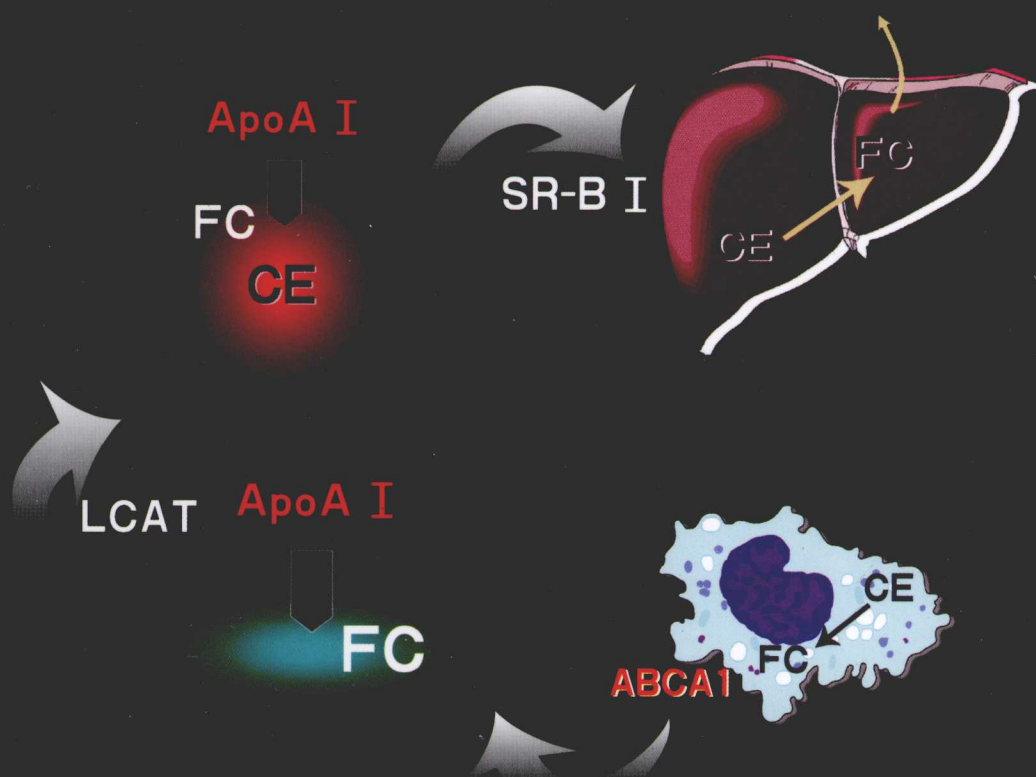


胆固醇逆向转运基础与临床

主编 廖端芳 唐朝克



科学出版社

www.sciencepress.com

中国物流转运基础与实务

主编 杨建民 副主编 陈国文



中国物流转运基础与实务

胆固醇逆向转运基础与临床

主 编 廖端芳 唐朝克
副主编 袁中华 易光辉 王 佐

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

胆固醇逆向转运是动脉粥样硬化发病的重要环节,但仍有许多理论及机制问题需进一步探讨。本书内容涵盖胆固醇逆向转运过程中的相关受体、酶及关键蛋白质分子的结构、功能、调控及其与疾病的关系等方面,比较详细地阐述胆固醇逆向转运的基本理论及其相关蛋白质分子和信号通路的研究进展,全面介绍胆固醇逆向转运的研究成果、发展方向及与动脉粥样硬化发生发展的关系。

本书在内容上兼顾基础和临床,同时介绍相关的研究方法,既可作为心血管疾病科研工作者的指导用书,也可作为广大临床工作者和医学生的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

胆固醇逆向转运基础与临床 / 廖端芳, 唐朝克主编. —北京: 科学出版社, 2009

ISBN 978-7-03-024763-6

I. 胆… II. ①廖…②唐… III. 胆固醇—控制—研究 IV. R151.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 096979 号

策划编辑: 沈红芬 / 责任编辑: 王 霞 / 责任校对: 包志虹

责任印制: 刘士平 / 封面设计: 黄 超

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2009 年 8 月第一次印刷 印张: 25 1/4

印数: 1—3 000 字数: 592 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《胆固醇逆向转运基础与临床》编写人员

主 编 廖端芳 唐朝克

副主编 袁中华 易光辉 王 佐

编 者 (以编写章节先后顺序排名)

廖端芳 南华大学药物药理研究所
生命科学研究中心

龙石银 南华大学生物化学教研室

胡炎伟 南华大学心血管病研究所

田国平 南华大学第二附属医院

陈临溪 南华大学药物药理研究所

唐朝克 南华大学心血管病研究所
生命科学研究中心

易光辉 南华大学心血管病研究所

虞勤慧 南华大学药物药理研究所

孙少卫 南华大学生命科学研究中心

杨 琼 南华大学心血管病研究所

武春艳 南华大学心血管病研究所

刘录山 南华大学心血管病研究所

赵战芝 南华大学心血管病研究所

姜志胜 南华大学心血管病研究所

袁中华 南华大学心血管病研究所

莫中成 南华大学心血管病研究所

王 双 南华大学心血管病研究所

尹卫东 南华大学心血管病研究所

王 佐 南华大学心血管病研究所

尹 凯 南华大学诊断学教研室

危当恒 南华大学心血管病研究所

顾洪丰 南华大学心血管病研究所

谢志忠 南华大学药物药理研究所

序 一

迈入新的世纪以来，尽管人类文明不断发展，医学技术有了很大的进步，但是心血管疾病仍是威胁人类健康的最大隐患，防治心血管疾病是人类社会亟待解决的难题。就目前的研究来看，心血管疾病多是由动脉粥样硬化导致的慢性病，可引起致残、致死的严重后果，对动脉粥样硬化的研究是心血管疾病防治的热点之一。关于动脉粥样硬化的发病机制，目前尚未确定其直接原因，迄今已经发现了300多种危险因素，其中血脂异常被确定为动脉粥样硬化发病的“主要的独立危险因素”。胆固醇逆向转运障碍是导致血脂异常和血管壁脂质沉积的关键环节，阐明胆固醇逆向转运所涉及物质，可以为动脉粥样硬化发病机制研究和相关药物筛选提供新的线索，无论对动脉粥样硬化的预防还是治疗都有重要意义。

近十几年来，随着心血管的分子生物学、细胞生物学、病理生理学和药理学等学科的发展，胆固醇逆向转运的研究取得长足进展，出现了很多新概念、新观点和新知识。本书的编者均为我国从事该研究的非常活跃的年轻学者，他们掌握了细胞生物学和分子生物学的先进技术，并且多有在国外先进实验室学习的经历，发表过许多有影响的学术论文。编者从胆固醇逆向转运的诸多环节进行了较全面和系统的阐述，例如，胆固醇逆向转运和细胞内胆固醇代谢相关蛋白、基因的分子结构，酶的功能，基因多态性，与动脉粥样硬化或者心血管疾病的关系等，力求给读者提供较详尽的新资料。相信本书的出版会为心血管疾病的基础研究和临床研究工作带来诸多便利，为知识更新和形成新的科研思路及新药设计提供有力的帮助。

北京大学医学部

唐朝枢

2009年5月

序 二

血脂异常是动脉粥样硬化的一个重要危险因素，而胆固醇逆向转运是体内脂质代谢重要的途径之一。近年来，随着细胞生物学与分子生物学等相关学科的发展，动脉粥样硬化的发病机制及防治研究越来越深入，目前临床上将胆固醇逆向转运过程中的一些重要蛋白质和酶类作为新的用药靶点进行了药物干预，开创了治疗动脉粥样硬化性疾病的新局面。在这种形势下，迫切需要有一本能从胆固醇逆向转运的角度阐述动脉粥样硬化发病机制及防治靶点方面的专著。最近，有幸拜读南华大学廖端芳、唐朝克教授等编写的《胆固醇逆向转运基础与临床》一书，倍感欣慰。该书以细胞内胆固醇的来源为起点，阐述C型尼曼-皮克病蛋白、固醇载体蛋白2、三磷酸腺苷结合盒转运体A1等近二十种与胆固醇逆向转运相关的蛋白质，详细介绍它们的结构、功能、调节及其与动脉粥样硬化的关系，同时融入大量新的研究成果，为读者提供有关胆固醇逆向转运过程中相关蛋白质及调控机制的全面系统认识，同时帮助读者了解该领域的研究前沿状态。书中还介绍了胆固醇逆向转运相关研究方法及调控胆固醇转运的相关药物，既能为相关领域研究工作者提供研究理论和方法指导，又能为临床工作者寻找相关的治疗靶点及用药提供帮助。

本书主编及各章节的作者均从事该领域各方面的相关研究工作多年，研究成果颇丰，书中内容除参考大量国内外文献之外，还融合了他们自己的实验成果。全书共21章，50余万字，内容丰富，编写起点高，相信对认识胆固醇逆向转运与动脉粥样硬化的关系和寻找动脉粥样硬化的防治靶点会有很大的启发，将为读者提供广阔的思索空间和具体的方向引导。本书很值得医学研究工作者、临床医师及医学院校的教师参考阅读，我深信本书的出版会受到广大读者的欢迎，故乐为之序，并予推荐。

中国病理生理学会动脉粥样硬化委员会主任委员

国际动脉粥样硬化学会中国分会主席

《中国动脉硬化杂志》主编

杨永宗

2009年5月

前 言

南华大学在杨永宗教授的带领下，自 20 世纪 70 年代初开始动脉粥样硬化病因发病学与防治的研究，在病理模型、发病机制及药物蛋白质组学研究等方面取得了具有一定国际影响的成绩，特别是在胆固醇逆向转运方面形成了自己的特色，已成为国内动脉粥样硬化研究的重要基地，培养了一大批中青年学术骨干，初步形成了一个年龄、学缘、学历、职称等诸要素优化组合的研究团队，并在 2006 年被评为湖南省“动脉硬化学”重点实验室，2008 年被授予湖南省普通高校科技创新团队。本书就是该团队工作的一次阶段性汇报。

关于胆固醇逆向转运（reverse cholesterol transportation, RCT）的研究，团队先后得到 11 项国家自然科学基金、8 项湖南省自然科学基金和多项教育部归国人员启动基金及人才基金的资助；还先后得到以北京大学唐朝枢教授为首席科学家和以中国协和医科大学刘德培院士为首席科学家的 2 项国家“973”项目部分资助。此外，本书的出版还得到诺美国际有限公司和南华大学立项资助。在此一并表示感谢！

因本书的编者大多为中青年科技工作者，受学术水平和编写时间的限制，错误之处在所难免，诚挚欢迎同行专家和读者批评指正。

编 者
2009 年 5 月

目 录

第一章 胆固醇逆向转运概论	1
第一节 荷脂细胞胆固醇的跨膜逆向转运	1
第二节 胆固醇逆向转运工作体系的网络调控	6
第二章 体内胆固醇的来源	18
第一节 概述	18
第二节 胆固醇的结构	18
第三节 胆固醇的来源	19
第四节 胆固醇的主要生理功能	22
第五节 体内胆固醇含量的调节	23
第三章 C型尼曼-皮克病蛋白	27
第一节 概述	27
第二节 C型尼曼-皮克病基因	29
第三节 NPC蛋白质的结构与定位	30
第四节 NPC蛋白质的生理功能	33
第五节 NPC疾病与NPC基因突变	36
第六节 NPC与动脉粥样硬化	38
第四章 固醇载体蛋白2 (SCP-2)	40
第一节 概述	40
第二节 SCP-2基因	40
第三节 SCP-2基因产物	46
第四节 SCP-2基因产物与脂质转运	55
第五节 SCP-2基因产物与脂质代谢	64
第五章 类固醇激素合成急性调节蛋白 (StAR)	72
第一节 概述	72
第二节 类固醇激素合成急性调节蛋白的分子结构	74
第三节 类固醇激素合成急性调节蛋白的生物学功能	75
第四节 类固醇激素合成急性调节蛋白合成的调节	79
第五节 类固醇激素合成急性调节蛋白基因突变和多态性	84
第六节 StAR与动脉粥样硬化	86
第七节 其他影响因素	87
第六章 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1	94
第一节 概述	94
第二节 ABCA1的结构与分布	94

第三节	ABCA1 的功能	95
第四节	ABCA1 的调节	96
第五节	ABCA1 的基因突变与单核苷酸多态性	100
第六节	转 ABCA1 基因小鼠中的脂质代谢	104
第七节	ABCA1 与动脉粥样硬化	107
第八节	ABC 转运体超家族对胆固醇吸收和血浆植物甾醇水平的调节作用	108
第七章	B 类 I 型清道夫受体	116
第一节	概述	116
第二节	SR-B I 的结构	118
第三节	SR-B I 的功能	121
第四节	SR-B I 的调节	127
第五节	SR-B I 的突变和多态性	135
第六节	SR-B I 与动脉粥样硬化	140
第八章	小凹蛋白	148
第一节	概述	148
第二节	小凹蛋白的结构	149
第三节	小凹蛋白的生物学功能	152
第四节	caveolin-1 的胆固醇转运功能	154
第五节	caveolin-1 与动脉粥样硬化	157
第九章	固醇 27-羟化酶 A1	162
第一节	概述	162
第二节	固醇 27-羟化酶 A1 的结构	162
第三节	固醇 27-羟化酶 A1 的功能	162
第四节	固醇 27-羟化酶 A1 的表达调节	165
第五节	固醇 27-羟化酶 A1 基因突变和多态性	166
第六节	固醇 27-羟化酶 A1 与临床疾病的关系	168
第十章	载脂蛋白 A I 和高密度脂蛋白	172
第一节	概述	172
第二节	载脂蛋白 A I	173
第三节	高密度脂蛋白	177
第十一章	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶	185
第一节	概述	185
第二节	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶的结构	187
第三节	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶的功能	196
第四节	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶与疾病的关系	201
第十二章	卵磷脂胆固醇酰基转移酶	207
第一节	概述	207
第二节	LCAT 的结构及分布	207
第三节	LCAT 的功能	210

第四节	LCAT 的调节	214
第五节	LCAT 的基因突变与多态性	218
第六节	LCAT 与动脉粥样硬化	221
第七节	LCAT 与其他疾病	224
第十三章	磷脂转移蛋白	229
第一节	概述	229
第二节	PLTP 结构	230
第三节	PLTP 功能	232
第四节	PLTP 调节	235
第五节	PLTP 突变和多态性	235
第六节	PLTP 与动脉粥样硬化	235
第十四章	脂肪酶	240
第一节	概述	240
第二节	肝脂酶	240
第三节	脂蛋白脂酶	247
第四节	内脂酶	256
第十五章	胆固醇酯转运蛋白	260
第十六章	核受体	275
第一节	概述	275
第二节	核受体的结构与分布	275
第三节	核受体的功能	276
第四节	核受体的调节	280
第五节	核受体的基因突变与单核苷酸多态性	284
第六节	PPAR 和 LXR 与动脉粥样硬化	288
第七节	其他影响因素	295
第十七章	载脂蛋白 E	301
第一节	概述	301
第二节	载脂蛋白 E 的蛋白结构	301
第三节	载脂蛋白 E 在体内的合成及其生理功能	304
第四节	载脂蛋白 E 基因的结构和多态性	305
第五节	载脂蛋白 E 与动脉粥样硬化	307
第六节	载脂蛋白 E 与阿尔茨海默病	311
第十八章	载脂蛋白 C	316
第一节	概述	316
第二节	载脂蛋白 C 的结构	316
第三节	载脂蛋白 C 的功能	320
第四节	人载脂蛋白 C 的基因突变与基因多态性	323
第五节	载脂蛋白 C 与动脉粥样硬化性疾病之间的关系	325
第六节	载脂蛋白 C 与人类其他疾病之间的关系	327

第十九章 低密度脂蛋白受体	330
第一节 概述	330
第二节 低密度脂蛋白受体的结构	330
第三节 低密度脂蛋白受体的表达调节	332
第四节 低密度脂蛋白受体的基因多态性	335
第五节 低密度脂蛋白受体的功能	339
第六节 低密度脂蛋白受体与疾病	340
第二十章 胆固醇逆向转运研究方法	346
第一节 胆固醇及胆固醇酯测定	346
第二节 泡沫细胞模型及胆固醇流入/流出模型	351
第三节 脂蛋白胆固醇测定	358
第二十一章 调节胆固醇逆向转运的药物	367
中文索引	380
英文索引	385

第一章 胆固醇逆向转运概论

广义的胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transportation, RCT) 是指肝外组织细胞内的胆固醇, 通过血液循环转运到肝, 在肝脏转化为胆汁酸排出体外的过程, 包括胆固醇的流出、酯化、转运和消除。而狭义的胆固醇逆向转运通常仅指细胞内胆固醇跨细胞膜外向转运 (或称胆固醇流出)。本章主要阐述狭义的胆固醇逆向转运。

第一节 荷脂细胞胆固醇的跨膜逆向转运

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 (主要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即 oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 后形成泡沫细胞仍然是 As 形成的最重要环节。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。一般说来, 泡沫细胞胆固醇外向转运的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动脉粥样硬化进程与转归的关键时期, 细胞胆固醇逆向转运的能力则是荷脂细胞是否向泡沫细胞演变的重要影响因素。

参与调控细胞胆固醇外向转运的蛋白质很多, 包括小凹蛋白家族 (如 caveolin-1、2、3)、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 ApoA I、ApoE、ApoC 等)、高密度脂蛋白受体家族 (如 SR-B I、CD36 等)、脂质转运蛋白 (如 SCP-2、PLTP、NPC、CETP 等)、胆固醇合成和代谢酶类 (如 LCAT、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、PKA) 以及固醇反应元件结合蛋白 (SREBP) 等, 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。四个体系即为以小凹蛋白 (caveolin-1) 为主体的胞内转运体系、以高密度脂蛋白/载脂蛋白 A (HDL/ApoA I) 为主体的胞外转运体系、以三磷酸腺苷结合盒转运体 (ABCA1、ABCG1) 为主体和以高密度脂蛋白受体 (SR-B I) 为主体跨膜转运体系; 一个中心即小凹 (caveolae) 转运中心, 胆固醇的跨膜逆向运动以小凹为转运枢纽, 以 caveolin-1 为主体的胞内转运体系首先将胆固醇从胞内转运到细胞膜, 储存于小凹; 位于小凹中心的以

SR-B I 和以 ABCA1 (G1) 为主体跨膜转运体系, 随后将胆固醇交给以 HDL/ApoA I 为主体的胞外转运体系, 后者将胆固醇最终转运到肝脏, 我们称之为偶联转运 (coupling transportation); 四个转运体系之间及整个转运过程实行网络调控 (networking regulation)。该工作模式虽需进一步完善, 但为胆固醇的跨膜逆向转运提供了一个简明的工作思路。

一、以小凹蛋白为主体的胆固醇胞内转运体系

小凹蛋白 (caveolin-1) 是分子质量为 21~24kDa 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。小凹蛋白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 caveolin-1 牢固结合在胞膜上, Schelgel 通过广泛的缺失和突变研究发现 82~101 (N-terminal membrane attachment domain, N-MAD) 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 像分子伴侣一样, 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、H-Has 等, 从而负性调节信号转导。脚手架区域也是 caveolin-1 与胆固醇等脂类相结合所必需的, 蛋白与磷脂竞争结合 caveolin-1 上相同的结构域, 如何调节还不清楚。

细胞荷脂后, 胆固醇通过存在于 caveolin-1 启动子的固醇调节元件 (sterol regulatory element, SRE) 和固醇调节元件结合蛋白-1 (SREBP-1) 上调 caveolin-1 表达, 同时 caveolin-1 促使细胞胆固醇的外流。caveolin-1 转运胆固醇出胞运动主要有两种方式: 一种是囊泡的形式, caveolin-1 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循蛋白分泌途径向胞膜转运。另一种是复合物形式, caveolin-1 可形成两种复合物: 一种是由 caveolin-1 与 cyclophilin A、cyclophilin 40 和 annexin-2 组成转运复合物用于运载从胞外摄取的胆固醇酯, 导致细胞荷脂; 另一种是由 caveolin-1 与 cyclophilin A、cyclophilin 40、HSP56 形成胆固醇转运复合物用于运载内质网新合成的胆固醇到胞膜上, 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 caveolin-1 和 cyclophilin A 存在, 说明: ① 该复合物在胞浆与胞膜之间存在穿梭与解聚; ② caveolin-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-1 是介导胞内胆固醇向胞膜移行的关键蛋白。

二、以高密度脂蛋白/载脂蛋白 A 为主体的胆固醇胞外转运体系

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成部分是载脂蛋白。不同的脂蛋白所含载脂蛋白的种类和数量都不相同, 包括 ApoA、ApoB、ApoC、ApoE 等。其中 ApoA I 是 HDL 的主要载体和胆固醇重要的接受体, 它可与清道夫受体 B I (scavenger receptor class B type I, SR-B I) 和 ABCA1 偶联完成胆固醇的

跨膜过程。

ApoA I 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; 这两段多肽与脂有高度亲和力, 还可被 SR-B I、ABCA1 识别。两性 α 螺旋结构与 SR-B I 结合后既可形成疏水通道, 促进 HDL 的胆固醇酯 (cholesterol ester, 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。ApoA I 与 ABCA1 结合后, 既可增加后者稳定性, 又能提高其功能。在细胞没受刺激或荷脂不太多时, ApoA I 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 ABCA1 磷酸化, 增加 ABCA1 稳定性和胆固醇流出功能。但当大量胆固醇流入细胞时, ABCA1 与激动型 G 蛋白的 α 亚基 (G_{as}) 偶联在一起, ApoA I 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 ABCA1 磷酸化, 防止 ABCA1 的降解, 促进磷脂和胆固醇流出。

HDL/SR-B I 和 ApoA I /ABCA1 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-B I 依赖的胆固醇流出途径受阻; >80% 时, ABCA1 表达减少、降解增多, ABCA1 依赖的胆固醇流出途径受阻。Yancey 等发现在 ApoA I 转基因鼠上过表达内脂脂肪酶后, 血清磷脂/ApoA I 比值、总胆固醇和 HDL 的胆固醇都分别下调 60%、89%、91%, ABCA1 介导的胆固醇流出增加 63%, SR-B I 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。

ApoA I 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。ApoA I 可上调 caveolin-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; ApoA I 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, 从而促进胆固醇逆向转运。

三、以三磷酸腺苷结合盒为主体的胆固醇跨膜转运体系

三磷酸腺苷结合盒转运体属于 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 6 个家族, 共 48 个成员; 其中 ABCA1 和 ABCG1 负责胆固醇的出胞运动, ABCG5 和 ABCG8 促进胆管上皮细胞向胆管分泌胆固醇, 利于其排泄。整个家族中 ABCA1 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 ABCA1 是调节和决定 HDL 浓度的一个重要因素。

ABCA1 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。ABCA1 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 ApoA I, 形成新的 HDL, 实现胆固醇的跨膜转运, 被称做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)。ABCA1 蛋白是通过 2 个大的细胞外环, 实现与 ApoA I 的交叉连接。Fitzgerald 等运用 4

个不同的突变转录子使胞外环结构域突变,失去与 ApoA I 交叉连接的能力,胆固醇流出随之减少。ABCA1 直接与 ApoA I 相互作用是 ABCA1 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 ABCA1 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 ABCA1 蛋白性质不稳定,胞浆段蛋白表达序列标签 (PEST) 磷酸化后,易被钙激活蛋白酶降解,并且不饱和脂肪酸、胞内毒性水平的胆固醇等可降低其蛋白稳定性,PKA、PKC 等激酶促进其 PEST 脱磷酸化和 Ser-1024、Ser-2054 磷酸化,增加 ABCA1 稳定性,加强胆固醇流出。ABCA1 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。

ABCA1 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:ABCA1 先催化磷脂和胆固醇侧向移位到 ABCA1 形成的液性通道中,在 ATP 作用下 ABCA1 的 NBD 结构域发生二聚化闭合通道,将磷脂和胆固醇分子挤到膜外,在膜外磷脂和胆固醇转移至 ApoA I,形成新的 HDL。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 ABCA1 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。第一个工作模式体现了 ABCA1 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。

ABCA1 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 等发现用带绿色荧光标记的 ABCA1 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 ApoA I 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 ApoA I 孵育,可观察到 ABCA1 与 ApoA I 共同着位于内涵体,胆固醇外流增加。说明 ABCA1 可促进内吞的 ApoA I 以新生 HDL 形式外释。ABCA1 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。

四、以高密度脂蛋白受体为主体的胆固醇跨膜转运体系

HDL 受体及结合蛋白包括 SR-B I、HDL 结合蛋白 (HDL binding protein, HBP)、CD36 等。其中 SR-B I 是被公认的 HDL 特异性受体,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:①一个大的环状细胞外区域 (403 个氨基酸残基),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;②两个胞浆区 (氨基端区和羧基端区);③两个跨膜区,SR-BI 的跨膜区 N 端为 28 个氨基酸残基, C 端为 25 个氨基酸残基。

HDL 通过 SR-B I 锚定在细胞膜上,或提供胆固醇酯或接纳胆固醇,运动方向取决于结合 SR-B I 的 HDL 亚型的载脂蛋白组成、颗粒大小以及细胞表面胆固醇的密度梯度,如贫脂的小颗粒 HDL (pre β -1 和 α -3) 以接受经 SR-B I 流出的胆固醇为主, ApoA II 在 HDL 中的含量则与 SR-B I 的选择性胆固醇酯摄取呈负相关,其具体机制不清。进一步研究发现 SR-B I 的胞外段除可与配体结合外,还可能形成疏水通道供 CE 通过。文献报道 SR-B I 介导的 CE 摄取的起始接受部位是细胞膜上的小凹结构,超过 80% 的 CE 在经由 SR-B I 摄取后首先累积于小凹。HDL 识别 SR-B I 后, SR-B I 通过亮氨酸拉链区形成二

聚体, 建立疏水通道, HDL 球形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-1 蛋白结合。小凹形成含有 SR-B I、caveolin-1 及 CE 的囊泡内陷至细胞内。将 CE 运输到胞内其他胆固醇池后, caveolin-1 及 SR-B I 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-B I 既可介导胆固醇酯的选择性摄取 (主要在肝细胞), 又可介导胆固醇外流 (主要在外周细胞)。SR-B I 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 (phosphatidyl choline, PC), 会降低胆固醇外流; 贫脂的 ApoA I 尽管能与 SR-B I 结合, 但并不诱导胆固醇流出。并且 SR-B I 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-B I 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。上述资料提示, SR-B I 对胆固醇的调节作用可能主要与易化胆固醇从胞膜上解偶联、促进其向趋于成熟的 HDL 扩散有关。

五、小凹转运中心

小凹是细胞表面特异性陷窝状结构, 与细胞膜的另一结构 raft 相比, 小凹的主要特征为含有大量 caveolin-1, caveolin-1 与细胞骨架蛋白 actin 间接偶联形成并维持小凹的内陷形态。这种结构非常稳固, 如同一把锁, 需特定信号事件打开才能使其内吞如细胞, 脂筏由于缺乏足够的 caveolin-1, 与质膜的联系短暂而脆弱, 无法形成稳定的内陷结构。小凹在细胞中主要以烧瓶样形态存在, 也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则由 caveolin-1 的表达情况来决定。细胞中 65%~80% 的总胆固醇存在于质膜中, 质膜中的胆固醇又在小凹中浓集程度最高, 因此小凹成为了细胞的胆固醇库。小凹集中了细胞约 95% 的鞘磷脂, 胆固醇对鞘磷脂有最大的亲和力, 因此尽管小凹只占质膜表面积的 1%, 却含有 10% 以上的质膜胆固醇, 这种强大亲和力也不利于小凹作为胆固醇流出的直接来源, caveolin-1 的存在则增强了小凹胆固醇流动的能力, 使小凹成为游离胆固醇储运和流出的主要部位或“洗涤池”, 同时很多与胆固醇摄取和流出相关的受体和蛋白质如低密度脂蛋白 (LDL) 受体、SR-B I、ABCA1 等也在小凹区域高度富集, 使小凹能够真正成为细胞与外界进行脂质交换的场所。Stephen 等分离各种膜结构进行研究表明, 脂质在小凹处大量聚集, 脂蛋白介导的胆固醇摄取或流出在小凹处非常迅速而且具有脂蛋白特异性, 而在非小凹处则极其缓慢且无脂蛋白特异性。Fielding 等报道, 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, caveolin-1 mRNA 和蛋白表达水平均上调, 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 caveolin-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。还有文献报道用钒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%。我们也观察到清道夫 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, 动脉粥样硬化发生率却显著增高。这些都说明了小凹是细胞内、外胆固醇交换的转换中心。

近年大量研究表明, 小凹还是细胞信号转导中心, 与信号转导有关的受体、激酶及连