PROGRESS IN CHEMISTRY 化学进展

DOI:10.7536/PC131028

# 胆固醇酯转移蛋白在胆固醇酯转移中的结构与功能*

雷东升[1,2] 童慧敏[2] 张 磊[2] 张 星[1,2] 张胜利[1**] 任 罡[2**]

(1. 西安交通大学理学院应用物理系 西安 710049; 2. The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA)

**摘 要** 人体胆固醇酯转移蛋白(CETP)会造成胆固醇酯从高密度脂蛋白(HDL)向低密度脂蛋白(LDL)或极低密度脂蛋白(VLDL)的转移,从而增加人体患心血管疾病的危险性。了解CETP在胆固醇酯转移过程中的作用和机理,是研发新的CETP抑制剂药物以预防和治疗心血管疾病的重要基础和关键步骤。本文综述了CETP结构与功能领域研究的最新进展,详细介绍了CETP与各类脂蛋白绑定结构的高分辨透射电子显微镜研究;并结合对CETP晶体结构的分析,以及生理溶液中CETP结构与动态特征、CETP与脂滴间相互作用的分子动力学模拟研究结果,阐述并讨论了CETP脂转移机理的"通道"模型;最后对尚待解决的关键问题与未来的研究方向进行了展望,以期促进CETP功能机理的研究和抑制药物的研制。

**关键词** 胆固醇酯 胆固醇酯转移蛋白 脂蛋白 透射电子显微镜 分子动力学模拟 结构柔性 通道模型

**中图分类号**:Q51;Q591.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1005-281X(2014)05-0879-10

# Structure and Function of Cholesteryl Ester Transfer Protein in Transferring Cholesteryl Ester*

*Lei Dongsheng*[1,2] *Tong Huimin*[2] *Zhang Lei*[2] *Zhang Xing*[1,2] *Zhang Shengli*[1**] *Ren Gang*[2**]

(1. Department of Applied Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA)

**Abstract** Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death worldwide. Human cholesteryl esters (CEs) are naturally transferred from atheroprotective high-density lipoproteins (HDLs) to atherogenic low-density lipoproteins (LDLs) and very low-density lipoproteins (VLDLs) by cholesteryl ester transfer protein (CETP), resulting in a higher probability of CVDs. Finding out the mechanism of CETP in CE transport is an important basis for designing new CETP inhibitors for treating CVDs. This review is focused on the recent studies of CETP structure and interactions with lipoproteins. Transmission electron microscopy (TEM) studies showed that CETP not only can bind to HDL, LDL and VLDL into binary complexes, respectively, but also connects HDL and LDL or VLDL into a ternary complex via penetrating into the HDL core with its N-terminal domain and the LDL or VLDL surface with its C-terminal domain. Molecular dynamics simulations suggested that the penetrated distal ends are highly flexible under physiological conditions and when CETP contacts lipid droplets. This flexibility allows for large-scale conformational changes, and can even open pores in the distal

收稿:2013年10月,收修改稿:2013年12月,网络出版:2014年4月30日

* 美国能源部基础科学基金资助项目(DE-AC02-05CH11231)和美国国立卫生研究院(NIH)基金资助项目(NHLBI 1R01HL115153),中国国家自然科学基金项目(No.11074196, 11374237)资助

The work was supported by Basic Energy Sciences-US Department of Energy (DE-AC02-05CH11231), US National Institutes of Health (NHLBI 1R01HL115153) and the National Natural Science Foundation of China (No.11074196, 11374237)

** Corresponding author e-mail: zhangsl@mail.xjtu.edu.cn; gren@lbl.gov

ends. These pores and the original hydrophobic cavities within the CETP crystal structure are generally stable in physiological solution, and can even connect together into a continuous tunnel for CE transfer. Based on above results, scientists introduced and discussed the "tunnel" model for CETP-mediated lipid transfer in detail, and further suggested new interfaces of CETP for being targeted by a new generation CETP inhibitors to treat CVDs.

**Key words** cholesteryl ester; cholesteryl ester transfer protein; lipoprotein; transmission electron microscopy; molecular dynamics simulation; structural flexibility; tunnel model

**Contents**

1 Introduction
2 Structure of CETP and lipoproteins by electron microscopy
2.1 Structure of the CETP·HDL complex by electron microscopy
2.2 3D reconstruction of CETP·HDL complex
2.3 Structure of the CETP·LDL and CETP·VLDL complexes by electron microscopy
2.4 Labeling of binding sites
2.5 Structure of the HDL·CETP·LDL and HDL·CETP·VLDL complexes by electron microscopy
2.6 Verification of CETP lipid transfer activity
3 CETP structural features by molecular dynamics simulations
3.1 Structural flexibility
3.2 Internal cavities and surface pores
3.3 Surface hydrophobicity
4 Tunnel mechanism for CETP-mediated lipid transfer
4.1 "Tunnel" model for CETP-mediated lipid transfer
4.2 CETP-lipoprotein binding
4.3 Formation of transfer tunnel
4.4 Neutral lipid transfer
5 Conclusions and outlook

## 1 引言

胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP)是一种与心血管疾病密切相关的蛋白[1,2]。大量研究证实,人体中高水平的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)胆固醇含量和低水平的高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)胆固醇含量是造成心血管疾病的主要原因[1,2]。低密度脂蛋白会将其内部的胆固醇沉积在动脉血管壁上从而形成动脉粥样硬化斑[3],造成血管堵塞;而高密度脂蛋白可以将血管组织中的胆固醇转移至肝脏分解[2,4~7],从而清除动脉血管壁上的硬化斑,保护血管畅通。然而,在高密度脂蛋白将胆固醇转移至肝脏的过程中,胆固醇酯转移蛋白又会将尚未运到肝脏的胆固醇酯从高密度脂蛋白转移到低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)中[8],从而增加了人体患心血管疾病的危险性。CETP 基因缺陷可降低血浆中 CETP 的活性,降低心血管疾病的风险并延长人类寿命[9]。而将 CETP 基因植入 CETP 基因先天缺失的 C57BL/6 小鼠中则可诱发动脉硬化[10]。基于此,胆固醇酯转移蛋白抑制类药物的开发成为当今治疗心血管疾病类药物研发的热点。

迄今为止,已有数种针对胆固醇酯转移蛋白的抑制类药物先后进行了大规模的临床药物试验。其中包括世界最大的制药公司美国辉瑞制药有限公司的 torcetrapib,第二大的默克医药公司的 anacetrapib,以及欧盟最大的瑞士罗氏公司的 dalcetrapib[11~13]。最先进入三期临床试验的美国辉瑞制药有限公司的 torcetrapib,于 2006 年底宣告失败,由此造成数百亿美元的投资和股票价值的经济损失[14]。因缺乏疗效,瑞士罗氏公司 dalcetrapib 的三期临床试验也于 2012 年停止[15]。胆固醇酯转移蛋白的抑制类药物开发失败的根本原因,正是由于胆固醇酯转移蛋白和各种脂蛋白之间结合方式以及胆固醇酯从高密度脂蛋白转移到低密度脂蛋白中的机理尚不明确。

本文综述了 CETP 结构与功能机理研究的最新进展。包括当前关于 CETP 与各类脂蛋白的相互作用的高分辨透射电子显微(transmission electron microscopy, TEM)研究,以及对 CETP 在生理溶液或与脂滴绑定状态下结构特征的分子动力学模拟分析研究成果。这些结果为揭示 CETP 脂转移机理提供了重要线索,提示 CETP 是通过"通道"模型转移脂分子。本文详细讨论了 CETP 脂转移的"通道"模型,以期促进对 CETP 功能的研究和抑制药物的研制。

## 2 CETP 和脂蛋白的电镜观察

人 CETP 共包含 476 个氨基酸,分子量约为 53

kDa。其晶体结构(PDB 号:2OBD)显示,CETP 的主体形状呈香蕉形,长度约为 125 Å;C-端和 N-端是 β 折叠桶,且 C-端比 N-端的尺寸要大一些;CETP 中央区域结构为 β 折叠,且存在一个 ~60 Å 长,可以容纳两个胆固醇酯分子和两个磷脂分子的疏水腔[1,16]。

通过 CETP 晶体结构无法直接了解 CETP 与脂蛋白的结合方式,更不能揭示 CETP 的脂转移功能机理。最近,由任罡科研小组主导的,来自三个国家的 9 所科研院校机构的国际科研团队(包括美国辉瑞制药公司),通过应用一系列的开创性的电镜技术,系统地完成了对胆固醇酯转移蛋白与脂蛋白相互作用机理的研究。这些开创性的技术包括:优化负染色电子显微镜技术(optimized negative-staining electron microscopy,OpNS-EM)[17,18],高动态蛋白结构的电子显微图像筛选与三维重构技术[19],颗粒几何平均尺寸随时间变化的统计分析方法[20],结合位点的抗体标定法[20]等手段。

透射电镜图的处理以及单颗粒重构可利用 SPIDER[21]、EMAN[22]、FREALIGN[23]与 RELION[24]等软件完成[25]。SPIDER 是使用 FORTRAN 编写的开源软件,用户可利用其代码自行编程实现特定的需求,自由度高,扩展性好。但它的用户交互界面基于命令行,并要求用户有一定的编程基础,因此门槛相对较高。相对的,EMAN 提供了图形交互界面,并将各种功能封装为多个相互独立的子程序,便于用户的掌握与使用;不过这在一定程度上也限制了使用的灵活性。FREALIGN 着重于三维结构的重构与优化。它使用完全基于傅里叶空间的三维结构优化算法,对电镜图的质量要求较高。于 2012 年发布的 RELION 使用了贝叶斯方法(Bayesian approach)。这使它可以根据原始数据自行确定重构所需的大部分输入参数,从而减少对研究者以往经验的依赖以及主观因素带来的偏差,目前的应用实例还较少。

在 CETP 与脂蛋白相互作用的研究中[20],对透射电镜图的处理使用了方便且成熟应用的 EMAN 套件。电镜图片经 *ctfit* 子程序计算衬度传递函数(Contrast Transfer Function,简称 CTF)后进行相位修正。随后,图片中蛋白颗粒利用 *boxer* 子程序挑选。

## 2.1 CETP·HDL 二聚体的电镜观察

CETP 和 HDL 的混合溶液的透射电镜图像显示,CETP(香蕉状)和 HDL(圆球状,直径 ~85 ~110 Å)混合物中可见大量的 CETP 与 HDL 绑定在一起的二聚体结构[20]。并且该绑定结构似乎是通过 CETP 的一端插入到 HDL 中而形成的(图 1a)。更为重要的是,在电镜图像中几乎没有同一个 CETP 两端各绑定一个 HDL(即 HDL·CETP·HDL)的现象,说明 CETP 只能有一端与 HDL 绑定;长条状的 CETP 与圆球状的 HDL 绑定后,CETP 表露在外的长度约为 77 ±10 Å,说明大约有 48 ±10 Å 的 β 折叠桶部分插入到了 HDL 中[20];而 CETP 晶体结构嵌入 CETP·HDL 二聚体后,两者吻合度很高[20],表明了 CETP 是通过一端和 HDL 结合的。CETP 与 HDL 的这种结合方式,与先前认为 CETP 侧面与 HDL 结合的观点[16]有很大区别,从而也就预示了 CETP 可能有另一种功能机理。

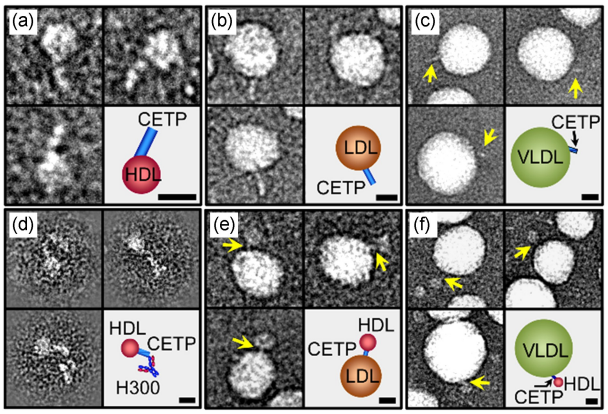


**图 1** 胆固醇酯转移蛋白和高密度脂蛋白,低密度脂蛋白,极低密度脂蛋白,以及抗体 H300 复合体的优化负染电镜图像[20]:(a)CETP·HDL 二聚体;(b)CETP·LDL 二聚体;(c)CETP·VLDL 二聚体;(d)HDL·CETP·H300 三聚体;(e)HDL·CETP·LDL 三聚体;(f)HDL·CETP·VLDL 三聚体;每组大图右下角的小图都是对应其左下角小图的示意图;箭头指向 CETP,标尺均为 100 Å

**Fig. 1** Structural conformations of CETP with HDL, LDL, VLDL or antibody H300 by OpNS-EM[20]. (a) CETP·HDL complex. (b) CETP·LDL complex. (c) CETP·VLDL complex. (d) HDL·CETP·H300 ternary complex. (e) HDL·CETP·LDL ternary complex. (f) HDL·CETP·VLDL ternary complex. The schematic on the bottom right of each panel represents the corresponding complex on the bottom left of each panel. CETPs are labeled by the yellow arrows. Scale bars, 100 Å.

## 2.2 CETP·HDL 二聚体三维结构重构

张磊等对 CETP·HDL 二聚体的三维重构使用了已成熟应用的 FREALIGN、EMAN 与 SPIDER 套件[20]。其中,FREALIGN 套件的 *ctffind3* 程序被用来计算所有电镜图的欠焦与像散。每张图片均经

SPIDER 相位修正。为保证获得的蛋白颗粒图像的质量并提高工作效率,电镜图片中的蛋白颗粒由 EMAN 套件的 *boxer* 程序自动挑选后经人工筛选以去除相互交叠或结构已被破坏的蛋白颗粒的图像。所得的图像经 EMAN 套件的 *refine2d. py* 和 *refine* 程序进行了二维图像分类分析和三维重构,得到了 CETP·HDL 二聚体三维结构。

对大分子的三维渲染是快速分析与展示数据,认知蛋白相互作用等生理过程的重要一环,目前广泛应用的软件有 Chimera[26]、PyMOL[27]、RasMol[28]与 VMD[29]等[30]。由 UCSF 开发的 Chimera 三维渲染效果极佳,可方便地产生用于发表的高质量图片,但在渲染大尺寸的体系时对电脑硬件要求较高。PyMOL 与 RasMol 的三维渲染能力也很优秀,但都对分子轨迹文件的支持不佳,限制了它们在分子动态过程的视频制作中的应用。VMD 可对大尺寸的体系进行快速的渲染,支持主流的各种分子结构文件格式,但在默认参数下的渲染效果不很理想。

图 2[20]是 CETP·HDL 二聚体三维结构重构图,分辨率约为 14 Å,使用 UCSF 的 Chimera 进行渲染。从图 2a 中可以看到,香蕉形的 CETP 并不是完全垂直于 HDL 表面,而是以大约 45°倾角结合在球形 HDL 的表面上。得益于甲酸双氧铀染色剂的低颗粒尺寸和高渗透性[17,18,31~35],HDL 内部的胆固醇酯腔也可以被清晰地重构出来(图 2b)。从二聚体三维结构的截面图(图 2c)来看,球状高密度脂蛋白的结构包括了一个约 20 Å 厚的高密度球壳以及一个直径约为 55 Å 的低密度球腔,高密度的球壳部分正好对应了载脂蛋白和单层磷脂的区域,低密度球腔对应了内部的胆固醇酯腔。另外, CETP·HDL 二聚体中的 CETP 有相当一部分是进入到了 HDL 内部,接触到 HDL 的胆固醇酯核球腔部分(图 2b 和 2c),并且 CETP·HDL 二聚体中外露的 CETP 部分是尺寸比较大的一端(C-端),提示我们 CETP 是通过 N-端与 HDL 进行绑定结合的。

## 2.3 CETP·LDL 和 CETP·VLDL 二聚体的电镜观察

优化负染电镜图像(图 1b)显示,与 CETP 和 HDL 混合物结果类似,CETP 和 LDL(直径 ~200 ~ 270 Å)混合物中同样发现了大量的 CETP 与 LDL 绑定在一起的二聚体结构,而且该绑定结构同样是通过 CETP 的一端插入到 LDL 中而形成的,并且在电镜图像中没有同一个 CETP 两端各绑定一个 LDL(即 LDL·CETP·LDL)的形态,说明 CETP 同样只能有一端与 LDL 绑定;长条状的 CETP 与圆球状的

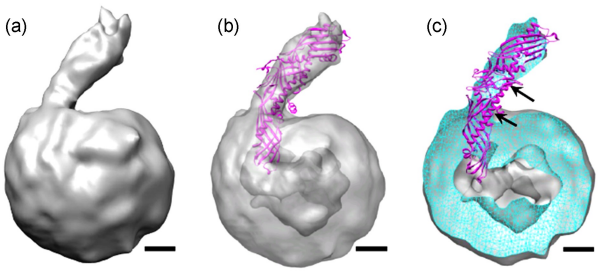


**图 2** CETP·HDL 二聚体三维结构重构[20]:(a) CETP·HDL 二聚体的三维密度图;(b) CETP 晶体结构嵌入 CETP·HDL 二聚体的三维密度图;(c) CETP·HDL 二聚体三维结构的剖面图。模型使用 UCSF Chimera 进行三维渲染[26];其中紫色是 CETP 的晶体结构,箭头标示 CETP 上两个绑定磷脂的微孔的位置,标尺均为 20 Å

**Fig. 2** Three-dimensional reconstruction of CETP·HDL complex by OpNS-EM[20]. (a) 3D reconstructed density map of CETP·HDL complex. (b) Transparent CETP·HDL complex with purple CETP crystal structure. (c) Cut-away surface view of CETP·HDL complex. CETP crystal structure is shown in purple. Its two phospholipid-binding pores are labeled by black arrows. Scale bars, 20 Å

LDL 绑定后表露在外的 CETP 长度约为 100 ± 10 Å[20],说明大约有 25 ± 10 Å 的 β 折叠桶部分进入到了 LDL 中。

和 LDL 类似,CETP 和 VLDL(直径 ~370 ~ 570 Å)混合溶液的优化负染电镜图像显示[20],混合物存在大量的 CETP 与 VLDL 绑定在一起的二聚体结构(图 1c),而且该绑定结构同样是通过 CETP 的一端插入到 VLDL 中而形成的,所有图像中也同样没有 VLDL·CETP·VLDL 的三聚体出现,说明 CETP 同样也只能有一端与 VLDL 绑定。CETP 在 CETP·VLDL 中表露在外的长度约为105 ± 10 Å[20],说明 VLDL 中嵌入的 CETP 部分大约有 20 ± 10 Å 长。

## 2.4 结合位点标定

CETP·HDL 二聚体三维结构重构结果与 CETP 晶体结构的比较(图 2)显示了 CETP 似乎是通过其 N-端与 HDL 结合的。为了进一步验证这个结合位点的位置,张磊等又引入了两种可以绑定 CETP 不同位点的抗体 H300 和 N13 来对 CETP·HDL 二聚体中 CETP 的端点进行标定[20]。

CETP 上对应于 H300 抗体的抗原位置处在 CETP 的 194 ~ 476 氨基酸处,包含了 CETP 的中部 β 折叠区域和整个 C-端 β 折叠桶区域;N13 抗体的抗原位置在 CETP 的 131 ~ 142 氨基酸处,处于 N-端 β 折叠桶区域和中部 β 折叠区域的交界处。因此通

过将 H300 和 N13 抗体分别加入 CETP 和 HDL 混合溶液并观察三聚体的电镜图像可得到 CETP 与 HDL 绑定位点的信息。

图 1d 就是抗体 H300 结合实验的结果图。从图中可以看出,呈“Y”字形的抗体 H300 与 CETP·HDL 二聚体形成了许多三聚体,而且标定 C-端的 H300 抗体主要位于 CETP·HDL 二聚体中 CETP 的远端,说明 CETP 是通过 N-端和 HDL 结合的。

抗体 N13 结合实验的结果显示,同样呈“Y”字形的抗体 N13 与 CETP·HDL 二聚体形成了许多三聚体[20]。与 H300 所不同的是,标定 N-端的 N13 抗体主要位于 CETP·HDL 二聚体中 CETP 的近端。所以 N13 抗体标定实验的结果再次说明,CETP 是通过其 N-端与 HDL 进行结合的。

另外,将 CETP 溶液和 H300 溶液混合培养后,再加入 LDL 溶液的电镜图像中几乎看不到 LDL·CETP·H300 三聚体[20],说明 C-端绑定的 H300 阻止了 CETP 和 LDL 的结合,也说明 CETP 是通过 C-端和 LDL 结合的。总之,以上实验表明,CETP 是通过其两端分别和 HDL,LDL 相结合的,其中 N-端结合 HDL,C-端结合 LDL。

### 2.5 HDL·CETP·LDL 和 HDL·CETP·VLDL 三聚体的电镜观察

电镜图像显示(图 1e),HDL,CETP 和 LDL 混合溶液的样品中,大约有 25% 的 LDL 与 HDL 和长条状 CETP 形成了 HDL·CETP·LDL 三聚体。此实验事实说明,CETP 可以作为一个“通道”把 HDL 和 LDL 连接起来,并且 CETP 的 N-端与 HDL 结合、C-端与 LDL 结合。同时,这些大量 HDL·CETP·LDL 三聚体的发现,透露了 CETP 和高密度脂蛋白、低密度脂蛋白相互作用的机理。

类似的,HDL,CETP 和 VLDL 混合溶液优化负染后的电镜图像显示(图 1f),大约有 30% 的 VLDL 形成了 HDL·CETP·VLDL 三聚体,也同样说明了 CETP 起到了连接 HDL 和 VLDL 的“通道”作用;且 CETP 的 N-端与 HDL 结合,C-端与 VLDL 结合。

### 2.6 CETP 活性验证

为了保证实验中 CETP、HDL 和 LDL 等仍然具有正常生物活性,张磊等进行了常温下 CETP、HDL 和 LDL 三体反应实验[20]。如果所有蛋白成分的功能正常,那 HDL 中的胆固醇酯将会被 CETP 以某种方式转运给 LDL,从而可能会造成 HDL 颗粒尺寸的变化。所以可以通过测量 HDL 的尺寸随时间的变化来观察胆固醇酯的转移机制是否正常,即所有蛋白的生物活性是否正常。

从 HDL·CETP·LDL 三体混合培养实验的结果来看,HDL 的尺寸随着时间显著变小,24 h 就几乎看不到 HDL,证明 HDL 中的胆固醇酯在逐渐消失。而在混合物中仅有 HDL 和 LDL,不含有 CETP 的对比实验中,HDL 的尺寸并没有明显变化[20]。

在以上两个实验中,LDL 的尺寸几乎没有变化,这应是因为 LDL 的尺寸非常大(LDL 直径约为 HDL 直径的 3 倍,所以 LDL 的体积为 HDL 体积的近 30 倍),所以即使 HDL 的体积全部贡献给 LDL(按照 HDL: LDL = 2∶1 的比例),LDL 的体积改变也小于 7%,直径改变也小于 3%,因而其尺寸变化是非常不明显的。

在所有不含 CETP 的实验中,HDL 和 LDL 的形态不会随着时间发生任何明显变化;在所有二体培养实验和单体培养实验中,各种脂蛋白和 CETP 的形态也不会发生明显变化;仅当 HDL、CETP 和 LDL 三体混合时,才会发生 HDL 尺寸明显缩小的现象[20]。

## 3 生理溶液中 CETP 结构特征的分子动力学模拟分析

胆固醇酯转移蛋白 CETP 的晶体结构可为我们了解其脂转移功能机理提供重要线索[16]。但它是结晶条件下的静态空间结构。而脂分子转运是生理条件下的动态过程,需要 CETP 结构的动态调整并考虑其与脂蛋白的相互作用。研究人员在分析晶体结构的基础上,分别利用 NAMD2[36] 与 GROMACS[24] 对生理溶液中 CETP 的空间结构,CETP 与脂滴(脂蛋白简化模型)的相互作用进行了全原子/粗粒化分子动力学模拟,并使用 VMD[29] 与 Chimera[26] 等分析与三维渲染软件对模拟结果进行了深入研究。

### 3.1 结构柔性

结构柔性有利于 CETP 在脂转移过程中的结构调整。在分子动力学模拟中,无论 CETP 是单独存在[37],还是通过内凹面与脂滴绑定[38],其在晶体结构中柔性较强的 C-端远端(链 Ω1:Met288-Gln320,链 Ω2:Phe350-Ala360,链 Ω3:Lys392-Ser404)与螺旋 X(Glu465-Ser476)的 Cα 原子空间位置涨落幅度大(图 3a),表示它们在生理溶液中仍然非常柔软。

虽然 CETP N-端远端在晶体结构中的刚性较强[16],但当 CETP 在生理溶液中时,空间位置涨落幅度最大的 30% 氨基酸位于此处,且集中分布于链 Ω4(Glu46 ~ Val55),链 Ω5(Gly100 ~ Gln111)及链

Ω6(Gln155 ~ Trp162)(图 3a)。此结果与对 CETP 晶体结构的简正模式分析结果吻合得很好(图 3b)[20,37]。此外,CETP 通过凹面与脂滴绑定后,两远端仍非常柔软[38],进一步说明 N-端远端与 C-端远端一样,本身都非常柔软;只是结晶后会因晶体的空间限制而变硬[39]。分子动力学模拟中这些区域的结构较其他区域的结构变化更大,说明结构柔性的确有利于 CETP 的结构调整。

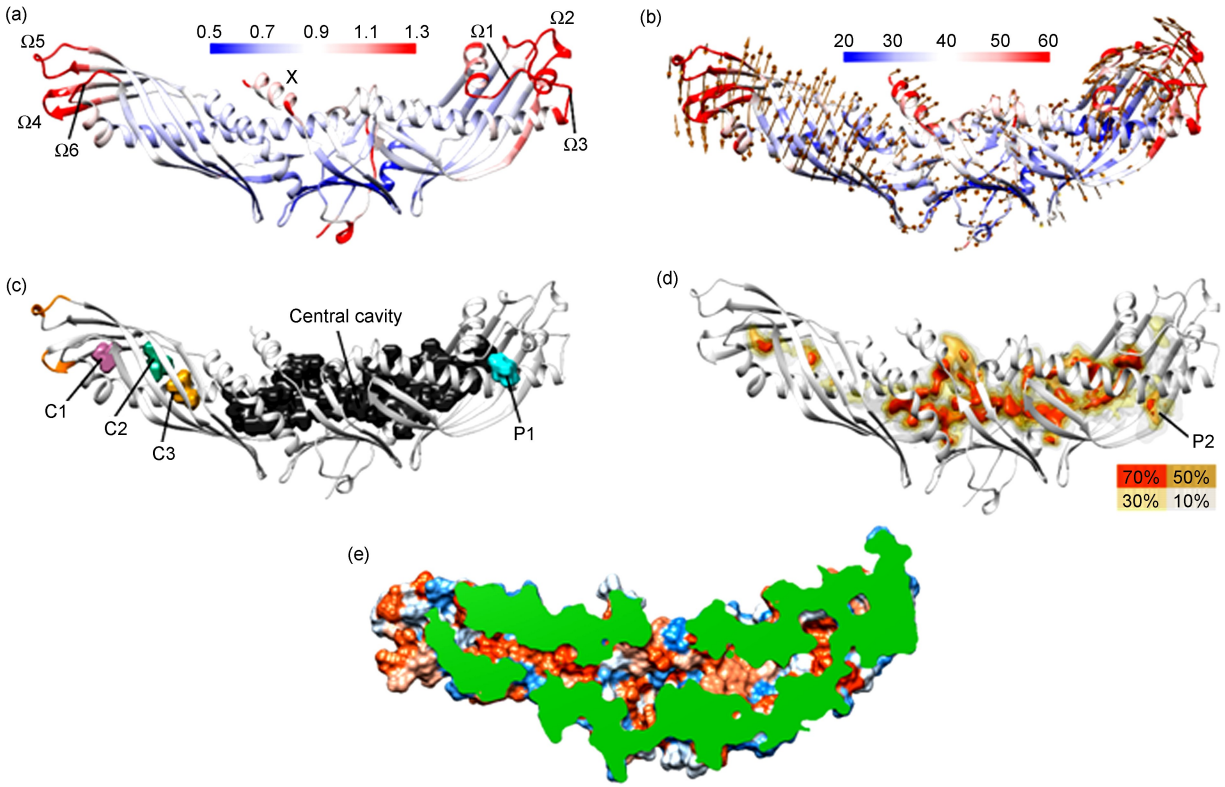


**图 3** CETP 结构的分子动力学模拟分析[20,37]:(a)CETP 在生理溶液中的结构柔性,CETP 在生理溶液中的稳定结构(带状模型)按 Cα 原子空间位置的均方根波动着色;(b)CETP 的理论结构柔性,CETP 晶体结构(带状模型)根据简正模式分析得到的温度因子着色;(c)CETP 晶体结构的内部腔(C1, C2, C3)与微孔(P1),N-端远端的两疏水链用橙色标示;(d)CETP 的空腔与微孔在生理溶液中的存在概率;(e)CETP 晶体结构的内部腔可在一本征简正振动模式下(图 b 箭头标示)连通为贯穿 CETP 的疏水通道(亲水:蓝色,疏水:橙色,横截面:绿色);模型使用 UCSF Chimera 进行三维渲染[26]

**Fig. 3** Molecular dynamics simulation studies of CETP structure[20,37]. (a) Structural flexibility of CETP in physiological solution. Equilibrated structure of CETP in physiological solution (shown in ribbon model) is colored by root mean square fluctuations of Cα. (b) Theoretical structural flexibility of CETP. Crystal structure of CETP (shown in ribbon model) is colored by its theoretical temperature factors obtained from normal mode analysis. (c) Cavities (C1, C2, C3) and pore (P1) in CETP crystal structure. The two hydrophobic chains at the N-terminal distal end are colored orange. (d) Probability of cavities and pores of CETP in physiological solution. (e) A continuous hydrophobic tunnel cross section (hydrophilic: blue, hydrophobic: orange, cross section plane: green) through CETP can be formed by connection of the cavities in CETP crystal structure through a special normal mode shown by the arrows in subfigure b.

盐键在蛋白结构与功能的多个方面,如结构柔性、热稳定性和分子识别等,发挥着重要作用[40]。虽然 CETP 的带电氨基酸大致均匀的分布于表面,在生理溶液中带电氨基酸间所形成的盐键却分布极不均匀,主要集中于蛋白中部,即刚性强的区域[37]。几乎所有柔软区域都缺乏盐键。盐键分布与结构柔性的一致性,一方面提示我们盐键的确有利于 CETP 结构的稳定并促进局部的刚性,是调控 CETP 结构柔性的重要因素;另一方面也进一步印证了生理条件下 CETP 的结构柔性特征。

### 3.2 疏水内腔与微孔

通过对 CETP 晶体结构的分析,裘夏阳等发现 CETP 内部除绑定脂分子的腔外,还存在一串空腔[41](如图 3c)。空腔 C1、C2 与 C3 的内壁几乎全由疏水氨基酸构成(分别占 100%, ~ 94% 与 100%),因此都高度疏水[37]。分子动力学模拟显示

这些疏水内腔的中心区域在生理溶液中保持打开(图 3d)。疏水内腔 C1 的体积基本保持在 ~120 Å$^3$。在经一定程度的收缩后,疏水内腔 C2 与 C3 分别稳定于 ~120 Å$^3$ 与 ~70 Å$^3$[37]。因此这些疏水内腔可在生理溶液中稳定存在。

在 CETP 晶体结构中,除靠近中部绑定磷脂的两微孔外,还有一位于 C-端远端的微孔 P1(图 3c)。此微孔在生理溶液中会受 Phe301 侧链移动的影响而被压缩[37],缩小近 70% 且经常关闭(图 3d)。与此同时,因 Gln410 侧链位置的调整[37],另一微孔 P2 在微孔 P1 旁逐渐形成并与 CETP 的脂绑定腔连通(图 3d)。其体积超过了晶态结构中的微孔 P1。

### 3.3 表面亲疏水性

对 CETP 表面亲疏水性的了解有助于我们对其与脂蛋白相互作用的研究。CETP 晶态结构的 N-端远端有疏水链(Ala48 ~ Leu52,Trp105 ~ Ile109)暴露于水环境(图 3c),较 C-端远端更加疏水。这使 CETP 具有一定极性。

雷东升等发现,在生理溶液中稳定后,CETP N-端远端疏水链的溶剂可及表面积仅减小 ~4.7%,而邻近的疏水氨基酸 Trp162 的溶剂可及表面积却显著增大[37]。当 CETP 通过凹面与脂滴绑定后,Trp162 仍处于水环境中[38]。Trp105,Trp106 也暴露在外,与水环境或脂滴的疏水层接触。这说明 N-端远端的疏水结构在生理条件下十分稳定,不是结晶与高盐浓度环境带来的假象。

在生理溶液中,位于 CETP C-端远端尤其链 Ω1 的亲水氨基酸的溶剂可及表面积显著增大(至少 30%)[37]。与此同时,微孔 P1 开口处的疏水氨基酸 Phe301,Ile307 和 Phe408 的溶剂可及表面积则显著减小,表明它们更加包埋于蛋白内部。以上变化使 CETP 的 C-端远端尤其是链 Ω1 的亲水性进一步提高。

## 4 CETP 作用机理——“通道”模型

裘夏阳等通过研究 CETP 的晶体结构发现,在 CETP 凹面中心附近存在着两个可以绑定磷脂的微孔(图 2c 中黑色箭头所示),再加上 CETP 的凹面的曲率半径大约是 5 nm,正好可以镶嵌在 HDL 表面,因此,裘夏阳等提出 CETP 是通过“班车(shuttle)”模型转运胆固醇酯的[16,42]。此模型中,CETP 的凹面分别与 HDL 和 VLDL 表面结合,胆固醇酯从磷脂绑定微孔进出,从而实现胆固醇酯从 HDL 到 VLDL 的转移。

然而,从 CETP·HDL 三维重构结果来看(图 2):首先,CETP 是以其 N-端进入 HDL 从而完成结合的;其次,当 CETP 一端结合 HDL 时,CETP 靠近中部的两个磷脂绑定微孔其实是在 HDL 表面附近,也就是暴露在外界水环境之下的;考虑到胆固醇酯是疏水性的,所以,裘夏阳等发现的磷脂绑定微孔并不一定是胆固醇酯进出的通道。另外,CETP 的凹面的曲率只与 HDL 契合,它需要通过潜在的结构调整[16]调节曲率以绑定尺寸比 HDL 大的多的 LDL 或 VLDL,但动力学模拟显示 CETP 无论是在生理溶液中,还是通过凹面绑定于脂滴,其中部的刚性都较强[37,38],难以通过猜测的结构调整改变曲率。

更进一步地,HDL·CETP·LDL 和 HDL·CETP·VLDL 三聚体电镜观察(图 1e 和 1f)说明,CETP 可以作为一个“通道”把 HDL 和 LDL 或 VLDL 连接起来,并且 CETP 的 N-端与 HDL 结合、C-端与 LDL 或 VLDL 结合。更重要的是,从 CETP 活性测试结果来看,CETP 是可以作为一个通道来实现胆固醇酯从 HDL 到 LDL 的转移的(图 4)。

### 4.1 通道模型

在 CETP 与脂蛋白绑定结构的透射电镜观察与 CETP 结构的分子动力学模拟分析结果基础上,张磊等提出 CETP 可以通过通道模型在脂蛋白间转移脂分子[20,43](图 4)。首先,CETP 与 HDL 结合,将 N-端远端插入 HDL 胆固醇酯核,形成 CETP·HDL 二聚体。然后,此二聚体在运动中与 LDL 或 VLDL 相互作用,使 CETP 的 C-端远端插入 LDL 或 VLDL 的表面,形成 HDL·CETP·LDL 或 HDL·CETP·VLDL 三聚体。随后,在与脂蛋白相互作用的驱动下,CETP 柔软的两端进行结构调整,逐渐打开并与内部的疏水腔连通为贯穿 CETP 的通道。最后,脂分子经贯穿 CETP 的疏水通道在脂蛋白间转移。

为转移脂分子,通道模型要求 CETP 绑定于脂蛋白,而不是像班车模型那样在脂蛋白间穿梭,这与人体血浆中超过 80% 的 CETP 绑定于 HDL[44]的结果吻合。另外,将位于 CETP 内部腔最狭窄处的氨基酸置换为体积较大的色氨酸可显著抑制 CETP 的脂转移活性但容许胆固醇酯的绑定[16]。而 CETP 抑制剂的绑定位点也正毗邻内部腔的最狭窄处[45]。这说明阻碍脂分子穿过 CETP 的内部通道可抑制脂分子转运,进一步支持了通道模型。

通道模型与螺旋 X 在脂转移过程中的重要作用并不违背。将位于 CETP 凹面中心的螺旋 X 删除可严重降低 CETP 转移中性脂的活性[46,47],因此人们猜测此螺旋应协助 CETP 与脂蛋白的结合,故

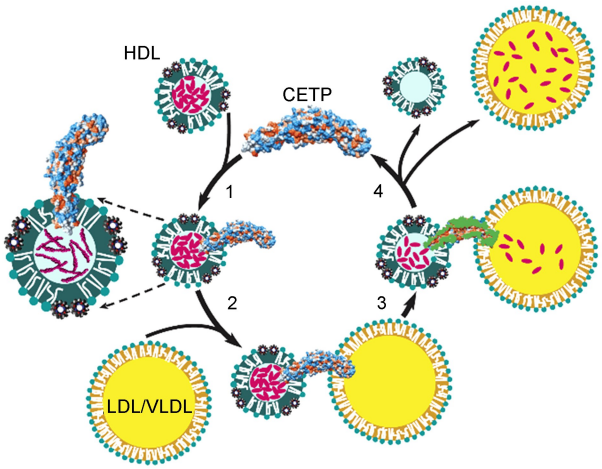


**图 4** CETP 脂转移的通道模型[20]:(1)CETP 与 HDL 结合并将 N-端插入 HDL 胆固醇酯核,形成 CETP·HDL 二聚体;(2)在 CETP·HDL 二聚体运动中,CETP 的 C-端与 LDL 或 VLDL 相互作用并插入 LDL 或 VLDL 表面,形成 HDL·CETP·LDL 或 HDL·CETP·VLDL 三聚体;(3)在与脂蛋白的作用下,CETP 柔软的两远端进行结构调整,逐渐打开,并与 CETP 内的疏水内腔连通为贯穿 CETP 的通道,介导胆固醇酯从 HDL 到 LDL 或 VLDL 的转移;(4)胆固醇酯转移完成后,三聚体解体。CETP 进入下一轮的脂转移

**Fig. 4** Tunnel mechanism for neutral lipid transfer by CETP[20]. (1) CETP initially interacts with HDL and penetrates its N-terminal β-barrel domain into HDL cholesteryl ester core, forming CETP·HDL complex. (2) CETP C-terminal β-barrel domain penetrates into a LDL or VLDL surface, leading to a HDL·CETP·LDL or HDL·CETP·VLDL ternary complex. (3) Interactions with lipoproteins trigger the twisting of the CETP β-barrel domains, opening of the two flexible distal ends and connecting of the internal cavities into a hydrophobic, continuous tunnel through CETP. This tunnel serves as a conduit, mediating cholesteryl ester transfer from HDL to LDL or VLDL. (4) Upon finishing lipid transfer, the ternary complex dissembles, releasing CETP for subsequent lipid transfer.

CETP 是通过凹面绑定脂蛋白的[16]。而电镜结果显示 CETP 是以 45°倾角结合在球形 HDL 上的,且 N-端插入深度达到 ~48 Å,此时距离 N-端远端 ~50 Å 的螺旋 X 仍可与脂蛋白相互作用[48]。

### 4.2 CETP 与脂蛋白的绑定

鉴于 CETP 可在无载脂蛋白的脂质体间转运脂分子[49],脂蛋白表面的脂质层与 CETP 间非特异性的亲疏水相互作用可能是影响两者绑定的首要因素。

CETP N-端远端在生理溶液中保持疏水,倾向于与脂蛋白疏水部分结合。且 N-端尺寸较 C-端小,呈锥状,便于插入脂蛋白。这就解释了为什么 N 端可插入 HDL 的疏水胆固醇酯核。此猜测也与 N-端远端的疏水链对 CETP 与磷脂转移蛋白(与 CETP 结构同源)的脂转移活性的重要作用吻合。将位于 N-端远端的疏水氨基酸 Ala48 置换为荷电氨基酸可强烈抑制 CETP 的脂转移活性[50]。而将磷脂转移蛋白上对应 CETP N-端远端疏水链的疏水氨基酸(Trp91, Phe92 和 Phe93)突变后,磷脂转移蛋白的活性将降低约 60%[51]。此外,Apolipophorin Ⅲ蛋白具有与 CETP N-端远端疏水链类似的链结构[52],而这些链结构在识别脂蛋白过程中发挥作用[53]。最后,虽然在 Koivuniemi 等的模拟中,CETP 是通过凹面而不是 N-端远端与脂滴绑定,位于此远端的 Trp105 与 Trp106 仍可与脂滴内的疏水层接触[38],印证了 N-端远端的疏水链在 CETP 与脂蛋白绑定中的潜在作用。

CETP C-端远端较 N 端更加亲水,无法与疏水的脂蛋白核心形成稳定的相互作用。相反的,它更加趋向于与脂蛋白表面磷脂层的亲水部分结合。此外,C-端尺寸较 N-端大且呈柱形,不利于插入脂蛋白内部。这与 CETP 将 C 端仅插入 LDL 或 VLDL ~ 20 Å,即表面磷脂层的结果相吻合。

考虑到 CETP 两端会选择性地绑定不同种类的脂蛋白,且绑定方式(如插入深度)存在显著差异,除了非特异性的亲疏水作用外,应有其他因素调节 CETP 与脂蛋白的绑定。首先,脂蛋白的表面结构存在差异。因 HDL 尺寸较 LDL 与 VLDL 小,其表面磷脂分子头部的间距更大,有利于 CETP 插入内部疏水区[48]。同时,CETP 的插入将提高脂蛋白,特别是尺寸较小的 HDL 的表面张力,这不利于尺寸较大且呈柱状的 C-端插入脂蛋白(特别是 HDL)内部,可能是促使 CETP 两端选择性绑定不同种类脂蛋白的重要原因。其次,脂蛋白表面的电性等特征存在差异。通过乙酰化载脂蛋白的赖氨酸或添加荷负电脂肪酸都可提高胆固醇酯受体 LDL 表面的负电荷数,增强 CETP 与 LDL 的绑定,改变 CETP 的脂转移活性[54,55]。再次,脂蛋白的载脂蛋白(apolipoprotein, apo)存在差异。HDL 内载脂蛋白主要为 apoA-Ⅰ与 apoA-Ⅱ,LDL 与 VLDL 则还包含 apoB,apoE 等多种载脂蛋白。一些载脂单白对 CETP 的功能有特定的调节作用,如 apoC-I 在体内与体外实验中都抑制 CETP 的脂转移活性[56,57]。

### 4.3 通道的形成

CETP 晶体结构中存在一串疏水空腔(图 3c)。它们可在生理溶液中稳定存在,因此并不是结晶带

来的假象。简正模式分析显示 CETP 的晶体结构沿长轴方向旋转仅 15°后(图 3b),所有的内部疏水腔将会联结成一个约 120 Å 长,5 ~ 15 Å 宽的疏水连续通道(图 3e)[20],证实了通道模型的存在性。

CETP 绑定脂蛋白时,靠近中部的两磷脂绑定微孔均暴露于脂蛋白表面外的水环境,因此并不一定是胆固醇酯进出的开口。考虑到 CETP 两端插入脂蛋白,且 CETP 内部可形成贯穿的疏水通道,插入脂蛋白的两远端可能是脂分子进出的潜在开口。

CETP 两远端在晶体结构中处于关闭状态,必须通过大尺度的结构调整才能打开。虽然晶体结构的 N-端远端刚性较强,但在脱离晶格约束后,CETP 两远端都因缺乏盐键的稳定作用而十分柔软。因此 CETP 两远端可在与脂蛋白的绑定过程中进行必要的大尺度构象调整,打开并传输脂分子。

虽然没有考虑 CETP 与脂蛋白的相互作用,在生理溶液中的分子动力学模拟显示 CETP C-端远端的微孔可产生与消亡,印证了柔软的两端可进行大尺度的结构调整而改变疏水通道的位置与尺寸,乃至在与脂蛋白的作用下完全打开的猜测。

### 4.4 脂分子传输

当 CETP 内部的疏水通道形成后,脂分子经 CETP 内部通道传输,特别是胆固醇酯分子的定向转运可由多种因素调控:(1)脂蛋白间脂分子的浓度差。HDL 与 LDL 核富含胆固醇酯而 VLDL 核富含甘油三酯,这可促进胆固醇酯的定向转移;(2)脂蛋白内部压强的差异。与 LDL 和 VLDL 相比,HDL 尺寸更小,可具有更高的内压强,促进脂分子从 HDL 到 LDL 或 VLDL 的定向传输;(3)CETP 内部通道的疏水性沿通道的变化,可能有利于疏水的胆固醇酯从 N-端向 C-端的定向传输[20];(4)脂分子在脂蛋白内化学能的差异。HDL 内胆固醇酯排列更加有序,趋于向分子排列更加无序的 LDL 和 VLDL 核转移[48]。

## 5 结论与展望

在胆固醇酯转移蛋白 CETP 晶体结构解析后,对 CETP 在脂转移过程中结构与功能的研究发展迅速。对 CETP 与脂蛋白绑定的高分辨透射电子显微研究,确定了 CETP 可通过 N-端和 HDL 结合,C-端与 LDL 或 VLDL 结合,从而形成 HDL·CETP·LDL 和 HDL·CETP·VLDL 三聚体,并介导胆固醇酯从 HDL 向 LDL 的转运。这说明 CETP 可能作为一个“通道”在脂蛋白间传递胆固醇酯。

对 CETP 晶体,生理溶液中及与脂滴绑定状态下的结构分析显示 CETP 内部拥有一串疏水空腔;它们可通过蛋白的结构调整连通为贯穿 CETP 的通道;而 CETP 两端柔性较强,允许其进行大尺度的结构调整甚至打开;CETP N-端远端的疏水链保持表露在外,也与 CETP 将 N 端插入 HDL 疏水的胆固醇酯核的电镜结果相吻合。这些结果都进一步印证了通道模型的存在性。

大量的电镜图像事实与分子动力学模拟预测都说明“通道”传输机制是 CETP 与脂蛋白作用的一个非常有说服力的模型。为彻底揭示 CETP 脂转移功能,今后可在该模型的可行性(即 CETP 的内部通道是否足以令一个胆固醇酯分子顺利通过)和驱动力(即 CETP 为何要发生形变,以及在何种作用力驱动下,胆固醇酯分子会从高密度脂蛋白一端传递到低密度脂蛋白一端)等方面展开更为细致的工作。

**致谢** 衷心感谢美国劳伦斯伯克利国家实验室 Matthew J. Rames,Meng Zhang 在此文撰写过程中所给予的帮助。

### 参 考 文 献

[1] Camejo G, Waich S, Quintero G, Berrizbeitia M L, Lalaguna F. Atherosclerosis, 1976, 24(3): 341.
[2] Gordon T, Castelli W P, Hjortland M C, Kannel W B, Dawber T R. The American Journal of Medicine, 1977, 62(5): 707.
[3] Moore R B, Long J M, Matts J P, Amplatz K, Varco R L, Buchwald H. Atherosclerosis, 1979, 32(2): 101.
[4] Gordon D J, Probstfield J L, Garrison R J, Neaton J D, Castelli W P, Knoke J D, Jacobs D R Jr, Bangdiwala S, Tyroler H A. Circulation, 1989, 79(1): 8.
[5] Barter P J, Rye K A. Current Opinion in Lipidology, 2006, 17(4): 399.
[6] Rader D J. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2007, 4(2): 102.
[7] Assmann G, Gotto A M Jr. Circulation, 2004, 109(23 Suppl 1): III8.
[8] Barter P J, Brewer H B Jr, Chapman M J, Hennekens C H, Rader D J, Tall A R. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003, 23(2): 160.
[9] Brown M L, Inazu A, Hesler C B, Agellon L B, Mann C, Whitlock M E, Marcel Y L, Milne R W, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Tall A R. Nature, 1989, 342(6248): 448.
[10] Marotti K R, Castle C K, Boyle T P, Lin A H, Murray R W, Melchior G W. Nature, 1993, 364(6432): 73.
[11] Morehouse L A, Sugarman E D, Bourassa P A, Sand T M, Zimetti F, Gao F, Rothblat G H, Milici A J. Journal of Lipid Research, 2007, 48(6): 1263.
[12] Rennings A J, Stalenhoef A. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2008, 17(10): 1589.

[13] Xie L, Li J, Xie L, Bourne P E. PLoS Computational Biology, 2009, 5(5): e1000387
[14] Barter P J, Caulfield M, Eriksson M, Grundy S M, Kastelein J J, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif J C, Waters D D, Shear C L, Revkin J H, Buhr K A, Fisher M R, Tall A R, Brewer B, Investigators I. The New England Journal of Medicine, 2007, 357(21): 2109.
[15] Schwartz G G, Olsson A G, Abt M, Ballantyne C M, Barter P J, Brumm J, Chaitman B R, Holme I M, Kallend D, Leiter L A, Leitersdorf E, McMurray J J, Mundl H, Nicholls S J, Shah P K, Tardif J C, Wright R S, Dal O I. The New England Journal of Medicine, 2012, 367(22): 2089.
[16] Qiu X, Mistry A, Ammirati M J, Chrunyk B A, Clark R W, Cong Y, Culp J S, Danley D E, Freeman T B, Geoghegan K F, Griffor M C, Hawrylik S J, Hayward C M, Hensley P, Hoth L R, Karam G A, Lira M E, Lloyd D B, McGrath K M, Stutzman-Engwall K J, Subashi A K, Subashi T A, Thompson J F, Wang I K, Zhao H, Seddon A P. Nature Structural & Molecular Biology, 2007, 14(2): 106.
[17] Zhang L, Song J, Newhouse Y, Zhang S, Weisgraber K H, Ren G. Journal of Lipid research, 2010, 51(5): 1228.
[18] Zhang L, Song J, Cavigiolio G, Ishida B Y, Zhang S, Kane J P, Weisgraber K H, Oda M N, Rye K A, Pownall H J, Ren G. Journal of Lipid research, 2011, 52(1): 175.
[19] Ren G, Rudenko G, Ludtke S J, Deisenhofer J, Chiu W, Pownall H J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(3): 1059.
[20] Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles M A, Cavigiolio G, Oda M, Krauss R M, Weisgraber K H, Rye K A, Pownall H J, Qiu X, Ren G. Nat. Chem. Biol., 2012, 8(4): 342.
[21] Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A. Journal of Structural Biology, 1996, 116(1): 190.
[22] Ludtke S J, Baldwin P R, Chiu W. Journal of Structural Biology, 1999, 128(1): 82.
[23] Grigorieff N. Journal of Structural Biology, 2007, 157(1): 117.
[24] Scheres S H. Journal of Structural Biology, 2012, 180(3): 519.
[25] Borkotoky S, Meena C K, Khan M W, Murali A. EXCLI Journal, 2013, 12: 335.
[26] Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, Couch G S, Greenblatt D M, Meng E C, Ferrin T E. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25(13): 1605.
[27] Schrodinger, LLC (2010) The Pymol Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
[28] Sayle R. Trends in Biochemical Sciences, 1995, 20(9): 374.
[29] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. Journal of Molecular Graphics, 1996, 14(1): 33.
[30] O'Donoghue S I, Goodsell D S, Frangakis A S, Jossinet F, Laskowski R A, Nilges M, Saibil H R, Schafferhans A, Wade R C, Westhof E, Olson A J. Nature Methods, 2010, 7(3 Suppl): S42.
[31] Zhang L, Cavigiolio G, Wang J J, Rye K A, Oda M, Ren G. Biophysical Journal, 2010, 98(3): 440a. DOI:10.1016/j.bpj.2009.12.2391.
[32] Zhang L, Kaspar A, Woodnutt G, Ren G. Biophysical Journal, 2010, 98(3): 440a. DOI:10.1016/j.bpj.2009.12.2392.
[33] Zhang L, Ren G. PloS one, 2012, 7(1): e30249
[34] Zhang L, Ren G. Biophysical Journal, 2010, 98(3): 441a. DOI:10.1016/j.bpj.2009.12.2393.
[35] Zhang L, Ren G. Biophysical Journal, 2010, 98(3): 441a. DOI:10.1016/j.bpj.2009.12.2394.
[36] Phillips J C, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel R D, Kale L, Schulten K. Journal of Computational Chemistry, 2005, 26(16): 1781.
[37] Lei D, Zhang X, Jiang S, Cai Z, Rames M J, Zhang L, Ren G, Zhang S. Proteins: Structure Function and Bioinformatics, 2013, 81(3): 415.
[38] Koivuniemi A, Vuorela T, Kovanen P T, Vattulainen I, Hyvonen M T. PLoS Computational Biology, 2012, 8(1): e1002299
[39] Hinsen K. Bioinformatics, 2008, 24(4): 521.
[40] Sinha N, Smith-Gill S J. Curr. Protein Pept. Sci., 2002, 3(6): 601.
[41] Hall J, Qiu X. Biochem. Soc. Trans., 2011, 39(4): 1000.
[42] Barter P J, Jones M E. Journal of Lipid Research, 1980, 21(2): 238.
[43] Ihm J, Quinn D M, Busch S J, Chataing B, Harmony J A K. Journal of Lipid Research, 1982, 23(9): 1328.
[44] Cheung M C, Wolf A C, Lum K D, Tollefson J H, Albers J J. Journal of Lipid Research, 1986, 27(11): 1135.
[45] Liu S, Mistry A, Reynolds J M, Lloyd D B, Griffor M C, Perry D A, Ruggeri R B, Clark R W, Qiu X. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(44): 37321.
[46] Wang S, Deng L P, Milne R W, Tall A R. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(25): 17487.
[47] Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne R W, Tall A R. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(3): 1955.
[48] Charles M A, Kane J P. Journal of Lipid Research, 2012, 53(8): 1451.
[49] Swenson T L, Brocia R W, Tall A R. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(11): 5150.
[50] Wang S, Deng L P, Brown M L, Agellon L B, Tall A R. Biochemistry, 1991, 30(14): 3484.
[51] Desrumaux C, Labeur C, Verhee A, Tavernier J, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Peelman F. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(8): 5908.
[52] Weers P M, Ryan R O. Insect. Biochem. Mol. Biol., 2006, 36(4): 231.
[53] Weers P M, Narayanaswami V, Kay C M, Ryan R O. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(31): 21804.
[54] Morton R E, Greene D J. Journal of Lipid Research, 2003, 44(12): 2287.
[55] Nishida H I, Arai H, Nishida T. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(22): 16352.
[56] Gautier T, Masson D, de Barros J P, Athias A, Gambert P, Aunis D, Metz-Boutigue M H, Lagrost L. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(48): 37504.
[57] Gautier T, Masson D, Jong M C, Duverneuil L, Le Guern N, Deckert V, Pais de Barros J P, Dumont L, Bataille A, Zak Z, Jiang X C, Tall A R, Havekes L M, Lagrost L. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(35): 31354.