

人及小鼠肝细胞膜载脂蛋白 C III 受体的研究*

方定志 刘秉文

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

提 要

用¹²⁵I 标记载脂蛋白 C III (apoC III) 为配体, 采用聚乙二醇沉淀分离法, 建立了小鼠肝细胞膜 apoC III 受体 (结合位点) 放射分析法, 并对人及小鼠肝细胞膜 apoC III 结合位点的特性进行了研究。

关键词 载脂蛋白 C III 受体 (结合位点), 肝细胞膜, 放射分析法

载脂蛋白 (apolipoprotein, apo) C 是分子量较小的一类载脂蛋白, 主要分布在血浆乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 及高密度脂蛋白 (HDL) 中。apoC 包括 apoC I, apoC II 及 apoC III 三个亚类。apoC III 由 79 个氨基酸组成, 分子量为 8751D, 含有以唾液酸为末端的糖基侧链, 根据所含唾液酸的分子数又可分为 apoC III₀, apoC III₁ 及 apoC III₂ 三种, 其等电点分别为 4.93, 4.72 和 4.45^[1]。实验证明, apoC III 除可抑制脂蛋白脂酶 (LPL) 活性外, 还可抑制肝细胞膜 apoE 受体的识别功能, 在 VLDL 及 HDL 等脂蛋白的分解代谢中起着重要的调节作用。首先是 Chao 等^[2] 观察到 apoC I, apoC II 及 apoC III 的混合制品具有抑制肝细胞识别、结合 VLDL 的作用。Van Berkel 等^[3] 发现, apoC III 可抑制完整 CM 与小鼠肝实质细胞及肝非实质细胞的结合。Gustafson^[4] 的研究显示, ¹²⁵I 标记 apoC III 可与肝内皮细胞呈可饱和性结合; Scatchard 作图分析发现这种结合具有受体结合的特征; 能被非标记 apoC III 所抑制。本室张林华等^[5] 的研究发现大鼠肝非实质细胞膜存在特异的 apoC III 受体。本文用 ¹²⁵I 标记人 apoC III 为配体, 建立了小鼠肝细胞膜 apoC III 受体放射分析法, 并对人及小鼠肝细胞膜 apoC III 结合位点的特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人 apoC III 由刘秉文等^[6] 制备提供。BALB/C 小鼠体重 18—20g, 由本校实验动物中心提供。¹²⁵I-NaI, 无载体, 北京原子能科学院产品。牛血清白蛋白 (BSA, 电泳纯) 为中国科学院生物物理所产品。聚乙二醇 (PEG), Mr = 6000, 分析纯, 日本进口分装。胰蛋白酶, Difco 进口分装。牛 γ-球蛋白由本室陈曼玲提供。正常人血浆来自献血员。人肝脏取自肝内胆管结石病人切除的肝叶, 由本校附一院外科提供。

1.2 方法

1.2.1 apoC III 的标记

按刘秉文等^[7] 氯胺-T 法标记人 apoC III。标记 apoC III 的比放射性为 13.1—25.8 μCi/μg, 其放射性 98.7%—99.6% 被 10% 三氯醋酸沉淀。随羊抗人 apoC III 血清稀释度的增加, ¹²⁵I 标记 apoC III 与抗体的结合逐渐减少, 表明 ¹²⁵I 标记 apoC III 具有免疫活性。

1.2.2 人血浆 HDL、LDL 及 VLDL 的分离纯化

按张林华等^[8] 一次性密度梯度超速离心法分离制备 VLDL、LDL 及 HDL。

* 国家教委博士点科学基金及纽约中华医学基金部分资助课题。

1.2.3 肝细胞膜的分离纯化

人及小鼠肝细胞膜分离纯化按 Ray 等^[9]法. 产率为 1.08mg 膜蛋白每克人肝湿组织, 1.23mg 膜蛋白每克鼠肝湿组织. 与肝匀浆比较, 纯化人肝细胞膜 5'-核苷酸酶 (5'-AMPase) 比活性增加 13.7 倍, 纯化鼠肝细胞膜 5'-核苷酸酶比活性增加 14.3 倍.

1.2.4 受体结合试验

反应介质为牛血清白蛋白 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 100mmol/L NaCl, 0.5mmol/L CaCl₂ 及 0.1% 牛血清白蛋白). 总结合管 (TB) 加入膜蛋白 10—18 μ g, ¹²⁵I-apoC III 50 000 cpm 左右及反应介质, 总体积为 100 μ l. 非特异结合管 (NSB) 加入膜蛋白 10—18 μ g, ¹²⁵I-apoC III 50 000cpm 左右, 过量 50 倍非标记 apoC III 及反应介质, 总体积为 100 μ l. 0—4℃ 保温 2h 后, 加 30 μ g 牛 γ -球蛋白及 0.5ml 5% (W/W) 4℃ 预冷的 PEG 6 000, 使 PEG 的终浓度为 4.2%. 0—4℃ 静置 15min, 3 500r/min 离心 15min, 吸弃上清, 沉淀于 FJ2003 型 γ -闪烁计数器 (西安 262 厂) 上计数. 非特异结合管与总结合管平行操作, 总结合减去非特异结合为特异结合 (SB). 各数据为双管测定的均值.

2 结 果

2.1 影响 apoC III 受体分析的某些因素

2.1.1 聚乙二醇分离结合及游离配体

随 PEG 浓度增加, 测得 TB 及 NSB 均增加. 当 PEG 终浓度达 4.2% 时, SB 达到最高. 因此选择 PEG 终浓度为 4.2% 来分离 B 与 F. B 代表与细胞膜结合的配体, F 代表未与细胞膜结合的游离配体.

2.1.2 膜蛋白量

在 0—18 μ g 范围内, 膜蛋白量与 ¹²⁵I-apoC III 的特异性结合呈比例关系.

2.1.3 保温时间

0—4℃ 保温 2h, ¹²⁵I-apoC III 与肝细胞膜的特异结合即可趋于平衡, 达到最大结合.

2.2 ¹²⁵I-apoC III 与人肝细胞膜的结合特

性

2.2.1 饱和试验及 Scatchard 作图分析

0—4℃ 保温 2h, ¹²⁵I-apoC III 随其浓度增加与人肝细胞膜的结合呈可饱和趋势 (图 1a). Scatchard 作图分析呈直线 (图 1b), $\gamma = -0.947$, K_d 值为 0.31 μ mol/L (3.1×10^{-7} mol/L), B_{max} 为 1.74 μ g/mg 膜蛋白. 表明 ¹²⁵I-apoC III 与人肝细胞膜的结合为可饱和和高亲和的结合, 无协同效应.

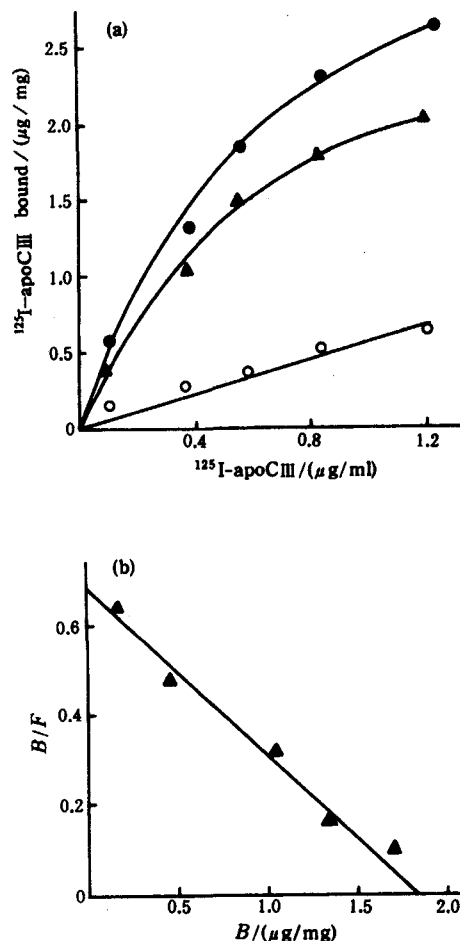


图 1 人肝细胞膜 apoC III 受体饱和曲线及 Scatchard 作图分析

Fig. 1 Binding of ¹²⁵I-labeled human apoC III to human liver plasma membranes

●—●—●: TB; ▲—▲—▲: SB; ○—○—○: NSB;

(a) 饱和曲线; (b) 特异结合的 Scatchard 图;

(a) Saturable curve; (b) Scatchard plot of specific binding at 0—4℃ for 2h

2.2.2 特异性

用 0—80 μg 蛋白质每毫升非标记 HDL, LDL 及 VLDL 进行竞争性结合反应, 结果见图 2, 非标记 VLDL 能抑制 ^{125}I -apoC III 与人肝细胞膜的特异结合, 且抑制曲线与非标记 apoC III 之抑制曲线相似. 而 LDL 及 HDL 不能抑制 ^{125}I -apoC III 与人肝细胞膜的结合.

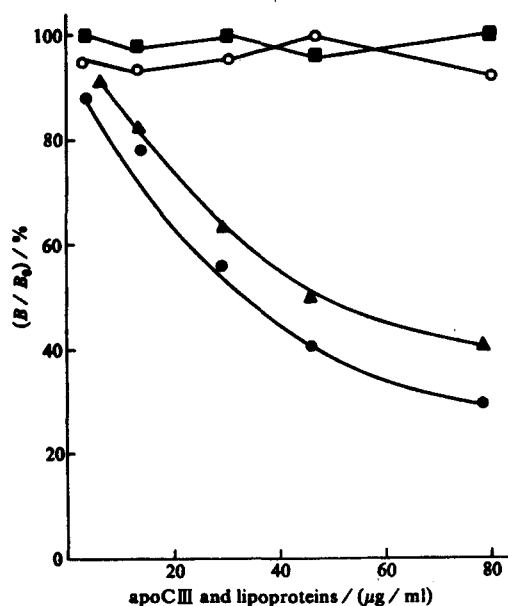


图2 非标记脂蛋白对人肝细胞膜结合 ^{125}I -apoC III 的影响

Fig. 2 Effect of unlabeled human apoC III and lipoproteins HDL, LDL and VLDL on the binding of ^{125}I -labeled human apoC III to human liver plasma membranes

○-○-○, HDL; ■-■-■, LDL; ▲-▲-▲, VLDL;
●-●-●, unlabeled human apoC III

2.2.3 Ca^{2+} , EDTA 及胰蛋白酶对 ^{125}I -apoC III 与人肝细胞膜结合的影响

在反应系统中加 0—5mmol/L CaCl_2 及 0—30mmol/L EDTA-Na_2 , 对 ^{125}I -apoC III 与人肝细胞膜的特异结合无影响, 而胰蛋白酶对结合有显著的抑制作用 (表 1). 表明 ^{125}I -apoC III 与人肝细胞膜的结合不依赖 Ca^{2+} , 对胰蛋白酶敏感.

2.3 ^{125}I -apoC III 与小鼠肝细胞膜的结合特性

2.3.1 饱和试验及 Scatchard 作图分析

将 ^{125}I -apoC III 与小鼠肝细胞膜在 0—4 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2h, ^{125}I -apoC III 与肝细胞膜的结合呈可饱和和趋势. Scatchard 作图分析呈直线, $r = -0.921$, K_d 为 $0.31\mu\text{mol/L}$ ($3.1 \times 10^{-7}\text{mol/L}$), B_{max} 为 $1.52\mu\text{g/mg}$ 膜蛋白. 表明 ^{125}I -apoC III 与小鼠肝细胞膜的结合为可饱和、高亲和的结合反应、结合无协同效应, 与人肝细胞膜相似.

表 1 Ca^{2+} , EDTA 及胰蛋白酶对 ^{125}I -apoC III 与人肝细胞膜结合的影响

Table 1 Effect of Ca^{2+} , EDTA-Na_2 and digestion with trypsin on the binding of human ^{125}I -apoC III to human liver plasma membranes

浓 度 Concentration	结合量 ^{125}I -apoC III bound ($\mu\text{g/mg}$)
CaCl_2 (mol/L)	
0	1.4
2.5	1.2
5.0	1.2
EDTA-Na_2 (mol/L)	
0	1.3
15	1.2
30	1.3
Trypsin (μg)	
0	1.2
25	0.5
50	0.3

2.3.2 特异性试验

以 0—80 μg 蛋白质每毫升非标记 VLDL, LDL 及 HDL 进行竞争性结合反应. 结果显示, 非标记 VLDL 能抑制 ^{125}I -apoC III 与小鼠肝细胞膜的结合, 且抑制曲线与非标记 apoC III 的抑制曲线相似. 而 LDL 及 HDL 不能抑制 ^{125}I -apoC III 与肝细胞膜的结合.

2.3.3 Ca^{2+} , EDTA 及胰蛋白酶对 ^{125}I -apoC III 与小鼠肝细胞膜结合的影响

在反应介质中加 0—5 mmol/L CaCl_2 及 0—30 mmol/L EDTA-Na_2 , ^{125}I -apoC III 与肝细胞膜的结合没有改变; 肝细胞膜与 0—50 μg 胰蛋白酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30min 后, 与 ^{125}I -apoC III 的

结合显著降低. 表明 ^{125}I -apoC III 与小鼠肝细胞膜的结合不依赖 Ca^{2+} , 对胰蛋白酶敏感.

3 讨 论

ApoC III 是分布于血浆 VLDL, CM 及 HDL 含量最多的一类 C 族载脂蛋白. 血浆 VLDL 及 TG 升高时, 血浆 apoC III 显著升高. apoC III 生物学功能迄今尚未阐明. 体外实验发现, apoC III 可抑制 apoC II 对 LPL 的激活^[1]. apoC III 还可以抑制 CM 残骸及 VLDL 残骸被灌注肝脏受体的摄取^[2]. 这些初步研究表明, apoC III 在 VLDL 及 CM 的代谢中发挥重要作用.

我们在本室张林华等^[5]发现大鼠肝实质与非实质细胞膜上存在 apoC III 结合位点的基础上, 分离了人及小鼠肝细胞膜, 用 ^{125}I -apoC III 建立了 apoC III 受体分析法, 证实了 Gustafson^[4]及张林华等提出的肝实质与非实质细胞膜上存在 apoC III 受体的设想. 本研究发现, 人及小鼠部分纯化的肝细胞膜存在可饱和特异性结合 ^{125}I -apoC III 的位点, Scatchard 作图呈直线, $r = -0.921$, K_d 为 $3.7 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $B_{\max}$ 为 $1.52 \mu\text{g/mg}$ 膜蛋白, apoC III 及 VLDL 能竞争性抑制 ^{125}I -apoC III 与膜蛋白结合, LDL 及 HDL 对结合无影响. ^{125}I -apoC III 结合特性研究表明, 肝细胞膜 apoC III 受体不同于已发现的肝脏其它脂蛋白受体, 如 LDL 受体, HDL 受体, apoE 受体及 apoA IV 结合位点. ^{125}I -apoC III 与膜的结合不依赖于 Ca^{2+} , 不受 EDTA 抑制, 对胰蛋白酶敏感. 而肝脏 LDL 受体及 apoE 受体与相应配体的结合则需 Ca^{2+} 存在^[4]; HDL 与 HDL 受体的结合不依赖于 Ca^{2+} , 对胰蛋白酶不敏感^[10]; apoA IV 结合位点部分依赖于 Ca^{2+} , 且对胰蛋白酶亦不敏感^[11]. 由此可见, 肝细胞膜 apoC III 结合位点是一种不同于上述几种已发现的脂蛋白受体的新受体.

由于正常人血浆 apoC III 主要分布于 VLDL 中; 且几种血浆脂蛋白中, 仅 VLDL 能竞争性地抑制 ^{125}I -apoC III 与膜结合; 我们对 apoC III 结合位点的组织及细胞定位进行了研

究, 发现 apoC III 结合位点仅存在于肝细胞膜表面 (图 3); 因此, 我们推测, 存在于肝细胞膜表面的 apoC III 受体能通过 apoC III 识别与结合 VLDL, 从而影响 VLDL 的降解代谢, apoC III 参与识别结合 apoC III 受体的作用可能是 apoC III 调节 VLDL 代谢的新功能. 以上仅是对 apoC III 受体的初步探讨, 其本质及确切功能尚有待进一步研究.

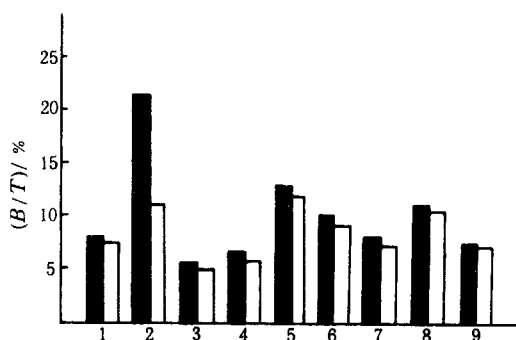


图 3 小鼠各组织匀浆与 ^{125}I -apoC III 的结合

Fig. 3 Binding of ^{125}I -labeled human apoC III to different tissues homogenate of mouse

- : 总结合量; □: 非特异性结合量
 ■: Total Binding; □: Nonspecific Binding
 1. 心脏; 2. 肝; 3. 脾; 4. 肺; 5. 肾; 6. 胃;
 7. 大肠; 8. 小肠; 9. 肌肉
 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung;
 5. Kidney; 6. Stomach; 7. Large intestine;
 8. Small intestine; 9. Muscle

本教研室张林华博士等在技术上给予了帮助, 谨致谢意.

参 考 文 献

- Mahley R W, Innerarity T L, Rall S C *et al.* Plasma lipoproteins; apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 1984; **25**: 1277
- Chao Y, Windler E, Chen G *et al.* Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *J Biol Chem*, 1979; **254**: 11360
- Van Berkel T, Kruijt J, Scheek L *et al.* Effect of apolipoprotein E and C III on the interaction of chylomicrons with parenchymal and non-parenchymal cells from rat liver. *Biochem J*, 1983; **216**: 71
- Gustafson S. Apolipoprotein C II, C III and E: studies on

- their distribution in serum and their role in the uptake of lipoproteins by reticuloendothelial cells. *Acta Universitatis Upsaliensis*, 1986; **57**: 1
- 5 张林华, 刘秉文. 大鼠肝非实质细胞载脂蛋白CⅢ结合位点(受体)的研究. 华西医科大学学报, 1992; **23** (3): 23
- 6 刘秉文, 傅明德, 刘婉珍等. 人血浆载脂蛋白CⅠ, CⅡ及CⅢ的分离与鉴定. 华西医科大学学报, 1986; **17**: 81
- 7 刘秉文, 张林华, 刘婉珍等. 人血清载脂蛋白CⅢ放射免疫测定法的研究. 华西医科大学学报, 1987; **18**: 1
- 8 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
- 9 Ray T K. A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1970; **196**: 1
- 10 张林华, 刘秉文, 蓝天鹤. 大鼠肝细胞膜高密度脂蛋白受体的研究. 生物化学与生物物理进展, 1991; **18**: 42
- 11 Weinberg R, Patton C. Binding of human apolipoprotein AⅣ to human hepatocellular plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1990; **1044**: 255

Study of apoCⅢ-Binding Sites of Human and Mouse Hepatic Plasma Membranes

Fang Dingzhi Liu Bingwen

(Department of Biochemistry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

ABSTRACT

A specific, sensitive and simple radioligand binding assay for apoCⅢ-binding sites of hepatic plasma membranes has been established by separation of B/F with PEG. Addition of increasing concentration of ^{125}I -labeled apoCⅢ to human hepatic plasma membranes revealed saturation binding to membranes with a K_d of $0.31\text{ }\mu\text{mol/L}$ ($3.1\times 10^{-7}\text{ mol/L}$) and binding maximum of $1.74\text{ }\mu\text{g/mg}$ of membrane protein. In displacement studies using unlabeled apoCⅢ and isolated lipoproteins HDL, LDL and VLDL, only apoCⅢ and VLDL effectively competed with ^{125}I -apoCⅢ for membrane binding sites. The binding of ^{125}I -apoCⅢ to human liver plasma membranes was Ca^{2+} -independent and was abolished when plasma membranes were treated with trypsin. The characteristics of apoCⅢ-binding sites of mouse liver plasma membranes was similar to that of human liver plasma membranes with an exception of binding maximum of $1.52\text{ }\mu\text{g/mg}$ of membrane protein.

Key words apoCⅢ binding sites (receptors), hepatic plasma membranes, radioligand assay

嗜肝病毒家族成员间进化关系的初步研究*

吴玉章 朱锡华

(第三军医大学免疫学教研室, 重庆 630038)

提 要

比较分析了嗜肝病毒家族四成员间的全基因核苷酸序列, 得出了它们之间的相对进化距离, DHBV 分野最早, GSHV, WHV 次之, HBV 最晚; 其进化方式属趋

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1992-02-29 修回日期: 1992-06-13