科学通报
第41卷 第4期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年2月

II, X型胶原与 Ca^{2+} 的相互作用*

郭 媛 魏立平 许善锦 王 夔
(北京医科大学药学院,北京 100083)

关键词 II型胶原 X型胶原 Ca^{2+} 结合量 结合常数

骨的增长主要通过长生板软骨向两端生长而实现. 在这一过程中,生长板软骨细胞除了要经历一系列的生化和细胞的变化,它分泌的胶原类型也会发生变化: 静止期和增殖期的软骨细胞以分泌II型胶原为主,而肥大期的软骨细胞还要分泌X型胶原. 目前一些实验表明II型、X型胶原可能与骨的增长这一生物矿化过程有关: 通过对刚分离的生长板软骨进行24 h培养发现,II型胶原碳端前多肽的含量与细胞富集 Ca^{2+} 是同步增加的[1],且它又与羟基磷灰石有较强的结合能力[2, 3]; 对于矿化的鸡软骨进行分析,发现在矿化处有X型胶原存在,且X型胶原富集的地方 Ca^{2+} 的浓度也很高[4]. 但目前它们的具体作用尚不清楚. 本文通过研究II, X型胶原与 Ca^{2+} 的结合性质,为阐明它们在生物矿化过程中的作用提供了实验数据.

1 材料和方法

1.1 实验材料

DMEM培养基, HEPES, β-APN及II型胶原酶均购自Sigma公司,其余均为国产试剂.

1.2 实验方法

(1) II型胶原的提取与纯化. 取鸡关节软骨,参照文献[5]进行提取,用NaCl分步盐析法分离出II型胶原,冷冻干燥,保存II型胶原固体, SDS-PAGE电脉测定其分子量及纯度.

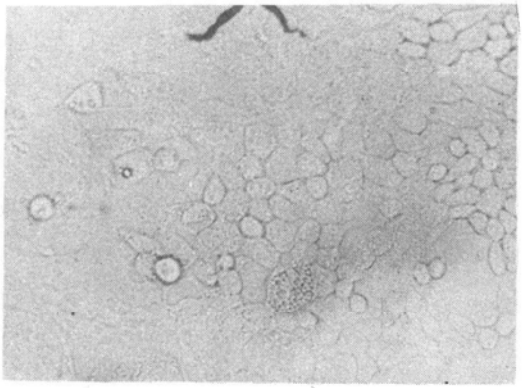


图1 培养的鸡肥大期软骨细胞×70

(2) X型胶原的提取与纯化. 取12日龄鸡胚,取下跖跗骨靠近附趾骨端生长板软骨细胞,进行传代长期培养,细胞密度为 6×10^4 个/mL, 见参考文献[6], 细胞生长7 d天后见图1, 从培养上清液中采用 $(NH_4)_2SO_4$(176 g/ L) 盐析法提取X型胶原粗品. 用NaCl分步盐析法得X型胶原,冷冻干燥,得X型胶原固体,用SDS-PAGE电泳测定其分子量及纯度.

(3) II型胶原、X型胶原与 Ca^{2+} 作用的结合量,结合常数的测定.

1995-03-20收稿, 1995-07-14收修改稿
*国家"八五"科技攻关资助项目

准确称取一定量 II, X 型胶原，用 Tris-HCl 缓冲溶液 (0.017 mol/L Tris, 0.1 mol/L NaCl, pH7.4) 稀释定容，取 2 mL 该溶液注入左半边透析池中，右半边透析池中的溶液除了用一定量的 $CaCl_2$ 代替胶原外，其余均与左半边相同，透析池中间夹一透析膜 (截留分子量 10 000). 把透析池置于恒温振荡器中振荡，温度为 37℃, 隔一定时间取样，以原子吸收分光光度法 (火焰法) 测定 Ca^{2+} 的浓度，直到不变为止，即得 Ca^{2+} 的平衡浓度.

2　实验结果

表 1, 2 分别为 II 型胶原、X 型胶原与 Ca^{2+} 相互作用的实验数据，为了确定 II 型、X 型胶原与 Ca^{2+} 的结合常数，我们采用 Scatchard 作图法[7]，其数学关系式为

$$\frac{r}{C}=\frac{n}{K_d}-\frac{r}{K_d}, \qquad (1)$$

其中 r 为每摩尔胶原结合 Ca^{2+} 的平均摩尔数，C 为 Ca^{2+} 的平衡浓度，n 为胶原结合 Ca^{2+} 的部位数，K_d 为胶原与 Ca^{2+} 结合物的解离常数. 以 r/C 对 r 作图 (图 2)，可得胶原结合 Ca^{2+} 的结合部位数 n 及结合常数 $\frac{1}{K_d}$.

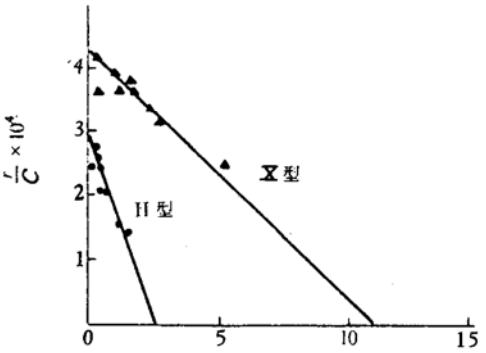


图 2　胶原与 Ca^{2+} 作用的 Scatchard 图

从图中可知，无论是 II 型胶原还是 X 型胶原，其 r/C 与 r 均线性相关，表明它们与 Ca^{2+} 都只有一类结合部位. 对于 II 型胶原和 X 型胶原，其结合部位数分别为 2.5 和 11. 直线的斜率即为结合常数，分别为 1.1×10^4 和 3.9×10^3.

表 1　II 型胶原与 Ca^{2+} 作用的实验数据[a)]

C_{CaCl_2}/ $\times10^5$ mol·L^{-1}	Ca^{2+} 结合浓度/ $\times10^5$ mol·L^{-1}	r	r/C $\times10^{-4}$
0.735	0.21	0.20	2.80
1.50	0.39	0.37	2.47
2.30	0.64	0.60	2.60
3.02	0.76	0.74	2.47
3.80	0.83	0.79	2.03
4.67	1.00	0.95	2.03
6.43	1.13	1.07	1.67
8.17	1.28	1.22	1.48

a) Tris-HCl 缓冲溶液 pH7.4, μ_{NaCl} 0.1, 37℃, $C_{II型胶原}=1.053\times10^{-5}$ mol/L

表 2　X 型胶原与 Ca^{2+} 作用的实验数据

C_{CaCl_2}/ $\times10^5$ mol·L^{-1}	Ca^{2+} 结合浓度/ $\times10^5$ mol·L^{-1}	r	r/C $\times10^{-4}$
0.81	0.13	0.34	4.21
1.65	0.24	0.61	3.68
2.45	0.39	0.98	3.98
3.30	0.48	1.22	3.69
4.10	0.63	1.58	3.86
4.95	0.72	1.82	3.68
6.56	0.91	2.31	3.47
8.40	1.05	2.65	3.20
20.6	2.09	5.31	2.57

a) $C_{X型胶原}=3.960\times10^{-6}$ mol/L, 其余条件同表 1 注

以 Ca^{2+} 的起始浓度 C_{CaCl_2} 对 r 作图. 可得胶原与 Ca^{2+} 的结合量曲线，见图 3.

比较 II 型、X 型胶原与 Ca^{2+} 的结合情况可知，X 型胶原与 Ca^{2+} 的结合部位数明显大于 II 型胶原而结合常数则正好相反. 从 II、X 型胶原分别与 Ca^{2+} 作用的结合量曲线上也可看出，在相同的 Ca^{2+} 浓度下，X 型胶原结合 Ca^{2+} 的量大于 II 型胶原，这与上述所得 X 型胶原结

合 Ca^{2+} 的部位数大于 II 型胶原相符.

3 讨论

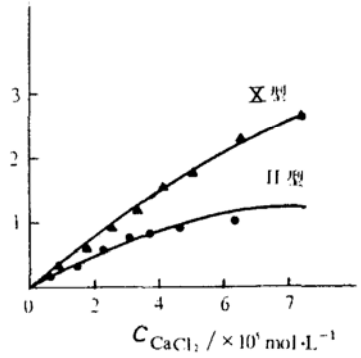


图3 胶原与 Ca^{2+} 的结合量曲线

本文结果表明,X 型胶原结合 Ca^{2+} 的部位数多于 II 型胶原,且相同 Ca^{2+} 浓度条件下其结合量也大些,这与这二种胶原的氨基酸成分上的差异有关. 与 II 型胶原相比较, X 型胶原在其非螺旋结构的碳端含有相对高含量的酸性氨基酸如门冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu)等[8], 由于这些酸性氨基酸与 Ca^{2+} 有较强的配位能力,从而增大了 X 型胶原与 Ca^{2+} 结合的结合部位数,也增大了其与 Ca^{2+} 的结合量.

从本文结果可以推测,在骨的增长这一生物矿化过程中, X 型胶原可能对 Ca^{2+} 的富集有一定的作用,而 II 型胶原的作用则相对小一些.

参 考 文 献

1 Hinek A, Reiner A, Poole A R. The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). J Cell Biol, 1987, 104: 1435
2 Choi H O, Tang L H, Johnson T L *et al*. Isolation and characterization of a 35000 molecular weight subunit fetal cartilage matrix protein. J Biol Chem, 1983, 258: 655
3 Poole A R, Pidoux I, Reiner A *et al*. Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. J Cell Biol, 1984, 98: 54
4 Iyama K I, Ninomiya Y, Olsen B R *et al*. Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification. The Anatomical Record, 1991, 229: 462
5 Curmingham L W eds. Methods in Ezymology, Vol 82, Part A. New York: Academic Press, 1982
6 Schmid T M, Linsenmayer T F. A short chain (pro) collagen from aged endochondral chondrocytes biochemical characterization. J Biol Chem, 1983, 258: 9504
7 李荣昌,左 琦,朱林松等. 牛血清白蛋白与四氯合铂(II)酸根、顺铂及顺式二水二氨合铂(II)相互作用的研究. 无机化学学报, 1990, 6: 339
8 Benya P D, Shaffer P D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, 1982, 30: 215