

## 脂蛋白与动脉粥样硬化关系研究的重要里程碑

王克勤

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

一个领域内科学研究的发展和前进往往由于技术的革新和理论上的飞跃。在动脉粥样硬化研究的漫长旅途中, 也有几个重要的里程碑, 才使我们的研究达到了今天的水平。

虽然早在 100 余年以前 Virchow 就提出了脂质浸润学说, 但没有足够的实验依据。直到 20 年代中期前苏联的一位病理学家 Anichkov 和他的同事用纯胆固醇喂养家兔在短短的三四个月就可形成类似于人的动脉粥样硬化(As)斑块和高脂血症, 为 As 的实验研究奠定了基础。迄今人们还用家兔为模型来研究 As 的发病和消退机理。这样的例子很多, 由于篇幅有限, 本文只拟介绍几个主要的里程碑。

### 1 血浆脂蛋白的发现

从 20 年代中期开始就有几位杰出的超速离心专家致力于胶体颗粒和蛋白质分子在超速离心中的下沉行为的研究。在他们研究过程中遇到一种使人费解的现象, 即在超速离心过程中发现血浆清蛋白界面不对称, 这种异常的界面形状往往随时间而改变, 并受盐浓度和稀释的影响, 一种含有脂质的成分可以在清蛋白附近沉降, 曾将这种蛋白称之为 X 蛋白。直到美国伯克利大学的唐纳(Donnan)实验室 Gofman 教授于 40 年代末期带着两位博士研究生开始研究脂蛋白上浮行为和其它理化性质, 用一种 Beckman 公司的新型超速离心机。该超速离心机以电驱动, 并装有光学系统可观察离心过程中蛋白质颗粒移动的行为。他们重复了以往科学家发现的不正常现象, 并发现基线下面有一下沉峰。这种现象很难甚至不可能用一般习惯的标准组分分析方法加以解释。于是他们怀疑以往科学家的解释不甚正确, 他们意识到可以用另一种方法来解释“X 蛋白”的异常超速离心现象将产生长远的重要影响。他们认为“X 蛋白”是可以上浮的组份, 在超速离心过程中会产生一种倒过来的峰, 如果将血浆的密度增加到远远大于 1.03 g/ml(这是“X 蛋白”的密度)时, 下沉和任何界面的歪曲现象问题均可避免, 对密度敏感的“X 蛋白”即可上浮。Gofman 和两位研究生 Lindgren 和 Elliott 按照他们的假设进行了实验。他们获得了一

种倒置的上浮峰, 从此解决了十余年来未解决的难题, 对“X 蛋白”的异常现象做出了正确的解释。他们在 1949 年发表了第一篇论著, 迷惑不少著名科学家 15 年之久的难题终于获得解决。从而开辟了以超速上浮方法来分离脂蛋白, 为脂蛋白的研究开辟了一个新纪元。

Gofman 等立即看到此新方法的优越性, 并马上用该法研究脂蛋白的分子大小、水合密度、上浮速率等基本理论问题及其与疾病的关系, 尤其是高、低脂蛋白血症和 As, 特别是冠心病, 通过测定人和家兔脂蛋白的超速离心图谱, 发现兔在喂胆固醇后, 其血清中  $S_{10-30}$ (IDL)脂蛋白有明显增加。而  $S_{5-8}$ (LDL)变化不多, 冠心病患者也有同样改变。

自 Gofman 等发表第一篇与冠心病有关的论文后, 研究脂蛋白的人骤增, 除了有专门的刊物发表这方面的论著外, 在欧美许多一流的刊物和杂志也发表这些论著。特别是近十年来由于细胞生物学、分子生物学和基因分子生物学等的应用、蛋白质化学的完善, 每年发表的论文, 数以千计, 脂蛋白与 As 的关系已获得广大科研工作者的公认。我国早在 1958 年就开展了脂蛋白的分离、提纯、结构、功能和代谢及其与 As 发病和消退的关系的研究。

### 2 载脂蛋白研究的重要性

血清脂质(包括胆固醇、甘油三酯、磷脂及脂肪酸)均不溶于水, 必须与蛋白质结合方能溶于血浆水溶液介质而在血浆中运行。50 年代末和 60 年代中有数位学者, 包括 Scanu、Shore 夫妇最初认识到了载脂蛋白的重要性, 开始分离提纯脂蛋白的载脂蛋白。随后, 许多科学家均在载脂蛋白研究中做出重大贡献。使载脂蛋白的研究成为国际上研究重点, 迄今已发现有 20 种之多, 其中 10 种的一级结构和基因已测出。它们是载脂蛋白 A I、A II、B<sub>100</sub>、B<sub>48</sub>、C I、C II、C III、D、E 和载脂蛋白(a)。发展之迅速使人瞩目。我组早就认识到载脂蛋白的重要性, 但由于种种原因, 在 80 年代初才开始载脂蛋白 A I、C II 和 C III 的研究, 迄今已将载脂蛋白 A I、C II 的一级结构和 C III 的 NH<sub>2</sub> 端部分一级结构测出。目前正在研究构建鸭肝基因库及克隆鸭载脂蛋白

A I cDNA。使我组载脂蛋白的研究初步进入国际先进水平。

目前,已发现各类载脂蛋白都有其重要生理功能,有些是共同的,例如与脂质结合使之溶于水溶液,有抗原性,调节胆固醇和 TG 代谢;是脂蛋白结构的支柱,是与细胞膜结合的特异配基。但各种载脂蛋白也有其特点,不同的载脂蛋白可激活不同的酶和因子。例如,载脂蛋白 A I 可激活 LCAT;C II 可激活脂蛋白脂肪酶 (LPL)。载脂蛋白 E 和载脂蛋白 B<sub>100</sub>则是 LDL 和 CM 残粒和 VLDL 残粒的受体的配基。载脂蛋白 E 的缺乏或变异往往会引起高脂蛋白 (HLP)血症。称之为分子代谢病或分子病。目前已发现各种载脂蛋白都有基因异构体。这些变异体大大丰富了我们对于脂蛋白和载脂蛋白的深入广泛的了解,也加深我们对 As 发病机理的认识,使人们能从分子水平和基因水平来研究高脂蛋白血症和 As 发病的分子基础。因此提出载脂蛋白的研究,认识它的重要性是第二个里程碑。

### 3 高 $\beta$ 脂蛋白血症的分型

60 年代初纸上电泳只是一种分离血清脂蛋白的方法,简便易行,很快获得推广,谁也没有去想它与高脂蛋白血症的内在联系。直到 1967 年 Fredrickson 等才洞察到它与高脂蛋白血症的有机联系,首次提出用纸上电泳的图像将高脂蛋白血症分为五种不同的类型,每种类型都有其特点,且与临床症状有较密切的关系。I 型 CM 较高,II 型胆固醇较高,III 型胆固醇和 TG 均较高,IV 型 TG 较高,V 型 CM、TG 和胆固醇均较高。II、III、V 为高脂蛋白血症、IV 型为高前 $\beta$ 脂蛋白血症。I 型为高 CM 血症。这样使基本理论的研究和临床医务人员对 As 和高 $\beta$ 脂蛋白有了共同的诊断方法和共同语言,较迅速确定患者发病的情况,该方法不需高、精、尖的仪器设备,但其影响是十分深远的,迄今广大研究人员和医务工作者仍采用该法进行研究和诊断及治疗的指标,亦堪称脂蛋白研究领域一重要突破。为此 Fredrickson 于 1991 年获得国际动脉粥样硬化大会的嘉奖,对他的非凡洞察力给予高度评价。

1968 年和 1972 年 Noble 和王克勤分别建立琼脂糖电泳分离脂蛋白,因其分辨能力远比纸上电泳为佳,可分离出三条前 $\beta$ 脂蛋白,为高 $\beta$ 脂蛋白血症的分型提供了更好的手段。

### 4 分子生物学在载脂蛋白研究中的应用

载脂蛋白有 5~6 种可以在脂蛋白分子间相互交换,他们的基因有许多共同点,例如载脂蛋白 A I, A II, C I, C II, C III, 载脂蛋白 A IV 和 E 都有 4 个外显子,3 个内含子。还有前肽和原肽,最大的载脂蛋白 A IV

分子量也只有 50 000 Da 左右,而 B<sub>100</sub>则与众不同,它的一级结构一直未解决,直到 80 年代中期才由 Lawrence Chan 用分子生物学的技术克隆出其 cDNA 序列、推测出其一级结构,并为杨朝俞用改进的蛋白质化学方法所证实。一举解决了 20 年来未解决的难题,开辟了一个新的领域,使脂蛋白和 As 专家可以更深入研究载脂蛋白 B<sub>100</sub>在 As 中的发病机理。进一步研究载脂蛋白 B<sub>100</sub>的结构、功能、代谢、基因表达、遗传变异和编辑以及其与载脂蛋白(a)相互结合的机理等等。为此 Chan 在 1987 年获得了 Henry Wieland 奖。

载脂蛋白 B<sub>100</sub>是载脂蛋白中分子量最大、含氨基酸最多的,分别为 512 937 Da 和 4 563,其中有 27 个为信号肽,成熟的分子含 4 536 个氨基酸。它与其他载脂蛋白不同,含 29 个外显子和 28 个内含子。并有 25 个半胱氨酸,大多集中在 NH<sub>2</sub> 基端,COOH 端的 7 个 Cys 有二个为自由的,可能是与载脂蛋白(a)结合而形成脂蛋白(a)。载脂蛋白 B<sub>100</sub>含疏水性氨基酸较高,在此基本基础上对下列几个方面进行了深入广泛的研究。

4.1 载脂蛋白 B<sub>100</sub>在 LDL 分子中的分布和排列与 LDL 结构的关系。初步认为 B<sub>100</sub>环绕 LDL 整个分子。可用凝血酶分解为 5 个区域,再用胰蛋白酶水解,认为可以水解的位于分子表面、不被水解的位于分子内部。不能水解的大部分位于羧基端的 33 氨基酸残基。这种推测已被电子显微镜直接观察所证实。

4.2 研究了载脂蛋白 B<sub>100</sub>与载脂蛋白(a)结合的机理。

4.3 研究了 LDL 受体与载脂蛋白 B<sub>100</sub>结合的机理。发现载脂蛋白 B<sub>100</sub>的羧基端是载脂蛋白 B<sub>100</sub>与 LDL 受体相结合的片段。因为羧基端缺损或变异,都不能与受体结合。载脂蛋白 B<sub>100</sub>分子中的第 3 500 位的 Arg 被 Gln 所取代则不能与受体结合,从而导致高脂蛋白血症。这是继载脂蛋白 E 基因变异后载脂蛋白变异而引起的高脂蛋白血症。

4.4 研究了载脂蛋白 B<sub>100</sub>基因变异与家族性高和低脂蛋白血症及 As 的关系。发现高脂蛋白血症多为 B<sub>100</sub>基因中某一核苷酸被另一核苷酸所取代,例如 Soria 发现 B<sub>100</sub>基因中编码第 3 500 位的 Arg 的核苷酸被编码 Gln 的核苷酸所代替后,使 B<sub>100</sub>与 LDL 受体结合很弱而引起高脂蛋白血症。低脂蛋白血症多因 B<sub>100</sub>基因在转录过程中过早地出现终止密码,现已发现 26 种之多,一般杂合子无明显症状,LDLC 只有正常的 1/2~1/4。纯合子则有严重的病变,例如脂肪吸收不良、棘形红细胞症、视网膜色素沉着和神经性肌肉退变等。

4.5 载脂蛋白 B mRNA 的编辑,是目前国际上研究的热点。一般人载脂蛋白 B<sub>48</sub>只在小肠合成,B<sub>100</sub>在肝脏

合成。1993年Greeve等测定了12种哺乳动物的mRNA的编辑,企图了解载脂蛋白B mRNA的编辑一般是否仅限于啮齿动物的小肠,还是亦发生在其他动物的肝脏,结果发现所有12种种属的小肠都可以编辑高水平的载脂蛋白B mRNA,分别为人、猴、牛和兔>90%,小鼠、大鼠、豚鼠、猫、狗、猪和马则分别为89%、88%、87%、84%和73%,羊只有40%。肝脏则不同,小鼠为70%、大鼠为62%、马43%、狗18%,兔和豚鼠<1%,人、猴、猪和羊肝脏中载脂蛋白B mRNA的编辑活性则不能测出。此外他们还研究了载脂蛋白B mRNA在肝和小肠中的编辑与血浆脂蛋白的关系,发现一般在肝脏中不能编辑载脂蛋白B mRNA的动物血浆中含载脂蛋白B的脂蛋白比能在肝脏中编辑载脂蛋白B mRNA者要高。上述结果说明:①载脂蛋白B mRNA的编辑不仅发生在小肠,而且也发生在其它哺乳动物的肝脏;②肝脏中载脂蛋白B mRNA的编辑是调控血浆中含载脂蛋白脂蛋白的重要因素。因此阐明载脂蛋白B mRNA的调控是十分重要的,了解其如何调控可能对研究高脂蛋白血症和As的防治有重要的意义。

## 5 脂蛋白受体的发现和研究

著名分子遗传学家Brown和Goldstein早在1972年就开始研究家族性高胆固醇血症(FHC),该病患者血清中胆固醇水平非常高且易早发冠心病。二位学者曾假设该显性遗传病是由于缺乏产物对胆固醇合成的反馈抑制作用并被此假说所迷惑,因为在以往的人和动物中遗传反馈调节尚未发现过,因此研究这种遗传病可能有助于代谢调节的基本理论的阐明。于是他们用纤维母细胞在体外培养的方法来揭示该假说。通过数年的努力,终于发现细胞表面存在着LDL受体,并系统地研究这些受体是如何反馈调节胆固醇的合成。这一发现对胆固醇的代谢、运输和使用具有划时代的突破,从而打开了受体研究的新领域,堪称脂蛋白和动脉硬化研究中的又一重要里程碑。二位分子遗传学家廿余年来对LDL深入广泛的研究,不仅阐明了LDL受体途径的调节机理,还对受体本身的基本理论问题进行了详尽的研究,如受体的结构、功能、代谢、遗传变异等。还对家族性高胆固醇血症的发病机理进行阐述,提出治疗方案,可算一项杰出的理论结合临床实际的研究工作。他们于1985年共获诺贝尔医学奖。

自此以后,脂蛋白受体研究工作进展很快,除LDL受体外,Brown和Goldstein及国际上其他科学家还发

现了许多新的受体,如载脂蛋白E受体或乳糜微粒残体受体、LDL受体相关蛋白、清道夫受体、 $\beta$ -VLDL受体等。

除低密度脂蛋白受体以外,值得一提的还有HDL受体,虽然Gwyne等早在1976年即发现大鼠肾上腺皮质有HDL受体的存在,近十余年来也发表了不少论著,但对动物体内是否存在特异性、高亲和性、可饱和性的受体尚有争议。作者首先发现北京鸭有很高的HDL水平,LCAT活性较高、CETP的活性极低,喂高胆固醇和高脂肪饲料不易形成As斑块,外源性和体内胆固醇主要由HDL携带。根据上述实验王克勤等于1987年提出HDL受体代谢胆固醇及其酯的假说,于1989~1990年用研究LDL受体的经典方法,证实北京鸭肝细胞膜存在特异性HDL受体,并进一步分离提纯了该受体,研究其理化性质、氨基酸组成,发现其含689个氨基酸,分子量为89 kDa,为具有4种多态性的糖蛋白。载脂蛋白A I为其重要配基,其中Lys被修饰不影响其与HDL受体结合。上述研究为作者提出的HDL受体途径提供有力依据。此外近年来Fidge、Oram和Bierman等亦证实特异性HDL受体的存在。

目前关于HDL受体途径研究正方兴未艾,是否能成为研究脂蛋白和As的里程碑,还需看研究的发展及其在脂蛋白代谢和抗As中的作用。

## 结束语

从1949年Gofman和Lindgren等发现脂蛋白以来已经历46个春秋,在这46年中脂蛋白和As的研究在各方面已取得令人瞩目的进展,这些进展是与上述主要成果、科学家的创造劳动分不开的。目前国际上和我国从事脂蛋白的研究者愈来愈多,解决的课题愈来愈广泛,使用的技术也愈来愈先进。基因治疗高脂蛋白血症和As已提到日程上来。不难看出脂蛋白和载脂蛋白的研究显然是因为它们与动脉粥样硬化的发生与发展机理的研究有密切的关系而得到发展,而As发病机理的彻底阐明和防治又依赖于基本理论深入广泛的研究。二者是相辅相成的。新近还发现载脂蛋白E的基因异构体E<sub>4</sub>与老年痴呆症有一定关系,又为载脂蛋白的功能开辟了新的领域。因此对载脂蛋白的结构、功能和代谢的了解还十分不够,希望在不久的将来有更大的突破,最终能找出消除危害人类健康的那些疾病的有效措施。