

· 研究进展 ·

# LIMA1 基因变异引起小肠胆固醇吸收下降和血液中低 LDL-C

宋保亮<sup>1\*</sup> 马依彤<sup>2</sup>

(1. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072; 2. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054)

**[摘要]** 血液中高水平的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)是心脑血管疾病的主要危险因素。已知在人群中 LDL-C 水平存在较大差异并可遗传。然而,影响 LDL-C 的遗传因素并未被完全揭示。我们在新疆哈萨克家系中发现 *LIMA1* (也被称为 *EPLIN* 或 *SREBP3*) 基因存在一个罕见移码变异,该变异影响肠道胆固醇吸收,并导致血液 LDL-C 降低。在小鼠中,*LIMA1* 主要在小肠中表达,并定位于小肠粘膜的刷状缘上。*LIMA1* 将介导胆固醇吸收的关键蛋白 NPC1L1 连接到含有 myosin Vb 的转运复合物上,从而促进胆固醇的摄取。*LIMA1* 缺失小鼠也表现与人表型相似的生理特征,并能抵抗由高脂饮食引起的高胆固醇血症。通过对小鼠和人的研究,我们证明 *LIMA1* 是调节肠道胆固醇吸收的关键蛋白。该工作发表于 2018 年 6 月 *Science* 杂志。

**[关键词]** *LIMA1*; NPC1L1; 胆固醇吸收; 移码突变; 哈萨克

## 1 研究背景

2012 年发布的全国成人血脂报告表明,中国人群的血脂异常总体患病率逐年增加,高达 40.4%<sup>[1]</sup>。血脂异常是心血管病的主要危险因素,尤其是低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)升高显著增加动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)发病率。最新数据显示血清胆固醇水平的升高将直接导致我国心血管病事件在 2010—2030 年期间增加约 920 万人次<sup>[2]</sup>。因此降低 LDL-C 水平是防控 ASCVD 危险的首要干预靶点,降低胆固醇可显著减少 ASCVD 的发病及死亡危险<sup>[3]</sup>。LDL-C 水平主要受遗传和饮食双重控制,了解人体 LDL-C 水平的遗传调控机制是疾病诊治和医药研究的先决条件,但目前对影响 LDL-C 水平的遗传机制认识依然有限。

血浆 LDL-C 水平在不同个体之间存在较大差异,并且具有一定的遗传性<sup>[4, 5]</sup>。已有研究发现人群中存在一些自发基因突变与血浆 LDL-C 水平有

关,例如 LDLR (LDL receptor)、ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia)等基因突变会造成血浆 LDL-C 水平升高,增加患心血管疾病的风险<sup>[6-8]</sup>,而 PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)、APOC3 (apolipoprotein C3)、APOB (apolipoprotein B)、NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1)、MTTP (microsomal triglyceride transfer protein)、ANGPTL3 (angiopoietin-like 3)、ANGPTL4 (angiopoietin-like 4)等基因突变会造成血浆 LDL-C 水平降低,从而降低患心血管疾病的风险<sup>[9-17]</sup>。鉴定与血浆 LDL-C 水平相关的基因突变可深入了解 LDL-C 水平的调控机制,为治疗心血管疾病提供新的药物靶点。

## 2 研究进展及成果

食物中胆固醇的吸收主要受小肠粘膜上皮细胞 NPC1L1 信号通路调控。2004 年 Altmann 等人通过生物信息学分析和基因敲除技术揭示了 NPC1L1 基因突变显著影响小肠上皮细胞对胆固醇的吸收<sup>[18]</sup>。进一步研究发现 NPC1L1 主要通过囊泡内

收稿日期: 2018-09-23; 修回日期: 2018-10-28

\* 通信作者, Email: bhsong@whu.edu.cn

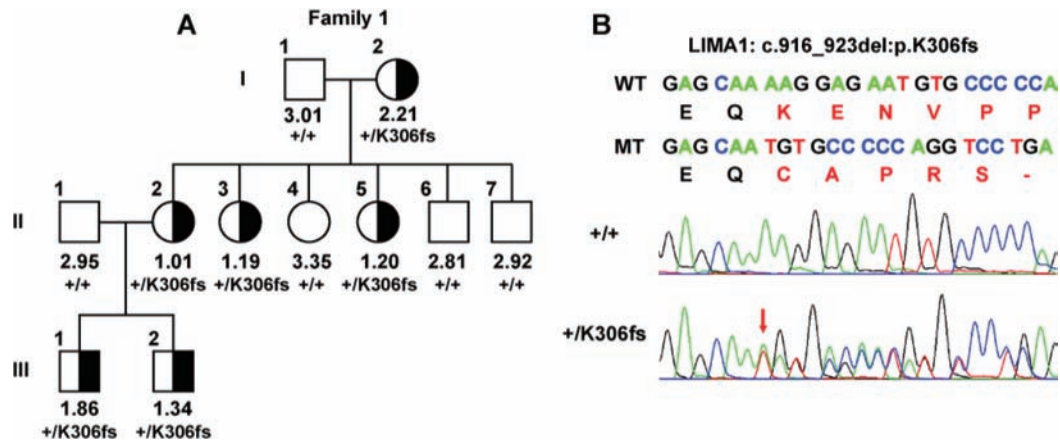


图1 在我们收集的一哈萨克家中鉴定出低血浆 LDL-C 与 *LIMA1* 基因突变相关

A: 一个低 LDL-C 水平的哈萨克人家系图; B: 正常 LDL-C 个体(II:4)与低 LDL-C 个体(II:2)的部分 DNA 测序结果

吞机制介导胆固醇吸收。在该过程中,蛋白质 NPC1L1 与脂筏蛋白 Flotillin-1 和 Flotillin-2 结合,同时结合细胞膜上的大量游离胆固醇<sup>[19]</sup>;胆固醇诱导 NPC1L1 结合 Numb 蛋白而内吞<sup>[20, 21]</sup>,将大量胆固醇递送到细胞内。

我国哈萨克人消耗牛羊肉和奶制品多,但心血管疾病发病率低于汉族人,且哈萨克人生活在相对隔离的地区,通常只与本族人结婚,遗传背景独特。这些特征使中国的哈萨克人成为非常合适的鉴定胆固醇代谢相关基因的人群。在一项新疆地区心血管病危险因素的流行病学调查研究中<sup>[22]</sup>,我们在哈萨克人中发现了—个血浆总胆固醇和 LDL-C 水平显著降低的家系(图 1 左),该家系成员的甘油三酯、血糖、高密度胆固醇(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平均无统计学差异。我们对该家系中 3 个 LDL-C 低水平个体和 1 个 LDL-C 正常水平个体的 DNA 进行了全外显子组测序分析,并结合全基因组连锁分析,发现 LIM domain and actin binding 1(*LIMA1*, 又名 *EPLIN* 或 *SREBP3*) 基因的一个杂合移码缺失突变 K306fs (*LIMA1*: NM\_001113546: exon 7: c. 916\_923 del: p. K306fs)与血浆低 LDL-C 水平相关(图 1 右)。我们首次鉴定了 *LIMA1* 在脂质代谢中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。

胆固醇内源合成和肠道胆固醇吸收是影响人体胆固醇水平的主要因素。已知芸苔甾醇(Ca)是一种只能从饮食中吸收获得的植物固醇,而 7-烯胆烷醇(L)是胆固醇合成的中间体,血浆中 7-烯胆烷醇的水平和胆固醇的内源合成密切相关。因此血浆中芸苔甾醇与 7-烯胆烷醇的比值(Ca: L)可作为胆固醇吸收效率的指标,其比值与胆固醇吸收效率正相

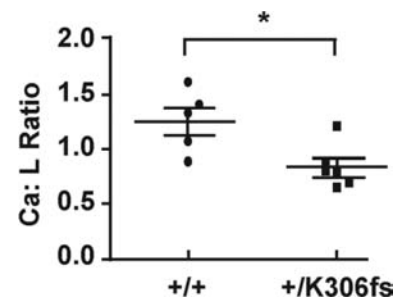


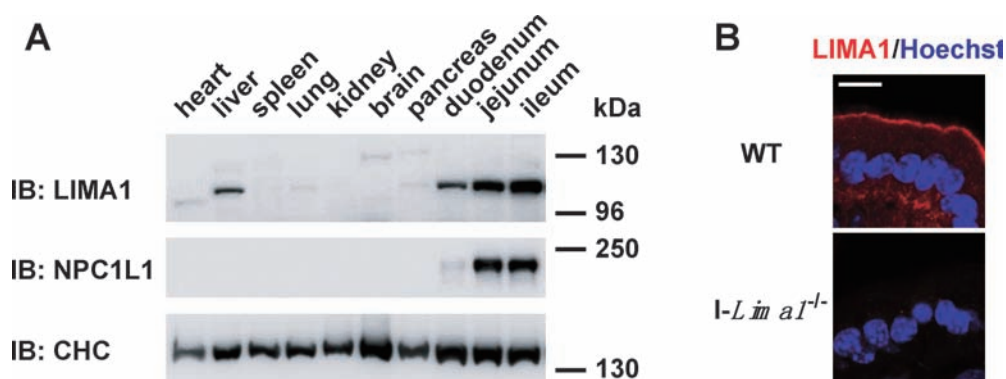
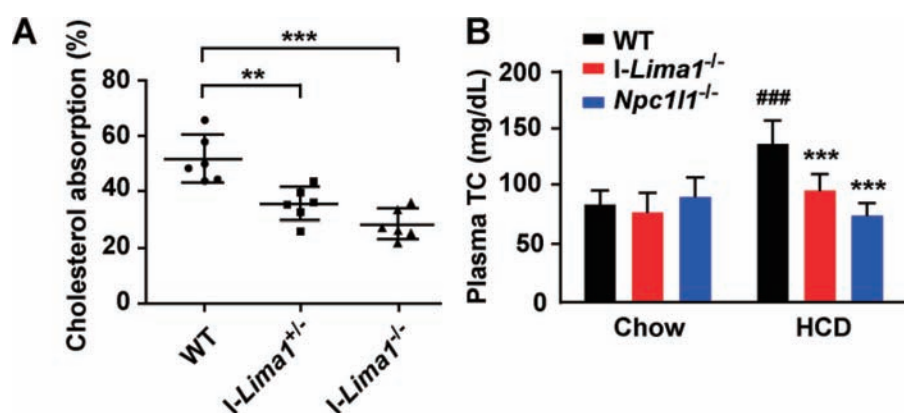
图2 图 1 所示家系的家庭成员 Ca: L 值

\*  $P < 0.05$ ; Ca: campesterol; L: lathosterol

关<sup>[24]</sup>。为进一步探究 *LIMA1* 基因突变对 LDL-C 的影响,我们通过用气相色谱-质谱(GC-MS)测定了该家系成员血浆中 Ca: L 的比值,发现携带 *LIMA1*-K306fs 突变的个体小肠胆固醇吸收显著降低(图 2)。

为探究 *LIMA1* 基因影响胆固醇吸收的分子机制,我们首先检测了小鼠中 *LIMA1* 的组织表达谱。*LIMA1* 在小肠(包括十二指肠、空肠和回肠)中高表达,主要定位于朝向肠腔的刷状缘上(图 3),而在肝脏中也有少量表达,但在心脏、脾脏、肺、大脑和胰腺中的表达量也很低。小肠吸收的胆固醇约占人体每日摄入胆固醇总量的 50%<sup>[25]</sup>,小肠吸收胆固醇主要由跨膜蛋白 NPC1L1 介导。

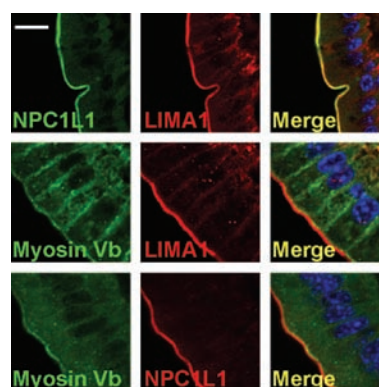
我们构建了小肠 *LIMA1* 基因特异性敲除小鼠(*I-Limal*<sup>-/-</sup>),通过粪便双同位素比值法,我们测得 *I-Limal*<sup>+/-</sup> (35.5%) 和 *I-Limal*<sup>-/-</sup> (28.6%) 小鼠的胆固醇吸收效率与野生型(WT)小鼠(51.6%)相比有显著差异(图 4A)。我们接着评估了 *LIMA1* 基因在饮食引起的高胆固醇血症中的作用。当喂食普通饲料时,*I-Limal*<sup>-/-</sup> 和 WT 小鼠血浆和肝脏中的 TC 水平相似,且高胆固醇饮食(HCD)喂养能使

图 3 小鼠 *LIMA1* 的组织表达谱和小肠定位图 4 小肠特异性敲除 *LIMA1* 基因能降低小肠胆固醇吸收及饮食引起的高胆固醇  
A: 不同小鼠的胆固醇吸收效率; B: 不同小鼠喂养普通饮食或高脂饮食 7 天测量血浆 TC 水平

WT 小鼠血浆和肝脏中的 TC 水平分别增加 1.63 倍和 4 倍。而 HCD 喂养的 *I-Lima1*<sup>-/-</sup> 小鼠血浆和肝脏的 TC 水平比 HCD 喂养的 WT 小鼠分别低 28.8% 及 58.3% (图 4 右), 但总甘油三酯 (TG) 水平相似。

为揭示 *LIMA1* 蛋白参与胆固醇吸收的分子机制, 我们通过免疫沉淀结合质谱分析的方法, 鉴定出 *LIMA1* 蛋白能同时结合 *NPC1L1* 和 myosin Vb 蛋白。已知 *NPC1L1* 是介导胆固醇肝肠吸收的关键蛋白<sup>[18, 26, 27]</sup>, 而 myosin Vb 蛋白参与 *NPC1L1* 在细胞内的转运<sup>[28]</sup>。小鼠小肠免疫荧光染色实验表明 *LIMA1*、*NPC1L1* 和 myosin Vb 蛋白共定位于小肠绒毛上皮细胞刷状缘膜上 (图 5)。

在细胞水平, 用 siRNA 干扰 *LIMA1* 和 myosin Vb 的表达 (图 6 左), 或过表达 *LIMA1*(1-306) 以竞争性抑制 *LIMA1* 和 *NPC1L1* 相互作用, 均能阻碍 *NPC1L1* 蛋白从内吞循环体 (Endocytic recycling compartment, ERC) 向质膜 (Plasma membrane, PM) 的转运。细胞和分子水平研究表明 *LIMA1* 蛋白介导 *NPC1L1* 蛋白和 myosin Vb 蛋白相互作用, 从而参与 *NPC1L1* 蛋白的细胞内转运。此外, 我们

图 5 *NPC1L1*、*LIMA1* 及 myosin Vb 在小鼠小肠中的分布

还发现阻断 *LIMA1* 和 *NPC1L1* 的结合可以抑制 *NPC1L1* 介导的胆固醇吸收。

### 3 结论与展望

本研究发现, *LIMA1* 通过介导 *NPC1L1* 蛋白和 myosin Vb 蛋白相互作用来调节人体和小鼠肠道胆固醇吸收从而影响血浆胆固醇水平。越来越多的证据表明, 低 LDL-C 水平与降低 ASCVD 风险有关。抑制胆固醇生物合成途径中限速酶 HMGCR 的他汀类药物<sup>[29]</sup>或抑制 *NPC1L1* 介导肠道胆固醇吸收

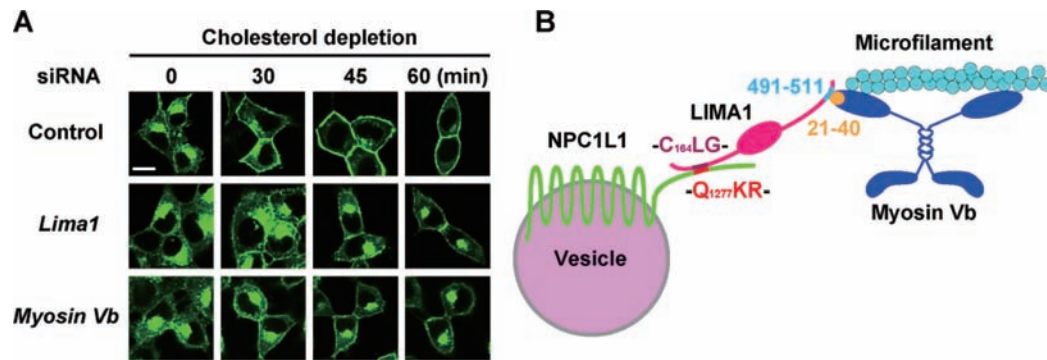


图6 LIMA1能将NPC1L1锚定到myosin Vb上,使其从内吞循环体(ERC)转运到质膜(PM)

A: 敲低LIMA1或myosin Vb的表达能减慢NPC1L1从ERC到PM的转运;

B: LIMA1、NPC1L1、myosin Vb的结合关系示意图

的Ezetimibe均可直接降低血LDL-C水平<sup>[18]</sup>。PCSK9抑制剂通过促进肝细胞表面LDLR水平增加降低LDL-C水平,是降低血浆LDL-C的第三类药物<sup>[30]</sup>。尽管有这些治疗方法,但ASCVD的患病率仍在逐年上升,许多人服用他汀类药物和/或依折麦布仍然无法达到他们的目标LDL-C水平<sup>[31, 32]</sup>。因此,非常有必要开发降低LDL-C新靶点的治疗方法。LIMA1不仅在胆固醇吸收过程中发挥重要作用,而且LIMA1基因突变并不影响健康,表明抑制LIMA1可能为治疗高胆固醇血症提供新的方向。该工作以研究论文形式发表于2018年6月*Science*杂志<sup>[33]</sup>,并被*Nature Reviews Cardiology*点评推荐<sup>[34]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 国家卫生和计划生育委员会疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [2] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in China: markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-china. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 2010, 3(3): 243—252.
- [3] 胡大一. 降低密度脂蛋白胆固醇是硬道理. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(1): 3—4.
- [4] Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, et al. Factors of risk in the development of coronary heart disease—six year follow-up experience. The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*, 1961, 55(1): 33—50.
- [5] Pilia G, Chen WM, Scuteri A, et al. Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 sardinians. *PLOS Genetics*, 2006, 2(8): 1207—1223.
- [6] Webb JC, Sun XM, McCarthy SN, et al. Characterization of mutations in the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene in patients with homozygous familial hypercholesterolemia, and frequency of these mutations in FH patients in the United Kingdom. *The Journal of Lipid Research*, 1996, 37(2): 368—381.
- [7] Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, 2001, 292(5520): 1394—1398.
- [8] Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, 2003, 34(2): 154—156.
- [9] Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nature Genetics*, 2005, 37: 161—165.
- [10] Pollin TI, Damcott CM, Shen H, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science*, 2008, 322(5908): 1702—1705.
- [11] Welty FK, Ordovas J, Schaefer EJ, et al. Identification and molecular analysis of two apoB gene mutations causing low plasma cholesterol levels. *Circulation*, 1995, 92(8): 2036—2040.
- [12] Stitzel NO, Won HH, Morrison AC, et al. Inactivating mutations in NPC1L1 and protection from coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 371: 2072—2082.



- [13] Ohashi K, Ishibashi S, Osuga J, et al. Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *The Journal of Lipid Research*, 2000, 41: 1199—1204.
- [14] Minicocci I, Montali A, Robciuc MR, et al. Mutations in the *ANGPTL3* gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012, 97(7): E1266—E1275.
- [15] Folsom AR, Peacock JM, Demerath E, et al. Variation in *ANGPTL4* and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 2008, 57(11): 1591—1596.
- [16] Abul-Husn NS, Manickam K, Jones LK, et al. Genetic identification of familial hypercholesterolemia within a single U. S. health care system. *Science*, 2016 354(6319): aaf7000.
- [17] Gravel S, Henn BM, Gutenkunst RN, et al. Demographic history and rare allele sharing among human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(29): 11983—11988.
- [18] Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 2004, 303(5661): 1201—1204.
- [19] Ge L, Qi W, Wang LJ, et al. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(2), 551—556.
- [20] Li PS, Fu ZY, Zhang YY, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1. *Nature medicine*, 2014, 20(1): 80—86.
- [21] Ge L, Wang J, Qi W, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metabolism*, 2008, 7(6): 508—519.
- [22] Yang YN, Xie X, Ma YT, et al. Type 2 diabetes in Xinjiang Uygur autonomous region, China. *PLOS ONE*, 2012, 7(4): e35270.
- [23] Yang JX, Brown MS, Ho YK, et al. Three different rearrangements in a single intron truncate sterol regulatory element binding protein-2 and produce sterol-resistant phenotype in three cell lines. Role of introns in protein evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(20), 12152—12161.
- [24] Wang LJ, Wang J, Li N, et al. Molecular characterization of the NPC1L1 variants identified from cholesterol low absorbers. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(9): 7397—7408.
- [25] Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual review of cell and developmental biology*, 2000, 16(1): 459—481.
- [26] Temel RE, Tang W, Ma Y, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *The Journal of clinical investigation*, 2007, 117(7): 1968—1978.
- [27] Chu BB, Ge L, Xie C, et al. Requirement of myosin Vb/Rab11a/Rab11-FIP2 complex in cholesterol-regulated translocation of Niemann-Pick C1 like 1 protein to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, jbc.M109.034355.
- [28] Chu BB, Liao YC, Qi W, et al. Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane Contacts. *Cell*, 2015, 161(2): 291—306.
- [29] Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2009, 29(4): 431—438.
- [30] Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 2012, 366(12): 1108—1118.
- [31] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2010, 121(7): 948—954.
- [32] Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 2008, 8(6): 373—418.
- [33] Zhang YY, Fu ZY, Wei J, et al. A variant promotes low plasma LDL cholesterol and decreases intestinal cholesterol absorption. *Science*, 2018, 360(6393): 1087—1092.
- [34] Lim GB. *LIMA1* variant influences cholesterol absorption. *Nature Reviews Cardiology*, 2018, 15(9): 502.

## A loss-of-function mutation in *LIMA1* decreases intestinal cholesterol absorption and reduces plasma LDL cholesterol

Song Baoliang<sup>1</sup> Ma Yitong<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. Heart Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

**Abstract** A high concentration of plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is a major risk factor for cardiovascular disease. LDL-C levels vary among humans and are heritable. However, the genetic factors affecting LDL-C are not fully characterized. We identified a rare frameshift variant in the *LIMA1* (also known as *EPLIN* or *SREBP3*) gene from a Chinese Kazakh family with inherited low LDL-C and reduced cholesterol absorption. In mice, *LIMA1* was mainly expressed in the small intestine and localized on the brush border membrane. *LIMA1* bridged *NPC1L1*, a critical protein for cholesterol absorption, to a transportation complex containing myosin Vb and facilitated cholesterol uptake. Similar to the human phenotype, *Limal*-deficient mice displayed reduced cholesterol absorption and were resistant to diet-induced hypercholesterolemia. Based on the findings from mice and humans, we conclude that *LIMA1* is a key protein regulating intestinal cholesterol absorption.

**Key words** *LIMA1*; *NPC1L1*; cholesterol absorption; frameshift mutation; Chinese Kazakhs

· 资料信息 ·

## 我国学者揭示觉醒维持的关键机制

在国家自然科学基金项目(项目编号:31771192、31500862)等资助下,中国人民解放军陆军军医大学(原第三军医大学)胡志安教授课题组揭示丘脑室旁核(paraventricular thalamus, PVT)是觉醒维持的关键核团。研究成果以“The paraventricular thalamus is a critical thalamic area for wakefulness”(丘脑室旁核是丘脑维持觉醒的关键脑区)为题,于2018年10月26日在 *Science* (《科学》)在线发表。论文链接:<http://science.sciencemag.org/content/362/6413/429>。陆军军医大学生理教研室胡志安教授、何超博士和脑研究中心谌小维教授为论文的共同通讯作者,陆军军医大学生理学专业任栓成博士研究生等为第一作者。

睡眠/觉醒是生命的基本现象,觉醒维持机制一直是神经科学家关注的重点。课题组首先发现 PTV 的即刻早期基因 *c-fos* 表达与觉醒紧密关联。在睡眠向觉醒转换过程中,PVT 的兴奋性明显增高,且在觉醒期间持续存在高水平活动。课题组进一步发现,抑制 PVT 谷氨酸能神经元可明显降低觉醒水平;特异性杀死 PVT 的谷氨酸能神经元或损毁 PVT 可引起持续性的觉醒障碍;相反,在睡眠期特异地激活 PVT 谷氨酸能神经元,可快速诱发睡眠向觉醒转换。课题组进一步发现 PVT 的谷氨酸能神经元接受来自位于外侧下丘脑(lateral hypothalamus, LH)的食欲素(hypocretin, Hcrt)神经元的支配;Hcrt 神经元的输入使得 PVT 的谷氨酸能神经元在觉醒期产生高兴奋性活动,发挥觉醒维持的作用。同时,PVT 的谷氨酸能神经元与皮层下伏隔核(nucleus accumbens, NAc)形成兴奋性的单突触功能连接;激活 PVT→NAc 通路能诱导睡眠向觉醒的转换;反之,抑制这一通路则可降低觉醒水平。该结果证实 PVT 是丘脑觉醒维持的关键脑区。

(供稿:生命科学部 张洪亮 冯雪莲)