

依泽替米贝及其靶点和胆固醇跨膜转运

夏承来综述 廖端芳* 审校

(南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 依泽替米贝是一种新型的胆固醇吸收抑制剂, 它是由先灵-葆雅公司研制开发的一种新型的降脂药物, 于2002年底经美国FDA批准上市, 商品名为Zetia, 目前所知其作用靶点是NPC1L1蛋白、膜联蛋白-2-小窝蛋白-1(annexin-2-caveolin-1)复合物和氨肽酶N(aminopeptidase N CD13, APN), 该药物的几个作用靶点与胆固醇的跨膜转运蛋白有关。

关键词: 依泽替米贝; 靶点; 胆固醇; 转运

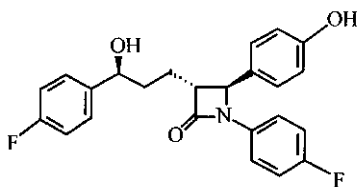
中图分类号: R972.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0971(2006)05-0361-04

近年来, 动脉粥样硬化性疾病成为威胁人类健康的头号杀手之一, 其发病机制与机体内的巨噬细胞和平滑肌细胞吞噬脂质后形成泡沫化细胞有关。因此, 抑制细胞对胆固醇的吸收为预防和治疗该病提供了一种思路。先灵-葆雅公司研制开发的新型降脂药物依泽替米贝(ezetimibe SCH58235)是一种胆固醇吸收抑制剂, 它能够选择性抑制肠道胆固醇及相关植物固醇的吸收, 国外的临床试验已经证实它有良好的降脂作用。本文将对其可能作用的靶点及其与胆固醇跨膜转运的关系进行综述。

1 概述

1.1 依泽替米贝的结构

依泽替米贝于2002年底经美国FDA批准上市, 商品名为Zetia, 它在常温下稳定, 极易溶于甲醇、乙醇、丙醇, 不溶于水, 熔点为163℃, 化学名称为1-(4-氟苯基)-3(R)-[3-(4-氟苯基)-3(S)-羟基]-4(S)-(4-羟基)-2-丙内酰胺。



依泽替米贝

1.2 依泽替米贝的药理作用

依泽替米贝是一种新型的选择性胆固醇吸收抑制剂, 它通过与小肠刷状缘膜上小囊泡上膜蛋白结合^[1], 选择性抑制肠道胆固醇及相关的植物固醇的吸收, 使到达肝脏的胆固醇减少, 降低肝脏中胆固醇的水平, 同时增加胆固醇在血液中的清除率。该药物主要作用于外源性胆固醇, 而他汀类药物主要作用是减少肝脏中胆固醇的合成, 因而两类药物具有协同作用。此外, 依泽替米贝不会显著影响体内脂溶性维生素A、D、E水平, 也不干扰肾上腺皮质激素的产生, 因此, 不会抑制肝脏中的胆固醇合成或者引起胆汁酸的分泌增加。它与胆酸螯合剂不同, 不影响胆固醇酯的吸收, 被吸收后, 在肝脏中与葡萄糖醛酸结合后经过肝肠循环, 几乎特定地定位于小肠粘膜细胞^[2]。

依泽替米贝口服吸收迅速, 大部分结合形成有药理活性的葡萄糖醛酸结合物(ezetimibe-glucuronide), 原形药物与结合物在血中的比例分别为10%~20%和80%~90%。成人空腹单次使用1.0 mg后达峰的时间(T_{max})为4~12 h, 峰浓度(c_{max})为3.4~5.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 结合物 T_{max} 为1~2 h, c_{max} 为45~71 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。食物对本品吸收无明显的影响, 但是高脂食物可引起 c_{max} 增加(约38%)。依泽替米贝及结合物与血浆蛋白结合率高达90%以上。主要经肝脏代谢, 随胆汁和尿液排出, 活性代谢物消除 $t_{1/2}$ 约为22 h, 故可1日给药1次。

小鼠实验表明, 给予0.1~0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的依泽替米贝可以抑制60%~90%的胆固醇的吸收。在肠道胆固醇的吸收模型中, 依泽替米贝抑制了放射

收稿日期: 2006-03-28

基金项目: 国家九七三基金资助项目(G2000056905)

作者简介: 夏承来, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管药理学, Tel: 0734-8281408, E-mail: xiachenglai@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 廖端芳, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管药理学, Tel: 0734-8281408, E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

性标记的胆固醇的吸收^[3]。在野生型 ApoE^{-/-} 和清道夫受体(SR-B I)^{-/-} 的小鼠体内,依泽替米贝具有显著的抑制胆固醇吸收的作用^[4,5]。

在胆固醇喂养的仓鼠、大鼠、狗及恒河猴中,依泽替米贝抑制血浆胆固醇升高的作用分别比另一种胆固醇吸收抑制剂 SCH-48461 强,对胆道插管和无损伤大鼠分别注射^[3H]标记的依泽替米贝 0.3 mg·kg⁻¹后,可见胆固醇的吸收被显著抑制,经大鼠肠道和胆道插管,给予^[3H]标记的依泽替米贝(2 mg·kg⁻¹)时,发现该药物选择性作用于肠道,与^[3H]标记的 SCH-48461 相比,该药抑制胆固醇的吸收率大于 95%,在肠腔和肠壁分别检测到该药的给药剂量也比在相应部位的 SCH-48461 高^[6]。

动物实验证实,用依泽替米贝处理 ApoE^{-/-} 小鼠,可引起小鼠体内的低密度脂蛋白(LDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)降低,高密度脂蛋白(HDL)水平有所升高,同时可抑制动脉粥样硬化的发展。尽管 ApoE^{-/-} 小鼠相对于人类更容易患高胆固醇血症,在人体中获得的结果不同于动物模型,但是依泽替米贝仍然可抑制高脂或适量低脂饮食个体的动脉粥样硬化病变^[4]。

2 依泽替米贝的作用靶点及其与胆固醇跨膜转运的关系

目前文献报道,依泽替米贝可能作用的靶点有: NPC1L1 蛋白、膜联蛋白-2-小窝蛋白-1 复合物、氨基肽酶 N(aminopeptidase N, CD13, APN)。下面分别叙述它们与胆固醇转运的关系。

2.1 NPC1L1 蛋白与胆固醇的转运

NPC1L1 蛋白是一种可能与肠道吸收胆固醇相关的、在小肠中段高度表达的蛋白,因为与 NPC1 蛋白同源而得名,而 NPC1 的缺陷可以导致严重的胆固醇蓄积症,它是 Davis 等^[7]用生物信息学的方法筛选出来的。Garcia-Calvo 等^[8]发现 NPC1L1 是依泽替米贝的一个作用靶点,他们用^[3H]标记的葡萄糖醛酸和依泽替米贝的复合物分别结合到表达了 NPC1L1 的细胞上面,发现小鼠、大鼠、恒河猴、人的 NPC1L1 的 K_d值分别是 12 000, 540, 40 和 220 nmol·L⁻¹,并且还发现,依泽替米贝不与 NPC1L1 敲除小鼠的肠上皮细胞结合。

NPC1L1 不但是胆固醇跨膜转运的关键物质,还对全身的胆固醇稳态的调控起关键作用。有研究表明,肠道 NPC1L1 对胆固醇的吸收是由雌激素受体

介导的,同时,跨膜蛋白 ABCG5 和 ABCG8 参与了其中的过程^[9]。

但是,对胆固醇饲养的野生型小鼠的研究发现,肠道 NPC1L1 的 mRNA 下调。同时,在 NPC1L1 缺失的小鼠体内,肠道 HMGCoA 合成酶的 mRNA 和胆固醇合成酶的 mRNA 表达上调,ABCA1 的 mRNA 的表达下调,但是 ABCG5 和 ABCG8 的 mRNA 并没有改变,说明 NPC1L1 对于调节肠道内胆固醇和植物甾醇类的摄取有重要的作用^[10],NPC1L1 对胆固醇跨膜转运的调节作用也许是通过 ABCA1 来实现的。

在 NPC1L1^{+/+} 的小鼠体内,依泽替米贝降低胆固醇的吸收达 68%~73%,这与不用依泽替米贝处理的 NPC1L1^{-/-} 的小鼠得到的结果大致相同,并且依泽替米贝对于 NPC1L1^{-/-} 而言,并没有进一步抑制胆固醇的吸收。这些实验都表明,在依泽替米贝抑制胆固醇的吸收过程中,NPC1L1 起了重要的作用。有研究表明,用 β-环糊精处理细胞使细胞荷脂后,NPC1L1 集中在细胞膜的表面,说明 NPC1L1 在胆固醇的跨膜转运中扮有重要的角色,但是用不同浓度的依泽替米贝处理细胞后发现,依泽替米贝与 NPC1L1 特异性结合,逆转了细胞的荷脂^[11]。

但是,用放射性标记等更直接的手段来证明两者关系的实验并不令人满意,这提示依泽替米贝抑制胆固醇的吸收作用的靶点不只是 NPC1L1 一个,也许还有其他的靶点蛋白共同参加作用。

对 NPC1L1^{-/-} 小鼠的实验发现,甘油三酯的吸收并没有改变;NPC1L1^{+/+} 小鼠体内的植物固醇的吸收减少了 37%~50%,但是人类和小鼠体内并没有将植物固醇类合成为胆固醇的能力,因此在用依泽替米贝治疗后的病人或 NPC1L1 缺失的小鼠体内,可以看到植物固醇的明显下降,这都说明了 NPC1L1 对于胆固醇和植物固醇的吸收起重要的作用,依泽替米贝是通过 NPC1L1 途径起作用的^[12]。在小鼠体内,ACAT2 被认为是在肠道胆固醇吸收的过程起重要的作用,ACAT2 有可能是 NPC1L1 下游的一个调节元件。

众所周知,ABCA1 和 SR-B I 在胆固醇的跨膜转运中起重要的作用,ABCA1 的 mRNA 在 NPC1L1^{+/+} 和 NPC1L1^{-/-} 的小鼠体内都有表达,但在这些基因未被激活的小鼠体内,它们对胆固醇的吸收并没有影响^[13],说明在这种情况下,胆固醇的跨膜转运是通过另一种信号通路来实现的。人类的 NPC1L1 的跨膜转运区域中具有一个分泌性信号区,跨膜转运

的 N 端糖基化位点定位在该蛋白的细胞小凹的结构处,此外,该蛋白还有一个固醇敏感的区域,是用来调节包括 HMGCoA 还原酶、SREBP-1 的激活蛋白 SCAP、PATCHED 和 NPC1 在内的胆固醇平衡调节部位^[14,15]。

在胆固醇食物喂养的 NPC1L1 缺失小鼠中可以发现,肠道 ABCA1 的 mRNA 的表达和 SR-B I 的 mRNA 下调,这种现象说明了 NPC1L1 对胆固醇的吸收调节作用有可能是通过 ABCA1 或者是 SR-B I 来实现的^[16]。有实验表明,用依泽替米贝处理小鼠,可以发现小鼠空肠的 ABCA1 表达下调,但是 ABCG5 和 ABCG8 的表达并没有改变,说明依泽替米贝通过 NPC1L1 抑制胆固醇的吸收,是和这些胆固醇跨膜转运蛋白有关的,具体机制并不清楚^[17]。

2.2 膜联蛋白-2-小窝蛋白-1 复合物和胆固醇跨膜转运

迄今所知,小窝蛋白-1 可形成两种类型的复合物:一类是小窝蛋白-1 和热休克蛋白 56,环亲素(cyclophilin)A 和环亲素 40 形成复合物,这类复合物将胆固醇从内质网运输到小凹结构处。另一类是小窝蛋白-1,膜联蛋白-2,环亲素 A 和环亲素 40 形成复合物,这类复合物将内源性胆固醇从小凹结构处转移到内质网。膜联蛋白是钙磷结合蛋白家族中的成员,它参与许多细胞的生理过程,包括离子通道构型的改变、膜的融合、囊泡转运、磷脂酶 A₂活性的调节等^[17]。

Smart 等^[18]用免疫共沉淀的方法证实了膜联蛋白-2-小窝蛋白-1 复合物是依泽替米贝的一个作用靶点,膜联蛋白-2-小窝蛋白-1 是通过二硫键形成 55 ku 的二聚体复合物,依泽替米贝是通过与小窝蛋白-1 结合而不是直接与膜联蛋白-2 或环亲素 A 共沉淀的。依泽替米贝可以使膜联蛋白-2-小窝蛋白-1 复合物的二硫键断裂,从而抑制了胆固醇的吸收。膜联蛋白-2-小窝蛋白-1 复合物引起胆固醇吸收的过程中,还需要热休克蛋白 56,环亲素 A 和环亲素 40 的参与,虽然目前对膜联蛋白-2 功能的研究还不十分清楚,但其在膜的融合^[19],肌动蛋白(actin)介导的巨细胞的胞饮作用和细胞内胆固醇的跨膜转运功能等方面的作用已经得到肯定^[20]。

小窝蛋白-1 能够从 HDL 中选择性吸收外源性胆固醇酯^[21],SR-B I 位于细胞表面特异性内陷结构处,在 HDL 存在的情况下,小窝对胆固醇的吸收很快达到饱和。Annette 等证实小窝蛋白-1 直接结合到胆固醇酯上,导致了胆固醇的跨膜转运,这个过程

需要 SR-B I 的参与,同时有文献报道,小窝蛋白-1 可从功能上负调控 SR-B I 的表达^[22],依泽替米贝对胆固醇吸收的抑制,是由多种蛋白共同参与的,具体机制还有待于实验的证实。

2.3 氨基酶 N 与胆固醇的跨膜转运

APN 是细胞表面表达的一种糖蛋白,曾用名氨基酶 N,亮氨酸氨基酶,抗原 CD13,广泛存在于人体的各种组织,尤其是以肝脏、肾脏、小肠含量最高。APN 酶催化多种氨基酸,尤其是中性氨基酸的水解。在 pH 值为 7.6 时具有最大的活性,在 pH 值为 6 ~ 10.5 时稳定,在 pH 值 ≤ 3.5 及 pH 值 ≥ 11 时,发生快速变性。

Kramer 等^[23]发现在空肠细胞的刷状缘有一个依泽替米贝的结合蛋白,而且还发现该蛋白具有特异结合胆固醇的功能,证实该蛋白就是 APN,并且证实 APN 是依泽替米贝作用的一个靶点。APN 具有多种功能,关于它和胆固醇的跨膜转运的功能报道很少。目前对该蛋白的研究主要集中在病毒方面,但是最近通过对 SARS 病毒的深入研究,发现 APN 与小窝蛋白-1 有一定的关联^[24],它作为依泽替米贝作用的一个靶点,对胆固醇的跨膜转运的作用是不是通过小窝蛋白-1 起作用,具体尚不清楚。

3 结语

依泽替米贝作为一种新型的降脂药物,已经越来越受到人们的关注。临床试验已经发现它具有良好的降脂效果,但具体的作用机制并不是很清楚。它的降脂作用可能是与细胞膜上一系列与胆固醇相关的跨膜转运蛋白(如小窝蛋白-1,ABCA1,SR-B I, SREBP-1)有关。随着对该药物研究的深入,越来越多药物作用的靶点将被发现,人们对动脉粥样硬化疾病的发病机制也将会变得越来越清楚,为今后更好地预防和治疗该病带来希望。

参 考 文 献

- [1] Frick W, Bauer-Schafer A, Bauer J, et al. Synthesis of a biotin-tagged photoaffinity probe of 2-azetidinone cholesterol absorption inhibitors. [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(8):1639 - 1642.
- [2] Rudel LL. Preclinical and clinical pharmacology of a new class of lipid management agent. [J]. *Am J Manag Care*, 2002, (8 2 Suppl) S33 - S35.
- [3] van Heek M, Compton DS, Davis HR. The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkey. [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 415(1):79 - 84.

- [4] Davis HR Jr , Compton DS , Hoos L , *et al.* Ezetimibe , a potent cholesterol absorption inhibitor , inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2001 , 21 (12) 2032 – 2038 .
- [5] Altmann SW , Davis HR Jr , Yao X , *et al.* The identification of intestinal scavenger receptor class B , type I (SR-B I) by expression cloning and its role in cholesterol absorption[J]. *Biochim Biophys Acta* , 2002 , 1580(1) 77 – 93 .
- [6] van Heek M , Farley C , Compton DS , *et al.* Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function[J]. *Br J Pharmacol* , 2001 , 134(2) 409 – 417 .
- [7] Davis HR Jr , Zhu LJ , Hoos LM , *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis[J]. *J Biol Chem* , 2004 , 279(32) 33586 – 33592 .
- [8] Garcia-Calvo M , Lisnock J , Bull HG , *et al.* The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2005 , 102(23) 8132 – 8137 .
- [9] Duan LP , Wang HH , Ohashi A , *et al.* Role of intestinal sterol transporters Abcg5 , Abcg8 , and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice : gender and age effects[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* , 2006 , 290(2) :G269 – G276 .
- [10] Altmann SW , Davis HR Jr , Zhu LJ , *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption[J]. *Science* , 2004 , 303(5661) :1201 – 1204 .
- [11] Yu L , Bharadwaj S , Brown JM , *et al.* Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake [J]. *J Biol Chem* , 2006 , 281(10) 6616 – 6624 .
- [12] Buhman KK , Accad M , Novak S , *et al.* Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice [J]. *Nat Med* , 2000 , 6(12) 1341 – 1347 .
- [13] Garver WS , Xie C , Repa JJ , *et al.* Niemann-Pick C1 expression is not regulated by the amount of cholesterol flowing through cells in the mouse[J]. *J Lipid Res* , 2005 , 46(8) 1745 – 1754 .
- [14] Davies JP , Levy B , Ioannou YA . Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family : identification and characterization of NPC1L1 [J]. *Genomics* , 2000 , 65(2) :137 – 145 .
- [15] Horton JD , Goldstein JL , Brown MS . SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest* , 2002 , 109(9) :1125 – 1131 .
- [16] Repa JJ , Dietschy JM , Turley SD . Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1 , ABCG5 , or ABCG8 in the enterocyte[J]. *J Lipid Res* , 2002 , 43(11) :1864 – 1874 .
- [17] Gerke V , Moss SE . Annexins : from structure to function[J]. *Physiol Rev* , 2002 , 82(2) 331 – 371 .
- [18] Smart EJ , De Rose RA , Farber SA . Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2004 , 101(10) 3450 – 3455 .
- [19] Smart EJ , Ying Y , Donzell WC , *et al.* A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane [J]. *J Biol Chem* , 1996 , 271(46) 29427 – 29435 .
- [20] Uittenbogaard A , Everson WV , Matveev SV , *et al.* Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex[J]. *J Biol Chem* , 2002 , 277 (7) 4925 – 4931 .
- [21] Feng B , Schwarz H , Jesuthasan S . Furrow-specific endocytosis during cytokinesis of zebrafish blastomeres[J]. *Exp Cell Res* , 2002 , 279 (1) :14 – 20 .
- [22] Matveev S , Uittenbogaard A , *et al.* Caveolin-1 negatively regulates SR-B I mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester[J]. *Eur J Biochem* , 2001 , 268(21) 5609 – 5616 .
- [23] Kramer W , Girbig F , Corsiero D , *et al.* Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane[J]. *J Biol Chem* , 2005 , 280 (2) :1306 – 1320 .
- [24] Nomura R , Kiyota A , Suzuki E , *et al.* Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae[J]. *J Virol* , 2004 , 78(16) 8701 – 8708 .

(上接第 360 页)

- [12] Harada H , Hirokawa Y , Suzuki K , *et al.* Discovery of a novel and potent human and rat beta3-adrenergic receptor agonist , [3-[(2R)-[[(2R)-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1H-indol-7-yloxy]acetic acid[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* , 2005 , 53(2) : 184 – 198 .
- [13] Kato H , Ohue M , Kato K , *et al.* Mechanism of amelioration of insulin resistance by beta 3-adrenoceptor agonist AJ-9677 in the KK-Ay/Ta diabetic obese mouse model[J]. *Diabetes* , 2001 , 50(1) :113 – 122 .
- [14] Francke S . TAK-677(Dainippon/Takeda) [J]. *Curr Opin Investig Drugs* , 2002 , 3(11) :1624 – 1628 .
- [15] Yanagisawa T , Sato T , Yamada H , *et al.* Selectivity and potency of agonists for the three subtypes of cloned human beta-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells[J]. *Tohoku J Exp Med* , 2000 , 192(3) :181 – 193 .
- [16] Correia ML , Haynes WG . Emerging drugs for obesity : linking novel biological mechanisms to pharmaceutical pipelines[J]. *Expert Opin Emerg Drugs* , 2005 , 10(3) :643 – 660 .
- [17] Ha JD , Kang SK , Chen HG , *et al.* Synthesis of tetrahydrocarbazole derivatives as potent β 3-adrenoceptor agonists[J]. *Bull Korean Chem Soc* , 2004 , 25(12) :1784 – 1790 .
- [18] Sakura H , Togashi M , Iwamoto Y , *et al.* Beta 3-adrenergic receptor agonists as anti-obese and anti-diabetic drugs[J]. *Nippon Rinsho* , 2002 , 60(1) :123 – 129 .