

## 血浆载脂蛋白 H 基因多态性研究进展

张文玲 刘德文

(山西医学院生物化学教研室, 太原 030001)

**摘要** 载脂蛋白 H (apolipoprotein H) 又称  $\beta_2$  糖蛋白 I 于 1961 年发现, 1980 年才根据其脂蛋白酯酶的体外激活作用命名为载脂蛋白 H, 成熟的载脂蛋白 H 是由 326 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白, 包括 5 个相似的结构域, 其中富含 Pro 及 Cys。载脂蛋白 H 的理化性质与先前发现的载脂蛋白差异较大, 人载脂蛋白 H 基因定位于 17 号染色体, 已发现 4 种等位基因, 以常染色体共显性方式遗传,  $APOH * 3$  等位基因可以显著提高血浆甘油三酯水平。载脂蛋白 H 促进血浆甘油三酯清除, 抑制凝血并与自身免疫性疾病有关。

**关键词** 载脂蛋白 H;  $\beta_2$  糖蛋白 I; 基因; 多态性

载脂蛋白 H 于 1961 年首先由 Schultze 等分离, 其后三十余年陆续阐明其理化特性、蛋白质一、二、三级结构、遗传学性质等, 但其具体生理功能仍待探讨。Nakaya 等<sup>[1]</sup>报道  $\beta_2$  糖蛋白 I 体外激活脂蛋白酯酶 (lipoprotein lipase, LPL) 并将其命名为载脂蛋白 H, 它由肝脏合成<sup>[2]</sup>, 主要存在于血浆中, 是血浆载脂蛋白的组分之一。

### 1 载脂蛋白 H 的物理化学特性与结构

载脂蛋白 H 是血浆中一种不为三氯乙酸、过氯酸等沉淀的糖蛋白, 它与血清中富含甘油三酯的组分有高度亲和力, 可共同被阴离子去垢剂选择性沉淀。血清载脂蛋白 H 总量中, 约 16% 存在于乳糜微粒及极低密度脂蛋白中, 2% 在低密度脂蛋白中, 17% 在密度脂蛋白中, 剩余的 65% 在  $d > 1.21 \text{ kg/L}$  的组分内。载脂蛋白 H 可以与 DNA、磷酸纤维素、脂蛋白、肝素、血小板、线粒体、人造脂肪乳剂 (intralipid) 等以带负电荷为共同特征的大分子相结合, 人们认为这种结合是载脂蛋白 H 发挥其生理功能的基础。纯化后的载脂蛋白 H 经等电聚焦 (isoelectro-focusing, IEF) 电泳显示 5 条主要带, 对不同血浆样品分析发现载脂蛋白 H 具有结构多态性, 但不管血浆中载脂蛋白 H 原来浓度及 IEF 电泳图谱带数目多少, 经神经氨酸酶作用去唾液酸后都

显示 pI 分别为 3.0、3.2 的两条带<sup>[3]</sup>。对 34 例不同样本的氨基酸序列分析发现, 第 247 位氨基酸有 Val/Leu 变换, 人群中 Val 约占 76% 而 Leu 约 23%<sup>[4]</sup>, 这些结果显示人血浆载脂蛋白 H 是由唾液酸化程度不同的两种蛋白组成的。

载脂蛋白 H 的性质及结构与以往发现的载脂蛋白相比差异较大。载脂蛋白 H 在水溶液中不自身缔合, 三级结构也不是松散折叠着而具有典型的球蛋白的特性。载脂蛋白 H 是由 5 个相似的结构域组成的, 是补体控制蛋白重复序列在家族的一员。前 4 个结构域以  $\text{Cys}_{281}\text{-Lys-Asn-Lys-G-u-Lys-Lys-Cys}_{288}$  这一序列介导载脂蛋白 H 与心磷脂的结合, 其构型对二者的结合也很关键<sup>[5]</sup>。载脂蛋白圆二色性光谱揭示, 与以往发现的富含  $\alpha$ -螺旋的载脂蛋白 A-I、载脂蛋白 A-II、载脂蛋白 C-I、载脂蛋白 E 等不同, 载脂蛋白 H 在水溶液中其二级结构不含  $\alpha$ -螺旋而是由  $\beta$  转角 (30%)、 $\beta$  片层 (40%)、无规则卷曲 (30%) 组成<sup>[6]</sup>。去掉载脂蛋白 H 90% 的糖基后, 其二级结构发生显著改变, 表现在水溶液中  $\beta$  转角比例升高及二氯乙醇溶液中  $\alpha$ -螺旋比例加大, 可以认为, 大分子的甘露糖、N 聚糖在载脂蛋白 H 合成过程中能保证肽段的正确折叠, 进而维持载脂蛋白 H 正常的生理功能<sup>[6]</sup>。

载脂蛋白 H 为含 326 个氨基残基的单链糖蛋白, 内含 5 个分支的寡聚多糖链。其氨基酸组成显示, 含量最丰富的为 Pro (10%), 这是迄今为止除胶原蛋白及其相关分子以外, 在真核细胞蛋白中 Pro 含量最多的蛋白之一。Cys (70%) 含量远高于载脂蛋白 A I (0)、载脂蛋白 B100 (0.6%) 和载脂蛋白 E (0.7%) 等。Pro 与 Cys 的高含量是载脂蛋白 H 不易变形的原因之一。另外引人注意的是载脂蛋白 H 内频频出现间隔排列的 Cys-Pro 结构。载脂蛋白 H 分子的糖链占整个糖蛋白重的 19%, 由半乳糖、甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖、岩藻糖及 N-乙酰神经氨酸组成。所有的寡聚多糖链以 Asn-X-Ser/Thr 这一糖基受体序列连接到 Asn 位点上, 其中有 Asn-Trp-Ser/Thr 受体序列, 这是十分罕见的<sup>[7]</sup>。

## 2 载脂蛋白 H 基因多态性

由于不同人群血浆载蛋白 H 浓度有差异,早期载脂蛋白 H 遗传学研究主要集中于其浓度的变化。Cleve 等<sup>[8]</sup>认为载脂蛋白 H 在血浆中浓度的变化由两个共显性表达的等位基因 *BgN*(正常)与 *BgD*(缺陷)来控制。*BgNBgN* 纯合子个体血浆载脂蛋白 H 浓度为 160~300 mg/L, *BgNBgD* 杂合子为 60~140 mg/L, 而 *BgDBgD* 纯合子低于免疫法可测水平(<50 mg/L)。进一步研究发现, *BgD* 等位基因在蒙古人中出现频率(>20%)比白人(约 6%)高得多。但 Cleve<sup>[9]</sup>也指出载脂蛋白 H 水平受到非遗传因素影响。Kambob 等<sup>[12]</sup>详尽探索了编码载脂蛋白 H 的等位基因在某些种族中的分配情况。他以薄层聚丙烯酰胺等电聚焦及免疫印迹方法研究发现,载脂蛋白 H 由 3 个较常出现的等位基因决定 3 种纯合子和 3 种杂合子共 6 种不同表现型,而黑人群体尚有独立的第四个等位基因。他将编码

载脂蛋白 H 的基因位点记作 *APOH*, 等电聚焦电泳图谱中偏酸性异构体由 *APOH* \* 1 等位基因编码成熟蛋白, *APOH* \* 2 编码偏中性异构体; *APOH* \* 3 编码偏碱性异构体。黑人群体中发现的罕见异构体由 *APOH* \* 4 编码。在所发现的 *APOH* \* 4 携带者中, *APOH* \* 4 都是与出现频率最高的 *APOH* \* 2 结合成杂合子形式,其表型记作在载脂蛋白 H4/2。家系研究证明,载脂蛋白 H 等位基因以常染色体共显性模式存在于同一基因位点上。

载脂蛋白 H 等位基因分布情况已在多种族多国家进行了调查,如表 1 所示。所列数据和表型分布基本符合 Hardy-Weiberg 平衡原则。这些数据提示, *APOH* \* 2 等位基因是最为主要的载脂蛋白 H 等位基因,由于仅在黑人群体中发现 *APOH* \* 4 等位基因,而且在非洲黑人中出现频率远高于美国黑人, Cleve 等<sup>[10]</sup>认为可以将 *APOH* \* 4 等位基因看作黑人特异的遗传标记。

表 1. 载脂蛋白 H 等位基因在不同种族、国家中的分布<sup>[9~13]</sup>

|            | 美国白人  | 美国黑人  | 非洲黑人  | 中国人   | 印度人   | 朝鲜人   | 意大利人  |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 载脂蛋白 H * 1 | 0.059 | 0.017 | 0.012 | 0.031 | 0.061 | 0.019 | 0.005 |
| 载脂蛋白 H * 2 | 0.882 | 0.902 | 0.921 | 0.900 | 0.866 | 0.916 | 0.933 |
| 载脂蛋白 H * 3 | 0.059 | 0.068 | 0.047 | 0.069 | 0.073 | 0.064 | 0.060 |
| 载脂蛋白 H * 4 |       | 0.013 | 0.020 |       |       |       |       |

目前,载脂蛋白 H 浓度与载脂蛋白 H 等位基因间尚未发现载脂蛋白 E 那样浓度与不同等位基因的显著相关性,但发现 *APOH* \* 3 携带者血浆甘油三酯水平升高。Sepehrnia 等<sup>[14]</sup>对 356 位尼日利亚黑人研究,分别测其血浆载脂蛋白 H 多态性及总胆固醇、甘油三酯、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白及亚组分等水平,发现载脂蛋白 H 表型对脂蛋白水平无显著影响,而仅对女性甘油三酯及高密度脂蛋白水平影响显著( $P<0.05$ )。 *APOH* \* 2 等位基因相比, *APOH* \* 3 可平均提高女性血浆甘油三酯水平达 99.2 mg/L ( $P<0.05$ )。而 Cassader 等<sup>[13]</sup>在意大利人也发现载脂蛋白 H 多态性与甘油三酯水平有关( $F=3.27, P=0.004$ )。从性别来看,男性载脂蛋白 H3/2 杂合子甘油三酯水平( $1427\pm11$  mg/L),显著高于载脂蛋白 H2/2 纯合子( $985\pm11$  mg/L,  $P=0.0053$ );若从年龄上看,50 岁以下人群中,载脂蛋白 3/2 杂合子甘油三酯水平( $1454\pm11.5$  mg/L)显著高于载脂蛋白 H2/2 纯合子( $985\pm10.5$  mg/L,  $P=0.0095$ )。可见, *APOH* \* 3 等位基因可以显著提高年龄小于 50 岁者及男性血浆甘

油三酯水平。这两个人群研究结果的差异可能归因于遗传、种族、饮食等因素之不同。

由于载脂蛋白 H 等位基因位于染色体 17q<sup>23~17q</sup> 末端<sup>[15]</sup>,位置和与高血压及心肌梗塞有关的 ACE 基因相仿, Rewers 等<sup>[16]</sup>研究了 356 例 I 型糖尿病患者(20~74 岁)中载脂蛋白 H 多态性与高血压的发病关系。在 1 098 个正常糖耐量对照中,载脂蛋白 H 基因多态性与高血压无显著联系;糖尿病患者中表型为载脂蛋白 H3/3(OR=5.7, 95% CI, 1.1-30)及载脂蛋白 H3/2(OR=3.5, 1.1-12)的患者,其高血压发病率远远高于表型为载脂蛋白 H2/2 的患者,而载脂蛋白 H2/1 表型的患者中未发现这一关系。85%表型为载脂蛋白 H3/2 及载脂蛋白 H3/2 的患者有高血压。携带 *APOH* \* 3 等位基因的 I 型糖尿病患者高血压发病风险上升的原因可能是载脂蛋白 H 基因随机地与染色体 17q 上的 ACE 基因或其他高血压基因相联之故。最近已制出 3 种载脂蛋白 H 免疫球蛋白 Glk 单克隆抗体<sup>[17]</sup>,分别命名为 3G<sub>1</sub>, 1B<sub>1</sub>, 3D<sub>11</sub>。Kambob 等<sup>[18]</sup>研究了四种载脂蛋白 H 等位基因的产物与 3 种单克隆抗体反应的情况,

3G<sub>2</sub>与1B<sub>4</sub>可以与所有4种等位基因的产物发生反应,这两种单克隆抗体性质上很象多克隆抗载脂蛋白H抗体;携带者中,发生3D<sub>11</sub>反应的机率分别是:中国人100%、美国白人89%、玻利维亚人75%,在非洲黑人中未观察到该反应的发生,87%的美国黑人也不发生该反应。可见,基于3D<sub>11</sub>反应,APOH\*3等位基因至少存在两种异构体,这可能和某些纯合子APOH\*3等位基因产物不与阴离子磷脂相结合的例子有着某种联系<sup>[18]</sup>。

### 3 载脂蛋白H的生理功能及与临床的关系

#### 3.1 载脂蛋白H的生理功能及与脂类代谢的关系

由于富含甘油三酯的脂蛋白可能是动脉粥样硬化的独立标志之一,对其代谢的研究也颇具吸引力。载脂蛋白H是血浆脂蛋白组成之一,可与富含甘油三酯的脂蛋白共同沉淀。早在1977年,Burstein等就报道某些高甘油三酯患者体内 $\beta_2$ 糖蛋白I相对缺乏,Nakaya等<sup>[1]</sup>证实体外甘油三酯乳剂中,载脂蛋白CⅡ存在时 $\beta_2$ 糖蛋白I可使脂蛋白脂酶活性提高50%。Wurm等以C<sup>14</sup>标记的人造脂肪乳剂(intralipid)灌注大鼠进一步证实载脂蛋白H可提高大鼠体内甘油三酯的清除。鉴于载脂蛋白CⅡ降低脂蛋白脂酶活性,脂蛋白脂酶催化甘油三酯的最终效率可能决定于载脂蛋白H、载脂蛋白CⅡ、载脂蛋白CⅢ的相对比例。对载脂蛋白H多态性在脂代谢中的作用也有多方面研究,但尚未发现载脂蛋白H浓度与脂蛋白水平有关,而已发现APOH\*3等位基因可以显著提高女性血浆甘油三酯水平。Sepehrnia<sup>[14]</sup>,Cassader<sup>[15]</sup>等都证实了这一点,但前者仅在女性中发现这规律,后一研究在男性及年龄小于50岁人群中未发现该规律,他们都认为载脂蛋白H参与甘油三酯代谢,但具体途径仍待探讨。对原发性高脂血症患者的研究发现,重度高胆固醇血症患者、高甘油三酯血症患者和混合型高脂血症患者血浆脂蛋白浓度分别为303.3、272.9、299.1(mg/L),比对照组(199.6 mg/L)显著升高( $P<0.01$ )。在对照组中,载脂蛋白H水平与甘油三酯及总胆固醇水平相关( $r$ 分别为0.387、0.559; $P<0.05$ ),但病人中未发现这一相关性。可见,高脂血症患者载脂蛋白H水平升高可能因其在血浆脂蛋白中的分配改变所致<sup>[19]</sup>。载脂蛋白H是否象高密度脂蛋白分为高密度脂蛋白-2和高密度脂蛋白-3等功能不同的亚组那样也由作用截然相反的两种亚组分构成的呢?这还有待探索。

#### 3.2 载脂蛋白H与凝血及自身免疫性疾病的关系

Schousboe等<sup>[20]</sup>发现载脂蛋白H可结合到血小板

膜上,调节cAMP活性而抑制ADP介导的血小板聚集,载脂蛋白H能中和所有进入血流的负电荷大分子而抑制凝血。血浆的接触系统由凝血因子Ⅻ及前激肽释放酶与负电荷表面的结合而启动,而载脂蛋白H与带负电荷的表面竞争性结合从而抑制内源性血凝激活<sup>[21]</sup>。抗心磷脂抗体、抗磷脂抗体(aPL Ab)和狼疮促凝剂(LA)水平升高与血栓形成、血小板减少症、复发性流产和免疫性疾病有关,但基本机理不详。载脂蛋白H与阴离子磷脂如磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)的结合使其在弥散性血管内凝血(DIC)、自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮(SLE)等占一席之地。自身免疫性疾病患者抗心磷脂抗体对心磷脂的结合需血清或血中辅助因子的参与,该辅助因子由McNeil等<sup>[21]</sup>鉴定为载脂蛋白H。但某些感染性疾病如疟疾、结核病、肝炎、梅毒等患者的抗心磷脂抗体与心磷脂结合并不依赖于载脂蛋白H<sup>[22]</sup>。Matsuda等<sup>[23]</sup>发现弥散性血管内凝血患者载脂蛋白H水平下降,其下降程度与弥散性血管内凝血严重程度有关,并建议以载脂蛋白H含量作为弥散性血管内凝血诊断与治疗的评价指标之一。Matsuda等<sup>[24]</sup>也发现系统性红斑狼疮患者载脂蛋白H水平下降,长期服用强的松龙,可使载脂蛋白H水平显著升高,甚而高于正常对照组( $P<0.05$ )。

另外,载脂蛋白H可作为反映肾小管慢性功能性异常的新指标。Lapsley等<sup>[25,26]</sup>以酶联免疫吸附法所检测最低浓度达5  $\mu$ g/L,范围5~40  $\mu$ g/L,发现载脂蛋白在生理条件下稳定,-25℃尿中至少能稳定两年,其测定比 $\alpha$ -1球蛋白或视黄醇结合蛋白更灵敏,比 $\beta_2$ 球蛋白和N-乙酰糖胺酶更可信,对肾小球与肾小管疾患的区分也优于视黄醇结合蛋白。

### 参考文献

- 1 Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB. Activation of human post heparin lipase by apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I). *Biochim Biophys Res Commun*, 1980, **95**: 1168.
- 2 Steinkasserer A, Estaller C, Elisabeth H, et al. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human  $\beta_2$ -glycoprotein I. *Biochem J*, 1991, **277**: 387.
- 3 Gries A, Nimpf J, Wurm H, et al. Characterization of isoelectric subspecies of asialo- $\beta_2$ -glycoprotein I. *Biochem J*, 1989, **260**: 531.
- 4 Steinkasserer A, Christa D, Reinhard W, et al. Human  $\beta_2$ -glycoprotein I: Molecular analysis of DNA and amino acid polymorphism. *Hum Genet*, 1993, **91** (4): 401.
- 5 Hunt J, Krilis S. The fifth domain of  $\beta_2$ -glycoprotein I contains a phospholipid binding site (cys<sub>281</sub>-cys<sub>288</sub>) and a

- region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol*, 1994, **152** (6): 653.
- 6 Walsh MT, Watzlawick H, Putnam FW, et al. Effect of the carbohydrate moiety on the secondary structure of  $\beta_2$ -glycoprotein I: Implication of the biosynthesis and folding of glycoproteins. *Biochem*, 1990, **29**: 6 250.
  - 7 Loizer J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta_2$ -glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 3 640.
  - 8 Cleve H. Genetic studies on the deficiency of  $\beta_2$ -glycoprotein I of human serum. *Humangenetik*, 1968, **5**: 294.
  - 9 Kamboh MI, Ferrell RE, Sepehrnia B. Genetic studies on human apolipoprotein IV: Structural heterogeneity of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I). *Am J Hum Genet*, 1989, **42**: 452.
  - 10 Cleve H, Vogt U, Kamboh MI. Genetic polymorphism of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) in African blacks from the Ivory Coast. *Electrophoresis*, 1992, **13** (11): 849.
  - 11 Saha N, Kamboh MI, Kelly LJ, et al. Apolipoprotein ( $\beta_2$ -glycoprotein I) polymorphism in Asians. *Hum Biol*, 1992, **64** (4): 617.
  - 12 Namkoong Yong, Yung Jin Kin, et al. Molecular genetic studies on the kocean population 22: Genetic polymorphisms of apolipoprotein C-III and apolipoprotein H. *Korean J Genet*, 1992, **14** (3): 256.
  - 13 Cassader M, Ruii G, Fambino R, et al. Influence of apolipoprotein H polymorphism on levels of triglyceroides. *Atherosclerosis*, 1994, **110**: 45.
  - 14 Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, et al. Genetic studies of human apolipoproteins VII: Role of the apolipoprotein H polymorphism in relation to serum lipoprotein concentrations. *Hum Genet*, 1989, **82**: 118.
  - 15 Steinkasserer A, et al. Assignment of apo H to human chromosome 17q<sup>23</sup>-17q<sup>ter</sup>; determination of the major express site. *Cytogenetic Cell Genet*, 1992, **61** (1): 31.
  - 16 Rewers M, Kamboh MI, Shetterly SM, et al. Association of apolipoprotein H polymorphism with hypertension; the San Luis Valley diabets study. *Circulation*, 1993, **88** (4): 2 761.
  - 17 Wagenknecht DR, Mc Intyre JA. Change in  $\beta_2$ -glycoprotein I antigenicity induced by phospholipid binding. *Thromb Haemost*, 1993, **69**: 361.
  - 18 Kamboh MI, Wagenknecht DR, Mc Intyre JA. Heterogeneity of the apolipoprotein H \* 3 allele and its role in affecting the binding of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) to anionic phspholipids. *Hum Genet*, 1995, **95** (4): 385.
  - 19 McMally T, Crook W, Mackie IJ, et al.  $\beta_2$ -glycoprotein I antigen is increased in primary hyperlipidaemia. *Br J Haematol*, 1994, **88** (2): 424.
  - 20 Schousboe I.  $\beta_2$ -glycoprotein I; A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*, 1985, **66** (5): 1 086.
  - 21 McNei L HP, Simpton RJ, Chesterman CN, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation;  $\beta_2$ -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4 120.
  - 22 Hunt JE, McNeinl HP, Morgan GJ. A phospholipid- $\beta_2$ -glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infectious. *Lunpus*, 1992, **1** (2): 75.
  - 23 Matsuda J, Wakasugik, Saiton N, et al. Low  $\beta_2$ -glycoprotein I levels in patients with disseminated intravascular ccagulation [letter]. *Am J Hematol*, 1993, **42** (2): 234.
  - 24 Matsuda J. Reduced serum  $\beta_2$ -glycoprotein I in SLE. *Ann Rheum Dis*, 1992, **51** (9): 1 099.
  - 25 Lapsley M, Samsen PA Maarlow CT, et al. Beta-2-glycoprotein I (apolipoprotein H) excretion in chronic renal tubular disorders; comparison with other protein markers of tubular malfunction. *J Clin Pathol*, 1991, **44**: 821.
  - 26 Flynn FV, Lapsley M, Samson PA, et al. Urinary excretion of  $\beta_2$ -glycoprotein I (apolipoprotein H) and other markers of tubuler malfunction in "non-tubuler" renal disease. *J Clin Pathol*, 1992, **45**: 561.

(1996-02-14 收到)