

大鼠肝细胞膜高密度脂蛋白受体的研究*

张林华 刘秉文 蓝天鹤

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

提 要

以 125 碘标记不含 apoE 的人 HDL₃ 为配体, 采用简便的聚乙二醇沉淀分离法, 建立了纯化的大鼠肝细胞膜 HDL 受体分析法, 并对膜 HDL 受体的性质进行了研究。

关键词 HDL 受体, 肝细胞膜, 放射分析

已发现, 在人及动物的肝、肾上腺、卵巢、脂肪等组织细胞膜上存在可特异结合高密度脂蛋白 (HDL) 的受体^[1-9], 它不同于已知的 LDL 受体及 apoE 受体^[10,11]。不同组织细胞 HDL 受体的生理功能可能不同, 肝外组织 HDL 受体介导细胞内胆固醇流出^[1]; 肝细胞 HDL 受体则介导细胞摄取 HDL 中的胆固醇, 并转化为胆汁排泄^[6]。最近 Fidge 等^[8]及 Graham 等^[9]测定 HDL 受体分子量为 78000—110000 道尔顿。HDL 在胆固醇逆行转运中起着重要的作用, 血浆 HDL 含量升高与动脉粥样硬化的发生呈负相关。因此, 深入研究细胞膜 HDL 受体的特性对阐明动脉粥样硬化形成的机理及其防治有重要意义。我们在国内首先建立了纯化的大鼠肝细胞膜 HDL 受体放射分析法, 并着重对膜 HDL 受体的一些结合特性进行了研究。

材 料 与 方 法

一、材料

Sprague Dawley 大鼠由本校实验动物中心提供。正常人血清采自献血员。Na¹²⁵I, 无载体, 北京原子能研究院产品。牛血清白蛋白 (BSA, 电泳纯), 中科院生物物理所产品。人血清白蛋白购自上海生物制品研究所。聚乙二醇 (PEG) 分子量 6000, 分析纯, 日本进口分装。

胰蛋白酶, Difco 进口分装。牛 γ -球蛋白, 本室陈曼玲教授赠。

二、方法

1. 大鼠肝细胞膜的分离纯化

蔗糖密度梯度超速离心法^[12]纯化大鼠肝细胞膜。收集 37%—41% 蔗糖密度界面膜成分, 用缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L CaCl₂) 稀释后, 于 10000×g 离心 20min。收集沉淀, 加少量缓冲液, 在 MSE-150 型超声波仪上处理 2×15s, 振幅 16。然后分装成小瓶于 -70℃ 冻存。膜产率为每 g 湿肝组织 1.0—1.2mg 膜蛋白。与肝匀浆比较, 5'-核苷酸酶 (5'-AMPase) 比活力提高 14 倍; 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 比活力降低 24 倍, 或不能测出。

部分纯化大鼠肝细胞膜参照 Kovanen 等^[13]的方法进行。

2. 血清脂蛋白的分离与标记

人血清极低密度脂蛋白 (VLDL, d. 1.006), 低密度脂蛋白 (LDL, d. 1.0400—1.0560), HDL₂ (d. 1.0800—1.1100) 及 HDL₃ (d. 1.1200—1.1750) 按一次性密度梯度超速离心法^[14]分离。

不含 apoE-HDL₃ 参照 Mitchel 等^[15]方法制备, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定不含 apo

* 国家“七·五”重点科技攻关资助项目。本文曾在第六次全国生物化学学术会议上报告。

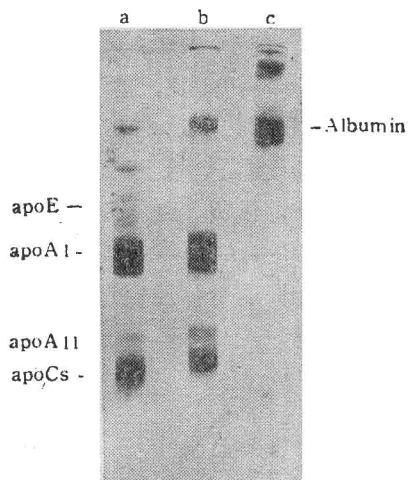


图1 不含 apoE HDL₃ 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

a. 脱脂 HDL₃ (80μg) b. 脱脂不含 apoE HDL₃ (80μg) c. 人血清白蛋白 (60μg)

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of apoE-deficient HDL₃

a. 80μg of delipidated HDL₃; b. 80μg of delipidated apoE-deficient HDL₃; c. 60μg of human serum albumin

(载脂蛋白) E (图1)。

用 IC1 法制备 ¹²⁵I 标记的不含 apoE-HDL₃ (简称为 ¹²⁵I-HDL₃)^[10], 其比放射性为 45—180 cpm/ng, 游离碘及脂质标记率分别小于 1% 及 4%。 ¹²⁵I-HDL₃ 蛋白质与 ¹²⁵碘原子比例为 1:0.007—0.08。

3. 受体结合实验

反应介质由 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 100mmol/L NaCl, 0.5mmol/L CaCl₂ 及 15mg/ml BSA 组成; 加入膜蛋白 25—50μg 以及 ¹²⁵I-HDL₃ (6—16 μg/ml) 后, 总体积为 100μl。反应混合物于 0—4℃ 保温 90min。保温结束后, 加入 30μg 牛 γ-球蛋白及 0.4ml 预冷的 16% (W/W) PEG, 于漩涡振荡器上充分混匀后, 4℃ 静置 25min, 3000r/min 离心 15min, 吸弃上清液, 沉淀于 γ-谱仪上计数测定。非特异性结合 (NSB) 管加入过量 25 倍非标记的不含 apoE-HDL₃, 空白管不加膜蛋白。上述各管平行操作测定。总结合 (TB, 不含非标记 HDL₃) 减去非特异性结合后即为特异性结合 (SB)。各数据均为二次或三次测定的均值。

4. 其它测定方法

蛋白质含量按 Markwell 等法^[14]测定, 以 BSA 为标准。 5'-AMPase 及 G-6-pase 分别参照修改的 Widnell^[15] 及 Hubscher 等^[16] 的方法测定。 SDS-PAGE 按本室常规方法进行。

结 果

一、影响肝细胞膜 HDL 受体放射分析法若干因素的探讨

1. 聚乙二醇分离 B/F

实验发现, 受体反应系统中 BSA 为 15mg/ml 为宜; PEG 最终浓度为 12.5% 可有效沉淀分离 ¹²⁵I-HDL₃-膜蛋白复合物。总结合量中 94% 以上为特异性结合。加入牛 γ-球蛋白及加 PEG 后静置 20—30min 可增加 B/F 分离效果。

2. 膜蛋白量对 ¹²⁵I-HDL₃ 与肝细胞膜结合的影响

4℃ 保温 90min, 加入膜蛋白量 0—60 μg 时, ¹²⁵I-HDL₃ 与肝细胞膜的特异结合成较好比例关系, 超过 100μg 可使 NSB 增加 (图2)。

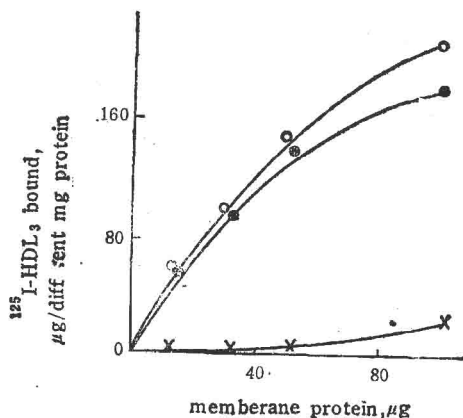


图2 膜蛋白量对肝细胞膜 HDL 受体的影响

Fig. 2 Effect of membrane protein concentration on the binding of ¹²⁵I-labeled HDL₃ to liver plasma membranes

○—○: TB ●—●: SB ×—×: NSB

3. 保温时间对 ¹²⁵I-HDL₃ 与肝细胞膜结合的影响

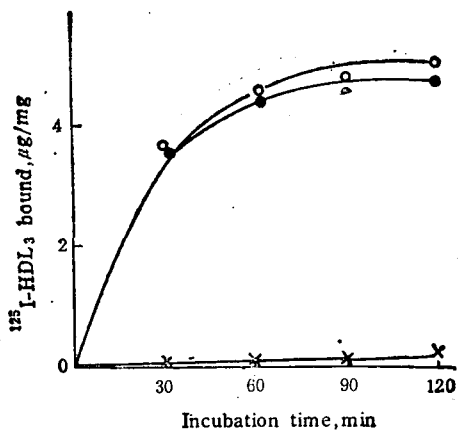


图3 保温时间对肝细胞膜 HDL 受体的影响
Fig. 3 Effect of incubation time on the binding of ^{125}I -labeled HDL₃ to rat liver plasma membranes.

○—○: TB ●—●: SB ×—×: NSB

反应液中加入 $25\mu\text{g}$ 膜蛋白, 4°C 保温 60 min, ^{125}I -HDL₃ 与肝细胞膜的结合即可趋于平衡状态, 且可持续至少 1h (图 3)。因此选择保温时间 90min。

二、肝细胞膜 HDL 受体结合特性的研究

1. 饱和实验及 Scatchard 作图

由图4可见, ^{125}I -HDL₃ 随其浓度增加与肝

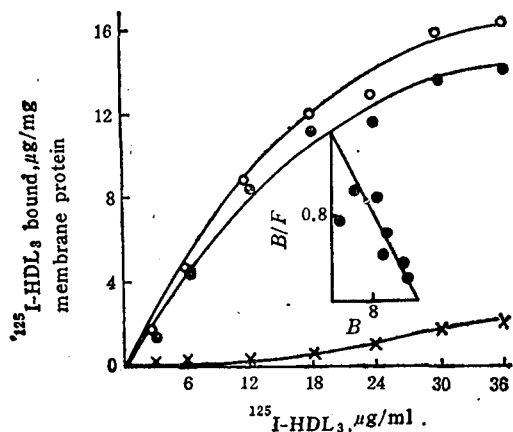


图4 肝细胞膜 HDL 受体饱和曲线及 Scatchard 作图分析

Fig. 4 Binding of ^{125}I -labeled HDL₃ to rat liver plasma membranes ($25\mu\text{g}$) at 4°C for 90 min

○—○: TB ●—●: SB ×—×: NSB

Insert is the Scatchard plot of the specific binding

细胞膜的总结合及特异性结合均呈可饱和趋势。将特异结合用于 Scatchard 作图 (插图) 分析为直线, $r = -0.907$, 解离常数 k_d 为 $14.50 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$ ($16.6 \times 10^{-8} \text{mol/L}$, HDL Mw 1.75×10^5 , 蛋白含量 50% 计; $\bar{x} \pm S. D$, 下同); 最大结合容量 B_{max} 为 $15.6 \pm 6.75 \mu\text{g/mg}$ 膜蛋白。表明 ^{125}I -HDL₃ 与肝细胞膜的结合为一可饱和和高亲和性的受体反应过程, 且受体结合位点间无协同效应。

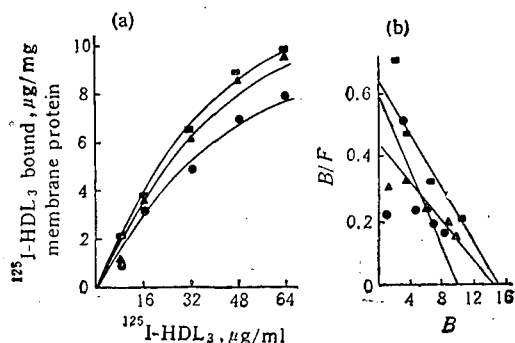


图5 温度对肝细胞膜 HDL 受体的影响

Fig. 5 Effect of incubation temperature on the ^{125}I -HDL₃ binding to rat liver plasma membranes ($50\mu\text{g}$)

●—●: 4°C ▲—▲: 22°C ■—■: 35°C

(b) is the scatchard plot of the specific binding

2. 反应温度的影响

$50\mu\text{g}$ 膜蛋白存在时, 4°C , 22°C 及 35°C 分别保温 90min, 随 ^{125}I -HDL₃ 浓度增加, 其与肝细胞膜的特异结合均可趋于饱和状态 (图 5a)。其 k_d 值分别为 14.08、31.10 及 $25.20 \mu\text{g/ml}$; B_{max} 分别为 9.76、14.4 及 $15.5 \mu\text{g/mg}$ 膜蛋白 (图 5b)。

3. 特异性

固定反应液中膜蛋白为 $25\mu\text{g}$, ^{125}I -HDL₃ 为 $10\mu\text{g/ml}$, 以非标记人 HDL₃、VLDL、LDL、白蛋白以及大鼠 HDL 进行竞争结合反应, 结果显示 (图 6), 非标记人 HDL₃ 过量 ^{125}I -HDL₃ 2 倍即可抑制其与肝细胞膜特异结合的 50%, 过量 16 倍可抑制 82%; 大鼠 HDL 亦呈相似抑制曲线。但是人 VLDL、LDL 过量 16 倍, 以及白蛋白过量 32 倍, 其抑制活性均小于

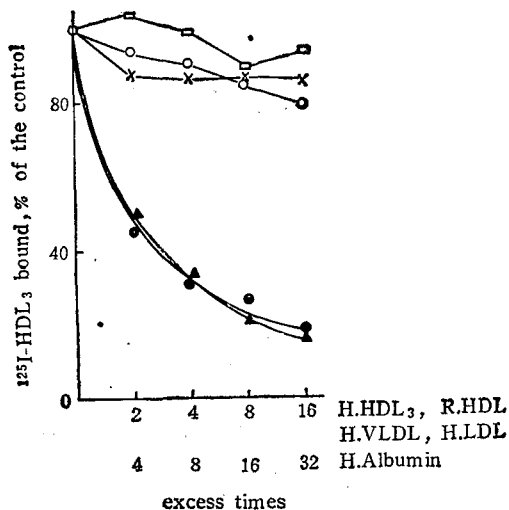


图6 非标记脂蛋白对肝细胞膜 HDL 受体结合 ^{125}I -HDL₃ 的影响

Fig. 6 Effect of unlabeled lipoproteins on the ^{125}I -HDL₃ binding to rat liver plasma membranes

●—● 人不含 apoE HDL₃; ▲—▲ 大鼠 HDL
○—○ 人 VLDL □—□ 人 LDL ×—× 人白蛋白
 ^{125}I -HDL₃, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Membrane protein, 25 μg ; 4°C, 90min.
●—● human apoE-deficient HDL₃; ▲—▲ rat HDL;
○—○ human VLDL; □—□ human LDL; ×—× human serum albumin

20%。表明 ^{125}I -HDL₃ 与大鼠肝细胞膜的结合为可逆反应过程,具有较高特异性;但该受体对人及大鼠 HDL 的识别没有明显差异。

4. Ca^{2+} 、EDTA 及胰蛋白酶对肝细胞膜 HDL 受体功能的影响

于反应系统中加入 0—5mmol/L CaCl_2 及 0—30 mmol/L $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$, ^{125}I -HDL₃ 与肝细胞膜的结合与对照比较没有明显改变。先将肝细胞膜与胰蛋白酶 37°C 保温 30min, 稀释后测定其结合 ^{125}I -HDL₃ 活性, 与对照比较亦无明显差异 (表 1)。

三、肝细胞膜纯度与 HDL 受体活性

由表 2 可见, HDL 受体活性有随细胞膜纯化程度增加而升高的趋势, 表明 HDL 受体可能主要分布在质膜上。

讨 论

本文采用聚乙二醇沉淀分离法, 成功地用于纯化大鼠肝细胞膜 HDL 受体的研究。结果表明, 肝细胞质膜上存在特异的、高亲和性、可饱和的 HDL 受体结合部位。人及大鼠 HDL 均为其特异的脂蛋白配体。反应温度升高略增加其 B_{max} 。该受体不依赖 Ca^{2+} 激活及不受

表1 Ca^{2+} 、EDTA·Na₂ 及胰蛋白酶对肝细胞膜 HDL 受体功能的影响

Table 1 Effects of Ca^{2+} , EDTA, Na₂ and digestion of trypsin on the ^{125}I -HDL₃ binding to rat liver plasma membranes

CaCl (mmol/L)	^{125}I -HDL ₃ bound ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EDTA·Na ₂ (mmol/L)	^{125}I -HDL ₃ bound ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	胰蛋白酶 Trypsin (μg)	^{125}I -HDL ₃ bound ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
0	4.28	0	3.95	0	2.20
2.5	5.02	15	3.86	25	3.12
5.0	5.37	30	3.60	50	2.56

EDTA 抑制, 且对胰蛋白酶不敏感, 表明它不同于 LDL 受体及 apoE 受体。

关于 HDL 受体的存在, 至今仍有一些争议, 主要是由于 (1) 尚未获得纯化 HDL 受体蛋白并确定其结构; (2) HDL 本身是一种不均一颗粒, 含 apoAI、AII 及 C 等多种载脂蛋白, 尽管 apoAI 为 HDL 的主要蛋白成分, 但目前在

载脂蛋白水平上对 HDL 受体的特异配体尚未完全阐明; (3) 还不能排除 HDL 脂质与细胞膜作用的影响^[17]。本方法的建立可能为进一步探讨这些问题提供了一种适宜的手段。

本法与国外常用高速离心及滤膜分离 B/F 法的效果相似^[3,4], 但更为简便。HDL 受体 kd 值为 14.08—31.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在文献值^[2-5,7]内。

表 2 肝细胞膜纯度与 HDL 受体活性
Table 2 Distribution of the ^{125}I -HDL₃ binding activity

	5'-AMPase ¹⁾	G-6-Pase ¹⁾	^{125}I -HDL ₃ bound ²⁾
肝匀浆 Homogenate	1.36±0.42	8.56±4.02	1.68±0.44
部分纯化肝细胞膜 Partial purified membrane	3.78	8.13	1.91
纯化肝细胞膜 Purified membrane	19.43±6.99	0.36±0.42	4.87±0.17

1) 比活: $\mu\text{mol Pi}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ 膜蛋白; 2) $\mu\text{g } ^{125}\text{I}$ -HDL₃/mg 膜蛋白.

参 考 文 献

- 1 Bierman EL *et al.* *Am Heart J*, 1987; 113: 549
- 2 Rifichi VA, Eder HA. *J Biol Chem*, 1984; 259: 13814
- 3 Chacko GK. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 712: 129
- 4 Mitchel YB *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1987; 917: 324
- 5 Kovanen PT *et al.* *J Biol Chem*, 1979; 254: 11367
- 6 Arbeeny CM *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1987; 917: 9
- 7 Fong BS *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1987; 920: 105
- 8 Fidge NH *et al.* *FEBS Lett*, 1986; 199: 265
- 9 Graham JL, Oram JF. *J Biol Chem*, 1987; 262: 7439
- 10 Brown MS, Goldstein JL. *Science*, 1986; 232: 34
- 11 Mahley RB *et al.* *J Clin Invest*, 1981; 68: 1197
- 12 Ray TK. *Biochim Biophys Acta*, 1970; 196: 1
- 13 张林华, 刘秉文. 生物化学与生物物理学报, 1989; 21(3): 257
- 14 Markwell MAK *et al.* *Anal Biol Chem*, 1978; 87: 206
- 15 Widnell CC, Unkeless JC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968; 61: 1050
- 16 Hubscher G, West GR. *Nature*, 1965; 205: 799
- 17 Tabas I, Tall AR. *J Biol Chem*, 1984; 259: 13897

[本文于1989年11月11日收到, 1990年4月3日修回]

HIGH DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR ON RAT LIVER PLASMA MEMBRANES

Zhang Linhua Liu Bingwen Lan Tianhe

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biochemistry,
West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

ABSTRACT

A simple radioassay of HDL-binding sites on purified rat liver plasma membranes with polyethyleneglycol (PEG) precipitation separation of B/F was developed. ^{125}I -labeled apoE-deficient human HDL₃ was prepared as the ligand. 12.5% of the final PEG concentration could effeciently sediment the ^{125}I -labeled HDL₃-membrane complex, and more than 94% of the total binding was specific (non-specific binding was determined at the presence of 25-fold excess HDL₃). A saturable and high affinity HDL-binding site on liver membranes with k_d $14.5 \pm 0.86 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($16.6 \times 10^{-8} \text{mol}/\text{L}$) and B_{max} $15.6 \pm 6.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ membrane protein was found. The B_{max} of this HDL-binding appeared to increase as the reaction temperature rose. The binding activity of this HDL receptor was not inhibited by 0—30 mmol/L EDTA and not activated by 0—5.0 mmol/L Ca^{2+} , as well as insensitive to trypsin. Human HDL₃ and rat HDL, but not human VLDL, LDL and albumin, could effectively inhibit the ^{125}I -labeled HDL₃ binding to the liver membranes. The ^{125}I -labeled HDL₃ binding activity ($\mu\text{g}/\text{mg}$ membrane protein) increased with the increasing of the liver membrane purity. These results suggest that there was a saturable and highly specific HDL-receptor on liver plasma membranes, and its biologic properties are different from LDL- and apoE-receptors.

Key words HDL receptor, liver plasma membrane, radioassay