

[文章编号] 1007-3949(2007)15-09-0653-04

•实验研究•

树鼠句膜转运蛋白 ATP 结合盒转运体 A1 cDNA 和蛋白质结构分析及其组织表达

周冰, 曾武威, 刘惠荣, 孙国涛, 吴钢, 薛红, 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)

[关键词] 分子生物学; 膜转运蛋白 ATP 结合盒转运体 A1; 蛋白质序列; 组织分布; 高密度脂蛋白; 树鼠句

[摘要] 目的 获得不易感动脉粥样硬化动物树鼠句的膜转运蛋白 ATP 结合盒转运体 A1 的 cDNA 和蛋白质序列, 鉴定其组织分布, 探讨其是否参与树鼠句独特的高密度脂蛋白代谢。方法 以树鼠句肝脏 mRNA 反转录获得的 cDNA 一链为模板, 应用 SMART-RACE 技术, 获得树鼠句 ATP 结合盒转运体 A1 cDNA 序列并推导出其氨基酸序列, 应用实时聚合酶链反应技术分析树鼠句 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 在各组织中的分布情况。结果 获得的树鼠句 ATP 结合盒转运体 A1 cDNA 序列全长为 7 762 bp, 其中开放阅读框架 6 786 bp, 编码 2 261 个氨基酸的蛋白。该蛋白与人类 ATP 结合盒转运体 A1 的长度相同, 二者在氨基酸水平上高度同源 (95%)。多组织表达谱显示树鼠句 ATP 结合盒转运体 A1 在多种组织中广泛表达, 其中表达量最高的依次为肺脏、肝脏、肾脏和脾脏, 这与人和小鼠 ATP 结合盒转运体 A1 在肝中高表达而在肺和脾中低表达的分布有很大差异。结论 树鼠句 ATP 结合盒转运体 A1 组织表达谱的特点有可能增加其在体内的浓度和数量, 从而可能间接增加高密度脂蛋白的合成。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

cDNA Cloning and Tissue Distribution of the Membrane Transporter ABCA1 from Tree Shrew

ZHOU Bing, ZENG Wu-Wei, Liu Hu-Rong, SUN Guo-Tao, WU Gang, XUE Hong, and CHEN Bao-Sheng

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] ATP-Binding Cassette Transporter A1; Protein Sequence; Tissue Distribution; High Density Lipoprotein; Tree Shrew

[ABSTRACT] **Aim** To obtain the nucleotide and amino acid sequences of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) from tree shrew; identify the tissue distribution of ABCA1 in tree shrew. **Methods** The first strand of cDNA was transcribed from mRNA isolated from tree shrew liver. Benefiting from SMART-RACE technique, cDNA clones of tree shrew ABCA1 were obtained and the amino acid sequence was deduced from the sequencing cDNA. The tissue distribution of ABCA1 in tree shrew was identified by Real-Time PCR. **Results** The nucleotide sequence of tree shrew ABCA1 covered 7762 bp, including a 6786 bp coding region which encoded a 2261 amino acids protein. This protein shared the same length as the high identity (95%) with human ABCA1. ABCA1 was expressed in many tissues in tree shrew, the highest in lung, followed by liver, kidney and spleen in turn. This pattern was much different from that in human and mouse, which were high in liver whereas less in lung and spleen. **Conclusion** The feature of tree shrew ABCA1 distributed in tissues may have effects on its concentration and mass, lead to indirectly increase the produce of high density lipoprotein.

血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 具有心血管保护作用, 这个作用是通过参与胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 过程实

现的。ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 是一种整合膜蛋白, 在 RCT 的初始步骤中促进细胞内游离胆固醇外流, 并形成新生 HDL。因此, ATP 结合盒转运体 A1 在 RCT 和 HDL 生成的起始步骤中起关键作用, 调控血浆 HDL 的水平^[1, 2]。

树鼠句被认为是具有特殊脂质代谢机制的不易感动脉粥样硬化动物, 其血浆中高 HDL 水平的特点可能是其不易感动脉粥样硬化的原因之一^[3]。喂饲高脂饮食后, 树鼠句的血浆脂质变化特点提示其体内 HDL 代谢旺盛, 合成增加。树鼠句的特殊 HDL 代谢可

[收稿日期] 2007-04-16 [修回日期] 2007-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金课题 (NSFC 30270558); “973” 项目 (2006CB503801)

[作者简介] 周冰, 博士研究生, 研究方向为脂质代谢及其与心血管疾病关系, 联系电话为 010-65296413。曾武威, 硕士, 助理研究员, 研究方向为脂质代谢及其与心血管疾病关系, 联系电话为 010-65296413, E-mail 为 zengwuwei@ibms.pumc.edu.cn。陈保生, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脂质代谢及其与心血管疾病关系, 联系电话为 010-65296413。

能与其体内 ATP 结合盒转运体 A1 的结构、表达和活性密切相关。本文即对树鼩 ABCA1 的 cDNA 和蛋白质结构及其组织表达谱进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

树鼩购自解放军 302 医院动物中心。Trizol 和 MMLV 逆转录酶 SuperscriptII 为 GIBCO BRL 公司产品; mRNA 纯化试剂盒和 DNA 连接试剂盒为 Promega 公司产品; RACE 试剂盒为 Clontech 公司产品; 引物为上海生工公司合成。

1.2 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 cDNA 的扩增、克隆及序列测定

应用 Trizol 试剂按一步法快速提取树鼩肝组织(约 1.0 g)总 RNA, 经 Oligo(dT) 分离纯化得到 mRNA。以 2 μ g mRNA 为模板, 以改进的 CDS ④为 3' 端引物, 以 SMART ⑤为 5' 端引物, 用 MMLV 逆转录酶 Superscript ⑥200 U 于 42 $^{\circ}$ C 作用 1.5 h, 逆转录得到 cDNA 一链。

特异引物的设计以人 ABCA1 cDNA 序列为主要参照, 在已知种属大鼠、小鼠、鸡等 ABCA1 cDNA 序列的高度保守区内确定合适的位置, 先分别设计出两对扩增树鼩 ABCA1 cDNA 编码区的特异引物以及两对检测引物。再根据扩增片段的测序结果, 结合参考其它种属 ABCA1 cDNA 编码区序列、5'-UTR 序列和 3'-UTR 序列, 分别设计出相应引物, 共 7 对。

将目的片段回收, 与 pGEM-T easy vector 连接, 转化 DH 5 α 感受态细胞, 筛选鉴定阳性克隆, 并进行双脱氧末端中止法自动荧光测序, 测序结果提交 Genbank 进行 Blast 同源性比较。

1.3 cDNA 序列的比较及鉴定

根据重叠原理, 将获得的 7 个片段的序列进行拼接, 最后得到完整的树鼩 ABCA1 cDNA 序列。将姑序列通过 Genbank 数据库进行同源性分析, 以确定是否与人及其它已知种属的 ABCA1 cDNA 有高度同源性。

1.4 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白质结构的分析和比较

应用分子生物学软件 DNAMAN, 从树鼩 ABCA1 cDNA 序列推导出其对应的氨基酸序列, 并对该蛋白的一、二级结构进行分析、预测和比较。

1.5 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的组织分布

以 1.2 中的方法分别提取 3 只树鼩的不同器官和组织来源的总 RNA, 包括心肌、骨骼肌、脂肪组

织、脑、肺、肝脏、胆囊、肾脏、脾、小肠和睾丸。以 β -actin 作为内对照, 应用以 SyBr-Green 为荧光物质的 Real-Time PCR 技术, 分别检测 ABCA1 mRNA 在 3 只树鼩中的不同组织器官中的相对表达量(用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算靶器官的相对表达量)。应用 Microsoft Excel 计算均数和标准差。

2 结果

2.1 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 cDNA 序列及分析

应用 RT-PCR 和 SMART-RACE 方法共扩增获得 7 个从 1.0 kb 到 1.6 kb 不等的 DNA 片段, 包含了树鼩 ABCA1 cDNA 的编码区和 3' 端非编码区。这 7 个片段均经过测序并与 Genbank 数据库比较, 证实为一个新的 ABCA1 cDNA 序列。

根据重叠原理, 将获得的经测序证实的 7 个树鼩 ABCA1 cDNA 片段的序列进行拼接, 图 1 为树鼩 ABCA1 cDNA 分段克隆及拼接的策略及结果示意图。获得的树鼩 ABCA1 cDNA 完整序列(GenBank accession number EF567110)全长为 7 762 bp, 其中开放阅读框架 6 786 bp, 3' 端非翻译区 1 080 bp, 未获得 5' 端非翻译区。各种属 ABCA1 cDNA 的 3' 非编码区长度差异很大, 树鼩 ABCA1 与小鼠 ABCA1 相近, 但比人 ABCA1 短近 2 kb, 却比鸡 ABCA1 的几十 bp 长得多, 这也反映了真核生物基因 cDNA 序列中, 3' 非编码区的种属变异最大。

2.2 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白质序列的分析和比较

树鼩 ABCA1 cDNA 序列中出现的第一个 ATG 的-3 位由于未得到序列无法确定, 但其+4 位的碱基为 G, 符合 Kozak 序列, 满足真核基因转录起始的要求, 可以作为有效起始密码子。此外, 与其它种属 ABCA1 序列的比较也证实了这个起始密码子的正确性。

树鼩 ABCA1 cDNA 的开放阅读框架编码 2 261 个氨基酸残基的蛋白, 与人、牛、小鼠和大鼠的 ABCA1 蛋白含有相同数量的氨基酸, 而比鸡 ABCA1 蛋白多一个氨基酸。通过 DNAMAN 软件的预测, 树鼩 ABCA1 蛋白的分子量约为 254 kDa, 等电点为 6.38, 偏酸性。该蛋白的亲疏水性区域分布与人 ABCA1 相似, 这与它们具有相近的氨基酸组成相一致。应用 Structure Prediction and Analysis 软件分析所得到的树鼩 ABCA1 二级结构也与 ABCA1 的结构很接近, 其各种构象的比例为: Helical 占 44.05%, Extended sheet 占 13.22%, Loop 占 42.72%。应用 Pro-

gram Pestfind 对树鼩和人 ABCA1 蛋白中的 PEST 序列进行评分, 结果发现前者为 + 16.42, 小于后者的 + 17.66。

氨基酸的同源性分析结果表明, ABCA1 的氨基

酸序列在种属间高度保守: 树鼩 ABCA1 与人、牛、小鼠、大鼠和鸡 ABCA1 的同源性分别为 95%、93%、93%、91% 和 84%。

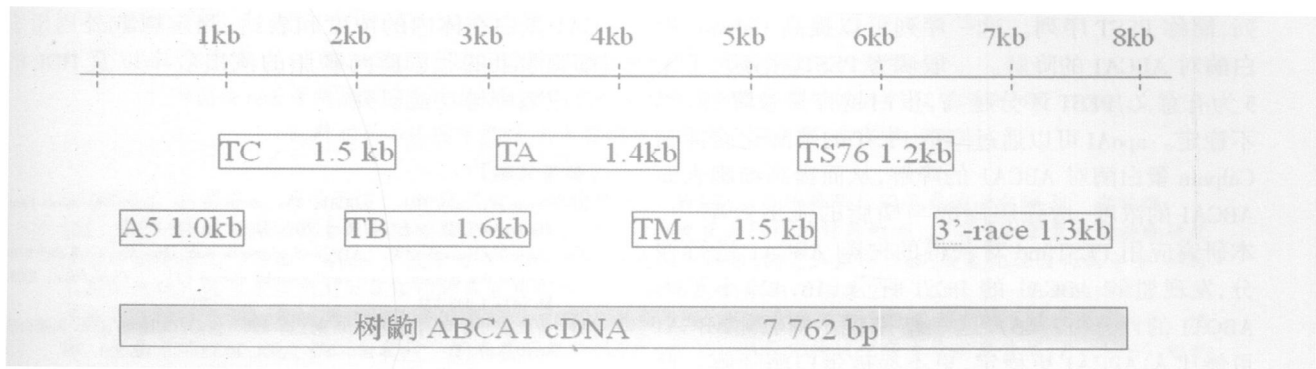


图 1. 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 分段克隆策略及拼接原理示意图

2.3 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的组织分布

分别对 3 只树鼩的 11 种组织进行 Real-Time PCR, 以分析 ABCA1 mRNA 在树鼩各组织中的表达 (表 1)。树鼩 ABCA1 mRNA 在多种组织中广泛表达, 其中表达量最高的两种组织是肺脏和肝脏, 其次是肾脏和脾脏以中高水平表达, 中等水平表达的组织包括心肌和胆囊, 低水平表达的组织有脂肪、睾丸和脑, 而在小肠中只有极低水平表达。树鼩 ABCA1 mRNA 在肌肉中几乎检测不到。树鼩 ABCA1 mRNA 的这个组织表达谱与已知种属人及小鼠 ABCA1 的组织表达谱^[4,5] 既有一定的一致性又有很大的差异: 一致性在于人和小鼠 ABCA1 也在肝脏中高表达, 而差异在于人和小鼠的肺脏和脾脏只表达少量的 ABCA1, 树鼩却在这两种组织中大量表达 ABCA1。

表 1. 树鼩 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的组织分布

树鼩的组织	ABCA1 mRNA 的相对表达量
肺脏	0.642 ± 0.973
肝脏	0.529 ± 0.093
肾脏	0.347 ± 0.405
脾脏	0.341 ± 0.403
心肌	0.218 ± 0.251
胆囊	0.198 ± 0.141
脂肪组织	0.123 ± 0.120
睾丸	0.108 ± 0.104
大脑	0.076 ± 0.043
小肠	0.018 ± 0.015
骨骼肌	0.001 ± 0.001

3 讨论

ATP 结合盒转运体 (ABCA1) 是最大的膜转运蛋白超家族 ABC 中的一个成员, 它以 ATP 为能源, 促进肝外组织细胞内的游离胆固醇和磷脂的流出。被转运出的游离胆固醇和磷脂与 apoAI 相结合, 从而形成新生的 HDL, 因此 ABCA1 在胆固醇逆转运 (RCT) 和 HDL 生成的起始步骤中起非常重要的作用, 被称为 RCT 的守门人^[1,2]。1999 年发现 ABCA1 基因突变造成严重的 HDL 缺陷, 导致 Tangier Disease, 患者血浆 HDL 和 apoAI 浓度极低, 胆固醇酯大量沉积在外周组织细胞内^[6]。ABCA1 基因缺陷的小鼠产生类似于 Tangier Disease 的症状^[7,8]。

树鼩的血浆总胆固醇水平接近于人, 但 HDL 含量很高。喂饲高脂高胆固醇饮食后, 其血浆总胆固醇浓度虽然升高, 但高密度胆固醇/低密度胆固醇升高, 病理检查没有明显动脉粥样硬化斑块形成。因此树鼩被认为是具有独特脂代谢的不易感动脉粥样硬化动物^[3]。目前对其不易感机制尚不十分了解。喂饲高脂饮食后树鼩的血浆脂质变化特点提示其体内 HDL 代谢旺盛, 合成增加。由于 ABCA1 在 RCT 和 HDL 代谢中的重要作用, 本研究推测树鼩 ABCA1 是否具有某些特点而与其体内特殊的 HDL 代谢有关。

本研究获得了树鼩 ABCA1 的 cDNA 序列, 推译出相应的氨基酸序列并进行了分析比较, 同时鉴定了其组织表达谱。研究结果发现树鼩 ABCA1 蛋白与人 ABCA1 蛋白同源性很高, 氨基酸序列的长度和组成都非常相似。除此保守性外, 树鼩 ABCA1 与人 ABCA1 蛋白的 PEST 序列评分不同, 二者在组织分

布上更显示出很大的差异。

Wang 等^[9, 10]发现,在 ABCA1 的胞浆区存在一个富含脯氨酸(Proline, P)、谷氨酸(Glutamic acid, E)、丝氨酸(Serine, S)和苏氨酸(Threonine, T)的序列,简称 PEST 序列。这一序列可以提高 Calpain 蛋白酶对 ABCA1 的降解。一般认为 PEST 评分大于+5 为有意义,PEST 评分越高,蛋白越容易被降解,越不稳定。apoAI 可以通过降低 PEST 的磷酸化而抑制 Calpain 蛋白酶对 ABCA1 的降解,从而提高细胞表面 ABCA1 的浓度,增强胆固醇与磷脂的流出效率^[11]。本研究应用 PESTfind 对获得的树鼩 ABCA1 进行评分,发现树鼩 ABCA1 的 PEST 评分(16.42)小于人 ABCA1 的评分(17.66),这一结果提示:树鼩 ABCA1 可能比人 ABCA1 更稳定,更不易被蛋白酶降解。此外,树鼩的血浆 apoAI 水平高于人,其对 PEST 磷酸化的抑制作用可能也强于人。以上两方面的因素可能使树鼩 ABCA1 蛋白相对稳定,在细胞膜上的浓度较高,从而可能促进更多的细胞内胆固醇与磷脂的流出,增加 HDL 的生成,最终表现为树鼩血浆高水平的 HDL 以及显著的抗动脉粥样硬化能力。

本研究分别鉴定了 3 只树鼩 11 种组织的 ABCA1 mRNA 表达水平。结果显示,树鼩 ABCA1 mRNA 在肝脏中高表达,这一点与已知种属人及小鼠 ABCA1 一样^[4, 5];而差异在于:人和小鼠的肺脏和脾脏只表达少量的 ABCA1,树鼩却在这两种组织中大量表达 ABCA1。这就意味着,树鼩体内 ABCA1 的合成可能比人和小鼠中的旺盛,从而可能使树鼩外周组织的细胞膜上分布有更多的 ABCA1 分子,以保持较高的转运胆固醇与磷脂的效率,最终有可能达到如前所述的效应,也就是增加了 HDL 的合成,体现为树鼩血浆高 HDL 的独特脂代谢特点。

因此,根据本研究结果推测,树鼩 ABCA1 有可能通过较高的表达效率和较高的蛋白稳定性两方面来增加 HDL 的合成,使血浆 HDL 浓度升高,这也可

能是 ABCA1 参与树鼩不易感动脉粥样硬化的分子机制之一。虽然由于树鼩 ABCA1 分子非常大,增加了对其功能研究的难度,但要明确树鼩 ABCA1 与其独特 HDL 代谢的关系,还需要进一步鉴定树鼩 ABCA1 蛋白在体内的浓度和表达、测定树鼩外周组织细胞膜上的胆固醇与磷脂的流出效率以及 HDL 的合成效率等功能研究。

[参考文献]

- [1] Oram JF, Lawn RM. ABCA1, The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol [J]. *J Lipid Res*, 2001, **42** (8): 1 173-179.
- [2] Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease [J]. *Physiol Rev*, 2005, **85** (4): 1 343-372.
- [3] 曾武威, 张坚, 陈保生, 吴钢, 薛红. 树鼩 CETP 的 cDNA 和蛋白质结构分析 [J]. *中华医学杂志*, 2001, **81** (21): 1 316-320.
- [4] Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABCI): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **257** (1): 29-33.
- [5] Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R, et al. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation [J]. *Lab Invest*, 2002, **82** (3): 273-283.
- [6] Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency [J]. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 336-345.
- [7] McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (8): 4 245-250.
- [8] Ragozin S, Niemeier A, Laatsch A, Loeffler B, Merkel M, Beisiegel U, et al. Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (7): 1 433-438.
- [9] Wang N, Chen W, Linse-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, et al. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I [J]. *J Clin Invest*, 2003, **111** (1): 99-107.
- [10] Chen W, Wang N, Tall AR. A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (32): 29 277-281.
- [11] Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Wang N, Chen W, Tall AR. Phosphorylation of a PEST sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (39): 37 368-374.

(此文编辑 李小玲)