

## · 研究简报 ·

## 脂蛋白(a)受体的研究

李白桦 刘德文<sup>①</sup> 沃兴德<sup>②</sup>

(山西中医学院生物化学教研室, 太原 030024)

## The Studies on Lipoprotein (a) Receptors

LI Bai-Hua, LIU De-Wen<sup>①</sup> and WO Xing-De<sup>②</sup>

(Department of Biochemistry, Shanxi traditional Chinese Medical College, Taiyuan 030024; ① Department of Biochemistry, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; ② Molecular Medical Institute, Zhejiang traditional Chinese Medical College, Hangzhou 310009; China)

**ABSTRACT** Lipoprotein (a) receptors on monkey liver cellular membranes were found by Western blotting. Since lipoprotein (a) is structural homology to plasminogen, the lipoprotein (a) receptors were further verified by plasminogen antibodies. The experiments were conducted as follows: first, the primary extract of the membrane receptors were made from fresh monkey liver by homogenization, centrifugation and ultrasonic treatment etc. Soon, the extract was separated by electrophoresis and transferred onto nitrocellulose (NC) filters. Then, lipoprotein (a) purified from human plasma bound with high affinity to isolated Chinese rhesus monkey liver cellular membrane lipoprotein receptors on nitrocellulose blots and in a solid-phase assay, and it was further verified by plasminogen antibodies. The results showed that there existed lipoprotein (a) receptors. Thus we conclude that lipoprotein (a) has its own catabolism pathway.

**KEY WORDS** lipoprotein (a) receptor; ligand; lipoprotein (a)-specific antibody; plasminogen; Western blotting

**摘要** 本文用蛋白质免疫印迹方法发现了猴肝细胞

膜上脂蛋白(a)受体,为进一步研究这一导致动脉粥样硬化的脂蛋白的致病机理提供了新的研究内容。具体方法为:取新鲜猴肝匀浆、离心、超声波等处理制得可溶性的膜受体粗提液,经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化后转移至硝酸纤维素膜,用蛋白质免疫印迹方法检测,出现特异的脂蛋白(a)受体条带(统计学处理,~300 kDa)。

**关键词** 脂蛋白(a)受体; 配体(基); 脂蛋白(a)单特异抗体; 血纤维蛋白溶酶原抗体

文献[1,2]报道,脂蛋白(a)浓度>200~300 mg/L 则有增加动脉粥样硬化性疾患的危险,但这一发现的分子基础仍不清楚。由于脂蛋白(a)与血纤维蛋白溶酶原在结构上有高度的同源性,因此,利用它们之间的交叉特性,研究脂蛋白(a)受体是探明脂蛋白(a)分解代谢途径及进一步表其致病机理的一种方法。本实验选用中华猕猴,经 Western blotting 方法发现了猴肝细胞膜上的脂蛋白(a)受体。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 试剂 配体脂蛋白(a)、脂蛋白(a)单特异抗体(是由脂蛋白(a)多克隆抗体经溴化氰激活的 Sepharose 4B 共价结合有低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的亲和柱反复层析8次,经鉴定与载脂蛋白 B100 无交叉反应的抗体)来自浙江中医学院分子医学研究所;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗羊免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)为 Sigma Co 产品;血纤维蛋白溶酶原抗体由奥地利 Graz 大学惠赠。

1.1.2 缓冲液 A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); B: 250 mmol/L Tris-Maleate (pH 6.0); C: 含 2% Triton X-100; blotting buffer: 50 mmol/L Tris-

①山西医科大学生物化学教研室,太原

②浙江中医学院分子医学研究所,杭州

HCl(pH 8.0); 显色液:含 0.18% 4-Cl-1-naphthol。

## 1.2 方法

### 1.2.1 猴肝细胞膜脂蛋白受体的分离纯化

按下述步骤进行。①处死动物,15 min 内无菌取出猴肝,置冰冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液。②称肝重 162 g,加 800 ml 缓冲液 A,置组织匀浆器内 14 800 r/min 匀浆,1.5 min 二次。再用 1 800 r/min 离心 5 min。③弃去细胞碎片,取上清液用二层纱布过滤后再用 1 800 r/min 离心 5 min。④弃去细胞碎片,取上清液用 37 000 r/min 离心 60 min。⑤弃去上清液,取沉淀物的 1/4(相当于 40 g 肝重)加 40 ml 缓冲液 B,置组织匀浆器内 1 800 r/min 匀浆,悬浮 1.5 min;超声波处理机设置最大振幅处理 2 min×2;将肝匀浆用缓冲液 C 加至 80 ml,4℃搅拌 20 min,37 000 r/min 离心 60 min。⑥去掉不溶的膜蛋白,得可溶的膜蛋白提取液约 50 ml,分装后置-20℃保存备用。⑦用 4.5%~20% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进一步纯化后,转移至硝酸纤维膜上,进行下一步试验。

### 1.2.2 Western blotting(蛋白质免疫印迹反应)

将转移有膜受体的硝酸纤维膜裁成宽约 1 cm 条膜,分别进行反应。第一条用含 5% BSA 的 blotting buffer 孵育 2 h,加入 100 mg/L 的配体人血浆脂蛋白(a)孵育 1.5 h;漂洗后,与 1:100 稀释的羊抗人脂蛋白(a)单特异抗体反应 1.5 h;漂洗后,再与 1:1 000 稀释的兔抗羊 IgG-HRP 反应 1.5 h;漂洗后,膜上的抗原抗体复合物用 4-Cl-1-naphthol 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下显色。第二条用上述同样方法封闭后,与 1:100 稀释的配体人血浆脂蛋白(a)孵育 1.5 h;经上述同样方法洗涤后,与 1:500 稀释的兔抗人血浆脂蛋白(a)血清反应 1.5 h;孵育后经洗涤,与 1:100 稀释的兔抗羊 IgG-HRP 反应 1.5 h;漂洗后与显色液反应。

## 2 结果

猴肝经匀浆、离心及超声波处理后得到细胞膜颗粒,用 Triton X-100 使受体蛋白从细胞膜上溶解下来,经梯度胶电泳纯化后,将受体蛋白转移到硝酸纤维膜上。Western blotting 检测结果(Figure 1)为:1 号为蛋白质标准分子量;2 号为受体与脂蛋白(a)及其抗体反应结果,为一条特异性条带(~300 kDa),该图说明有脂蛋白(a)受体的存在。

将受体膜片与配体脂蛋白(a)反应后,接着

与 pIg 抗体反应,出现二条特异性条带(~300 kDa 和 ~110 kDa),其中一条带与 Figure 1 中 2 号脂蛋白(a)受体条带相同,该图进一步验证了脂蛋白(a)受体的存在(Figure 2)。

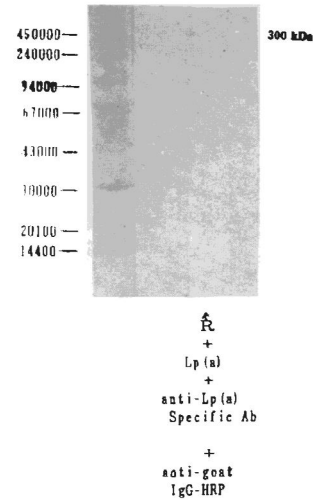


Figure 1. Measurement of lipoprotein (a) receptor by Western blotting.

## 3 讨论

本实验改变了以往诸多学者将 LDL 受体先进行纯化、再观察其与配体脂蛋白(a)反应情况的方法,而是将猴肝细胞膜的受体蛋白只进行粗分离,达到电泳纯即进行受体检测,目的是探索除 LDL 受体以外是否还有与脂蛋白(a)有关的受体。实验结果发现:当肝细胞膜受体膜片与配体脂蛋白(a)及脂蛋白(a)单特异抗体发生结合反应时,出现一条特异性的免疫反应条带(统计学处理~300 kDa),根据免疫反应的特异性,此条带应为脂蛋白(a)受体。有关文献报

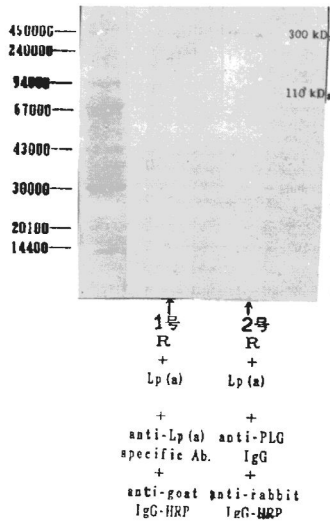


Figure 2. Verification of lipoprotein(a) receptor by Western blotting.

道<sup>[3,4]</sup>,载脂蛋白(a)不仅在蛋白质水平,而且其cDNA克隆在结构上显示了与pLG有高度的同源性;载脂蛋白(a)不仅具有与pLG相同的kringle 5单拷贝和蛋白酶区域;同时,载脂蛋白(a)也有pLG所具有的kringle 4区域,拷贝数目变化在17~34。由此推论,pLG抗体对pLG和脂蛋白(a)均有特异性;脂蛋白(a)也具有既可与自身受体结合,也可与pLG受体结合的特性<sup>[5]</sup>,推测~110 kDa条带为pLG受体;该结果从另外的角度证实了新发现的脂蛋白(a)受体条带。

本实验初步得出脂蛋白(a)有其自身代谢途径(受体)的结论,对此途径进行研究,将对动脉粥样硬化的形成有更深刻的认识。因为脂蛋白(a)与纤溶作用的相互关系<sup>[6~8]</sup>及它与pLG竞争结合到特异的内皮细胞受体上<sup>[5]</sup>或许可以解释动脉粥样硬化的形成。

#### 参考文献

- 1 Murai A, Miyahara T, Fujimoto N. Lp(a) as a risk factor for coronary heart disease and cerebral infarction. *Atherosclerosis*, 1985, 59: 199~204.
- 2 Hoeffler G, Harmoncourt F, Paschke E. Lipoprotein (a), a risk factor for myocardial infarction. *Arteriosclerosis*, 1988, 8: 398~401.
- 3 Mclean JW, Tomlison JE, Kuang WJ. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987, 300: 132~137.
- 4 Kratani H, Armstrong W, Niehaus M. Structural relationship of an apo(a) phenotype (570 kDa) to plasminogen; homologous kringle domains are linked by carbohydrate-rich regions. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1987, 368: 1533~1544.
- 5 Kostner GM, Grillhofer HK. Lipoprotein (a) mediates high affinity low density lipoprotein association to receptor negative fibroblasts. *J Biol Chem*, 1991, 266: 21287~21292.
- 6 Karadi I, Kostner GM, Gries A. Lipoprotein (a) and plasminogen are immunochemically related. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 960: 91~97.
- 7 Hajjar KA, Gaviak D, Breslow JL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature*, 1989, 339: 303~305.
- 8 Edelberg JM, Gonzales-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein (a) inhibits streptokinase-mediated activation of human plasminogen. *Biochemistry*, 1989, 28: 370~374.
- 9 Miles LA, Fleiss GM, Levin EG. Potential basis for the thrombotic risk associated with lipoprotein(a). *Nature*, 1989, 339: 301~303.

(1996-10-14收到)