

载脂蛋白家族新成员——载脂蛋白 A5 基因研究进展

李国平 综述, 陈保生 审校

(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)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 A5 基因研究进展; 综述; 基因多态性; 脂蛋白, 高密度; 甘油三酯

[摘要] 通过抑制消减杂交技术和生物信息学技术发现并证实了载脂蛋白家族新成员载脂蛋白 A5 基因的存在, 进一步的实验结果证实该基因定位于人 11 号染色体长臂 23 区。该基因可能在大鼠肝脏再生过程中调节肝脏脂质的摄入量, 但具体机制不详。转基因动物以及基因敲除动物与对照组动物比较发现, 该基因非常显著地影响实验组动物的血浆甘油三酯水平。讨论了在不同地域人群中该基因的多态性以及单倍型与人血浆中甘油三酯水平的关系, 介绍了载脂蛋白 A5 的表达调控机制。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

载脂蛋白 A5 是由两个独立的课题组在 2001 年同期发现并证实的一个载脂蛋白家族新成员^[1,2], 对血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平有重要的影响。血浆 TG 代谢与心血管疾病的关系十分密切, TG 代谢异常常常引起多种心血管疾病, 如高血压、心脏病等^[3,4], 所以探明载脂蛋白 A5 的调控机制及代谢机理具有重要意义。

1 载脂蛋白 A5 基因是如何发现的

1.1 抑制消减杂交技术

使用 cDNA 抑制消减杂交技术, Vliet 等^[1]证实大鼠肝脏切除 70% 以后, 在肝脏再生过程中有 3 个上调表达基因, 命名为再生相关蛋白 1、2、3 (regeneration associated proteins, RAP)。在大鼠肝脏 cDNA 文库中克隆了 RAP3, 利用快速扩增 cDNA 末端技术获得 cDNA 全长。通过 3' 快速扩增 cDNA 末端技术和 Northern 杂交证实 RAP3 在肝脏中大量转录, 有两个转录本, 推测是由 poly A 位点的选择造成的。虽然长度不同, 但预测开放阅读框完全一致, 编码 367 个氨基酸。进一步的蛋白质结构分析显示, 该蛋白质具有双螺旋, N 末端信号肽具有脂质结合特征, 多克隆抗体技术证实 RAP3 存在于大鼠血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 中, 在不同物种间与载脂蛋白 A1 和载脂蛋白 A4 有 20% ~ 28% 的同源性。这些特征说明它可能是一种新的载脂蛋白, 所以命名为载脂蛋白 A5。

核苷酸同源性分析证实, 人以及小鼠中都存在高度同源序列, 与 11 号染色体长臂 23 区 (11q23) 载脂蛋白 A1/C3/A4 基因簇所在的位置具有 80% 的同源性, 与小鼠肝脏和胎盘的表达序列标签 (expression sequence tags, EST) 有 90% 的同源

性。Northern 杂交证实, 载脂蛋白 A5 在人肝脏组织中大量表达, 且存在两个转录本。小鼠中载脂蛋白 A5 的 cDNA 序列已经被基因库收录 (收录号 AA987093), 只是此序列当时被收录时并不知道它编码载脂蛋白 A5。

1.2 生物信息学技术

位于人 11 号染色体长臂 23 区的载脂蛋白 A1/C3/A4 基因簇是一个研究得比较清楚的与脂蛋白代谢密切相关的区域, 人类基因组计划的实施与发展, 提供了大量有价值的序列信息, 这一染色体区域测序的完成, 为比较基因组学和功能基因组学的研究提供了可能。为了寻找进化上保守且具有潜在功能的序列, Pennacchio 等^[2]于 2001 年首先测定了小鼠一段 200 kb 基因组的 DNA 片段, 然后与人染色体 11q23 这一区域进行核苷酸序列比对分析, 发现人与小鼠核苷酸序列同源性很高, 载脂蛋白 A1/C3/A4 基因簇更是高度保守, 在距离载脂蛋白 A1/C3/A4 基因簇约 30 kb 处有一段高度保守区域, 编码载脂蛋白样蛋白。小鼠表达序列标签数据库证实该基因被转录了, 预测该基因有 4 个外显子, 编码 368 个氨基酸, 与多种已知载脂蛋白具有同源性, 其中与载脂蛋白 A4 编码的蛋白质同源性最高, 有 24% 的氨基酸相同, 相似性达到 49%, 定义此基因为载脂蛋白 A5。

在人染色体 11q23 区域, 与小鼠载脂蛋白 A5 基因相对应的高度保守区, 即人载脂蛋白 A5 基因, 预测该基因有 4 个外显子, 编码 366 个氨基酸, 这一点与 Vliet 等^[1]的推断不同, 以后的实验结果^[5]更支持 Pennacchio 等^[2]的预测。人载脂蛋白 A5 基因预测的编码蛋白与小鼠载脂蛋白 A5 基因预测的编码蛋白有 71% 的氨基酸完全相同, 相似性达到 79%。进一步的 Northern 杂交实验证实该基因在肝脏中大量转录, 有 2 个转录本, 约 1.3 kb 和 1.9 kb, 这与 Vliet 等^[1]的实验结果相同。

2 载脂蛋白 A5 基因的功能

肝脏再生需要摄取大量的脂类合成细胞膜, 但摄入量又不能超过负荷。大鼠肝脏切除后, 在肝脏再生过程中载脂蛋

[收稿日期] 2003-05-26 [修回日期] 2003-08-04

[作者简介] 李国平, 生物化学及分子生物学专业博士研究生, E-mail 为 guoping_li@yahoo.com。陈保生, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管脂蛋白研究, 现任中国生物化学学会脂蛋白专业委员会主任委员, 曾获得 2 项国家科技进步奖, 5 项卫生部和市部级科技成果奖; 本文通讯作者, 联系电话为 010-65296413, E-mail 为 capogene@yahoo.com。

白 A5 大量转录、表达;推测载脂蛋白 A5 在这一过程中的作用可能是调节肝脏脂质的摄入量^[1]。

缺乏载脂蛋白 A5 基因的基因敲除小鼠血浆 TG 浓度是对照组小鼠血浆 TG 浓度的 4 倍;含有人载脂蛋白 A5 的转基因小鼠血浆 TG 浓度比对照组小鼠降低约 66%,而基因敲除小鼠和转基因小鼠血浆中高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 的浓度没有明显变化^[2]。

缺乏载脂蛋白 A5 基因的基因敲除小鼠表现出高 TG 血症症状。为研究载脂蛋白 A5 在 TG 体内代谢当中的作用, Vliet 等^[6]比较了正义载脂蛋白 A5 腺病毒载体与反义腺病毒载体以及 PBS 处理小鼠以后的血浆脂类形态变化。发现正义载脂蛋白 A5 腺病毒载体处理的小鼠载脂蛋白 A5 表达量比反义腺病毒载体和 PBS 处理的小鼠平均表达量要高出 20 倍。载脂蛋白 A5 过量表达小鼠血浆 TG 浓度降低近 70%, 胆固醇浓度也降低了约 40%, 原因是载脂蛋白 A5 过表达以后极大地降低了极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL) 的比例, 从而降低 TG 水平, 也使所有脂蛋白成分中的胆固醇减少, 其中 HDL 中的胆固醇降低幅度最大, 从而使血浆胆固醇的浓度也降低。载脂蛋白 A5 过表达导致小鼠血浆胆固醇浓度降低, 这与 Pennacchio 等^[2]的研究结果不一致, 到底实际情况如何还有待于进一步的研究证实。

3 人载脂蛋白 A5 基因多态性与血浆脂质的关系

到目前为止, 在美国国家生物技术信息中心单核苷酸多态性数据库中, 共收录了载脂蛋白 A5 基因内及附近区域 11 个多态性位点, 其中-1131T> C 和 56C> G 这两个多态性位点最受关注^[7]。近期不同的课题组采用不同的实验设计研究不同种族载脂蛋白 A5 多态性与 TG 的关系时得出的结论相似, 即在绝大多数种族人群中-1131T> C 和 56C> G 多态性的改变都会极大地影响人血浆 TG 的水平, 而对胆固醇的影响不同的课题组得出的结论不同。

Pennacchio 等^[2]选择了一个 501 人血脂正常的健康成年白人群, 研究了载脂蛋白 A5 基因的 1259T> C、476G> A、-1131T> C、-12238T> C 4 个多态性位点, 结果发现前 3 个多态性位点与血浆 TG 以及 VLDL 水平密切相关, 而-12238T> C 位点与之无关。基因型为 1259T/C、476G/A 或者-1131T/C 的杂合个体比 1259T/T、476G/G 或者-1131T/T 同源纯合个体血浆 TG 分别要高出 20%~30%。他们在另外一个实验中^[2], 根据血浆 TG 浓度结合统计学上百分位数区间选取 2 个区段, 161 人的高 TG 人群和 291 人的低 TG 人群, 经比较发现在高 TG 人群中-1131T/C 杂合子个体所占比例为 21.7%, 在低 TG 人群中-1131T/C 杂合子个体所占比例仅为 6.7%。根据性别分类, 在高 TG 男性人群中-1131T/C 杂合子个体所占比例为 29.9%, 在低 TG 人群中-1131T/C 杂合子个体所占比例为 4.2%, 女性个体在高低 TG 人群中没有显著差别。这一实验结果提示-1131T> C 多态性位点显著影响血浆 TG 浓度。

Endo 等^[8]在 552 个日本中学生人人群中发现, -1131T/C 杂合子个体比-1131T/T 同源纯合个体 TG 水平高出 12.7%, -1131C/C 个体比-1131T/T 同源纯合个体 TG 水平高出 31.8%。

在这项研究中, TG 浓度大于 1.48 g/L 的个体定义为高甘油三酯血症, -1131C/C 个体在高甘油三酯血症人群中出现频率为 27.6%, 而在正常个体中为 10.7%。在日本人群中, -1131C/C 基因型频率(11.6%)比白人人群-1131C/C 基因型频率(0.70%)要高得多, 而对应的血浆 TG 的浓度却没有相应的增加, 这说明血浆 TG 的浓度不仅和载脂蛋白 A5 基因多态性有关, 而且和整体的遗传背景以及环境因素也密切相关。同时 HDLC 含量在 3 种基因型中差异显著, -1131T/C 杂合子个体、-1131C/C 纯合个体 HDLC 含量比-1131T/T 纯合个体 HDLC 含量分别低 5.2% 和 6.8%, 这与 Pennacchio^[2] 和 Nabika 等^[9]的研究结果不一致, 这也许是由于白种人和黄种人整体的遗传背景不同引起的, 但也有可能是由于环境因素或者取样大小以及样本本身的差异造成的, -1131T> C 多态性位点是否影响 HDLC 含量仍有待进一步研究证实。

Martin 等^[10]对欧洲大学生的研究发现, 禁食后-1131T/C 杂合子个体 TG 水平要比-1131T/T 纯合子个体高 11% ($P=0.008$); 患病子代个体中载脂蛋白 A5 56C/G 杂合个体 TG 水平要比 56C/C 纯合个体高 21% ($P=0.026$); 这两者的作用是相互独立的, 可以叠加, 若一个体同时携带-1131T/C 和 56C/G, 此时他的 TG 水平比野生型要高 23% ($P<0.005$)。

Aouizerat 等^[11]选择了 3 组血脂异常人群(高脂血症 167 人, 高 α 脂蛋白血症 194 人, 低 α 脂蛋白血症 75 人)和 1 组随机选择人群(191 人)作对照, 研究-1131T> C 多态性位点与血脂的关系; 结果发现在中国人群中稀有碱基携带者(CT+CC)占到 47.1%, 大大高出西班牙人的 23.5% 和欧洲人的 25.3%, 稀有位点携带者显著增加 TG ($P=0.012$)、极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC) ($P=0.0007$)、极低密度脂蛋白甘油三酯(very low density lipoprotein triglyceride, VLDLTG) ($P=0.012$)、低密度脂蛋白甘油三酯($P=0.003$) 和高密度脂蛋白甘油三酯($P=0.016$)。线性回归分析显示, 稀有位点携带者可以增加 TG 210 mg/L ($P=0.009$)、VLDLC 80 mg/L ($P=0.0001$), 减少 HDLC 20 mg/L ($P=0.017$)。这与 Pennacchio 等^[2]的研究结果稀有位点携带者可以增加 VLDL 含量相一致, 但对 HDLC 的影响不同^[2]。

Ribalta 等^[12]研究了 16 个西班牙家族性高脂血症家系(103 人), 同时以西班牙随机人群(408 人)、荷兰人群(89 人)作对照组, 发现在西班牙家族性高脂血症家系中, -1131T/C 多态性位点与 TG 水平密切相关; 然而, 考虑年龄、性别、体重和饮食这些因素, 在西班牙随机人群和荷兰正常人群当中, -1131T/C 多态性位点与 TG 水平之间的关系不显著, 这与前述研究结果有差别^[11]。在 FCHL 家族当中, 稀有碱基携带者大约增加血浆 TG 30% ($P=0.004$)、VLDLTG 61% ($P=0.008$)、中间密度脂蛋白甘油三酯 30% ($P=0.007$); VLDLC、VLDL- LAPOB 也明显增加。这一实验结果提示, 仅仅在发生遗传或代谢改变的基础上载脂蛋白 A5 才能调整 TG 的浓度。

综上所述, 载脂蛋白 A5 基因-1131T> C 多态性位点在不同种族人群中可以不同程度地影响人血浆 TG 的水平, 这一点是毫无疑问的; 而对胆固醇的影响却没有统一的认识, 原因或许是由于遗传背景、实验方法、观察手段、样本特征等

这些因素造成的系统误差引起的。

4 载脂蛋白 A5 基因单倍型与血浆脂质的关系

单倍型是指在一条染色体或者一条 DNA 分子上的基因型,因此单倍型能够体现不同多态性位点之间的相互关系以及作用强度,可以从更高水平上观察基因型对观测指标的影响,得出的数据比仅仅依靠单一多态性位点更可靠。

根据 Pennacchio 分型标准,在载脂蛋白 A5 基因区域内选取 5 个多态性位点,定义了 3 种单倍型^[13]。以前的研究^[2]证实,单倍型 2 在白种人群中约占 16%,此单倍型可以增加 TG 浓度。在 Pennacchio 近期的研究中发现^[13],在 3 个不同的人群中,单倍型 3 作为独立的影响因素也可以影响 TG 的浓度。在 A 组 264 人的白种人群中,对高 TG 人群与低 TG 人群比较发现,单倍型 3 个体比单倍型 1 个体血浆 TG 平均要高出 3 倍;在 B 组 419 人的白种人群中,单倍型 3 不论高脂饮食、低脂饮食或是随机饮食,同样有升高 TG 的作用;在 C 组随机取样的 2 660 人的人群中(包括 1 392 个美国黑人,420 个西班牙人,848 个白种;单倍型 3 在白种中占 12%,在美国黑人中占 14%,在西班牙人中占 28%),不管单倍型 3 所占比例如何,在不同种族、不同性别人群当中均有不同程度的升高 TG 的作用。

在 Talmud 等^[14]的研究工作中,选择了一个 2 808 人的健康中年男性人群,并在 11q23 载脂蛋白 A1/C3/A4/A5 这一基因簇处选择了 9 个多态性位点,实验证实载脂蛋白 A5 和载脂蛋白 C3 之间存在着强烈的连锁不平衡现象,载脂蛋白 A5 56G/G 和 1131C/C 位点携带者与同源纯合常用位点(载脂蛋白 A5 56C/C 和 1131T/T)相比,分别有 52% 和 40% 升高 TG 的作用,这两个位点的作用是相互独立的且可以相互叠加。根据 Talmud 等人的分类标准^[14],在所有的单倍型中,单倍型 1、2、5 人群中的 TG 水平最高,单倍型 20、21、22 人群的 TG 水平最低。最重要的升 TG 的两个位点是载脂蛋白 A5 56G/G 和载脂蛋白 C3-482T/T。

人血浆 TG 的水平是受多个因素共同决定的,遗传因素起了重要的作用,特别是 11q23 载脂蛋白 A1/C3/A4/A5 这一基因簇,其中载脂蛋白 A5-1131T> C、56G> G 和载脂蛋白 C3-482C> T 这 3 个多态性位点又是重中之重,值得认真研究。

5 载脂蛋白 A5 基因的表达调控机制

要研究一个基因的表达调控机制,首先需要确定它的转录起始位点,这样才能确定它的表达调控区。由于 Vliet 等^[1]和 Pennacchio 等^[2]对载脂蛋白 A5 基因含有 3 个还是 4 个外显子的研究结果不一致,所以 Prieur 等^[5]首先需要确定它的转录起始位点。他们^[5]采用 RNA 酶调节的快速扩增 cDNA 末端技术,确定载脂蛋白 A5 基因只有一个转录起始位点,含有 4 个外显子,第 1 个外显子有 12 个非翻译核苷酸,在第 2 个外显子有 57 个或者 81 个核苷酸两种形式,这是由于内部受体位点不同造成的。与早期的研究结果一致的编码区覆盖第 2、第 3、第 4 外显子,第 4 外显子存在两种不同

的 poly A 尾剪切方式^[2]。

Prieur 等^[5]采用 5' 缺失突变分析、点突变分析以及凝胶阻滞实验研究证实,在载脂蛋白 A5 基因转录起始位点上游-103/-84 的位置存在一个法呢酸 X 激活受体反应元件。在胆汁酸的诱导下,法呢酸 X 激活受体 α 和类视黄酸受体 α 结合形成异源二聚体以后结合到一段特异的 DNA 序列上,即法呢酸 X 激活受体反应元件,从而激活载脂蛋白 A5 基因的转录。同时在转录起始位点上游-271/-259 处存在一个过氧化物酶体增殖物激活受体反应元件,过氧化物酶体增殖物激活受体 α 与类视黄酸受体 α 形成二聚体以后结合到过氧化物酶体增殖物激活受体反应元件上,也可以激活载脂蛋白 A5 基因的转录。

Vu-Dac 等^[15]也研究证实载脂蛋白 A5 基因受过氧化物酶体增殖物激活受体 α 调控,同时证实贝特类药物可以诱导载脂蛋白 A5 基因的转录。结合以前的研究结果,载脂蛋白 A5 基因敲除小鼠可以使血浆 TG 升高 400%,载脂蛋白 C3 基因敲除小鼠使甘油三酯降低 30%,转基因实验也同样证明似乎载脂蛋白 A5 对 TG 的影响比载脂蛋白 C3 更强些,因此载脂蛋白 A5 可能是影响血浆 TG 水平主要的决定因素。

6 回顾与展望

生物信息学的发展对载脂蛋白家族的影响是深刻而又广泛的,其中比较基因组学以及功能基因组学对于新基因的发现、功能预测以及表达调控机制起了重要的指导作用。载脂蛋白 A5 的发现是应用生物信息学的一个成功范例,值得引起广大从事脂蛋白及动脉粥样硬化研究工作者的关注。

载脂蛋白 A5 显著影响 TG 的水平,它的调控机制也获得了一些进展,但它的代谢机理还不是十分清楚。载脂蛋白 A5 在脂蛋白代谢中起什么作用?如何通过上下游代谢调控途径影响血浆 TG 水平?究竟谁是它上下游代谢途径的调控靶点?它与胆固醇到底是一个什么样的关系?这些问题目前还没有答案,将会成为今后研究的重点。由于载脂蛋白 A5 基因多态性与血浆 TG 水平关系密切,所以载脂蛋白 A5 基因多态性位点可能成为高甘油三酯血症的临床预警指标,为预防以及治疗心血管疾病提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Van der Vliet HN, Samuels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 44 512-520
- [2] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*, 2001, **294**: 169-173
- [3] 曾武威,陈保生. 载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症的相关性研究. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4**: 185-189
- [4] 曾武威,陈保生. 胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 262-264
- [5] XA-Vier Prieur, Hervé Coste, Joan C Rodríguez. The human apolipoprotein A5 gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- α and α 11ns a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 25 468-480
- [6] Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels

- of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **295**: 1 156-159
- [7] Seda O, Sedova L. New apolipoprotein A-V: comparative genomics meets metabolism. *Physiol Res*, 2003, **52**: 141-146
- [8] Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet*, 2002, **111**: 570-572
- [9] Nabika T, Nasreen S, Kobayashi S, Masuda J. The genetic effect of the apolipoprotein A-V gene on the serum triglyceride level in Japanese. *Atherosclerosis*, 2002, **165**: 201-204
- [10] Martin S, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1637**: 217-225
- [11] Aouizerat BE, Kulkarni M, Heilbron D, Drown D, Raskin S, Pullinger CR, et al. Genetic analysis of a polymorphism in the human apolipoprotein A-V gene: effect on plasma lipids. *J Lipid Res*, 2003, **44**: 1 167-173
- [12] Ribalta J, Figuera L, Fernandez-Ballart J, Vilella E, Castro Cabezas M, Masana L, et al. Newly identified apolipoprotein A-V gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem*, 2002, **48**: 1 597-600
- [13] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**: 3 031-038
- [14] Talmud PJ, Have E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**: 3 039-046
- [15] Vurduc N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, et al. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 17 982-985
- (此文编辑 曾学清, 胡必利)