

放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用

张爱宏, 刘国庆

(北京大学心血管研究所, 北京 100083)

[关键词] 生物化学与分子生物学; 脂蛋白脂肪酶活性的检测; 放射性同位素标记法; 基因表达; 重组腺病毒; 肝素后血浆

[摘要] 脂蛋白脂肪酶活性测定国内常用滴定法和比色法, 但这两种方法都不够灵敏和可靠。为准确检测脂蛋白脂肪酶的活性, 我们在国内首次建立了放射性同位素标记法, 并用此方法检测了基因体外表达的脂蛋白脂肪酶, 以及摄食条件下 C57 小鼠肝素后血浆中及心肌、脂肪和肝脏组织中的脂蛋白脂肪酶的活性。测定使用含³H 标记三油酸甘油酯的甘油乳剂为底物。标本与底物 37℃ 孵育反应后通过抽提将甘油酯与游离脂肪酸分开。脂解产生的游离脂肪酸的放射活性与标本中脂肪酶的活性成正比。表达人脂蛋白脂肪酶的重组腺病毒感染培养的 293A 细胞后, 肝素后培养液中表达很高的脂蛋白脂肪酶活性。5 只小鼠肝素后血浆及心肌、脂肪组织中脂蛋白脂肪酶活性检测结果均值分别为 314.3 U/L 以及 349 和 61 mU/g。结果表明, 放射性同位素标记法用于脂蛋白脂肪酶基因表达的研究灵敏、准确和稳定。小鼠血浆和组织标本脂蛋白脂肪酶活性检测为今后利用小鼠进一步研究脂蛋白脂肪酶提供了一些资料。

[中图分类号] Q5-3

[文献标识码] A

Determination of Lipoprotein Lipase Activity Using Radioactive Substrate Emulsion and Its Application

ZHANG Ai-Hong, and LIU Guo-Qing

(Cardiovascular Institute of Peking University, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein Lipase; Gene Expression; Recombinant Adenovirus; Post-heparin Plasma

ABSTRACT **Aim** To study lipoprotein lipase (LPL) gene expression in vitro and observe the mouse LPL activity in post-heparin plasma and various tissue samples we adopted a standard method using radioactive emulsion as substrate. **Methods** ³H-labeled triolein emulsion was prepared and used for subsequent incubation with different enzyme sources. **Results** There was high LPL activity expression in cultured 293A cells infected with recombinant adenovirus encoding human LPL. The LPL activity of post-heparin plasma, cardiac muscle, and adipose tissue of mice were 314.3 U/L, 349 mU/g and 61 mU/g respectively.

Conclusions The method of determination for LPL activity was sensitive, accurate and stable. The results of LPL activity of post-heparin plasma and various tissue samples of mice provided helpful data for further research.

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)是脂质代谢中最重要的酶之一, 主要由脂肪和肌肉细胞合成后分泌至细胞外, 并经进一步转运至邻近毛细血管内皮表面的硫酸类肝素上, 在那里发挥生理功能。LPL 水解血浆中乳糜微粒和 VLDL 所携带的甘油三酯 1 位和 3 位上的酯键与甘油二酯非 2 位酯键, 使得机体能够利用自食物摄取和肝脏合成的脂肪。杂合子和纯合子 LPL 缺乏的病人临床上表现为显著的血浆脂蛋白紊乱和高脂血症^[1]。在过去长期研究 LPL 的工作基础上, 我们正在进一步进行 LPL 基因表达的研究。基因表达的检测可以通过逆转录 PCR

或 Northern blot 检测 mRNA, 也可以用 Western blot 对表达的蛋白质进行检测, 最终还需要对基因表达产物的功能进行分析。然而对于 LPL 基因体外和体内表达活性的研究, 国内目前尚缺少一种灵敏、准确和稳定的检测方法。为此, 我们参考文献[2], 建立了放射性同位素标记 LPL 活性检测法, 并初步用于体外细胞水平转基因表达的 LPL 活性的检测。因为小鼠是整体基因表达实验中最常用的动物模型之一, 因此我们还用建立的放射性同位素标记法检测了正常喂食状态下 C57 小鼠脂肪、心肌和肝脏组织以及肝素后血浆标本中 LPL 的活性, 以期为进一步的研究打下基础。

[收稿日期] 2003-01-20

[修回日期] 2003-08-24

[作者简介] 张爱宏, 男, 博士研究生。刘国庆, 男, 长江特聘教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, 联系电话: 010-62091153, E-mail: Georgeliu@bjmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要试剂的配制

1.1.1 无水乳剂 取 200 g/L 三油酸甘油酯(triolein, TO, sigma 公司) 3.0 mL, 5 Ci/L [^3H]-TO (Amersham 公司) 0.2 mL, 20 g/L 卵磷脂(sigma 公司) 1.8 mL, 混匀, 用氮气吹干。加入 10 mL (12.5 g) 甘油, 匀浆器 20 000 r/min 匀浆 5 min。避光, 室温保存。

1.1.2 牛血清白蛋白-肝素液 取牛血清白蛋白(sigma 公司) 3.0 g, 肝素(sigma 公司) 0.5 mg, 氯化钠 195 mg, 溶于 0.3 mol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 100 mL 中。分装, -20°C 保存。

1.1.3 抽提剂 取甲醇 1 410 mL、氯仿 1 250 mL 和正庚烷 1 000 mL 混匀。④配制 50 mmol/L 碳酸-硼酸缓冲液(pH 10.5): 取碳酸钾(分析纯) 6.910 g, 硼酸(分析纯) 3.092 g, 溶于 900 mL 水中, 5 mol 氢氧化钠调 pH 至 10.5, 加水至 1 000 mL。

1.1.4 闪烁液 POPOP[1,4 双(5-苯基-2-恶唑)] 0.16 g, PPO (2,5-二苯基恶唑) 3.0 g, 萘 45 g, 乙二醇 10 mL, 溶于 500 mL 二氧六环中。

1.2 感染后细胞培养液及细胞抽提液制备

1.2.1 培养液标本制备 带有人 LPL 基因的重组腺病毒(Ad-hLPL, 本室制备^[3]) 感染 293A 细胞, 24 h 后吸弃 60 mm 培养皿中的培养液, 加入预冷的含 10 ku/L 肝素的 5% DMEM 1 mL, 4°C 放置 10 min。吸出培养液, 4°C 离心, 上清 -20°C 冻存。

1.2.2 细胞抽提液标本制备 用 PBS 洗下上述培养皿中感染后 24 h 的细胞, 4°C 离心。细胞沉淀重悬于 1 mL 抽提液(25 mmol/L 氨水盐酸缓冲液, pH 8.2, 含 5 mmol/L EDTA。另外取 8 g/L Triton X-100、0.4 mg SDS、32.5 μg 肝素^[4]) 中, 反复吹打混匀, 4°C 离心, 取上清液, -20°C 保存。

同样, 用未感染 Ad-hLPL 的 293A 培养细胞制备对照细胞培养液标本和对照细胞抽提液标本。

1.3 肝素后血浆标本制备

C57 小鼠尾静脉注射肝素 100~200 U/kg 体重, 10 min 后摘眼球取血。立即在 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min, 分离上层血浆, -20°C 冻存。

1.4 组织匀浆标本制备

C57 小鼠 5 只, 处死后立即分离心脏、肝脏和脂肪组织。按 10 mL/g 加入抽提液, 冰浴条件下匀浆器(Tekmar 公司) 匀浆。心脏和肝脏每次 5 s, 匀浆两次; 脂肪组织每次 10 s, 匀浆两次。匀浆后, 立即离心取上清。 -20°C 冻存。

1.5 放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性

操作流程可以简单归纳为三步: 孵育反应、抽提游离脂肪酸和液体闪烁计数器计数。具体方法如下: 首先将一定量的无水乳剂、牛血清白蛋白-肝素

液和禁食后大鼠血清按一定比例混合, 得到应用底物液。三者混合的比例是 1.6: 7.4: 1.0 (V: V: V)。取 100 μL 应用底物液, 加一定量标本液(培养液标本和细胞抽提液标本各 75 μL , 其它标本各 10 μL , PBS 补足体积至 100 μL), 漩涡混匀器混匀 3 次, 每次 15 s。 37°C 孵育 60 min。加抽提剂 3.25 mL, 加 50 mmol/L 碳酸-硼酸缓冲液(pH 10.5) 1.05 mL, 同样用漩涡混匀器混匀。室温, 3 000 r/min 离心 15 min。吸取 1 mL 上层液体至标记好的液闪杯中, 加闪烁液 10 mL, 液体闪烁计数器(Parmacia 公司) 中进行每分钟计数(cpm)。将 37°C 反应条件下产生 1 nmol/min 油酸时的脂肪酶活性定义为 1 mU。脂肪酶活性可以通过下式计算:

$$\text{脂肪酶活性(mU)} = \text{净 cpm} \times (1/\text{孵育 min 数}) \times (1/\text{每 nmol 底物 cpm}) \times 3 \times 2.45 \times (1/0.76)。$$

脂蛋白脂肪酶活性可以被 1 mol/L 氯化钠冰浴预处理 30 min 而抑制, 而肝脂肪酶(HL) 活性不被抑制。由总脂肪酶(TL) 活性减去肝脂肪酶活性即可得到脂蛋白脂肪酶(LPL) 的活性(用于肝素后血浆标本)。

2 结果

2.1 脂蛋白脂肪酶活性测定的酶量曲线

以重组腺病毒 Ad-hLPL 感染 293A 细胞后培养 24 h 的培养液上清作为标本, 观察不同酶量时 LPL 酶活性的变化情况。由图 1(Figure 1) 可见, 在标本量在 0~100 μL 之间随着酶量的递增, 酶活性测定值与酶量之间呈一直线关系。

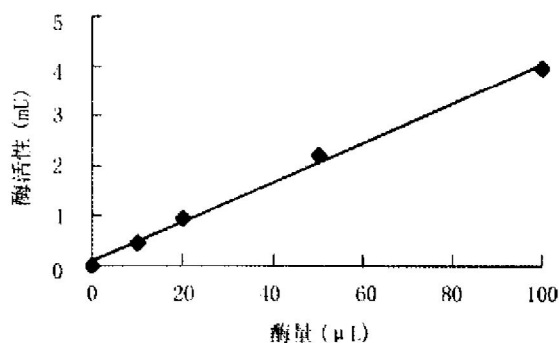


图 1. 脂蛋白脂肪酶活性测定酶量曲线

Figure 1. Relation of enzyme activity measured under standard conditions to enzyme concentration

2.2 脂蛋白脂肪酶活性测定反应时间曲线

同样以重组腺病毒 Ad-hLPL 感染 293A 细胞后培养 24 h 的培养液上清作为标本, 观察不同孵育时

间条件下酶促反应的产物游离脂肪酸量的变化。图 2(Figure 2) 中, 标本用量 75 μ L(标本用量的原则是保证底物分解率不超过 8%), 孵育时间在 90 min 内时, 水解产生的游离脂肪酸的量与反应时间基本呈直线关系。但再延长孵育时间, 产物增加的量减少, 两者不再呈正比关系。这可能是由于反应时间过长时, 部分酶失活所致。

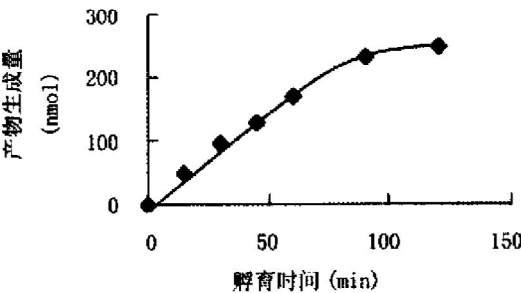


图 2. 反应时间对酶活性的影响
Figure 2. Relation of enzyme activity measured under standard conditions to

2.3 体外培养的 293A 细胞中脂蛋白脂肪酶活性的检测结果

表 1(Table 1) 示感染重组腺病毒 Ad-hLPL 后的 293A 培养细胞中过表达的 LPL 活性。重组腺病毒感染后, 肝素后培养液中的 LPL, 亦即细胞表面的 LPL 活性很高, 而细胞内的 LPL 活性则较低。对照标本, 无论是培养液还是细胞抽提液, LPL 活性都极低。

表 1. 脂蛋白脂肪酶过表达之 293A 培养细胞中的脂蛋白脂肪酶活性检测
Table 1. Lipoprotein lipase activity in 293A culture cells infected by Ad-hLPL

标 本		LPL 活性 (U/L)
对照	培养液(肝素后)	0.35 $\pm$ 0.15
	细胞抽提液	0
感染后	培养液(肝素后)	100.5 $\pm$ 0.57
	细胞抽提液	5.1 $\pm$ 0.07

2.4 小鼠肝素后血浆脂肪酶活性

图 3(Figure 3) 为小鼠肝素后血浆脂肪酶活性测定结果。血浆标本中不仅有肝外组织来源的 LPL, 还有肝组织来源的肝脂肪酶(hepatic lipase, HL)。测得的脂肪酶活性为两者之和的总脂肪酶活性。通过用 1 mol/L 氯化钠冰浴预处理标本 30 min 抑制 LPL

活性, 此时测得的脂肪酶活性代表 HL 活性。由总脂肪酶活性减去 HL 活性得到 LPL 活性。

2.5 小鼠组织标本脂肪酶活性

小鼠心肌组织、脂肪组织以及肝脏组织标本的总脂肪酶活性和 1 mol/L 氯化钠冰浴预处理后的脂肪酶活性见表 2 (Table 2)。组织中的脂肪酶活性以 mU/g 表示。表 2 中“不可抑制”代表 1 mol/L 氯化钠冰浴预处理后的脂肪酶活性。由总脂肪酶活性减去 1 mol/L 氯化钠“不可抑制”的活性得“可抑制”的活性。脂肪和心肌组织中 1 mol/L 氯化钠可抑制活性来源于脂蛋白脂肪酶。肝组织中 1 mol/L 氯化钠不可抑制活性来源于肝脂肪酶。

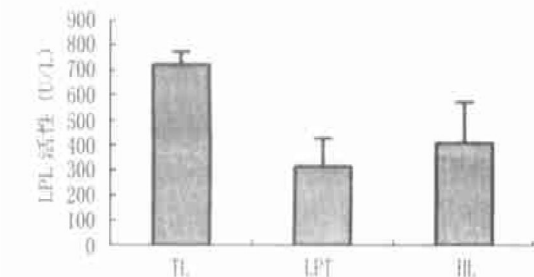


图 3. 小鼠肝素后血浆脂肪酶活性. 图中, TL 为总脂肪酶, HL 为肝脂肪酶。
Figure 3. The LPL activity of post heparin plasma of mice

表 2. 小鼠组织标本脂肪酶活性

Table 2. The lipase activity of various mice tissue samples				
组织类别	n	总脂肪酶活性 (mU/g)	可抑制 (mU/g)	不可抑制 (mU/g)
脂肪	5	60.5 $\pm$ 16.3	60.5 $\pm$ 16.3	0
心肌	5	511 $\pm$ 286	349 $\pm$ 118	162 $\pm$ 154
肝	5	91.2 $\pm$ 41.7	33.8 $\pm$ 26.7	57.4 $\pm$ 20.7

3 讨论

脂蛋白脂肪酶活性测定国内常用滴定法和比色法^[5]。滴定法虽然简便易行, 但其灵敏度差, 终点不易把握, 误差大, 且产物中有酮酸的干扰, 测定结果常偏高。常用的二苯卡巴肼显色法利用二苯卡巴肼与脂肪酸铜盐显红色反应, 通过与标准物比较, 得出样品中游离脂肪酸的含量。虽然显色法测定灵敏度有所提高, 但某些二价金属离子如铅、汞、铁、铬等均可与二苯卡巴肼起反应, 故容易产生干扰。脂蛋白脂肪酶活性测定的放射性同位素标记法, 其测定

灵敏度比显色法又提高了百倍以上,稳定性好,结果准确,是目前国外普遍采用的经典的和可靠的测定方法。我们参考国外报导建立了脂蛋白脂肪酶活性的放射性同位素标记法测定,并初步用于 LPL 体外基因表达的检测,同时测定了正常 C57 小鼠不同组织标本中 LPL 的活性。

在 LPL 体外基因表达活性的检测中,对照细胞培养液标本和对照细胞抽提液标本中 LPL 活性均极低,说明 293A 细胞正常情况下本身并不表达 LPL。在用重组腺病毒 AdhLPL 感染 293A 细胞并培养 24 h 后,培养液标本(肝素后)表现有很高的 LPL 活性,而在细胞抽提液标本中 LPL 活性则较低。因为 LPL 蛋白翻译后须进行糖基化并形成双体后才具有活性。故认为基因表达产生的有活性的 LPL 绝大部分被分泌至细胞外,并通过与细胞表面的硫酸类肝素结合而固定在细胞表面。加入肝素后使 LPL 从细胞表面释放出来。

小鼠是在整体水平研究基因表达最常用的动物模型。为便于今后在整体水平进一步研究 LPL 的基因表达,我们用建立的放射性同位素标记法检测了 C57 小鼠肝素后血浆、心肌组织和脂肪组织 LPL 活性水平,均值分别为 314.3 U/L 以及 349 mU/g 和 61 mU/g。小鼠肝素后血浆 LPL 活性结果高于国外文献报道的 200^[7]、118^[8] 和 110 U/L^[9]。心肌组织 LPL 活性结果稍低于 Goldberg 等^[10] 最新报道结果(400mU/g),但高于国外其它三份文献报道结果(280^[6]、300^[7] 和 316 mU/g^[8])。脂肪组织中 LPL 活性与 Goldberg 等^[10] 报道结果较接近,低于国外其它文献报道的 145^[6]、166^[7] 和 137 mU/g^[8]。从结果中可以看出,血浆中总的脂肪酶活性最高,脂蛋白脂肪酶活性也很高。组织标本中心肌组织的 LPL 活性水平最高。但心肌组织中除 LPL 活性外,还有少量

不能被 1 mol/L 氯化钠抑制的脂肪酶活性,这少部分脂肪酶活性可能来自其它甘油三酯水解酶。另外还检测了小鼠肝脏标本中的脂肪酶活性。肝脏中除其本身产生的 HL 活性外,还有少量可被 1 mol/L 氯化钠抑制的脂肪酶活性。

总之,我们的实验证明,使用建立的放射性同位素标记法测定 LPL 活性是检测 LPL 基因表达产物功能的灵敏、稳定和可靠的方法。

[参考文献]

- [1] Brunzell JD, Iverius PH, Scheibel MS, Fujimoto WY, Hayden MR, McLeod R, et al. Primary lipoprotein lipase deficiency. *Adv Exp Med Biol*, 1986, **201**: 227-239
- [2] Nilsson-Ehle P, Schotz MC. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res*, 1976, **17**: 536-541
- [3] Liu G, Ashbourne-Excoffon KJ, Wilson JE, McManus BM, Rogers QR, Miao L, et al. Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther*, 2000, **11** (1): 21-32
- [4] Liu G, Olivecrona T. Pulse chase study on lipoprotein lipase in perfused guinea pig. *Heart*, 1991, **261** (6 pt 2): H2 044-050
- [5] 张蓉,刘宇,刘秉文. 血浆脂蛋白脂肪酶及肝脂肪酶的比色测定法. 华西医科大学学报, 1996, **27** (1): 106-110
- [6] Haemmerle G, Zimmermann R, Strauss JG, Kratky D, Riederer M, Knipping G, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by affecting the tissue-specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle. *JBC*, 2002, **277** (15): 12 946-952
- [7] Levak-Frank S, Weinstock PH, Hayek T, Verdery R, Hofmann W, Ramakrishnan R, et al. Induced mutant mice expressing lipoprotein lipase exclusively in muscle have subnormal triglycerides yet reduced high density lipoprotein cholesterol levels in plasma. *JBC*, 1997, **272** (27): 17 182-190
- [8] Levak-Frank S, Hofmann W, Weinstock PH, Radner H, Sattler W, Breslow JL. Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol levels. *PNAS*, 1999, **96**: 3 165-170
- [9] Kratky D, Strauss JG, Zechner R. Tissue-specific activity of lipoprotein lipase in skeletal muscle regulates the expression of uncoupling protein 3 in transgenic mouse models. *Biochem J*, 2001, **355** (3): 647-652
- [10] Yagyu H, Lutz EP, Kako Y, Marks S, Hu Y, Choi SY, et al. Very low density lipoprotein (VLDL) receptor-deficient mice have reduced lipoprotein lipase activity. *J Biol Chem*, 2002, **277** (12): 10 037-043

(此文编辑 胡必利)