

# 内脂酶在动脉粥样硬化形成中的作用

马天容 综述, 霍勇 审校

(北京大学第一医院心内科, 北京市 100034)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内脂酶; 动脉粥样硬化; 高密度脂蛋白; 炎症

[摘要] 内脂酶是新近发现的甘油三酯脂肪酶基因家族的新成员,由血管内皮细胞合成、分泌,并在内皮细胞表面发挥作用。内脂酶是一种磷脂酶,参与高密度脂蛋白代谢。本文就内脂酶的来源、活性及其与高密度脂蛋白、炎症和其他动脉粥样硬化形成因素之间的相互作用进行综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

内脂酶(endothelial lipase, EL)是近年来发现的甘油三酯脂肪酶基因家族的新成员。内脂酶不仅参与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的代谢,还可能通过其他非脂解作用参与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成,是一种值得关注的新型脂肪酶。

## 1 内脂酶的发现、来源及活性

1999年,有人运用抑相差减杂交技术研究静止期单层内皮细胞与血管形成期内皮细胞基因表达的差别时,意外地发现了一种新的脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)样的基因<sup>[1]</sup>。在血管形成过程中,这种基因的表达上调。同年,在探讨THP-1细胞在氧化型低密度脂蛋白作用下基因表达的改变时,也发现了这一基因<sup>[2]</sup>。这种基因编码的核苷酸序列与LPL、肝脂酶(hepatic lipase, HL)和胰脂肪酶分别有44%、41%和31%的同源性,因此被确定为甘油三酯脂肪酶基因家族的新成员,命名为内脂酶,相应的基因命名为LIPG。

为了明确合成内脂酶的细胞,应用Northern blot和Western blot两种方法证实人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)和人冠状动脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cell, hCAEC)都有内脂酶mRNA及蛋白的表达<sup>[2]</sup>。体内研究发现,内脂酶mRNA在鼠的肝脏有高水平表达,对肝脏切片进一步进行免疫组织化学和原位杂交显示,内脂酶蛋白在肝脏的内皮细胞,而不是肝细胞内表达。因此,内脂酶被确定是内皮细胞的产物。研究发现,在肺、肝脏、甲状腺、肾脏和胎盘中也有较高水平的内脂酶mRNA表达,而在心脏和骨骼肌中却没有。相比而言,LPL由肌肉、脂肪、心脏、乳腺、脑和巨噬细胞表达,肝脂酶由肝细胞合成并在原位滞留,粘附于肝细胞和内皮细胞,或者被转运到肾上腺和卵巢的内皮细胞。可见,LPL和肝脂酶都

是在一个部位合成然后转运到另一个部位发挥作用,内脂酶则在其合成部位发挥作用。

内脂酶作为一种全新的脂肪酶,其活性的确定尤为重要,人和小鼠的内脂酶蛋白均含有信号肽,因此,内脂酶和LPL、肝脂酶一样能被分泌到细胞外发挥作用。起初,研究认为内脂酶没有甘油三酯酶活性<sup>[2,3]</sup>。但是,以McCoy等<sup>[4]</sup>为代表的后续研究证实,内脂酶具有甘油三酯酶活性,这种活性不需要载脂蛋白C<sub>2</sub>的激活,不被高浓度NaCl(1M)抑制,却被血清抑制,而且呈剂量依赖性。作为同一家族的成员,内脂酶、肝脂酶、LPL的甘油三酯酶活性和磷脂酶活性的比分别是0.65、24.1和139.9。因此,内脂酶主要是一种磷脂酶,同时还有较少的甘油三酯酶活性。

Badellino等<sup>[5]</sup>用夹心酶联免疫吸附法检测了一组具有早发冠心病家族史的正常人血浆内脂酶浓度。结果发现,肝素化前后血浆内脂酶浓度分别为442(324~617)μg/L和1313(888~1927)μg/L,说明与肝脂酶和LPL一样,肝素能够促进粘附在内皮细胞表面的内脂酶释放入血液。有关内脂酶血浆浓度的报道非常少,其正常范围尚需进一步的研究确定。

## 2 内脂酶与高密度脂蛋白代谢

大量的流行病学资料表明,血浆高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)浓度与患冠心病的风险呈负相关,低HDLC是冠心病发病的独立危险因素,人体内的HDL具有抗As作用。

血浆HDL水平决定于它的代谢率,然而对HDL颗粒的代谢并不十分清楚<sup>[6]</sup>。现在,越来越多的研究证实,内脂酶参与HDL的代谢。为了研究体内内脂酶的作用,构建含人内脂酶cDNA的腺病毒载体AdhEL,将AdhEL注入小鼠体内,引起HDLC水平明显而较持久地降低<sup>[2]</sup>。Jim等<sup>[7]</sup>将内脂酶抗体注入野生型小鼠体内,与对照组相比,小鼠HDLC和磷脂水平明显升高。为了证实内脂酶对人HDL的作用,用人载脂蛋白A<sub>IV</sub>基因转染小鼠(载脂蛋白A<sub>IV</sub>转基因小鼠),这种转基因小鼠模型体内的HDL与人类的更为相似,从尾静脉注入内脂酶多克隆抗体后,HDLC和磷脂水

[收稿日期] 2006-09-19 [修回日期] 2006-12-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30500529)

[作者简介] 马天容, 博士后, 主治医师, 主要从事脂蛋白代谢与动脉粥样硬化形成关系的基础与临床研究, E-mail 为 matianrong@tom.com. 通讯作者霍勇, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病介入治疗、介入治疗后再狭窄的形成机制、血管再生及血管内放射治疗的实验研究。

平也明显升高。已知肝脂酶参与 HDL 的代谢,内脂酶与肝脂酶的核苷酸序列有 41% 的同源性,因此,注入内脂酶抗体,可能会交叉抑制肝脂酶,从而导致 HDLC 水平升高。为了排除这种可能性,Jim 等<sup>[7]</sup>进一步采用肝脂酶基因敲除(肝脂酶<sup>-/-</sup>)小鼠模型,注射内脂酶多克隆抗体后,同样引起 HDLC 和磷脂水平明显升高,从而证实抑制内脂酶确实导致 HDLC 和磷脂浓度增加。此外,与野生型、载脂蛋白 A iv 转基因小鼠模型相比,肝脂酶<sup>-/-</sup>小鼠注入内脂酶抗体后,还出现了 HDL 颗粒内磷脂含量增加、HDL 颗粒变大的现象,说明内脂酶与肝脂酶在调节 HDL 组成和颗粒大小方面的作用不同。研究表明,内脂酶基因敲除小鼠血浆 HDLC 浓度明显增加,此外,他们还报道了两个现象: ①内脂酶基因敲除小鼠出现了与性别相关的甘油三酯(雌性)和 LDLC(雄性)升高,这种变化与内脂酶基因的表达量没有明显的关系; ②内脂酶基因敲除小鼠肝脏和骨骼肌中其它脂蛋白调节酶的表达发生了改变,与野生型小鼠比较,肝脏磷脂转运蛋白(phospholipid transfer protein, PLTP)的表达减少了 76%,而肝脂酶和卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin-cholesterol acyl transferase, LCAT)的表达分别增加了 62% 和 261%,骨骼肌 LPL 的表达增加了近 400%<sup>[8]</sup>。上述实验说明: 内脂酶参与 HDLC 的代谢,它能水解 HDL 内的磷脂,使 HDL 颗粒体积变小而易于分解,内脂酶基因的表达量与 HDLC、磷脂和总胆固醇水平呈负相关; ③甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平与内脂酶无明显关系,而与性别有关; ④内脂酶与 PLTP、肝脂酶、LCAT、LPL 可能在功能上有重叠,并可能存在参与脂蛋白代谢的共同途径。

研究报道,在内脂酶基因敲除小鼠中,HDL 中磷脂的周转减少 20%,血浆 HDLC 和磷脂水平却升高了 47%<sup>[9]</sup>。因此推测,敲除内脂酶基因后,HDLC 和磷脂水平升高的机制并非完全由于 HDL 中磷脂的周转减慢,还可能同时促进了胆固醇和磷脂从其它脂蛋白或组织转运到 HDL 前体,从而增加了 HDL 的合成<sup>[10]</sup>。

高密度脂蛋白(HDL)水平有 50% 以上是由基因决定的,但是决定 HDL 水平的相关基因并不清楚。目前,有多项研究证实,内脂酶基因的多态性与人 HDLC 或 HDL3C 水平有关<sup>[11-13]</sup>。已发现的与内脂酶活性和水平有关的单核苷酸多态性包括启动子区的 -410C/G、-303A/C、-384A/C,编码区的 G26S、T111I、T298S 和 N396S,还有 5' 非翻译区的 2237G/A。其中,T111I 多态性虽然与 HDLC 水平无关,但是与 HDL 亚类的分布有关,I111 纯合子女性比 T111 纯合子女性 HDL3C 水平高 10%。

总之,无论在基因水平还是在蛋白水平,内脂酶在调节 HDL 代谢和决定 HDL 水平中均起着重要的作用。内脂酶可能通过调节血浆 HDLC 浓度及结构参与 As 的形成过程。对内脂酶的研究,能够帮助寻找升高 HDL 的新策略。

### 3 内脂酶与炎症反应

炎症反应是 As 形成的重要机制之一<sup>[14]</sup>。炎症反应中的重要环节包括炎症因子、单核细胞、血小板和血管内皮。

肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 是重要的早期炎症因子。Hirata 等<sup>[15]</sup>研究发现,huVEC 和 hCAEC 分别在 TNF- $\alpha$  或者 IL-1 $\beta$  刺激下,内脂酶 mRNA 水平明显升高。Jim 等<sup>[16]</sup>同样用 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  刺激内皮细胞,证实内皮细胞内脂酶的表达受炎症因子的调节,并进一步揭示 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  通过核因子  $\kappa$ B 依赖方式使内脂酶 mRNA 和蛋白表达增加。

在血管局部的炎症过程中,单核细胞聚集和粘附是粥样斑块形成的重要因素。有研究探讨了内脂酶对单核细胞粘附作用的影响。通过注射脂多糖塑造小鼠的炎症模型,其内皮细胞内脂酶 mRNA 和蛋白的表达明显增加<sup>[17]</sup>。体外粘附实验显示,过表达内脂酶的 COS-7 细胞和 Pro5 细胞能促进单核细胞连接到内脂酶表达细胞表面,这种内脂酶介导的单核细胞粘附数量的增加可以被肝素或肝素酶所抑制。体内粘附实验显示,与野生型小鼠比较,内脂酶转基因小鼠主动脉内膜损伤处单核细胞粘附数量增加,而内脂酶基因敲除小鼠的单核细胞粘附数量减少。这些结果显示,内脂酶通过内皮细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖促进单核细胞对内皮细胞的粘附。因此,炎症反应导致内脂酶表达和合成增加<sup>[18]</sup>,而内脂酶又通过增加单核细胞的粘附进一步促进 As 的形成和发展。

目前的研究显示,血小板是连接炎症、血栓和 As 形成的重要枢纽。炎症反应的特点是血小板、白细胞和内皮细胞三者间的相互作用。最初认为,内皮受损剥脱,内皮下基质暴露,是血小板聚集、粘附的必要条件。目前研究显示,完整但被激活的内皮同样能吸引血小板的粘附。在粘附过程中,血小板被激活,并释放大量的炎性及促分裂物质到局部内环境,如一些生长因子(血小板源性生长因子、内皮生长因子等)、细胞因子样物质(IL-1 $\beta$ 、CD40L 等)、凝血因子(因子 VII、因子 VIII 纤溶酶原、蛋白 S 等)<sup>[19]</sup>,引起血管壁局部发生急慢性炎症,促进 As 的形成。已知在 IL-1 $\beta$  作用下,内皮细胞内脂酶 mRNA 的表达明显增加,而血小板源性生长因子和内皮生长因子能促进内皮细胞增殖,并增加内脂酶 mRNA 的表达。内脂酶由内皮细胞合成并分泌到内皮细胞表面,或者参与脂蛋白的代谢,或者吸引单核细胞向内皮细胞聚集、粘附。研究发现,静脉注射肝素后,内皮细胞表面的 LPL、肝脂酶释放到血液,这些酶在血浆中水解脂蛋白,生成脂蛋白降解产物,尤其是非酯化的脂肪酸,引起血小板功能发生异常<sup>[20]</sup>。内脂酶与肝脂酶、LPL 同属于脂肪酶基因家族,在血管内皮表面介导 HDL 的代谢,亦能被肝素释放到血浆中,水解 HDL 的磷脂,释放出游离的脂肪酸。因此推测,可能存在这样一条通路,即血小板激活,释放 IL-1 $\beta$ 、内皮生长因子等炎症因子,促进内皮细胞增殖,内皮细胞内脂酶 mRNA 表达和蛋白合成增加,在内皮表面发挥脂肪酶作用,HDLC 降解产物增加,进而作用于血小板,共同参与 As 的形成。对内脂酶与血小板之间关系的研究,有助于了解阿司匹林抵抗和支架内再狭窄形成的新机制,进而为阿司匹林抵抗和再狭窄的防治带来新的解决思路。

#### 4 内脂酶参与动脉粥样硬化形成的其他证据

Azumi 等<sup>[21]</sup>通过免疫组织化学定位证实了内脂酶在 As 斑块的内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞和新生血管均有表达。表明内脂酶确实参与 As 的形成。As 的形成机制非常复杂,有众多的因素参与其中。研究表明,作用于血管壁的物理压力与 As 的病理过程有关。粥样斑块最易出现在血管分支部位,部分原因是由于局部血管壁的剪切力和张力的改变导致内皮功能异常。通过 Northern blot 分析,12 dvn/cm<sup>2</sup> 的剪切应力作用下,hUVEC 和 hCAEC 内脂酶 mRNA 的表达分别增加了 3.2 倍和 2 倍,而升高的循环张力使这两种细胞内脂酶 mRNA 水平增加了 2.7 倍<sup>[15]</sup>。说明作用于血管壁的循环压力增加,可能通过内皮细胞内脂酶表达与合成增加而促进 As 的形成。

代谢综合征和早发冠心病家族史是 As 的危险因素。晚近, Badellino 等<sup>[5]</sup>观察了 858 名有早发冠心病家族史的健康人,发现内脂酶浓度与 NCEP ATPIII 定义的所有代谢综合征的指标包括腰围、血压、甘油三酯、HDLc、空腹血糖有明显的相关关系。在校正了年龄、性别、腰围、激素替代治疗(妇女)、血管活性药物和其它明确的心血管危险因素后,内脂酶浓度与冠状动脉钙化明显相关。因此,内脂酶浓度与代谢综合征以及亚临床 As 形成之间有着密切的关系。内脂酶可能是人类的一种致 As 因子,尤其在超重和患代谢综合征的人群。

脂蛋白、炎症及内皮是 As 形成的关键因素。内脂酶与这三个因素之间有着密切的联系。内脂酶由血管内皮细胞合成、分泌,并在血管内皮表面发挥作用。因此,内脂酶可能是血管局部参与 As 形成的诸多因素的枢纽及媒介。如果能够证实这种作用,抑制内脂酶就能抑制炎症反应的诸多环节,达到特异性升高 HDL 浓度及抗炎作用,从而为 As 的防治提供新的重要的靶点。

#### [参考文献]

- [1] Choi SY, Kerr-ichi Hirata, Tatsuro Ishida, Thomas Quertermous, Cooper AD. Endothelial lipase: a new lipase on the block [J]. *J Lipid Res*, 2002, **43**: 1763-1769
- [2] Michael Jaye, Lynch KJ, John Krawiec, Dawn Marchadier, Cyrille Maugeais, Kim Doan, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism [J]. *Nat Genet*, 1999, **21**: 424-428
- [3] Kerr-ichi Hirata, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Leah Quintana, et al. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 14 170-175
- [4] McCoy MG, Gwo-Shing Sun, Dawn Marchadier, Cyrille Maugeais, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase [J]. *J Lipid Res*, 2002, **43**: 921-929
- [5] Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis [J]. *PLOS Medicine*, 2006, **3** (2): e22
- [6] 赵水平. 高密度脂蛋白的研究现状 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 673-675
- [7] Jin WJ, Millar JS, Uli Broedl, Glick JM, Rader DJ. Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2003, **111**: 357-362
- [8] Tatsuro Ishida, Sungshin Choi, Kundu RK, Kerr-ichi Hirata, Rubin EM, Cooper AD, et al. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level [J]. *J Clin Invest*, 2003, **111**: 347-355
- [9] Ke MA, Mehmet Gilingiroglu, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Lawrence Chan. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 2 748-753
- [10] Cyrille Maugeais, Tietge UJF, Broedl UC, Dawn Marchadier, William Cain, McCoy MG, et al. Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 2 121-126
- [11] deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Rasheeta Sivapackianathan, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol [J]. *Circulation*, 2002, **106**: 1 321-326
- [12] Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Endo K, Hamaguchi H. Relationship between serum HDLc levels and common genetic variants of the endothelial lipase gene in Japanese school-aged children [J]. *Hum Genet*, 2003, **113**: 311-315
- [13] Marie-Eve Paradis, Patrick Couture, Yohan Boss\*, Jear-Pierre Despres, Louis P\*russe, Claude Bouchard, et al. The T1111 mutation in the EL gene modulates the impact of dietary fat on the HDL profile in women [J]. *J Lipid Res*, 2003, **44**: 1 902-908
- [14] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 249-253
- [15] Hirata K, Ishida T, Matsushita H, Quertermous T. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **272**: 90-93
- [16] Jin WJ, Gwo-Shing Sun, Dawn Marchadier, Edelyn Octaviani, Glick JM, Rader DJ. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase [J]. *Circ Res*, 2003, **92**: 644-650
- [17] Yoko Kojima, Kerr-ichi Hirata, Tatsuro Ishida, Yasushi Shimokawa, Nobutaka Inoue, Seinosuke Kawashima, et al. Endothelial lipase modulates monocyte adhesion to the vessel wall [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (52): 54 032-038
- [18] Hasham SN, Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, **372**: 179-183
- [19] Meinrad Gawaz, Harald Langer, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2005, **115** (12): 3 378-384
- [20] Muriithi EW, Belcher PR, Day SP, Chaudhry MA, Caslake MTJ, Wheatley DJ. Lipolysis generates platelet dysfunction after in vivo heparin administration [J]. *Clinic Sci*, 2002, **103**: 433-440
- [21] Azumi H, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Rikitake Y, Takeuchi S, et al. Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **58**: 647-654

(此文编辑 文玉珊)