

人血浆 HDL 对动脉粥样硬化家兔肝细胞膜 LDL 受体活性影响的研究*

吴新伟 傅明德 蓝德宾 邓 萍¹⁾ 周建均¹⁾

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610041)

摘要 高胆固醇饲料喂养造成的动脉粥样硬化 (As) 模型家兔通过静脉注射人血浆 HDL 制剂, 观察 HDL 对 As 家兔肝细胞膜 LDL 受体活性的影响. 结果发现, 摄取高胆固醇饲料的 As 家兔, 其肝细胞膜 LDL 受体 K_d 值虽无明显变化但 B_{max} 值显著减小 ($P < 0.01$, 与正常对照组比较); 注射 HDL 制剂后, As 家兔肝细胞膜 LDL 受体 K_d 值仍无明显改变, 但 B_{max} 值却显著回升 ($P < 0.01$, 与高脂组比较). 表明人血浆 HDL 具有增加 As 家兔肝细胞膜 LDL 受体活性的作用.

关键词 动脉粥样硬化, 高密度脂蛋白, 低密度脂蛋白受体, 肝细胞膜, 胆固醇逆向转运

学科分类号 R363

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是常见的多发性疾病, 严重威胁人类健康和生命. 流行病学和动物实验研究表明, 高密度脂蛋白 (HDL) 具有抗 As 的作用. 研究发现 HDL 参与胆固醇逆向转运 (RCT), 即 HDL 接受外周组织 (包括动脉壁) 移出的胆固醇, 酯化后在胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 作用下, 部分转移至血浆低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 及残粒之中, 最后通过血循环经肝细胞膜上相应的 HDL、LDL 以及 VLDL 等受体分别被肝脏摄取、转化及排出^[1~3]. 本实验采用高胆固醇饲养, 造成 As 家兔模型, 通过静脉注射人血浆 HDL, 观察 HDL 对 As 家兔肝细胞膜 LDL 受体活性的影响, 并根据 As 家兔血脂、肝脏和胆囊胆汁脂质含量, 分析讨论肝细胞膜 LDL 受体活性的变化规律, 为研究 HDL 抗 As 作用机理提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 人血浆 HDL 制剂的制备

采用经改进的低温乙醇法制备. 脂蛋白预染电泳表明制品 HDL 含量 $> 96\%$, 免疫双扩散试验证实制品不与抗 apoB₁₀₀ 血清产生沉淀线, 制品中 apoA I 含量为 7.0 g/L .

1.2 As 家兔造模及分组

选择健康雄性日本大耳白兔 20 只, 体重 $2.0 \sim 2.5 \text{ kg}$, 普通颗粒饲料饲养, 观察 1 周后, 每只动物每日加饲 0.2 g 胆固醇, 持续 2 周, 并于第 2

周末测定动物血浆总胆固醇 (TC) 含量, 然后筛选出对胆固醇中度敏感的家兔 12 只, 改用每只家兔每天供给 0.5 g 胆固醇及 5% 猪油的高脂饲料饲养. As 造模 12 周后, 再按 TC 含量分层随机分为两组: 高脂 (C) 组和 HDL 治疗 (H) 组. 整个试验期间, C 组和 H 组动物仍饲以高脂饲料, 并于第 13 周开始, 由耳缘静脉分别缓慢推注生理盐水或含 50 mg apoA I 的 HDL 制剂, 每周 1 次, 共计 10 周. 剖杀动物前 $14 \sim 16 \text{ h}$ 禁食, 剖杀时由腹主动脉插管采血, 摘取肝脏, 并收集胆囊胆汁.

1.3 兔肝细胞膜的制备

取新鲜肝脏按蔗糖密度梯度超速离心法^[4]制备, 分装后于 -70°C 保存备用. 膜产率为每克湿肝组织产膜 $1.5 \sim 2.0 \text{ mg}$, 与肝匀浆相比, 纯化兔肝细胞膜 5'-核苷酸酶活力提高 $6 \sim 10$ 倍.

1.4 脂蛋白的制备

按一次性密度梯度超速离心法^[5]分离人血浆及兔血浆脂蛋白, 收集 $d = 1.030 \sim 1.050 \text{ g/ml}$ 的 LDL 组分, 透析脱盐后于 4°C 保存备用.

膜蛋白及脂蛋白均按 Markwell 等^[6]的方法测定蛋白质含量.

1.5 LDL 受体结合活性测定

兔肝细胞膜 LDL 受体结合活性按抗配体抗体酶联免疫受体检测法^[7]测定.

* 国家新药研究基金资助项目 (96-901-05-78).

¹⁾ 成都蜀阳制药厂, 成都 610214.

收稿日期: 1998-09-21, 修回日期: 1999-10-25

1.6 As 模型动物血清、肝脏及胆囊胆汁脂质测定

TC、甘油三酯 (TG)、HDL-胆固醇 (HDL-C) 含量均采用北京中生生物工程技术有限公司酶法试剂盒测定, 磷脂 (PL) 含量采用本室常规化学法测定. 测定肝脏脂质时, 先将动物肝脏洗净血迹, 剪成小块, 置 110℃ 烘干至恒重. 精确称取干燥后的肝脏, 磨成细粉, 用氯仿: 甲醇 (2: 1) 抽提所含脂质, 过滤定容后再按上述方法测定.

表 1 正常及 As 家兔血清脂质的含量

组别	mmol/L			
	TC	TG	PL	HDL-C
N	1.16 ± 0.21	0.57 ± 0.16	0.93 ± 0.31	0.62 ± 0.17
C	28.73 ± 1.35 ¹⁾	2.89 ± 0.15 ¹⁾	7.13 ± 0.41 ¹⁾	0.53 ± 0.04
H	28.55 ± 1.41 ¹⁾	3.09 ± 0.24 ¹⁾	7.42 ± 0.49 ¹⁾	0.55 ± 0.06

注: $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ¹⁾ $P < 0.001$, 与正常对照组 (N) 比较.

2.2 As 模型动物肝脏脂质的含量

由表 2 可见, As 模型家兔肝脏 TC、TG 及 PL 含量显著增加 ($P < 0.01$). H 组动物肝脏 TC 和 PL 含量较 C 组明显降低 ($P < 0.01$), 分别为 C 组的 83.1% 和 66.7%, TG 含量也有所降低, 表明 HDL 具有减少肝脏脂质沉积的作用.

表 2 正常及 As 家兔肝脏脂质的含量

组别	mmol/g		
	TC	TG	PL
N	0.45 ± 0.04	0.24 ± 0.08	0.30 ± 0.04
C	5.96 ± 0.40 ¹⁾	0.94 ± 0.09 ¹⁾	0.48 ± 0.11 ¹⁾
H	4.95 ± 0.26 ²⁾	0.87 ± 0.14 ¹⁾	0.32 ± 0.05 ²⁾

注: $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ¹⁾ $P < 0.01$, 与正常对照组 (N) 比较; ²⁾ $P < 0.01$, 与高脂组 (C) 比较.

2.3 As 模型动物胆汁脂质的含量

由表 3 可见, AS 模型家兔胆囊胆汁 TC 及 PL 含量依次呈显著增高 ($P < 0.01$), H 组动物胆汁 TC 及 PL 含量较 N 组增加 157.4% 和 572.3%, 较 C 组增加 46.6% 和 29.3%. 结果表明, 家兔饲以高脂饲料后, 胆汁中胆固醇及 PL 含量增加, 而注射 HDL 制剂具有显著促进肝脏经胆道排出胆固醇及 PL 的作用.

表 3 正常及 As 家兔胆囊胆汁脂质含量

组别	mmol/L	
	TC	PL
N	2.91 ± 0.52	1.77 ± 0.37
C	5.11 ± 0.59 ¹⁾	9.20 ± 0.75 ¹⁾
H	7.49 ± 1.14 ²⁾	11.90 ± 1.83 ²⁾

注: $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ¹⁾ $P < 0.001$, 与正常对照组 (N) 比较; ²⁾ $P < 0.01$, 与高脂组 (C) 比较.

2 结 果

2.1 As 模型动物血清脂质的含量

由表 1 可见, 家兔饲以高胆固醇饲料造成 As 模型后, 血清 TC、TG 和 PL 水平与正常对照组相比显著升高 ($P < 0.001$), 注射 HDL 制剂后, 其水平亦与高脂组无明显差异, 表明人 HDL 制剂无降低 As 动物血清 TC、TG 和 PL 水平的作用.

2.4 As 模型动物肝细胞膜 LDL 受体活性

由表 4 可见, 各组动物肝细胞膜 LDL 受体的 K_d 值无明显差异; C 组动物的 B_{max} 值较 N 组明显下降 ($P < 0.01$); H 组动物的 B_{max} 值虽明显低于 N 组 ($P < 0.05$), 但却较 C 组明显增加 ($P < 0.01$). 表明高脂饲料造成 As 模型动物肝细胞膜 LDL 受体 B_{max} 值显著下降, 而注射 HDL 制剂有使 As 模型动物的 B_{max} 值明显回升的作用.

表 4 正常及 As 家兔肝细胞膜 LDL 受体 K_d 及 B_{max} 值

组别	$K_d / \mu g \cdot ml^{-1}$	$B_{max} / mg \cdot g^{-1}$
N	13.59 ± 3.50	123.83 ± 6.94
C	13.30 ± 2.99	94.50 ± 10.78 ¹⁾
H	14.17 ± 1.80	112.83 ± 8.35 ²⁾³⁾

注: $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$, 与正常对照组 (N) 比较; ³⁾ $P < 0.01$, 与高脂组 (C) 比较.

3 讨 论

3.1 人血浆 HDL 制剂对 As 模型动物血脂、肝脏及胆囊胆汁脂质含量的影响

动物饲以高脂饲料后, 血清 TC、TG 及 PL 水平均显著高于正常组, 注射 HDL 制剂后, 血清脂质水平与高脂组相比无明显改变, 表明注射 HDL 无降低摄取高脂饲料的 As 模型动物血清脂质的作用. 此结果与 Badimon 等^[8]的报道一致.

肝脏及胆囊胆汁脂质测定的结果表明, 长期摄入高脂饲料的模型动物形成以胆固醇大量沉积为特点的严重脂肪肝病. 注射 HDL 后, 动物肝脏 TC、PL 水平明显降低 ($P < 0.01$, 与 C 组比较),

但胆汁脂质却显著增加 ($P < 0.01$, 与 C 组比较)。可见, 人血浆 HDL 制剂不仅减少高脂饲养的 As 模型动物肝脏脂质沉积, 而且具有促进脂质经胆道排泄的作用。

3.2 人血浆 HDL 制剂对 As 模型动物肝细胞膜 LDL 受体活性的影响

胆固醇是调节 LDL 受体活性的重要因素, 血浆 TC 升高时, 细胞羟甲基戊二酰单酰 CoA (HMGCoA) 还原酶活性降低, 脂酰 CoA 胆固醇脂酰转移酶 (ACAT) 活性增加, 而且 LDL 受体呈现以受体数目减少为特征的受体活性降低 (下降调节)^[9]。本实验发现, 高胆固醇饲料造成的 As 模型家兔, 其肝细胞膜 LDL 受体的 K_d 值没有明显变化, 但 B_{max} 值显著降低 ($P < 0.01$, 与 N 组比较), 因此 LDL 受体表达受到抑制。

我室人血浆 HDL 对 As 家兔肝细胞膜 HDL 受体活性影响的研究曾发现^[10], As 动物注射 HDL 后, 肝细胞膜 HDL 受体的 K_d 值无改变, 但 B_{max} 值显著减小 ($P < 0.05$, 与 N 组比较), 表明肝脏通过 HDL 受体经直接 RCT 途径^[3]摄取胆固醇的能力下降。然而胆汁脂质检测结果却表明, 经胆道排出的胆固醇显著增加, 显然肝脏通过其他途径摄取胆固醇酯的功能应有所增强。Oram 等^[11]观察到 HDL 促进成纤维细胞胆固醇流出, 增加 LDL 受体活性; 胡咏梅等^[12]则发现脱脂 apoA I 接纳家兔主动脉平滑肌细胞外流的胆固醇, 促进细胞 LDL 受体的表达。本研究发现各组动物肝细胞膜 LDL 受体 K_d 值虽无明显变化, 但高脂组 B_{max} 显著降低 ($P < 0.01$, 与 N 组比较)。注射 HDL 后, 其 B_{max} 值明显回升, 尽管未恢复到 N 组水平, 但比 C 组动物升高了 20% ($P < 0.01$, 与 C 组比较), 显然, 注射人血浆 HDL 可使 As 家兔肝脏通过 LDL 受体摄取 CE 的间接 RCT 途径^[3]增强。因此本结果表明高脂饲料使肝细胞膜 LDL 受体的表达受到抑制, 而注射 HDL 使 As 模型动物肝细胞膜 LDL 受体呈现以受体合成显著增加为特征的活性增加。

参 考 文 献

- Fielding C J, Fielding P E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, **36** (2): 211~228
- Francone O L, Gurakar A, Fielding C J. Distribution and functions of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. *J Biol Chem*, 1989, **264** (12): 7066~7072
- 刘国庆. 脂蛋白代谢. 见: 蔡海江主编. 动脉粥样硬化基础与临床. 南京: 江苏科学技术出版社 (Liu G Q. In: Cai H J ed. *Atherosclerosis—Basic Theory and Clinical Practice*. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press), 1996. 38~66
- Ray T K. A modified method of the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **196** (1): 1~9
- 张林华, 刘秉文 (Zhang L H, Liu B W). 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 (Acta Biochim Biophys Sin)*, 1989, **21** (3): 257~260
- Markwell M K, Haas S M, Bieber L L, *et al.* A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 1978, **87** (1): 206~210
- 吴新伟, 傅明德, 刘秉文, 等 (Wu X W, Fu M D, Liu B W, *et al.*). 肝细胞膜低密度脂蛋白受体酶联免疫测定法的建立. *中国动脉硬化杂志 (Chin J Arterioscler)*, 1997, **5** (1): 67~70
- Badimon J J, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*, 1990, **85** (4): 1234~1241
- Brawn M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, **232** (4748): 34~47
- 纪 延, 傅明德, 蓝德宾, 等 (Ji Y, Fu M D, Lan D B, *et al.*). 人血浆 HDL 制品对 As 家兔肝细胞膜 HDL 受体活性的影响. *中国动脉硬化杂志 (Chin J Arterioscler)*, 1997, **7** (2): 125~127
- Oram J F, Albers J J, Cheung M C, *et al.* The effects of subfractions of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *J Biol Chem*, 1981, **256** (16): 8348~8356
- 胡咏梅, 薛 红, 吴 钢, 等 (Hu Y M, Xue H, Wu G, *et al.*). 载脂蛋白 A-I 对低密度脂蛋白受体的表达作用. *生物化学与生物物理学报 (Acta Biochim Biophys Sin)*, 1990, **22** (4): 397~400

Effect of Human Plasma HDL on LDL Receptors of Atherosclerosis Rabbit Liver Plasma Membranes. WU Xin-Wei, FU Ming-De, LAN De-Bin, DENG Ping¹⁾, ZHOU Jiar-Jun¹⁾ (*Laboratory of Apolipoprotein, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China; ¹⁾ Chengdu Shuyang Pharmaceutical Factory, Chengdu 610214, China*).

Abstract Atherosclerosis (As) rabbit model was developed by feeding with high-cholesterol diet for 12 weeks, then As rabbits were injected intravenously with human plasma HDL preparation for 10 weeks, the effect of HDL on activity of LDL receptors on As rabbit liver plasma membranes was investigated. It was shown that the value of B_{max} of LDL receptor was significantly lower in As rabbit than that in normal rabbit ($P < 0.01$), while the value of K_d showed no difference; in HDL-treated rabbits, the value of B_{max} increased significantly compared with the rabbits without HDL treatment ($P < 0.01$), while the value of K_d showed no difference yet. The results suggested that human plasma HDL could enhance the activity of LDL receptors on liver plasma membranes of As rabbit.

Key words atherosclerosis, HDL, LDL receptor, liver plasma membrane, reverse cholesterol transport