

西南岩溶区土壤细菌胞外碳酸酐酶的稳定性研究

余龙江, 吴云, 李为, 曾宪东

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 中国湖北 武汉 430074)

摘要: 分析了来源于西南几个不同类型岩溶地区土壤细菌的胞外碳酸酐酶(CA)活性, 发现有不少菌株能够产生分泌胞外CA。以一株编号为GLCa102的菌株为代表, 模拟岩溶环境条件, 研究其胞外CA的稳定性, 结果表明该微生物胞外CA具有良好的热稳定性。偏碱性条件的岩溶土壤环境有利于胞外CA活性的相对稳定。岩溶环境主要金属离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 等以及阴离子如 SO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Cl^- 、 Br^- 和 I^- 等在一定浓度范围内可使微生物胞外碳酸酐酶保持50%以上的活性。参照岩溶土壤水体元素背景值, 表明岩溶环境的离子含量有利于该微生物胞外CA活性的相对稳定。此研究为深入研究微生物CA在生物岩溶中的作用和地位提供了一定的科学依据。

关键词: 岩溶环境; 土壤细菌; 碳酸酐酶(CA)活性; 稳定性

中图分类号 S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)04-0365-06

Study on Stability of Extracellular Carbonic Anhydrase from Soil Bacteria in Karst Areas of Southwest China

YU Long-jiang, WU Yun, LI Wei, ZENG Xian-dong

(School of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: The activity of extracellular carbonic anhydrase (CA) from some soil bacteria in different types of karst area in southwest China was analyzed. It was found that quite a few of strains could produce and secrete extracellular CA. Taking a strain numbered GLCa102 for example, the stability of its extracellular CA was studied through simulating karst environmental conditions. The results showed that the microbial extracellular CA displayed good thermostability. Alkaline condition of karst soil environments was fit for keeping relative stability of extracellular CA. More than 50% of the activity of the microbial extracellular CA could remain under a certain range of concentration of metal ions in karst environment such as Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} and Co^{2+} , along with anions such as SO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Cl^- 、 Br^- and I^- . According to the background of elements in karst environments, the stability of the microbial extracellular CA could be well maintained in the concentration region of ions in soilwater and karstwater. This research provides scientific basis for further study on the role of microbial CA in biokarst.

Key words: karst environment; soil bacteria; carbonic anhydrase (CA) activity; stability

(Life Science Research, 2004, 8(4): 365 ~ 370)

收稿日期: 2004-04-08; 修回日期: 2004-08-15

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(90202016); 国家自然科学基金面上项目(40152002, 40302034); 国土资源部岩溶动力学重点实验室资助

作者简介: 余龙江(1966-)男, 湖北黄梅人, 华中科技大学教授, 博士生导师, 从事生物技术、地质生态学研究, Tel: +86-027-87540184, E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn.

碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA, EC4. 2. 1. 1) 不仅广泛存在于动物和植物中, 而且广泛存在于古细菌界和细菌界代谢多样化的原核生物种类中^[1]. 它是一种以锌为活性中心的金属酶, 可以催化 CO_2 和 HCO_3^- 之间的相互转化^[2]. CA 不仅对于许多真核生物的生理过程如光合作用、呼吸作用、 CO_2 和离子运输、钙化作用和酸碱平衡等是必需的^[3, 4], 而且在原核生物生理学上具有重要作用^[5]. 近年来有研究发现^[6], 在石灰岩的溶解实验中加入 CA, 可使溶解速率提高 10 倍, 然而该实验所用的 CA 仅为试剂公司购买的牛 CA 纯品. 本文分析了来源于西南几个不同类型岩溶地区土壤细菌的 CA 活性, 发现有不少菌株能够产生分泌胞外 CA. 这些细菌产生分泌的 CA 渗入到土壤或岩石周围, 可能会对岩溶地区碳酸盐岩的溶解或沉积产生影响, 从而影响到岩溶地区的元素迁移和土壤肥力等. 然而由微生物分泌到岩溶环境中的 CA 是否稳定将决定其对岩溶作用的贡献, 而有关这方面的研究尚未见报道. 本文以从西南岩溶地区筛选的一株胞外产 CA 的细菌 (编号为 GLCa102) 为材料研究 CA 的稳定性, 为评价微生物分泌的 CA 在生物岩溶中的作用和地位提供科学依据.

1 材料与方 法

1.1 西南岩溶区土壤细菌胞外碳酸酐酶活性分析

土壤样品分别采集于西南 4 个不同类型的岩溶地区: 1) 重庆金佛山; 2) 贵州六盘水米苏嘎; 3) 广西马山县弄拉; 4) 广西桂林丫吉村岩溶试验场. 参照《土壤微生物研究法》^[7] 进行土壤细菌的分离, 然后测定纯细菌培养物的胞外 CA 活性. 并以其中一株编号为 GLCa102 的菌株为代表, 研究其胞外 CA 的稳定性. 该菌株初步鉴定属于芽孢杆菌科^[8].

1.2 细菌 GLCa102 胞外碳酸酐酶的获取

在无菌条件下, 将菌种以 10% 的接种量接入基本培养基中, 进行摇瓶振荡培养, 培养温度为 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 摇床转速为 120 r/min. 培养结束后将培养物在 7 000 r/min 下离心, 去除菌体后获得含有胞外碳酸酐酶的粗酶液.

1.3 微生物胞外碳酸酐酶的热稳定性

将 1.2 所得酶液分别在 10°C 、 20°C 、 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 温浴一定时间, 测定 CA 活性.

1.4 pH 值对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响

将 1.2 所得酶液分别在 pH 5.2、6.2、7.2、8.2、9.2、10.2 和 11.2 下处理一定时间后, 测定 CA 活性.

1.5 金属离子、阴离子对碳酸酐酶活性的影响

配制好一定浓度的 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以及 SO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 Cl^- 、 I^- 和 Br^- 溶液, 分别将一定稀释度的上述离子溶液与酶液按比例混合, 混合后使各离子的终浓度达到实验设计的终浓度, 将混合液在低温下平衡 40 min 后, 检测 CA 活性.

1.6 碳酸酐酶活性的测定

CA 活性的测定参照 Brownell 等^[9] 的方法略作改进. 该测定是在一个 2°C 的冷冻反应室中, 通过测定在含有 0.5 mL 煮沸或未煮沸酶液的测定液中注入 4.5 mL 冰冷的 CO_2 饱和水后 pH 下降的速度差异来进行的. 酶活单位数由公式 $U = 10 [(T_0/T_e) - 1]$ 求得, T_0 为加入煮沸酶液测得的 pH 变化所需时间, T_e 为加入未煮沸酶液测得的 pH 变化所需时间. 酶活性以每 mg 蛋白含有的酶活单位数 (U/mg) 表示, 蛋白测定参照 Lowry 等的方法^[10]. 数据为 3 次平行测定的均值. 酶活性以每 mg 蛋白含有的酶活单位数 (U/mg) 表示, 蛋白测定参照 Lowry 等的方法^[10]. 数据为 3 次平行测定的均值.

2 结果与分析

2.1 西南岩溶区土壤细菌胞外碳酸酐酶活性分析

对来自 4 个不同岩溶区的土壤样品进行了产胞外 CA 微生物的筛选和分离, 并测定了酶活性, CA 活性测定结果的部分数据见表 1 所示. 测定结果表明, 有不少土壤细菌能够分泌产生胞外 CA, 但是不同岩溶地区的土壤细菌所产生的胞外 CA 活性存在明显差异.

2.2 微生物胞外碳酸酐酶的热稳定性

酶活性以相对活性表示见图 1, 从中可知, 处理 20 min 时不同温度下酶的相对活性变化趋势与处理 30 min 时相同, 但处理 30 min 时酶的相对活性都低于处理 20 min 时, 说明不同温度下酶的相对活性随处理时间增加而下降. 在 $0 \sim 40^\circ\text{C}$ 范围内处理 20 min 或 30 min 后酶活性基本保持不变, 甚至还有一定幅度的增加, 如在 20°C 下处理 20 min 时酶活性增加了 30.29%, 处理 30 min 时

表 1 不同岩溶地区土壤细菌胞外 CA 活性分析

Table 1 CA activities of soil bacteria from different karst areas

菌株编号 Strain No.	来源 Source	胞外碳酸酐酶活性 / (U · mg ⁻¹) Extracellular CA activity
JFS103	金佛山	2.74 ± 0.24
JFS303	金佛山	2.54 ± 0.36
JFS202	金佛山	0.94 ± 0.05
LIU101	米苏嘎	0.36 ± 0.04
LIU201	米苏嘎	0.31 ± 0.03
NLCa602	弄拉	0.23 ± 0.02
NLCa101	弄拉	0.14 ± 0.01
NL403	弄拉	0.16 ± 0.02
GLCa102	试验场	1.12 ± 0.20
GLCa504	试验场	0.40 ± 0.05
GL302	试验场	0.57 ± 0.02

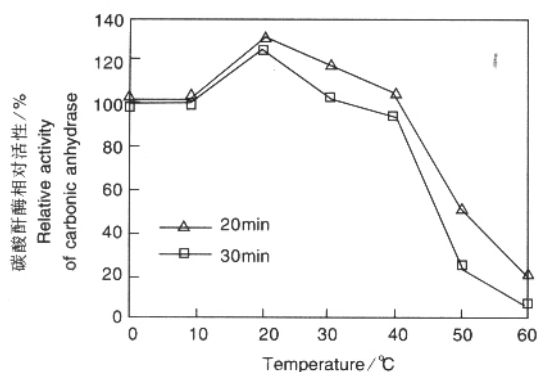


图 1 温度对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响

Fig. 1 Effects of temperature on activity of microbial extracellular carbonic anhydrase

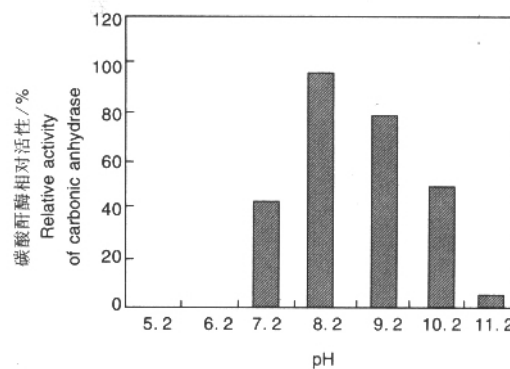


图 2 pH 对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响

Fig. 2 Effects of pH on activity of microbial extracellular carbonic anhydrase

酶活性增加了 25.82%。温度高于 40 °C 后,随着温度的升高,CA 活性逐渐下降,说明高温下 CA 活性受到抑制。温度从 40 °C 升高到 50 °C,CA 活性在处理 20 min 后丧失了 52.76%,在处理 30 min 后丧失了 74.97%。当温度升高到 60 °C 时,还可以检测到碳酸酐酶活性,但相对其它温度来说则很低。综合实验结果可以得出,常温下该微生物胞外碳酸酐酶具有良好的热稳定性。

2.3 pH 值对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响

如图 2 所示,pH 对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响较大,在酸性 pH 条件下检测不到酶活性,说明酶活性已丧失,而在偏碱性或碱性条件下均

可检测到不同程度的酶活性,其中 pH 8.2 时酶的相对活性最高,达 96.45%,这与该微生物产生的胞外酶液的自然 pH 值在 8.5 左右相对应。其次是 pH 9.2 时,酶活性可保持 74.65%。过碱 (pH ≥ 10.2) 或偏中性条件 (pH = 7.2) 下酶的相对活性都不太高。

2.4 金属离子对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响

金属锌是碳酸酐酶的活性中心,对碳酸酐酶高效催化 CO₂ 水合可逆反应起到至关重要的作用^[2],不过碳酸酐酶活性中心的锌可能会由于被其他金属离子取代等原因而影响催化活性。据报道,植

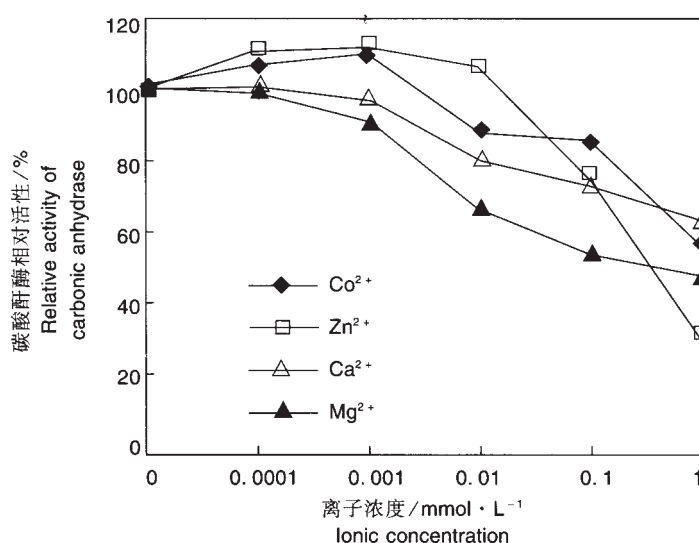


图3 金属离子对微生物胞外 CA 活性的影响

Fig. 3 Effects of metal ions on microbial extracellular CA activity

物碳酸酐酶的锌 (Zn^{2+}) 被钴 (Co^{2+}) 取代后仅能保持部分活性^[11], 而动物碳酸酐酶的这种取代却可以保持较高的活性^[12]. 本实验结果表明 (图 3), Zn^{2+} 在不高于 0.01 mmol/L 的浓度范围内对碳酸酐酶活性有一定的激活作用, 碳酸酐酶活性可提高 12.30%, 当 Zn^{2+} 浓度大于 0.01 mmol/L 时开始出现抑制作用, 但在 0.01 ~ 0.1 mmol/L 浓度范围内, 碳酸酐酶可保持 75% 以上的活性. Co^{2+} 在不高于 0.001 mmol/L 浓度范围内对碳酸酐酶活性亦有一定的激活作用, 但最高激活作用略低于 Zn^{2+} , 可提高 10.21%, 说明该微生物胞外碳酸酐酶的 Zn^{2+} 可被 Co^{2+} 取代并可保持较高的活性, 这与动物碳酸酐酶的情况相似^[12]. 当 Co^{2+} 浓度大于 0.001 mmol/L 时开始出现抑制作用, 但在 0.001 ~ 0.1 mmol/L 浓度范围内, 碳酸酐酶可保持 85% 以上的活性. Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的激活作用较 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 小, 在 10^{-4} mmol/L 数量级浓度范围内酶活性略有提高, 分别提高 1.48% 和 0.34%, Mg^{2+} 的激活作用最小; 而当离子浓度高于 10^{-4} mmol/L 时 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 开始对碳酸酐酶活性产生一定抑制作用, 其中 Mg^{2+} 的抑制作用较大, 在 1 mmol/L 离子浓度时, Mg^{2+} 处理下的酶液可保持 45% 以上的活性, 而 Ca^{2+} 处理下的酶液仍可保持 60% 以上的活性.

2.5 阴离子对微生物胞外碳酸酐酶活性的影响

如图 4 所示, 7 种阴离子对微生物胞外碳酸酐酶活性都有一定的影响. 当阴离子浓度不高于 0.0001 mmol/L 时, Cl^- 、 Br^- 和 I^- 对碳酸酐酶略有

激活作用, 而 SO_4^{2-} 、 $H_2PO_4^-$ 、 NO_3^- 和 NO_2^- 则使碳酸酐酶活性基本维持不变. 当阴离子浓度大于 0.0001 mmol/L 时, 碳酸酐酶活性开始受到抑制, 抑制作用随着阴离子浓度的增加而逐渐增大. 7 种阴离子中, NO_2^- 对微生物胞外碳酸酐酶的抑制作用最强, 0.1 mmol/L 浓度下酶活性被抑制了 87.22%, I^- 的抑制作用与 NO_2^- 大致相同. Cl^- 和 Br^- 的抑制作用也大致相同, 比 NO_2^- 和 I^- 的抑制作用小些, 0.1 mmol/L 浓度下酶活性分别被抑制了 69.23% 和 76.59%. SO_4^{2-} 、 $H_2PO_4^-$ 和 NO_3^- 的抑制作用则比上述 4 种阴离子的要小些, 0.1 mmol/L 浓度下酶活性可保持近 50% 以上, 1 mmol/L 浓度下仍存留一定的酶活性, 其中 SO_4^{2-} 对酶的抑制作用最小, 0.1 mmol/L 浓度下酶活性仅丧失了 28.52%, 1 mmol/L 浓度下酶活性仍可保持在 50% 以上.

3 讨论

目前有关微生物碳酸酐酶的研究主要集中在原核生物细菌和古细菌胞内碳酸酐酶的结构、特性及生理功能等方面, 对微生物产生分泌的胞外碳酸酐酶研究很少, 特别是从地质生态学角度, 探讨微生物胞外碳酸酐酶在岩溶环境中的稳定性则尚未见报道. 本文以从西南岩溶地区筛选的一株产胞外碳酸酐酶的细菌 GLCa102 为例, 借助室内模拟实验来研究其胞外碳酸酐酶的稳定性. 结果表明该微生物胞外碳酸酐酶具有良好的热稳定性, 在 0 ~ 40 °C 下处理 30 min 后酶活性保持良好, 50 °C 和 60 °C 下处理 20 或 30 min 后亦能保持

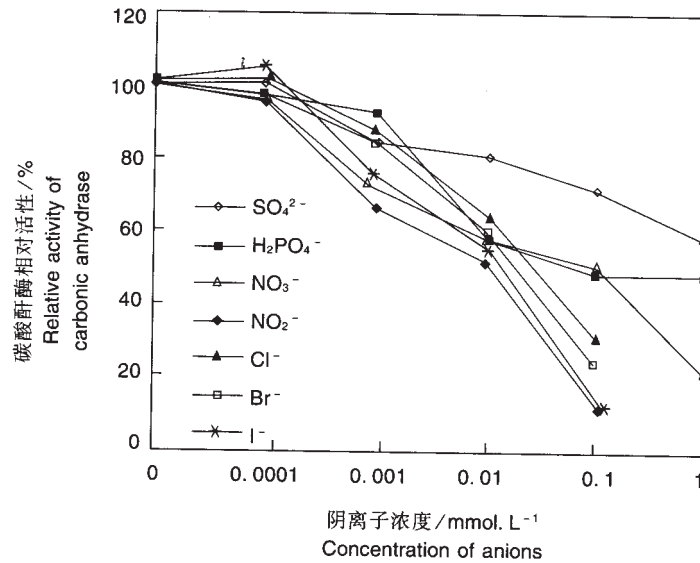


图 4 阴离子对微生物胞外 CA 活性的影响

Fig. 4 Effects of anions on microbial extracellular CA activity

(A: SO₄²⁻, B: H₂PO₃⁻, C: NO₃⁻, D: NO₂⁻, E: Cl⁻, F: Br⁻, G: I⁻)

一定的活性. 在以前的研究中我们在不同季节的岩溶土壤中都能检测到不同程度的碳酸酐酶活性^[13], 而岩溶土壤中碳酸酐酶的主要来源之一就是土壤微生物产生分泌的胞外碳酸酐酶, 野外采集样品的分析结果与室内模拟试验的结果相对应.

pH 影响实验的结果表明, 在偏碱性或碱性条件下均可保持一定的胞外碳酸酐酶活性, 而岩溶土壤环境是富钙偏碱性的环境, 故有利于保持胞外碳酸酐酶活性的相对稳定.

离子影响实验的结果表明 Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Co²⁺ 等金属离子以及 SO₄²⁻、H₂PO₄⁻、NO₃⁻、NO₂⁻、Cl⁻、Br⁻ 和 I⁻ 等阴离子在一定浓度范围内可使微生物胞外碳酸酐酶保持 50% 以上的活性. Ca 和 Mg 是岩溶生态环境中的大量元素^[14], Ca 较 Mg 含量高一些, 且在岩溶环境中更容易表现出自由离子活性^[15], 而 Zn 和 Co 在岩溶环境中属微量元素. 综合本实验结果, 并对照广西弄拉岩溶泉水和土壤水的元素背景值^[16], 由表 2 可以看出, 该

表 2 广西弄拉岩溶环境中主要金属离子的含量^[16]

Table 2 Several main metal ionic content in karst environment of Nongla, Guangxi mmol/L

	土壤水的离子含量	岩溶泉水的离子含量
Mg ²⁺	0.345 ~ 1.00	0.980 ~ 1.625
Ca ²⁺	0.452 ~ 2.819	1.717 ~ 1.971
Zn ²⁺	0.0016 ~ 0.0103	0.00012
Co ²⁺	0.0001 ~ 0.0003	0.00005 ~ 0.0001

岩溶环境中的 Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 和 Co²⁺ 都有利于保持碳酸酐酶的相对稳定性, 而且 Zn²⁺ 和 Co²⁺ 浓度都在活化细菌 GLRT102Ca 分泌到环境中的碳酸酐酶活性所需的离子浓度范围内, 因此, 岩溶环境中的微量元素 Zn 和 Co 有利于激活微生物胞外碳酸酐酶, 并使其保持相对稳定. Ca²⁺ 的活化作用可能是细菌碳酸酐酶在长期进化过程中对富含 Ca 的岩溶环境逐渐适应, 从而使其产生的碳酸酐

酶在富含 Ca 的岩溶环境中能够保持一定的稳定性. Mg 与 Ca 同属碱土金属, 相对 Ca 而言, Mg 在岩溶地质环境中难表现出自由离子活性^[15], 且含量低, 因此对活化碳酸酐酶作用不大, 但岩溶环境中的 Mg²⁺ 有利于保持该微生物胞外碳酸酐酶活性的相对稳定. 以上研究结果为进一步评价微生物碳酸酐酶在生物岩溶中的作用和地位提供了一定的科学依据.

参考文献 (References):

- [1] SMITH K S, JAKUBZICK C, WHITTAM T S, *et al.* Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 15184-15189.
- [2] TRIPP B C, SMITH K, FERRY J G. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 48615-48618.
- [3] BADGER M R, PRICE G D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, 45: 369-392.
- [4] HENRY R P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism [J]. Annu Rev Physiol, 1996, 58: 523-538.
- [5] 李为, 余龙江, 徐辉碧. 原核生物的碳酸酐酶[J]. 生命的化学 (LI W, YU L J, XU H B. Prokaryotic carbonic anhydrase [J]. Life Chem), 2002, 22 (6): 526-529.
- [6] LIU Z H, DREYBRODT W. Dissolution kinetics of calcium carbonate minerals in H₂O-CO₂ solutions in turbulent flow: the role of the diffusion boundary layer and the slow reaction H₂O + CO₂ ⇌ H⁺ + HCO₃⁻ [J]. Geochim Cosmochim Acta, 1997, 61: 2879-2889.
- [7] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社 (Nanjing Institute of Soil, Chinese Academy of Sciences. Research Methods of Soil Microorganisms [M]. Beijing: Science Press), 1985. 40-58.
- [8] HOLT J G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [9] BROWNELL P F, BIELIG L M, GROF C P L. Increased carbonic anhydrase activity in leaves of sodium-deficient C₄ plants [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1991, 18: 589-592.
- [10] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [11] STEMLER A. Carbonic anhydrase associated with thylakoids and Photosystem II particles from maize [J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 850 (1): 97-107.
- [12] POCKER Y, BJORKQUIST L, BJORKQUIST D W. Zinc(II) and cobalt(II) bovine carbonic anhydrases. Comparative studies and esterase activity [J]. Biochemistry, 1977, 16 (18): 3967-3973.
- [13] 李为, 余龙江, 袁道先, 等. 不同岩溶生态系统土壤及其细菌碳酸酐酶活性分析及其生态意义 [J]. 生态学报 (LI W, YU L J, YUAN D X, *et al.* Study on activity of carbonic anhydrase from soil and its bacteria in different karst ecosystems and its ecological significance [J]. Acta Ecologica Sinica), 2004, (3): 438-443.
- [14] 曹建华, 袁道先, 潘根兴. 岩溶生态系统中的土壤 [J]. 地球科学进展 (CAO J H, YUAN D X, PAN G X. Some soil features in karst ecosystem [J]. Advance in Earth Sci), 2003, 18(1): 37-44.
- [15] 杨继镛, 汪柄根, 唐俊. 广西南部林地土壤与适生树种 [M]. 北京: 中国林业出版社 (YANG J G, WANG B G, TANG J. Forest Land Soil and Suitable Tree Species in South Guangxi [M]. Beijing: China Forestry Press), 1995. 24-83.
- [16] 蒋忠诚. 论南方岩溶山区生态环境的元素有效态 [J]. 中国岩溶 (JIANG Z C. Liable content of elements in ecological environments in karst mountains in south China [J]. Carsologica Sinica) 2000, 19(2): 123-128.
- [17] DAWSON R, MILNE G, WILLIAMS R B. Changes in the collagen of rat heart in copper deficiency-induced cardiac hypertrophy [J]. Cardiovasc Res, 1982, 16: 559-565.
- [18] OKADA H, KAWAGUCHI H, KUDO T, *et al.* Alteration of extracellular matrix in dilated cardiomyopathic hamster heart [J]. Mol Cell Biochem, 1996, 156: 9-15.
- [19] MUKHERJEE D, SEN S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy [J]. J Clin Invest, 1991, 88: 1141-1146.
- [20] GARDI C, CALZONI P, MARCOLONGO P, *et al.* Collagen breakdown products and lung collagen metabolism: an *in vitro* study on fibroblast cultures [J]. Thorax, 1994, 49: 312-318.
- [21] GUNJA-SMITH Z, MORALES A R, ROMANLLI R, *et al.* Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links [J]. Am J Pathol, 1996, 148: 1639-1648.
- [22] WEBER K, ANVERSA P, ARMSTRONG P W, *et al.* Remodeling and repair of the cardiovascular system [J]. J Am Coll Cardiol, 1992, 20: 13-16.
- [23] DIEZ J, LOPEZ B, GONZALEA A, *et al.* Clinical aspects of hypertensive myocardial fibrosis [J]. Curr Opin Cardiol, 2001, 16 (6): 328-335.

(上接第 321 页)

- [11] PIPER C, SCHULTHEISS H P, AKDEMIR D, *et al.* Remodeling of the cardiac extracellular matrix differs between volume- and pressure-overloaded ventricles and is specific for each heart valve lesion [J]. J Heart Valve Dis, 2003, 12(5): 592-600.
- [12] CLORE J N, COHEN I K, DIEGELMANN R F. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1979, 161: 337-340.
- [13] CLEUTJENS J P M, VERLUYTEN M J A, SMITS J F M, *et al.* Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart [J]. Am J Pathol, 1995, 147: 325-338.
- [14] WEBER K T, JANICKI J S, SHROFF S G, *et al.* Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium [J]. Circ Res, 1988, 62: 757-765.
- [15] ELEFTHERIADES E G, DURAND J B, FERGUSON A G, *et al.* Regulation of procollagen metabolism in the pressure-overloaded rat heart [J]. J Clin Invest, 1993, 91: 1113-1122.
- [16] MEDUGORAC I, JACOB R. Characterization of left ventricular collagen in the rat [J]. Cardiovasc Res, 1983, 17: 15-21.