

胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化的关系

曾武威, 陈保生

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室, 北京市 100005)

[主题词] 胆固醇酯; 动脉粥样硬化; 胆固醇; 载体蛋白

[摘要] 胆固醇酯转运蛋白参与体内胆固醇逆转运过程, 促进胆固醇酯和甘油三酯在脂蛋白之间的交换, 同时参与高密度脂蛋白颗粒的重塑。本文介绍有关胆固醇酯转运蛋白的分子生物学、结构与功能的关系及其与动脉粥样硬化关系研究的新发现和新认识。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

除提供正常生理需要外, 体内外周组织中多余的胆固醇需要通过血浆高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)运送回肝脏并进一步代谢, 这一过程称为胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)。由于 RCT 可降低血浆胆固醇水平, 因此被认为是体内具有抗动脉粥样硬化作用的防御系统。胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)促进胆固醇酯从 HDL 流向富含载脂蛋白 B 的极低密度脂蛋白

(very low density lipoprotein, VLDL)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 调节血浆高密度脂蛋白胆固醇(HDL cholesterol, HDLC)水平, 同时参与 HDL 颗粒重塑, 因此 CETP 是 RCT 过程中的一个关键交换因子, 在脂蛋白的代谢中起重要作用。CETP 基因缺陷造成高 α 脂蛋白血症, 体内 HDL 和 LDL 的结构均出现异常^[1]。近年来应用定点突变和基因敲除研究及对 CETP 基因缺陷患者和 CETP 转基因动物的研究进一步证实了 CETP 在脂代谢中的重要作用。

[收稿日期] 2001-11-05 [修回日期] 2002-05-08

[作者简介] 曾武威, 女, 1970 年 10 月生, 湖南人, 硕士, 助理研究员, 主要从事脂蛋白与载脂蛋白的结构、功能和代谢及其与心血管疾病关系的分子生物学研究。陈保生, 男, 教授, 博士研究生导师, 本文的联系人。

1 胆固醇酯转运蛋白的结构与功能

1.1 基因和蛋白质结构

人 CETP 基因约 25 kb, 含有 16 个外显子和 15 个内含子, 位于第 16 号染色体的长臂(16q¹²⁻²¹), 靠近卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) 基因。在 CETP 基因的翻译起始上游有一个 TATA box 和一个 SP-1 的结合位点, 另一个转录因子——增强子结合蛋白(enhancer-binding protein, EBP) 结合的序列 CCAAT 也位于启动子内, 此外该启动子区还含有三个特异的细胞核提取物的结合位点。人 CETP mRNA 约 1.9 kb, 在 3' poly(A) 尾上游为一个变异的 poly(A) 加尾信号 ATTA¹²¹。

CETP 成熟蛋白由 476 个氨基酸组成, 富含疏水氨基酸, 是一种疏水性极强的糖蛋白^[3]。CETP 以单体形式存在, 分子中 7 个 Cys 中至少有一个是游离的, 位于或接近 CETP 结合脂质的位点^[4]。人 CETP 在体内的表达比较广泛, 主要在肝、脾和脂肪组织中表达, 在小肠、肾上腺、肾和心脏中也有低水平的表达。有些种属动物如小鼠、大鼠的血浆中不含 CETP。目前已经克隆了人、兔、猴、仓鼠和树鼩的 CETP cDNA。CETP 基因与载脂蛋白的同源性很低, 与血浆磷脂转运蛋白(plasma phospholipid transfer protein, PLTP) 基因的同源性为 20%^[5]。它们和脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP) 及细菌增加通透性蛋白(bactericidal/permeability-increasing protein, BPI) 同属于脂多糖结合蛋白基因家族。尽管这四个成员各自具有不同的生理功能, 但它们的生物化学性质相似, 均可以结合脂多糖、磷脂和其它脂类。

1.2 结构与功能的关系

CETP 的 C 末端形成双性 α 螺旋, 单抗表面所要求的氨基酸集中在极性表面, 而与胆固醇酯转运活性相关的氨基酸分布在非极性表面。研究显示, His 466 和 Leu 475 之间带电荷的氨基酸, 尤其是动脉粥样硬化 p 460 突变的 CETP, 其转运胆固醇酯活性正常, 但不能与其单抗结合; 而这个区域的疏水性氨基酸, 尤其是 Phe 454、Phe 461、Leu 468、Phe 471 和 Leu 475 突变则引起胆固醇酯转运活性下降, 但仍可与其单抗结合, 提示 C 末端 α 螺旋的疏水性表面参与胆固醇酯转运, 单抗 TP2 由于形成局部位阻机制而抑制 CETP 活性。CETP 的 C 末端由于富含 Phe 和 Leu 所形成的高疏水特性对胆固醇酯的转运非常关键, 尤其是第 454~457 位的 Phe-Leu-Leu-Leu 是其与脂质正常结合及有效转运甘油三酯和胆固醇酯所必需的。

人 CETP 蛋白中含有 4 个 N-糖基化位点(Asn 88, 240, 341, 396)。定点突变实验证明, 人 CETP 的 88 Asn: Gln 和 396 Asn: Gln 突变将造成 CETP 不能分泌, 而 341 Asn: Gln 突变不但可以正常分泌 CETP, 还具有比野生型 CETP 更高的胆固醇酯转运活性^[6]。

2 胆固醇酯转运蛋白活性的调节

大量摄取甘油三酯和胆固醇使体内 CETP mRNA 合成增加, 血浆 CETP 含量和活性升高。转基因鼠敲除实验表明, 缺失转录起点上游 -370~-138 的 232 bp 片段造成 CETP 对外源性胆固醇的应答消失, 提示这个区域含有胆固醇应答元件(cholesterol responsive element, CRE)^[7]。与 CETP 一样受外源

性胆固醇调节的 HMG-CoA 还原酶的启动子区内也发现了 CRE 的存在。内源性高脂血症也可使 CETP 表达增加, 机制类似于外源性胆固醇的调节作用。此外, CETP 的表达还受肾上腺皮质激素和脂多糖的影响, 它们可降低肝脏 CETP mRNA 的水平, 肾上腺切除则可防止 CETP mRNA 的下降。

人 CETP mRNA 有两种异构体, 一种是全长的 CETP, 另一种是第九外显子完全缺失的变异体(短 CETP)。这种短 CETP mRNA 是 CETP 基因变位剪接的产物, 并不改变 CETP 的翻译阅读框架。人体内约 65% 的 CETP mRNA 可能是缺失第九外显子的短 CETP。短 CETP 不能分泌, 因此血浆中不能检出其存在。体外表达人工合成的 CETP 突变体结果表明, 短 CETP 的合成不受胆固醇浓度的影响。将短 CETP cDNA 转染至 COS 细胞, 可产生这种短而不分泌且无活性的 CETP; 而将短 CETP 与全长 CETP 共转染 COS 细胞时, 有活性的全长 CETP 的分泌被抑制。尽管如此, 短 CETP 并不影响血浆脂蛋白水平^[8]。提示短 CETP 可能对全长 CETP 的表达起负调控作用, CETP 基因的变位剪接可能作为转录后水平的一种下调机制而调节 CETP 的表达。

3 胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化的关系

3.1 促进动脉粥样硬化发生的证据

Quinet 等^[9]用适量的诱发动脉粥样硬化饮食喂饲恒河猴 5 年后, 发现其血浆 CETP 水平与血管内皮增厚的程度呈直接相关, 提示 CETP 具有促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 发生的作用。另外, 血管内壁增厚程度与血浆 LDL 水平也有明显相关性, 而且比与 CETP 的相关性更密切, 因此 CETP 水平升高可能是 LDL 引起的继发反应, 对动脉粥样硬化的发生可能起加剧作用, 也可能是机体的一种保护性反应。

由于小鼠血浆中不含 CETP, 因此研究过度表达 CETP 基因的转基因鼠将能很好地揭示 CETP 的生理作用。用高胆固醇饮食喂饲转基因小鼠和对照组小鼠 28 周后, 转基因小鼠血浆中(VLDL+LDL)/HDL 远高于对照组, 同时体内形成动脉粥样硬化斑块的面积几乎是对照组的两倍^[10]。转基因小鼠体内 CETP 活性显著升高而 HDL 水平明显下降。说明 CETP 转基因鼠对动脉粥样硬化的易感性增加, 提示 CETP 具有致动脉粥样硬化作用。应用 CETP 反义寡核苷酸抑制 CETP 活性, 模仿 CETP 基因缺陷状态发现, 兔血浆 HDLC 浓度升高, 主动脉粥样硬化病变程度减轻^[11], 说明 CETP 活性下降可以降低动脉粥样硬化的危险性。

Okamoto 等^[12]研究显示, CETP 被抑制后, 血浆 HDLC 水平升高, 而非 HDLC 水平则降低, 同时抑制家兔体内动脉粥样硬化的发展, 提示 CETP 在体内可能具有致动脉粥样硬化的作用。

3.2 抑制动脉粥样硬化发生的证据

尽管上述研究支持 CETP 促进动脉粥样硬化的发生, 但一些 CETP 基因缺陷和高 α 脂蛋白血症患者心脑血管疾病的发生率仍高于正常人群。体外研究表明, CETP 可以将胆固醇酯从泡沫细胞中清除出去, 而且这个过程不依赖于脂蛋白

的存在。由于动脉粥样硬化病灶处的巨噬细胞可以分泌 CETP, 它可穿过血管内皮将病灶处的胆固醇酯清除并转运到脂蛋白中, 从而起到抗动脉粥样硬化作用。Sakai 等^[13]发现一些 CETP 缺陷患者的肝 LDL 受体对 LDL 的亲和力显著下降, 肝 LDL 受体可能在 CETP 缺陷时作为补偿机制而上调, 那些不能进入肝脏代谢的 LDL 则增加了患动脉粥样硬化的危险性。另外, CETP 通过使胆固醇酯在脂蛋白间重新分布, 将其从 HDL 中转运到 LDL 中, 而富含胆固醇酯的 LDL 与肝 LDL 受体具有最佳的亲和力, 从而起到清除血浆胆固醇酯的作用。

体内 HDL 有两种形式: 大 HDL(HDL₂) 和小 HDL(HDL₃), 小 HDL 可以清除细胞膜上的胆固醇酯, 具有抗动脉粥样硬化作用, 而大 HDL 则无此功能。CETP 缺陷患者不能有效代谢大 HDL, 造成血浆大 HDL 浓度增加, 使其对胆固醇的清除能力降低。Collet 等^[14]将 CETP 加入培养的细胞中, 并不增加细胞对 HDL 胆固醇酯的摄取。但细胞与 CETP 和富含甘油三酯的脂蛋白共同培养时, 细胞 HDL 中的甘油三酯含量升高, 用肝脂酶处理后, 细胞对 HDL 胆固醇酯的摄取则大大增加。说明 CETP 对 HDL 的重塑过程使清道夫受体 B 类 I 型介导的对 HDL 胆固醇酯的摄取增强, 从而降低血浆胆固醇酯水平。

CETP 致动脉粥样硬化作用及其与 HDLC 浓度的关系没有血液透析患者中发现^[15]。对 202 例血液透析患者的研究表明, 血管疾病患者 CETP 浓度明显低于无血管疾病患者, 提示 CETP 在血液透析患者的血管疾病中可能起着保护作用, 尤其是对于 HDLC 浓度正常或高于正常的患者。

3.3 与动脉粥样硬化关系的新观点

Hirano 等^[16]对日本北部的一个 CETP 第 14 内含子剪接缺陷的高发区进行的研究表明, 大部分高 α 脂蛋白血症患者血浆 HDLC 水平降低, 对动脉粥样硬化的易感性增加。而用 CETP 单抗抑制仓鼠 CETP 的活性, 其血浆 HDLC 和 HDL 胆固醇酯浓度显著升高, 且大 HDL 的比例升高。Tall 等认为 CETP 下调肝脏 LDL 受体和 HMG-CoA 还原酶的表达, 一方面 LDL 受体减少使血浆 LDL 升高, 促进动脉粥样硬化的发生; 另一方面 HMG-CoA 还原酶的合成减少使胆固醇的合成下降, 血浆 VLDL 和 LDL 随之降低, 又具有抑制动脉粥样硬化作用。

最近的一些研究表明, 血浆 HDLC 水平升高不总是抗动脉粥样硬化的^[17-19]。清道夫受体 B 类 I 型(scavenger receptor class B type I, SR-BI) 基因敲除小鼠的血浆 HDLC 明显升高, HDL 体积增大, 但由于 SR-BI 基因紊乱而引起主动脉根部和心血管出现动脉粥样硬化。提示尽管 HDLC 升高, 但由于参与 RCT 过程的 SR-BI 表达降低, RCT 途径破坏, 仍可能促使动脉粥样硬化的发生。CETP 基因缺陷患者血浆脂蛋白的特点与 SR-BI 基因敲除小鼠相似, 因此推测他们体内也处于 RCT 过程被破坏的状态, 增加了对动脉粥样硬化的易感性。

CETP 与动脉粥样硬化的关系十分微妙, 呈现双面作用, 因此目前还没有定论。由于动脉粥样硬化的影响因素非常

多, 因此 CETP 对其形成和发展的影响可能是通过影响脂代谢的诸多环节而起的综合作用。

[参考文献]

- [1] Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin in Lipidology*, 2000, **11**: 589-596
- [2] Agellon L, Quinet E, Gillette T, et al. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry*, 1990, **29**: 1 372-376
- [3] Bruce C, Chouinard RA, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr*, 1998, **18**: 297-330
- [4] Connolly DT, Heuvelman D, Glenn K. Inactivation of cholesteryl ester transfer protein by cysteine modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **223**: 42-47
- [5] Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhainen M, et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 2001, **155** (2): 269-81
- [6] Stevenson SC, Wang S, Deng L, et al. Human plasma cholesteryl ester transfer protein consists of a mixture of two forms reflecting variable glycosylation at asparagine 341. *Biochemistry*, 1993, **32**: 5 121-126
- [7] Oliveira HCF, Chouinard RA, Agellon LB, et al. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences; cis-acting sequences mapped in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 31 831-838
- [8] Quinet E, Yang TP, Marinos C, et al. Inhibition of the cellular secretion of cholesteryl ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 16 891-894
- [9] Quinet E, Tall A, Ramakrishnan R, et al. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J Clin Invest*, 1991, **87**: 1 559-566
- [10] Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, et al. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature*, 1993, **364**: 73-75
- [11] Sugano M, Makino N, Sawada S, et al. Effects of antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 5 033-036
- [12] Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, et al. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature*, 2000, **406** (6792): 203-207
- [13] Sakai N, Yamashita S, Hirano KL, et al. Decreased affinity of low density lipoprotein (LDL) particles for LDL receptors in patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Eur J Clin Invest*, 1995, **25**: 332-339
- [14] Collet X, Tall AR, Serajuddin H, et al. Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL-CE by cells expressing scavenger receptor BI. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 1 185-193
- [15] Kimura H, Miyazaki R, Suzuki S, et al. Cholesteryl ester transfer protein as a protective factor against vascular disease in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 2001, **38** (1): 70-76
- [16] Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan; marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 1 053-059
- [17] Trigatti B, Rayburn H, Vinals M, et al. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 9 322-327
- [18] Huszar D, Varban ML, Rinninger E, et al. Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor BI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 068-073
- [19] Yamashita S, Sakai N, Hirano K, et al. Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Front Biosci*, 2001, **6**: D366-387

(此文编辑 文玉珊)