

- 11 Sekiya F, Atoda H, Morita T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 1993, **32** (27): 6892~ 6897
- 12 Sekiya F, Yamashita T, Morita T. Role of calcium (Ca^{2+}) ions in the recognition of coagulation factor IX and X by IX/X-bp, an anticoagulant from snake venom. *Biochemistry*, 1995, **34** (31): 10043~ 10047

The Binding of the Anticoagulation Factor II from the Venom of *Agkistrodon acutus* with Activated Factor X. XU Xiao-Long, LIU Qing-Liang, WU Shuang-Ding (Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China).

Abstract Anticoagulation factor II (ACF II) from the venom of *Agkistrodon acutus* forms a 1:1 complex with activated coagulation factor X (F Xa)

in the presence of Ca^{2+} ions. The result that ACF II fails to form a complex with F Xa in the absence of Ca^{2+} ions indicates that the binding is in the Ca^{2+} -dependent manner. ACF II is a new member of the IX/X-bp family, and has a similar amino acid composition to the other members of this family. It is composed of 251 amino acid residues with a relative molecular mass of 29 468.1, determined by MALDI-TOF-MS. ACF II prolongs plasma prothrombin time (PPT) in the dose-dependent fashion and exhibits marked anticoagulant activity only at the concentration higher than the critical concentration (12 nmol/L) of ACF II.

Key words binding protein, anticoagulation factor, activated coagulation factor X, calcium ion

蛋白凝胶基质的制备与基质内的血管生成反应*

李福洋 药立波 杨静华

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 利用肝素亲和层析从血清中提取玻璃粘连蛋白 (vitronectin), 以硫酸铵沉淀法从血浆中粗提含纤维蛋白原的复合蛋白质组分, 向血浆蛋白、胎牛血清和 DMEM 组成的复合成分中加入凝血酶, 制成蛋白质凝胶。观察血管内皮细胞在此基质上或在基质中的生长及在碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的诱导下形成的血管样结构。结果表明血管内皮细胞可粘附在此凝胶基质表面正常生长, 在 bFGF 的诱导下, 内皮细胞向胶内迁移、生长并形成管状结构, 多个管状结构连接、融合形成毛细血管网状结构。

关键词 血管生成, 细胞外基质, 凝胶基质

学科分类号 Q71

血管生成, 即从原有毛细血管或毛细血管后血管生长出新血管的过程, 这个过程主要包括内皮细胞的活化、血管基底层降解、内皮细胞的沿细胞外基质迁移和增殖、相连并分化形成管状结构, 然后血管外基质层的形成以及基质细胞的聚集包裹等形成成熟的血管^[1]。在血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的血管生成过程中, 渗漏到血管外的血浆蛋白通过纤维蛋白原的聚合形成胶状细胞外基质, 可作为内皮细胞迁移和形成血管的结构支架^[2, 3]。本研究从血浆中粗提含纤维蛋白原的复合蛋白质组分并在体外进行蛋白质聚合过程制备蛋白质凝胶, 并尝试以此凝胶模拟细胞外基质的作用, 观察血管内皮细胞在此基质中的血管生成。

1 材料和方法

1.1 材料

人血浆由第四军医大学西京医院血库提供, 牛血浆由西安高新技术开发区奶业所提供。凝血酶、胶原酶为 Sigma 公司产品, 胎牛血清、DMEM 培养基及碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 为 Gibco 公司产品, 肝素-Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品; 24 孔培养板为美国 Nunc 公司产品。

BT 325 细胞株由北京神经外科研究所惠赠。

* 国家杰出青年自然科学基金资助课题 (39825113, 39625023)。

Tel: (029) 3374513, E-mail: Bioyao@fmmu.edu.cn

收稿日期: 1999-08-23, 修回日期: 2000-01-06

1.2 方法

1.2.1 牛主动脉血管内皮细胞 (bovine aortic endothelial cell, BAEC) 的培养: 方法参照文献 [4]. 取新生牛主动脉, 止血钳夹住一端, 灌入 0.2% 胶原酶溶液, 扎住另一端, 室温消化 10 min, 吸出消化液, 2000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 转接到含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养, 用抗 VIII 因子相关抗原抗体进行免疫组化鉴定.

1.2.2 三维凝胶基质的制备: a. Vitronectin 提取方法参照文献 [5]. 向血浆中加入尿素至 8 mol/L, 将变性的血浆-尿素溶液过肝素-Sepharose 4B 亲和层析柱, 用 8 mol/L 尿素洗涤至基线, 再以 8 mol/L 尿素-0.5 mol/L NaCl 洗脱; 去离子水中透析除尿素, 紫外定量. 将纯化的蛋白质包被到培养板上, 观察对 BAEC 贴壁过程的影响. b. 含纤维蛋白原复合蛋白组分的制备. 以 40% 饱和的硫酸铵粗提血浆蛋白, 去离子水中 4℃ 透析 2×24 h 后, 转移到 0.15 mol/L NaCl 中透析 2×6 h, 以 0.25 μm 孔径的滤膜过滤除菌. c. 凝胶制备. 取等体积的血浆蛋白提取液、胎牛血清和 DMEM 混合并加入 vitronectin 至 20~100 mg/L, 再加入约 0.1~1 U 凝血酶, 混匀后迅速以 0.4~0.5 ml/孔铺于 24 孔培养板. 静置 10 min 后凝胶稳定形成.

1.2.3 血管内皮细胞在凝胶基质表面的生长: 将蛋白质凝胶铺在 24 孔培养板内, 静置 10 min 后将约 2×10^3 个 BAE 细胞铺于凝胶顶层, 在含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 48 h, 观察细胞的生长与形态变化.

1.2.4 血管内皮细胞在凝胶基质中的血管生成: 将 20 ng bFGF 滴在数张直径约 0.25 cm 的醋酸纤维素薄膜上, 晾干, 将膜置于培养板孔内, 然后倒入凝胶基质, 再将内皮细胞接种在凝胶顶层, 培养 48~72 h, 观察细胞形态的变化.

2 结果

2.1 Vitronectin 的提取与凝胶的制备

经过 8 mol/L 尿素变性条件下的肝素亲和层析纯化, 得到分子质量大小分别为 78、65、61 ku 的三个成分, 其中以 78 ku 和 65 ku 为主, 61 ku 为 vitronectin 降解片段 (图 1). 内皮细胞粘附分析证实此纯化的蛋白质有显著的促进细胞粘附作用: 经过 vitronectin 包被的培养板, BAE 细胞在接种后 30 min 就有 90% 以上细胞贴壁, 而仅包被明胶的

对照孔 BAE 细胞只有 50% 左右贴壁, 完全贴壁需 2 h. 将血浆粗提蛋白与胎牛血清、DMEM 和凝血酶混合后 1~10 min 可成胶, 胶体透明, 在倒置显微镜下不影响观察.

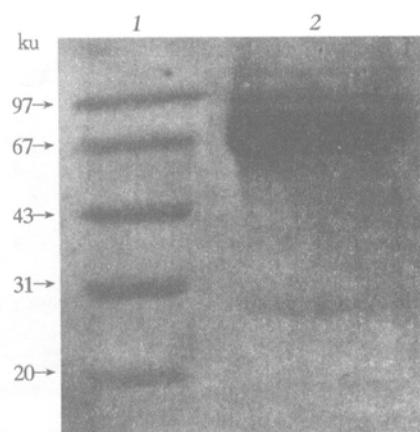


图 1 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯化的 vitronectin
1: 蛋白质分子质量标准; 2: 纯化的 vitronectin.

2.2 血管内皮细胞在凝胶表面的生长

BAE 细胞可在凝胶表面贴附并生长, 细胞形态与在普通培养板表面生长基本一致, 呈多角形. 细胞只在凝胶表面生长, 并不向胶内生长, 如图 2.

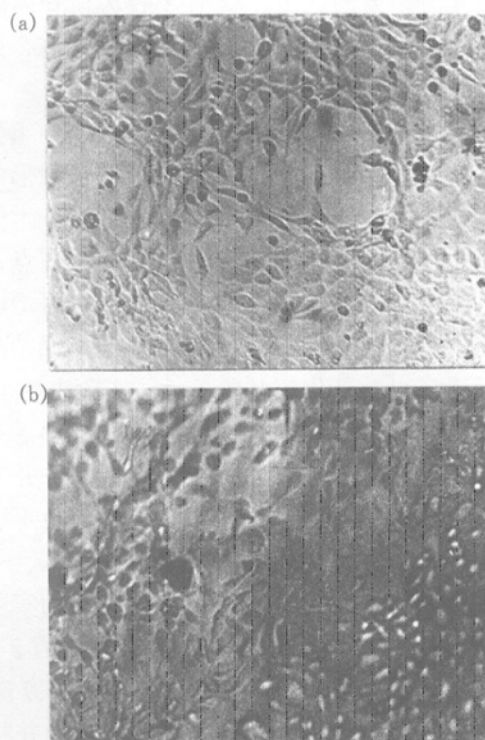


图 2 BAE 细胞在凝胶表面的生长

(a) 培养在普通培养板表面的 BAE 细胞; (b) 培养在凝胶表面的 BAE 细胞.

2.3 血管内皮细胞在凝胶基质中的血管生成

在 bFGF 的诱导下, 凝胶顶层的内皮细胞形态发生变化, 由原来的多角形变成长梭形, 并向凝胶

基质中延伸生长, 形成管状结构, 如图 3a; 多个管状结构交叉连接, 在基质中形成三维网状结构, 如图 3b.

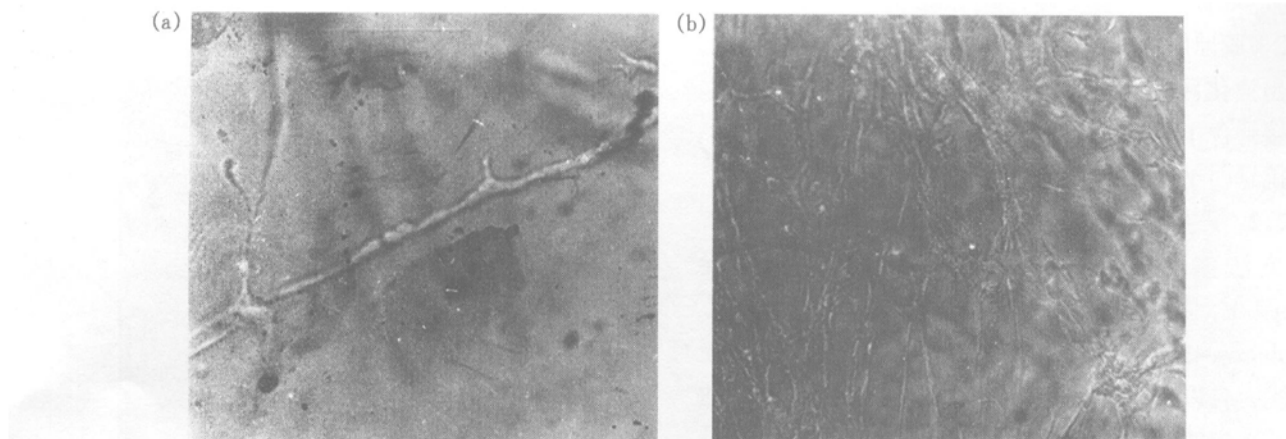


图3 BAE细胞在凝胶基质中血管样结构的形成

(a) BAE细胞在凝胶基质中形成的管状结构 ($\times 200$); (b) BAE细胞在凝胶基质中形成的毛细血管样结构 ($\times 100$).

3 讨 论

血管生成是一个复杂的过程, 除了需要促血管生成因子的刺激, 还需要细胞与细胞之间、细胞和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 间的相互作用, 其中细胞与 ECM 间的相互作用在血管生成中起着十分重要的作用, ECM 不仅为血管内皮细胞提供粘附刺激, 使其保持存活和特有形态, 还为其提供迁移和形成血管的结构支架^[2, 3].

从血浆中粗提含纤维蛋白原的复合蛋白组分可在凝血酶的作用下在体外发生蛋白质聚合并形成蛋白质凝胶. 粘附过程是内皮细胞与 ECM 发生作用的基础, 纤维蛋白可为内皮细胞提供粘附位点, 向胶中加入细胞粘附分子——玻璃粘连蛋白可增加粘附位点. 粘附作用是内皮细胞保持形态、保持存活和生长迁移以及分化的必要条件. 实验表明 BAE 细胞可粘附在此凝胶表面, 保持正常形态存活并生长, 但在没有血管生成刺激信号的情况下, 并不发生定向迁移, 细胞不向胶体内生长, 因而也不能形成管状结构.

在血管生成之初, 需要新生血管组织的实质细胞或间质细胞分泌血管生长因子, 并向血管扩散, 被激活的内皮细胞逆血管生长因子扩散方向在 ECM 内作趋化性迁移、生长, 细胞间相连并粘附在 ECM 上分化形成管状结构^[6], 为了观察 bFGF 刺激血管内皮细胞在凝胶基质内生成血管的作用, 我们将 BAE 细胞培养在凝胶顶层表面, 而将 bFGF

加在滤膜上并置于凝胶底部或内部, 这样模拟趋化过程. 实验中观察到在血管生成促进因子 bFGF 的诱导下, 血管内皮细胞向基质内迁移、生长, 并在此基质胶中形成管状结构, 进而形成立体网状血管样结构. 结果表明: 本实验方法制备的蛋白质凝胶可用以模拟细胞外基质的作用, 并可作为三维基质分析血管生成过程.

参 考 文 献

- 1 Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 1997, **386** (4): 671~ 674
- 2 Dvorak H F, Brown L F, Detmar M, *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995, **146** (4): 1029~ 1039
- 3 Senger D R. Molecular framework for angiogenesis. *Am J Pathol*, 1996, **146** (2): 439~ 442
- 4 Folkman J. Long term culture of bovine capillary endothelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 5217~ 5221
- 5 Yotahgo T, Izumi M, Kashiwagi H, *et al.* Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct Funct*, 1988, **13** (4): 281~ 292
- 6 Folkman J, D'Amore. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 1996, **87** (11): 1153~ 1155

Preparation of Protein Gel Matrix and Angiogenesis of Vascular Endothelial Cell in the Gel. LI Fu-Yang, YAO Li-Bo, YANG Jing-Hua (Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China).

Abstract Vitronectin was purified from human plasma by heparin affinity chromatography and rough plasma protein containing fibrinogen was isolated from human plasma by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation. Protein gel was generated by addition of thrombin to the complex composed of plasma protein, bovine fetal serum and DMEM. Bovine aortic endothelial cell (BAEC) was plated on the gel matrix and the growth, vascular formation of endothelial cell in the

gel were observed. The results demonstrated that BAEC can adhere to the gel surface and grow normally as grow on the culture plate, while under the induction of bFGF, BAEC can migrate into the gel and form vascular-like structure in the gel matrix. Many vascular-like structures can link to each other to form capillary net structure.

Key words angiogenesis, extracellular matrix, gel matrix

菌紫质膜光电响应系统的功能模块研究*

杨俭华 钱 霞

(首都师范大学物理系, 北京 100037)

摘要 引进 Hong 的化学电容概念, 将菌紫质膜光电响应系统 (SPRBM) 抽象为 G-电容、N-电容、质子泵通道和质子返回通道等模块, 构筑了功能模块框图模型. 用该模型导出了 SPRBM 的冲击响应电流、“铁/紫膜/胶/铜”光电池的电势分布表达式及等效电路模型.

关键词 菌紫质, 膜, 模型, 光电响应

学科分类号 Q632

对前景广阔的菌紫质膜光电响应系统 (SPRBM) 研究, 大多围绕光化学分子过程进行. 我们则从整体上讨论该系统, 在引进 Hong^[1,2] 的化学电容概念后, 把它抽象为四个功能模块. 即, 表示膜 C 端、N 端化学电容及并联电流源的 G-电容模块, N-电容模块, 质子泵通道模块和质子返回通道模块. 以此构筑了功能模块框图模型. 模型指出 SPRBM 的电荷来源于并联于 G-电容、N-电容的电流源. 模型又指出, SPRBM 中的微分响应成分是由 G-电容和 N-电容的存在所决定, 而直流成分则决定于“质子返回通道”的存在. 前者因 G-电容和 N-电容的存在而普遍出现, 后者则因返回

通道的不常存在而不普遍出现. 该结论与实验结果较为一致. 依据于该模型, 我们将光循环的多态简化为基态和激发态两态, 并定义 N 为受激分子数, η 和 K_i ($i=1, 2$) 为交直流成分比及相关的动力学系数. 导出了 SPRBM 的冲击响应电流, 它可描述 SPRBM 光电响应的部分特征.

$$h(t) = N \delta(t) - [k_1 \eta - k_2(1-\eta)](N^{-(k_1+k_2)t})$$

应用 $y(t) = h(t) * i(t)$ ($y(t)$ 和 $i(t)$ 为系统输出和输入, $*$ 为卷积) 就可模拟系统响应.

依据该模型及双电层理论, 我们还获得了“铁/紫膜/胶/铜”光电池^[3]在光激发瞬时的电势分布表达式及其分布图 (图略):

$$\begin{aligned} \phi(0) &= F[\text{Br}^*] \left[\frac{C_m + C_n}{C_m C_n + C_c(C_m + C_n)} - \frac{C_m}{C_m C_c + C_n(C_m + C_c)} \right] \\ \phi(d) &= F[\text{Br}^*] \left[\frac{C_m}{C_m C_c + C_c(C_m + C_n)} - \frac{C_m + C_c}{C_m C_c + C_n(C_m + C_c)} \right] \end{aligned}$$

其中, $\phi(X)$ 为电势分布, d 为膜界面间距 (原点为 C 端界面), F 为法拉第常数, $[\text{Br}^*]$ 为激发态分子浓度, C_m 、 C_c 和 C_n 分别为膜电容、C 电容和 N 电容.

最后, 用模型还获得“铁/紫膜/胶/铜”光电池的

等效电路模型. 该等效电路模型对脉冲光、阶跃光和矩形波光的电流和电压响应和实验结果较为一致.

* 北京市教委资助课题, 首都师范大学重点课题.

Tel: (010) 62542873, E-mail: Y-JH@BJ163.COM

收稿日期: 1999-10-14, 修回日期: 2000-02-18