

荷脂细胞胆固醇外向转运的工作模式

廖端芳¹, 杨永宗²

(南华大学 1. 药物药理研究所, 2. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 荷脂细胞; 胆固醇外向转运; 小凹; 小凹蛋白 1; 清道夫受体 B1; 三磷酸腺苷结合盒 A1; 高密度脂蛋白; 载脂蛋白 A1

[摘要] 荷脂细胞外向转运胆固醇的能力是决定动脉粥样硬化进程与转归的关键。参与调控荷脂细胞胆固醇外向转运的蛋白质很多, 经归纳、整理, 我们提出“四个体系、一个中心、偶联转运、网络调控”的工作模式。即小凹蛋白 1 胞内转运体系、三磷酸腺苷结合盒 A1 跨膜转运体系、高密度脂蛋白受体(清道夫受体 B1)跨膜转运体系、高密度脂蛋白—载脂蛋白 A1 胞外转运体系和小凹转运中心。以小凹为转运枢纽, 小凹蛋白 1 胞内转运体系首先将胆固醇从胞内转运到细胞膜, 贮存于小凹; 位于小凹中心的清道夫受体 B1 跨膜转运体系和三磷酸腺苷结合盒 A1 跨膜转运体系随后将胆固醇交给高密度脂蛋白—载脂蛋白 A1 胞外转运体系; 四个转运体系之间进行网络调控。该工作模式为动脉粥样硬化性疾病的发生发展及治疗提供一个简明的工作思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Model and Regulation of Cholesterol Efflux from Lipid-loaded Cells

LIAO Duang Fang¹, and YANG Yong-Zong²

(1. The Institute of Pharmacy & Pharmacology, 2. The Institute of Cardiovascular Diseases, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Lipid-loaded Cells; Cholesterol Efflux; Caveolae; Caveolins; ATP Binding Cassette Transporter A1; Scavenger Receptor B1; High Density Lipoprotein; Apolipoprotein A1

[ABSTRACT] Cholesterol efflux from lipid-loaded cells is a key event associating with stability and subsidence of plaque. There are many proteins and factors participating in regulation of cholesterol efflux of lipid-loaded cells, which is very complex. We propose, by summarizing the recent research, a novel mode of “four systems and one center with coupling transportation and networking regulation”. The novel mode consists of 1) intracellular trafficking system of caveolin 1 complex, 2) transmembrane transporting system of ATP binding cassette transporter(ABC)-A1 complex, 3) transmembrane transporting system of scavenger receptor (SR)-B1 complex, 4) extracellular trafficking system of high density lipoprotein/apolipoprotein (HDL/Apo)-A1 and 5) caveolae transporting center. In brief, caveolin 1 complex system transports cholesterol from intracellular compartments to caveolae; both ABC-A1 and SR-B1 complex systems transfer cholesterol from caveolae to HDL/Apo-A1. There are networking regulation among four systems. This mode provides a simple and concise way to understand the dynamic process of atherosclerosis.

大量研究表明: 尽管动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一个多因素参与、多基因异常调控的复杂病理过程, 但巨噬细胞(由循环中单核细胞迁移至内膜下形成)和迁移到内膜下的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)吞噬脂质, 特别是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)后形成泡沫细胞仍然是最重要环节。从进化的角度讲, 巨噬细胞和 VSMC 摄取过多进入(或沉积于)血管内膜的脂质, 其本身是一种自我保护机制, 关键是巨噬细胞和 VSMC 摄取脂质后能否将其代谢并转运出去。巨噬细胞和 VSMC 从吞噬脂质到形成泡沫细胞需经过一个相对较长的时期, 处于这一时期的巨噬细胞和 VSMC, 其细胞内胆固醇不断增加并逐步酯化。普遍认为, 当细胞胆固醇酯占总胆固醇的比例超过 50% 时, 称为泡沫细胞。在此之前, 通常称

为荷脂(lipid-loaded)细胞。一般来说, 泡沫细胞胆固醇外向转运能力已经很低或接近丧失, 而荷脂细胞尚有较强的(早期)或一定的(中后期)外向转运胆固醇的能力。单核细胞和 VSMC 从迁移至内膜下开始吞噬脂质至演变成泡沫细胞的荷脂过程是决定 As 进程与转归的关键时期。关于这一时期细胞胆固醇外向转运的研究一直未取得突破, 研究发现参与荷脂细胞胆固醇外向转运的蛋白质很多, 包括小凹蛋白(caveolin)家族如 Caveolin 1 三磷酸腺苷结合盒转运体家族(ATP binding cassette transporter, ABC)、载脂蛋白家族如载脂蛋白 A1、HDL 受体家族如清道夫受体 B1(scavenger receptor class B type I, SR-B1)和 CD36 等, 胆固醇合成和代谢酶类如 LCAT、CETP、ACAT、LPL 等, 亲脂素家族, 核受体或核因子如 PPAR、LXR、RXR、FXR 等, 激酶类如 PKC 和 PKA, 以及固醇反应元件结合蛋白(SREBP)等。这些蛋白之间的相互作用并不十分清楚, 但它们都直接或间接参与胆固醇外向转运。

1 小凹与细胞胆固醇外向转运

小凹(caveolae)是细胞表面特异性脂筏结构, 富含胆固

[收稿日期] 2004-10-11

[基金项目] 国家 973 项目(G2000056905)和国家自然科学基金(39970847, 30171084, 30470719, 30470720)资助

[作者简介] 廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师。杨永宗, 教授, 博士研究生导师。

醇和磷脂,由细胞骨架蛋白 actin 与小凹蛋白(Caveolin) 1 间接耦联来维持它的内陷形态。如果用 actin 解聚药松胞素 D (cytochalasin D) 处理转染了带绿色荧光标记 Caveolin 的细胞,会发现 Caveolin 侧移,小凹结构变平^[1]。小凹还以许多非传统的内陷结构出现在大量细胞里,如骨骼肌细胞的葡萄串样结构、脂肪细胞的玫瑰花结、内皮细胞的管道结构等。巨噬细胞的小凹结构由 Caveolir 1 的表达情况来决定^[2]。

近年研究表明,小凹是细胞信号转导中心,与信号转导有关的受体、激酶及连接蛋白等在小凹区域高度富集。小凹还是游离胆固醇储运和流出的主要部位或“洗涤池”,很多与胆固醇摄取和流出相关的受体和蛋白如低密度脂蛋白(LDL)受体、SR-B1、ABC-A1 等在小凹区域高度富集。Fielding 等^[3,4]报道,当培养的成纤维细胞或单核-巨噬细胞与 LDL 一同孵育使整个细胞胆固醇增加 15% 时,Caveolir 1 mRNA 和蛋白表达水平平均上调,膜上小凹结构数倍增加,随后将这些细胞再与 HDL 共同孵育,小凹上的胆固醇则被移出到培养基中;如果用 Caveolir 1 反义寡核苷酸预先处理细胞,细胞小凹数目明显减少,胆固醇流出也下调。文献[5]报道,用钬酸盐破坏平滑肌和内皮细胞的小凹结构后,胆固醇流出减少 80%。我们观察到清道夫 A 受体转基因小鼠高脂饲养组血管内膜小凹结构明显少于正常饲养组,As 发生率却显著增高^[6]。因此,我们推测小凹是细胞内外胆固醇的转换中心。

2 高密度脂蛋白受体及结合蛋白

高密度脂蛋白(HDL)受体及结合蛋白包括 SR-B1、HDL 结合蛋白(HDL binding protein, HBP)和 CD36 等。其中 SR-B1 是被公认的 HDL 特异性受体^[7],由 509 个氨基酸残基构成,是一种跨膜糖蛋白。细胞膜上的结构如马蹄样,由 5 个区域构成: 一个大的环状细胞外区域(403 氨基酸残基),此区域有 9 个 N 端连接的糖基化位点,富含半胱氨酸,对于 HDL-C 的选择性摄取十分重要。④两个胞浆区(氨基端区和羧基端区)。⑤两个跨膜区,SR-B1 的跨膜区 N 端为 28 个氨基酸残基,C 端为 25 个氨基酸残基。

高密度脂蛋白(HDL)通过 SR-B1 锚定在细胞膜上,或提供或接纳胆固醇,运动方向取决于 HDL 及细胞表面胆固醇的密度梯度,具体机制不清。进一步研究发现 SR-B1 的胞外段除可与配体结合外,还可能形成疏水通道供胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)通过。文献[8]报道,SR-B1 介导的 CE 摄取的起始接受部位是细胞膜上的小凹,超过 80% 的 CE 由 SR-B1 摄取后首先累积于小凹。HDL 识别 SR-B1 后,SR-B1 通过亮氨酸拉链区形成二聚体,建立疏水通道,HDL 球型颗粒外面的磷脂膜与细胞外层形成半融合状态,CE 通过疏水通道沿浓度梯度转运至小凹,并与 Caveolin 结合。小凹形成含有 SR-B1、Caveolin 及 CE 的囊泡内陷至细胞内^[9]。将 CE 运输到胞内其它胆固醇池后,Caveolin 及 SR-B1 重新回到细胞表面进行下一个转运过程,从而完成 CE 的选择性摄取。同时,游离胆固醇则通过融合的磷脂膜在细胞和 HDL 之间交换。SR-B1 既可介导 CE 的选择性摄取(主要在肝细胞),又可介导胆固醇外流(主要在外周细胞)^[10]。Ji 等^[11]发现用鼠 SR-B1 转染 CHO 细胞后,胆固醇外流明显增强。转染 SR-

B1 的 COS-7 细胞外向转运胆固醇的能力也明显强于未转染组^[12]。并且在动物模型上观察到 SR-B1 基因敲除会进一步加重载脂蛋白 E 缺陷小鼠 As 病变,如果对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠移植 SR-B1^{+/+} 小鼠骨髓,会缩小粥样斑块,说明 SR-B1 可通过促进胆固醇流出缓解 As 病变^[13]。

同时,SR-B1 外向转运胆固醇的作用依赖其配体所含磷脂,用磷脂酶 A2 耗竭 HDL 上的磷脂酰胆碱(PC),会降低胆固醇外流^[14];贫脂的载脂蛋白 A1 尽管能与 SR-B1 结合,但并不诱导胆固醇流出^[15]。并且 SR-B1 调节的胆固醇外运作用对磷脂种类十分敏感。富含 PC 的 HDL 或鞘磷脂的 HDL 都可促进 SR-B1 调节的胆固醇流出,但前者诱导的胆固醇流出频率明显强于后者^[16]。上述资料提示,SR-B1 对胆固醇的调节作用可能主要与易化胆固醇从胞膜上解耦联、促进其向趋于成熟的 HDL 扩散有关。

3 三磷酸腺苷结合盒转运体家族

三磷酸腺苷结合盒转运体(ATP binding cassette transporter, ABC)属于 ABC 超家族,ABC 基因编码细胞内胆固醇流出调节蛋白(cholesterol efflux regulatory protein, CERP),介导许多作用底物如氨基酸、蛋白质、胆固醇、磷脂等的跨膜转运。目前已发现的 ABC 分为 A、B、C、D、E、F 六个家族,共 48 个成员;其中 ABC-A1 和 ABC-G1 负责胆固醇的出胞运动,ABC-G5 和 ABC-G8 促进胆管上皮细胞分泌胆固醇,利于排泄。整个家族中 ABC-A1 在脂质代谢中起的作用最重要,因为有关 Tangier 病和家族性 HDL 缺乏症基因缺陷的研究使人们认识到 ABC-A1 是调节和决定 HDL 浓度的一个重要因素^[17]。

三磷酸腺苷结合盒转运体(ABC) A1 属于整合膜蛋白,包括 2 个高度保守的细胞浆 ATP 结合盒(含 2 对助行器)和 2 个跨膜结构域,每个跨膜域由 6 个螺旋跨膜片段构成,其跨膜片段构成浆膜内液性通道壁,连通细胞外和浆膜内脂相。ABC-A1 以 ATP 为能源,将细胞内未酯化的胆固醇(游离胆固醇)和磷脂通过该通道转运至载脂蛋白 A1,形成新的 HDL,实现胆固醇的跨膜转运,被称作调控外周细胞胆固醇流出并进入逆转运(RCT)途径的“守门员”(gate keeper)^[18]。ABC-A1 蛋白是通过 2 个大的细胞外环,实现与载脂蛋白 A1 的交叉连接。Fitzgerald 等^[19]运用 4 个不同的突变转录子使胞外环结构域突变,失去与载脂蛋白 A1 交叉连接的能力,胆固醇流出随之减少。ABC-A1 直接与载脂蛋白 A1 相互作用是 ABC-A1 介导胆固醇流出所必需的,但并不是决定性步骤。只有完整的 ABC-A1 三磷酸腺苷激酶活性存在,才能保证结合到细胞表面的脂蛋白发挥促胆固醇流出的功能。并且 ABC-A1 蛋白性质不稳定,胞浆段蛋白表达序列标签(PEST)磷酸化后,易被钙激活蛋白酶、不饱和脂肪酸、胞内毒性水平的胆固醇等降解,PKA 和 PKC 等激酶促进其 PEST 脱磷酸化和 Ser-1024、Ser-2054 磷酸化,增加 ABC-A1 稳定性,加强胆固醇流出。ABC-A1 介导胆固醇跨膜外运还需脂的参与,与细胞膜上磷脂和胆固醇富集区如小凹密切相关^[20]。

三磷酸腺苷结合盒转运体(ABC) A1 诱导胆固醇跨膜外运的具体过程由两个工作模式来描述,一是分子流出,又称为两步转运模式:ABC-A1 先催化磷脂转移到脂蛋白上,构成

媒介复合物,然后该复合物从胆固醇富集区外移胆固醇,并与之结合逐步形成 HDL^[5];另一个是膜溶解,也称一步转运模式:磷脂和胆固醇作为两个不连续的单位,在 ABC-A1 介导下同时流动、扩散到脂蛋白上,组成磷脂、胆固醇和脂蛋白的三者复合物,该复合物在膜上运动带走大量胆固醇^[21]。第一个工作模式体现了 ABC-A1 作为磷脂转移酶,在诱导胆固醇流出过程中,磷脂的流出先于胆固醇转运;第二个工作模式有利于解释巨噬细胞胆固醇大量外流时并不出现膜磷脂的缺乏。两个工作模式各有优势。

文献[22]报道,ABC-A1 过量表达的转基因动物体内 HDL 浓度升高,动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞胆固醇酯沉积减轻;转 ABC-A1 基因到载脂蛋白 E 敲除小鼠可明显缩小粥样斑块。我们发现油酸可减少 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABC-A1 表达,同时伴有细胞内胆固醇外向转运降低^[23]。而 22(R)-羟基胆固醇促进 THP-1 细胞 ABC-A1 mRNA 的表达和胆固醇外流^[24]。提示 ABC-A1 可能主要介导细胞膜和 HDL 之间的胆固醇交换。

三磷酸腺苷结合盒转运体(ABC)-A1 不仅促进胆固醇的跨膜外运,也诱导胞内胆固醇向胞膜的运动。Neufeld 等^[25]发现用带绿色荧光标记的 ABC-A1 腺病毒载体转染 Tangier 病患者的纤维原细胞后,可修正内涵体向胞膜的转运功能并恢复载脂蛋白 A1 介导的胆固醇流出。如果转染正常纤维原细胞,然后用荧光标记的载脂蛋白 A1 孵育,可观察到 ABC-A1 与载脂蛋白 A1 共同着位于内涵体,胆固醇外流增加。说明 ABC-A1 可促进内吞的载脂蛋白 A1 以新生 HDL 形式外释。ABC-A1 还可影响细胞膜的构成,升高细胞膜外层(extracellular leaflet)磷脂和胆固醇的分布^[26]。

4 高密度脂蛋白和载脂蛋白

胆固醇逆向转运的关键步骤是将胆固醇从细胞转移到脂蛋白上,各类脂蛋白的重要组分是载脂蛋白。不同的脂蛋白所含载脂蛋白的种类和数量都不相同,包括载脂蛋白 A、载脂蛋白 B、载脂蛋白 C 和载脂蛋白 E 等。其中载脂蛋白 A1 是 HDL 的主要载体和胆固醇重要的接受体,它可与 SR-B1 和 ABC-A1 耦联完成胆固醇的跨膜过程。

载脂蛋白 A1 包含 243 个氨基酸,C 末端的 209~219 和 220~241 两段氨基酸被脯氨酸残基分割成两性 α 螺旋^[27];这两段多肽与脂有高度亲和力,还可被 SR-B1、ABC-A1 识别。两性 α 螺旋结构与 SR-B1 结合后既可形成疏水通道,促进 HDL-CE 向胞内扩散和胆固醇的出胞运动;又可激活 DG/PKC 信号通路,通过 PKC 激酶,促进胆固醇外运^[28]。载脂蛋白 A1 与 ABC-A1 结合后,可增加后者稳定性,也提高其功能。在细胞没受刺激或荷脂不太多时,载脂蛋白 A1 通过活化磷脂酰胆碱磷脂酶 C(PC-PLC),水解磷脂产生二酰甘油(DG),进一步激活 PKC,加速 ABC-A1 磷酸化,增加 ABC-A1 稳定性和胆固醇流出功能。但当大量胆固醇流入细胞时,ABC-A1 与激动型 G 蛋白的 α 亚基($G_{\alpha s}$)偶联在一起,载脂蛋白 A1 与其组成复合物,激活酰基酸环化酶,cAMP 增多,进一步活化 PKA,PKA 可促进 ABC-A1 磷酸化,防止 ABC-A1 的降解,促进磷脂和胆固醇流出^[29]。

高密度脂蛋白(HDL)/SR-B1 和载脂蛋白 A1/ABC-A1 两条途径共同调节胆固醇的跨膜转运。调控这两条通路的因素很多,包括血清 HDL 颗粒大小、HDL 所含胆固醇的量、以及总胆固醇浓度等。当细胞膜上胆固醇着位超过 20% 时,SR-B1 依赖的胆固醇流出途径受阻;>80% 时,ABC-A1 表达减少、降解增多,ABC-A1 依赖的胆固醇流出途径受阻^[30]。Yancey 等^[31]发现在载脂蛋白 A1 转基因鼠上过表达内皮脂肪酶后,血清磷脂/载脂蛋白 A1 比值、总胆固醇和 HDL 的胆固醇都分别下调 60%、89% 和 91%,ABC-A1 介导的胆固醇流出增加 63%,SR-B1 诱导的胆固醇流出下调 90%;但如果过表达磷脂酰丝氨酸磷脂酶,结果恰好相反。载脂蛋白 A1 不仅参与胆固醇的跨膜转运,也诱导胞内和胞外胆固醇运动。载脂蛋白 A1 可上调 Caveolir 1 的表达,它和磷脂的复合体与 HDL 受体结合后可触发游离胆固醇从细胞内池转移到细胞表面的复杂过程^[32];载脂蛋白 A1 还是卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)的激活剂,可使血浆 HDL 从外周组织接收的游离胆固醇转变成胆固醇酯^[33],从而促进胆固醇逆向转运。

5 小凹蛋白 1 及其胞内转运复合物

小凹蛋白(Caveolir)1 是分子质量为 21~24 kDa 的多功能信号蛋白,为小凹蛋白家族最重要的成员,富集于细胞膜特异结构小凹、内质网和高尔基体,并可在胞浆与胞膜之间穿梭,其功能与其酪氨酸磷酸化程度密切相关。Caveolin 的氨基酸序列中包括一段长达 33 个氨基酸的疏水区域,该疏水区域两端均带有一个脯氨酸残基,借助此两个脯氨酸残基形成一个 N 末端、C 末端均面向胞浆的发夹结构。借助疏水区不足以将 Caveolir 1 牢固结合在胞膜上,Schlegel 通过广泛的缺失/突变研究发现 82~101(N-MAD,N-terminal membrane attachment domain)和 135~150(C-MAD)氨基酸残基参与蛋白与膜的结合,并且 N-MAD 是 Caveolin 蛋白序列上高度保守的骨架区域(scaffolding domain)。这一区域在正常情况下可使 Caveolin 象分子伴侣一样,结合并失活一些细胞内信号转导的重要分子,如 Src 家族酪氨酸激酶、G 蛋白的 α 亚单位、PKC α 、PKA 和 H-Has 等,从而负性调节信号传导^[34]。绞手架区域也是 CAV 与脂类相结合所必须的,蛋白与磷脂竞争结合 Caveolin 上相同的结构域,如何调节还不清楚。

Fu 等^[35]报道,Caveolir 1 质粒转染 HepG2 细胞后,胞内胆固醇酯化下调 50%,胞内胆固醇向胞膜区聚集增多,外流也随之增加。文献[36]报道,天然缺乏 Caveolir 1 的 L1210J 细胞株不能够将胞内合成的胆固醇迅速转运出胞,但细胞一旦转染 Caveolir 1 的 cDNA 后,就具备了将胆固醇快速外运到细胞膜的作用。我们用 50 mg/L α -LDL 与培养的 VSMC 孵育不同时间,发现用 α -LDL 处理的早期,Caveolir 1 表达有所增加,并且在细胞内的空间分布发生改变,胞膜区相对增加。但随着处理时间的延长,特别是细胞泡沫化时,Caveolir 1 表达明显减少。转染 Caveolir 1 表达质粒的 VSMC-Pc+CAV 细胞,经相同量的 α -LDL 处理后,细胞内脂滴明显少于未转染组和空载质粒组^[37]。

小凹蛋白(Caveolir)1 转运胆固醇出胞运动主要有两种方式:一种是囊泡形式^[38],另一种复合物形式^[39]。Caveolir 1

可跨内质网膜,促进内质网装配的脂滴以出芽形式离开内质网,并随同 Adipophilin 一起覆盖在脂滴表面,携带脂滴以囊泡形式向胞膜转运^[40]。Pol 等^[41]发现结构突变的 Caveolin 出现在胞内脂滴膜上时,启动了大量的胆固醇由胞膜向内涵体转运,伴随胆固醇合成和流出都减少,引起胞内胆固醇聚集。可见与脂滴耦联的 Caveolin 对于调控胆固醇代谢平衡和脂的转运都十分重要。Smart^[39]实验室还发现 Caveolir 1 可与 Cyclophilin A、Cyclophilin 40 和热休克蛋白 56 形成胆固醇转运复合物,参与细胞内胆固醇外向转运。但在胞膜上只有组成该复合物的两种蛋白 Caveolir 1 和 Cyclophilin A 存在。说明:

该复合物在胞浆与胞膜之间存在穿梭与解聚;④Caveolir 1 和 Cyclophilin A 在该复合物形成和细胞内胆固醇转运过程中起主要作用(均在胞膜中存在)。上述资料提示,Caveolin 是介导胞内胆固醇向胞膜移行关键蛋白。

6 亲免素(immunophilins)家族

参与细胞胆固醇转运的有 Cyclophilin A 和 Cyclophilin 40。Cyclophilin A 系分子质量为 18 kDa 的蛋白质,其结构中含一个 Caveolin 结合区和一个特异的热休克蛋白结合区^[42]。它是肽脯氨酸异构酶(peptidyl prolyl cis-trans isomerase, PPIase),可使脯氨酸发生顺一反式变化,能参与蛋白折叠,是已知钙调神经磷酸酶(Calcineurin)活性的重要抑制物。而钙调神经磷酸酶活性增高能有效抑制 PPAR γ 的表达及活性,后者通过 LXR 调控 SR-B1、ABC-A1 和 CD36 等的转录。并且 Cyclophilin A 的抑制剂环孢霉素 A 抑制载脂蛋白 A1 诱导的胞内胆固醇外运,以及与 HDL 结合的过程^[32]。这提示,Cyclophilin A 不但参与 Caveolir 1 胆固醇转运复合物的形成,还可能参与 SR-B1 和 ABC-A1 介导的胆固醇跨膜转运的调控。

7 卵磷脂胆固醇酰基转移酶和胆固醇酯转运蛋白

与胆固醇代谢有关的酶类很多,除卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)和胆固醇酯转运蛋白(CETP)外,还有脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)、乙酰胆固醇酰基转移酶(ACAT)等,参与胆固醇外向转运的酶主要是 LCAT 和 CETP。LCAT 催化的基本化学反应是将一个酰基供体上的酰基基团转移至另一个酰基受体,如 HDL 颗粒中从卵磷脂到胆固醇的酯酰基转移反应。LCAT 通过促使盘状和小球状的新生 HDL(HDL₃)转化为成熟的球状 HDL(HDL₂),减少血浆 HDL 游离胆固醇的浓度,构成胆固醇从细胞膜流向血浆脂蛋白的浓度梯度,有利于细胞胆固醇外向转运。CETP 促使血浆脂蛋白间胆固醇酯(CE)和甘油三酯(TG)转运与交换,包括将 CE 从 HDL 转移至 VLDL、乳糜微粒(CM)及残粒,最后至 LDL;而 TG 从 VLDL、CM 转移至 HDL。在 CETP 作用下经 LCAT 催化生成的 CE 可转运至富含 TG 的脂蛋白,流向残粒和 LDL,最终通过肝脏相应受体摄取这些 CE 完成逆向转运^[44]。脂蛋白脂酶(LPL)是血循环中内源性甘油三酯(TG)代谢酶,主要分解乳糜微粒(CM)和 VLDL 中的 TG,并在脂蛋白之间转移胆固醇、磷脂及载脂蛋白。其代谢产物游离脂肪酸(FA)为组织提供能量,或再酯化为 TG 储存到脂肪组织中。代谢后的 VLDL 转变为 LDL,分解后的 CM 表面脂质脱落,形成新生 HDL。我

们研究发现脂蛋白脂酶诱导剂 NO-1886 能升高高胆固醇喂养大鼠血浆 LPL 活性,降低血浆 TG 水平,升高 HDL 水平;并抑制冠状动脉 As 病变^[45,46]。LCAT、CETP 和 LPL 主要由肝脏合成且存在于血液中,并不直接参与巨噬细胞和 VSMC 胆固醇的跨膜转运。

8 核受体或核因子

参与调控胆固醇外向转运的核受体或核因子很多,包括类视黄醇 X 受体(RXR)、肝 X 受体(LXR)、过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)等。LXR 是一种氧化固醇激活的核受体,与 RXR 结合形成杂合二聚体,再结合 DR-4(direct repeat response element)启动转录活性,可激活很多与细胞胆固醇外向转运相关蛋白质(如 ABC-A1)的表达^[47,48]。LXR 的主要激活剂有氧化固醇、PPAR γ 等;RXR 主要由类视黄醇酸激活。PPAR 有三种同型异构体,PPAR γ 、PPAR δ 和 PPAR α ,其中 PPAR γ 参与对 ABC-A1 的调控^[49],亦有研究显示 PPAR δ 促进细胞内胆固醇外向转运和增加细胞内脂质聚集^[50]。核因子受体主要在转录水平参与对胆固醇外向转运的调控,而不直接参与胆固醇的外向转运。

9 影响或参与胆固醇外向转运的其它蛋白或因子

9.1 Adipophilin

Adipophilin 又称脂肪分化相关蛋白(ADRP),由 Jiang 等于 1992 年发现。2000 年 9 月,Shiffman 等用 α -LDL 与 THP-1 细胞孵育形成泡沫细胞模型,将这种细胞的 RNA 与含 9808 个人类基因的芯片杂交后,发现有 268 个基因在一个或多个时间点表达显示 2 倍以上的改变。其中,只有 Adipophilin 一个基因在与 α -LDL 孵育 30 min 时即有 2 倍以上表达升高,在连续 4 天的观察过程中,Adipophilin 始终是表达最高的基因。泡沫细胞内的脂质以脂滴的形式存在,脂滴外面包裹一些膜蛋白,其中 Adipophilin 是最主要的膜蛋白。Adipophilin 通过 PKC 参与细胞内脂滴代谢的调节,是脂质在细胞内积聚和移动的标志物。最近,文献报道 Adipophilin 可阻止 THP-1 巨噬细胞脂质流出和增加脂质聚集,其作用与脂质流出相关基因的表达无关^[51]。Adipophilin 的表达受 PPAR γ /RXR 二聚体激活的调节^[52]。

9.2 胆固醇调节元件结合蛋白

胆固醇调节元件结合蛋白(SREBP)是膜结合的转录因子和细胞内胆固醇代谢的重要调控蛋白,它定位于内质网,由调节亚基和 DNA 结合亚基构成。调节亚基对细胞内游离胆固醇浓度高度敏感,当细胞内游离胆固醇浓度下降时,调节亚基与 DNA 结合亚基分离,后者进入核内与目的基因序列中 SRE 元件结合,调控基因转录^[53,54]。Caveolin 的基因序列上也存在固醇反应元件(SRE),能被 SREBP 识别,下调 Caveolin 的表达。目前已知胆固醇合成酶、LDL 受体、HMG-CoA 还原酶等的表达均通过这一机制进行调控。并且 SREBP-1 受 LXR、PPAR γ 等受体调节。

9.3 磷脂

研究发现,若用中性的不含载脂蛋白的磷脂双层脂质体

作用于细胞,虽然无法与 SR-B1 或 ABC-A1 结合,但同样可刺激胆固醇的外流。但如果用抗体阻断结合,同时也阻断了胆固醇外流到脂蛋白^[55],说明磷脂在介导胆固醇外流中也至关重要。另外,cAMP、蛋白激酶 C 和蛋白激酶 A 通过调节 ABC-A1 等蛋白活性或信号通路也参与对胆固醇外向转运的调控^[56-58]。

10 细胞胆固醇外向转运工作模式

综上所述,很多蛋白质参与了细胞胆固醇外向转运的过程,但哪些是最关键的蛋白质以及它们在胆固醇转运过程中的作用和相互关系并不十分清楚。我们通过大量阅读文献,归纳总结国内外最新进展,并结合我们多年的研究结果,认为细胞胆固醇外向转运主要由 Caveolir 1 胞内转运体系、SR-B1 跨膜转运体系(或 HDL 受体跨膜转运体系)、ABC-A1 跨膜转运体系、HDL 胞外转运体系和小凹转运中心组成,并提出“四个体系、一个中心、偶联转运、网络调控”的细胞胆固醇外向转运工作模式(图 1,见目次 彩图)。其要点如下:(1)小凹蛋白 1 胞内转运体系。该体系主要由 Caveolir 1/cyclophilin A/cyclophilin 40/HSP56 胆固醇转运复合物构成,可能还有未知关键蛋白质参与。主要参与胆固醇从胞浆向胞膜的转运,受胆固醇调节元件结合蛋白(SREBP)等的调节。(2)清道夫受体 B1 跨膜转运体系(HDL 受体跨膜转运体系)。该体系以 SR-B1 为核心,可能还有未知关键蛋白质参与。其接受体为富含脂质(磷脂)的载脂蛋白(lipidated apolipoproteins),可双向进行胆固醇酯的摄取和游离胆固醇的流出。以摄取为主,净流出方向依据跨膜胆固醇浓度梯度。受 PPAR- γ 和 HDL 等的调节。(3)ABC-A1 跨膜转运体系。该体系以 ABC-A1 为核心,可能还有未知关键蛋白质参与。其接受体为贫脂的载脂蛋白(lipid-poor apolipoproteins),主要介导游离胆固醇和磷脂偶联外向转运,需 ATP 供能。受 PPAR- γ 、LXR、cAMP 和 HDL 等的调节。(4)小凹转运中心。细胞膜上的小凹(Caveolae)为胆固醇的贮存转运中心,上述三个转运体系的主要蛋白质 Caveolir 1、ABC-A1 和 SR-B1 均富集于小凹结构,Caveolir 1、ABC-A1、SR-B1 和胞外转运体系中胆固醇的主要接受体 HDL 均可通过这个中心进行胆固醇交换和信息交换。(5)HDL 胞外转运体系。主要由含载脂蛋白 A1(载脂蛋白 A1)较高的 HDL 组成。卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)、胆固醇酯转运蛋白(CETP)、脂蛋白脂酶(LPL)和 LDL 等参与。主要接受从跨膜转运体系转运而来的胆固醇,并最终转运至肝脏。(6)四个转运体系对细胞内胆固醇进行耦联转运。即 Caveolir 1 胞内转运体系将胆固醇从胞内转运到细胞膜,贮存于小凹。位于小凹中心的 SR-B1 跨膜转运体系和 ABC-A1 跨膜转运体系将胆固醇交给胞外转运体系的接受体 HDL。(7)四个转运体系之间进行网络调控。

[致谢] 虔勤慧博士为本文收集、整理大量资料;罗迪贤硕士为本文作图。

[参考文献]

- [1] Deurs B van, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol*, 2003, **13** (2): 92-100
- [2] Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, 2002, **54** (3): 431-467
- [3] Fielding CJ, Bist A, Fielding PE. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (8): 3 753-758
- [4] Fielding PE, Fielding CJ. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry*, 1995, **34** (44): 14 288-292
- [5] Fielding PE, Nagao K, Hakamata H, Chimini G, Fielding CJ. A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry*, 2000, **39** (46): 14 113-120
- [6] 王蓉蓉,严鹏科,廖端芳. Caveolae/Caveolir 1 在清道夫受体转基因小鼠动脉粥样硬化发生中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 461-464
- [7] Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996, **271** (5248): 518-520
- [8] Gu X, Trigatti B, Xu S, Acton S, Babitt J, Krieger M. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I require not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem*, 1998, **273** (41): 26 338-348
- [9] Graf GA, Connell PM, van der Westhuyzen DR, Smart EJ. The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high-density lipoproteins cholesterol esters into caveolae. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 12 043-048
- [10] Trigatti B, Covey S, Rizvi A. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochem Soc Trans*, 2004, **32**: 116-120
- [11] Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 1997, **272** (34): 20 982-985
- [12] Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Connelly MA, Stoudt G, Christian AE, Haynes MP, et al. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry*, 2000, **39** (1): 221-229
- [13] Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, et al. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2003, **108** (18): 2 258-263
- [14] Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, et al. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem*, 2000, **275** (47): 36 596-604
- [15] de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res*, 1999, **40** (3): 575-580
- [16] Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 712-719
- [17] Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 2004, **53** (3): 235-243
- [18] Oram JF, Lawn RM. ABC-A1, the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res*, 2001, **42** (8): 1 173-179
- [19] Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A1. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 33 178-187
- [20] Drobnik W, Borsukova H, Bottcher A, Pfeiffer A, Liebisch G, Schutz GJ, et al. Apo A1/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic*, 2002, **3**: 268-278
- [21] Gillotte KL, Zaiou M, Lum-Katz S, Anantharamaiah GM, Holvoet P, Dhoest A, et al. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization: role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 2 021-028
- [22] Joyce CW, Amar MJ, Lambert G, Vaisman BL, Paigen B, Najjar-Fruchart J, et al. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the develop-

- ment of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (1): 407-412
- [23] 唐朝克, 杨峻浩, 易光辉, 王佐, 刘录山, 万载阳, 等. 油酸对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达和胆固醇流出的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **35** (12): 1 077-082
- [24] 唐朝克, 贺修胜, 易光辉, 王佐, 袁中华, 刘录山, 等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 940-944
- [25] Neufeld EB, Stonik JA, Demosky SJ Jr, Knapper CL, Combs CA, Cooney A, et al. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem*, 2004, **279** (15): 15 571-578
- [26] Smith JD, Waelde C, Horwitz A, Zheng P. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem*, 2002, **277** (20): 17 797-803
- [27] Bocharov AV, Baranova IN, Vishnyakova TG, Remaley AT, Csako G, Thomas F, et al. Targeting of scavenger receptor class B type I by synthetic amphipathic α helical containing peptides blocks LPS uptake and LPS-induced proinflammatory cytokine responses in THP-1 monocyte cells. *J Biol Chem*, 2004 [Epub ahead of print]
- [28] Yamauchi Y, Hayashi M, Aberdohmae S, Yokoyama S. Apolipoprotein A1 activates protein kinase C α signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J Biol Chem*, 2003, **278** (48): 47 890-897
- [29] Haidar B, Denis M, Marcil M, Krimbou L, Genest J Jr. Apolipoprotein A1 activates cellular cAMP signaling through the ABCA1 transporter. *J Biol Chem*, 2004, **279** (11): 9 963-969
- [30] Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J Biol Chem*, 2002, **277** (45): 43 271-280
- [31] Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, et al. In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 2004, **45** (2): 337-346
- [32] Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R, Yokoyama S. Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid, and caveolin 1 to cytosol in rat astrocytes. *J Biol Chem*, 2002, **277** (10): 7 929-935
- [33] Chisholm JW, Paterniti JR, Dolphin PJ. Accumulation of cholesteryl lipoproteins in ANIT-treated human apolipoprotein A-I transgenic rats is diminished through dose-dependent apolipoprotein A-I activation of LCAT. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1 487** (2-3): 145-154
- [34] Babak R, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. *Pharmacol Rev*, 2002, **54**: 431-467
- [35] Fu Y, Hoang A, Escher G, Parton RG, Krozowski Z, Sviridov D. Expression of caveolin 1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem*, 2004, **279** (14): 14 140-146
- [36] Uittenbogaard A, Smart EJ. Palmitoylation of caveolin 1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem*, 2000, **275** (33): 25 595-599
- [37] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin 1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 379-383
- [38] van Meer G. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol*, 2001, **152** (5): F29-34
- [39] Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem*, 1998, **273** (11): 6 525-532
- [40] Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol*, 2001, **11** (11): R446-449
- [41] Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol*, 2001, **152**: 1 057-070
- [42] Kallen J, Walkinshaw MD. The X-ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human cyclophilin A. *FEBS Lett*, 1992, **300** (3): 286-290
- [43] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 1989, **337** (6206): 473-475
- [44] Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. *Curr Opin Lipidol*, 2001, **12** (4): 377-382
- [45] Yin WD, Liao DF, Wang ZB, et al. Nr1886 inhibits size of adipocytes, suppresses plasma levels of tumor necrosis factor- α and free fatty acids, improves glucose metabolism in high fat/high sucrose-fed miniature pigs. *Pharmacol Res*, 2004, **49** (3): 199-206
- [46] Yin WD, Liao DF, Kusunoki M, et al. Nr1886 decreases ectopic lipids deposition and protects pancreatic cell in diet-induced diabetic swine. *J Endocrinol*, 2004, **180** (3): 399-407
- [47] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 12 097-102
- [48] Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, 2000, **289** (5484): 1 524-529
- [49] Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator activated receptor γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 1998, **391**: 82-86
- [50] Olive JWR, Shank JL, Snaith MR, et al. A selective peroxisome proliferator activated receptor agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 5 306-311
- [51] Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart JC, et al. Adipophilin enhance lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 Macrophage: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 504-510
- [52] Bildirici I, Roh CR, et al. The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor- γ /retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**: 6 056-062
- [53] Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 10 693-698
- [54] Yokoyama C, Wang X, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low-density lipoprotein receptor gene. *Cell*, 1993, **75**: 187-197
- [55] Zhao Y, Sparks DL, Marcel YL. Specific phospholipid association with apolipoprotein A1 stimulates cholesterol efflux from human fibroblasts. Studies with reconstituted sonicated lipoproteins. *J Biol Chem*, 1996, **271** (41): 25 145-151
- [56] Haidar B, Denis M, Krimbou L, Marcil M, Genest J Jr. cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lipid Res*, 2002, **43** (12): 2 087-094
- [57] Yamauchi Y, Hayashi M, Aberdohmae S, Yokoyama S. Apolipoprotein A1 activates protein kinase C α signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J Biol Chem*, 2003, **278** (48): 47 890-897
- [58] See RH, Caday-Malcolm RA, Singaraja RR, et al. Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem*, 2002, **277** (44): 41 835-842

(此文编辑 胡必利)