

载脂蛋白 A-1 模拟肽

杜 林 张振刚

【摘要】 高密度脂蛋白(HDL)在动脉硬化中的有益作用与其主要结构性蛋白载脂蛋白 A-1 密切相关。载脂蛋白 A-1 相对分子质量大,用于治疗干预需要静脉给药,且制造困难、价格昂贵,因此,研制了载脂蛋白 A-1 模拟肽。载脂蛋白 A-1 模拟肽与载脂蛋白 A-1 有类似地抗炎、抗氧化、抗动脉硬化作用,模拟肽抗炎和抗动脉硬化的机制包括增加前 β -HDL 的形成、增加胆固醇的流出和减少脂蛋白的氧化。动物实验表明模拟肽不仅在动脉硬化模型小鼠中有抗炎、减轻动脉硬化作用,在移植排斥、糖尿病、慢性肾脏疾病中均有潜在的治疗作用。

【关键词】 载脂蛋白 A-1; 模拟肽; 高密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 炎症

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.01.008

多重流行病学调查证明血浆低水平的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)是发生心血管疾病的独立危险因素^[1]。研究显示, HDL-C 每升高 1 mg/dl, 相关心血管病风险下降 2%~3%^[2]。HDL 通过多种机制对抗动脉硬化,最重要的是增加了胆固醇的逆转运,提升一氧化氮合酶(NOS)的活性,以及抗氧化、抗炎和抗血栓形成的作用^[3]。HDL 的有益作用与其主要结构性蛋白载脂蛋白 A-1 密切相关。载脂蛋白 A-1 是含有 243 个氨基酸序列的蛋白质,由规则重复的双性 α 螺旋组成,其相对分子质量大因此必须由静脉给药,且制造困难和昂贵。因此,研究分子量更小的类似载脂蛋白 A-1 的模拟肽成为近年来心血管疾病治疗领域的热点^[4]。已有大量的研究证实载脂蛋白 A-1 模拟肽在动物模型和人体内具有抗炎、抗氧化和对抗动脉硬化的治疗作用^[5]。本文对载脂蛋白 A-1 模拟肽的发展、理化特性、作用机制、在动物模型研究中的应用进行介绍。

1 载脂蛋白 A-1 模拟肽

Anantharamaiah 等^[6]发现, HDL 组成部分的脂类结合特性很大程度上与 A 级双性螺旋相关,由此合成了由 18 种氨基酸组成的肽并可褶皱成 α 螺旋,这种肽与载脂蛋白 A-1 没有序列同源性,但与

载脂蛋白 A-1 有着类似的二级结构。随后证实,这种被命名为 18A 的小肽在电荷分布和脂质结合能力等方面与载脂蛋白 A-1 单环的性质类似。使用培养的鼠成纤维细胞研究表明,18A 诱导细胞内胆固醇流出的能力与载脂蛋白 A-1 相似^[7]。在试图优化这种肽时,用苯丙氨酸(F)取代疏水面上的非极性氨基酸,开始合成了含有两个苯丙氨酸的肽称为 2F, 2F 虽然模拟了载脂蛋白的脂质结合特性,但却未能抑制高脂饮食导致的 C57/BL6 小鼠动脉硬化斑块的形成^[8]。在 2F 的基础上,制造的另外一些肽有着与 2F 相似的结构,基于其疏水面上 F 残基的数量,分别被命名为 3F、4F、5F、6F、7F。F 残基数量的提高意味着脂质结合能力和疏水性的提高。先前研究显示,当将上述模拟肽加入到有人低密度脂蛋白(LDL)存在的人主动脉壁细胞的共同培养时,2F 显示出轻微抑制 LDL 诱导的单核细胞趋化活性,而 4F、5F 和 6F 则非常有效,7F 与 2F 相比其活性更小^[8]。动脉硬化小鼠模型在体研究也表明,2F 在体内的作用很微弱,而 4F 和 5F 则有很高的活性,其中 4F 显示出的生物活性最高且最有利的物理化学特性。4F 可以全部由左旋-氨基酸(L-4F)或右旋-氨基酸(D-4F)合成,目前研究也最为广泛^[8]。体外研究显示两种同分异构体有着类似的特性,但是 L-4F 蛋白质在胃肠道更易受蛋白酶水解,因此不能口服^[9]。

Wool 等^[10]还合成了对称的肽类,包含两个 4F 肽由脯氨酸或苯丙氨酸残基连接,与单个 4F 肽相比,其在充满脂质的小鼠巨噬细胞胆固醇流出中更

基金项目:国家自然科学基金(81070096),江苏省自然科学基金(BK2008220, BK2010324),江苏省科教兴卫工程医学重点人才基金(RC2011045)

作者单位:225001 扬州大学第二临床医学院心血管内科

通信作者:张振刚, Email:zhzgyzu@163.com

加有效。单个 4F 可以抑制铜介导的纯合小鼠 LDL 的氧化,而对称的肽增加了 LDL 的氧化。

2 模拟肽的抗炎和抗动脉粥样硬化特性

在动脉硬化转基因小鼠模型中,Plump 等^[11]发现载脂蛋白 A-1 与动脉硬化的减少相关。另外,小鼠模型研究表明载脂蛋白 A-1 可以诱导动脉硬化斑块的快速消退^[12],人体注入载脂蛋白 A-1 后显示增加了前 β -HDL 的产生,改善了胆固醇的流出,增强了胆固醇酯从 HDL 转变为其他脂蛋白^[13]。载脂蛋白 A-1 显示有抗炎特性,这种抗炎特性被证实部分与清除内皮细胞和 LDL 的致炎作用有关,特别是氧化磷脂类。Van Lenten 等^[14]用表面细胞质基因组共振测定 4F 肽与载脂蛋白 A-1 与氧化脂类和非氧化脂类的亲和力,发现 4F 肽和载脂蛋白 A-1 结合非氧化脂质的能力没有显著区别,但 4F 肽比载脂蛋白 A-1 具有显著的结合促炎症氧化脂质的能力。在体研究发现,4F 肽在小鼠体内具有显著的抗炎和抗动脉硬化活性。LDL 受体缺失小鼠(LDL R^{-/-})被喂予高脂饮食后用 D-4F 治疗,HDL 表现出抗炎效应,动脉硬化损害降低了 79%,但并不改变血浆胆固醇或 HDL 的水平。载脂蛋白 E 缺失小鼠(ApoE^{-/-})饮水中加入 D-4F 后,HDL 从促炎转变为抗炎且改变了动脉硬化损害的程度,经病变脂质含量测定显示,其减少了 75%^[15]。Garber 等^[16]也在体研究了模拟肽的作用,对 C57BL/6J 小鼠喂致动脉硬化膳食,通过腹腔内注射 5F,剂量为 20 μ g/d 共 16 周,载脂蛋白 A-1 (50 μ g/d)或磷酸盐缓冲液(PBS)为对照组,治疗后 5F 组比对照组动脉硬化斑块损害减少 44%。Van Lenten 等^[17]利用新西兰大白兔模型研究模拟肽发现,D-4F 和 L-4F 在降低 LDL 和 HDL 的炎症特性上具有相似的作用,也可降低血浆中血清淀粉样蛋白 A 的水平,减少了动脉硬化。在加速动脉硬化的 ApoE^{-/-}小鼠模型中,在颈动脉植入一个下腔静脉片段,小鼠喂予高脂饮食,通过口服或腹腔内注射治疗 D-4F 4 周,发现其可以显著降低病变形成斑块脂质和巨噬细胞的含量^[18]。因此,模拟肽可能是通过炎症介质而起到抑制动脉硬化的作用^[19]。有研究显示,合成的双性螺旋肽可以促进依赖三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)胆固醇的流出,小鼠在体研究显示 4F 有降低脂蛋白的过氧化氢脂质,升高 HDL 中对氧磷脂酶的活性,促进巨噬细胞内胆固醇的逆转录(LCAT),这可能是这些肽防止动脉硬化作用另一个机制^[20]。

3 载脂蛋白 A-1 模拟肽的其他前景

载脂蛋白 A-1 模拟肽的效应不只限于血脂异常的鼠模型,Vaziri 等^[21]使用 L-4F(5 mg/kg 皮下注射,一周 3 次,共 4 周)研究在慢性肾疾病鼠模型中的炎症和氧化应激效应,L-4F 可大大减弱胸主动脉炎症及氧化指标,如 COX-2、12-氧化脂肪酸、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、髓过氧化物酶等,并且不改变血浆脂质的水平。镰刀形红细胞病小鼠模型给予高脂高胆固醇饮食,使得血管反应性严重被损害,动脉壁显著增厚,在这些小鼠饮水中加入 D-4F 可改善其血管反应性,阻止动脉壁变厚,减轻已经存在的动脉壁厚度^[22]。Kruger 等^[23]通过注射链脲霉素制作了鼠糖尿病模型,证实了有内皮细胞的脱落,同时血红素加氧酶(HO-1)和细胞外超氧化物歧化酶下降,D-4F 治疗后可显著增加 HO-1 和超氧化物歧化酶在动脉内的水平,减少内皮细胞的破坏。诱导糖尿病后,内皮祖细胞(EPC)功能降低了,也降低了 EPC 集落的形成,集落从对照组的 19.3 ± 1.3 到糖尿病组的 8.8 ± 1.3 ($P < 0.001$),D-4F 治疗糖尿病鼠升高集落到 17.3 ± 1.5 ,比用安慰剂的糖尿病鼠显著升高 ($P < 0.002$),与非糖尿病组无显著差异,长期以 D-4F 治疗糖尿病鼠降低了氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL),而非糖尿病鼠 ox-LDL 无显著差异^[24]。Zhang 等^[25]利用外周血分离培养 EPC 的研究,也观察到 D-4F 处理不仅可显著增加 EPC 增殖、迁移及黏附能力,且其诱导合成 NO 的能力也显著增加。另外,有研究表明 L-4F 可以改善雄性肥胖小鼠的胰岛素抵抗和肥胖,与 D-4F 一样,L-4F 有改善血管功能,恢复 NO 和超氧负离子之间的平衡,增加 HO-1 和 P-eNOS 水平,且可以降低氧化应激,恢复磷酸化的腺苷一磷酸蛋白激酶和 HO-1 水平,增加血管保护^[26]。在认知功能减退小鼠模型,LDL^{-/-}小鼠喂以高脂饮食 6~8 周有显著的认知功能的下降,实验证实了小鼠大脑炎症趋化因子类,如 MCP-1 和巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)产生显著增多,当饮水中加入 D-4F,可以使散布在小动脉和神经元细胞周围的化学趋化因子 MCP-1 和 MIP-1 α 的下降,改善认知功能^[27]。D-4F 早期临床实验正在进行中,Bloedon 等^[28]提供的 D-4F 实验资料显示 D-4F 有很好的耐受性,可以明显改善冠心病等危症病人 HDL 的抗炎指标。

4 结语

总而言之,载脂蛋白 A-1 模拟肽有着与载脂蛋

白 A-1 相同的生物学效应,包括增加前 β -HDL 形成,增加胆固醇的流出,转变促炎症 HDL 为抗炎 HDL,降低脂蛋白的氧化起到抗炎、抗动脉硬化的作用。此外,它还有助于降低体重、改善胰岛素抵抗、降低炎症细胞因子的产生等作用。目前载脂蛋白 A-1 模拟肽特别是 4F 肽已经应用于多种实验动物模型且取得了很好的效果,D-4F 已经开始早期临床试验,其潜在的应用价值可能成为治疗和预防动脉粥样硬化的理想药物。相信在不久的将来,可广泛应用于临床。

参 考 文 献

- [1] Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham study[J]. Am J Med, 1977, 62(5): 707-714.
- [2] Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies [J]. Circulation, 1989, 79(1): 8-15.
- [3] Degoma EM, deGoma RL, Rader DJ. Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(23): 2199-2211.
- [4] 谢琼,赵水平. 载脂蛋白模拟肽的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(09): 754-756.
- [5] Garber DW, Handattu SP, Datta G, et al. Atherosclerosis and vascular disease effects of peptide mimetics of apolipoprotein [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2006, 7(4): 235-240.
- [6] Anantharamaiah GM, Jones JL, Brouillette CG, et al. Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine [J]. J Biol Chem, 1985, 260(18): 10248-10255.
- [7] Mendez AJ, Anantharamaiah GM, Segrest JP, et al. Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1698-1705.
- [8] Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(7): 1325-1331.
- [9] Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, et al. Oral administration of an apo AI mimetic peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol [J]. Circulation, 2002, 105(3): 290-292.
- [10] Wool GD, Reardon CA, Getz GS. Apolipoprotein A-I mimetic peptide helix number and helix linker influence potentially antiatherogenic properties[J]. J Lipid Res, 2008, 49(6): 1268-1283.
- [11] Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(20): 9607-9611.
- [12] Chiesa G, Sirtori CR. Use of recombinant apolipoproteins in vascular diseases; the case of apoA-I [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2002, 3(3): 420-426.
- [13] Kujiraoka T, Nanjee MN, Oka T, et al. Effects of intravenous apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine discs on LCAT, PLTP, and CETP in plasma and peripheral lymph in humans [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(9): 1653-1659.
- [14] Van Lenten BJ, Wagner AC, Jung CL, et al. Anti-inflammatory apoA-I mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I[J]. J Lipid Res, 2008, 49(11): 2302-2311.
- [15] Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, et al. Oral administration of an apoA-I mimetic peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol [J]. Circulation, 2002, 105(3): 290-292.
- [16] Garber DW, Datta G, Chaddha M, et al. A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis[J]. J Lipid Res, 2001, 42(4): 545-552.
- [17] Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, et al. Lipoprotein inflammatory properties and serum amyloid A levels but not cholesterol levels predict lesion area in cholesterol-fed rabbits [J]. J Lipid Res, 2007, 48(11): 2344-2353.
- [18] Li X, Chyu KY, Faria Neto JR, et al. Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice[J]. Circulation, 2004, 110(12): 1701-1705.
- [19] Getz GS, Wool GD, Reardon CA. Apoprotein A-I mimetic peptides and their potential antiatherogenic mechanisms of action[J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20(3): 171-175.
- [20] Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice[J]. Circulation, 2004, 109(25): 3215-3220.
- [21] Vaziri ND, Bai Y, Yuan J, et al. ApoA-1 mimetic peptide reverses uremia-induced upregulation of pro-atherogenic pathways in the aorta[J]. Am J Nephrol, 2010, 32(3): 201-211.
- [22] Ou J, Wang J, Xu H, et al. Effects of D-4F on vasodilation and vessel wall thickness in hypercholesterolemic LDL receptor-null and LDL receptor/apolipoprotein A-I double-knockout mice on Western diet[J]. Circ Res, 2005, 97(11): 1190-1197.

- [13] Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing[J]. Z Gerontol Geriatr, 2007, 40(5):349-356.
- [14] Kim SR, Bae YH, Bae SK, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(5):886-895.
- [15] Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, et al. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes[J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(3):473-483.
- [16] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappaB in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(10):2030-2037.
- [17] Hamid T, Gu Y, Ortines RV, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation[J]. Circulation, 2009, 119(10):1386-1397.
- [18] 黄娅茜, 王 宪, 孔 炜. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2010, 41(1):31-36.
- [19] Wu M, Han M, Li J, et al. 17beta-estradiol inhibits angiotensin II-induced cardiac myofibroblast differentiation[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 616(1-3):155-159.
- [20] Kumar S, Seqqat R, Chigurupati S, et al. Inhibition of nuclear factor kappaB regresses cardiac hypertrophy by modulating the expression of extracellular matrix and adhesion molecules[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(1):206-215.
- [21] Yoon SJ, Yoon YW, Lee BK, et al. Potential role of HMG CoA reductase inhibitor on oxidative stress induced by advanced glycation endproducts in vascular smooth muscle cells of diabetic vasculopathy[J]. Exp Mol Med, 2009, 41(11):802-811.
- [22] Picchi A, Capobianco S, Qiu T, et al. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: A review[J]. World J Cardiol, 2010, 2(11):377-390.
- [23] Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(10-12):775-787.
- [24] de Vries-van der Weij J, Toet K, Zadelaar S, et al. Anti-inflammatory salicylate beneficially modulates pre-existing atherosclerosis through quenching of NF-kappaB activity and lowering of cholesterol[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1):241-246.
- [25] 熊 莺, 王广发, 张俊艳, 等. 柚皮苷抑制高糖诱导的脐静脉内皮细胞与单核细胞的黏附作用[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2):321-325.
- [26] Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(8):1425-1430.

(收稿:2011-08-15 修回:2011-09-22)

(本文编辑:金谷英)

(上接第 27 页)

- [23] Kruger AL, Peterson S, Turkseven S, et al. D-4F induces heme oxygenase-1 and extracellular superoxide dismutase, decreases endothelial cell sloughing, and improves vascular reactivity in a rat model of diabetes[J]. Circulation, 2005, 111(23):3126-3134.
- [24] Peterson SJ, Husney D, Kruger AL, et al. Long-term treatment with the apolipoprotein A1 mimetic peptide increases antioxidants and vascular repair in type I diabetic rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 322(2):514-520.
- [25] Zhang Z, Qun J, Cao C, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide D-4F promotes human endothelial progenitor cell proliferation, migration, adhesion through eNOS/NO pathway[J]. Mol Biol Rep, 2011 Sep 25. [Epub ahead of print]
- [26] Peterson SJ, Kim DH, Li M, et al. The L-4F mimetic peptide prevents insulin resistance through increased levels of HO-1, pAMPK, and pAKT in obese mice[J]. J Lipid Res, 2009, 50(7):1293-1304.
- [27] Buga GM, Frank JS, Mottino GA, et al. D-4F decreased brain arteriole inflammation and improves cognitive performance in LDL receptor-null mice on a Western diet[J]. J Lipid Res, 2006, 47(10):2148-2160.
- [28] Bloeden LT, Dunbar RL, Duffy D, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients[J]. J Lipid Res, 2008, 49(6):1344-1352.

(收稿:2011-10-08 修回:2011-11-21)

(本文编辑:金谷英)