



磷脂酶 A2 在心血管疾病动物实验中的研究进展

杨钦钦, 陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 磷脂酶 A2 (PLA2) 是一类能催化脂蛋白和膜甘油磷脂水解的酶族, 主要包括分泌型磷脂酶 A2 (sPLA2)、胞浆型磷脂酶 A2 (cPLA2)、钙离子非依赖型磷脂酶 A2 (iPLA2) 和脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2)。sPLA2, cPLA2, iPLA2 和 Lp-PLA2 与多种疾病密切相关, 尤其在心血管疾病中的研究成为近年来的热点。本文就近几年 PLA2 在心血管疾病动物中的实验研究作一综述。

【关键词】 磷脂酶 A2; 心血管疾病; 动物实验

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0055-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 012. 011

Progress of animal experimental research on phospholipase A2 in cardiovascular diseases

YANG Qin-qin, CHEN Min-li

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Phospholipase A2 (PLA2) is a class of enzymes with the ability to catalyze hydrolysis of lipoproteins and glycerophospholipid in the membrane, mainly including secreted PLA2 (sPLA2), cytosolic PLA2 (cPLA2), Ca^{2+} -independent PLA2 (iPLA2) and lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2). They are closely related to many diseases. The studies of the role of PLA2 in cardiovascular diseases have been a hot topic in recent years. This paper focuses on the recent advances in research on the effects of PLA2 on cardiovascular diseases in animal experiments.

【Key words】 Phospholipase A2; Cardiovascular diseases; Animal experiments

磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 是一种能催化膜磷脂甘油分子水解的酶, 生成游离脂肪酸和溶血磷脂, 如花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 和溶血磷脂^[1-2]。水解物通过不同代谢途径在体内发挥生理作用, 如膜磷脂降解、能量代谢、信号传导、血液凝固、质膜重建等^[3-7], 具有广泛的生物活性。至今已发现磷脂酶 A2 超家族有 27 个成员, 主要分为四大类: 1、分泌型磷脂酶 A2 (secreted phospholipase A2, sPLA2); 2、胞浆型磷脂酶 A2 (cytosolic phospholipase A2, cPLA2); 3、钙离子非依赖型磷脂酶 A2 (calcium-

independent phospholipase A2, iPLA2); 4、脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)。目前研究发现 sPLA2 与炎症、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)、肿瘤等疾病紧密相关; cPLA2 涉及炎症、中枢神经系统疾病等病理过程; iPLA2 在脂类代谢、肿瘤等生理病理过程中必不可少; Lp-PLA2 在 AS 形成中发挥重要作用。对这些疾病研究中, PLA2 在心血管疾病中的作用逐渐成为了研究热点。

【基金项目】 1. 国家科技重大专项子课题 (2012ZX09103101-008), 2. 受“浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目”资助。

【作者简介】 杨钦钦 (1988 -), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理与比较医学, E-mail: qqy_mengxiangz8@163.com。

【通讯作者】 陈民利 (1963 -), 女, 教授、硕士, 研究方向: 实验动物与比较医学, E-mail: cmli991@aliyun.com。

心血管疾病是全球发病率和死亡率较高的疾病之一,而动脉粥样硬化是其重要的病理基础,动脉炎症在 AS 和恶性心血管事件中起着核心作用。近年来,研究发现 PLA2 与心血管病变(如动脉粥样硬化、心肌缺血等)有着密切的联系,sPLA2 涉及 AS 从早期病变(脂纹)到复合病变各阶段的生理病理过程;cPLA2 和 iPLA2 很可能通过形成脂质媒介促进 AS 形成;而 Lp-PLA2 已成为动脉粥样硬化的一种新型炎症标志物。因此,探究 PLA2 在 AS 相关炎症性疾病中的作用至关重要,利用动物实验研究能进一步揭示 PLA2 与 AS 的关系。

随着生物技术和应用,利用各种转基因、基因敲除小鼠或其他动物模型为研究 PLA2 在 AS 中的作用提供了新的途径。各 PLA2 基因操作小鼠展现的 AS 表型可能不单归因于脂质代谢信号的改变,更多的可能是类花生酸信号变化,但也可能是

各种靶向细胞膜的降解。本文结合近年来国内外对 PLA2 在心血管疾病中的动物实验研究报道逐个进行阐述。

1 sPLA2 与 AS 在动物实验中的研究

sPLA2 是一种 Ca^{2+} 依赖的分泌型胞外酶,分子量为 14 ~ 18 kDa^[8]。100 多年前,从眼镜蛇毒液中分离出 sPLA2s 的首个成员,命名为 group IA(GIA),开启了 PLA2 家族的篇章。至今,在哺乳动物中已发现 11 种 sPLA2 亚型,分别为 GIB、IIA、IIC、IID、IIE、IIF、III、V、X、XIIA 和 XIIB。而人类基因组只能编码 9 种蛋白,其中 IIC 型 sPLA2 是以假基因形式存在于人体内,鼠类中含有上述的全部 PLA2。sPLA2s 与疾病的关系在动物实验中进行了颇多研究,sPLA2 亚型的分布及在小鼠中的表现归纳见表 1。

表 1 sPLA2 主要分布及在 KO/Tg 小鼠中的表现
Tab.1 The main distribution and phenotypes of sPLA2 in KO/Tg mice

亚型 Subtypes	主要分布 Main distribution	在 KO/Tg 小鼠中表现 Phenotypes in KO/Tg mice
IB	脑、肝、脾、肺、肾、胰、卵巢 Brain, liver, spleen, lung, kidney, pancreas, ovary	KO 小鼠:胃肠道磷脂消化减少,预防肥胖和胰岛素抵抗 KO mice:reduced gastrointestinal phospholipid digestion, protection from obesity and insulin resistance
IIA	急性相血清、肠粘膜、前列腺上皮细胞 Acute phase serum, intestinal mucosa, prostatic epithelial cells	KO 小鼠:改善关节炎、结直肠癌易感性增加; Tg 小鼠:促 AS、炎症恶化、关节炎、秃头、表皮增生及皮肤癌 KO mice:protection from inflammatory arthritis, increased susceptibility to colorectal cancer. Tg mice:increased atherosclerosis, exacerbation of inflammation, arthritis, alopecia, epidermal hyperplasia and skin cancer
IIC	睾丸 Testis	未知 Unkown
IID	脾、肺、胸腺、胰、卵巢、皮肤、嗜酸细胞 Spleen, lung, thymus, pancreas, ovary, skin, eosinophils	未知 Unkown
IIE	甲状腺、子宫、胚胎 Thyroid gland, uterus, embryo	未知 Unkown
IIF	肝、肾、胸腺、子宫、胎盘、睾丸 Liver, kidney, thymus, uterus, placenta, testis	未知 Unkown
III	心、肝、肾、胰、骨骼肌、白细胞 Heart, liver, kidney, pancreas, skeletal muscle, leukocyte	KO 小鼠:附睾精子成熟受损; Tg 小鼠:促 AS、老年性系统炎症 KO mice:impaired epididymal sperm maturation. Tg mice:increased atherosclerosis, systemic inflammation after aging
V	心、眼、胰、巨噬细胞、中性细胞、肥大细胞 Heart, eye, pancreas, macrophages, neutrophils, mastocytes	KO 小鼠:腹膜炎、呼吸道炎症、AS 减少,细菌易感性增加; Tg 小鼠:新生幼鼠由于呼吸道缺陷死亡 KO mice:reduced peritonitis, airway inflammation and atherosclerosis; increased susceptibility to bacterial infection. Tg mice:neonatal death due to respiratory defects
X	肺、胃、肠、睾丸、巨噬细胞 Lung, stomach, intestine, testis, macrophage	KO 小鼠:气喘反应减少、防止心肌缺血损伤、精子生育力受损、肾上腺皮质酮分泌增加、肥胖;Tg 小鼠:由于呼吸道疾病死亡 KO mice:reduced asthmatic response, protection from ischemic myocardia linjury, impaired fertility of spermatozoa, increased adrenal corticosterone secretion. Tg mice:early death due to respiratory defects
XIIA	心、肾、胰、骨骼肌 Heart, kidney, pancreas, skeletal muscle	未知 Unkown
XIIB	心、肝、肾、骨骼肌 Heart, liver, kidney, skeletal muscle	未知 Unkown

注:KO(knockout)小鼠:基因敲除小鼠;Tg(transgenic)小鼠:转基因小鼠。

Note. KO mice:knockout mice; Tg mice:transgenic mice.

sPLA2 在 AS 病变动物中的实验研究已成为此研究领域的热门话题。越来越多的研究表明 sPLA2-IIA, sPLA2-III, sPLA2-V 和 sPLA2-X 很可能在血管壁上有多种致 AS 特性^[9]。脂蛋白颗粒(如 LDL 和 HDL)表面覆盖的 PC 是 sPLA2 的底物。sPLA-X, V, III, II 都能水解 PC, 其中 X 型的水解能力最强。sPLA2 水解脂蛋白表面 PC 生成的游离脂肪酸和 LPC 有转换血管活性和促炎性作用, 从而加速 AS 的形成。sPLA2 水解 LDL 形成更多小致密并带负电荷的修饰 LDL。这些 LDL 比较容易渗进血管壁, 形成氧化性 LDL(ox-LDL), 诱导巨噬细胞泡沫化, 最终导致 AS 的发生^[10]。同时水解 HDL 能降低这些抗 AS 颗粒促进胆固醇从脂质丰富的泡沫细胞中外流的能力。动脉斑块中修饰的 LDL 比循环 LDL 含有较少的 PC 和更多的 LPC, 这表明斑块部位的 LDL 经过了 sPLA2 的脂解修饰。事实上, LDL 被 sPLA2 水解后, 会导致磷脂降解颗粒上 apoB-100 的结构改变, 从而促进了聚合作用^[11-12]。

1.1 sPLA2-IIA 与 AS 的动物实验研究

大量研究表明在 AS 病变的各个阶段都能发现 sPLA2-IIA, 主要存在于巨噬细胞富集的区域、动脉粥样硬化的非细胞脂类核心及病变血管内膜的细胞外基质中。Li WH 等^[13]研究发现 sPLA2-IIA 在 AS 大鼠血管平滑肌细胞、心肌组织及脂肪组织中的表达均升高。Niessen 等^[14]认为 sPLA2-IIA 是 AS 和心肌细胞缺血性损害的介质, 可作为心血管疾病中的一个重要炎症因子。sPLA2-IIA 能诱导许多脂质介质生成, 如非酯化脂肪酸、氧化性非酯化脂肪酸、溶血磷脂等, 促发下游多种炎症信号传导, 从而导致 AS 斑块形成。

许多 AS 动物研究也表明 sPLA2 与 AS 斑块形成紧密相关。PLA2G2A-Tg 小鼠持续饲喂高胆固醇饮食后, 血管中出现 AS 斑块的几率大大增加^[15]。在这类小鼠的动脉粥样斑块中发现有 sPLA2-IIA, 而且相比与正常组其血浆 HDL 降低, LDL 和活性氧化磷脂含量升高。Ivandic 等^[16]研究揭示 PLA2G2A-Tg 小鼠即使在低脂饮食下也能呈现出 AS 病变, 免疫组化印染显示 sPLA2 出现在转基因小鼠的 AS 病变斑块中。转基因小鼠巨噬细胞分泌的 sPLA2-IIA 能增强 12/15-脂氧合酶(12/15-LOX)的表达, 引起氧化压力产生, 被认为是 AS 形成的一个重要因子^[17]。尤其是, 当将 PLA2G2A-Tg 小鼠的骨髓细胞移植到 Ldlr^{-/-} 的小鼠后, 尽管血清脂蛋白浓度变

化不大, 但是后者主动脉弓部和窦部的 AS 病变程度显著增加^[18]。由此推论, sPLA2-IIA 可以独立于脂蛋白代谢而促进 AS 的形成。

1.2 sPLA2-V 与 AS 的实验研究

近来研究发现 sPLA2-V 比 sPLA2-IIA 具有更强的水解 LDL 和 HDL 表面 PC 的活性, 经 sPLA2-V 修饰后的 LDL 能更有效诱导巨噬细胞转化成泡沫细胞, 提示 sPLA2-V 可能是促进 AS 形成中的一个更重要的酶^[19]。事实上, sPLA2-V 在动物 AS 斑块中含量的确更高。含脂量高的饮食能上调大动脉中 sPLA-V 的表达, 而且自发性 AS 的 apoE^{-/-} × Ldlr^{-/-} 小鼠的动脉斑块中 sPLA2-V 也显著表达^[8]。因为 sPLA2-V 通过结合蛋白聚糖后能使其对 LDL 的作用活性大大增强, 所以巨噬细胞能依赖于蛋白聚糖(粘结蛋白聚糖-4)途径而不是清道夫受体 SR-A 和 CD36 摄取由 sPLA2-V 修饰的 LDL, sPLA2-V 形成的游离脂肪酸刺激巨噬细胞通过 NF-κB 途径诱发促炎因子生成, 最终导致 AS 发生^[20]。

更重要的是, Ldlr^{-/-} 小鼠接受逆转录酶病毒介导的 pla2g5 基因移植之后, 其升主动脉根部的斑块面积明显增加, 局部区域伴随有胶原沉积, 然而移植 pla2g5^{-/-} 骨髓细胞小鼠的主动脉弓部和胸主动脉中的斑块显著减少^[21]。这些实验结果充分说明了巨噬细胞相关的 sPLA2-V 参与动脉粥样硬化的发展。另外, 缺乏 sPLA-V 的 ApoE^{-/-} 小鼠斑块中血小板胶原含量也显著降低^[22]。值得注意的是, 这些骨髓移植方法只能评价巨噬细胞或其他造血细胞中 sPLA2-V 的作用, AS 非造血细胞中 sPLA2-V 的作用有待进一步探究。

1.3 sPLA2-X 与 AS 的实验研究

sPLA2-X 和 sPLA2-V 在体外均能有效水解脂蛋白上的卵磷脂, 而且 sPLA-X 水解活性比 sPLA2-V 更强^[12]。sPLA2-X 作用于 LDL 颗粒产生小而致密的 LDL 颗粒, 促进巨噬细胞形成, 以及增加内皮细胞粘附因子的表达, 最终导致 AS 形成。sPLA2-X 脂解修饰之后的 HDL, 其促进胆固醇从载脂巨噬细胞中外流的能力被削弱。最近, Zack M 等^[23]在动物实验中的研究表明缺失 sPLA2-X 的 ApoE^{-/-} 小鼠能显著减少血管紧张素-II(Ang-II)诱发的腹主动脉瘤和 AS 的发生, 同时一些脂类促炎因子的形成也降低。

当动脉粥样硬化发生在冠状动脉时则容易引起心肌梗塞, 严重威胁人类的生命。在心肌缺血再灌

注实验中,Pla2g10^{-/-}小鼠的心肌梗死面积和嗜中性粒细胞数量显著下降,且当受辐照的野生型小鼠再用 Pla2g10^{-/-}骨髓细胞重造后,心肌梗死面积显著变少,说明 sPLA2-X 也是一个很强促 AS 因子^[24]。Pla2g10^{-/-}小鼠的缺血区域显示出较低的中性粒细胞含量,分离这些 Pla2g10^{-/-}中性粒细胞能减少 AA 释放以及产物 LTB4 的分泌,也能改善呼吸道疾病。而且,另有研究发现 sPLA2 抑制剂能减少野生型小鼠的心肌缺血面积。这些动物实验研究结果使人们进一步认识了 sPLA2-X 在中性粒细胞介导心肌损伤中的作用,未来应用合适的小鼠模型将会认识 sPLA2-X 在斑块中更多的作用。

1.4 sPLA2-III 与 AS 的实验研究

sPLA2-III 也能有效水解 LDL 和 HDL 中的磷脂质。体内研究表明 sPLA2-III 修饰的 LDL 也类似于 sPLA2-V 或 sPLA2-X 作用的 LDL,能促进巨噬细胞转化成泡沫细胞。ApoE^{-/-}小鼠中能检测到 sPLA2-III 在斑块中聚集^[25]。在 PLA2G3-Tg 小鼠研究中显示,当其摄食导致 AS 饮食后大动脉中会形成比 ApoE 敲除小鼠更严重的动脉斑块,而且炎症因子(如 LPC 和 TXA2)的含量也随着升高。由此说明,sPLA2-III 与动脉粥样硬化有潜在的联系,但是进一步的病理生理关系将有待于在 pla2g3^{-/-}小鼠中进行更多的后续研究。

另外,在动物 AS 斑块中也能检测出其他的 sPLA2,包括 sPLA2-IIID, IIE 和 IIF。sPLA2-IIF 亦能水解脂蛋白表面的 PC,其功效作用值得进一步探究。综上所述,X, V, III 和 II-PLA2 是血浆中主要的促动脉粥样硬化因子,通过水解 LDL 和 HDL 表面的 PC,产生 LPC 和小而致密的 LDL,促进巨噬细胞、平滑肌细胞泡沫化以及胶原的聚积,最终导致动脉粥样硬化斑块的发生和发展。

1.5 sPLA2 与其他相关疾病的实验研究

sPLA2 还与糖尿病、高脂血症、肥胖等疾病相关。脂肪饲喂的 Pla2g1b^{-/-}小鼠与普通食物饲喂的 Pla2g1b^{+/+}小鼠相比,虽然前者脂肪吸收多但两者体重相当^[26]。同时喂以低脂饮食时,Pla2g1b^{-/-}小鼠则展示出了更佳的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性,表明 PLA2G1B 能调节肥胖症、葡萄糖代谢和胰岛素敏感性。在研究 PLA2G2A 基因自然突变的 C57BL/6 小鼠时发现炎症也提高了脂肪组织中 PLA2G2A 的表达,这表明 PLA2G2A 不仅能促进 AS 发生,而且也是其他炎症代谢性疾病(如糖尿病)的

促炎因子^[27]。

2 cPLA2 和 iPLA2 与心血管疾病在动物实验中的研究

2.1 cPLA2 与心血管疾病在动物实验中的研究

在 PLA2 家族中列为 IV 型,属于此家族中的胞外酶,在哺乳类动物中已经鉴别出 6 大种,即 cPLA2 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ξ (即 GIVA、IVB、IVC、IVD 和 IVF),而人类中仅有 A-D 四种亚型。GIVA cPLA α 是最为广泛研究的一个酶,在人类和鼠科动物的大脑、肝、肾、胰等组织中普遍表达,具有 PLA2 和溶血磷脂酶活性,也是唯一一个对含 AA 的磷脂底物有特异性的酶。cPLA α 受刺激时释放类花生酸的前体物质 AA,因此在炎症性疾病中有重要作用。近年来的研究表明,心血管疾病是一种炎症性疾病,而 cPLA α 能产生各种脂质介质诱发血管炎症和动脉粥样硬化,与心血管疾病的发生发展关系密切。

动脉粥样硬化病变始于内皮损伤,还有血脂沉积和血小板粘附释放的多种炎症因子(如 TXA2)共同作用下,可激活内皮细胞和血管平滑肌细胞,合成胶原等细胞外基质,在这些复杂因子的协同作用下形成 AS,而 cPLA2 在此过程中起到了关键性作用^[28]。目前,cPLA2 的研究主要集中在 cPLA2 α ,在动脉炎症反应中的机制研究包括:①、cPLA2 α 诱导炎症因子及趋化因子(IL-1 β , IL-6, TNF- α)生成;②、cPLA2 α 通过“cPLA2 α -AA-NADPH 氧化酶-超氧阴离子”途径产生大量氧自由基;③、cPLA2 α 通过 5-LOX 促进病理状态下诱导型一氧化氮合酶(NOS)生成,造成血管损伤。因此,cPLA2 α 参与了广泛的生理病理反应。

血小板活化依赖于 COX-1 途径参与促血栓因子 TXA2 的形成。Wong DA^[29] 实验室研究发现 pla2g4a^{-/-}小鼠中 cPLA2 α 在胶原刺激血小板产生 TXA2 过程中是必不可少的,而 ADP 诱导 TXA2 形成不依赖 cPLA2 α 。此外,pla2g4a^{-/-}小鼠体外血小板聚集只有极少量地下降,这可能是由于冗余 PLA2 产生的小部分 TXA2 能有效保护聚集。但是,依赖于 TXA2 的血管收缩缺失解释了 pla2g4a^{-/-}小鼠流血时间延长以及免于血管栓塞疾病的原因。

cPLA2 α 也存在于各种细胞类型的脂肪液滴中。这些脂肪液滴由合成酶(神经酰胺激酶)通过 C1P 途径合成,并依赖于 JNK 途径在 cPLA2 α 的 Ser⁵⁰⁵ 位点通过磷酸化作用进行诱导。而且,pla2g4a^{-/-}小鼠的体内研究发现它们不会随着年龄增长或饮食

(正常或高脂饮食)而在脂肪细胞或肝脏中积累脂肪液滴,脂肪形成或促炎介质也相应减少^[30]。同理,pla2g4a^{-/-}小鼠在高脂饮食下也能抵抗形成 AS。

2.2 iPLA2 与心血管疾病在动物实验中的研究

iPLA2 在 PLA2 家族中列为 VI 型,亦属胞内酶,催化活性不依赖于 Ca²⁺。iPLA2 家族具有相同的蛋白域,这个蛋白域最初是从马铃薯糖蛋白(patatin)中发现的。因此,iPLA2 也叫 PNPLA2,包括 GVIA (iPLA2 β ; PNPLA9), GVIB (iPLA2 γ ; PNPLA8), GVIC (iPLA2 δ ; PNPLA6), GVID (iPLA2 ϵ ; PNPLA3), GVIE (iPLA2 ζ ; PNPLA2) 和 GVIF (iPLA2 η ; PNPLA4) 等 6 种亚型,大部分可以水解脂肪。基因变异小鼠模型使人们对 iPLA2 家族在脂质代谢和能量稳态方面有了进一步的认识,各 iPLA2 在动物疾病中也发挥着不可或缺的作用。

当前 iPLA2 的研究主要集中于 iPLA2 β 。iPLA2 β 是一种 Ca²⁺ 非依赖型酶催化剂,它一直被认为在磷脂重建、细胞增殖、迁移等过程中起着重要作用。现在越来越多的实验研究发现 iPLA2 β 在各种心血管疾病起着重要作用,如血管重构、高血压、心肌缺血、冠心病等^[31]。

在转基因模型小鼠中,Shu Liu 等^[32]观察到 Pla2g6^{-/-}小鼠表现出动脉平滑肌细胞 Ca²⁺ 平衡失调症状,血管损伤的 Pla2g6^{-/-}小鼠由于 COX-2 途径依赖的 PGE2 生成减少,平滑肌细胞迁移和增殖也相应降低,所以抑制 iPLA2 β 能减轻血管壁炎症进而预防心血管疾病。Lindsay E 等^[33]进一步在 iPLA2 β -Tg 小鼠研究中表明 iPLA2 β 在血管平滑肌中超表达,通过 12/15-LOX 和 c-Jun 途径恶化 Ang-II 诱导的平滑肌细胞肥大、血管重构和高血压等生理病理过程。PKC 能介导 iPLA2 β 上调,进而活化 RhoA/Rho-kinase/CPI-17,导致糖尿病动物的血管平滑肌细胞过度收缩,所以 iPLA2 β 是血管细胞中血管收缩和放松、Ca²⁺ 平衡以及脂质媒介合成的重要介质。

另有研究^[34]表明 iPLA2 β -Tg 小鼠在心脏灌注致冠状动脉闭塞时会引起大量脂肪酸和 LPC 释放到静脉及缺血部位,从而在短时间内局部缺血造成恶性心律失常。但是,当对 iPLA2 β -Tg 小鼠用 BEL 进行心肌缺血预处理后,脂肪酸和 LPC 的积累消失,还能保护小鼠免于遭受快速心律失常。这些结果说明心肌 iPLA2 β 在心脏缺血时活化,通过介导膜

磷脂水解在急性心肌缺血期间诱导致命的恶性心律失常。

3 Lp-PLA2 与 AS 在动物实验中的研究

血小板活化因子乙酰水解酶(platelet activating factor acetylhydrolase, PAF-AH) 家族已经有四种酶被鉴别出来,最被熟知的是分泌型脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)。其余三种均为胞内蛋白质,分别为 II 型 PAF-AH(GVII PLA2) 和 I 型 PAF-AH(GVIII PLA2),I 型 PAF-AH 包括 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 两个亚种^[31]。Lp-PLA2 是一种与 AS 发生机制密切相关的酶^[35],目前已被确立为预测 AS 发生的独立风险因子。

Lp-PLA2 和 sPLA2 都能水解脂蛋白产生脂质介质和修饰脂质颗粒而在心血管疾病中发挥独特的作用,但是它们各自的作用和潜在机制是明显不同的。Lp-PLA2 能水解 PAF 和氧化磷脂 sn-2 位置的酰基。在人类中,这个酶的主要部分结合于血浆 LDL 和 HDL apoB100 的 C 端,但是小鼠由于缺乏与之结合的关键性残基,所以此酶与小鼠 LDL 无关。最初发现用 PAF-AH 预处理的小鼠能阻断 PAF 诱导的哮喘,也能使动物避免患败血症,因此它能水解有害的 PAF 从而对机体有保护作用。但是越来越多的研究发现,Lp-PLA2 更是一种促炎因子。Lp-PLA2 在 LDL 氧化过程中由于清除氧化磷脂(oxLDL)产生溶血卵磷脂(LPC)和氧化游离脂肪酸(oxFFA)两种关键的促炎介质^[36],引起单核细胞聚集,内皮功能改变,诱导内皮细胞粘附分子表达,增加血小板源性生长因子和表皮生长因子的表达,泡沫细胞形成,从而促进 AS 形成。这两种促炎介质,尤其是 LPC 作为 G 蛋白偶联受体 G2A 的调控者,能调节巨噬细胞和 T 细胞的迁移、活化嗜中性粒细胞和巨噬细胞、吞噬清除凋亡细胞等,促进动脉斑块进一步发展,最后导致脂质坏死核心形成。Lp-PLA2 在坏死核心快凋亡巨噬细胞和易损斑块纤维帽中高度表达,但不包括稳定斑块,因此 Lp-PLA2 水解物对斑块稳定性起着关键性作用。

在 AS 动物模型的大量研究中发现猪是一种脂蛋白结构最接近于人类的理想实验动物^[37]。糖尿病和高胆固醇血症(DM-HC)猪模型中发现血清和斑块中 Lp-PLA2 活性显著增加,斑块形成明显,Lp-PLA2 的基因表达量也相应升高,伴随 MCP-1、MMP-9、组织蛋白酶 S 等炎症基因的高度表达^[38]。刘军妮等^[39]发现血管有易损斑块的兔子血清中 Lp-

PLA2 显著升高,表明 Lp-PLA2 与斑块的不稳定性相关性好。大鼠给予 LPS 刺激时,Lp-PLA2 在肝脏、肺、胸腺、脾、肾、腹膜巨嗜细胞、Kupffer 细胞以及循环白细胞中亦显著增加^[31]。但是,因为小鼠中 Lp-PLA2 与 LDL 无关,所以只能应用转基因小鼠进行研究。ApoE^{-/-}小鼠经高脂诱导后,Lp-PLA2 血浆含量显著升高^[40]。同样,高脂诱导 LDLR^{-/-}小鼠形成 AS,小鼠中血清 Lp-PLA2 活性及 IL-6、hs-CRP 和 PAF 等炎症因子含量显著升高^[41]。现代研究发现,Darapladib 是 Lp-PLA2 的一种选择性有效抑制剂,已进行到 III 期临床试验,它能有效抑制 Lp-PLA2 的活性和含量,因此对动脉粥样硬化的预防和治疗有积极作用^[42]。Hui Zhang 等^[40]研究发现慢病毒介导的 RNAi 不仅能抑制 Lp-PLA2 活性,还能使动物的斑块面积更小以及斑块稳定性更高,因此 RNAi 可能是一种更有效的 Lp-PLA2 抑制剂。

4 总结

对 PLA2 的研究已有多年历史,但其在体内的功能作用还不是很清楚。通过对各相应 PLA2 基因敲除或转基因小鼠进行研究,为人们了解哺乳动物 PLA2 的生理功能提供了新的视角,目前关于 PLA2 在心血管疾病中的研究已成为热点问题。在血循环和动脉壁中的 PLA2 与 AS 的形成均有关,是心血管事件的危险因素。sPLA2 和 Lp-PLA2 可作为预测 AS 发生的风险因子,cPLA2 和 iPLA2 在 AS 形成过程中也起着非常重要的作用,因此 PLA2 在研究心血管疾病中有着广泛的应用前景。但 PLA2 调节血管炎症及斑块发展的确切体内机制均有待进一步探究。未来,将会在基因敲除或转基因动物中进行更深入的研究以明确 PLA2 在心血管疾病中的作用,这也有助于开发以 PLA2 为靶标的药物从而有效治疗动脉粥样硬化疾病。

参考文献:

- [1] Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(11): 1246 - 1259.
- [2] Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009, 49: 123 - 150.
- [3] Triggiani M, Granata F, Giannattasio G, et al. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116 (5): 1000 - 1006.
- [4] Diaz BL, Arm JP. Phospholipase A2 [J]. *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids*, 2003, 69(2-3): 87 - 97.
- [5] Balsinde J, Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells [J]. *Cell Signal*, 2005, 17 (9): 1052 - 1062.
- [6] Brown WJ, Chambers K, Doody A. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function [J]. *Traffic*, 2003, 4(4): 214 - 221.
- [7] Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Diversity of phospholipase A2 enzymes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(8): 1168 - 1173.
- [8] Boyanovsky BB, Webb NR. Biology of secretory phospholipase A2 [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23(1): 61 - 72.
- [9] Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2 [J]. *Annu Rev Biochem* [J]. 2008, 77: 495 - 520.
- [10] 张良, 韩丹, 赵诗萌, 等. OX-LDL 与单核巨噬细胞相互作用促进动脉粥样硬化形成 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23 (4): 31 - 36.
- [11] Rosenson RS, Hislop C, McConnell D, et al. Effects of 1-H-indole-3-glyoxamide (A-002) on concentration of secretory phospholipase A2 (PLASMA study): a phase II double-blind, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2009, 373 (9664): 649 - 658.
- [12] Rosenson RS. Future role for selective phospholipase A2 inhibitors in the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23(1): 93 - 101.
- [13] Wei HL, Chang QS, Qiang X, et al. Simvastatin inhibits sPLA2 IIa expression in aorta and myocardium [J]. *Arch Med Res*, 2009, 40(2): 67 - 72.
- [14] Niessen HW, Krijnen PA, Visser CA, et al. Type II secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 60(1): 68 - 77.
- [15] Romano M, Romano E, Björkerud S, et al. Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A2 in atherosclerotic and nonatherosclerotic regions of human arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(4): 519 - 525.
- [16] Webb NR, Bostrom MA, Szilvassy SJ, et al. Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2): 263 - 268.
- [17] Tietge UJ, Pratico D, Ding T, et al. Macrophage-specific expression of group IIA sPLA2 results in accelerated atherogenesis by increasing oxidative stress [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(8): 1604 - 1614.
- [18] Ghesquiere SA, Gijbels MJ, Anthonen M, et al. Macrophage-specific overexpression of group IIA sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(2): 201 - 210.

- [19] Boilard E, Lai Y, Larabee K, et al. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis[J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2(5): 172–187.
- [20] Boyanovsky BB, Li X, Shridas P, et al. Bioactive products generated by group V sPLA (2) hydrolysis of LDL activate macrophages to secrete pro-inflammatory cytokines [J]. *Cytokine*, 2010, 50(1): 50–57.
- [21] Bostrom MA, Boyanovsky BB, Jordan CT, et al. Group V secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis; evidence from genetically altered mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(3): 600–606.
- [22] Boyanovsky B, Zack M, Forrest K, et al. The capacity of group V sPLA2 to increase atherogenicity of ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mouse LDL in vitro predicts its atherogenic role in vivo [J]. *ArteriosclerThrombVascBiol*, 2009, 29(4): 532–538.
- [23] Zack M, Boyanovsky BB, Shridas P, et al. Group X secretory phospholipase A2 augments angiotensin II-induced inflammatory responses and abdominal aortic aneurysm formation in apoE-deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1): 58–64.
- [24] Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, et al. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice [J]. *Circulation*, 2008, 117(23): 2977–2985.
- [25] Sato H, Kato R, Isogai Y, et al. Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33483–33497.
- [26] Hui DY. Phospholipase A2 enzymes in metabolic and cardiovascular diseases[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(3): 235–240.
- [27] Dutour A, Achard V, Sell H, et al. Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(2): 963–967.
- [28] 韩俊愈, 李卫华. 胞浆型磷脂酶 A2 与冠心病的相关性研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2008, 5: 037.
- [29] Wong DA, Kita Y, Uozumi N, et al. Discrete role for cytosolic phospholipase A2 α in platelets studies using single and double mutant mice of cytosolic and group IIA secretory phospholipase A2[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(3): 349–357.
- [30] Ii H, Yokoyama N, Yoshida S, et al. Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice[J]. *Plos ONE*, 2009, 4(12): e8089.
- [31] Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, et al. Recent progress in phospholipase A2 research: from cells to animals to humans[J]. *Prog Lipid Res*, 2011, 50(2): 152–192.
- [32] Liu S, Xie Z, Zhao Q, et al. Smooth muscle-specific expression of calcium-independent phospholipase A2 β (iPLA2 β) participates in the initiation and early progression of vascular inflammation and neointima formation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(29): 24739–24753.
- [33] Calderon LE, Liu S, Su W, et al. iPLA2 β overexpression in smooth muscle exacerbates angiotensin II-induced hypertension and vascular remodeling[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e31850.
- [34] Ramanadham S, Yarasheski KE, Silva MJ, et al. Age-related changes in bone morphology are accelerated in group VIA phospholipase A2 (iPLA2 β)-null mice [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(4): 868–881.
- [35] Cai A, Zheng D, Qiu R, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): A novel and promising biomarker for cardiovascular risks assessment [J]. *Dis Markers*, 2013, 34(5): 323–331.
- [36] Steen DL, O'Donoghue ML. Lp-PLA2 inhibitors for the reduction of cardiovascular events[J]. *Cardiol Ther*, 2013, 2(2): 125–134.
- [37] 陈华. 小型猪动脉粥样硬化模型[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(5): 376–380.
- [38] Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development [J]. *Nat Med*, 2008, 14(10): 1059–1066.
- [39] 刘军妮, 徐冬玲, 杜贻萌, 等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与兔易损斑块的相关性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(4): 669–675.
- [40] Zhang H, Zhang JY, Sun TW, et al. Amelioration of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 [J]. *Clin Invest Med*, 2013, 36(1): E32–E41.
- [41] Hu MM, Zhang J, Wang WY, et al. The inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 exerts beneficial effects against atherosclerosis in LDLR-deficient mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(10): 1253–1258.
- [42] Abhijit R, Punit KS. Phospholipase A2 in airway diseases; target for drug discovery[J]. *J Drug Disc Ther*, 2013, 1(8): 28–40.

[修回日期]2014-08-28