

载脂蛋白 D 的结构、功能及临床应用

王磊 宿红艳* 明永飞 赵志文¹(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025; ¹ 山东警察学院刑事科学技术系, 济南 250100)

摘要 载脂蛋白 D (apolipoprotein D, apoD) 是一个 29 kDa 的糖蛋白, 它最初是在人血浆的高密度脂蛋白中被分离出来的。apoD 在结构上与其他类型的载脂蛋白存在很大的差异, 被归入脂肪促成素家族。apoD 可以与胆固醇、黄体酮、胆红素等多种疏水性小分子结合。另外, apoD 在多种脊索动物的各类组织中广泛表达, 揭示了 apoD 在脊椎动物中重要的生理功能。最近的研究表明, apoD 可以作为多种癌症及神经系统疾病的早期诊断标记, 因而备受关注。所有这些显示 apoD 是一个多配体、多功能的蛋白质。

关键词 载脂蛋白 D; 结构; 功能; 临床应用

众所周知, 脂类向身体各部位的运输是靠脂蛋白 (lipoproteins) 来完成的。血浆中的各类脂蛋白都由蛋白质和脂类两部分组成, 其蛋白质部分主要为载脂蛋白 (apolipoprotein, apo)。现已发现的载脂蛋白有 20 种之多, 主要有 apoA、apoB、apoC、apoD、apoE、apoJ 等类型。其中载脂蛋白 D (apolipoprotein D, apoD) 是分子量为 29 kDa 的糖蛋白, 主要存在于人类和其他生物血浆中, 并与高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 结合。由于 apoD 的结构及合成部位与其他载脂蛋白的差别很大, 故 apoD 是一类非典型的载脂蛋白, 被归入脂肪促成素基因超家族 (lipocalin superfamily) 中^[1]。该家族的成员都有相似的结构并可作为疏水的小分子物质的载体, apoD 也发现具有脂肪促成素基因超家族的结构特征, 并能结合胆固醇、黄体酮、孕烯醇酮、亚铁血红素相关化合物及花生四烯酸等疏水小分子^[2]。

ApoD 于 1963 年首次在人血浆中被发现^[3], McConathy 等^[4]将人的 apoD 从血浆高密度脂蛋白中分离出来。后来免疫双扩散实验证实 apoD 同样也存在于极高密度脂蛋白中。此外, 在极低密度脂蛋白中也有少量 apoD 的存在。目前人们已经在 apoD 的结构、表达与调控以及功能等方面展开研究。

1 ApoD 的结构

对 apoD 分子水平的研究所涉及的物种比较少, 目前, apoD 只在 5 种脊椎动物中被克隆和测序, 包括: 人、猴子、猪、兔子、老鼠和鸡^[5-10]。最近, 我们在头索动物文昌鱼中也克隆到了 apoD cDNA^[11]。

Drayna 等^[12]首次克隆到了人 apoD cDNA, 该基因 cDNA 全长 885 bp, 基因组 DNA 长 20 kb, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 内含子和外显子的这种排列方式与其他载脂蛋白不同, 是脂肪促成素家族的特征。在启动子区域有很多调控元件, 有雌激素反应元件、黄体酮反应元件、肾上腺皮质激素反应元件、脂肪反应元件和甲状腺激素反应元件, 以及血清反应元件、急相期反应元件、金属反应元件、胁迫反应元件和固醇依赖型阻遏子等^[13]。这些不同调控元件的存在反映出人 apoD 表达调控的复杂性。

2 ApoD 的结构

2.1 ApoD 的一级结构

McConathy 等^[4]分离人的 apoD 时就已确定 apoD 是一种糖蛋白, 由一条单一的肽链组成, 糖基化部分占蛋白质总量的 18%, 而其他载脂蛋白中碳水化合物的含量仅 10%。由 cDNA 推断出的蛋白质一级结构中含 189 个氨基酸, 其中包含由 20 个疏水氨基酸组成的信号肽, 经加工后可成为 N 端是谷氨酸的 169 个氨基酸残基组成的成熟蛋白质。该氨基酸序列与其他的载脂蛋白没有相似性, 但与视黄醇结合蛋白 (retinol-binding protein, RBP) 有 25% 的一致性, 与昆虫的胆汁三烯结合蛋白 (biling-binding protein, BBP) 有 30%~40% 的一致性, 以上的这两种蛋白质都属于脂肪促成素家族 (当时称为 α_2 -微球蛋白家族)。除

收稿日期: 2007-09-11 接受日期: 2007-11-15

国家自然科学基金(No.30740017)、鲁东大学校科研基金(No.20063301)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0535-6695961, E-mail: suhongyan66@126.com

RBP、BBP 和 apoD 之外, β 乳球蛋白(β -lactoglobulin)、昆虫花青苷(insecticyanin)和气味物质结合蛋白(odorant-binding protein)都属于此家族。脂肪促成素家族成员均具有的两个特征序列是: Asn-hyd-acidic-hyd-X-basic-hyd-X-Gly-X-Trp-aro-X-hyd-hyd-hyd-hyd 和 aro-X-hyd -hyd-X-Thr-Asp-Tyr-Asp-X-aro-hyd-hyd-hyd, 其中的 acidic 指的是酸性氨基酸; basic 指的是碱性氨基酸; hyb 指的是疏水性氨基酸; aro 指芳香族氨基酸; X 则代表任意的氨基酸残基。apoD 除了含有上述脂肪促成素家族的特征基序外, 它们 N 末端还含有一个由 20 个疏水氨基酸组成的信号肽、2 个天冬酰氨糖基化位点和 5 个保守的半胱氨酸(图 1)。人 apoD 的结构与功能关系研究表明, Cys⁸ 与 Cys¹¹⁴ 以及 Cys⁴¹ 与 Cys¹⁶⁵ 之间可以形成链内二硫键, Cys¹¹⁶ 则可以同其他生物大分子形成链间二硫键, 这对维持 apoD 的空间结构和生理作用极为重要^[14]。Western 杂交结果显示, apoD 在 HDL 和极高密度脂蛋白(very high density lipoprotein, VHDL)中的杂交条

带分别为 29 kDa 和 38 kDa。氨基酸顺序分析证实, 29 kDa 处的带是处于还原状态的 apoD, 而 38 kDa 处的带是 apoD 和 apoA-I 通过二硫键结合成的异二聚体。apoD 以二硫键与 apoA-I 结合是血浆中 apoD 存在的主要形式, apoD 通过与 apoA-I 形成聚合物而在外围与 HDL 结合。在低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)中也发现 apoD 和 apoB-100 形成的异二聚体。

2.2 ApoD 的二级和三级结构

载脂蛋白家族其他成员如 apoA、apoE 等的二级结构以 α 螺旋为主, 而 apoD 的结构经预测主要由 β 片层结构组成, α 螺旋则少于 5%, 因此 apoD 的结构与其他载脂蛋白明显不同。研究表明 apoD 具有脂肪促成素家族成员的结构特征, 人 apoD 的晶体结构与昆虫的 BBP 的结构非常接近, 并且半胱氨酸和二硫键的位置也是保守的^[15]。从蛋白质数据库(protein data bank, PDB)中我们检索到了人 apoD (PDB 检索



图 1 ApoD 家族成员比序分析

阴影表示相同的氨基酸序列, (-) 示序列比较时产生的序列间的空隙。N 端的信号肽用方框包围。保守的半胱氨酸残基用星号标识(*), 两个天冬酰氨糖基化位点用井号标识(#), 两个脂肪促成素家族的特征序列用下划线表示。

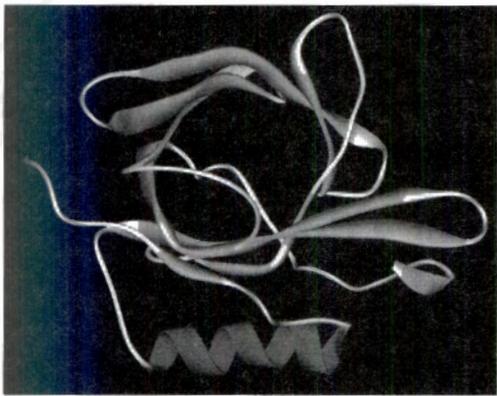


图2 ApoD的三维结构图
柱状物代表 α 螺旋,带状物代表 β 片层。

号: 2HZR)的晶体结构(图2),可以看出载脂蛋白D是由8个反向平行的 β 片层围绕形成了 β 桶状的超二级结构组成的,顶端开口底部闭合,并且在C末端连有一个 α 螺旋结构。这反映了apoD作为疏水小分子载体的特性,apoD的 β 桶状结构主要是由疏水侧链构成,成为一个结合配体的空腔,可以结合黄体酮等疏水配体并把它们运输到各组织中。同时,apoD的疏水性表面可以使其与HDL或脂膜结合,发挥生理作用。

3 ApoD在生物体内的表达分布

Northern杂交和原位杂交结果表明,apoD不同于其他类型的载脂蛋白主要局限于肝脏或肠道中表达,其表达的组织器官更为广泛。自上世纪90年代开始,人们陆续研究了人、猴子、老鼠、兔子、猪等哺乳动物中的apoD的组织表达情况,发现apoD在大脑、小脑和脊髓等中枢神经系统中高度表达,在肾脏、脾脏等内脏器官以及卵巢、睾丸等生殖器官中也有不同程度的表达,而在肝脏和肠道中的表达水平较低^[16, 6-9]。Vieria等^[17]在鸡快速生长的卵母细胞的卵黄中检测到apoD,这是首次在非哺乳动物中发现apoD的存在,并由此推测在卵生生物中apoD可能在胚胎发生过程中起着运输血浆中的脂类到卵母细胞的特殊作用。Ganfornina等^[10]克隆到了鸡的apoD,并比较了鸡和鼠apoD的表达模式。胚胎原位杂交和RT-PCR表明鸡的apoD在胚形成晚期的神经细胞和神经胶质细胞中开始表达,而与鼠apoD所不同的是其在神经嵴衍生的头部间叶细胞和血管周围细胞中不表达。鸡中apoD的发现将该基因的起源追溯到了2.5亿年前,即羊膜动物开始分化的时期。同时,根据哺乳动物和鸟类apoD在神经外胚层衍生

的中枢神经系统中的表达模式,Ganfornina等推测在哺乳动物和爬行动物的共同原始祖先中apoD也是在神经系统中特异表达的。apoD在生物体的多种组织中以不同水平表达表明apoD在生物体内发挥重要的作用,同时也表明apoD可能有多种组织特异的配体,并在不同组织中有着不同的生理功能。

从头索动物文昌鱼的肠cDNA文库中也分离到了apoD,并利用Northern杂交和原位杂交对文昌鱼apoD的时空表达模式进行了深入的探讨,结果发现其表达模式明显不同于其他已知物种中的情况,在文昌鱼中apoD主要在后肠和脊索中表达,而在神经系统中不表达,表现出很多原始的特征^[11]。这为揭示apoD在发育中的作用以及脊椎动物的进化历程提供参考。

4 ApoD表达的调控

大量的研究表明apoD的表达受很多因素的调控。人们首先发现类固醇类激素对apoD表达的影响,在AR-75-1乳腺表皮癌细胞和LNCaP前列腺癌细胞中,雌激素雌二醇抑制apoD的表达,而雄性激素二氢睾酮以及的塞米松则能增强apoD的表达^[18]。在体外培养的细胞中apoD的表达量还与细胞的增殖呈负相关,细胞生长抑制及衰老可以增加apoD的表达^[19]。另外,白介素-1 α 、视黄酸、羟基胆固醇等因素也都可以增加apoD的表达^[20]。

分析人apoD的上游启动子部分表明该区域存在着一系列的转录调控和反应元件,其中就包括雌激素、孕激素、糖皮质激素等类固醇类激素的调控元件,以及与细胞生长抑制有关的血清反应元件,这也从一个方面解释了上述apoD mRNA的表达受激素和细胞生长抑制调控的现象。将apoD的启动子同荧光素酶的报告基因相连接研究apoD在鼠纤维原细胞中的表达情况,缺失突变实验表明-174至-4部分是启动apoD表达的关键部分,而-558至-179区间则与细胞生长抑制导致的apoD表达量升高有关^[13]。

5 ApoD的生理功能和临床研究进展

5.1 生理功能

由于apoD在各种组织中广泛表达,并且apoD作为脂肪促成素家族成员可以与胆固醇、黄体酮、孕烯醇酮、胆红素、花生四烯酸等配体结合,人们推测apoD在不同组织或器官中可能通过与不同的配体结合发挥不同的生理作用。此外,apoD众多的调

控、结合元件和复杂的表达调控也反映出 apoD 作为一种多配体、多功能蛋白的可能性^[21]。

作为人体血浆HDL和VHDL中的一种载脂蛋白, apoD 有结合和转运脂质的功能。人血浆中 apoD 与 apoA-I 和卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(lecithin:cholesterol acyl transferase, LCAT)形成一个复合体,它们之间可以协同作用: apoA-I 调节 LCAT 活力, LCAT 催化胆固醇转变为胆固醇酯,最后由 apoD 将胆固醇酯转运到 LDL 和 VLDL 中。由于此复合体承担胆固醇酯的合成和转运,维持体内平衡,故被称为“胆固醇酯转运复合体”。同时, apoD 还能稳定 LCAT 活力,是 LCAT 的潜在激动剂。因此, apoD 在调节胆固醇的代谢中起重要作用。

ApoD 存在于正常人的中枢和外周神经系统中,不论血浆中的 apoD 还是脑本身合成的 apoD 均能结合血浆、细胞间隙和脑脊液中的胆固醇及其衍生物,便于胆固醇等疏水物质自由通过血脑屏障,对脑的脂质转运和维持脂质代谢平衡起重要作用。

研究表明,泪腺也能合成 apoD, apoD 与泪液中其它脂质相互作用,可起清洁作用,保护角膜免受亲脂分子的损害^[22]。此外, apoD 还是抗氧化防御系统的一部分,保护细胞和组织免受氧化损害^[15]。

5.2 临床研究进展

随着对 apoD 生物医学研究的深入,人们逐渐开始对其较为关注,这主要是源于 apoD 的表达与许多临床病理症状的关联性。

首先在脂类代谢与动脉粥样硬化的研究领域,研究表明血浆中 apoD 的水平与 HDL 中的胆固醇之间存在着相关性,并参与了胆固醇或其他类固醇的酯化过程,并且发现了 apoD 在动脉粥样硬化斑块处聚集的现象^[23]。

在肿瘤患者中人们发现了 apoD 高表达的情况。在女性乳腺囊性疾病和乳腺肿瘤患者中,囊肿综合征流出蛋白 GCDFP-24(又称为黄体酮结合蛋白)的浓度显著升高, GCDFP-24 约占囊液中全部蛋白质总量的 50%,后来人们研究发现 apoD 即是该蛋白质。研究者又陆续在前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢上皮癌、肝癌等病例中发现了 apoD 的高表达情况^[24~28]。

更为重要的是人们注意到 apoD 在正常的中枢神经系统中由星形胶质细胞分泌并高度表达^[29],这与花生四烯酸的转运、代谢和信号转导存在这一定的联系,而在病理条件下此表达水平还会进一步升高。

大量报道表明在多种神经系统功能失调疾病患者的脑脊液和血浆中 apoD 的含量明显增高,这些疾病包括:脑损伤、阿尔茨海默病、Neiman-Pick 病、帕金森病、中风、脑膜炎、痴呆和精神分裂症等^[29~32]。因此,人们认为可将 apoD 作为一个敏感分子病理生理标记,根据 apoD 的免疫反应来进行心血管疾病、癌症和神经系统疾病等的早期预测和诊断。除此之外,这些研究可望为相关疾病发病机制的探讨及其防治寻求新的措施、开拓新的前景。人们也由此联想到利用 apoD 作为靶位来治疗心血管疾病、癌症和神经系统疾病的可能性,但是人们至今尚不能确定是由于 apoD 的高表达导致了疾病的发生还是由于机体的防御反应使病患部位 apoD 的浓度升高。Walker 等^[33]曾在果蝇中利用过量表达的方法研究了 apoD 的同系物(homolog) Glial Lazarillo (GLaz),发现 GLaz 的过量表达能导致果蝇的抗逆能力的增加,并延长其寿命,推测人类的 apoD 或许可以作为治疗对象在抵消某些神经系统疾病中发挥保护作用。人们还对脂蛋白代谢紊乱与载脂蛋白分子缺陷的相关性进行调查,人们发现 apoD 呈现多态性, apoD 结构基因或其调控区序列的突变与高脂血症或早发动脉粥样硬化存在一定的关联。

6 展望

对于 apoD 的研究已经取得了一定的进展,大量研究表明 apoD 可能是一个多配体、多功能的蛋白质。apoD 在多种脊索动物中的表达情况反映了 apoD 在脊椎动物进化中的起着重要的作用,对 apoD 在不同生物表达图式的比较将有助于推断生物的进化过程。此外,大量关于 apoD 在相关疾病中的表达情况的研究表明 apoD 在肿瘤和神经系统疾病患者体内过量表达,可以作为前列腺癌、阿尔茨海默病、精神分裂症、帕金森病等疾病的病理标记。然而,尽管 apoD 能与多种疏水小分子物质结合,但其生理学配体至今尚未被最终确定,其生理功能还需进一步确定。且 apoD 与相关疾病发病机制的研究工作目前几近空白,人们是否可以将 apoD 作为药物作用靶点应用于临床治疗尚需大量基础研究工作的支持。

参考文献 (References)

- [1] Rassart E et al. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1482: 185
- [2] Thomas EA et al. *Schizophr Res*, 2007, 89: 147
- [3] Ayrault-Jarrie M et al. *Bull Soc Chim Biol*, 1963, 45: 703

- [4] McConathy WJ *et al. FEBS Lett*, 1973, **37**: 178
 [5] Drayna D *et al. J Biol Chem*, 1986, **261**: 16535
 [6] Smith KM *et al. J Lipid Res*, 1990, **31**: 995
 [7] Provost PR *et al. Mol Cell Endocrinol*, 1995, **109**: 225
 [8] Provost PR *et al. J Lipid Res*, 1990, **31**: 2057
 [9] Séguin D *et al. Mol Brain Res*, 1995, **30**: 242
 [10] Ganfornina MD *et al. Dev Dyn*, 2005, **232**: 191
 [11] Wang L *et al. Cell Biol Int*, 2007, **31**: 74
 [12] Drayna DT *et al. DNA*, 1987, **6**: 199
 [13] Do Carmo S *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 5514
 [14] Yang CY *et al. Biochemistry*, 1994, **33**: 12451
 [15] Skerra A. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482**: 337
 [16] Borghini I *et al. Biochim Biophys Acta*, 1995, **1255**: 192
 [17] Vieira AV *et al. Mol Reprod Dev*, 1995, **42**: 443
 [18] Simard J *et al. Endocrinology*, 1992, **130**: 1115
 [19] Do Carmo S *et al. Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**: 954
 [20] López-Boado YS *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 32105
 [21] Thomas EA *et al. Mol Psychiatry*, 2003, **8**: 167
 [22] Cofer S *et al. Gene*, 1996, **171**: 261
 [23] Sarjeant JM *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 2172
 [24] Hall RE *et al. Prostate*, 2004, **58**: 103
 [25] Soiland H *et al. Cell Oncol*, 2007, **29**: 195
 [26] Rojo JV *et al. Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001, **80**: 158
 [27] Vázquez J *et al. Gynecol Oncol*, 2000, **76**: 340
 [28] Vizoso FJ *et al. World J Gastroenterol*, 2007, **13**: 3221
 [29] Miranda E *et al. J Surg Oncol*, 2003, **83**: 99
 [30] Holston EC. *Issues Ment Health Nurs*, 2005, **26**: 1103
 [31] Ordoñez C *et al. Histol Histopathol*, 2006, **21**: 361
 [32] Hansen T *et al. Pharmacogenomics J*, 2006, **6**: 120
 [33] Walker DW *et al. Curr Biol*, 2006, **16**: 674

Structure, Function and Clinical Application of the Apolipoprotein D

Lei Wang, Hong-Yan Su*, Yong-Fei Ming, Zhi-Wen Zhao¹

(College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China;

¹Department of Criminological Technology, Shandong Police College, Jinan 250014, China)

Abstract Apolipoprotein D (apoD) is a 29-kDa glycoprotein that was initially isolated from human plasma high density lipoproteins fraction. It is an atypical apolipoprotein and was subsequently identified to be a member of lipocalin family by structural analysis. Several small hydrophobic molecules were identified as potential ligand for apoD, such as cholesterol, progesterone and bilirubin. Wide distribution of the *apoD* gene in the tissues of several chordates suggests the functional importance of its corresponding protein. Recently study reveals that ApoD has received attention as prognostic marker for various cancer development and neurological diseases. All of these indicate that apoD is likely to be a multi-ligand, multi-functional protein.

Key words apolipoprotein D; structure; function; clinical application

Received: September 11, 2007 Accepted: November 15, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30740017) and the Ludong University Sciences Foundation (No.20063301)

*Corresponding author. Tel: 86-535-6695961, E-mail:suhongyan66@126.com