

## 载脂蛋白 J 研究的进展

梅 美 珍

(上海医科大学药学院生物化学教研室, 上海 200032)

载脂蛋白 J 是一种生物体液中含量较丰富的糖蛋白, 近年来在生物学领域中越来越多地受到人们的关注。载脂蛋白 J 与载脂蛋白 A<sub>1</sub> 一起形成高密度脂蛋白 (HDL) 复合物, 参与末端补体反应, 为神经细胞和内分泌细胞颗粒的成分。在雄性生殖腔和上皮细胞腔的管中亦有载脂蛋白 J。它参与脂质运转、补体功能调节、精子成熟、组织再生、生物活性肽转运等, 在生理与病理过程中起着重要作用。

1983 年 Fritg IB 与其同事们从睾丸网液中提得, 从红细胞中亦可提取得到。它是一种成簇的蛋白, 称 clusterin。大约在同时 Griswold MD 与其同事通过双向凝胶电泳分析, 证明该糖蛋白通过培养大鼠足细胞 (sertolcell) 而分泌。为了研究载脂蛋白 J 的生理及其在生殖细胞繁殖中的重要性, 克隆了一些基因, 从 cDNA 推导大鼠硫酸酯糖蛋白-2 (SGP-2) 的氨基酸顺序, 并纯化了羊的载脂蛋白 J, 测定其氨基酸顺序, 表明大鼠与羊载脂蛋白 J 在种属上有同源性。1988 年分离到人的载脂蛋白 J, 通过克隆证明它是末端补体细胞溶解反应的特异抑制剂。该抑制剂特异地结合于新生末端补体复合物, 类似于全血清的 C<sub>3</sub>~C<sub>6</sub> 组分, 以 SP4040 表示 (CLI), 类似于 Vitronectin (以往称 S-蛋白)。在激素反应时组织改造, 接触化学毒剂, 肾性高血压及发育等情况时载脂蛋白 J 含量增加。最早发现大鼠前列腺退化, 雄性激素分泌时载脂蛋白 J 水平增高。后来研究表明, 当组织与毒剂接触发生细胞坏死时亦伴有载脂蛋白 J 生成。

载脂蛋白 J 的序列分析表明: 细胞溶解抑制剂、Sp40 40、T<sub>44</sub>、TRPM-2、pADHC-9、pTB<sub>18</sub>、载脂蛋白 J、NA-1/2、糖蛋白-Ⅱ (GP-Ⅱ)、HSL-19 及 GP80 均为同一蛋白或在种属上是同源的。

### 1 载脂蛋白 J 的分子结构

通过纯化蛋白的氨基酸序列分析和脊椎动物 (包括人、大鼠、羊、牛、狗、仓鼠、鹌鹑等) 各种组织提取的 cDNA 顺序分析相结合阐明了载脂蛋白 J 的氨基酸顺序。应用不同哺乳动物 cDNA 通过 southern blotting 及分子杂交分析表明载脂蛋白 J 为单个拷贝基因的翻

译产物, 即在人第八对染色体的基因。人与狗及人与羊载脂蛋白 J 的氨基酸和它们 mRNA 的碱基顺序有很高的同源性 (分别为 78% 和 72% 的氨基酸相同), 鹌鹑和人的同源性较差 (为 49%), 这与它们之间的系统发育差距相符。其中有一个片段的同源性很大 (即残基 87~150 间有 98% 氨基酸相同), 推测该片段具有重要功能。

人的载脂蛋白 J 为不均一的二聚体, 由大小几乎相同的  $\alpha$ 、 $\beta$  (35~40 kDa) 亚基组成, 计算所得分子量为 51 kDa。大鼠足细胞的载脂蛋白 J 含 23%~30% 糖, 并高度硫酸化, 称为大鼠硫酸化糖蛋白-2 (SGP-2), 翻译生成的蛋白质分子量为 75~80 kDa。应用算术计算机阐明了  $\alpha$ -螺旋的一级结构, 曾有报道载脂蛋白 J 与富含  $\alpha$ -螺旋蛋白如载脂蛋白和具有  $\alpha$ -螺旋卷曲蛋白 (myocin, deomins) 之间也略有相同顺序, 尤其是在  $\alpha$ -端的 76 氨基酸残基, 表明有较强的  $\alpha$ -螺旋区, 接着有一小段顺序 (77~98) 与富含半胱氨酸末端补体蛋白中的 thrombospondin-I 组分相同, 推测在大多数保守区有一个双核苷酸结合的结构 (105~135)。

按 Chow-Fasman 法推测, 载脂蛋白 J 含 35%  $\alpha$ -螺旋、20%  $\beta$ -片层及 44% 随机结构。而按 Garnier 法推测, 载脂蛋白 J 由 42%  $\alpha$ -螺旋、13%  $\beta$ -片层、20%  $\beta$ -转角及 21% 随机结构组成。这些推测的  $\alpha$ -螺旋区域中有 3 个  $\alpha$ -螺旋能产生两性螺旋, 其中 1 个在载脂蛋白 J $\alpha$  亚基中 (150~167 氨基酸残基), 2 个在载脂蛋白 J $\beta$  亚基中 (221~237、407~418 氨基酸残基), 两性螺旋在载脂蛋白和脂类的相互作用中起重要作用。

载脂蛋白 J 前体为 427 个氨基酸残基组成的多肽链, 经加工于 Arg<sub>205</sub> 和 Ser<sub>206</sub> 之间肽键裂解, 生成亚基载脂蛋白 J $\alpha$  (相应于 1~205 氨基酸残基) 和载脂蛋白 J $\beta$  (相应于 206~427 氨基酸残基),  $\alpha$  和  $\beta$  亚基间通过 5 对二硫键相联接, 即 Cys<sub>38</sub> ( $\alpha$ )-Cys<sub>107</sub> ( $\beta$ ), Cys<sub>38</sub> ( $\alpha$ )-Cys<sub>39</sub> ( $\beta$ ), Cys<sub>75</sub> ( $\alpha$ )-Cys<sub>84</sub> ( $\beta$ ), Cys<sub>78</sub> ( $\alpha$ )-Cys<sub>81</sub> ( $\beta$ ), Cys<sub>86</sub> ( $\alpha$ )-Cys<sub>80</sub> ( $\beta$ ),  $\alpha$  与  $\beta$  亚基的氨基酸组成不同, 经胰蛋白酶降解后通过高效液相色谱分析, 其肽图谱也不同, 但  $\alpha$  与  $\beta$  亚基中有 5 个短肽段 (长约 3~4 个氨基酸残基)

是相同的,这一点可为两株单克隆抗体对  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基都能识别的事实作解释。在载脂蛋白 J 氨基酸顺序中,有 7 个 N-连接糖基化部位(ASW-X-Ser/Thr)。去糖基后  $\alpha$ -与  $\beta$ -亚基的分子量分别由原来的 34~36 kDa 和 36~39 kDa 降为 24 kDa 和 28 kDa,表明  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基的含糖量分别为 32% 和 26%。此外,在  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基中含有二个可与肝素结合的结构区,其中包括多个碱性氨基酸 Lys 和 Arg。

纯化的载脂蛋白 J 具有很强的聚集成大分子多聚体的倾向,并结合于颗粒的疏水表面,因而需要加入去污剂(detergent)以保持单体型。载脂蛋白 J 分泌入足细胞的生长基质中,大多数以多聚体形式存在于睾丸网中。而在循环血液中(人血浆浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )以单体形式与载脂蛋白 A I 结合于富含胆固醇的 HDL 颗粒中,约含 50% 的游离与酯化胆固醇。这种颗粒在脂蛋白琼脂糖电泳中泳动位于前- $\beta$ -部位,与大块  $\alpha$ -泳动 HDL(快泳动)相反。

## 2 载脂蛋白 J 的生物合成

不同种的载脂蛋白 J 多肽前体合成时均有一典型的信号肽。已研究了培养足细胞的大鼠载脂蛋白 J 与狗 MDCK 细胞中的载脂蛋白 J 的生物合成与细胞内分类,这些细胞形成高度极化的细胞单层,还研究了 HepG<sub>2</sub> 肝癌细胞的载脂蛋白 J 释放前的单链前体在 Arg<sub>105</sub>(人载脂蛋白 J 的顺序数)后经蛋白酶水解成两条链。这种分子沿着组织的分泌通路运送到外表面。经 NH<sub>4</sub>Cl 或氯奎(chloroquine)处理使血管 pH 升高,不影响极性分泌,但抑制前体蛋白的蛋白水解。表明在 Arg<sub>105</sub>后的分解对极化分泌是不需要的,可能是在酸性亚细胞部位发生。事实上,血浆与神经分泌颗粒中约有 5% 载脂蛋白 J 不分解,而以单链形式分泌。

当 Asn 联结糖基化抑制剂 tunicamycin 存在时,MDCK 细胞的向量分泌消失,推测 Asn 联结糖链对载脂蛋白 J 的顶端转运是重要的。顶端分泌发生在前列腺管腔系统、乳腺、睾丸及附睾的上皮细胞,在一些大脑神经细胞也有发生。而在肝细胞载脂蛋白 J 与所有其他血浆蛋白一起则从窦状细胞表面分泌。具有蛋白分泌调节通路(胞吐作用)的细胞如 PC<sub>12</sub> 细胞及肾上腺髓质与脑下垂体神经内分泌细胞中载脂蛋白 J 为可溶性的。在嗜铬性颗粒表面膜上有少量的载脂蛋白 J。多聚(N-乙酰乳糖胺)双糖重复单位连于颗粒连接载脂蛋白 J,这些糖是否只有在神经内分泌细胞内合成尚待研究。

## 3 载脂蛋白 J 的组织分布

通过 Northern blot 分析,测定了人、大鼠与鹌鹑

等各种组织中 mRNA 的水平。载脂蛋白 J 在不同种属的广泛分布与其表达的相对水平极相似,推测不同组织载脂蛋白 J 的多种生物功能是非常保守和基本的。大脑、肾上腺髓质、垂体前叶和后叶、卵巢、睾丸及肝脏中的 mRNA 水平很高,胸腺、脾、肾、肺、心、乳腺及膀胱等较低。用大鼠前列腺、睾丸组织建立了原位杂交,证明载脂蛋白 J mRNA 特异地定位于前列腺系统的上皮细胞、足细胞、附睾的上皮细胞以及神经细胞、星形(胶质)细胞以及脑组织的小神经胶质细胞等。应用单克隆与多克隆抗体作免疫组织化学试验,结果表明神经内分泌细胞(肾上腺髓质、垂体、甲状腺 C-型细胞、黑色素细胞、肠和支气管上皮细胞及一些神经细胞)中产生载脂蛋白 J。大鼠神经细胞、星形细胞、肾上皮细胞及大鼠和羊的附睾与睾丸亦产生载脂蛋白 J。人 T 淋巴细胞测不到载脂蛋白 J mRNA。高水平表达的细胞多数是高度分泌性的,并形成许多液体区域的细胞界面。

损伤组织中载脂蛋白 J 基因表达升高,它是一种退化或损伤组织中基因转录上行调节的蛋白。一般除去营养因素或接触毒剂,二天内会引起局部载脂蛋白 J 浓度与其 mRNA 水平升高,4~7 天达高峰。

在血浆中载脂蛋白 J 不仅与 HDL 和 VLDL 中的载脂蛋白 A I 结合,它还与人血浆中的对氧磷酶(E<sub>600</sub>酶)和载脂蛋白 A I 一起结合。血浆载脂蛋白 J 与 E<sub>600</sub>酶结合的意义不太清楚,有人推测可作为血管损伤的预报。

## 4 载脂蛋白 J 与动脉粥样硬化

载脂蛋白 J 与 As 的关系研究得较少。在各种病理灶周围的细胞有大量载脂蛋白 J 存在。应用 mRNA 原位杂交与蛋白免疫荧光检测,在成熟的巨噬细胞中有高水平的载脂蛋白 J 基因表达与蛋白积聚。David PW 等的研究表明载脂蛋白 J 贮存于血小板颗粒,当血小板激活后它就释放到细胞外液中。他们应用免疫组织化学技术分析了动脉粥样硬化血管载脂蛋白 J,观察到在斑块内膜有强的荧光标记。正常成年人无粥样硬化的动脉与婴儿主动脉中均无载脂蛋白 J 积聚。动脉粥样硬化病灶切片与不免疫的小鼠血清孵育为阴性反应。相反,粥样硬化动脉的斑块内膜无载脂蛋白 J mRNA 积聚,而在同一样本中可测得  $\beta$ -actin mRNA。载脂蛋白 J 存在于一些病灶中的意义不清楚。血小板在 As 斑块病灶发生中具有很复杂的关系,已表明血小板生长因子和细胞分裂素的释放可刺激血管平滑肌细胞增殖。由于原位杂交分析未观察到内膜病灶中载脂蛋白 J 基因表达,动脉粥样硬化斑块中载脂蛋白 J 的存在可能是血小板中积聚或从血浆浸润的结果。任一情

况似乎都可加剧动脉粥样硬化血管病灶的发展。目前重要的是要确定载脂蛋白 J 在病灶中的作用部位及载脂蛋白 J 的作用是促进还是抑制动脉粥样硬化损伤的发生。

### 5 载脂蛋白 J-高密度脂蛋白与脂质转运

血浆中载脂蛋白 J 存在于 HDL 和 VHDL, 它在  $\text{HDL}_2$  ( $d=1.06\sim 1.125 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 和  $\text{HDL}_3+\text{VHDL}$  ( $d=1.125\sim 1.21 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $1.21\sim 1.25 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 密度范围, VHDL 中含量丰富。载脂蛋白 J-HDL 仅占总 HDL 的 5% 以下。载脂蛋白 J-HDL 颗粒的蛋白质含量较多, 占 89%, 主要是载脂蛋白 A I 和载脂蛋白 J, 脂质较少, 占 11%, 脂质中主要是磷脂和胆固醇, 甘油三酯仅占总脂质的 1%。在正常血浆中载脂蛋白 J 大部分不与载脂蛋白 A I 结合, 仅少量载脂蛋白 J-HDL 同时也含有载脂蛋白 A I, 与载脂蛋白 J-HDL 联结的载脂蛋白 A I 仅占血浆中总载脂蛋白 A I 的 2%~4%。载脂蛋白 J-HDL 中载脂蛋白 J/载脂蛋白 A I 的分子比率为 5/1。

用免疫亲和层析分离纯化得到的载脂蛋白 J-HDL 亚组分表观分子量为 80、160、240、340 及 520 kDa。在新鲜血浆中含量较多的载脂蛋白 J-HDL 为 70~90 kDa, 其他分布于 140~1 000 kDa, 而贮存血浆中 70~90 kDa 的载脂蛋白 J-HDL 明显减少, 同时伴有 150~320 及 >400 kDa 的载脂蛋白 J-HDL 的增加。

由于载脂蛋白 J-HDL 结构上的特点, 推测可能在胆固醇逆向转运中起重要作用。在  $\text{HDL}_3/\text{VHDL}$  密度

范围的载脂蛋白 J-HDL 具有分子小, 缺乏脂类及含有 LCAT 激活物、载脂蛋白 A I 等适于作胆固醇接受体与 LCAT 底物的特性, 当它们接受大量胆固醇并将其酯化后就变成  $\text{HDL}_2$  密度范围的载脂蛋白 J-HDL。由于载脂蛋白 J 基因在许多组织中表达, 分泌的载脂蛋白 J 可能直接介导细胞胆固醇外流。

Barkey 等证明 Hep G<sub>2</sub> 人肝癌细胞以脂蛋白形式分泌载脂蛋白 J, 表明载脂蛋白 J 能运输脂类。Hep G<sub>2</sub> 细胞分泌的载脂蛋白 J-脂蛋白的密度较高 ( $>1.25 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 大小不均一, 可从 100~900 kDa。Hep G<sub>2</sub> 细胞载脂蛋白 J-脂蛋白分子量在 240~300 kDa 和 450~650 kDa, 它也有  $\alpha_2$  电泳迁移率。该脂蛋白富含甘油三酯, 缺乏载脂蛋白 A I。因而, 肝脏分泌的新生载脂蛋白 J 脂蛋白需经历血浆改造分解掉甘油三酯, 并和载脂蛋白 A I 结合。肝脏是循环载脂蛋白 J-HDL 的重要来源。这一改造在局部组织 (尤其是在通过细胞屏障与血液分隔的器官, 如睾丸和大脑) 的脂质平衡中起重要作用。

从人血浆分离纯化的载脂蛋白 J-HDL 常伴有胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 活性, 可能具有脂质交换作用, 尤其是在各种脂蛋白之间的胆固醇交换中起重要作用。

目前载脂蛋白 J 的许多生理功能仍属推论, 尚需要深入的研究。相信通过科学家们的努力, 必将日见明朗化。