

载脂蛋白 AI 结构中个别氨基酸置换或缺失对促细胞内胆固醇流出能力的影响

张春妮 袴田秀树^① 黄伟^② 庄一义 堀内正公^①

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

Effects of Replacement or Deletion in Individual Amino Acid Residue on the Capacity of Apolipoprotein AI to Promote Cellular Cholesterol Efflux

ZHANG Chun-Ni, Hakamata Hideki, HUANG Wei, ZHANG Yi-Yi and Seikon Horiuchi

(Department of Laboratory Diagnosis, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT

Aim The effects of replacement of amino acid residue Val156 with Glu or deletion in Glu235 on the capacity of apolipoprotein AI (Apo AI) to promote cholesterol efflux from murine peritoneal macrophages.

Methods Cultured mouse peritoneal macrophages were used. ³H-oleate labeled acetyl low density lipoprotein (ac-LDL) was employed as an inducer for foam cell formation. After macrophages were cultured with Apo AI, ³H-cholesterol released from cells to the medium was measured by scintillation spectrometry.

Results The replacement of Val156→Glu did not influence the capacity of Apo AI to promote cellular cholesterol efflux. However, a deletion in the residue Glu235 significantly reduced the ability of Apo AI to promote cellular cholesterol efflux.

Conclusions Amino acid residue Glu235 of ApoAI is important for cellular cholesterol efflux.

KEY WORDS Apolipoprotein AI; Cholesterol ef-flux; Murine peritoneal macrophages

摘要 载脂蛋白 AI 促进胆固醇从外周细胞流出, 在 高密度脂蛋白对胆固醇的逆向运输中起关键作用。为 探讨载脂蛋白 AI 介导胆固醇流出功能的结构特征, 观 察了天然存在的氨基酸置换: 载脂蛋白 AI 结构中第 156 位上的缬氨酸由谷氨酸置换, 和氨基酸缺失: 第 235 位上的谷氨酸缺失对载脂蛋白 AI 促胆固醇从鼠腹 腔巨噬细胞流出能力的影响。以体外培养的鼠腹腔巨 噬细胞为对象, 用氚标油酸酯标记的乙酰化低密度脂 蛋白作泡沫细胞诱导物, 巨噬细胞与载脂蛋白 AI 孵育 一段时间后, 测定由细胞释放入培养基中的³H 标记胆 固醇量。结果发现载脂蛋白 AI 结构中第 156 位上的缬 氨酸由谷氨酸置换不影响载脂蛋白 AI 的促细胞胆固 醇流出能力, 而第 235 位上的谷氨酸缺失可使胆固醇 流出能力降低 50%, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。 此结果提示, 载脂蛋白 AI 的 C 末端残基第 235 位谷氨 酸对胆固醇流出功能起重要作用。

关键词 载脂蛋白 AI; 胆固醇流出; 鼠腹腔巨噬 细胞

载脂蛋白 AI (Apo AI) 的原始合成产物是 具有 267 个氨基酸残基的前载脂蛋白 AI 原 (preproApo AI), 前载脂蛋白 AI 原在粗面内 质网处被信号肽酶切除 N 末端 18 个残基的前 片段 (presegment), 形成载脂蛋白 AI 原 (proApoAI)。载脂蛋白 AI 原分泌入血, 进一步 由转化酶切除具有 6 个氨基酸残基的原片段 (prosegment), 转变为血浆成熟的载脂蛋白 AI。成熟的载脂蛋白 AI 的 243 个氨基酸残基 折叠成双螺旋结构, 构成其功能区。作为高密度 脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的主要

本文获日中医学协会笹川医学金资助

① 日本熊本大学医学部生化系

② 日本福岡大学医学部内科

载脂蛋白, 载脂蛋白 AI 在 HDL 对胆固醇的逆向运输中起关键作用。它可激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT), 促进胆固醇从外周细胞流出^[1]。近年来, 国内外学者采用单克隆抗体、转基因及重组载脂蛋白 AI 变异体等方法探讨载脂蛋白 AI 的结构与功能的关系^[2-4], 但至今对两者的关系尚不完全清楚。本实验观察了载脂蛋白 AI 结构中天然存在的氨基酸置换第 156 位上的缬氨酸由谷氨酸置换 (Val-156→Glu) (变异体为载脂蛋白 AI Oita) 和氨基酸缺失: 第 235 位上的谷氨酸没有了 (Glu-235→0) (变异体为载脂蛋白 AI Nichinan) 对载脂蛋白 AI 促胆固醇从鼠腹腔巨噬细胞流出能力的影响, 旨在进一步探讨载脂蛋白 AI 与胆固醇流出功能有关的结构特征。

1 材料和方法

1.1 材料

载脂蛋白 AI Oita (其结构中第 156 位上的缬氨酸由谷氨酸置换, Val-156→Glu) 系纯合点突变, 来源于一名无男性患者, 患者为日本 Oita 玉照住院病人。该患者血清载脂蛋白 AI 和 HDL 水平极低, 并伴有冠心病和黄色瘤。载脂蛋白 AI Nichinan (其结构中缺第 235 位上的谷氨酸, Glu-235→0) 系杂合点缺失, 取自一名日本男性患者, 该患者仅显示低 HDL 水平, 未见其它临床症状。

1.2 乙酰化低密度脂蛋白的制备

密度梯度法分离正常人血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) ($d=1.019\sim1.063\text{ g/mL}$), 用脂酰衍化学修饰 LDL 制备乙酰化低密度脂蛋白 (acetylated LDL, ac-LDL)^[5]。参照文献^[8]方法^[9], $10(n=3)$ 油酸酯标记 ac-LDL。

1.3 载脂蛋白 AI 的分离和纯化

密度梯度离心法^[10]分别分离载脂蛋白 AI Oita 携带者和一正常人血浆 HDL ($d=1.063\sim1.21\text{ g/mL}$), HDL 脱脂后, 用 Sephacryl S-200 (Sigma 产品) 柱层析纯化。

1.4 重组载脂蛋白 AI 原的制备

重组人 (载脂蛋白 AI Nichinan 携带者和正常人) 载脂蛋白 AI 原以融合蛋白形式表达于 *Escherichia coli* pGEX 载体表达系统。载脂蛋白 AI 原以融合蛋白经谷

胱甘肽-琼脂糖 (glutathione-agarose) (Sigma 产品) 亲和层析纯化, 凝血酶 (thrombin) (Sigma 产品) 酶切及再纯化以去除谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase) 载体。

1.5 鼠腹腔巨噬细胞培养

参照文献^[10]方法分离鼠腹腔巨噬细胞, 培养基为含 0.5% 血清蛋白白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 DMEM (Life Technologies 产品)。

1.6 测定释放入培养基中的 ^3H 标记胆固醇

参照文献^[11]。巨噬细胞 (2×10^6 细胞/L) 培养于 6 孔板中, 形成单层后, 加入 50 mg/L 的 ^3H 油酸酯标记 ac-LDL, 37°C 培养 18 h, 用磷酸盐缓冲生理盐水洗 3 次, 分别加入 20 mg/L 的载脂蛋白 AI, 载脂蛋白 AI Oita, 重组正常载脂蛋白 AI 原和重组载脂蛋白 AI 原 Nichinan, 培养基改为含 0.2% BSA 的 DMEM, 继续培养 18 h。培养基移入 Eppendorf 离心管, 离心 10 min, 取 400 μL 上清液, 加入 2 mL Scintosol (日本和光制药工业产品), 用闪烁分光法测定放射活性。实验每组取 3 个复孔。

1.7 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 样本均数的比较。

2 结果

2.1 载脂蛋白 AI Oita 促细胞胆固醇流出的能力

由载脂蛋白 AI Oita 介导的释放入培养基中 ^3H 标记胆固醇量 $[(22.73\pm 1.13)\times 10^{-1}\text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 是未加载脂蛋白 AI (对照组) 的 6.8 倍, 差异有极显著性意义 ($P<0.001$), 但与正常载脂蛋白 AI $[(21.37\pm 0.51)\times 10^{-1}\text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 相比无显著性差异 (图 1, Figure 1, $P>0.05$)。

2.2 载脂蛋白 AI 原 Nichinan 促细胞胆固醇流出的能力

载脂蛋白 AI 原 Nichinan 促细胞胆固醇流出量 $[(5.86\pm 0.19)\times 10^{-1}\text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 仅为正常载脂蛋白 AI 原 $[(12.6\pm 0.58)\times 10^{-1}\text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 的 46%, 经 t 检验此差异有极显著性意义 ($P<0.001$), 同时我们观察到正常载脂蛋白 AI 原介导胆固醇流出量仅为载脂蛋白 AI 的 60% (图 2, Figure 2)。

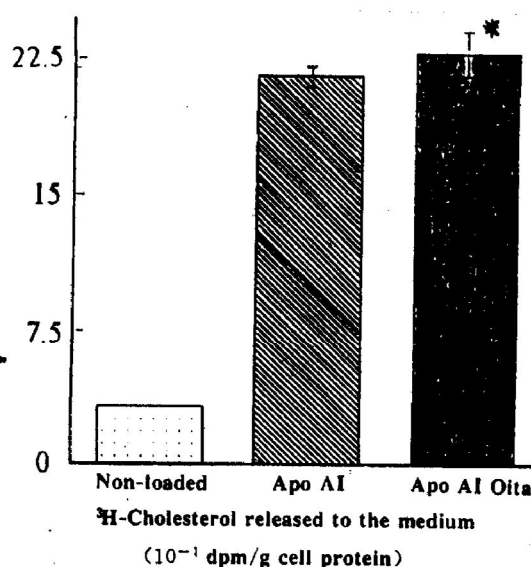


Figure 1. Cellular cholesterol efflux mediated by Apo AI Oita. Each value represents the mean of triplicate determinations. *: $P < 0.001$, compared with non-loaded group.

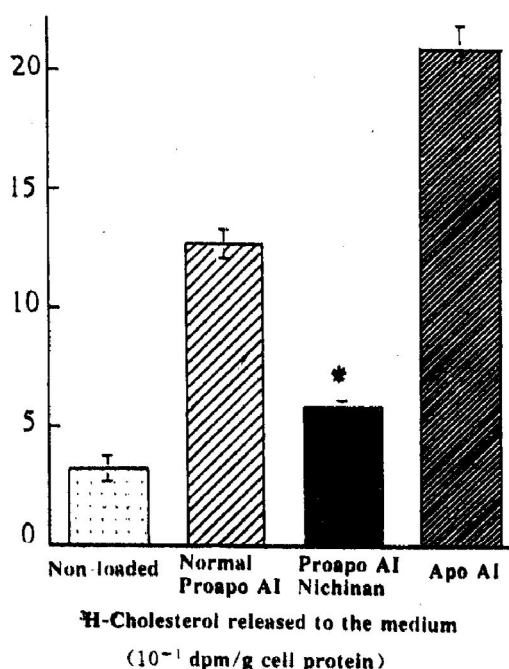


Figure 2. Reduced capacity of proapoAI Nichinan to promote cellular cholesterol efflux. *: $P < 0.01$, compared with normal proapoAI group.

3 讨论

载脂蛋白 AI 促进胆固醇从外周细胞流出的机制有二:一是在 LCAT 存在时,富含脂质的 HDL 导致一种慢而非饱和的细胞胆固醇流

出^[12];二是作为脂游离的载脂蛋白 AI 或作为脂含量低的 HDL 的一部分,推动一种快速饱和且独立于 LCAT 的细胞胆固醇流出^[13]。至今对与胆固醇流出功能有关的结构特征尚不十分明了。据报道^[13],具有双螺旋结构的短肽可刺激细胞清除胆固醇,提示双螺旋结构是胆固醇流出所必需的。最近,新的证据表明,一些载脂蛋白 AI 的特有序列对胆固醇流出起重要作用。Fielding 等^[3]利用单克隆抗体发现氨基酸残基-137~144 与胆固醇流出功能有关。Sviridov 等^[8]利用重组载脂蛋白 AI 发现载脂蛋白 AI 的羧基末端残基-222~243 对胆固醇流出起关键作用。并指出,载脂蛋白 AI 促胆固醇流出能力与其动员磷脂能力有关。

本实验用氚标油酸酯标记的乙酰化低密度脂蛋白作泡沫细胞诱导物使巨噬细胞胆固醇酯蓄积而转为泡沫细胞,并使细胞中的胆固醇得以标记。泡沫细胞再与载脂蛋白 AI 孵育一段时间,通过与细胞表面高亲和性的结合位点相互作用,载脂蛋白 AI 介导胆固醇从细胞流出,根据释放入培养基中的³H 胆固醇量评价载脂蛋白 AI 清除细胞胆固醇能力。我们发现,载脂蛋白 AI 原 Nichinan 促胆固醇从鼠腹腔巨噬细胞流出能力仅为正常载脂蛋白 AI 原的 46%,C 末端残基 Glu-235 的缺失可严重损害胆固醇流出之能力,表明 Glu-235 与胆固醇流出能力有关。此外我们观察到,载脂蛋白 AI Oita 促胆固醇流出能力与正常载脂蛋白 AI 相似,提示氨基酸置换:Val-156→Glu 不影响胆固醇的流出。载脂蛋白 AI Oita 患者血清 LCAT 活力及胆固醇酯化速率仅为正常的 40%,由此推测残基 Val-156 可能与 LCAT 激活能力有关。

鉴于载脂蛋白 AI Nichinan(Glu-235→0)系杂合点缺失,因此本研究中我们利用重组载脂蛋白 AI 原观察点缺失 Glu-235→0 对胆固醇流出能力的影响。近年来,重组载脂蛋白 AI 原已被广泛用于实验中。尽管当与脂质结合成复合物后,载脂蛋白 AI 原的性质与成熟载脂蛋白 AI 相差无几,但载脂蛋白 AI 原促胆固醇流出之能力有异于成熟载脂蛋白 AI。其可能的原因

有两个:一是原片段与分子的其他部位相互作用,对功能产生一定的影响;二是重组蛋白的折叠方式可能不同于天然载脂蛋白 AI。我们观察到重组载脂蛋白 AI 原促胆固醇流出能力仅为成熟载脂蛋白 AI 的 60%,与 Sviridov D 等^[5]报道的结果一致。

本实验结果提示。载脂蛋白 AI 的 C-末端残基 Glu-235 对胆固醇流出功能起关键作用。至于 Glu-235 影响胆固醇流出的机制尚需进一步研究。

参考文献

- Fielding C, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 211~228.
- Brouillette CG, Anantharamaiah GM. Structural models of human apolipoprotein AI. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1256**: 103~129.
- Fielding PE, Kawano M, Alberico L, et al. Unique epitope of apolipoprotein AI expressed in pre β 1 highdensity lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol. *Biochemistry*, 1994, **33**: 6 981~985.
- von Eckardstein, Castro AG, Wybranska I, et al. Interaction of reconstituted high density lipoprotein discs containing human apolipoprotein AI (apoAI) variants with murine adipocytes and macrophages; evidence for reduced cholesterol efflux promotion by apoAI (Pro165 Arg). *J Biol Chem*, 1993, **268**: 2 616~622.
- Sviridov D, Pyle L, Fidge N. Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to apolipoprotein AI mutants. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 33 277~283.
- Sviridov D, Pyle L, Fidge N. Identification of a sequence in apolipoprotein AI associated with the efflux of intracellular cholesterol to human species and apolipoprotein AI containing particles. *Biochemistry*, 1996, **35**: 189~196.
- Miyazaki M, Sakai M, Suginoara Y, et al. Acetylated low density lipoprotein reduces its ligand activity for the scavenger receptor after interaction with reconstituted high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 5 254~269.
- Roberts DC, Miller NE, Price SG, et al. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem J*, 1985, **226**: 319~322.
- Sakai M, Miyazaki A, Sakamoto Y, et al. Cross linking of apolipoproteins is involved in a loss of the ligand activity of high density lipoprotein upon Cu^{2+} mediated oxidation. *FEBS Lett*, 1992, **314**: 199~203.
- Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, et al. Species difference in cholesteryl ester cycle and HDL induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 1 860~865.
- Czarnecka H, Yokoyama S. Lecithin cholesterol acyltransferase reaction on cellular lipid released by free apolipoprotein mediated efflux. *Biochemistry*, 1995, **34**: 4 385~392.
- Li Q, Yokoyama S. Independent regulation of cholesterol incorporation into free apolipoprotein mediated cellular lipid efflux in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1995, **269**: 26 216~223.
- Mendez AJ, Anantharamaiah GM, Segrest JP. Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein AI in clearing cellular cholesterol. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1 689~705.

(1998-05-18 收到, 1998-08-25 修回。编辑: 胡必利)