

A 型清道夫受体基因敲除小鼠的腹腔巨噬细胞 特异性氧化型低密度脂蛋白受体

闻 剑, 凌文华

(中山大学卫生学院, 广东省广州市 510080)

[主题词] 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 腹膜腔; 巨噬细胞; 受体, LDL

[摘 要] 为研究巨噬细胞表面是否存在特异性氧化型低密度脂蛋白受体, 选用 A 型清道夫受体基因敲除小鼠来进行研究。竞争抑制实验发现, 在乙酰化低密度脂蛋白存在(终浓度为 200 mg/L)的情况下, A 型清道夫受体基因敲除小鼠的腹腔巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取降低了 24.8%, 还有大约 80% 的氧化型低密度脂蛋白可能通过特异性受体途径被摄取。蛋白配基印迹技术发现一种膜蛋白, 分子量为 84~97 kDa, 它不结合乙酰化低密度脂蛋白, 只结合氧化型低密度脂蛋白, 并且未标记¹²⁵I 的氧化型低密度脂蛋白能竞争性抑制¹²⁵I 标记氧化型低密度脂蛋白与该膜蛋白的结合, 上述结果提示这种膜蛋白是特异性氧化型低密度脂蛋白受体。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Study on Specific Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor from Scavenger Receptor A iv/ ③ Knockout Mouse Peritoneal Macrophages

WEN Jian, and LING WenHua

(School of Public Health, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

[MeSH] Lipoprotein, LDL, Oxidized; Peritoneal Cavity; Macrophages; Receptors, LDL

[ABSTRACT] **Aim** To explore the existence of specific oxidized low density lipoprotein(ox-LDL) receptor and assay its molecular weight. **Method** Cross-competition studies and ligand blotting were performed for analyzing specific ox-LDL receptor.

Results As an effective competitor, acetyl LDL(ac-LDL) could block the uptake of nonspecific ox-LDL. Studies indicated that excess ac-LDL(200 mg/L) could only inhibited 24.8% of the association and 77.1% of the degradation of ox-LDL.

Ligand blotting studies showed that ¹²⁵I-ox-LDL could bind to a protein of 84~97 kDa. The binding of ox-LDL to this membrane protein was inhibited completely by the addition of excess unlabeled ox-LDL. In contrast, ¹²⁵I-ac-LDL couldn't bind to the 84~97 kDa band. **Conclusion** Studies showed the existence of specific ox-LDL receptor and the molecular weight of this receptor was 84~97 kDa.

大量研究表明, 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)对泡沫细胞的形成起着重要作用^[1], ox-LDL 经巨噬细胞上 ox-LDL 受体识别而被摄取^[2]。细胞不断地摄取 ox-LDL 最终导致泡沫细胞的形成。近年研究表明, 调节 ox-LDL 摄取的受体有很多, 包括清道夫受体 A (scavenger receptor A, SRA)、CD36、Fc 受体和 macrophage 等。目前对于这些受体多数是通过探针钓取 cDNA 文库中的基因以及基因转染技术来研究, 由于这些结果很难反映体内受体和配体结合的真实情况, 因此对于何种受体才是细胞摄取 ox-LDL 的主要受体(即 ox-LDL 特异性受体), 至今尚无定论。鉴于 SRA 在细胞摄取

ox-LDL 过程中可能不占主导地位, 同时乙酰化低密度脂蛋白(acetyl low density lipoprotein, ac-LDL)和 ox-LDL 均可与 SRA 结合, 用正常动物难以评价单个受体的活性。因此本实验选用 SRA 基因敲除小鼠, 通过对离体小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophages, MPM)的培养和分离 MPM 上的膜蛋白受体来研究 ox-LDL 受体。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清道夫受体 A 基因敲除小鼠和基因未敲除小鼠均由日本东京大学 Kodama 教授赠送。

1.2 细胞培养

分离纯化后的 MPM 在 DMEM 培养基中培养, 培养箱内含 5% CO₂, 温度 37℃。

1.3 低密度脂蛋白的分离、修饰、鉴定和标记

[收稿日期] 2001-08-25 [修回日期] 2002-02-03

[基金项目] 国家自然科学基金(37870326)资助。

[作者简介] 闻剑, 男, 1975 年出生, 浙江宁波人, 营养与食品卫生学专业, 硕士, 现工作于广东省疾病预防控制中心公共卫生研究所(邮编: 510300)。凌文华, 男, 1955 年出生, 安徽合肥人, 临床营养学专业, 教授, 博士研究生导师, 现从事营养与抗动脉粥样硬化研究。

1.3.1 低密度脂蛋白的分离 健康人血浆购自广州市中心血站。用一次性密度梯度离心法^[3]分离人血浆,制得 LDL,提纯的 LDL 在含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 液中透析 48 h,过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 低密度脂蛋白的氧化修饰 在氧化前,LDL 先用无 EDTA 的 PBS 液透析 24 h,LDL 用 PBS 液调节蛋白浓度至 0.5~1 g/L。每 1 mL 无 EDTA 的 LDL (0.5~1 g/L) 加入含 100 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 液 50 μL 使 CuSO_4 终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 22 h,制得 ox-LDL。然后在含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 液中室温透析 24 h。

1.3.3 低密度脂蛋白的乙酰化修饰 于每份含 16 mg 蛋白的 LDL 中加入 1 mL 0.15 mol/L NaCl 和 1 mL 饱和醋酸钠,于冰浴中不断搅拌,然后醋酸酐(总量相当于 LDL 蛋白量的 1.5 倍)以小液滴(2 μL /滴)形式于冰浴中在不断搅拌下 1 h 内全量加入,加入后继续搅拌 30 min,将反应溶液移入透析袋中,在乙酰化 LDL 透析液(0.15 mol/L NaCl,0.3 mol/L EDTA, pH 7.4)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 24 h。

1.3.4 氧化和乙酰化修饰的鉴定和标记 氧化和乙酰化修饰程度的鉴定采用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳分析;用 Na^{125}I 标记修饰的 LDL, ^{125}I 标记脂蛋白的比放射活性在 100~300 cpm/ng 之间,游离碘率不超过 3%。

1.4 巨噬细胞与氧化型低密度脂蛋白结合量测定

设 thioglycollate 诱导组和未诱导组,诱导组对每只基因敲除小鼠行腹腔注射 1 mL thioglycollate,4 天后分离 MPM。然后分别在两组 MPM 中加入不同浓度的 ^{125}F -ox-LDL (终浓度分别为 0、5、10、20 和 50 mg/L),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1.5 h。弃去培养基,用冷 PBS 液冲洗细胞 3 次。加入 0.2 mol/L NaOH 溶解细胞,用吸管吹打,然后将液体收集于离心管,用 γ 射线计数器进行放射活性计数。细胞蛋白含量测定采用 Lowry's 法。

1.5 竞争性抑制实验

设 ac-LDL 组和对照组,在测定降解量时加设空白组。ac-LDL 组和对照组是在基因敲除 MPM 中分别加入含有或不含 ac-LDL (ac-LDL 是 ^{125}F -ox-LDL 含量的 40 倍,终浓度为 200 mg/L) 的 ^{125}F -ox-LDL (终浓度为 5 mg/L);空白组为不含 MPM 的培养液中加入 ^{125}F -ox-LDL (终浓度为 5 mg/L),然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4.5 h。将培养基吸出,在培养基中加入预冷的 10% TCA,混匀,离心,取上清,0.5 mL 上清液中加入 0.25 mL 5% AgNO_3 ,再次混匀,离心,取上清,用 γ 射线计数器进行放射活性计数(注意在结果中减去空白组,

以扣除非细胞结合部分的影响)。该数值代表细胞对 ox-LDL 的降解量。细胞用 PBS 液冲洗 3 遍,加入 0.2 mol/L NaOH 溶解细胞,用吸管吹打,然后将液体收集于离心管,用 γ 射线计数器进行放射活性计数。该数值代表细胞对 ox-LDL 的摄取量,细胞蛋白含量测定采用 Lowry's 法。

1.6 膜蛋白的粗分离

将裂解缓冲液 A (20 mmol/L Tris, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF) 加入分离纯化的 SRA 基因敲除 MPM 中,然后用细胞刮将粘附细胞刮除下来,液体收集于离心管中。在冰浴中,将离心管中的细胞悬液进行超声破碎,超声处理 3 遍,每次 10 s,然后进行镜下涂片,观察细胞破碎程度。在 2 500 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min,弃去沉淀部分,上清部分在 35 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 1 h,倒掉上清,保留沉淀部分。加入裂解缓冲液 B (50 mmol/L Tris, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 40 mmol/L Octyl glucoside),将沉淀部分重悬,然后在 35 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 1 h,保留上清液,弃去沉淀部分。此上清液中含粗制膜蛋白。用 Lowry's 法测定上清液中膜蛋白的含量。

1.7 蛋白配基印迹实验

设 ox-LDL 组和 ac-LDL 组。在非还原性状态下进行 SDS-PAGE 电泳(电泳 200 V, 60 mA, 50 min),然后在转移缓冲液(192 mmol/L 甘氨酸,25 mmol/L Tris, 20% 甲醇, pH 8.3)中,100 V 250 mA 4 $^{\circ}\text{C}$ 电转移 1.5 h,将蛋白转移至硝酸纤维素滤膜上。在室温下用洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris, 90 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5)将膜洗涤,孵育 30 min。硝酸纤维素滤膜用封闭缓冲液(含 1% 牛血清白蛋白的洗涤缓冲液)封闭 2 h。ox-LDL 组和 ac-LDL 组分别加入 ^{125}F -ox-LDL 和 ^{125}F -ac-LDL 于封闭缓冲液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1.5 h (其中 ^{125}F -ox-LDL 和 ^{125}F -ac-LDL 的终浓度分别为 10 mg/L)。竞争实验是在转有膜蛋白的硝酸纤维素膜与标记 ^{125}I 的脂蛋白孵育前,ox-LDL 组和 ac-LDL 组分别加入未标记 ox-LDL 和 ac-LDL 孵育 1 h。最后膜用洗涤缓冲液洗涤 3~5 次,每次 10 min,于室温下将膜风干。膜用 Kodak X-AR 胶片曝光 3 天,经显影、定影,观察结果。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白的鉴定

相对迁移率(relative electrophoretic mobility, REM)是氧化型 LDL 的泳动距离和天然 LDL 泳动距

离之比, LDL 修饰过程产生的醛类物质和载脂蛋白 B 上的游离氨基结合, 导致其负电性增加, REM 增大, 因此 REM 能直观地反映 LDL 修饰的程度。电泳结果发现 ox-LDL 的 REM 为 1.4, ac-LDL 的 REM 为 2.0。

2.2 乙酰化低密度脂蛋白对巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白的影响

结果发现, 在过量 ac-LDL (终浓度为 200 mg/L) 存在的情况下, SRA 基因敲除 MPM 对 ox-LDL 的摄取降低了 24.8%。同时, SRA 基因敲除 MPM 对 ox-LDL 的降解降低了 77.1% (图 1, Figure 1)。

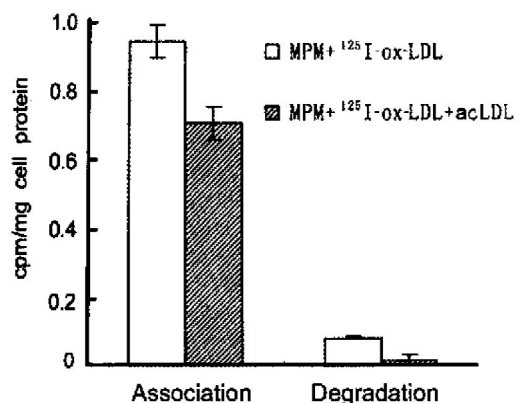


图 1. 乙酰化低密度脂蛋白对清道夫受体 A 基因敲除小鼠巨噬细胞摄取和降解氧化型低密度脂蛋白的影响。

Figure 1. Cell association and degradation of ox-LDL in SRA-deficient MPM in the absence or presence of ac-LDL.

2.3 Thioglycollate 对巨噬细胞结合氧化型低密度脂蛋白的影响

实验表明经 thioglycollate 诱导的 MPM 与 ox-LDL 结合较未诱导组略为增加, 但两组之间的差异没有统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2, Figure 2)。

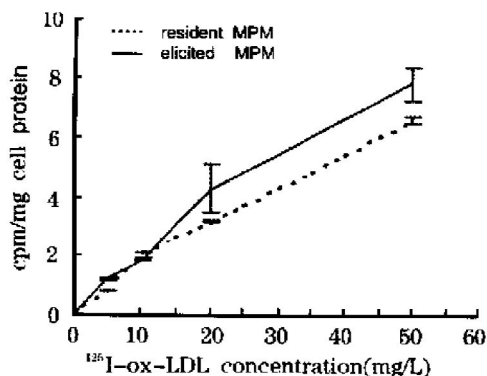


图 2. Thioglycollate 对清道夫受体 A 基因敲除小鼠巨噬细胞结合氧化型低密度脂蛋白的影响。

Figure 2. Cell binding of ox-LDL in resident and thioglycollate-elicited MPM (cpm/ μg cell protein).

2.4 分离特异性氧化型低密度脂蛋白受体并测定

其分子质量

氧化型低密度脂蛋白组在 84~97 kDa 之间有一条带, 它能与 ^{125}I -ox-LDL 结合, 在事先用过量的未标记 ox-LDL 封闭后, 这一条带消失 (图 3, Figure 3), ac-LDL 组并未出现明显条带, 说明该条带不与 ^{125}I -ac-LDL 结合 (图 4, Figure 4)。以上结果提示这一条带是只结合 ox-LDL 的特异性受体蛋白, 并且该受体蛋白的分子量大约在 84~97 kDa 之间。

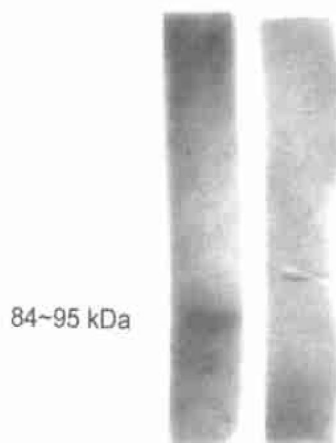


图 3. ^{125}I 氧化型低密度脂蛋白与膜蛋白的配基印迹结果。

Figure 3. Binding of ^{125}I ox-LDL to MPM membrane proteins in the absence (left) or in the presence (right) of excess unlabeled ox-LDL.

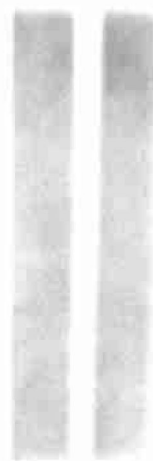


图 4. ^{125}I 乙酰化低密度脂蛋白与膜蛋白的配基印迹结果。

Figure 4. Binding of ^{125}I ac-LDL to MPM membrane proteins in the absence (left) or in the presence (right) of excess unlabeled ac-LDL.

3 讨论

现今已被证实的细胞表面调节 ox-LDL 摄取的受体蛋白除了 SRA 之外, 还包括 FcγRII-B2、CD36、SR-BI^[4]、Lectin-like oxidized LDL (LOX-1) 以及 macro-sialin。^[5] 为证实 ox-LDL 特异性受体的存在, 本研究

选用 ac-LDL 作为非特异性受体的封闭剂, 竞争 MPM 上的 ox-LDL 非特异性受体的位点。结果发现, 在过量 ac-LDL (终浓度为 200 mg/L) 存在的条件下, 基因敲除 MPM 对 ox-LDL 的摄取降低了 24.8%, 对 ox-LDL 的降解降低了 77.1%, 说明由非特异性受体途径摄取的 ox-LDL 约占总摄取量的 24.8%, 其余约 80% 的 ox-LDL 可能通过 MPM 上特异性受体被摄取。本实验结果提示在基因敲除 MPM 上存在 ox-LDL 特异性受体。

Macrosialin 是近年来发现的 ox-LDL 受体蛋白, 目前的研究认为它是 ox-LDL 特异性受体的可能性很大。Macrosialin 是 LAMP (lysosomal-associated membrane proteins) 家族中的一个成员, 正常情况下, 在细胞表面的表达量较少, 大约只有 macrosialin 总表达量的 4%^[6], 其余的部分主要集中分布在靠近核内体的地方。在这一点上, 它不同于其它 LAMP 家族成员, 后者主要集中在溶酶体。

Thioglycollate 是巨噬细胞的诱导剂, 它可以增加腹腔巨噬细胞的数量, 同时还能够刺激细胞蛋白的表达, 导致细胞 macrosialin 总表达量增加 17 倍(其中有 10%~15% 表达在细胞表面部分)^[6], 进而影响到 MPM 与 ox-LDL 的结合量。但是 Smith 等^[7]认为 thioglycollate 刺激细胞表面 macrosialin 的表达作用不大。我们的研究表明, 随着¹²⁵I-ox-LDL 剂量的增加(0.5、10、20 和 50 mg/L), 诱导组 MPM 与 ox-LDL 的结合和未诱导组相比差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。说明经 thioglycollate 诱导后的 MPM, 并没有明显增加细胞与 ox-LDL 的结合量, 这与 Loughheed 等^[8]的研究结果基本一致。对于 thioglycollate 能否刺激 macrosialin 的表达增加, 还有待于做进一步的研究。

由于经 thioglycollate 诱导后的 MPM 并没有明显增加细胞与 ox-LDL 的结合量, 同时考虑到增加 MPM 的数量以提高膜蛋白总量。我们对每只基因敲除小鼠行腹腔注射 thioglycollate, 4 天后取 MPM。为有效地分离出膜蛋白, 本实验采用超声法结合去污剂抽提来分离膜蛋白, 然后利用蛋白配基印迹实验来测定特异性 ox-LDL 受体的分子量。结果发现, ox-LDL 组在 84~97 kDa 之间有一条带, 它能与标记 ox-LDL 结合, 当增加未标记 ox-LDL 含量时, 这一条带消失, ac-LDL 组未出现明显条带, 说明该条带不与标记 ac-LDL 结合。以上结果说明在 ox-LDL 组出现的条带是只结合 ox-LDL 的特异性受体蛋白, 并且该蛋白的分子量大约在 84~97 kDa 之间。ac-LDL 组未出现明显条带, 这与前面的实验结果(即 ac-LDL 能够抑

制 24.8% ox-LDL 被摄取)存在一定的差异, 出现这种情况, 可能是由于非特异性受体的膜蛋白含量较低, 结合在它上面的标记配基信号太弱, 而无法显现出来的缘故。

与以往的结果比较发现, FcγRIIb 的分子量大约为 50 kDa; CD36 是分子量为 88 kDa 的糖蛋白, 存在于血小板、单核/巨噬细胞和毛细血管内皮细胞; SR-BI 存在于仓鼠中, 分子量大约为 85 kDa, 主要在脂肪组织中表达^[9]; LOX-1 受体是近年发现的植物血凝素类的 ox-LDL 受体, 该受体的分子量大约在 31~50 kDa, 分布于牛和人的内皮细胞、血单核细胞、脐平滑肌细胞以及 3T3 成纤维细胞^[10]; Macrosialin 存在于鼠 Kupffer 细胞和腹腔巨噬细胞, 分子量在 87~115 kDa 之间。

我们分离出的 ox-LDL 特异性受体蛋白的分子量大约在 84~97 kDa 之间, 从分离出的膜蛋白的分子量以及细胞来源来看, 它可能是 CD36 或者是 macrosialin, 究竟是它们中的哪一个或是存在新的未发现的 ox-LDL 特异性受体, 有待于更进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Jialal I, Devaraj S. The role of oxidized low density lipoproteins in atherosclerosis. *J Nutr*, 1996, **126**: 1 053-057
- [2] Leitinger N, Oguogho A, Rodrigues M, et al. The effect of NO/EDRF and monocytes/macrophages on LDL-oxidation. *J Physiol Pharmacol*, 1995, **46** (4): 385-408
- [3] 王克勤, 何锦麟. 一次密度梯度超速离心分离人血清的 VLDL、LDL、HDL2、HDL3 及无脂血清. *生物化学杂志*, 1986, **2** (1): 15-22
- [4] Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Science*, 1996, **271** (5248): 518-520
- [5] Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, et al. The 94 to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 9 580-584
- [6] Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, et al. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (25): 14 833-838
- [7] Smith MJ, Koch GL. Differential expression of murine macrophage surface glycoprotein antigens in intracellular membrane. *J Cell Sci*, 1987, **87**: 113-119
- [8] Loughheed M, Lum CM, Ling W, et al. High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. *J Biol Chem*, 1997, **272** (20): 12 938-944
- [9] Calvo D, Gomez CD, Lasuncion MA, et al. CLA-1 is an 85-kDa plasma membrane glycoprotein that acts as a high affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (ox-LDL and ac-LDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (11): 2 341-349
- [10] Draude G, Hrboticky N, Lorenz RL. The expression of the lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin. *Biochem Pharmacol*, 1999, **57** (4): 383-386

(此文编辑 朱雯霞)