

· 综述 ·

载脂蛋白 A5 基因多态性与脂类代谢疾病相关性研究进展*

陈娟^{1,2} 综述, 张葵^{1△} 审校

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008; 2. 东南大学医学院, 江苏南京 210009)

关键词: 载脂蛋白 A5; 单核苷酸多态性; 冠心病; 代谢综合征; 糖尿病, 2 型**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.020**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2012)05-0554-03

载脂蛋白 A5(apoA5)是最近通过蛋白组学技术发现的载脂蛋白家族新成员, 与血浆三酰甘油(TG)浓度呈负相关。apoA5 基因至少有 23 个单核苷酸多态性(SNP)位点, 其中多个位点的变异影响血浆 TG 水平, 且存在着种族差异。国内外均有针对 apoA5 基因 SNP 位点与脂类代谢疾病的报道。现对 apoA5 基因分子结构、影响 TG 代谢的机制作简要介绍, 并着重讨论其基因多态性与脂类代谢疾病的相关性。

1 apoA5 的生物学特性

2001 年 Pennacchio 等^[1] 比较了人与小鼠 DNA 基因序列, 发现位于 11q23 区、距 apoA1/C3/A4 基因簇下游约 30 kb 处存在 1 个新的载脂蛋白编码基因。同年, van der Vliet 等^[2] 采用 cDNA 抑制消减杂交技术发现 1 种与小鼠肝脏再生早期阶段相关的载脂蛋白, 即 apoA5。人 apoA5 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 全长 1 889 bp, 编码 366 个氨基酸, 成熟的 apoA5 蛋白由 343 个氨基酸组成, 相对分子质量约 39×10^3 , 主要分布于乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)和高密度脂蛋白(HDL)中, 其血浆浓度极低, 不到 apoA1 的 0.1% 和 apoA4 的 1%^[3]。蛋白结构分析显示, apoA5 蛋白含有 2 个独立折叠结构域:N-末端和 C-末端^[4]。N-末端 1~146 氨基酸残基在无脂类的中性缓冲液中呈疏水 α 螺旋结构。C-末端 186~227 氨基酸残基包含 1 段含有大量正电荷的氨基酸序列, 该序列可能具有促 TG 脂解从而降低 TG 的作用; 293~296 氨基酸残基附近存在 1 个独特的四脯氨酸序列, 与 apoA5 脂类结合活性有关, 该片段缺失会导致 apoA5 与脂类结合能力受损^[5-6]。

2 apoA5 调节 TG 代谢的机制

apoA5 在肝脏中合成后分泌到血浆中, 对调节血浆 TG 水平具有决定性作用。目前认为 apoA5 通过细胞内和细胞外两种途径调控血浆 TG 水平。apoA5 通过细胞内途径抑制肝脏 VLDL-TG 合成与分泌。van der Vliet 等^[2] 发现过表达 apoA5 的转基因小鼠和腺病毒载体处理小鼠血浆 TG 浓度均降低, 而敲除 apoA5 基因的小鼠血浆 TG 浓度增加 4 倍。Shu 等^[7] 认为 apoA5 可作为肝细胞输出脂类的控制闸, 具有延缓 VLDL 装配和进入分泌途径的作用。在细胞外途径中, apoA5 可通过影响脂蛋白脂肪酶(LPL)促进血 TG 的清除。Merkel 等^[8] 指出 apoA5 可作为 LPL 异构激活剂, 通过变构效应促进 LPL 与血管内皮细胞表面硫酸乙酰肝素糖蛋白(HSPG)结合, 增加富含 TG 的脂蛋白与 HSPG-LPL 复合物相互接触的机会, 从而使 TG 水平降低; Fruchart-Najib 等^[9] 进一步证实 apoA5 可通过稳定 LPL 二聚体而增加其脂解活性。Schaap 等^[10] 认为 apoA5 既可抑制肝脏合成 VLDL-TG, 也可作为 LPL 及肝脂酶

(HL) 的激活剂加速血管内 VLDL-TG 的脂解。Grosskopf 等^[11] 则发现 apoA5 的缺失或无效可降低脂蛋白残基与 LDL 受体的亲和力, 从而使富含 TG 的脂蛋白不能被肝脏有效地摄入及降解。还有研究表明 apoA5 可作用于一些与 HDL-C 代谢有关的蛋白质, 加速 HDL-C 的脂解^[10-11]。

3 apoA5 基因多态性与脂类代谢疾病的关系

apoA5 基因多态性不但与血浆 TG 水平升高有关, 而且与脂类代谢疾病显著关联。目前已经发现多个多态性位点, 部分位于非编码区, 如 -1131T>C (SNP3)、-3A>G (Kodak)、IVS3+G476A (SNP2)、c. 1259T>C (SNP1) 等, 另有部分位于编码区, 如 c. 56C>G (S19W)、c. 553G>T (G185C) 等。

3.1 与高甘油三酯血症(HTG)的关系 HTG 以一种或多种血脂紊乱为特征, 即总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)升高, 或 HDL 降低, 是冠心病(CHD)及脑卒中的独立危险因素之一^[12]。Hadarits 等^[13] 根据血浆 TG 浓度将 436 名匈牙利人分成 4 组 (q1: TG<1.31 mmol/L; q2: 1.31~2.90 mmol/L; q3: 2.91~4.85 mmol/L; q4: TG>4.85 mmol/L), 研究了 apoA5-1131T>C、IVS3+G476A、c. 1259T>C、c. 56C>G 多态性位点, 发现等位基因频率与血浆 TG 浓度呈明显正相关 ($P<0.05$)。Pullinger 等^[14] 在分析 c. 553G>T 等位基因与 TG 的关系时, 发现 TG 水平升高人群的稀有半胱氨酸等位基因频率比 TG 水平降低人群高 4 倍以上, 且 HTG 患病风险增高 4.45 倍 ($P<0.001$)。Liu 等^[15] 对中国香港 56 例家族性混合型高脂血症(FCH)患者的研究表明, apoA5 等位基因 -1131T>C、-3A>G、1891T>C、c. 553G>T 与 FCH 有相关性, 且等位基因出现频率明显高于对照组 ($P<0.01$); 纯合子个体 TG 和 LDL-C 水平升高, HDL-C 水平降低。

3.2 与 CHD 的关系 CHD 是一类受环境影响较大的多基因遗传病, HTG 是其主要的发病危险因素之一。邱方等^[16] 分析了 CHD 患者 apoA5 基因 -1131T>C 和 c. 553G>T 多态性位点, 发现 CHD 患者 -1131CC 基因型人群血清 TG 水平较 -1131TT 和 -1131TC 基因型人群分别升高了 35.6% 和 26.2% ($P=0.016$), c. 553T 等位基因携带者血清 TG 水平较 c. 553GG 基因型人群升高 20.6% ($P=0.008$)。Jang 等^[17] 对 741 名韩国 CHD 患者在校正了体质指数(BMI)、酒精消耗等影响因素后进行分析, 显示 apoA5-1131T>C 基因多态性携带者 CHD 患病风险增加 ($P=0.007$), 且血浆 apoA5 水平低于健康对照组 ($P=0.001$); CHD 患者基因型为 T/C 和 C/C 人群血浆 TG 水平较 T/T 人群高, 前者的 LDL 颗粒小于后者 ($P=0.003$)。Sarwar 等^[18] 的研究也证实 -1131T>C 与血浆 TG 浓度有强相关性, C 等位基因携带者的血浆 TG 浓度明显

* 基金项目: 南京市科技发展重点项目(zkx09030)。 △ 通讯作者, E-mail: zkangkui@yahoo.com.cn。

高于对照组,CHD 发病风险增加 18% ($P=2.6 \times 10^{-7}$)。

3.3 与代谢综合征(MS)的关系 MS 是以空腹血糖紊乱、向心性肥胖、HTG、高血压和 HDL-C 水平降低等为主要标志的临床综合征。除环境因素(如吸烟、肥胖、缺乏锻炼和营养习惯不良)外,遗传因素也与 MS 发病有关^[19]。Grallert 等^[20]对参加奥格斯堡区健康协作研究(KORA)和萨尔茨堡区冠状动脉硬化高危险因素患者预防组织(SAPHIR)的 MS 患者进行检测,结果显示-1131T>C,-3A>G,c. 56C>G,476G>A 和 c. 1259T>C 等位基因携带者血浆 TG 水平升高($P<0.001$)。在 SAPHIR 研究中,以上等位基因携带者血浆 HDL 水平降低($P<0.001$)。特别是 c. 56C>G 等位基因与 MS 风险增高有明显相关性($P=0.03$ KORA; $P=0.009$ SAPHIR)。Kisfali 等^[21]研究了 343 名匈牙利 MS 患者,发现-1131C,IVS3+473A 和 1259C 等位基因携带者血浆 TG 水平均升高,并认为 apoA5 二单倍体型(T-1131C,IVS3+G476A 和 T1259C)是 MS 独立危险因素,且对男性影响更明显。Ong 等^[22]对中国香港 1 330 例和广东 1 952 例 MS 患者的检测发现,-1131T>C 等位基因携带者 MS 发病危险性明显增加。

3.4 与 2 型糖尿病(T2DM)的关系 T2DM 与肥胖、胰岛素抵抗、HTG、MS 密切相关,HTG 是糖尿病常见的脂类紊乱之一。Dorfmeister 等^[23]检测了欧洲白人、印第安人和非洲人 T2DM 患者,证实 apoA5-1131C 欧洲白人及 19W 印第安人携带者血浆 TG 水平显著高于-1131T 和 19S 纯合子($P<0.001$);但未发现 apoA5-1131T>C 和 S19W 基因型多态性对以上 3 种人群的 T2DM 发病率有直接影响。翟光华等^[24]等检测中国镇江地区 71 例 T2DM 患者,发现糖尿病组 apoA5-1131C 等位基因频率显著高于对照组($P=0.006$),CC 纯合子糖尿病患病风险是 TT 纯合子的 3.75 倍,且校正年龄、BMI 等影响因素后,该差异仍具有显著性意义,糖尿病组 C 等位基因携带者 TG 水平显著高于非 C 等位基因携带者,TC 水平和 LDL-C 水平亦明显升高($P<0.05$),提示 apoA5-1131C 等位基因可能与 T2DM 的发生、发展有关。Cabré 等^[25]研究结果显示,T2DM 患者 TC 杂合子血浆 apoA5 水平及富含 TG 的脂蛋白浓度是 TT 纯合子的 2 倍,HTG 发病危险性增高($P=0.01$),提示 T2DM 患者 apoA5-1131T>C 基因型多态性影响 apoA5 的功能,并与 HTG 发病率有关。

4 小 结

自从 apoA5 被发现以来,国内外众多学者对 apoA5 的作用机制、结构和基因多态性做了大量研究,认为 apoA5 基因多态性位点与血浆脂类水平密切相关。然而,apoA5 基因多态性位点与疾病发病风险的相关性及其在脂类代谢中的作用还需大规模流行病学研究的证实。其是否可用于指导高脂血症、CHD 等脂类代谢疾病的预防和治疗仍将是研究热点。

参考文献

- [1] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing[J]. Science, 2001, 294(5540): 169-173.
- [2] van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 44512-44520.
- [3] Nelbach L, Shu X, Konrad RJ, et al. Effect of apolipoprotein A-V on plasma triglyceride, lipoprotein size, and composition in genetically engineered mice[J]. J Lipid Res, 2008, 49(3): 572-580.
- [4] Wong K, Beckstead JA, Lee D, et al. The N-terminus of apolipoprotein A-V adopts a helix bundle molecular architecture[J]. Biochemistry, 2008, 47(33): 8768-8774.
- [5] Wong-Mauldin K, Raussens V, Forte TM, et al. Apolipoprotein A-V N-terminal domain lipid interaction properties in vitro explain the hypertriglyceridemic phenotype associated with natural truncation mutants[J]. J Biol Chem, 2009, 284(48): 33369-33376.
- [6] Mauldin K, Lee BL, Oleszczuk M, et al. The carboxyl-terminal segment of apolipoprotein A-V undergoes a lipid-induced conformational change[J]. Biochemistry, 2010, 49(23): 4821-4826.
- [7] Shu X, Chan J, Ryan RO, et al. Apolipoprotein A-V association with intracellular lipid droplets[J]. J Lipid Res, 2007, 48(12): 1445-1450.
- [8] Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase[J]. J Biol Chem, 2005, 280(22): 21553-21560.
- [9] Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu LS, et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(2): 397-404.
- [10] Schaat FG, Rensen PCN, Voshol PJ, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis[J]. J Biolog Chem, 2004, 279(27): 27941-27947.
- [11] Grosskopf I, Baroukh N, Lee SJ, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants[J]. Arterioscl Thromb Vascul Biol, 2005, 25(12): 2573-2579.
- [12] Menown IB, Murtagh G, Maher V, et al. Dyslipidemia therapy update: the importance of full lipid profile assessment[J]. Adv Ther, 2009, 26(7): 711-718.
- [13] Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, et al. Stepwise positive association between APOA5 minor allele frequencies and increasing plasma triglyceride quartiles in random patients with hypertriglyceridemia of unclarified origin[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(1): 39-44.
- [14] Pullinger CR, Aouizerat BE, Movsesyan I, et al. An apolipoprotein A-V gene SNP is associated with marked hypertriglyceridemia among Asian-American patients[J]. J Lipid Res, 2008, 49(8): 1846-1854.
- [15] Liu ZK, Hu M, Baum L, et al. Associations of polymorphisms in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with familial combined hyperlipidaemia in Hong Kong Chinese[J]. Atherosclerosis, 2010, 208(2): 427-432.
- [16] 邱方, 张葵, 徐标, 等. 冠心病患者载脂蛋白 A5 基因多态性与冠状动脉病变程度的相关性分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(9): 695-698.
- [17] Jang Y, Paik JK, Hyun YJ, et al. The apolipoprotein A5-1131T>C promoter polymorphism in Koreans: association with plasma APOA5 and serum triglyceride concentrations, LDL particle size and coronary artery disease[J]. Clin Chim Acta, 2009, 402(1-2): 83-87.
- [18] Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, et al. Triglyceride-mediated pathways and coronary heart disease: collaborative analysis of 101 studies[J]. Lancet, 2010, 375(9726): 1634-1639.
- [19] Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, et al. The metabolic syndrome[J]. Lancet, 2010, 375(9710): 181-183.

- [20] Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, et al. APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians[J]. J Lipid Res, 2007, 48(12): 2614-2621.
- [21] Kisfali P, Mohás M, Maász A, et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010, 20(7): 505-511.
- [22] Ong KL, Jiang CQ, Liu B, et al. Association of a genetic variant in the apolipoprotein A5 gene with the metabolic syndrome in Chinese[J]. Clin Endocrinol, 2011, 74(2): 206-213.
- [23] Dorfmeister B, Cooper JA, Stephens JW, et al. The effect of APOA5 and APOC3 variants on lipid parameters in European whites, In-

· 综 述 ·

dian Asians and Afro-Caribbeans with type 2 diabetes[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(3): 355-363.

- [24] 瞿光华, 闻平, 郭兰芳, 等. II 型糖尿病患者 APOA5-1131 T>C 基因多态性与血脂代谢和胰岛素抵抗的关系研究[J]. 遗传, 2007, 29(5): 541-546.

- [25] Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. The APOA5-1131 T>C variant enhances the association between RBP4 and hypertriglyceridemia in diabetes[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010, 20(4): 243-248.

(收稿日期:2011-12-28)

肺癌血清蛋白质组学研究及应用进展

李 克, 刘 辉 综述, 汪俊军 审校

(南京军区南京总医院检验科, 南京 210002)

关键词: 蛋白质组学; 肺肿瘤; 血清; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)05-0556-03

肺癌是严重危害人类健康和生命的恶性肿瘤之一,其发病率和患者死亡率呈上升趋势。现有的影像学、组织(细胞)病理学、支气管镜检等检测难以实现肺癌早期诊断。对肺癌发病机制、肺癌细胞抗药性及肺癌进程所涉及细胞通路的认识均不够深入。更重要的是,尚未能发现预测肺癌进程和疾病分期的可靠标志物。基因是遗传信息的携带者,但生命活动的执行者却是蛋白质。蛋白质组学以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象,是后基因时代生命科学研究的核心内容^[1]。在肺癌发生、发展过程中,许多蛋白质发生异常变化,包括表达量、蛋白质翻译后加工、修饰,蛋白质分子间或与其他生物分子间的相互作用等均有可能发生变化。上述一系列改变所导致的细胞信号通路异常与肿瘤发生、发展密切相关。因此,动态、全面的血清蛋白质组学分析将有助于更加完整、真实地揭示肺癌的发病机制,寻找诊断标志物,为肺癌的诊断、预防和治疗提供依据。近年来肺癌血清蛋白质组学研究及应用已取得了一系列的进展。

1 在肺癌早期诊断中的应用

肺癌患者早期均无明显症状,超过 2/3 的患者往往在局部进展或出现远处转移时才被发现,失去了最佳治疗时机。患者体内出现肿瘤细胞后,其分泌的某些蛋白质被释放入血液中,通过对血清蛋白质组动态全面的分析,可以探查出疾病早期微小的变化和征兆,为临床医生提供诊断参考。

血清中含有种类众多的低丰度蛋白质,能够提供大量关于机体健康以及疾病状态的信息,从中可发现诊断疾病的特异性标志物,或新的药物作用靶蛋白。利用免疫亲和色谱去除血清中高丰度蛋白质后,将低丰度蛋白质分组并分别利用不同荧光染料标记,以二维荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)进行定量分析,可分离获得约 3 890 个蛋白质点,其中 364 个蛋白质点在肺癌患者中比健康对照者高 2 倍以上($P < 0.05$)^[2]。应用微量液相色谱联合电喷雾质谱分析技术对Ⅲ B 期或Ⅳ 期肺腺癌患者以及健康人的血清进行检测,共发现 6 种低相对分子质量差异蛋白质,其中 5 种表达升高,1 种表达降低。有 4 种差异蛋白质有可能成为新的肺癌肿瘤标志物^[3]。Liu 等^[4]采用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)

检测肺癌和健康人血清样本后发现,肺癌患者有 3 个蛋白质峰表达明显降低,以其为诊断标志进行酶联免疫吸附试验,区分肺癌患者与健康人的灵敏度为 78.5%,特异度为 77.5%。提示对于临床高度怀疑肺癌但无法取得病理证实的患者,血清蛋白质组检测具有一定的参考价值。

肺癌患者、健康人及肺部良性疾病患者的血清差异蛋白质组学研究有助于筛选、鉴定差异蛋白质,若能以此为依据建立分类树诊断模型,其诊断灵敏度及准确性大大高于传统方法^[5-6]。周继红等^[7]用 SELDI-TOF-MS 技术、弱阳离子交换蛋白质芯片,检测肺癌和肺部良性病变患者的血清蛋白质质谱图,用 Biomarker Pattern 软件分析差异蛋白质并建立其诊断模型,结果发现有 20 个蛋白质峰有统计学差异,其中肺癌患者血清高表达蛋白质峰 14 个,低表达蛋白质峰 6 个,诊断肺癌的灵敏度和特异度分别为 88% 和 95%。Yang 等^[8]对肺癌患者和健康对照者血清进行分析,发现了 18 个蛋白质峰异常表达。选其中 5 个蛋白质峰建立肿瘤标志物图谱。经盲法检测发现其诊断非小细胞肺癌(NSCLC)的灵敏度达 91.4%。对于早期肺癌(I / II 期)的诊断灵敏度为 79.1%,远超过了目前临床使用的肿瘤标志物。

2 在肺癌分型中的应用

发现与病理分期相关的具有高灵敏度和特异度的标志物,将有助于制定有效的临床治疗决策。由于以解剖学为基础的恶性肿瘤 TNM 分期系统存在不足,许多学者开始研究分子标志物对肿瘤分期的应用,但目前结果尚不一致,可能与研究样本量较小、试验过程中易产生误差,以及截点选择标准不统一等因素有关。Han 等^[9]用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片系统对小细胞肺癌(SCLC)患者、NSCLC 患者、肺炎患者以及健康对照者血清样本进行了检测,发现 4 个蛋白质峰可以区分 SCLC 患者与健康对照者,其灵敏度和特异度分别是 88.9% 和 85.7%;2 个蛋白质峰可以区分 SCLC 和肺炎患者,其灵敏度和特异度分别是 88.9% 和 91.7%;3 个蛋白质峰可以区分 SCLC 和 NSCLC 患者,其灵敏度和特异度分别是 83.3% 和 75.0%。上述结果表明,SELDI-TOF-MS 蛋白质组学检测可有效提高 SCLC、NSCLC 的诊断和鉴别诊断效率。此外,应用