

• 论著 •

## 醛类修饰低密度脂蛋白抗原结构及其生物学意义的研究

陈琪 王南 陈秀英

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

## Antigenic Structure and Biological Significance of Aldehydes-Modified Low Density Lipoprotein

CHEN Qi, WANG Nan and CHEN Xiu-Ying  
(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University,  
Nanjing 210029, China)

## ABSTRACT

**Aim** Characterization of the structural and functional changes in low density lipoprotein (LDL) after modification with both malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE).**Methods** LDL was modified with both 40 mmol/L MDA and 6 mmol/L HNE. A rabbit antibody against this double modified LDL was produced by use of continuous LDL-coupled affinity chromatography. The antigenic structure properties of MDA-HNE-LDL (MH-LDL) was investigated with a competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The degradation of  $^{125}\text{I}$ -MH-LDL by THP-1 cells and mouse peritoneal macrophages were measured separately to evaluate the biological significance of LDL modified with double aldehydes.**Results** The purified antibody against MH-LDL did not react with native LDL and acetyl LDL. However, MDA-LDL, HNE-LDL, and oxidised LDL showed a certain degree of competitive inhibitory effects to the binding of the antibody with MDA-HNE-LDL (70%, 33% and 21%, respectively). The degradation of  $^{125}\text{I}$ -MH-LDL by THP-1 cells ( $243 \pm 53 \mu\text{g/g}$  cell protein) was similar to that of  $^{125}\text{I}$ -oxidised LDL ( $233 \pm 35 \mu\text{g/g}$  cell protein) but lower than  $^{125}\text{I}$ -LDL ( $441$  $\pm 16 \mu\text{g/g}$  cell protein). Both MH-LDL and acetyl LDL could competitively inhibit  $^{125}\text{I}$ -MH-LDL degradation by THP-1 cells where as native LDL did not. In mouse peritoneal macrophages  $^{125}\text{I}$ -MH-LDL was degraded as much as 10 times of  $^{125}\text{I}$ -LDL. When incubated with various amounts of antibody against MH-LDL,  $^{125}\text{I}$ -MH-LDL degradation by macrophages differed from 18% to 223% of that in the absence of the antibody.**Conclusion** Antigenicity of MH-LDL might primarily depended on the modification of MDA. The uptake of MH-LDL by cells would be mediated via scavenger receptor pathway.**KEY WORDS** Low density lipoprotein; Malondialdehyde; 4-hydroxynonenal; THP-1 cells; Mouse peritoneal macrophages; Antibody**摘要** 为研究丙二醛和 4-羟基壬烯醛同时修饰低密度脂蛋白后引起其结构和功能的变化,先用这两种醛类同时修饰低密度脂蛋白,再用琼脂糖凝胶电泳测定了其相对迁移率,然后制成特异性抗体,用放射性标记法测定了这种抗体对细胞降解醛类修饰低密度脂蛋白的影响。结果发现这种修饰脂蛋白的抗原性主要取决于丙二醛的修饰(约 70%),与氧化型低密度脂蛋白有一定程度的类同(约 21%),但不同于乙酰化低密度脂蛋白。THP-1 细胞降解  $^{125}\text{I}$ -醛类修饰低密度脂蛋白的能力与  $^{125}\text{I}$ -氧化型低密度脂蛋白相似,分别为  $243 \pm 53 \mu\text{g/g}$  细胞蛋白和  $233 \pm 35 \mu\text{g/g}$  细胞蛋白,但不如  $^{125}\text{I}$ -未修饰低密度脂蛋白( $441 \pm 16 \mu\text{g/g}$  细胞蛋白);乙酰化低密度脂蛋白能竞争性抑制  $^{125}\text{I}$ -醛类修饰低密度脂蛋白的降解,而低密度脂蛋白则不能。在小鼠腹腔巨噬细胞,对  $^{125}\text{I}$ -醛类修饰低密度脂蛋白的降解值约为  $^{125}\text{I}$ -低密度脂蛋白的 10 倍,当加入不同浓度针对醛类修饰低密度脂蛋白的抗体后,发现细胞的降解值为原来的 18%~223%,提示这种双醛修饰低密度脂蛋白可能主

要通过细胞膜清道夫受体途径为细胞所摄取。

**关键词** 低密度脂蛋白; 丙二醛; 4-羟基壬烯醛; THP-1 细胞; 小鼠腹腔巨噬细胞; 抗体

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化修饰在动脉粥样硬化发病学中的作用正愈来愈受到重视。当 LDL 中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应时,有许多醛类物质产生,其中最引人注目的为丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, HNE)<sup>[1]</sup>。在体外分别用丙二醛或 HNE 修饰 LDL,均可改变 LDL 的物理化学特性和生物学活性,因而醛类修饰 LDL 被广泛应用于修饰脂蛋白致动脉粥样硬化机理的研究。由于丙二醛和 HNE 分别为水溶性和脂溶性,属于两种性质不同的醛类,又同时存在于 LDL 的氧化反应中<sup>[1,2]</sup>,为进一步研究醛类的修饰对 LDL 结构和功能的影响,我们在体外联合应用丙二醛和 HNE 修饰 LDL(LDL modified with both malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, MH-LDL),并对其免疫化学特性和生物学意义进行了探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 低密度脂蛋白的分离及修饰

人空腹血清经密度梯度序列超速离心分离出 LDL,透析后滤菌,存放于 4℃ 冰箱,蛋白质浓度用 Lowry 法测定。丙二醛由酸解四甲氧丙烷制得:0.165 mL 1,1,3,3-四甲氧丙烷(Sigma,美国)与 0.2 mL HCl 室温反应 1 min 后,用 NaOH 将反应液的 pH 调至 7.0 备用。丙二醛含量用硫代巴比妥酸法测定。HNE-二乙基乙缩醛系奥地利格拉茨大学 Esterbauer 和 Jurgens 教授馈赠,在 pH 3.0 条件下皂化 1 h 后,于 200~300 nm 波长段连续检测皂化物,结果在 223 nm 处可见一吸收峰,即为 HNE。HNE 浓度(mol/L) = 光密度<sub>223 nm</sub> ÷ 13 750。

将 40 mmol/L 丙二醛与 2 g/L LDL 在 37℃ 作用 5 h,经含有 1 g/L 乙二胺四乙酸(ethylenediamine-tetraacetate, EDTA)和 50 mg/L 庆大霉素的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4) 4℃ 透析过夜,次日再用终浓度为 6 mmol/L HNE 修饰丙二醛修饰型 LDL(malondialdehyde-modi-

fied LDL, MDA-LDL),方法同丙二醛的修饰,透析后即得 MH-LDL<sup>[3]</sup>。LDL 的氧化反应由加入 Cu<sup>2+</sup> 诱导。1 g/L LDL 经 10 mmol/L PBS 透析后,加入终浓度为 50 μmol/L CuCl<sub>2</sub>, 37℃ 孵育 24 h 后,加入终浓度为 1 g/L 的 EDTA 4℃ 终止反应<sup>[4]</sup>。LDL 的乙酰化修饰按 Basu<sup>[5]</sup>的方法进行。脂蛋白在 0.5% 琼脂糖凝胶中电泳 1 h,测定电泳迁移率<sup>[4]</sup>。

### 1.2 双醛修饰低密度脂蛋白的抗体制备

0.5 mL MH-LDL 与 0.5 mL 福氏完全佐剂混匀后,于家兔皮下多点注射,以后每间隔两周用同样方法再加强免疫,兔抗血清滴度用双向扩散试验和酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测。抗体纯化用亲和层析法:溴化氢活化的 Sepharose-4B(Pharmacia,瑞典)的处理及蛋白质偶联参照产品说明书标准方法进行,但在工作液中加入 0.1 g/L EDTA。1 g 凝胶与 10 mg LDL 偶联后,取 0.3 mL LDL-凝胶与 1 mL 抗血清 4℃ 作用过夜,纯化效果由竞争性 ELISA 法鉴定。

### 1.3 酶联免疫吸附检测

1 mg/L MH-LDL 溶于 50 mmol/L 碳酸盐缓冲溶液中(pH 9.6),加入 40 孔微孔板(浙江黄岩拱东化学塑料实验厂),200 μL/孔,4℃ 过夜,次日用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗涤 3 遍,每孔再加 250 μL 封闭液 37℃ 孵育 1 h。封闭液为 50 mmol/L PBS 含 0.5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和 6% 山梨醇。100 μL 抗血清和 100 μL 竞争物或 PBS 加至微孔中,37℃ 孵育 2 h。稀释液为含 1 g/L BSA 的洗涤液,结合的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)含量检测采用辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG-邻苯二胺-硫酸检测系统,在酶联检测仪(华东电子管厂)上读取每孔溶液的光密度值<sup>[6]</sup>。

### 1.4 细胞培养及脂蛋白受体活性测定

THP-1 细胞株悬浮培养于含 10% 小牛血清和 2 × 10<sup>-5</sup> mol/L 巯基乙醇的 RPMI-1640 培养液(Gibco,美国)中,临用前以佛波酯(Sigma,美国)诱导 96 h,使之贴壁生长。小鼠腹腔巨噬细胞则培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中。无还原剂 Na<sup>125</sup>I 购自中国原子能科学研究院(北京),脂蛋白的放射性碘标记按 McFarlane 法进行,<sup>125</sup>I-LDL 的放射比活性 > 1 × 10<sup>11</sup> 每分钟计数(counts per minute, cpm)克(cpm/g)蛋白质。细胞膜受体功能活性测定参照 Goldstein 等<sup>[7]</sup>的方法:放射性配体与细胞孵育 4 h 后,测定培养液中不被三氯醋酸所沉淀的上清部分放射性,以此作为细胞降解值。

## 2 结果

### 2.1 双醛修饰与其它化学修饰低密度脂蛋白抗原结构的比较

低密度脂蛋白(LDL)经 40 mmol/L 丙二醛和 6 mmol/L HNE 共同修饰后,其相对电泳迁移率(relative electrophoretic mobility, REM)为 3.0,与相同浓度丙二醛修饰后 LDL 的 REM 相似,而 3 mmol/L HNE 修饰后 LDL 的 REM 为 1.2,乙酰化 LDL(acetyl-LDL, ac-LDL)的 REM 为 2.0,氧化型 LDL 的 REM 为 3.2,天然未修饰 LDL 的 REM 则为 1。用 MH-LDL 免疫家兔后,所得的抗血清不仅能识别 MH-LDL,还与天然 LDL 有一定程度的交叉反应性(约 20%)。当这种抗体经 LDL 偶联的 Sepharose-4B 亲和层析柱连续两次纯化后,便不再与天然 LDL 有交叉反应(图 1, Figure 1),因此,本研究的后续实验均用纯化的抗体,分别用 MH-LDL、MDA-LDL、HNE-LDL、氧化型 LDL 或 ac-LDL 作为竞争物。如图 2(Figure 2)所示,发现 MH-LDL 的竞争性抑制作用最强,最大抑制率为 74%,其次为 MDA-LDL (70%),HNE-LDL 约为 33%,氧化型 LDL 为 21%,ac-LDL 则几乎不产生竞争性抑制作用(10%)。

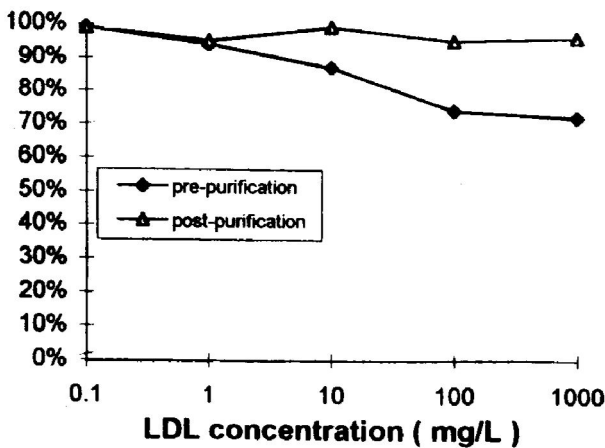


Figure 1. Effects of the antibody against MH-LDL after affinity chromatography on its interaction with native LDL. Working concentration of the antibody, pre-purification: 1:600; post-purification: 1:300.

### 2.2 双醛修饰低密度脂蛋白与 THP-1 细胞的反应性

将<sup>125</sup>I-MH-LDL 与 THP-1 细胞共同孵育 4 h,细胞对脂蛋白的降解值为 243±53 μg/g 细胞蛋白,与<sup>125</sup>I-氧化型 LDL 相仿(233±35 μg/g),但不及<sup>125</sup>I-LDL(441±16 μg/g)。未标记 MH-LDL 和 ac-LDL 分别对 THP-1 细胞降解<sup>125</sup>I-MH-LDL 有明显的竞争性抑制作用,但 LDL 的作用则不明显(表 1, Table 1)。

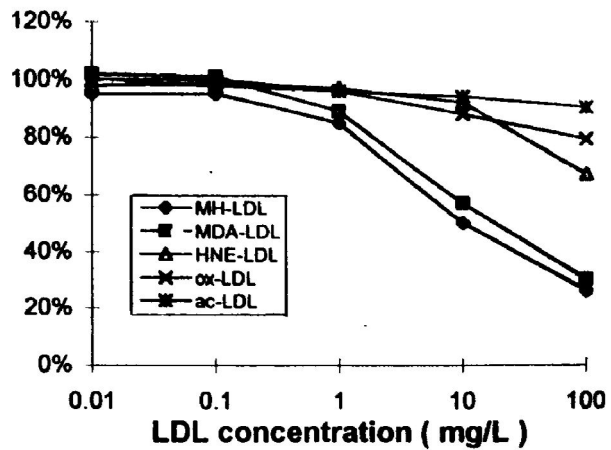


Figure 2. Effects of various competitors on the binding of antibody against MH-LDL with MH-LDL.

Table 1. Degradation of <sup>125</sup>I-labelled lipoproteins by THP-1 cells ( $\bar{x} \pm s$ ).

Lipoprotein (10 mg/L)	Competitors (300 mg/L)	n	Degradation (μg/g)
LDL	-	4	441±16
Ox-LDL	-	4	233±36 <sup>a</sup>
MH-LDL	-	4	243±53 <sup>a</sup>
MH-LDL	LDL	4	202±26 <sup>a</sup>
MH-LDL	ac-LDL	4	124±18 <sup>b</sup>
MH-LDL	MH-LDL	4	104±21 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ , compared with LDL group.

### 2.3 双醛修饰低密度脂蛋白与小鼠腹腔巨噬细胞的反应性

小鼠腹腔巨噬细胞降解<sup>125</sup>I-MH-LDL 的能力明显高于<sup>125</sup>I-LDL,后者约为前者的 1/10。<sup>125</sup>I-MH-LDL 的降解值也高于氧化型 LDL,约高

出 1/4, 结果见表 2(Table 2)。

Table 2. Degradation of <sup>125</sup>I-labelled lipoproteins by mouse peritoneal macrophages ( $\bar{x} \pm s$ ).

Lipoprotein (5 mg/L)	n	Degradation ( $\mu\text{g/g}$ )
MH-LDL	4	2 506 ± 33 <sup>b</sup>
LDL	4	235 ± 232
Ox-LDL	4	1 966 ± 262 <sup>b</sup>

b:  $P < 0.01$ , compared with LDL group.

### 2.4 特异性抗体对细胞降解双醛修饰低密度脂蛋白的影响

观察不同浓度 MH-LDL 抗体对小鼠腹腔巨噬细胞的作用, 如图 3(Figure 3)所示, 当抗体的终浓度为 1 : 10 稀释时, 细胞降解值为无抗体存在时的 223%; 当抗体浓度为 1 : 50 时, 降解值为正常的 39%; 而抗体稀释至 1 : 250 时, 细胞的降解值仅为正常的 18%。

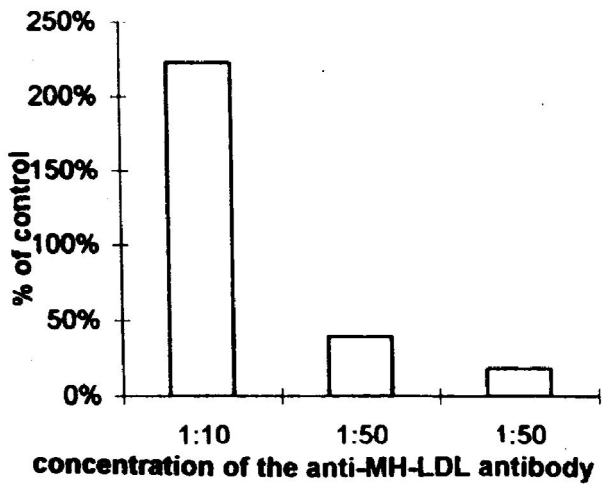


Figure 3. Influence of the presence of anti-MH-LDL antibody on the degradation of <sup>125</sup>I-MH-LDL by mouse peritoneal macrophages.

### 3 讨论

许多研究结果表明, MDA-LDL 和 HNE-LDL 可被细胞膜上的清道夫受体识别, 引起脂质在细胞中的过度积蓄。在动脉粥样硬化病灶中, 已检出 MDA-LDL 和 HNE-LDL。血浆

MDA-LDL 的自身抗体和 HNE-LDL 含量增高与颈动脉粥样硬化和冠心病的发生关系密切<sup>[6,8,9]</sup>。然而有关两种醛类同时修饰 LDL 的研究尚不多见, 仅 Hoff 等<sup>[10]</sup>报道, 丙二醛修饰后的 LDL 能被更高浓度的 HNE 修饰而不发生聚积反应。我们的结果也表明, 高达 6 mmol/L HNE 修饰 MDA-LDL 后, 未见单独用 HNE 修饰时常见的聚积反应。不仅如此, 本研究更进一步制成 MH-LDL 的特异性抗体, 并用这种抗体进行竞争性 ELISA 分析, 结果发现 MH-LDL 的抗原性可能主要取决于丙二醛抗原决定簇, 因为 MDA-LDL 的最大竞争性抑制率是 HNE-LDL 的 2 倍(分别为 70% 和 33%), 几乎与 MH-LDL 自身的抑制率(74%)相似, 这可能与丙二醛修饰浓度较高(40 mmol/L)以及双醛的反应性更强等因素有关。MH-LDL 与氧化型 LDL 的抗原结构有一定程度的相似性, 但与 ac-LDL 却很少相似, 后者的最大竞争性抑制率仅为 10%。

<sup>125</sup>I-MH-LDL 在体外培养的 THP-1 细胞株上的降解值与 <sup>125</sup>I-氧化型 LDL 相似, 约为 <sup>125</sup>I-LDL 降解值的 55%。由于 THP-1 细胞膜上同时表达 LDL 受体和清道夫受体<sup>[11]</sup>, 为确定 MH-LDL 主要以何种受体途径进入细胞, 本研究分别用过量的清道夫受体的配体(ac-LDL 或氧化型 LDL)以及 LDL 受体的配体 LDL 作为竞争物, 观察其对细胞降解 MH-LDL 的影响, 结果发现 ac-LDL 和氧化型 LDL 均能明显抑制细胞降解 <sup>125</sup>I-MH-LDL, 但 LDL 却不产生类似作用, 提示 MH-LDL 可能主要通过清道夫受体途径为 THP-1 细胞所摄取。这一结果与 J774 细胞株的实验结果相一致<sup>[10]</sup>。进一步用主要表达清道夫受体而很少表达 LDL 受体的小鼠腹腔巨噬细胞进行试验, 发现等量 <sup>125</sup>I-MH-LDL 和 <sup>125</sup>I-LDL 的降解值之比约为 10 : 1。从而证实 MH-LDL 主要为清道夫受体所识别。然而小鼠腹腔巨噬细胞对 MH-LDL 和氧化型 LDL 的摄取及其后续性处理机制可能并不完全相同, 因为 MH-LDL 的降解值高出氧化型 LDL 约 1/4。最近文献<sup>[12]</sup>报道在小鼠腹腔巨噬细胞上发

现有别于 A 类清道夫受体的氧化型 LDL 细胞膜结合蛋白,这种膜结合蛋白与 MH-LDL 的反应性尚不清楚,细胞膜上是否还存在其它能识别 MH-LDL 的受体也值得进一步研究。

血浆中针对醛类修饰 LDL 和氧化型 LDL 自身抗体的作用正愈来愈受到广泛重视<sup>[9]</sup>,我们则对 MH-LDL 与其特异性抗体在体外作用后对细胞降解的影响进行了研究。结果表明不同比例的抗原抗体产生的后果差别很大,高浓度的抗体使小鼠腹腔巨噬细胞降解值增加 123%。这可能是由于大量的抗体与 MH-LDL 结合后形成抗原抗体复合物,后者可被细胞膜上的 Fc 受体结合<sup>[13]</sup>,从而促进了 MH-LDL 的摄取。随着抗体浓度的减小,细胞降解值也随之减小,最低时(1:250)细胞降解值仅为无抗体时的 18%,这可能系少量抗体的结合不足以被 Fc 受体所识别,但这种结合却封闭了 MH-LDL 上清道夫受体的识别位点,因而表现为细胞的摄取明显减少。

#### 参考文献

- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal and malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med*, 1991, 11: 81~128.
- Jurgens G, Hoff HF, Chisolm GM, et al. Modification of human low density lipoproteins by oxidation; characterization and pathophysiological implications. *Chem Phys Lipids*, 1987, 45: 315~336.
- Chen Q, Esterbauer H, Jurgens G. Studies on epitopes on low density lipoprotein modified by 4-hydroxynonenal: Biochemical characterization and determination. *Biochem J*, 1992, 288: 249~254.
- 陈琪,蔡海江,范乐明,等. 人血浆低密度脂蛋白亚组分氧化反应敏感性的比较. *生物化学与生物物理学报*, 1994, 26(3): 271~276.
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, et al. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 3 178~182.
- 陈琪,蔡海江,陈秀英,等. 血浆载脂蛋白 B 上的 4-羟基壬烯醛抗原决定簇表达与冠心病的关系. *中华医学杂志*, 1995, 78: 581~583.
- 陈琪,蔡海江,倪斌,等. 载脂蛋白 B-100 上低密度脂蛋白受体结合部位的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21: 145~151.
- Jurgens G, Chen Q, Esterbauer H, et al. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apoprotein B and apoprotein (a). *Arterioscler Thromb*, 1993, 13: 1 689~699.
- Salonen JT, Yla-Herttuala, Yamamoto R, et al. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1992, 339: 883~887.
- Hoff HF, O'Neil J. Structural and functional changes in LDL after modification with both 4-hydroxynonenal and malondialdehyde. *J Lipid Res*, 1993, 34: 1 209~217.
- Via DP, Pons L, Dennison DK, et al. Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1. *J Lipid Res*, 1989, 30: 1 515~524.
- Ottend E, Parthasarathy S, Sambrano GR, et al. A macrophage receptor for oxidized low density lipoprotein distinct from the receptor for acetyl low density lipoprotein: Partial purification and role in recognition of oxidatively damaged cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 1 391~395.
- Morganelli PM, Rogers RA, Kitzmiller TJ, et al. Enhanced metabolism of LDL aggregates mediated by specific human monocyte IgG Fc receptors. *J Lipid Res*, 1995, 36: 714~724.

(1997-06-03 收到, 1997-08-16 修回)