

肝脂酶及其在血浆脂蛋白代谢中的作用

方定志 刘秉文

(华西医科大学生物化学教研室, 成都 610041)

主题词 肝脂酶; 分子生物学; 脂蛋白代谢; 动脉粥样硬化

摘要 肝脂酶是一种糖蛋白, 由肝实质细胞合成, 在内质网中糖化后转移至高尔基体, 形成具有催化活性的成熟酶并转运到窦状隙内皮细胞表面发挥作用。肝素可将结合在肝窦状隙内皮细胞表面的肝脂酶释放入血, 选择性测定肝素化血浆脂肪酶活性可了解体内肝脂酶的活性。基因及蛋白质结构分析均表明肝脂酶是脂肪酶家族的成员之一, 能水解乳糜微粒、中间密度脂蛋白及高密度脂蛋白中的甘油三酯和磷脂, 在乳糜微粒残骸的清除、低密度脂蛋白的形成及胆固醇逆向转运过程中起着十分重要的作用。肝脂酶活性的改变会引起脂蛋白代谢变化、特别是血浆高密度脂蛋白胆固醇浓度的改变; 肝脂酶基因变异是血浆高密度脂蛋白胆固醇水平的重要遗传决定因素之一, 与动脉粥样硬化及冠心病关系密切。

大量的流行病学调查表明^[1], 血浆高密度脂蛋白 (high density lipoproteins, HDL) 具有十分重要的抗动脉粥样硬化作用, 血浆高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平的高低与冠心病的发生呈负相关, 冠心病患者血浆 HDL-C 含量明显低于正常人。实验研究也发现^[2], HDL 能通过 HDL 受体在体内逆向转运胆固醇。在肝外组织, HDL 与 HDL 受体结合, 从细胞中获取多余的胆固醇并将这些胆固醇运往肝脏; 在肝脏, HDL 与肝细胞膜上的 HDL 受体结合后, 肝细胞能将其中的胆固醇摄取并转化成胆汁酸排出体外。人血浆 HDL-C 水平除了受饮食、肥胖和运动等因素影响外, 性别及遗传因素对血浆 HDL-C 水平有十分重要的作用, 遗传因素对血浆 HDL-C 水平的影响占上述因素影响的 40%~80%。在遗传因素中, Cohen 等^[3]发现, 肝脂酶 (hepatic lipase, HL; EC 3. 1. 1. 3) 基因变异占 25%, 表明肝脂酶基因变异是血浆高密度脂蛋白胆固醇水平的重要遗传决定因素之一。研究肝脂酶不仅对阐明肝脂酶的作用及其与血浆脂蛋白代谢的关系有着十分重要的作用; 而且对阐明动脉粥样硬化、冠心病、中风等的发生机制, 寻找其新的诊断、预防和治疗措施也具有十分重要的意义。本文将对肝脂酶的一般性质、分离纯化、结构、基因变异、在脂蛋白代谢及动脉粥样硬化发生中的作用作一综述。

1 肝脂酶的分离纯化及一般性质

早在 20 世纪 50 年代, Kom 在肝脏中发现了脂肪酶活性, 这种脂肪酶与另一种存在于肝外组织的脂肪酶即脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 很相似, 但也有不同于 LPL 的特性, 它水解人造脂肪乳的能力比水解乳糜微粒 (chylomicron, CM) 的能力更强。1969 年, Guder 等^[4]发现, 肝组织匀浆中至少含有三种不同的脂肪酶。一种是酸性脂肪酶, 最适 pH 为 5.0。一种为碱性脂肪酶, 最适 pH 为 8.6。还有一种脂肪酶能被肝素激活, 其最适 pH 为 7.5, 它存在于肝组织匀浆的膜成份部分, 能够被肝素从膜上解离。肝素化血浆中的脂肪酶就包括了该脂肪酶和 LPL, 肝素亲和层析能将肝素化血浆中的这两种脂肪酶分开。一种脂肪酶可被低浓度 NaCl

(0.6~0.8 mol/L) 洗脱, 酶活性不受高离子强度抑制, 也不需要血清辅助因子激活, 在肝切除后的动物肝素化血浆中, 没有这种脂肪酶, 当用肝素灌注肝脏后, 可在灌注液发现该脂肪酶, 故该脂肪酶被称作肝脂酶 (hepatic lipase, HL; EC 3. 1. 1. 3)。另一种需要高浓度的 NaCl (1.2~1.5 mol/L) 才能洗脱的脂肪酶即 LPL。尽管后来在肾上腺及卵巢中也测到了肝脂酶, 但肝脏仍然是肝素化血浆肝脂酶的主要来源。免疫电镜观察发现, 肝脂酶分布于肝窦状隙内皮细胞表面。

尽管肝素化血浆、肝脏灌注液和肝组织匀浆都可以作为肝脂酶分离纯化的材料, 但分离纯化人肝脂酶最容易获得的材料还是肝素化血浆。根据肝脂酶与其底物、肝素、磷酸钙及植物凝集素等的高亲和力, 联合采用脂肪乳吸附、肝素亲和层析、磷酸钙吸附、DEAE-Sephacel 离子交换层析、凝胶过滤及 ConA 亲和层析等方法, 获得肝脂酶纯品。

经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得从肝素化人血浆纯化的肝脂酶单体分子质量为 64 000~69 000, 从肝脏灌注液纯化的肝脂酶表观分子质量为 60 000~62 000, 从肝组织匀浆纯化的肝脂酶分子质量稍小, 为 53 000。而没有去污剂时, 用凝胶过滤法测得的肝脂酶分子质量为 75 000。肝脂酶与 Con A 的亲和力高, 与 Con A 结合后可被糖解离, 表明肝脂酶为糖蛋白。结构分析发现, 肝脂酶含 4 个可糖化成 N 糖苷键的部位。肝脂酶的底物有乳糜微粒残骸、中等密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) 和 HDL, 它能水解其中的甘油三酯 (triglyceride, TG) 和磷脂 (phospholipids, PL), 也能作用于硫酸酯基辅酶 A。除了免疫学性质与 LPL 完全不同外, 肝脂酶活性不需要载脂蛋白 (apolipoprotein) CII 激活, 不受高浓度盐及鱼精蛋白的抑制, 但可被 SDS 抑制, Ca^{2+} 可显著增加肝脂酶活性, 氯丙嗪可抑制 Ca^{2+} 对肝脂酶的激活作用。激素可调节及控制肝脂酶的释放, 雄性激素可增高肝脂酶活性, 雌激素则降低肝脂酶活性。在妊妇及哺乳期妇女, 肝素化血浆肝脂酶活性与血浆游离胆固醇浓度及类固醇激素浓度呈负相关, 小剂量孕酮对肝脂酶活性没有影响, 大剂量孕酮则呈现雄激素样作用, 刺激肝脂酶活性, 去甲肾上腺

素能抑制肝脂酶活性。

2 肝脂酶的分子生物学

人肝脂酶基因位于 15 号染色体的 15q21 区域,其 DNA 序列已基本阐明^[5],它由 9 个外显子组成,核苷酸长度约为 35 kb。内含子的位置与人 LPL 及猪胰脂酶相当,表明它们属同一个脂酶基因家族,由同一祖先基因进化而来。含丝氨酸的催化部位存在于外显子 4,与其它脂酶高度同源。转录起始位点位于转录起始密码上游的 43 个核苷酸处。在转录起始位点上游 25 个核苷酸处有一个启动子元件,为 TATA 盒样的序列 TAATA;在转录起始位点上游 63 个核苷酸处有另一个启动子元件 AGGTTAATTATTAAT,该序列存在于许多肝脏特异表达基因的启动子区域。在 5' - 非转录区,还发现了糖皮质激素反应元件同源序列、cAMP 反应元件的同源序列和多个蛋白结合位点如肝细胞富集转录因子-1 (hepatocyte-enriched transcription factor-1, HNF-1) 结合位点,提示这些序列可能在肝脂酶基因的表达过程中起转录调节作用^[6]。尽管在肾上腺中发现了因剪接方式不同而形成的较短的肝脂酶 mRNA,但全长的肝脂酶 mRNA 只存在于肝细胞。高水平的肝脂酶 mRNA 只存在于高分化的肝癌细胞和正常肝细胞,表明肝脂酶基因表达依赖于肝细胞的分化。肝脂酶在肝实质细胞中合成,经肝细胞分泌后结合于肝内皮细胞表面。研究表明,肝脂酶蛋白的糖基化及低聚糖修饰是肝细胞分泌肝脂酶的必要条件,新合成的肝脂酶需要在内质网被糖化后,才能转移到高尔基体,形成具有催化活性的肝脂酶^[7]。

人肝脂酶蛋白由 499 个氨基酸组成,其中包括一个含有 23 个氨基酸残基的信号肽。成熟肝脂酶由 476 个氨基酸组成,分子质量为 53 kDa,其氨基酸顺序与 LPL 和胰脂酶有高度同源性,同属于脂肪酶基因家族。与所有脂肪酶一样,肝脂酶中的甘氨酸和丝氨酸参与酶活性中心的组成,形成 Gly - X - Ser - X - Gly 结构,与肝脂酶催化活性有关的 Ser 位于 145 位^[8]。和 LPL 一样,肝脂酶含有 RVRTKRNK 序列,可与肝素结合。

3 肝脂酶在脂蛋白代谢中的作用

体外实验发现,肝脂酶可水解 CM、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)及 HDL 中的 TG,释放出游离脂肪酸。在体内,肝脂酶可水解 CM 残骸表面的磷脂,使 CM 残骸中的载脂蛋白 E 暴露出来,促进 CM 残骸与识别载脂蛋白 E 的脂蛋白受体结合^[8]。肝脂酶作用于 IDL,能水解其内核中残余的 TG,将 IDL 转变成 LDL。肝脂酶活性改变还能引起 LDL 密度改变,从而改变血浆小颗粒致密 LDL 浓度。肝脂酶还可选择性地作用于 HDL2,水解其中的 TG 和磷脂^[9]。HDL2 的磷脂被水解后,表面的胆固醇与磷脂的比例增高,促进胆固醇及其酯向肝细胞流动^[10],这有利于肝脏摄取 HDL2 中胆固醇及其酯,用于胆汁酸的合成。与此同时,HDL2 转变成 HDL3 进入血液循环,又可从肝外组织及 VLDL 获取胆固醇及其酯。可见,肝脂酶在胆固醇逆向转运过程中起着十分重要的作用。

用。此作用也在人体实验中得到证实。由于遗传因素或药物等引起的肝脂酶活性改变对血浆 HDL 亚类的分布具有特异的影响,肝脂酶活性升高会显著地减少大颗粒的 HDL2b 和 HDL2a^[11]。

肝脂酶除了作为酶发挥上述催化功能外,还可作为脂蛋白与肝细胞结合的配体蛋白参与肝脏对脂蛋白的结合和摄取。Donner 等^[12]发现,表达肝脂酶的细胞对脂蛋白的结合和摄取显著增加;肝脂酶不仅能够介导 LRP 与脂蛋白的结合从而促进细胞对脂蛋白的摄取^[13],也能介导 LDL 受体与脂蛋白结合、通过 LDL 受体促进细胞对脂蛋白的摄取和降解^[14];肝脂酶甚至可能介导脂蛋白与清道夫受体(SR-BI)的结合,使细胞选择性地摄取胆固醇酯^[15]。肝脂酶介导上述脂蛋白受体与相应脂蛋白的结合很可能是通过细胞表面的硫酸肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)完成的^[16],因为缺乏这种蛋白聚糖的 CHO 细胞不能降解肝脂酶,肝脂酶处理能抑制肝脂酶介导的乳糜微粒残粒摄取。肝细胞选择性地摄取 HDL 中的胆固醇酯是胆固醇逆向运转的重要环节,尽管尚不知道体内肝脂酶在这一环节上起多大作用,但体外实验发现,肝脂酶能增加培养肝细胞对 HDL 胆固醇酯的选择性摄取,经肝脂酶处理后,该作用降低 80%^[16],抑制 LRP 对该作用无影响。虽然载脂蛋白 E 也能增加 HDL 与肝细胞的结合,但对肝细胞选择性摄取 HDL 胆固醇酯无影响,表明通过肝脂酶与 HSPG 相互作用介导的肝细胞对 HDL 胆固醇酯的选择性摄取在胆固醇逆向转运中可能起着关键的作用。

4 肝脂酶与动脉粥样硬化

由于在 CM 残骸的清除、IDL 的转变及胆固醇逆向转运中起着十分重要的作用,肝脂酶的异常可能与高脂血症及动脉粥样硬化发生的关系密切,究竟肝脂酶在动脉粥样硬化中起什么作用、怎样起作用,目前还无确切的答案,尚需进一步研究。肝脂酶缺乏病人血浆富含胆固醇和甘油三酯的残粒样脂蛋白含量增加,引起早发性动脉粥样硬化^[17]。近年来发现了多种肝脂酶基因变异能降低血浆肝脂酶活性,能增加男性血浆 HDLC 浓度,降低动脉粥样硬化的易感性^[18]。我们也发现^[19],男性中国人肝脂酶基因的 A - C (Leu334Phe) 变异与血浆 HDLC 及载脂蛋白 AII 相关,能增加其血浆 HDLC。动物实验结果也不完全一致,肝脂酶转基因家兔血浆总胆固醇降低 42%,甘油三酯降低 58%,HDLC 也从 250 ± 100 mg/L 降低至 40 ± 20 mg/L,非 HDL 胆固醇无变化;用高胆固醇饲料喂养后,血浆总胆固醇浓度的升高仅为对照组的三分之一^[20]。将血浆总胆固醇维持在相同的水平,肝脂酶转基因家兔动脉粥样硬化斑块的形成与对照组没有差异。Dicke 等^[21]发现,肝脂酶在转基因小鼠的超表达不仅能降低血浆 HDL,也能降低血浆含载脂蛋白 B 脂蛋白的浓度。前面我们讨论了肝脂酶具有两方面的作用,一是作为酶发挥催化作用,还有就是作为脂蛋白与肝细胞结合的配体蛋白参与肝脏对脂蛋白的结合和摄取。肝脂酶在血浆脂蛋白代谢及动脉粥样硬化发生中的作用应是这两方面作用的综合体现,这也很可能是上

述研究结果不完全一致的主要原因。

5 研究展望

除参与血浆 TG 代谢外, 肝脂酶也是血浆磷脂代谢的主要参与者之一。磷脂是血浆脂蛋白的重要成份, 尤其是 HDL, 约 50% 的脂质是磷脂。HDL 的磷脂含量与 HDL 刺激外周细胞胆固醇流出能力有关, 虽然有研究发现, HDL- 磷脂的这些作用与磷脂分子中的脂肪酸种类有关, 但最近 Gilotte 等^[22] 发现, HDL- 磷脂的脂肪酸种类对 HDL 刺激细胞胆固醇流出没有影响。在整体研究中, Kunz 等^[23] 发现, 冠心病入血浆 HDL- 磷脂的降低比 HDLC 的降低更显著, 与冠心病的关系也更密切。上述结果表明, 血浆磷脂、特别是 HDL- 磷脂水平的改变会影响血浆脂蛋白代谢, 与高脂血症、冠心病的发生有关。HDL 代谢的主要参与者之一是肝脂酶, 它在血浆磷脂酰胆碱的清除代谢中起着重要作用^[24], HDL- 磷脂含量与肝脂酶活性有关。近年来发现, 肝脂酶基因的多种变异会改变肝脂酶活性, 影响血浆脂蛋白、尤其是 HDL 的代谢^[18]。我们设想: 血浆甘油三酯、胆固醇代谢受血浆磷脂的影响; 血浆磷脂代谢异常与高脂血症、冠心病的发生有关, 其遗传决定因素之一是肝脂酶基因变异。本实验室正在研究正常人及高脂血症患者血浆磷脂、磷脂脂蛋白分部含量的改变及肝脂酶基因变异, 进而探讨血脂、血浆磷脂脂蛋白分部含量和肝脂酶基因变异三者之间的相互关系及其在高脂血症和冠心病发生中的作用。

参考文献

- Gordon DJ, Probstfield JL, Carrison RJ, et al. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*, 1989, **79**: 8- 15
- Fielding JF, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 211- 228
- Cohen JC, Wang Z, Grundy SM, et al. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CIII/AIV loci is a major cause of genetically determined variation in plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Invest*. 1994, **94**: 2 377- 384
- Guder W, Weiss L, Wieland O. Triglyceride breakdown in rat liver. The demonstration of three different lipases. *Biochim Biophys Acta*, 1969, **187**: 173- 185
- Ameis D, Stahnke G, Kobayashi J, et al. Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 6 552- 555
- Chang SF, Scharf JG, Will H. Structural and functional analysis of the promoter of the hepatic lipase gene. *Eur J Biochem*, 1997, **247**: 148 - 159
- Verhoeven AJ, Neve PB, Jansen H. Secretion and apparent activation of human hepatic lipase requires proper oligosaccharide processing in the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 1999, **337** (Pt 1) : 133- 140
- Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 9 647- 651
- Dugi KA, Vaisman BL, Sakai N, et al. Adenovirus- mediated expression of HL in LCAT transgenic mice. *J Lipid Res*, 1997, **38**: 1 822- 832
- Marques- Vidal P, Azama C, Collet X, et al. Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *J Lipid Res*, 1994, **35**: 373- 384
- Grundy SM, Vega GL, Otvos JD, et al. Hepatic lipase activity influences high density lipoprotein subclass distribution in normotriglyceridemic men. Genetic and pharmacological evidence. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 229- 234
- Donner C, Choi S, Komaromy M, et al. Accelerated lipoprotein uptake by transplantable hepatomas that express hepatic lipase. *J Lipid Res*, 1998, **39**: 1 805- 815
- Krapp A, Ahle S, Kersting S, et al. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta- VLDL into cells via the LDL receptor- related protein. *J Lipid Res*, 1996, **37**: 926- 936
- Mehd JD, Bowen SL, Fry GL, et al. Hepatic triglyceride lipase promotes low density lipoprotein receptor- mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 1 263- 275
- Amar MJ, Dugi KA, Haudenschild CC, et al. Hepatic lipase facilitates the selective uptake of cholesteryl esters from remnant lipoproteins in apo E- deficient mice. *J Lipid Res*, 1998, **39**: 2 436- 442
- Ji ZS, Dichek HL, Miranda RD, et al. Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E- mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density lipoproteins. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 31 285- 292
- Connelly PW, Maguire GF, Lee M, et al. Plasma lipoproteins in familial hepatic lipase deficiency. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**: 40- 48
- Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol*, 1999, **10**: 259- 267
- Fang DZ, Liu BW. A- C (Leu334Phe) polymorphism of hepatic lipase gene is associated with plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AII in Chinese men. *Atherosclerosis*, 2000, in press.
- Brousseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 365- 375
- Dichek HL, Brecht W, Fan J. Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B- containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 1 896- 903
- Gillote KL, Lund- Katz S, de la Llera- Moya M, et al. Dietary modification of high density lipoprotein phospholipid and influence on cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 1998, **39**: 2 065- 075
- Kunz F, Pechlaner C, Erhart R, et al. HDL and plasma phospholipids in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 1 146 - 150
- Shamburek RD, Zech LA, Cooper PS, et al. Disappearance of two major phosphatidylcholines from plasma is predominantly via LCAT and hepatic lipase. *Am J Physiol*, 1996, **271**(6 Pt 1): E1073- 082

(此文 1999- 07- 12 收到, 1999- 11- 15 修回)

(此文编辑 胡必利)