

载脂蛋白 M 的研究进展

祝成亮^{1,2}, 刘芳¹, 周新²

(1. 武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 湖北省武汉市 430072;

2. 武汉大学中南医院检验科, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 M 的研究; 综述; 高密度脂蛋白; 胆固醇逆转运

[摘要] 载脂蛋白 M 是分子量为 26 kDa 的糖蛋白, 在血浆中, 主要存在于高密度脂蛋白。载脂蛋白 M 是非典型的载脂蛋白, 根据其基本结构, 认为它属于 Lipocalin 家族。Lipocalin 含有一个 β 平行桶状三级结构, 能够运输疏水小分子复合物。载脂蛋白 M 基因的表达具有组织特异性, 仅在肝脏和肾脏表达, 然而它在高密度脂蛋白代谢中的作用尚不清楚, 其功能可能与肝脏高密度脂蛋白的合成和分泌有关, 参与胆固醇逆转运。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

大量流行病学与临床数据表明, 冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是多数发达国家和许多发展中国家成人死亡的主要原因之一^[1], 脂蛋白和载脂蛋白在冠心病的发病机制中起着重要作用^[2]。研究证明, 血液中高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 的水平与冠心病的发生呈负相关^[3]。而 HDLC 在胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 中起着重要作用, 但其在 RCT 中的分子机制却不很清楚。HDL 主要由载脂蛋白 A_{iv} 和载脂蛋白 A₁ 组成, 也包含有其他的载脂蛋白, 如载脂蛋白 A₂、载脂蛋白 C_{iv}、载脂蛋白 C₁、载脂蛋白 C₂、载脂蛋白 E、载脂蛋白 D、载脂蛋白 F、载脂蛋白 H 和载脂蛋白 L 等。

在新的载脂蛋白的研究中, 1999 年 Xu 等^[4]报道鉴定、克隆了一个新的 HDL 特异性载脂蛋白 M。目前国外仅瑞典和日本有三个实验室开展了有关载脂蛋白 M 方面的研究工作, 重点在于蛋白质结构、性质、特征等方面。血浆中载脂蛋白 M 主要存在于 HDL、富含甘油三酯的脂蛋白 (triacylglycerol rich lipoprotein, TGRLP) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。本文就载脂蛋白 M 的结构特点、调节和生理功能等方面作一些综述。

1 载脂蛋白 M 的分子结构

载脂蛋白 M 的 cDNA 在 1999 年被克隆和测序^[4], 其 mRNA 仅存在于肝脏和肾脏。载脂蛋白 M 的氨基酸序列和它的载脂蛋白没有相似性, 因为在血浆中载脂蛋白 M 主要与脂蛋白结合, 因而载脂蛋白 M 符合载脂蛋白的标准。载脂蛋白 M 与 Lipocalin 家族成员间有很大程度的相似性。在小鼠中, 编码载脂蛋白 M 的基因位于 17 号染色体主要组织相容性复合体 (MHC), 在 HLA-B 相关的转录物 BAT3 和 BAT4

之间, 与 TNF 基因相接近, 人类载脂蛋白 M 的基因位于 6 号染色体主要组织相容性复合体 (MHC), 被 BAT3 和 BAT4 所包绕, 其 cDNA 由 734 对碱基组成, 编码 188 个氨基酸, 分子量 26 kDa。在哺乳动物, 载脂蛋白 M 的基因序列比较保守。小鼠和人的载脂蛋白 M 一样, 在 1.6 kb 的基因组区域都含有 6 个外显子和 5 个内含子, 氨基酸序列有 79% 相同 (图 1)。

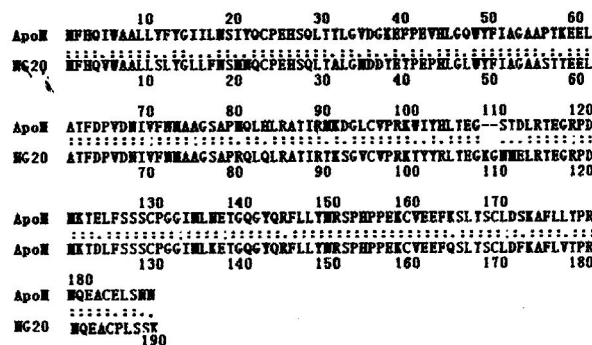


图 1. 人和小鼠载脂蛋白 M 的氨基酸序列比较 图中载脂蛋白 M 为人载脂蛋白 M 的氨基酸序列, NG20 为小鼠载脂蛋白 M 的氨基酸序列。

2 载脂蛋白 M 的蛋白结构

人的载脂蛋白 M 是由 188 个氨基酸组成的糖蛋白, 分子量 26 kDa, 属于 Lipocalin 家族。与众不同的是, 载脂蛋白 M 的前 20 个氨基酸片段组成一个疏水的特征信号肽, 由于没有信号肽酶, 所以疏水信号肽保留于其成熟蛋白质, 可能是在形成一个疏水的 α 螺旋后, 用于与磷脂层的锚着^[4]。Lipocalins 含有共同的蛋白质结构: 一段 8 链反 β 平行桶状结构围绕一个中心空穴, 此空穴通常衬有疏水或芳香族氨基酸残基, 以利于疏水小分子的结合^[5-8]。Lipocalin 具有很多生物学活性如信息素活性、酶活性、细胞和免疫调节等^[9-11]。

载脂蛋白 M 含有 3 个 S-S 二硫键, 在以 8 链反 β 平行桶状结构为特征的 3D 模型中, 含 Asn135 的片段可呈开放或封闭构象 (图 2)。实验证明野生型的载脂蛋白 M Asn135 出现

[收稿日期] 2004-02-16 [修回日期] 2004-09-01

[作者简介] 祝成亮, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的生物化学诊断。通讯作者刘芳, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 liufang@126.com。周新, 教授, 博士研究生导师。

糖基化,表明该片段呈现两个可能有重要功能的强酸片段,一个在N端周围,另一个在 β 桶状结构开口。

试验证明^[12],载脂蛋白M和小鼠的主要尿液蛋白(major urinary protein, MUP)的结构具有相似性,氨基酸的序列有19%是相同的。大多数Lipocalin家族的成员能够结合和转运疏水分子,原因在于Lipocalin家族的折叠结构很保守,有一个特征性的疏水结合盒。载脂蛋白M的N端保留有一个信号肽,载脂蛋白M很可能通过此信号肽锚着在HDL磷脂单层。HDL主要的磷脂是磷脂酰乙醇胺,它是一个暴露于溶剂的带正电的基团^[13]。在载脂蛋白M的模型中有两个很明显的带负电的区域,它们位于N端和结合袋开口处的周围。载脂蛋白M N端带负电的区域和HDL的磷脂酰乙醇胺之间的相互作用可能有很重要的生理功能。而且,在结合袋的开口处带有强的负电荷,这在与假定的配体和膜受体的相互作用中起到重要的作用。结合袋的开口比较大,以容纳135位糖基化的天冬氨酸。衬在结合袋内的主要氨基酸残基有Phe49、Asn68、Met73、Leu82、Tyr102、Thr109、Leu111、Thr113、Met119、Met133、Arg143、Leu145、Tyr147和Val70。载脂蛋白M的这种结构特征将有助于进一步探讨其生理功能。

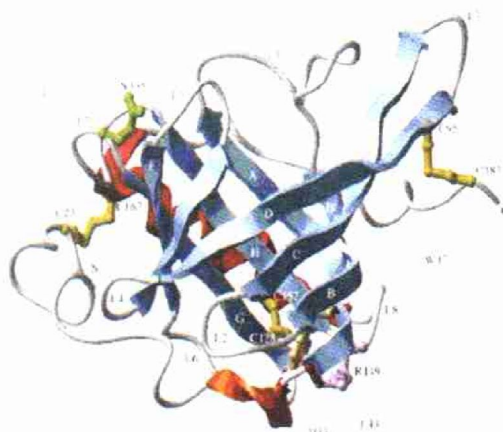


图2. 载脂蛋白M的二级结构 环L1、L2、L3、L5及L7位于结合袋开口处附近,其它环在结合袋的面。其中黄色的为S-S二硫键,圆形的光圈为lipocalin结合空穴。

3 载脂蛋白M的分布

载脂蛋白M基因存在于所有的哺乳动物基因组。Zhang等^[13]研究证明,在人类,载脂蛋白M mRNA表达具有组织特异性,仅在肝脏和肾脏表达,且在成年时期大量表达,而在胚胎时期表达很少;在肾脏,载脂蛋白M主要表达在肾小管内皮细胞,近端肾小管的表达较远端肾小管多。Western blotting证明,在各种脂蛋白中,较TGRLP和LDL而言,HDL含有更多的载脂蛋白M,血浆中仅有极少量的游离载脂蛋白M。与其他载脂蛋白相比较,载脂蛋白M是次要组成^[4]。肝脏中载脂蛋白M的合成可能与HDL的产生有关,但在肾脏载脂蛋白M mRNA的生理学意义却不是很明显。

4 载脂蛋白M的调节

载脂蛋白M的调节包括生理调节和分子调节,生理调

节主要是指高脂饮食对载脂蛋白M水平的影响,在分子调节方面,肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor 1 α , HNF-1 α)和血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)对载脂蛋白M的表达具有较强的调节作用。在生理情况下,饮食后3~4 h,血浆中载脂蛋白M的含量达高峰,5 h后恢复正常;在高脂饮食后,TGRLP中载脂蛋白M的含量升高,表明载脂蛋白M可能参与餐后血脂代谢。高脂饮食是否能够刺激肝脏产生更多的载脂蛋白M尚不清楚。由于小肠不表达载脂蛋白M,饮食后TGRLP中载脂蛋白M的升高可能不参与乳糜微粒(chylomicron, CM)的合成与分泌。在分子水平调节方面,最近Symi Richter等^[14]证明HNF-1 α 有调节载脂蛋白M的作用。HNF-1 α 是转录调节因子,它在胰腺 β 细胞、小肠、肾脏和肝脏基因表达的调控中起到重要的作用。载脂蛋白M的启动子处证明有HNF-1 α 结合位点,HNF-1 α 基因突变可以降低血浆中载脂蛋白M的水平,HNF-1 α 基因敲除的小鼠载脂蛋白M转录水平降低,这些都表明了HNF-1 α 通过和载脂蛋白M启动子结合来直接激活载脂蛋白M的转录,它是载脂蛋白M表达所必需的转录调节因子。

研究表明^[15],载脂蛋白M的在肝细胞合成水平还受到PAF的调节。低浓度的PAF能够刺激HepG2细胞表达载脂蛋白M量的增加,高浓度的PAF促进载脂蛋白M mRNA和载脂蛋白M表达增加,PAF的这种刺激作用受到PAF-R调节,PAF-R是G蛋白耦合受体,PAF-R的活化可以介导信号传输途径^[15,16],利用拮抗剂封闭PAF-R能够抑制PAF的作用。Lexipafant是PAF-R强的拮抗剂,它能够抑制HepG2细胞载脂蛋白M mRNA的转录和载脂蛋白M的分泌。且受到Lexipafant剂量的调节,高剂量有强的抑制作用,低剂量的抑制作用较弱,但对其它的载脂蛋白如载脂蛋白A、载脂蛋白B和载脂蛋白E的水平没有影响。

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素1 α (IL-1 α)对载脂蛋白M的水平调节不起作用,PAF、载脂蛋白M和PAF-R之间的剂量关系也不是很清楚,载脂蛋白M可能参与PAF的代谢系统。PAF及PAF-R的这种调节作用的分子机制有待进一步研究。

5 载脂蛋白M的生理功能

血液中HDL的水平与冠心病的发生呈负相关,其主要机制是HDL在RCT起着重要作用,RCT指HDL从肝外组织将胆固醇转运到肝脏进行代谢。在RCT中HDL通过将动脉内膜细胞中多余的胆固醇动员出来,转运至肝脏、分泌入胆汁中,从而抵抗LDL的致动脉粥样硬化作用。但是到目前为止还不清楚HDL的抗动脉粥样硬化作用中HDL对RCT效率的调节作用。在人类血浆HDL特异性载脂蛋白中,载脂蛋白A iv的含量为1.1~2.2 g/L,载脂蛋白M的含量为0.05~0.15 g/L,载脂蛋白C和载脂蛋白E的含量为0.02~0.1 g/L^[14]。这表明载脂蛋白M是HDL的主要成分之一,可能在RCT中发挥重要作用。有人认为载脂蛋白M与肝脏HDL的合成和分泌有密切的联系,载脂蛋白M和载脂蛋白D一样,在血浆胆固醇的代谢和转运起到特殊的作用。同时载脂蛋

白 M 可以结合疏水性小分子复合物,说明在脂质代谢和转运中可能起有重要作用。人类载脂蛋白 M 的基因位于 6 号染色体主要组织相容性复合体 (MHC) 区,这个区编码的蛋白质主要参与炎症反应。研究表明载脂蛋白 M 有可能参与炎症反应^[15]。

6 研究进展

自 Xu 等人 1999 年报道鉴定、克隆了一个新的 HDL 特异性载脂蛋白 M 以来,对载脂蛋白 M 的研究已经取得了较大进展,这主要体现在对蛋白质和分子的结构,组织表达与分布,分子调节等方面,对于其功能的研究尚未进行。载脂蛋白 M 属于 Lipocalin 家族,但又远离 Lipocalin 家族,其表达具有组织特异性,仅肝脏和肾脏表达,PAF 和 HNF-1 α 对载脂蛋白 M 的表达水平具有较强的调节作用。载脂蛋白 M 是 HDL 的组成成分之一,对于载脂蛋白 M 是否参与 HDL 中的胆固醇逆转运,及其机制究竟如何,与高密度脂蛋白血症以及冠心病等究竟关系如何,尚需进一步的证实。

[参考文献]

- [1] Mahley RW, The J. David Gladstone Institutes. *Mol Med*, 1997, **3**: 569-571
- [2] Mahley RW. Cell and molecular biology of lipoprotein metabolism in atherosclerosis. *Diabetes*, 1981, **30**: 60-65
- [3] Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 2002, **161**: 1-16
- [4] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM). *J Biol Chem*, 1999, **274**: 31 286-290
- [5] Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482**: 9-24
- [6] Akerstrom B, Ljgdberg L, Bergg•rd T, Babiker-Mohamed H, Lohmander S, Rask L. α -(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482**: 1-8
- [7] Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, 1995, **247**: 536-540
- [8] Orengo CA, Michie AD, Jones S, Jones DT, Swindells MB, Thornton JM. CATH-a hierarchic classification of protein domain stuctures. *Structure*, 1997, **5**: 1 093-108
- [9] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 1996, **318**: 1-14
- [10] Flower DR. The lipocalin proteinfamily: a role in cell regulation. *FEBS Lett*, 1994, **354**: 7-11
- [11] Coles M, Diercks T, Muehlenweg B, Bartsch S, Zolzer V, Tschesche H, Kessler H, Kessler H. The solution structure and dynamics of human neutrophil gelatinase associated lipocalin. *J Mol Biol*, 1999, **289**: 139-157
- [12] Duan J, Dahlback B, Villoutreix BO. Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, 2001, **499**: 127-132
- [13] Zhang XY, Dong X, Zheng L, Luo GH, Liu YH, Ekstrom U, et al. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization. *Acta Histochem*, 2003, **105** (1): 67-72
- [14] Symi Richter, David Q Shih, Richter S, Shih DQ, Pearson ER, Wolfrom C, et al. Regulation of apolipoprotein M gene expressed by MODY3 gene hipatocyte nuclear factor 1 α haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. *Diabetes*, 2003, **52** (12): 2 989-995
- [15] Xu N, Zhang XY, Dong X, Ekstrom U, Ye Q, Nilsson-Ehle P. Effects of platelet activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin 1 α on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells. *Biochem biophys Res Commun*, 2002, **292**: 944-950
- [16] Bart De G, Stengel D, Landeloos M, Lox M, Le Gat L, Collen D, et al. Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein associated enzymes, platelet activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apoA-I gene transfer and human apo AI transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: E68-75

(此文编辑 文玉珊)