

• 综 述 •

载脂蛋白 M 的组织定位及其生物学意义的研究进展*

朱春华¹, 王宗春¹综述, 张晓膺^{1△}, 罗光华²审校

(苏州大学附属第三医院: 1. 心胸外科; 2. 综合实验室, 江苏常州 213003)

关键词: 载脂蛋白类; 组织定位; 生物学功能

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 17. 024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)17-1967-03

载脂蛋白 M(ApoM)是 1999 年由瑞典隆德大学的 Xu 和 Dahlback^[1]发现并从乳糜微粒中分离、克隆出来的一种新型的载脂蛋白。正如此前命名载脂蛋白 L (apolipoprotein L, ApoL)一样, 将其命名为 ApoM。其相对分子量为 26×10^3 。根据序列检索结果分析, ApoM 属于 Lipocalin 蛋白超家族成员^[2]。ApoM 主要存在于高密度脂蛋白, 同时也是富三酰甘油和低密度脂蛋白的组成部分。

1 血浆中 ApoM 的定位

ApoM 同其他载脂蛋白一样, 在血浆中的主要功能是参加脂蛋白的组成, 增加脂类在血浆中的溶解度并参与脂质的运输, 促进 Pre- β HDL 的形成和外周组织胆固醇的逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT)^[3]。ApoM 主要定位在高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 和富三酰甘油的脂蛋白 (triglyceride-rich lipoprotein, TRL), 同时也参与低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 及极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的组成。另有少量 ApoM 以游离形式存在于血浆中^[4]。

2 肝脏中 ApoM 的表达

肝脏是生物体合成和代谢各种物质的主要器官。在脂蛋白及载脂蛋白生物学功能的发挥中起非常重要的作用。Zhang 等^[5]通过原位杂交和免疫组化的方法证实 ApoM 在肝脏中主要表达于肝实质细胞。在生理状态下, 肝细胞功能的完整性保证了 ApoM 的正常表达。在病理状态下, 肝脏 ApoM 的表达发生了相应的改变。Xu 等^[6]研究了肝缺血再灌注损伤时肝内 ApoM mRNA 及血浆 ApoM 的表达。结果肝组织损伤随灌注时间的延长而逐渐加重。肝组织 ApoM mRNA 的表达则先有一过性的下降, 此后随着灌注时间的延长其表达明显增强。血浆 ApoM 蛋白也有相同的变化趋势, 但其表达变化相应滞后。在灌注早期 ApoM 表达的一过性下降可能是由于肝细胞损伤导致肝细胞表达 ApoM 下降, 而血浆中该蛋白的半衰期较短, 血浆中的蛋白大量降解。另一种可能是血流开放后 ApoM 蛋白大量沉积至肝脏, 导致血浆中该蛋白的含量减少; 随后的增加可能是由于肝脏缺血再灌注损伤后产生大量的炎症介质, 这些炎症介质可以影响肝细胞 ApoM mRNA 的转录和 ApoM 蛋白的合成, 且与浓度相关。在肝缺血再灌注损伤过程早期 ApoM 的明显变化表明、其具有急性时相反应蛋白的特征。

Jiang 等^[7]研究了正常肝组织、肝癌组织、慢性肝病组织以及血浆中 ApoM 的表达情况及相关关系。结果表明肝细胞癌患者的血浆 ApoM 水平显著高于健康对照组 ($t = 3.399, P < 0.05$)。慢性肝炎和肝硬化患者的 ApoM 的水平更高, 肝硬化

患者的血浆 ApoM 水平最高。肝细胞癌、慢性肝炎及肝硬化患者血浆中的载脂蛋白 A1(ApoA1)和 Lp(a)水平较健康对照组明显降低, 其下降的水平反映肝细胞受损的程度, 可以作为评估肝细胞受损的指标。在肝脏病变时血浆中 ApoM、ApoA1 和 Lp(a)的不同表现的机制还需要进一步的研究^[8]。同时, 本研究发现肝癌组织中 ApoM mRNA 及蛋白水平均较癌旁正常组织明显降低 ($P < 0.05$)。这可能是因为肝细胞癌时肝功能受损, 肝细胞表达 ApoM 下降。这与血浆 ApoM 水平的变化不一致。推测在肝细胞癌及其他慢性肝病中存在增强的肝外 ApoM 的分泌, 具体机制还需要进一步的探讨。

3 肾脏中 ApoM 的表达

Xu 等^[1]在鉴定出 ApoM 的时候就明确肾脏中表达 ApoM。Zhang 等^[5]应用原位杂交和免疫组化技术证实肾脏中 ApoM 主要在肾小管上皮细胞中表达, 且大部分表达于近曲小管, 小部分表达于远曲小管, 而在髓祥中无表达。Faber 等^[9]研究证明在肾小管中 ApoM 的重吸收是通过 Megalin 介导的。小鼠如缺乏 Megalin, ApoM 则会随尿液排泄。

唐华等^[10]研究了 ApoM 在急性肾衰 (acute renal failure, ARF) 大鼠肾组织中的表达及 NF- κ B 抑制剂的干预作用, Western Blotting 结果显示 ARF 组各时点 ApoM 水平较假手术组明显增高 ($P < 0.01$), 且呈双峰型变化, 于再灌注 6 h 达第 1 次高峰, 之后表达逐渐下降, 从 24~48 h 表达再次上调; 核因子- κ B(NF- κ B) 特异性抑制剂-吡咯烷二硫代氨基酸甲酸盐 (PDTC) 组 ApoM 的变化趋势与 ARF 组相同, 但各时点 ApoM 水平较 ARF 组显著降低 ($P < 0.01$)。ApoM 与核内 NF- κ B p65 亚基的表达呈明显正相关。推测缺血再灌注性 ARF 可能引起多种炎症介质释放并进而影响 ApoM 的表达。

4 肠道中 ApoM 的表达

Calayir 等^[11]在研究肝 X 受体对 ApoM 表达的影响时发现小鼠小肠黏膜组织和人大肠癌细胞株 Caco2 细胞中均有 ApoM 的表达; 但与肝来源细胞的调节作用不一样, 肝 X 受体人工合成激动剂 TO901317 下调肝细胞 ApoM 的表达, 上调肠细胞 ApoM 的表达。这可能是由于不同组织细胞的不同调节机制导致的^[12]。

Luo 等^[13]进一步研究了肠组织中 ApoM 的表达和定位。结果显示 ApoM 在肠组织中表达丰富, 其 mRNA 和蛋白水平在癌组织中明显低于癌旁正常组织、炎症黏膜组织、肠息肉和正常黏膜组织。而在分期晚的肠癌组织中 ApoM 的表达显著高于分期早的组织。这种 ApoM 的表达水平在大肠癌变过程中的变化可以反映癌变的进程和分期, 推测 ApoM 可以作为评估癌变程度和预后的指标。

5 胚胎组织中 ApoM 的表达

Zhang 等^[14]研究发现在小鼠胚胎组织中 ApoM 在胚期 7.5~18.5 d 可以检测到 ApoM 的表达;在 7.5 d 开始表达,到 9.5 d 明显升高,至 10.5 d 有所下降,然后持续升高直到 18.5 d。12 d 时的胚胎 ApoM 主要表达于胎肝,在 15 d 时同时表达于胎肝和胎肾。在人胚胎中,胚胎肝脏从 3~5 月龄开始表达并持续整个胚胎发育期。胚胎肾脏在 5~9 月胎龄期间高表达。胚胎肠组织主要在胚胎发育后期表达 ApoM;胚胎骨骼肌组织在 3~5 月龄时也表达少量 ApoM;另外在胚胎发育早期胎胃中也有些 ApoM 的表达。推测 ApoM 在胚胎发育的各个时间段对各器官的发育起一定的作用,而在成年后有些组织不再表达 ApoM,说明 ApoM 的表达既有组织特异性又有时间特异性。进一步推测 ApoM 在组织中的异常表达往往提示一定的病理生理改变^[15]。

6 展 望

ApoM 基因定位于 6 号染色体 p21.3,紧邻主要组织复合物Ⅲ所在的区域^[16]。该区域是包含有许多功能未知基因的高度保守区。包括一些天然免疫与炎症的相关基因。这些基因在漫长的生物进化过程中一直保留下来,在不同的物种之间有很高的同源性。人类与小鼠 ApoM 的基因序列有大约 80% 的同源性^[17]。蛋白序列分析显示,ApoM 属于 Lipocalin 超家族成员,Duan 等^[2]以小鼠的尿主要蛋白(major urinary protein, MUP)和人维生素 A 结合蛋白(retinol binding protein, RBP),即 Lipocalin 超家族的两个成员为原始模板并采用计算机模拟技术构建的 ApoM 蛋白结构的三维模型。根据该模型,ApoM 具有一个八股反向平行的 β 折叠和一个手柄样的 α 螺旋。其中有 6 个半胱氨酸残基组成 3 个二硫键。Sevvana 等^[18]最近应用晶体模型分析小鼠 ApoM 蛋白存在一种不同的结构,它包括七股反向平行的 β 折叠,这不是仅仅缺失一个 β 折叠,而是 E 和 F β 折叠被一条从氨基酸链 N 末端形成的 A' β 折叠代替了。分子热动力模型分析显示,小鼠体内七股 β 折叠 ApoM 蛋白和八股 β 折叠 ApoM 蛋白都存在,且其表达机会均等。这种同时存在于小鼠体内的两种不同结构的其 ApoM 的生物学意义还不甚清楚。在人的血浆中糖基化的和非糖基化的 ApoM 都有。ApoM 保留有与脂蛋白单磷脂层结合的 N 末端信号肽,这是由于 ApoM 蛋白序列缺乏一个信号肽切割位点。质谱分析结果显示 ApoM 蛋白有 3 个亚型,但是他们分子结构和功能的差别还需要进一步的探索。

根据 ApoM 的基因定位、蛋白结构、表达模式,推测其可能参与机体许多纷繁复杂的生物学行为,有各种各样的功能。目前的研究显示其与血脂代谢^[19-20]、心血管疾病^[21]、糖尿病及肥胖等都有很好的相关性^[21-26];在一些器官组织中可作为评估肿瘤进展、预后及功能受损的指标;同时 ApoM 广泛参与机体的免疫炎性反应,在感染和炎性反应过程中有相关的改变^[27]。笔者推测,ApoM 在免疫器官、组织及免疫细胞中也有表达。接下来笔者将进一步检测扁桃体、增殖体、胸腺、脾脏、骨髓、淋巴细胞、单核细胞等组织细胞及各种肿瘤组织中的 ApoM 表达水平及其相关调节机制。

参考文献

- [1] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. J Biol Chem, 1999, 274(44): 31286-31290.
- [2] Duan J, Dahlback B, Villoutreix BO. Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed muta-

- genesis [J]. FEBS Lett, 2001, 499(1-2): 127-132.
- [3] Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis [J]. Nat Med, 2005, 11(4): 418-422.
- [4] 田时志, 魏明亮. 载脂蛋白 M 的研究近况 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(3): 175-176.
- [5] Zhang XY, Dong X, Zheng L, et al. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization [J]. Acta Histochem, 2003, 105(1): 67-72.
- [6] Xu X, Ye Q, Xu N, et al. Effects of ischemia-reperfusion injury on apolipoprotein M expression in the liver [J]. Transplant Proc, 2006, 38(9): 2769-2773.
- [7] Jiang J, Zhang X, Wu C, et al. Increased plasma apoM levels in the patients suffered from hepatocellular carcinoma and other chronic liver diseases [J]. Lipids Health Dis, 2008, 7: 25.
- [8] Jiang J, Wu C, Luo G, et al. Expression of apolipoprotein M in human hepatocellular carcinoma tissues [J]. Acta Histochem, 2011, 113(1): 53-57.
- [9] Faber K, Axler O, Dahlback B, et al. Characterization of apoM in normal and genetically modified mice [J]. J Lipid Res, 2004, 45(7): 1272-1278.
- [10] 唐华, 张春梅, 罗娜, 等. 载脂蛋白 M 在急性肾衰大鼠肾组织中的表达及 NF- κ B 抑制剂的干预作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 24(11): 2141-2144.
- [11] Calayir E, Becker TM, Kratzer A, et al. LXR-agonists regulate ApoM expression differentially in liver and intestine [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(6): 516-521.
- [12] Mosialou I, Zannis VI, Kardassis D. Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors [J]. J Biol Chem, 2010, 285(40): 30719-30730.
- [13] Luo G, Zhang X, Mu Q, et al. Expression and localization of apolipoprotein M in human colorectal tissues [J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 102.
- [14] Zhang XY, Jiao GQ, Hurtig M, et al. Expression pattern of apolipoprotein M during mouse and human embryogenesis [J]. Acta Histochem, 2004, 106(2): 123-128.
- [15] Ahnstrom J, Lindqvist PG, Walle U, et al. Plasma levels of apolipoprotein M in normal and complicated pregnancy [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2010, 89(9): 1214-1217.
- [16] Xu N, Zhang XY, Dong X, et al. Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin-1alpha on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(4): 944-950.
- [17] Xie T, Rowen L, Aguado B, et al. Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse [J]. Genome Res, 2003, 13(12): 2621-2636.
- [18] Sevvana M, Kassler K, Ahnstrom J, et al. Mouse ApoM displays an unprecedented seven-stranded lipocalin fold: folding decoy or alternative native fold [J]. J Mol Biol, 2010, 404(3): 363-371.
- [19] Arora BM, Singh MK. Evaluation of ApoM as a biomarker of coronary artery disease [J]. Clin Biochem, 2010, 43(10-11): 932.
- [20] Mulya A, Seo J, Brown AL, et al. Apolipoprotein M expression increases the size of nascent pre beta HDL formed by ATP binding cassette transporter A1 [J]. J Lipid Res, 2010, 51(3): 514-524.
- [21] Hu YW, Zheng L, Wang Q. Characteristics of apolipoprotein M and its relation to atherosclerosis and diabetes [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(2): 100-105.
- [22] Plomgaard P, Dullaart RP, de Vries R, et al. Apolipoprotein M

- predicts pre-beta-HDL formation; studies in type 2 diabetic and nondiabetic subjects[J]. J Intern Med, 2009, 266(3): 258-267.
- [23] Kappelle PJ, Ahnstrom J, Dikkeschei BD, et al. Plasma apolipoprotein M responses to statin and fibrate administration in type 2 diabetes mellitus[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1): 247-250.
- [24] 白洲霞. 2 型糖尿病血清载脂蛋白 A1、B、脂蛋白(a)水平观察分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1146-1147.
- [25] Ooi EM, Watts GF, Chan DC, et al. Association of apolipoprotein M with high-density lipoprotein kinetics in overweight-obese men

- [J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 326-330.
- [26] Luo G, Zhang X, Nilsson-Ehle P, et al. Apolipoprotein M [J]. Lipids Health Dis, 2004, 3: 21.
- [27] Feingold KR, Shigenaga JK, Chui LG, et al. Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression[J]. Atherosclerosis, 2008, 199(1): 19-26.

(收稿日期: 2011-05-15)

• 综 述 •

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在临床微生物领域的应用进展^{*}

颜英俊^{1,2}综述, 汤一苇^{2△}审校

(1. 四川省医学科学院/四川省人民医院, 成都 610072; 2. 美国范德堡大学医学中心, 田纳西州, 美国 37232)

关键词: 细菌; 真菌; 病毒; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 17. 025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)17-1969-04

在临床微生物实验室, 革兰染色、菌落形态、显微镜检查、选择培养基的生长特点、各种手工或自动的生化试验是细菌、酵母、真菌的主要鉴定方法。这些方法依赖细菌生产代谢过程, 需要长时间的孵育, 一般需要 24~48 h, 不能满足临床对感染患者的快速诊断和适当的治疗。分子生物学方法、细菌核糖体(16S rRNA) 基因序列分析、实时荧光定量 PCR 检测特定的基因被认为是替代方法, 但这些技术复杂、耗费高, 不适用于临床微生物实验室的检测工作。目前迫切需要寻找和建立新的病原微生物快速诊断的方法, 以满足临床的需要。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 是近年来发展的一种简便、快速、准确、经济的病原微生物鉴定的新方法, 随着该方法的发展和在临床微生物实验室的应用, 将取代或改变现在微生物实验室的工作模式和流程, 有着良好的应用前景。

1 MALDI-TOF MS 的检测原理、特点及优势

20 世纪 80 年代以来, 有 4 种软电离质谱技术产生, 分别为等离子体解吸(plasma desorption, PD)、快原子轰击(fast atom bombardment)、电喷雾电离(electrospray ionization)和基质辅助激光解吸/电离(MALDI)。MALDI 质谱(MALDI-MS) 是 19 世纪 80 年代末问世并迅速发展起来的质谱分析技术。这种离子化方式产生的离子常用飞行时间(time of flight, TOF)检测器检测。MALDI 与 TOF 合用的 MALDI-TOF MS 技术, 使传统的主要用于小分子物质研究的质谱技术发生了革命性的变革, 从此迈入生物质谱技术发展新时代。

MALDI-TOF MS 首先由 Karas 等^[1]于 1987 年提出, 用于分析非挥发性生物大分子^[2]。其原理非常简单: 当用一定强度的激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜, 基质从激光中吸收能量, 样品解吸附, 基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离, 电离的样品在电场作用下加速飞过飞行管道, 根据到达检测器的飞行时间不同而被检测, 即测定离子的质量电荷之比(m/z)与离子的飞行时间呈正比来检测离子。MALDI-TOF-

MS 的中心技术就是依据样品 m/z 的不同来进行检测, 并测得样品的相对分子质量。完整的细胞可以产生特殊的蛋白图谱(指纹图谱), 通过和以前收集的数据库中的指纹图谱相比较来鉴定微生物。

2 MALDI-TOF MS 在临床微生物检测和鉴定中的应用

在细菌检测和鉴定方面: Cain 等^[3]最早通过提取水溶性蛋白应用 MALDI-TOF MS 来鉴别微生物。这种方法可以区别几种革兰阴性和阳性的细菌。后来 Holland 等^[4]应用完整的细胞而不是提取物来鉴定细菌。在研究中, 取琼脂平板上的细菌菌落直接和基质溶液混合, 然后直接点样在 MALDI-TOF MS 样品靶盘上分析。应用这种方法, 不仅可以鉴定一系列肠杆菌, 还能区别假单胞菌 3 个不同的种。后来有研究认为直接检测完整细胞可以获得革兰阴性和阳性的细菌的种和株特异的鉴定图谱^[5-6]。这些研究不仅表明分析细菌完整细胞可以鉴定和区别细菌不同的种和株, 而且表明和细胞提取方法相比较, 这种样品制备的方法更加简便和快速。

近年来, 有不少研究应用 MALDI-TOF MS 直接鉴定细菌菌落: Eigner 等^[7]应用细菌菌落直接检测上千株常规分离的细菌, 代表临床微生物实验室主要分离的细菌, 用 MALDI-TOF MS 能准确鉴定 95.2%。Seng 等^[8]研究 1 660 株分离细菌菌株, 代表 109 个不同的种, 用 MALDI-TOF MS 84.1% 能准确鉴定到种, 11.3% 只能鉴定到属。笔者认为结果错误或不能鉴定是由于 MALDI-TOF MS 数据库不完善。van Veen 等^[9]分析 980 株细菌, 发现和传统方法相比, 两种方法鉴定到种和属的一致率分别为 79.9% 和 17.3%。另有试验证实^[10], 分析 1 371 株临床分离株发现 1 278 株(93.2%) 能鉴定到种水平, 73 株(5.3%) 到属水平, 不能得到可靠结果的有 20 株(1.5%)。在这 1 278 株准确鉴定的结果中, 和传统生化方法鉴定到种的水平一致率为 95.1% (1 215 株), 和属的一致率为 3% (39 株), 种和属不一致率 1.9% (24 株)。大部分的差异(42/63) 是因为系统数据库相关的分类学差异, 14 个是因为得到的 MALDI-TOF MS 图谱的鉴别能力差, 7 个因为最初传统方法

^{*} 基金项目: 美国国立卫生研究院基金资助项目(UL1-RR024975)。 [△] 通讯作者, E-mail: yingjun. yan@vanderbilt. edu。