

高密度脂蛋白对其动脉粥样硬化家兔肝细胞膜受体活性的影响

纪 延 傅明德 吴新伟 蓝德宾 刘秉文 周建均^①

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610041)

主题词 动脉粥样硬化; 家兔; 脂蛋白, 高密度; 受体; 肝; 细胞膜; 活性; 脂质

摘 要 为了研究高密度脂蛋白对抗动脉粥样硬化的作用机理, 采用酶联免疫受体分析法对注射高密度脂蛋白的动脉粥样硬化家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体活性进行了检测。结果表明, 人血浆高密度脂蛋白虽不能降低高脂饲养的家兔血脂含量, 但可显著降低其肝脏脂质水平和显著升高胆囊胆汁脂质水平。受体分析发现, 高脂对照组动物肝细胞膜高密度脂蛋白受体 Kd 值显著降低, 而高密度脂蛋白试验组动物 Kd 值未见明显变化, 但 Bmax 却显著降低。提示长期高脂饲养有使动脉粥样硬化模型动物肝细胞膜高密度脂蛋白受体 Kd 值显著降低的作用。

Effects of Human Plasma HDL on HDL Receptors of As Rabbit Liver Cell Membranes

Ji Yan, Fu Ming-De, Wu Xin-Wei, Lan De-Bin, Liu Bing-Wen and Zhou Jian-Jun

(Apolipoprotein Research Laboratory, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

MeSH Atherosclerosis; Rabbits; Lipoprotein, HDL; Receptors; Liver; Cell Membrane; Activity; Lipids

ABSTRACT **Aim** In an effect to study further the anti-atherogenic effects of human plasma HDL, the HDL receptor activity on liver plasma membranes of cholesterol-fed As rabbits injected with HDL was investigated. **Methods** HDL receptor activity was detected by the method of enzyme-linked immunosorbent receptor assay (ELISA) and the levels of serum, liver and bile lipids of As rabbits were also determined. **Results** The results of lipid measurement showed that human plasma HDL could not decrease the level of serum lipids of cholesterol-fed rabbits, but decreased significantly the levels of live lipids and increased significantly the levels of bile lipids of As rabbits compared with As rabbits injected with saline. The results of HDL receptor assay showed that the value of Kd was significantly lower in As rabbits than that in normal rabbits ($P < 0.01$). In HDL treated rabbits, no difference was observed with Kd ($P > 0.05$) while Bmax reduced significantly ($P < 0.05$) compared with normal rabbits. **Conclusion** These results suggested that Kd of rabbit liver plasma membrane HDL receptor reduced significantly when the rabbits were fed with cholesterol-rich diet for a long period (22 weeks), whereas HDL seemed to ameliorate or avoid this change.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是因动脉壁脂质沉积、纤维及结缔组织增生而造成动脉管壁增厚变硬, 形成粥样样病灶的常见多发性疾病。七十年代以来, 大量流行病学和动物实验研究表明, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 有抗 As 作用^[1, 2]。研究发现肝细胞、成纤维细胞、动脉平滑肌细胞、巨噬细胞和主动脉内皮细胞等的细胞表面存在 HDL 受体, 其主要功能是参与体内过量胆固醇的逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT)^[3]。本实验检测注射人血浆 HDL 的 As 家兔肝细胞膜 HDL 受体活性, 为 HDL 抗 As 作用提供实验依据。

1 材料与方法

本文为国家新药研究基金 96-901-05-78) 资助项目

① 成都蜀阳制药厂

1.1 人血浆高密度脂蛋白制剂的制备

采用改进的冷乙醇法^[4]制备。脂蛋白预染电泳表明制品 HDL 含量 $> 96\%$, 免疫双扩散试验证实制品不与抗载脂蛋白 B100 血清产生沉淀线, 制品载脂蛋白 AI 含量为 7.0 g/L 。

1.2 模型的建立及分组

选择健康雄性日本大耳白兔 20 只, 体重 $2.0 \sim 2.5 \text{ kg}$, 普通颗粒饲料饲养, 观察一周后, 每只动物加饲 0.2 g/d 胆固醇, 持续 2 周, 并测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量, 然后筛选出对胆固醇中度敏感的家兔 10 只, 改用含 0.5 g 胆固醇及每日 5% 猪油/只的高脂膳食饲养。As 造型 12 周后, 按 TC 含量分层随机分为两组: 高脂对照组 (简称对照组, C) 及 HDL 治疗组 (简称治疗组, H), 并于第 13 周开始由耳缘静脉分别缓慢推注生理盐水或含 50 mg 载脂蛋白 AI 的 HDL 制剂, 每周 1 次, 共计 10 周。剖杀动

物前 14~16 h 禁食,剖杀时由腹主动脉插管采血、摘取肝脏、并收集胆囊胆汁。另选择体重 2.0~2.5 kg 健康雄性日本大耳白兔 20 只,作为正常组 (N),同法采集血清、肝脏标本及胆囊胆汁。

1.3 血清、肝脏及胆囊胆汁中脂质测定

总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和 HDL 胆固醇 (HDL cholesterol, HDLC) 均采用北京中生物工程技术公司酶法试剂盒测定,磷脂采用本室常规化学法测定。测定肝脏脂质时,先将动物肝脏洗净血迹,剪成小块,置 110℃ 烘干至恒重,精确称取干燥后的肝脏,磨成细粉,用氯仿:甲醇 2:1, v/v) 抽提所含脂质,过滤定容后再按上述方法测定。

1.4 肝细胞膜高密度脂蛋白受体活性测定

按照酶受体分析原理^[5,6]建立肝细胞膜 HDL 受体酶联免疫测定法。测定时,膜蛋白与抗载脂蛋白 AI IgG 包被浓度为 25 mg/L, HRP-羊抗人载脂蛋白 AI IgG 交联物稀释度为 1:250, HDL 结合量的标准曲线范围为 0~200 ng。

1.5 统计分析

采用 SPSS 软件包进行 *t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 血清脂质的含量

由表 1 (Table 1) 可见,对照组家兔血清 TC、TG 和磷脂水平与正常组相比显著升高 ($P < 0.01$),治疗组与高脂对照组无明显差异 ($P > 0.05$),对照组 HDLC 含量有所下降,为正常组的 83.5%,而治疗组 HDLC 水平较对照组有所升高,均无统计学意义。

表 1. 血清脂质的含量

Table 1. Levels of TC, TG, PL, and HDLC in As rabbit serum ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, mmol/L)

Groups	TC	TG	PL	HDLC
N	1.19 ± 0.23	0.51 ± 0.07	0.83 ± 0.22	0.60 ± 0.19
C	28.36 ± 1.6 ^a	2.86 ± 0.2 ^a	6.99 ± 0.5 ^a	0.50 ± 0.0
H	27.14 ± 1.9 ^a	2.96 ± 0.2 ^a	6.81 ± 0.1 ^a	0.55 ± 0.1

N: normal group, C: HDL control group, H: HDL treated group. a: $P < 0.01$, compared with normal group

2.2 肝脏脂质的含量

由表 2 (Table 2) 可见,对照组肝脏 TC、TG 及磷脂含量显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。治疗组动物肝脏 TC 和磷脂含量较高脂对照组明显降低 ($P < 0.05$),分别为对照组的 84.6% 和 73.1%,TG 含量也有降低,为对照组的 92.7%。

表 2. 肝脏脂质的含量

Table 2. Contents of TC, TG and PL in As rabbit liver ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, mg/g of dried liver)

Groups	TC	TG	PL
N	17.1 ± 1.8	16.8 ± 4.0	22.1 ± 2.3
C	211.5 ± 23.6 ^a	82.3 ± 4.3 ^a	32.4 ± 6.3 ^b
H	178.9 ± 20.3 ^{ac}	76.3 ± 6.2 ^a	23.7 ± 4.7 ^c

N: normal group, C: HDL control group, H: HDL treated group. a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with normal group, c: $P < 0.05$, compared with HDL control group

2.3 胆汁脂质的含量

由表 3 (Table 3) 可见,三组动物的胆囊胆汁 TC 和磷脂含量依次增高 ($P < 0.01$),治疗组动物胆汁 TC 及磷脂含量较正常组增加 179.6% 及 506.9%,较对照组增加 48.3% 及 49.7%。

表 3. 胆汁脂质含量

Table 3. Contents of TC, TG and PL in As rabbit bile ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, mmol/L)

Groups	TC	PL
N	2.51 ± 0.40	1.98 ± 0.14
C	4.73 ± 0.32 ^a	8.02 ± 0.17 ^b
H	7.01 ± 1.11 ^{ac}	12.00 ± 1.54 ^{ac}

N: normal group, C: HDL control group, H: HDL treated group. a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with normal group, c: $P < 0.01$, compared with HDL control group

2.4 肝细胞膜高密度脂蛋白受体的活性

由表 4 (Table 4) 可见,与正常组比较,高脂对照组动物肝细胞膜 HDL 受体 Kd 值显著降低 ($P < 0.01$),而 HDL 治疗组动物 Kd 值未见明显变化 ($P > 0.05$),但 Bmax 却显著降低 ($P < 0.05$)。

表 4. 肝细胞膜高密度脂蛋白受体的活性

Table 4. Kd (g/L) and Bmax (ng/g membrane) of HDL receptors on As rabbit liver plasma membranes ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Groups	Kd	Bmax
N	7.41 ± 1.34	597.2 ± 106.6
C	4.12 ± 0.71 ^a	539.3 ± 71.4
H	7.12 ± 1.40 ^c	462.3 ± 51.2 ^b

N: normal group, C: HDL control group, H: HDL treated group. a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with normal group, c: $P < 0.01$, compared with HDL control group

3 讨论

动物饲以高脂膳食后,血 TC、TG 及磷脂水平显

著高于正常对照组, HDL 制剂治疗后, 血中脂质水平与高脂组相比无明显改变, 表明 HDL 制剂无降低摄取高脂膳食的 As 模型动物血清脂质的作用。此结果与 Badimon 等^[1]的实验结果一致。

肝脏及胆囊胆汁脂质测定的结果表明, 模型动物长期摄入高脂膳食造成以胆固醇大量沉积为特点的严重脂肪肝病。注射 HDL 后, 动物肝脏 TC 和磷脂水平明显降低, 胆汁脂质含量却显著增加。因此, 人血浆 HDL 制剂不仅可减少高脂饲养的 As 模型动物肝脏脂质沉积, 而且具有促进脂质经胆道排泄的作用。

现已证实, HDL 具有将外周组织中的胆固醇运至肝脏转化和排泄的功能, 在 RCT 中起着重要作用。本室 HDL 制剂抗 As 试验性预防试验曾发现注射人血浆 HDL 制剂 (含 50 mg 载脂蛋白 AI 的 HDL/周, 共 10 周) 的 As 模型动物, 其肝细胞膜 HDL 受体 Kd 值与正常动物一致, 但 Bmax 显著增加。这表明 As 模型动物若在摄取高胆固醇膳食的同时注射人血浆 HDL 制剂, 其肝细胞膜 HDL 受体呈现以受体数目显著增加为特征的受体结合活性升高。但 As 试验性治疗试验的检测结果却发现, 对已造成 As 病变的家兔, 若在继续摄取高脂膳食的同时注射人血浆 HDL 制剂 (含 50 mg 载脂蛋白 AI 的 HDL/周, 共 10 周), 肝细胞膜 HDL 受体 Kd 值与正常动物无显著差异, 但 Bmax 明显降低。表明肝脏经 LPAL- 及 LPAL/A II-HDL 直接 RCT 途径^[2]摄取的胆固醇显著减少。然而胆汁脂质检测却表明, 经胆道排出的胆固醇显著增加, 显然肝脏通过其它途径摄取固醇的功能应有所增强。本室 As 模型动物 LDL 受体活性检测曾发现, 高胆固醇饲养 22 周的 As 家兔肝细胞膜 LDL 受体 Bmax 明显降低, 注射人血浆 HDL 制剂后, Bmax 值显著增加。Oram 等^[3]也观察到密度在 1.10 至 1.25 的 HDL 颗粒 (VHDL、HDL₃) 可促进成纤维细胞胆固醇流出而提高 LDL 受体活性。因此尽管肝细胞膜 HDL 受体活性降低, 但经 LDL 受体或其它受体介导的直接及间接 RCT 途径^[2]则会因 HDL 诱导而有所增强。至于本试验发现的 HDL 受体 Bmax 显著降

低, 可能是长期 (22 周) 摄取高胆固醇膳食, 造成动物肝脏严重脂肪性病变, 受体合成功能减退的原故。本实验还发现高脂对照组动物的 HDL 受体 Kd 值明显降低, 表明长期高脂饲养的 As 模型动物肝脏 HDL 受体亲和力显著升高, 而注射 HDL 似有减小或避免长期高脂饲养的 As 模型动物肝细胞膜 HDL 受体活性发生改变的作用。

此外, 肝细胞与肝外组织细胞 (中性粒细胞、成纤维细胞以及平滑肌细胞等) 含有两类功能完全不同的 HDL 受体, 前者促进胆固醇的摄入, 后者促进胆固醇流出。为什么当外源胆固醇增多时, HDL 受体活性有相似的变化规律? 其机理有待深入研究。

参考文献

- 1 Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med*, 1977, **62** (3): 707-714
- 2 Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*, 1990, **85** (4): 1234-241
- 3 Fidge NH, Nestel PJ. Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein3 with receptors on cultured cells. *J Biol Chem*, 1985, **260** (6): 3570-575
- 4 Cohn EJ, Gurd FRN, Surgenor DM, et al. A system for the separation of the components of human blood: Quantitative procedure for the separation of protein compounds of human plasma. *J Am Chem Soc*, 1950, **72** (2): 465-474
- 5 傅明德. 酶受体分析法. 见: 曹泽毅 (主编), 激素受体及其临床应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 169-176
- 6 吴新伟, 傅明德, 刘秉文, 等. 肝细胞膜低密度脂蛋白受体酶联免疫测定法的建立. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (1): 67-70
- 7 陈琪. 脂蛋白代谢与高脂血症. 见: 蔡海江 (主编), 动脉粥样硬化-基础与临床. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 47-49
- 8 Oram JF, Albers JJ, Cheung MC, et al. The effects of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts: Regulation of low density lipoprotein receptor activity. *J Biol Chem*, 1981, **256** (6): 8348-356

此文 1998-11-16 收到, 1999-05-07 修回)

此文编辑 朱雯霞)