Original Article

Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Kiwifruit Actinidin

A. Bidmeshkipour, Ph.D.[1], Z. Shirvani Farsani, M.Sc.[1], K. Mansouri, M.Sc.[2]
A. Mostafaie, Ph.D.[2]

1. Biology Department, College of Sciences, Razi University, Kermanshah
2. Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences

Corresponding Address: P.O.Box: 1568, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
Email: amostafaie@kums.ac.ir

Abstract

Received: 30/Jan/2007, Accepted: 2/Jun/2007

Objective: Proteolytic enzymes, specially collagenase, are used to digest extracellular matrix, cells isolation and primary culture. It is important to find new sources of plant or animal protease instead of bacterial or tissue collagenase. In the present research, actinidin, a plentiful protease in kiwifriut (*Actinidia deliciosa*), was used to isolate human umbilical vein endothelial cells.

Materials and Methods: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated using different doses of actinidin (from 1 to 16 mg/ml) and different incubation times (from 10 to 60 minutes). Freshly isolated endothelial cells were cultured in MCDB131 medium. Endothelial cells were identified by their non-overlapping cobblestone morphology and immunostaining. The viability of separated cells was assessed by trypan blue exclusion test.

Results: Actinidin in concentration of 4 mg/ml for 20-30 minutes selectively isolates human umbilical vein endothelial cells with minimal contamination of other cell populations. The viability of separated cells was estimated 90-95% in this situation.

Conclusion: The results showed that actinidin has not toxic effect on separated cells and is a novel and suitable protease for isolation of HUVEC cells.

Keywords: Kiwifruit, *Actinidin,* Protease, Endothelial Cells, Human Umbilical Vein

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages: 151-156

جداسازی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسان با آنزیم اکتینیدین میوه کیوی

علی بیدمشکی‌پور Ph.D.[1]، زینب شیروانی فارسانی M.Sc.[1]، کامران منصوری M.Sc.[2]، علی مصطفایی Ph.D.[2*]

۱. دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۲. دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

* آدرس مکاتبه: کرمانشاه، صندوق پستی: ۱۵۶۸، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی
پست الکترونیک: Email: amostafaie@kums.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۱/۱۱، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۱۲

* **هدف:** استفاده از آنزیم اکتینیدین میوه کیوی (*Actinidia deliciosa*) به منظور جداسازی سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان

* **مواد و روش‌ها:** اکتینیدین در دامنه غلظت ۱ تا ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و زمان ۱۰ تا ۶۰ دقیقه برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال مورد آزمایش قرار گرفت. سلول‌های جدا شده در محیط کشت MCDB131 کشت داده شدند. تشخیص سلول‌های اندوتلیال با شواهد مورفولوژیک و روش ایمونوسیتوشیمیایی و درصد زنده بودن سلول‌ها با آزمون تریپان‌بلو انجام گرفت.

* **یافته‌ها:** اکتینیدین در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه توانست به طور انتخابی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف را جدا کند. درصد بقای سلول‌های اندوتلیال جدا شده ۹۵-۹۰ درصد تخمین زده شد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد اکتینیدین اثر سمی بر سلول ندارد و در مقایسه با کلاژناز کارایی بسیار مطلوبی در جداسازی سلول‌های اندوتلیال از سیاهرگ بندناف انسان دارد.

کلیدواژگان: میوه کیوی، اکتینیدین، پروتئاز، سلول‌های اندوتلیال، سیاهرگ بندناف انسان

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۱۵۶-۱۵۱

مقدمه

سلول‌های اندوتلیال یک لایه سلولی هستند که سطح داخلی رگ‌ها را مفروش می‌کنند. این سلول‌ها نقش تعیین کننده‌ای در هموستاز بدن و پاتوژنز انواعی از بیماری‌های عروقی دارند (۱). مطالعه سلول‌های اندوتلیال در حالت‌های طبیعی و بیماری، نیازمند جداسازی این سلول‌ها از رگ ها وکشت آنها است. جداسازی سلول‌های اندوتلیال از رگ‌ها با هضم آنزیمی بافت توسط پروتئازها، به خصوص کلاژناز انجام می‌شود که پیوندهای پپتیدی را در مارپیچ سه‌تایی کلاژن می‌شکنند (۲). کلاژنازهای باکتریایی و کلاژنازهای بافتی دو دسته عمده از این آنزیم‌ها هستند که برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال از بعضی رگ‌ها همچون سیاهرگ بندناف انسان (۳) سیاهرگ اجوف تحتانی گاو (۴) شریان ریوی خرگوش و گاو (۵، ۶) و رگ‌های قلب (۹-۷) به کار برده شده‌اند. تهیه کلاژناز از منابع باکتریایی و یا جانوری به دلیل مقدار بسیارکم آنزیم در این منابع، پیچیده بودن مراحل تخلیص و پایداری کم کلاژنازها از مشکلات چندی برخوردار است (۱۲-۱۰). بدین لحاظ یافتن پروتئاز جایگزین در منابع دیگر که دسترسی به آن مشکلات کمتری داشته باشد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی (*Actinidia deliciosa*) به وفور وجود دارد. این پروتئاز از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی همچون پاپائین است (۱۳، ۱۴). اکتینیدین اثر مطلوبی در ترد کردن گوشت دارد و در هضم مواد پروتیینی در بیماران دارای مشکل گوارشی قابل استفاده است (۱۵). در چند مطالعه اثر کلاژنازی اکتینیدین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۸-۱۶). با توجه به وفور اکتینیدین در میوه و تخلیص آن با روشی کوتاه و ساده که در مطالعه قبل انجام گرفت (۱۹)، در این مطالعه برای جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسان (HUVEC) از آن استفاده شد. این مطالعه ظاهرا اولین مطالعه‌ای است که در آن از آنزیم اکتینیدین به هدف جداسازی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسان استفاده شده و نتایج آن قابل مقایسه با کلاژناز بوده است.

مواد و روش‌ها

آنزیم اکتینیدین میوه کیوی طبق روش استفاده شده در مطالعه قبلی (۱۹) طی مراحل رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یون تخلیص شد. بیش از سی بندناف طبیعی طی انجام این مطالعه از زایشگاه بیمارستان حضرت معصومه (س) کرمانشاه تهیه و در محیط کشت استریل به آزمایشگاه کشت سلول منتقل گردید. محیط کشت MCDB131، کلاژناز، جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، آمفوتریسین B(۲/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سرم جنین گاو (FCS)، هپارین (۲۵ واحد بر میلی‌لیتر)، محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو (Gibco)، ال-گلوتامین (۲ میلی‌مول در میلی‌لیتر)، آنتی بادی اولیه ضد فاکتور وان

ویلبراند (anti-von-Willebrand factor from rabbit)، آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با آنزیم پراکسیداز (goat Anti-rabbit IgG HRP) و سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین از شرکت سیگما تهیه شد. محلول ۵درصد اسیدسولفوریک، بافرفسفات نمکی (PBS) محلول ۰/۲۵ درصد Trypsin-EDTA، محلول فیکساتیو (متانول: استون با نسبت ۳:۱) و پراکسید هیدروژن از شرکت مرک تهیه شدند.

جداسازی و کشت اولیه سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان

جداسازی سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان براساس روش استاندارد (۳) انجام گرفت. بندناف انسان در PBS استریل با pH معادل ۷/۴ از اتاق عمل بیمارستان به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا یک کاتر نافی به درون سیاهرگ بندناف فرو کرده و مقدار کافی PBS توسط سرنگ به داخل آن پمپ شد تا خون و مواد زاید درون بند ناف خارج گردد. یک انتهای بندناف با گیره نافی مسدود شد و سپس از طریق همان کاتر نافی حدود ۱۵–۱۰ میلی‌لیتر از آنزیم کلاژناز و یا آنزیم اکتینیدین با غلظت ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ یا ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط MCDB131 به داخل سیاهرگ بندناف تزریق شد. انتهای دیگر بندناف نیز با یک گیره نافی مسدود شد. بندناف متورم شده در چندین گاز استریل پیچیده شد و به مدت ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ یا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵درصد co_2 و ۹۵ درصد o_2 انکوبه شد. پس از مدت زمان مذکور، بندناف به مدت ۵–۳ دقیقه در زیر هود ماساژ داده شد. گیره‌ها برداشته شد و از یک سمت بندناف ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MCDB131 به درون سیاهرگ با فشار تزریق و مواد خروجی سمت دیگر، درون یک لوله جمع‌آوری شد. سپس محتوای لوله به مدت ۳ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب ته لوله در ۵ میلی لیتر محیط کشت MCDB 131 به تعلیق درآمد ومجددا با سانتریفیوژ رسوب داده شد. این عمل ۳ بار تکرار شد. پس از سانتریفیوژ سوم، رسوب سلولی در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MCDB131 حاوی FCS ۲۰درصد و ۲۵ میکرولیتر هپارین به تعلیق درآمد. تعلیق سلولی در فلاسک‌های کشت که سطح آنها با کلاژن مفروش شده بود، کشت داده شد. ۲۴ ساعت پس از کشت، مایع درون فلاسک کشت دور ریخته شد و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با محیط کشت جدید ۲ بار شستشو داده شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MCDB131 حاوی FCS ۲۰ درصد به فلاسک اضافه شد و هر دو روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. پس از پرشدن کف پلیت‌ها، سلول‌ها با کمک محلول Trypsin-EDTA ۰/۲۵ درصد از کف پلیت‌ها کنده شدند و پس از شستشو با محیط کشت حاوی FCS در فلاسک‌های جدید کشت داده شدند.

شناسایی سلول‌های اندوتلیال جداشده از سیاهرگ بند ناف

برای شناسایی سلول‌های اندوتلیال از شواهد مورفولوژیک و رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوسیتوشیمیایی (۲۰) کمک گرفته شد. برای این کار سلول‌ها با کمک محلول متانول–استن در کف پلیت‌ها فیکس شدند. سپس با کمک آنتی‌بادی علیه فاکتور وان ویلبراند تهیه شده در خرگوش (با رقت ۱/۱۰۰۰) و آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی بزی ضد IgG خرگوش کونژوگه با پراکسیداز) با رقت ۱/۵۰۰۰ و سوبسترای دی آمینو بنزیدین و پراکسید هیدروژن، وجود فاکتور وان ویلبراند در این سلول‌ها ارزیابی شد. در کنترل منفی به جای آنتی‌بادی لایه اول (آنتی‌بادی ضدفاکتور وان ویلبراند) از محلول بافر استفاده شد و بقیه مراحل مشابه آزمون بود.

تعیین درصد بقای سلول‌های جدا شده

برای تعیین درصد بقای سلول‌های اندوتلیال جدا شده، ۲۵۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط و در ۱۵۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. شستشو با PBS ۳–۲ بار انجام شد. پس از آخرین سانتریفیوژ، رسوب سلولی در ۳ میلی‌لیتر PBS به تعلیق درآمد. یک قطره از این تعلیق با یک قطره از تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط شد. قطره‌ای از تعلیق حاصله روی لام شمارش سلول قرار داده شد. تعداد کل سلول‌ها و سلول‌های رنگ شده با تریپان بلو شمارش و درصد بقای سلول‌ها تعیین گردید.

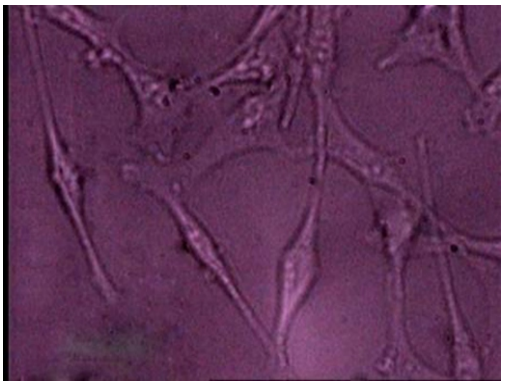
تعیین غلظت آنزیم

برای تعیین غلظت آنزیم اکتینیدین و کلاژناز از روش برادفورد (۲۱) استفاده شد. استاندارد مورد استفاده در این روش شامل محلول آلبومین گاوی با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

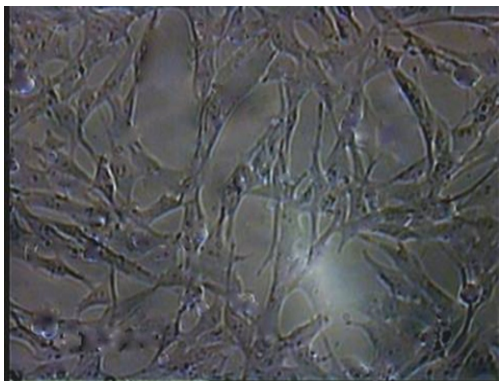
یافته‌ها

در این مطالعه اکتینیدین در مقایسه با کلاژناز در غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۴، ۶، ۸ یا ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و مدت زمان‌های مختلف (از ده تا شصت دقیقه) برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال از سیاهرگ بند ناف انسان مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از شمارش سلول، درصد بقای سلول‌های جدا شده و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی لیتر آنزیم اکتینیدین در مدت زمان ۳۰–۲۰ دقیقه، مناسب‌ترین غلظت و زمان برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال سالم از بندناف در مقایسه با کلاژناز در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم اکتینیدین طی مدت زمان ۲۰ دقیقه است. درصد بقای سلول‌های جدا شده از سیاهرگ بندناف در شرایط ذکر شده برای آنزیم اکتینیدین ۹۵–۹۰ درصد و برای کلاژناز نزدیک ۹۰ درصد تخمین زده شد. سلول‌های اندوتلیال جدا شده حاصل از پرفیوژن بندناف با آنزیم اکتینیدین در فلاسک‌هاکشت داده شدند. سپس مورفولوژی آنها زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. این سلول‌ها ابتدا به صورت کروی و در محیط کشت کاملا شناور بودند. در اواخر روز اول به تدریج ته‌نشین شدند و تعدادی از آنها به کف فلاسک چسبیدند. در روز دوم، سلول‌های زنده و سالم، ظاهری دوکی شکل پیدا کردند و کاملا به کف فلاسک چسبیدند (شکل ۱).

شکل۱: مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال جداشده توسط آنزیم اکتینیدین ۲۴ ساعت پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰) (مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)



شکل۲: مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال جداشده با آنزیم اکتینیدین ۴۸ ساعت پس از جدا سازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۴۰۰) (مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)



شکل۳: مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف جداشده با آنزیم اکتینیدین ۷ روز پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰) (مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)

۴۸ ساعت پس از جداسازی، با تعویض محیط، سلول‌های شناور و مرده از محیط عمل خارج و سلول‌های چسبیده تکثیر شدند (شکل ۲). بعد از ۷۲ ساعت، سلول‌ها، تکثیر بیشتری یافته و کف فلاسک را پر کردند. این سلول‌ها در محیط کشت MCDB131 با ۲۰ درصد FCS و هپارین بدون افزودن مواد کمکی مانند فاکتورهای رشد حداقل یک هفته زنده ماندند. سلول‌های حاصله در روز هفتم به صورت یک لایه سلولی کف پلیت‌ها را پوشاندند. در این حالت سلول‌ها، کاملا دوکی شکل شدند و شبکه‌ای از سلول‌ها به دست آمد (شکل۳).

نتایج رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی نشان داد که سلول‌های چسبیده به کف میکروپلیت عمدتا از نظر وجود فاکتور فون ویل براند مثبت‌اند و پس از افزودن سوبسترای پراکسیداز به چاهک‌ها رنگ قهوه‌ای به خود می‌گیرند.

درصد بقای سلول‌های جدا شده از سیاهرگ بندناف در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آنزیم اکتینیدین ۹۵-۹۰ درصد تخمین زده شد. این نتیجه نشان داد که سلول‌ها، سالم و زنده جدا شده‌اند و غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر این آنزیم و مدت زمان ۲۵-۲۰ دقیقه برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان مناسب است. اکتیندین در غلظت‌های پایین‌تر از ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعداد کمتری از سلول‌های اندوتلیال را استخراج کرد و در غلظت‌های بالاتر از ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر درصد بقای سلول‌های جدا شده کمتر بود.

بحث

کلاژنازها از انتخابی‌ترین پروتئازها برای هضم کلاژن زمینه خارج سلولی و جداسازی سلول‌ها از بافت هستند (۲۲، ۲۳). جف و همکاران (۳) از پرفیوژن کلاژناز با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و مدت زمان ۱۵ دقیقه برای جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان استفاده کرده‌اند. در مطالعات بعدی گیمبرون و همکاران (۲۴)، سیمونسینی و همکاران (۲۵)، مارکوویک (۲۶)، کورباچو و همکاران (۲۷) نیز از آنزیم کلاژناز با غلظت و زم ان متفاوت برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان استفاده کرده و سلول‌های جدا شده را در محیط M199 کشت داده‌اند. درصد بقای سلول‌های جدا شده در این مطالعات در محدوده ۹۵-۸۵ درصد گزارش شد.

اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور یافت می‌شود (۱۲). تاکنون مطالعات معدودی اثر هیدرولازی این آنزیم را بر کلاژن بررسی کرده‌اند (۱۸-۱۶) ولی نتایج حاصله حاکی از عدم فعالیت کلاژناز آن بوده است. برای مثال، موریموتو و همکارانش گزارش کرده‌اند که اکتینیدین قادر به هیدرولیز مارپیچ سه تایی کلاژن نیست، اما در pH اسیدی می‌تواند آتلوکلاژن (کلاژن هیدرولیز شده با پپسین) را هضم کند (۱۸). در مقایسه با مطالعات فوق، مصطفایی و همکاران نشان دادند که آنزیم اکتینیدین اگر در pH خنثی یا قلیایی ضعیف بر کلاژن اثر نماید، این پروتیین را هیدرولیز می‌کند (۲۸). با توجه اثر اکتینیدین در ترد کردن گوشت و اثر کلاژنازی آن، در این مطالعه از این آنزیم با هدف جداسازی سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسان، در مقایسه با کلاژناز استفاده شد. نتایج نشان داد که اکتینیدین در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۳۰-۲۰ دقیقه قادر است سلول‌های اندوتلیال را از جدار داخلی سیاهرگ بندناف جدا کند. بقای سلول‌های جداشده در این شرایط ۹۵-۹۰ درصد تخمین زده

شد. سلول‌های اندوتلیال جدا شده که هویت آنها با شواهد مورفولوژی و ایمونوهیستوشیمی تایید شده است در محیط کشت MCDB131 بدون نیاز به فاکتور رشد حداقل یک هفته زنده بودند. به علاوه این سلول‌ها از کف پلیت‌ها قابل جداسازی و کشت مجدد بودند.

مطالعه حاضر ظاهرا اولین مطالعه‌ای است که در آن با کمک اکتنیدین که یک سیستئین پروتئاز گیاهی است، به جداسازی سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان پرداخته و به نتایج قابل توجهی در مقایسه با کلاژناز دست یافته است. با توجه به مقدار کم کلاژنازها در منابع باکتریایی و بافتی و مشکلات تخلیص و پایداری ضعیف این آنزیم‌ها در مراحل تخلیص (۱۲-۱۰)، به نظر می‌رسد آنزیم اکتینیدین جایگزین مناسبی برای کلاژناز در جداسازی سلول‌های اندوتلیال و احتمالا سایر سلول‌ها از دیگر بافت‌ها باشد. فراوانی آنزیم اکتینیدین در میوه کیوی، تخلیص مقادیر زیاد آن با روشی نسبتا ساده و عدم خطرآلودگی در تهیه آن از دلایلی است که چنین ادعایی را تقویت می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که آنزیم اکتینیدین پروتئازی مناسب برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال از سیاهرگ بندناف انسان است. فراوانی این آنزیم در میوه کیوی و تخلیص آن با روشی نسبتا ساده در مقایسه با کلاژناز از مزیت‌های استفاده از این آنزیم در مقایسه با کلاژناز است. در مطالعات بعدی هدف بر آن است که از آنزیم اکتینیدین در جداسازی انواعی از سلول‌ها از بافت‌های مختلف استفاده شود.

References

1. Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. J Ann NY Acad Sci, 1982; 401: 1-8
2. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eizen AZ. Human fibroblast collagenase; complete primary structure and homology to an ancogene transformation-induced rat protein. J Biol Chem, 1986; 261: 6600-6605
3. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest, 1973; 52: 2745–2756
4. Wechezak A, Mansfield PB. Isolation and growth characteristics of cell lines from bovine venous endothelium. In Vitro, 1973; 9: 39-45
5. Crutchley DJ, Ryan US, Ryan JW. Effects of aspirin and dypiridamole on the degradation of adenosine diphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery. J Clin Invest, 1980; 66: 29-35
6. Carley WW, Tanoue L, Merker M, Gillis CN. Isolation of rabbit pulmonary microvascular endothelial cells and characterization of their angiotensin converting enzyme activity. Pulm Pharmacol, 1990; 3: 35-40
7. Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, Ellingsen O, Kelly RA, Smith TW. Isolation and characterization of human and rat microvascular endothelial cells. Am J Physiol, 1993; 264: H639-H652
8. Grafe M, Auch-Schwelk W, Graf K, Terbeek D, Hertel H, Unkelbach M, Hilderbrandt A, Fleck E. Isolation and characterization of macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts. Am J Physiol, 1994; 36: H2138-H2148
9. Cirillo P, Golino P, Ragni M, Guarino A, Calabro P, Chiarriello M. A simple method for the isolation, cultivation, and characterization of endothelial cells from rabbit coronary circulation. Thromb Res, 1999; 96: 329-333
10. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes: Analyses of their actions on soluble and insoluble collagens. J Biochem, 1982; 203: 209-221
11. Woolley DE, Glanville RW, Roberts DR, Evanson JM. Purification, Characterization and Inhibition of Human Skin Collagenase. J Biochem, 1978; 169: 265-276
12. Nachman RL, Jaffe EA. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. J Clin Invest, 2004; 114(8): 1037-1040
13. Boland MJ, Hardman MJ. kinetic studies on the thiol protease from actinidia chinensis , J FEBES Letters, 1972; 27(2): 282-284
14. Reid JD, Hussain S, S F Bailey T, Sonkaria S, K.Sreedharan S, W Thomas E, Remini M, Brocklehurst K. Isomerization of the uncomplexed actinidin molecule: kinetic accessibility of additional steps in enzyme catalysis provided by solvent perturbation. J Biochem, 2004; 378: 699-703
15. Boland MJ, Burns D. Production of actinidin; a proteolytic enzyme from kiwifruit. Internal report 1. Auckland N.Z.: DSIR. Mt. Albert research Center, 1980
16. Sugiyama S, Ohtsuki K, Sato K, Kawabata M. Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1997; 43(5): 581-589

17. Ohyama H, Enomoto T, Mitsunaga S. Variety of kiwi fruit protease and their collagenolytic activity. Nippon Eiyo Syokuyo Gakkaishi (in Japanese), 1997; 50: 57-62
18. Morimoto K, Kuni S, Hamano K, Tonomura B. preparation and structural analysis of actinidain-processed atelocollagen of Yellowfin Tuna (Thunnus albacares). J Biosci Biotechnol Biochem, 2004; 68: 861-867
19. Mostafaie A, Chalabi M. Kiwifruit actinidin: its purification and examination of amount in different Varieties. J Sci Technol Agric Natur Resour, 2006, 10(3): 223-230
20. Zenetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Eng K, Shamamian P, Mignatti P. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. Int J Cancer, 2000; 85(2): 281-288
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizingthe principle of protein- dye binding. Anal Biochem, 1976; 72: 248-254
22. Wittstock M, Flemmig TF, Schmidt H, Mutters R, Karch H. Serodiagnosis of Porphyromonas gingivalis Infection by Immunoblot Analysis with Recombinant Collagenase. J Clincal Microbio, 1996; 34(10): 2411-1413
23. Yoshihara K, Matsushita O, Minami J, Okabe A. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the colH Gene from Clostnidium histolyticum Encoding a Collagenase and a Gelatinase. J Bacteriol, 1994; 176(21): 6489-6496
24. Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture: Growth and DNA Synthesis. J Cell Biol, 1974; 60: 673-684
25. Simoncini T, Apa R, Reis FM, Miceli F, Stomati M, Driul L, Lanzone A, Genazzani AR, Petraglia F. Human Umbilical Vein Endothelial Cells: A New Source and Potential Target for Corticotropin-Releasing Factor. J Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999; 84(8): 2802-2806
26. Markovic S. Professional Scientific Exchange Programme Report: Effects of cytokines on the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). J IFCC, 2001; 13(3): 1328-1358
27. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Dueñas Z, Noris G, Molares MA, Martinez G, Escalera DL, Clapp C. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. J Endocrinology, 2000; 166: 53-62
28. Mostafaie A, Chalabi M, Ferdosi ME. purification of kiwifruit actinidin and examination of its proteolytic activity. Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, 2004; Project No. 8016