

## 载脂蛋白 E 拟肽 EpK 对 apoE<sup>-/-</sup>小鼠 动脉粥样硬化的影响 \*

曹 佳 \*\* 徐延勇 \*\* 商 亮 刘红梅 杜 芬 喻 红 \*\*\*

(武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 发育源性疾病湖北省重点实验室, 武汉 430071)

**摘要** 前期设计合成了一种模拟人载脂蛋白 E(apoE)结构域的小分子多肽 EpK, 体外实验证实该拟肽具有抑制巨噬细胞炎症及增强高密度脂蛋白(HDL)介导细胞胆固醇外流的作用. 本文拟借助慢病毒体系分泌性表达 EpK, 研究 EpK 在体对 apoE 基因敲除(apoE<sup>-/-</sup>)小鼠动脉粥样硬化斑块的影响. 将 11 月龄雌性 apoE<sup>-/-</sup>小鼠 18 只, 随机分两组, 分别经眼球后静脉丛注射 pWPI 慢病毒(Lv-GFP 对照组)和含 EpK 的重组慢病毒(Lv-EpK 组). 小鼠普食喂养, 间隔采血监测血脂状态, 检测血浆对氧磷脂酶(PON1)活性, 病毒注射 18 周后小鼠安乐死, 从主动脉根部连续冰冻切片及主动脉胸腹段纵剖面(en face)进行油红 O 染色分析斑块面积, 采用实时荧光定量 PCR 检测小鼠肝脏相关基因的 mRNA 表达水平, 蛋白质印迹检测血浆中 apoA-I、PON1 及血清淀粉样蛋白 A(SAA)水平. 结果显示: 慢病毒感染小鼠可成功在血循环中检测到 EpK, 与 Lv-GFP 对照组比较, Lv-EpK 组 apoE<sup>-/-</sup>小鼠的血脂及脂蛋白分布、apoA-I 水平、PON1 活性无明显改变, 但 EpK 组小鼠的主动脉斑块面积较对照组显著减少(主动脉根部斑块面积(0.87±0.07) mm<sup>2</sup> vs (1.03±0.08) mm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ; 主动脉胸腹段斑块占管腔比 42.0% vs 55.8%,  $P < 0.01$ ). EpK 可显著降低血中 SAA 水平, 并抑制肝脏炎症因子 TNF $\alpha$  和 IL-6 的表达. 结果说明, EpK 拟肽具有减退 apoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块的作用, 其机制可能与其发挥的抗炎作用有关.

**关键词** 动脉粥样硬化, apoE, 拟肽, 炎症, 脂代谢

**学科分类号** R54

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0117

载脂蛋白 E(apolipoprotein E, apoE)是血液中一种多功能载脂蛋白, 其在人血浆中浓度平均为 50 mg/L, 主要存在于极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中. apoE 通过低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)和 LDLR 相关蛋白硫酸肝素糖蛋白(heparin sulfate proteoglycans, HSPG)途径介导肝脏对循环中 VLDL 及 LDL 胆固醇的清除, 同时作为 HDL 的主要载脂蛋白组分之一, 参与血管壁巨噬细胞胆固醇的外流、抗氧化、抗炎、抗平滑肌细胞增殖等, 从而实现 HDL 的部分功能, 加之其存在血液与肝脏间的再循环机制, apoE 在机体脂代谢平衡中发挥重要作用, 被公认为抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的功能蛋白<sup>[1]</sup>. 研究显示, 人类 apoE 具有显著多态性, 其结构差异能引起人群中约 14% 的个体易发高胆固醇血症; 最早利用基因敲除制备的

apoE<sup>-/-</sup>小鼠具有自发性高胆固醇血症, 而成为 As 研究的常用典型模型之一; 各种针对 apoE 的补偿性治疗能有效改善高脂血症或缓解 As 病程<sup>[2-4]</sup>, 如我们前期利用骨髓移植证实, 即使少量补偿巨噬细胞源性的 apoE, 都可有效改善双基因敲除鼠的高脂血症、缓解 As 病程, 甚至挽救其生命<sup>[5]</sup>. 但基因治疗的安全性问题及制备全长的 apoE(34 ku)的难度及补充治疗产生毒性片段等问题, 极大地制约了其作为临床治疗药物的应用, 因此, 发展小分子 apoE 功能拟肽用于调脂及防治 As 的手段应运而生<sup>[6-8]</sup>.

\* 国家自然科学基金(81270364)和湖北省卫生厅人才计划基金(JX6B60)资助项目.

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 027-68759795, E-mail: yu.hong@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-04-23, 接受日期: 2015-06-30

apoE 包含 2 个结构功能域: N 端(1~191 氨基酸肽段)的 4 个螺旋负责结合 LDLR 和 HSPG, C 端(192~299 氨基酸肽段)的 1 个  $\alpha$  螺旋模序为脂质结构域的基础. 已公认 LDLR 结合域具有促进循环中脂蛋白残粒清除、抗炎及抗氧化作用, 脂质结合区可促进巨噬细胞胆固醇的外流, apoE 功能域间可相互调节, 脂质结合域与脂质的结合可诱导 N 端结构域构象改变, 增强 LDLR 结合力从而调控脂质代谢<sup>[1, 9-10]</sup>. 我们前期设计了一种 apoE 衍生肽 EpK, 其含人源性 apoE N 端 10 个氨基酸的 LDLR 结合域和一段 C 端 21 个氨基酸残基的脂质结合域, 中间通过 6 个带正电荷的赖氨酸残基(Lys)连接. 体外实验证实其改善 HDL 介导的巨噬细胞胆固醇外流并抑制 LPS 诱发的巨噬细胞炎症反应, 纯品注射入小鼠体内可与 HDL 早期结合<sup>[11]</sup>. 本研究拟采用慢病毒感染手段实现 EpK 在 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠体内的表达, 以探讨 EpK 对 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠脂质代谢和 As 斑块的作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验采用 C57BL/6J 种系的 apoE<sup>-/-</sup> 雌性小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证: SCXK 京 2012-0001), 武汉大学 SPF 级动物实验中心饲养, 室温 21℃~25℃, 光照时间 12 h/天. 基础饲料由湖北省疾病预防控制中心提供.

### 1.2 材料与试剂

含 EpK 的 PUC 载体和 pWPI-GFP 慢病毒表达载体及包装质粒均受赠于美国 South Carolina 大学医学院樊大平博士; 质粒提取试剂盒购于 TIANGEN 公司; PCR 相关试剂为 Takara 公司产品; LB 培养基为 OXOID 公司产品; DNA 凝胶纯化回收试剂盒购于 Axygen 公司; 人胚肾上皮 293T 细胞购于武汉大学细胞保藏中心; lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒、Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司; 胎牛血清、DMEM 购于 Gibco 公司; 总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)测定试剂盒购于上海名典生物工程有限公司; 对氧磷(paraoxon)、油红 O 为 Sigma 公司试剂; 羊抗人 apoE 抗体购于 Academy Biomedical 公司; HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体、抗小鼠 PON1 单抗、羊抗小鼠 IgG 购于 Abcam 公司; 羊抗小鼠血清淀粉样蛋白 A(serum amyloid A, SAA)购于 Santa Cruz 公司; ECL 化学显影液购于

Thermo 公司.

### 1.3 pWPI-EpK 分泌型重组载体构建及慢病毒包装

参考 apoE 的信号肽序列(ATG AAG GTT CTG TGG GCT GCG CTG CTG GTC ACA TTC CTG GCA GGA TGC CAG GCC<sup>[12]</sup>), 设计信号肽序列之后连接含 6xHis 标签的 EpK, 两端为 Pac I 酶切位点, 由上海桑尼生物科技有限公司合成含该设计序列的重组 PUC/EpK 质粒, 将该质粒及 pWPI 慢病毒表达载体同时经 Pac I 单酶切、琼脂糖凝胶电泳分离及胶回收后, 纯化 DNA 片段经连接酶反应, 转化、筛选, pWPI/EpK 重组子经 DNA 测序鉴定. 采用脂质体转染法将 pWPI/EpK 或 pWPI 载体与慢病毒包装质粒(PCMV、PD2G)共转染 293T 细胞, 收集含病毒颗粒的培养液, 经超速离心浓缩后, PBS 重溶获得慢病毒颗粒浓缩液, 以流式细胞仪检测病毒滴度. 利用病毒浓缩液按 MOI 为 10:1 感染 293T 细胞 12 h 后换液, 继续培养 48 h 后, 荧光显微镜下观察细胞内慢病毒载体表达的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)并拍照. 收集细胞培养液, 蛋白质印迹检测培养液 EpK 的蛋白质水平.

### 1.4 动物分组及处理

将 11 月龄雌性 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠 18 只, 随机分为两组(每组 9 只). 两组小鼠分别经眼球后静脉丛注射 pWPI 慢病毒(Lv-GFP 组)和含 EpK 的重组慢病毒(Lv-EpK 组)颗粒 200  $\mu$ l,  $1.6 \times 10^8$  个/只. 全程普食喂养, 从第 2 周起每 4 周采血 1 次, 用于小鼠血脂及相关指标的生化分析. 小鼠病毒注射后第 18 周异氟烷麻醉下取血后安乐死. 小鼠肝脏做快速冰冻切片, 于荧光显微镜下观察 GFP 的表达状态.

### 1.5 血脂、脂蛋白分布及酶活性分析

小鼠禁食 12 h 后, 以肝素抗凝采血管经眼眶球后静脉丛采血, 于 4℃ 离心(4 000 r/min, 10 min)制备血浆, 采用酶学终点法测定血 TC、TG 水平. 利用快速蛋白液相色谱(fast-performance liquid chromatography, FPLC)进行血浆脂蛋白分布分析, 取 100  $\mu$ l 的小鼠混合血清上样 Superose 6 10/300GL 凝胶层析柱(Amersham Biosciences), 于 AKTA purifier 系统(GE Healthcare)进行 FPLC, 连续收集 40 个 0.5 ml 的样品管<sup>[5]</sup>. 血浆对氧磷酯酶 1(paraoxonase 1, PON1)酶活性测定以对氧磷为底物, 按本室建立的酶学动力学方法进行<sup>[13]</sup>. 酶活性以每毫升血浆(清)每分钟生成产物的纳摩尔数(nmol $\cdot$ min<sup>-1</sup> $\cdot$ ml<sup>-1</sup>)表示 1 个 PON1 酶活性单位值(用

U 表示). 血浆谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)活性测定采用 Mohum 氏法.

### 1.6 主动脉粥样斑块分析

小鼠取血后安乐死, 剖胸后用磷酸盐缓冲液经心脏左室灌流, 分离心脏及主动脉根部, OCT (Tissue-Teck)包埋, 于主动脉近心端作 10  $\mu$ m 连续冰冻切片, 油红 O 染色, 显微镜下照相; 分离小鼠主动脉弓及胸腹段于 10% 甲醛固定, 去除血管外围组织, 纵剖面(en face)固定, 油红 O 染色后照相, 使用 Image Pro Plus 6.0 软件对成像血管作主动脉 As 斑块面积的定量分析<sup>[3]</sup>.

### 1.7 蛋白质印迹(Western blot)检测相关蛋白的表达水平

细胞培养基 100  $\mu$ l 经 TCA 法沉淀浓缩及血浆以 0.2~1  $\mu$ l/ 孔上样量进行 SDS-PAGE, 蛋白转印至 NC 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; 分别加羊抗人 apoE 抗体 apoE (1 : 1 500)、apoA- I (1 : 1 000)、SAA (1 : 200) 或 PON1 (1 : 1 000) 一抗, 洗膜, 酶标二抗孵育及洗膜; 最后化学发光 ECL 法显影.

### 1.8 实时定量 PCR 检测肝脏基因的 mRNA 表达水平

取小鼠肝脏用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 紫外法检测 RNA 的纯度与浓度, 逆转录合成 cDNA, 并用 PCR master mix (Invitrogen) 公司进行目标基因的实时定量 PCR (quantitative Real-time PCR, qPCR). qPCR 的引物由上海桑尼生物科技有限公司合成, 采用的引物序列如下: 肿瘤坏死因

子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), 5' CGTCA-GCCGATTTGCTATCT 3' (正向) 和 5' CGGAC-TC CGCAA A GTCTAAG 3' (反向); 白介素 6 (interleukin-6, IL-6), 5' AGTTGCCTTCTTGGG-ACTGA 3' (正向) 和 5' TCCACGATTTCACAG-AGAAC 3' (反向); 内参 18s rRNA, 5' CGCGG-TTCTATTTTGTGTTGGT 3' (正向) 和 5' AGTCG-GCATCGTTTATGGTC 3' (反向). PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; PCR 循环条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 利用荧光实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司 CFX96 Touch<sup>TM</sup>) 进行 40 个循环. 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对相关基因进行半定量分析.

### 1.9 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析, 组间差异采用 Student *t*-tests 检验, Mann-Whitney test 用于斑块面积的统计学分析,  $P < 0.05$  表示有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 pWPI-EpK 重组慢病毒载体构建与鉴定

pUC/EpK 质粒载体 (2 898 bp, 含 212 bp 的 EpK 序列) 经 *Pac* I 单酶切及琼脂糖凝胶电泳分离, 对凝胶中约 200 bp 的条带进行胶回收 (图 1a), 与同样 *Pac* I 单酶切线性化的 pWPI 载体 (11 101 bp) (图 1b) 进行连接反应, 转化、筛选克隆单菌落, 经 DNA 测序鉴定, 获得序列正确的重组子.

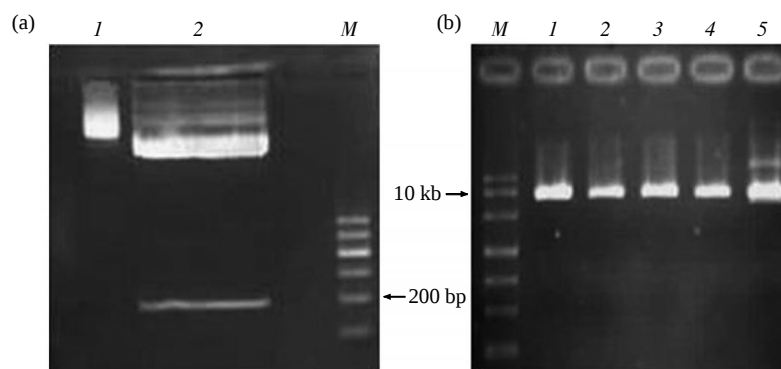
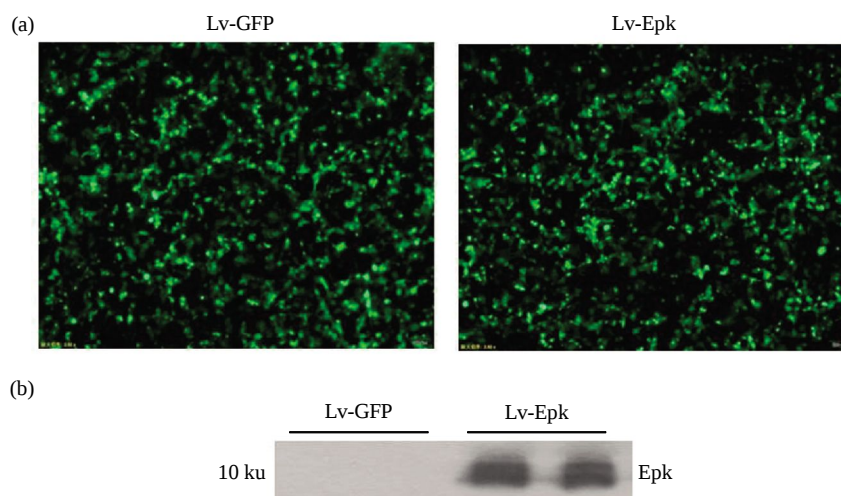


Fig. 1 Construction of pWPI/EpK vector by conjugating isolated EpK DNA fragment (a) and linear pWPI plasmid vector (b)

(a) 1: pUC/EpK plasmid vector; 2: pUC/EPK was digested by *Pac* I. (b) 1~4: pWPI plasmid vector were digested by *Pac* I; 5: pWPI plasmid vector; M: Molecular mass marker.

因 pWPI 慢病毒载体具有表达 GFP 标签蛋白的报告基因, 故制备的 Lv-GFP 或 Lv-EpK 慢病毒颗粒感染 293T 细胞, 荧光显微镜可直接检测到

GFP 的高表达 (图 2a). 同时 Western blot 可检测到细胞培养液中 EpK 的分泌表达 (图 2b), 表明构建的 Lv-EpK 慢病毒感染细胞, 可合成分泌 EpK 多肽.



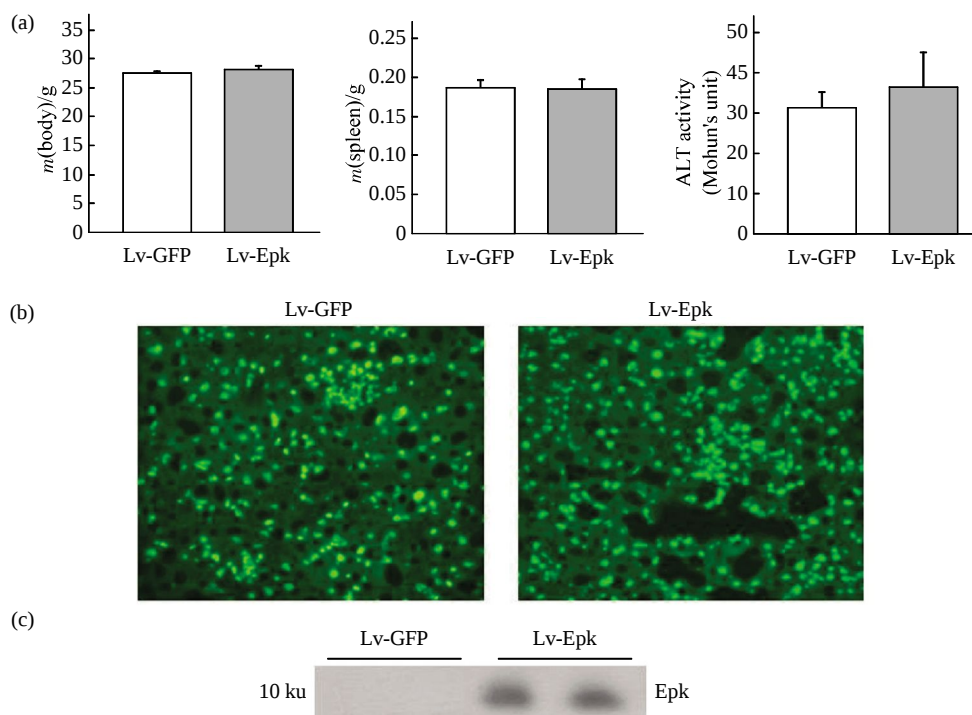
**Fig. 2 Identification of the expression of GFP/EpK protein in lentivirus-transfected 293T cells**

The cells were cultured in 6 wells plate with DMEM for 12 h, and transfected with pWPI/EpK vector or the control pWPI-GFP vector using Lipofectamine 2000. (a) GFP fluorescence were visualized under the microscope at 48 h after lentivirus transfection. (b) The EpK peptide was detected in culture medium of 293T cells by Western blot.

## 2.2 慢病毒感染小鼠后 EpK 的表达

慢病毒注射  $\text{apoE}^{-/-}$  小鼠后, 观察小鼠的日常活动、进食状态, 组间无明显差异。直至病毒注射第 18 周处理小鼠, 测量两组小鼠的体重、脾重及血

浆 ALT 活性, 未见组间明显差异( $P > 0.05$ , 图 3a)。对实验小鼠的肝脏进行快速冰冻切片, 在荧光显微镜可直接检测到各组 GFP 在肝脏中的高表达(图 3b), Western blot 可检测到 Lv-EpK 组小鼠血浆



**Fig. 3 Identification of EpK expression by lentiviral injection does not cause *in vivo* toxicity**

Lv-EpK or Lv-GFP mice were sacrificed at 18 weeks after lentiviral injection. (a) Body weight and spleen weight of mice were observed and plasma alanine aminotransferase (ALT) represented liver function was determined using Mohum's method. Data are represented as  $\bar{x} \pm s$ ,  $P > 0.05$  by  $t$ -test ( $n = 5 \sim 6$  for each group). (b) GFP fluorescence of liver cytoslices in both Lv-EpK and Lv-GFP control mice were directly visualized under the microscope. (c) Plasma EpK was detected by Western blot in the Lv-EpK lentivirus injected mice.

EpK 的分泌表达(图 3c), 说明慢病毒介导外源基因高表达对两组 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠的免疫系统和肝功能未产生明显差异, EpK 在 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠中表达的实验模型构建成功.

### 2.3 EpK 表达对 apoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平、脂蛋白分布及 PON1 活性的影响

慢病毒注射小鼠 2 周后, 每间隔 4 周采血, 连

续监测 EpK 表达对 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠血脂的影响, 结果显示: 与 Lv-GFP 对照组相比, 肝脏高表达 EpK 对普食喂养下 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆 TC、TG 水平无明显影响(图 4a, b), FPLC 结果可见血浆脂蛋白胆固醇分布无明显差异(图 4c). 此外, 如图 4d 所示, 血浆中与 HDL 结合的 PON1 酶活性在 Lv-EpK 组有所升高, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

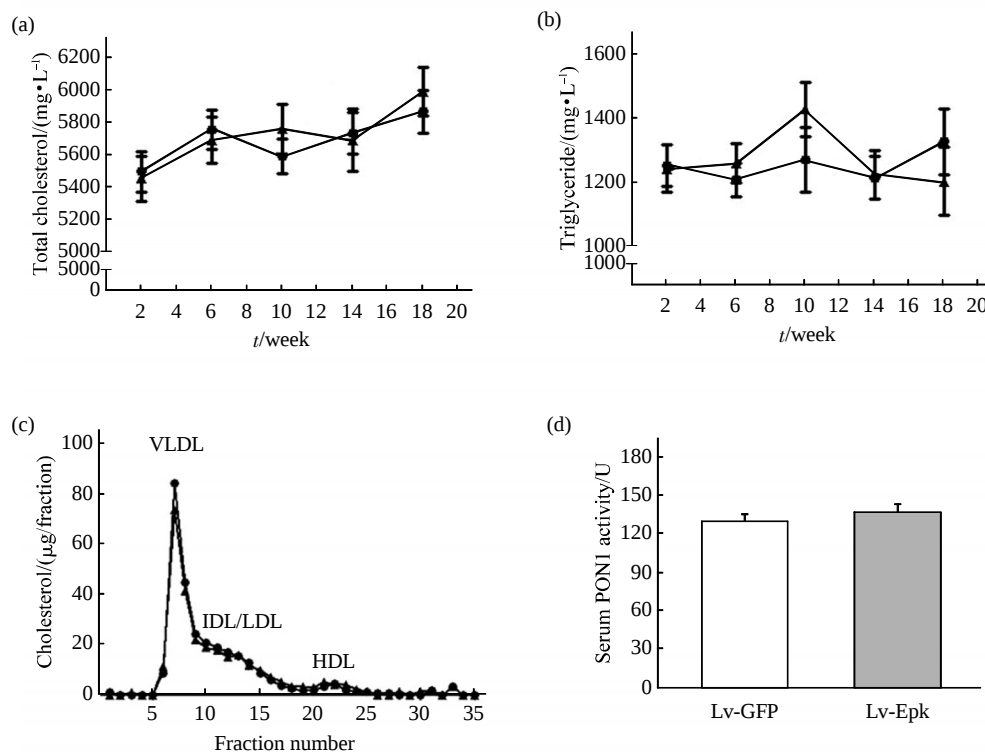


Fig. 4 The effects of EpK expression on plasma lipids and PON1 activity in apoE<sup>-/-</sup> mice

(a, b) The plasma total cholesterol and triglycerides levels of apoE<sup>-/-</sup> mice at the indicated time after lentiviral injection. (c) Plasma lipoprotein profiles were size fractionated by FPLC using a Superose 6 10/300 GL column, and cholesterol (VLDL, LDL and HDL) were measured. ●—●: Lv-GFP; ▲—▲: Lv-Epk. (d) Plasma PON1 activity was measured in Lv-Epk or Lv-GFP mice at 18 weeks after lentivirus injection. Data are presented as  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ .  $P > 0.05$ .

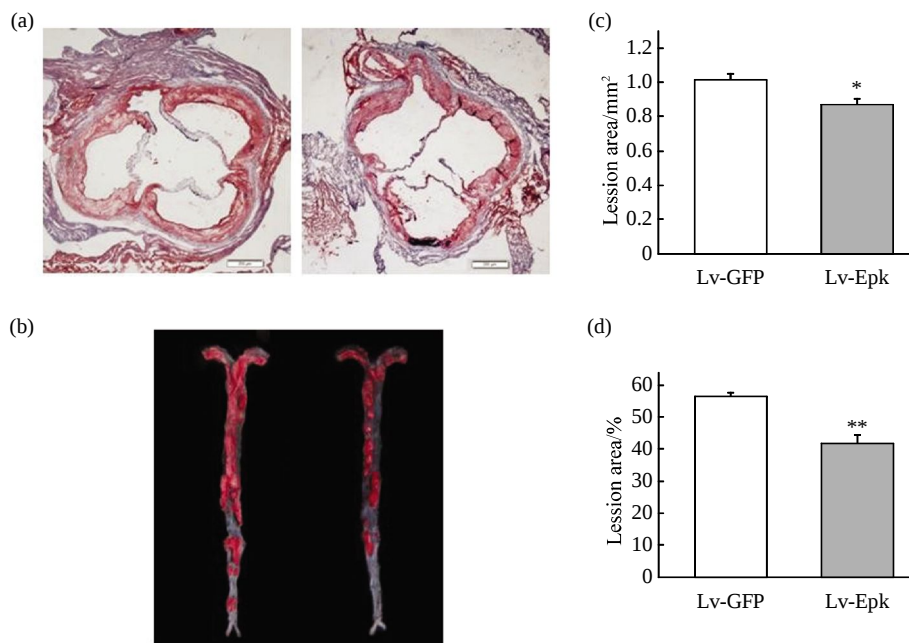
### 2.4 EpK 表达对 apoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块的影响

apoE<sup>-/-</sup> 小鼠为自发性、进展性发展 As 病程. 我们采用 11 月龄的小鼠, 病毒注射后普食喂养第 18 周, 对主动脉根部的冰冻切片和胸腹主动脉段纵剖面的油红 O 染色显示, 小鼠主动脉均有明显粥样斑块形成, 管腔病理性扩增(图 5a, b). 与 Lv-GFP 组比较, Lv-EpK 组主动脉窦部的 As 斑块面积明显减少( $0.87 \pm 0.07$  mm<sup>2</sup> vs ( $1.03 \pm 0.08$ ) mm<sup>2</sup>,  $P = 0.013$ ), 主动脉胸腹段斑块面积占管腔的百分比

减少了 24.7% ( $42.0\%$  vs  $55.8\%$ ,  $P = 0.001$ ), 可见, EpK 有明显减退 As 斑块的作用.

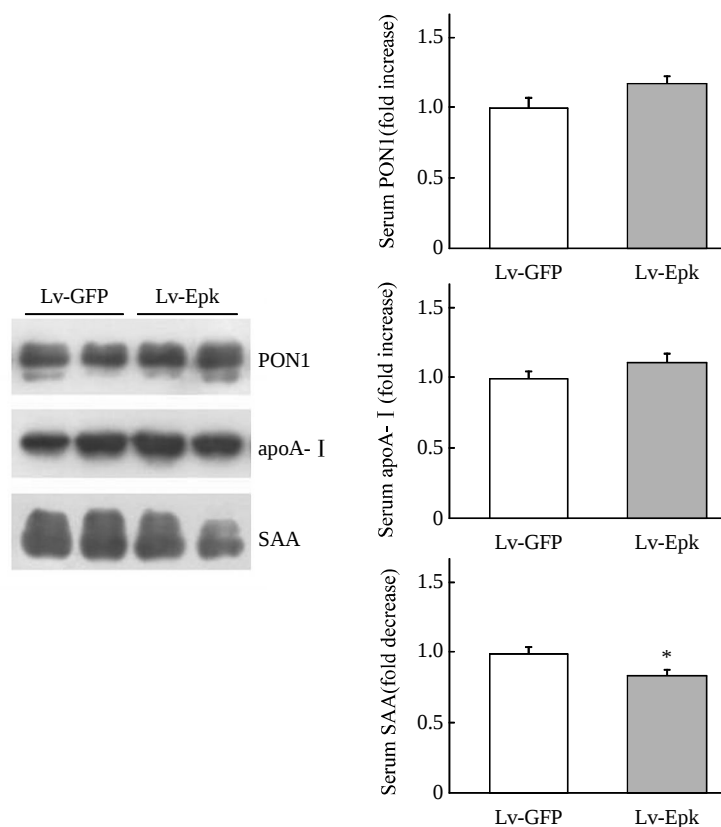
### 2.5 EpK 表达对 apoE<sup>-/-</sup>小鼠血浆氧化炎症相关蛋白的影响

利用蛋白质印迹检测血浆与 HDL 抗炎抗氧化相关功能蛋白 apoAI、PON1 及血清急性应激蛋白 SAA 的蛋白质水平, 结果如图 6 所示, 与 Lv-GFP 组相比, Lv-EpK 组小鼠血浆 apoA-I 及 PON1 蛋白水平有所提高, 但差异无统计学意义, 而血清炎症标志 SAA 水平明显下降( $P < 0.05$ ).



**Fig. 5 EpK expression reduces atherosclerotic lesions in apoE<sup>-/-</sup> mice**

(a, b) Images of representative atherosclerotic lesions in cross-sections of aorta root and by *en face* analysis of the aorta from Lv-GFP or Lv-Epk mice respectively. (c, d) Quantitative analysis of cross-sectional lesion area of the aorta roots (c) and percentage lesions area in total lesion areas (d). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ,  $n=6\sim 8$ .



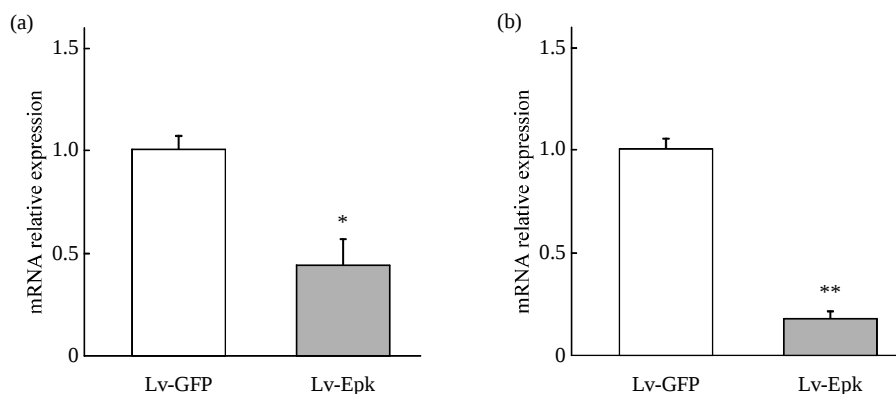
**Fig. 6 The effects of EpK expression on plasma PON1, apoA- I and SAA protein levels in apoE<sup>-/-</sup> mice at 18 weeks after lentiviral injection**

\* $P < 0.05$ , Compared with Lv-GFP.  $n=4$  for each group.

## 2.6 EpK 表达对 apoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏 TNF $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR (qPCR)检测小鼠肝组织中

炎症因子 TNF $\alpha$  及 IL-6 mRNA 水平, 结果显示, 与 Lv-GFP 组比较, Lv-EpK 组小鼠肝组织 TNF $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 水平显著降低(图 7)。



**Fig. 7 Effects of EpK expression on mRNA levels of inflammation related genes in apoE<sup>-/-</sup> mice**

(a) TNF $\alpha$ . (b) IL-6. Compared with Lv-GFP, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . ( $n=3\sim 4$  for each group).

## 3 讨 论

基于人源性 apoE 结构功能域的分析, 我们设计了 EpK 拟肽, 其同时包含 apoE 的 N 端 LDLR 结合区(141~150 氨基酸残基: LRKLRKRLLR)和 C 端的脂质结合区(234~254 氨基酸残基: QVAEVRKLEEQAAQIRLQAE), 为增加 EpK 的溶解度及与磷脂结合的亲和力, 中间采用了 6 个 Lys 连接体。前期我们利用原核表达体系表达并纯化了 EpK, 离体实验证实, EpK 可增强 HDL 介导的巨噬细胞胆固醇外流和抑制巨噬细胞炎症反应, 短时在体实验发现: 该肽注射入 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠体内并没有引起血浆胆固醇水平的降低, 而是优先选择与 HDL 结合<sup>[11]</sup>。为进一步探讨 EpK 是否有抗 As 的潜力, 本研究采用 pWPI 慢病毒载体构建真核分泌表达系统, 以研究分泌入血的 EpK 对 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠典型的高脂血症和 As 斑块的影响。我们的在体实验证实, 慢病毒注射使小鼠在肝脏中高表达分泌型 EpK 入血, EpK 对血 TC、TG 水平及脂蛋白分布无显著改变, 但明显减退 As 斑块, 其作用机制可能涉及 EpK 具有的抗炎功能。

已公认 apoE 是血液中的一种重要载脂蛋白, 其在肝脏摄取清除血浆脂蛋白残粒、参与 HDL 介导血管壁细胞胆固醇外流、抗氧化、抗炎等多方面地发挥抗 As 的作用。目前 apoE 作为 HDL 功能体现

的主要载脂蛋白之一, 已成为研究者开发 HDL 功能增强剂和抗 As 生物药物的重要靶点。鉴于人类 apoE 结构的多态性和功能异质性特点, apoE 功能拟肽的研发有望成为新型治疗 As 的多肽类药物<sup>[8, 10]</sup>。

目前报道的小分子 apoE 拟肽, 研究较为成功的是 Anantharamaiah 实验室设计并化学合成的 Ac-hE18A-NH<sub>2</sub>, 其由 apoE 的 LDLR 结合区(141~150 氨基酸残基)与一个 18 个氨基酸残基的 Class A 兼性肽 18A 共价结合而成, 已证实有多种功能: 可结合 LDL 和 VLDL 介导循环中脂蛋白残粒的清除, 因此降低高脂血症家兔和小鼠的血浆胆固醇水平; 尽管其不能升高血浆 HDL 胆固醇水平, 但能刺激体内 pre $\beta$ -HDL 和 apoE 的合成分泌, 并增强血浆 PON1 酶活性而改善 HDL 的功能; 同时还能促巨噬细胞胆固醇外流和抑制 LPS 刺激引起的巨噬细胞和内皮细胞炎症反应; 此外, 它的再循环特性有益于其有效期延长达 24 h 以上<sup>[6-8, 14-15]</sup>。最近 Ac-hE18A-NH<sub>2</sub> 已作为新型 apoE 功能拟肽, 注册为 AEM-28 的商品名正进入早期临床试验阶段, 有望发展成为 As 等心血管疾病及脂源性炎症疾病的治疗药物。

我们设计的 EpK 在 LDLR 结合区采用了相同的 10 个氨基酸肽段, 而考虑 Ac-hE18A-NH<sub>2</sub> 的 18 个氨基酸残基的异源性可能会潜在地引起的免疫应答, 我们选择了人 apoE 的 C 端脂质结合域中一段

21个氨基酸肽段作为EpK的C端,之前的二级结构检测表明EpK可自发形成兼性 $\alpha$ 螺旋结构,易于与脂质结合,之后与血浆孵育及注射入小鼠体内,也观察到EpK与脂蛋白的结合,并在细胞水平证实了此肽结构具有促巨噬细胞胆固醇外流和抑制LPS刺激巨噬细胞炎症反应的作用。不过遗憾的是,EpK的脂蛋白结合实验看到的是EpK优先与HDL结合而不是与VLDL和LDL结合<sup>[1]</sup>。本研究在小鼠注射EpK后18周内连续观察血脂水平,也发现EpK表达未引起apoE<sup>-/-</sup>小鼠血浆TC、TG水平的降低,故我们推测,EpK没有与apoE<sup>-/-</sup>小鼠体内脂蛋白残粒(VLDL和IDL)密切结合,未能增加肝脏对血浆脂蛋白残粒的清除而表现降脂效果,其优先与富含磷脂、较小的HDL结合,原因可能与EpK结构中有较多正电荷的Arg和Lys,又加上6个Lys连接体的设计有关。尽管EpK C端脂质结合区的设计未能体现降脂作用,但细胞实验证实了其增强HDL介导的细胞胆固醇外流的作用,同时EpK与HDL的优先结合也可能具有另外的优势:EpK不会很快通过LDLR从血浆中清除,故EpK在循环中的半衰期延长,有助于增强HDL对血管壁细胞的脂质调节和抗氧化抗炎功能。本实验中证实,没有改变血脂的情况下,EpK仍具有显著减退apoE<sup>-/-</sup>小鼠的主动脉As斑块的作用。此前的动物研究也有报道:即使低浓度apoE可能改变不了血浆中严重的高胆固醇血症,但也能显著阻抑As的发展<sup>[16-17]</sup>。多项回归分析指出,调节apoE而非胆固醇水平与血管内膜与中层比值的降低显著相关,均有利说明apoE的非调脂效应的重要性<sup>[18]</sup>,因此针对apoE的多功能效应,我们观察了EpK拟肽调脂效应以外的抗炎功能。

目前认为As是一种以血管壁脂质斑块为主要特征的慢性炎症性疾病,脂质代谢紊乱、氧化应激等均可引发炎症,致炎及抗炎因素的平衡控制着As斑块的形成、进程及不稳定性<sup>[19]</sup>。除了已有降脂药物的发展应用,临床斑块的炎症病理学证据和As实验模型研究支持,靶向抗炎的治疗策略用于降低或稳定As斑块成为心血管疾病防治中不容忽视的领域<sup>[19]</sup>。apoE作为心血管的多功能保护因素,其拥有抗炎能力已得到多方面研究的证实,apoE可抑制LDL的氧化,刺激一氧化氮合成;apoE可阻抑LPS刺激下巨噬细胞TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、IL-6等炎症因子的释放,其原因可能与下调炎症相关TLR4受体的表达,抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激

活有关,在抗As中均起到积极作用<sup>[19]</sup>。我们设计的EpK拟肽的N端LDLR结合区也被证实是其抗炎功能的关键结构,前期细胞实验观察到EpK显著降低LPS诱导的巨噬细胞TNF $\alpha$ 、IL-6和MCP1炎症因子的表达,本研究在apoE<sup>-/-</sup>小鼠中也进一步证实EpK可显著下调肝脏炎症因子TNF $\alpha$ 及IL-6的表达,与已发表的其他apoE拟肽结果一致<sup>[15]</sup>。

其次,我们前期的体外实验证实,EpK具有增强HDL介导细胞胆固醇外流的作用。那是否还影响HDL的结构或其他功能?我们关注了HDL结构与功能的代表性蛋白组分apoA-I、PON1及SAA。apoA-I是HDL上介导RCT、抗氧化抗炎作用的最主要载脂蛋白;PON1是肝脏合成分泌入血、特异结合于HDL上的抗氧化抗炎功能酶<sup>[20]</sup>;SAA为急性炎症期反应蛋白,炎症期间取代apoAI而升高在HDL中的比例。新近研究证实,脂质代谢紊乱、氧化应激、炎症可引起HDL结构改变及“失功能”,主要表现为apoA-I、PON1的降低,而SAA升高<sup>[21]</sup>。本研究中发现EpK显著降低SAA水平,而apoA-I、PON1未见明显变化,推测血中EpK与HDL结合可有利于HDL直接抗炎作用的发挥,降低SAA水平,而尚未对apoA-I、PON1的表达产生影响。

综上所述,我们在此报道了一种apoE拟肽——EpK在apoE<sup>-/-</sup>小鼠模型上明显消减As斑块的作用,尽管该拟肽未发挥降血脂作用,但其显著的抗炎作用可能是抗As的重要机制,因此深入探讨apoE拟肽的结构与功能的关系及其作用机制,将对As相关疾病的防治有重要意义,我们相信,EpK拟肽将有潜力发展成为As及其所致心血管疾病的治疗药物。

## 参 考 文 献

- [1] Hatters D M, Peters-Libeu C A, Weisgraber K H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci*, 2006, **31**(8): 445-454
- [2] Harris J D, Evans V, Owen J S. ApoE gene therapy to treat hyperlipidemia and atherosclerosis. *Curr Opin Mol Ther*, 2006, **8**(4): 275-287
- [3] Kolovou G D, Anagnostopoulou K K. Apolipoprotein E polymorphism, age and coronary heart disease. *Ageing Res Rev*, 2007, **6**(2): 94-108
- [4] Nieminen T, Kahonen M, Viiri L E, *et al.* Pharmacogenetics of apolipoprotein E gene during lipid-lowering therapy: lipid levels and prevention of coronary heart disease. *Pharmacogenomics*, 2008, **9**(10): 1475-1486

- [5] Yu H, Zhang W, Yancey P G, *et al.* Macrophage apolipoprotein E reduces atherosclerosis and prevents premature death in apolipoprotein E and scavenger receptor-class BI double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(1): 150–156
- [6] Bielicki J K, Zhang H, Cortez Y, *et al.* A new HDL mimetic peptide that stimulates cellular cholesterol efflux with high efficiency greatly reduces atherosclerosis in mice. *J Lipid Res*, 2010, **51**(6): 1496–1503
- [7] Sharifov O F, Nayyar G, Garber D W, *et al.* Apolipoprotein E mimetics and cholesterol-lowering properties. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2011, **11**(6): 371–381
- [8] White C R, Garber D W, Anantharamaiah G M. Anti-inflammatory and cholesterol-reducing properties of apolipoprotein mimetics: a review. *J Lipid Res*, 2014, **55**(10): 2007–2021
- [9] Vedhachalam C, Narayanaswami V, Neto N, *et al.* The C-terminal lipid-binding domain of apolipoprotein E is a highly efficient mediator of ABCA1-dependent cholesterol efflux that promotes the assembly of high-density lipoproteins. *Biochemistry*, 2007, **46**(10): 2583–2593
- [10] Osei-Hwedie D O, Amar M, Sviridov D, *et al.* Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents. *Pharmacol Ther*, 2011, **130**(1): 83–91
- [11] Zhao W, Du F, Zhang M, *et al.* A new recombinant human apolipoprotein E mimetic peptide with high-density lipoprotein binding and function enhancing activity. *Exp Biol Med*, 2011, **236**(12): 1468–1476
- [12] Zannis V I, McPherson J, Goldberger G, *et al.* Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 1984, **259**(9): 5495–5499
- [13] Zhou C Y, Cao J, Shang L, *et al.* Reduced paraoxonase 1 activity as a marker for severe coronary artery disease. *Disease Markers*, 2013, **35**(2): 97–103
- [14] Datta G, Chaddha M, Handattu S P, *et al.* ApoE mimetic peptide reduces plasma lipid hydroperoxide content with a concomitant increase in HDL paraoxonase activity. *Adv Exp Med Biol*, 2010, **660**: 1–4
- [15] Datta G, White C R, Dashti N, *et al.* Anti-inflammatory and recycling properties of an apolipoprotein mimetic peptide, Ac-hE18A-NH(2). *Atherosclerosis*, 2010, **208**(1): 134–141
- [16] Thorngate F E, Rudel L L, Walzem R L, *et al.* Low levels of extrahepatic nonmacrophage ApoE inhibit atherosclerosis without correcting hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(8): 1939–1945
- [17] Raffai R L, Loeb S M, Weisgraber K H. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(2): 436–441
- [18] Davignon J. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(2): 267–269
- [19] Tietge U J. Hyperlipidemia and cardiovascular disease: inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2014, **25**(1): 94–95
- [20] Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci*, 2012, **4**(11): 523–532
- [21] Kontush A, Chapman M J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*, 2006, **58**(3): 342–374

## Effect of The Apolipoprotein E Mimetic Peptide EpK on Atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> Mice\*

CAO Jia\*\*, XU Yan-Yong\*\*, SHANG Liang, LIU Hong-Mei, DU Fen, YU Hong\*\*\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology Hubei Provincial Key Laboratory of Developmentally Originated Disease, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430071, China)

**Abstract** We previously reported that a human apolipoprotein E mimetic peptide, designated EpK, enhanced the ability of HDL in mediating cholesterol efflux and suppressing LPS-induced proinflammatory cytokine expression in culture macrophage. The aim of this study was to investigate the impact of this peptide on atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice, employed lentivirus expression system to achieve the secretion of EpK *in vivo*. Eighteen female apoE<sup>-/-</sup> mice at 11 months of age were randomly divided into two groups. All mice were injected with pWPI lentivirus (Lv-GFP control group) or pWPI/ EpK lentivirus (Lv-EpK) from retro-orbital venous plexus and fed with a chow diet. Blood samples were collected from mice to determine plasma lipids levels and paraoxonase-1 (PON1) activity during eighteen weeks after lentiviral injection. The extent of atherosclerosis was examined using Oil Red O-stained cross-sections of the aorta root and by *en face* analysis of the aorta. The mRNA levels of inflammatory cytokines in liver were measured by quantitative real-time PCR and the target protein levels in plasma were detected by Western blot. The results showed that EpK peptide was successfully detected in blood by secreting expression in the liver. There were no obvious differences in plasma lipids levels, lipoprotein profile, apolipoprotein A I level and paraoxonase-1 (PON1) activity between two groups. However, the mean area of atherosclerotic lesions in Lv-EpK mice was significant reduced in aortic arch and total aorta, compared with Lv-GFP control groups (the lesion area of aortic root was  $(0.87 \pm 0.07) \text{ mm}^2$  *vs*  $(1.03 \pm 0.08) \text{ mm}^2$ ,  $P < 0.05$ ; the percent area of aortic lesion area was 42% *vs* 55.8%,  $P < 0.01$ ). Moreover, expression of EpK resulted in significantly reduced plasma serum amyloid A (SAA) levels and the mRNA levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in mouse liver. These results suggest that the apoE mimetic peptide EpK, is able to reduce atherosclerotic plaque in apoE<sup>-/-</sup> mice, which the mechanism may be involved in its anti-inflammatory property.

**Key words** atherosclerosis, apolipoprotein E, mimetic peptide, inflammation, lipid metabolism

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0117

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81270364) and Talent Project Funds of Health Board From Hubei Province (JX6B60).

\*\*These authors contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-27-68759795, E-mail: yu.hong@whu.edu.cn

Received: April 23, 2015 Accepted: June 30, 2015