

载脂蛋白 A iv 的抗动脉粥样硬化功能研究进展

张新波^{1,2} 综述, 王绿娅², 陈保生³ 审校

(1. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院心肺血管疾病研究所动脉粥样硬化研究室, 北京市 100029; 3. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京市 100005)

[关键词] 病理学与病理生理学; 载脂蛋白 A iv; 动脉粥样硬化; 高密度脂蛋白; 重组体; 载脂蛋白 A iv Milano

[摘要] 载脂蛋白 A iv 是高密度脂蛋白的主要蛋白质组分, 其脂质结合型和脂质游离型表现为不同的构象, 在胆固醇代谢过程中发挥重要作用。动物实验及临床试验表明, 载脂蛋白 A iv 及其重组体、模拟肽等类似物都具有显著的抗动脉粥样硬化作用, 具有广阔的临床应用前景。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

高胆固醇血症是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 和冠心病最主要的危险因素之一。大量的流行病学调查表明, 血浆中高密度脂蛋白 (high density lipoproteins, HDL) 的含量与冠状动脉疾病的发生呈负相关^[1], 载脂蛋白 A iv (apolipoprotein A iv, ApoA iv) 在预测 As 性心血管疾病和冠状动脉事件的危险性优于低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇等^[2]。研究证明, HDL 改善冠状动脉疾病的作用与其主要结构成分载脂蛋白 A iv 密切相关。载脂蛋白 A iv 是 HDL 的主要蛋白质成分, 约占其蛋白质含量的 70%, 在将胆固醇由外周组织转运到肝中代谢的胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 过程中发挥关键作用。载脂蛋白 A iv 对胆固醇代谢和 As 等多种病理生理改变的调节作用, 使其结构和功能的研究成为热点。

本文对载脂蛋白 A iv 与脂质结合过程中高级结构的转变及其基因转染、模拟肽和重组体等类似物抗 As 作用的研究进展进行综述, 并提出重组载脂蛋白 A iv, 尤其是重组载脂蛋白 A iM (apoA iv milano, apoA ivM) 可能会成为 As 和冠心病治疗的理想药物, 具有广阔的临床应用前景。

1 载脂蛋白 A iv 的结构及变化

人载脂蛋白 A iv 基因位于第 11 号染色体长臂末端区域内 (11q23-11qter), 由 3 个内含子和 4 个外显子组成, 全长 1863 bp, 可在肝和小肠中表达。载脂蛋白 A iv 基因的初级翻译产物包含 267 个氨基酸残基 (pre pro ApoA iv), 在蛋白加工过程中, 剪切去除 18 个氨基酸残基的信号肽后, 以 249 个氨

基酸残基的原蛋白 (pro ApoA iv) 形式释放到血液中, 进一步加工形成 243 个氨基酸残基的成熟型载脂蛋白 A iv。成熟型载脂蛋白 A iv 最显著的特征是含有 8 个 22 个氨基酸和 2 个 11 个氨基酸组成的串联重复序列, 重复序列之间被脯氨酸隔开。22 个氨基酸组成的重复序列与两性 α 螺旋的形成密切相关。当两性 α 螺旋的亲水性界面与水相发生作用时, 其疏水性界面可以作为蛋白和磷脂作用的场所^[3]。

了解脂质游离型和脂质结合型两种不同状态时载脂蛋白 A iv 的三级结构模型有助于揭示载脂蛋白 A iv 在脂质转运过程中的作用机制。脂质结合型载脂蛋白 A iv 三级结构的研究对象主要是由两个载脂蛋白 A iv 分子与磷脂结合形成的新生盘状 HDL。目前存在两种模型: 带状模型 (belt model) 和栅栏模型 (picket fence model)。在带状模型中, 载脂蛋白 A iv 环绕盘状分子边缘, 其 α 螺旋垂直于磷脂酰基链 (即平行于盘状平面), 两个载脂蛋白 A iv 反向平行排列, 分子间通过盐桥 (salt bridge) 相互作用^[4]; 栅栏模型中, 载脂蛋白 A iv 环绕盘状脂质分子, 其分子内 8 个 α 螺旋反向平行排列, α 螺旋与磷脂酰基链相平行 (即垂直于盘状平面), 两个载脂蛋白 A iv 分子间没有明显的相互作用^[5]。Klon 等^[6] 对载脂蛋白 A ivM 和载脂蛋白 A iParis 盘状 HDL 羧基末端与脂质结合的 200 个氨基酸进行研究, 结果也表明两个载脂蛋白 A iv 突变体单体以反向平行的形式与脂质结合, α 螺旋重复序列的长轴垂直于脂质双分子层从而通过二硫键形成同源二聚体。尽管目前的研究结果更加倾向于带状模型, 而以两者混合形式存在的可能性仍然没有排除。

Borhani 等^[7,8] 观察到截短的脂质游离型载脂蛋白 A iv (去除 N 末端 1~43 氨基酸残基; 载脂蛋白 A iv Δ (1-43)) 的晶体结构呈现由 4 分子蛋白构成的椭圆环样结构。在此椭圆环样结构中, 两个反向平行的载脂蛋白 A iv 分子通过两性 (螺旋疏水面形成二聚体, 两个载脂蛋白 A iv 二聚体再通过相互作用形成 4 螺旋束样非对称椭圆环样结构。单体分子的 α 螺旋反平行排列使分子内 N 端和 C 端螺旋相互邻近。最近, Ajees 等^[9] 发现脂游离型载脂蛋白 A iv 的晶体结构由 N 末端的 4 个螺旋和 C 末端的 2 个螺旋组成 2 个螺旋束。N

[收稿日期] 2006-07-14 [修回日期] 2007-02-12

[基金项目] 国家重点基础研究“973”项目资助 (G2000056902)

[作者简介] 张新波, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化的病理生理学, 联系电话为 010-64456436, E-mail 为 zhangxinbo823@yahoo.com.cn。王绿娅, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的病理生理学, E-mail 为 wangluya@sina.com, 联系电话为 010-64456436。通讯作者陈保生, 教授, 博士生导师, 中国协和医科大学-中国医学科学院基础医学研究所生物化学与分子生物学系 (100005), E-mail 为 carpogene@yahoo.com, 联系电话为 010-65296413。

末端在保持其脂游离构象中发挥重要的作用,这也表明 Borhani 等对去除 N 末端的载脂蛋白 A iv Δ (1-43) 的功能研究可能是不完整的。载脂蛋白 A iv 在由脂游离型构象向脂结合型构象转变的过程中,可能先通过脂质与 4 螺旋束的结合形成一个螺旋发夹样中间体(helical hairpin intermediate),继而转变为带状或栅栏样脂结合型构象。

AFCAPS/TexCAPS(the air force/Texas coronary artery prevent study) 研究表明低 HDL 患者是他汀类药物治疗最大的受益者,并且这种保护效应可能部分来自他汀类药物的升 HDL 作用。近年来,随着基因工程技术的发展,以载脂蛋白 A iv 为主要成分和功能单位的重组 HDL 以及模拟肽相继出现,为升高血浆 HDL 及载脂蛋白 A iv 水平,降低血浆和组织胆固醇含量提供了一种新的有效途径。1980 年,载脂蛋白 A iv 的天然半胱氨酸突变体—载脂蛋白 A ivM 的发现及功能研究为重组 HDL 的临床应用提供了光明的前景。

2 载脂蛋白 A iv 的抗动脉粥样硬化作用

载脂蛋白 A iv 在 RCT 过程中发挥关键作用,主要包括以下几个方面: ①在包括巨噬细胞在内的外周组织中作为游离胆固醇和磷脂的受体,促进 HDL 对外周组织中胆固醇的摄取; ②在脂蛋白表面作为卵磷脂胆固醇酰基转移酶的辅助激活因子,参与胆固醇的酯化; ③在肝脏表面介导 HDL 与 B 族 I 型清道夫受体(scavenger receptor class B type I, SR-BI) 的作用,将 HDL 中胆固醇酯转移到肝脏进行代谢,从而降低胆固醇在外周组织的沉积,具有抗 As 作用。另外,载脂蛋白 A iv 通过其抗炎、抗血栓形成和内皮功能保护等多种作用抑制 As 的发生和发展。

Pastore 等^[10]利用含人载脂蛋白 A iv 基因的依赖于辅助病毒的腺病毒载体转染载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠后发现,小鼠体内过表达的载脂蛋白 A iv 显著抑制 As 的进展。Liu 等^[11]将致 As 的载脂蛋白 a(apolipoprotein(a)),载脂蛋白(a)基因和载脂蛋白 A iv 一起转入小鼠,发现只转染载脂蛋白(a)基因的小鼠易发生 As,而载脂蛋白(a)和载脂蛋白 A iv 基因共转染的小鼠可有效地防止 As 斑块的形成,提示载脂蛋白 A iv 能对抗载脂蛋白(a)的致 As 作用。Belalcazar 等^[12]研究了人载脂蛋白 A iv 基因长期稳定表达对 LDLR^{-/-} 小鼠 As 进展和斑块重塑的影响。84 只 LDLR^{-/-} 小鼠高脂饮食 6 周后,随机处死 10 只作为基线对照,其余随机分为对照组($n=38$)和实验组($n=36$),分别给予尾静脉注射生理盐水和含载脂蛋白 A iv 的 HD-Ad。12 周后,治疗组 As 斑块中脂质、巨噬细胞和血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)减少,平滑肌细胞和胶原增多,As 斑块面积减少 43%; 24 周后,As 面积减少达到 50%。提示载脂蛋白 A iv 的长期稳定表达能够延缓 As 的进展,并使斑块重塑到稳定的表型。

3 载脂蛋白 A iv 模拟肽的抗动脉粥样硬化作用

载脂蛋白 A iv 模拟肽是人工合成的具有载脂蛋白 A iv 类似功能的两亲性螺旋肽类。目前研究最多最透彻的是 D-

4F,它是由能够抵抗哺乳动物胃肠酶降解的 D-氨基酸合成的 18 个氨基酸的肽类。在它的 A 型两亲性螺旋的非极性界面上有 4 个脯氨酸残基,使它具有与载脂蛋白 A iv 类似的脂质结合能力^[13]。

Navab 等^[14]分别利用 D-氨基酸和 L-氨基酸合成载脂蛋白 A iv 模拟肽 D-4F 和 L-4F,结果 D-4F 经口服后在循环中完整存在,而 L-4F 在循环中快速降解并经尿液排出。LDLR^{-/-} 小鼠每天两次口服 D-4F,6 周后其 As 斑块减少 79%,LDL 介导的单核细胞趋化活性明显降低。在载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠饮水中加入 D-4F,5 周后,即使是最低剂量(50 mg/L)也能使斑块减少 75%。Li 等^[15]通过颈动脉移植手术研究口服或腹腔注射 D-4F 对已形成斑块和进展中斑块的影响,结果表明口服或腹腔注射 D-4F 都使进展中斑块面积、斑块内脂质和巨噬细胞含量显著减少,而对已形成斑块却没有明显影响。提示载脂蛋白 A iv 模拟肽可能是通过作用于 As 的早期阶段而发挥抗 As 作用或者给药时间不充分。最近,Navab 等^[15]给予载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠口服两个具有两亲性特性的四肽(KRES 和 FREL),虽然由于太小而不能形成两亲性螺旋,但仍能够增强对氧磷酶的活性、抑制炎症和减轻 As。

4 重组高密度脂蛋白的抗动脉粥样硬化作用

重组高密度脂蛋白(reconstituted high density lipoproteins, rHDL)是由载脂蛋白 A iv 与磷脂形成的类似于新生盘状 HDL 的复合体。Nicholls 等^[16]研究了 rHDL 对颈动脉套环引起的急性促氧化和促炎症反应的影响。结果表明 rHDL 使颈动脉套环产生的活性氧减少 90% 以上,中性粒细胞渗透减少 73%-94%,细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、VCAM-1 和单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)的表达也显著降低。由于炎症反应是 As 发生的最早期事件,因此,抑制炎症反应表明载脂蛋白 A iv 能预防和治疗 As。Nicholls 等^[17]对 rHDL 与阿托伐他汀的抗 As 作用进行比较,结果使 As 斑块面积明显减少的是 rHDL,而不是阿托伐他汀。载脂蛋白 A ivMilano 是载脂蛋白 A iv 的天然突变体,其多肽链中 173 位精氨酸被半胱氨酸取代,从而可通过链间二硫键形成同源二聚体(A ivM/A ivM)或与载脂蛋白 A ①形成异源二聚体。载脂蛋白 A ivM 突变体携带者表现为血浆 HDL 和载脂蛋白 A1 水平低下、中度高甘油三酯血症等冠心病高危表象,然而携带者并不表现冠心病的病理改变。随着对载脂蛋白 A ivM 结构和功能研究的深入,其独特的心血管保护作用及其广阔的临床应用前景使对 rHDL 的研究转向了这一天然突变体。

Shah 等^[18]给予载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠隔天尾静脉注射 40 mg/kg 重组载脂蛋白 A ivM/磷脂复合物,持续 5 周,而对照组仅给予卵磷脂。结果重组载脂蛋白 A ivM 组主动脉粥样硬化没有明显进展,斑块内脂质和巨噬细胞明显减少,而对照组主动脉粥样硬化和脂质含量明显升高。另外,在 3 只注射高剂量(80 mg/kg)载脂蛋白 A ivM/磷脂复合物的动物体内观察到斑块消退现象。随后,Shah 等^[19]向 26 周龄载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠体内单次高剂量(400 mg/kg)灌注射脂蛋白 A ivM/

二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) 复合物, 灌注 1 h 到血浆中出现明显的总胆固醇和游离胆固醇水平升高, 提示单次高剂量治疗可明显促进组织中胆固醇的外迁。另外, 主动脉根部巨噬细胞和斑块内脂质明显减少, 体外实验也显示, 载脂蛋白 A ivM 治疗组的血浆较对照组能更有效的促进 Fu5AH 细胞胆固醇外流。目前, 载脂蛋白 A ivM 的作用机制还未阐明, 分析其抗 As 的作用可能是由于 A ivM/A ivM 在血循环中比单体蛋白半衰期延长^[20], 并且与脂质的结合能力和解离能力的增强, 从而促进了胆固醇的逆转运。同时, 其对 LDL 氧化和炎症的抑制、对外周组织脂过氧化物的清除和对纤维蛋白溶解作用的促进也发挥了一定的影响。

目前, 美国密歇根州的 Esperion 公司研制的新型降血脂注射药物——ETC-216, 即载脂蛋白 A ivM 和磷脂形成的复合物, 已经进入三期临床试验。在一项随机、对照、双盲、多中心的临床试验中^[21], 57 例急性冠状动脉综合征患者随机分为小剂量(15 mg/kg)、大剂量(45 mg/kg) ETC-216 组和安慰剂组。各组患者每周静脉注射 ETC-216 或安慰剂 1 次, 持续 5 周, 血管内超声检测发现 As 斑块总体积减少 4. 2%, 而对照组没有明显改变。提示静脉注射重组载脂蛋白 A ivM 能够显著“逆转”人 As 的发展, 而其程度与实验动物的差异可能是由于人斑块内含有的泡沫细胞、富含胆固醇的碎片等“可移动物质”只有 13%~26%, 而新西兰白兔和小鼠中则达到 90% 的缘故^[22]。

5 展望

动脉粥样硬化(As) 和冠心病是当前严重危害人类生命和健康的主要疾病之一。载脂蛋白 A iv 作为 HDL 的主要蛋白成分, 无论是基因转染还是其模拟肽或重组体都表现出显著的抗 As 功能。基因治疗虽然是一种最理想的方法, 但技术本身还存在载体的安全性、表达的效率等许多问题。载脂蛋白 A iv 模拟肽尽管在动物模型上表现出明显的抗 As 作用, 仍需要关于临床应用有效性和安全性的数据以及作用机制的探讨。大量的动物及临床试验表明重组载脂蛋白 A iv 不仅显著抑制 As 的发生和发展, 而且使已形成的病变得“逆转”, 在人体内也未见明显的副作用^[23], 因此, 重组载脂蛋白 A iv, 尤其是重组载脂蛋白 A ivM 可能会成为 As 和冠心病治疗的理想药物, 具有广阔的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Goldberg U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (1): 107-113.
- [2] 庄一义. 载脂蛋白 A1 和 B 的参考值及临床意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 263-266.
- [3] Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships [J]. *J Lipid Res*, 2000, **41** (6): 853-872.
- [4] Segrest JP, Jones MK, Klon AE, Sheldahl CJ, Hellinger M, De Loof H, et al. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (45): 31 755-758.
- [5] Phillips JC, Wriggers W, Li Z, Jonas A, Schulten K. Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks [J]. *Bio-*

phys J, 1997, **73** (5): 2 337-346.

- [6] Klon AE, Jones MK, Segrest JP, Harvey SC. Molecular belt models for the apolipoprotein A-I paris and milano mutations [J]. *Biophys J*, 2000, **79** (3): 1679-685.
- [7] Borhani DW, Engler JA, Brouillette CG. Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, **55** (9): 1 578-583.
- [8] Borhani DW, Rogers DP, Engler JA, Brouillette CG. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (23): 12 291-296.
- [9] Ajees AA, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain MM, Murthy HM. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its protective effect against cardiovascular diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (7): 2 126-131.
- [10] Pastore L, Belacazar LM, Oka K, Cela R, Lee B, Chan L, et al. Helper-dependent adenoviral vector-mediated long-term expression of human apolipoprotein A-I reduces atherosclerosis in apo E-deficient mice [J]. *Gene*, 2004, **327** (2): 153-160.
- [11] Liu AC, Lawn RM, Verstuyft JG, Rubin EM. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein (a) in transgenic mice [J]. *J Lipid Res*, 1994, **35** (12): 2 263-267.
- [12] Belacazar LM, Merched A, Carr B, Oka K, Chen KH, Pastore L, et al. Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2003, **107** (21): 2 726-732.
- [13] Li X, Chyu KY, Faria Neto JR, Yano J, Nathwani N, Ferreira C, et al. Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circulation*, 2004, **110** (12): 1 701-705.
- [14] Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, et al. Oral administration of an Apo A-I mimetic peptide synthesized from D-Amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol [J]. *Circulation*, 2002, **105** (3): 290-292.
- [15] Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Frank JS, et al. Oral small peptides render HDL antiinflammatory in mice and monkeys and reduce atherosclerosis in ApoE null mice [J]. *Circ Res*, 2005, **97** (6): 524-532.
- [16] Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periaortic collar in normocholesterolemic rabbits [J]. *Circulation*, 2005, **111** (12): 1 543-550.
- [17] Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, Kee P, Rye KA, Bao S, et al. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (11): 2 416-421.
- [18] Shah PK, Nilsson J, Kaul S, Fishbein MC, Ageland H, Hamsten A, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 1998, **97** (8): 780-785.
- [19] Shah PK, Yano J, Reyes O, Chyu KY, Kaul S, Bisgaier CL, et al. High Dose Recombinant Apolipoprotein A-I Milano Mobilizes Tissue Cholesterol and Rapidly Reduces Plaque Lipid and Macrophage Content in Apolipoprotein E-Deficient Mice [J]. *Circulation*, 2001, **103** (25): 3 047-050.
- [20] Roma P, Gregg RE, Meng MS, Ronan R, Zech LA, Franceschini G, et al. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apoA-I Milano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia [J]. *J Clin Invest*, 1993, **91** (4): 1 445-452.
- [21] Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2003, **290** (17): 2 292-300.
- [22] Fazio S, Linton MF. Apolipoprotein AI as therapy for atherosclerosis: does the future of preventive cardiology include weekly injections of the HDL protein [J]? *Mol Interv*, 2003, **3** (8): 436-440.
- [23] Nanjee MN, Crouse JR, King JM, Hovorka R, Rees SE, Carson ER, et al. Effects of intravenous infusion of lipid-free apoA-iv in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (9): 1 203-214. (此文编辑 李玲玲)