

家兔体内低密度脂蛋白受体分布的免疫荧光研究*

单止茵 楼定安 沈建根^①(浙江医科大学病理学教研室, ^①免疫学教研室, 杭州 310006)

Distribution of Low Density Lipoprotein Receptors in Various Tissues of Rabbit: an Immunohistochemical Study

SHAN Zhi-Yin, LOU Ding-An and SHEN Jian-Gen
(Department of Pathology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT The distribution of low density lipoprotein (LDL) receptors in various tissues of rabbit was studied using indirect immunofluorescence staining with monoclonal anti-rabbit LDL receptor antibodies prepared in our laboratory. The results showed that there was specific fluorescence in liver, adrenal cortex, ovary, intestine, bronchus and skin, but in liver and adrenal cortex, the specific fluorescence of the cells was brighter than that in all other tissues. In heart muscle, skeletal muscle and adrenal medulla the fluorescence of the cells was very faint, especially in brain parenchyma. It suggests that there may be an interrelationship between the LDL receptor activity and the physiological function and metabolism of the tissues.

KEY WORDS Low density lipoprotein receptor; Immunofluorescence; Monoclonal antibody; Rabbit; Tissue cell

摘要 以本实验室制备的两种抗兔低密度脂蛋白受体单克隆抗体, 进行间接免疫荧光染色, 观察此种受体在兔各种组织中的分布。结果显示, 肝细胞、肾上腺皮质细胞的特异性免疫荧光最强; 卵泡细胞、

黄体细胞、肠道及支气管上皮细胞和表皮基底细胞等都显示较强的免疫荧光; 心肌、骨骼肌、肾上腺髓质及结缔组织的荧光很弱, 而脑实质几乎无荧光反应。提示低密度脂蛋白受体活性可能与组织的生理功能和代谢特性有关。

关键词 低密度脂蛋白受体分布; 免疫荧光; 单克隆抗体; 兔; 组织细胞

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体是细胞膜上的一种糖蛋白^[1], 血浆中的 LDL 进入细胞内主要是经受体介导的。LDL 受体对细胞内和血浆中的 LDL 胆固醇浓度起到调节作用, 以保持体内胆固醇代谢的平衡^[2]。不同组织因功能不同, 对胆固醇的需求也不相同, 故细胞的 LDL 受体活性与细胞对胆固醇的需求之间可能存在着一定的联系。为此本实验采用抗兔肝 LDL 受体特异性单克隆抗体, 以间接免疫荧光方法来观察不同组织内 LDL 受体活性, 以验证细胞的功能和代谢特点与胆固醇需求和受体活性之间的联系。

1 材料与方法

1.1 抗兔肝 LDL 受体单克隆抗体的制备和鉴定^[3,4]

以 DE-AE 纤维素初步纯化的兔肝 LDL 受体免疫 BA LB/C 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与 NS/骨髓瘤细胞融合, 产生杂交瘤细胞, 取其培养上清液作酶联免疫吸附检测 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 筛选出产生特异性抗体的细胞进行克隆, 克隆完成后将单克隆细胞接种于同种小鼠腹腔, 收集腹水中单克隆抗体 (Monoclonal antibody, McAb)

用 ELISA 法测定抗 LDL 受体 McAb 与可溶性 LDA 受体的特异性结合。用细胞 ELISA 法测定抗

LDL 受体 McAb 与成纤维细胞膜上 LDL 受体的结合^[1], 并对不同种系的培养细胞用抗 LDL 受体 McAb 作间接免疫荧光染色。实验中均采用抗牛肾上腺 LDL 受体 McAb(IgG-C, 南京医科大学蔡海江教授赠送)和与 LDL 受体无关的 McAb 作对照。

1.2 各脏器的 LDL 受体免疫荧光染色

取兔肝、肾上腺、卵巢、大肠、小肠、心、脑、骨骼肌新鲜组织低温恒冷切片, 自然干燥 1~2 h, 丙酮固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 加抗兔 LDL 受体 McAb 400 mg · L⁻¹; 或对照单抗或 PBS, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5~10 min, 再与羊抗鼠 IgG-FITC (Sigma) 孵育 30 min, 洗 3 次, 缓冲甘油封片, 荧光显微镜观察结果。荧光强度分为四级, 均可定为“+”, 荧光最强定为“+++”, 介于两者之间的根据强弱不同定为“++”和“+”。

2 结果

2.1 单克隆细胞株及抗体的特异性鉴定

杂交瘤细胞经 5 次克隆培养, 获得两株能分泌特异性抗兔 LDL 受体的单克隆细胞株: ZMRE6 和 ZMRE7, 两株细胞分泌的抗体均能与可溶性 LDL 受体特异性结合, 呈一饱和曲线; 与成纤维细胞上的 LDL 受体也呈现特异性结合, 间接免疫荧光染色显示兔成纤维细胞有多量特异性颗粒状荧光, 以细胞核周围较多, 而人或猴的细胞则未见特异性荧光。

2.2 兔的各种组织 LDL 受体免疫荧光染色

兔的各种组织以抗兔 LDL 受体 McAb 作间接免疫荧光染色, 发现肝细胞呈现很强的特异性荧光反应, 尤以细胞的肝窦侧更明显 (Figure 1); 肾上腺皮质细胞也显很强的特异性荧光。尤其是束状带、网状带反应更强, 而球状带的反应较弱 (Figure 2); 卵巢的卵细胞、黄体细胞、肠道上皮细胞及腺体 (Figure 3)、支气管上皮细胞也有较强的 LDL 受体免疫荧光; 肺泡组织、心肌、骨骼肌、肾上腺髓质及结缔组织的 LDL 受体免疫荧光反应很弱; 脑组织的蛛网膜、软脑膜有较弱的荧光, 而脑实质中则几乎没有特异性免疫荧光反应 (Figure 4)。各种组织 LDL 受体特异性免疫荧光强度见 Table。

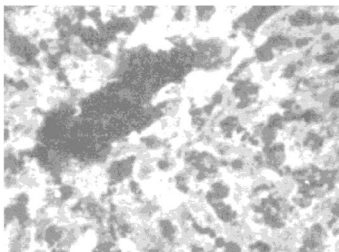


Figure 1. Liver. At the sinusoidal side of liver cells the fluorescence is brighter than that in cytoplasm or other sites.



Figure 2. Adrenal cortex. The cells in zona fasciculata and reticularis the fluorescence is very bright, but in zona glomerulosa the fluorescence is very faint.

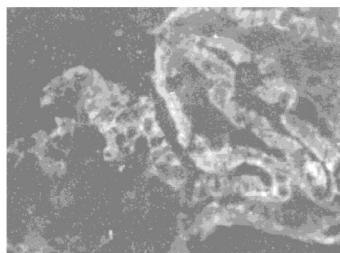


Figure 3. Intestine. The fluorescence appears primarily in intestine epithelium.

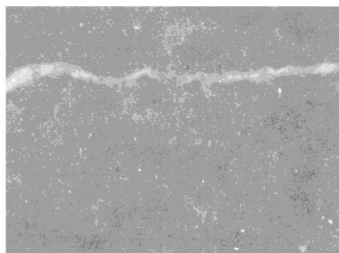


Figure 4. Brain. There is no fluorescence in brain parenchyma except arachnoid and piamater.

Table. The LDL receptor specific immunofluorescence in various tissues.

Tissues	intensity of LDL receptor immunofluorescence
liver	+++
zona glomerulosa of adrenal cortex	+
zona fasciculata and zona reticularis of adrenal cortex	+++
adrenal medulla	+
intestine epithelium	+++
bronchus epithelium	+++
ovarian follicle, corpus luteum	++
lung, myocardial and skeletal muscle	+
brain parenchyma	-
pia-arachnoid	++

3 讨论

本次实验结果以荧光的相对强度来表示,由于不同组织荧光强弱差别较大,肉眼能较易区分四级变化,且每次实验均取不同组织,在相同条件下进行染色,故对同一批实验标本以肉眼观察进行半定量。

本文用本实验自己制备的两种抗兔 LDL 受体单克隆抗体 (IgG ZMR6, IgG ZMR7) 对兔各种组织作免疫荧光染色,发现不同脏器组织的 LDL 受体免疫荧光反应强度有很大差异。这种差异反映了不同组织 LDL 受体的活性不同,也反应了不同组织的功能和代谢特点。据报道,体内 50%~70% 的 LDL 受体位于肝脏^[6,7],肝脏内 LDL 受体浓度的改变将影响血浆胆固醇的水平^[2],肾上腺和卵巢等合成胆固醇的组织也有很强的 LDL 受体活性^[8,9],但这些脏器的体积远小于肝脏,因而对血浆中的胆固醇水平无明显影响,骨骼肌、心肌、大脑^[10]等组织 LDL 受体活性则很低。

肝脏是体内 LDL 降解的主要部位,大约有 50% 以上的 LDL 被肝脏摄取,然后在溶酶体内降解转化成胆酸盐形式或胆汁,经胆道系统被排到肠道内^[11]。用抗 LDL 受体 McAb 进行免疫荧光染色,整个肝细胞都有黄绿色颗粒状荧光,而以肝细胞的肝窦面反应最强,说明肝脏具有很高的 LDL 受体活性,而且肝细胞的肝窦面接触血浆,关系密切,摄取 LDL 最多,故该面 LDL 受体活性更高。最能说明 LDL 受体活性与细胞功能有关的脏器是肾上腺,肾上腺皮质能合成由胆固醇衍生而来的激素,因而皮质细胞对胆固醇的需求量很大,需要有较强的 LDL 受体活性,而髓质内的嗜铬细胞合成的激素是儿茶酚胺,合成原料为酪氨酸,不象皮质细胞那样需要大量胆固醇,故 LDL 受体免疫荧光反应在皮质的束状带、网状带很强,被皮质所环绕的髓质内则几乎看不到荧光,提示受体的活性与细胞对胆固醇的需求有关。卵巢的卵泡细胞、黄体细胞也需要用胆固醇为原料合成类固醇激素,故也显示较强的 LDL 受体免疫荧光。

我们在实验中还观察到,肠道、呼吸道上皮和表皮基底细胞都呈现较强的 LDL 受体免疫荧光,这些细胞是生长活跃的细胞,细胞分裂频率很高,如肠上皮细胞 2~5 天就可更新一次。细胞需摄取较多的 LDL 提供胆固醇

以供合成膜结构之用。特别是肠绒毛表面上皮细胞荧光较强,而固有膜内的腺细胞只在基底部有较强的荧光,这可能与粘膜表面上皮细胞的增殖活性远大于腺细胞,所需的胆固醇量也较多有关。相反,大脑的神经细胞、骨骼肌、心肌细胞增殖能力很低,也不分泌以胆固醇为原料的物质,对胆固醇的需求量相对较少,用抗 LDL 受体 McAb 作免疫荧光染色,这些细胞的特异性荧光反应很弱,脑组织除蛛网膜、软脑膜有较弱的荧光外,脑实质几乎呈现阴性反应。因此推测 LDL 受体的活性可能与细胞的生长增殖有关。

本实验中的某些现象值得注意。肾上腺球状带细胞分泌醛固酮,也需要以胆固醇为原料,但用抗 LDL 受体 McAb 免疫荧光染色,荧光很弱。Fong 用酶联免疫组织化学法观察结果也如此,这是否提示球状带细胞自身合成胆固醇能力较强,对 LDL 提供外源性胆固醇的需求量不如束状带和网状带那样高? 这个问题尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Schneider WJ, Beisiegel U, Joseph L, et al. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164 000 molecular weight. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 2664
- 2 Spade DK, Huettinger M, David W, et al. Role of receptor independent low density lipoprotein transport in the maintenance of tissue cholesterol balance in the normal and WHHL rabbit. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 32
- 3 沈奇桂, 刘子贻, 沈乐翊, et al. 家兔肝低密度脂蛋白受体的提取和初步纯化. *浙江医科大学学报*, 1993, **22** (1): 12
- 4 沈建根, 单淑茵, 楼定安, et al. 抗低密度脂蛋白受体单克隆抗体的制备及其生物学特性. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2**(1): 14
- 5 May K, Kraemer FB, Chen J, et al. ELISA measurement of LDL receptors. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 1683
- 6 Pittman RC, Attie AD, Carew TE, et al. Tissue sites of degradation of low density lipoprotein: application of a method for determining the fate of plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 534
- 7 Spady DK, Bilheimer DW, Dietschy. Rates of receptor dependent and independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 23499
- 8 Brown MS, Kovanen PL, Goldstein JL. Receptor mediated uptake of lipoprotein cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog Horm Res*, 1979, **35**: 215
- 9 Azhar SA, Cooper LT, Maffe W, et al. Characterization of apoB₁₀₀ E receptor function in the luteinized ovary. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 869
- 10 Fong LG, Bonney E, Kosek JC, et al. Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptors in adrenal gland liver and intestine. *J Clin Invest*, 1989, **84**: 847
- 11 Renaud G, Hamilton BJ, Havel RJ. Hepatic metabolism of colloidal gold low density lipoprotein complexes in the rat; evidence for bulk excretion of the lysosomal contents into bile. *Hepatology*, 1989, **9**(3): 380

(本文 1994-11-21 收到)