

第 XIV 章 血液流变学的分子生物学基础

分子血液流变学问题

随着科学技术的发展,实验研究手段不断地更新,生物学和医学的研究方法已深入到分子水平。血液流变学作为一门新兴的交叉学科也不例外,日前已从分子水平来研究血液流变学的一些基本问题,故有人提出“分子血液流变学”这样的概念。企图用分子生物学的最新技术和理论从分子水平上来阐明心脏—血管—血液中的分子在血液流变学中生理和病理的作用和机制。总的说来,在分子血液流变学方面积累的资料已越来越多。作者一方面是介绍一些现有资料,另一方面是希望学术界,尤其是从事血液流变学研究的同行们,对于从分子水平上研究血液流变学给予充分的重视,因为这方面的研究在国际上利用分子生物学的来研究血液流变学问题已相当普遍。目的是为了理解分子水平上的心脏—血管—血液的生理和病理生理过程,从而能在细胞、组织、器官、系统、整体等不同水平上了解它们正常的生理和病理学的过程。

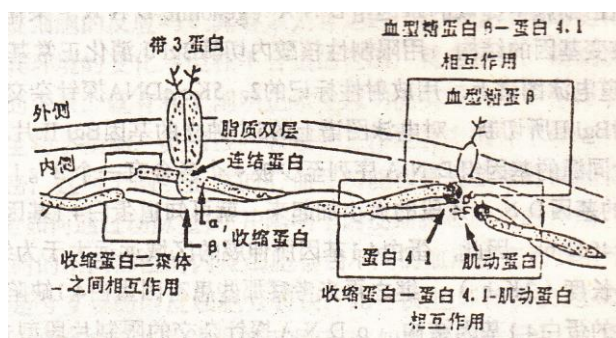


图 14-1 红细胞膜骨架蛋白模式图

红细胞变形的分子生物学基础

哺乳类红细胞的流变特性强力地受分布广泛的结构蛋白网络的影响,结构蛋白网络系贴在细胞膜的细胞质一侧。这种“膜骨架”在决定膜强度和可曲性的特殊力学特性方面起主要作用。在外周循环中,在流体切应力作用下细胞持续变形就靠这膜骨架来维持细胞的完整性。一旦细胞的完整性被结构异常或膜蛋白成分的缺陷而损坏,红细胞将失去其特殊的形态,而容易破碎。遗传性溶血性贫血和红细胞形态的改变是由于收缩蛋白和蛋白 4.1 的缺陷所致。图 14-1 示,收缩蛋白异质二聚体的 α 和 β 链通过端-端自身缔合形成四聚体,进而在其尾端横向连接成三合一的复合体,其中包括蛋白 4.1、很短的肌动蛋白低聚体以及收缩蛋白本身。这种高级结构至少在两个相互作用点上与膜附着在一起, β 收缩蛋白通过连结蛋白作媒介,连接到整合膜蛋白带 3 上,而蛋白 4.1 直接与另一种整合膜蛋白,血型糖蛋白相结合。

美国加州大学 San Francisco 分校的 L.Canboy 等已于 1986 年成功地将蛋白 4.1 的基因克隆于表达载体 λ g11 上,为在分子水平上研究 4.1 奠定了基础。用分子生物学方法来研究作为膜骨架蛋白重要成分之一的蛋白 4.1 生化和遗传,还需要经过下列步骤:(1)分离编码蛋白 4.1 的克隆 DNA 序列;(2)从这些克隆的核苷酸序列推断、分析蛋白 4.1 多肽的一级结构;(3)用红细胞的蛋白 4.1DNA 探针研究非红细胞来源的蛋白 4.1 异构体;(4)人体基因组中蛋白 4.1 的结构组织,并把蛋白 4.1 基因定位于特定的染色体上;(5)研究遗传性椭圆形红细胞症病人的突变蛋白 4.1 基因,这种病人是由于在红细胞膜蛋白中蛋白 4.1 多肽缺陷所致。经研究发现蛋白 4.1 是由 588 个氨基酸组成。蛋白 4.1 与血型糖蛋白结合活性仅次于氨基酸 30Kda 区段上,而与收缩蛋白-肌动蛋白易结合部位在中间 8Kda 区域上,其他潜在的重要一级结构特性,例如半胱氨酸基团(它通过二硫键形成以影响三级结构)和磷酸化位点(它

能调节结合活性), 也被定位到特定的区段上。但由于决定蛋白质序列的技术困难, 只有少量的氨基酸序列被测定了。

Conboy 等人用几条途径从事这种基础性工作, 以取得蛋白 4.1 的较高分辨率的结构-功能定位, 首先他们利用 Dr. Robert Stroud 建立的计算机算法预测与一级氨基酸序列相应的二级结构特点。其次, 用体外定点诱变技术, 按实验设计要求, 通过对 cDNA 的特定位点的改变, 来合成结构改变的多肽。将正常和突变蛋白的功能进行平行的比较, 并借此相当精确地确定与蛋白质-蛋白质相互作用的有关氨基酸。588 个氨基酸组成的蛋白 4.1, 若用限制糜蛋白酶断列, 蛋白 4.1 可以分成 4 个区段, 在二级结构中, 蛋白 4.1 有 α -螺旋结构、两亲性 α -螺旋结构、疏水性 α -螺旋结构、 β -板状结构、拐弯和随机旋转等结构。用免疫学方法在几种哺乳类非红细胞组织 (包括脑、血小板、内皮细胞、晶状体细胞、成纤维细胞和淋巴细胞) 中发现了蛋白 4.1 相似物, 它是一个十分有用的分子探针, 通过对各种非红细胞组织特定的 cDNA 库的筛选, 在可能对非红细胞蛋白 4.1 种系进行分离和确定序列。用红细胞的蛋白 4.1cDNA 作为探针来测定 4.1 基因的定位, 最后将蛋白 4.1 定位于 1 号染色体短臂的 1p32-1P 终端内, 其长度至少为 40Kb。他们利用蛋白 4.1cDNA 探针研究正常蛋白 4.1 基因的结构组织, 并探讨一个阿尔及利亚家庭由于蛋白 4.1c 缺陷而引起的遗传性椭圆形红细胞症的分子基础, 他们的谱系表示, 三个纯合子患病女儿 (II-1, II-2, II-3) 有明显的椭圆红细胞症, 红细胞膜上完全没有蛋白 4.1, 临床症状有明显的严重的溶血性贫血。在脾切除以前, 需要经常输血。异合的双亲和一个异合的女儿有轻度的椭圆红细胞症, 临床上没有明显贫血, 在他们的红细胞膜上 50% 的蛋白 4.1 属于正常水平。第五个女儿血液学完全正常。

使用从外周血白细胞中提取的基因组 DNA (genomic DNA) 来作 Southern 印迹杂交分析, 确定正常和突变基因的结构。用限制性核酸内切酶 Bgl II 消化正常基因, 形成的限制片段表示于 7 道电泳图谱上。用放射性标记的 2.5Kb 的 cDNA 探针杂交来显示限制性片段, 此探针本身不能为 Bgl II 所切断, 对电泳图谱上的 5 个独立的基因 Bgl II 片段进行观察, 证明与这种 cDNA 探针同源的基因组 DNA 序列至少被 4 个各含有一个 Bgl II 位点的内含子中断。将这 5 个杂交的基因 DNA 片段的大小加起来, 就可知道蛋白 4.1 基因 (包括内含子和外显子) 的总长度大于 40Kb。因此, 蛋白 4.1 基因所伸展的区域远远大于为编码这种 78Kda 的蛋白质所需的最小长度 (2Kb)。继之再来考察那些患有因蛋白 4.1 缺陷导致的遗传性椭圆红细胞症的家庭成员的蛋白 4.1 基因结构。cDNA 探针杂交的限制片段型式的变化精确地与这些被试者蛋白 4.1 的存在与否相关。三个纯合子患病女儿 (II-1, II-2, II-3) 有 12Kb 带, 而血液学正常的女儿 (II-5) 有 14Kb 带, 异合的双亲 (I-1 和 I-2) 和异合的女儿既有正常的 14Kb 带, 又有突变的 12Kb 带。异常带是可能由于影响到 Bgl II 位点的点突变, 也可能是由于更广泛的基因重排所致。为区别这两种可能性, 他们用限制酶 E. cori 和 Pvu II 来重复 Southern 印迹杂交分析。为简化所产生的型式, 也将较小的 cDNA 片段当全一探针, 用两种酶中任一种复合型式, 即包括正常又包括突变的部分。这结果表明异常是基因重排、而不是 Bgl II 位点的突变。为了构画重排的边界, 他们使含有 Pst I 消化的基因组 DNA 与下述三个由 cDNA 克隆衍生而来的不同片段的放射活性探针杂交。探针 A: mRNA 5' 非转录部分衍生来的 254-bp (碱基对) cDNA 片段; 探针 B: 刚好在起始编码子以前的 502bp 部分; 探针 C: 蛋白编码区的 756bp 部分。探针 A 和 C 在正常和患病的家庭成员中产生相同的型式, 而探针 B 产生了分析突变基因的起始变码区之前。上述结果与这样的认识是一致的, 即部分基因的缺失, 包括几百个甚至几个核苷酸缺失, 是与患病个体椭圆红细胞表型有关的。但是, 至今还不能排除基因片段以列复杂的形式发生逆位或重排的可能性。为找到这种论点的确切证据, 需对突变基因进行克隆和分析。因为假定缺失发生在近翻译的起始编码区, 从这基因转录的蛋白 4.1 mRNA 可能不能进行正常翻译, 从而阐明了这些病人红细胞膜中蛋白 4.1 完全缺失。

自 1980 年以来,美国加州大学圣地亚哥生物工程研究所,钱煦及其同事已对红细胞膜的变形性的分子生物学基础作出明了的解释,它们采用分子克隆技术搞清了两个膜上蛋白(即蛋白 4.2 和原调节蛋白)的氨基酸的顺序及其作用。前者的即蛋白 4.2 是连接血影蛋白和联在 3 带上的钩联蛋白的成分,其结构与几个转谷酰胺酶是负责铰链作用的,而蛋白 4.2 是负责保护膜蛋白免受转谷酰胺酶铰链的。后者的原调节蛋白是负责调节原肌球蛋白和肌动蛋白之间的联络作用的,系负责肌动蛋白细丝的长度的。这两个蛋白调制着红细胞的变形能力。这种研究不是单学科,而是多个学科间的研究,它涉及到正常生理和疾病病理条件下的各种细胞的生物物理学、生物力学、生物流变学、生物化学和分子生物学的基础问题的研究。

切应力对内皮细胞的基因调控

心血管系统产生的力,其目的是运送血液至各组织和细胞提供氧气与营养进行新陈代谢之用。这一切能实现是由于心血管系统内的各种细胞互相配合的结果,也必定会追根其分子生物学事件上的。这种机械力也会反过来改变心血管系统的细胞的基因表达,因而改变了其本身的结构和功能。机械力能诱导生物化学和分子生物学的改变吗?如压力会促使心肌增生,其分子生物学基础是什么?流动会导致内皮细胞的反应吗?其答案是肯定的。这种适应性的变化,在一定的范围内是有利于机体适应其环境的变化,但在不合适的适应就会致病。因此解释以上的力学行为与分子生物学事件的关系,就有利于阐明正常生理功能实现的分子生物学基础,也有利于阐明病理变化的分子生物学秘密,这对阐明正常的心血管功能和病理变化的机理有着巨大的意义。

如生物大分子是如何通过动脉壁的,并阐明了内皮细胞在其中的作用。钱煦及其同事的研究结果表明,在动脉树的不同部位的内皮细胞会因不同的血液流态而具有不同的分化、衰老、死亡期,值得指出的是分支点的内皮细胞分化快、死亡快,也即转换快,这就意味着生物大分子容易在这一部位溢出血管渗透到动脉壁中而沉积下来(如低密度脂蛋白),这就是发生动脉硬化的重要机理之一。而动脉硬化的部位是好发于动脉的分支点或弯曲点,这种事实表明了血流动力学上有明显的作用。因此此处最易发现单核细胞被转变成巨噬细胞或泡沫细胞。为此可研究切应力是否对于内皮细胞的基因产生单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)有调节作用,这是一个很好的实验来证明内皮细胞的基因调控对于切应力是否有作用。钱煦及其同事发现内皮细胞所分泌的 MCP-1 可因施加的机械剪切应力而控制调节,如机械剪切应力施加以后,则其内皮细胞会导致生产很多的 MCP-1 蛋白,而这蛋白的基因被他们证明是 TGACTCC 这 7 个核苷酸链。特别值得指出的是 TGACTCC 也控制 TPA 的生产,然而钱证明 TGACTCC 是 MCP-1 表达不可缺少的组成,但需要另一个 AP-1 的蛋白质参加才能实现对 MCP1 的调节生产。钱煦是第一位发现机械剪切应力与化学因子结合在一起进行细胞分子基因调控反应的。

纤维蛋白原的结构和功能

脊椎动物血液起着交通运输的作用,虽然血液有一定的流动性,但有时有失血的危险,因此在组织损伤和血管破裂时,血液易于流出血管。在机体内也存在着保护自己血液不让流失的控制系统。这种控制系统有其力学、流变学和生物物理学上的物质基础。这里包括受损肌肉和血管的收缩作用,血小板和细细胞的聚集阻塞,以及最后纤维蛋白的凝块的形成。其中的纤维蛋白对于物化学、生物物理和医生们是极感兴趣的问题,已足足对这一问题研究了两个世纪了,但最近对于纤维蛋白原的复杂结构的细节有了较好了解。

回顾一下历来对纤维蛋白原所进行的研究工作

纤维蛋白原的提取方法有等电点(等电点为 5.8)提取法和冷乙醇(8-10%)提取纯化。最早发现血浆中存在一种大分子物质,会变成多聚体式的网状结构的凝块,其前身就是

纤维蛋白原，由它变为纤维蛋白凝块。凝血酶本身在血液中就存在着的，不过它是以其前身是以凝血酶原的形式而存在，是一个含丝氨酸的蛋白酶。如何有凝血酶原变成为凝血酶，是一个极其复杂的过程，涉及一系的内凝血系统的连锁激活反应才能实现。其较链纤维蛋白凝块大致过程有两个，如图 14-2 所示。

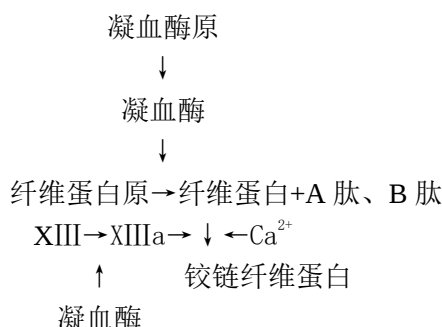


图 14-2 较链纤维蛋白形成过程

由于从纤维蛋白原上脱下 A 和 B 两肽以后，虽只有损失其百分之几的总重量，但可使纤维蛋白原的剩下物互聚，以非共价键形式形成多聚体。A 和 B 的脱落大约有两个作用，一个是揭开聚合区，另一个脱下的是一个带负电荷的肽段，因此使纤维蛋白原间静电斥力下降，导致互聚。互聚成为线状以后，由 XIIIa 和 Ca^{2+} 作用下，以共价键形式互相成为较链结构。虽然近一、两百年来已认为纤维蛋白凝块的形成，首先由于纤维蛋白原肽链脱下 A、B 肽片而开始的，但仅仅还是上世纪的许多实验才打下坚实的基础，很多实验证明，纤维蛋白凝块的亚基与纤维蛋白的结构与形状上大致相近，但有区别，如 Elemer 和 Mihalyi 比较了纤维蛋白原和纤维蛋白在高浓度的尿素溶液中电泳行为和等电点的区别，发现 A 和 B 肽链的脱下，使纤维蛋白丧失了好大一部分的负电荷。同时，二硝基氟苯 (FDNB) 作为氨基末端的识别的工作，引起了生物化学家的巨大兴趣。英国剑桥和里兹两个研究组，同时地进行纤维蛋白原和纤维蛋白的氨基末端进行了鉴别，发现两者完全不同，他们认为这是由于 A 和 B 两肽释放后，才引起如此大的区别，他们证明 A 和 B 肽上确实具有很多负电量，其结果完全与 Mihalyi 的电泳结果完全一致。虽然 A 和 B 肽的释放，可以很好地解释这是由纤维蛋白原变成为纤维蛋白的启动关键，但是纤维蛋白在空间结构是如何排列的，而不以什么化学力把它们母分子们约束在一起呢？

首先，纤维蛋白原分子极不对称，而且其母体是多聚体，是一以折叠形式而聚成的，而且重复距离是半个分子的，这些问题应如何解释为好呢？

其次，由凝血酶单独作用后而形成的纤维蛋白可以用各种蛋白质解聚剂如尿素、肽、去污剂和稀酸等，可使纤维蛋白分散为单体，这证明为非共价键。如在生理条件下，即由凝血酶激活 VIIIa，VIIIa 使线状的纤维蛋白原以共价键形成纤维蛋白，这时用以上试剂就解不开了。这是何种原因呢？

还有，在生物化学历史上，指出关于纤维蛋白原的结构和功能的模式很多，这些模式由于当时条件限制，不能很好解释，而且互相有矛盾，造成思想上有些混乱，但这段时间却引起很多科学家们去进行精细的工作，由于其分子量之大，形状复杂，非刚性而具有柔性，天然存在于人体之中，至今未被晶化，电镜的观察也不很精确，仅供获得模棱两可的结果。至今很多工作者正在从事与它的一级结构的测定工作，在此基础上就有可能说明如何纤维蛋白原变成为纤维蛋白的“机制”的细节何在？

建立新纤维蛋白原的结构特征及要点

过去，对于确立纤维蛋白原的结构还不很成熟，但有很假设性的模型，虽然有时使人们造成

思想上的混乱。有的还内部矛盾，其原因是忽视了当前有价值的发现，在此本文引用最新材料，建立的模型也许是颇符合实际情况的。

首先纤维蛋白原是一个 Astbury 式的角-皮-肌-纤维式蛋白质类型来考虑，从其 X 衍射结果来看，有 5.1 埃 (angstrom, 10^{-8} 厘米) 的重复性，是一个典型的卷曲螺旋结构。因为纤维蛋白原中约有 30-35% 为螺旋结构，其中某些是卷曲着的。

其次，电镜揭示，纤维蛋白原具有三个球部的结构，而且三个球基本上是在一条直线上的。这些结果进而验证了早先工作观点，先由凝血酶作用后，形成聚体，最终产物形成网架结构，但具有线状花纹。X 衍射结果证明重复离距为 225 至 230 埃。几乎有半个分子的折叠距离，因为整个纤维蛋白原分子约为 450 至 460 埃长。

Hall 和 Slayter 的线性三球结构，得到酶学上的有力证明，因为纤维蛋白原和纤维蛋白的消化（如血浆素、许多蛋白水解酶）结果均释放出亚片，完全与如此三度空间结构相符合。其中间联结部分、很明显地是一个容易接触消化的区域，但是球部部分却较难酶解消化。最后模型要能作出解释为什么 A 和 B 链的移去，开始导致纤维蛋白原的聚合，以及进一步又由 VIIIa 作用下完成了交链作用。

在此建立新的纤维蛋白原模型的依据是什么？

下面试图提供现代较新的结构，虽然在某些方面与从前 Hall 和 Slayter 的有相似，但认为至今为比较合适的，根据的有关资料有：（1）一级结构分析；（2）电镜观察；（3）生物化学分析结果；（4）酶介分析结果；（5）三条非等同的链均来同一祖先的认识；（6）一个长螺旋的卷曲存在。

纤维蛋白原的一级结构和氨基酸组成

一级结构的主链：纤维蛋白原分子量约为 330,000 至 360,000，沉降系数为 7.65，其中 95% 为氨基酸，5% 为多糖，分子为一个二聚体，分子式可以用 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 或 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 来表示，每半个分子中有 α 、 β 、 γ 三条肽链。 γ 链在所有生物中比较恒定，分子量约处于 55000~60000 之间， β 链分子量约为 40000~50000， α 链有更大差异，分子量处于 6000~80000 之间，整个分子为 6 条链，它们之间由一条二硫键连在一起[图 14-3 (1)]。

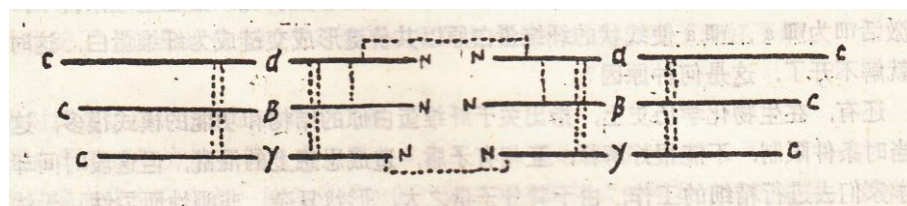


图 14-3 (1) 纤维蛋白原的 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 平面结构示意图

(虚线示二硫键，C 示 COOH 端，N 示 NH₂ 端)

纤维蛋白原的氨基酸组成：在某种程度上，它与典型的球蛋白的分子相近，这三条链的氨基酸组成不完全相同，若相互之间作一比较，这一点就更为突出，如 α 链的羧基端，有大量的甘、丝和苏氨酸，而缺乏非极性氨基酸，其他部位有的地方无脯氨酸，另有一些其他部位含有丰富的半胱氨酸。这些资料是提供纤维蛋白原分子结构的关键资料，目前虽还缺少 X 衍射的高分辨率的资料，但也足可以建立一个纤维蛋白原子结构的模型。

纤维蛋白原的一级结构的阐明

对纤维蛋白原的一级结构的测定有多个方案，其中之一，不外乎首先将二硫键打开，对各条链进行酶和化学方法分解成段片，然后测出各片段的氨基酸排列顺序。另一方法，就首先用酶和化学方法，将各链分解成片，测定各片段的氨基酸。其结果证明后一种方法是最为有利

的，因为这一方法以最快速度搞清楚了 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 结构式，从而引伸出 Hall 和 Slayter 的三球结构。其中最为关键的一步为 Blomback 工作组所进行的工作，他们首先分离了一个溴化氰产物的片断，证明其有整个纤维蛋白原子分的六个氨基末端，这一端为整个分子分子量的 20% 弱，但具有全体分子一半以上的二硫键，这一片断被命名氨基末端“二硫键结 (N-DSK)”，后来另有人独立地分离到 E 片段。发现与上述溴化氰产物片断有免疫学上的交叉反应性。因而证明这部分为 Hall 和 Slayter 的三球结构中的中心球结构，这部分的结构的完全明白，就基本上确立了 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 的基本结构，图 14-3 (2) 示侧中心结的结构。在上述 N-DSK 中可以看到 CYS-PRO-SER/THR-GLY/THR-CYS 的共同结构，为什么三条链上都有这样的结构，而且相互碰巧地绕在一起，推测认为三链来自同一祖先，如此共同的结构相应的反映了具有共同的功能。故天然地三条链上都用半胱氨酸打上“烙印”，这就是所谓的“二硫链结”，这结的一侧的氨基酸均为非极性的，三条链之间互相比较扭的结构称之为“二硫链结”这种结在远离氨基末端处还有存在。

α 、 β 、 γ 链的同源性

除上述以外，其他区也有同源性，这包括羧基末端片段 (图 14-4)，血浆素攻击部位和凝血酶作用区域 (释放 A、B 肽)，半胱氨酸分布上，还有 Cys-Pro 的“节律”及其一侧无极性氨基酸。尤其是半胱氨酸的相似区，实在是三条链间最相似的“音符”。

但是这三条链在分化过程中，在功能上已有些不同了，如 γ 链，在止血过程中，即由纤维蛋白原变成纤维蛋白时，能在 VIII 因子作用下，赖氨酸和谷氨酰胺间连结作用，这两个相邻的 γ 链是在排列上起反平行作用的。这种排列绘出双折重叠的二聚对称体的分子，造出线状的不对称的结构来 (图 14-5)。



图 14-3 (2) 纤维蛋白原中心之半侧结构 (o-o 示二硫键)

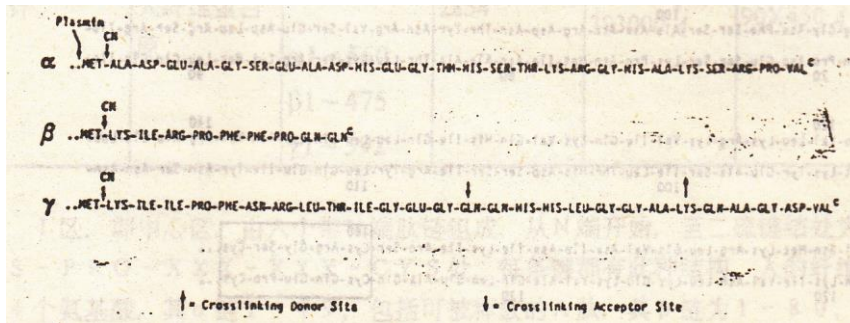


图 14-4 三条链即 α β γ 的 COOH 端溴化氰片段之间的同源性分析:

β γ 前面的氨基酸基之间很相似, α 和 γ 之间很少相似,
但与形成铰链的赖氨酸 (LYS) 是一致的。

此三条链的相互交链的问题, β 链已丧失其交链性能, 但 α 链仍有, 虽然它以所谓共价链的连结方式保证立体形状上的组合, 在形成多聚体中, α 链的作用被认为主要起侧向交链。这种交链主要发生于极性残基区, 而且含有此链上的 2/3 的羧基残基, 而且是露落于外面的区域上。

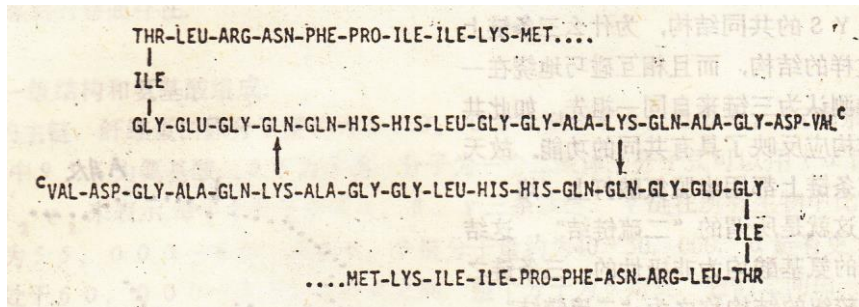


图 14-5 两条 γ 链的互相铰链系通过赖氨酸 (LYS) 和
谷氨酰胺 (GLN) 之间形成共价键的结果, 两条链间形成反平行排列。

对纤维蛋白原模型解说

从一级结构推测出其三度空间结构是有些冒险性, 但文章企图从电镜和生化分析相结合方法来试图列一个三度空间结构。Hall 和 Slagter 的模型认为, 纤维蛋白原来三个球, 中心是小球, 两边稍大些, 这三个球在同一条直线上, 球间连接部位由于金属喷镀太模糊而看不清楚。Cohn 通过 X 衍射认为球间连结有 α 螺旋区。酶介结果展示血浆素解下的 E 片, 一个分子产生仅为一片, 而解下的 D 片, 一个分子产生两片。溴化氰产物片段的二硫结展示有六个末端的氨基酸, 且从免疫学的交叉反映进一步得到证实, 此 E 片即分子的中心球部结构。以上结果为基础, 我们绘出纤维蛋白原分子的详细结构如表 14-7 和图 14-8。

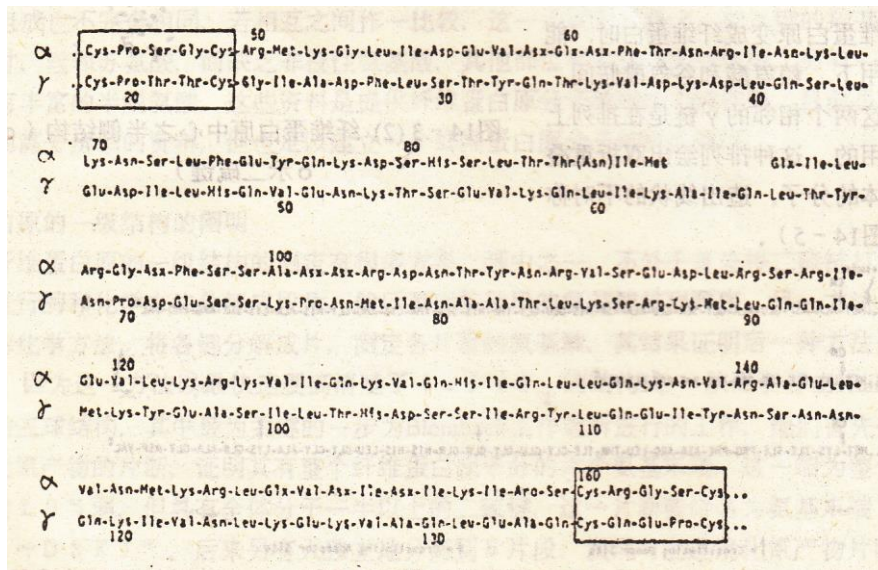


图 14-6 α 和 γ 两条链在两个“二硫键结”之间的一级结构

表 14-1 纤维蛋白原的结构分区域分析

区域	说明	链内残基号	总残基数	计算体积 ^a	外形尺寸	含脯氨酸%
I (中心)	从中心结引出的 6 个 N 端片	2 • α 1~49 2 • β 1~80 2 • γ 1~23	304	42560A ³	自由卷曲链	5.6
II (左)	主要为三股 α 螺旋	α 50~160 β 81~191 γ 24~134	333	46620A ³	20X157 A ^b	1.2
II (右)	主要为三股 α 螺旋	α 50~160 β 81~191 γ 24~134	333	46620 A ³	20X157 A	1.2
III (左)	形成一个椭圆	β 192~475 γ 135~392	542	75880 A ³	66X46X46A ^c 的长椭圆	4.8
III (右)	形成一个椭圆	β 192~475 γ 135~392	542	75880 A ³	66X46X46A ^c 的长椭圆	4.8
IV (左)	α 链的自由附加端	α 161~560	400	52000 A ³		8.0.
IV (右)	α 链的自由附加端	α 161~560	400	52000 A ³		8.0
合计	人纤维蛋白原	α 1~560 β 1~475 γ 1~392	2854	393000 A ³	90X450 A	5.2

A 无水干体积、b 柱体、c 长椭圆形状区。

I 区 即中心区，由六个带 N 端肽链组成，从 N 端开始，至二硫键结处为止，终止于 CYS-PRO-XXX-XXX-CYS 处，每条键部都有此种结构，人的纤维蛋白原含有 304 个氨基酸，其 α 链 1-49，包括可被释放的 A 肽，其 β 链为 1-80，包括可被释放的 B 肽， γ 链为 23 个。

这一球部并非完全对称，中心的二硫键结得很牢的，它可能非均一体，而像马尾巴结，此区有相当于平均量的脯氨酸，约占 5.6%，但在本区内，脯氨酸的量并不平均的。

II 区，有两个，在中心区两旁，左、右各一，是连结中心与两端球部的桥梁。X 衍射证明此区存在着卷曲螺旋，氨基酸排列顺序支持这一观点。首先二硫键结为“烙印”开始，内含非极性残基开始，约束成为三股式螺旋，非极性朝内背向溶剂的。其次，所有这些链内缺少脯氨酸，这样形成螺旋更为容易（平均只有 1.2%），第三，在这个区域中心部位，也存在着极性区，使这一区域不能形成螺旋，这样这个区也易被蛋白酶水解。最后，再看一看两个二硫键绞结间的关系， γ 链起始于 CYS-PRO-XXX-XXX-CYS 止于 CYS-XXX-XXX-PRO-CYS，中间相间 110 个残基，而 α 链也有如此结构，开始于 CYS-PRO-XXX-XXX-CYS 止于 CYS-ARG-GLY-SER-CYS，有些相近，由于 β 链的顺序尚未确定，但也证明有二硫键绞结。由此模型可以看出，在这一区域上三条链带有同源性，这一区域总残基数为 333，每条约占 111 个，按照 α 螺旋 5.1A 的重复性，此区应长达 157A。纤维蛋白原的弹性可能主要从这一区域的螺旋性弹簧上表现出来，II 区的一级结构一氨基酸的排列顺序如图 14-6 所示。

III 区，即外侧两个球部，大致于血浆素下的 D 片。从生物化学上来年，其大小与形状与血浆中清蛋白有具大的区别，其二硫键绞结着的三股头时分子量为 70,000，脯氨酸含量平均为 4.8%，其重量主要地一半来自 β 链羧端，一半来自 γ 链羧端。其中有些二硫键使 β 和 γ 捆成一起的坚实形状，而 α 链自二硫绞结伸出后，尚有一小段仍有二端绞结相连着的。

IV 区，即为 α 链自二硫绞结伸出后的自由附加端，此区缺少非极性氨基酸，但有丰富的甘、丝氨酸及其他极性氨基酸，脯氨酸平均为 8.0%，圆二色散证明这一区域存在着随机卷曲，仅有一个二硫键使这个区域成为一个环状，此随机卷曲非为任意的柔软化。而且具有固定化的形状的。另一方面， α -链在聚合过程中所起的交链作用时，似乎表明这一片断实际上也是自由可以运动的。虽然这区域仅为 400 残基，但所占空间相当大而又广，可能相当于纤维蛋白原其他部分的总体积那么大。这一区域在生物化学上应有很重要的作用的。全模型示图 8，根据残基的计算，绘出每区域的尺寸，并在老的经典模式有一定相符性，也与 Hall 和 Slayter 的模型有一定程度相符性，但这一模型比较精细，许多之处不同于老的。根据二硫键联结外的平行性，二聚体间应有一个角度，约为 145 度，这一角度系根据 Tooney 和 Cohen 对于附结晶的电镜观察以及纤维蛋白的 X 衍射重复点而确立的。还有最后一点，这一模型可以解释纤维蛋白的形成。I，II，III 单侧的示意图如图 14-7 所示，全分子双侧示意图如图 14-8。

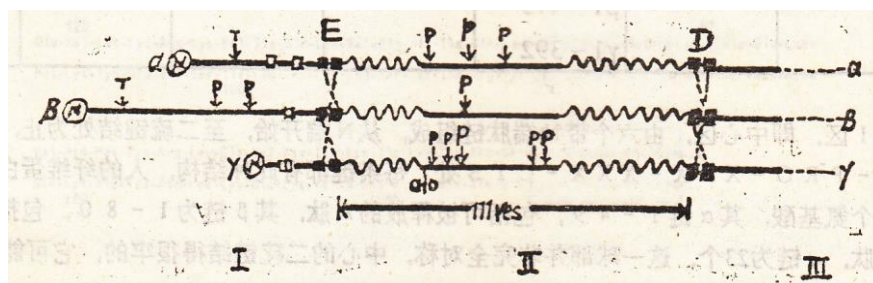


图 14-7E、E 片与 I，II，III 区之间的关系（I 和 II 相当于 E 区，III 相当于 D 区）

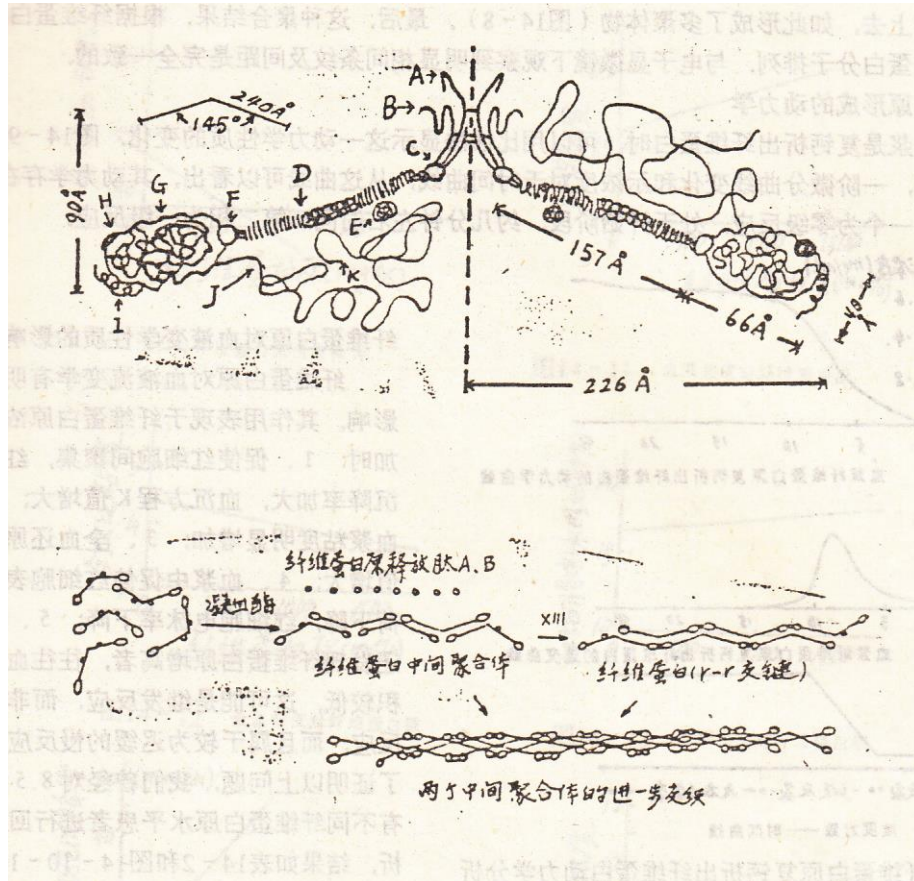


图 14-8 (上) 纤维蛋白原的结构模型 (A 代表 A 断落头, B 代表 B 断落头, C 代表 COOH 端的二硫键结, D 代表螺旋卷曲区, E 代表 γ 链上 52 位的碳水化合物基团, F 代表远离 COOH 端的二硫键结, D 代表 III 区即相当于 D 片, H 代表 β 链上的碳水化合物基团, I 代表 γ 链上的 COOH 的端此链参与分子间的铰链作用, J 代表血浆素攻击区, K 代表 α 链 COOH 端)
(下) 纤维蛋白原左右上下聚合过程。

纤维蛋白的形成机制

任何模型都要能解释, 纤维蛋白是如何形成的。它包括纤维蛋白原释放的起动作用, 连接羧基端的双分子相连的作用, 然后 α 链的羧基端又如何交链成为多聚物的凝块。此模型能对上述问题均作出巧妙的解释。

首先纤维蛋白肽链的释放就允许两个纤维蛋白互补排列, 当两个纤维蛋白的原分子, 各有一个失去一个 A 和 B 肽链时, 就可以因带异种静电而互补平行靠拢, 随着凝血酶的作用, 这种互补作用即可以很快延长。只要有三个分子互相形成互补结构, 即可以形成双分子聚合体, 但小于三个就不行, 根据纤维蛋白原分子结构特点, 这种聚合的相互之间是反平行式的。其次 α 链羧基端具有形成多聚体的作用, 由于 α 链羧基端占有较大的空间, 每一个羧基端可能有两个或更多个交链部位, 当双分子粗细的微纤维伸出来时, 它可以被连接到几个邻近的 α 链上去, 如此形成了多聚体 (图 14-8 下)。最后, 这种聚合结果, 根据纤维蛋白原形成纤维蛋白分子排列, 与电子显微镜下观察到明显相间条纹及间距是完全一致的。

纤维蛋白原形成的动力学

当血浆是复钙析出纤维蛋白时, 可以用比浊法显示这一动力学性质的变化。图 14-9 示动力学曲线, 一阶微分曲线变化示浓度对于时间曲线; 从这曲线可以看出, 其动力学存在着两个

相：一个为零级反应，处于开始阶段，约几分钟左右时间；第二相为一级反应。

纤维蛋白对血液变学性质的影响

纤维蛋白原对血液流变学有明显的影 响，其作用表现于纤维蛋白原浓度增加时：1、促使红 细胞间聚集，红细胞沉降率加大，血沉方程 K 值增大；2、血浆粘度明显增加；3、全血还原 粘度值增大；4、血浆中促使红细胞表面电荷下降，红细胞电泳率下降；5、同时还发现纤维 蛋白原增高者，往往血球压积较低，这可能是继发反应，而直接反应，而且属于较为迟疑的 慢反应。为了证明以上问题，我们曾经对 85 例具有不同纤维蛋白原水平患者进行回归分析， 结果如表 14-2 和图 14-10~16。

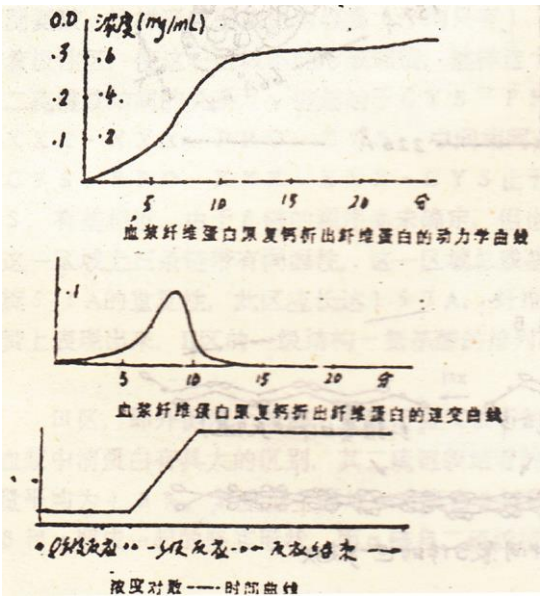


图 14—9 血浆纤维蛋白原复钙出纤维蛋白的动力学分析

表 14-2 纤维蛋白原浓度对整体的血液流变学的影响直线回归分析

项目	相关系数	P	回归方程
血球压积对纤维蛋白原（图 14-10）	-0.405	<0.05	$Y=0.43183-7.26205 \cdot 10^{-4}X$
血浆比粘度对纤维蛋白原（图 14-11）	0.416	>0.05	$Y=1.60972+2.6314 \cdot 10^{-4}X$
全血比粘度对纤维蛋白原（图 14-12）	-0.0958	>0.05	$Y=4.1305-1.63289 \cdot 10^{-4}X$
红细胞电泳对纤维蛋白原（图 14-13）	0.257	<0.05	$Y=16.8621+9.49211 \cdot 10^{-4}X$
红细胞沉降率对纤维蛋白原(图 14-14)	0.781	<0.05	$Y=6.2785+0.0575183 \cdot 10^{-4}X$
全血还原黏度对纤维蛋白原(图 14-15)	0.396	<0.05	$Y=7.83524+1.2454 \cdot 10^{-4}X$
血沉方程 K 值对纤维蛋白原(图 14-16)	0.773	<0.05	$Y=6.69976+0.139134 \cdot 10^{-4}X$

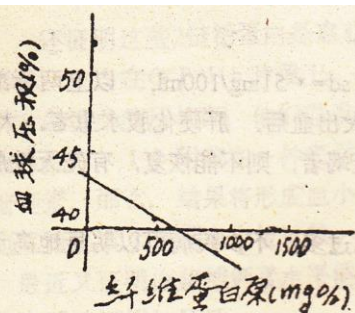


图14-10 血压对纤维蛋白原浓度还标为
纤维蛋白原: (mg%, 下同)

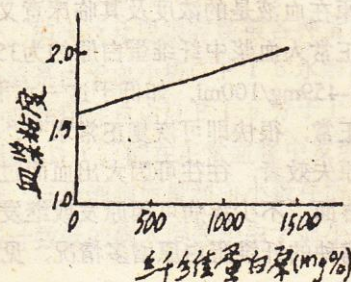


图14-11 血浆粘度对纤维蛋白原

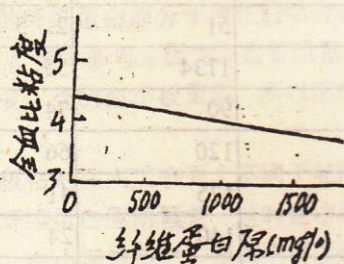


图14-12 全血粘度对纤维蛋白原

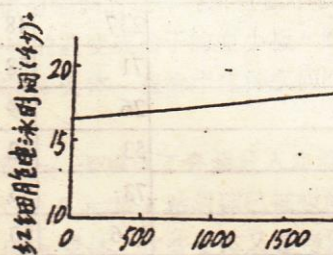


图14-13 红细胞电泳对纤维蛋白原

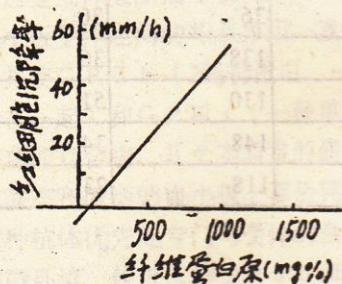


图14-14 红细胞沉降率对纤维蛋白原

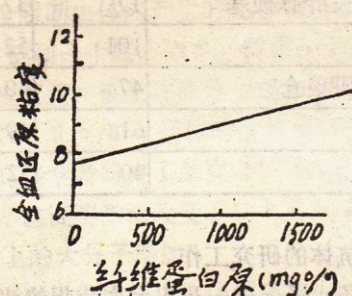


图14-15 全血还原粘度对纤维蛋白原

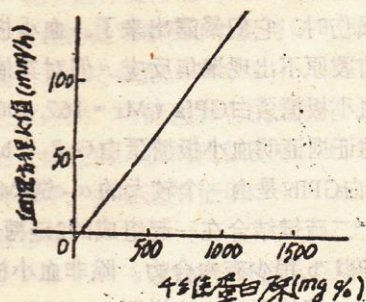


图14-16 血沉方程K值对纤维蛋白原

纤维蛋白原在血液的浓度及其临床意义

一般正常人血浆中纤维蛋白原约为 $357\text{mg}/100\text{ml}$, $\text{SD}=\pm 51\text{mg}/100\text{ml}$, 以上两标准差计算, 约 $255-459\text{mg}/100\text{ml}$ 。如低于这一水平, 常见于大出血后, 肝硬化腹水患者。大出血只要肝功能正常, 很快即可恢复正常水平。凡肝功能衰竭者, 则不能恢复, 有先天性肝脏合成纤维蛋白原失效者, 往往可因大出血而过早死亡。另一方面, 不少疾病与原发或继发纤维蛋白原过多有关 (见表 14—3)。

表 14-3 纤维蛋白原的正常人水平及其与各种疾病病人之间的比较

组别	例数	年龄	平均值	标准差	异常高率 (%)
正常人	237	48	357	51	2. 5
缺血性中风	71	58	490	1134	55
出血性中风	26	59	545	90	74
心肌梗塞	53	62	570	120	66
心绞痛	73	55	446	125	41
心律失常	156	50	413	140	24
脉管炎	26	40	300	58	3.85
视网膜中央动脉梗塞	11	47	421	97	55
视网膜中央静脉梗塞	17	37	433	36	30
肿瘤	101	52	408	138	30
系统性红斑狼疮	47	40	475	130	51
紫舌	61	49	430	148	34
红舌	40	52	376	118	23

抗血小板抗体的研究工作

从分子水平上进一步揭示血小板的流变特征,目前已经有了一些报道。当血管壁受损时,通过血小板受体使血小板粘附到胶原和 von Willebrand 因子上,胶原和 von Willebrand 因子都是内皮下的蛋白质,在内皮细胞受损时,它们暴露出来了,血小板的胶原受体至今还不清楚。轻度出血障碍的病人血小板对胶原不出现聚集反应,但对其他所有的诱导剂能发生聚集反应,并发现其血小板严重缺乏血小板糖蛋白 GPIa (M=167, 000),这说明它至少可能是血小板胶原受体之一,在相当多的证据证明血小板糖蛋白 GPIb 是对内皮下层的 von Willebrand 因子的受体。血小板糖蛋白 GPIb 是由一个较大的 α -链 (Mr=14500) 和一个较小的 β -链 (Mr=22000) 通过一个或多个二硫键结合在一起组成的 2 链糖蛋白。有趣的是在溶液中, von Willebrand 因子对血小板 GPIb 很少有亲合力,除非血小板用抗菌素瑞斯托霉素、蛇毒素 botrocetin 或种种不同的 polycation 等处理过。这说明 von Willebrand 因子吸附到表面必定以某种方式改变它的浓度、构型和微环境。

Coller 等人获得了对血小板糖蛋白 GPIb 的灰鼠克隆抗体。他们用洗涤过的人体血小板使灰鼠免疫,并用灰鼠骨髓瘤细胞株与脾细胞融合测试这咱杂交细胞分泌抗体的能力。这种抗体。已证明它能与 GPIb 相结合,并且用免疫提纯的方法提纯了另一种血小板糖蛋白(GPLx),还证明这些 2 链糖蛋白是靠非共价键而结合在一起的。6D1 的结合位点在 α -链的外侧部分,包括在 GPIb 片段上,称为糖钙素,因为这段很容易被各种蛋白酶,包括血小板通过 GPIb 附着在一种表面上或和这种酶作用在自由 GPIb 分子上使血小板表面释放糖钙素,那么,结果将形成血小板血栓。利用 6D1,能在正常血浆中发现糖钙素。他们认为血浆糖钙素水平是血小板计数,血小板质量、巨核细胞质量和血小板存活期等的复合函数,最近证明血浆糖钙素水平能鉴别血小板计数低的病人倒底是由于血小板产生减少抑制或是由于破坏增加所致。在体内能被所有的兴奋剂激活的血小板能改变他们的表面受体,GP II b/IIIa 使它们对纤维蛋白原的低亲和力加改变为高亲和力,与纤维蛋白结合后,血小板之间彼此聚集(假定通过二聚的纤维蛋白原分子使它们结合在一起)。值得强调的是体内所有血小板聚集都有 GP II b/IIIa 受体参与,因为,血管阻塞的加重和易碎的能变成栓子的血小板-纤维块的增大可能都需要广泛的血小板聚集。所以阻断 GP II b/IIIa 受体,在治疗这种疾病时可能是很有效的。血小板粘附在人工表面上不同于粘附在自然表面上。若将人工表面放入血流中,人工表面很快被纤维蛋白原所覆盖,这时血小板可能通过 GP II b/IIIa 粘附到已被吸附的纤维蛋白原表

面上，血小板被激活，暴露出更多的 GP IIb/IIIa 受体，这些受体又参与聚集过程。

使灰鼠免疫并产生杂交株，以获得灰鼠对 GP IIb/IIIa 体的单克隆抗体，测试培养上清液中这些抗体阻断血小板凝集到纤维蛋白原覆盖层的能力，也就是这种抗体阻断纤维蛋白原和血小板受体之间的相互作用，发现这些抗体完全阻断由体内产生的化合物引起的血小板聚集，并使 GP IIb（2 链糖蛋白，一个较大的 α -链和一个较小的 β -链借一个或多个二硫链结合在一起）和 GPIIIa（一种单链糖蛋白）免疫沉淀，证明这些分子是作为纤维蛋白原受体的功能复合物。几个实验室的研究结果已确定 GP IIb/IIIa 受体的生物学特性，证明这受体在静态和激活的血小板上都是钙依赖复合物。有些学者研究了单克隆抗体的激活改变了 GP IIb/IIIa 受体的构型和微环境，使进入到 GP IIb/IIIa 的结合位点上的大分子增加。

纤维蛋白原不存在的情况下，用凝血酶激活的血小板能使纤维连接蛋白和 vonWillebrand 因子与 GP IIb/IIIa 结合，说明这种受体能与几种不同的糖蛋白相继合，这些相互作用的生理学意义有待进一步探讨。有趣的是观察到 3 个能与 GP IIb/IIIa 结合的分子都有特定的 3 氨基酸序列：精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸（RGD）。具有此序列的小多肽能抑制所有 3 种糖蛋白的结合，这种相同的三肽序列，可能也参与使这些糖蛋白和相关蛋白结合到其他细胞中参与细胞粘附现象的其他受体很相似。

Coller 已采用 2 种 GP IIb/IIIa 受体作用的单克隆抗体，10E5 和 7E3 作为各种不同的诊断和治疗手段，其中包括：

1. 在体内使血栓成象。他们利用抗体有与血小板结合的高度亲和力的优点，设计了简单方法用 ^{125}I -7E3 抗体放射标记血小板，抗体的浓度很低，血小板功能没有明显地抑制，将这种标记血小板注入到患有实验性血栓的动物中去，使得血栓成象，外面用伽玛照相机记录。
2. Glanzman 血小板机能不全的诊断。这罕见的遗传性疾病患者的血小板上只有很小或不存在 GP IIb/IIIa 受体，他们身上经常出现与外伤有关的出血，在以色列的伊拉克-犹太族居民中，这种疾病有高发倾向。用放射标记的 10E5 抗体不能与他们的血小板结合，借此诊断该疾病。定量的 10E5 结合研究使医生们能高度精确地诊断该病的携带者，因为这些携带者的血小板能结合 10E5 正常量的 60%。还可利用此技术作产前诊断，证明母亲所怀的胎儿是这种疾病的患儿还是疾病携带者。
3. 抗血栓作用。在狗身上的初步研究表明，用 7E3 中（ab'）2 片段，剂量 0.8mg/kg（不用完整的 7E3 是为了避免抗体覆盖的血小板脾巨噬细胞之间的相互作用，这种巨噬细胞具有对免疫球蛋白 Fc 部分敏感的受体），ADP 诱发的血小板聚集几乎被消除掉，近 85%GP IIb/IIIa 受体被阻断，但没有自发性出血或明显的症状发生动物模型中试用这种剂量的抗体，该模型内部分狭窄的血管中有血小板血栓形成（狗的冠状动脉和猴的颈总动脉中）。抗体能消除血小板血栓形成，导致血流增加，刺激性措施包括低剂量肾上腺素的灌注，对血管的机械损伤，都不能逆转抗体的作用。抗体是该模型试验中最强有力的抗血栓药物，狗模型的冠状动脉含有血栓和高度固定的狭窄，用重组的组织纤维蛋白溶酶原激活物使血栓溶解掉以后，观察抗体对于预防这种冠状动脉再栓塞的能力，初步结果表明，抗体预防再阻塞比肝素更有效。
4. 抑制癌肿转移。在癌转移过程中涉及到血小板，因为在实验模型中血小板减少症能降低癌转移。用抗体 10E5 使 GP IIb/IIIa 受体阻断能预防癌转移，其程度与血小板减少症降低癌转移的程度相同。联想到最近已证实含有 RGD 的多肽也能抑制癌转移，这些结果是很有意义的。

以后要进一步在体外实验和体内实验中采用单克隆抗体研究血小板功能的生理和病理生理学，并用它作为诊断治疗疾病的武器。

关于凝溶蛋白的研究

肌动蛋白是自然界中最丰富、储藏得最丰富的蛋白质之一，是细胞运动和细胞形态的主要决定因素。在细胞质中，肌动蛋白可逆地从单聚体球状亚单位（G-actin）装配成双螺旋细胞丝（F-actin），再进一步组成各种相互的结构，从平行的束到各向同性的垂直的网络结构，这些结构的形成和很大的变异性决定于大量细胞质的肌动结合蛋白的作用。

1. 凝溶蛋白是在从低等的真核细胞哺乳类中发现的一类肌动-调制蛋白的代表，它对肌动蛋白细丝的长度有决定性影响。在兔肺的巨噬细胞中首次发现，以后在很多种哺乳类细胞中相继被发现。它的名字来源于它能参与细胞质提取物，从凝胶相通过股动细丝长度分布的缩短，向溶胶相过度这过程。细胞质凝溶蛋白是由单多肽组成，用聚丙烯酰胺凝胶电学期工作总结电泳在十二烷基硫酸钠（SDS-PAGE）存在时，估计它的表观分子量为 90Kda。在血浆中发现一种稍大凝溶蛋白，分子量 93Kda（用 SDS-PAGE），与细胞质凝溶蛋白相比，在氨基端多 325 个氨基酸。生物合成实验已证明人体肝癌细胞 Hep G2 合成不等量的两种凝溶蛋白在已知的哺乳类蛋白中是很独特的，它作为内在的细胞质成分而合成。而分泌到细胞外介质中去。

2. 在细胞质中凝溶蛋白和肌动蛋白间的相互作用是多方面的，而且是复杂的， Ca^{2+} 浓度较低时，纯化的凝溶蛋白对 G-或 F-肌动蛋白的结合相对较弱。当 Ca^{2+} 超过 10^{-6}M ，凝溶蛋白对肌动蛋白的亲合力几乎升高 3 个数量级。凝深蛋白能同时与 2 个肌动蛋白单体结合，在有 Ca^{2+} 存在时，凝溶蛋白与肌动蛋白结合的高亲合力似乎与溶蛋白对 F-肌动蛋白强力作用有关，即在肌动蛋白细丝内部，肌动蛋白之间的键断裂造成细断裂。这咱效应保证少量的凝溶蛋白迅速地使肌动蛋白细丝缩短，并使横向联系的股动蛋白凝胶网络溶胶化，此后凝溶蛋白继续与变短的肌动蛋白细丝的高亲合力端结合，通过低亲和端部分的解聚作用导致 F-肌动蛋白进一步缩短。此外，凝溶蛋白能加速肌动蛋白单体装配成细丝，这个过程称为成核作用，在细胞内凝溶蛋白对肌动蛋白的复杂作用使凝溶蛋白调节肌动蛋白的装配。进而控制细胞结构和活动性。

3. 血浆凝蛋白，与细胞质凝溶蛋白相反，血液中血浆凝溶蛋白的功能尚待阐明。由于凝溶蛋白非常有效地使股动蛋白细丝变短，有可以涉及到循环系统中肌动蛋白的清除。在组织损伤或正常细胞更新时，作为主要的细胞和肌肉蛋白的肌动蛋白能被释放到血液中去，引起短暂的局部的肌动蛋白浓度增高。血液中离子状态有利于肌动蛋白装配成细丝，肌动蛋白细丝数量增多，导致血液粘度升高，可能引起严重后果。并且，肌动蛋白细丝，通过其本身或可能与纤维形成复合物，使毛细血管阻塞，损害微循环，因此，肌动蛋白细丝长度和/或血浓度减少的机制是很意义的。越来越多的证据说明在一定条件下肌动蛋白释放入血，血浆凝溶蛋白最可能是细胞外肌动蛋白的“中和”蛋白。下列事实增强了需要去除细胞外肌动蛋白细丝的设计，即除了血浆凝溶蛋白外，至少还发现有另一种血浆蛋白细丝解聚化。所以，这两种肌动蛋白调节蛋白能协同地从血液中去掉肌动蛋白。

4. 凝溶蛋白的分子生物学问题，为了探讨凝溶蛋白多功能性的结构基础，心脏细胞质凝溶蛋白和凝溶蛋白的形式形成的分子基础，采取两种方法：首先是蛋白质的结构-功能分析，第二是凝溶蛋白 cDNA 和基因分子克隆，凝溶蛋白有 2 个位点可协调地与肌动蛋白结合。用水解蛋白酶切断和单克隆抗体定位技术能将这些结合点定位出来，分子的 NH_2 端那一半含有 Ca^{2+} 不敏感肌动蛋白切变区段，它不能切断肌动蛋白细丝，因完整的凝溶蛋白与肌动蛋白相互作用，尤其是用凝溶蛋白切断肌动蛋白细丝时，是受 Ca^{2+} 充分调节的。这些资料说明完整的凝溶蛋白 NH_2 端切断区段，是受 Ca^{2+} 调节的 COOH 端分子那一半第一个肌动蛋白结合位点和占领需要有 Ca^{2+} ，然后第二个隐蔽的但特有 Ca^{2+} 不敏感位点才暴露出来，使肌动蛋白与凝溶蛋白的 NH_2 端那一半区段相结合。

从人体血浆凝溶蛋白 cDNA 克隆推测的凝溶蛋白一级结构支持存在着两个肌动蛋白结合区段的假设，这些区段可能通过基因重复而产生的，而后分化以适应它们各自的独特功能。凝溶蛋白的血浆和细胞质形式是由各自 mRNA 编码的，Southern 印迹分析证明它们都来自单

个基因。凝溶蛋白基因结构分析显示每个蛋白的特异信使是由不同的 RNA 拼接衍生而来，这些信使有特异的录制起始位点，很可能凝溶蛋白的两种形式的表达调控是互相独立的，以适应细胞骨架蛋白重组和运动的需要，以及血浆凝溶蛋白分泌的需要。

钙离子与剪切引起肿瘤细胞破坏的关系

每于有几百万肿瘤细胞进入血流，通过循环系统转运至身体各部。如果在这阶段，让肿瘤细胞接触流变切应力，它们被破坏的速率相当高，用流变学方法使肿瘤细胞破坏在生物学上有重要意义。

Koyama 等采用旋转型锥—板粘度计对鼠的纤维肉瘤 KMT17 细胞悬浮液进行剪切，最大切应力为 5.3 牛顿/平方米，相当于循环系统中最大切应力。切应力持续 1-2 小时，切应力越大，肿瘤细胞的存活率越低；剪切时间越长，肿瘤细胞存活率越低。如果悬浮液中不含有 EDTA，经剪切 2 小时后，尚有 80% 的肿瘤细胞存活。若悬浮液中含有 EDTA，则几乎所有的肿瘤细胞在剪切 2 小时后被破坏了。但若将肿瘤细胞悬浮在这种含有 EDTA 的介质中，不给予任何剪切，在 37℃ 下培养 2 小时，80% 肿瘤继续存活。这说明二价阳离子缺乏和/或被螯合不能单独地破坏肿瘤细胞。

纤维肉瘤 KMT17 细胞的直径为 $17.4 \pm 2.2 \mu\text{m}$ ，用核孔滤膜，核孔直径分别为 10 μm ，8 μm ，5 μm ，让肿瘤细胞通过此膜，肿瘤细胞要经过变形才能通过，有些细胞在通过滤膜时时被破坏，大部分肿瘤细胞通过 10 μm 滤孔以后能继续存活，一半多的细胞在通过 8 μm 滤孔时被存坏了，几乎所有的肿瘤细胞通过 5 μm 滤孔时被破坏。如果悬浮介质中含有 EDTA，肿瘤的破坏率明显增高，这说明二价阳离子的缺乏和/或 EDTA 加入增强了肿瘤细胞通过核孔时的破坏。

异搏定是一种钙离子通道阻滞剂，如果在悬浮液中加入异搏定（2.5mg/ml），通过核孔后肿瘤细胞的存活率明显降低。以上结果说明二价阳离子的消除和/或细胞膜钙离子通道阻滞能增强循环系统中肿瘤细胞的流变学破坏作用。