

去唾液酸对低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢的影响

沃兴德 G. M. Kostner^① 洪行球 岑利权
(浙江中医学院分子医学研究所, 杭州 310009)

Effect of Desialylated Acid on Metabolism of Low Density Lipoprotein and Lipoprotein (a)

WO Xing-De, G. M. Kostner^①, HONG Xing-Qiu and CHEN Li-Quan

(Molecular Medical Institute of Zhejiang Traditional Chinese Medical College, Hangzhou 310009, China. ^①Institute of Medical Biochemistry, University of Graz, A-8010 Austria)

ABSTRACT

Aim We used hedgehogs to study the effects of sialic acid in the structure of low density lipoprotein (LDL) and lipoprotein (a) [Lp(a)] on the metabolism of the LDL and Lp(a) with 125 iodine.

Methods The end sialic acid on the structure of LDL and lipoprotein (a) were removed with the treatment of neuraminidase. The desialylated lipoprotein (a) (ds-Lp(a)), desialylated low density lipoprotein (ds-LDL), LDL and Lp(a) were marked with 125 iodine tyramine cellobiose. They were injected into the body of the hedgehogs via the armpit vein. The animals were put to death in 3 h and 6 h. The concentration of radioactivity in the blood, liver, spleen, kidney and gall were measured. The change of metabolism of ds-LDL and ds-Lp(a) were analyzed and compared with that of normal LDL and Lp(a).

Results The experiments showed that the rate of the metabolism of ds-LDL in 3 h is 7.6% lower than that of LDL, and the rate of the metabolism of ds-LDL in 6 h is 12.23% higher than that of LDL. On the contrary the concentrations of ds-Lp(a) in all the organs reduced by 2 times and 3.85 times to the concentrations of

Lp(a) in 3 h and 6 h respectively. LDL and ds-LDL can be swallowed by the spleen cells and stored. Although Lp(a) can also be swallowed by the spleen cells, ds-LP(a) had a little to enter the spleen cells. Even so it can be removed quickly.

Conclusions Experiments proved that sialic acid plays a very important role in the metabolism of Lp(a) and remaining stable of the structure of Lp(a).

KEY WORDS Desialylated lipoprotein (a); Desialylated low density lipoprotein; Lipoprotein(a); Low density lipoprotein; Hedgehog

摘要 将低密度脂蛋白和脂蛋白(a)用神经氨酸酶处理,去除低密度脂蛋白(a)中所含末端唾液酸,然后用¹²⁵I-纤维素二糖酪胺标记,经刺猬腋下静脉注射,分别于3 h和6 h处死,测定血、肝、脾、肾和胆汁中放射含量,分析和比较去唾液酸和富含唾液酸低密度脂蛋白和脂蛋白(a)的代谢变化。实验发现:注射去唾液酸低密度脂蛋白的最初3 h,组织内的代谢速率低于低密度脂蛋白组,而6 h后代谢速率则高于低密度脂蛋白组。注射去唾液酸脂蛋白(a)3 h和6 h在组织中代谢速率均显著高于脂蛋白(a)组。低密度脂蛋白和去唾液酸低密度脂蛋白均能被脾脏中巨噬细胞吞噬后蓄积在细胞内,脂蛋白(a)虽然能被脾脏巨噬细胞吞噬,但去唾液酸脂蛋白(a)很少进入脾细胞,即使进入也很快被清除。

关键词 刺猬;低密度脂蛋白;脂蛋白(a);去唾液酸低密度脂蛋白;去唾液酸脂蛋白(a)

脂蛋白(a)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)结构组成相似,都有相同的载脂蛋白B100和类似的脂质成分。但存在二个区别:①脂蛋白(a)糖类含量比LDL高数倍,特别是唾液酸含量比LDL高6倍(66:11, mg/g 蛋白)^[1];脂蛋白(a)蛋白质含量高于LDL,除含有70%的载脂蛋白B100外,还含有其他脂蛋白不

①奥地利格拉茨大学生物化学研究所

含有的载脂蛋白(a)。由于与凝血酶原高度同源,因此可能参与凝血过程^[2]。近年来发现动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)血管壁上沉积的主要是氧化型低密度脂蛋白。通过蓖麻凝集素亲和柱层析将 LDL 分为富含唾液酸 LDL 和缺乏唾液酸 LDL,发现缺乏唾液酸的 LDL 易侵入血管内皮细胞,导致细胞内胆固醇聚集^[3]。冠状 As 和糖尿病人 LDL 中唾液酸含量明显低于正常人^[4]。既然唾液酸在致 As 中起着非常重要的作用,因此可以设想脂蛋白(a)中有相当的唾液酸含量,必定对脂蛋白(a)的代谢起着重要的作用。本文用神经氨酸酶去除 LDL 和脂蛋白(a)糖链末端的唾液酸,用¹²⁵I-标记后注入刺猬体内观察各组织代谢的变化。

1 材料与方法

1.1 脂蛋白分离纯化

抗凝血经离心后得到血浆,通过序列超速离心获得 $d=1.019\sim 1.060$ kg/L 部分,即为 LDL。 $d=1.060\sim 1.12$ kg/L 部分,再经凝胶过滤后获得纯化的脂蛋白(a)。经免疫双扩散和免疫印迹试验证实后, -37℃ 保存待用^[5]。

1.2 ¹²⁵I-标记脂蛋白

纯化的 LDL 和脂蛋白(a)与神经氨酸酶孵育后经 Sephadex G25 柱除去解离的唾液酸得到去唾液酸 LDL (desialylated LDL, ds-LDL) 和去唾液酸脂蛋白(a) (desialylated lipoprotein(a), ds-L(a))。LDL、ds-LDL、脂蛋白(a)和 ds-Lp(a)根据 Pittman 等的方法用¹²⁵I-纤维素二糖酐标记^[6]。纤维素二糖酐(40 mmol/L)与 Na¹²⁵I-(1 mci)在室温反应 30 min, 2 mg 脂蛋白与被激活的放射碘纤维素二糖酐混合室温反应 30 min, 标记的脂蛋白过 Sephadex G25 柱, 对抗 NaCl/EDTA 4℃ 透析过夜, 最后经 0.15 mol/L NaCl 透析除去 EDTA, 用 0.45 μm 滤膜过滤去除微生物, 测定其标记的放射性活性为¹²⁵I-LDL 4.1 mci/g 蛋白, 游离碘 9.0%; ¹²⁵I-Lp(a) 3.6 mci/g 蛋白, 游离碘 10%; ¹²⁵I-ds-LDL 6.3 mci/g 蛋白, 游离碘 10%; ¹²⁵I-ds-Lp(a) 6.3 mci/g 蛋白, 游离碘 15%。

1.3 实验操作

健康成年刺猬, 购于江苏启东县, 体重 384.7±38.2 g。乙醚麻醉暴露腋下静脉, LDL 组动物注射 LDL 71 110 Bq/只; ds-LDL 组 73 746 Bq/只; 脂蛋白(a)组 39

578 Bq/只; ds-Lp(a)组 39 569 Bq/只。注射后 3 h 和 6 h 分别处死动物(处死前 1 min 腋下静脉注射肝素, 便于组织灌注), 收取血液, 切取肝、脾、肾和胆囊, 用含肝素的生理盐水灌注, 滤纸吸干称量后用 r-计数仪测定组织器官放射含量, 并计算其占总注射量的百分比。每组实验结果为二只动物平均值。

2 结果

2.1 去唾液酸对低密度脂蛋白代谢的影响

注射 ds-LDL 和 LDL 3 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中总残余量分别是注射量的 61.19% 和 53.50% (Table 1), ds-LDL 组被测组织器官放射总量比 LDL 组高 7.69%。注射 ds-LDL 和 LDL 6 h 后肝、脾、肾、胆汁和血液总残余量分别是注射量的 34.88% 和 47.11% (Table 1), ds-LDL 组被测组织器官放射总量比 LDL 组低 12.23%。说明在最初的 3 h 内, ds-LDL 在组织器官中内的代谢速率低于 LDL 组, 而 6 h 后 ds-LDL 在组织器官中代谢速率明显高于 LDL 组。

注射 LDL 3 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中总残余量是注射总量的 53.50%, 注射 LDL 6 h 后是 47.11%, 仅降低 6.39%。注射 ds-LDL 3h 后肝、脾、肾、胆汁和血中总残余量是注射总量的 61.19%, 而 6 h 后是 34.88%, 降低了 26.31%, 说明 LDL 经去唾液酸后, 它的代谢速率明显加快。

注射 LDL 6 h 脾脏中放射含量为 0.94%, 比 3 h 的 0.70% 高 0.24%; 注射 ds-LDL 6 h 时脾脏中放射含量是 1.07%, 比 3 h 的 0.78% 高 0.29%。同时我们发现注射 ds-LDL 3 h 和 6 h 脾脏中的放射含量均高于同时相的 LDL 组, 分别高 0.08% 和 0.13%。说明 LDL 和 ds-LDL 均能被脾脏中巨噬细胞吞噬后蓄积在细胞内, 而且这种作用 ds-LDL 组大于 LDL 组。

2.2 去唾液酸对脂蛋白(a)代谢的影响

注射 ds-Lp(a)和脂蛋白(a) 3 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中总残余量分别是注射量的 30.41% 和 61.82% (Table 2), ds-Lp(a)组被测组织放射总量比脂蛋白(a)组低 31.41%。注射 ds-Lp(a)和脂蛋白(a) 6 h 后肝、脾、肾、胆汁和血

Table 1. Comparison of the percentage of radioactive isotope 3 h and 6 h after injecting LDL or ds-LDL into hedgehogs.

Organs	LDL		ds-LDL	
	3 h	6 h	3 h	6 h
liver	11.80	7.08	13.54	8.97
spleen	0.70	0.94	0.78	1.07
kidney	1.46	1.32	2.12	1.20
gall	3.85	5.11	3.05	2.96
blood	35.69	32.66	41.70	20.68
total	53.50	47.11	61.19	34.88

①The data in the Table 1 in $O/T \times 100\%$, the O is the radioactivity measured in the organ and T is total radioactivity injected into the body of the hedgehogs. ②Total radioactivity of the LDL is 71 110 Bq a hedgehog, the ds-LDL is 73 746 Bq.

总残余量分别是注射量的 15.94% 和 61.58%, ds-Lp(a) 组被测组织放射总量比脂蛋白(a) 组低 45.64%。说明脂蛋白(a) 经去唾液酸后, 在组织中的降解速度显著增加。

注射脂蛋白(a) 3 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中总残余量是注射总量的 61.82%, 注射 Lp(a) 6 h 后是 61.58%, 仅降低 0.24%。注射 ds-Lp(a) 3 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中总残余量是注射总量的 30.41%, 而注射 ds-Lp(a) 6 h 后是 15.94%, 降低了 14.47%。说明脂蛋白(a) 在 3 h 和 6 h 代谢几乎无变化。而经去唾液酸后, 几乎每 3 h ds-Lp(a) 的含量减少一半。

注射脂蛋白(a) 6 h 脾脏中放射含量为 0.70%, 比 3 h 的 0.49% 高 0.21%; 注射 ds-LP(a) 6 h 时脾脏中放射含量是 0.18%, 比 3 h 的 0.30% 低 0.12%。同时我们发现注射 ds-Lp(a) 3 h 和 6 h 脾脏中的放射含量均低于同时相的脂蛋白(a) 组, 分别低 0.19% 和 0.52%。说明 Lp(a) 能被脾脏中巨噬细胞吞噬后蓄积在细胞内, 而 ds-Lp(a) 则相反, 它很少进入脾脏巨噬细胞内, 即使进入脾脏后也能很快被清除。

3 讨论

脂蛋白(a) 和 LDL 结构组成相似, 都有相

Table 2. Comparison of the percentage of radioactive isotope 3 h and 6 h after injecting Lp(a) or ds-Lp(a) in to hedgehogs.

Organs	Lp(a)		ds-Lp(a)	
	3 h	6 h	3 h	6 h
liver	4.75	4.17	6.42	2.55
spleen	0.49	0.70	0.30	0.18
kidney	3.38	1.81	1.99	1.25
gall	2.46	3.38	4.43	2.11
blood	50.74	51.52	17.27	9.85
total	61.82	61.58	30.41	15.94

①The data in the Table 2 is $O/T \times 100\%$, the O is the radioactivity measured in the organ and T is total radioactivity injected into the body of the hedgehogs. ②Total radioactivity of the lipoprotein (a) is 38 578 Bq a hedgehog, the ds-Lp(a) is 39 569 Bq.

同的载脂蛋白 B100 和相似的脂质成分。但主要差异在于脂蛋白(a) 糖类含量比 LDL 高数倍, 特别是唾液酸含量比 LDL 高 6 倍^[1]。脂蛋白(a) 和 LDL 一样被认为是造成 As 和脑卒中独立的危险因子, 由于脂蛋白(a) 中的载脂蛋白(a) 与凝血酶原同源, 参与凝血过程, 因此它可能具有脂质沉积和血栓形成的双重作用^[7]。通过 LDL 致 As 作用的深入研究发现并不是所有的 LDL 都会导致 As, 血管壁沉积的主要是氧化型脂蛋白。最近一些学者认为除了氧化型 LDL 能导致 As 外, 在冠状 As 和糖尿病病人中发现有大量的低唾液酸 LDL。这种低唾液酸 LDL 能促进 As 形成, 并且导致细胞内胆固醇聚集^[3]。正常人的 LDL 经蓖麻凝集素亲和柱层析可以将 LDL 分为富含唾液酸 LDL 和缺乏唾液酸的 LDL, 在体外细胞培养中缺乏唾液酸的 LDL 或神经氨酸酶处理的 LDL 与病人的 LDL 一样容易导致 As 和造成细胞内胆固醇聚集^[4]。我们设想脂蛋白(a) 结构中的唾液酸与功能之间可能存在着重要的联系, 它们在 As 和脂蛋白(a) 功能之间可能存着重要的联系, 它们在致 As 和脂蛋白(a) 代谢中起重要作用。

我们用神经氨酸酶处理 LDL 和脂蛋白(a), 去掉脂蛋白糖链末端的唾液酸, 用¹²⁵I-纤

维生素二糖酐胺标记后经刺猬腋下静脉注入体内,3 h 和 6 h 后分别处死,测定各组织器官中放射性同位素含量。通常脂蛋白(a)在体内的代谢速度较 LDL 慢,脂蛋白(a)在血中的半衰期约为 45 h,而 LDL 约为 15 h^[5]。实验中发现注射 LDL 6 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中的放射总量比 3 h 低 6.39%,而注射脂蛋白(a)6 h 后肝、脾、肾、胆汁和血中的放射含量比 3 h 仅低 0.24%。

低密度脂蛋白去唾液酸后在最初的 3 h,其代谢速度与 LDL 比较没有增加,反见降低,被测组织器官放射含量比 LDL 组高 7.69%,但 6 h 后代谢速度加快,被测组织器官放射含量比 LDL 组低 12.23%。因此 ds-LDL 在组织中代谢有一个滞后期,除 LDL 受体途径外,通过一段时间促发另一条途径,加速 ds-LDL 的代谢。

与此相反,脂蛋白(a)去唾液酸后,代谢大大加快。注射后 3 h 代谢速度比脂蛋白(a)快 2 倍,而 6 h 快近 4 倍。因此,可以设想脂蛋白(a)中的唾液酸在脂蛋白(a)结构中起稳定作用,其代谢与去唾液酸有关,可能存在 ds-Lp(a)的受体途径,这一途径可能对 ds-LDL 的代谢也有影响。正常情况下人体 LDL 的 15% 经清道夫受体途径代谢,因此,注射 LDL 6 h 脾脏放射含量从 3 h 的 0.7% 增长到 0.94%,同样注射 ds-LDL 6 h 脾脏放射含量从 3 h 的 0.78% 增加到 1.07%,因此脾脏中的巨噬细胞可能通过清道夫受体途径不断将 LDL 和 ds-LDL 摄入细胞内,并且在细胞内蓄积,其作用 ds-LDL 大于 LDL 组。

相反,虽然脂蛋白(a)也经清道夫受体途径从 3 h 的 0.49% 增加到 6 h 0.70%,但去唾液酸脂蛋白(a)经脾摄入明显低于脂蛋白(a),并且 6 h 脾脏放射活性明显低于 3 h,从 0.30% 降到 0.18%,因此可能脾脏巨噬细胞不参与 ds-Lp(a)的代谢。

从实验结果分析可以得出以下结论:脂蛋白(a)中的唾液酸在结构稳定和代谢中起非常

重要作用,脂蛋白(a)的分解代谢可能需要分子内脱唾液酸过程;去唾液酸脂蛋白(a)一般不被机体重新利用,主要经胆囊和肾脏排出;脂蛋白(a)去唾液酸后不增加脾脏摄取,因此巨噬细胞膜表面可能不具有脂蛋白(a)或去唾液酸脂蛋白(a)受体。脂蛋白(a)在人群中呈偏正态分布,在血中浓度仅为 0~2.6 g/L^[6],可能与脂蛋白(a)分子中的唾液酸含量成正比。脂蛋白(a)中的唾液酸含量与 mRNA 转译后的糖基化修饰程度有关。去唾液酸脂蛋白(a)致 As 的作用,以及内皮细胞对胆固醇的聚集作用和去唾液酸脂蛋白(a)与基因多态性的关系尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Fless GM, Zum Mallen ME, Scanu AM. Isolation of apolipoprotein (a) from lipoprotein(a). *J Lipid Res*, 1985, 26: 1 224~229.
- 2 Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM, et al. Human plasma lipoprotein (a), Structural properties. *J Biol Chem*, 1983, 258: 4 582~589.
- 3 Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, et al. Carbohydrate composition of protein and lipid components insialic acid-rich and poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease. *J Lipid Res*, 1993, 34: 365~375.
- 4 Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, et al. Receptor mediated endocytosis. *Cell Biol*, 1985, 1: 1~39.
- 5 沃兴德, Kostner GM, 洪行球, 等. 刺猬体内低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢途径的比较. *中国动脉硬化杂志*, 1996, 4: 35~39.
- 6 Pittman RC, Thomas EC, Christoper K, et al. A radioiodinated intracellularly trapped ligand for determining the side of plasma protein degradation in vivo. *Biochem J*, 1983, 212: 791~800.
- 7 Edelberg MJ, Mario Gonzalez-Gronow, Salvatore V Pizzo. Lipoprotein a inhibits streptokinase-mediated activation of human plasminogen. *Biochemistry*, 1989, 28: 2 370~374.
- 8 Gavish D, Neal Azrolan, Breslow L. Plasma Lp(a) concentration is inversely correlated with the ratio of kringle IV Kaingle V encoding domains in the Apo(a) gene. *J Clin Invest*, 1989, 84: 2 021~27.

(1995-09-18 收到, 1996-05-15 修回)