

Rassegna

Lipasi lipoproteica: funzione e significato clinico

RIASSUNTO

Questa rassegna riassume le conoscenze più rilevanti riguardo alla lipasi lipoproteica (LPL), evidenziando il ruolo centrale che questo enzima esplica nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni e VLDL. Ci si è focalizzati su struttura, sintesi e funzione della LPL principalmente del tessuto adiposo, nonché sui meccanismi che sono responsabili dei cambiamenti nell'espressione e nella funzione della LPL, in relazione a stimoli nutrizionali e ormonali, al fine di cercare di definire il ruolo della LPL in alcune condizioni patologiche. Inoltre, in questa rassegna, sono discussi i limiti e i vantaggi dei metodi più utilizzati per la misurazione dell'attività della LPL nell'uomo.

SUMMARY

Lipoprotein lipase: function and clinical relevance

This review summarizes the most remarkable findings in relation to lipoprotein lipase (LPL), pointing out the important role that this enzyme plays in triglyceride-rich lipoproteins metabolism, such as chylomicrons and VLDL. We focus our attention mainly on adipose tissue LPL structure, synthesis and function, and mechanisms that influence LPL expression in relation to nourishing and hormonal stimuli, in order to define the role of LPL in some pathological conditions as diabetes and insulin-resistance. Furthermore, in this review we discuss limits and benefits of the most commonly used methods for measuring LPL activity in human beings.

Introduzione

La lipasi lipoproteica (LPL) è un enzima chiave nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi quali chilomicroni, di origine intestinale, e VLDL, di origine epatica¹⁻².

È espressa in diversi tessuti (adiposo, muscolare, cardiaco e ghiandola mammaria) e la sua regolazione è specifica per ognuno di essi, tanto che l'espressione della LPL si correla altamente con il bisogno e la captazione dei lipidi da parte dei tessuti.

**G. Costabile, L. Di Marino, G. Annuzzi,
P. Massaro, G. Riccardi, A.A. Rivellese**

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli

Corrispondenza: prof.ssa Angela A. Rivellese,
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale,
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Federico II,
via S. Pansini 5, 80131 Napoli
e-mail: rivelles@unina.it

G It Diabetol Metab 2007;27:82-92

*Pervenuto in Redazione il 13-2-2007
Accettato per la pubblicazione il 4-4-2007*

Parole chiave: lipasi lipoproteica (LPL), tessuto adiposo, lipoproteine, insulino-resistenza

Key words: lipoprotein lipase, adipose tissue, lipoproteins, insulin-resistance

Negli ultimi decenni, molti progressi sono stati fatti nella comprensione dei meccanismi che sono alla base della regolazione dell'espressione e della funzione della LPL, in risposta a variazioni fisiologiche e nutrizionali. La presenza della LPL nel latte bovino³ ha notevolmente facilitato la caratterizzazione delle proprietà biochimiche dell'enzima, provvedendo a una fonte conveniente per la purificazione. Colture cellulari e linee cellulari hanno anche consentito l'uso di sistemi cellulari per esaminare la sintesi, trasformazione e secrezione della LPL.

Alla luce di quanto detto, si è pensato che potesse essere utile riassumere le conoscenze più rilevanti riguardo a struttura, sintesi e funzione della LPL, nonché alla sua regolazione ormonale e nutrizionale, in particolare a livello del tessuto adiposo, al fine di cercare di definire il suo possibile ruolo in alcune condizioni patologiche quali obesità, dislipidemie, diabete mellito, insulino-resistenza e aterosclerosi.

Struttura e biochimica

La LPL, insieme con la lipasi pancreatica e la lipasi epatica, appartiene alla cosiddetta superfamiglia delle lipasi⁴. La struttura tridimensionale della LPL non è stata ancora determinata, ma un modello molecolare è stato proposto sulla base della sua omologia con la lipasi pancreatica⁵. I risultati di alcuni studi hanno mostrato che la LPL è una glicoproteina, composta da due subunità identiche, ciascuna del peso di 51 kD e con un contenuto in carboidrati pari all'8-12%³⁻⁶. Ogni subunità è organizzata in due regioni strutturalmente distinte, consistenti in un dominio più grande N-terminale (residui 1-312) e in uno, più piccolo, C-terminale (residui 313-448). Il dominio N-terminale comprende la triade catalitica (Ser¹³², Asp¹⁵⁶ e His²⁴¹), aminoacidi carichi positivamente, che potrebbero essere siti di legame per l'eparina e per le catene di eparan-solfato delle super-

fici cellulari, e il sito di legame per il cofattore apoproteina C-II.

Il dominio C-terminale include un ulteriore sito di legame per l'eparina e per l'eparan-solfato dei proteoglicani, e un sito di legame per i substrati lipidici, il quale conferisce specificità alla lipasi. L'enzima presenta un'altra regione funzionalmente molto importante, che include 10 residui di cisteina, implicati nella formazione di 5 ponti disolfuro^{7,8} e aminoacidi che sono essenziali per la dimerizzazione e per la stabilità del dimero^{9,10}.

La forma attiva della LPL, infatti, è un omodimero non covalente, la cui dissociazione porta a una inattivazione irreversibile dell'enzima¹¹ (Fig. 1). Studi *in vitro* hanno mostrato che il dimero tende reversibilmente all'equilibrio con un monomero, il quale, viceversa, è orientato verso un cambiamento conformazionale che inattiva il monomero stesso; tale monomero può essere inattivato sia *in vivo* sia *in vitro*; nel primo caso l'inattivazione è dovuta a segnali ormonali, nel secondo a cambiamenti di pH, di temperatura e di concentrazione di sali. I monomeri inattivi possono riassociarsi dando vita ad aggregati pesanti¹².

La forma dimerica della LPL ha un'affinità 6000 volte più alta per l'eparina e, perciò, per l'eparan-solfato dei proteoglicani, rispetto alla forma monomerica. Questa interazione è mediata dai diversi siti di legame con l'eparina, presenti, come precedentemente detto, su entrambe le subunità, le quali lavorano in maniera altamente coordinata¹³.

Sintesi

La lipasi lipoproteica è presente in numerosi tessuti; prevalentemente è sintetizzata nel tessuto adiposo, nel tessuto cardiaco, in quello muscolare e nella ghiandola mammaria. Viene prodotta, in minor misura, anche nelle ghiandole ova-

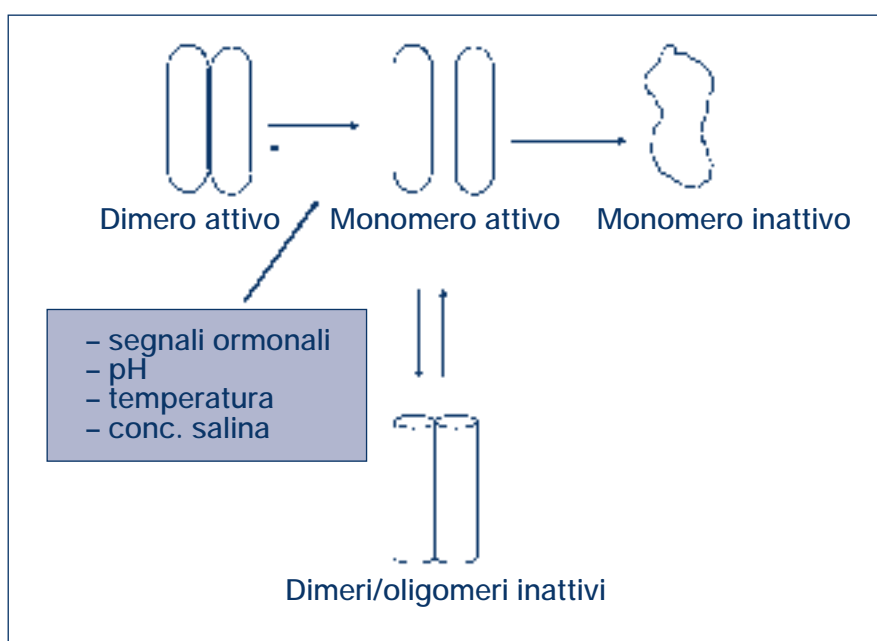


Figura 1 Attivazione/inattivazione della LPL.

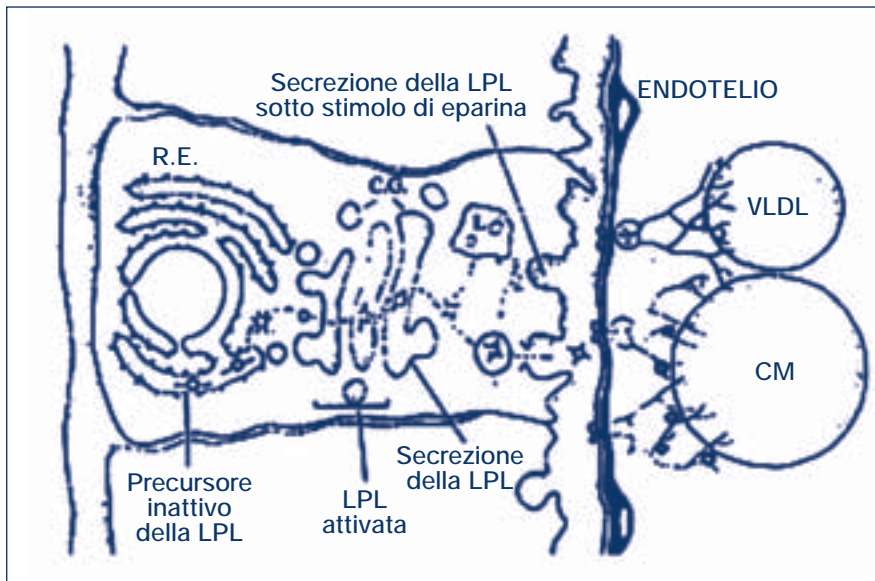


Figura 2 Sintesi e secrezione della LPL nella cellula (modificata da Ecker²¹).

riche e surrenaliche, in alcune cellule neuronali, nell'aorta toracica, nella milza, nel polmone e nel rene¹⁴⁻¹⁸. Sebbene il sito fisiologico di azione per la LPL sia la superficie luminale dei vasi sanguigni, dove l'enzima può interagire con le lipoproteine circolanti, le cellule dell'endotelio vascolare non sintetizzano LPL. Studi di ibridizzazione *in situ* hanno evidenziato la presenza di LPL mRNA in tutti gli altri tipi cellulari dei diversi tessuti analizzati (adipociti, miociti)^{18,19} indicando che la LPL endoteliale viene sintetizzata dalle cellule parenchimali dei tessuti e poi traslocata al suo sito di azione¹⁶.

La LPL viene sintetizzata come precursore inattivo nel reticolo endoplasmatico ruvido delle cellule parenchimali (Fig. 2). Dopo una serie di trasformazioni post-traslazionali, è attivata, mediante progressive N-glicosilazioni, nell'apparato del Golgi, da dove è secreta in vescicole secernenti e diretta o ai lisosomi, per la degradazione cellulare, o alla superficie delle cellule parenchimali, dove va a legarsi all'eparano-solfato dei proteoglicani. Infine, in presenza di fattori stimolanti, come l'eparina, la LPL viene trasportata sulla superficie dell'endotelio vasale, dove si lega alla parte terminale dei proteoglicani, cioè alle catene di eparano-solfato del glicocalice, grazie a interazioni di natura elettrostatica^{20,21}.

La sequenza di DNA responsabile della sintesi della lipasi lipoproteica è situata sul braccio corto del cromosoma 8, banda 22= 8p22. Il gene della LPL umano è ampio 30 kb e codifica per un peptide di segnale di 27 aminoacidi e per una proteina matura di 448 aminoacidi^{22,23}.

Nell'uomo sono state identificate più di 100 mutazioni naturalmente presenti nel gene della LPL²⁴. Una sola variante, identificata come Ser447stop, è associata a un aumento dell'attività della LPL, ed è riscontrata in oltre il 20% della popolazione generale²⁵. Per il resto si tratta di mutazioni che riducono l'attività della LPL. Nella più comune di queste, la variante Asn291Ser, i portatori eterozigoti (2-5% della popolazione caucasica²⁶) manifestano un incremento della concentrazione dei trigliceridi nel plasma del 31% circa e una severa diminuzione di colesterolo-

HDL²⁷. Un marcato deficit di attività della LPL, risultante da mutazioni omozigoti o eterozigoti composte, determina l'insorgere di un fenotipo, noto come iperlipoproteinemia di tipo I o chilomicronemia, caratterizzato dall'accumulo di chilomicroni nel plasma e da un marcato aumento dei livelli di trigliceridi in circolo²⁴.

Funzione

Nel lume vasale la lipasi agisce sulla componente trigliceridica delle lipoproteine in circolo, soprattutto lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni e VLDL, generando di- e mono-gliceridi, acidi grassi liberi e lipoproteine a densità intermedia.

Dopo l'idrolisi, i chilomicroni, resi più piccoli (*remnant*), sono trasportati nel fegato, dove uno specifico recettore riconosce la loro apoproteina E, rendendone possibile la metabolizzazione all'interno degli epatociti¹⁴⁻²⁸. In genere, tutti i chilomicroni scompaiono dal circolo sanguigno nell'arco di 12-14 ore dopo un pasto ricco in grasso²⁸.

Per quanto concerne le VLDL, in seguito all'azione idrolitica della LPL, esse vengono trasformate in IDL (lipoproteine a densità intermedia, ancora ricche di esteri del colesterolo), per poi dare vita alle LDL, le quali rappresentano la maggiore riserva di colesterolo per la sintesi degli steroidi o degli acidi biliari²⁹.

La LPL richiede, per la sua ottimale attività, sia *in vitro* sia *in vivo*, la presenza dell'apoproteina C-II, parte integrante delle lipoproteine ricche in trigliceridi quali chilomicroni e VLDL. Il deficit genetico di apo C-II *in vivo* è responsabile di ipertrigliceridemia e aumento di chilomicroni; *in vitro* la LPL può idrolizzare i suoi substrati anche in assenza di apo C-II, ma l'enzima esibisce una velocità di catalisi molto ridotta¹⁵⁻¹⁶. Diversi studi hanno evidenziato che la formazione del complesso lipasi-attivatore determina una riorganizzazione conformazio-

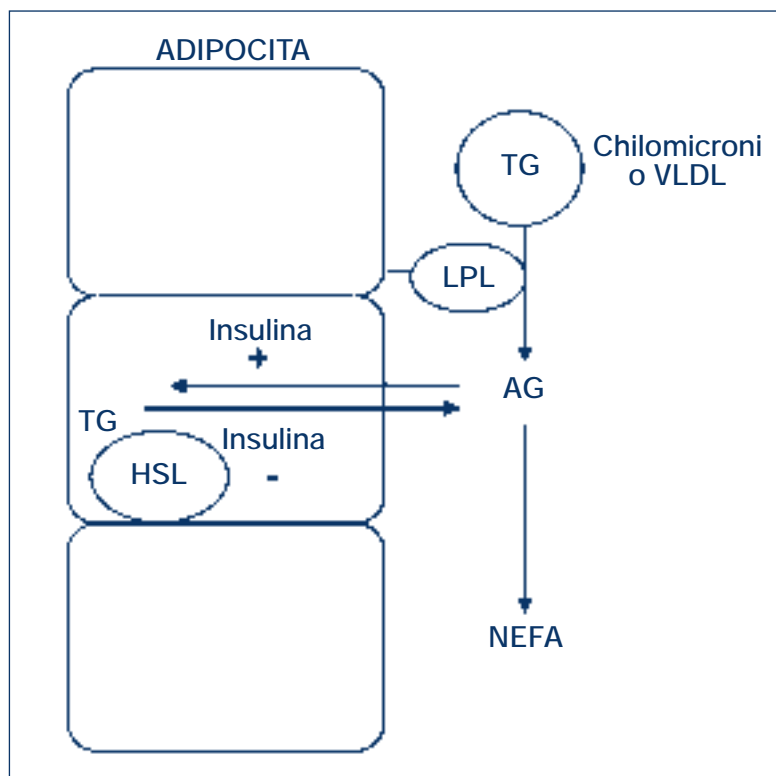


Figura 3 Schema della regolazione del movimento degli acidi grassi nel tessuto adiposo. AG: acidi grassi; NEFA: acidi grassi liberi; TG: trigliceridi; LPL: lipasi lipoproteica; HSL: lipasi ormono-sensibile.

nale dell'enzima, di modo che il substrato diventa più facilmente disponibile per l'idrolisi²³⁻³⁰, rendendo così più efficiente l'azione della LPL.

L'attivazione della LPL da parte del suo cofattore è inibita da elevate forze ioniche, cosa che indica l'esistenza di interazioni di natura elettrostatica tra queste proteine³¹. Infatti, grazie alla combinazione di tecniche morfologiche, chimiche e biochimiche¹⁴⁻¹⁷ è stato possibile dimostrare che il legame dei chilomicroni e delle VLDL alle molecole di LPL endoteliale è mediato da una specifica interazione tra apo C-II ed enzima³². Questa reazione implica l'interazione tra i residui di carica negativa, presenti sul dominio C-terminale dell'apo C-II, e quelli carichi positivamente della LPL^{32,33}.

Diversi studi hanno evidenziato che più molecole di LPL possono agire simultaneamente sulle particelle lipoproteiche, aumentando così la velocità di idrolisi dei trigliceridi in esse contenuti³⁴. Inoltre, alle lipoproteine impoverite di trigliceridi (*remnant*) restano ancorate alcune molecole di LPL^{35,36}, le quali vengono sostituite da nuove molecole rilasciate dalle cellule parenchimali durante il percorso intravasale. Pertanto vi è un continuo turnover di LPL al sito endoteliale di azione¹⁶.

Regolazione dell'attività della LPL

L'espressione e l'attività della LPL sono correlate allo stato metabolico e nutrizionale dei tessuti, cioè variano in accordo al fabbisogno e all'utilizzazione di acidi grassi da parte dei tessuti stessi. A tal proposito si parla di regolazione tessuto-specifica della LPL. Per esempio, durante il periodo di allat-

tamento si assiste a un marcato aumento dell'attività della LPL nella ghiandola mammaria e a una sua corrispondente diminuzione nel tessuto adiposo³⁷; in fase post-prandiale, la LPL è attiva nel tessuto adiposo, mentre è inattiva nel tessuto muscolare e nel muscolo cardiaco; a digiuno, invece, la situazione è inversa, infatti l'attività della LPL aumenta nel tessuto muscolare e in quello cardiaco, e diminuisce nel tessuto adiposo^{16,38,39}.

Il ruolo della regolazione tessuto-specifica, perciò, sembra essere quello di dirigere gli acidi grassi, generati dall'attività idrolitica dell'enzima sulla componente trigliceridica delle lipoproteine, o al tessuto adiposo, per l'esterificazione e l'immagazzinamento, in un momento di surplus energetico, quale è la fase che segue l'apporto di alimenti⁴⁰, oppure al tessuto muscolare e/o cardiaco, dove gli acidi grassi vengono ossidati a scopo energetico durante il periodo di digiuno⁴⁰⁻⁴².

Il movimento degli acidi grassi dal sito di azione della LPL alle cellule parenchimali non è ancora ben chiaro, ma, nel tessuto adiposo, sembra seguire un gradiente di concentrazione tra gli adipociti e il plasma^{43,44}. Il tutto è strettamente dipendente dai diversi meccanismi di regolazione dell'esterificazione degli acidi grassi nel tessuto adiposo^{45,46} e dalla regolazione di un altro importante enzima situato nell'adipocita: la lipasi ormono-sensibile (HSL, *hormone-sensitive lipase*).

L'HSL è il principale enzima responsabile della mobilizzazione intracellulare dei trigliceridi nel tessuto adiposo. È attivata in seguito alla fosforilazione di un singolo residuo di serina, in risposta ad agenti β -adrenergici, come l'adrenalina, e disattivata dalla defosforilazione in risposta all'insulina e ad altri agenti antilipolitici⁴⁷. In fase postprandiale l'attività dell'HSL si

riduce ed è stimolata l'esterificazione degli acidi grassi (è da sottolineare che la maggior parte dei dati della letteratura su questo argomento derivano da studi su animali) (Fig. 3). A digiuno, invece, l'attività dell'HSL aumenta, la LPL è inibita, e il meccanismo di esterificazione non è stimolato. Pertanto gli acidi grassi sono diretti dagli adipociti ai capillari, per essere poi distribuiti ad altri tessuti tramite il circolo sanguigno (Fig. 3). Esiste, quindi, una regolazione altamente coordinata di LPL, HSL ed esterificazione degli acidi grassi, la quale governa la mobilitazione o la deposizione degli acidi grassi nel tessuto adiposo⁴⁸.

L'aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo a cui si assiste nel periodo post-prandiale è da associarsi all'aumentata secrezione insulinica che si ha in seguito a un apporto di alimenti^{39,49}. In particolare, la somministrazione di un pasto ad alto contenuto in carboidrati determina un rapido incremento dell'attività della LPL del tessuto adiposo, proprio in virtù di un'immediata risposta insulinica⁵⁰. In esperimenti a breve termine, condotti su ratti, pasti ricchi in grassi hanno determinato un aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo, ma in misura minore rispetto all'aumento registrato dopo somministrazione di pasti più ricchi in carboidrati⁵¹. Nell'uomo, l'effetto acuto di un carico di glucosio sull'attività della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo ha indotto un rapido aumento dell'attività dell'enzima, mentre la somministrazione di olio di mais non ha determinato nessuna variazione significativa dell'attività enzimatica della LPL⁵². Secondo alcuni studiosi, l'ingestione di grassi potrebbe attenuare notevolmente la risposta insulino- e glucosio-dipendente della LPL del tessuto adiposo⁵³; inoltre, anche la quantità, il grado di insaturazione e la lunghezza della catena degli acidi grassi della dieta potrebbero influenzare l'attività della LPL^{54,55}.

L'insulina è uno dei più potenti regolatori noti della LPL^{56,57}. Infatti, sia in adipociti isolati dall'uomo e dal ratto^{58,59} sia in adipociti differenziati da colture cellulari 3T3-L1 dai fibroblasti murini^{60,61}, l'insulina determina un incremento dell'attività della LPL. L'ormone stimola la lipasi lipoproteica tramite diversi meccanismi^{62,63} e, se solo uno di questi risulta alterato, ne consegue una ridotta clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi. L'insulina può influenzare, in maniera diversa, ciascuna delle fasi implicate nell'espressione dell'attività dell'enzima, quali la trascrizione del gene che codifica per la LPL, la sintesi dell'mRNA, le fasi di trasporto e traduzione, così come può anche indurre modifiche post-traslazionali (glicosilazione e attivazione o inattivazione della proteina^{64,65}), e influenzare anche la fase di secrezione dell'enzima. Il preciso meccanismo biochimico, tramite il quale l'ormone regola l'espressione dell'attività della lipasi lipoproteica, non è ancora ben chiaro, ma sembra dipendere anche dalla particolare preparazione cellulare, utilizzata ai fini dello studio sperimentale. Ad esempio, Chan et al., in uno studio effettuato utilizzando colture cellulari di fibroblasti 3T3-L1, differenziati in adipociti, hanno mostrato che basse concentrazioni di insulina inducono un rapido rilascio della LPL endoteliale, tramite meccanismi che sono indipendenti dal metabolismo energetico e dalla sintesi proteica⁶⁶. L'ipotesi avanzata da questi studiosi è che tale azione metabolica dell'insulina

potrebbe essere mediata dall'attivazione di una specifica fosfolipasi (fosfolipasi C) che idrolizza una molecola di glicosil-fosfatidilinositolo (PI). La LPL sembra essere ancorata alla superficie cellulare degli adipociti 3T3-L1 proprio tramite la molecola di glicosil-PI e il suo rapido rilascio potrebbe essere dovuto all'attivazione, da parte dell'insulina, di questa glicosil-PI fosfolipasi C specifica.

Studi *in vitro*, effettuati su adipociti isolati di ratto, trattati con insulina, hanno dimostrato che l'ormone può stimolare anche la produzione di mRNA della LPL⁶² e incrementare la velocità di sintesi della LPL, suggerendo che l'attività della LPL sia controllata quasi completamente a livello trascrizionale. Diversamente, esperimenti eseguiti su tessuto adiposo intatto e su adipociti isolati di ratto hanno evidenziato che l'insulina stimola l'attività della LPL anche in presenza di inibitori della sintesi proteica (cordicepina) e della sintesi di RNA (α -aminotina), implicando così un meccanismo di regolazione dell'attività della LPL da parte dell'insulina esclusivamente a livello post-trascrizionale e post-traslazionale⁶⁷. A supporto di questa ipotesi, è stato osservato che in colture di adipociti 3T3-L1 l'insulina incrementa l'attività della LPL, nonostante una riduzione della sintesi dell'enzima e cambiamenti molto piccoli nei livelli di LPL mRNA⁶³.

Oltre all'insulina, anche l'adrenalina e la noradrenalina influenzano l'attività della LPL nel tessuto adiposo^{68,69}. Questi ormoni sembrano essere responsabili di una diminuzione dell'attività della LPL, inattivando l'enzima prima del suo rilascio dall'adipocita⁷⁰. Un effetto simile sembra sia esercitato dagli estrogeni, i quali, in studi condotti su animali, si sono dimostrati responsabili della diminuzione dell'attività della LPL e dei livelli di mRNA LPL del tessuto adiposo⁷¹. Anche nell'uomo, gli estrogeni sembrano ridurre in maniera significativa l'attività della LPL sia nel plasma⁷² sia nel tessuto adiposo⁷³. Diversamente, l'iniezione *in vivo* di glucocorticoidi determina un aumento dell'attività della LPL nel tessuto adiposo⁷⁴; inoltre, in studi effettuati su adipociti isolati di ratto, questi ormoni sembrano potenziare l'effetto dell'insulina sulla sintesi dell'enzima⁷⁰, in particolare a livello della sintesi dell'RNA. L'ormone della crescita (GH) sembra determinare un aumento sia dell'espressione dell'mRNA sia dell'attività della LPL del tessuto adiposo⁷⁵.

Nella tabella 1 vengono riassunti gli effetti dei principali ormoni sull'espressione dell'mRNA della LPL e sulla sua attività a livello del tessuto adiposo.

Tabella 1 Effetti dei principali ormoni sull'attività della LPL e sull'mRNA della LPL a livello del tessuto adiposo (\uparrow aumento, \downarrow diminuzione).

Ormone	Attività LPL	mRNA LPL
Insulina	\uparrow	\uparrow
Glucocorticoidi	\uparrow	\uparrow
Catecolamine	\downarrow	
GH	\uparrow	\uparrow
Estrogeni	\downarrow	\downarrow

Misurazione della LPL nell'uomo

Considerando il ruolo fondamentale della LPL in condizioni sia fisiologiche sia patologiche, è importante avere a disposizione dei metodi per la sua valutazione. A tal proposito, è necessario tenere presente che i metodi fino a ora validati sono piuttosto complessi e, pertanto, non possono essere proposti per la comune routine clinica. Di seguito cercheremo di illustrare brevemente i metodi a nostra disposizione e i campioni biologici su cui è utile effettuare le valutazioni.

Innanzitutto, c'è da dire che è possibile misurare sia la massa sia l'attività della LPL. La misurazione della massa della LPL ha il grosso svantaggio di non fornire indicazioni circa l'attività dell'enzima, che è l'informazione che più interessa dal punto di vista fisiopatologico. Per il dosaggio della massa della LPL nel plasma si usano metodi immunologici, i quali, utilizzando l'enzima purificato e anticorpi monoclonali, sfruttano la reazione antigene-anticorpo. I metodi immunologici includono soprattutto i metodi radioimmunoenzimatici (EIA oppure ELISA)⁷⁶ e quelli immunofluorescenti (DELFIA)⁷⁷. L'attività della LPL può essere misurata in diversi campioni biologici (plasma, tessuto adiposo e tessuto muscolare). Una delle fonti più utilizzate, per la sua minore invasività, è senz'altro il plasma post-eparinico⁷⁸. La somministrazione endovenosa di eparina promuove il rapido rilascio della LPL in circolo, in quanto essa compete con l'eparan-solfato dei proteoglicani della superficie endoteliale per il legame con l'enzima, il quale viene così rilasciato in circolo come complesso enzima-eparina, altamente stabile⁷⁹.

L'attività della LPL può essere misurata anche nel plasma senza stimolo di eparina (plasma pre-eparinico), ma la scarsa sensibilità del metodo, in relazione alla bassa attività in assenza dello stimolo, fa sì che i dati ottenuti non siano molto attendibili. Inoltre, non è ancora ben chiaro il significato funzionale della LPL presente in circolo.

Poiché l'attività della LPL dei diversi organi e tessuti è regolata in maniera diversa, gli studi di regolazione enzimatica richiedono a volte misurazioni dirette dell'attività dell'enzima in campioni di tessuto (adiposo, muscolare...). Per questo scopo si può ricorrere a campioni agobiopici di tessuto, i quali possono essere sottoposti a un processo di omogeneizzazione oppure possono essere essiccati e ridotti in polvere con acetone/etere e poi risolubilizzati in buffer a pH 8¹². Gli estratti, così ottenuti, sono poi utilizzati per la valutazione dell'attività totale della LPL, che rappresenta l'attività dell'effettivo pool intra- ed extracellulare della LPL, compresa la frazione dell'enzima fisiologicamente attiva presente sulla superficie endoteliale. Inoltre, i campioni agobiopici di tessuto possono essere incubati in buffer contenenti eparina per la determinazione dell'attività della LPL rilasciata dall'eparina, che è una stima della capacità del tessuto di rilasciare l'enzima sotto stimolo di eparina.

La misurazione dell'attività della LPL tiene conto del fatto che l'enzima agisce sulla componente trigliceridica delle lipoproteine plasmatiche (VLDL e chilomicroni), generando di- e monogliceridi e acidi grassi liberi. Attualmente, la determinazione dell'attività catalitica della LPL viene in genere effettuata valutando il rilascio dei prodotti della reazione di idrolisi e, in particolare, degli acidi grassi che si liberano dai trigliceridi

per azione della LPL. Le tecniche più comunemente utilizzate a tal fine includono metodi titolometrici, radioisotopici, fotometrici, fluorometrici ed enzimatici. Tali metodiche non sempre garantiscono una buona riproducibilità dei risultati e una buona sensibilità di analisi e alcune prevedono procedure analitiche abbastanza lunghe e dispendiose.

I metodi più in uso per l'analisi dell'attività della LPL, che offrono una maggiore sensibilità, prevedono l'uso di un substrato radioattivo, in genere di una miscela emulsionata di trioleina marcata radioisotopicamente e non marcata, che rende possibile isolare e quantizzare gli acidi grassi liberati per azione idrolitica dell'enzima¹².

Utilizzando come substrato un'emulsione di trioleina, gli acidi grassi liberati dall'attività idrolitica della LPL possono essere determinati anche mediante metodo enzimatico⁸⁰. Un'altra possibile alternativa ai metodi radioisotopici è rappresentata dalle tecniche fluorimetriche per il dosaggio dell'attività catalitica della LPL⁸¹. Il substrato su cui la lipasi lipoproteica va ad agire è di solito un alchildiacyl-glicerolo fluorogenico, contenente un pirene, la cui fluorescenza è intramolecolarmente bloccata da un gruppo trinitrofenilico^{81,82}. In presenza della LPL attiva, il trinitrofenile è idrolizzato e la fluorescenza del pirene può essere rilevata. La cinetica con cui aumenta l'intensità della fluorescenza a 37 °C è proporzionale all'attività della LPL. Recentemente, è stato proposto un nuovo metodo di analisi dell'attività della LPL, che prevede l'uso di un sistema HPLC con rivelatore fluorescente⁸³. In questo modo è stato possibile rivelare l'acido oleico, generato dalla trioleina per azione della LPL, in seguito alla sua derivatizzazione con 9-antildiazometano (ADAM), un derivatizzatore fluorescente. Questa tecnica offre due importanti vantaggi: l'utilizzazione di un substrato non radioattivo e la velocità e semplicità con le quali può essere misurata l'attività della LPL.

C'è da dire che, sia per quanto concerne i metodi fluorometrici, sia per la più recente metodologia che si avvale dell'uso di un sistema HPLC, sono necessari ulteriori approfondimenti, al fine di validare queste due procedure e correlarle con i metodi radioisotopici.

Effetti clinici del deficit di LPL

La lipasi lipoproteica è un enzima chiave nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi e, quindi, alterazioni della sua attività si associano ad aumento di queste lipoproteine. Mutazioni che interessano il gene della LPL, sito sul cromosoma 8, possono condurre a un deficit totale dell'attività dell'enzima come avviene nella sindrome chilomicronemica, una rara patologia a trasmissione autosomica recessiva la cui prevalenza è stimata intorno a 1:1.000.000. La malattia si caratterizza per una massiva ipertrigliceridemia (trigliceridi > 1000 mg/dl, potendo anche superare i 7000 mg/dl) con presenza di chilomicroni a digiuno; il colesterolo totale è spesso aumentato in quanto aumenta la quota trasportata dalle lipoproteine ricche in trigliceridi, mentre il colesterolo HDL ed LDL è basso. La diagnosi viene in genere posta in età pediatrica per la comparsa di dolore addominale ricorrente; vi è infatti un alto rischio di

pancreatite acuta, dal momento che nei capillari pancreatici i chilomicroni sono esposti a piccole quantità di lipasi pancreatiche che idrolizza in parte i trigliceridi e i fosfolipidi con formazione di acidi grassi e lisolecitina che sono tossici per il parenchima pancreatico. I trigliceridi, inoltre, sono captati dagli istiociti cutanei e dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale dando luogo a xantomi eruttivi (localizzati alle natiche e alla superficie estensoria degli arti) e a splenomegalia. Inoltre, per valori di trigliceridi > 2000 mg/dl si può evidenziare lipaemia retinalis, con pallore della retina e vasi retinici biancastri, e può coesistere cefalea per la iperviscosità ematica²⁴. La diagnosi può essere posta sulla valutazione del plasma posto per 24 ore a 4 °C, poiché presenta un caratteristico strato cremoso in superficie con infranatante limpido, sulla determinazione dei trigliceridi e dei chilomicroni e sulla determinazione della LPL in campioni di plasma post-eparinici: nei soggetti normali, infatti, l'infusione di eparina aumenta i livelli di LPL nel plasma, perché l'enzima viene staccato dall'endotelio capillare, mentre nei soggetti affetti tale aumento non si riscontra. Una sindrome analoga, anch'essa a trasmissione autosomica recessiva, è causata dal deficit di Apo C-II, l'attivatore della LPL codificato da un gene sito sul cromosoma 19. La carenza può essere dimostrata dall'assenza dell'Apo C-II all'elettroforesi su gel. Sia per il deficit di LPL sia per quello di Apo C-II è possibile, inoltre, documentare le mutazioni dei rispettivi geni. Oltre a queste due patologie rare, ben caratterizzate dal punto di vista genetico e fisiopatologico,

va considerata anche l'ipertrigliceridemia familiare, una malattia a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da un aumento della trigliceridemia (compresa tra 200 e 500 mg/dl), il cui difetto genetico non è noto. L'ipertrigliceridemia familiare è, probabilmente, dovuta a un aumento della sintesi delle VLDL associato a una riduzione del suo catabolismo per ridotta attività della LPL. Questa forma di ipertrigliceridemia si manifesta dopo la pubertà e spesso può essere esacerbata dall'eccesso di grassi o carboidrati nella dieta, dallo stile di vita sedentario, dall'obesità, dalla resistenza insulinica, dall'uso di alcol e dall'assunzione di estrogeni. La diagnosi viene posta per la presenza di trigliceridemia compresa tra 200 e 500 mg/dl in assenza di patologie associate (superiore a 500 mg/dl se presente diabete) e nel riscontro di ipertrigliceridemia in almeno il 50% dei parenti di primo grado del probando. Le principali caratteristiche di queste condizioni cliniche e le indicazioni terapeutiche vengono riportate nella tabella 2.

LPL, insulino-resistenza e diabete

Essendo, come abbiamo detto precedentemente, la LPL un enzima la cui attività è regolata principalmente dall'insulina, è facile dedurre che alterazioni della sua attività possano essere presenti in tutte le condizioni caratterizzate o da deficit più

Tabella 2 Condizioni cliniche dovute a deficit totale o parziale dell'attività della lipasi lipoproteica: principali caratteristiche cliniche e indicazioni terapeutiche.

Condizione clinica	Alterazione biochimica	Ereditarietà	Laboratorio	Fenotipo Clinico	Terapia non farmacologica	Terapia farmacologica
Sindrome chilomicronemica	Deficit assoluto di LPL	Autosomica recessiva	↑↑ chilomicroni ↑↑ trigliceridi	- Xantomi eruttivi, dolore addominale (rischio di pancreatite), splenomegalia, lipaemia retinalis, cefalea - Esordio prima della pubertà	- Dieta Grassi < 20% delle calorie della dieta Olio MCT (acidi grassi a catena media) - Abolizione del consumo di alcol	
	Deficit di Apo CII	Autosomica recessiva	Simile al deficit assoluto di LPL	Simile al deficit assoluto di LPL	Simile al deficit assoluto di LPL	
Ipertrigliceridemia familiare	Deficit parziale di LPL	Autosomica dominante	↑↑ trigliceridi	- Xantomi eruttivi, dolore addominale (rischio di pancreatite) - Lieve aumento del rischio cardiovascolare - Esordio dopo la pubertà	- Dieta Saturi < 10% CHO 40-45% delle calorie della dieta - Abolizione del consumo di alcol	Fibrati

o meno assoluto dell'insulina (diabete tipo 1 all'insorgenza, prima dell'inizio della terapia insulinica) o da insulino-resistenza, come obesità, diabete tipo 2 e sindrome metabolica. In tutte queste condizioni, la ridotta attività della LPL si associa ad aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi.

Alcuni studi hanno dimostrato che, in pazienti con diabete tipo 1 (all'insorgenza) o tipo 2, l'attività catalitica della LPL è ridotta sia nel plasma post-eparinico^{84,85} sia nel tessuto adiposo⁸⁶; inoltre, successivi trattamenti di questi pazienti con insulina e, in genere, con farmaci capaci di migliorare il controllo glicemico, inducono un aumento dell'attività della LPL, coincidente con una riduzione dei trigliceridi plasmatici⁸⁷⁻⁸⁹. In particolare per quanto concerne il diabete, questi studi suggerirebbero che anche l'iperlipemia può avere una certa influenza, anche se sicuramente di secondaria importanza, nella regolazione dell'attività dell'enzima. Inoltre, poiché il diabete tipo 2 è caratterizzato sia da insulino-resistenza sia da un deficit, almeno relativo, di secrezione insulinica, è ipotizzabile che tutte e due queste alterazioni possano concorrere a ridurre l'attività della lipasi lipoproteica a livello del tessuto adiposo, come il nostro gruppo ha recentemente osservato⁹⁰. Questa ridotta attività della lipasi a livello del tessuto adiposo presente nei pazienti con diabete tipo 2 potrebbe concorrere a spiegare anche le alterazioni lipidiche postprandiali tipiche di questi pazienti⁹¹.

Possibili correzioni terapeutiche del deficit di LPL

Posto che per il deficit assoluto di attività della LPL una terapia eziologica non è ancora disponibile, il trattamento del deficit familiare di lipasi lipoproteica è soprattutto dietetico: la restrizione dei grassi della dieta < 20% delle calorie totali giornaliere riesce a ridurre i trigliceridi plasmatici e mantenere il paziente libero da sintomi. Per l'ipertrigliceridemia familiare e le altre forme secondarie di ipertrigliceridemia si deve agire in primis su quei fattori concomitanti che contribuiscono a ridurre l'attività della LPL come sedentarietà, obesità, resistenza insulinica. La perdita di peso e l'incremento dell'attività fisica assumono pertanto notevole importanza, insieme ad alcuni nutrienti della dieta il cui ruolo e le cui potenzialità sono ancora oggetto di studio. Per quanto riguarda l'intervento farmacologico, sono disponibili i derivati dell'acido fibrico, gli acidi grassi n-3 e l'acido nicotinico (quest'ultimo non ancora disponibile in Italia). I derivati dell'acido fibrico, quali il bezafibrato, il gemfibrozil e il fenofibrato, sono i farmaci di prima scelta nel trattamento dell'ipertrigliceridemia e agiscono stimolando l'attività della LPL e inibendo la produzione epatica di VLDL; gli effetti collaterali più comuni sono rappresentati da colelitiasi, nausea, anomalie della funzione epatica, rhabdomiolisi in associazione con le statine. Potenziano, inoltre, l'azione dei dicumarolici e delle sulfoniluree. Gli acidi grassi n-3, a dosi non inferiori ai 2 g/die, determinano una significativa riduzione della trigliceridemia agendo sia tramite la riduzione della sintesi delle VLDL sia tramite un aumento dell'attività della LPL. L'acido nicotinico agisce riducendo principalmente la sintesi epatica delle VLDL.

Conclusioni

La lipasi lipoproteica è un enzima fondamentale per numerosi processi metabolici, principalmente connessi al catabolismo delle lipoproteine plasmatiche e alla distribuzione dei grassi nei vari tessuti. Lo studio della sua attività è importante, dal punto di vista scientifico, per cercare di approfondire le nostre conoscenze sui meccanismi patogenetici di molte delle alterazioni lipidiche presenti in patologie di elevata frequenza. Dal punto di vista clinico e diagnostico, considerando anche la complessità dei metodi disponibili, l'indicazione principale per la determinazione dell'attività della lipasi lipoproteica rimane l'individuazione dei pazienti con sindrome chilomicronemica dovuta a deficit genetico.

Bibliografia

1. Nilsson-Ehle P, Garfinkel AS, Scotz MC. *Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism*. Annu Rev Biochem 1980; 49:667-93.
2. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Share VG, Fielding PE, Egelrud T. *Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources*. Biochemistry 1973;12:1828-33.
3. Iverius PH, Ostlund-Lindqvist AM. *Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization, and molecular weight analysis*. J Biol Chem 1976;251:7791-5.
4. Hide WA, Chan L, Wen-Hsiung L. *Structure and evolution of the lipase superfamily*. J Lipid Res 1992;33:167-78.
5. Van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. *Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis*. J Biol Chem 1994;269:4626-33.
6. Vannier C, Ailhaud G. *Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. II. Processing, subunit assembly and intracellular transport*. J Biol Chem 1989;264:13206-16.
7. Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noe L, Chuat JC et al. *Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1995;111:385-98.
8. Yang CY, Gu ZW, Yang HX, Rohde MF, Gotto AM Jr, Pownall HJ. *Structure of bovine milk lipoprotein lipase*. J Biol Chem 1989;264:16822-7.
9. Hata A, Ridinger DN, Sutherland SD, Emi M, Kwong LK, Shuhua J et al. *Missense mutations in exon 5 of the human lipoprotein lipase gene. Inactivation correlates with loss of dimerization*. J Biol Chem 1992;267:20132-9.
10. Keiper T, Schneider JG, Dugi KA. *Novel site in lipoprotein lipase (LPL 415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability*. J Lipid Res 2001;42:1180-6.
11. Osborne JC Jr, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. *Studies on activation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation*. Biochemistry 1985;24:5606-11.
12. Nilsson-Ehle P, Ekman R. *Rapid, simple and specific assays for lipoprotein lipase and hepatic lipase*. Artery 1977;3:194-209.
13. Lookene A, Chevreuil O, Ostergaard P, Olivecrona G. *Interaction of lipoprotein lipase with heparin fragments and with heparin*

- sulphate: stoichiometry, stabilization, and kinetics.* *Biochemistry* 1996;35:12155-63.
14. Cryer A. *Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism.* *Int J Biochem* 1981;13:525-41.
 15. Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. *Structure and functional properties of lipoprotein lipase.* *Biochim Biophys Acta* 1992;1123:1-17.
 16. Braun JEA, Severson DL. *Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase.* *Biochemical Journal* 1992;287:337-47.
 17. Enerback S, Gimble JM. *Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level.* *Biochim Biophys Acta* 1993;1169:107-25.
 18. Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S, Olivecrona T. *Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution.* *Am J Physiol* 1990;258:C673-81.
 19. Camps L, Reina M, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T, Vilaro S. *Lipoprotein lipase in lungs, spleen and liver: synthesis and distribution.* *J Lipid Res* 1991;32:1877-88.
 20. Goldberg IJ. *Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis.* *J Lipid Res* 1996;37:693-707.
 21. Eckel RH. *Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases.* *N Engl J Med* 1989;320:1060-8.
 22. Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. *Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology.* *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:243-68.
 23. Santamarina-Fojo S. *Genetic dyslipoproteinemias: role of lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II.* *Curr Opin Lipidol* 1992;3:186-95.
 24. Brunzell JD. *Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome.* In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease.* 7th ed. New York: McGraw Hill 1995, pp. 1913-32.
 25. Huang AQ, Hu YH, Zhan SY, Xu B, Pang ZC, Cao WH et al. *Lipoprotein lipase gene S447X polymorphism modulates the relation between central obesity and serum lipids, a twin study.* *Intern J Obes* 2006;30:1693-1701.
 26. Wittekoek ME, Pimstone SN, Reymer PW, Feuth L, Botma GJ, Defesche JC et al. *A common mutation in the lipoprotein lipase gene (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patient with familial hypercholesterolemia.* *Circulation* 1998;97:729-35.
 27. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgard BG. *Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis.* *Circulation* 1999;99:2901-7.
 28. Mahmood Hussain M, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A. *Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors.* *Biochim Biophys Acta* 1996;1300:151-70.
 29. Fielding PE, Fielding CJ. *Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system.* In: Vance DE, Vance J, eds. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.* Amsterdam: Elsevier 1991, pp. 427-59.
 30. Bengtsson G, Olivecrona T. *Lipoprotein lipase: some effects of activator proteins.* *Eur J Biochem* 1980;106:549-55.
 31. Fielding CJ, Fielding PE. *Mechanism of salt-mediated inhibition of lipoprotein lipase.* *J Lipid Res* 1976;17:248-56.
 32. Miller AL, Smith LC. *Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein glutamic acid. Formation of a stable surface film.* *J Biol Chem* 1973;248:3359-62.
 33. Eisenberg S, Rachmilewitz D. *Interaction of rat plasma very low density lipoprotein lipase-rich (post-heparin) plasma.* *J Lipid Res* 1975;16:341-51.
 34. Scow RO, Olivecrona T. *Effect of albumin on products formed from chylomicron triacylglycerol by lipoprotein lipase in vitro.* *Biochim Biophys Acta* 1977;487:472-86.
 35. Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ. *Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids.* *J Biol Chem* 1989;264:4349-55.
 36. Vilella E, Joven J, Fernandez M, Vilaro S, Brunzell JD, Olivecrona T et al. *Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins.* *J Lipid Res* 1993;34:1555-64.
 37. Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. *Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats.* *Biochim Biophys Acta* 1970;210:473-82.
 38. Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG. *The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranscriptional regulation.* *J Biol Chem* 1990;265:4570-7.
 39. Lithell H, Boberg J, Helsing K, Lundqvist G, Vessby B. *Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states.* *Atherosclerosis* 1978;30:89-94.
 40. Cryer A, Riley SE, Williams ER, Robinson DS. *Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentrations.* *Clinical Science and Molecular Medicine* 1976;50:213-21.
 41. Kaciuba-Uscilko H, Dudley DA, Terjung RL. *Influence of thyroid status on skeletal muscle LPL activity and TG uptake.* *Am J Physiol* 1980;238:E518-23.
 42. Borensztajn J. *Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase.* In: Borensztajn J, ed. *Lipoprotein lipase.* Chicago, IL: Evener 1987, pp. 133-48.
 43. Frayn KN, Shadid S, Hamlani R, Humphreys SM, Clark ML, Fielding BA et al. *Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition.* *Am J Physiol* 1994;266:E308-17.
 44. Van der Vusse GJ, Reneman RS. *Lipid metabolism in muscle.* In: *Handbook of physiology.* New York, NY: American Physiological Society 1996;12:952-44.
 45. Leboeuf B. *Regulation of fatty acid esterification in adipose tissue incubated in vitro.* In: Renold AE, Cahill GF, eds. *Handbook of physiology: Adipose tissue.* Washington, DC: American Physiological Society 1965, section 5.
 46. Campbell PJ, Carlson MG, Hill JO, Nurjhan N. *Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification.* *Am J Physiol* 1992;263:E1063-9.
 47. Langin D, Holm C, Lafontan M. *Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism.* *Proceedings of the Nutrition Society* 1996;55:93-109.
 48. Frayn KN, Coppak SW, Fielding BA, Humphreys SM. *Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization.* *Advances in Enzyme Regulation* 1995;35:163-78.
 49. Taskinen MR, Nikkila EA, Kuusi T, Harno K. *Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity.* *Diabetologia* 1982;22:46-50.

50. Nikkila EA. Control of plasma and liver triglyceride kinetics by carbohydrate metabolism and insulin. *Adv Lipid Res* 1969; 7:63-134.
51. Pokrajac N, Lossow WJ. The effect of tube feeding of glucose or corn oil on adipose tissue lipoprotein lipase activity and uptake of ¹⁴C-labeled palmitic acid of chylomicron triglycerides in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1967;137:291.
52. Nilsson-Ehle P, Carlstrom S, Belfrage P. Rapid effects on lipoprotein lipase activity in adipose tissue of human after carbohydrate and lipid intake. Time course and relation to plasma glycerol, triglyceride, and insulin levels. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35:373-8.
53. Sadur CN, Yost TJ, Eckel RH. Fat feeding decreases insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase. *Metabolism* 1984;33:1043-7.
54. Sato N, Deckelbaum RJ, Neeser G, Carpentier YA, Kinney JM. Hydrolysis of mixed lipid emulsions containing medium-chain and long-chain triacylglycerol with lipoprotein lipase in plasma-like medium. *J Parenter Enteral Nutr* 1994;18:112-8.
55. Saxena U, Goldberg IJ. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II: effects of free fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1990;1043:161-8.
56. Farese RV Jr, Yost TJ, Eckel RH. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 1991;40:214-6.
57. Sadur CN, Eckel RH. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* 1982;69:1119-25.
58. Kern PA, Marshall S, Eckel RH. Regulation of lipoprotein lipase in primary cultures of isolated human adipocytes. *J Clin Invest* 1985;75:199-208.
59. Eckel RH, Robbins RJ. Lipoprotein lipase is produced, regulated, and functional in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7604-7.
60. Wise LS, Green H. Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 1978;13:233-42.
61. Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem* 1979;254:10021-9.
62. Ong J, Kirchgessner TG, Schotz MC, Kern PA. Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 1988;263:12933-8.
63. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at post-transcriptional and post-translational levels. *J Biol Chem* 1989;264:9030-8.
64. Vannier C, Amrie Z, Etienne J, Negrel R, Ailhaud G. Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. I. Intracellular activation of the enzyme. *J Biol Chem* 1985;260:4424-31.
65. Olivecrona T, Chernick SS, Bengtsson-Olivecrona G, Garrison M, Scow RO. Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. Demonstration of inactive forms of lipase in cells. *J Biol Chem* 1987;262:10748-59.
66. Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E, Saltiel AR. Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* 1988;241:1670-2.
67. Vydelingum N, Drake RL, Etienne J, Kissebah AH. Insulin regulation of fat cell ribosomes, protein synthesis, and lipoprotein lipase. *Am J Physiol* 1983;245:E121-31.
68. Wing DR, Salaman MR, Robinson DS. Clearing-factor lipase in adipose tissue. Factors influencing the increase in enzyme activity produced on incubation of tissue from starved rats in vitro. *Biochem J* 1966;99:648-56.
69. Davies P, Cryer A, Robinson DS. Hormonal control of adipose tissue clearing factor lipase activity. *FEBS Lett* 1974;45:271-5.
70. Ashby P, Robinson DS. Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipase. *Biochem J* 1980;188:185-92.
71. Hamosh M, Hamosh P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 1975;55:1132-5.
72. Urabe M, Yamamoto T, Kashiwagi T, Okubo T, Tsuchiya H, Iwasa K et al. Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocr J* 1996;43:737-42.
73. Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase: possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:101-7.
74. De Gasquet P, Pequignot E. Changes in adipose tissue and heart lipoprotein lipase activities and in serum glucose, insulin and corticosterone concentrations in rats adapted to a daily meal. *Horm Metal Re* 1973;5:440-3.
75. Barcellini-Couget S, Pradines-Figueres A, Roux P, Dani C, Ailhaud G. The regulation by growth hormone of lipoprotein lipase gene expression is mediated by c-fos protoonco-gene. *Endocrinology* 1993;132:53-60.
76. Kimura H, Okharu Y, Katoh K, Ishii H, Sunahara N, Takagi A et al. Development and evaluation of a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of lipoprotein lipase mass in human plasma. *Clin Bioch* 1999;32:15-23.
77. Wicher I, Sattler W, Ibovnik A, Kostner GM, Zechner R, Malle E. Quantification of lipoprotein lipase (LPL) by dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. Comparison of immunoreactivity of LPL mass and enzyme activity of LPL. *J Immunol Meth* 1996;192:1-11.
78. Klose G, De Grella R, Greten H. A comparative study of human tissue and post-heparin plasma triglyceride lipases. *Atherosclerosis* 1976;25:175-82.
79. Olivecrona T, Bengtsson G, Marklund SE, Lindahl U, Hook M. Heparin-lipoprotein lipase interactions. *Fed Proc* 1977;36:60-5.
80. Nozaki S, Masaharu K, Matsuzawa Y, Seiichiro T. Sensitive non-radioisotopic method for measuring lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in post-heparin plasma. *Clin Chem* 1984;30:748-51.
81. Duque M, Graupner M, Stutz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F et al. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res* 1996;37:868-76.
82. Zandonella G, Haalck L, Spener F, Faber K, Paltauf F, Hermetter A. Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyl diacylglycerols. Effect of substrate solubilization. *Eur J Biochem* 1995;231:50-5.
83. Eguchi Y. Analysis of lipoprotein lipase activity using high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2002;16:500-3.
84. Nikkila EA, Huttunen JK, Ehnholm C. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes* 1977;26:11-21.
85. Pfeifer MA, Brunzell JD, Best RG, Judzewitsch JB, Halter, Porte D Jr. The response of plasma triglyceride, cholesterol, and

- lipoprotein lipase to treatment in non-insulin-dependent diabetic subjects without familial hypertriglyceridemia.* Diabetes 1983;32:525-31.
86. Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD. *Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity.* J Clin Invest 1975;56:1108-17.
87. Brunzell JD, Porte D Jr, Bierman EL. *Reversible abnormalities in post-heparin lipolytic activity during the late phase of release in diabetes mellitus.* Metabolism 1975;24:1123-38.
88. Taskinen MR, Kuusi T, Helve E, Nikkila EA, Yki-Jarvinen H. *Insulin therapy induces anti-atherogenic changes of serum lipoproteins in noninsulin-dependent diabetes.* Arteriosclerosis 1988;8:168-77.
89. Agardh CD, Nilsson-Ehle P, Schersten B. *Improvement of the plasma lipoprotein pattern after institution of insulin treatment in diabetes mellitus.* Diabetes Care 1982;5:322-5.
90. Annuzzi G, Giacco R, Patti L, Di Marino L, Santangelo C, De Natale C et al. *Abnormal postprandial chylomicron response and decreased adipose tissue lipoprotein lipase activity in type 2 diabetes are independent of insulin resistance.* Diabetologia 2005;48:A96.
91. Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S et al. *Exogenous and endogenous postprandial abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels.* J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2153-9.