

几种哺乳类动物胸主动脉中的蛋白聚糖

张春玲 张英珊 赵培真*

邓卓霖

(中国医学科学院心血管病研究所生化研究室, 北京 100037)

(广西医学院病理教研室)

提 要

本文报道了北京(As 高发)、广西南宁(As 低发)两地区的人、兔(“易感”As)及狗(“不易感”As)胸主动脉中三种蛋白聚糖(CSPG, DSCSPG 及 HSPG)的含量。结果表明: a. 广西南宁样品的总 PGs, HSPG 及 DSCSPG 含量均高于北京, 尤以 HSPG 差异显著。b. 兔、狗胸主动脉 PG 总量均低于人的。其中 HSPG, CSPG 含量及百分率以及兔的 DSCSPG 含量亦低于人的相应 PG 含量, 而狗的 DSCSPG 含量与人的类似。c. 南宁人及狗的 DSCSPG 含量及相对百分率虽高, 但其 DSCSPG 中 DS 链所占相对百分率低于北京人和兔的。以上结果提示动脉壁 PG 质与量的差异可能与 As 发病有关。

关键词 蛋白聚糖、糖胺聚糖, 动脉粥样硬化

前 言

早在 1856 年, Virchow 就注意到动脉粥样硬化(As)病灶中基质增多^[1], 现已知蛋白聚糖(PG)即为 Virchow 所说基质中的重要成分。以往的研究已发现动脉壁中 PG 的结构单位糖胺聚糖(GAG)含量随 As 的发展而改变^[2], 并有作者^[3]提出 As 斑块中脂蛋白沉积是继发于动脉壁基质的变化, 但对 PG 的有关报道则甚少。在体内 GAG 主要是与蛋白质共价结合为 PG, 而发挥其重要生理功能, 所以对 PG 大分子的研究更为重要。本文利用本实验室建立的提取、分离及鉴定 PG 的方法^[4], 研究了几种哺乳类动物胸主动脉中 PG 质与量的异同, 试图探讨动脉壁 PG 在 As 高发、低发地区的人群及 As 易感、不易感的兔及狗的胸主动脉中的含量、组成上的差异, 以期对了解 PGs 在 As 发病中的作用有所裨益。

材 料 和 方 法

1. 试剂 详见参考文献[4]。

2. 材料及方法^[4] 收集(1)人: 死后24h内尸检的109例主动脉(右半, 1—6肋间, 年龄

15—39岁)。北京52例(男33, 女19); 广西南宁57例(男41, 女16); (2)兔: 24只(青紫蓝, 体重2—3kg)处死后即刻取胸主动脉, 因量少将8只兔的胸主动脉混合为一份, 故实测3份样品; (3)狗: 5条(杂种, 青壮, 体重13—17kg)处死后即刻取胸主动脉。均剥去外膜, 取内-中膜, 用蒸馏水洗净、滤纸吸干、剪碎(约1mm × 2mm), 称重后浸入一定量(3ml)含蛋白酶抑制剂的4mol/L 盐酸胍提取液中, -30℃保存备用(南宁样品置装有干冰的容器中运至北京)。分析时, 先将样品迅速解冻, 加入上述提取液(样品: 提取液 = 1:15g/ml), 搅拌提取72h(4℃), 离心, 取上清透析后, 用一定量(10—15ml)先经 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析, 以 8mol/L 尿素, 0.05 mol/L NaAc, 内含 0.15—1.5mol/L NaCl, 梯度洗脱, 分部收集, 各管测电导及糖醛酸(PG量以糖醛酸表示), 经 HONO 及软骨素酶鉴定^[4], 在 0.23—0.30mol/L NaCl 洗脱的峰为 HSPG, 将在 0.35—0.45mol/L NaCl 洗脱的主峰收集, 以 95% 乙醇(样品: 乙醇 = 1:3 V/V)沉淀浓缩后, 再以

* 系中国医学科学院心血管病研究所病理科。

Sephrose CL-4B 柱层析,可分为 dI 及 dII 两个峰,经碱性氢硼化钠处理后分离出的 GAG 再以软骨素酶 ABC、ACII 降解及乙酸纤维素薄膜电泳^[4]鉴定在排阻部位洗脱的峰 (PG-dI) 为 CSPG, 在进入部位的峰 (PG-dII) 为 DSCSPG (为 DS 及 CS 的杂聚体), 后者电泳图谱扫描计算出硫酸皮肤素 (DS) 及硫酸软骨素 (CS) 的相对百分率。

结果与讨论

我们发现两地区的人群及兔、狗胸主动脉中 PG 的 DEAE-Sephacel 柱层析谱和各峰洗

脱的 NaCl 浓度基本类似 (图略, 见参考文献 4)。d 峰再用 Sephrose CL-4B 柱进一步分离, 全部北京样品及 50 例 (50/57) 南宁样品能较好地分成两个峰 (PG-dI 及 PG-dII, 图略, 见参考文献 4)。

经鉴定证明, 两地区的人群、兔及狗胸主动脉中至少含有三种 PG, 即硫酸乙酰肝素-PG (HSPG), 硫酸软骨素 PG (CSPG) 及硫酸皮肤素-硫酸软骨素 PG (DSCSPG)。PG 分析结果 ($M \pm SD$) 见表 1。乙酸纤维素薄膜电泳图谱扫描结果见图 1 和表 2。

以往工作发现不同动物的动脉壁各种

表 1 几种哺乳类动物胸主动脉壁中的 PG 含量¹⁾及相对百分率
Table 1 Contents¹⁾ and relative percentages of aortic proteoglycans of several species of mammals ($X \pm SD$)

种 属 Species	PG						
	PGs总量 Total	HSPG	%	CSPG	%	DSCSPG	%
人 (Man) 北京 (Beijing)	2610.6 $\pm$ 681.3 (52)	484.6 $\pm$ 165.4 (52)	18.6 $\pm$ 4.1	1306.0 $\pm$ 446.5 (52)	49.9 $\pm$ 9.9	820.0 $\pm$ 322.4 (52)	31.6 $\pm$ 10.0
人 (Man) 南宁 (Nanning)	3027.6 $\pm$ 814.5 ²⁾ (57)	677.3 $\pm$ 254.8 ³⁾ (57)	22.3 $\pm$ 5.2 ³⁾	1249.5 $\pm$ 475.9 (50)	43.0 $\pm$ 13.3 ²⁾	1015.0 $\pm$ 436.0 ¹⁾ (50)	34.6 $\pm$ 12.0
兔 (Rabbit)	1372.2 $\pm$ 61.5 (3)	152.9 $\pm$ 35.0 (3)	11.2 $\pm$ 2.5	640.2 $\pm$ 26.5 (3)	46.7 $\pm$ 3.0	579.0 $\pm$ 87.4 (3)	42.1 $\pm$ 5.1
狗 (Dog)	1408.4 $\pm$ 207.5 (5)	115.7 $\pm$ 50.2 (5)	8.4 $\pm$ 3.8	491.5 $\pm$ 63.4 (5)	35.1 $\pm$ 3.4	801.0 $\pm$ 171.8 (5)	56.5 $\pm$ 6.1

1) PG 含量以 μg 糖醛酸/g 内中膜湿重表示。
与北京人群样品相应 PG 比较: 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$, 4) $P < 0.05$ 。
1) Proteoglycans were presented as μg hexuronic acid/g wet weight of intima-media.
vs the corresponding PG of Beijing man: 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$, 4) $P < 0.05$ 。

GAG 的含量随种属、年龄及动脉种类而异^[5], As 易感动物主动脉中的 GAG 含量比不易感动物高^[6], 且有人^[2]将 As 病变分为 I-IV 级, 比较各级病变中 GAG 含量, 发现动脉内膜的 C6-S, HS 随病变严重化而下降, 而 DS 则上升, 动脉中膜 GAG 总量于 I-III 级病变时上升, IV 级病变时又降至 I 级水平, 近十余年来随方法学的进展, 开始转向对动脉壁完整 PG 大分子的研究, 发现从牛、马及人动脉中分离出的 PG 其成分及分子量不同^[7]。但因

方法不同, 结果不易比较。我们用同一种方法^[4]分别对几种哺乳类动物的胸主动脉 PG 进行分析, 发现人胸主动脉总 PG, 及三种不同 PG 的含量均高于兔及狗胸主动脉中的含量, 兔与狗的总 PG, 量差异虽不大, 但 HSPG, CSPG 及 DSCSPG 含量却有所不同, 狗胸主动脉中 HSPG, CSPG 含量较低, 唯 DSCSPG 含量则高于兔胸主动脉中的 (样品数量较少, 未计算 P 值)。两地区人胸主动脉 PG 分析结果的统计学处理提示: 在同一地区内不同

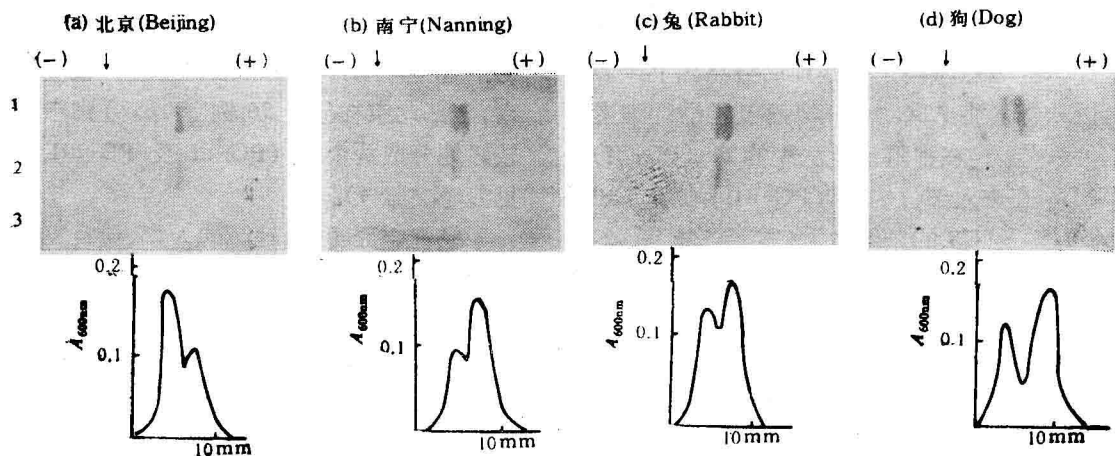


图1 DSCSPG 中 GAG 乙酸纤维素膜电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of GAG in DSCSPG on cellulose acetate

上: 电泳图谱 1. 碱水解后, 2. 软骨素酶 AC-II 消化后, 3. 软骨素酶 ABC 消化后
下: 带1的光密度扫描图谱 ↓: 原点

Upper: Electrophoretogram 1. After alkaline hydrolysis, 2. After chondroitinase AC-II digestion, 3. After chondroitinase ABC digestion
Lower: Densitometric scanning of No. 1 ↓: (Origin)

表2 几种哺乳类动物胸主动脉 DSCSPG 中 DS 及 CS 的相对百分率

Table 2 Relative percentages of DS and CS in aortic DSCSPG of several species of mammals

种 属 Species	样品 Sample	DSCSPG			
		DS		CS	
		%	均数 average	%	均数 average
人 (Man) 北京 (Beijing)	1 ¹⁾	60.2	64.1	39.8	35.9
	2 ¹⁾	68.0		32.0	
人 (Man) 南宁 (Nanning)	1 ¹⁾	32.0	36.5	67.5	63.5
	2 ¹⁾	40.5		59.5	
兔 (Rabbit) ²⁾	1	41.7		48.3	
狗 (Dog)	1	32.3		67.7	

1) 每一个为 8—11 例样品混合后的电泳谱。

2) 兔 DS 及 CS 电泳谱 CS 带与 DS 带不能清晰地分开, 重叠区域扫描占 10.0%。

1) Each sample was a pooled DSCSPG from 8—11 thoracic aortas.

2) The separation of CS and DS was not good, the overlapping area in densitometric scanning was 10.0%.

年龄及性别胸主动脉 PG 未见显著差异, 故只分地区进行 t-检验, 发现广西南宁样品的总 PG, HSPG (及相对百分率) 及

DSCSPG 的量均高于北京样品, 尤以 HSPG 差异显著。而且广西南宁地区人胸主动脉 DSCSPG 中 DS 相对含量低, 而 CS 含量高于北京地区的人、兔及狗 DSCSPG 样品中的相应含量, 有趣的是南宁人和狗的 DSCSPG 样品中的 DS、CS 的百分含量近似。

HSPG 普遍存在于各种类型细胞的表面, 它可激活脂蛋白脂酶及抗凝等, 近年来国外报道 HS 随 As 加重而减少, 随 As 病变消退而增加^[7]。还有作者^[8]发现人主动脉 HS 含量随胆固醇含量的增高而降低, 且从细胞膜 HSPG 中分离出的 HS 能抑制动脉平滑肌细胞增生, 故 HS(HSPG) 含量的增高可能是抑制平滑肌细胞增生因素之一, 而平滑肌细胞增生对 As 斑块的发生极为重要。国内八十年代心血管病理及流行病学调查发现北方的 As 检出率和冠心病发病率均高于南方, 所以南宁样品中 HSPG 含量较高是否与 As 低发有关尚待深入研究。

早期的研究就曾提示人主动脉中 DS 含量与脂纹的严重程度平行^[9], 高脂膳食可使恒河猴动脉壁中 DS 明显增高, 并与动脉胆固醇的

增高呈正相关^[9]。近年来还有学者^[10]发现人主动脉脂纹病变部位的 CSPG 低,而 DSCSPG 高于正常部位,在体外 DS (或 DSPG) 与血浆 LDL 结合成不溶性复合物的能力最强,可能有促使 LDL 沉积于动脉壁或有促进 As 病变的作用^[10]。部分样品电泳图谱扫描结果提示,南宁人和狗的 DSCSPG 中 DS 相对百分率接近且明显低于北京人及兔的含量,似也与南宁为 As 低发区,狗为 As 不易感动物一致。但南宁人及狗样品中的 DSCSPG 量高于北京人及兔,则很可能是由于其 CS 含量高所致。

本文报道的 As 高发(北京)与 As 低发(广西南宁)区的人群及 As 易感(兔)与不易感(狗)动物胸主动脉 PG 异同的初步结果,未见国内外有报道,这一问题值得深入探讨。

参 考 文 献

- 1 张英珊,丛祥凤,张春玲等,生物化学与生物物理学报,

1987;19: 261

- 2 Stevens PL, Colombo M, Gonzales JJ *et al.* *J Clin Invest*, 1976; 58: 470
- 3 Radhakrishnamurthy B, Ruiz HA, Dalferes ER *et al.* *Atherosclerosis*, 1978; 29: 25
- 4 张英珊,丛祥凤,朱志敏等. 生物化学与生物物理学报,1987;19: 253
- 5 张英珊,见:吉林医学院科研处编,医学资料选编(动脉粥样硬化学术论文汇编),吉林:吉林医学院科研处,1985;15: 31.
- 6 Mancini M, Rossi G B, Oriente P *et al.* *Nature*, 1965; 207: 1206
- 7 郭明,张英珊,陈国芬. 生物化学杂志,1988;4: 307
- 8 Schmidt A, Vischer P, Völker W *et al.* In: Hauss WH *et al.* eds. *Modern Aspects of the pathogenesis of Arteriosclerosis*, Germany: Verlag, 1989; 121
- 9 Wagner WD, Salisbury BGJ. *Lab Invest*, 1978; 39:322
- 10 Iverius PH. *J Biol Chem*, 1972; 247: 2607

[本文于1990年9月10日收到,1991年1月

14日修回]

PROTEOGLYCANS IN AORTAS FROM SEVERAL SPECIES OF MAMMALS

Zhang Chunling, Zhang Yingshan, Zhao Peizhen

(Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037)

Deng Chuolin

(Guang Xi Medical College)

ABSTRACT

For the study on the relationship between arterial proteoglycans (PG_s) and atherosclerosis (As), PG_s of aortic intima-media of man (from Beijing with higher and Nanning in Guang Xi province with lower prevalence of As), rabbit and dog were separated successively on DEAE-Sephacel ion exchange and gel filtration column chromatography. Three types of PG, namely heparan sulfate PG(HSPG), chondroitin sulfate PG (CSPG) and dermatan sulfate-chondroitin sulfate PG(DSCSPG) were characterized and quantitated. Glycosaminoglycans from DSCSPG were run on cellulose acetate membrane and the relative percentages of DS and CS were calculated densitometrically on stained strips.

The results revealed: 1. The contents of total PG_s, HSPG and DSCSPG in Nanning sample were significantly higher than the corresponding ones in Beijing sample; 2. The contents of total PG_s in aortas of rabbit and dog were lower than that of man, among which the contents and relative percentages of CSPG, HSPG of rabbit and dog, the content of DSCSPG of rabbit were also lower than that of corresponding PG in man; while the DSCSPG content of dog were similar to Nanning man; 3. Lower relative percentages of DS in DSCSPG from Nanning man and dog in comparing with those from either Beijing man or rabbit even though the content and relative percentage of DSCSPG of Nanning man and dog were higher.

(continued on page 463)

有独特的识别特性,为此,我们就选用了 N250 和 BuGR1 这两种识别 GR 不同部位的 Mab. 同时,由于甾体激素受体的 DNA 结合区高度同源,而其免疫活性区则存在明显的差异^[12],为了避免可能的交叉反应,先用 N250 纯化 GR,然后再用 BuGR1 进行 ELISA 检测,就能提高检测的特异性. 实验结果(图 2)表明,本法的特异性是很好的.

在没有 GR 标准品的条件下,我们以 GR_{IR}/GR_B 分析 GR 蛋白分子和 GR 结合活性的关系,并由此求得 GR_{IR} 扫描值/mg 蛋白. 为了保证精确性,我们取 5 个点回归,在样品不够时,可在充分预实验的基础上,作 2—3 个点,从而求得 GR_{IR} 扫描值,相对反映 GR_{IR} 的水平.

由于 Mab 所检测的是受体蛋白的免疫活性,这对受体这种极易失活的敏感蛋白来说无疑具有很大的优越性,尤其是对病理情况下受体变化的研究有着重要意义. 受体纯化浓缩后,可以先保存起来待以后检测,也可以把大批标本先纯化制备其浓缩液,然后再集中进行 ELISA 检测. 本法的缺点是只能测定出 GR_{IR} 的相对含量,同时检测的灵敏度也不如放射配体结合法.

关于免疫活性受体的测定,一般采用放射

免疫法,最近朱迅等报导用放免法测定 IL-2 受体就是一例^[13]. 但是放免法的建立需要消耗较多量的 Mab, 还需要有受体的标准品,本方法是在不具备这两个条件的情况下建立的. 鉴于用 Mab 检测受体的工作国内正在起步,多数实验室可能尚不具备上述这两个条件,因此,本方法对国内当前受体的免疫检测研究有一定的参考意义.

本文承蒙张世民和张鲁榕两同志的大力协助,特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Okret S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; **81**: 1609
- 2 Eisen L P *et al.* *J Biol Chem*, 1985; **260**: 11805
- 3 Eisen H J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; **77**: 3893
- 4 徐仁宝等. 科学通报, 1983; (3): 178
- 5 徐仁宝等. 第二军医大学学报, 1981; (3): 161
- 6 裘丽珠等. 上海免疫学杂志, 1988; (2): 118
- 7 Grandics P *et al.* *Endocrinology*, 1982; **111**: 1731
- 8 Westphal H M *et al.* *EMBO J*, 1982; **1**: 1461
- 9 Gametchu B *et al.* *Endocrinology*, 1984; **114**: 274
- 10 Jane T *et al.* *J Pathol*, 1986; **150**: 227
- 11 Robertson N M *et al.* *Biochem J*, 1987; **246**: 55
- 12 杨义力. 生物化学与生物物理进展, 1988; (15): 330
- 13 朱迅等. 中华核医学杂志, 1990; (1): 36

[本文于1990年7月18日收到, 10月22日修回]

(continued from page 451)

As HSPG and DSPG were known to be antiproliferative to arterial smooth muscle cells and of higher binding affinity to plasma low density lipoprotein respectively, the above results might be implicated in the lower prevalence of As in Nanning man and "resistant" co As of dog.

Key words proteoglycan, atherosclerosis, glycosaminoglycan