

载脂蛋白模拟肽的研究进展

谢琼, 赵水平

(中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 载脂蛋白模拟肽; 动脉粥样硬化; 高密度脂蛋白

[摘要] 载脂蛋白模拟肽是利用现代生物技术合成的与载脂蛋白功能相当而分子量更小的一类多肽。应用这类模拟肽治疗动脉粥样硬化及其相关性疾病已成为近年来心血管疾病治疗领域的研究热点。本文就载脂蛋白模拟肽最新研究进展做一综述。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Research Progress of Apolipoprotein Mimetic Peptides

XIE Qiong and ZHAO Shuiping

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein Mimetic Peptides Atherosclerosis High Density Lipoprotein

[ABSTRACT] Apolipoprotein mimetic peptides that mimic the function of apolipoprotein with or without bearing the sequence homology to apolipoprotein have become a hot topic of atherosclerosis therapy research. The importance of apolipoprotein mimetic peptides in atherosclerosis and related disease was established by testing in animal models and its potential usefulness in humans has been confirmed in preliminary studies. In this article, the development of apolipoprotein mimetic peptides is reviewed.

动脉粥样硬化(As)所致缺血性心血管疾病是中老年人发病和死亡的常见原因,探索能有效防治As的措施一直是心血管疾病领域的研究重点和难点。他汀类降脂药物能有效降低胆固醇,但仅能减少三分之一的冠状动脉事件发生^[1]。现有研究显示,高密度脂蛋白(HDL)与As和冠心病的发生、发展呈负相关。载脂蛋白是HDL中主要的蛋白成分,通过多种机制发挥抗As作用,由于人类载脂蛋白来源有限,应用于临床十分困难。因此,利用现代生物技术,通过研制分子量更小而功能上相当的载脂蛋白模拟肽用以治疗As及其相关性疾病成为近年来心血管疾病治疗领域的研究热点^[1],其中载脂蛋白Aiv模拟肽的研究较为深入。已有大量研究证实载脂蛋白Aiv模拟肽在动物模型和人体内具有逆转As的治疗作用^[2],本文对目前研究较多的几种载脂蛋白模拟肽进行介绍。

1 载脂蛋白Aiv模拟肽

载脂蛋白Aiv是HDL的主要结构成分,约占HDL总蛋白含量的70%。它在血浆中的浓度与HDL水平相关,Brinton等^[3]已经阐明,血浆HDL水平主要由载脂蛋白Aiv和载脂蛋白AⅡ的分解代谢率(FCR)决定。因此,HDL

中载脂蛋白(主要是载脂蛋白Aiv)代谢的特征已经成为整个HDL颗粒代谢的代表。研究表明,载脂蛋白Aiv具有抗As功能^[4]。贫脂的载脂蛋白Aiv是ABCA1介导巨噬细胞胆固醇流出的主要接受体。此外,载脂蛋白Aiv还与HDL的其他功能如抗氧化和抗炎密切相关^[5]。动物实验已经证实,即使保持HDL水平,载脂蛋白Aiv缺乏也会引起小鼠As病变增加,而通过转基因过度表达载脂蛋白Aiv或直接静脉注射载脂蛋白Aiv均可有效抑制As斑块形成^[6]。因此,上调内源性载脂蛋白Aiv表达应该是针对HDL的最理想手段。但遗憾的是目前为止还没有发现一种上调载脂蛋白Aiv转录的小分子物质。而且载脂蛋白Aiv是由243个氨基酸组成的大分子蛋白质,这就决定了其必须通过静脉才能给药。而且,合成载脂蛋白Aiv难度很大,花费很高。同时,应用正常的载脂蛋白Aiv作为治疗手段似乎缺乏创新性,也没有专利保护,因此研究者的兴趣集中在载脂蛋白Aiv模拟肽。

目前认为,含有243个氨基酸的载脂蛋白Aiv与脂质结合的特性与其结构中的A族两性螺旋结构有关,该螺旋结构的一面亲水,另一面亲脂。根据载脂蛋白Aiv的这一结构特性,有学者构建了一种二级结构及电荷分布与载脂蛋白Aiv相似但与载脂蛋白Aiv序列没有同源性的小分子模拟肽^[7]。最早合成的肽模拟了载脂蛋白Aiv的部分脂质结合特性,但是却并不能预防小鼠As的发生。对于这些肽的物理化学性质的深入研究使得研究者认识到,这类肽的疏水区域对于决定其生物活性至关重要。通过对18肽的氨基酸序列进行优化,发现疏水端含4个苯丙氨酸残基的模拟肽具有最佳的物理化学特性和最高的生物学活性,这类模拟肽被命

[收稿日期] 2010-06-24 [修回日期] 2010-07-24

[作者简介] 谢琼,博士,研究方向为血脂与动脉粥样硬化,Email为 bestxq80@hotmail.com。通讯作者赵水平,教授,博士研究生导师,研究方向为血脂与动脉粥样硬化,Email为 zhaosp@medmail.com.cn。

名为 4F^[8-9]。一系列体外实验证实, 4F 能与磷脂结合, 促进胆固醇流出, 激活 LCAT, 且能清除氧化 LDL 的氧化磷脂, 恢复 HDL 相关的抗氧化酶 (对氧磷酶) 的活性, 促使 HDL 由致炎特性转变为抗炎作用, 抑制单核细胞的趋化活性和炎症反应^[10-11]。当用右旋氨基酸代替 4F 模拟肽中的左旋氨基酸后, D-4F 模拟肽可以由口服吸收而避免消化酶的破坏, 产生类似静脉或腹腔注射的效果, 加之其分子量小, 容易合成和体内应用, 使其更具有临床应用前景。动物实验证实, 口服给予 D-4F 后, 可以减少 As 病变, 快速增加循环中前 β -HDL 水平, 增强对氧磷酶活性, 将 HDL 由促炎逆转为抗炎, 降低细胞中病毒滴度, 还可以导致 HDL 中 LOOH 含量显著减少, 并增加巨噬细胞的胆固醇逆转运, 不影响血浆中脂质水平的情况下, 增加动脉血管反应性, 这之前体外实验所观察到的结果也是相似的^[12]。此外, Navab 等^[13]发现 D-4F 和普伐他汀的联合应用对载脂蛋白 E 敲除小鼠具有明显的协同作用。联合使用 D-4F 和普伐他汀后, 在年轻小鼠能显著增加 HDLC 和载脂蛋白 Aiv 水平及对氧磷酶的活性; 而在老年基因敲除小鼠能使病变面积缩小, 使已形成的病变得到消退。与对照组比较, 联合使用 D-4F 和普伐他汀使平均病变面积减少至 38%, 使病变中巨噬细胞含量降低至 79%。而且, 肠道合成载脂蛋白 Aiv 增加 60%, 这也是血浆中载脂蛋白 Aiv 水平升高的原因之一。在猴的动物模型上联合使用 D-4F 和普伐他汀也使其 HDL 转变为具有抗炎特性。由此可见, 联合使用 D-4F 和他汀对诱导病变消退和预防病变进展都有有效作用。此外, Ou 等^[14]还报道, 在体外, LDL 能使内皮细胞一氧化氮合酶活性去耦合, 导致超氧化物阴离子生成增加, 一氧化氮合成减少。4F 能对抗 LDL 对内皮细胞的作用, 使超氧化物产生减少, 而使一氧化氮合成增加。高脂高胆固醇饮食的 LDL 受体敲除小鼠模型和镰刀病的小鼠模型中动脉血管的反应性均明显降低^[15], 注射 4F 后能显著增加这两种模型小鼠的动脉血管反应性。高脂饮食使 LDL 受体敲除小鼠的动脉壁明显增厚。而通过胃肠道给予小鼠 D-4F 后在不影响血浆中脂质水平的情况下, 显著降低动脉壁的厚度, 改善 HDL 的炎症效应, 并且增加动脉血管的反应性^[16]。目前 D-4F 的人体早期临床试验正在进行之中。Navab 等^[17]最近研究发现 Niclosamide (一种临床应用的抗寄生虫药物) 能抑制蛋白酶对 L-4F 的分解作用, 两者合用可使 L-4F 能口服吸收, 从而起到抗 As 作用。

2 载脂蛋白 J 模拟肽

载脂蛋白 J 是另一种 HDL 相关蛋白, 它包含有 17 个 G 型两性螺旋结构, Navab 等^[18]仅研究合成了其中的 7 个, 发现只有 2 个与完整的载脂蛋白 J 蛋白具有相似的作用, 于是根据其序列合成了右旋氨基酸模拟短肽, 并在载脂蛋白 E 敲除小鼠模型进行抗 As 功能的检测。研究发现, 只有序列 [113-122] 能够显著抑制载脂蛋白 E 敲除小鼠 As 病变形成。这种仅包含 10 个右旋氨基酸的短肽在体内的清除明显慢于 D-4F, 因此, 口服该短肽后可以促进 HDL 的抗炎功能, 效果长达 48 h。在猴模型中应用该短肽可迅速降低 LOOH, 增加

对氧磷酶活性, 并提高 HDL 抗炎特性。

3 其他合成模拟短肽

Navab 等^[19]还研究和合成了一种更短的肽, 由于这种肽只包含 4 个氨基酸, 不能形成螺旋结构。该短肽中正电荷氨基酸和负电荷氨基酸没有被保护, 在其两端加上丁醇基团保护, 从而保持氨基端和羧基端为非极性状态。研究者合成比较了两种该类 4 肽, 包含的氨基酸完全相同, 只是中间两种氨基酸排列顺序稍有不同, 分别为 KRES 和 KERS。体外研究发现 KRES 可以降低 LOOH, 增加对氧磷酶活性。体内实验中, KRES 同样使载脂蛋白 E 敲除小鼠 LOOH 水平降低, 对氧磷酶活性增加, 减少脂蛋白的过氧化氢脂质, 同时还升高 HDLC 浓度, 使 HDL 转为抗炎, 从而减少 As 病变。相较于只有右旋氨基酸合成的 4F (D-4F) 能够通过口服给药, 无论左旋或右旋 KRES 均可通过胃肠道给药发挥其生物学效应。仅改变这种 4 肽中间两种氨基酸顺序, 则丧失了其抗 As 的生物学活性。负电荷染色电泳检查发现 KRES 可以形成机化的肽-脂质结构而 KERS 则不能。另一种 4 肽 FREL 与 KRES 具有相似的理化性质, 无论左旋或右旋 FREL 在动物模型中均可通过口服给药发挥其生物学活性。

4 双结构域模拟肽

载脂蛋白 E 的受体结合结构域被认为是抗 As 的重要结构。来源于该结构域氨基酸序列的载脂蛋白 E 模拟肽主要通过 LDL 受体家族调节血脂代谢途径发挥抗 As 作用。此外, 这类模拟肽还可抑制 Cu^{2+} 介导的 LDL 氧化修饰, 并能抑制脂多糖诱导的炎症反应^[20]。于是有研究者利用天然载脂蛋白 Aiv 与载脂蛋白 E 功能上的互补性, 将载脂蛋白 E 受体结合域与含有两性螺旋结构的载脂蛋白 Aiv 模拟肽共价结合, 形成一种新型的具有双结构域的模拟肽^[21], 即 A c-hE-18A-NH₂。研究发现这种双结构域的模拟肽可以促进成纤维细胞、HepG2 细胞对 LDL 的摄取吸收和降解, 此作用可能与该模拟肽与细胞表面的蛋白聚糖类结合有关^[22]。研究发现 A c-hE-18A-NH₂ 模拟肽在体内具有抗炎及抗氧化的特性。在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠模型, 静脉注射该模拟肽, 血浆胆固醇水平降低 88%^[23]。研究者给高胆固醇血症兔静脉注射嵌合肽后, 不仅显著降低了血浆胆固醇水平, 而且通过降低血浆中过氧化氢脂质、增加 HDL 对氧磷酶浓度、诱导超氧阴离子形成从而对抗氧化应激、改善内皮功能, 从而起到抗 As 作用^[24]。此外, A c-hE-18A-NH₂ 可以抑制脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 血管细胞粘附分子 1 (VCAM-1) 和单核细胞粘附分子的表达, 还能降低 THP-1 细胞中白细胞介素 6 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的分泌^[25]。本实验室研究发现, 这种双结构域的模拟肽可以明显促进巨噬细胞胆固醇流出, 其作用可能与促进细胞内环磷酸腺苷释放及上调 LXR-PPAR-ABCA1 通路有关。同时我们还观察到, 该模拟肽通过促进胆固醇流出, 减少细胞内胆固醇蓄积, 抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡。因此, 这种双结构域的模

拟肽被认为是防治As很有前景的新策略。

总而言之,载脂蛋白模拟肽的研究不仅帮助我们更好地理解载脂蛋白在As发生过程中发挥的作用,更因为它们具有的抗As作用,从而有可能成为治疗和预防As的理想药物,具有广阔的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Anantharamaiah G, Navab M, Reddy ST, et al. Synthetic peptides managing lipid disorders [J]. *Curr Opin Lipidol* 2006 **17** (3): 233-237.
- [2] Garber DW, Handattu SP, Datta G, et al. Atherosclerosis and vascular disease: effects of peptide mimetics of apolipoproteins [J]. *Curr Pharm Biotechnol* 2006 **7** (4): 235-240.
- [3] Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. Human HDL cholesterol levels are determined by apoA IV fractional catabolic rate which correlates inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution [J]. *Arterioscler Thromb* 1994 **14** (5): 707-720.
- [4] 张新波,王绿娅,陈保生. 载脂蛋白A IV的抗动脉粥样硬化功能研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007 **15** (3): 233-235.
- [5] Moore RE, Navab M, Millar JS, et al. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A IV attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation [J]. *Circ Res* 2005 **97** (8): 763-771.
- [6] Benoit P, Emmanuel F, Caillaud M, et al. Somatic gene transfer of human apoA IV inhibits atherosclerosis progression in mouse models [J]. *Circulation* 1999 **99** (1): 105-110.
- [7] Anantharamaiah GM. Synthetic peptide analogs of apolipoproteins [J]. *Methods Enzymol* 1986 **128**: 627-647.
- [8] Datta G, Chaddha M, Hama S, et al. Effects of increasing hydrophobicity on the physicochemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide [J]. *J Lipid Res* 2001 **42**: 1096-1104.
- [9] Van Lenten BJ, Wagner AC, Anantharamaiah GM, et al. Apolipoprotein A IV mimetic peptides [J]. *Curr Atheroscler Rep* 2009 **11** (1): 52-57.
- [10] Getz GS, Wool CD, Reardon CA. Apolipoprotein A IV mimetic peptides and their potential antiatherogenic mechanisms of action [J]. *Curr Opin Lipidol* 2009 **20** (3): 171-175.
- [11] 黄全跃,赵水平. 载脂蛋白A IV模拟肽的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004 **12** (1): 119-120.
- [12] Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circulation* 2004 **109** (25): 3215-220.
- [13] Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, et al. D-4F and statins synergize to render HDL anti-inflammatory in mice and monkeys and cause lesion regression in old apolipoprotein E-null mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 **25**: 1426-432.
- [14] Ou Z, Ou J, Ackerman AW, et al. L-4F, an apolipoprotein mimetic, restores nitric oxide and superoxide anion balance in low density lipoprotein-treated endothelial cells [J]. *Circulation* 2003 **107**: 1520-524.
- [15] Ou J, Ou Z, Jones DW, et al. L-4F, an apolipoprotein A IV mimetic, dramatically improves vasodilation in hypercholesterolemia and sickle cell disease [J]. *Circulation* 2003 **107**: 2337-341.
- [16] Ou J, Wang J, Xu H, et al. Effects of D-4F on vasodilation and vessel wall thickness in hypercholesterolemic LDL receptor-null and LDL receptor/apolipoprotein A IV double-knockout mice on Western diet [J]. *Circ Res* 2005 **97**: 1190-197.
- [17] Navab M, Ruchala P, Waring AJ, et al. A novel method for oral delivery of apolipoprotein mimetic peptides synthesized from all L-amino acids [J]. *J Lipid Res* 2009 **50** (8): 1538-547.
- [18] Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. An oral apoJ peptide renders HDL anti-inflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 **25**: 1932-937.
- [19] Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Oral small peptides render HDL anti-inflammatory in mice and monkeys and reduce atherosclerosis in apoE null mice [J]. *Circ Res* 2005 **97**: 524-532.
- [20] Nikoulin R, Curtiss LK. An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo [J]. *J Clin Invest* 1998 **101** (1): 223-234.
- [21] Anantharamaiah GM. Synthetic peptide analogs of apolipoproteins [J]. *Methods Enzymol* 1996 **128**: 627-647.
- [22] Datta G, Chaddha M, Garber DW, et al. The receptor binding domain of apolipoprotein E, linked to a model class A amphipathic helix, enhances internalization and degradation of LDL in fibroblasts [J]. *Biochemistry* 2000 **39**: 213-220.
- [23] Garber DW, Handattu S, Aslan I, et al. Effect of an arginine-rich amphipathic helical peptide on plasma cholesterol in dyslipidemic mice [J]. *Atherosclerosis* 2003 **168**: 229-237.
- [24] Gupta H, White CR, Handattu S, et al. Apolipoprotein E mimetic peptide dramatically lowers plasma cholesterol and restores endothelial function in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits [J]. *Circulation* 2005 **111**: 3112-118.
- [25] Datta G, White CR, Dashti N, et al. Anti-inflammatory and recycling properties of an apolipoprotein mimetic peptide, Ac-HETSA-NH₂ [J]. *Atherosclerosis* 2010 **208** (1): 134-141.

(此文编辑 文玉珊)