

ATP 结合盒转运体 A1 介导细胞胆固醇流出及新生盘状高密度脂蛋白形成机制研究进展

吴 满 平

(复旦大学药学院, 上海市 200032)

[关键词] 生物化学; ATP 结合盒转运体 A1; 细胞胆固醇流出; 新生高密度脂蛋白; 载脂蛋白 AI 细胞结合部位

[摘 要] ATP 结合盒转运体 A1 介导细胞胆固醇流出, 在新生高密度脂蛋白形成中起重要作用, 具有抗动脉粥样硬化功能已被普遍接受, 但其机制尚未很好阐明。近来研究显示 ABCA1 活性可使细胞表面产生两种高亲和力载脂蛋白 AI 结合部位: 载脂蛋白 AI/ABCA1 直接相互作用的低容量结合部位和载脂蛋白 AI/脂质相互作用的高容量结合部位。一个关于 ABCA1 介导细胞胆固醇流出到载脂蛋白 AI 及新生高密度脂蛋白形成机制的三步学说已提出。第一步: 载脂蛋白 AI 与 ABCA1 结合引起细胞膜磷脂转位, 导致膜磷脂不对称分布。第二步: 膜磷脂不对称分布产生膜张力, 导致突出膜外囊泡突起状载脂蛋白 AI 高容量结合部位形成。第三步: 载脂蛋白 AI 与高容量结合部位脂质结合, 导致高容量结合部位脂质自发溶解和载脂蛋白 AI 脂质化, 形成新生高密度脂蛋白。此步反应是整个过程的限速步骤。细胞内也存在载脂蛋白 AI 脂质化部位, 这一过程也是由 ABCA1 介导的。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette A1, ABCA1)是胆固醇逆向转运的一个关键成分, 介导细胞胆固醇流出, 防止泡沫细胞形成, 具有抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)功能^[1]。ABCA1 也是新生盘状高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)形成的一个关键因素^[2]。肝脏和小肠 ABCA1 产生几乎所有循环 HDL^[3,4]。肝脏和小肠合成载脂蛋白 AI 以无脂质载脂蛋白 AI 单体形式分泌(SR 2.6 nm), 与细胞表面 ABCA1 相互作用后经历构象改变, 转变为较疏松折叠构象(SR 3.6 nm), 才获得结合磷脂的能力^[5]。ABCA1 敲除小鼠不含 HDL, 并对 As 敏感^[6]。选择性敲除巨噬细胞 ABCA1, 尽管对血浆 HDL 浓度影响有限, 但也促进 As 形成^[1]。ABCA1 过表达导致血浆 HDL 升高, 具有抗 As 功能^[7]。Tangier 患者血浆缺乏 HDL, 胆固醇逆向转运受阻, 增加 As 危险性是由于 ABCA1 基因突变^[8,9]。人 ABCA1 基因变异是低 α 脂蛋白血症的主要原因^[10,11]。

关于 ABCA1 与载脂蛋白 AI 相互作用, 介导细胞胆固醇流出及形成新生 HDL 的机制是目前关注的热点。大量报道^[12-16]提出此过程涉及三个过程: 载脂蛋白 AI 与 ABCA1 直接相互作用或间接与 ABCA1 活性形成的脂质部位结合。④膜磷脂和胆固醇流出到载脂蛋白 AI。⑤新生 HDL 在细胞表面或细胞内组装。后来一种二步模式机制被提出^[17-20]: 载脂蛋白 AI/ABCA1 复合物形成和随后载脂蛋白 AI 脂质化, 以及形成的载脂蛋白 AI/脂质复合物的解离。最近, ABCA1/载脂蛋白 AI 相互作用取得了重要进展^[21-24]。Vedhachalam 等^[21]在其他实验室取得研究成果基础上, 结合自己研究的

最新成果, 提出了 ABCA1/载脂蛋白 AI 相互作用介导细胞胆固醇流出及新生 HDL 形成的三步反应机制最新模式。此模式能较好解释先前研究成果。

1 载脂蛋白 AI 与 ATP 盒转运体 A1 结合

载脂蛋白 AI 与膜 ABCA1 结合是 ABCA1/载脂蛋白 AI 相互作用的第一步。ABCA1 分子中“490~710”和“1345~1466”片断是载脂蛋白 AI 结合部位^[25]。它们分别位于 ABCA1 分子细胞膜外最大的第 1 和第 4 个环状结构^[22]。其中第 1 个环状结构是结合载脂蛋白 AI, 介导细胞胆固醇流出所需要的, 而第 4 个环状结构结合载脂蛋白 AI 后对稳定 ABCA1 起重要作用^[22]。第 4 个环状结构紧接着 ABCA1 分子中 PEST 区域(“1283~1306”片断)。此区域参与 ABCA1 的细胞内吞和分解, 这是一个钙蛋白酶介导的过程^[26]。PEST 区域删除抑制 ABCA1 的内吞和分解^[26]。也有报道载脂蛋白 AI 结合通过 Jans 激酶 2 介导的信号通路以及磷酸化修饰抑制 Caspases 引起的 ABCA1 分解, 从而增加 ABCA1 稳定性^[27,28]。交联实验结果显示载脂蛋白 AI 与 ABCA1 间距离 < 7Å, 也支持细胞表面 ABCA1 分子中载脂蛋白 AI 直接结合部位的存在^[17,18,23]。ABCA1 分子中载脂蛋白 AI 直接结合部位特性是低结合容量^[24], 结合后产生环腺苷酸(cAMP), 通过 PKA 依赖通路使 ABCA1 磷酸化, 从而调节 ABCA1 活性^[29]。ABCA1 活性形式是寡聚体^[30,31]。

活性 ABCA1 的磷脂转位活性导致膜对称磷脂双层结构发生变化: 胞浆内侧层磷脂向胞浆外侧层转移、浓集。这种磷脂的不对称分布导致膜张力增加, 使突出膜外侧囊泡突起形成, 以释放膜张力^[21]。Wang 等^[32]也观察到在表达 ABCA1 细胞表面存在细胞膜突起。Lin 等^[33]在载脂蛋白 AI 结合的

[收稿日期] 2007-10-29

[修回日期] 2008-03-15

[作者简介] 吴满平, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高密度脂蛋白代谢、动脉粥样硬化和载脂蛋白 AI 功能研究, 联系电话为 021-54237291, E-mail 为 mpwu@shmu.edu.cn。

成纤维细胞和 THP1 巨噬细胞表面发现有 10~60 nm 的蘑菇样突起。此突出膜外的囊泡区域是细胞表面另一种载脂蛋白 AI 结合部位。它的特性是高容量结合载脂蛋白 AI。其最大结合载脂蛋白 AI 容量是 ABCA1 结合量的 10 倍, 因此称之为高容量结合部位^[21, 24]。高容量结合部位是由 ABCA1 磷脂转位活性诱导形成, 但又区别于 ABCA1 结合部位。ABCA1 过表达 BHK 细胞促进高容量结合部位形成。Glyburide(一种 ABCA1 活性抑制剂)及 ABCA1 变异成纤维细胞(Q597R)抑制载脂蛋白 AI 结合到 HCBS^[24]。这些实验结果也支持活性 ABCA1 是 HCBS 形成所需要的观点。

2 载脂蛋白 AI 结合到高容量结合部位

与载脂蛋白 AI/ABCA1 直接结合(蛋白-蛋白相互作用)不同, 载脂蛋白 AI/高容量结合部位结合是蛋白-脂质相互作用。脂筏是细胞膜上一个富含脂质的特殊的功能区域, 一些受体位于此区域, 该区域脂质成分特征是富含鞘磷脂^[34]。高容量结合部位是细胞膜上另一种类型的富含脂质的功能区域, 与脂筏区域不同, 它的脂质成分特征是富含卵磷脂^[24]。膜脂筏区域专有的 Caveolase 在 HDL3 或血浆介导的细胞胆固醇转运和脂质流出中起重要作用^[35]。卵磷脂专一的磷脂酶 C 处理细胞, 由于选择性扰乱了高容量结合部位的结构, 从而抑制了载脂蛋白 AI 与细胞膜结合、载脂蛋白 AI/ABCA1 介导的细胞胆固醇流出和新生 HDL 形成, 但不影响 HDL3 介导的细胞胆固醇流出。鞘磷脂酶处理细胞, 由于选择性扰乱了膜脂筏的结构, 从而抑制 HDL3 介导的细胞胆固醇流出, 但不影响载脂蛋白 AI/ABCA1 介导的细胞胆固醇流出^[24]。

3 载脂蛋白 AI 溶解高容量结合部位脂质, 形成新生盘状高密度脂蛋白

载脂蛋白 AI 螺旋结构插入 HCBS 磷脂层, 导致膜脂质自发溶解, 产生新生盘状 HDL 颗粒。此颗粒含有 2、3 或 4 分子载脂蛋白 AI、磷脂和胆固醇^[21, 36]。这一步是 ABCA1 介导细胞胆固醇流出全过程中的限速步骤^[21]。载脂蛋白 AI 分子中疏水性 C 末端 α 螺旋结构起关键作用^[37, 38]。载脂蛋白 AI C 末端 α 螺旋结构删除抑制其结合高容量结合部位能力, 不能有效溶解膜脂质以形成新生 HDL^[21, 23]。产生的新生 HDL 颗粒异质性可能与不同细胞膜环境中高容量结合部位溶解结果有关^[36]。研究显示 ABCA1 与载脂蛋白 AI 结合及细胞脂质流出这两功能可能是分离的^[21, 22]。

在利用 220H/9CRA 刺激成纤维细胞和过表达 ABCA1 的幼仓鼠肾细胞(baby hamster kidney cell, BHK)细胞试验中发现大部分载脂蛋白 AI 是非 ABCA1 结合的。载脂蛋白 AI/ABCA1 复合物经历一个结合-解离的过程, 使游离出来 ABCA1 结合部位可被再利用, 已达到通过同一个 ABCA1 寡聚体使许多载脂蛋白 AI 分子脂质化, 大大提高载脂蛋白 AI 脂质化效率^[20, 24, 39]。

最近研究又显示除了膜 HCBS 区域是载脂蛋白 AI 脂质

化部位外, 在细胞内也可发现载脂蛋白 AI 脂质化。载脂蛋白 AI/ABCA1 复合物可以细胞内吞, 在细胞内发生载脂蛋白 AI 脂质化, 作为逆向胞饮过程的一部分^[40, 41]。研究发现细胞结合载脂蛋白 AI 中 2/3 是膜结合(以高容量结合部位为主), 而剩余 1/3 是与细胞内区域(Intracellular compartments, ICCs)结合。ABCA1 变异(A597R)抑制了载脂蛋白 AI 与此两部分结合, 进一步证实 ABCA1 参与载脂蛋白 AI 与膜和 ICCs 结合。卵磷脂专一的磷脂酶 C 处理可显著抑制载脂蛋白 AI 与膜结合, 但不影响与 ICCs 结合^[24]。Chen 等^[42]研究显示删除 PEST 区域导致 ABCA1 内吞降低及胆固醇从内体胆固醇池流出减少。Cavelier 等^[43]结果进一步证实 ABCA1 调节载脂蛋白 AI 转入内皮细胞内。这些结果都表明载脂蛋白 AI 细胞内脂质化途径的存在以及 ABCA1 内吞在介导载脂蛋白 AI 细胞内脂质化中的作用。

[参考文献]

- [1] Van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, et al. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (9): 6 298-303.
- [2] Mott S, Yu L, Marcil M, et al. Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: role of the ABCA1 gene mutations [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **152** (2): 457-468.
- [3] Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I [J]. *J Clin Invest*, 2005, **115** (5): 1 333-342.
- [4] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2006, **116** (4): 1 052-062.
- [5] Chau P, Nakamura Y, Fielding CJ, et al. Mechanism of prebeta-HDL formation and activation [J]. *Biochemistry*, 2006, **45** (12): 3 981-987.
- [6] Aiello RJ, Brees D, Francone OL. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (6): 972-980.
- [7] Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, et al. Study of ABCA1 function in transgenic mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (6): 965-971.
- [8] Oram JF. Tangier disease and ABCA1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1 529** (1-3): 321-330.
- [9] Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62** (19-20): 2 150-160.
- [10] Marcil M, Bissonnette R, Vincent J, et al. Cellular phospholipid and cholesterol efflux in high-density lipoprotein deficiency [J]. *Circulation*, 2003, **107** (10): 1 366-371.
- [11] Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, et al. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (8): 1 322-332.
- [12] Yokoyama S. Assembly of high-density lipoprotein [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (1): 20-27.
- [13] Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, et al. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2006, **17** (3): 247-257.
- [14] 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.
- [15] Wang N, Tall AR. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (7): 1 178-184.
- [16] Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel C, et al. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 712-719.
- [17] Chroni A, Liu T, Fitzgerald ML, et al. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and AB-

- CA1 [J]. *Biochemistry*, 2004, **43** (7): 2 126-139.
- [18] Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, et al. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux [J]. *J Lipid Res*, 2004, **45** (2): 287-294.
- [19] Vedhachalam C, Liu L, Nickel M, et al. Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (48): 49 931-939.
- [20] Krimbou L, Marcil M, Genest J. New insights into the biogenesis of human high density lipoproteins [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2006, **17** (3): 258-267.
- [21] Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, et al. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282** (34): 25 123-130.
- [22] Mukhamedova N, Fu Y, Bukrinsky M, et al. The role of different regions of ATP-binding cassette transporter A1 in cholesterol efflux [J]. *Biochemistry*, 2007, **46** (33): 9 388-398.
- [23] Vedhachalam C, Ghering AB, Davidson WS, et al. ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (7): 1 603-609.
- [24] Hajj Hassan H, Denis M, Donna Lee DY, et al. Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: Implications for current models of HDL biogenesis [J]. *J Lipid Res*, 2007, **48** (11): 2428-42.
- [25] Rigot V, Hamon Y, Chambenoit O, et al. Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids [J]. *J Lipid Res*, 2002, **43** (12): 2 077-086.
- [26] Wang N, Chen W, Linse-Nitschke P, 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.
- [27] Tang C, Vaughan AM, Anantharamaiah GM, et al. Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1 [J]. *J Lipid Res*, 2006, **47** (1): 107-114.
- [28] Yamauchi Y, Hayashi M, Aber-Dohmae S, et al. Apolipoprotein A-I activates protein kinase C α signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (48): 47 890-897.
- [29] Haidar B, Denis M, Marcil M, et al. Apolipoprotein A-I activates cellular cAMP signaling through the ABCA1 transporter [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (11): 9 963-969.
- [30] Denis M, Haidar B, Marcil M, et al. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (40): 41 529-536.
- [31] Trompier D, Alibert M, Davanture S, et al. Transition from dimers to higher oligomeric forms occurs during the ATPase cycle of the ABCA1 transporter [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281** (29): 20 283-290.
- [32] Wang N, Silver DL, Costet P, et al. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABCA1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (42): 33 053-058.
- [33] Lin G, Oram JF. Apolipoprotein binding to protruding membrane domains during removal of excess cellular cholesterol [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **149** (2): 359-370.
- [34] Landry YD, Denis M, Nandi S, et al. ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281** (47): 36 091-101.
- [35] Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, et al. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 29 427-435.
- [36] Duong PT, Collins HL, Nickel M, et al. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I [J]. *J Lipid Res*, 2006, **47** (4): 832-843.
- [37] Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins [J]. *Prog Lipid Res*, 2004, **43** (4): 350-380.
- [38] Tanaka M, Dhanasekaran P, Nguyen D, et al. Contributions of the N- and C-terminal helical segments to the lipid-free structure and lipid interaction of apolipoprotein A-I [J]. *Biochemistry*, 2006, **45** (34): 10 351-358.
- [39] O'Connell BJ, Denis M, Genest J. Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells [J]. *Circulation*, 2004, **110** (18): 2 881-888.
- [40] Neufeld EB, Stonik JA, Demosky SJ Jr, et al. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (15): 15 571-578.
- [41] Le Goff W, Peng DQ, Settle M, et al. Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (11): 2 155-161.
- [42] 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.
- [43] Cavelier C, Rohrer L, von Eckardstein A. ATP-Binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2006, **99** (10): 1 060-066.

(此文编辑 李玲玲)