

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2000)-02-0140-03

高胆固醇饲养对家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体的影响

方定志, 刘秉文

(华西医科大学基础医学院载脂蛋白研究室, 四川省成都市 610041)

[关键词] 受体, 高密度脂蛋白; 细胞膜; 肝脏; 甘油三酯; 胆固醇; 家兔

[摘要] 为探讨高胆固醇饲养对兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体的影响, 用高胆固醇饲料喂养家兔6个月后剖杀, 取肝脏用蔗糖密度梯度超速离心法分离肝细胞膜, 用密度梯度超速离心法分离普通饲料喂养的家兔血浆不含载脂蛋白E的高密度脂蛋白3, 用氯化单碘法对兔高密度脂蛋白3进行¹²⁵I标记。以¹²⁵I标记的兔高密度脂蛋白3作为配体, 对肝细胞膜高密度脂蛋白受体进行研究。结果发现, 高胆固醇饲料和普通饲料喂养的家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体的最大结合分别为 2.46 ± 0.72 mg/g和 1.18 ± 0.48 mg/g, 两者差异显著($P < 0.001$), 但解离常数无显著性改变(8.06 ± 3.10 mg/L比 9.27 ± 3.54 mg/L, $P > 0.05$)。该结果表明高胆固醇饲养能上升调节家兔高密度脂蛋白受体, 使家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体活性升高。

[中图分类号] R363.21

[文献标识码] A

Effect of High Cholesterol Chow on High Density Lipoprotein Receptors in Hepatic Plasma Membranes of Rabbits

FANG Ding-Zhi, and LIU Bing-Wen

(Apolipoprotein Research Unit, School of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

MeSH Receptors, HDL; Plasma Membranes; Liver; Triglycerides; Cholesterol; Rabbits

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of high cholesterol chow on high density lipoprotein (HDL) receptors in hepatic plasma membranes with ¹²⁵I- labeled HDL₃ as ligands. **Methods** The hepatic plasma membranes were purified by density gradient ultracentrifugation from rabbits fed with high cholesterol chow and rabbits fed with normal chow. Apolipoprotein E deficient HDL₃ was isolated from plasma of normally fed rabbits by density gradient ultracentrifugation, and labeled with ¹²⁵I by ICI method. Radioreceptor assays were carried out by incubation of the purified plasma membranes with labeled and unlabeled HDL. **Results** HDL receptors on hepatic plasma membranes of rabbits fed with high cholesterol chow and normal chow have an average K_d of 8.06 ± 3.10 mg/L and 9.27 ± 3.54 mg/L. There is no statistical difference of K_d between the two groups. But HDL receptors on hepatic plasma membranes of rabbits fed with high cholesterol chow have an higher value of B_{max} than those with normal chow (2.46 ± 0.72 mg/g vs 1.18 ± 0.48 mg/g, $P < 0.001$). **Conclusions** The high cholesterol chow can up-regulate the HDL receptors, and increase the HDL receptor activity on hepatic plasma membranes of rabbits.

流行病学调查表明, 血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平与冠心病的发生呈负相关, 冠心病患者血浆 HDL 含量明显低于正常人^[1]。某些血浆 HDL 水平较高的动物如貂^[2]不易甚至不发生动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)。在哺乳动物体内, 脂蛋白与细胞间的相互作用在脂蛋白代谢中起着十分重要的作用, 这种相互作用主要通过细胞膜上特异的脂蛋白受体介导完成^[3]。研究发现,

HDL 的主要作用是通过 HDL 受体 (HDL receptor, HDLR)^[4] 在体内逆向转运胆固醇。在肝外组织, HDL 与 HDLR 结合, 从细胞中获取多余的胆固醇并将这些胆固醇运往肝脏; 在肝脏, HDL 与肝细胞膜上的 HDLR 结合后, 肝细胞能将其中的胆固醇摄取并转化成胆汁酸排出体外^[5]。本文对高胆固醇饲养的家兔肝细胞膜 HDLR 进行了研究, 发现其最大结合 (maximal binding, B_{max}) 显著增加, 解离常数 (dissociation constant, K_d) 无显著改变。

[作者简介] 方定志, 男, 副教授, 华西医科大学分子生物学开放实验室副主任, 华西医科大学基础医学院院长助理。刘秉文, 男, 1930年12月出生, 四川省梓潼县人, 生物化学与分子生物学教授, 博士研究生导师。华西医科大学生物化学与分子生物学研究所所长, 载脂蛋白研究室主任, 四川省生物化学与分子生物学学会理事长。

1 材料和方法

1.1 材料

日本大耳白兔, SPF 级, 雄性, 体重 2.0~ 2.5 kg, 从四川省动物学会养殖中心购买。胆固醇, AR, 苏州吴县越溪生物化学制品厂产品。蛋黄粉, 食品级, 武汉市食品厂出品。化猪油, 市场购进。¹²⁵I- NaI, 无载体, 北京原子能科学院产品。牛血清白蛋白 (BSA), 电泳纯, 中国科学院生物物理所产品。聚乙二醇 (PEG), Mr= 6, 000, 分析纯, 日本进口分装。超速离心机, Beckman 公司产品。血浆总胆固醇酶法测定试剂盒及甘油三酯酶法测定试剂盒均为北京中生生物技术公司产品。

1.2 动物饲养

日本大耳白兔先用普通饲料喂养二周。第二周末测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 后, 随机分为两组: 对照组普通饲料喂养; 高胆固醇组高胆固醇饲料喂养。高胆固醇饲料由 85% 颗粒饲料、10% 蛋黄粉和 5% 猪油组成, 每只兔每日加喂胆固醇 0.2 g。喂养 6 个月后剖杀, 收集肝脏和血液标本。

1.3 兔血浆及肝组织脂质测定

收集家兔血液标本, 分离血浆。采用总胆固醇酶法及甘油三酯酶法测定血浆总胆固醇和甘油三酯。取兔肝组织, 干燥后称重, 用有机溶剂抽提脂质, 采用化学法测定肝脏总胆固醇、甘油三酯和磷脂 (phospholipids, PL) 含量。

1.4 兔肝细胞膜的分离纯化

按 Ray^[6] 方法, 采用蔗糖密度梯度超速离心, 从肝脏组织匀浆中分离纯化。肝细胞膜的产率为每克肝脏湿组织 0.84 ± 0.27 mg 膜蛋白。与肝组织匀浆比较, 纯化肝细胞膜 5'-核苷酸酶 (5'-ATPase) 比活性增加 10.4 ± 2.6 倍。

1.5 兔不含载脂蛋白 E 高密度脂蛋白 3 分离纯化

收集普通饲料喂养的家兔血浆, 按 Steinberg^[7] 方法制备兔不含载脂蛋白 E 的 HDL₃ (以下简称为 HDL₃), 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定不含载脂蛋白 E。采用 ICI 法^[8] 对分离纯化的 HDL₃ 进行¹²⁵I 标记, 所得¹²⁵I- HDL₃ 制剂的比放射性为 1.68 × 10¹¹/(min·g) 蛋白质, 其放射性 99.6% 能被三氯醋酸沉淀, 脂质标记率为 6.7%。

1.6 兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体分析

按张林华等^[9] 方法进行, 将纯化肝细胞膜与¹²⁵I- HDL₃ 反应后, 分离与肝细胞膜结合的¹²⁵I- HDL₃ 和游离¹²⁵I- HDL₃, 对结合¹²⁵I- HDL₃ 进行放射性计数。最后经 Scatchard 作图求出兔肝细胞膜与 HDL₃ 结合的 Bmax 值和 Kd 值。

2 结果

2.1 高胆固醇喂养的家兔血浆脂质水平变化

由表 1 (Table 1) 可见, 高胆固醇喂养 6 个月后, 家兔血浆总胆固醇和甘油三酯水平显著增高, 分别是普通饲料喂养的 19.4 倍和 8.5 倍 ($P < 0.001$)。

表 1. 对照组及高胆固醇组家兔血浆甘油三酯和总胆固醇水平。

Table 1. Plasma TC and TG contents of rabbits in control and high cholesterol groups (mmol/L).

Groups	n	TC	TG
Control	5	1.74 ± 0.30	0.77 ± 0.11
High cholesterol	7	33.8 ± 6.24 ^a	6.58 ± 1.85 ^a

a: $P < 0.001$, compared with control group.

2.2 高胆固醇喂养的家兔肝脏脂质含量变化

由表 2 (Table 2) 可见, 高胆固醇喂养 6 个月后, 家兔肝脏总胆固醇含量显著增高 ($P < 0.001$)。

表 2. 对照组及高胆固醇组家兔肝脏总胆固醇、甘油三酯及磷脂含量。

Table 2. Liver lipids contents of rabbits in control and high cholesterol groups (mg/g of dried liver).

Groups	n	TC	TG	PL
Control	5	18.7 ± 3.3	21.9 ± 8.0	42.2 ± 8.8
High cholesterol	7	211.4 ± 26.8 ^a	27.2 ± 8.2	30.0 ± 6.4

a: $P < 0.001$, compared with control group.

2.3 高胆固醇喂养的家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体变化

由表 3 (Table 3) 可见, 高胆固醇喂养 6 个月后, 兔肝细胞膜 HDL_R 的最大结合 Bmax 值显著增加 ($P < 0.001$), 但 Kd 值无显著性改变 ($P > 0.05$)。表明高胆固醇喂养能上升调节兔肝细胞膜 HDL_R, 使兔肝细胞膜 HDL_R 最大结合容量增加。

表 3. 对照组及高胆固醇组家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体的最大结合值和解离常数。

Table 3. Bmax and Kd of HDL_R in hepatic plasma membranes of rabbits in control and high cholesterol groups.

Groups	n	Bmax (mg/g)	Kd (mg/L)
Control	5	1.18 ± 0.48	9.27 ± 3.54
High cholesterol	7	2.46 ± 0.72 ^a	8.06 ± 3.10

a: $P < 0.001$, compared with control group.

3 讨论

在生理状况下,各种血浆脂蛋白维持在相对恒定水平,这种恒定被打破就可能导致疾病,如血浆高密度脂蛋白降低与动脉粥样硬化关系密切,是冠心病发生的重要危险因素之一。多种脂蛋白受体在维持血浆脂蛋白水平恒定中起了十分重要的作用^[3,4]。高密度脂蛋白不均一,有大小、组成、性质各异,功能也有所不同的多个亚类,它在大小、组成、性质及功能上的复杂性也给人们认识高密度脂蛋白受体带来了困难。虽然对高密度脂蛋白受体进行了大量的研究,但人们对高密度脂蛋白受体的认识尚不十分清楚。高密度脂蛋白在大小、组成、性质及功能上的复杂性提示体内可能存在多种能识别和结合高密度脂蛋白的受体蛋白。目前已克隆了至少三种高密度脂蛋白受体蛋白^[10],即高密度脂蛋白结合蛋白(HDL binding protein, HBP)、清道夫受体-BI(scavenger receptor-BI, SR-BI)和高密度脂蛋白结合蛋白 B₂(HDL binding protein B₂, HB₂)。尽管它们在高密度脂蛋白代谢中的作用及其机制尚需进一步研究,但已经发现这三种受体蛋白基因的表达都对细胞胆固醇敏感。胆固醇对高密度脂蛋白受体有上升调节作用,增加细胞胆固醇含量能使高密度脂蛋白结合蛋白和 SR-BI 基因表达加强^[11,12],降低细胞胆固醇含量则能减少高密度脂蛋白结合蛋白 B₂ 基因表达^[13]。本文用家兔肝细胞膜进行的受体结合动力学研究发现,高胆固醇饲养的家兔肝细胞膜高密度脂蛋白受体 B_{max} 显著增加, K_d 无显著改变。从受体结合动力学表明,活体内肝细胞膜高密度脂蛋白受体受胆固醇的上升调节而使受体活性增加。该结果与上述实验结果一致,为活体内高密度脂蛋白受体的存在提供了又一证据,为在整体条件下认识高密度脂蛋白 R 的功能积累了资料。

参考文献

- [1] Barter PJ, Rye KA. High density lipoproteins and coronary heart disease [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **121** (1): 1
- [2] Zilversmit DB, Clarkson TB, Hughes LB. High plasma cholesterol in mink without atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1977, **26** (1): 97
- [3] Gu X, Trigatti B, Xu S, et al. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 26 338
- [4] 方定志,刘秉文. 肝脏脂蛋白受体 [J]. *生理科学进展*, 1993, **24** (2): 103
- [5] Fielding JF, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport [J]. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 211
- [6] Ray TK. A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **196** (1): 1
- [7] Steinberg D. A docking receptor for HDL cholesterol ester [J]. *Science*, 1996, **271**: 460
- [8] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 1986, **232** (4746): 34
- [9] 张林华,刘秉文,蓝天鹤. 大鼠肝细胞膜高密度脂蛋白受体的研究 [J]. *生物化学与生物物理学进展*, 1991, **18** (1): 42
- [10] Fidge NH. High density lipoprotein receptors, binding proteins and ligands [J]. *J Lipid Res*, 1999, **40** (2): 187
- [11] McKnight GL, Reasoner J, Gilbert T, et al. Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267** (17): 12 131
- [12] Wang N, Weng W, Breslow JL, et al. Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein AI and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol store [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271** (35): 2 100
- [13] Mathai D, Fidge NH, Tozuka M, et al. Simvastatin and cholesterylamine treatment reduces the level of expression of high density lipoprotein binding proteins in rat liver [J]. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**: 1 045

(此文 1999-09-15 收到, 2000-01-06 修回)

(此文编辑 文玉珊)