

- 4 Gaubtz J W, Cushing G L, Morrisett J D. Quantitation, isolation and characterization of human lipoprotein (a). *Methods in Enzymol*, 1987; **129**:167
- 5 许平, 庄一义, 汪俊军等. 人血清脂蛋白(a)的分离纯化及其抗血清制备. *中华医学检验杂志*, 1991; **14**(4):194
- 6 Albers J J, Marcovina S M, Lodge M S. The unique lipoprotein(a): properties and immunochemical measurement. *Clin Chem*, 1990; **36**(12):2019
- 7 王世中编. 免疫化学技术. 北京: 科学出版社, 1980; 4—5
- 8 March S C, Parikh I, Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem*, 1974; **60**:149
- 9 Burstein M, Scholnick P, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res*, 1970; **11**:583
- 10 蒋中俊, 张华征, 殷以礼等. 血清脂蛋白四种电泳方法的比较. *湖北医学院学报*, 1980; **1**:18
- 11 McLean J W, Tomlinson J E, Kung W J *et al.* cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987; **330**:132
- 12 Eaton D L, Fless G M, Kohr W J *et al.* Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**(10):3224
- 13 McNamara J R. Screening for lipoprotein(a) elevations in plasma and assessment of size heterogeneity using gradient gel electrophoresis. *J Lipid Res*, 1989; **30**(5):745

人淋巴细胞低密度脂蛋白受体酶联测定法的研究*

洪 瑛 刘秉文** 傅明德

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

提 要

将辣根过氧化物酶与低密度脂蛋白交联, 并将人淋巴细胞固定于酶标板上, 成功地建立了淋巴细胞 LDL 受体酶联测定法. 此法特异、灵敏、可靠, 不需放射性同位素。

关键词 淋巴细胞, LDL 受体, 酶联测定法

低密度脂蛋白 (LDL) 受体是广泛存在于各组织细胞膜的跨膜糖蛋白^[1]. LDL 受体活性与血浆胆固醇水平及冠心病的发生有明显关系^[2]. 测定细胞 LDL 受体对动脉粥样硬化发病机理的研究及诊断家族性高胆固醇血症 (FH) 等具有重要意义. 我们利用辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的 LDL 交联, 并将人淋巴细胞固定于酶标板上, 成功地建立了人淋巴细胞 LDL 受体酶联测定法. 经方法学研究证明本法特异、灵敏、可靠、简便、不需放射性同位素, HRP-LDL 酶联物较¹²⁵I-LDL 稳定, 易于在一般实验室推广应用.

1 材料与方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶 (HRP, RZ=3.0) Sigma 公司产品, RM1640 培养液为日本制药株式会社产品, HEPES 为 Merck 公司产品, 淋巴细胞分离剂 (Ficoll) 购自上海试剂三厂, 戊二醛进口分装. 55 孔聚苯乙烯酶标板为四川分析仪器厂产品, 临用前用 95% 乙醇处理.

* 卫生部科学基金资助课题.

** 通讯联系人.

收稿日期: 1992-03-21 修回日期: 1992-07-13

1.2 方法

1.2.1 LDL及去脂蛋白血清(LPDS)的制备

按一次性密度梯度超速离心法分离人血清LDL及LPDS^[3]. 收集 $d=1.040-1.056$ 的LDL及 $d>1.21$ 的LPDS, 透析, 过滤除菌, 保存4℃备用. 经PAGE鉴定LDL为一条带, 与免抗人apoB100抗体形成一条清晰的免疫沉淀线. LPDS胆固醇含量少于2.5mg/ml. 按Makwell等方法^[4]测定LDL及LPDS中的蛋白质含量.

1.2.2 辣根过氧化物酶-LDL交联物(HRP-LDL)的制备

按过碘酸钠法^[5]制备. 2.0mg HRP溶于0.5ml双蒸水中, 加新配制0.06mol/L NaIO₄水溶液0.5ml, 混匀, 置4℃, 30min. 加0.16mol/L乙二醇水溶液0.5ml, 室温放置30min后, 加含LDL 4mg溶液1.0ml, 混匀, 放入透析袋对0.05mol/L, pH9.5碳酸盐缓冲液搅拌透析6h(或过夜). 加NaBH₄液(5mg/ml)0.2ml, 置4℃2h. 逐滴加饱和硫酸铵液至40%饱和度, 边加边摇, 混匀. 4℃放置30min后, 10℃, 10000r/min离心20min. 将所得悬浮物溶于少量0.02mol/L, pH7.4 PBS中并对之透析过夜即得HRP-LDL交联物, 加1ml甘油及硫柳汞(10⁻⁴mol/L), 0.2ml分装, -20℃保存备用.

1.2.3 淋巴细胞的分离与培养

按改进的Boyüm方法^[6]分离淋巴细胞. 新分离的淋巴细胞用10% LPDS-RM 1640培养液37℃培养24h以诱导LDL受体的合成, 然后用于测定.

1.2.4 淋巴细胞LDL受体结合活性的测定

按Stocker和Heuser方法^[7]稍加修改固定细胞于酶标板上. 培养后的淋巴细胞, 用含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS洗3次后, 计数稀释成1×10⁶-10×10⁶/ml的细胞悬液, 加到55孔酶标板中, 每孔50μl, 空白孔不加细胞. 1000r/min离心5min后, 逐孔加新配制的0.1%戊二醛-

PBS液50μl, 4℃静置10min, PBS洗三次, 再逐孔加200μl 1% BSA-0.1mol/L甘氨酸-PBS液, 室温放置1h或4℃保存备用. 另取50μl细胞悬液, 加0.1mol/L NaOH 0.15ml, 37℃过夜, 按Makwell法^[4]测定细胞蛋白质量.

LDL受体结合活性测定: 将固定有细胞的酶标板甩干, PBS洗3次. 每孔加50μl HRP-LDL稀释液, 37℃孵育1h. PBS洗3次后逐孔加入酶反应基质液(0.04%邻苯二胺, 0.15% H₂O₂, pH6.5的0.1mol/L柠檬酸-Na₂HPO₄缓冲液, 临用前配制)50μl, 37℃保温30min, 加50μl 2mol/L H₂SO₄终止反应. 以基质液加2mol/L H₂SO₄ 50μl为空白于492nm测光密度(CXM-酶标光度计, 四川分析仪器厂). 由HRP-LDL酶活性与LDL蛋白质含量标准曲线查得细胞结合LDL的量. 细胞对HRP-LDL的非特异性结合, 同时用加入过量25倍未标记的LDL的方法测定. 总结合量减去非特异性结合量而即LDL受体特异性结合量.

2 结果

2.1 HRP-LDL交联物鉴定

HRP-LDL与免抗人apoB100血清进行免疫电泳, 经酶基质液染色呈一条清晰的棕色沉淀弧, 表明HRP-LDL既能与免抗人apoB100血清发生特异免疫反应, 又具有HRP酶活性. HRP-LDL的标记率为0.5, HRP/LDL克分子比为0.89.

2.2 HRP-LDL标准曲线

于酶标板上逐孔加入10μl对倍稀释的HRP-LDL交联物及50μl基质液, 37℃保温30min后加50μl 2mol/L H₂SO₄终止反应, 测定A_{492nm}. HRP-LDL蛋白质质量按Makwell法测定. A_{492nm}与每孔HRP-LDL中LDL蛋白质含量在0-7.5ng范围内呈直线关系, 最低检测量为0.12ng(图1).

2.3 影响细胞固定于酶标板的因素

2.3.1 戊二醛浓度 分别用0.1%, 0.25%戊二醛固定细胞, 进行受体结合活性测定. 结果表明(表1), 0.1%戊二醛足能固定细

胞。

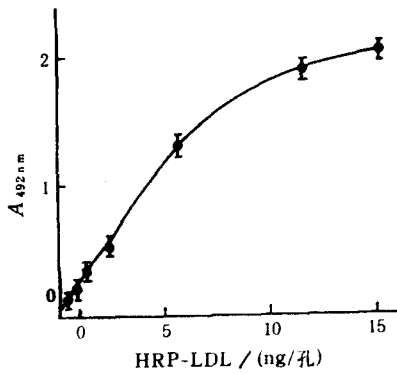


图1 HRP-LDL 标准曲线 (n=3)

表1 戊二醛浓度对淋巴细胞结合 HRP-LDL 的影响 (37°C, 1h)

戊二醛浓度(%)	细胞蛋白的 HRP-LDL 结合量/(ng/mg)
0.25	21.2 ± 2.56 (n=3)
0.1	23.6 ± 3.19 (n=3)

2.3.2 细胞浓度: 50 μ l 不同浓度 (每毫升含 2×10^5 — 200×10^5 个细胞) 的细胞悬液加入酶标板各孔中, 离心后用 0.1% 戊二醛固定, 并测定受体结合活性. 结果表明 (图 2), 细胞浓度为 20×10^5 个/ml 时, 结合 HRP-LDL 的量达到最大. 倒置显微镜观察亦证实, 当细胞浓度为 20×10^5 个/ml 时, 细胞连续均匀地分布于酶标板小孔底部; 细胞浓度低于 20×10^5 个/ml 的各孔, 细胞呈不连续分布, 出现许多空隙; 细胞浓度高于 20×10^5 个/ml 的各孔, 细胞重叠分布. 说明细胞的最适包被 (固定) 浓度为 20×10^5 个/ml, 即 1×10^5 个/孔.

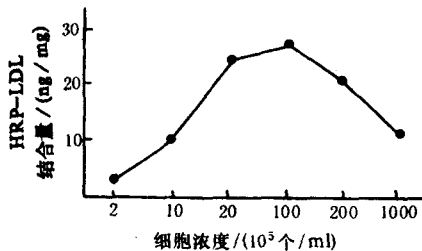


图2 细胞浓度对淋巴细胞结合 HRP-LDL 的影响 (37°C, 1h)

2.4 饱和实验及 Scatchard 作图分析

37°C 保温 1h, 细胞特异结合 HRP-LDL 的

量随 HRP-LDL 的浓度增加而增加 (图 3). Scatchard 作图呈直线 (图 3), $r = -0.985$, K_d 值为 $13.18 \mu\text{g/ml}$ 或 21.9nmol/L (按 LDL 分子量为 3×10^6 , 蛋白质含量为 20% 计), 细胞蛋白质的最大结合容量 B_{max} 为 46.67ng/mg .

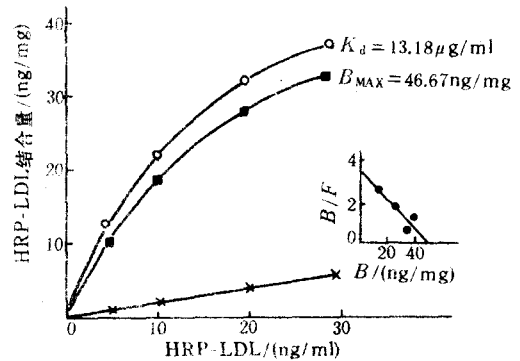


图3 人淋巴细胞 LDL 受体饱和曲线及 Scatchard 作图

纵座标示每 mg 细胞蛋白的 HRP-LDL 结合量

2.5 特异性试验

以非标记 LDL 及不含 apoE-HDL 进行竞争性结合试验. 结果显示 (图 4), 非标记 LDL 量超过 HRP-LDL 量 2 倍即可抑制其与淋巴细胞特异结合的 50%, 过量 20 倍则抑制 85%; 而不含 apoE-HDL 过量 20 倍, 抑制活性仍小于 20%. 结果表明, HRP-LDL 与淋巴细胞的结合为一可逆过程, 具较高特异性.

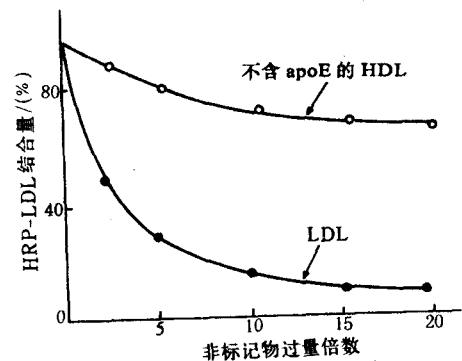


图4 非标记 LDL 及不含 apoE-HDL 对淋巴细胞 LDL 受体结合 HRP-LDL 的影响

2.6 Ca^{2+} , EDTA 及胰蛋白酶对人淋巴细胞 LDL 受体结合 HRP-LDL 的影响

于反应体系中加 0—5.0mmol/L CaCl_2 及 0—3.0mmol/L EDTA, HRP-LDL 与淋巴细胞

结合活性见图 5。

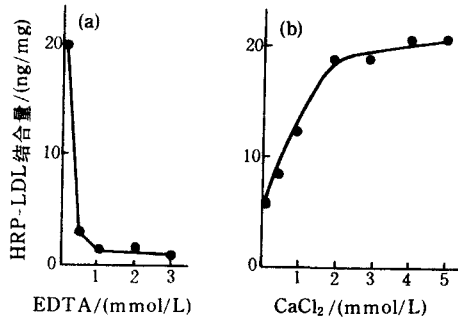


图 5 EDTA (a) 及 CaCl₂ (b) 对人淋巴细胞 LDL 受体结合 HRP 的影响
纵座标示每 mg 细胞蛋白的 HRP-LDL 结合量

先将淋巴细胞与胰蛋白酶 (10μg) 37℃ 保温 30min, 再作结合活性测定, 结果见表 2。

表 2 胰蛋白酶对人淋巴细胞 LDL 受体结合 HRP-LDL 的影响

胰蛋白酶/(μg)	细胞蛋白的 HRP-LDL 结合量/(ng/mg)
0	23.2 ± 3.5 (n=2)
10	5.1 ± 1.7 ¹⁾ (n=2)

1) 与对照比较, P < 0.001

结果表明, HRP-LDL 与淋巴细胞的结合依赖于 Ca²⁺ 存在, EDTA 可阻断其结合, 结合对胰蛋白酶敏感, 符合 LDL 受体特性。

2.7 重复性试验

取同一血标本淋巴细胞悬液, 分成 4 份, 同时测定其与 HRP-LDL (10μg/ml) 特异结合, 细胞蛋白的 HRP-LDL 结合量为 19.8 ± 2.4 ng/mg (n=4), 变异系数为 12.1%。

2.8 正常人淋巴细胞 LDL 受体的测定

用本法测定了 10 例正常人 (血清总胆固醇 ≤ 230mg/dl) 淋巴细胞的 LDL 受体, 细胞蛋白结合 LDL 的 B_{max} 为 37.6 ± 10.9 ng/mg, 据此计算出每个淋巴细胞平均有 2 780 ± 807 个 LDL 受体, 与 Hoyk 等^[8] 用受体放射分析法测定的结果 (每个细胞含 1 800—3 600 个受体) 相近。

3 讨 论

我们制备的 HRP-LDL 经免疫电泳后酶基

质液染色证实, 它既有免疫活性又有 HRP 酶活性; 未标记 LDL 可竞争性抑制 HRP-LDL 与淋巴细胞结合, 抑制程度与 Hoyk 等^[8] 用放射分析法的报道一致, 这提示 HRP 标记 LDL 不影响 LDL 与细胞 LDL 受体的特异结合。

淋巴细胞 LDL 受体与 HRP-LDL 结合具较高特异性, 需 Ca²⁺ 存在, 对胰蛋白酶敏感, 这些均符合 LDL 受体的特征。淋巴细胞与 HRP-LDL 结合的饱和曲线及竞争性抑制曲线与放射受体分析法相似^[8]。按 Scatchard 作图计算出的 K_d 值为 13.18 μg/ml 与文献 [8] 相符。用本法测得正常人淋巴细胞 LDL 受体数亦与文献报道 [8] 相近。这些结果均表明, 我们建立的 LDL 受体酶联测定法是可靠的。

本法与放射受体法比较具有不需放射性同位素, 不需特殊设备, HRP-LDL 制备简单, 且保存期较¹²⁵I-LDL 长等优点, 更适于一般实验室推广应用。

参 考 文 献

- Schnider W J, Beisiegel V, Goldstein J L *et al.* Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164 000 molecular weight. *J Biol Chem*, 1982; **257**:2664
- Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986; **232**:34
- 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989; **21**(3):257
- Makwell M K, Haas S M, Bieber *et al.* A modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 1978; **87**:206
- 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸法. *上海免疫学杂志*, 1983; **3**(2): 97
- 范乐明, 蔡海江, 黄曼倩等. 人体培养细胞的低密度脂蛋白受体功能研究. *病理生理学报*, 1985; **1**(2):32
- Stocker J W, Heusser. Methods for binding cells to plastic: Application to a solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens. *J Immuno Methods* 1979; **26**:87
- H₀ Y K, Brown M S, Bilheimer D W *et al.* Regulation of LDL receptor activity in freshly isolated human lymphocytes. *J clin Invest*, 1976; **58**:1465