

载脂蛋白 M 的研究进展

张 艳, 董金瑜 综述, 江 渝 审校

(第三军医大学基础部生物化学教研室, 重庆市 400038)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 M; 高密度脂蛋白; 脂代谢; 动脉粥样硬化; 胆固醇逆向转运

[摘要] 载脂蛋白 M, 是一种新近发现的载脂蛋白, 该蛋白属于 Lipocalin 超家族成员, 它含有一个特征性的疏水结合盒, 成熟的载脂蛋白 M 保留了具有“疏水锚”作用的信号肽, 有研究发现载脂蛋白 M 很可能通过此信号肽锚着在高密度脂蛋白磷脂单层中, 并且在高密度脂蛋白中含量极为丰富。研究结果表明载脂蛋白 M 可通过影响胆固醇的逆向转运过程参与高密度脂蛋白的代谢过程, 进而发挥重要的调节功能。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

载脂蛋白是脂蛋白的组成成分, 生理功能是构成并稳定脂蛋白的结构, 参与脂蛋白与其受体的结合及代谢过程。迄今发现的载脂蛋白已有 20 余种, 它们通过不同的途径调节体内的脂质代谢。载脂蛋白 M (apolipoprotein M, apoM) 是 1999 年新发现的一种具有特殊结构并在高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 代谢及抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 中发挥重要作用的载脂蛋白^[1]。

1 载脂蛋白 M 的结构

人类 apoM 分子量为 24 kDa, 由 188 个氨基酸组成。Xu 等^[2]研究显示, 人类 apoM cDNA (734 个碱基对) 编码一种含 188 个氨基酸残基的蛋白质, 分子模型显示 apoM 属于 Lipocalin 超家族^[2]。apoM 的三维结构是以小鼠的尿主要蛋白 (major urinary protein, MUP) 及人维生素 A 结合蛋白 (retinol binding protein RBP) (Lipocalin 家族的两个成员) 为原始模板构建的。Duan 等^[3]研究发现, apoM 在空间结构上特征性地表现为 8 股反向 β 折叠片段, 有一个潜在的糖基化位点, 位于 135 天冬氨酸 (Asn), 野生型的 apoM 的 Asn135 发生糖基化, 与蛋白质的氨基端及紧邻 β 折叠开放处形成两个较强的酸性基团, 该基团可能对 apoM 的功能起着重要作用。人与小鼠的 apoM 有 79% 的同源性, 与大鼠有 82% 的同源性。apoM 保留 N 端未切除的信号肽链构成的疏水区形成一个“信号锚”, 将其锚定脂蛋白单磷脂层。

2 载脂蛋白 M 基因的定位和表达

人类 apoM 基因定位在 6 号染色体的 6p21.33 该区的

基因序列已测定, 并且人类 apoM 基因已被确认 (GenBank 登录号: AF118393)。其 cDNA 全长为 734 bp, 编码 188 个氨基酸残基。其 5' 及 3' 端未转录区分别由 33 个和 120 个核苷酸组成, 不包括 poly(A) 尾。血浆中的 apoM 主要存在于 HDL 颗粒中, 仅有极小部分存在于三酰甘油载脂蛋白 (TGRLP) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 中, 故被认为是 HDL 的一个组成成分。apoM 的表达具有高度的组织特异性^[4]。Zhang 等^[5]利用人多种组织 Northern blot 膜通过原位杂交以及肝、肾组织原位杂交实验证实, apoM 基因的表达有组织特异性, 仅在人类肝脏肝细胞和肾脏肾小管上皮细胞中检测出明显高表达的 mRNA。由此可推断, apoM 可能与肝和肾的相关机能活动存在密切关系。Xu 等^[6]利用体外培养 HepG2 细胞研究促肾上腺皮质激素 (adrenocortrophic hormone, ACTH) 对载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apoB) 的影响时发现 ACTH 引起 apoB 表达降低, 但是对 apoM 的表达及分泌无影响, 说明 apoM 有别其它载脂蛋白的表达调控。

3 载脂蛋白 M 与脂质代谢

实验证明高脂饮食后 TGRLP 中 apoM 明显增高, 峰值出现在餐后 3~4 h, 5 h 后恢复正常, apoM 可能参与餐后脂蛋白代谢。Xu 等^[7]在对血液中 apoM 浓度与血液中其他脂质代谢指标进行比较时, 发现 apoM 与体重指数以及血液中瘦素含量呈正相关, 而与血液中总胆固醇含量呈负相关。而 Luo 等^[8]的研究发现, 超过生理剂量的瘦素抑制肝癌细胞株 HepG2 细胞 apoM 的转录与分泌, 这种抑制效应呈剂量依赖性, 0.1 ng/L 的瘦素使 apoM mRNA 水平降低 30%, 0.5 ng/L 的瘦素使 apoM mRNA 水平降低 50%。上述研究都提示, apoM 在脂质代谢中具有特殊的作用, 可能参与胆固醇或者其他具有生物活性的疏水分子的转运, 其具体的作用机制仍待进一步研究。

3.1 载脂蛋白 M 和血浆脂蛋白的关系

超速离心分离人血浆脂蛋白, 发现 apoM 主要存在于 HDL, 而在 LDL、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein

[收稿日期] 2008-09-19 [修回日期] 2008-12-10

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助 (CSTC, 2007BB5050) 和第三军医大学留学回国人员启动基金资助 (06HG010)

[作者简介] 张艳, 硕士研究生, 研究方向为脂代谢及动脉粥样硬化的分子研究机制, 联系电话为 023-68752842, Email 为 zhangyan7@medmail.com.cn; 董金瑜, 硕士研究生, 研究方向为脂代谢及动脉粥样硬化的分子研究机制, Email 为 dongjinyu456@163.com; 江渝, 博士, 教授, 研究方向为脂代谢及动脉粥样硬化的分子研究机制, 联系电话为 023-68752841, Email 为 yujiang61@gmail.com。

, VLDL)和乳糜微粒中的量很小^[12]。大部分人血浆中的 apoM 是糖基化的, 分子量为 25 kDa 而老鼠的 apoM 缺乏 N 端糖基^[13]。采用二维凝胶高分辨率电泳分离 LDL, 然后通过质谱测定法发现 apoM 有三个亚型, 而且亚型之间的分子不同^[19]。apoM 在血浆中的精确浓度, 不同的实验室测定的浓度从 20 mg/L 到 150 mg/L 不等, 这比 HDL 中的主要蛋白质 apoA-I 的浓度 (1~2 g/L, 分子量为 25 kDa) 低得多, 提示血浆中含有的 apoM 仅仅是 HDL 颗粒的一个亚群^[12 10 11]。正常老鼠, 大部分的 apoM 存在于 HDL 中, 而 LDL 受体缺陷老鼠, apoM 存在于 LDL 和 HDL 中^[10]。给 apoE 基因缺陷鼠喂养高胆固醇/高脂饮食, 使血浆胆固醇的水平达到约 40 mmol/L, apoM 主要分布于 LDL 和 VLDL。以上的结果表明 apoM 不是 HDL 专一性载脂蛋白。在 apoA-iv 缺陷老鼠, 血浆 apoM 的浓度降低到正常值的 33%, 推测血浆 apoM 的合成、分泌或转化在一定程度上依赖于 apoA-iv^[10]。

3.2 载脂蛋白 M 对高密度脂蛋白形成的影响

HDL 的形成是一系列相互关联的复杂反应的结果, 各种载脂蛋白参与了 HDL 的代谢。在一项针对鼠的实验中, Wolfum 等^[12]使用 siRNA 直接阻止 apoM mRNA, 使肝脏中 apoM 的表达暂时降低了 90%, 导致血浆中 apoM 的浓度显著降低, 并且使血浆 HDL 的水平下降了 25%。apoM 表达缺失伴随血浆 apoA-iv 浓度的轻度减少, 但是对 apoA-I、apoC 或 apoB 则没有影响。apoM 表达的降低使鼠的血浆中出现大于正常 HDL 的高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol HDLC)。此外, apoM 表达缺失与血浆中前 β 高密度脂蛋白 (pre β -HDL) 的消失有关。类似于 apoM siRNA 处理鼠的实验, 肝细胞核因子-1 α (hepatoma nuclear factor-1 α , HNF-1 α) 缺陷鼠, apoM 的表达很低, 血浆中也出现异常大的 HDL 以及 pre β -HDL 消失^[11 12]。有趣的是, 通过给 HNF-1 α 缺陷鼠注射能表达 apoM 的重组腺病毒, 可使 apoM mRNA 重新表达, 结果导致了胆固醇从大 HDL 颗粒转移到正常大小 HDL, 血浆再现 pre β -HDL^[12]。这些研究结果提示, apoM 在鼠 pre β -HDL 形成中起着重要的作用。

3.3 载脂蛋白 M 对胆固醇逆向转运的影响

胆固醇逆向转运是影响 As 的重要机制, HDL 的心血管保护作用主要是通过胆固醇逆向转运机制来实现的, apoM 可通过对 pre β -HDL 的调节来影响胆固醇逆向转运的过程。Wolfum 等^[12]从 apoM 基因沉默型小鼠和野生型小鼠的血浆中分别提取的 HDL 和 pre β -HDL 来培养 RAW 巨噬细胞, 结果前者培养的 RAW 巨噬细胞胆固醇流出较后者减少 50%; 另外, 使用含抗 apoM 抗体的 HDL 培养的 RAW 细胞, 其胆固醇流出较不含抗体的 HDL 培养组减少 50%。有研究者^[13]发现, 含有 apoM 的 HDL 亚群与缺乏 apoM 的 HDL 相比, 前者能更有效地防止 LDL 的氧化和促进胆固醇逆向转运。研究结果表明 apoM 在 HDL 和 pre β -HDL 中的存在有助于体内胆固醇的逆向转运。

3.4 载脂蛋白 M 水平与有关血脂指标的相关性

最近有研究发现, 血浆 apoM 的浓度与血液中有有关血脂指标存在相关性。有人观察到, 健康人血浆中 apoM 与

HDLC 及 HDLC/apoA-I 呈明显的正相关, 而冠心病患者血浆中 apoM 与 apoA-I、LDLC 及 LDLC/apoB 呈明显的负相关, 提示 apoM 可能参与体内的胆固醇代谢, 但具体的调节机制有待进一步研究^[14]。另有研究^[15]发现, 在 2 型糖尿病患者中血浆 apoM 水平与 apoA-I 呈正相关、与脂蛋白 a 呈负相关, 进一步支持 apoM 可能为 As 保护因子。

4 载脂蛋白 M 与动脉粥样硬化性心脏病

As 形成是一个复杂的病理生理过程, 涉及多种发病环节, 若对其中任何一种环节进行干预乃至阻断, 都将有助于防止 As 的形成并延缓其进程。apoM 对 As 影响在动物模型研究中有了初步认识。Wolfum 等^[12]验证了 apoM 过度表达对 As 产生的影响, 即采用高胆固醇喂养的 LDL 受体缺失型小鼠, 这种小鼠证实可引起 As 后予以注射腺病毒载体装配的 apoM, 经注射后小鼠血浆的 apoM 水平升高 2~3 倍, 同时 HDL 也上升 40%, 在 apoM 过度表达 3 周以后, 观察到实验组主动脉粥样病变面积仅为对照组的 28%, 主动脉的印记病变区域以及主动脉根部的油红 O 染色病变区域均降低了 70%。同时, Wolfum 等^[12]还发现 apoM 缺陷的小鼠形成的 pre β -HDL 也有缺陷; 而高度表达 apoM 基因的 LDL 受体基因敲除的小鼠在以高胆固醇饮食喂养时, As 病变也是降低的。这些结果提示 apoM 介导的 pre β -HDL 的形成对于 HDL 发挥抗 As 作用是很重要的。炎症也是 As 成的一个重要机制, 贯穿 As 病变的整个过程。因此, 减轻或阻止 As 有关的炎症反应被认为是防治的一个重要手段。研究表明, 人类载脂蛋白 M 基因定位于 6 号染色体的 MHC- α 区, 该区的许多基因均与体内免疫炎症反应相关, 且载脂蛋白 M 基因与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor- β , TNF- β) 这两种炎症因子的基因序列非常接近。因此, 有研究者推测, 载脂蛋白 M 很可能参与体内免疫炎症反应的调控。然而, 目前的研究显示, 载脂蛋白 M 在 As 发病中扮演的炎症角色 (抗炎或致炎) 远不如其在脂代谢中的明确^[16]。有研究结果发现, 随着冠状动脉病变数量的增加及狭窄程度加重, 血清载脂蛋白 M 水平逐渐降低。这提示血清载脂蛋白 M 水平不仅与冠心病的发病有关, 而且与冠心病的进展有关, 冠状动脉病变程度越重, 血清载脂蛋白 M 水平越低。因此, 载脂蛋白 M 可能作为反映冠状动脉粥样硬化程度和数量标记物之一^[17]。已证明糖代谢的紊乱能促进 As 发生和发展, Xu 等^[18]通过动物实验表明, 糖尿病小鼠血浆 apoM 水平下降 70%, 肝脏 apoM mRNA 表达下降 40%, 肾脏 apoM mRNA 表达下降 20%。而外源性的胰岛素注射可增加血浆 apoM 水平及肝肾 apoM mRNA 的表达, 部分逆转 apoM 的下调。研究表明高 apoM 水平对 As 病变的形成有保护作用。在人体实验中, Richter 等^[11]证实成年发病的年轻型糖尿病患者与正常人和血糖控制良好的糖尿病患者相比, 血浆 apoM 水平下降, 提示低 apoM 水平可增加人类患 As 的易感性。xu 等^[7]研究表明, 血浆 apoM 水平与抗 As 因子 (如 apoA-I 和 HDLC) 呈正相关, 而与三酰甘油、总胆固醇和脂蛋白 a 呈负相关; 血浆 apoM 伴随 apoA-I

的升高可拮抗体内脂蛋白 a 的致 A s 作用。

5 载脂蛋白 M 与糖尿病

糖尿病极易并发 A s 相关性疾病^[19], 尽管目前尚不清楚 apoM 通过何种机制或途径阻止糖尿病的发病, 但现有的研究显示, 血浆 apoM 水平与糖尿病发病呈明显负相关。Richter 等^[11]观察到, 青春晚期糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young 3 MODY3) 患者血浆 apoM 水平较正常人群明显下降。其原因在于该类患者体内的 HNF-1 α 在基因突变, 而 HNF-1 α 恰又是编码 apoM 基因的一个强效转录激活因子。在动物实验中进一步发现, 当敲除小鼠的 HNF-1 α , 其肝脏和肾脏中的载脂蛋白 M 表达会因此完全抑制, 同时也造成小鼠的血糖水平显著升高。由此表明, 血浆 apoM 水平减低与 HNF-1 α 基因表达显著相关, 也是 MODY3 发病的一个重要预测因子。Niu 等^[20]研究了汉族人群载脂蛋白 M 基因近端启动子与 2 型糖尿病发病的关系。结果发现, 与非糖尿病人群相比, 2 型糖尿病人群的近端启动子区域存在单核苷酸多态性 T-778C, 这种 apoM 的基因多态性能够显著升高糖尿病患者血浆胆固醇水平和空腹血糖水平。由此认为 apoM 的单核苷酸多态性 T-778C 能够增加汉族人群罹患 2 型糖尿病的风险。

此外, 还有研究表明, 无论是动物还是人, 其体内 apoM 的浓度或表达均与瘦素呈正相关, 而后者恰恰是糖尿病尤其是 2 型糖尿病发病的一个重要负调节因子^[7, 21]。由此可见, apoM 很可能在一定程度上延缓甚至阻止糖尿病的发病, 从而降低由此病所导致的 A s 的发病率。

6 展望

apoM 主要存在于血浆 HDL, 在肝肾组织专一表达的人类载脂蛋白, 其病理生理功能如 apoM 在肾小管中表达的生理意义等迄今尚未阐明, 在糖尿病、心脑血管疾病、免疫炎症性疾病的发生、发展中的作用及其机制等需要进一步探讨和研究。但 apoM 的发现及已进行的研究无疑大大地推动了在 A s、糖尿病和肾病等领域的基础与临床研究。

[参考文献]

- [1] Dahlback B, Nielsen LB. Apolipoprotein M a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol* 2006 **17** (3): 291-295
- [2] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. *J Biol Chem*, 1999 **274** (44): 31 286-290
- [3] Duan J, Dahlback B, Viloutreix BO. Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site directed mutagenesis [J]. *FEBS Lett* 2001 **499** (122): 127-132
- [4] Xu N, Zhang XY, Dong X, et al. Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin-1 α on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002 **292** (4): 944-950
- [5] Zhang XY, Dong X, Zheng L, et al. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization [J]. *Acta Histochem*, 2003 **105** (1): 67-72
- [6] Maisel AS, Koon J, Krishnaswamy P, et al. Utility of B-natriuretic peptide as a rapid point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction [J]. *Am Heart J*, 2001 **141** (3): 367-374
- [7] Xu N, Nilsson-Ehle P, Ahren B. Correlation of apolipoprotein M with leptin and cholesterol in normal and obese subjects [J]. *J Nutr Biochem*, 2004 **15** (10): 579-582
- [8] Luo G, Hurtig M, Zhang X, et al. Leptin inhibits apolipoprotein M transcription and secretion in human hepatoma cell line HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005 **1734** (2): 198-202
- [9] Karlsson H, Leanderon P, Tagesson C, et al. Lipoprotein I mapping of protein in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass Spectrometry [J]. *Proteomics* 2005 **5** (2): 551-565
- [10] Faher K, Axler O, Dahlback B, et al. Characterization of apoM in normal and genetically modified mice [J]. *J Lipid Res* 2004 **45** (7): 1 272-278
- [11] Richter S, Shin DQ, Pearson ER, et al. Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1 α haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels [J]. *Diabetes* 2003 **52** (12): 2 989-995
- [12] Wolfum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for pre β -HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis [J]. *Nat Med* 2005 **11** (4): 418-422
- [13] Christoffersen C, Nielsen LB, Axler O, et al. Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins [J]. *J Lipid Res* 2006 **47** (8): 1 833-843
- [14] 焦国庆, 张晓鹰, 董选, 等. 冠心病患者血浆载脂蛋白 M 水平及其相关性研究 [J]. *现代医学*, 2004 **32** (1): 22-25
- [15] 荆朝辉, 张晓鹰, 徐宁, 等. 2 型糖尿病患者中浆载脂蛋白 M 与脂蛋白 a、载脂蛋白 AI 的关系研究 [J]. *现代医学*, 2006 **34** (2): 96-100
- [16] 黄贤圣, 赵水平. 载脂蛋白 M 抗动脉粥样硬化机制的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (4): 318-320
- [17] 胡志高, 屈晓冰, 胡敏. 载脂蛋白 M 与冠状动脉病变的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (3): 224-226
- [18] Xu N, Nilsson-Ehle P, Ahren B. Suppression of apolipoprotein M expression and secretion in alloxan-diabetic mouse: partial reversal by insulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006 **342** (4): 1 174-177
- [19] Stone NJ, Bilek S, Rosenbaum S. Recent national cholesterol education program adult treatment panel update: adjustments optimums [J]. *Am J Cardiol* 2005 **96** (4A): 53E-59E
- [20] Niu NF, Zhu XJ, Liu Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of apolipoprotein M gene (apoM) confer the susceptibility to development of type 2 diabetes in Han Chinese [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006 **22** (4): 168-172
- [21] Xu N, Nilsson-Ehle P, Hurtig M. Both leptin and leptin-receptor are essential for apolipoprotein M expression in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004 **321** (4): 916-921

(此文编辑 李玲玲)