

## 猪肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合蛋白的研究

黄以兰<sup>①</sup> 庄庆祺 吴满平 梅美珍

(上海医科大学药学院生物化学教研室, 上海 200032)

### Study of High Density Lipoprotein Binding Protein from Swine Adrenal Cortical Cell Membrane

HUANG Yi-Lan, ZHUANG Qing-Qi, WU Man-Ping and MEI Mei-Zhen

(Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To study the existence of high density lipoprotein (HDL) receptor in the cell membrane, and this may be provided the evidence for study of HDL receptor function.

**Methods** HDL binding protein was prepared from fresh swine adrenal cortical cell membranes, and purified with affinity chromatography. The soluble membrane protein was analyzed by ligand blotting.

**Results** The dot blotting showed that the membrane protein possessed high affinity with HDL, and western blotting suggested that the molecular weight (MW) of the binding protein by affinity chromatography is 77 kDa. The characters of the HDL binding protein was measured by biotin-avidin enzyme linked immunosorbent assay (BA-ELISA):  $K_d = 21.6 \text{ mg/L}$ ,  $B_{\max} = 678.2 \text{ } \mu\text{g/g}$  protein.

**Conclusion** It is showed that the condition of affinity chromatography was moderate, and the purified swine adrenal cortical cell membrane possessed high affinity with HDL.

**KEY WORDS** Swine adrenal cortical cell membrane; High density lipoprotein binding protein; Biotin-avidin enzyme linked immunosorbent assay col-

loidal gold

**摘要** 为鉴定猪肾上腺皮质细胞膜是否存在高密度脂蛋白结合蛋白,并研究其特性,从新鲜猪肾上腺皮质细胞膜提取高密度脂蛋白结合蛋白,应用亲和层析法将其初步纯化。获得的可溶性蛋白经 Ligand blot 结合分析和 Dot blot 法测定,结果发现此膜蛋白与高密度脂蛋白有高度亲和力,用 Western blot 法测得该蛋白的分子量为 80 kDa,亲和层析提取得到的结合蛋白分子量为 77 kDa。应用生物素-亲和素酶联免疫吸附试验测定该蛋白的结合特性:平衡解离常数( $K_d$ )= $21.6 \text{ } \mu\text{g/g}$ ,最大结合量( $B_{\max}$ )= $678.2 \text{ mg/L}$  蛋白。结果提示纯化的猪肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合蛋白具有很高的亲和力,证明亲和层析法条件温和。

**关键词** 猪肾上腺皮质细胞膜;高密度脂蛋白结合蛋白;生物素-亲和素酶联免疫试验;金胶体

1976 年 Gwynne JT 等<sup>[1]</sup>首先提出大鼠肾上腺皮质细胞膜表面具有与高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 高亲和力的部位。以后人们相继发现人肝细胞<sup>[2]</sup>、人纤维母细胞<sup>[3]</sup>、胎盘<sup>[4]</sup>和血小板<sup>[5]</sup>等组织均存在高密度脂蛋白受体。但也有学者对高密度脂蛋白受体的存在持不同看法<sup>[6]</sup>,并且否定高密度脂蛋白受体在“胆固醇逆向转运”中的作用<sup>[7]</sup>。目前,已从分子水平和细胞水平上对高密度脂蛋白受体进一步进行研究揭示动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的形成机理,为防治 As 提供理论依据。本文对猪肾上腺皮质细胞膜的高密度脂蛋白结合蛋白的分离纯化及其特性进行了研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

<sup>①</sup>研究生,现在福建省计划生育科学研究所

猪肾上腺(上海龙华肉联厂), Sepharose CL-4B (Pharmacia), 硝酸纤维素纸(浙江黄岩人民化工厂), HAuCl<sub>4</sub>(上海试剂一厂), 活化生物素(上海东风生化试剂厂), 亲和素-辣根过氧化物酶(本校基础部汪乃经教授提供), 高密度脂蛋白抗血清(上海生物制品研究所)。

## 1.2 无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白的制备

参考 Chuang<sup>[8]</sup>和 Tyler 等<sup>[9]</sup>超速离心法制得高密度脂蛋白, 然后采用亲和层析法去除载脂蛋白 E。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法鉴定无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白的纯度。

## 1.3 猪肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合蛋白的部分纯化

**1.3.1 猪肾上腺皮质细胞膜的初步提取** 参考 Fidge 等<sup>[10]</sup>和 Ferrei 等<sup>[11]</sup>法, 将新鲜猪肾上腺用冷生理盐水冲洗, 然后加入五倍体积的 20 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl(含 1 mmol/L PMSF)缓冲液, 用高速分散器于冰浴中匀浆(15 s, 5 次), 1 000 g 离心 20 min, 取上清液, 于 100 000 g 离心 1 h, 取沉淀加入五倍体积 0.25 mol/L Tris-马来酸缓冲液(含 1 mmol/L PMSF), 用分散器匀浆(15 s, 2 次)。60 W 超声粉碎(30 S, 2 次), 加入等体积 0.9% NaCl(含 2% Triton X-100)溶液, 4℃放置 2 h。100 000 g 离心 1 h, 取中层可溶性蛋白部分, 对 PBS 透析。4℃保存, 在两周内应用。

**1.3.2 结合蛋白分子量的测定** 参考 Karibauri 等<sup>[12]</sup>法进行。

**1.3.2.1 高密度脂蛋白金胶体的制备** 参考李月彬等<sup>[13]</sup>法在临用前制备。

**1.3.2.2 膜蛋白的 Ligand blot 结合分析** Dot blot 参考 Rocch 等<sup>[14]</sup>法进行。硝酸纤维素纸浸泡于 50 mmol/L pH 7.4 的 PBS 中, 用前固定于 96 孔抽滤加样器中, 加入不同浓度膜蛋白溶液, 抽滤后取出硝酸纤维素纸, 室温晾干。膜蛋白加入等体积非还原性样品溶解液, 直接进行 SDS-PAGE。蛋白浓度调节至约 10 µg/L。上样量 100 µg 膜蛋白/孔, 稳流电泳, 浓缩胶电流 20 mA, 分离胶电流 40 mA。

Western blot 参考 Towbin 等<sup>[15]</sup>法进行。稳压转移电泳, 电压 5~6 V/cm, 4℃电泳 12 h, 电泳结束后, 硝酸纤维素纸浸泡于 0.05 mol/L pH 7.4 PBS 中, 4℃过夜去除 SDS。

Dot blot 和 Western blot 所得吸附有膜蛋白的硝酸纤维素纸于封闭缓冲液(60 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L NaCl, 0.4% BSA, pH 8.0)中, 室温下于印迹

摇床上振摇 1 h。然后加入含有 20 mg/L 高密度脂蛋白-金胶体的孵育缓冲液(60 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.2% BSA, pH 8.0)中振摇 1 h, 移入 37℃水浴中振荡 30 min, 用重蒸馏水冲洗后进行银染色。7.5 mL 40 mmol/L AgNO<sub>3</sub> 中加入 10 mL pH 3.85 的 1 mol/L 柠檬酸缓冲液, 20 mL 重蒸馏水, 最后加入 7.5 mL 0.5 mol/L 对苯二酚混匀, 组成银染色液。将硝酸纤维素纸浸入此混合液, 反应 5~10 min, 硝酸纤维素纸用蒸馏水冲洗干净, 于暗处晾干。

## 1.3.3 亲和层析纯化猪肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合蛋白及结合实验

10 mL Sepharose CL-4B 用溴化氰活化, 加入无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白约 50 mg, 4℃搅拌反应 20 h, 加入 1 mL 乙醇胺盐酸盐溶液(pH 9.0), 继续反应 4 h, 用蒸馏水洗去未反应物, 然后加 pH 7.4, 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液(含 0.05% Tween-20)平衡。在凝胶中加入膜蛋白粗提液 30 g/L, 搅拌反应 3 h, 装柱(1.0 cm×10 cm), 用 0.05 mol/L pH 7.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(含 0.05% Tween-20), 缓冲液洗脱至 A<sub>280</sub> nm 小于 0.002, 换以 0.05 mol/L pH 7.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(含 0.05% Tween-20)及 0.05 mol/L NaCl 缓冲液洗脱, 收集蛋白峰, 对相同缓冲液透析并浓缩。收集到的膜蛋白用碳酸盐缓冲液(pH 9.0)调节至 25 mg/L, 40 孔酶标板每孔以 100 µL 包被, 37℃保温 2 h, 4℃放置过夜。用 10 mol/L pH 7.4 PBS(含 0.05% Tween-20)洗涤 3 次, 每次 3 min, 加入生物素-无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白 100 µL, 37℃保温 2 h, 洗涤, 加入 100 µL 抗生物素-辣根过氧化物酶原液, 37℃保温 30 min, 加入底物液 100 µL, 反应 10 min, 加入 100 µL 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 490 nm 比色。25 mg/g 抗体包被酶标板, 相同条件下作标准曲线。

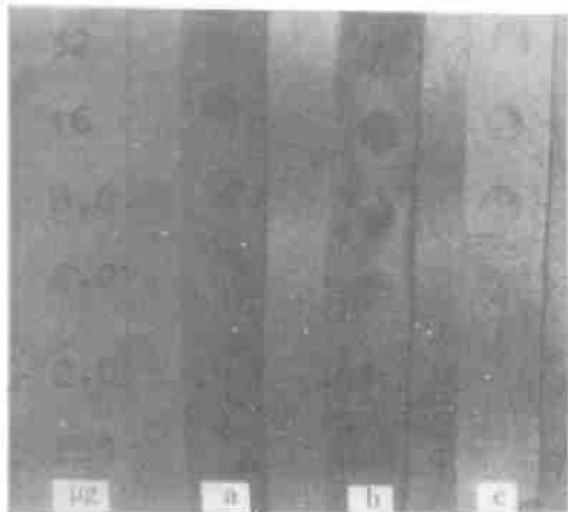
用 SDS-PAGE 鉴定经亲和层析纯化的猪肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合蛋白, 方法同前。

## 2 结果

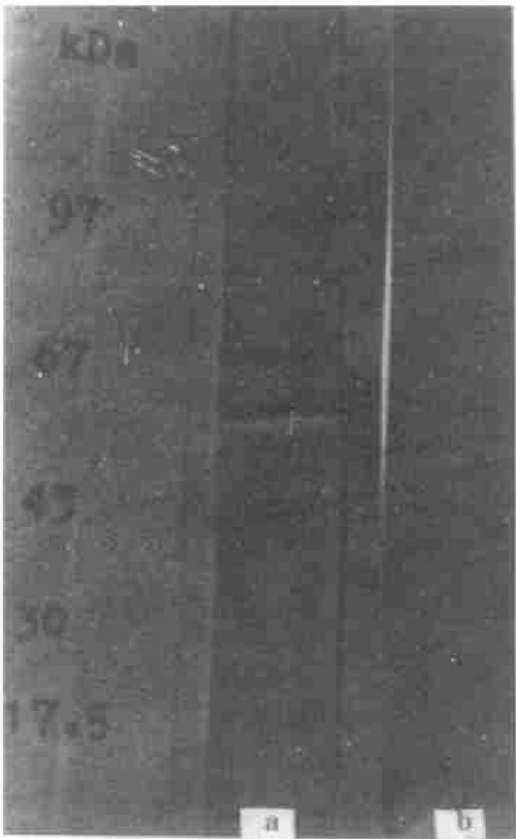
### 2.1 无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白的制备与鉴定

用肝素-Sepharose CL 4B 亲和层析法制备无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白, 洗脱所得的第一个峰经 SDS-PAGE 鉴定为无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白。亲和层析不仅可去除载脂蛋白 E, 同时也可除去部分杂质蛋白。所制得的无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白中主要载脂蛋白为载脂蛋白 AI, 其分子量为 27 kDa 左右, 其它载脂蛋白含

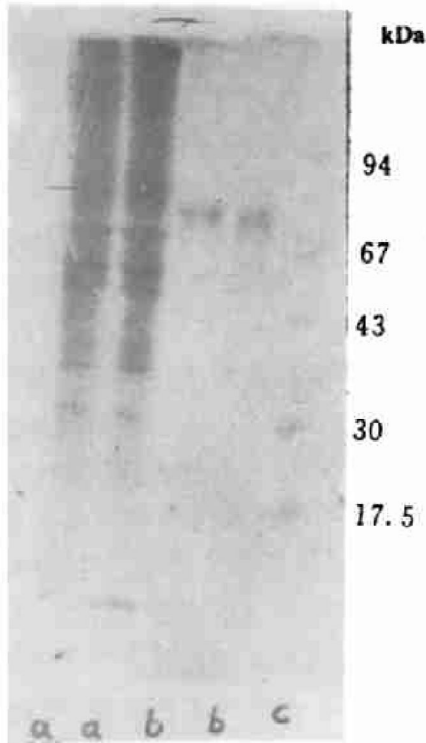
量很少。



**Figure 1. Dot-blotting analysis for swine adrenal cortical membrane protein.** (a) Binding of apo E-free-HDL-gold conjugate to membrane protein; (b) Effect of 10 times of unmodified LDL added; (c) Effect of 10 times unmodified HDL added.



**Figure 2. Western-blotting of swine adrenal cortical membrane protein and followed by clloidal gold-apoE-free HDL conjugate incubation and silver staining** (a) Low molecular weight standards; (b) Membrane protein SDS-PAGE; (c) HDL binding band.



**Figure 3. SDS-PAGE of the protein unpurified (a), the protein purified by affinity chromatography (b) and low molecular weight standards (c).**

2.2 猪肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合

蛋白初步纯化与鉴定

2.2.1 Dot blot 分析 从图 1(Figure 1)可见,随着膜蛋白量的增加,颜色逐渐加深。另外在保温时加入过量未标记 LDL 对实验结果影响不大,而过量的未标记高密度脂蛋白则可大大降低无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白金胶体与膜蛋白的结合。这表明粗提的细胞膜可溶性蛋白中存在有与高密度脂蛋白特异结合的成份。

2.2.2 Western blot 分析 从图 2(Figure 2)可见,初步纯化的膜蛋白与无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白—金胶体保温,发现仅有一条带可与无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白—金胶体结合,其分子量约为 80 kDa,此结果与文献[9]报道相符。

2.2.3 亲和层析提取物的鉴定 亲和层析

提取的高密度脂蛋白结合蛋白经 SDS-PAGE 鉴定,分子量约为 77 kDa。此蛋白与 Western blot 所观察到的条带可能是同一物质(图 3, Figure 3)。

### 2.3 膜蛋白与高密度脂蛋白的结合特性

亲和层析提取的蛋白质与生物素一无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白结合的剂量饱和曲线见图 4(Figure 4)。从图中可以看出,亲和层析所提取的膜蛋白对生物素一无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白有高度亲和力,牛血清白蛋白在相同条件下只有较低的非特异性吸附。

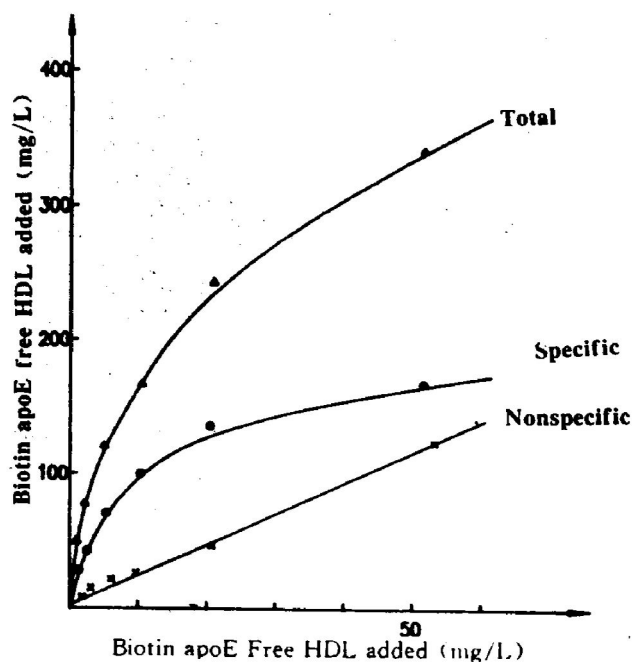


Figure 4. Binding curves for biotin-apoE-free HDL binding to rat hepatocytes.

将实验数据经回归分析作 Scatchard 图(Figure 5),其线性相关系数  $r=0.95$  ( $P<0.01$ ),相关性显著。由此求得平衡解离常数( $K_d$ ) = 21.6 mg/L, 最大结合量 ( $B_{max}$ ) = 678.2 mg/g 结合蛋白。

### 3 讨论

本文采用垂直转头超速离心,分离到较纯的高密度脂蛋白,并用肝素-亲和层析法制得无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白,该无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白符合实验所需要求,证明这种制备

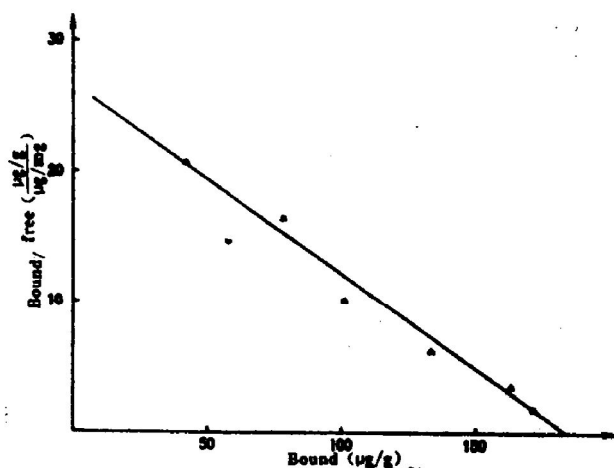


Figure 5. The scatchard analysis of the specific binding obtained in Figure 4.

方法较为经济实用,可以大大缩短离心时间。

Fidge NH 等<sup>[10]</sup>曾报道羊肾上腺皮质细胞膜蛋白中有一分子量为 78 kDa 的条带可与高密度脂蛋白特异地结合,此条带可特异地识别载脂蛋白 A I 和 A II。本文采用金胶体标记法研究高密度脂蛋白受体,胶体金标记抗体是近十多年来免疫组织化学迅速发展起来的一项免疫标记技术。试验中采用凝聚法制备金溶胶,通过控制还原剂柠檬酸三钠的量使形成的胶体金颗粒直径在 10 nm 以下,这样胶体金与高密度脂蛋白颗粒吸附后,不致对高密度脂蛋白的活性造成太大的影响。从本文结果可以看出,粗提的猪肾上腺皮质细胞膜蛋白中的某些成分对高密度脂蛋白具有亲和力。过量的未修饰高密度脂蛋白对这种结合有较大抑制作用,而 LDL 则影响不大,提示猪肾上腺皮质细胞膜中的高密度脂蛋白结合蛋白具有专一性。Western blot 结果得到一个分子量约为 80 kDa 的结合条带,与文献报导的不同动物肾上腺皮质细胞膜高密度脂蛋白结合蛋白分子量相符。据此推测,不同动物的肾上腺皮质细胞膜中高密度脂蛋白结合蛋白可能具有某些相同的特性。

通过无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白-Sepharose CL 4B 亲和层析法提取得一个蛋白成分,其分子量约为 77 kDa,它可与生物素-无载脂蛋白 E 高密度脂蛋白特异地结合,经 BA-酶

标法测定,具有较高的亲和力。说明这种提取方法条件较为温和,能较好地保留高密度脂蛋白结合蛋白的活性。通过以上高密度脂蛋白结合蛋白的粗筛、初步分离纯化以及特性测定,我们可以初步确定,猪肾上腺皮质细胞膜中存在有与高密度脂蛋白高亲和力的特异蛋白成分,其特性与功能值得进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Gwynne JT, Mahaffee D, Brewer HB, et al. Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins, regulation by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**: 4 329.
- 2 Schouten D, Kleinherenbrink Sting MF, Brouwer A, et al. Characterization in vitro of interaction of human apolipoprotein E-free high density lipoprotein with human hepatocytes. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**: 1 127.
- 3 Oram JF, Brinton EA, Bortsm EL, et al. Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscles cells. *J Clin Invest*, 1983, **72**: 1 611.
- 4 Keso, Lukka M, Ehnholm C, et al. Apolipoprotein A-I-binding protein from human term placenta: purification and partial characterization. *FEBS Lett*, 1987, **215**: 105.
- 5 Elisabeth K. Lipoprotein-binding protein in the human platelet membrane. *FEBS Lett*, 1986, **200**: 97.
- 6 Mendel CM, Kunitake ST, Hong K. Radiation inactivation of binding site for high density lipoprotein in human liver membranes. *Biochem Biophys Acta*, 1988, **961**: 188.
- 7 Mendel CM, Kunitake ST. Cell surface binding sites for high density lipoproteins do not mediate efflux of cholesterol for human fibroblasts in tissue culture. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 171.
- 8 Chuang BH, Wilkinson T, Geer JC, et al. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins; rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 171.
- 9 Tyler CR, Lubberink K. Identification of four ovarian receptor proteins that bind vitellogenin but not other homologous plasma lipoproteins in the rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *J Comp Physiol B*, 1996, **166**(1): II~26.
- 10 Fidge NH. Identification of HDL binding protein from adrenal cortical membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, **129**: 759.
- 11 Ferrei K, Menon KM. Characterization and isolation of a HDL-binding protein from bovine corpus luteum plasma membrane. *Biochem J*, 1992, **287**(pt3): 841~848.
- 12 Kambouris AM, Roach PD, Ivestel DJ, et al. Demonstration of a high density lipoprotein (HDL)-binding protein in HepG2 cell using colloidal gold-HDL conjugates. *FEBS Lett*, 1988, **230**: 176.
- 13 李月彬,吴满平,梅美珍,等. 细胞膜上高密度脂蛋白(HDL)结合蛋白的鉴定. *生物化学与生物物理学报*, 1992, **24**: 23.
- 14 Roach PD, Zollinger M, Woel SP, et al. Detection of the low density lipoprotein (LDL) receptor on nitrocellulose paper with colloidal gold-LDL conjugates. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 1 515.
- 15 Towbin H, Staehelin T, Gordon J, et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4 350.

(1997-05-24 收到, 1997-09-12 修回)