

内源性高甘油三酯血症患者淋巴细胞 LDL 受体及 LDL 结合活性的研究*

刘秉文 洪 瑛 傅明德

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所载脂蛋白研究室 成都 610041)

LDL Receptors of Lymphocytes and Binding of LDL by Non-Parenchymal Cells of Rat Liver in Endogenous Hypertriglyceridemias
LIU Bing-Wen HONG Ying FU Ming-De

(Apolipoprotein Research Unit, West China University of Medical Sciences, Chengdu, 610041 China)

ABSTRACT A study on LDL receptors of lymphocytes and plasma LDL binding activity to liver non-parenchymal cells of rat in 5 normal persons and endogenous hypertriglyceridemias (whose plasma triglycerides levels were 0.87 ± 0.32 and 3.07 ± 1.67 mmol/L respectively) was made. Plasma LDL was isolated by density gradient ultracentrifugation. LDL receptors of lymphocytes were measured by a enzyme-linked method developed by this laboratory. 125 I-labelled-LDL was prepared by IC1 method. Liver non-parenchymal cells (NPC) of rat were prepared by collagenase method. 125 I-LDL binding to rat liver NPC was measured by Goldstein and Brown's method. The results showed that the B_{max} of LDL binding to lymphocytes from hypertriglyceridemic group was significantly higher than that of normal group (57.5 ± 13.2 vs 38.2 ± 9.3 ng/mg cell protein, $P < 0.05$), but there was no difference in affinity (Kd) between the normal and hypertriglyceridemic groups (12.0 ± 3.2 vs 13.3 ± 4.1 μ g/ml, $P > 0.05$). The binding activity of plasma LDL from hypertriglyceridemias to rat liver NPC was significantly lower than that of LDL from the normal group ($P < 0.05$). The results are discussed.

KEY WORDS Endogenous hypertriglyceridemia; LDL receptors of lymphocytes; Plasma LDL; Non-parenchymal cell of rat

摘要 用酶联法对内源性高甘油三酯血症患者血淋巴细胞 LDL 受体进行了分析。结果表明, 高甘油三酯血症患者淋巴细胞 LDL 受体结合容量 B_{max} 为 57.5 ± 13.2 ng/mg 细胞蛋白, 较血脂正常者的 38.2 ± 9.3 ng/mg 细胞蛋白显著升高 ($P < 0.05$), 而其 Kd 值无改变 (12.0 ± 3.2 对 13.3 ± 4.1 μ g/ml, $P > 0.05$)。患者血浆 LDL 与大鼠肝非实质细胞的结合活性较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$)。

关键词 内源性高甘油三酯血症; 淋巴细胞 LDL 受体; 血浆 LDL; 大鼠肝非实质细胞 LDL 受体

内源性高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemias, HTG) 是我国常见的一类高脂血症, 占高脂血症的 65%^[1]。我们以往的研究发现, 近半数高脂血症及冠心病患者耐糖耐脂能力下降, 胰岛素分泌增强, 峰值延后, 出现高胰岛素血症^[2,3]。HTG 患者血浆 VLDL 显著升高, 同时高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 及低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 下降^[4]。Grundy 等^[5]测定了 12 例 HTG 患者 LDL 部分降解率 (fractional catabolic rate, FCR), 发现同源及异源 LDL 的 FCR 均较正常对照显著升高, 且同源 LDL 较异源 LDL 代谢更快。HTG 患者血浆 LDL 清除加快的机制尚不清楚, 患者 LDL 受体功能是否有改变未见报道。我们对 HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体进行了分析, 并观察了患者血浆 LDL 与大鼠肝非实质细胞 LDL 受体的结合活性。兹将所得

* 卫生部科学基金资助课题

结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

空腹 12~14 h 血脂正常者 (甘油三酯 (TG) ≤ 120 mg/dl, 胆固醇 (TC) ≤ 200 mg/dl 5 例为正常对照组; 空腹 12~14 h, TG ≥ 170 mg/dl, TC < 230 mg/dl 者 5 例为 HTG 组。

1.2 方法

1.2.1 血浆 LDL 及无脂血清 (LPDS) 的制备 按本室张林华等^[6]建立的一次性密度梯度超速离心法分离 $d = 1.040 \sim 1.056$ 的 LDL 及无脂血清 ($d > 1.21$)。

1.2.2 ^{125}I -LDL 制备 按改良的 MacFarlane^[7]法标记 LDL。Na ^{125}I , 无载体, 北京原子能研究所产品。 ^{125}I -LDL 比放射活性为 75~250 cpm/ng 蛋白, 脂标记率小于 5%, 游离碘 $< 1\%$ 。

1.2.3 人淋巴细胞 LDL 受体分析 按自己建立的 LDL 受体酶联测定法^[8]进行。取空腹 12~14 h 静脉血 10 ml。肝素抗凝, 以淋巴细胞分离液分离淋巴

细胞。

1.2.4 LDL 与大鼠肝非实质细胞 LDL 受体的结合活性 SD 大鼠, 150 g; 按胶原酶法^[9]分离肝非实质细胞 (NPC), 纯度 $> 95\%$, 台盼兰染色, 存活率 $> 90\%$ 。将分离的大鼠肝 NPC 悬浮于培养液 (20 mmol/L HEPES, 8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.06 g/L Na $_2$ HPO $_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH $_2$ PO $_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L MgSO $_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L CaCl $_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L 葡萄糖及 10% LPDS, pH 7.4) 中, 在冰浴中平衡 30 min。离心后, 细胞加入新鲜培养液, 稀释到 $(0.2 \sim 0.6) \times 10^6$ 个细胞/ml, 立即进行与 ^{125}I -LDL 的结合实验。 ^{125}I -LDL 与 NPC 的结合按 Goldstein 及 Brown 法^[10]进行。

1.2.5 血浆 TG、TC、HDL-C、LDL-C 测定 按本室常规方法进行。

2 结果

2.1 血脂水平

内源性高甘油三酯血症患者与正常人的血脂水平见 Tab 1。

Tab 1. Plasma lipid levels in HTG and normals ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

groups	n	TG	TC	HDL-C	LDL-C
Normal	5	0.87 ± 0.32	4.76 ± 0.50	1.28 ± 0.19	3.12 ± 0.42
HTG	5	$3.07 \pm 1.67^{**}$	5.67 ± 0.63	$0.85 \pm 0.26^*$	2.83 ± 0.35

compared with normal group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

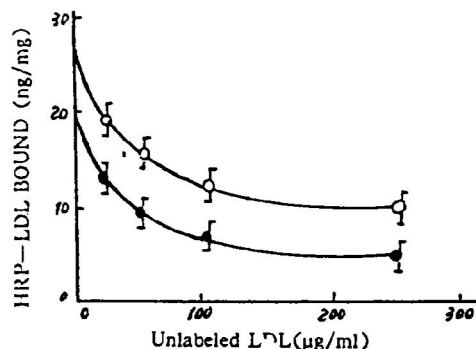
由 Tab 1 可见, HTG 组血浆 TG 较正常对照组显著为高 ($P < 0.01$), HDL-C 显著降低 ($P < 0.05$), TC 略有升高, LDL-C 略有下降, 但统计处理差别不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 淋巴细胞 LDL 受体分析

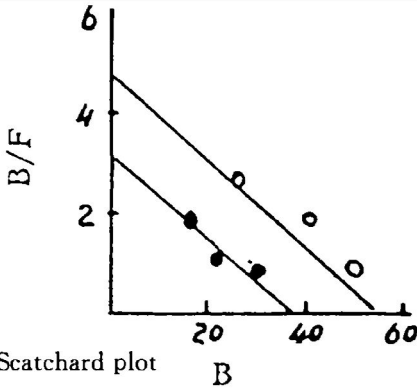
对 5 例正常人及 5 例 HTG 患者淋巴细胞的 LDL 受体进行了分析, Fig 1 为淋巴细胞结合正常 LDL 的抑制曲线 (A) 及 Scatchard 作图 (B)。

结果表明, 非标记 LDL 可竞争性抑制 HRP-LDL 与正常人及 HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体的结合。Scatchard 作图均为直线。HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体与 HRP-LDL 结合的解离常数 K_d 为 $12.0 \pm 3.2 \mu\text{g/ml}$, 最大结合容量 $B_{\max}$ 为 57.5 ± 13.2 ng/mg 细胞

蛋白; 正常淋巴细胞 LDL 受体结合 HRP-LDL 的 K_d 值为 $13.3 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$, 最大结合容量 $B_{\max}$ 为 38.2 ± 9.3 ng/mg 细胞蛋白。由此可见, 患者淋巴细胞 LDL 受体的 $B_{\max}$ 显著升高 ($P < 0.05$), 而亲和力 (K_d) 无改变。



(A) Inhibitory curve



(B) Scatchard plot

Fig 1. The inhibitory curve of LDL receptor on normal and HTG lymphocytes.

(HRP-LDL: 15 $\mu\text{g/ml}$; 37°C, 1 h, Normal: - - - ; HTG: · · · · ·)

2.3 LDL 与大鼠肝非实质细胞的结合活性

大鼠肝实质细胞 (PC) 与非实质细胞 (NPC) 均存在 LDL 受体。后者 LDL 受体数目较前者高 5~7 倍。我们将 HTG 患者 LDL (HTG-LDL) 及正常人 LDL (N-LDL), 分别加入 NPC 与 ^{125}I -LDL 的反应液中, 以观察 HTG-LDL 及 N-LDL 对大鼠肝 NPC 结合 ^{125}I -LDL 的抑制作用 (Fig 2)。

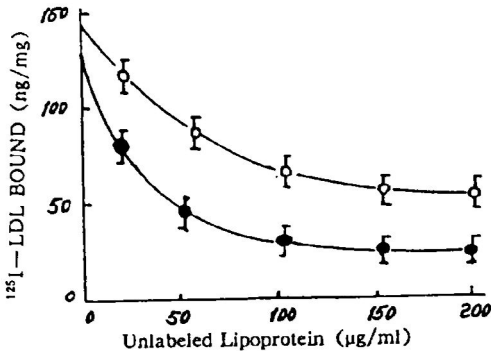


Fig 2. Comparison of the ability of HTG-LDL (· · · · ·) and N-LDL (- - -) to compete with ^{125}I -LDL for binding to rat liver NPC. NPC: 0.6×10^6 ; ^{125}I -LDL: 15 $\mu\text{g/ml}$

由 Fig 2 可见, 未标记的 HTG-LDL 及 N-LDL 均可竞争性抑制 ^{125}I -LDL 与大鼠肝非实质细胞 LDL 受体结合, 且 N-LDL 的抑制作用较 HTG-LDL 的更大。这一结果提示, HTG-LDL 与大鼠肝 NPC-LDL 受体的

结合活性明显降低。

3 讨论

3.1 HTG 患者 LDL 受体的改变

本研究发现, HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体最大结合容量 B_{max} 显著增加, 较正常增加 50.2% ($P < 0.05$), 而受体的亲和力无改变。这一结果与我们用高淀粉膳食 (糖占总热量 80%) 诱发的 HTG 大鼠肝 NPC LDL 受体的改变完全一致, HTG 大鼠肝 NPC LDL 受体 B_{max} 亦显著增加, 较对照增加 42% ($P < 0.05$), 其 K_d 值亦无改变。这些结果提示, Grundy 等发现 HTG 患者 LDL 的 FCR 增加, 可能是患者细胞 LDL 受体、特别是肝实质及非实质细胞数目增加所致。肝细胞 LDL 受体数目增加, 可结合、摄取及降解血浆中更多的 LDL。这可能是 LDL 降解增加的重要原因。HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体数目增加可能与 HTG 患者血浆胰岛素升高及 cAMP 水平下降有关。我们以往的研究发现, 高糖膳食可诱发正常人^[11]及大鼠^[12]血糖、胰岛素及甘油三酯含量升高; HTG 患者常伴有高胰岛素血症及 cAMP 含量下降。Chait 等^[13]发现, 胰岛素可增加细胞表面的 LDL 受体的数目, 从而使 LDL 通过受体降解的速度增加 25%, 而其亲和力无改变。Stout 等^[14]发现二丁酰 cAMP 可抑制成纤维细胞及动脉平滑肌细胞对 ^{125}I -LDL 的结合、摄取和降解。这些结果提示, HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体数目增加可能与胰岛素水平升高及 cAMP 水平下降有关。此外, LDL 受体的数目还受血浆 LDL 水平的负反馈调节 (即下降调节), 特别是 LDL 中胆固醇含量的下降调节。HTG 患者多伴有 LDLC 含量下降, 这可能是引起 HTG 患者淋巴细胞 LDL 受体数目增加的另一原因。

3.2 HTG 患者血浆 LDL 与肝 NPC LDL 受体的结合活性改变

本研究结果表明, HTG 患者 LDL 与肝 NPC LDL 受体结合能力降低。这可能与 HTG 患者 LDL 中 TG 含量升高有关^[15]。

Michael 等^[15]研究 HTG-LDL、N-LDL 及 HL-LDL (经肝脂酶处理后的 LDL) 的圆二色谱和核磁共振谱发现, 由于 HL-LDL 内核 TG 被水解清除, 因而使 Apo B100 的空间结构改变, 使 LDL 颗粒中的赖氨酸残基移至 LDL 的表面, 因此这种 LDL 与 LDL 受体的亲和力增加。而 HTG 患者的 LDL, 其内核 TG 含量较 N-LDL 显著增加, 这种 HTG-LDL, 则又导致 Apo B100 空间结构改变, 使分子表面的赖氨酸残基又移至 LDL 的内核, 因而使 HTG-LDL 与 LDL 受体的亲和力下降。本研究发现, HTG-LDL 与大鼠肝非实质细胞 LDL 受体结合活性降低亦支持 Michael 等的发现。

4 参考文献

- 1 四川医学院生物化学教研组. 无症状高脂血症 60 例的血脂分析. 新医学, 1975, 6: 14.
- 2 Department of Biochemistry and cardiovascular Group, Department of Medicine, Szechun Medical college (刘秉文, 等). A study on carbohydrate and lipid metabolism in cases of hyperlipidemia and coronary heart disease. I. Glucose tolerance test and lipid tolerance test. *Chin Med J*, 1978, 91: 465
- 3 刘秉文, 张荣爵, 付明德 et al. 高脂血症及冠心病患者糖、脂代谢的研究. II. 糖餐对血浆胰岛素含量的影响. 四川医学院学报, 1982, 13: 239
- 4 张林华, 刘秉文. 内源性高甘油三酯血症患者血浆脂蛋白中脂质和载脂蛋白组成及分布的初步研究. 华西医科大学学报, 1992, 23: 117
- 5 Vega GL, Grundy SM. Studies on mechanisms for enhanced clearance of low-density lipoproteins in patients with primary hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*, 1989, 226: 5
- 6 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. 生物化学与生物物理学报, 1989, 21: 257
- 7 Bilheimer DW, Eisenbergs, Levy RI. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 260: 212
- 8 洪 瑛, 刘秉文, 付明德. 人淋巴细胞低密度脂蛋白受体酶联测定法研究. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20: 297
- 9 Cai HJ, He ZG, Ding YN. Effects of monocyte macrophages stimulation on hepatic lipoprotein receptors. *Biochem Biophys Act*, 1988, 958: 334
- 10 Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 1974, 249: 5153
- 11 刘秉文, 何毓颖, 张荣爵 et al. 高糖及高脂膳食对血糖、胰岛素及血脂的影响. 华西医科大学学报, 1990, 21: 145
- 12 张林华, 刘秉文, 吴兆锋 et al. 高淀粉膳食对血浆胰岛素、cAMP 含量及组织 cAMP 代谢的影响. 生物化学杂志, 1986, 2: 70
- 13 Chait A, Bierman EL, Albers J. Low density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J clin Invest*, 1979; 64: 1309
- 14 Stout RS, Bierman EL. Dibutyl cyclic AMP inhibits LDL binding in cultured fibroblasts and arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1983, 46: 13
- 15 Michael A, Sissel LK, Michael C et al. The influence of triglyceride content of low density lipoprotein on interaction of apolipoprotein B100 with cells. *J Biol chem*, 1988, 263: 16842