

载脂蛋白 E 基因调控的研究进展

陈培利 综述 邓耀祖 审校

(同济医科大学生物化学教研室, 武汉 430030)

摘要 载脂蛋白 E 基因的表达受多种因素的影响。在其 5' 及 3' 翼区存在多种调控元件, 众多的蛋白质因子可以与 5' 翼区结合而调节载脂蛋白 E 在不同状态下的表达, 3' 翼区的一个顺式作用元件则对其在肝脏的特异性表达具有重要作用。

关键词 载脂蛋白 E; 基因调控

载脂蛋白 E 是人及某些哺乳动物血浆中多种脂蛋白的正常组成成分之一。这种富含精氨酸和赖氨酸的载脂蛋白在介导各种脂蛋白经由肝内或肝外相应受体途径的摄取与降解中起着重要的作用。此外, 载脂蛋白 E 尚具有调节轴突与基质的作用而促进其再生及延伸, 参与影响平滑肌细胞及小鼠 F9 畸胎瘤细胞的增殖或/和分化以及对淋巴细胞的免疫效应的调节等功能^[1]。

新合成的载脂蛋白 E 在氨基端带有 18 个氨基酸残基的信号肽, 该信号肽在翻译的同时被切除。成熟的载脂蛋白 E 由含 299 个氨基酸残基的一条多肽链构成, 分子量约为 34 kDa。人载脂蛋白 E 的双向电泳结果表明, 它具有几种分子大小与电荷不同的亚型, 最常见的三种亚型根据它们在等电聚焦电泳中不同的位置而称之为 E2、E3 和 E4 亚型, 三种亚型的产生是第 112 位及第 158 位半胱氨酸或精氨酸变换的结果。它们分别由位于 19 号染色体上单基因位点的三个等位基因 ϵ_2 、 ϵ_3 和 ϵ_4 所编码^[2,3]。该基因序列及其 cDNA 序列均已测定^[4,5], 近年来的研究也发现了一些影响其表达的调控元件和因素。本文就该方面综述其进展。

1 载脂蛋白 E mRNA 及其 cDNA

人肝细胞 mRNA 的 Northern 印迹分析及其 cDNA 序列的研究表明载脂蛋白 E mRNA 的长度约为 1 160 碱基对^[5,6]。除了编码 317 个氨基酸残基的 951 个碱基对外, 在 5' 端尚有 67 个碱基对的非翻译区, 3' 端有

翻译终止信号 TGA、142 个碱基对的非翻译区及一个多聚腺苷酸[poly(A)]信号(AAT AAA)。在其编码区 G-C 碱基对的含量较为丰富, 约占核苷酸总数的 70%^[5]。对大鼠载脂蛋白 E 的分析除了获得类似的碱基对组成外, 尚发现在其编码区及 5' 端存在着高度的同源性^[5,7], 推测后者可能在其表达中起重要作用, 这与 3' 端较低的同源性形成了明显的对比。

2 载脂蛋白 E 基因及其调控序列

人载脂蛋白 E 基因与载脂蛋白 C I、C II 及新近发现的载脂蛋白 CN 基因均定位于 19 号染色体上一个长约 45 kb 的基因簇内。载脂蛋白 E 基因包含四个外显子及三个内含子, 其长度约 3 597 bp^[4]。内含子 I 处于相当于 mRNA 5' 端非翻译区中距翻译起始的 23 与 24 位碱基对之间, 长度约 765 bp; 内含子 II 位于编码信号肽第 14 位氨基酸残基的密码中, 约 1 092 bp; 内含子 III 位于编码成熟载脂蛋白 E 第 61 位氨基酸残基的密码中, 约 528 bp。该基因具有其它真核细胞基因的一些特征: 如内含子以 GT 开始并以 AG 结束, 启动子(AAT AATT)处于-33 碱基对处("-"表示转录起始点上游)及具有两个拷贝的 G-C 盒等。虽然先前的研究表明 5' 端 5.0 kb 的序列足以使载脂蛋白 E 基因在培养细胞系中得到表达^[8], 近年的研究表明-5 kb 的缺失对载脂蛋白 E 基因的表达少有影响。重叠发生于 G-C 盒区的两个回文样结构, 由于高 G-C 含量所赋予的高度稳定性, 在被某些转录因子结合后可能会影响载脂蛋白 E 基因的表达。S1 核酸酶分析法发现载脂蛋白 E 基因可能存在两个或更多的转录起始位点^[4], 但其功能尚需进一步研究。

在 5' 翼区及内含子 I 中存在着一些对载脂蛋白 E 基因表达具有不同作用的片段^[9,10], 它们可使载脂蛋白 E 的表达变化 10 倍之多。并且其中的某些元件尚表现

出相对强的组织特异性,例如自-227 bp 到-207 bp 及自 88 bp 到 349 bp 能够降低 Hela 细胞载脂蛋白 E 的表达,但在 HepG2 中却无此作用;正常状况下不表达载脂蛋白 E 的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)在转导含有 5'端带有-383 bp 的载脂蛋白 E 基因后则表达较高水平的载脂蛋白 E^[8]。这些可能在某种程度上解释了载脂蛋白 E 组织特异性分布。但上述特异性似乎并不重要,决定载脂蛋白 E 在肝脏特异性表达的元件主要位于其基因的 3'端(见后)。用缺失法以及以 HepG2 细胞核提取物进行的 DNase I 足纹实验证明:在近端 5'翼区及内含子中存在着两个增强子样元件[B1, (G/C)CCCACCTC, B2, G (C/G)CCCCCAGNNTC)和一个负性作用元件[A, CTCCC(T/C)CTG(T/C)CC],其中存在于-161 bp 到-141 bp 间的 B1 元件最为引人注目。该元件的调控作用无距离、方向及位置特异性,活性较强。这可能是载脂蛋白 E 在组织中广泛分布的原因之一。凝胶滞留实验显示:该片段可与转录因子 SP1 和另一种分子量约为 55 000 蛋白质因子相结合^[11],其中 SP1 为其活性所必需,而后者则不然。另一研究较多的序列为-101 bp 至-89 bp 间的片段^[12]。该序列在大鼠、小鼠及人中保持着高度的同源性(85%),对载脂蛋白 E 在肝组织中的特异性表达具有一定作用。该片段与一分子量约 300 KD 的四聚体蛋白质因子结合后对载脂蛋白 E 的转录具有促进作用。

除此之外, DNase I 消化实验显示,包含了转录因子 SP1 同感序列的近端 G-C 盒能够使载脂蛋白 E 的表达升高^[13,14],而远端 G-C 盒周围的片段在与 HepG2 细胞和 CHO 细胞核提取物进行的 DNase I 消化实验中却未被保护。该 G-C 盒是否参与载脂蛋白 E 的组织特异性表达尚不清楚。

上述 A 元件的前 10 个碱基对与低密度脂蛋白受体启动子区的固醇反应元件的第三个片段具有部分同源性^[15]。该片段通过蛋白质因子 SREB-1 介导由胆固醇引起的低密度脂蛋白受体的下向调节^[16]。但由于细胞内胆固醇的增高所引起的是载脂蛋白 E mRNA 及相应蛋白质产物的增加,该片段参与载脂蛋白 E 的调控机理有待于进一步阐明。以下两种可能性值得考虑:一是另种不同的 DNA 结合蛋白参与了载脂蛋白 E 的调控;二是该片段仅为对胆固醇起反应所必需的元件,并不直接参与其调控过程。

除了组织特异性、细胞内胆固醇水平外,发育、营养状况及某些激素也参与载脂蛋白 E 基因表达的调控。Tam 等^[17]提出雌激素能够使 HepG2 细胞载脂蛋白 E mRNA 的水平升高及载脂蛋白 E 的合成和分泌增

加。一个与 Walker 等^[18]提出的雌激素反应元件仅有一个碱基对差异的同源序列存在于载脂蛋白 E 基因 5'端-173 bp 到-162 bp 间,该元件可能是雌激素参与载脂蛋白 E 基因表达调控的分子基础。此外,卵泡刺激素在促进大鼠卵巢颗粒层细胞固醇类激素合成的同时能够使其载脂蛋白 E 的合成增加 2 倍,此时增加的载脂蛋白 E 可能起着促进胆固醇摄取及利用的作用。虽然已有证据表明,环腺苷酸 cAMP 在该过程中担当了第二信使的功能,但其详细的分子机制尚不清楚。

除了 5'翼区对载脂蛋白 E 基因表达的影响外,外显 I 和 3'翼区的作用也有了较为广泛研究。Simonet 等^[19,20]曾报道了在 3'翼区一个约 23 kb 的片段中包含有肝组织特异性表达的调控元件。当此元件缺失时,载脂蛋白 E 能在转基因鼠的肾脏中以较高水平的表达,与包含了该元件的肝脏中的高表达形成了明显的对比。同一研究者进一步的研究认为该调控区(hepatic control region, HCR)为一距载脂蛋白 E 基因约 15 kb 的 774 bp 片段^[21]。该片段的一些特征,如特定的核蛋白结合区,肝脏特异的 DNase I 超敏感区等可能是其作用的分子基础^[22]。但是由于 HCR 同样也能够使载脂蛋白 C I 基因及载脂蛋白 A IV 基因在肝脏中得到高表达,该调控元件或许只是某些蛋白在肝脏中特异表达所必需。上述 HCR 的下游尚存在另一具有上述活性的 HCR 拷贝(HCR-2,前者则称之为 HCR-1)^[23]。HCR-2 距载脂蛋白 E 约 27 kb,与 HCR-1 具有 85%的同源性。与邻近的载脂蛋白 C I 假基因相关,HCR-2 可能同样来源于部分片段的扩增。

在对顺式调控因子进行研究的同时,转录因子的作用也受到了越来越多的重视。这或许是更好的明确载脂蛋白 E 表达调控的分子基础的关键。对于 AP1 样蛋白质因子^[24]及 BEF-1 因子^[25]作用的研究为其很好的例证。在载脂蛋白 E 基因-602 bp 处存在一 AP-1 因子反应元件,AP-1 样蛋白质因子与载脂蛋白 E 基因中-623 bp 至-47 bp 间的序列结合可以诱导单核细胞系细胞向巨噬细胞分化过程中载脂蛋白 E 基因的表达,而 AP-1 因子则受蛋白激酶 C 诱导。转录抑制因子 BEF-1 与载脂蛋白 E 基因-94 到-84 间同源顺序相结合可抑制 HepG2 细胞载脂蛋白 E 基因的表达。BEF-1 为 HepG2 等细胞中自然存在的酪氨酸磷酸化核蛋白,蛋白激酶 C 激活时能够使其磷酸化^[26]。由此可见,载脂蛋白 E 基因表达是在接受到细胞外信号后细胞内多种转录因子相互作用的结果。

近年的研究发现载脂蛋白 E 的表达尚受其它一些因素的影响。如胰岛素、皮质类固醇激素、甲状腺素及

过氧化物酶体增生因子(peroxisome proliferator)等^[27,28]。与在甲亢大鼠血浆中较低的载脂蛋白 E 水平相比,甲状腺素(三碘甲状腺氨酸)有使 HepG2 细胞载脂蛋白 E mRNA 及蛋白质水平增高和促进载脂蛋白 E mRNA 降解的作用。其中后一作用可能是一种核内蛋白的重新合成过程。另一引人注目的进展是过氧化物酶体增生因子对血浆载脂蛋白 E 的下调作用。虽然该过程的生理功能目前尚不清楚,但它可能暗示了载脂蛋白 E 的表达与固醇类激素受体超家族中的一员—过氧化物酶体增生因子激活的受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)的作用间的关系。分子机制方面的研究已在载脂蛋白 E 基因的 5' 端发现了过氧化物酶体增生因子反应元件样的调控区,但其作用尚待进一步探讨。

3 载脂蛋白 E 基因周围的 Alu 序列及 c-fos 调控元件样序列。

在载脂蛋白 E 基因周围存在于四个 Alu 序列^[4], 其中两个存在内含子 I 中,另外两个分别存在其 5' 端与 3' 端。虽然 Alu 序列具有多种可能的功能,但删除 5' 端后该序列的大部分对载脂蛋白 E 基因启动子的活性未发生明显的影响。

在载脂蛋白 E 基因-338 bp 处有一与人 c-fos 基因的血清反应元件存在 65% 同源性的序列。c-fos 基因中的该序列对于血清因子所致的其 RNA 一过性的表达增加所必需,它可被一分子量约 67 KD 的蛋白质因子所结合^[29]。由于载脂蛋白 E 基因中该序列能被 HepG2 细胞核提取物所保护,并显示出对载脂蛋白 E 表达的正效应,它可能也参入某些因素(如细胞因子^[30])对载脂蛋白 E 基因表达的调节。Duan 等^[31]证明新分离的人单核细胞与肿瘤坏死因子共同孵育可导致其载脂蛋白 E mRNA 与蛋白质的合成增加,同时,该过程也诱导了 c-fos 基因的表达。

综上所述,载脂蛋白 E 基因的表达受多种因素的影响,这些因素相互协调、相互影响,从而调节载脂蛋白 E 在不同组织和不同代谢状态下的表达。由于载脂蛋白 E 具有参与多种生理功能(如脂质运输,淋巴细胞免疫功能调节等)和病理过程(如家族性 III 型高脂血症,Alzheimer 氏病等),弄清其分子水平的表达调控将对上述疾病的防治起着重要的作用。

致谢 冯宗忱教授对本文提出了有益的建议。

参考文献

- 1 Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, **240**: 622~630.
- 2 Lethimaki T, Moilamen T, Viikari J, et al. Apolipoprotein E phenotype in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 487~492.
- 3 Eggertsen G, Tegelmann, Ericsson S, et al. Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population: variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentration. *Clin Chem*, 1993, **39**: 2 125~129.
- 4 Paik Y-K, Chang DJ, Reardon CA, et al. Nucleotide sequence and structure of the human Apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 3 445~449.
- 5 Mclean JW, Elshoarbagy NA, Chang DJ, et al. Human apolipoprotein E mRNA, cDNA cloning and nucleotide sequence of a new variant. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 6 498~504.
- 6 Zannis VI, McPherson J, Goldberger G. Synthesis, intracellular processing and signal peptide of human Apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 5 495~499.
- 7 Mclean JW, Fukazwa C, Taylor JM. Rat Apolipoprotein E mRNA—Cloning and sequence of double strand cDNA. *J Biol Chem*, 1983, **258**: 8 993~9 000.
- 8 Reardon CA, Lau Y-F, Paik Y-K, et al. Expression of the human Apolipoprotein E gene in cultured mammalian cells. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 9 858~864.
- 9 Smith JD, Melian A, Leff T, et al. Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 8 300~308.
- 10 Paik Y-K, Chang DJ, Reardon CA, et al. Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 13 340~349.
- 11 Chang DJ, Paik Y-K, Leven TP, et al. Characterization of a human apolipoprotein E gene enhancer element and its associated protein factors. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 9 496~504.
- 12 Jo D-W, Leren TP, Yang Z-Y, et al. Characterization of an upstream regulatory element of the human apolipoprotein E gene, and purification of its binding protein from the human placenta. *J Biochem*, 1995, **117**: 915~922.
- 13 Briggs MR, Kadonaga JT, Bell ST, et al. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific-transcription factor SP1. *Science*, 1986, **234**: 47~52.
- 14 Dyhan WS, Tjian R. Control of eukaryotic messenger

- RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature*, 1985, **316**: 774~778.
- 15 Sudhof TC, Russell DW, Brown MS, et al. 42bp element from LDL receptor gene confers end-product repression by sterols when inserted into viral TK promoter. *Cell*, 1987, **48**: 1 061~069.
- 16 Wang X, Sato R, Brown MS, et al. SREBP-1, A membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, 1994, **77**: 53~62.
- 17 Tam SP, Hache RJG, Deeley RG, et al. Estrogen memory effect in human hepatocytes during repeated cell division without hormone. *Science*, 1986, **234**: 1 234 ~ 1 237.
- 18 Walker P, Germond JE, Brown-Luedit M, et al. Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen responsive vitellogenin and apo-VLDL I genes. *Nucleic Acids Res*, 1984, **12**: 8 611~626.
- 19 Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, et al. In the absence of a downstream element, the apolipoprotein E gene is expressed at high levels in kidneys of transgenic mice. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 10 809~812.
- 20 Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, et al. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/CI gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 8 651~654.
- 21 Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, et al. A far-downstream hepatocyte specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and CI genes in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 8 221~229.
- 22 Dang Q, Walker D, Taylor S, et al. structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C gene locus. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 22 577~585.
- 23 Allan CM, Walker D and Taylor JM, Evolutionary duplication of a hepatic control region in the Apolipoprotein E gene locus. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 26 278~281.
- 24 Basheeruddin K, Rechteris C, Mazzone T. Evaluation of the role of AP1-like proteins in the enhanced apolipoprotein E gene transcription accompanying phorbol ester induced macrophage differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1281**: 235~241.
- 25 Berg DT, Calnek DS, Grinnell BW. The human apolipoprotein E gene is negatively regulated in human liver HepG2 cells by the transcription factor BEF-1. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 15 447~450.
- 26 Berg DT, Calnek DS, Grinnell BW. Trans-repressor BEF-1 phosphorylation: a potential control mechanism for apolipoprotein E gene regulation. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 4 589~592.
- 27 Vandenbroeck Y, Janvier B, Lorette C, et al. The modulation of apolipoprotein E gene expression by 3,3'-5-triiodothyronine in HepG2 cells occurs at transcriptional and post-transcriptional levels. *Eur J Biochem*, 1994, **224**: 463~471.
- 28 Kiyoto M, Goto S. Characterization of serum proteins down-regulated by peroxisome proliferators: Transient repression of apoE gene expression in rat liver. *J Biochem*, 1995, **117**: 597~602.
- 29 Treisman R. Identification and purification of a polypeptide that bind to the c-fos serum response element. *EMBO J*, 1987, **6**: 2 711~718.
- 30 Zucherman SH, Evens GF, O'neal L. Cytokines regulation of macrophage apoE secretion: Opposing effects of GM-CSF and TGF- β . *Atherosclerosis*, 1992, **96**: 203~214.
- 31 Duan H, Li Z, Mazzone T. Tumornecrosis factor- α modulates monocyte/macrophage Apo E gene expression. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 915~922.

(1997-03-18 收到, 1997-08-24 修回)