

血浆脂质转运蛋白

上海医科大学药学院生化教研室 梅美珍 吴满平

七十年代中期发现血浆无脂蛋白部分具有一种特殊转运蛋白^①。它可促进脂蛋白间胆固醇酯(CE)和甘油三酯(TG)转运和交换,称脂质转运蛋白(LTP)或胆固醇转运蛋白(CETP)。现已证实血浆脂质转运蛋白并不是载脂蛋白D。从它的发现迄今才十多年,由于它与其它脂蛋白代谢有关酶一起参与脂蛋白代谢调控,并与动脉粥样硬化的发生密切相关,故引起人们对该领域研究的极大兴趣。

1 LTP 的结构

1978年 Zilversmit 首次从人血浆分离纯化得LTP,它是一个大分子糖蛋白。与此同时 Chajek 与 Fielding 等^②发现 HDL 中有可观量的 LTP。Morton 和 Zilversmit 改进提纯方法,观察到两个组分,其分子量分别为 58 000 与 66 000 Daltons。这两个组分对非极性脂质、TG 的转运同样有效,其速率比转运 CE 小 30%。各种汞试剂能抑制 TG 转运,但对 CE 转运却不影响。有人认为低分子量组分是高分子量的降解产物。用免疫亲和法能纯化得到的 LTP 的分子量低至 30 000 Da。Hesler 等改进了纯化方法,将 LTP 及附于 TG 乳剂,所得到的 LTP 分子量为 74 000 Da。有人认为各实验室所分离得到的 LTP 分子量不同,部分原因是由于有神经胺酶存在,该酶常与 LTP 一起被提取,神经胺酶可催化 LTP 中的唾液酸释出。该酶在 4℃ 可能被激活,除非有 EDTA 或巯基乙酸存在。

现已分离到两种 LTP:①LTP-I:与报道的分子量为 74kD 的 LTP 为同一蛋白,具有 CE 及 50% 磷脂(PL)的转运活性。②LTP-II:具有 50% 的 PL 转运活性,但无 CE 转运活性。

1987年 Drayon 等^③从克隆 LTP 的 cDNA 测定了 LTP 的完整一级结构(编码人血浆 LTP 的 cDNA 顺序已测定,从 cDNA 推测人血浆完整氨基酸顺序),它是一个 17 个氨基酸组成的信号肽和一个 476 个氨基酸多肽组成的酸性糖蛋白,含有丰富

的非极性氨基酸,故 LTP 具有较强的疏水性。在 LTP 分子结构中有 4 个 N-连接的糖基化部位(即 88、240、342、397 位门冬酰胺)。去掉信号肽的 LTP 表观分子量为 74kD。

附表 LTP-I 和 LTP-II 的性质比较^④

性质	LTP-I	LTP-II
蛋白质种类	酸性糖蛋白	不清楚
分子量(kD)		
凝胶过滤法	65	70
SDS 凝胶电泳法	64	69
等电点	5.0	5.1
热稳定性	58℃ 稳定 1 小时	不稳定
与肝素结合	不能	能
与抗 LTP-I 的反应	能沉淀	不能沉淀
CE、TG 转运	能	不能
PL 转运	能(50%)	能(50%)

Tall 等^⑤采用突变扫描技术,分析了 27 个连接插入变种,结果表明大多数变种仍具有正常 LTP 活力,只有在下列三个区域:①48~53 氨基酸区域;②165 位氨基酸;③313~379 氨基酸区域的氨基酸被取代后,则对 LTP 的活力产生严重的影响。表明氨基酸的取代对 LTP 活力影响不大。分子中疏水基的相互作用对维持 LTP 结构起重要作用。LTP 活性不需要糖基部分,然而糖基化对 LTP 活性形式的形成是必需的^⑥。

人 LTP 基因定位在染色体的长臂 16 处,接近于 LCAT 编码的基因^⑦。人 LTP 基因大约为 25kbp,有 16 个外显子(32~250bp)和 15 个内含子(87~6000bp)。已知人肝、小肠、肾上腺、脾各器官及脂肪组织均具有 mRNA。LTP 的一级结构和基因组成不同于载脂蛋白及其它脂蛋白代谢酶编码的基因,然而与 apoA I、apoA IV、LTP 都有一段相

同氨基酸顺序:Val-Leu-Thr-Leu-Ala[®],这段相同的氨基酸顺序究竟有何意义则不清楚。LTP的一级结构与人的亲神经杀菌蛋白或通透性增加蛋白及脂多糖结合蛋白的结构有关,而事实上整个结构的相似程度低,编码这些蛋白的基因在进化上可能有同源性。

Akihiro Inazu 等[®]应用交替拼接技术研究了人LTP的基因表达。结果表明,在人某些组织中,通过第九个外显子交替拼接,可修饰LTP基因表达,产生无转运中性脂质活性的其它活性蛋白,可能作为调节生物活性蛋白局部浓度的“开关”。

2 LTP 的功能

2.1 在 HDL 各亚类间转运和平衡由 LCAT 催化生成的 CE

绝大部分 LCAT 与含 apoA I 而不含 apoA II 的 HDL(仅占很少部分)相联结。在血浆中 LCAT 仅作用于此小部分 HDL,产生 CE,再由 LTP 转运到其它 HDL。已证实人血浆 TG 浓度与 HDL-C 呈负相关。人血浆 HDL-C 水平降低同时伴有 HDL₂ 减少, HDL₂ 颗粒较大,所含 CE 比 HDL₃ 多。高 TG 血症患者缺少 HDL₂。研究表明,当血浆 TG 增加的同时, HDL₃ 颗粒变小[®]。一些体外试验结果,推测高 TG 血症患者的 LTP 可能使 CE 除去,同时使 HDL 颗粒变小。

相反,无 β -脂蛋白血症患者缺少 LTP,出现富含 CE 的大颗粒 HDL₂,这种患者缺乏含 apoB 的颗粒。如这种病人补充 VLDL 及 LPL 后,其 HDL 颗粒的大小和组成几乎与正常的 HDL 相同。

2.2 在各类脂蛋白间交换会含不同脂肪酸的 CE

体内 CE 来源有两种:①由肝和小肠酰基胆固醇酯转移酶(ACAT)催化生成;②由血浆 LCAT 催化生成(主要为亚油酸酯)。事实上血浆中任何一种脂蛋白,包括肝和小肠分泌的 VLDL 和 LDL,它们的 CE 组成都和 HDL 中 LCAT 催化生成的 CE 相同,这是由于 LTP 交换的结果。

LTP 对 CE 的转运强度与 CE 脂肪酸组成有关[®]。不论用重组 HDL 或超声粉碎的 PL 脂质体作为供体,再加入不同脂肪酸的 CE,进行体外转运试验。其结果表明,不同脂肪酸 CE 的转运量顺序为:胆固醇油酸酯>胆固醇亚油酸酯>胆固醇花生四烯酸酯>胆固醇棕榈酸酯。棕榈酸酯的转移量为油

酸酯的 65%。

CE 从 HDL 转移至含 apoB 的接受体亦与 LP(a)有关。当 LP(a)存在时,CE 从 HDL 向 LP(a)的转运只有无 apo(a)时的一半,即非常类似于转运至正常的 LDL[®]。

2.3 促进 HDL 和 LDL 的 CE 与富含 TG 脂蛋白的 TG 交换

当 LTP 存在时, HDL 和 VLDL 一起保温,近于等分子量的 CE 与 TG 相互向反方向转移,从而观察到 CE 与 TG 的净转运,这是一种不均一的交换,CE 从 HDL 转移至 VLDL、CM 及其残粒,最终至 LDL, TG 从 VLDL、CM 转移至 HDL、LDL,这是 LTP 的主要功能。

Fielding PE 实验结果提示[®]:LCAT 催化生成的 CE 有 2/3 转运至 VLDL 和 LDL,这一转运与 apoB 无关。CE 在各类脂蛋白间转运取决于 LTP 和脂蛋白的结合。LTP 和 HDL 的亲合力大于与 LDL 的亲合力,故 LTP 优先促进 HDL 各亚类间 CE 的交换与平衡。

LTP 与各脂蛋白的结合呈饱和性,其转运活力与 LTP 和脂蛋白结合力成比例。

2.4 促进 CE 在细胞与血浆脂蛋白间的转运

体外试验表明 LTP 促 HepG₂ 细胞摄取 HDL-CE,但不影响 HDL 中蛋白质摄取[®]。近来发现,当 LTP 存在时,牛主动脉平滑肌细胞流出的 Ch 增加 3~10 倍,当巨噬细胞中 CE 含量增加时,其 LTP 分泌也增加。LTP 也促进肝外细胞中 Ch 流出及肝细胞摄取 Ch,这些均有利于胆固醇逆向转运。大鼠血浆无 LTP,如用大鼠血浆作试验,则 Ch 流出不增加,兔主动脉平滑肌细胞和人成纤维细胞, LTP 对它们摄取 CE 的影响较小。LTP 对猪主动脉内皮细胞和 J774 M ϕ 摄取 CE 无促进作用,但可加速 CE 流出。奇怪的是转运引起的 CE 流出并不依赖于培养基中接受体颗粒。

2.5 促进血浆 PL 转运

LTP-I 和 LTP-II 各具有 50% 血浆 PL 转运活性。它们促进 LDL、VLDL 与 HDL 间 PL 交换和净转运。

3 LTP 的作用机制

LTP 介导 CE 转运动力学研究表明, LTP 与脂蛋白结合是一种物理相互作用,可能通过脂蛋白表

面卵磷脂上带负电的磷脂酸胆碱部分或带负电脂肪酸的静电作用,这是一个饱和性的可逆过程。如血浆 pH 降至 5.5 时可使 LTP 从脂蛋白结合部位完全水解下来。这种结合在脂质转运中极为重要。

LTP 介导的 CE 转运可能存在两种模式:

(1) Ihm 等假设的模式是:LTP 和脂质供体(HDL)及脂质受体(LDL 或 VLDL)形成三元复合物^⑧,然后通过三元复合物进行脂质交换,这是通过凝胶过滤法而证实的,研究证明,负电荷可促进这种结合,而很容易被 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 所破坏或分解。

(2) LTP 作为脂质载体在脂蛋白间穿梭而进行脂质转运,即乒乓机制^⑨,但一些动力学研究结果不支持乒乓机制,且乒乓模式也不能完全解释 LTP 结合供体脂蛋白、受体脂蛋白的增加导致脂质交换增加的现象。

已有研究表明脂蛋白组成改变而使 LTP 与脂蛋白结合增加,从而促进脂质转运,这一事实支持三元复合物模式。两种模式不同,但他们都提出 LTP 必需结合到脂质表面,这一点两者是一致的。

4 影响 LTP 活性的因素

4.1 LTP 抑制因子(LTIP)

Barter 等报道大鼠或猪的 LTP 活性(LTA)小或没有 LTP,为了阐明其原因是否由于缺乏 LTP 还是有抑制剂存在,Morton 与 Zilversmit^⑩对此进行了研究。他们观察到大鼠或猪的无脂蛋白血浆加入部分纯化的兔 LTP,则兔 LTP 的转移活性降低。更惊奇的是,无脂蛋白人血浆加入部分纯化的人 LTP,其活力也降低,这两者抑制 CE 和 TG 交换极为相似,其抑制程度主要依赖于供体脂蛋白和受体脂蛋白。表明无脂蛋白血浆中有抑制因子存在。

经分离及分析此抑制因子,表明它为含唾液酸的糖蛋白,分子量 32 000 Da。Nishide 等纯化的抑制因子分子量为 29 000 Da 存在于 HDL 亚组分,仅占 HDL 总量的 1%。LTIP 能抑制 LTP-I 和 LTP-II 介导的 CE、TG、PL 转运。用免疫亲和层析法分离除去 LTIP,可提高人、猪及大鼠血浆 LTP 活性,大鼠 LTP 活性可提高 123%,猪提高 222%。因此这些 LTP 活性低的动物并非缺乏 LTP,而是由于抑制因子的存在所致。

HepG₂ 细胞培养基中分泌一种抑制蛋白与含 apoE 脂蛋白颗粒,这种抑制蛋白的特性有待进一步研究。

4.2 血浆脂蛋白池大小和脂蛋白组成

脂蛋白池大小变化可引起 LTP 在脂蛋白间分配的改变,从而影响脂质转运的活性。脂蛋白组成的变化在调节 LTP 活性中起重要作用^⑪。当 HDL 中 TG/CE 比值升高,CE 转运到 HDL 也减少,这就导致 HDL 的正常成熟受阻。高 β -脂蛋白血症、宽 β -脂蛋白血症和伴有高 TG 冠心病患者,其 LCAT 活性正常,但 VLDL 和 LDL 浓度和组成均显著变化,使 CE 转运到 VLDL 和 LDL 受阻。

4.3 LPL、HL 和 LCAT

VLDL 和 HDL 通过 LPL 和 HL 的脂解作用释出游离脂肪酸并改变这两脂蛋白的组成,从而影响 LTP 活性^⑫。所释出的游离脂肪酸可以提高和修饰 LTP 活性。LTP 与游离脂肪酸有协同作用,但作用机制不清楚,LTP 可能从脂蛋白表面或循环中获得游离脂肪酸,并与之形成复合物,接着与 HDL 反应并进行修饰。

LCAT 和 LTP 在 HDL₂ 的表面相互作用,促进 HDL-CE 转运到 VLDL 和 LDL,这一作用必须要有 apoA I 参加^⑬。但 LCAT 不能提高 HDL₂ 中 CE 的转运,即 LTPL 活性不升高。LTP 与 LCAT 相互作用可能促使 LTP 中脂质结合部位成为最适定位,促进 CE 趋近结合部位,导致中性脂质转运增加。

5 LTP 与胆固醇逆向转运(RCT)

已证实肝细胞与外周细胞间有胆固醇的双向流动,胆固醇从外周细胞转入肝细胞的过程称为胆固醇逆向转运(RCT)。血浆 LTP 参与 RCT,有些直接证据表明血浆 LTP 可调节胆固醇从血浆转运至肝脏的速率。

LCAT 作用结果可造成组织与血浆脂蛋白间的浓度差,驱动组织 Ch 流向血液。在 LTP 作用下,经 LCAT 催化生成的 CE 可转运至富含 TG 的脂蛋白,实际最终流向残粒和 LDL,通过肝脏相应受体摄取这些 CE 完成 RCT。同时 LTP 还参与细胞 Ch 流出^⑭和肝脏摄取 HDL-CE^⑮。因此 LTP 在 RCT 中占有重要地位。它不仅提供了一条 LCAT 所生成 CE 代谢的主要通路(通过 LDL 和残粒代谢),而且也在调节 LCAT 反应中起重要作用(去除产物 CE 抑制作用)。已有证据表明 LCAT、LTP 与含 apoA I 的 HDL 之间有联系,它们是胆固醇逆向转运的关键成份。HDL 对 CAD 的保护作用是否通

过胆固醇转运还不清楚,故研究 LTP 在 RCT 中的作用具有重要意义。

6 LTP 与 As 的关系

LTP 在 RCT 中占有重要地位,照理 LTP 在清除组织多余 Ch、防止 As 发生中起到有益的作用。Fielding 研究了 22 名冠心病的高脂血症患者,发现他们的 LTP 活性低下。但实际上大量证据却表明高活性 LTP 与 As 发生密切相关。LTP 活性种系差异很大,大鼠、豚鼠、狗、羊、牛、~~猪~~和北京鸭等 LTP 活性低,这些动物呈现抗 As 的作用,而兔、猴和人具有高活性 LTP,容易发生 As。日本人普遍遗传性 LTP 缺乏,但没有加速或明显 As 的报道,奇怪的是缺乏 LTP 的家族往往是长寿的。研究食蟹猴喂高脂饲料其 LTP 与 As 的关系,结果表明其血浆 LTP 是血浆 LPS 中致 As 的主要决定因素。以上事实可能是由于 LTP 促使 CE 从 HDL 转运至 LDL 或 LTP 影响 LDL 颗粒数的缘故。Tall 等^②认为 LTP 在促进 Ch 逆向转运的同时也促进 CE 聚集在致 As 极强的残粒和 LDL 中。他们用 Ch 喂饲家兔,发现其血浆 LTP 活性增加 2~3 倍,并伴有 CE 从 HDL 向含 apoB 脂蛋白转运的增加,以及 CE 在巨噬细胞中大量沉积,他们还发现低 HDL-CE 的高血脂患者其血浆 LTP 升高,以加速 HDL-CE 向含 apoB 脂蛋白转移。这些现象都有力地说明 LTP 的致 As 作用。Tall 等还认为,高 HDL-Ch 人的 HDL-CE 向 apoB 脂蛋白转运率低,高 HDL-Ch 可(至少部分)反映 HDL-CE 转运率低,他们可能具有另一条清除 HDL-CE 的途径。至少有两个证据证实这另一条途径的存在:①新合成 CE 的速率超过从 HDL 转运出 CE 的速率;②一些缺乏 LTP 活性的动物具有另一种处理 HDL-CE 的途径,即肝脏摄取含 apoE 的 HDL。相反,低 HDL-Ch 的人,可能(至少部分)由于加速 HDL-CE 转运的结果,这种人的高 LTP 活性往往继发于 apoB 脂蛋白的代谢变化(如低 LPL 活性,肝 LDL 受体缺陷等所造成的 apoB 脂蛋白升高)。高 LTP 活性引起残粒和 LDL 升高而造成 As。因此 LTP 提供了致 As 的残粒、LDL 水平增加, HDL-Ch 降低和 As 三者之间的相互联系。

Stein、Sparks、Heller 等均支持 Tall 的观点, Heller 发现有血管病变的冠心病患者血浆 LTP 较正常者升高 50%。Sparks 发现原发性高脂血症患

者 CE 从固相结合 HDL 向血浆 HDL 池转运降低,而转运至 LDL 增加,导致 CE 沉积在致 As 颗粒中,而不贮存在非致 As 的 HDL 池中。Stein 发现仓鼠喂饲脂肪和 Ch 后,血浆 LTP 活性升高,出现高 Ch 和 TG 血症,他认为 LTP 促进 CE 向残粒和 LDL 过程只有在不导致它们在血管内积蓄大量增加的情况下,才可能有利于胆固醇逆向转运,防止 As 发生。

缺乏 LTP 的高 α -脂蛋白血症患者,由于缺乏脂质转运活力,冠心病发生的危险性降低。LTP 缺乏的纯合子其总 Ch 与 HDL-Ch 升高,及 LDL-Ch 低于正常。一些无 LTP 活力的种系可能通过其它机制进行调节,如选择性摄取 HDL-CE 从而促进 Ch 平衡的调节。兔 LTP 活性四倍于人,喂饲高胆固醇和饱和脂肪的家兔,两周后即产生斑块。正常水平的 LTP 协助血浆 Ch 的清除,但食物性高脂(包括 Ch、TG)可导致过多 Ch 进入 LDL 池,高水平 LDL 可促使 As 斑块的形成。

王克勤等^③比较易患 As 家兔和不易患 As 北京鸭在以高 Ch 和脂肪喂养过程中血浆 LTP 水平的变化,发现家兔 LTP 活性从 26% 增加到 65%,而北京鸭 LTP 活性很小(<1%),饲养后仅增加 10% 左右。兔血浆 LDL 及其 Ch 与 apoB 大量增加,而北京鸭增加很少,apoB 亦然, HDL 和 apoA I 则明显增加,说明外源性 Ch 主要由 HDL 携带,家兔主要由 LDL 和 β -VLDL 携带。王克勤等并提出 HDL 受体途径的假设,且加以证实,认为北京鸭之所以不易形成 As 的原因,主要由于 HDL 中胆固醇酯化后,经 HDL 受体途径直接进入肝细胞代谢,而不被 LTP 反转运至 VLDL, LDL 经 LDL 或 apoE 受体途径代谢。

总之 LTP 及胆固醇逆向转运与 As 的关系是复杂的,可能由于动脉壁细胞中 LTP 的局部合成或者促进 Ch 流出,故 LTP 具有抗 As 作用。然而由于 LTP 的作用使 LPS 发生改变是典型的 As 先兆。当血浆脂蛋白残粒积聚时(如 β -脂蛋白血症) LTP 可促使 HDL 及富含 CE 残粒降低。应用能抑制 LTP 合成或其活性的药物处理脂质代谢障碍或 As,这是一种很好的实验方法,虽然它可使 HDL 增加 VLDL、LDL 及 LDL-CE 降低,但这些变化对阐明 As 的发病机制及防治还不够全面。LTP 与 As 的关系尚待进一步研究。

参考文献

1. Zilversmit D B, et al. Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein free rabbit plasma. *Biochim Biophys Acta* 1975;409:393
2. Chajek I, Fielding CJ. Isolation and characterization of human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:3445
3. Drayana D, Jarnagin AS, Mclean J, et al. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature* 1987;327:632
4. Albers JJ, et al. Plasma cholesteryl ester and phospholipid transfer proteins and their regulation. *Adv Exp Med Biol* 1988;243:213
5. Wang S, Deng L, Tall AR. Structure function studies of human cholesteryl ester transfer protein by linker insertion scanning mutagenesis. *Biochemistry* 1991;30:3484
6. Swenson TL, Simmons JS, Hester CB, et al. Cholesteryl ester transfer proteins is secreted by HepG2 cells and contains asparagine-linked carbohydrate and sialic acid. *J Biol Chem* 1987;262:162-71
7. Lusis AJ, Zollman S, Sparkes RS, et al. Assignment of human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21. *Genomics* 1987;1:232
8. Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, et al. Organization of the human gene of cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry* 1990;29:1372
9. Inazu A, Quinet EM, Tall AR. Alternative splicing of mRNA encoding the human cholesteryl ester transfer protein. *Biochemistry* 1992;31:2352
10. Chang LBF, Hopkins GJ, Barter PJ. Particle size distribution of high density lipoproteins as a function of plasma triglyceride concentration in human subjects. *Atherosclerosis* 1985;56:61
11. Morton RE. Specificity of lipid transfer protein for molecular species of cholesterol ester. *J Lipid Res* 1986;27:523
12. Groener JEM, Kostner GM. Lipid transfer protein catalyzed exchange of cholesteryl ester between high density lipoprotein and apoB containing lipoproteins. *J Lipid Res* 1987;28:1053
13. Fielding CJ, et al. The human plasma CETP structure and physiology. *Adv Exp Med Biol* 1988;243:219
14. Granot E, Tabas I, Tall AR. Human plasma cholesteryl ester transfer protein enhances the transfer of CE from high density lipoprotein into cultured HepG2 cells. *J Biol Chem* 1987;262:3482
15. Ihm J, Quinn DM, Busch SJ, et al. Kinetics of plasma protein catalyzed exchange of phosphatidylcholine and cholesteryl ester between plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1982;23:1328
16. Barter PJ, Jones ME. Kinetics studies of the transfer esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1980;21:238
17. Morton RE, Zilversmit DB. A plasma inhibitor of triglyceride and cholesteryl ester transfer protein activities. *J Biol Chem* 1981;256:11992
18. Sparks DL, Frohlich J, Lack AG, et al. Relationship between cholesteryl ester transfer activity and high density lipoprotein composition in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis* 1989;77:183
19. Barter PJ, Chang LBF, Newnham NN. The interaction of CETP and unesterified fatty acids promotes a reduction in the particle size of high density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta* 1990;1045:81
20. Nishide HJ, Koto H and Nishide T. Affinity of lipid transfer protein for lipid and lipoprotein particles as influenced by lecithine cholesteryl acyltransferase. *J Biol Chem* 1990;265:4876
21. Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *J Lipid Res* 1986;27:361
22. 王克勤,等. 鸭血清脂蛋白运转胆固醇的特点及其在抗动脉粥样硬化的作用. *中国医学科学院学报* 1986;8:88