

低密度脂蛋白对动脉壁内皮细胞膜血栓调节蛋白功能的影响

经建中 周凤鑫 黄桂秋 葛志英^① 胡燕琴 刘玮 李慧丽 张健 张依宁 徐也鲁

(上海第二军医大学病理生理学教研室 上海血液学研究所基础实验室, 上海 200025)

Effect of Low Density Lipoprotein on Thrombomodulin Function of the Surface of Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells

JING Jian-zhong, ZHOU Feng-Xin, HUANG Gui-Qiu, GE Zhi-Yin^①, HU Yian-Qin, LIU Wei, LI Hui-Li, ZHANG Jian, ZHANG Yi-Ning and XU Ye-Lu
(Department of Pathophysiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, ^①Department of biochemistry, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT To explain the relationship between low density lipoprotein (LDL) and local anticoagulation in the atherosclerotic pathogenesis, the effect of varied LDL concentration with different incubation time on the activation of protein C by thrombomodulin (TM) of the surface of cultured newborn bovine aortic endothelial cells was investigated. After incubation, thrombin, protein C, and S-2238 were used for measuring TM-dependent protein C activation. The results showed a significant decline of TM activity after incubation with over $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of LDL and a significantly negative correlation between the LDL concentration and TM activity ($y = -0.25x + 65.96$, $r = -0.87$, $n = 175$, $P < 0.001$). The longer the incubation time with more than $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of LDL was taken, the more significant inhibition of TM activity would be shown. Reaction rate of activated protein C generation was decreased in early, and increased later. These data suggest that elevated blood levels of LDL may contribute to the atherosclerotic pathogenesis by

decreasing function of local anticoagulation.

KEY WORDS Low density lipoprotein; Endothelial cell; Thrombomodulin; Atherosclerosis

摘要 通过不同浓度的低密度脂蛋白与体外培养的新生小牛主动脉内皮细胞经不同时间孵育后,应用凝血酶、蛋白C和S-2238发色底物显色法,观察单层内皮细胞膜上血栓调节蛋白功能的变化。结果显示:低密度脂蛋白孵育浓度 $>6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,血栓调节蛋白活性降低,两者呈良好的负相关($y = -0.25x + 65.96$, $r = -0.87$, $n = 175$, $P < 0.001$);浓度 $\geq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着孵育时间延长,血栓调节蛋白受抑制较显著,并呈相关性;低密度脂蛋白还使血栓调节蛋白辅助激活蛋白C的反应速率出现早、中期减慢,后期加快的变化。这些变化表明低密度脂蛋白具有影响血栓调节蛋白功能的作用,提示高脂血症可以通过抑制动脉血管壁局部抗凝功能来促进动脉粥样硬化的发生发展。

关键词 低密度脂蛋白; 血管内皮细胞; 血栓调节蛋白; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展是一种多层次、多原因、多细胞成份参与的瀑布式过程^[1],血脂增高是其中一项重要因素。在有关脂质导致As的机制中,血液凝固性的变化,尤其是血管壁局部抗凝功能改变的重要意义已逐渐被关注。本文通过不同浓度的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在体外与培养的新生小牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cells, BAEC)经不同时间孵育后,观察单层BAEC的膜上血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)功能的变化,探讨脂质与内皮抗凝作用之间的关系。

1 材料和方法

1.1 蛋白质分离纯化

① 上海中医药大学生物化学教研室, 上海 200032

1.1.1 低密度脂蛋白制备 新鲜人血清,采用溴化钾分步密度梯度超速离心法离心后(Hitachi centrifuge, 70p72, RP50T-302, $50\,000\times g$, 24~29 h),收集密度为 1.040~1.060 区间的 LDL 层液体,以火箭电泳和快速平板电泳法确定其纯度后,透析,置 4℃ 保存两周。

1.1.2 蛋白 C 制备 参照 Suzuki 方法^[2]改良,用 $0.129\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸钠以 1:4(容积比)抗凝的新鲜牛血,分离血浆;加入 1/10 体积的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BaCl_2 ,取其沉淀物后重溶,再以硫酸铵沉淀,取其 25%~50% 浓度段沉淀物,经 pH 6.0 和 pH 8.0 两次离子交换层析,和一次肝素亲和层析,获得蛋白 C,以聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定其纯度,用 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛇毒(Southern Copperhead, Sigma)激活,以 KPTT 和发色底物 S-2238(kabi Vitrum)显色确定活性,透析分装,置 -30℃ 保存备用。

1.1.3 抗凝血酶 III 制备 用 $0.129\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸钠以 1:4 抗凝的新鲜牛血,分离血浆;经 0.1% 硫酸右旋糖酐(Fluka)沉淀后,上清液在 pH 7.4 作肝素-Sepharose 柱亲和层析,收集 0.6 mol NaCl 洗脱峰,用电泳法鉴定纯度,以凝血酶凝胶纤维蛋白形成空斑法确定活性,透析分装,置 -30℃ 保存。

1.2 小牛主动脉内皮细胞的采集和培养

采集荷兰种系新生小牛主动脉,剥去外膜,以 0.25% 胰酶消化内膜,收集脱落 BAEC,洗涤,置 37℃ 20% M199(Nissui)培养瓶,24 h 后,用 Hank's 液洗涤换液。经 72~96 h 培养,待生长融合成单层后传代;连续 4~5 次继代。再按常规收集细胞和计数,以每孔 1 万个细胞接种在预先用 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 人血浆纤维连结蛋白处理过的 96 孔培养板内,48 h 37℃ 培养贴壁后,用于下述测试。

1.3 血栓调节蛋白活性测定方法

在单层贴壁 BAEC 生长良好的 96 孔培养板内,分别定量加入含 LDL 0.3、6、12、25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液,置 37℃ 孵育,并缓慢摇 2、4 或 6 h 后,倾净孔内液,洗涤三次,每孔加含 400 NIH-U $\cdot\text{L}^{-1}$ 牛凝血酶(Parke-Davis)、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白 C、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、pH 7.4 的激活液 50 μl ,经 37℃ 30 min 后,每孔吸出 25 μl ,置酶标板中;各孔加入含 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗凝血酶 III 和 $5\times 10^5\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 肝素的缓冲液 5 μl ,在室温(18~20℃)中静置 5 min;再加入含 0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 发色底物 S-2238、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、pH 8.0 的发色液 100 μl ;立即放入酶标仪读数(Bio-Tek CERES 9000, OD_{405}),以后每隔 60 s 读数一次,持续 15 min 终止;再以每孔

OD 的增值(ΔA),按 $5\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 活化蛋白 C(activated protein C, APC) = $\Delta A_{\text{OD}_{405}}\cdot 0.025\cdot\text{min}^{-1}$ 计算后,统计分析。

1.4 数据处理方法

1.4.1 两组均数间比较采用方差不齐的 t 检验。

1.4.2 两种数据之间的关系采用直线相关分析、相关系数的显著性检验,以及曲线回归拟合等方法。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白孵育浓度对血栓调节蛋白活性的影响

血栓调节蛋白活性用单位时间的 APC 生成量来表示,根据对照组 APC 生成的时间-反应动力学曲线变化,10 min 时 APC 生成已达 15 min 时的 97% 以上(Figure 1),因此实验组选择观察 10 min 以前的变化,当 LDL 孵育浓度 $\geq 12\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,APC 由对照组 71.7 ± 6.1 降至 $\leq 59.3\pm 9.3\text{ nmol}\cdot(\text{L}\cdot 10^4\text{ cells}\cdot 10\text{ min})^{-1}$ ($P<0.01$);LDL 为 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 APC 为 $64.5\pm 7.9\text{ nmol}\cdot(\text{L}\cdot 10^4\text{ Cells}\cdot 10\text{ min})^{-1}$,与对照组相比,虽有所减少,但无统计学意义($P>0.05$, Table 1)。LDL 的预先孵育处理使得 APC 生成的时间-反应动力学曲线向下移位,可见两者之间存在一定的相关关系,经直线相关分析,呈现良好的负相关,即 LDL 的孵育浓度越高对 BAEC 膜上 TM 活性的抑制程度越显著。其相关系数具有显著性意义($y=-0.25x+65.97$, $r=-0.87$, $n=175$, $P<0.001$),若用四项式曲线回归拟合,相关性极佳($y=-1E-06X^4-0.0003X^3+0.03X^2-1.329X+72.2$, $r=-0.998$; Figure 2)。

2.2 低密度脂蛋白孵育时间对血栓调节蛋白活性的影响

当 LDL 浓度 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,孵育 2、4 或 6 h 后,第一分钟 APC 生成量分别与 4、6 小时组之间差异显著($P<0.01$),但在反应中,后期这种差异消失(Table 2);孵育时间与第一分钟 APC 生成量之间呈负相关($y=2.88X^2-15.75X+33.58$, $r=-0.994$, $n=25$, $P<0.01$)。而当 LDL 浓度降至 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下时,这种相关关系不存在。

Table 1. Effect of LDL concentration on thrombomodulin activity.

LDL (mg · L ⁻¹)	n	activated protein C ($\bar{x} \pm s$, nmol · (L · 10 ⁴ Cells) ⁻¹)			
		1 min	3 min	5 min	10 min
100	25	16.01 ± 6.45***	25.79 ± 7.57***	35.38 ± 9.84***	45.07 ± 9.87***
50	25	18.45 ± 5.75***	30.02 ± 7.98***	40.06 ± 9.18***	48.48 ± 9.37***
25	25	22.38 ± 7.09***	34.37 ± 9.12***	45.54 ± 9.96***	53.31 ± 9.71***
12	25	26.94 ± 7.10**	39.86 ± 10.55**	52.45 ± 9.47**	59.33 ± 9.34**
6	25	32.45 ± 10.88*	45.46 ± 10.94*	57.80 ± 8.50*	64.46 ± 7.89*
3	25	35.93 ± 9.83	50.62 ± 9.08	62.67 ± 8.01	69.75 ± 7.47
control	25	39.95 ± 7.77	52.56 ± 7.02	65.99 ± 5.86	71.69 ± 6.06

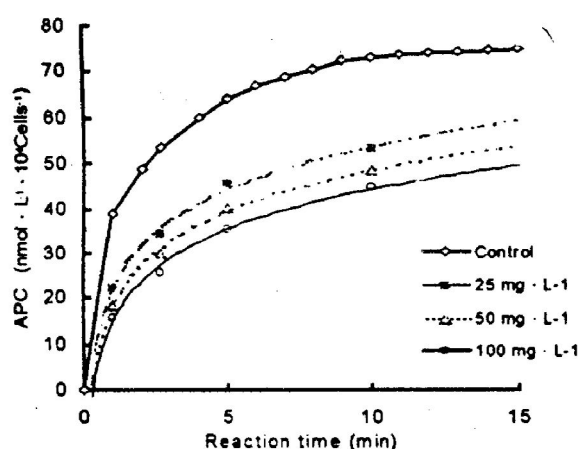
***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$, *, $P < 0.05$ compared with control.

Figure 1. Effect on APC generation reaction time curve of LDL

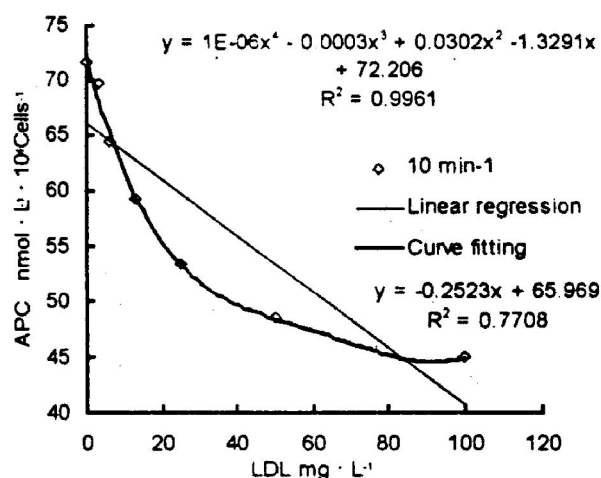


Figure 2. Relationship between LDL incubation concentration and APC generation.

Table 2. Effect of 100 mg · L⁻¹ of LDL incubation time on TM activity.

Incubation time (Hours)	n	APC($\bar{x} \pm s$, nmol · L ⁻¹ · 10 ⁴ Cells ⁻¹)			
		1 min	3 min	5 min	10 min
2	10	20.7 ± 4.7**	29.3 ± 5.3*	36.2 ± 4.7	45.3 ± 5.3
4	7	13.6 ± 5.1	22.9 ± 8.7	36.5 ± 15.3	43.4 ± 12.9
6	8	12.3 ± 6.2	23.9 ± 8.1	35.9 ± 10.0	44.2 ± 11.9

**, $P < 0.01$, * $P < 0.05$, compared with 4 h and 6 h

2.3 低密度脂蛋白对活化蛋白生成反应速率的影响

活化蛋白 C 生成的反应速率是取反应过程中 1~3、3~5、5~10 min 的时间片段,由该片段终末的 APC 量减去起始的 APC 量,除以该片段持续时间而获得。随着 LDL 孵育浓度逐渐增高,APC 生成的反应速率出现早、中期由轻度加快趋向减慢,后期则相反,出现加快倾向 (Table 3),这提示 LDL 的孵育浓度对 APC 生

成的反应动力学过程有影响。

3 讨论

血管内皮细胞有多种抗凝功能,其中膜蛋白 TM 起着重要的作用。在膜表面的 TM 通过其 N-端第一区结构可与凝血酶结合形成复合物,改变凝血酶分子立体构型的特异性,使之不能酶解纤维蛋白原从而不能发挥凝血作用,相反转而激活蛋白 C,生成 APC,在蛋白 S 辅助下,迅速灭活 V 和 VIII 因子,产生抗凝功能^[3]。

Table 3. Effect on APC generative rate of LDL

LDL (mg · L ⁻¹)	n	reaction rate[$\bar{x} \pm s$, nmol · (L · min) ⁻¹]		
		1~3 min	3~5 min	5~10 min
100	25	4.9 ± 1.9**	4.8 ± 2.8*	1.9 ± 0.7**
50	25	5.9 ± 3.1*	5.2 ± 2.7*	1.7 ± 0.6*
25	25	6.0 ± 2.5	5.7 ± 3.4	1.5 ± 0.6
13	25	6.5 ± 2.9	6.3 ± 3.4	1.4 ± 0.5
6	25	6.5 ± 3.6	6.2 ± 3.0	1.3 ± 0.4
3	25	7.4 ± 2.8	6.0 ± 2.40	1.4 ± 0.4
control	25	6.3 ± 1.3	6.7 ± 1.7	1.1 ± 0.3

** , $P < 0.01$, * , $P < 0.05$ compared with control.

血栓调节蛋白和低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)一样,是一种具有糖基化和多个环状结构的嵌膜蛋白。比较两者的蛋白结构,除N端的三分之一外,氨基酸序列十分相似^[4]。

本实验应用 LDLR 的配体 LDL 预先孵育 BAEC,造成 BAEC 膜上的 LDLR 被饱和,在此基础上,去掉液相反应系统中的 LDL,再观察 TM 的变化,结果发现,LDL 的预处理可以使 TM 活力受抑,并不仅在一定浓度范围内呈浓度依赖性变化,也与较高浓度下孵育时间有一定相关。说明 LDL 对 TM 功能有抑制作用,但具体机制尚不明了,可能与 LDL 结合 LDLR 促使其复合物内吞有关。Beretz^[5]曾用不依赖 LDLR 内吞的乙酰化 LDL 预处理 BAEC 造成内吞增加,但 TM 的功能没有变化。而本室近期发现,经 LDL 预处理后,BAEC 膜表面凝血酶结合位点会有减少(待发表)。故推测 LDL 结合 LDLR 形成被膜小凹而内吞时,可能将其周围具有相似穿膜结构的 TM 一起带入胞内。由于 TM 没有翻转循环的特性,而使其分解增加;加上 TM 的 mRNA 半衰期相当短,而使其合成受抑。此外,LDLR 内吞会促使胞内 LDLR 合成表达的增加,而 LDLR 和 TM 具有高度相似的 N-端 EGF 区和 C-端胞浆区的受体集落片段^[6],当胞内装配 LDLR 增加时,有关集落片段消耗增加,而使 TM 装配相对受限。这提示 TM 功能受抑的机理可能与 LDL 对 BAEC 膜表面 TM 表达的影响有关。

由于较高浓度的 LDL 孵育 24 h 以上就会造成 BAEC 损伤,故本实验采用控制浓度和较短时间的孵育,据观察 6 h 以内对 BAEC 贴壁生长无明显影响。APC 生成过程的反应速率研究表明较高浓度 LDL 的孵育,使早、中期的反应速率减慢,而后期反而加快。这提示 LDL 对 TM 功能的抑制作用有限,可能 LDL 预处理使膜表面 TM 位点密度降低,或部分 TM 功能被封闭,而残存 TM 的功能完好,故在底物丰富时能超常发挥。因此在实验最高浓度的 LDL (100 mg · L⁻¹)孵育 6 h 后,虽比 2 h TM 受抑明显,但 TM 活性也未丧失殆尽。此外,LDL 和凝血酶结构差异很大,LDLR 和 TM 的配体结合区序列也不大相同^[7],可以排除结合位点竞争抑制的可能性,但由于 LDL 分子较大,故不能排除 LDL 预先结合占据一定的膜表面空间,而妨碍凝血酶的结合和蛋白 C 的接触活化,因此,推测 LDL 对 TM 抑制的机理可能有多方面因素。

总之,根据结构与功能一致的观点,LDLR 与 TM 这两种膜蛋白具有一定的蛋白结构相似性,当在膜表面局部发挥作用时可能有内在的功能联系。这些变化提示高脂血症可能通过抑制血管壁局部抗凝功能促使 As 发生发展,其具体机理有待进一步阐明。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801.
- 2 Suzuki K, stenflo J, Teodorsson B. Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. *J Biol Chem*, 1983, **258** (3): 1 914.
- 3 Maruyama J. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant; its structure, function and expression. *Jpn Circ J*, 1992, **56** (2): 187.
- 4 Jackman RW, Beeler DL, Van De Water L, et al. Characterization of a thrombomodulin cDNA reveals structural similarity to the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 8 834.
- 5 Beretz A, Freyssinet JM, Gauchy J, et al. Stability of the thrombin-thrombomodulin complex on the surface of endothelial cells from human saphenous vein or from the

cell line EA hy926. *Biochem J*, 1989, **259**: 35.

- 6 Wen DZ, Dittman WA, Ye RD, et al. Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*, 1987, **26**: 4 350.

- 7 Tsiang M, Lentz SR, Dittman WA, et al. Equilibrium

binding of thrombin to recombinant human thrombomodulin; effect of hirudin, fibrinogen, factor Va, and peptide analogues. *Biochemistry*, 1990, **29**: 10 602.

(本文 1995-01-29 收到)

关于中文稿件中名词术语使用外文缩写的规定

《中国动脉硬化杂志》编辑部

当一个名词术语在中文稿件中反复出现时,作者往往喜欢用一个外文缩写来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,本刊亦不例外。然而我们在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的外文缩写时存在以下问题:①同一个英文词,译成的中文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有译为衍化,还有的译成衍生;②缩写不规范,字母大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein),缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;③用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写来代替,而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,本刊对中文稿件中名词术语使用外文缩写来代替作如下规定,请作者遵照执行。

1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用中文;多于 3 个汉字的,可使用外文缩写;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用中文;但冠心病、肺心病等例外。

2 文题、摘要和关键词中的名词术语,不得使用外文缩写来代替。

3 正文中的各级标题不得用缩写来代替名词术语。正文中段首和句首的名词术语,也不得用缩写来代替。

4 第一次使用外文缩写来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:中文(外文,缩写)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等,以下

行文,可只写缩写,不必注释中文。

5 名词术语的外文缩写原则

5.1 由两个或两个以上的词构成的名词术语,缩写时一律取实词首字母,全大写;如总胆固醇(total cholesterol, TC)。

5.2 由主干词加前缀构成的单词名词术语缩写时,不论主干词和前缀之间是否有连字符,一律取前缀和主干词的首字母,全大写,如去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)。

5.3 组合法构成的单词名词术语,其间若没有连字符,缩写时取首字母和另 1~2 个字母,首字母大写,余小写,如动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),但相沿成习的写法例外,如动脉硬化(arteriosclerosis, AS)、甘油三酯(triglyceride, TG)、白细胞介素(interleukin, IL)等。

5.4 组合法构成的名词术语,其间有连字符的,按照上述第 5.1 条原则缩写。

5.5 用来代替中文名词术语的外文缩写,在中文稿件中不用复数。

5.6 缩写字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

6 书写、打字或排版时,名词术语的外文缩写不移行。

以上规定,自 1994 年 10 月 1 日起生效;此后,凡文稿中有不符合规定者,本刊将退回作者重写,直到符合本规定为止。

(胡必利起草)