2.2 LC-MS 实验验证结果

经质量解析后的εPA44胰蛋白酶消化液总离子流色谱图(TIC)，见图1。从图1可以发现，有4段与理论上酶解后片段相吻合，即理论上的(3)[418.45]、(4)[2 568.86]、(5)[273.34]、(6)[666.77]片断。实际质量图谱中没有发现片断(1)及片断(2)，但经仔细的片断间质量电荷比(m/z)分析能发现未酶解的片断(1)加片断(2)的质量片断。

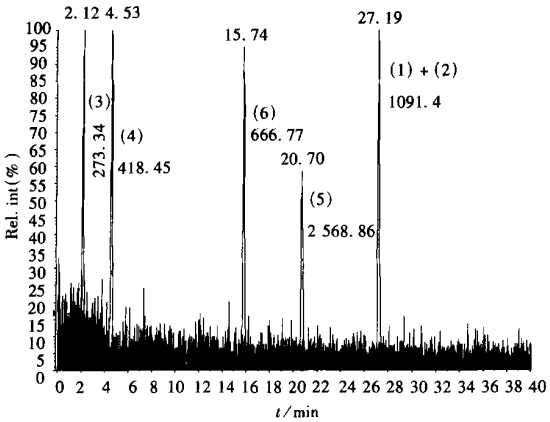


图1 总离子流色谱图及其各峰理论归属

3 讨论

从图1可见，εPA44胰蛋白酶消化后产生的(3)[418.45]、(4)[2 568.86]、(5)[273.34]、(6)[666.77]片断MS分析结果与理论推导完全一致。对于导致胰蛋白酶没有对εPA44 N端的K进行切割的原因，经仔细分析εPA44的氨基酸序列，以及结合既往的研究后找到了答案。其中胰蛋白酶自身的K经类似的化学修饰后，能产生具有强的抗自我降解的新型高效胰蛋白酶的实验最具代表性[3]。εPA44氨基酸序列N末端的K被棕榈酰化后，一方面导致其疏水性较大程度的增强，另外更重要的一方面是，因其N末端的K被棕榈酰修饰后其空间构象或表面电荷发生了改变，这种化学修饰显然增强了其抵抗胰蛋白酶酶解的能力，从而逃避了胰蛋白酶对其的降解。综上所述，因乙肝治疗性多肽εPA44具有很强的疏水性，使其胰蛋白酶消化肽图的制作很具挑战性，本实验通过恒温持续振荡，直接对处于大颗粒悬浮溶液状态的乙肝治疗性疏水肽εPA44进行胰蛋白酶消化，运用比RP-HPLC多肽色谱指纹图谱技术更具特异性的LC-MS多肽质量图谱解析技术，验证了使用该方法产生的εPA44的RP-HPLC胰蛋白酶肽特征图谱的可信度，同时消除了因PAWS蛋白质分析软件设计的缺陷而产生的误导，即忽视了经化学修饰后的K其抵抗胰蛋白酶酶解能力增强的现象，为乙肝治疗性多肽εPA44的RP-HPLC胰蛋白酶肽图谱的质量研究奠定了基础；整个LC-MS验证方法具普遍性，可运用于类似多肽药物的肽图谱可信度研究。

关键词：乙肝治疗性多肽；肽图；液质联用
中图法分类号：R345.16 文献标识码：B

参考文献：

[1] 饶春明，张 翊，韩春梅，等. 重组人白细胞介素-11的胰蛋白酶切肽图分析[J]. 药学学报，2000，35(5)：378－380
[2] Eric C H，Jack D H. LC/MS and LC/MS/MS determination of protein tryptic digests[J]. J Am Soc Mass Spectr，1990(2)：158－165.
[3] Christian E，Sibylla G，Sebastian B，*et al*. Effects of chemical modification of lysine residues in trypsin[J]. J Mol Catal B-Enzym，2000(8)：193－200

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2002)10-1049-02

技术方法

体外培养的新生小牛冠状动脉内皮细胞释放NO、ET-1和PGI_2的实验研究

Experimental studies on the release of endothelin-1, nitric oxide and prostacyclin from cultured bovine coronary artery endothelial cells

廖卫公，许蜀闽，严 俊，万 强，谢增柱 （第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室、全军高原生理与高原病研究重点实验室，重庆 400038）

提 要：目的 建立新生小牛冠状动脉内皮细胞体外培养模型，并观测其对NO、ET-1和PGI_2的分泌。方法 采用机械分离方法，通过内皮细胞Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色和其在倒置相差显微镜下的形态进行鉴别。用放免法和比色法测定培养液中ET-1、PGI_2、NO浓度。结果 新生小牛冠状动脉内皮细胞在体外生长曲线呈"S"形，并能分泌ET-1、PGI_2和NO。结论 新生小牛冠状动脉内皮细胞能够进行体外培养，并能分泌ET-1、PGI_2和NO。

内皮细胞具有多种重要功能，它能分泌血管活性物质调节血管张力。冠状动脉内皮细胞在冠脉血流调节中有重要作用。大量在体研究表明冠状动脉内皮细

作者简介：廖卫公(1970－)，男，重庆市人，硕士，讲师，主要从事低氧与心血管方面的研究。电话：(023)68752339-8202
收稿日期：2001-05-18；修回日期：2002-02-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞能够分泌 ET-1、PGI_2 和 NO。但在体研究难以反映其在内皮细胞处的产生状况，国内外有关离体肺血管、主动脉、脐静脉内皮细胞的研究较多。但国内尚未对冠状血管内皮细胞进行研究。由于血管具有异质性，即不同部位的血管生理和病理特点及其对刺激的反应不同。本研究探讨了离体培养冠状血管的方法，并研究其分泌 ET-1、PGI_2 和 NO 的状况，从而推断这些介质在冠脉血流量的调节作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养[1,2,3]

采用机械分离法，用 10 号手术刀片将内皮细胞从新生小公牛冠状动脉管腔面分离下来，收集到 12 孔培养板中，置 5% 二氧化碳培养箱中培养。培养液为 DMEM＋20% 新生小牛血清＋青、链霉素各 100 U/ml。细胞长满后按 1∶2 比例传代。

1.2 细胞鉴定

1.2.1 形态观察

1.2.2 内皮细胞Ⅷ因子相关抗原检验 按中山公司Ⅷ因子相关抗原 S-P 免疫组化试剂盒说明书操作。主要步骤如下：①用 PBS 冲洗培养在 12 孔培养板上的冠状动脉内皮细胞 5 min×3 次；②4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定 30 min；③PBS 冲洗 5 min×3 次，空气中晾干；④3% 过氧化氢孵育 5 min，蒸馏水冲洗后，PBS 浸泡 5 min；⑤加山羊血清工作液室温孵育 10 min；⑥倾去血清，加兔抗Ⅷ因子抗体(1∶200 稀释)，4 ℃过夜；⑦PBS 冲洗 5 min×3 次后，滴加生物素标记的二抗，室温孵育 4 h；⑧PBS 冲洗 3 min×3 次，滴加辣根酶标记链霉卵白素，室温孵育 2h；⑨PBS 冲洗 3 min×3 次，在显微镜下用 DAB 显色至合适程度。阴性对照用 PBS 取代一抗，其余步骤同上。显微镜下观察，胞浆着色者为阳性细胞。

1.3 绘制冠状动脉内皮细胞体外生长曲线

将生长状况良好的细胞用胰酶消化后制成细胞悬液。按 4.0×10^4/孔的密度接种于 24 孔培养板上。每隔 24 h 取 3 孔消化后制成细胞悬液，用血球计数板计数。以时间为横座标，细胞数为纵座标，在半对数坐标纸上绘制生长曲线。

1.4 离体培养冠状动脉内皮细胞对 ET-1、NO 和 PGI_2 的分泌

1.4.1 标本搜集 取 5～10 代冠状动脉内皮细胞制成悬液，计数稀释后按 1.0×10^5/孔的密度接种于数块 12 孔培养板上。细胞长满后，随机分为 5 个组。更换无血清 DMEM(2 ml/孔)后，置于 5% CO_2 培养箱中培养。分别于 2、4、16、24、48 h 末收集上清液待测。细胞用胰酶消化后计数。

1.4.2 ET-1、PGI_2 测定 采用放免法，按解放军总院放射研究所放免药盒说明书进行操作。

1.4.3 NO 测定[4] 采用铜镉还原法，间接测定 NO 量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计程序的 One-way ANOVA 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 体外培养的冠状动脉内皮细胞的特性

体外培养的冠状动脉内皮细胞，在倒置相差显微镜下呈单层鹅卵石状生长，见图 1，有接触抑制现象。免疫组化显示内皮Ⅷ因子相关抗原阳性，见图 2。冠状动脉内皮细胞纯度＞99%，活性细胞率＞96%。冠状动脉内皮细胞在体外的生长曲线呈“S”形，见图 3。

2.2 冠状动脉内皮细胞分泌 ET-1、NO、PGI_2 的时相性

体外培养的冠状动脉内皮细胞能分泌 ET-1、NO、PGI_2。随着培养时间延长，冠状动脉内皮细胞释放入培养液中的 ET-1、NO 和 PGI_2 增加，见表 1。

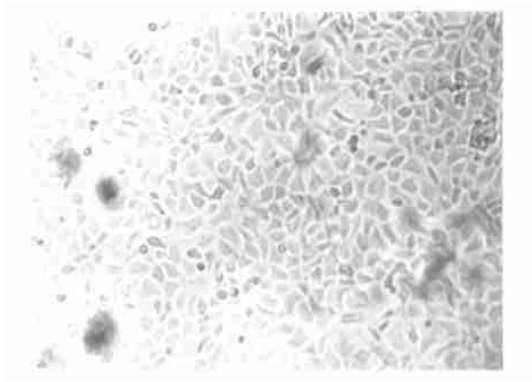


图 1 冠状动脉内皮细胞的形态 (倒置显微镜× 100)



图 2 内皮细胞Ⅷ因子相关抗原免疫组化阳性结果 (S-P× 110)

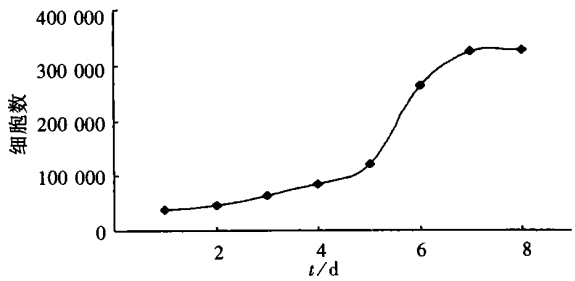


图 3 冠状动脉内皮细胞生长曲线

表 1 培养的新生小牛冠状动脉内皮细胞对 ET-1、NO、PGI_2 的分泌($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	ET-1		6-keto PGF1α		NO_x^-	
	Pg/10^5cells	n	Pg/10^5cells	n	μmol/10^6 cells	n
2	25.6±5.8	7	275.4±64.5	8	20.0±2.7	9
4	102.4±30.7 *	7	349.6±26.5 *	7	28.0±4.6 *	10
16	276.8±16.9 *△	7	536.0±67.7 *△	7	32.0±5.1 *△	10
24	379.2±50.8 *△▽	7	902.4±171.4 *△▽	7	52.8±5.8 *△▽	9
48	763.2±228.6 *△▽#	7	1329.6±149.3 *△▽#	8	76.8±4.6 *△▽#	10

*：$P<0.05$ *vs* 2 h；△：$P<0.05$ *vs* 4 h；▽：$P<0.05$ *vs* 16 h；#：$P<0.05$ *vs* 24 h

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

冠状动脉内皮细胞具有重要的功能，在体内情况复杂，体外培养是研究其特性和功能的重要手段。而目前国内还未见冠状动脉内皮细胞离体培养的报道。冠状动脉内皮细胞在体内呈梭形，其细胞长轴与血流方向一致。在体外培养的冠状动脉内皮细胞与体内的冠状动脉内皮细胞在形态上不同。本实验培养的冠状动脉内皮细胞在相差显微镜下呈鹅卵石样单层排列，具有接触抑制现象。免疫组化提示内皮Ⅷ因子相关抗原呈阳性反应。所培养细胞具有分泌活性。因此从取材部位、细胞形态、免疫组化鉴定和具有分泌功能这几方面我们可以确认所培养细胞为冠状血管内皮细胞。

体外培养的冠状动脉内皮细胞生长曲线呈“S”形，细胞接种时由于胰酶消化等的损害作用，细胞并不全部贴壁生长。因此第一天细胞数出现轻微下降。在最初几天细胞增殖缓慢。随后细胞出现快速增长，即呈指数级增长。细胞长满融合后，细胞增殖基本停止，细胞数目不再继续增多。

本实验发现体外培养的冠状动脉内皮细胞能够分泌 ET-1、NO 和 PGI_2。随着培养时间的延长，冠状动脉内皮细胞分泌到培养液中 ET-1、NO 和 PGI_2 逐渐增多。表明冠状动脉内皮细胞内含有合成这些物质所需的酶系。ET-1、NO 和 PGI_2 是公认的血管活性物质，因此我们推测冠状血管分泌的 ET-1、NO 和 PGI_2 参与了冠脉血流量的调节。

关键词：冠状动脉内皮细胞；培养；内皮素-1；一氧化氮；前列环素
中图法分类号：R331.33　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Hieda H S, Gomez C E. Hypoxia increases endothelin release in bovine endothelial cells in culture, but epinephrine, norepinephine, serotonin, histamine and angiotensin Ⅱ do not[J]. Life Sci, 1990, 47(3): 247—251.
[2] Gordon E E, Gordon J A, Spector A A. HETEs and coronary artery endothelial cells: metabolite and functional interactions[J]. Am J Physiol, 1991, 261(4Pt1): C623—633.
[3] Molossi S, Clausell N, Rabinovitch M. Coronary artery endothelial interleukin to post-cardiac transplant arteriopathy in piglets[J]. Circulation, 1993, 88(5Pt2): Ⅱ248—256.
[4] 王成彬，沈文梅，田亚平，等. 铜离子活化镉还原法测定血清中硝酸盐浓度[J]. 中华医学检验杂志，1996，19(5)：281—283.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2002)10-1251-01

个案与短篇

颌下单个巨大型淋巴结核 1 例

A case of submandibular giant lymphonotic tuberculosis

杜　令[1]，谭颖徽[2]　（[1] 四川省旺苍县红十字医院口腔科，旺苍 628200；[2] 第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037）

患者，男，79 岁，因“右颌下逐渐长大包块 20 年，生长加快 3 年”入院，患者病史：20 年前发现右颌下区有一肿物，约蚕豆大小，不痛，从未治疗，开始生长缓慢，3 年前肿物生长加快，1 个月内长至鸡蛋大小，现肿物约拳头大小，仍无明显症状。因有碍面容而就诊。发病 20 年来患者无鼻衄，无呼吸及吞咽困难，无发热、盗汗。体重无减轻。入院查体：体温 36.7 ℃，心肺肝脾肾无异常。右颌下区明显膨隆，皮肤颜色正常，无瘘管，皮温不高。该区可触及约 12 cm×10 cm×7 cm 大小肿物，边界清晰，活动，表面光滑，无压痛，与颌下腺有联系。其周围及双侧颈部未扪及肿大淋巴结。CT 提示：右颌下 12 cm×9 cm×7 cm 均质软组织影，边界清楚，与颌下腺联系紧密。胸部平片未见肺门淋巴结肿大。术前诊断考虑为右颌下腺良性肿瘤可能性大。在全麻下行右颌下包块切除术，术中见包块大小约 11 cm×8 cm×7 cm，与颌下腺有纤维粘连，颌下腺已明显萎缩，将包块与颌下腺一并完整切除。术后病理报告为右颌下区淋巴结结核（广泛干酪样坏死）。术后 7 d 伤口拆线，I 期愈合。出院嘱服用异烟肼、利福平、乙安丁醇 9～12 个月。

讨论

大部分的颌下或颈部淋巴结结核为多个淋巴结同时发病，因而常为串珠状样改变，结核活动期易出现疼痛、发热、盗汗、消瘦等全身症状，局部皮肤红肿，溃破后长期不愈而形成瘘管[1]。病程长的单个巨大型的淋巴结核临床上罕见，容易误诊为肿瘤，发生在大涎腺区者易与混合瘤等良性肿瘤混淆，临床上应予注意[2]。穿刺活检是有效的鉴别手段。

关键词：淋巴结；结核
中图法分类号：R522　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，1995. 159—160.
[2] 谢惠安. 现代结核病学[M]. 北京：人民卫生出版社，2000. 310—314.

（编辑　陈聪连）

作者简介：杜　令（1974—），男，四川省绵阳市人，医师，主要从事口腔颌面外科方面的研究。电话：(0839)4220364
收稿日期：2001-09-10；修回日期：2001-12-31

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net