

低密度脂蛋白受体抑制剂对低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢的影响

沃兴德 G. M. Kostner^① 洪行球 岑利权

(浙江中医学院分子医学研究所, 杭州 310009)

Effects of Low Density Lipoprotein Receptor Inhibitor on the Metabolism of Low Density Lipoprotein and Lipoprotein (a)

WO Xing-De, G. M. Kostner^①, HONG Xing-Qiu and CHEN Li-Quan

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

ABSTRACT

Aim We used hedgehogs to study the effects of low density lipoprotein-receptor inhibitor on the metabolism of low density lipoprotein and lipoprotein (a) with 125 iodine.

Methods Low density lipoprotein receptor inhibitor, Lactoferrin and receptor associated protein were used to inject into the body of hedgehogs via the armpit vein 2 minutes before the 125 iodine low density lipoprotein or 125 iodine lipoprotein (a) were injected. The animals were put to death in 6 h. The radioactivity in the blood, liver, kidney, spleen, gall and adrenal were measured.

Results Experiments showed that the low density lipoprotein receptor were inhibited by lactoferrin and receptor associated protein. The concentration of low density lipoprotein were decreased over 11.7%~86.7% in respectively compared with control group. However, the take up of lipoprotein (a) in organs had not been inhibited, on the contrary it increases the take up of lipoprotein (a) by the lactoferrin and receptor associated protein. The value of increasing was about 40%~120%.

Conclusions The results indicated that lipoprotein (a) lose the capability to bind low density lipoprotein receptor since the configuration of lipoprotein (a) was changed in binding apolipoprotein (a) with apolipoprotein B100 although the construction and composition were similar with low density lipoprotein that they all contain the apolipoprotein B100. It was inferred that lactoferrin and receptor associated protein could activate other mechanism on the cell membrane and favoured the lipoprotein (a) into the cells.

KEY WORDS Hedgehog; Low density lipoprotein; Lipoprotein (a); Lactoferrin; Receptor associated protein

摘要 应用低密度脂蛋白受体抑制剂乳酸肝褐质和受体结合蛋白经刺猬腋下静脉注入, 2 min 后注射¹²⁵I-低密度脂蛋白或¹²⁵I-脂蛋白(a), 6 h 后处死, 测定血、肝、肾、脾、胆汁和肾上腺的放射活性。实验发现: 乳酸肝褐质和受体结合蛋白均能抑制低密度脂蛋白受体活性, 使各组织摄取低密度脂蛋白分别降低 15%~86% 以上, 但乳酸肝褐质和受体结合蛋白对脂蛋白(a)的组织摄取不但无抑制作用, 反而能使脂蛋白(a)进入组织量增加, 激活率分别达 40%~126%。实验结果说明: 脂蛋白(a)虽然与低密度脂蛋白结构相似, 含有 70% 载脂蛋白 B100, 但由于与载脂蛋白(a)以二硫键的形式连接, 改变了空间结构, 失去了与低密度脂蛋白受体结合的能力, 并且推测乳酸肝褐质和受体结合蛋白在抑制低密度脂蛋白受体的同时, 可能激活了细胞膜的其它机制, 从而利于脂蛋白(a)进入细胞内。

关键词 刺猬; 低密度脂蛋白; 脂蛋白(a); 乳酸肝褐质; 受体结合蛋白

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体是一个参与细胞膜 LDL 转运的膜蛋

^①奥地利格拉茨大学医学生物化学研究所

白,除了 LDL 受体外,近年发现 LDL 受体相关蛋白(receptor related protein, LRP)也能促进乳糜微粒(chylomicrons, CM)残余颗粒和 β -极低密度脂蛋白(β -very low density lipoprotein, β -VLDL)在组织中的代谢。上述二种受体都存在于细胞膜上,它们相互作用并调节脂蛋白代谢。但它们的作用又有所区别,LRP 是一个多功能受体,能结合富含载脂蛋白 E 的脂蛋白(CM 和 β -VLDL)。而 LDL 受体主要与富含载脂蛋白 B100 的 LDL 结合^[1]。从牛奶中提取的乳酸肝褐质能与 LRP 结合,并且能抑制 LDL 受体和 LRP 活性,抑制肝对 CM 残余颗粒的清除^[2]。受体结合蛋白(receptor associated protein, RAP)共存于合成 LDL 受体和 LRP 的细胞中。主要存在于细胞内,可能与细胞内受体组装和转运有关,它与细胞表面的 LRP 具有高的亲和力。能抑制配体和受体的结合,从而抑制 CM、VLDL 和 LDL 进入细胞。因此它被认为是受体的负调节剂^[3]。脂蛋白(a)与 LDL 结构和组成相似,它们是否共享同一类受体进行代谢,目前尚无定论。我们采用刺猬从静脉给乳酸肝褐质(lactoferrin, LF)和 RAP 后,再注入 125 I-LDL 或 125 I-脂蛋白(a),观察受体抑制剂对 LDL 和脂蛋白(a)代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 脂蛋白分离纯化

抗凝血经离心后得到血浆,通过序列超速离心获得 $d=1.019\sim 1.060$ kg/L 部分,即为 LDL。 $d=1.060\sim 1.12$ kg/L 部分,再经凝胶过滤后获得纯化的脂蛋白(a)。经免疫双扩散和免疫印迹试验验证后, -37°C 保存待用^[4]。

1.2 125 I-标记脂蛋白

根据 Pittman 等^[5]的方法用 125 I-纤维素二糖酐标记低密度脂蛋白和脂蛋白(a)。纤维素二糖酐(40 mmol/L)与 Na^{125}I (1 mCi)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酐混合室温反应 30 min。标记的脂蛋白过 10 ml Sephadex G25 柱,对抗 NaCl -EDTA 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜,最后经 0.15 mol/L NaCl 透析除去 EDTA,用 0.45 μm 滤膜过滤去除微生物,测定其标记的放射活性为: 125 I-LDL 24.1 mCi/g 蛋白,游离

碘 7.7%; 125 I-脂蛋白(a) 13.5 mCi/g 蛋白,游离碘 8.3%。

1.3 受体结合蛋白的处理

受体结合蛋白由奥地利格拉茨大学 Kostner 教授提供,50 mg RAP 放在 30 ml 50% 的甘油中(含 300 mg 白蛋白), -20°C 保存。实验前 2 天置室温下加 0.5 kg/L 盐酸胍和 154 mg/L 二硫苏糖醇室温下在氮气中温和搅拌孵育 30 min,装入透析袋,10 mmol/L PBS 透析液中加少量二硫苏糖醇在氮气中搅拌多次换液透析 2 天,充分除去盐酸胍和甘油,最后用 10 mmol/L PBS 透析一次,透析完毕后马上用于实验。

1.4 实验操作

健康成年刺猬,购于江苏启东县,体重 340 ± 49 g。分成 6 组:LDL 组,LDL+LF 组,LDL+RAP 组,脂蛋白(a)组,脂蛋白(a)+LF 组和脂蛋白(a)+RAP 组。乙醚麻醉暴露腋下静脉,LDL 组注射 LDL 1.4 kBq/g 体重;LDL+LF 组注射 LF 50 mg/只,2 min 后再给 LDL 1.4 kBq/g 体重;LDL+RAP 组注射 RAP 12.5 mg/只,2 min 后再注射 LDL 1.4 kBq/g 体重;脂蛋白(a)组注射脂蛋白(a)1 150 Bq/g 体重;脂蛋白(a)+LF 组注射 LF 50 mg/只,2 min 后再给脂蛋白(a)1 150 Bq/g 体重;脂蛋白(a)+RAP 组注射 RAP 12.5 mg/只,2 min 后再注射脂蛋白(a)1 150 Bq/g 体重。注射后 6 h 处死动物(处死前 1 min 腋下静脉注射肝素,便于组织灌注)收取血、切除肝、肾、脾、胆囊和肾上腺,用含肝素的生理盐水灌注,滤纸吸干称重后用 γ -计数器测定组织放射性,每组实验结果为二只动物平均值,表内值用 Bq/g 组织表示。

2 结果

2.1 乳酸肝褐质对低密度脂蛋白代谢的影响

从 Table 1 中可见应用 LF 能使 LDL 受体和 LRP 的活性降低,使 LDL 进入各组织器官的量明显减少,尤其是胆汁和肾脏中的 LDL 含量,分别减少 86.7% 和 45.3%。表明乳酸肝褐质有抑制 LDL 受体和 LRP 活性的作用。

2.2 受体结合蛋白对低密度脂蛋白代谢的影响

从 Table 2 中可见,应用 RAP 后,LDL 进入各组织器官的量与应用 LF 一样降低,降低幅度为 11.7%~78.6%,尤其是在胆汁和脾脏中($P<0.05$)。

Table 1. The effect of lactoferrin (LF) on the metabolism of the low density lipoprotein.

Organ	LDL (a)	LDL+LF (b)	(b-a)/a (%)
liver	3 424	2 824	-17.5
gall	8 415	1 119	-86.7
kidney	2 642	1 446	-45.3
spleen	8 098	6 912	-14.6
adrenal	3 119	2 549	-18.3
blood	6 551	5 743	-12.3

Table 2. The effect of the receptor associated protein (RAP) on the metabolism of the low density lipoprotein.

Organ	LDL (a)	LDL+RAP (b)	(b-a)/a (%)
liver	3 424	2 620	-23.5
gall	8 415	1 803	-78.6
kidney	2 642	2 027	-23.3
spleen	8 098	5 165	-36.3
adrenal	3 119	2 287	-26.7
blood	6 551	5 783	-11.7

Table 3. The effect of lactoferrin on the metabolism of the lipoprotein (a).

Organ	Lp(a) (A)	Lp(a)+LF (B)	(B-A)/A (%)
liver	855	1 161	35.8
gall	3 225	7 301	126.4
kidney	1 050	1 510	43.8
spleen	1 041	2 185	109.9
adrenal	810	1 376	69.9
blood	4 142	6 578	58.8

2.3 乳酸肝褐质对脂蛋白(a)代谢的影响

从 Table 3 可见应用 LF 不但没有通过抑制 LDL 受体活性和 LRP 活性使脂蛋白(a)在各组织器官内的含量减少;相反,各组织器官对脂蛋白(a)的摄取量大大增加,增加率在 35.8%~126.4%,尤其是在脾脏和胆汁中。

2.4 受体结合蛋白对脂蛋白(a)代谢的影响

从 Table 4 可见应用 RAP 不但没有通过抑制 LDL 受体和 LRP 的活性使脂蛋白(a)在组织内的含量减少,相反,各组织器官对脂蛋白(a)的摄取量大大增加,增加率在 41.0%~95.8%之间,尤其是脾脏对脂蛋白(a)的摄取量增加了 95.8%。由于肝对脂蛋白(a)的摄取量增加了 60.5%,使胆汁中脂蛋白(a)的含量也增加了 68.7%。

Table 4. The effect of the receptor associated protein on the metabolism of the lipoprotein (a).

Organ	Lp(a) (A)	Lp(a)+RAP (B)	(B-A)/A (%)
Liver	855	1 372	60.5
gall	3 225	5 440	68.7
kidney	1 050	1 637	55.9
spleen	1 041	2 038	95.8
adrenal	810	1 251	54.4
blood	4 142	5 842	41.0

3 讨论

脂蛋白(a)与 LDL 的结构和化学组成极其相似,均含有载脂蛋白 B100 和类似的脂质成份。开始人们认为它是 LDL 的基因变种^[6,7]。但脂蛋白(a)除了含有 70%载脂蛋白 B100 外,还含有其它脂蛋白所不具有的载脂蛋白(a),它通过二硫键与载脂蛋白 B100 连接^[6]。近年来发现高脂蛋白(a)与动脉粥样硬化、冠心病和血栓形成有密切关系,是心脑血管疾病的危险因素^[9,10]。因此,脂蛋白(a)与 LDL 在组织代谢中是否有相同的机制或者是否都通过相同的受体途径代谢引起研究者极大兴趣。一些学者认为脂蛋白(a)能与 LDL 受体特异地结合,至少一部分脂蛋白(a)经 LDL 受体途径代谢^[11,12]。而另一些学者认为脂蛋白(a)不是 LDL 受体的配体,载脂蛋白(a)与载脂蛋白 B100 结合后改变了后者的构象,而前者能抑制与 LDL 受体的结合。但如果脂蛋白(a)经还原后除去载脂蛋白(a),剩下的部分具有 LDL 相同的生物学效应,能与 LDL 受体结合被细胞摄取降解和利

用^[13,14]。我们曾用¹²⁵I-LDL和¹²⁵I-脂蛋白(a)给刺猬静脉注射后,进行3~96h组织代谢动态观察,发现LDL与脂蛋白(a)的代谢途径完全不同,脂蛋白(a)可能是通过细胞被动吸收或其它受体途径代谢^[4]。

为了进一步鉴别LDL和脂蛋白(a)的代谢途径,我们选用LDL受体和LRP的抑制剂LF和RAP经动物静脉先于¹²⁵I-LDL和¹²⁵I-脂蛋白(a)2min注射入刺猬体内,观察LF和RAP对LDL和脂蛋白(a)组织摄取的影响。实验发现LF和RAP对LDL的组织摄取作用相同,均有明显的抑制作用,各组织的抑制率在17.5%~86.7%之间,尤其是肝脏对LDL的摄取明显降低,同时导致胆汁中的LDL含量大大地降低。比对照组动物低5倍左右,应用LF和RAP后,脾脏对LDL摄取也降低,而且RAP的抑制作用强于LF,推测受体抑制剂对清道夫受体途径也有一定的抑制作用。由于巨噬细胞表面缺少LDL受体而富含LRP,因此RAP的抑制作用更明显,但有趣的是给予LF和RAP对脂蛋白(a)的代谢分布情况则相反。LF和RAP能抑制LDL受体和LRP活性,但不能阻止脂蛋白(a)进入组织细胞,反而使脂蛋白(a)在各组织中的含量增加,肝脏在对脂蛋白(a)摄取增加的同时,使胆汁中的脂蛋白(a)含量明显增加。尤其是脾脏对脂蛋白(a)的摄取增加100%左右,说明脂蛋白(a)代谢可能不是通过LDL受体和LRP途径,LDL受体抑制剂不影响脂蛋白(a)进入细胞内,推测LF和RAP在对LDL受体和LRP抑制的同时激活了细胞的其它途径,使脂蛋白(a)更容易进入细胞。实验为探索脂蛋白(a)的细胞膜受体途径提供了线索。

参考文献

- Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, et al. Low density lipoprotein receptor related protein and GP 330 bind similar ligands, including plasminogen activator inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem*, 1992, **267**(36): 26 172~180.
- Van Dijk MC, Ziere GJ, Boers W, et al. Recognition of chylomicron remnants and beta-migrating very low density

lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver alpha Z-macroglobulin recognition site. *Biochem J*, 1991, **279**(3): 863~870.

- Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, et al. Organ distribution in rats of two members of the low density lipoprotein receptor gene family, gp300 and LRP/alpha 2MR, and the receptor associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem*, 1994, **423**(4): 531~542.
- 沃兴德, Kostner GM, 洪行球, 等. 刺猬体内低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢途径的比较. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4**(1): 35~39.
- Pittman RC, Thomas EC, Christopher K, et al. A radioiodinated intracellularly trapped ligand for determining the side of plasma protein degradation in vivo. *Biochem J*, 1983, **212**: 791~800.
- Enholm C, Garoff H, Renkonen O, et al. Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochemistry*, 1972, **11**: 3 229~232.
- Fless GM, Zum Mallen ME, Scanu AM. Isolation of apolipoprotein(a) from lipoprotein(a). *J Lipid Res*, 1985, **26**: 1 224~229.
- Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM, et al. Human plasma lipoprotein (a), structural properties. *J Biol Chem*, 1983, **258**: 4 582~589.
- Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, et al. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 1981, **38**: 51~61.
- 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.
- 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.
- Floren CH, Albers JJ, Biechem EL. Uptake of Lp(a) lipoprotein by cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Res Commun*, 1981, **102**: 636~639.
- Martmann-Moc K, Berg K. Lp(a) lipoprotein enters cultured fibroblasts independently of the plasma membrane low density lipoprotein receptor. *Clin Genet*, 1981, **20**: 352~362.
- 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.

(1995-09-18收到, 1996-05-18修回)