

脂蛋白(a)的赖氨酸结合异质性对人动脉SMC增殖的影响*

喻红 汪炳华 洪嘉玲** 武军驻 王韵 李小明

(湖北医科大学生物化教研室, 武汉 430071)

摘要 为探讨脂蛋白(a) [Lp(a)]的赖氨酸结合功能在致动脉粥样硬化中的作用, 利用短时超速离心结合凝胶层析分离纯化Lp(a), 以Lysine-Sepharose 4B亲和层析分离出能与柱结合的Lp(a) Lys⁺和不能与柱结合的Lp(a)Lys⁻. 采用MTT比色法、流式细胞仪分析细胞增殖状况, 同时以ELISA法检测细胞培养液中转化生长因子 β (TGF- β)的活化水平, 观察了两种Lp(a)对培养的人动脉平滑肌细胞(SMC)增殖的影响. 结果表明: Lp(a)、Lp(a)Lys⁺较Lp(a)Lys⁻能有效地促进SMC增殖, 刺激细胞从G₀/G₁期进入S和G₂/M期, 并显著降低培养液中TGF- β 活化量. 提示: Lp(a)Lys⁺可能是Lp(a)促人SMC增殖的主要组分, 其机制可能与干扰纤溶酶原活化, 从而抑制TGF- β 活化有关.

关键词 脂蛋白(a), 赖氨酸结合, 平滑肌细胞, 转化生长因子 β

中图分类号 Q513⁺. 5, Q253, Q503

Effects of Lysine-binding Heterogenous Lipoprotein (a) on the Proliferation of Human Arterial Smooth Muscle Cells*

YU Hong, WANG Bing-hua, HONG Jia-ling**, WU Jun-Zhu, WANG Yun, LI Xiaoming

(Department of Biochemistry, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

Abstract The effects of lysine-binding heterogenous lipoprotein (a) [Lp(a)] on proliferation of human arterial smooth muscle cells (SMCs) and its mechanism of action were investigated. Lp(a) was isolated and purified from human plasma by ultracentrifugation and gel permeation chromatography, followed by Lysine-Sepharose 4B affinity chromatography, which was separated into Lp(a)Lys⁺ and Lp(a)Lys⁻. The proliferation of SMCs was determined by flow cytometry and MTT colorimetry. ELISA assay was used to detect the active form of transforming growth factor β (TGF- β). The results showed that Lp(a), Lp(a)Lys⁺ effectively promoted proliferation of human SMCs, stimulated cells in the G₁/G₀ phase of cell cycle to S and G₂/M phase, and reduced significantly the amounts of active TGF- β in culture, however, Lp(a)Lys⁻ had no effect. The results suggest that Lp(a)Lys⁺ might be the major source of Lp(a) in stimulating the proliferation of SMCs and its mechanism may be involved in inhibition of plasminogen activation and consequently the activation of latent TGF- β .

Key words Lipoprotein (a), Lysine binding, Smooth muscle cells, Transforming growth factor- β

脂蛋白(a) [lipoprotein (a), Lp(a)]是已公认致动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的独立危险因素, 但致病机制至今尚未完全阐明. 由于其结构中载脂蛋白(a) [apolipoprotein (a), apo(a)]与纤溶酶原(plasminogen, Pg)高度同源, 目前认为Lp(a)可竞争性干扰Pg的赖氨酸结合部位(lysine-binding site, LBS)与血纤维蛋白、血细胞及血管内皮细胞等的结合及其活化, 抑制纤溶过程^[1]. 近年有实验表

明, 人血浆Lp(a)存在有赖氨酸结合能力上的差异, 即可分成能与赖氨酸亲和柱结合的Lp(a)Lys⁺和

* 湖北省卫生厅重点资助项目(97407)

** 联系人 Tel: (027)87331907, Fax: (027)87307966

E-mail: shh@hbm.u.edu.cn

喻红, 女, 1968年12月生, 医学博士, 副教授

收稿日期: 1999-11-16, 修回日期: 2000-04-03

不能与柱结合的Lp(a)Lys⁻, 它们在对Pg的结合与活化的抑制能力上有明显差异^[2]. 而Grainger等^[3]报道Lp(a)能促进人动脉平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)增殖, 可能与其干扰Pg活化形成纤溶酶, 从而抑制转化生长因子 β (transforming growth factor β TGF- β)活化有关. 鉴于血管壁SMC增殖在AS病变的发生发展过程中处于关键地位, 本研究用亲和层析分离赖氨酸结合功能异质性的两种Lp(a), 观察二者对培养的人动脉SMC增殖的影响.

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、小牛血清(calf serum, CS)(Gibco); 胰蛋白酶、胶原酶I型、L-Lysine、6-氨基正己酸(6-amino-caproic acid, EACA), MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl-2, 5]-diphenyltetrazolium bromide)、碘化丙锭(propidium iodide, PI)、RNase A (Sigma); Sephacryl S-400, CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia); TGF- β EmaxTM Immunoassay System (Promega); 羊抗人apo(A)、apo(B) IgG、胎儿血清(自行制备), 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 人动脉平滑肌细胞培养

取水囊引产胎儿的主动脉胸腹段, 按本室建立的酶离结合贴块法^[4]进行SMC培养, 原代细胞培养液采用含10%胎儿血清及10%FBS的DMEM. 传代培养常规进行, 实验所用为第5~8代细胞.

1.2.2 脂蛋白(a)的制备

1.2.2.1 Lp(a)的分离纯化^[5]: 单向火箭免疫电泳法筛选高Lp(a)含量血, 以磷钨酸 Mg^{2+} 沉淀, 制备含apo(B)脂蛋白溶液, 经短时超速离心结合Sephacryl S-400凝胶层析分离纯化Lp(a).

1.2.2.2 Lp(a)的Lysine-Sepharose 4B亲和层析: 常规方法制备L-Lysine-Sepharose 4B亲和层析柱, Lp(a)纯品上柱, 室温保留4h, 先后以0.1 mol/L PBS(含0.2 mol/L NaCl, 2.0 mmol/L EDTA-Na₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4)及含0.2 mol/L EACA的PBS洗脱. 分别集中两部分洗脱液, 充分透析, 聚乙二醇-20000浓缩后即得Lp(a)Lys⁻和Lp(a)Lys⁺, 双层火箭免疫电泳进一步确定两部分Lp(a)的性质及含量.

1.2.3 MTT 比色法^[6]

将生长良好的SMC调整为 5×10^4 个细胞/ml的悬液, 按每孔0.1 ml接种于96孔培养板, 37、5% CO₂温育24h后换无血清培养液培养24h, 使细胞同步化至G₀期, 然后随机分组, 以含5% CS的DMEM为对照组, 各组脂蛋白终浓度均为100 mg/L, 作用48h后每孔加入MTT (50 g/L) 15 μ l, 于37 培养4h, 加异丙醇100 μ l充分溶解蓝紫色结晶, 酶标仪上测定570 nm的吸光度, 用A₅₇₀值表示活细胞生长情况.

1.2.4 流式细胞仪分析细胞周期

SMC以 1×10^5 个/ml分瓶接种于25 ml培养瓶中, 37、5% CO₂培养24h, 无血清培养液同步化处理, 分组同上. 细胞处理后24h制备成单细胞悬液于70%乙醇固定. 细胞染色前弃固定液, PBS洗涤, 加RNase A (1.0 mg/ml) 37 水浴30 min, 再以碘化丙锭(PI)染色液避光染色30 min, 于流式细胞仪(FACSORT, 美国BD公司)上检测, 计算样品细胞各周期时相分布(G₀/G₁/S和G₂/M期的DNA含量), 每个样本测定 8×10^4 个细胞.

1.2.5 培养液中TGF- β 生物活性测定^[7]

人SMC于10%CS的DMEM培养24h后更换培养液, 分组同上, 经96h后收集培养液, 贮存于-20 一周内测定. 培养液中TGF- β 的活化量测定用TGF- β EmaxTM Immunoassay System试剂盒直接按ELISA法进行分析. TGF- β 总量, 则将标本酸化处理使潜活的TGF- β 活化, 然后中和样本, 再以ELISA法测定.

1.2.6 统计学分析

实验结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 Lp(a)Lys⁺和Lp(a)Lys⁻的分离鉴定

将Lp(a) 20 mg经Lysine-Sepharose 4B亲和层析分离纯化得到Lp(a)Lys⁺ 11.1 mg和Lp(a)Lys⁻ 5.0 mg, 两者经双层火箭免疫电泳鉴定均只在抗apo(A)抗体凝胶部分出现火箭峰(Fig 1).

2.2 Lp(a)Lys⁺和Lp(a)Lys⁻对培养的人SMC增殖的影响

2.2.1 MTT比色法检测细胞增殖 与对照组比较, Lp(a)、Lp(a)Lys⁺组A₅₇₀值明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Lp(a)Lys⁻虽使A₅₇₀值增加, 但与对照组比较无显著性差异, 而Lp(a)Lys⁺与Lp(a)

Lys⁻ 相比, A₅₇₀ 值明显增高, 差异有高度显著性 ($P < 0.01$) (Table 1) .

Anti-apoB

Anti-apo(a)

A B C D E F

Fig 1 Double-decker rocket immunoelectrophoresis of

Lp(a)Lys⁻ and Lp(a)Lys⁺

A: Lp(a)Lys⁻; B: Lp(a)Lys⁺; C, D: Lp(a)+LDL;
E, F: LDL

2.2.2 流式细胞仪分析 Lp(a)Lys⁻ 组细胞增殖指数 (proliferation index, PI) 与对照组比较无显著

Table 2 Effects of lipoproteins on cell cycle of human arterial SMC

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
Control	80.70 ± 2.17	18.71 ± 2.04	0.59 ± 0.41	19.30 ± 2.17
Lp(a)	75.08 ± 3.33 ¹⁾	21.24 ± 3.13	3.68 ± 0.64	24.92 ± 3.33 ¹⁾
Lp(a)Lys ⁺	64.19 ± 4.52 ^{2), 3)}	28.96 ± 3.53 ²⁾	6.85 ± 2.55	35.82 ± 4.52 ^{2), 3)}
Lp(a)Lys ⁻	76.93 ± 3.06	19.64 ± 2.64	3.83 ± 1.02	23.07 ± 3.06

n = 5, $\bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ³⁾ $P < 0.01$, compared with Lp(a)Lys⁻ group; PI = (S + G₂/M) / (G₁ + S + G₂/M)

2.3 SMC 培养液中 TGF-β 活性测定

Lp(a)、Lp(a)Lys⁺ 组培养 TGF-β 活化量明显降低, 与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 而 Lp(a)Lys⁻ 则对 TGF-β 活化量无明显影响 ($P > 0.05$)。培养液中 TGF-β 总量 (潜活+ 活化的) 并不受 Lp(a)、Lp(a)Lys⁺ 和 Lp(a)Lys⁻ 的影响 (Table 3) .

Table 3 Effects of lipoproteins on the activation of TGF-β

Group	n	TGF-β/μg·L ⁻¹	
		Active	Latent plus active
Control	12	8.6 ± 1.6	16.8 ± 2.4
Lp(a)	12	3.8 ± 0.8*	16.1 ± 1.7
Lp(a)Lys ⁺	12	1.3 ± 0.2*	16.0 ± 2.0
Lp(a)Lys ⁻	11	7.4 ± 1.8	17.1 ± 2.5

($\bar{x} \pm s$) * $P < 0.01$, compared with control group

Table 1 Effects of lipoproteins on proliferation of human arterial SMC

Group	A ₅₇₀
Control	0.585 ± 0.052
Lp(a)	0.681 ± 0.055 ¹⁾
Lp(a)Lys ⁺	0.762 ± 0.055 ^{2), 3)}
Lp(a)Lys ⁻	0.629 ± 0.060

n = 10, $\bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with control group; ³⁾ $P < 0.01$, compared with Lp(a)Lys⁻ group

差异 ($P > 0.05$), 而 Lp(a)、Lp(a)Lys⁺ 组 PI 则明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 其中 Lp(a)Lys⁺ 与 Lp(a)Lys⁻ 组比较, PI 亦具显著性差异 ($P < 0.01$); 对细胞周期时相分布分析, 人 SMC 经无血清培养 24 h, 5% CS 刺激 24 h, 平均 80-70% 的细胞仍停留于 G₀/G₁ 期, 加脂蛋白的各组均促使 G₀/G₁ 期细胞进入 S 和 G₂/M 期, 其中 Lp(a)Lys⁻ 组的促进作用与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 Lp(a)、Lp(a)Lys⁺ 则有明显促进作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 Lp(a)Lys⁺ 与 Lp(a)Lys⁻ 组比较, 差异也具显著性 ($P < 0.01$) (Table 2) .

3 讨 论

Lp(a) 的赖氨酸结合异质性最先由 Amstrong 和 Leerink 等^[2] 研究提出, 并发现这种功能异质性与 apo(a) 的表型无关, 在蛋白质、脂质组成及电泳迁移率上也无明显差异。同一个体血浆中可同时有 Lp(a)Lys⁺ 和 Lp(a)Lys⁻ 的存在, 不同个体中两者比例可相差较大。本研究将混合血中分离纯化的 Lp(a) 进一步通过 Lys-Sepharose 4B 亲和柱, 得到的 Lp(a)Lys⁺ 和 Lp(a)Lys⁻ 比例约为 0.7:0.3, 应用双层火箭免疫电泳确认了二者均具免疫学活性。

对这种功能异质性的原因及作用目前仍在探讨中, 由于 Pglycine 结构中的 LBS 是其与细胞表面

受体、血纤维蛋白等的赖氨酸残基结合的关键部位,故 apo(a) kringle 上 LBS 的活性变化也可能是引起 Lp(a) 赖氨酸结合能力差异的主要原因. 有关转基因鼠的研究证实, 表达有赖氨酸结合功能活性的 apo(a) 或 Lp(a) 可明显促进 Lp(a) 在血管壁中聚集及脂质斑块的发生^[8,9]. 我们近年的工作也证实, 仅 Lp(a)Lys⁺ 部分能有效抑制 Pg 与血小板表面的结合^[10], 这些结果都说明 Lp(a) 的赖氨酸结合活性不同可能影响其致 AS 的能力.

SMC 增殖是贯穿于整个 AS 发生发展过程中的基本特征. 人 Lp(a) 能促进 SMC 的增殖, 此作用可能是通过 Lp(a) 或 apo(a) 竞争抑制细胞表面 Pg 活化, 减少纤溶酶生成而抑制 TGF- β 活化间接进行的^[3]. TGF- β 是一种调控细胞增殖、分化及其它一些功能的多功能细胞因子, 正常生理条件下, SMC 可分泌无活性的 TGF- β 经纤溶酶的蛋白水解作用切除其 N 端多肽而活化, 可抑制 SMC 的增殖及迁移, 转 apo(a) 基因鼠的动脉壁及血清中确实也发现 TGF- β 的活化受抑^[11]. 这些都是以总 Lp(a) 进行的研究, 本文将 Lp(a) 分为 Lp(a)Lys⁺ 和 Lp(a)Lys⁻ 两种组分, 比较观察了它们对血管 SMC 增殖的影响, 结果表明 Lp(a)、Lp(a)Lys⁺ 有明显的促人 SMC 增殖的效应, 均显著降低 TGF- β 活化量, 而 Lp(a)Lys⁻ 则无显著影响. 揭示 Lp(a) 促人 SMC 增殖效应可能主要是 Lp(a)Lys⁺ 组分的作用, 其机制可能是 Lp(a)Lys⁺ 通过干扰 Pg 活化形成纤溶酶从而抑制 TGF- β 活化而间接实现的. 由此可以推测, 对一个高 Lp(a) 血浆水平的个体而言, 如其 Lp(a)Lys⁺ / Lp(a)Lys⁻ 比率越高, 则发生 AS 的危险性大大增加. 因此进一步研究 Lp(a) 的赖氨酸结合异质性的分子机制及其与 AS 作用的关系将有十分重要的意义.

参考文献(References)

1 Hajjar K A, Nachman R L. The role of lipoprotein (a) in atherogenesis and thrombosis *Ann Rev Med*, 1996, **47**: 423~442

- 2 Leerink C B, Duif P F, Gimpel J A, Kortlandt W, Bouma B N, van Rijn H J M. Lysine-binding heterogeneity of Lp(a): consequence for fibrin binding and inhibition of plasminogen activation. *Thromb Haemost*, 1992, **68**(2): 185~188
- 3 Grainger D J, Kirschenlohr H L, Metcalfe J C, Weissberg P L, Wade D P, Lawn R M. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein (a). *Science*, 1993, **260**: 1655~1658
- 4 喻红, 汪炳华, 洪嘉玲. 氧化型脂蛋白(a)对兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响. 中国动脉硬化杂志 (Yu Hong, Wang Bing-hua, Hong Jia-ling. Effect of oxidized Lipoprotein (a) on proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells *Chin J Arterioscler*), 1998, **6**(3): 198~201
- 5 喻红, 汪炳华, 洪嘉玲, 许春玲, 林春榕. 一种快速简便的人血浆脂蛋白(a)分离方法. 湖北医科大学学报 (Yu Hong, Wang Bing-hua, Hong Jia-ling, Xu Chun-ling, Lin Chun-rong. A rapid and simple method for isolation of human plasma Lipoprotein (a). *Acta Acad Med Hubei*), 1998, **19**(suppl): 14~16
- 6 Kotnik V, Fleischmann W R. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J Immunol Meth*, 1990, **129**: 23~30
- 7 Veba H, Kawakami M, Yaginuma T. Shear stress as an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation: role of transforming growth factor- β and tissue-type plasminogen activator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**(8): 1512~1516
- 8 Hughes S D, Rubin E M. Vascular accumulation of Lp(a): *in vivo* analysis of the role of lysine-binding sites using recombinant adenovirus *Clin Genet*, 1997, **52**(5): 861~866
- 9 Boonmark N W, Lou X J, Yang Z J, Schwartz K, Zhang J L, Rubin E M, Lawn R M. Modification of apolipoprotein (a) lysine binding site reduces atherosclerosis in transgenic mice *J Clin Invest*, 1997, **100**(3): 558~564
- 10 汪炳华, 洪嘉玲, 陈丽达, 武栋成. 脂蛋白(a)的赖氨酸结合异质性对纤溶酶原与血小板结合的影响. 基础医学与临床 (Wang Bing-hua, Hong Jia-ling, Chen Lida, Wu Dong-cheng. Effects of Lysine-binding heterogeneity of Lipoprotein (a) on the binding of plasminogen to platelets *Basic Med Sci Clinics*), 1999, **2**: 68~74
- 11 Grainger D J, Kemp P R, Liu A C, Lawn R M, Metcalfe J C. Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein (a) in mice *Nature*, 1994, **370**: 460~462