

CNIC-01412
NLNM-0001

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE
AND TECHNOLOGY REPORT

蛋白 C 系统功能调节及致血栓形成因素的研究
THE FUNCTION REGULATION OF PROTEIN C
SYSTEM AND NOVEL HIGH RISK
OF VENOUS THROMBOSIS

(In Chinese)



中国核情报中心
原子能出版社

China Nuclear Information Centre
Atomic Energy Press

图书在版编目 (CIP) 数据

中国核科技报告 CNIC-01412, NLNM-0001: 蛋白 C 系统功能调节及致血栓形成因素的研究/金坚等著. —北京: 原子能出版社, 1999. 11

ISBN 7-5022-2102-6

I. 中... II. 金... III. 核技术-研究报告-中国 IV. TL-2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 53998 号

原子能出版社出版 发行

责任编辑 孙凤春

社址: 北京市海淀区阜成路 43 号 邮政编码: 100037

中国核科技报告编辑部排版

核科学技术情报研究所印刷

开本 787×1092 mm 1/16 印张 3/2 字数 21 千字

1999年 12 月北京第 1 版 1999年 12 月北京第 1 次印刷

印数: 1—150

定价 5.00 元



金坚：博士，中国核医学国家重点实验室研究员。

JIN Jian: Ph. D. Research professor of State Key Laboratory of Nuclear Medicine, P. R. China.

CNIC-01412
NLNM-0001

蛋白 C 系统功能调节及致血栓 形成因素的研究

金 坚 陶永辉 张莲芬 张荣军 张满达 王博诚
(核医学国家重点实验室, 无锡)

何 杨 白 霞 阮长耿
(苏州医学院, 苏州)

摘 要

从人血浆和人尿中纯化了蛋白 C 系统各组分及抗凝血酶Ⅲ。免疫家兔产生了抗血清, 氯胺 T 法, Iodogen 法和 Bolton-Hunter 法制备了碘标记化合物。采用平衡法建立了放射免疫分析方法。所有方法的最低可测限均小于 10 $\mu\text{g/L}$, 回收率在 94.30%~105.22%之间, 未见与因子Ⅱ和凝血酶的交叉反应。采用所建的放射免疫分析法和流式细胞技术分析了蛋白 C 系统在内皮细胞表面的功能表达和调节。建立了简单、可靠, 适于分析 APC 耐性的 APC-APTT 方法和可明确因子 V 纯合子和杂合子 G1691A 点突变的聚合酶链反应方法。结果表明, 中国和其他地区的黄种人因子 V G1691A 点突变发生率显著低于欧洲白种人, 而 APC 耐性并不低。提示中国等黄种人群有独立于因子 V G1691A 点突变以外的因子 V 或因子Ⅷ突变点存在的可能或存在其他致 APC 耐性因素等。

The Function Regulation of Protein C System and Novel High Risk of Venous Thrombosis

(In Chinese)

JIN Jian TAO Yonghui ZHANG Lianfen ZHANG Rongjun
ZHANG Manda WANG Bocheng
(National Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi)

HE Yang BAI Xia RUAN Changgeng
(Suzhou Medical College, Suzhou)

ABSTRACT

The procedures for isolation and purification of PC, PS, PCI and antithrombin III (ATIII) from human plasma and TM from human urine were developed. Five RIAs were also developed, on the equilibrium method, by raising the antisera in rabbits. ^{125}I -PC, ^{125}I -PS and ^{125}I -ATIII were prepared using the chloramine-T method, ^{125}I -PCI by Iodogen method and ^{125}I -TM by Bolton-Hunter method. All of their sensitivities were below 10 $\mu\text{g/L}$, and the ranges of recovery rates were 94.30% to 105.22%. The cross reactivities of these methods with factor II and thrombin (Th) were negligible. The functional regulation of protein C system with flow cytometry and the five RIAs was investigated. On the basis of the five RIAs. The technique of APC-APTT was developed, which is a simple and reliable method to detect APC-resistance. A PCR was also developed for identification and verification of G1691A transition or point mutation of factor V on homozygotes and heterozygotes. Even though the diagnostic level of APC-APTT were the same as. It is observed that factor V G1691A mutation incidence on Chinese is much lower than on North European. There may be other factors about APC-resistance, such as factor VIII mutation or factor V mutation but not on G1691A in Chinese.

前 言

凝血瀑布反应过程中的每个反应阶段均受相应机制的制约, 如果不加限制, 可导致纤维蛋白原转变成纤维蛋白, 血栓形成。血凝调节的近期研究表明有三种主要途径, 即 (1) Serpins 家族成员抗凝血酶 III (Antithrombin III, AT-III) 对凝血瀑布反应中心反应产物凝血酶 (Thrombin, Th) 及其他丝氨酸蛋白酶的抑制或灭活途径; (2) 以灭活因子 VIII_a (Factor VIII_a, FVIII_a) 和因子 V_a (Factor V_a, FV_a) 为反应主体, 从而影响内外源凝血活化途径交汇处因子 X 活化和凝血酶原酶形成的蛋白 C 系统 (Protein C system, PCS) 途径; (3) 阻断 FVIII_a-组织因子复合物活性的脂蛋白相关的凝血系统抑制物和外源途径抑制物途径。这三种主要途径联合作用抑制凝血系统的蛋白酶和辅因子活性, 以调节血凝状态与生理条件相适应^[1]。

PCS 是由蛋白 C (PC)、蛋白 S (Protein S, PS)、血栓调节素 (Thrombomodulin, TM) 和蛋白 C 抑制物 (Protein C inhibitor, PCI) 所组成。自 1976 年 Stenflo 以纯化的 PC 证明了 Th 具有抗凝活性以来, 先后阐明了 PS, TM 和 PCI 在系统中的作用, 建立了 PCS 的抗凝反应体系和途径。随着技术的进步、新的致血栓形成因素地发现及 PCS 调节和成分功能表达信息的积累, 促使人们又将 PCS 列入了研究工作热点, 为阐明血栓疾病的发病机制增添了新的内容。从 PCS 参与反应的成份结构看, 主反应体系, 尤其是 PC 的激活, PS 辅佐灭活 FV_a 和 FVIII_a 是膜或磷脂依赖的已得到了肯定。Th 是 PC 激活反应的唯一生理性活化剂, 在体外纯化体系中, 激活过程相当缓慢且受 Ca²⁺ 的抑制。Th 是一个由二硫键连接的双链蛋白酶, 活性中心位于 β 链。α-Th 的三维空间结构测定和计算机模拟分析显示其有多个表面 "exosites", 可与许多大分子底物、辅因子、细胞表面受体和血浆中的抑制物相互作用。Th 自身与 TM 的反应部分尚不明确, 但可以肯定的是非 Th 活性中心, 这已有 DFP-Th 与 TM 结合的 K_d 相同而证明。Th 与 TM 结构中第 5, 6 个 EGF 重复区域可逆结合成 1:1 的复合物 (K_d 为 0.48 nM), 引起 Th 大分子构象、反应特异性改变, 阻碍了 Th 自身催化的凝血反应, 特别是对纤维蛋白形成。因子 V 活化和血小板活化可因复合物形成受到抑制^[2]。这种复合物可与 PC 结合, 并加速 PC 重链 N 端 Arg₁₂-Leu₁₃ 位裂解, 释放 12 肽残基, 转化成具有丝氨酸蛋白酶活性的活化的 PC (Activated protein C, APC)。与 Th 和 TM 结合反应不同的是, PC 结合成三元复合物是 Ca²⁺ 依赖的^[3]。令人费解的是, PC 所含的 Ca²⁺ 结合部位 γ-COOH Glu 和 β-OH Asp 对 TM 介导的 PC 活化似乎不是必需的, 只是有利于膜表面 TM 的结合。PC 究竟是与 Th-TM 复合物中的哪个成份结合至今不明。多数倾向于整个复合体, 并受 TM 的调节, 原因是 TM 第 4~6 个 EGF 区域包含 PC, Th 的结合部位。

PCS 参与辅助激活 PC 的 TM 结构研究显示除与 Th 结合的第 5 个 EGF 区域外, TM 还含有与 PC 相互作用的第 4 个 EGF 区域, 这似乎提示 TM 自身可结合 PC, 起到局部浓聚 PC, 便于由 Th 主导的 PC 激活反应。问题是 TM 自身是否有激活 PC 的能力, 还是与 Th 结合后才暴露与 PC 结合的 EGF 区域参与辅助激活 PC? 除了 TM 以外, 内皮细胞和血小板表面还存在着另一种 Th 受体, 该受体的功能研究阐明了一个受体被酶水解并自动激活的崭新机制, 但这种受体与 PC 激活的关系至今尚未明确^[4]。TM 除了有 PC 激活反应的辅因子活性和抑制 Th 激活纤维蛋白原的直接抗凝活性外, 尚有 AT-III 依赖性抗凝活性。

这种结论的实验基础是 Th-TM 复合物保留着与 AT-III 的结合能力,而这种结合是受 TM 结构中的硫酸软骨素的含量所调节的^[2]。需要进一步明确的是 AT-III 是否参与 PC 系统抗凝反应的控制。另外, PCS 的调节因子 PCI 灭活 APC 反应环境和高含量 γ -COOH Glu PC 的膜亲和性与 Th-TM 复合物的关系也需探讨。

已明确的遗传性和获得性血栓形成倾向疾病包括 AT-III, PC, PS 缺乏和抗磷脂综合征, 阵发性夜间血红蛋白尿等。PCS 是凝血调节的关键成分, APC 与它的辅因子 PS 共同抑制 FV_a 和 FVIII_a。遗传性凝血倾向与 PC 和 PS 缺陷均有关, 与 AT-III 一起, 在 8%~12% 的凝血倾向病人中可发现这三个抑制因子的缺陷^[2]。1993 年, Dahlback 等报道, 在一位从 19 岁开始有多次静脉血栓形成发生的 50 岁患者身上, APC 不能延长其白陶土部分凝血活酶时间测定 (APTT)。其数个亲属也有反复发生血栓形成的情况, 加入 APC 也不能延长血浆凝固时间。先证者及其亲戚都有正常水平的 AT-III, PC 和 PS, 也没有抗磷脂抗体和其他明显的危险因素。这种被 Dahlback 称为 APC 耐性的现象可由加入正常血浆消除, 故作者认为其原因可能是缺乏一个 APC 辅助因子^[3]。后来的研究提示这个因子就是因子 V 的一个未被认识的功能, 且该区域应位于远离其活性中心。荷兰 Leiden 血栓研究小组采用分子生物学技术发现, APC 耐性的表型与因子 V 基因的单个点突变的杂合性或纯合性有关^[3]。Dahlback 等认为由 APC 耐性引起的静脉血栓形成可达全部静脉血栓形成的 40%~60%, 说明在普通人群中这种基因突变的频率很高^[3]。建立 APC 耐性的分析方法, 可以预期哪些人可能会由于基因突变而最终导致血栓形成。鉴于 PCS 和 AT-III 系统抗凝血能力在机体总抗凝血能力中所占的比例, 本文在获得两系统高纯度单一成分和建立了定量方法的基础上, 利用流式细胞分析 (FCM) 技术, 进行了人脐内皮细胞表面 PC 激活调控的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

利凡诺 (Rivanol) 去白蛋白人血浆由苏州市中心血站提供。浓缩 200 倍健康人尿由珠海丽珠公司上海分公司提供。新鲜人脐带由吴县红十字医院、苏州医学院第一医院、苏州市妇幼保健院等单位提供。全血标本分别由法国 Robert Debe 医院、安徽省人民医院、苏州医学院第二医院、无锡市第一、第二人民医院和江苏省江原医院提供, 其中前二者标本均经 APC-APTT 鉴定有 APC 耐性患者。

苯甲脒, 东京化成产品。十二烷基硫酸钠 (SDS), Serve 产品。人 Th, Taq DNA 聚合酶、dNTP、Hinf I, HindIII 和 $\Phi\chi$ 174 DNA 标准, Boehringer mannheim 产品。大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI), 苯甲烷磺酰氟化物 (PMSF), Triton X-100 和氯胺 T, Merck 产品。异硫氰酸荧光黄 (FITC), 1, 3, 4, 6-四氯-3 α 、6 α -二苯甘脲 (Iodogen), Aldrich 产品。胶原酶, Hepes, 水蛭素, 3-(4-羟苯基) 丙酸-N-琥珀酰亚胺 (HPNS), FII, 牛血清白蛋白第 V 部分 (BSA-V), aprotinin, 明胶, 溴乙锭, RNase, 蛋白酶 K, 福氏完全和不完全佐剂, Sigma 产品。 β -巯基乙醇和考马斯亮兰 R250, Fluka 产品。DE₅₂, Sephadex G-100, QAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephadex CL-6B, 蛋白 A-Sephadex CL-6B, 肝素-Sephadex CL-6B, Blue-Sephadex CL-6B, Sephadex CL-6B, Ampholine, TEMED, 过硫酸铵, 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 转移电泳用硝酸纤维素膜和电泳标准

等电点 (pI) 蛋白, Pharmacia 产品。色谱标准分子量蛋白, Bio-Rad 产品。抗 BALB/c 小鼠 IgG 酶标抗体, Immunotech 产品。APC-APTT 试剂盒 (APCTMResistan-SC), COATEST^R, Sweden 产品。抗兔 IgG 酶标抗体, 上海华美生物公司产品。AT-III 活性测定试剂盒和抗 IgG 亚型血清, 卫生部上海生物制品所产品。BSA, S₂₃₆₆ 和电泳标准分子量蛋白, 中科院上海东风试剂厂产品。APTT 试剂盒, 上海通用医用仪器公司产品。小牛血清 (FCS), 杭州四季青生物制品研究所产品。TM 单克隆抗体 (SZ-57), SZ-57IgG₁-SephroseCL-6B 柱, PC IgG 亲和层析柱, 去 PS 血浆和红细胞生成素 (EPO), 核医学国家重点实验室制备^[6,7]。自配脐带保存液 (0.14 mol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 11 mmol/L 葡萄糖, 10⁵ u/L 青霉素, 10 mmol/L PB pH=7.4), MEM 完全培养液 (20% FCS, 15 mmol/L HEPES, 2 mmol/L Gln, 2 mmol/L 丙酮酸钠, 0.1 g/L 链霉素和 10⁵ u/L 青霉素) 和 TEN 缓冲液 (0.15 mol/L NaCl, 0.6 mmol/L EDTANa₂, 20 mmol/L Tris-HCl pH=7.4)。实验血浆均经 3.8% 柠檬酸-Hepes pH=7.5 与全血 1:9 (V/V) 抗凝制成。10×PCR 缓冲液 (0.5 mol/L KCl, 25 mmol/L MgCl₂·6H₂O, 4.5% NP40, 4.5% Tween-20, 0.1 mol/L Tris-HCl pH=8.3) 和 PCR 实验用无菌水为自制 (D 7033, Barnstead)。Na¹²⁵I, 中国原子能科学研究院产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 PC, PS, PCI 和 AT-III 的个别纯化

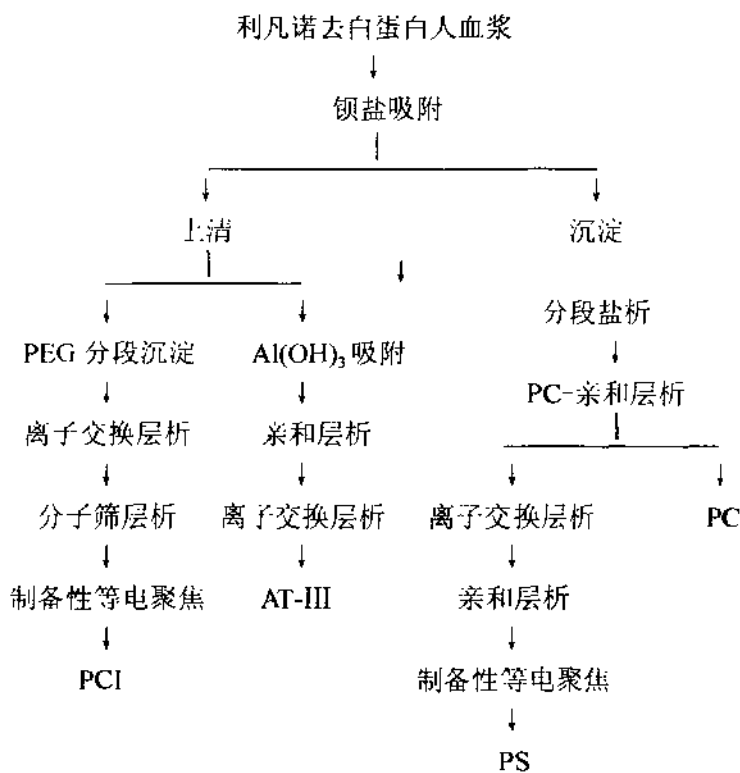


图 1 PC, PS, PCI 和 AT-III 联合纯化工艺设计

利凡诺去白蛋白人血浆添加 STI, PMSF 和苯甲脒等酶蛋白酶抑制剂后, 边搅拌边滴加 BaCl_2 溶液至终浓度为 74 mmol/L。连续角转头离心 2 h, 分别收集上清和沉淀物 (JCFZ, $\text{J}_2\text{-HS}$, Backman)。沉淀物进行 25%和 65%饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分段盐析后, 上样于 PC IgG-Sepharose CL-6B 亲和层析柱, 进行 25 mmol/L CaCl_2 溶液洗脱 (Econo, Bio-Rad)。合并经 SDS-PAGE, 等电聚焦 (IEF) 和 APTT 证实含 PC 组分。收集不吸附 PC IgG-Sepharose CL-6B 柱的流过液, 上阴离子交换 Q_2 柱 (751-0001Bio-Scale Q_2 , Bio-Rad), 进行 0~0.8 mol/L NaCl 线性洗脱 (Bio-Scale, Bio-Rad)。收集 82-84KD 组分, 过 Blue-Sepharose CL-6B 柱, 收集穿过峰。进行制备性液体滚动式 IEF, Ampholine pH 4.0~6.0, 恒功率 12 W 电泳 5 h (RotoforTM, Bio-Rad)。回收 pI 为 5.0~5.5 组分, 即 PS。

BaCl_2 处理过的血浆上清, 经 6%和 12% PEG6000 分段沉淀 (20PR-50D, HITACHI)。沉淀用含 aprotinin 和 PMSF 的 50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5 溶解, 上 DEAE-Sepharose CL-6B 柱, 收集不吸附组分。进行 Sephadex G-100 分子筛层析, 收集 M_w 56KD 组分。制备性液体滚动式 IEF, Ampholine pH 6.5~9.0, 收集 pI 为 7.9~8.1 的 PCI 组分。

BaCl_2 处理过的血浆上清, 滴加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 溶液至终浓度为 0.2 mol/L, 离心 2 h, 收集浅粉红色沉淀胶状物。洗涤后, 上肝素-Sepharose CL-6B 柱。用含 0.155~2.0 mol/L NaCl 的缓冲液线性洗脱。收集 M_w 57KD 和 Th 凝胶空斑法证实的含 AT-III 组分, 上 DE_{52} 柱^[8]。进行 0~0.8 mol/L NaCl 线性洗脱, 收集含 AT-III 组分。

1.3 TM 的纯化

浓缩尿添加苯甲脒、PMSF 和石炭酸等蛋白酶和细菌抑制剂后, 经 QAE-Sephadex A-50 吸附, 用含 1 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱。收集洗脱液, 以截留分子量 20KD 的膜超滤浓缩后 (Pellicon^R, USA), 70 °C 热变性 10 min, 上清上 SZ-57 IgO₁-Sepharose CL-6B 柱, 洗脱液为 0.1 mol/L Gly pH=3.0。收集 PC 辅因子活性抗凝试验测定有活性的 TM 组分^[9]。

1.4 抗血清制备

抗血清由免疫家兔产生。免疫双扩散法测定滴度均大于 1:16。Scatchard 作图法计算亲和常数分别为 PC 4.35×10^9 L/mol, PS 3.20×10^9 L/mol, PCI 1.44×10^{10} L/mol, TM 6.68×10^8 L/mol 和 AT-III 5.15×10^9 L/mol^[10]。抗血清稀释曲线法分析工作浓度均大于 1:2 × 10⁴^[11]。五种抗血清与相应抗原的结构类似物没有明显交叉反应。

1.5 示踪化合物的制备

¹²⁵I-PC, ¹²⁵I-PS 和 ¹²⁵I-AT-III 采用氯胺-T 法制备^[12]。¹²⁵I-PCI 用 Iodogen 法制备^[13]。采用 Bolton-Hunter 法制备 ¹²⁵I-TM^[14]。除 ¹²⁵I-TM 用 Sephadex G-25 分离外, 其他均用 Sephadex G-50 分离。第一洗脱峰各管用给定稀释比例的兔抗相应抗原抗血清测定免疫活性, 选择结合率高, 非特异结合最低的洗脱峰管用于 RIA。¹²⁵I-HPNS 的碘化产率由测定两相放射性强度比例而得, 放化纯用硅胶薄层层析分析, 展开剂为乙酸乙酯: 甲苯 (1:1, V/V)。¹²⁵I 利用率均大于 16.50%, 标记率在 30%~80%之间, 三氯醋酸沉淀法测得放化纯均大于 80%, 比放射性在 1.4~2.7 GBq/mg 之间。

1.6 RIA 方法学

(1) 于 RIA 反应试管中, 依次加入 100 μl 参考标准 (或样品)、100 μl 工作浓度抗血清, 100 μl (约 240 Bq) 示踪化合物, 4 °C 保温 24 h, 再加入 500 μl 1:50 正常兔血清, 100 μl 1:5 羊抗兔第二抗体, 4 °C 保温 24 h。抗体结合的示踪化合物用 γ-计数器测量。B/T

或 $B/B_0\%$ 对参考标准作图 (C5002, Parkard)。

(2) 所建的五种 RIA 适合于测量血浆和细胞培养系统相应成分的含量, 其中 TM RIA 还可用于尿中 TM 的检测。所有的 ^{125}I 标记化合物均经标准曲线和稀释曲线比较鉴定, 免疫反应性基本无损失。 ^{125}I 标记化合物放置 3~4 周后, 最高结合管和非特异结合管无明显改变, 说明这些化合物稳定性好。在所有的方法学考核中, 我们曾把血浆样品经多次稀释后用于方法学测定, 换算后的结果非常接近。用这些系列稀释血浆代替相应的参考标准做标准曲线, 经 Logit 转换成线性, 其斜率与各自的标准曲线斜率基本一致, 表明本文方法有良好的健全性, 血浆基质对方法学没有明显影响。所有方法测量 12 管重复 6 组参考标准点的平均批变异系数均 <6.0 , 批内和批间重复性研究亦证明本文方法学是可靠的。

1.7 内皮细胞培养

参考徐新来方法制备鼠尾胶原^[15]。参考 Jaffe 等人方法并略加改进培养内皮细胞^[16]。取置于脐带保存液中的分娩后人脐带, 用 10 mmol/L PBS pH=7.4 冲洗去除残留血细胞, 注入 5 ml 的上述溶液配制的 0.1% 胶原酶, 37 °C, 15 min。用 40 ml 含 0.2% BSA 的缓冲液将内皮细胞混合液冲出, 2000 g 离心 10 min, 弃上清, 内皮细胞用 MEM 完全培养液悬浮。接种内皮细胞于预涂鼠尾胶原的培养瓶中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱 (B10620M, Lunaire) 培养, 隔天换培养液, 用相差显微镜 (Wilovert[®], Germany) 形态学观察。用 10 mmol/L PBS pH=7.4 洗涤生成成簇的内皮细胞, 解离液为含 10 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA Na₂ 的上述缓冲液。依次用 TEN 和含 2 mmol/L PMSF 的 TEN 缓冲液, 无 FCS 的 MEM 培养液洗涤内皮细胞。

1.8 FITC 标记化合物的制备

参照倪灿荣介绍的方法制备 FITC-PC, -PS, -PCI, -Th, -AT-III 和 -SZ-57 IgG₁ 标记化合物^[17]。HPLC 分子筛分级纯化标记化合物和游离荧光素, 荧光检测分析产物 (5000T, Bio-Rad)。

1.9 FCM

(1) 碘化丙啶(IP)荧光染色法鉴别死活细胞。

(2) 取无 FCS MEM 培养液数次洗涤的内皮细胞, 调整为 4×10^5 个/ml 细胞, 分为三组, 第一组用 500 uL Th 的无 FCS 的 MEM 培养液刺激内皮细胞, 37 °C, 孵育 15 min; 第二组用 SZ-57 IgG₁ 封闭内皮细胞; 第三组为无 Th 和 SZ-57 IgG₁ 的内皮细胞。分别进行 FITC-PC, -PS, -PCI, -Th, -AT-III 和 -SZ-57 IgG₁ 掺入, 洗涤两次, FCM 分析 (Bryte HS, Bio-Rad)。

1.10 APC 耐性试验

(1) APC 的制备: 0.5 ml 含 0.1 mol/L NaCl, 0.05% BSA-V 的 50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5 中, 依次加入 10 μg PC, 149 μg Th, 240 μg TM, 37 °C, 保持 45 min, 再加入 245 μg AT-III, 37 μg 肝素, 37 °C, 15 min。

(2) 该实验由两组 APTT 组成。一组为 50 μl 血浆样品、50 μl 不含 PC 的上述 APC 制备液和 50 μl APTT 试剂混合后, 37 °C 反应 6 min, 加入 50 μl 33 mmol/L CaCl₂ 触发反应, 计凝血时间 t_1 (Coag-a-metax₂, Durham); 另一组以 APC 取代不含 PC 的 APC 制备液, 计凝血时间 t_2 。

1.11 聚合酶链反应 (PCR)

(1) EDTA 抗凝血去血浆, NH_4HCO_3 - NH_4Cl 裂解红细胞。以 0.32 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L MgCl_2 , 1% Triton X-100 的 10 mmol/L Tris-HCl pH=7.5 悬浮核, 5000 g, 10 min, 沉淀复溶于 PCR 缓冲液, 并添加蛋白酶 K, 55 °C 孵育 3 h 后, 99 °C 反应 10 min, -20 °C 保存备用。

(2) 引物设计和合成: 根据 Cripe 和 Kane 等发表的人凝血因子 V 核酸序列设计 PCR 引物^[18]。为了便于产物的检测, 在引物两端加有 Hinf I 和 Hind III 限制性内切酶位点。引物用 DNA 合成仪合成, HPLC 分离 (Oligo100, Beckman)。

上游引物: 5'-TTTCTTTCAGGCAGGAACAACACCAGAATC-3'

下游引物: 5'AGCTTTACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACC-3'

(3) PCR 反应: PCR 的模板为白细胞 DNA。100 μl 反应体系中含有 40 pmol/L 上游和下游引物各 4 μl , 10 \times PCR 缓冲液 10 μl , 2 mmol/L 四种 dNTP 10 μl , 5 u/ μl Taq DNA 聚合酶 0.2 μl 及无菌水 68.8 μl 。在 Bio-Rad 公司的 P-4 PCR 反应仪上进行 35 个循环, 循环条件为 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min。PCR 产物用 20 u Hinf I 和 40 u Hind III 37 °C 消化过液, 经 6% 连续的 PAGE 分离, 参考标准为 $\Phi\chi 174$ DNA (72-1353bp), BET 染色, 观察结果。

1.12 蛋白纯度鉴定

用毛细管区带电泳法, 毛细管 24 cm \times 25 μm 涂层管 (148-3031 Capillary Cartridge, Bio-Rad)^[19]。PC, PS 和 AT-III 分析电极液为 0.1 mol/L PB pH 2.5, 电泳走向 + \rightarrow -; TM 分析电极液为 0.1 mol/L PB pH 6.0, 电泳走向 - \rightarrow +; PCI 分析电极液为 0.1 mol/L PB pH 4.0, 电泳走向 + \rightarrow -, 稳压 10 kV (Bio-Focus3000, Bio-Rad)。

1.13 分子量测定和等电点测定

分子量测定采用 SDS-PAGE 和分子筛 HPLC 法^[20]。电泳标准蛋白分子量范围为 17.5~96 KD (Mini Protein II, Bio-Rad), 色谱分子量参考范围为 1.35~670 KD (125-0477 Bio-SilSEC-400, Bio-Rad)。pI 测定用薄层 IEF^[21]。标准 pI 蛋白为 2.40~5.65, 3.0~9.5 (Electrophor 2117-II, Pharmacia)。

1.14 氨基酸组分分析

产品于 HCl 中高温消化, 真空干燥后, 定容, 用日立 8350 型氨基酸全自动分析仪分析氨基酸组分^[22]。

2 结果

2.1 PC 系统 RIA 方法学考核

2.1.1 PC 系统各组分和 AT-III 的鉴定

本文是国内外首次研究综合利用利凡诺去白蛋白人血浆实验工艺的工作。制备 VitK 依赖蛋白、PCI 和 AT-III 的最佳材料是新鲜人血浆, 而国内血站较普遍采用利凡诺沉淀法制备白蛋白。利用 VitK 依赖蛋白均含高比例 γ -COOH Glu 可结合二价阳离子的特性, 分别以钡盐吸附物和上清作为 PC, PS, PCI 和 AT-III 制备的前体是可行的。在 PC 纯化中, 采用免疫亲和层析技术, 得率高, 产品纯度好, 简便, 并可进一步避免纯化中 β -PC 的产生^[23]。因基本无 PC 的干扰, 后续的 PS 纯化设计可着重于产率提高。PCI 不含 γ -COOH

Glu,大量采用低吸热试剂 PEG 的优点是适于工艺建立,对溶液条件敏感性低;制备性 IEF 可解决 AT-III 干扰的难题。AT-III 血含量相对高,因缺乏 Cyt,结构中无二硫键,导致结构较伸展,电荷分布较均匀。这些结构上的特殊性要求工艺设计以高产率、高特异、高容量的技术为主体,选用铝盐吸附,亲和层析和离子交换层析三步法技术参数满意(见表 1)。

表 1 PC, PS, PCI, TM 和 AT-III 生化参数分数

种类	分子量(KD)	等电点	高含量氨基酸	制备产率/%
PC	62	4.69	Glu, Asp, Leu	28.3
PS	83	5.20	Asp, Glu, Leu	12.6
PCI	56	8.03	Glu, Leu, Asp	10.5
TM	60	3.70	Glu, Ala, Gly	25.0
AT-III	57	4.82	Glu, Asp, Leu	12.7

血浆和尿中 TM 含亲水的 NH₂ 端区域,保持着与 Th 结合和辅助激活 PC 的活性。采用离子交换技术作为分离 TM 的前道工序已为许多学者所接受。许多工作注重 TM 与 Th 的亲和关系。进一步研究发现, TM 与 β-Th 和 γ-Th 的亲力均很低,与 α-Th 和 DFP 修饰的 α-Th 的结合解离常数分别为 0.48 nM 和 0.56 nM^[2]。结果提示,由后者建立的亲和层析分离 TM 产率均在 20% 以内,且产品纯度低。原因可能有两个:(1)商品化 Th 是其同工酶的混合物,α-Th 所占比例是柱载容量的限制性因素;(2)Th 的 Try, Arg 和 Tyr 残基是与 TM 可逆性结合必需的,改变这些残基可降低亲和力,甚至不能结合。建立亲和固相化的 CNBr 活化联接过程需含末端 NH₂ 的氨基酸残基参与,导致 Th 中大量 Arg 残基化学修饰而降低与 TM 的亲和力。采用 SZ-57 IgG₁-Sepharose CL-6B 亲和层析系统避免了上述问题,产率高。

2.1.2 RIA 方法学考核

RIA 曲线拟合方程为四参数 Logistic 函数,方法学质量参数见表 2。

表 2 方法学质量参数评价

RIA	工作范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	灵敏度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CV%		回收率/%
			批内	批间	
PC	6.25~1024	3.94	4.40	9.68	104.28
PS	21~700	9.87	4.99	13.14	94.30
PCI	4.8~1024	2.58	2.73	8.62	101.89
TM	8.1~560	6.16	5.10	10.94	105.22
AT-III	4~800	2.03	3.56	8.01	97.5

2.2 FITC 标记化合物的理化和免疫学鉴定

FITC 是酸性染料,可共价结合到蛋白带正电荷的基团上,它较高的消光系数 (8×10^4) 和量子产额 (0.5),适于氩离子激光器的 488 nm 激发^[2]。由于发射明亮的绿色荧光 (525 nm) 与 pH 有关,为获得其最大发光选择 pH ≥ 8.5 时测量荧光(见表 3)。

表 3 FITC 标记化合物的理化和免疫学评价

被标记物	标记方法	FIP 比值	荧光效价
PC	Marshall	3.6	$1 \cdot 10^5$ 抗体
PS	Marshall	4.8	1.3×10^5 抗体
PCI	Chadwick	2.9	1.12×10^6 抗体
SZ-53	Chadwick	1.7	62.5 pmol/L SZ-57IgG
兔白蛋白	Chadwick	1.6	
AT-III	Chadwick	4.6	$1:2.4 \times 10^5$ 抗体
Th	Marshall	3.2	87 pmol/L AT-III

2.3 人脐静脉内皮细胞与 PC 膜或磷脂亲和性

无 FCS MEM 培养液洗涤过的培养人脐静脉内皮细胞, 每 2×10^5 个细胞分别掺入 100 amol~80 nmol 的 FITC-PC, 4 °C 避光保持 14 h 后, 以 10~15 °C 的 50 mmol/L PB pH 8.5 洗涤细胞 3 次, 进行 FCM 测量, 以相同数量的内皮细胞和加相同荧光强度的 FITC-兔白蛋白的内皮细胞作参照。非参数分析显示无 Th-TM 复合物的人脐静脉内皮细胞可结合 PC 的饱和量为 16 fmol, 即每个内皮细胞可结合 4.5709×10^5 个 PC 分子。单参数直方图上呈

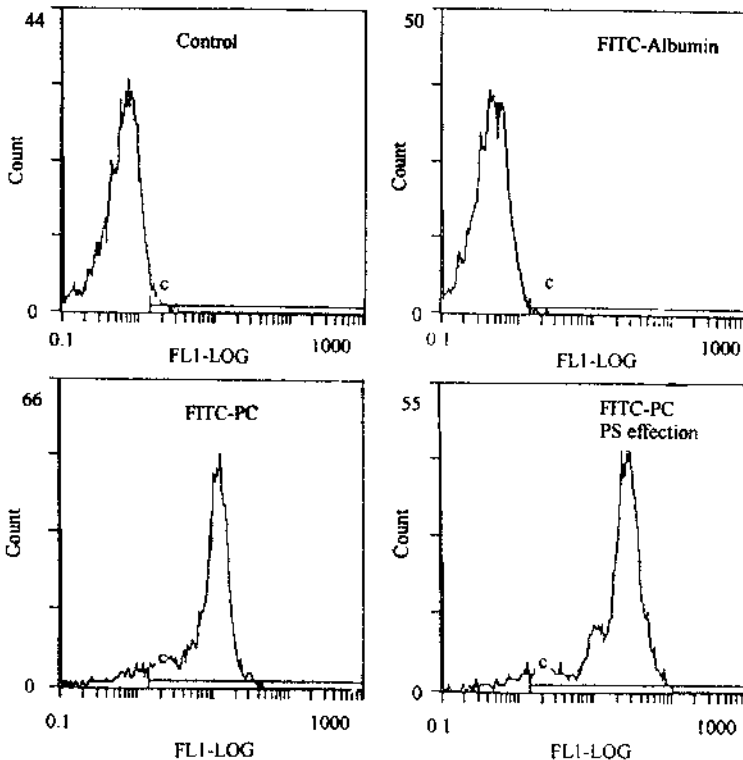


图 2 PC 与人脐内皮细胞的结合关系

上图为内皮细胞自发荧光和 FITC-白蛋白参照系

下图为 PC 与内皮细胞的结合和 PS 掺入的影响

单一峰，并不受掺入 PS 和预掺入 SZ-57 封闭 TM 的影响；掺入 Ca^{2+} 后荧光道数增加，阳性细胞数略有增加 (如图 2~4 所示)。说明人脐静脉内皮细胞表面含有不依赖于 TM，不受 PS 辅助的 PC 结合部位，结合部位可能与 PC 钙结合区域 γ -COOH Glu 重复的 EGF 有关。预经 PC 孵育的内皮细胞，在肝素存在时，用 FITC-PCI 示踪无细胞结合，表明内皮细胞表面的 PC 结合部位无激活 PC 的作用。

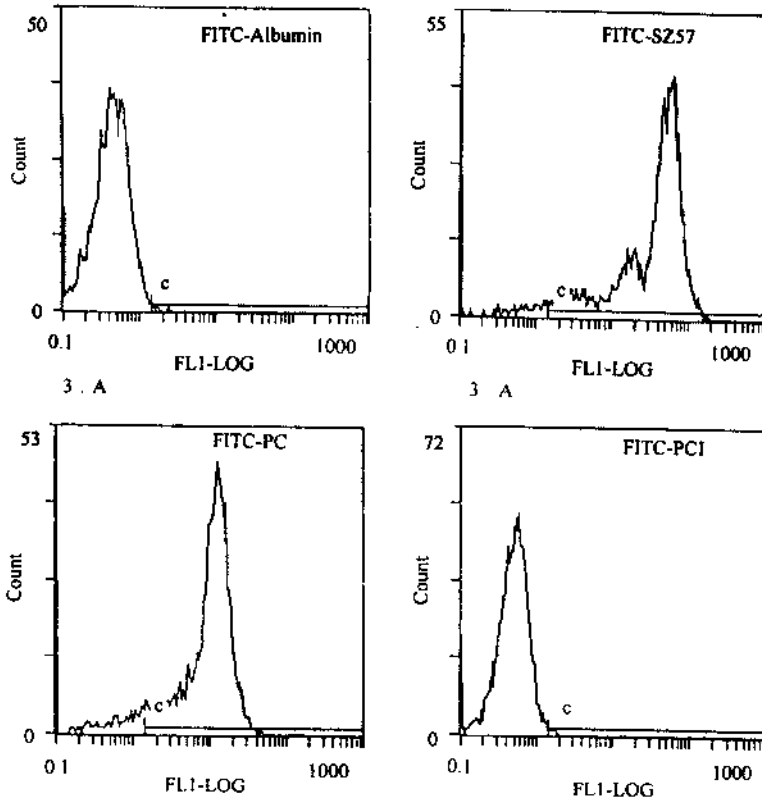


图 3 PC 与人脐内皮细胞的关系

上图为 FITC-白蛋白的参照系和 SZ-57 结合内皮细胞表面 TM；

下图为在 SZ-57 封闭 TM 后，PC 结合内皮细胞及 PC 激活抑制状况

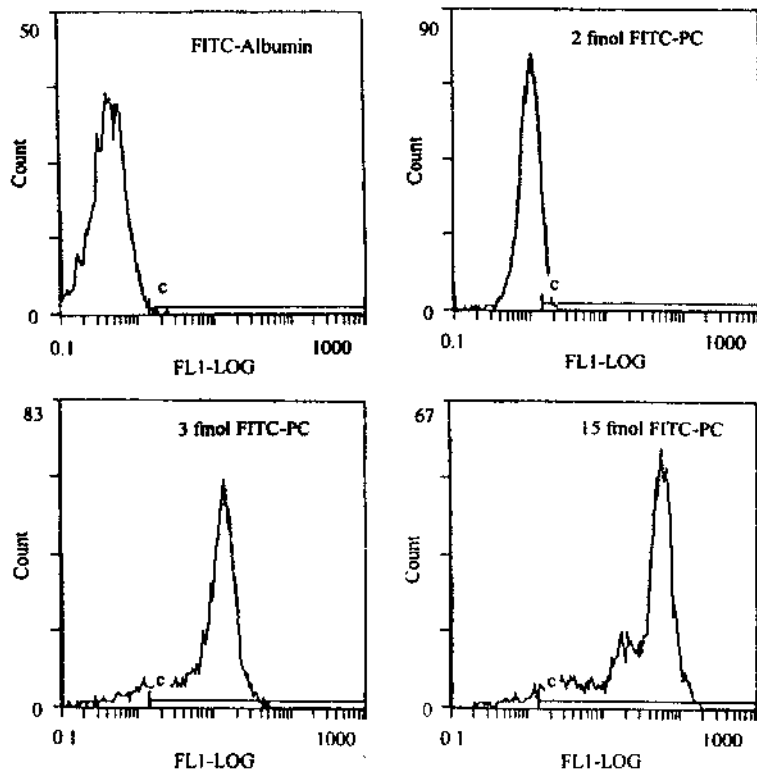


图 4 PC 结合人脐内皮细胞的剂量关系

2.4 非 TM 的 Th 受体与 Th-TM 复合物激活 PC 的关系

相同荧光强度的 FITC-PC 掺入预经 0.75 μ Th 活化的内皮细胞，阳性细胞数和荧光道数都显著增加，饱和时可达 92.4%和 32.8。说明该峰是 PC 与 Th-TM 复合物结合的化合物，而非人脐内皮细胞结合 PC 部位的 PC (见图 5)。预先用 SZ-57 封闭内皮细胞表面的 TM 后，掺入 FITC-Th 仍显示单峰，说明除 TM 外，内皮细胞表面还有另外一种非 TM 的 Th 受体。在这种体系中，用 FITC-PC 示踪，阳性细胞数和荧光道数显著增加，说明这种非 TM 的 Th 受体也可活化 PC，FITC-PCI 示踪也证明了这种结论 (见图 6)。

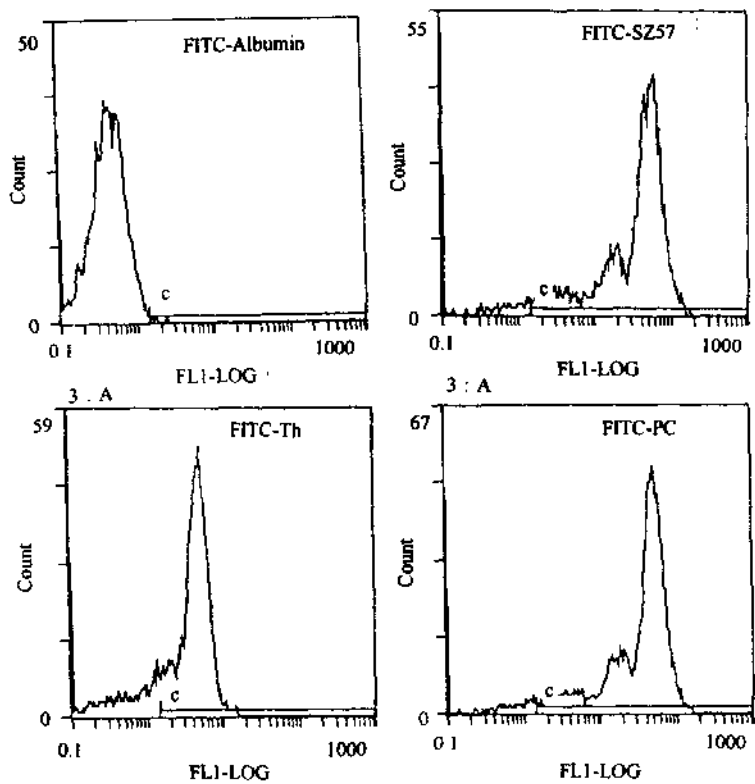


图 5 PC 与 Th-TM 复合物结合的关系

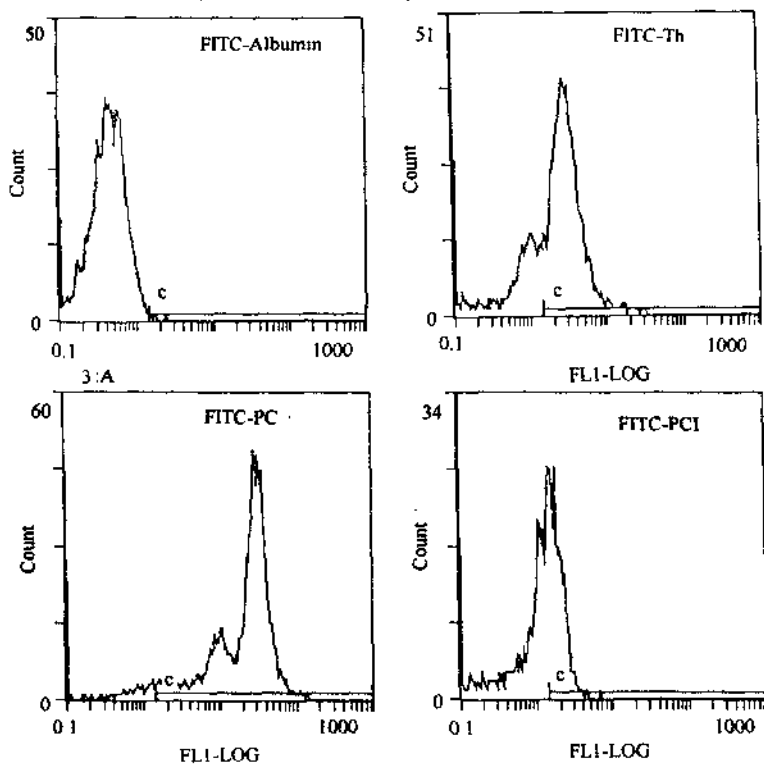


图 6 PC 与非 Th-TM 的 TM 受体结合及激活的关系

2.5 Th-TM 复合物与 AT-III 的关系

(1) 在含 Th-TM 复合物的内皮细胞体系中，掺入 FITC-AT-III 呈单峰；添加不同量的肝素，阳性细胞数和荧光道数无显著改变。在含 AT-III-Th-TM 复合物的内皮细胞体系中，掺入 FITC-PC，未见阳性细胞数和荧光道数增加，表明 AT-III 与 Th-TM 形成三元复合物主要受 TM 的调节，且该三元复合物形成可影响 PC 的激活 (见图 7, 8)。

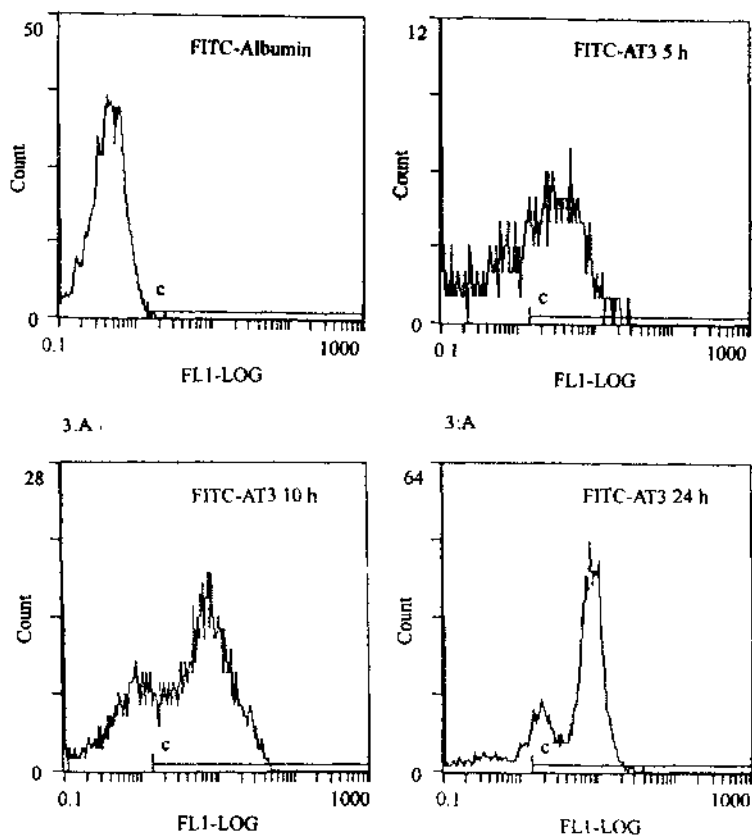


图 7 AT-III 与 Th-TM 复合物结合的时间反应动力学