

- 15 郑裕岚,陈惠黎,生物化学与生物物理进展,1988; 15:45
16 徐伟军,周金耀,吉鑫松等,生物化学与生物物理学报,1986; 18:410
17 Rajgopal S, Vijayalakshmi M A. US patent No. 4666604, 1987
18 Kanoun S, Amourache L. J Chromatogr, 1986; 376: 259
19 Amourache L, Vijayalakshmi M A. J Chromatogr, 1984; 303: 285
20 Groman E V, Wilchek M. Trends Biotech, 1987; 5: 220

载脂蛋白 B 的分子生物学基础

许霖水

(第三军医大学生化教研室,重庆 630038)

提 要

载脂蛋白 B(apoB)是富含甘油三酯和胆固醇的脂蛋白(CM、VLDL 和 LDL)特有的蛋白质成分。apoB₁₀₀ 是 LDL 受体的专一性配基,介导血中 LDL-胆固醇(LDL-Ch)被外周组织细胞摄取和清除。载脂蛋白 B 基因遗传变异和 apoB 异常,血中 LDL-Ch 堆积,导致动脉粥样硬化发生是冠心病危险因素。

关键词 载脂蛋白 B, 载脂蛋白 B 基因, 动脉粥样硬化, 基因突变

现代理论认为动脉粥样硬化斑块的形成是血管壁损伤-修复的反复循环结果。大量流行病学和遗传学调查、临床资料和动物模型的病理研究证明^[1,2],血中低密度脂蛋白的胆固醇(LDL-Ch)浓度异常升高是动脉粥样硬化的前提条件,高胆固醇血症和动脉粥样硬化、冠心病的发病率成正比。载脂蛋白 B(apoB₁₀₀)对 VLDL 和 LDL 的生成、运输和从血浆中被清除,调节血中胆固醇浓度起关键性作用。本文就近年来载脂蛋白 B 分子生物学研究进展作一简要叙述。

1 载脂蛋白 B 的结构与功能

apoB 是 8 种主要载脂蛋白中分子量最大,疏水性最强的一种。它是富含甘油三酯(CM、VLDL)和富含胆固醇(LDL)的脂蛋白重要蛋白质成分,尤其是 LDL 受体的专一性配基。介导 LDL-Ch 从血中被清除。现知 apoB 有两种形式:apoB₁₀₀ 和 apoB₄₈。人类 apoB₁₀₀ 由肝细胞合成(大鼠肝脏合成 apoB₁₀₀ 和 apoB₄₈)。它结合和运输内源性甘油三酯和胆固醇。apoB₄₈

由小肠上皮细胞合成,它结合和运输外源(食物)性脂质和脂溶性维生素。

apoB₁₀₀ 是一种分子量为 512kD 的糖蛋白。其全氨基酸顺序 1986 年已阐明,它由 4536 个氨基酸残基组成的单-多肽链。每分子 LDL 颗粒只含一分子 apoB。蛋白质仅能覆盖颗粒表面的 $\frac{1}{3}$ 至 $\frac{1}{2}$ 。apoB₁₀₀ 分子含有 25 个 Cys 残基,其中 11 个 Cys 残基集中分布在前面 500 个氨基酸组成的区域,形成链内二硫键。所以 N-端高度交联呈典型的球状结构^[3]。Cys 残基通过硫酯键与软脂酸、硬脂酸等共价结合使 apoB 牢固地连接脂质成分^[4]。另外 apoB₁₀₀ 还有分子内硫酯键(Cys₅₁-Glu₅₄ 和 Cys₃₇₃₄-Asp₃₇₃₇)以及 Cys 和 Tyr 的磷酸化位点。这对维持 apoB 空间构象,促进 VLDL 生成和分泌有重要意义^[5]。apoB₁₀₀ 还含有 20 个 N-糖苷化位点(Asn-X-Thr/Ser),大部分集中在 3197-3438 残基之间。关于 O-糖苷化位点尚不清楚。

冰冻蚀刻电镜发现 LDL 表面的 apoB 呈现若干球状结构域 (domain)。圆二色提供的数字证明位于 apoB₁₀₀ 的 2035—2506 和 4 002—4527 残基之间的两个结构域重复出现的两性亲脂 (amphipathic) α -螺旋区段与其它较小的 apoA1、apo-AIV 和 apo-E 重复序列一样对脂质的结合是十分必要的^[6]。apoB₁₀₀ 另一种结合脂质的重要结构是含疏水和亲水氨基酸交替排列的两性亲脂 β -折叠。这种结构分布在整个 apoB 序列中,但仍然相对集中于 1167—2324, 2561—2762, 3102—3305, 3687—3865 四个脯氨酸 (Pro) 富含区。而且形成一种酸性-芳香族-极性-脂肪族-脯氨酸顺序的较短重复片段。这种富含脯氨酸的重复序列是 apoB 所特有的,它们使 apoB 能够将磷脂侧链深埋其间并使之紧密结合^[6]。由于 apoB 的两性 α -螺旋和富含脯氨酸的疏水短肽和可脂酰化的 Cys 残基形成的特殊结构,使得 apoB 能够与单层极性脂牢固结合,并赋予 apoB 在 VLDL 和 LDL 从分泌到被清除的整个过程中与其它脂蛋白颗粒的不可交换性的特点。

apoB 和 apo-E 一样具有结合 LDL 受体和血管内皮糖胺多糖(如肝素)的性质。许多研究^[7,8]证明无论是 apoB 或 apoE 的 Lys (赖)和 Arg (精)残基的电荷经化学修饰后,它们的上述两种功能即完全消失。说明含碱性氨基酸的结构域对 LDL 受体或肝素的相互作用是关键的。apoB 7 个结合肝素的碱性氨基酸结构域位于 3134—3209 和 3356—3489 残基之间。这些碱性氨基酸结构域还可帮助富含甘油三酯的脂蛋白与毛细血管内皮细胞结合,便于脂蛋白脂肪酶发挥作用。同时含 apoB 脂蛋白的肝素结合区还可与主动脉壁的糖胺多糖相作用从而对动脉粥样硬化起推波助澜的作用。

apoB₁₀₀ 的 LDL 受体结合区在 VLDL 颗粒时是不表现的,只有当 VLDL 的甘油三酯水解后其它载脂蛋白从颗粒表面移去, apoB₁₀₀ 蛋白质空间构象发生改变后, LDL 受体的结合位点才能暴露。此时 apoB₁₀₀ 才真正成为 LDL 受体的专一性配基。apoB₁₀₀ 的 LDL 受体结合区

序列包括 3147—3157 和 3357—3367 的氨基酸残基(表 1 所示)。同时可能涉及富含脯氨酸的两性 β -折叠的 3102—3305 及 3687—3865 等序列。

表 1 apoB₁₀₀ 的 LDL 受体结合顺序

apoB(T ₁)	³¹⁴⁷ Lys-Ala-Gln-Tyr-Lys-Lys-Asn-Lys-His-Arg-His- ³¹⁵⁷
apoB(T ₂)	³³⁵⁷ Thr-Thr-Arg-Len-Thr-Arg-Lys-Arg-Gly-Len-Lys- ³³⁶⁷
LDL 受体相应	-Cys-Asp-X-X-X-Asp-Cys-X-Asp-Gly-Ser-Asp-Glu-

已知人和猪的 apoB₁₀₀ 的 LDL 受体结合区有高度保守性^[9]。最近证明,人 apoB₁₀₀ 的 3500, 3611 和 4154 残基发生取代后, apoB₁₀₀ 的 LDL 受体结合功能可以完全消失,出现中等程度的高胆固醇血症。

小肠合成的 apoB 在聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳谱上其分子量为 250kD, 相当于肝脏合成的 apoB 的 48%, 故称 apoB₄₈。从小肠 apoB 的 cDNA 文库或氨基酸顺序分析及单克隆抗体结合图谱知道^[10], apoB₄₈ 相当于 apoB₁₀₀ N-端的一半 (2152 个氨基酸残基)。apoB₄₈ 的羧末端同样含有重复顺序的两性亲脂 α -螺旋和多个疏水短肽 (β -折叠), 使 apoB₄₈ 羧末端能够紧密“锚”在脂蛋白 (CM、VLDL) 颗粒上。但是 apoB₄₈ 缺乏羧末端的 LDL 受体结合区,故不能为 LDL 受体所识别。

2 载脂蛋白 B 的生物合成与组装

人类的 apoB₁₀₀ 由含 14121 核苷酸的 mRNA 编码。这种 mRNA 包括 5'-端 128 核苷酸和 3'-端 301 核苷酸的非翻译区以及 13689 核苷酸的编码区和 UAA 为终止密码。引物链延伸分析证实它是一种单一转录点^[11]。apoB₁₀₀ 前体所含的 27 个氨基酸疏水信号肽在未组装成脂蛋白颗粒之前已被切除,故血中成熟的 apoB₁₀₀ 为 4536 残基。脉冲示踪和细胞亚组分研究证明^[6,12], apoB₁₀₀ 的 mRNA 在正常肝细胞和 HepG2 细胞的核糖体上 10min 完成翻译过程。合成的 apoB₁₀₀ 开始附着在内质网 (ER)

膜内侧面,磷脂及中性脂由膜外侧加入,形成脂蛋白颗粒后随即游离于内质网腔。apoB 磷酸化作用是该过程所必需的。因此新生脂蛋白转移到高尔基氏器之前 apoB 必需进一步形成适宜的空间构象^[13]。脂蛋白颗粒在高尔基氏器停留时间(40min)比在 ER(30min)长,认为在高尔基氏器继续有脂质,特别是胆固醇的加入。同时 apoB 甘露糖链也被修饰成复合糖链^[14]。许多研究证明合成的 apoB 仅 1/3—1/2 组装成脂蛋白被分泌,其余则在细胞内降解。这是 apoB 合成和分泌的主要调节方式。

关于 apoB₄₈ 的生物合成机制一直有争议。曾认为 apoB₄₈ 是由一种独立于 apoB₁₀₀ 的基因所编码,或是由 apoB₁₀₀ 基因的外显子经选择性剪接或是小肠的 apoB 基因重排而编码 apoB₄₈ 蛋白质的生物合成。最近的研究证实^[10], apoB₄₈ 生物合成是由 apoB₁₀₀ 同一基因提供的 mRNA 所编码的。即 apoB₁₀₀ 基因第 6538 位(谷氨酰胺密码 CAA)的胞嘧啶核苷酸(C)脱氨基化生成尿嘧啶核苷酸(U)使 CAA → UAA, 作为 apoB₄₈ 生物合成的终止密码(Premature in frame stop codon)。从人和家兔小肠分离出 7kb 的 apoB-mRNA 恰好是全长为 15kb apoB₁₀₀ mRNA 5'-端的一半。大鼠肝脏这种短的 mRNA 在终止密码(UAA)下游可出现多聚核苷酸(Poly(A))化。而人肝脏的 mRNA 未发现有多聚(A)化或其它修饰。因此大鼠肝脏合成 apoB₄₈ 的机制与小肠相同^[15], 只是 apoB₁₀₀ 和 apoB₄₈ 合成依不同代谢状况而改变。如当甘油三酯增多, apoB₁₀₀ 合成减少而 apoB₄₈ 合成增多。甲状腺激素使甲亢大鼠 apoB₁₀₀ 合成完全停止,此时主要(>95%)合成的是 apoB₄₈。同时含早熟终止密码(Premature in frame stop codon)的 mRNA 比例明显增加。

apoB 生物合成还可受其它因素调节^[16]。如油酸使正常大鼠肝细胞和 HepG2 细胞 apoB 合成增加 3—4 倍。而胰岛素和清蛋白可使 apoB 减少 50—70%, 所以糖尿病和慢性肾炎(低清蛋白)可引起高脂血症。钙(载体)通道使结肠肉瘤(CaCo2)细胞 apoB 分泌增加。这些

调节机理不在转录水平或 mRNA 稳定性,而是通过翻译或翻译后短期的 apoB 分泌的调节。孟德尔遗传的无 β -脂蛋白血症患者肝脏 apoB-mRNA 水平升高 5 倍却无含 apoB 的脂蛋白分泌。

3 载脂蛋白 B 的遗传变异

apoB 基因与其它载脂蛋白的基因不同,它独立位于 2 号染色体短臂末端(2p²³),以单拷贝方式编码 apoB 蛋白质。基因全长 43kb。含有 28 个内含子和 29 个外显子。其前面 25 个外显子编码载脂蛋白 N-端 1/3(相当凝血酶降解物 T₄ 片段)肽段,后 4 个外显子编码 C-端 2/3 蛋白质(相当于凝血酶降解物 T₃ 和 T₂ 片段),见图 1。最大的外显子 26(7572bp)和 29(1906bp)。

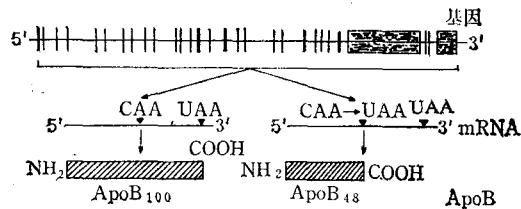


图 1 apoB 基因结构及编码 apoB₁₀₀ 和 apoB₄₈ 的 mRNA

apoB 基因 DNA 3'-端 181bp 构成一种由 11—16bp 重复排列的富含 A-T 的超变异小卫星序列,分布于 500~800bp 之间。超变区两侧由 14bp 的重复序列直接包绕,当复制时可看到许多可转移成分的插入点。直接基因顺序或是特异性的 DNA 倍增技术(PCR)分检证明 apoB 有 12 种易于区别的等位基因^[17]。从两个大外显子和 3'-端富含 A-T 超变异区的事实,认为 apoB 基因早期进化从 3'-端偶合一个部分加工的 mRNA 前体的可能性,而 26, 27, 28 三个内含子未被切除并在超变区连接一个 Poly(A) 尾。

已有许多文献^[18,19]评价 apoB 基因 DNA 的多态性或遗传变异与高胆固醇血症,动脉粥样硬化、心肌梗塞,冠心病以及肥胖之间的关系。一致认为 apoB 基因只要一个或几个位点

有微小变异(或缺陷)都可引起个体出现高胆固醇和高甘油三酯血症,最后导致动脉粥样硬化或冠心病。Rajput-Williams 等对 290 名白种人进行限制性片段长度多态性(RFLPs)分析,证明血浆胆固醇变化明显与三种功能性等位基因缺陷(由 MspI 和 EcoRI 降解的 RFLPs)相关。这些 RFLPs 相应出现于带电荷氨基酸的相互取代(Arg/Lys, Arg/Glu, Gln/Glu),即密码发生改变(3611CGA → CAA, 4154GAA → AAA)。而且这些突变发生在 apoB 的 LDL 受体结合区附近。由 apoB 基因带电荷氨基酸相互取代的基因突变影响了血中胆固醇浓度升高最终促使冠心病和肥胖。最近 Soria 等^[19]对一个家族性 apoB₁₀₀ 缺陷的杂合子的两个等位基因进行序列分析,证明 apoB₁₀₀ 基因第 3500 密码(CGG → CAG)发生突变使 Arg 被 Gln 取代造成 apoB₁₀₀ 变异,而对外周组织 apoB·E(LDL)受体结合产生障碍,结果血中胆固醇和 LDL 浓度升高。另外还发现 apoB 基因短缺或 apoB 蛋白截短等异常,可出现低胆固醇血症或低 β-脂蛋白血症,此时杂合子个体血中胆固醇浓度只

有正常人的一半。纯合子个体血中可以完全缺乏含 apoB 的脂蛋白。人群中发生频率为 1/500—1/1000。

参 考 文 献

- 1 Scott J. *Nature*, 1987; 325: 574
- 2 Yang C-Y *et al. Nature*, 1986; 323: 738
- 3 Hoeg J M *et al. J Lipid Res*, 1988; 29: 1215
- 4 Sparks J D *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 5001
- 5 De Loof H *et al. J Lipid Res*, 1987; 28: 1455
- 6 Olofsson S-O *et al. Amer Heart J*, 1987; 113: 446
- 7 Hirose N *et al. Biochemistry*, 1987; 26: 5505
- 8 Weisgraber K H *et al. J Biol Chem*, 1987; 262: 11697
- 9 Maeda N *et al. Gene*, 1988; 70: 213
- 10 Higuchi K *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 85: 1772
- 11 Protter A A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 1467
- 12 Borchardt A R *et al. J Biol Chem*, 1987; 262: 16394
- 13 Bamberger M J *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 11868
- 14 Boström K *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 4434
- 15 Davidson N O *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 13482
- 16 Pullinger C R *et al. J Lipid Res*, 1989; 30: 1065
- 17 Boerwinkle E *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 212
- 18 Scott J. *Mole Biol & Med* 1989; 6: 65
- 19 Rajput-Williams J *et al. Lancet*, 1988; II: 1442
- 20 Soria LF *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 587

神 经 生 长 因 子

王 丽 辉* 童 坦 君

(北京医科大学生物化学教研室,北京 100083)

提 要

神经生长因子是一类能促进神经生长的多肽,近年来的研究表明它在非神经系统及肿瘤的发生中也有重要作用。本文综述了神经生长因子的结构、生物合成、作用机制及生理、病理作用等方面的研究进展。

关键词 神经生长因子,神经生长因子受体,肿瘤,癌基因

1948 年 Buker 发现,将小鼠肉瘤组织移入鸡胚体壁可使移植区感觉神经节数增加,其后,Levi-Montalcini 和 Hamburger 发现交感神经节数亦有增加,而且远离移植区的神经节亦有所增加,由此设想肉瘤组织释放了一种可在血

液中扩散的因子——神经生长因子(nerve growth factor, NGF)。1959 年, Cohn 发现蛇毒含有较多的 NGF,并发现另一个富含 NGF

* 基础医学系 86 级学生。

收稿日期: 1990-10-29

修回日期: 1991-03-02