

## 脂肪酸移位酶 FAT/CD36 与长链脂肪酸的结合机制

薄俊霞, 李敬达, 刘庆平

(辽宁省糖脂代谢研究重点实验室 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁省大连市 116622)

[关键词] 脂肪酸移位酶; 长链脂肪酸; 分子模拟对接

[摘要] **目的** 探讨脂肪酸移位酶 FAT/CD36 与长链脂肪酸的结合机制。**方法** ELISA 分析重组蛋白 FAT/CD36 与不同种类长链脂肪酸结合强弱机制, 分子模拟对接进一步验证其结合机制并分析其可能作用位点。**结果** ELISA 证明重组蛋白 FAT/CD36 与不同种类长链脂肪酸均显示特异性结合, 结合值大小为油酸>棕榈酸>棕榈油酸>肉豆蔻酸>硬脂酸。分子模拟对接进一步验证 FAT/CD36 受体蛋白主要与其中的油酸、棕榈酸及棕榈油酸结合, 且结合位点位于 FAT/CD36 受体蛋白胞外结构的 Arg183-Lys-Gly-Lys-Arg-Asn-Leu-Ser-Tyr238 区域组成的活性口袋。**结论** FAT/CD36 作为细胞长链脂肪酸转运的主要受体, 其可能主要转运油酸、棕榈酸和棕榈油酸这三种脂肪酸。

[中图分类号] Q547

[文献标识码] A

### The combined mechanism of fatty acid translocase FAT/CD36 and long chain fatty acid

BO Jun-Xia, LI Jing-Da, LIU Qing-Ping

(Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism Research & College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

[KEY WORDS] FAT/CD36; Long chain fatty acid; Molecular simulation docking

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the binding mechanism of fatty acid translocase FAT/CD36 and long chain fatty acid. **Methods** ELISA was used to analyze the intensity mechanism of the purity of FAT/CD36 binding with different fatty acid, molecular simulation docking was used to further verify the binding mechanism and analyze its possible binding sites. **Results** ELISA proved that the recombinant protein FAT/CD36 with different types of long chain fatty acids showed specific binding, binding values for oleic acid>palmitic acid>palmitoleic acid>myristic acid>stearic acid. Molecular simulation docking further confirmed that FAT/CD36 receptor protein mainly combines with oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid. And the binding site was located in the extracellular structure of the FAT/CD36 receptor protein Arg183-Lys-Gly-Lys-Arg-Asn-Leu-Ser-Tyr238 region consisting of the active pocket. **Conclusion** FAT/CD36, as the main receptor of long chain fatty acid transport, may transport oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid.

CD36 清道夫受体家族成员通过识别、吞噬脂类分子在脂质代谢与先天性免疫中发挥重要作用, 其家族成员主要包括清道夫受体 SR-BI、溶酶体整合膜蛋白 LIMP-2/LGP85、脂肪酸移位酶(fatty acid translocase, FAT/CD36)<sup>[1-3]</sup>。其中 FAT/CD36 作为一种调节脂肪酸代谢的主要受体蛋白在长链脂肪酸(long chain fatty acid, LCFA)跨膜转运和调控代谢中具有重要作用<sup>[4-5]</sup>。然而由于 FAT/CD36 受体

分子缺乏蛋白晶体结构, 其特异性转运脂肪酸种类以及详细结合机制目前知之甚少, 鲜见报道。本文利用同源建模构建 FAT/CD36 蛋白的活性部位 3D 结构, 通过分子模拟对接技术和 ELISA 鉴定 FAT/CD36 与不同 LCFA 的结合方式, 确定 FAT/CD36 转运 LCFA 种类, 以期为 FAT/CD36 为靶点引起的脂质代谢紊乱性疾病的药物设计与治疗提供新思路。

[收稿日期] 2017-02-27

[修回日期] 2017-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(81673494)

[作者简介] 薄俊霞, 硕士研究生, 主要从事小分子化合物抗脂质紊乱性疾病研究, E-mail 为 596527426@qq.com。通讯作者刘庆平, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病研究及药物开发, E-mail 为 qingpingliu40@126.com。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与材料

FAT/CD36 重组蛋白(带有抗 His 标签)购自 Thermo Fisher 公司;棕榈酸(palmitic acid, PA)、硬脂酸(stearic acid, SA)、油酸(oleic acid, OA)、棕榈油酸(palmitoleic acid, POA)、肉豆蔻酸(myristic acid, MA)购自 Sigma 公司;重组蛋白的缓冲稀释液 PBS (0.05 nmol/L, pH7.4)、Tween-20 及溶解脂类物质的无水乙醇(分子级别)购自上海生工生物工程有限公司。分子模拟软件 AUTODOCK 4.2.6。

### 1.2 ELISA 检测 FAT/CD36 与不同种类脂肪酸的结合特性

分别量取棕榈酸、硬脂酸、油酸、棕榈油酸、肉豆蔻酸并溶于 1 mL 无水乙醇中,使其终浓度为 2 g/L。将不同种类的 LCFA (20 mg/L, 100  $\mu$ L/well) 包被于 ELISA 板,每种脂肪酸设 3 个复孔;按照常规 ELISA 方法,封闭后用 PBST 清洗 3 次;加入 FAT/CD36 重组蛋白孵育 1 h, PBST 洗板 3 次,以抗 His 抗体为一抗加入孵育 1 h, PBST 洗板 3 次后加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h, OPD 显色, 492 nm 下观察结果。以 OD<sub>490nm</sub> 吸光值大小代表其结合强弱。

### 1.3 FAT/CD36 结构蛋白模型的建立

靶蛋白三维结构从蛋白质数据库 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 中搜索下载,获得含配体且分辨率较高的 FAT/CD36 晶体结构(PDB 编号为 5LGD)<sup>[6]</sup>。利用 Discovery Studio4.0 (DS) 中的 Clean Protein 工具对蛋白结构进行以下操作:删去配体分子和水分子、补全不完整残基、删除多余蛋白质构象、加入氢原子以及 Gasteiger-Marsili 电荷等获得相应受体。

### 1.4 分子模拟分析 FAT/CD36 结构蛋白与不同种类 LCFA 结合机制

将已修饰改造好的 FAT/CD36 受体导入到 AUTODOCK 4.2.6 软件包之后, FAT/CD36 受体蛋白和棕榈酸、硬脂酸、油酸、棕榈油酸、肉豆蔻酸分子保存为 PDBQT 格式(包含原子类型和电荷)的文件,利用 AUTODOCK 4.2.6 软件包对 FAT/CD36 受体蛋白和棕榈酸、硬脂酸、油酸、棕榈油酸、肉豆蔻酸分子进行半柔性对接。分子对接中各种 LCFA 与受体蛋白按 1:1 比例结合。在进行半柔性对接模拟前,使用 AUTOGRID 计算网格,每一次对接所用的网格长、宽和高均为 100 个网格点,网格中包含各种脂肪酸可能作用的所有活性氨基酸残基。模拟对接过程中 FAT/CD36 结构视为刚性, LCFA 分子

视为柔性,小分子内的旋转键由 AUTODOCK 程序识别并可以在搜索过程中任意旋转,分子对接在 AUTODOCK 软件包中进行,对接使用 Lamarckian 遗传算法与局部能量搜索相结合(GALS)对上述小分子化合物与 FAT/CD36 受体蛋白复合物构象进行搜索。每一次均进行 100 次对接计算,最终的计算结果从软件生成的输出文件中抽提出来<sup>[7-8]</sup>。

### 1.5 统计学分析

ELISA 实验结果来自 3 次重复实验的平均值和标准差,组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FAT/CD36 与不同种类 LCFA 结合情况

通过对不同种类的 LCFA 与 FAT/CD36 进行的 ELISA 实验发现, FAT/CD36 能够与这 5 种脂肪酸结合,并且结合强弱为油酸>棕榈酸>棕榈油酸>肉豆蔻酸>硬脂酸(图 1)。

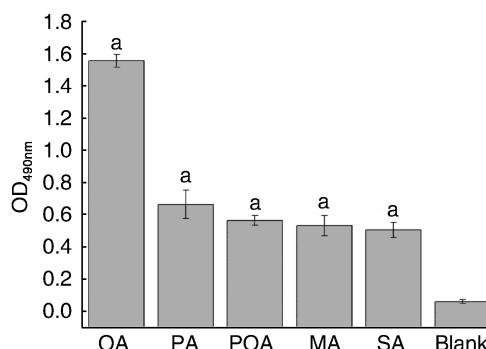


图 1. ELISA 检测 FAT/CD36 与不同 LCFA 的结合结果 ( $n=3$ ) a 为  $P < 0.0001$ , 与空白对照组比较。

Figure 1. Detection of FAT/CD36 binding with different LCFA by ELISA ( $n=3$ )

### 2.2 FAT/CD36 结构蛋白模型

利用 Discovery Studio4.0 (DS) 中的 Clean Protein 工具对蛋白结构进行以下操作后获得相应 FAT/CD36 结构蛋白,其结构如图 2 所示。

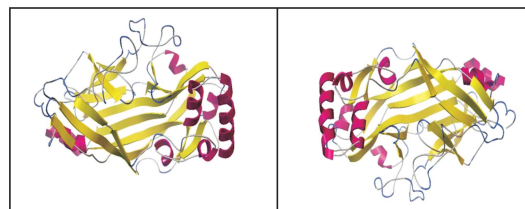


图 2. FAT/CD36 结构蛋白模型

Figure 2. FAT/CD36 structural protein model

### 2.3 FAT/CD36 结构蛋白与 LCFA 分子模拟对接情况

FAT/CD36 与不同 LCFA (图 3 中红色区域) 经 AUTODOCK 对接后, LCFA 进入由 Arg183-Lys-Gly-Lys-Arg-Asn-Leu-Ser-Tyr238 区域组成的活性口袋, 且油酸羧基端能够与活性口袋中 Arg183、Thr196、Thr197 形成氢键 (图 3A), 棕榈酸羧基端能够与 Tyr230、Lys231、Tyr238 形成氢键 (图 3B), 棕榈油酸羧基端能够与 Tyr230、Tyr238 形成氢键 (图 3C), 肉豆蔻酸羧基端能够与 Tyr230、Lys231、Tyr238 形成氢键 (图 3D), 硬脂酸羧基端能够与 Arg183 形成氢键 (图 3E)。其进行 100 次对接后结合能量均值分别为油酸为  $-4.16$  kcal/mol, 棕榈酸为  $-4.06$  kcal/mol, 棕榈油酸为  $-4.0$  kcal/mol, 肉豆蔻酸为  $-3.75$  kcal/mol, 硬脂酸为  $-3.35$  kcal/mol (图 4)。

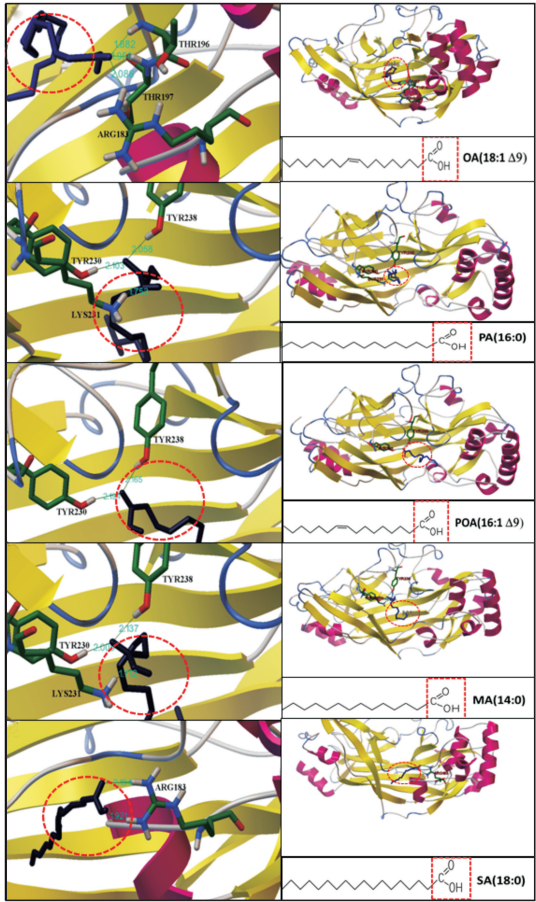


图 3. FAT/CD36 与不同脂肪酸分子对接  
Figure 3. The docking of FAT/CD36 with different fatty acids

### 3 讨论

FAT/CD36 是由 472 个氨基酸组成的相对分子量为 88 kDa 的跨膜糖蛋白, 它能够结合 LCFA、血小板反应蛋白、氧化型低密度脂蛋白等多种配体。其

C、N 末端均位于胞内, 且均具有一对半胱氨酸残基并发生棕榈酰化, 这对于 FAT/CD36 定位于胞膜窖和脂筏结构中发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。FAT/CD36 与 LCFA 胞外结合位点在它的中间段外残基 127~279 个氨基酸区间<sup>[5]</sup>。在 C-末端有两个泛素化位点, 其功能是招募信号分子如小窝蛋白, 形成对 LCFA 的识别、移位和吞噬摄取, 基因沉默与抑制剂实验显示 FAT/CD36 在 LCFA 识别、转运和吞噬过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

Allred 等<sup>[11]</sup>首次使用 ELISA 检测到脂肪组织 FAT/CD36 表达, Jay 等<sup>[12]</sup>通过利用表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 发现 FAT/CD36 可以与油酸、棕榈酸、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 等 LCFA 结合。且 FAT/CD36 受体蛋白包含多个 LCFA 结合位点。本研究通过 ELISA 实验证实 FAT/CD36 能够与 LCFA 结合, 且结合大小为油酸>棕榈酸>棕榈油酸>肉豆蔻酸>硬脂酸, 表明 FAT/CD36 可能主要结合油酸、棕榈酸以及棕榈油酸这三种 LCFA, 而对肉豆蔻酸与硬脂酸的结合能力显示较弱。

为了进一步验证上述实验的可靠性, 探讨 FAT/CD36 受体蛋白与 LCFA 结合机制, 该研究进行了分子模拟对接实验, 结果发现油酸、棕榈酸、棕榈油酸、肉豆蔻酸、硬脂酸与 FAT/CD36 受体结构蛋白结合过程中, 几种 LCFA 羧基端中的两个氧原子及氢原子均能与 FAT/CD36 受体结构蛋白胞外区域中 Arg183-Lys-Gly-Lys-Arg-Asn-Leu-Ser-Tyr238 疏水区活性口袋中的 230Tyr、231Lys、238Tyr 等几种重要氨基酸形成氢键。Pepino 等<sup>[13]</sup>通过使用 Phyre2 与 SwissDock 软件对 FAT/CD36 与 LCFA 中的 C18:1 脂肪酸进行对接, 证实了 C18:1 脂肪酸能够通过其疏水性凹槽中的转运通道进入细胞内, 当 FAT/CD36 第 231 位赖氨酸发生酰化后将会限制脂肪酸进入细胞内, 表明 FAT/CD36 第 231 位赖氨酸等结合 LCFA 的重要性。该研究结果与之相符, 显示 FAT/CD36 在脂质运输过程中可能扮演了一个通道的角色, 且运输位置位于其疏水区活性口袋。能量结合结果显示油酸、棕榈酸、棕榈油酸这三种 LCFA 结合的稳定能量均值高于其它肉豆蔻酸与硬脂酸两种脂肪酸, 在进行的 100 次对接过程中 FAT/CD36 结构蛋白活性口袋中的 Arg183、Thr196、Thr197、Tyr230、Lys231、Tyr238 等氨基酸均发挥重要作用。其中油酸、棕榈酸、棕榈油酸的羧基端“COOH”均能与上述 6 种氨基酸结合, 但油酸首要结合 Arg183、Thr196 和 Thr197 这 3 种氨基酸。油酸



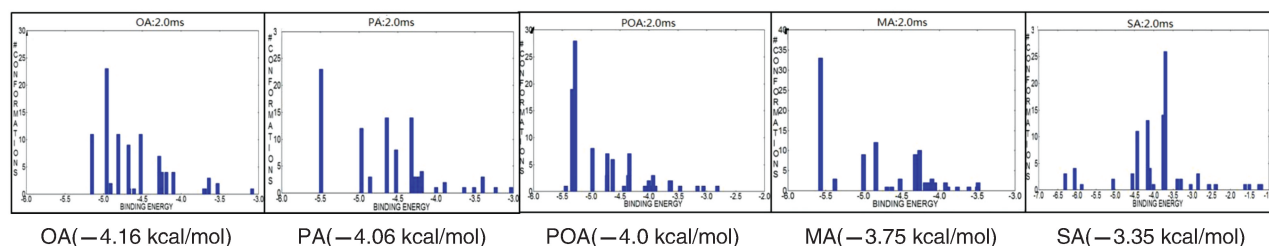


图 4. FAT/CD36 与不同脂肪酸结合能量值

Figure 4. The energy values of FAT/CD36 combined with different fatty acids

羧基端的“O”既能够与 Arg183 羧基端的“H”原子形成氢键;同时也能够与 Thr196、Thr197 氨基端的NH 形成氢键;棕榈酸、棕榈油酸羧基端“O”则能够与 230Tyr 和 238Tyr 羧基端的“H”形成氢键;棕榈酸羧基端氧能够与 231Lys 氨基“N”形成氢键;而肉豆蔻酸只能与 Tyr230、Lys231、Tyr238 氨基酸结合;硬脂酸绝大多数与 Arg183 结合,与其它 5 种氨基酸基本不结合。上述 5 种 LCFA 结合属性和能量值均表明 FAT/CD36 可能主要结合油酸、棕榈酸、棕榈油酸这 3 种 LCFA,初步证实了 ELISA 结合实验结果。肉豆蔻酸与硬脂酸结合能量值较低是否是由于其本身的结合属性决定还有待于进一步研究。

细胞水平研究结果证实了上述结论,研究显示棕榈酸能够增加 FAT/CD36 表达,加速胞内脂质积累<sup>[14]</sup>。在脂肪组织中,纯化的 FAT/CD36 与 LCFA 结合而不与短链脂肪酸结合<sup>[15]</sup>,CHO 细胞株过表达 FAT/CD36 能特异性摄取 LCFA<sup>[16]</sup>。日常饮食中油酸和棕榈酸两种 LCFA 占 90% 以上<sup>[17-18]</sup>。由此推测 FAT/CD36 过量摄取 LCFA 中的油酸与棕榈酸可能是导致脂质代谢紊乱性疾病的一个重要原因。

综上所述,FAT/CD36 在 LCFA 的转运过程中发挥着重要的作用,因此通过药物靶向抑制 FAT/CD36 结合 LCFA 及其表达可能成为治疗脂质代谢紊乱性疾病发生发展的一种新思路。本研究通过分子模拟对接技术和 ELISA 探讨 FAT/CD36 与不同 LCFA 的结合方式,确定 FAT/CD36 转运 LCFA 种类,为后期细胞和动物水平 FAT/CD36 转运 LCFA 研究提供实验依据,为 FAT/CD36 为靶点引起的脂质代谢紊乱性疾病的药物设计与治疗提供了新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Dante N, Michael S, Mani R, et al. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36 [J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 172-176.
- [2] Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(6): e99.

- [3] Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(11): 2 012-030.
- [4] Kazantzis M, Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(5): 852-857.
- [5] Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism; implications for metabolic disease[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1): 367-417.
- [6] Hsieh FL, Turner L, Bolla JR, et al. The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12837.
- [7] Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(3): 363-371.
- [8] Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(suppl 2): W 270-277.
- [9] Tao N, Wagner S J, Lublin DM. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(37): 22 315-320.
- [10] Eyre NS, Cleland LG, Tandon NN, et al. Importance of the carboxyl terminus of FAT/CD36 for plasma membrane localization and function in long-chain fatty acid uptake[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(3): 528-542.
- [11] Allred CC, Krennmayr T, Koutsari C, et al. A novel ELISA for measuring CD36 protein in human adipose tissue[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(2): 408-415.
- [12] Jay AG, Hamilton JA. The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: New insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL[J]. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 2016, doi: 10.1016/j.plefa.2016.05.005.
- [13] Pepino MY, Kuda O, Samovski D, et al. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism[J]. *Annu Rev Nutr*, 2014, 34: 281-303.
- [14] Wang C, Yong Y, Lin H, et al. Rapamycin-mediated CD36 translational suppression contributes to alleviation of hepatic steatosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447(1): 57-63.
- [15] Baillie AGS, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog [J]. *J Membr Biol*, 1996, 153(1): 75-81.
- [16] Eyre NS, Cleland LG, Mayrhofer G. FAT/CD36 expression alone is insufficient to enhance cellular uptake of oleate[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(3): 404-409.
- [17] Stump DD, Fan X, Berk PD. Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake[J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(4): 509-520.
- [18] Yang ZH, Miyahara H, Iwasaki Y, et al. Dietary supplementation with long-chain monounsaturated fatty acids attenuates obesity-related metabolic dysfunction and increases expression of PPAR gamma in adipose tissue in type 2 diabetic KK-Ay, mice [J]. *Nutr Metab*, 2013, 10(1): 16.

(此文编辑 文玉珊)