

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

變異的脂蛋白解脂酵素在血胞內位置的研究

Study of Intracellular Destination of Mutated Lipoprotein Lipase

計畫編號：NSC 88-2314-B-002-243

執行期間：87年8月1日至88年7月31日

主持人：高照村 台大醫學院醫事技術學系

一. 中文摘要

脂蛋白解脂酶是一種醣蛋白，由許多種組織的實質細胞分泌後送到血管，再經由脂蛋白元 CII 的活化，能將血液中的極低密度脂蛋白與乳糜微粒中的三酸甘油酯分解。如缺乏此種酶，則上述的脂蛋白便無法被分解而積聚集在體內，因而使血中的三酸甘油酯濃度上升，臨床上則會出現第一型高脂血症。在前次的研究中發現有國人因脂蛋白解脂酶分子缺陷其第 252 位置胺基酸為纈胺酸的突變型，而引起脂蛋白解脂酶缺乏之疾病。為了想了解此變異脂蛋白解脂酶在細胞分泌過程之機制，以作為治療此種疾病之依據。本研究利用免疫螢光及免疫電子顯微鏡技術來探討脂蛋白解脂酶在細胞內加工之過程。以光學及共軛聚焦顯微鏡觀察，發現在突變型中 DAB 色素原分佈及螢光反應均較弱。而在電子顯微鏡下，雖然突變型蛋白質也像野生型一樣可以在高基氏體及溶酶體中觀察到，但突變型其 DAB 色素原則在細胞小泡囊中堆積較多。此結果顯示變異型之脂蛋白解脂酶在細胞內不會有效地被分泌出去，而分配到小泡囊中，但合成減少也可能是另一原因。

關鍵詞：脂蛋白解脂酶、變異、分泌、細胞內加工

Abstract

Lipoprotein lipase (LPL) is a glycoprotein. After secretion by parenchymal cells, LPL becomes bound on the luminal surface of capillary endothelial cells. In the presence of its cofactor, apolipoprotein CII (apo CII), LPL hydrolyzes triglycerides of circulating chylomicrons and very low-density lipoproteins to monoglycerides and free fatty acids. In the deficiency of LPL or apo CII, type I hyperlipoproteinemia will occur. Deficiency of LPL usually results from gene mutation. In our previous study, two unrelated Chinese females with a L252V that leads to deficiency of LPL activity have been identified. In order to gain insight into the mechanism of LPL secretion of this mutant, an immunofluorescence and immunoelectron microscopy were performed in this study. Mutant contained less diaminobenzidine (DAB) reaction products and weak fluorescence intensity under the fluorescence microscope and confocal microscope. The result was confirmed by immunoelectron microscopy. Although the LPL protein was observed in the Golgi apparatus and lysosomes both in the wild and mutant type, more DAB reaction products were found in the small vesicles of the cell in the mutant type. The results showed that the LPL from L252V was not efficiently secreted

into the extracellular medium and missorted to the small vesicles. The decreased synthesis was another reason but needed further investigation.

Keywords: Lipoprotein Lipase, Mutation, Secretion, Intracellular Processing

二、緣由與目的

脂蛋白解脂酶是一種醣蛋白，由許多種組織的實質細胞分泌後送到血管[1-2]，在此脂蛋白解脂酶會固定在血管內膜上，再經由脂蛋白元 CII 的活化[3]，脂蛋白解脂酶便能將血液中的極低密度脂蛋白與乳糜微粒中的三酸甘油酯分解成甘油、二酸甘油酯及游離脂肪酸，後者可被當作能量的來源或在週邊組織細胞中再酯化而被儲存。在分解過程當中脂蛋白元 CI、CII、CIII、E 及磷脂和膽固醇會由極低密度脂蛋白與乳糜微粒中輸送至高密度脂蛋白，因此脂蛋白解脂酶對極低密度脂蛋白與乳糜微粒和高密度脂蛋白的新陳代謝非常重要。當脂蛋白解脂酶活性高則極低密度脂蛋白與乳糜微粒的濃度便低而高密度脂蛋白濃度則高，反之亦然[4]。如果缺乏此種酶或脂蛋白元 CII 缺乏則上述的脂蛋白便無法被分解而積聚在體內，因而會使血中的三酸甘油酯濃度上升。臨床上則出現第一型高脂血症[5]，常會發生胰臟炎。如果只是一條脂蛋白解脂酶基因異常之病人則非但脂蛋白解脂酶活性及濃度減少，其高密度脂蛋白濃度也會降低[6]，而高密度脂蛋白濃度低常被認為是冠狀動脈疾病的一重要危險因子，因此脂蛋白解脂酶之缺陷可能會增加發生動脈粥狀硬化疾病的機會[7]。脂蛋白解脂酶的基因位在第八對染色體上[8]，含有十個表現序列，總共約有三萬五千鹼基對[9-11]。此基因可編成 475 個胺基酸的蛋白質其中含有二十七個信號胺基酸。脂蛋白解脂酶在構造上可以分成兩大部份，較

大的胺基端區域由第 1 至第 312 個胺基酸構成，而較小的部份則由第 313 至第 448 個胺基酸所形成。前面的胺基端具有催化作用之功能。其中第 132 位置的絲胺酸，第 156 位置的天門冬酸及第 241 位置的組織胺酸[12-13]，是所謂的催化組，此催化組與脂蛋白解脂酶和其輔助因子結合的位置皆在此胺基端的區域[14]。雖然其結合的真正位置尚未完全決定出來，但根據 Bruin 等人的研究指出第 147 及 148 位置上的離胺酸可能就是[15]。在我們前次的研究中發現有兩例無親屬關係的國人因脂蛋白解脂酶分子缺陷而引起脂蛋白解脂酶缺乏之疾病，在第 1009 核甘酸位置上的胞嘧啶變成鳥嘌呤，以至於第 252 上的白胺酸被纈胺酸所取代[16]。為了想了解此變異脂蛋白解脂酶在細胞分泌過程中之機制，以作為治療此種疾病之依據，本研究利用免疫螢光及免疫電子顯微鏡技術來探討脂蛋白解脂酶在細胞內加工之過程，以了解其引起脂蛋白解脂酶缺乏之原因。進而提供研究可行之藥品，以促使該變異的脂蛋白解脂酶分泌至細胞外，而執行其分解三酸甘油酯的功能，以治療高三酸甘油酯血症，來避免胰臟炎或粥狀動脈硬化之發生。

三、結果與討論

利用電子穿透法分別將帶有野生型及 L252V 基因之質體轉感至 HEK293 細胞，培養 48 小時後，再用免疫螢光染色，在光學顯微鏡下觀察。表現野生型基因之細胞在細胞質及核之周圍顯示有較濃染之反應物，而表現變異型基因之細胞其顏色則較淡(Fig.1)。在共軛聚焦顯微鏡下觀察也顯示類似之結果，兩者分佈之區域皆相同，但野生型較濃染，同時變異型者會呈現網狀之構造(Fig. 2)。而在電子顯微鏡下則帶有野生型基因之細

胞，其反應物大都分佈在內質網、高基氏體及溶小體，少部分在小囊泡內。但變異型者除了細胞內反應物量少外，其反應物則大都在小囊泡內(Fig. 3)。此結果顯示 L252V 的變異引起脂蛋白解脂酶之降低原因可能是合成的酶聚集在小囊泡內而無法分泌出細胞外，導致該酶下降。但在細胞內量之減少可能之另一原因則是合成減少，不過這仍需再加以研究以證實之。

四、計畫成果自評

本研究已達到原來預期的目標，同時參與之工作人員也學到了脂蛋白解脂酶互補 DNA 的選殖，免疫螢光共軛聚焦顯微法及免疫電子顯微鏡法。所得的結果具有學術參考之價值。

五、參考文獻

1. Mahoney, E.M., Khoo, J.C., and Sterberg D.: Lipoprotein lipase secretion by human monocytes and rabbit alveolar macrophages in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:1639-42.
2. Chait, A., Iverius, P.H., and Brunzell, J.D.: Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1982; 69:490-3.
3. LaRosa, J.C., Levey, R.I., Herbert, P, Lux, S.E., and Fredrickson, D.S.: A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 41:57-62.
4. Kungsi, T., Ehnholm, C., Viikari, J., et al: Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo-and hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1989; 30:1117-26.
5. Brunzell, J.D.: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, Valle D, *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. McGraw-Hill, New York, p.1128-80.
6. Babirak, S.P., Iverius, P.H., Fujimoto, W. Y., Brunzell, J. D.: The detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989; 9:326-34.
7. Reymer, P.W., Gagne, E., Groenemeyer, B.E., Zhang, H., Forsyth, , Jansen, H., Seidell, J.C., Kromhout, D., Lie, K.E., Kastelein, J. et al. *Nature genetics*. 1995; 10:28-34.
8. Sparks, R.S., Zollner, S., Klisak, I., Kirchgessner, T.G., et al: Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15s21 *Genomics* 1987; 1:138-41.
9. Deeb, S.S., and Peng, R.: Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 1989; 28:4131-4.
10. Wion, K.L., Kirchgessner, T.G.,

- Lusis, A.T. et al : Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 1987; 235:1638-41.
11. Kirchgessner, T.G., Svenson, K.L., Lusis, A.J., and Schotz, M.C.: The sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1987; 262:8463-7.
 12. Emmerich, J., Beg, O., Peterson, J., Previato, L., Brunzell, J.D., Brewer, H.B. Jr., Santamarina-Fojo, S.: Human lipoprotein lipase. Analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis of Ser-132, Asp-156 and His-241. *J Biol Chem* 1991; 267:4161-5.
 13. Faustinella, F., Smith, L.C., Semenkovich, C.F., Chan, L.: Structural and functional roles of highly conserved serine in human lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1992; 267:9481-5.
 14. Davis, R.C., Wong, H., Nikazy, J., Wang, K., Han, W., Schotz, M.C.: Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *J Biol Chem* 1992; 267:21499-504.
 15. Bruin, T., Van der Sluis, B., Kastelein, J.J.P.: Identification of apo CII binding site on human lipoprotein lipase. *Circulation* 1992; 86:1-608.
 16. Kao, J.T., Hsiao, W.H., Yu, C.J., Chiang, F.T.: Newly identified missense mutation reduces lipoprotein lipase activity in Taiwanese patients with hypertriglyceridemia. *J Formos Med Assoc* 1999; 98:606-12.

Fig. 1 Intracellular distribution of human LPL protein from L252L (B) and L252V (C) in HEK 293 cells

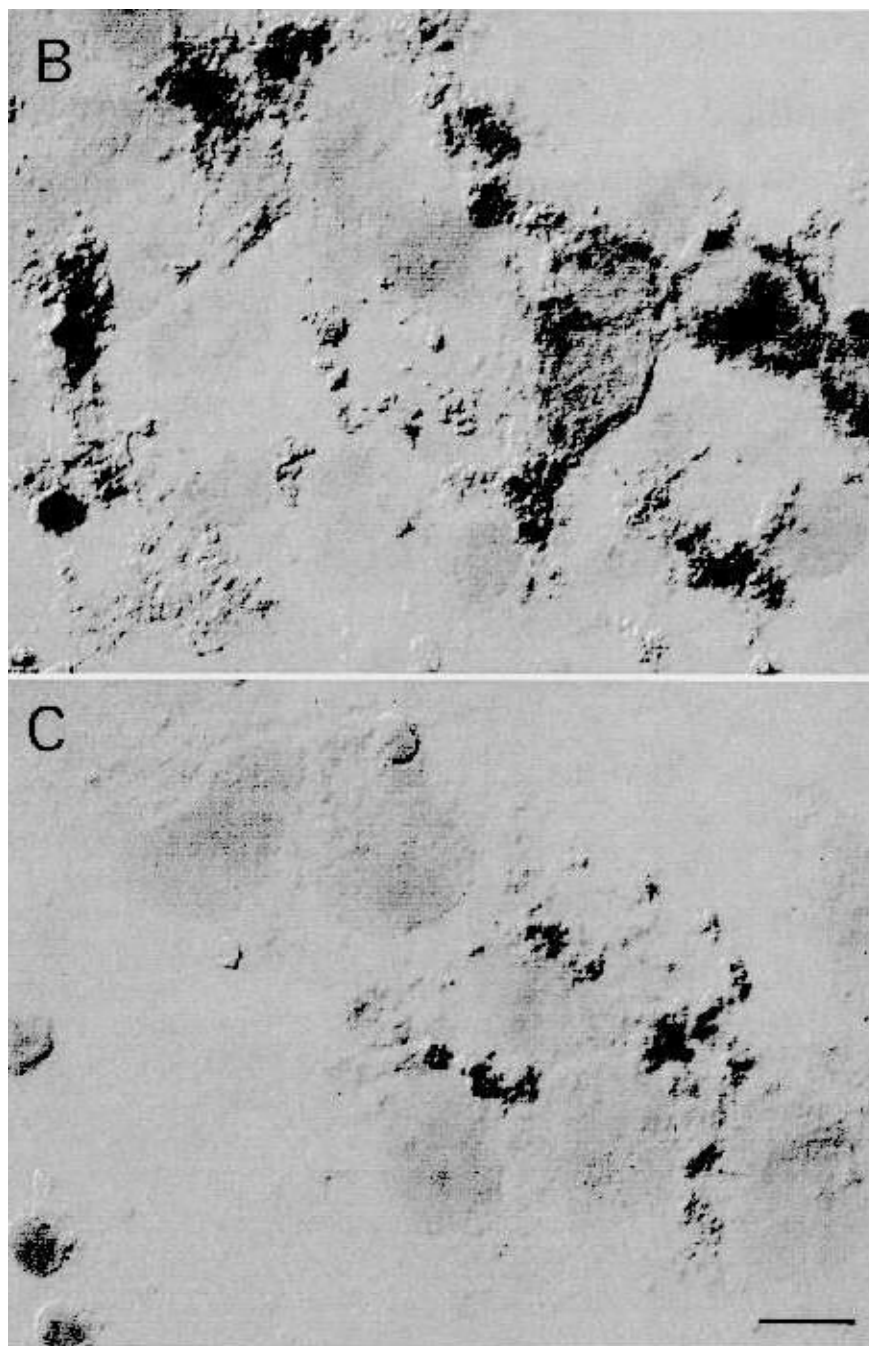
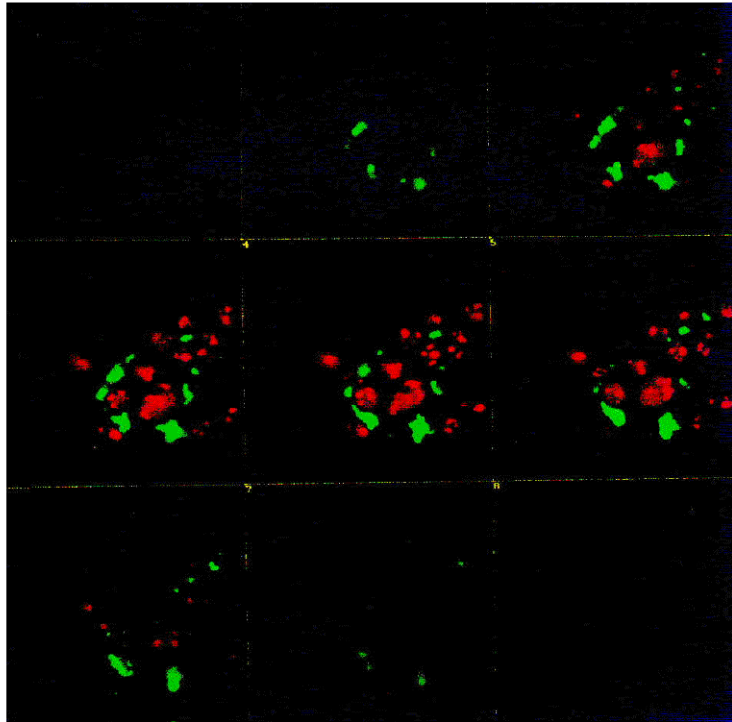


Fig. 2 Intracellular distribution of human LPL protein from L252L (A) and L252V (B) in HEK 293 cells

A.



B.

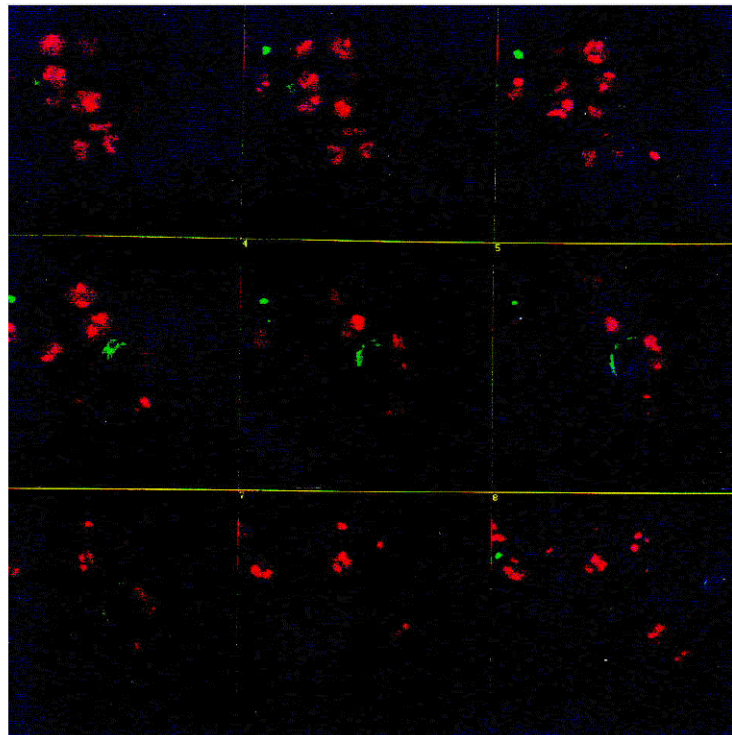


Fig. 3 Intracellular distribution of human LPL protein from L252L (C) and L252V (D) in HEK 293 cells

