

刺猬体内低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢途径的比较

沃兴德 G. M. Kostner^① 洪行球 岑利权 李万里 何一中

(浙江中医学院分子医学研究所, 杭州 310009)

The Comparison of Metabolic Pathway both Low Density Lipoprotein and Lipoprotein (a) in the Body of Hedgehog

WO Xing-De, G. M. Kostner^①, HONG Xing-Qiu, CHEN Li-Quan, LI Wan-Li and HE Yi-Zhong

(Molecular Medical Institute, Zhejiang Traditional Chinese Medical College, Hangzhou 310009, China. ^①Institute of Medical Biochemistry, University of Graz, A-8010 Austria)

Aim Study on the metabolic pathway and the interrelation both low density lipoprotein and lipoprotein (a) in the body of the hedgehogs

Methods The purified low density lipoprotein and lipoprotein (a) from the human plasma were obtained by sequence ultracentrifugation and sepharose 6B chromatography. They were injected into the body of the hedgehogs by armpit vein under anaesthesia with ether after they were labelled with Na¹²⁵I tyramine-cellobiose. The animals were put to death 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 hours after low density lipoprotein and lipoprotein (a) were injected. The radioactivity in the blood, liver, kidney, spleen and gall were measured. The results were showed by figures.

Results Low density lipoprotein in the blood has at 1/2 of 15 hours, while lipoprotein (a) has at 1/2 of 45 hours (Figure 1). The levels of low density lipoprotein in the liver present two peaks which appear in 3 and 72 hours after injecting, and was the lowest in 24 hours after injecting; on the contrary the levels of lipoprotein (a) in the liver keep relatively stable (Figure 2). The same result was seen in the gall that the

levels of low density lipoprotein present two peaks, but the second peak move up and the peak was lower. The level of lipoprotein (a) in the gall was same as in the liver (Figure 3). The levels of low density lipoprotein in the kidney same as in the liver. The level of lipoprotein (a) present a peak in 3 hours after injecting, then it goes down and keep relatively stable (Figure 4). The levels of low density lipoprotein in the spleen present single peak which was in 48 hours after injecting. The levels of lipoprotein (a) goes down in 6 to 12 hours and then goes up (Figure 5).

Conclusion The results provide that low density lipoprotein was matabolized through two ways; B or B/E receptor and scavenger path. It is possible that lipoprotein (a) was taken up by passive course or was matabolized by other receptor way.

KEY WORDS Hedgehog; Lipoprotein, low density; Lipoprotein (a); Metabolic pathway

摘要 用序列超速离心和 Sepharose 6B 凝胶柱层析获得人体低密度脂蛋白和脂蛋白(a), 经纤维素二糖酐¹²⁵碘标记后, 从腋下静脉注入刺猬体内, 3、6、12、24、48、72 和 96 h 后分别处死动物, 测量血、肝、肾、脾和胆囊胆汁中放射性同位素含量。发现低密度脂蛋白在血和组织中的代谢速率较脂蛋白(a)快, 出现有规律的二相反应曲线。脾脏对低密度脂蛋白的摄取大于对脂蛋白(a)的摄取 2.5 倍以上, 而脂蛋白(a)在胆囊胆汁中的含量则大于低密度脂蛋白 3 倍以上。因此推测低密度脂蛋白除经载脂蛋白 B 或 B/E 受体代谢外, 尚经清道夫受体途径代谢。脂蛋白(a)可能经被动过程摄取或经其它的受体途径代谢。

关键词 刺猬; 低密度脂蛋白; 脂蛋白(a); 代谢途径

脂蛋白(a)是一种独立的、特殊的血浆脂蛋白,它与低密度脂蛋白的结构和化学组成相似,含有载脂蛋白 B-100 和类似的脂质成份^[1,2],但脂蛋白(a)除含 70% 载脂蛋白 B-100 外,还含有其它脂蛋白所不具有的载脂蛋白(a),载脂蛋白(a)通过二硫键与载脂蛋白 B-100 连接^[3],它的结构与血浆纤溶酶原结构高度同源。近年来发现脂蛋白(a)与低密度脂蛋白一样,与动脉粥样硬化、冠心病和血栓形成有密切的关系^[4]。

低密度脂蛋白的代谢途径已有很多报道^[5,6],由于脂蛋白(a)的结构与低密度脂蛋白相似,因此脂蛋白(a)是否与低密度脂蛋白一样,具有相同的代谢途径和机制,受到研究者极大的兴趣。由于这方面的研究尚少,我们应用同位素标记低密度脂蛋白和脂蛋白(a),注射到刺猬体内,根据不同时间的分布状态分析低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢特点和途径。

1 材料与方法

1.1 脂蛋白分离纯化

400 ml Na_2EDTA 抗凝全血经 $800 \times G$ 离心 20 min 后得到血浆,用 NaBr 调密度至 1.019 g/ml,再在 10°C RP 50T 转头 $115000 \times G$ 离心 20 h,离心后取下层液调密度至 1.060 g/ml,重复超速离心后从上清液中获得密度为 1.019~1.060 g/ml 部分,即为低密度脂蛋白。去除低密度脂蛋白的下层液调密度至 1.12 g/ml,再次超速离心后从上清液中获得密度为 1.060~1.12 g/ml 部分,富含脂蛋白(a)。进一步纯化使用 1.6×90 cm Sepharose 6B 凝胶柱,上样后用 0.15 mol/L NaCl 洗脱,流速为 12 ml/h,洗脱液用核酸蛋白仪检测并记录,每管收集 2 ml 样品,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶免疫双扩散,免疫电泳扩散和免疫印迹法检测,合并纯化的脂蛋白(a), -37°C 保存待用。

1.2 ^{125}I 标记脂蛋白

低密度脂蛋白和脂蛋白(a)根据 Pittman 等^[7]的方法用 40 nmol ^{125}I 碘纤维素二糖与 1 mCi Na^{125}I 在室温反应 30 min,2 mg 脂蛋白与被激活的放射碘纤维素二糖混合室温反应 30 min。标记的脂蛋白过 Sephadex G25 柱,在 NaCl/EDTA 溶液中 4°C 透析过夜,最后在 0.15 mol/L NaCl 中透析除去 EDTA,用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤纸过滤除去微生物,测定其标记的放射性, ^{125}I 标记低密度脂蛋白 24.1 mCi/g 蛋白,游离碘 7.7%; ^{125}I 标记脂蛋白(a) 13.

5 mCi/g 蛋白,游离碘 8.3%。

1.3 实验操作

健康成年刺猬,购于江苏启东县,体重 582 ± 116 g,乙醚麻醉暴露腋下静脉,I 组动物注射低密度脂蛋白 1500 Bq/g 体重;II 组动物注射脂蛋白(a) 1400 Bq/g 体重,注射后 3、6、12、24、48、72 和 96 h 分别处死动物,收取血液,切取肝、胆、肾和脾。用含肝素生理盐水灌洗滤纸吸干称量后用 γ -计数器测定组织放射性含量。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白和脂蛋白(a)在血中的代谢

低密度脂蛋白在血中的清除比脂蛋白(a)快,48 h 后仅占注射后 3 h 量的 11.6%;而脂蛋白(a)占 24.6%。低密度脂蛋白在血中的半衰期约为 15 h,而脂蛋白(a)约为 45 h。Figure 1 显示注射低密度脂蛋白和脂蛋白(a) 3~6 h 血中浓度几乎一致,6 h 后血中清除率才出现明显差异。

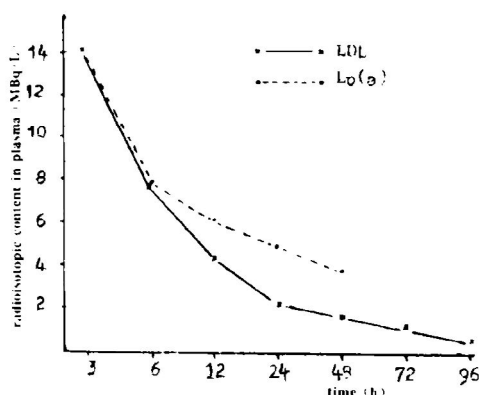


Figure 1. Metabolism of low density lipoprotein and lipoprotein (a) in the blood of hedgehog.

2.2 低密度脂蛋白和脂蛋白(a)在肝脏的代谢

肝对低密度脂蛋白的吸收呈双峰曲线,即注射低密度脂蛋白后肝对其吸收量大,以后逐渐降低,48 h 后又出现一个强的吸收峰,而脂蛋白(a)在 48 h 内吸收始终保持恒定(Figure 2)。

2.3 低密度脂蛋白和脂蛋白(a)在胆囊胆汁中的浓度

胆囊胆汁中的低密度脂蛋白和脂蛋白(a)来自肝脏的分解代谢,当注射低密度脂蛋白后,肝脏吸收大量的低密度脂蛋白,使进入胆囊的量也随之增加,因此出现一个高峰,在以后的时间中低密度脂蛋白在胆囊中的含量降低,48 h后再次出现一个小峰。低密度脂蛋白在胆囊胆汁中的含量与肝脏对低密度脂蛋白吸收的曲线基本相似,同样脂蛋白(a)在胆囊胆汁中的含量也与肝对脂蛋白(a)的吸收基本一致,呈恒定状态。脂蛋白(a)在胆囊胆汁中的含量比低密度脂蛋白在胆囊中的含量高3倍以上(Figure 3)。

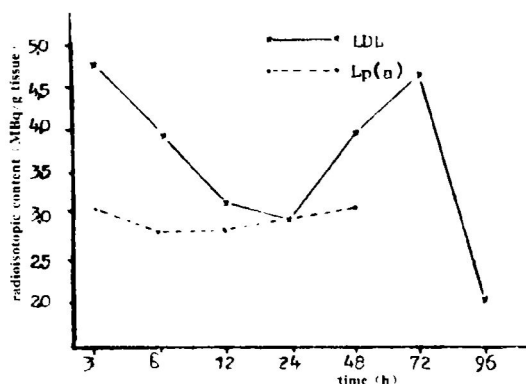


Figure 2. Metabolism of low density lipoprotein and lipoprotein (a) in the lever of hedgehog.

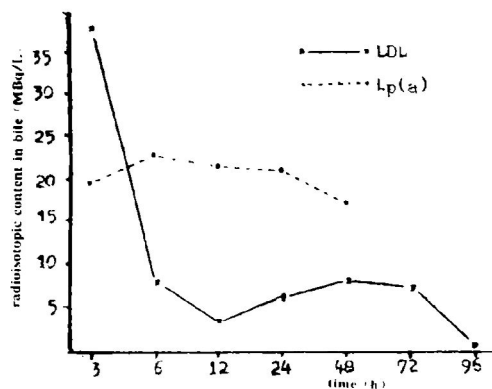


Figure 3. Concentration of low density lipoprotein and lipoprotein (a) in the gall of hedgehog.

2.4 低密度脂蛋白和脂蛋白(a)在肾脏的代谢
肾脏中的低密度脂蛋白的代谢曲线与肝和

胆囊胆汁中的相似,有二个吸收峰,即在注射低密度脂蛋白后3 h和48 h。而脂蛋白(a)的代谢无曲线变化,虽然注射脂蛋白(a)后3 h曾出现吸收峰,但以后各时相肾脏对脂蛋白(a)的吸收均处于相对恒定(Figure 4)。

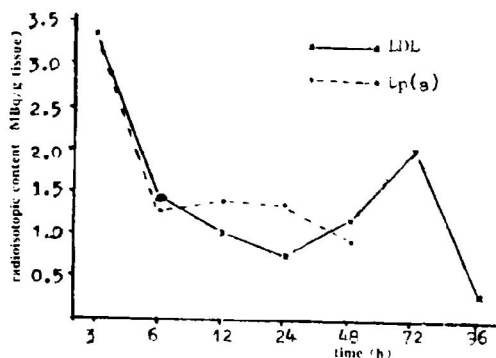


Figure 4. Metabolism of low density lipoprotein and lipoprotein (a) in the kidney of hedgehog.

2.5 低密度脂蛋白和脂蛋白(a)在脾脏的代谢

脾脏对低密度脂蛋白的代谢与肝肾不同,当注射低密度脂蛋白后,脾脏对低密度脂蛋白的吸收逐渐增加,48 h达到最高,以后逐渐降低。脂蛋白(a)在脾脏中的代谢虽有小波动,但也比较恒定,有意义的是脾细胞对低密度脂蛋白的吸收比对脂蛋白(a)的吸收大2.5倍以上(Figure 5)。

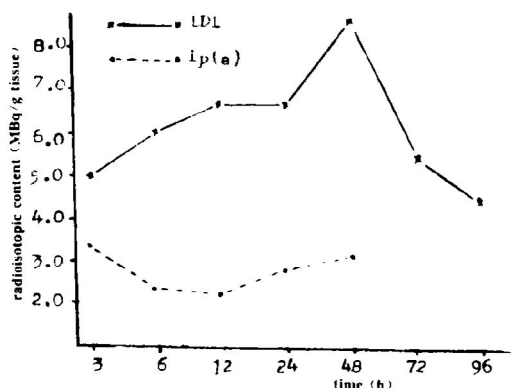


Figure 5. Metabolism of low density lipoprotein and lipoprotein (a) in the spleen of hedgehog.

3 讨论

由于脂蛋白(a)的结构与低密度脂蛋白相似,并且又都是心脑血管疾病的危险因子^[8,9],因此脂蛋白(a)与低密度脂蛋白在组织代谢中是否有相同的机制或者是否通过低密度脂蛋白受体途径代谢受到研究者的极大兴趣。一些学者认为脂蛋白(a)能与低密度脂蛋白受体特异性地结合,至少一部分脂蛋白(a)经低密度脂蛋白受体途径代谢^[10,11],而另一些学者认为脂蛋白(a)不是低密度脂蛋白受体的配体,载脂蛋白(a)与载脂蛋白 B-100 结合后改变了载脂蛋白 B-100 的构象,并且脂蛋白(a)中的载脂蛋白(a)能抑制与低密度脂蛋白受体的结合。但如果脂蛋白(a)经还原后去除载脂蛋白(a)的部分,则具低密度脂蛋白相同的效应,能与低密度脂蛋白受体结合而被细胞摄取降解^[12,13]。

目前发现不是所有的动物都能合成脂蛋白(a),脂蛋白(a)通常存在于灵长类及豚鼠和刺猬血液中^[14],我们利用刺猬作为实验动物,经腋下静脉注射¹²⁵碘纤维素二糖酰胺标记的低密度脂蛋白和脂蛋白(a),此标记物不改变在血中的衰变和影响组织摄取。以此考察低密度脂蛋白和脂蛋白(a)在组织中的代谢状态,分析低密度脂蛋白和脂蛋白(a)可能的代谢途径。

实验证明低密度脂蛋白在血中的清除速率大于脂蛋白(a),96 h 后仅占 3 h 测定量的 2.6%,血中半衰期约为 15 h,而脂蛋白(a)在血中的半衰期约为 45 h。一个明显的特点是低密度脂蛋白在肝肾中的代谢很有规律,呈二相反应,快相反应体现了细胞膜上低密度脂蛋白受体的即时效应,是对大量低密度脂蛋白的主动吸收增加。慢相反应是由于注射低密度脂蛋白后刺激了肝细胞内对胆固醇代谢的机制,使细胞内低密度脂蛋白受体合成增加,新生的低密度脂蛋白受体进入细胞膜表面促进低密度脂蛋白的吸收。低密度脂蛋白在胆囊胆汁中的含量也反映了肝脏对低密度脂蛋白摄取和代谢的规律。脂蛋白(a)在肝肾中的代谢没有曲线变化,注射脂蛋白(a)后的各个时相内肝肾脂蛋白(a)含量处于恒定状态。因此推测脂蛋白(a)与低密度脂

蛋白可能不是同享一个受体,可能是通过一个非饱和性、低亲和力和高容量被动过程摄取,此过程不受饱和和胆固醇的反馈调节。一般认为低密度脂蛋白在血液中参与脂蛋白交换,可被外周组织摄取利用或分解代谢经胆汁排出。脂蛋白(a)不与其它脂蛋白交换,它在血浆中的出现和消失始终呈原样颗粒^[15]。实验发现脂蛋白(a)主要被肝脏摄取,大部分排入胆囊,脂蛋白(a)在胆囊胆汁中的含量比低密度脂蛋白高 3 倍以上,因此经肝脏排入胆囊是脂蛋白(a)的主要代谢途径之一。

低密度脂蛋白代谢除了受体途径外,还有一条不依赖受体的清道夫细胞代谢途径,正常人大约 15% 的血浆低密度脂蛋白每天通过这一途径清除^[6]。实验发现当注射低密度脂蛋白后,脾脏对低密度脂蛋白的摄取逐渐增加,至 48 h 后达到最大量,以后随血中低密度脂蛋白浓度降低脾脏含量也随之降低。脂蛋白(a)在脾脏中的代谢虽有小波动,但基本保持恒定,有趣的是脾脏对低密度脂蛋白的摄取量大于脂蛋白(a) 2.5 倍以上,由此推测脂蛋白(a)可能不经清道夫细胞途径代谢。

综上所述,低密度脂蛋白在血和组织中的代谢速率较脂蛋白(a)快,并且有规则的二相反应曲线,低密度脂蛋白经低密度脂蛋白受体和清道夫细胞途径代谢。而脂蛋白(a)与低密度脂蛋白受体的结合能力很弱,并且不经清道夫细胞途径代谢,因此设想脂蛋白(a)可能经由细胞被动吸收或其它的受体途径代谢,经肝排入胆囊是脂蛋白(a)的主要排出途径之一。

参考文献

- 1 Ehnholm C, Garoff H, Renkonen O, et al. Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochemistry*, 1972, 11: 3 229~232.
- 2 Fless GM, Zum Mellen ME, Scanu AM. Isolation of apolipoprotein (a) from lipoprotein (a). *J Lipid Res*, 1985, 26: 1 224~229.
- 3 Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM, et al. Human plasma lipoprotein (a), structural properties. *J Biol Chem*, 1983, 258: 4 582~589.

- 4 Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, et al. Association of levels of lipoprotein (a), plasma lipid, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation*, 1986, **74**: 785~765.
- 5 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, **232**: 4~47.
- 6 Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, et al. Receptor-mediated endocytosis. *Cell Biol*, 1985, **1**: 1~39.
- 7 Pittman RC, Thomas EC, Christopher K, et al. A radiolabeled, intracellularly trapped ligand for determining the site of plasma protein degradation *in vivo*. *Biochem J*, 1983, **212**: 791~800.
- 8 Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, et al. Lipoprotein (a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 1981, **38**: 51~61.
- 9 Armstrong VW, Cremer P, Eberle E, et al. The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. Dependence on serum LDL levels. *Atherosclerosis*, 1986, **62**: 249~257.
- 10 Krempler FG, Kostner GM, Roscher A, et al. Studies on the role of specific cell surface receptors in the removal of lipoprotein (a) in man. *J Clin Invest*, 1983, **71**: 1 431~441.
- 11 Floren CH, Albers JJ, Biechem EL. Uptake of Lp(a) lipoprotein by cultured fibroblasts. *Biophys Res Commun*, 1981, **102**: 636~639.
- 12 Maartman-K, Berg K. Lp(a) lipoprotein enters cultured fibroblasts independently of the plasma membrane low density lipoprotein receptor. *Clin Genet*, 1981, **20**: 352~362.
- 13 Armstrong VW, Harrach B, Robenek H, et al. Heterogeneity of human lipoprotein Lp(a): cytochemical and biochemical studies in the interaction of two Lp(a) species with the LDL receptor. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 429~441.
- 14 Rath MA, Niendorf T, Reblin M, et al. Detection and quantification of lipoprotein (a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**: 579~592.
- 15 Krempler F, Kostner C, Bolzano K. Turnover of lipoprotein (a) in man. *J Clin Invest*, 1980, **65**: 1 483~490.
- 16 Assmann G. Lipidstoffwechsel und Atherosklerose. In FK Schattauer Verlag Gmb H, Stuttgart, Germany. 1982, 42

(1995-06-12 收到, 1996-01-17 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅲ)

巨细胞病毒	cytomegalovirus, CMV
内皮细胞增殖	endotheliocytosis
气相层析(气相色谱法)	gas chromatography, GC
分层血栓	laminated thrombus, LT
分子遗传学	molecular genetics, MG
分子病理学	molecular pathology
分光光度分析	spectrophotometric analysis
分光光度测定法	spectrophotometry
毛细血管袢	capillary loops, CL
毛细血管脆性试验	capillary fragility test, CFT
牛磺胆酸	taurocholic acid, TA
牛磺胆酸生成	taurocholanopoiesis
牛磺胆酸钠	sodium taurocholate, ST
牛血清白蛋白	bovine serum albumin, BSA
心肌缺血	myocardial ischemia, MI

(胡必利编写)