

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.008

抗 PAI 抑制作用的纤溶酶原激活剂突变体的活性研究 *

李 飞² 李忠培² 占 志¹ 王冬雪¹ 朱美财^{1Δ}

(1 中国人民解放军空军总医院临床检验中心 北京 100142; 2 泰安市中心医院检验科 山东 泰安 271000)

摘要 目的:重组表达抗 PAI 抑制作用的 t-PA 突变体,经诱导表达、复性、纯化后进行生物学活性和酶动力学分析。**方法:**构建 pBV220-tpa 重组表达质粒,经 DNA 测序确认后,转化至大肠杆菌 DH5a,温控诱导表达,凝胶过滤法对包涵体蛋白进行初步纯化,复性后,过制胰凝乳蛋白酶亲和层析柱纯化,酶动力学分析其活性。**结果:**测序证实,t-PA 突变体的 DNA 序列正确,表达蛋白占总菌体蛋白的 30%,经纯化后纯度达 95% 以上,比活性为 4.2×10^5 IU/mg, t-PA 突变体与 PAI-1 反应后,其活性未受到抑制。t-PA 突变体酶的米氏常数 K_m 为 $0.3298 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最大水解速度 $V_{\max}$ 为 $0.0476 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ 。**结论:**经生物学活性测定,表达蛋白能够明显抵抗 PAI 的抑制作用,并具有良好的生物活性,该突变体有可能成为用量更少、疗效更佳的新型溶栓药物。

关键词:组织型纤溶酶原激活剂;突变体;蛋白表达;纯化;酶动力学

中图分类号: Q78; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3029-04

Expression and Activity of Tissue-type Plasminogen Activator Mutant Reteplase with Deletion of PAI-1 Binding Sites*

LI Fei², LI Zhong-peif², ZHAN Zhi¹, WANG Dong-xue¹, ZHU Mei-cai^{1Δ}

(1 Air Force General Hospital Clinical laboratory center, Beijing, 100142, China;

2 The Central Hospital Of TaiAN Clinical laboratory, Taian, Shandong, 271000, China)

ABSTRACT Objective: To construct a prokaryotic expression vector for tissue-type plasminogen activator mutant reteplase with deletion of a PAI-1 binding site, and evaluate its biological activity by enzyme kinetics analysis. **Methods:** The recombinant plasmid pBV220-t-PA was transformed into *E.coli* for expression after DNA sequencing. The recombinant mutant t-PA inclusion body was purified with gel filtration, and then was purified with erythrina trypsin affinity chromatography after refolding. **Results:** The mutant t-PA encoding sequence was confirmed by DNA sequencing. The expression product was about 30% of whole lysis protein. After purified with gel filtration, the protein purity was more than 95%. The specific activity of mutant t-PA with deletion of PAI-1 binding site was 4.2×10^5 IU/mg. This protein was not inhibited by PAI-1. The K_m was $0.3298 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $V_{\max}$ of mutant t-PA was $0.0476 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** Recombinant mutant t-PA with deletion of PAI-1 binding site prepared from *E.coli* could resist the inhibitions of PAI-1, and harbor a better biological activity.

Key words: t-PA; Mutant; Protein expression; Purification; Enzyme kinetics

Chinese Library Classification (CLC): Q78; R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3029-04

前言

血栓性疾病在西方国家是最高发和致命的疾病,随着生活水平的提升,人口老龄化的不断加剧、人民的饮食结构改变以及运动量减少等,我国心血管疾病的发生率急剧升高,目前心血管疾病已经成为中国人健康的“头号杀手”^[1-3]。我国约有 5200 万心脑血管病患者,每年急性心肌梗塞发病人数约为 110 万人,心脑血管栓塞性疾病死亡率很高^[4,5]。目前市场上的大多数溶栓药物离真正的安全、高效、低毒都还有很大的差距,而且费用昂贵,因此研发成本低、性价比高、被我国普通民众所能够接受的溶栓药物已经成为了各大研发机构的研究热点^[6]。

本研究根据 t-PA 的结构特点,在将 t-PA 分子中指状区、

表皮生长因子区和 Kringle 1 区去掉的基础上,将 t-PA 分子中 PAI-1 结合位点碱基进行突变,构建具有 t-PA 活性且其活性不被 PAI-1 抑制的新一代 t-PA 突变体^[7,8]。抗 PAI 抑制的 t-PA 突变体是一新的结构,国际上尚未见对该重组突变体进行纯化、活性鉴定及酶动力学研究。因此本研究拟对新一代 t-PA 突变体的纯化和活性鉴定进行系统的实验研究,进一步进行中试试验和系统的临床前评价,为其作为溶栓药物的临床研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

截短形式的 t-PA 基因片段由本实验室构建保存, pBV-220

* 基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2009 ZX09103-603)

作者简介:李飞(1985-),男,硕士研究生,病毒基因工程与蛋白质组学研究, E-mail: lf314@163.com

Δ 通讯作者:朱美财(1964-),男,博士,教授,病毒基因工程与蛋白质组学研究, E-mail: zhumei@yahoo.com

(收稿日期:2013-10-28 接受日期:2013-11-25)

载体购自中美泰合生物技术有限公司, *E.coli* DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*HI、T4DNA 连接酶、DNA Markers 和 dNTP、小提质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; Chromozym t-PA 为德国罗氏(Roche)制药公司产品; PAI-1 为奥地利 Technoclone 公司产品; PCR 相关试剂为北京德源伟业科技有限公司产品; 其他试剂均为进口或者国产分析纯试剂; 引物由中美泰合生物技术有限公司合成。

电转移电泳槽(北京六一仪器厂); SCIENTZ-IIID 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物股份有限公司); 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); RT-6000 酶标分析仪(深圳雷杜生命科学有限公司); HD-2 核酸蛋白检测仪(上海沪西分析仪器有限公司); 刺桐胰蛋白酶抑制剂和层析柱由本室制备。

1.2 PAI t-PA 重组质粒的构建

以本实验室已经构建成功的 t-PA-pET28a(+) 重组质粒^[6] 为模板。使用 PCR 点突变法构建缺失 PAI-1 位点的 PAI t-PA 突变体, 以上游引物为 5'-GGAATTCATGTCATATCAGGGTAATAGCGACTGCTAC-3', 下游引物为 5'-CGGGATCCT-TACGGACGCATGTTG-3' (下划线为限制性酶切位点) 进行 PCR。扩增条件: 95℃ 预变性 5 min, 循环 35 次(94℃ 变性 30 sec, 50℃ 退火 30 sec, 72℃ 延伸 60 sec), 最后 72℃ 延伸 5 min。将扩增的 PCR 产物进行酚抽提后, 与 pBV220 载体分别用 *EcoR* I、*Bam*HI 进行双酶切, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收片段, 酶切、连接及转化受体菌 *E.coli* DH5 α , 操作方法参照试剂盒说明。对阳性菌落进行小提质粒, 用限制性内切酶进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。将酶切鉴定的重组质粒样品进行序列测定。

1.3 重组质粒 PAI t-PA 在大肠杆菌中的表达及复性

挑选单个菌落接种于含 Amp 的 5 mL 2 $\times$ YT 培养基中 30℃ 振荡过夜。次日按 1% 比例将菌液扩大培养至 A 600 达 0.5~0.6 时, 转入 42℃ 诱导培养 4 h 后收获菌液。取少量诱导前、后的菌液, 加入含 DTT 的 SDS 样品缓冲液, 于 95℃ 加热 5 min, 10% SDS-PAGE 鉴定。5000 $\times$ g 离心 12 min 收集经诱导后的细菌, 用 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.4)-5 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA 洗菌体, 离心收集沉淀。重悬于洗涤缓冲液中, 超声破碎菌体, 12000 $\times$ g 离心 20 min 收集包涵体。将包涵体以洗涤缓冲液洗三次, 离心回收。取少量进行 10% SDS-PAGE 鉴定。将剩余包涵体溶于 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.9)、8 mmol $\cdot$ L⁻¹ 脲及 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ DTT、1 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA 中, 置室温 30 min 磁力搅拌使完全溶解, 过 G25 琼脂糖柱, 收集目的蛋白峰, 按 1:15 比例用 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl(pH 9.3)、0.5 mol $\cdot$ L⁻¹ Arg, 5 mmol $\cdot$ L⁻¹ GSSG 及 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ GSH 稀释后, 室温静置 3 h。

1.4 大肠杆菌表达的 PAI t-PA 的纯化

以 0.5 ml $\cdot$ min⁻¹ 流速上 ETI-Sepharose4B 柱, 用缓冲液 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4) 平衡基线, 在用 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl, 0.5 mol $\cdot$ L⁻¹ NaCl(pH 7.4) 洗柱, 去除杂蛋白; 最后用 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl, 0.5 mol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, 1.6 mol $\cdot$ L⁻¹ KSCN(pH 7.4) 平衡液洗脱 PAI t-PA。用 SDS-PAGE 检测洗脱的蛋白质峰, 确定纯化后的 PAI t-PA 的纯度。

1.5 PAI t-PA 的活性测定

根据 Chromozym t-PA 的说明书进行, 略有改动。取 100

μ L 的 t-PA 加 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.5), 0.15% Tween80 至 50 μ L, 与 50 μ L 4 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 Chromozym t-PA 溶液和 100 μ L 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.5) 及 0.15% Tween80 缓冲液混匀后, 于 37℃ 30 min, 加 100 g $\cdot$ L⁻¹ 的枸橼酸 500 μ L 终止反应。以水为对照, 测定 OD 405, 计算出比活性。t-PA 对人血浆凝块裂解活性测定参照文献^[9], t-PA 对人纤溶酶原溴化氰切割片段刺激活性测定参照文献^[9]。

1.6 PAI-1 对 t-PA 活性的抑制作用和酶动力学分析

取 t-PA 5 ng 在 50 μ L 反应体积中与不同浓度的 PAI-1 25℃ 反应 15 分钟, 加 Chromozym t-PA 底物 50 μ L, 缓冲液 450 μ L 37℃ 反应 30 min, 加枸橼酸 250 μ L 终止反应, 以水为对照测 OD 405。t-PA 酶动力学分析采用最佳的酶反应条件, 所有反应在 96 孔板进行, 即在 30℃, pH 为 7.5 Chromozym t-PA 底物浓度为 0.15 g $\cdot$ L⁻¹, 分别加入 t-PA 酶 0.035、0.07、0.14、0.28、0.56 μ mol $\cdot$ L⁻¹, 进行酶促反应, 反应时间为 20 min, 然后加入 31.25 μ L 枸橼酸终止反应, 用酶标仪测定各孔 405 nm 处吸光度, 检测产物的生成。用 OD 405 表示反应速度, 采用双倒数作图法, 即以 t-PA 酶浓度的倒数为横坐标, 反应速度的倒数为纵坐标, 绘制 1/[V]-1/[S] 曲线求米氏常数 Km 和最大速率 Vmax。

2 结果

2.1 PAI t-PA 突变体重组质粒的构建

利用基因突变的方法成功扩增出 PAI t-PA 突变体基因(图 1)。重组表达载体 pBV220-t-PA 以限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*HI 双酶切, 得到目的基因片段 1200bp。经测序目的片段所插位置正确。成功构建 t-PA 突变体的 Pbv220-t-PA 原核表达载体。

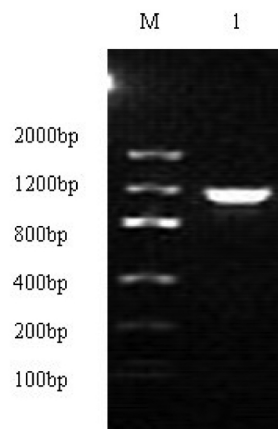


图 1 瑞替普酶 PAI t-PA 突变体基因的扩增产物

Fig. 1 The PCR amplification product of PAI t-PA mutant

2.2 PAI t-PA 在大肠杆菌中的表达和纯化

重组质粒 PAI t-PA 突变体经转化、42℃ 温度诱导和培养后, 收菌、裂解, 取上清液经 10% SDS-PAGE 分析, 结果显示, 经温度诱导表达的菌液在分子量 36000 处可见一条蛋白带(图 2), 未诱导表达的菌液在相应位置无蛋白表达。说明重组质粒已成功在大肠杆菌中以可溶蛋白形式表达, 表达产物占菌体总蛋白的 30%, 主要以包涵体形式存在, 经刺桐胰蛋白酶抑制剂和层析柱纯化后^[7], 透析后蛋白用 10% SDS-PAGE 分析后纯

度达到 95 % 以上。(图 2)。

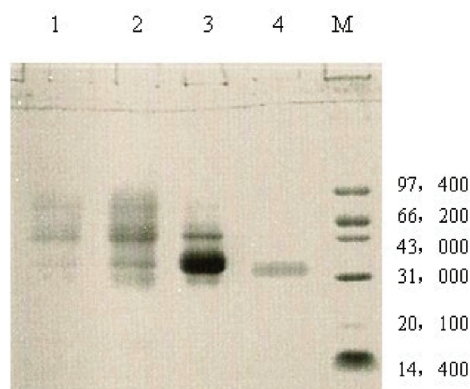


图 2 PAI t-PA 突变体在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Analysis of PAI t-PA mutant expressed in *E. coli* by SDS-PAGE:

1: Before induction 诱导前 2: After induction 诱导后 3: Inclusion body 包涵体 4: Purified t-PA t-PA 纯化

2.3 PAI t-PA 的活性测定

PAI t-PA 突变体以包涵体的形式在大肠杆菌中表达,通过体外稀释法复性后恢复生物活性,经亲和层析对复性后的蛋白进行纯化,测得活性为 $4.2 \times 10^5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$,人血浆凝块裂解活性实验是模拟血管内溶解活性测定,实验说明该蛋白可以使血块于数小时内溶解(图 3)优于天然的 t-PA 蛋白。采用人纤溶酶原溴化氰切割片段进行刺激活性测定,在纤维蛋白存在下,CHO t-PA 活化在 48 min 达到最大,而 PAI t-PA 活性增加相对较低,但相对时间增加到 170 min 也可以达到相近的比值,与文献^[9]报道的瑞替普酶的活性相一致(图 4)。

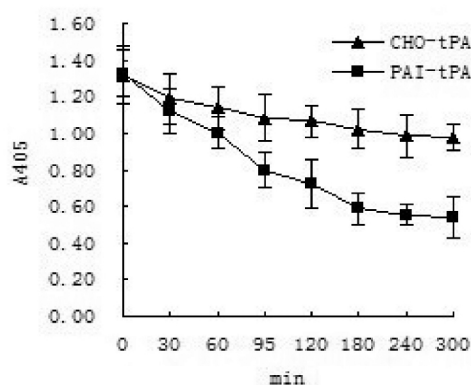


图 3 人血浆凝块裂解活性测定

Fig. 3 Measured of human plasma clot lysis activity

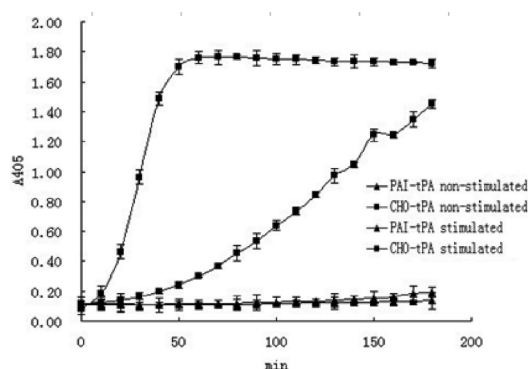


图 4 人纤溶酶原溴化氰切割片段刺激活性测定

Fig.4 Plasminogen activity of t-PA stimulated by fibrinogen

2.4 PAI 对 PAI t-PA 活性的抑制作用和酶动力学分析

随着 PAI-1 浓度的增加,CHO t-PA 的活性逐渐降低,而 PAI t-PA 突变体的活性则不受 PAI-1 的抑制(图 5)。Lineweaver-Burk 双倒数作图法绘制其趋势图(图 6),线性方程为 $y = 6.9236x + 20.993$ ($R^2 = 0.9962$)。t-PA 突变体酶的米氏常数 K_m 为 $0.3298 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最大水解速度 $V_{\max}$ 为 $0.0476 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,结果表明纯化的 t-PA 蛋白具有纤溶酶活性。

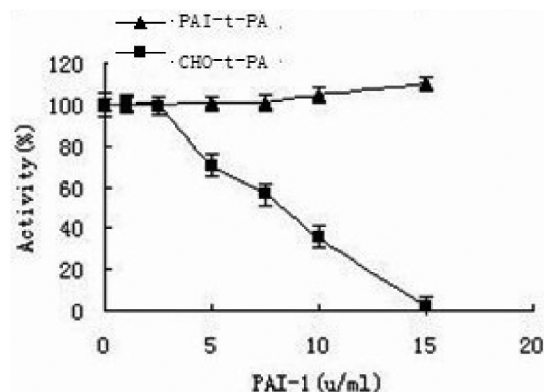


图 5 PAI-1 对 CHO-t-PA 及 PAI-t-PA 突变体活性的抑制

Fig. 5 The effect of PAI-1 on activities of CHO t-PA and PAI t-PA mutant

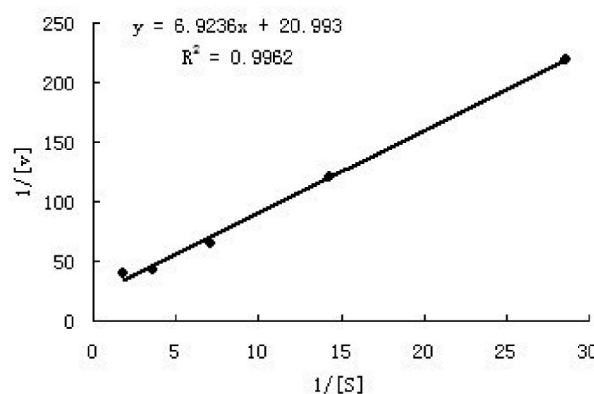


图 6 PAI-t-PA 酶动力学趋势图

Fig. 6 PAI-t-PA enzyme kinetics trend graph

3 讨论

t-PA 属丝氨酸蛋白酶家族成员,主要由血管内皮细胞合成分泌,是一种生理性纤溶酶原激活剂^[9,10]。t-PA 分子结构与其特定的功能特性有关,天然的 t-PA 分子是由 527 个氨基酸组成^[11]。其中指状区(AA 1-99)与纤维蛋白区结合,表皮生长因子区和 Kringle 1 区(AA 100-175)与肝细胞受体结合,Kringle 2 区(AA 176-261)与纤维蛋白结合,蛋白酶区(AA 262-527)与 PAI-1 结合,对纤溶酶原具有高度专一性,碳水化合物区与血浆清除作用有关^[12-14]。目前通过对天然 t-PA 分子的结构改造已经成功构建几种新型 t-PA,如 r-t-PA 及 TNK-t-PA^[15,16]。r-t-PA 去除指状区、表皮生长因子区和 Kringle 1 区后整个分子的性质可发生很大改变。首先,其与纤维蛋白的结合率远低于天然的 t-PA,且是可逆的结合,未结合部分能进入血凝块并促进纤维蛋白溶解。其次半衰期的延长(19 min)使得清除率变低,从而降低了

临床为病人维持治疗水平所需药量,可以很方便通过静脉注射给药^[17]。临床试验显示,重组变异体瑞替普酶在被注入 60 min 时梗塞相关冠状动脉的总开放率和完全开放率均优于天然 CHO-t-PA,而安全性与天然 CHO-t-PA 相一致。但体外实验显示,5000 U·L⁻¹ 的 PAI-1 可使 5 μg·L⁻¹ 的瑞替普酶失活,与相关文献报道一致^[18]。本实验在 r-t-PA 的基础上参照 TNK-t-PA 将 PAI-1 位点上的氨基酸进行突变,即第 373~384 位(AAG-CACAGGAGG)突变为 (GCGGCCGCGGCG),相应的氨基酸 KHRR 则变为 AAAA。构建成溶栓活性不被 PAI-1 抑制的新一代 t-PA 突变体,比活性 t-PA 4.5 × 10⁵ IU·mg⁻¹ 与天然 CHO-t-PA 4.2 × 10⁵ IU·mg⁻¹ 基本一致。实验结果表明,在本实验诱导条件下,克隆的 pBV220-t-PA 可在大肠杆菌中表达,且表达产物具有生物学活性。基因的表达体系主要有大肠杆菌、动物细胞、酵母等。而大肠杆菌是发展最早、技术最成熟的原核表达系统。它的优点主要体现在成本低、产量高、易于操作,本文用的温控型表达载体同时有效避免了污染、营养要求简单、表达过程容易控制等问题。进行蛋白表达经常会遇到蛋白的溶解问题,大多数用大肠杆菌表达的蛋白最后都会导致形成包涵体,但纯化此蛋白需要尿素来变性溶解包涵体中的蛋白质,透析后蛋白质可复性。经变性、复性后的蛋白易丧失,有时表达量低。下一步需要解决表达产量的问题。

CHO-t-PA 溶解富含血小板凝块和陈旧凝块的能力较低,动脉血栓的组成以血小板为主,心肌梗死等栓塞患者血中 PAI-1 的浓度较高^[19-21]。本研究 PAI-1 对 t-PA 活性抑制实验证实,随着 PAI-1 浓度的增加,天然 CHO-t-PA 的活性逐渐降低,当 PAI-1 浓度为 15U·mL⁻¹ 时,天然 CHO-t-PA 的活性降到了 2.1%,而 t-PA 突变体活性未受到 PAI-1 的抑制,当 PAI-1 浓度为 15U·mL⁻¹ 时,t-PA 突变体的活性仍然保持在 100%。

本研究体外溶栓实验表明其对体外贫血小板血浆凝块的溶解效率与天然 t-PA 没有区别,而对富血小板血浆凝块的溶解效率明显优于后者,t-PA 突变体达到 50%凝块溶解时间约为 5 小时,而天然 CHO-t-PA 为 2 小时,21 小时最大溶解值相同。其原因有可能在于用电负性的酸性 Glu 替换 Lys 296、Arg 298 和 Arg 299 三个电正性碱性氨基酸残基,也可显著增高 PAI-1 的抗性。用 Glu 替换 Arg 298 和 Arg 299 所得到的突变体只有部分的 PAI-1 抗性,表明 t-PA 分子中的这 3 个电正性氨基酸残基是 PAI-1 抑制其活性的关键部位。研究了人纤溶酶原溴化氰切割片段刺激活性作用,无刺激时 t-PA 突变体活性较低,在纤维蛋白存在下,天然 CHO-t-PA 对人纤溶酶原溴化氰切割片段刺激活性在 48 min 达到最大,而 PAI t-PA 对人纤溶酶原溴化氰切割片段刺激活性增加相对较低,但相对时间增加到 170 min 也可以达到相近的比值,说明该 t-PA 突变体可明显抵抗 PAI 对其抑制作用。

酶动力学分析表明,由于 t-PA 突变体去除了 PAI-1 的结合位点造成了活性的提高,当底物浓度很低时,酶促反应速度与底物浓度成正比,当浓度达到一定程度时,酶与底物结合达到饱和,反应速度达到最大值。米氏常数 Km 表示酶与底物亲和力的大小,为反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度。纯化的 t-PA 突变体 Km 为 0.3298 μmol·L⁻¹,Vmax 为 0.0476 μmol⁻¹·g⁻¹ 优于天然 t-PA Km 为 0.5298 μmol·L⁻¹,Vmax

为 0.0595 μmol·min⁻¹·g⁻¹。Km 值大小与酶的性质有关,与酶的浓度无关,Km 值越小表示酶与底物的亲和力越大,说明获得的蛋白与底物的亲和力高。

综上所述,该课题研究的抗 PAI 抑制的 t-PA 突变体是一新的结构,在国际上尚未见相关报道,所以该突变体具有优良的生物学活性,为其安全性及动物试验和毒性评价打下基础,作为一种双功能突变体具有极大的研究以及开发价值。

致谢:感谢李文老师、高润光同学的热情帮助。

参考文献(References)

- [1] Wooster MB, Luzier AB. Reteplase: a new thrombolytic for the treatment of acute myocardial infarction[J]. The Annals of Pharmacotherapy, 1999,33(3):318-324
- [2] Collen D, Lijnen HR, Todd PA, et al. Tissue type plasminogen activator: a review of its pharmacology and therapeutic use as a thrombolytic agent [J]. Drugs, 1989,38(3):346-388
- [3] Collen D, Lijnen HR. The tissue-type plasminogen activator story[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009,29 (8): 1151-1155
- [4] Seifried E, Muller MM, Martin U, et al. Bolus application of a novel recombinant plasminogen activator in acute myocardial infarction patients: pharmacokinetics and effects on the hemostatic system [J]. Ann N Y Acad Sci, 1992,667(12):417-420
- [5] Collen D, Lijnen HR. Thrombolytic agents [J]. Thromb haemost, 2005 (93):627-630
- [6] Suzuki Y, Mogami H, Ihara H, et al. Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells[J]. Blood, 2009, 113 (2): 470-478
- [7] Zhu MC, Zhan Z, Wang YJ, et al. Expression and activity of tissue-type plasminogen activator mutant reteplase with deletion of PAI-1 binding sites [J]. Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2005, 21 (5): 565-569
- [8] Zhu MC, Zhan Z, Wang YJ, et al. Expression of erythrina trypsin inhibitor mutant rser ETI in E.coli and application of expressed product in purification of recombinant t-PA [J]. Chinese journal of biologicals, 2007, 11(11): 802-806
- [9] Horrevoetes AJ, Smilde A, de Vries C, et al. The specific roles of finger and kringle 2 domains of tissue-type plasminogen activator during in vitro fibrinolysis[J]. J Biol Chem, 1994,269(17):12639-12644
- [10] Zhang JG, Krajden OB, Kainthan RK, et al. Conjugation to hyperbranched improves rgd-mediated inhibition of platelet function in vitro[J]. Bioconjug Chem, 2008, 19(6):1241-1247
- [11] Foley JH, Cook PF, Nesheim ME. Kinetics of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa)-catalyzed cleavage of C-terminal lysine residues of fibrin degradation products and removal of plasminogen-binding sites [J]. J Biol Chem, 2011,286 (22): 19280-19286
- [12] Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, et al. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies [J]. Blood, 2011,117 (2): 661-668
- [13] Hak JL, Hana I. Soluble expression and purification of human tissue-type plasminogen activator protease domain [J]. Bull Korean Chem Soc, 2010,31(9): 2607-2612

(下转第 3037 页)

是一种经济、简便、可靠的方法。

参考文献(References)

- [1] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis [J]. *Lancet*, 2008, 371(9615): 838-851
- [2] Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(4): 402-410
- [3] Mdol T, Natal C, Prez de Obanos MP, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells mediated by specific protein nitration [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(3):451-458
- [4] Dechne A, Sowa JP, Gieseler RK, et al. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation [J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 1008-1016
- [5] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6(3):425-456
- [6] Tacke F1, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 8. pii: S0168-8278(14)00005-1
- [7] Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis [J]. *Hepatology*, 2004, 39 (2):273-278
- [8] Canbay A, Taimr P, Torok N, et al. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic [J]. *Lab Invest*, 2003,83(5): 655-663
- [9] Bian EB, Huang C, Wang H, et al. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(2):175-185
- [10] Giampieri MP, Jezequel AM, Orlandi F. The lipocytes in normal human liver [J]. *Digestion*, 1981, 22(4):165-169
- [11] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4):1473-1492
- [12] Liu W, Hou Y, Chen H, et al. Sample preparation method for isolation of single—cell types from mouse liver for proteomic studies [J]. *Proteomics*, 2011, 11(17): 3556-3564
- [13] Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotension II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(9):1383-94
- [14] 叶娟,王群,付溪,等. 原代大鼠肝细胞分离及培养鉴定 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(7):531-533
- Ye Juan, Wang Qun, Fu Xi, et al. Isolation culture and identification of hepatocytes of primary rat [J]. *J Appl Clin Pediatr*, 2012, 27(7): 531-533
- [15] 王燕,周露婷,章卫平,等.高活力原代小鼠肝细胞的分离与纯化[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(3):28-31
- Wang Yan, Zhou Lu-ting, Zhang Wei-ping, et al. Isolation of Primary Mouse Hepatocytes with High Viability [J]. *J Med Res*, 2011, 40(3): 28-31
- [16] Meurer SK, Alsamman M, Sahin H, et al. Overexpression of endoglin modulates TGF- β 1-signalling pathways in a novel immortalized mouse hepatic stellate cell line[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56116
- [17] D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, et al. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24993
- [18] Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 117(2): 99-113
- [19] Maschmeyer P, Flach M, Winau F. Seven steps to stellate cells [J]. *J Vis Exp*, 2011, 10:(51),e2710
- [20] Rickwood D, Ford T, Graham J. Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium [J]. *Anal Biochem*, 1982, 123(1): 23-31
- (上接第 3032 页)
- [14] Tilley D, Levit I, Samis JA. Measurement of factor v activity in human plasma using a microplate coagulation assay [J]. *J Vis Exp*. 2012 Sep 9(67). pii:3822
- [15] Kohhert U, Rudolph R, Verheijen JH. Weening-Verhorff J, Stern A, Opitz U. et al. Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022[J]. *Protein Eng*, 1992, 5(1):93-100
- [16] Tilley D, Levit I, Samis JA. Measurement of factor v activity in human plasma using a microplate coagulation assay [J]. *J Vis Exp*, 2012, 9(67):3822-3829
- [17] Mir Mohammad Sadeghi H, Rabbani M, Rismani E, et al. Optimization of the expression of reteplase in *Escherichia coli*[J]. *Res Pharm Sci*, 2011, 6(2): 87-92
- [18] Jankun J, Aleem AM, Struniawski R, et al. Accelerated thrombus lysis in the blood of plasminogen activator inhibitor deficient mice is inhibited by PAI-1 with a very long half-life[J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61(4): 673-680
- [19] Ozolina A, Strike E, Jaunalksne I, et al. PAI-1 and t-PA/PAI-1 complex potential markers of fibrinolytic bleeding after cardiac surgery employing cardiopulmonary bypass [J]. *BMC Anesthesiol*, 2012, 30(12): 27
- [20] Davami F, Sardari S, Majidzadeh AK, et al. A novel variant of t-PA resistant to plasminogen activator inhibitor-1; expression in CHO cells based on In Silico experiments[J]. *BMB Rep*, 2011, 44(1): 34-39
- [21] Jensen JK, Thompson LC, Bucci JC, et al. Crystal Structure of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in an Active Conformation with Normal Thermodynamic Stability [J]. *Biol Chem*, 2011, 286 (34): 29709 - 29717