

- [7] Buttyan, R. et al., 1989, *Mol. Cell Biol.*, 9: 3473—3481.
- [8] Sensibar, J. A. et al., 1990, *Prostate*, 16: 263—269.
- [9] Fesus, L. et al., 1991, *Eur. J. Cell Biol.*, 56: 170—177.
- [10] Wyllie, A. H., 1993, *Br. J. Cancer*, 67: 205—208.
- [11] Gong, J. et al., 1994, *Anal. Biochem.*, 218: 314—318.
- [12] Rosl, F., 1992, *Nucleic Acid Res.*, 20: 5243—5244.
- [13] Huang, P. and Plunkett, W., 1992, *Anal. Biochem.*, 207: 163—169.
- [14] Huschtscha, L. I. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, 212: 161—172.
- [15] Wijsman, J. H. et al., 1993, *J. Histochem.*, 7—11.

植物钙调素结合蛋白(CaMBPs)的研究概况

唐军 郭毅 孙大业

(河北师范大学生物系 石家庄 050016)

钙调素结合蛋白(CaMBPs),从广义上说是指能和钙调素(CaM)结合的所有蛋白,包括已经确定了其活性直接受钙调素控制的各种酶类(比如PDE、Ca²⁺-ATPase、蛋白激酶等),以及在体外或体内条件下能和钙调素结合,但功能性质都有待深入探讨的各种未知蛋白;从狭义上说,钙调素结合蛋白仅指那些能和钙调素结合的未知蛋白质。本文将讨论广义的植物钙调素结合蛋白。

一、钙调素结合蛋白 研究的意义

CaMBPs是Ca²⁺、CaM信号传递通路中的一个重要组成部分,是CaM直接结合和作用的靶蛋白,因此研究CaMBPs有助于探明Ca²⁺、CaM调控某些生理活动的分子机制。它的研究还可将Ca²⁺、CaM途径从其他Ca²⁺信号途径中甄别出来,并且有利于了解CaM的多种作用途径,如现已发现一些CaMBPs,它们和CaM的结合不依赖Ca²⁺,暗示着CaM可能具有不依赖于Ca²⁺的其他功能;另外,在动物中已发现许多CaMBPs,同时又是PKA或PKC的靶蛋白,从信号系统的全局来看,这些

CaMBPs处在各信号通路之间的枢纽位置,因此搞清CaMBPs的性质尤其是它可能存在的磷酸化性质,对理清胞内信号通路间错杂的脉络有重要的意义。

二、钙调素结合蛋白 的研究方法

CaM亲和层析和CaM gel overlay是目前在CaMBPs研究中最基本与常见的方法。其中CaM gel overlay法主要用于检测CaMBPs的有无,以及研究在环境刺激下或发育等动态过程中CaMBPs的变化情况,包括它们和CaM结合能力的变化情况;CaM亲和层析法则通常和CaM gel overlay联用,用于某种CaMBP的酶活性检测以及某些CaMBPs的纯化及部分纯化。除了这两种基本的方法外,还可根据实际研究的需要,选用其他方法,如若以膜CaMBPs为研究对象,可使用一些双功能试剂,将CaM探针和膜上CaMBPs偶联起来,再进行SDS-PAGE分析,这样可防止膜上CaMBPs解离下来时发生的构象变化影响它与CaM结合能力;若想进行CaMBPs的定位,可用荧光或其他标记的CaM做探测工具,使用某种

CaMBP的抗体则可对具体的CaMBP进行定位;在活体上研究一些酶对CaM的依赖性时,可使用CaM的拮抗剂或进一步去除内源CaM,或纯化出酶之后再加CaM研究酶活性的变化情况加以确认。

近年来,对CaMBPs的研究也开始借助于分子生物学的手段,比如用 ^{125}I -CaM或 ^{35}S -CaM筛选一个基因文库,把一些CaMBPs的cDNA克隆分离出来,然后从cDNA推断蛋白序列,或用PCR扩增后,对这些片段进行表达,再从CaMBPs的结构、特点等方面做进一步的研究。

三、植物CaMBPs的研究概况

有关植物CaMBPs的研究工作,目前虽然进行了一些,但非常有限。下面就这方面的工作做一简要介绍。

(一) 依赖于CaM的酶

1. NAD激酶和 Ca^{2+} -ATP酶

NAD激酶和 Ca^{2+} -ATP酶是植物细胞中研究的最多的CaMBPs。NAD激酶在生物体中有两种存在形式,一种不依赖于CaM,而另一种则绝对依赖于CaM,由于NAD激酶不稳定,因而难以纯化;该酶的天然分子量约为50KD—55KD。NAD激酶主要催化NAD(H)向NADP(H)的转变,因而胞内NAD(H)和NADP(H)浓度比例的变化是判定NAD激酶参与的一个重要指标,由于有不依赖于CaM的NAD激酶的存在,给依赖于CaM的NAD激酶的功能研究造成了一定的困难。目前在叶绿体、胞浆、线粒体中都发现有NAD激酶,而且分布因物种而异。Muto^{[1][2]}认为NAD激酶主要存在于叶绿体中,其中不依赖于CaM的NAD激酶存在于基质中,主要催化叶绿体中光诱导的NAD(H)向NADP(H)的转变,该过程产生的NADP(H)参与了 CO_2 固定循环;而CaM依赖型的NAD激酶则位于叶绿体的内膜

上,主要负责胞浆中NADP的供应,产生的NADP可被叶绿体内膜上的磷酸转位装置(translocator)利用,参与磷酸丙糖/3-磷酸甘油酯穿梭系统。除光以外,低温和铝毒害等外界刺激也能提高胞内NAD激酶的含量,其中包括CaM依赖的NAD激酶^[3]。在它们的作用下NAD(H)和NADP(H)的比例下降,但这些外界刺激通过NAD(H)和NADP(H)的比例变化,所产生的生理效应还不清楚。

对植物 Ca^{2+} -ATPase的了解远不如动物 Ca^{2+} -ATPase清楚。动物 Ca^{2+} -ATPase已明确存在于质膜上,受CaM调控,对维持胞内平衡的 Ca^{2+} 环境起着重要的作用。虽然在植物方面大量的研究结果表明,植物细胞的质膜上也存在有 Ca^{2+} -ATPase而且同样具有维持胞内 Ca^{2+} 环境的功能,但在CaM是否激活 Ca^{2+} -ATPase方面所得到的研究结果并不完全一致。一些研究表明CaM可以激活质膜上的 Ca^{2+} -ATPase,而且Briars等^[4]用CaM-Sepharose亲和层析柱分离纯化出了分子量为140KD的CaM可激活的植物 Ca^{2+} -ATPase,抗红细胞膜138KD Ca^{2+} -ATPase的抗体能和这种植物 Ca^{2+} -ATPase发生交叉反应。但另一些研究表明一些ATP依赖的 Ca^{2+} 通过质膜的过程并不受CaM激活。因而推测植物细胞中 Ca^{2+} -ATPase可能也有两种存在形式,一种受CaM的调控,而另一种则不受CaM调控。值得一提的是Brauer^[5]的实验表明在玉米细胞中 Ca^{2+} -ATPase位于内质网上而不在质膜上。以上这些研究表明植物细胞中的 Ca^{2+} -ATPase的情况可能和动物上的 Ca^{2+} -ATPase不完全一样。

2. 依赖于CaM的蛋白激酶

磷酸化过程一向被认为是细胞信号系统中最重要传递步骤。在动物细胞中许多有关 Ca^{2+} 、CaM的信号传递都是通过依赖CaM的磷酸化酶完成的,其中CaM依赖的磷酸化酶II,可磷酸化多种底物,因此显得尤为重要。在植物方面,虽然还未将这种依赖于CaM的

蛋白激酶分离纯化,但证明其可能存在的证据已有不少,如:①一些研究表明奎宁:NAD氧化还原酶和 H^+ -ATPase^[6]是受依赖于 Ca^{2+} .CaM的磷酸化作用调节的,这些CaM蛋白激酶的可能底物的存在,是证明植物中存在CaM蛋白激酶的有力证据之一。②Blowers等^[7]从豌豆质膜上初步分离出具有蛋白激酶活性的蛋白,通过Western blotting对其活力进行了研究,发现该蛋白能以 Ca^{2+} .CaM激活的方式在丝氨酸残基上自磷酸化。③最近的研究则着重于寻找类似于动物中依赖于CaM的蛋白激酶II。利用抗动物CaM激酶II调节亚基上不同肽段的抗体,对玉米、豌豆、拟南芥等的可溶性蛋白和膜蛋白进行了检测,结果在可溶性蛋白部分检测到一到二条带,分子量在54—56KD之间,这和动物CaM激酶II的分子量很相似^[9]。④玉米根可溶性提取物部分,能以依赖于 Ca^{2+} .CaM的方式磷酸化动物CaM激酶的天然底物突触素I,而且其磷酸化位点和CaM激酶II的磷酸化位点一致^[8]。⑤Wattillon等^[9]利用¹²⁵I-CaM筛选一个植物基因表达文库,分离出了一个CaMBP的cDNA克隆,推断出的Aa顺序和兔脑CaM激酶II的氨基酸顺序非常相似。以上这些实验证据表明在植物中可能有CaM激酶存在,也许是由于含量微小的缘故,很难纯化而直接证明它的存在,但毫无疑问,这方面的工作仍将是研究的热点。

3. NTPase(细胞核中的三磷酸核苷酶)

一些研究事实表明核内的NTPase是受CaM调节的。Molsamoto等^[10]在豌豆细胞核中与染色体结合的部分,发现有NTPase存在,其活力在有 $\mu M Ca^{2+}$ 存在下,能被CaM激活15倍。Chen等^[11]对该酶进行了更为详尽的研究,他们首次从豌豆细胞核中分离纯化出这种NTPase,在SDS-PAGE中其表现分子量为47KD, Ca^{2+} .CaM能将该酶的活力提高3倍, Ca^{2+} 螯合剂EGTA、CaM拮抗剂48/80和Chlopromazine都能抑制 Ca^{2+} .CaM对其的

激活。这些研究事实强有力地证明了NTPase是一种依赖于CaM的酶。Chen等的研究还表明^[11],核内NTPase是受光激活光敏素调控的,因此推测 Ca^{2+} .CaM介导参与了光敏素对NTPase的调节。

此外我们的研究发现用CaM拮抗剂及外加CaM激活实验表明玉米和白芷细胞线粒体膜的粗制液中琥珀酸脱氢酶可能受控于CaM。在玉米线粒体中部分纯化出的琥珀酸脱氢酶的天然电泳图谱中,CaM在天然状态下和琥珀酸脱氢酶的大小亚基复合物紧密结合为一个带,而在SDS-PAGE条件下可分离出一个分子量与CaM相同的带,表明CaM可能是琥珀酸脱氢酶的一个亚组份。另外有实验表明^[12]谷氨酸脱羧酶也是一种受 Ca^{2+} .CaM调节的酶。

(二)能和CaM结合的蛋白质

1. 器官、组织以及细胞亚结构中的Ca-MBPs

虽然研究鉴定CaMBPs对深入了解 Ca^{2+} .CaM信号通路有重要的意义,但在植物领域,有关的研究非常有限,其中尚克进、凌启阁等^[13]对白菜胞浆中10KD的CaMBP的研究进行的比较全面和深入。他们从白菜胞浆中发现存在一种依赖于CaM的磷酸二酯酶的活性抑制因子,用¹²⁵I-CaM gel overlay分析,证明该因子为一种CaMBP(暂名BP-10),而且它对 Ca^{2+} 不敏感,甚至在EGTA存在的条件下表现出和CaM有更多的结合,分离纯化出BP-10之后,把它用作CaM的专一抑制剂,研究外加BP-10后对生长素应答反应的影响,结果表明BP-10抑制了生长素诱导的胚芽鞘的伸长和质子外排,这种抑制作用能被外加CaM所克服,从而说明CaM可能参与了植物生长素的应答反应^[14]。虽然在真正的生理状态下,BP-10是否和CaM参与的激素诱导效应有关还不得而知,但在探索BP-10的可能功能以及利用其作为研究CaM功能的手段等方面做了有益的尝试。最近Ling等^[12]用¹²⁵I-CaM gel overlay方法,在蚕豆苗中检测到一

组 CaMBPs, 其中根中分子量为 62 KD 的 Ca-MBP 已被纯化。

其他有关 CaMBPs 的研究大多还停留在 CaMBPs 存在与否上, 以及定性比较不同部位 CaMBPs 分布情况等方面, 但这些初步的研究对了解 CaM 的功能以及 Ca^{2+} 传导途径方面是很有用的。Roberts 等^[15] 曾用 ^{125}I -gel overlay 对菠菜和豌豆叶绿体亚结构上 CaMBPs 的分布情况进行了分析比较, 结果表明在叶绿体的外膜部分上存在分子量为 33 KD 的主要 Ca-MBP; 在类囊体和基质部分则未检测到该蛋白。这种 CaMBPs 的分布差异表明 CaM 可能通过其结合蛋白参与了叶绿体功能的调控, 而这种调控作用的进行有空间上的次序。Ling 等^[16] 检测了 *Vicia faba* 不同组织、器官以及叶表皮细胞、保卫细胞、叶肉细胞所制备得到的原生质体中的 CaMBPs 分布情况, 结果发现 CaMBPs 的分布有器官、组织乃至细胞类型的差别, 说明 CaM 介导的过程有组织特异性。另外有人在玉米花粉中也检测到了 CaMBPs^[17]。

有趣的是, 叶正华等^[17] 在小麦细胞的细胞壁检测到了 CaMBPs, 唐军等^[18] 用 CaM gel overlay 的方法也分别在小麦愈伤组织的细胞壁、白芷悬浮培养细胞的细胞壁上检测到了 CaMBPs, 其中白芷细胞壁中的一个 21 KD 的 CaMBP 已经被纯化。据报道植物胞壁上有 CaM 存在^[20], 而且这些胞外的 CaM 能促进细胞的增殖^[21], 但其具体的作用机制以及其他的功能意义都不清楚。因此研究胞外 CaMBPs 的性质、特点、功能可为阐明胞外 CaM 存在的意义开辟了道路。

2. 脱分化、分化以及发育等动态过程中的 CaMBPs

在植物脱分化形成愈伤组织以及再分化的过程中, 对有关的各种代谢事件的研究方面已经积累了不少资料, 由于脱分化过程实际上是一个激素应答的过程, 因而从信号系统的角度探索这个过程是很有价值的。已有的大量研究

结果表明 Ca^{2+} 、CaM 参与了激素诱导愈伤组织的形成和诸如芽分化、不定根、维管束的分化等分化过程。我室的李家旭^[22] 用生物素标记的 CaM 检测了胡萝卜在形成愈伤组织的过程中 CaMBPs 的变化情况, 结果发现有一个 2, 4-D, KT 等激素诱导的分子量为 54.5 KD 的 CaMBP 存在, 而在对应的无激素诱导的胡萝卜外植体中未检测到该蛋白。结合我们以往的工作, Ca^{2+} 、CaM 很可能参与了激素诱导愈伤组织形成过程的调节, 但激素诱导和 CaMBPs 之间的关系, 有待于进一步阐明。在对分化过程中 CaMBPs 的研究方面, Oh 等^[23] 用 ^{125}I -CaM gel overlay 研究发现在胡萝卜胚状体形成过程中, 分子量为 26 KD 的 CaMBP 有较高的含量, 而在无分化能力的细胞中该蛋白的含量极低, 最近 Kobayashi 等^[24] 在研究生长素和细胞分裂素诱导百日草细胞管状分子分化时发现, 在细胞次生壁形成以前新出现了分子量分别为 28 KD 和 27 KD 的两种 CaMBPs。虽然目前对这些 CaMBPs 的作用还不清楚, 但深入对它们的研究, 对揭示 Ca^{2+} 、CaM 参与细胞分化和脱分化的调控机制将会起重要的作用。

对植物其他发育过程的研究同样也是人们注目的焦点。在根尖细胞早期发育中, 依赖于 CaM 的 NADKase 发生了相应的变化。Cocucci 等^[25] 发现在小萝卜种子萌发早期 CaM 含量升高而同时 CaM 依赖的 PDE 的抑制因子的含量则相应下降, 这种抑制因子可能是一种 CaMBP, 说明 CaM 以及 CaMBPs 可能参与了种子萌发过程。Braudey 等^[26] 用 ^{125}I -CaM 对岩藻从配子到合子的发育过程中 CaMBPs 的变化进行了检测, 结果发现精子和卵子的 CaMBPs 种类不同, 在精卵结合产生合子后的 1 到 65 小时中, 分子量为 72 KD 的 CaMBP 的带极为突出。Oh 等^[23] 的研究发现在胡萝卜悬浮培养中产生的胚状体萌发时, 新出现一条 54 KD 的 CaMBP 带, 而且该蛋白已被纯化。这些研究事实表明, 某些 CaMBPs 和发育有关并随发育的进程而发生相应的变化, 因此 CaM 在发育

的各个阶段可能起着不同的调控作用。深入研究这些 CaMBPs 可以搞清 Ca^{2+} ·CaM 信号在发育过程中通过不同的 CaMBPs 所起的重要作用。

3. CaMBPs 的基因克隆研究

O'eil 等^[27]对动物系统 CaMBPs 的结构研究表明, CaMBPs 和 CaM 的结合区是一个碱性双亲的 α -螺旋。虽然不同类型的 CaMBPs 在结合区内的氨基酸并不保守, 但同一类的 CaMBPs 在结合区内的氨基酸是高度保守的。在植物方面有人用 ^{35}S -CaM 筛选的方法从玉米根尖 cDNA 表达库中分离出两个 CaMBPs 克隆, 比较两者推测得到的氨基酸顺序, 有 50% 的相似性, 在羧基端的 34 个氨基酸序列中, 表现出 100% 的一致, 推测这 34 个氨基酸序列也可形成双亲 α -螺旋, 因此极有可能是 CaM 结合区, 而且说明这两种 CaMBP 有功能上的相似性。对这两种 cDNA 进行 Northern 分析表明, 这两种蛋白在所测试部分都得到表达, 表明它们据有广泛的功能。Southern 分析表明这两种 cDNA 虽在推测的氨基酸组成上有 50% 的相似性, 但相互之间却不能杂交。

四、比较和展望

比较动植物领域 CaMBPs 的研究情况, 不难看出前者要更广泛和深入, 在动物中已经查明的 CaM 依赖的酶就有 20 余种, 在植物方面却只有有限的几个。有关 Ca^{2+} ·CaM 参与调控生理事件的具体机制在动物方面已在非肌细胞的收缩、糖原代谢等方面有了令人满意的研究结果。但在植物方面, 几乎对所有的 CaM 参与的生理功能的具体机制都不很清楚。在这种动物 CaMBPs 的研究远远领先于植物 CaMBPs 研究的情况下, 借鉴在动物方面的经验和思路, 对植物 CaMBPs 的研究是非常有益的。CaM 促进细胞增殖生长等普适于动植物细胞的功能, 在动物上已从 CaMBPs 方面做了多方面的研究, 在植物方面则刚刚起步。例如, 在动物方面已经发现: 1) 一些骨架蛋白受 CaM

调控, 它们通过纺锤体微管的组装和去组装影响着细胞分裂。2) 上述这些骨架蛋白也发现存在于细胞核中, 当细胞从静止状态进入增殖状态后, 这些骨架蛋白在数量和空间上发生了相应的变化, 推测 CaM 通过作用于核骨架而调节 DNA 的合成^[28]。3) 在核中还鉴定出依赖于 CaM 的激酶和磷酸酶如 Calcinerin, 表明核中发生的事件可能和依赖于 CaM 的磷酸化过程有关^[29]。4) 已发现一个 68 KD 的 CaMBP 可能和 DNA 复制的起点有关^[30], 在植物方面还未见有关的报道。植物细胞中也有细胞骨架存在, 但它们和 CaM 的关系还不明确; 另外对细胞核中的 CaMBPs 的研究也还是空白。

前面提到的对植物 CaM 依赖的激酶的研究就是受动物细胞信号系统模式的影响, 如对蛋白磷酸化作用的深刻认识, 推测植物细胞中也应该有 CaM 依赖的激酶存在, 并且利用动物 CaM 依赖的蛋白激酶 II 及其抗体做直接的研究工具检测植物细胞存在 CaM 依赖的蛋白激酶 II 的可能性。磷酸化和去磷酸化是可逆的调节过程, 在动物中同时有依赖于 CaM 的蛋白激酶和 CaM 依赖的磷酸酶存在。在植物细胞中对是否存在 CaM 依赖的蛋白激酶已作了不少研究, 但有关 CaM 依赖的磷酸酶的工作还未见报道, 相信今后也应得到重视。

植物细胞中所确定的 CaMBPs 比较少的原因除了起步晚以外, 可能还和含量少有关。相信随着研究手段灵敏程度的不断提高, 越来越多的 CaMBPs 将被发现, 特别是最近出现的用同位素标记 CaM 筛选 CaMBPs cDNA 克隆的方法, 会有助于植物 CaMBPs 研究的深入。

虽然我们可以从对动物 CaMBPs 的研究中得到许多帮助和启发, 但仍必须小心谨慎, 因为动植物细胞的结构和功能本身就有些差别。已有的研究表明植物细胞中 Ca^{2+} 信号通路有自己的特点, 例如植物细胞外有细胞壁存在, 越来越多的研究表明细胞壁在某些信号的传递上起着重要的作用^[31], 我们在细胞壁上证实

有 CaM 存在,因此对胞外 CaMBPs 的研究也将成为植物细胞信号系统研究中重要的一部分。

摘 要

本文简要论述了研究钙调素结合蛋白的意义和方法,着重介绍了植物领域中钙调素结合蛋白的研究状况,其中包括一些依赖于钙调素的酶的研究进展及未知钙调素结合蛋白的研究方向和现状,并在比较动植物钙调素结合蛋白研究工作的基础上,对植物钙调素结合蛋白今后的研究谈了些粗浅的设想。

参 考 文 献

- [1] Muto, S. and Hiroswawa, T., 1987, *Plant Cell Physiol.* 28: 1569—74.
- [2] Muto, S., 1992, *International Review of Cytology*, 142: 305—345.
- [3] Roberts, D. M. and Harmor, A. C., 1992, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 375—414.
- [4] Briars, S. A. et al., 1988, *Planta*, 176: 283—285.
- [5] Brauer, D. et al., 1990, *Physiol. Plant.*, 78: 335—344.
- [6] Zocchi, G., 1985, *Plant Sci.*, 40: 153—159.
- [7] Blowers, D. P. et al., 1985, *Planta*, 166: 208—215.
- [8] Poovaiah, B. W. and Reddy, A. S. N., 1993, *Critical Review in Plant Science*, 12: 185—211.
- [9] Watillon, B. et al., 1992, *Plant Sci.*, 81: 227—231.
- [10] Matsumoto, H. et al., 1984, *Plant Cell Physiol.*, 25: 191—195.
- [11] Chen, Y. -R. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 10689—94.
- [12] Ling, V. et al., 1994, *Plant Cell*, 6: 1135—1143.
- [13] 尚克进等, 1991, *生物化学和生物物理学报*, 23: 416—422.
- [14] 凌启闯等, 1993, *科学通报*, 38, 21—26.
- [15] Roberts, D. M. et al., 1983, *J. Cell Biol.*, 97: 1644—1647.
- [16] Ling, V. et al., 1992, *Plant Physiol.*, 100: 970—978.
- [17] 张虞安等, 1992, *生物化学和生物物理学报*, 24: 83—87.
- [18] 叶正华和孙大业等, 1988, *科学通报*, 8: 624—26.
- [19] 唐军和孙大业, 1994, *河北师范大学学报*, 18: 121—122.
- [20] Biro, R. L. et al., 1984, *Plant Physiol.*, 75: 382—386.
- [21] Sun, D. -Y. and Li, H. -B., 1994, *Plant Sci.*, 99: 1—8.
- [22] 李家旭等, 1994, *植物生理学报*, 20: 157—162.
- [23] Oh, S. -H. et al., 1992, *Archi. Bioche. Biophys.*, 28—29.
- [24] Kobayashi, H. and Fukuda, H., 1994, *Planta*, 194: 388—394.
- [25] Cocucci, M. et al., 1988, *Plant Physiol.*, 88: 910—914.
- [26] Braudey, S. et al., 1989, *Dev. Biol.*, 131: 313—320.
- [27] O'cil, K. T. and De Grado, W. E., 1990, *Trends Biochem. Sci.*, 15: 59—64.
- [28] Bachs, O. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265: 18595—60.
- [29] Bachs, O. et al., 1992, *Bioche. Biophys. Acta.*, 259—270.
- [30] Subramanyam, C. et al., 1990, *J. Cellular Physiol.*, 66: 787—792.
- [31] Dixon, R. A. and Lamb, C. J., 1990, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 41: 339—367.

(上接 126 页)

A STEADY AND HIGH-YIELD METHOD OF ISOLATING HEPATIC FAT-STORING CELLS

Xu Lieming, Liu Cheng, Liu Ping, et al.

(Liver Diseases Research Center, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032).

ABSTRACT

Successful isolation of hepatic fat-storing cells (FSC) was carried out with perfusing solution of Pronas E and collagenase *in situ* in rat liver and centrifuging the cellular suspension with 11% Metrizamide. Usually, the yield of FSC was 3—4 × 10⁷ cell per liver, the viability of cultured FSC was more than 98% and the purity was between 90%—95%. After trypsinization, the purity of subcultured FSC was over 98%.

Key words: FAT-storing cells Cell isolation Cell culture