1: 对照; 2~6: 分别加入 staurosporine 浓度为 3、30、100、300 和 1000 nmol/L 温育 1 min 后，加入 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187.

3 讨 论

Ca^{2+} 在血小板中的作用是广泛的, 也是复杂的. 血小板内钙浓度升高, 血小板会被激活, 大部分激动剂都有升高血小板内钙的作用. 内钙升高对血小板变形和分泌有重要作用, 膜结合钙能使纤维蛋白原受体 (GPIb/IIIa) 保持完整, Ca^{2+} 在血小板的聚集中起着必要作用. $0.1 \sim 1 \text{ mmol/L}$ 的钙或 Mg^{2+} 是纤维蛋白原与其受体结合所必需的, 在血小板聚集中, Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 和纤维蛋白原是必需的. 用 GPIb/IIIa 单抗专一结合研究表明, PKC 激活和 IP_3 释放的 Ca^{2+} 都能使纤维蛋白原受体暴露^[6]. 这些事实表明, PKC 激活可使纤维蛋白受体暴露, 从而使血小板发生聚集. A23187 没有受体, 也不直接水解磷脂产生 DG、磷脂酸 (PA)、肌醇磷酸酯 (IP_x)^[7], A23187 没有直接激活 PLC (phospholipase C), 导致 PIP_2 水解, 只是使细胞内钙浓度升高, 导致细胞效应, 在某些实验条件下 A23187 可激活 PLA2 (phospholipase A2) 诱导花生四烯酸 (AA) 释放、促 EPS (endoperoxides), TXA_2 (thromboxane A2) 生成、ADP 释放^[8]. 本实验在 Aspirin 阻断花生四烯酸代谢, Apyrase 去除分泌的 ADP 下进行 (实验中加入 $10 \mu\text{mol/L}$ ADP 血小板仍然不聚集, 结果略). 因此, 我们认为 A23187 和 PMA 分别升高细胞内 Ca^{2+} 和激活 PKC 而引起细胞效应.

细胞内钙增加的主要来源有: 一是细胞外钙进入; 二是细胞器 (如内质网) 内钙的释放; 三是细胞膜上结合钙的释放. 有实验显示^[9], A23187 可使上述三种状态下的钙释放, 使胞内钙升高, 从表 1 和图 1 看出, 随着 A23187 浓度的增加, 细胞内钙浓度都明显增加, 血小板发生聚集. 当细胞悬液中加入 EGTA 络合胞外钙时, 加入 A23187 时仍可以升高细胞内钙, 诱导血小板聚集, 这表明在有或无细胞外钙情况下, A23187 可以促使细胞内贮存的钙释放, 使血小板发生聚集激活. 细胞内钙升高, 通过什么途径进一步激活血小

板, 这是我们要进一步讨论的问题.

A23187 诱导血小板聚集较快, 在 2 min 内可以达最大聚集, 从图 3 可看出, 随着时间和聚集增加, 40 ku 和 20 ku 蛋白质磷酸化明显增加, 同时, 随着 A23187 浓度增加, 蛋白质磷酸化也增加, 血小板聚集程度增加. 也有实验显示^[10], 脱氧佛波酯 (12-deoxyphorbol 13-phenylacetate 20-acetate) 在亚聚集剂量下, 加入 A23187, 能大大增加 40 ku (47 ku) 蛋白质磷酸化和血小板聚集, 但对激活分泌作用不存在协同作用. 因此, A23187 诱导的聚集主要是由钙引起, 而非由分泌作用引起, 因为分泌作用引起的二相聚集不可能发生这样迅速. 关于蛋白质磷酸化引起聚集, 还是聚集引起蛋白质磷酸化的问题, 蛋白质磷酸化是在激动剂与血小板接触时发生, 而血小板聚集是在血小板激活后, 发生在血小板之间的事件. 在有 A23187 存在时, 假如不搅拌, 血小板不发生聚集, 但是蛋白质磷酸化还是发生 (结果略), 可见蛋白质磷酸化是血小板聚集的原因, 随着 PKC 的激活, 蛋白质磷酸化增加, 血小板也就发生聚集. 我们认为, A23187 增加细胞内钙浓度, 激活 PKC, 而导致血小板聚集.

PKC 最初被发现时, 是一种可以被钙依赖的中性巯基蛋白水解酶水解激活的蛋白激酶^[11]. 蛋白激酶 C 可以被钙依赖性的巯基蛋白水解酶分解成两个部分. 一部分是与膜结合的亲脂部分, 另一部分是含有催化亚基的亲水部分, 后者在没有钙、磷脂或 DG 下, 充分显示其活性, 还有一类 Ca^{2+} 依赖的巯基蛋白水解酶, 在 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 时, 可以水解激活 PKC^[12]. 因而在完整细胞中, 由于钙浓度的增加, 激活蛋白水解酶, 从而水解激活 PKC. 也有实验显示, A23187 能使 [^3H] - PdBu 与血小板结合增加, 也就是内钙的增加激活 PKC (Ca^{2+} mobilization primes PKC)^[13]; 在完整血小板中, 无论是激动剂还是非激动剂引起内钙升高, 都可以增加 PKC 与 PdBu 或内源性 DG 结合力^[14]. 也就是细胞内钙的升高, 可以激活 PKC, 因而我们认为, 在完整

细胞中, 由于钙浓度升高, 促使 PKC 向细胞膜移动, PKC 和膜上磷脂结合, PKC 被激活.

Nishizuka^[1]认为, 在血小板中, Ca^{2+} 和 PMA 协同作用是分别通过钙途径和 PKC 途径激活血小板的. 从我们结果看来, 在血小板聚集中, Ca^{2+} 途径和 PKC 途径并不是独立的, 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加可以激活 PKC, Ca^{2+} 可以通过激活 PKC 而起作用. 大部分激动剂首先引起 Ca^{2+} 的增加, 然后才引起大量 DG 的形成^[15], Ca^{2+} / Calmodulin 依赖的肌球蛋白轻链 (20 ku) 磷酸化比 PKC 依赖的 40 ku 蛋白磷酸化先出现^[16], 这样 Ca^{2+} 就有足够时间触发 PKC, 即使少量 DG 存在, 甚至只有完整细胞膜磷脂存在, Ca^{2+} 也能激活 PKC, 诱导血小板聚集. 因此, Ca^{2+} 与 PMA 协同效应是建立在共同激活 PKC 的基础上.

Staurosporine 作为较专一的, 较强的 PKC 抑制剂, 抑制血小板聚集同时也抑制蛋白质磷酸化, 且抑制浓度也一致. 但实验中 $1 \mu\text{mol/L}$ Staurosporine 几乎完全抑制 $20 \mu\text{mol/L}$ A23187 诱导的 40 ku 蛋白质磷酸化, 却不能完全抑制 A23187 诱导的血小板聚集. 也有报道^[5] $1 \mu\text{mol/L}$ staurosporine 只是部分抑制 $1 \mu\text{mol/L}$ PAF、 $3 \mu\text{mol/L}$ ADP、 500 nmol/L A23187 诱导的血小板聚集, 完全抑制 400 nmol/L PdBu (phorbol dibutyrate) 诱导的聚集, 但实验中只是加 $10 \mu\text{mol/L}$ 消炎痛 (Indomethacin) 而没加 Apyrase 消除分泌 ADP 的影响. Staurosporine 抑制血小板 PKC 后这种不强的血小板聚集, 可能是钙依赖的肌动蛋白重排而导致血小板激活^[17], 或者由于血小板的制备方法不同和 Ca^{2+} 作用的复杂性引起. 有人认为它可通过 Ca^{2+} / calmodulin 依赖的 MLCK 激活引起血小板聚集^[18], 但从我们结果看来, staurosporine 完全抑制 PKC 的 40 ku 底物磷酸化, 同时也完全抑制 Ca^{2+} / calmodulin 依赖的 20 ku 底物磷酸化, 因而不是 Ca^{2+} / calmodulin 依赖的 MLCK 激活而使血小板聚集. 只要 staurosporine 抑制 PKC 活性, 血小板聚集就受到抑制, Ca^{2+} 诱导 PKC 激活是血小板聚集的主

要原因.

结果表明, Ca^{2+} 升高伴随着 PKC 激活, 血小板发生聚集; Ca^{2+} 和 PMA 的聚集协同作用是建立在 Ca^{2+} 激活 PKC 基础上; 若 PKC 受抑制, Ca^{2+} 诱导的血小板聚集也受抑制. 因此, 我们认为, Ca^{2+} 通过激活 PKC, 诱导血小板聚集, 这是 Ca^{2+} 激活血小板的主要途径.

参 考 文 献

- 1 Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992, **258** (23): 607~ 614
- 2 陈日炎, 江黎明, 覃燕梅等 (Chen R Y, Jiang L M, Qin Y M *et al*). PKC、PKA 和 TPK 在血小板激活中的作用. *生物化学杂志* (Chinese Biochemical Journal), 1995, **11** (5): 584~ 588
- 3 Rink T J, Sage S O. Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol*, 1990, **52**: 431~ 449
- 4 Murphy C T, Westwick J. Selective inhibition of protein kinase C effect on platelet-activating factor-induced platelet functional responses. *Biochem J*, 1992, **283** (Pt1): 159~ 164
- 5 Waston S P, Hambleton S. Phosphorylation-dependent and independent pathways of platelet aggregation. *Biochem J*, 1989, **258** (2): 479~ 485
- 6 Gabbeta J, Yang X, Sun L *et al*. Abnormal inside-out signal transduction-dependent activation of glycoprotein IIb/IIIa in a patient with impaired pleckstrin phosphorylation. *Blood*, 1996, **87** (4): 1368~ 1376
- 7 Lepetina E G, Reep B, Waston S P. Ionophore A23187 stimulates phospholipase C activation. *Life sci*, 1986, **39** (8): 751~ 759
- 8 Rittenhouse S E. Activation of human platelet phospholipase C by ionophore A23187 is totally dependent upon cyclo-oxygenase products and ADP. *Biochem J*, 1984, **222** (1): 1030~ 1110
- 9 Jancinova V, Nosal R, Petrikova M. Evidence on the role of three calcium pools in Ca^{2+} ionophore A23187 stimulated rat platelet aggregation. *Cell Signal*, 1992, **4** (5): 525~ 530
- 10 Brooks S F, Gordge P C, Toker A *et al*. Platelet protein phosphorylation and protein kinase C activation by phorbol esters with different biological activity and novel synergistic response with Ca^{2+} ionophore. *Eur J biochem*, 1990, **188** (2): 431~ 437
- 11 Inoue M, Kishimoto A, Takai Y J *et al*. Studies on a cyclic nucleotide independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *Biol Chem*, 1977, **252** (21): 7610~ 7616
- 12 Kishimoto A, Kajikawa N, Shiota M *et al*. Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J Biol Chem*, 1983, **258** (2): 1156~ 1160
- 13 Siew W, Lepetina E G. Ca^{2+} mobilization primes protein kinase C in human platelet. Ca^{2+} and phorbol esters stimulate platelet aggregation and secretion synergistically through

- protein kinase C. Biochem J, 1988, **255** (1): 309~ 318
- 14 Takaya J, Kimura M, Lasker N *et al.* Phorbol 12, 13-dibutyrate binding to intact human platelets. the role of cytosolic free Ca^{2+} . Biochem J, 1991, **278**: 411~ 4114
 - 15 Sag S O, Rink T J. Kinetic differences between thrombin-induced and ADP-induced calcium influx and release from internal store in fura-2 loaded human platelet. Biochem Biophys Res Commun, 1986, **163** (3): 1124~ 1128
 - 16 Daniel J L, Molish I R, rigmaiden M *et al.* Evidence for a role of myosin phosphorylation in the inhibition of the platelet shape change response. J Biochem Chem, 1984, **259** (15): 9826~ 9831
 - 17 Hartwig J H. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. J Cell Biol, 1992, **118** (6): 1421~ 1442
 - 18 Waston S P, McNally J, Shipman L J *et al.* The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelet. evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol triphosphate by thrombin. Biochem J, 1988, **249** (2): 345~ 350

Effects of A23187 on Platelet Aggregation and Protein Phosphorylation.

CHEN Rí yan, JIANG Lì ming, QIN Yarr mei, LIANG Niarr ci
(Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjing 524023, China).

Abstract To study further the role of Ca^{2+} and protein kinase C in platelet aggregation, suspen-

sions of aspirin-treated, ^{32}P -prelabelled, washed pig platelets containing ADP scavenger in the buffer were stimulated by Ca^{2+} ionophore A23187 and PMA, a stimulator of protein kinase C. The results indicated that: (1) 1~ 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187 induced platelet aggregation, as well as the phosphorylation of 40 ku and 20 ku proteins. There were dose-response and time-response effects of the protein phosphorylation in A23187-induced platelet activation. (2) A23187 and PMA were synergistic in platelet aggregation and protein phosphorylation. (3) Staurosporine, a protein kinase C inhibitor, in concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$, largely suppressed platelet aggregation and completely suppressed phosphorylation of 40 ku and 20 ku proteins induced by 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187. The results imply that Ca^{2+} mobilization alone could activate protein kinase C in platelet, and Ca^{2+} -induced platelet aggregation is largely dependent on activation of protein kinase C.

Key words A23187, PMA, platelet aggregation, protein kinase C

人 I 型胶原基因第一内含子调节转录的研究

陈俊杰 杨绍华¹⁾ 王若菡 彭文珍²⁾ 马英红 刘智敏 李昌龙

(华西医科大学重组 DNA 研究室, 成都 610041)

摘要 人 I 型胶原 $\alpha 1(I)$ 链 (COL I A1) 基因内含子序列在不同细胞内有不同的转录调节活性. 报道了含人 COL I A1 基因内含子 I 不同区段 (+ 544~ + 855 和 + 820~ + 1 093) 的重组质粒 pSCEP-CAT 和 pSCIP-CAT 的构建并转染人胚肌腱成纤维细胞和 Tca 8113 舌癌细胞. 地高辛标记抗 CAT-ELISA 检测结果显示: pSCEP-CAT 在两种细胞均获表达; pSCIP-CAT 在人成纤维细胞未表达, 但在舌癌细胞其表达量明显高于 pSCEP-CAT. 这表明人 COL I A1 基因内含子 I + 544~ + 855 区段增强氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 表达; + 820~ + 1 093 区段则抑制人成纤维细胞但显著增强舌癌细胞的 CAT 表达.

关键词 胶原基因, 内含子, 人成纤维细胞, 转录调节, 报告基因, 酶联免疫吸附分析

学科分类号 Q523

¹⁾ 中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031. ²⁾ 华西医科大学医学分子生物学研究室, 成都 610041.

收稿日期: 1997-05-02, 修回日期: 1997-10-30