

## 5 脂氧合酶途径和动脉粥样硬化的研究进展

葛 颂 综述, 刘新峰 审校

(南京军区南京总医院神经内科, 江苏省南京市, 210002)

[关键词] 病理学与病理生理学; 5 脂氧合酶; 5 脂氧合酶激活蛋白; 白三烯; 半胱氨酰白三烯; 基因多态性; 动脉粥样硬化; 炎症反应

[摘要] 白三烯是一类重要的炎症介质, 由花生四烯酸经过一系列的酶促反应生成, 其中 5 脂氧合酶是关键酶, 因此该反应途径称为 5 脂氧合酶代谢途径。近年来发现 5 脂氧合酶代谢途径在动脉粥样硬化的炎症反应中起着重要的调节作用。阻断 5 脂氧合酶代谢途径可以抑制动脉粥样硬化发生和发展。5 脂氧合酶代谢途径的基因多态性也与心肌梗死和卒中的发病率密切相关。本文就 5 脂氧合酶途径和动脉粥样硬化关系的研究进展做一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是心脑血管疾病的主要原因。在 As 发病机制方面, 主要有脂源性学说、致突变学说、损伤应答学说、炎症免疫学说和受体缺失学说等。其中炎症免疫学说受到广泛重视<sup>[1, 2]</sup>。近年来发现 5 脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LO) 途径在调节 As 炎症反应中发挥重要作用。本文就 5-LO 途径和 As 的关系进行综述。

### 1 5 脂氧合酶途径

当细胞受到各种刺激, 如氧化低密度脂蛋白、高血压、糖尿病以及感染等, 细胞膜溶质型磷脂酶 A2 (cytosolic phospholipase A2, CplA2) 被激活, 催化膜甘油磷脂释放花生四烯酸 (arachidonic acid, AA); AA 结合到 5 脂氧合酶激活蛋白 (five lipoxygenase activating protein, FLAP), 再递呈给已转移到核膜上的 5-LO, 催化 AA 形成 5-氢过氧化二十碳四烯酸 (5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid, 5-HPETE) 和 5-羟二十碳四烯酸 (5-hydroxyeicosatetraenoic acid, 5-HETE), 随即转化为不稳定的白三烯 A4 (leukotriene A4, LTA4)。LTA4 在 LTA4 水解酶和 LTC4 合成酶的作用下, 分别生成 LTB4 和 LTC4; LTC4 又可以转化为 LTD4 和 LTE4, 由于三者均含有半胱氨酰基, 故统称为半胱氨酰白三烯 (cysteinyl Leukotrienes, CysLTs)。白三烯必需和特异性受体结合才能发挥生物学效应。目前已发现两种类型受体: LTB4 受体 (leukotriene B4 receptor, BLTR) 和 cysLTs 受体 (cysteinyl Leukotrienes receptor, cysLTRs)。BLTR 包含 BLT1R 和 BLT2R, cysLTRs 包含 cysLT1R 和 cysLT2R<sup>[3]</sup>。

### 2 5 脂氧合酶与动脉粥样硬化

5 脂氧合酶是调节白三烯生成的关键酶。Spanbroek

等<sup>[4]</sup>用 RT-PCR 和免疫组化法在人粥样硬化的主动脉、颈动脉和冠状动脉中检测到 5-LO 途径成分, 包括 5-LO、FLAP、LTA4 水解酶、LTC4 合成酶以及 BLT1R、BLT2R、cysLT1R 和 cysLT2R; 5-LO 主要表达在巨噬泡沫细胞以及其它炎症细胞如肥大细胞、树突状细胞和中性粒细胞; 在进行性加重的血管损伤中 5-LO 表达阳性细胞明显增多。有脑缺血病史病人的颈动脉斑块中检测到 5-LO、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 2 和 9 表达上调, 它们共同位于泡沫细胞胞浆, 特别是在血管滋养血管周围; 并且症状性斑块中含有大量 HLA-DR 抗原阳性的活化巨噬细胞。这提示 5-LO 途径不仅影响粥样斑块的发展, 而且还影响斑块的稳定<sup>[5]</sup>。

Zhao 等<sup>[6]</sup>在人损伤血管的外膜, 尤其是新生血管区发现 5-LO<sup>+</sup> 巨噬细胞。在载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knock-out, ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠中也发现同样的结果。5-LO<sup>+</sup> 巨噬细胞在主动脉瘤中特别丰富。敲除 5-LO 基因后可以显著地降低动脉瘤形成, 这主要和降低 MMP2 活性和血浆中巨噬细胞炎症蛋白 1α (macrophage inflammatory protein 1α, MIP-1α) 的浓度相关。5-LO<sup>+</sup> 巨噬细胞主要分布在纤维帽的“肩”部<sup>[4, 5]</sup>和动脉瘤周围的肉芽肿<sup>[6]</sup>。这说明 As 血管中 5-LO<sup>+</sup> 巨噬细胞是一个导致组织破坏的炎症活动标志。

### 3 5 脂氧合酶激活蛋白与动脉粥样硬化

5 脂氧合酶激活蛋白由位于染色体 13q12-13 上的 5 脂氧合酶激活蛋白基因 (5-lipoxygenase activating protein gene, ALOX5AP) 编码, 是一种含 161 氨基酸的膜结合蛋白, 能与细胞膜磷脂释放出来的 AA 特异性结合, 将 AA 传递给 5-LO, 并激活 5-LO。FLAP 对于维持 5-LO 的活性、调控白三烯的生成非常重要<sup>[7]</sup>。Jawien 等<sup>[8]</sup>选用 8 周龄雌性载脂蛋白 E 和低密度脂蛋白受体基因 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 都敲除的小鼠, 给与高脂饮食并口服 FLAP 抑制剂 MK-886 [40 μg/(g·d)] 4 个月, 结果发现 MK-886 干预组主动脉斑块面积显著小于对照组, 血脂水平没有明显影响, 但血管胶原和平滑肌细胞增多, 巨噬细胞减少, 从而提高斑块稳定性。

[收稿日期] 2007-07-03

[修回日期] 2007-12-05

[作者简介] 葛颂, 博士研究生, 现在南京大学临床学院 (南京军区南京总医院) 神经内科学习, 主要从事动脉粥样硬化炎症机制的研究, 联系电话为 13776689322, E-mail 为 mouse7778313@sina.com。通讯作者刘新峰, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化基础和临床研究以及脑血管病的介入治疗, 联系电话为 025-80860454, E-mail 为 xliu2@gmail.com。

#### 4 白三烯 B4 和动脉粥样硬化

白三烯 B4 是 LTA4 在 LTA4 水解酶的作用下生成, 具有强烈的促炎作用。LTB4 通过结合 G 蛋白偶联受体 BLT-1 和 BLT-2 发挥作用<sup>[9]</sup>。载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 和 LDLR<sup>-/-</sup> 鼠接受 LTB4 受体拮抗剂 CP-105, 696 干预 35 天后明显减少主动脉脂质浸润、单核细胞聚集和斑块大小, 说明 LTB4 参与了泡沫细胞的形成。在单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 和载脂蛋白 E 基因敲除 (载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>) 鼠, CP-105, 696 却无效, 这表明 LTB4 发挥作用需要 MCP-1 的参与。表达粘附分子对于单核细胞的浸润很重要, CP-105, 696 还可以减少损伤区的整合素 CD11b 水平。这表明上调细胞表面 CD11b 是 LTB4 刺激单核细胞进入血管壁的另一重要机制<sup>[10]</sup>。

从 BLT-1<sup>-/-</sup> 鼠提取的巨噬细胞仅表达低亲和力的受体 BLT-2, 但 LTB4 同样具有趋化性。但载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 鼠敲除 BLT-1 仅在初期 (4~8 周) 可以减少损伤形成, 而对高脂喂养 19 周的小鼠却没有作用。LTB4 改变大鼠嗜碱性粒细胞 (RBL-2H3) 基因表达, 提高脂肪酸易位酶/CD36 和细胞因子 MCP-1/JE/CCL2。LTB4 通过结合受体 BLT-1 和 BLT-2, 刺激 MCP-1 生成, 提高对单核细胞的趋化作用, 提高 CD36 和脂肪酸的聚集, 从而促进单核细胞向泡沫细胞转化<sup>[11]</sup>。

LTB4 对血管平滑肌细胞也有趋化作用, 而对 BLT-1<sup>-/-</sup> 的平滑肌细胞则没有作用。和载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 鼠比, BLT-1<sup>-/-</sup>/载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠显著降低斑块形成。斑块中巨噬细胞和 T 细胞数下降的同时, 血管平滑肌细胞也明显下降。在人颈动脉粥样斑块中, BLT-1 强烈表达在巨噬细胞的同时, 也表达在血管平滑肌细胞中, 特别是在纤维帽中<sup>[12]</sup>。BLT-1 受体拮抗剂 BIIL284 可以减轻大鼠颈动脉球囊拉伤后的内膜增生, 主要因为显性负相 Ik 激酶 B 阻断血管平滑肌 BLT-1 表达上调, 提示 LTB4/BLT-1 信号转导通路依赖核因子  $\kappa$ B<sup>[13]</sup>。

#### 5 半胱氨酰白三烯和动脉粥样硬化

半胱氨酰白三烯具有强烈炎症介导作用, 参与 As 的慢性炎症反应。Allen 等<sup>[14]</sup> 对心脏移植时取下的人心外膜冠状动脉进行研究, 将 LTC4、LTD4 分别作用 As 病人的冠状动脉及非 As 病人 (扩张性心脏病和先天性心肌缺损) 的冠状动脉, 结果为非 As 病人的冠状动脉对 LTC4、LTD4 没有反应, 而 LTC4、LTD4 能够明显诱导 As 病人的冠状动脉收缩。Buck 等<sup>[15]</sup> 发现 As 受试者龈沟液中 CysLTs 浓度明显高于非 As 受试者, 也说明 CysLTs 与 As 有关。人 As 好发部位主动脉、颈动脉和冠状动脉中都检测到 LTC4 合成酶、cysLT1R 和 cysLT2R<sup>[5]</sup>。而以正常髂动脉为对照, 人颈动脉斑块中 LTC4 合成酶、cysLT1R 和 cysLT2R mRNA 水平没有显著升高; 但在动物模型中 cysLT1R 和 cysLT2R mRNA 均明显升高, 在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠, cysLT1R mRNA 升高 2.5 倍, cysLT2R mRNA 升高 3 倍; 在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> 鼠, cysLT1R mRNA 升高 3 倍<sup>[16]</sup>。

体外试验中, Ltzner 等<sup>[17]</sup> 发现人脐静脉内皮细胞 (human

umbilical vein endothelial cells, hUVEC) 主要表达 cysLT2R, IL-4 可以上调 cysLT2R 表达; 巨噬细胞主要表达 cysLT1R; 巨噬细胞生成白三烯经旁分泌和 cysLT2R 作用, 经自分泌和旁分泌和 cysLT1R 作用。CysLTs 可以通过结合 cysLT1R 促进单核细胞 MIP-1 $\alpha$  和 MCP-1 及其受体 CCR2B 的表达<sup>[6, 18]</sup>。IFN- $\gamma$  可以上调内皮细胞 cysLT2R 表达, 促进 CysLTs 介导的炎症反应<sup>[19]</sup>。

#### 6 5 脂氧合酶基因多态性与动脉粥样硬化

人 5-LO 基因启动子包含 8 个 GC 框, 其中 5 个是相连的。人 5-LO 基因启动子自然突变主要涉及相连 GC 框的数目, 这种突变修改了报告基因组。5-LO 基因突变和 As 相关性首先在动物模型中被发现, LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠敲除 5-LO 基因后可以显著抵抗主动脉 As 的进展<sup>[20]</sup>。洛杉矶动脉粥样硬化研究纳入了 470 名健康中年人, 其中 6% 发生了 5-LO 基因突变 (相连 GC 框数目增加或减少), 而 5-LO 基因突变又和颈动脉内膜中膜增厚以及糖尿病相关, 突变的等位基因携带者血浆 CRP 浓度升高 2 倍, 提高 AA 摄入量可以明显促进 As 的发生, 而 r3 脂肪酸摄入量的提高则可以减轻 As 的发生<sup>[21]</sup>。

#### 7 5 脂氧合酶激活蛋白基因多态性与动脉粥样硬化

2004 年 deCODE 研究对冰岛 296 个家族的 713 例心肌梗死患者进行基因筛选, 结果发现编码 FLAP 的基因 ALOX5AP 与心肌梗死和卒中相关。该基因包含 5 个外显子, 4 个内含子, 长度为 31 kb, 含有 4 个标志性单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的单倍体。该研究中发现一个 ALOX5AP 单倍体可以使冰岛人群心肌梗死和卒中的患病风险增高 2 倍, 这一易感单倍体被命名为 HapA; 另一个可以增高英国人心肌梗死患病风险的单倍体, 被命名为 HapB。相对于对照组, 伊屋诺霉素刺激携带 HapA 有心肌梗死病史男性的中性粒细胞可以产生更多的 LTB4<sup>[22]</sup>。2005 年另一项对苏格兰人群的研究 (纳入 450 名缺血性卒中患者和 710 名对照) 结果发现卒中患者 HapA 携带率为 33.4%, 而对照组为 26.4%<sup>[23]</sup>。对中欧人群 (639 名卒中患者, 736 名对照) 的研究结果也发现卒中和 ALOX5AP 多个 SNP 相关, 尤其是在男性患者<sup>[24]</sup>。一项关于 FLAP 抑制剂 DG-031 和心肌梗死的随机、双盲、安慰剂对照的前瞻性研究纳入 268 名冰岛人, 其中 191 名携带 ALOX5AP 突变 (87%) 或者 LTA4 水解酶基因突变 (13%)。DG-031 剂量依赖性地降低血浆中和心肌梗死危险性相关的生化标记物 LTB4、髓过氧化物酶和 C-反应蛋白水平<sup>[25]</sup>。由此说明 ALOX5AP 多态性是通过提高白三烯生成和血管壁的炎症反应参与心肌梗死和卒中的发病。

#### 8 白三烯 A4 水解酶基因多态性与动脉粥样硬化

2006 年 deCODE 研究小组又发现了一个编码 LTA4 水解酶基因的单倍体 HapK。在冰岛人群中 (1 553 名心肌梗死患者和 863 名对照), 14.5% 心肌梗死患者携带 HapK, 而对照人

群中有 10.4% 携带 HapK。用伊屋诺霉素刺激心肌梗死患者的粒细胞可以产生更多的 LTB<sub>4</sub>, 这提示 HapK 中度增加心肌梗死风险主要是通过上调白三烯途径。对美国人群研究发现尽管对照人群中欧裔美国人有 27% 携带 HapK, 而非裔美国人只有 6%, 但是 HapK 仅使欧裔美国人心肌梗死发病风险提高 1.16 倍, 而非裔美国人则提高 3 倍, 这可能是因为它遗传和环境危险因素在非裔美国人中更常见<sup>[26]</sup>。

## 9 展望

白三烯在炎症疾病作为重要的脂质炎症介质被发现已经有 20 多年。5-LO 途径和许多变态反应性疾病相关, 如哮喘和过敏性鼻炎。5-LO 拮抗剂和 cysLT<sub>1</sub>R 拮抗剂作为白三烯调节剂能有效控制哮喘症状, 已经在临床上广泛应用。大量研究表明 5-LO 途径参与了动脉粥样硬化的炎症反应, 和人类的心脑血管疾病密切相关, 这为白三烯调节剂用于干预动脉粥样硬化提供了一些理论依据。但仍有许多问题尚需进一步研究, 比如针对 5-LO、FLAP 和 LTB<sub>4</sub> 的拮抗剂在动物体内被证明有效, 但还缺乏足够的临床证据; cysLT<sub>1</sub>R 拮抗剂对 AS 的作用尚停留在体外实验水平等等。随着对抗白三烯药物研究的深入, 将为 AS 的治疗提供一个新的途径。

## [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126.
- [2] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. *Am Heart J*, 1999, **138** (5): 419-420.
- [3] Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology [J]. *Science*, 2001, **294** (5 548): 1 871-875.
- [4] Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Rühling K, et al. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100** (3): 1 238-243.
- [5] Cipollone F, Mezzetti A, Fazia ML, Cuccurullo C, Iezzi A, Uccino S, et al. Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (8): 1 665-670.
- [6] Zhao L, Moos MP, Grabner R, Pedroni F, Fan J, Kaiser B, et al. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm [J]. *Nat Med*, 2004, **10** (9): 966-973.
- [7] Peters-Golden M, Brock TG. 5-lipoxygenase and FLAP [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, **69** (2-3): 99-109.
- [8] Jawien J, Gajda M, Rudling M, Mateuszuk L, Olszanecki R, Guzik TJ, et al. Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR double knockout mice [J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, **36** (3): 141-146.
- [9] Toda A, Yokomizo T, Shimizu T. Leukotriene B<sub>4</sub> receptors [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, **68-69**: 575-585.
- [10] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, et al. Leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (3): 443-449.
- [11] Subbarao K, Jala VR, Mathis S, Suttles J, Zacharias W, Ahamed J, et al. Role of leukotriene B<sub>4</sub> receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (2): 369-375.
- [12] Heller EA, Liu E, Tager AM, Sinha S, Roberts JD, Koehn SL, et al. Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB<sub>4</sub> and BLT1 in smooth muscle cell recruitment [J]. *Circulation*, 2005, **112** (4): 578-586.
- [13] Bäck M, Bu DX, Brännström R, Sheikine Y, Yan ZQ, Hansson GK. Leukotriene B<sub>4</sub> signaling through NF- $\kappa$ B-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, **102** (48): 1 7501-506.
- [14] Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries [J]. *Circulation*, 1998, **97** (24): 2 406-413.
- [15] Bäck M, Airila-Manninen S, Jøgestrand T, Söder B, Söder PO. Increased leukotriene concentrations in gingival crevicular fluid from subjects with periodontal disease and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **193** (2): 389-394.
- [16] Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103** (21): 8 161-166.
- [17] Lotzer K, Spanbroek R, Hildner M, Urbach A, Heller R, Bretschneider E, et al. Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5-lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (8): e32-36.
- [18] Ichihama T, Hasegawa M, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein 1 in human monocytes/macrophages [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, **35** (9): 1 214-219.
- [19] Wozniak G, Chen LY, Nagineni S, Alsaaty S, Harry A, Logan C, et al. IFN- $\gamma$  induces cysteinyl leukotriene receptor 2 expression and enhances the responsiveness of human endothelial cells to cysteinyl leukotrienes [J]. *J Immunol*, 2007, **178** (8): 5 262-270.
- [20] Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, et al. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (2): 120-126.
- [21] Lyons MA. Arachidonate 5-lipoxygenase variants in atherosclerosis, obesity, and bone traits [J]. *Circ Res*, 2006, **98** (8): e66.
- [22] Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jónsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke [J]. *Nat Genet*, 2004, **36** (3): 233-239.
- [23] Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, St Clair D, Manolescu A, Cheung J, Thorleifsson G, et al. Association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and stroke replicated in a Scottish population [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, **76** (3): 505-509.
- [24] L. Hussaer E, Gschwendtner A, Mueller JC, Org T, Wichmann E, Hamann G, et al. ALOX5AP gene and the PDE4D gene in a central European population of stroke patients [J]. *Stroke*, 2005, **36** (4): 731-736.
- [25] Hakonarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, Gudbjartsson D, Zink F, Arrdalsdóttir M, et al. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial [J]. *JAMA*, 2005, **293** (18): 2 245-256.
- [26] Helgadóttir A, Manolescu A, Helgason A, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Gudbjartsson DF, et al. A variant of the gene encoding leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction [J]. *Nat Genet*, 2006, **38** (1): 68-74.

(此文编辑 李玲玲)