

## 乙酰咪唑修饰对高密度脂蛋白(HDL)结合 人肝癌 SMMC-7721 细胞的影响

上海医科大学药学院生物化学教研室 吴满平 陈佩芳 卜书红\*\* 张 燕 梅美珍

**摘 要** 我们以前的研究显示人肝癌 SMMC-7721 细胞具有 HDL<sub>3</sub> 高亲和力结合部位。FITC 标记无 ApoE HDL<sub>3</sub> (FITC-HDL<sub>3</sub>) 和天然 HDL<sub>3</sub> 与肝癌细胞结合具有竞争性。本研究 HDL<sub>3</sub> 乙酰咪唑修饰降低它的竞争结合作用。这一抑制作用取决于乙酰咪唑浓度, 在 1mol/L 时达最大抑制。我们结果提示 HDL<sub>3</sub> 中酪氨酸残基存在于 HDL<sub>3</sub> 结合确认部位, 参与 HDL<sub>3</sub> 的受体结合过程。

**关键词** 荧光素异硫氰酸酯标记高密度脂蛋白-3; 乙酰咪唑-高密度脂蛋白-3; 肝癌 SMMC-7721 细胞; 高密度脂蛋白-3 的细胞结合

高密度脂蛋白(HDL)与动脉粥样硬化呈负相关。HDL 从周围组织摄取多余胆固醇并带到肝脏代谢(胆固醇逆向转运)从而呈现抗动脉粥样硬化作用<sup>①</sup>。我们实验室<sup>②③</sup>和其他实验室<sup>④⑤</sup>的结果都显示 HDL 与周围组织细胞和肝细胞之间相互作用的本质是 HDL 载脂蛋白(ApoA-1)与细胞受体相互作用。Tabas 和 Tall<sup>⑥</sup>实验室认为 HDL 的表面脂质是与细胞相互作用的主要成分。本研究的目的是利用酪氨酸残基的化学修饰剂 N-乙酰咪唑观察 HDL 中 ApoA-1 经化学修饰后对其结合肝癌 SMMC-7721 细胞能力的影响。结果表明 ApoA-1 酪氨酸残基的修饰抑制其细胞结合能力, 抑制作用大小取决于乙酰咪唑浓度。这结果有力支持 HDL 中载脂蛋白是与细胞受体相互作用主要成分的观点, 也表明载脂蛋白中酪氨酸残基参与受体结合过程。

### 1 材料和方法

人全血由上海市中心血站提供。荧光素异硫氰酸酯(FITC)系 Fluka 产品。N-乙酰咪唑系 Sigma 产品。RPMI1640 系日本制药株式会社产品。人肝癌 SMMC-7721 系第二军医大学建株<sup>⑦</sup>。

#### 1.1 HDL<sub>3</sub> 分离 正常人血超离心取 d 1.125

~1.21g/ml 部分<sup>⑧</sup>。

1.2 无 ApoE-HDL<sub>3</sub> 制备 超离心所得 HDL<sub>3</sub>, 经肝素-Sepharose 4B 亲和层析制备<sup>⑨</sup>。

1.3 无 ApoE-HDL<sub>3</sub> 的荧光标记 (FITC-HDL<sub>3</sub>) FITC 与无 ApoE-HDL<sub>3</sub> 反应后, 经 Sephadex G50 分离纯化 FITC-HDL<sub>3</sub><sup>⑩</sup>。用三氯醋酸(TCA)沉淀 FITC-HDL<sub>3</sub>, 并测定沉淀前后荧光强度比值来鉴定 FITC 与 FITC-HDL<sub>3</sub> 分离程度。

1.4 无 ApoE-HDL<sub>3</sub> 的乙酰咪唑修饰 调整无 ApoE-HDL<sub>3</sub> 浓度 2mg/ml, 取 1ml 加入 0.5ml 含 N-乙酰咪唑的 pH7.4, 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L EDTA 缓冲液。室温搅拌反应 1 小时。对 pH7.4 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L EDTA 缓冲液 4℃透析过夜。按实验需要乙酰咪唑浓度分别为 0.003mol/L、0.03mol/L、0.3mol/L、1mol/L 和 3mol/L。

1.5 人肝癌 SMMC-7721 细胞培养 待细胞铺满生长面后用 0.25%胰蛋白酶消化, 用含 20%小牛血清(56℃灭活 1 小时)、青霉素 100<sup>u</sup>/ml、链霉素 100<sup>u</sup>/ml、pH7.0~7.2 的无菌过滤 RPMI-1640 培养液分散, 分装于培养瓶中密封置 CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃培养 3~5 天。待细胞铺满生长面后进

• 本研究受国家自然科学基金资助(39270158)

\*\* 系本院 1993 届药学专业毕业生

行下一次传代备用。分散细胞调整至  $10^6$  个/ml, 取 1ml 加入培养皿中,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 24h, 细胞贴壁生长供实验用。

### 1.6 乙酰咪唑修饰对 HDL<sub>3</sub> 细胞结合的影响

1.6.1 空白对照: 取两个含贴壁生长细胞的培养皿, 加  $100\mu\text{g/ml}$  FITC-HDL<sub>3</sub> 0.5ml 和 1ml 无酚红的 Hanks 液(调整培养液总体积),  $37^{\circ}\text{C}$  培养 2h, 无酚红 Hanks 液 1ml 洗 3 次。加 1ml Hanks 液将细胞混悬, 测细胞结合荧光强度(激发波长  $495\text{nm}$ , 发射波长  $519\text{nm}$ ), 取平均值作为 100% 细胞结合荧光强度。

1.6.2 乙酰咪唑修饰对 HDL<sub>3</sub> 细胞结合的影响: 实验分二组, 一组每培养皿中加 0.5ml  $100\mu\text{g/ml}$  FITC-HDL<sub>3</sub> 和 1ml  $3\text{mol/L}$  乙酰咪唑修饰的 HDL<sub>3</sub>(浓度分别为 100、300 和  $1000\mu\text{g/ml}$ )。另一组每培养皿中加 0.5ml  $100\mu\text{g/ml}$  FITC-HDL<sub>3</sub> 和 1ml 未修饰天然 HDL<sub>3</sub>(浓度分别为 100、300 和  $1000\mu\text{g/ml}$ )。经细胞培养后测细胞结合荧光强度, 换算成空白对照细胞结合荧光强度的相对百分值。每个数据是两次实验平均值(下同)。

1.6.3 不同浓度乙酰咪唑修饰对 HDL<sub>3</sub> 细胞结合影响: 每培养皿中加入 0.5ml  $100\mu\text{g/ml}$  FITC

-HDL 和 1ml 乙酰咪唑修饰的 HDL  $100\mu\text{g/ml}$ 。乙酰咪唑修饰浓度分别为  $0.003\text{mol/L}$ 、 $0.03\text{mol/L}$ 、 $0.3\text{mol/L}$ 、 $1\text{mol/L}$  和  $3\text{mol/L}$ 。经细胞培养后测细胞结合荧光强度, 换算成空白对照细胞结合荧光强度的相对百分值。

## 2 实验结果

超离心所得 HDL<sub>3</sub> 除了 ApoA-I 外还含有 ApoE 和杂蛋白(血浆白蛋白)等。肝素-Sephrose 4B 亲和层析可分离到三个蛋白峰(图 1)。第一个峰(a 峰)为无 ApoE-HDL<sub>3</sub>, 经 10% SDS-PAGE 鉴定只有一条分子量为 25KD(ApoA-I)条带。第二、三峰(b、c 峰)分别为白蛋白和 ApoE。FITC 荧光激发光谱和发射光谱分别为 495 和  $519\text{nm}$ 。FITC-HDL<sub>3</sub> 为 494 和  $519\text{nm}$ 。表明 HDL<sub>3</sub> 的荧光标记对 FITC 的荧光光谱无影响。

经 Sephadex G<sub>50</sub> 纯化所得 FITC-HDL<sub>3</sub> 溶液中 99.8% 荧光强度是 TCA 可沉淀的(即 HDL<sub>3</sub> 连接的 FITC), 这表明 FITC-HDL<sub>3</sub> 溶液中几乎不含未反应的游离 FITC。

图 2 所示, 在  $100\mu\text{g/ml}$  HDL<sub>3</sub> 条件下 FITC-HDL<sub>3</sub> 细胞结合荧光强度仅是对照组(单独 FITC-HDL<sub>3</sub> 与细胞培养)的 42.95%。

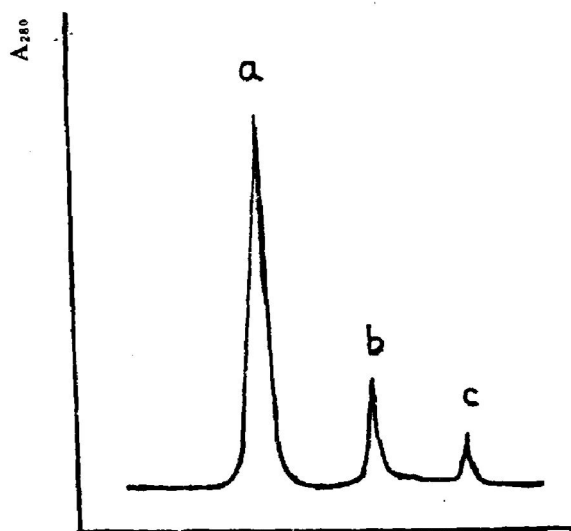


Fig 1 Chromatography of HDL<sub>3</sub> by heparin-sopharose 4B affinity column

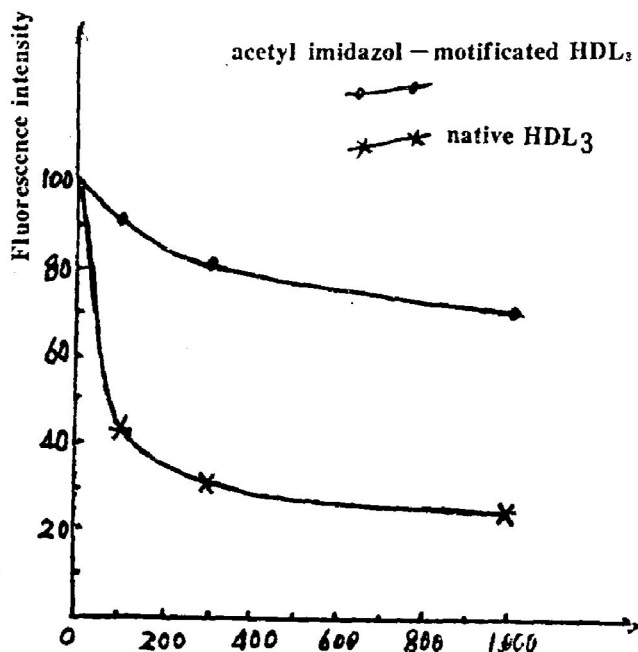


Fig 2 Effect of modification of acetyl imidazol on binding of HDL<sub>3</sub> to cells

提示未标记天然 HDL<sub>3</sub> 和 FITC-HDL<sub>3</sub> 竞争结合于肝癌细胞, 也表明 FITC 的标记不影响 HDL<sub>3</sub> 的生物活性。在 100 $\mu$ g/ml 乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub> 存在时细胞结合荧光强度是对照组的 91.3%, 即使在 10 倍浓度(1000 $\mu$ g/ml)乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub> 条件下细胞结合荧光强度仍高达 71.5%, 而与其相对应在 10 倍浓度天然 HDL<sub>3</sub> 存在时细胞结合荧光强度仅为 25.15%(图 2)。这充分显示乙酰咪唑修饰使 HDL<sub>3</sub> 丧失与细胞受体结合能力, 从而不能与 FITC-HDL<sub>3</sub> 竞争结合肝癌细胞。

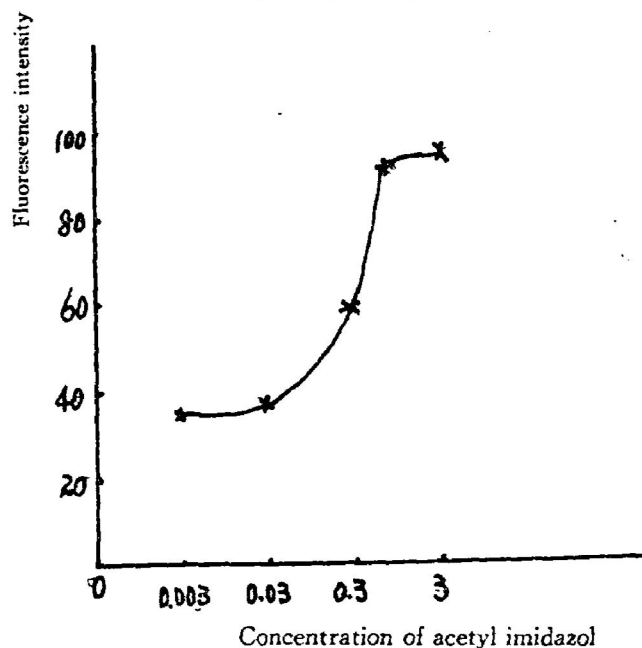


Fig 3 Effect of modification by acetyl imidazol of various concentrations on the binding of HDL<sub>3</sub> to cells

图 3 结果可见乙酰咪唑修饰抑制 HDL<sub>3</sub> 的细胞结合是一个取决于修饰剂浓度(dose-dependent)的过程。乙酰咪唑在 0.003-0.03mol/L 范围内对 HDL<sub>3</sub> 细胞结合能力影响不显著。当乙酰咪唑浓度超过 0.03mol/L 时修饰 HDL<sub>3</sub> 细胞结合能力急剧下降, 直到 1mol/L 时达到最大抑制作用。

### 3 讨论

我们实验室以前的工作已证实肝癌 SMMC-7721 细胞具有 HDL<sub>3</sub> 受体, 这是 ApoA-I 所确认的<sup>②</sup>。在研究肝细胞 ApoA-I 受体(HDL 受体)过程中, 为了排除肝细胞表面 ApoE 受体的影响, 必须首先除去 HDL<sub>3</sub> 中 ApoE。利用肝素-Sepharose

4B 亲和层析可有效去除 ApoE 及杂质白蛋白, 得到不含 ApoE 的纯净 HDL<sub>3</sub>。

乙酰咪唑是多肽酪氨酸碱基的专一修饰试剂。乙酰咪唑修饰使 HDL<sub>3</sub> 几乎完全丧失其竞争结合肝癌细胞受体的能力(图 2)。当乙酰咪唑浓度超过 1mol/L 时, 其修饰效应趋于最大值(图 3)。这一结果强烈提示酪氨酸存在于 HDL<sub>3</sub> 的受体结合部位, 参与 HDL<sub>3</sub> 与受体结合过程。因而我们的结果有力支持 HDL 与细胞相互作用本质是 HDL<sub>3</sub> 中 ApoA-I 与细胞受体之间特异性结合的观点, 而与 Tabas 和 Tall<sup>③</sup>认为 HDL 中表面脂质是与细胞相互作用的主要成份的观点相反。

我们结果表明乙酰咪唑修饰作用呈现“剂量-效应”现象(dose-response)(图 3)。1~3mol/L 乙酰咪唑是最适浓度。这可利用在研究 ApoA-I 受体中作为一个阴性对照, 具有较高使用价值。

### 参考文献

1. Werb Z, et al. Cholesterol metabolism in the macrophage I. Alteration of subcellular exchangeable cholesterol compartments and exchange in other cell types. *J Exp Med* 1971;134: 1570
2. 李月彬, 等. 细胞膜上高密度脂蛋白(HDL)结合蛋白的鉴定. *生物化学与生物物理学报* 1992;24(3):233
3. 吴满平, 等. 大鼠肝非实质性细胞的高密度脂蛋白(HDL)非溶酶体途径细胞内吞. *生物化学与生物物理学报* 1993;25(5):543
4. Brinton EA, et al. Apoprotein specificity of the HDL receptor on cultured human fibroblasts. *Arterioscler* 1985;4:536a
5. Oram JF, et al. Regulation of high density lipoprotein receptors activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1983;72:1611
6. Tabas I, et al. Mechanism of the association of HDL<sub>3</sub> with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. *J Biol Chem* 1984;259:13897
7. 董荣春, 等. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及生物性状的持续观察. *第二军医大学学报* 1980;1:5

## **Effect of Acetyl Imidazol Modification on Binding of HDL<sub>3</sub> to Human SMMC—7721 Hepatocarcinoma Cells**

Wu Manping, Chen Peifang, Pu Shuhong, Zhang Yan, Mei Meizhen

Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shanghai Medical University

Our previous study proved that there were high affinity HDL<sub>3</sub>—binding sites (HDL receptor) on the membrane of human SMMC—7721 hepatocarcinoma cells and the bindings of FITC—labelled Apo E—free HDL<sub>3</sub> (FITC—HDL<sub>3</sub>) and native HDL<sub>3</sub> to the cells were competitive. This paper showed that modification of HDL<sub>3</sub> by acetyl imidazol decreased its competitive binding to the cells. This inhibition was dose—dependent with the maximum inhibition at 1 mol/L of acetyl imidazol. Our results suggest that tyrosin residue in HDL is present in the HDL binding recognition site and takes part in the binding to its receptor.

**Key Words** FITC—HDL<sub>3</sub>; acetyl imidazol—modified HDL<sub>3</sub>; hepatocarcinoma SMMC—7721 cell; binding of HDL<sub>3</sub> to cells

---