

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2002)10-01-0030-04

天然及氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞表面结合

林春榕¹, 洪嘉玲², 汪炳华², 吴学东³, 狄勇¹

(1. 大理医学院生物化学教研室; 3. 附属医院外科, 云南省大理市 671000;

2. 武汉大学医学院生物化学教研室, 湖北省武汉市 430071)

[主题词] 脂蛋白(a); 氧化修饰; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨脂蛋白(a)及氧化型脂蛋白(a)在巨噬细胞上的结合和降解途径, 将生物素标记的脂蛋白与小鼠腹腔巨噬细胞进行结合和竞争性结合试验。结果发现, 脂蛋白(a)能以一定的亲和力、可饱和性地与巨噬细胞表面结合; 低密度脂蛋白对其结合无明显抑制作用, 而氧化型低密度脂蛋白、氧化型脂蛋白(a)均能不同程度地抑制这种结合。脂蛋白(a)经氧化修饰后, 与巨噬细胞的结合量显著增加。脂蛋白(a)、低密度脂蛋白不能有效竞争氧化型脂蛋白(a)的结合, 而氧化型脂蛋白(a)和氧化型低密度脂蛋白为有效的竞争性抑制剂。提示脂蛋白(a)主要经清道夫受体与巨噬细胞表面结合; 氧化型脂蛋白(a)除经清道夫受体介导外, 可能还通过其它特异性受体与巨噬细胞表面结合。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Binding of Lipoprotein (a) and Oxidized Lipoprotein (a) by the Mouse Peritoneal Macrophage

LIN Chun Rong, HONG Jia Ling, WANG Bing Hua, WU Xue Dong, and DI Yong

(1. Department of Biochemistry, Dali Medical College, Dali 671000; 2. Department of Biochemistry, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

[MeSH] Lipoprotein (a); Oxidative Modification; Macrophage; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To clarify the binding and degradative pathway of lipoprotein (a) [Lp(a)] and oxidized lipoprotein (a) [ox-Lp(a)]. **Methods** The binding and the competitive binding assays about Lp(a) and oxidized Lp(a) with the mouse peritoneal macrophage were performed. **Results** Lp(a) was bound with affinity, saturation to macrophage surface. LDL was minimal potency in competing with Lp(a) for the binding site, in contrast, ox-LDL and ox-Lp(a) were efficient competitor for the binding of Lp(a). Oxidative modification of Lp(a) by Cu^{2+} increased markedly its binding to macrophages. Ox-Lp(a) and ox-LDL were excellent competitor for the binding of ox-Lp(a) to macrophages. **Conclusions** The binding of Lp(a) with macrophages by the scavenger receptor mediated pathway; Scavenger receptor provided a significant route for the metabolism of ox-Lp(a), perhaps, any other special receptor also mediated the binding of ox-Lp(a) to macrophages.

巨噬细胞通过清道夫受体过量摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 导致细胞内脂质堆积转变为泡沫细胞, 这一机制在低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)中起着重要作用^[1]。脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]是一种高度致动脉粥样硬化的血浆脂蛋白, 其结构、理化性质和脂质组成与LDL极为相似, 同样富含胆固醇及其酯, 除含载脂蛋白(a)[apolipoprotein(a)]外, 脂蛋白(a)也以载脂蛋白B100(apolipoproteinB100)为主要载脂蛋白^[2]。在体内脂蛋白(a)能被氧化修饰, 且氧化型脂蛋白(a)与动

脉粥样硬化的形成有密切关系^[3]。然而, 脂蛋白(a)和氧化型脂蛋白(a)的代谢途径、在泡沫细胞形成中的作用及其致动脉粥样硬化机理却远不如LDL研究得透彻, 尚需进行更深入、细致的研究。本文应用 Cu^{2+} 介导脂蛋白氧化修饰, 进行天然脂蛋白(a)及氧化型脂蛋白(a)与小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophage, MPM)结合的动力学研究, 以期从脂质沉着和泡沫细胞形成的角度来阐明脂蛋白(a)致动脉粥样硬化形成的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种小白鼠为武汉大学医学院动物室提供。脂蛋白(a)浓度检测试剂盒为美国Pharmacia公司产品; Sepharose 6B为美国Pharmacia公司产品; BNHS(D-

[收稿日期] 2001-06-04 [修回日期] 2001-12-18

[作者简介] 林春榕, 女, 1968年出生, 福建人, 讲师, 生物化学硕士研究生, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化。洪嘉玲, 女, 1937年出生, 教授, 生物化学博士生导师, 多年来一直从事脂蛋白与动脉粥样硬化关系的研究。

biotin-N-hydroxysuccinimide ester, BNHS) 及 Avidin-HRP 购于华美生物工程公司; RPMI-1640 培养基为美国 INC 生命技术公司产品; 羊抗人载脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 单克隆抗体由武汉大学医学院生物化学教研室提供。密度梯度超速离心分离血清, $d > 1.250 \text{ kg/L}$ 部分即为无脂血清。超速离心机(L8-80M 型)为美国 Beckman 公司产品; 全自动层析仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 脂蛋白的分离纯化及氧化修饰

密度梯度超速离心(55.2 Ti, 4℃, 50 000 r/min, 22 h × 2 次)分离富含脂蛋白(a)含量血[用脂蛋白(a)浓度检测试剂盒从健康献血员中筛选富含脂蛋白(a)血]。收集密度为 1.055~1.120 kg/L 部分进一步经 Sepharose 6B 凝胶层析纯化, 分别收集脂蛋白(a)和低密度脂蛋白备用。在体外用 Cu^{2+} 介导脂蛋白的氧化修饰, 制得氧化型脂蛋白(a)及氧化型 LDL 备用。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞制备

参照 Wasley 法^[4]小鼠颈椎脱臼处死, 消毒胸腹部, 暴露腹膜, 腹腔内注入预冷 RPMI-1640 培养基 5 mL/只, 按摩腹部, 回抽腹腔清洗液约 4 mL/只, 低速离心沉淀细胞, 制成细胞悬液; 计数后 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 40 孔微量培养板, 37℃培养 3 h, 观察细胞贴壁后, 用于细胞结合试验。

1.4 生物素标记脂蛋白

按 Roach 等^[5]方法, 将 2 g/L 脂蛋白中迅速加入 0.5 μmol/L BNHS 的二甲基甲酰胺溶液, 室温下磁力搅拌 2 h, 0.01 mol/L PBS(pH 7.4, 含 1 mmol/L EDTA·Na₂, 0.01% NaN₃) 透析过夜。

1.5 脂蛋白浓度标准曲线的制备

以纯化羊抗人载脂蛋白(a)和载脂蛋白 B IgG (50 mg/L, 碳酸氢盐缓冲液, pH 9.6) 分别包被 40 孔酶标板, 100 μL/孔, 4℃过夜。0.01 mol/L PBS(pH 7.4, 含 0.2% BSA) 洗涤 3 次, 分别加入不同浓度的生物素标记脂蛋白[Biotin-脂蛋白(a)与 Biotin-LDL, Biotin-氧化型脂蛋白(a)与 Biotin-ox-LDL] 100 μL/孔, 37℃2 h, 0.01 mol/L PBS(pH 7.4, 含 0.02% BSA) 洗涤; 加 100 μL 1:200 的 Avidin-HRP(华美生物工程公司) 37℃30 min, PBS 洗涤; 加邻苯二胺 100 μL, 37℃20 min, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应; 于酶标仪上读取 490 nm 吸光度值(A_{490}), 绘制标准曲线(图 1, Figure 1)。

1.6 脂蛋白与细胞的结合试验

经无脂血清诱导培养 24 h 的细胞单层, 用 4℃预冷的培养基(含 0.2% BSA) 洗 3 次, 加入生物素标记的脂蛋白 4℃2 h, 用冷 PBS 洗涤; 加 100 μL Avidin-HRP(1:200) 4℃1 h, 冷 PBS 洗涤; 加邻苯二胺 100 μL, 37℃20 min, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于酶标仪上读取 490 nm 吸光度值(A_{490}), 从标准曲线中查出脂蛋白与细胞的结合量。细胞特异结合量=总结量-非特异性结合量(含 50 倍对应未标记脂蛋白)

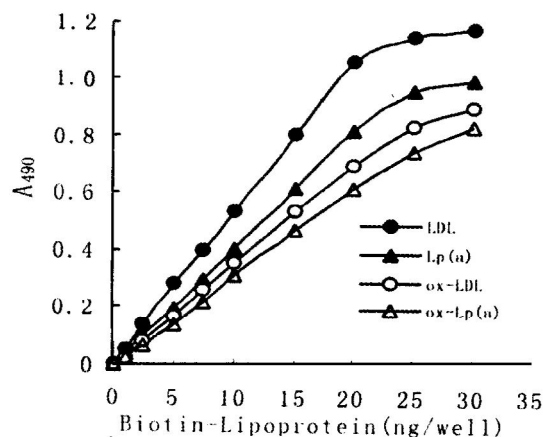


图 1. 脂蛋白浓度标准曲线。

Figure 1. Calibration curve for concentration of LDL, lipoprotein (a), ox-LDL and ox-lipoprotein (a). LDL: $r = 0.98$, $Y = 0.043X + 0.062$; ox-LDL: $r = 0.99$, $Y = 0.032X + 0.009$; Lp(a): $r = 0.99$, $Y = 0.036X + 0.026$; ox-Lp(a): $r = 0.99$, $Y = 0.029X + 0.002$.

dir-HRP(1:200) 4℃1 h, 冷 PBS 洗涤; 加邻苯二胺 100 μL, 37℃20 min, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于酶标仪上读取 A_{490} , 从标准曲线中查出脂蛋白与细胞的结合量。细胞特异结合量=总结量-非特异性结合量(含 50 倍对应未标记脂蛋白)

1.7 脂蛋白与细胞结合的竞争性试验

无脂血清诱导培养的 MPM 与浓度为 50 mg/L 生物素标记的脂蛋白共同孵育, 加或不加 25 倍各种未标记脂蛋白为竞争性抑制剂, 标记脂蛋白与细胞结合量的测定同上述结合试验。

1.8 统计学处理

1.8.1 标准曲线 将脂蛋白的浓度与对应的 A_{490} 进行直线回归处理, 求出直线方程, 再绘出标准曲线。

1.8.2 受体浓度结合曲线 采用 Scatchard 作图法, 将原始数据进行直线回归处理, 求出受体结合时的平衡解离常数 K_d 和最大结合容量 B_{max} 。

2 结果

2.1 天然和氧化型脂蛋白与巨噬细胞表面的结合

生物素-亲和素-酶联法测不同浓度生物素标记的天然、氧化型脂蛋白(a)和 LDL 与 MPM 表面的结合量, 结果如图 2(Figure 2) 所示, 可见天然脂蛋白(a)以一定亲和力、可饱和地与 MPM 表面结合; 脂蛋白(a)经氧化修饰后与巨噬细胞的结合量显著增加。经 Scatchard 作图法分析表明, 氧化型脂蛋白(a)最大

结合容量为 0.33 mg/g 细胞蛋白,是天然脂蛋白(a)的 1.55 倍($B_{max}=0.21$ mg/g 细胞蛋白),亲和解离常数 K_d 为 31.65 mg/L,比天然脂蛋白(a)的 K_d (112 mg/L)小 3.5 倍。天然 LDL 与 MPM 的结合极少,氧化修饰后结合量显著增加,氧化型 LDL 最大结合容量为 0.42 mg/g 细胞蛋白, K_d 为 44 mg/L。

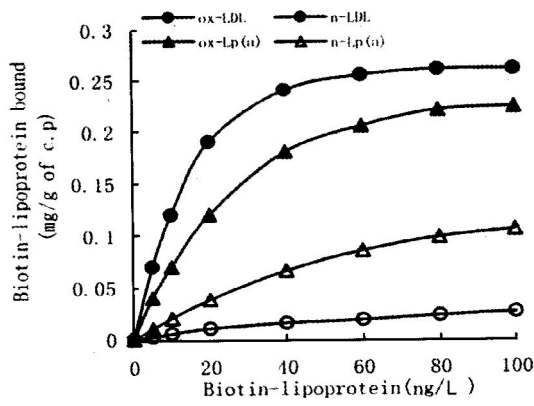


图 2. 生物素标记天然及氧化型脂蛋白与巨噬细胞的特异性结合.

Figure 2. Binding of Bio-native lipoprotein and Bio-oxidized lipoprotein to MPM.

表 1. 氧化型脂蛋白与巨噬细胞的竞争性结合($\bar{x} \pm s$).

Table 1. The competitive binding of oxidized lipoprotein and macrophage($\bar{x} \pm s$).

Competitive Inhibitor	Biotin ox ⁻ lipoprotein (a)		Biotin ox ⁻ LDL	
	Binding amount (mg/g cell protein)	Inhibitive rate (%)	Binding amount (mg/g cell protein)	Inhibitive rate (%)
na- lipol serum	198.0±9.2	—	250.0±11.3	—
nr lipoprotein (a)	162.4±5.1	18.0±4.3	194.5±6.6	22.2±6.4
nrLDL	165.5±4.0	16.4±3.8	220.0±3.9	12.0±4.2
ox ⁻ lipoprotein (a)	42.8±4.8	78.4±5.6	144.5±6.7	42.2±7.0
ox ⁻ LDL	85.5±6.9	56.8±7.2	41.3±6.2	83.5±6.8

3 讨论

巨噬细胞是体内重要的清除细胞,表面存在许多脂蛋白清除受体,其中最主要的是清道夫受体,清道夫受体的配基很广,其共同特点是多阴离子化合物。脂蛋白(a)是一种高度糖基化的脂蛋白,分子含较多的唾液酸,使其表现出较强的负电性^[6],故脂蛋白(a)能否与巨噬细胞表面的清道夫受体直接结合值得探讨。本实验结果表明,天然脂蛋白(a)能以一定亲和力、可饱和地与巨噬细胞表面结合;天然低密度脂蛋白对这种结合无明显抑制作用,而氧化型低密度脂蛋白及氧化型脂蛋白(a)均具有不同程度的抑制作用,说明天然脂蛋白(a)与巨噬细胞表面的结

2.2 脂蛋白(a)与巨噬细胞结合的竞争性试验

各种未标记脂蛋白对 Biotin⁻天然脂蛋白(a)结合的抑制效率分别是: nrLDL 对 Biotin⁻天然脂蛋白(a)与巨噬细胞的结合无明显的抑制作用,抑制百分率为 16.0%±3.6%;天然脂蛋白(a)本身是良好的竞争性抑制剂,抑制百分率为 81.6%±6.8%;氧化型 LDL 和氧化型脂蛋白(a)对 Biotin⁻天然脂蛋白(a)与 MPM 的结合均有不同程度的抑制作用,抑制率分别为 42.5%±5.4%及 37.6%±4.3%。

2.3 氧化型脂蛋白与巨噬细胞结合的竞争性试验

各种未标记脂蛋白对 Biotin⁻氧化型脂蛋白(a)和 Biotin⁻氧化型 LDL 结合的抑制率见表 1(Table 1)。天然脂蛋白(a)及天然 LDL 对 Biotin⁻氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞的结合无明显抑制作用,抑制率分别为 18.0%±4.3%和 16.4%±3.8%;氧化型 LDL 抑制率为 56.8%±7.2%;氧化型脂蛋白(a)对 Biotin⁻氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞的结合抑制作用最强,抑制率分别为 78.4%±5.6%。

合不是通过低密度脂蛋白受体途径,很可能是经清道夫受体介导而摄取。

已有证据表明,动脉粥样斑块中泡沫细胞的形成与氧化型低密度脂蛋白密切相关,氧化型低密度脂蛋白主要经清道夫受体被巨噬细胞结合降解,导致细胞内脂质堆积,泡沫细胞形成^[1]。脂蛋白(a)分子中除载脂蛋白(a)部分外,其余组分均与低密度脂蛋白极为相似,也富含胆固醇及其酯,为了解脂蛋白(a)在体外的氧化修饰、其可能的代谢途径及与泡沫细胞形成的关系。本实验在体外应用 Cu²⁺ 氧化修饰脂蛋白(a)和低密度脂蛋白,并观察氧化型脂蛋白(a)、氧化型低密度脂蛋白与 MPM 的结合特性,结果

表明:氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞结合能力较天然脂蛋白(a)显著增加,天然脂蛋白(a)和天然低密度脂蛋白均不能有效地竞争氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞的结合,而氧化型脂蛋白(a)和氧化型低密度脂蛋白为有效的竞争性抑制剂,说明氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞的结合主要也通过清道夫受体途径。脂蛋白(a)经氧化修饰后与MPM的结合量明显增加,如果说天然脂蛋白(a)的结合是通过清道夫受体介导,那么氧化型脂蛋白(a)除经清道夫受体介导外,是否还有专一的氧化型脂蛋白受体介导值得进一步研究。

脂蛋白(a)的氧化及其与巨噬细胞的有效结合,为我们探讨脂蛋白(a)致动脉粥样硬化机理提供了一条新的途径。由于脂蛋白(a)所含独特的载脂蛋白(a),使脂蛋白(a)较低密度脂蛋白更易固定于血管内壁,或穿过内皮与组织基膜上的纤维蛋白、蛋白多糖等牢固结合,使脂蛋白(a)局部浓度升高,滞留时间延长^[7]。从手术获得的动脉粥样硬化斑块中已提取出氧化型脂蛋白(a),提示氧化型脂蛋白(a)在动脉粥样硬化形成中具有重要的作用^[8]。本实验结果亦显示,脂蛋白(a)在体外能被氧化且氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞结合量明显增加。据此,我们推测脂蛋

白(a)在体内血管内壁滞留时间延长将促进内皮细胞、平滑肌细胞等对其氧化修饰;巨噬细胞对氧化型脂蛋白(a)结合、摄取量增加,将促进泡沫细胞的形成及动脉粥样硬化的发生。当然,有关脂蛋白(a)在体内的实际氧化过程,脂蛋白(a)及氧化型脂蛋白(a)对巨噬细胞中脂质含量的确切影响及其在动脉粥样硬化发生发展中的作用,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*, 2000, **407**: 233-241
- [2] Hoogveen RC, Gambhir JK, Gambhir DS, et al. Evaluation of Lipoprotein. *J Lipid Res*, 2001, **42**(4): 631-638
- [3] Nielsen LB. Atherogenicity of lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx, degradation and efflux. *Atherosclerosis*, 1999, **143**: 229-243
- [4] Wasley GD 主编. 动物组织培养技术. 北京: 科学出版社, 1982; 116
- [5] Roach PD, Noel SP. Biotinylation of LDL via free amino groups without loss of receptor binding activity. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 1508-514
- [6] Scarni AM, Nakajima K, Edelstein C. Apolipoprotein(a): structure and biology. *Front Biosci*, 2001, **6**: D546-554
- [7] Sechi LA, De Marchi S. Relationship of Lp(a) to variables of coagulation in hypertensive subjects. *J Invest Med*, 2001, **49**(1): 12-22
- [8] Zhao SP, Xu DY. Oxidized Lp(a) enhanced the expression of P-selectin in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res*, 2000, **100**(6): 501-510

(此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者•

《中国动脉硬化杂志》第二届编委会 (1997年1月)

名誉主任委员: 蔡海江*

主任委员(兼主编): 杨永宗*

副主任委员: 唐朝枢* 邓仲端*

编辑委员(以下按姓氏笔画排列)

韦立新*	王宗立*	王孝铭	邓漪平	卢兴	刘秉文
刘德文*	朱晓东	吕俊升	陈琪*	陈瑗	陈文培
陈保生	陈铁镇	沈卫峰	李元建	吴可贵	吴其夏
吴葆杰	吴满平*	杨小毅	杨和平*	林曙光*	周群
范乐明*	胡必利* (专职副主编)		胡维诚	赵水平	徐也鲁
涂玉林	夏辉明	黄士通	黄永麟	温进坤	楼定安*

廖端芳*

注:姓名右上角打“*”者为常务编辑委员。