

脂蛋白相关磷脂酶 A2 在缺血性卒中风险评估中的价值

梁江红 综述, 魏麓云 审校

(南华大学附属第二医院神经内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 神经病学; 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 氧化型低密度脂蛋白; 溶血卵磷脂; 氧化型游离脂肪酸; 炎症; 动脉粥样硬化

[摘要] 脂蛋白相关磷脂酶 A2 是磷脂酶 A2 超家族的一个成员, 由成熟的巨噬细胞和淋巴细胞合成和分泌, 主要与低密度脂蛋白结合, 能水解低密度脂蛋白上的氧化卵磷脂, 生成促炎物质溶血卵磷脂和氧化型游离脂肪酸, 促进动脉粥样硬化形成, 抑制脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性可能有抗动脉粥样硬化的效应。在缺血性卒中的发病风险及预防性治疗上, 脂蛋白相关磷脂酶 A2 是一个新的有待研究的因子, 可能是缺血性卒中独立的预测因子及治疗靶标。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

越来越多的证据表明炎症在动脉粥样硬化中起着重要的作用, 粥样斑块形成的开始、过程和最终破裂均有炎症介质的参与^[1]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是一种存在于血浆中的危险因子, 能促进炎症发生引起动脉粥样硬化。脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 在 ox-LDL 的促炎症效应和引起动脉粥样硬化形成过程中起着重要作用, 它是介导 ox-LDL 产生以上生物学效应的关键性酶^[2]。近年来研究显示, Lp-PLA2 与缺血性卒中风险增加相关。本文综述了 Lp-PLA2 的生物学性质、与动脉粥样硬化的关系及在缺血性卒中风险评估中的价值。

1 脂蛋白相关磷脂酶 A2 生物学性质

1.1 脂蛋白相关磷脂酶 A2 分类、来源、存在形式

脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2) 是磷脂酶超家族中的一员, 又称之为血小板活化因子乙酰水解酶(platelet activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)。迄今为止, 已知 Lp-PLA2 有两种类型: 血浆型 Lp-PLA2、细胞型 Lp-PLA2。血浆型 Lp-PLA2 分子量为 45 kDa, 主要由成熟的巨噬细胞合成和分泌, 肥大细胞受炎症刺激时少量分泌, 并受炎症介质的调节, 如 γ 干扰素和脂多糖抑制其分泌, 血小板活化因子(platelet activating factor, PAF) 促进其分泌^[3]; 细胞型 Lp-PLA2 包括: Lp-PLA2II、Lp-PLA2Ib。Lp-PLA2II 和 Lp-PLA2Ib 有 41% 相同序列, 在肝脏和肾脏中高度表达; Lp-PLA2Ib 结构复杂, 由两个 26 kDa 的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 催化亚基和 45 kDa 的 β 调节亚基组成, $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚基之间存在 63% 的相同序列。

血浆型 Lp-PLA2 在血中与脂蛋白结合, 在人类其中 2/3 与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 结合, 1/3 与高密度脂蛋白(high density lipoproteins, HDL) 结合, 而在啮齿类动物, 主要与 HDL 结合。Lp-PLA2 与 LDL 的结合位点是 Tyr205, Try115 和 Leu116^[4]。此酶与 LDL 的结合利于防止 LDL 的氧化修饰。

1.2 脂蛋白相关磷脂酶基因表达、调节及基因的多态性

1995 年, Tjoelker 等^[5] 首次成功克隆出人血浆型 Lp-PLA2, 从巨噬细胞 mRNA 建立质粒 cDNA 文库, 应用 PCR 扩增和与特异的 N2 末端氨基酸序列杂交相结合的方法, 得到一完整克隆, 它编码的蛋白质是由 441 个氨基酸残基组成。人类血浆型 Lp-PLA2 基因位于 6p. 12p. 21. 1, 包含 12 个外显子, 含至少 45 kb 的核苷酸。血浆型 Lp-PLA2 的一级结构具有 GX₂SX 特征性序列, 活性区域为催化三联体结构: Ser-273, His-351, Asp-296。Lp-PLA2 氨基酸序列中包含一个 Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly 活性基团(其中 Xaa 为任意氨基酸) 该活性基团也普遍存在于脂肪酶和酯酶中, 基团中的丝氨酸是底物的亲和位点。

脂蛋白相关磷脂酶 A2 核苷酸序列其 5' 端转录起始点包含有许多顺式启动子元件, 包括 Sp1 位点、MS2 结合共有序列、MS1 位点、Pu. 1 盒以及 STAT 结合共有序列。Cao 等^[6] 报道了转录水平 Lp-PLA2 基因的调控, 他们克隆出该酶的启动子序列, 并找到转录起始位点, 发现位于 cDNA 5' 端上游 67 碱基腺苷酸处 PAF 乙酰水解酶启动子不含 TATA 盒。启动子位点周围序列为 CAGCCC, 与启动子元件极为近似。PAF 乙酰水解酶启动子含多个区域, 含有可与信号转导子、转录相关蛋白、髓特异性转录因子结合的反应元件。最近 Wu 等^[7] 证明脂多糖能诱导 Lp-PLA2 的转录活性, 增强由 p38-MAPK 激活的 Sp1 的转录活性。

1988 年 Miwa 等^[8] 首次报道在日本人中血浆型 Lp-PLA2 发现常染色体隐性遗传缺陷。Stafforini 等^[9] 研究发现, Lp-PLA2 外显子-9 点突变, (核酸 994 发生 G $\rightarrow$ T 置换) 使成熟蛋白 279 位上的缬氨酸被苯丙氨酸取代(Val279Phe), Lp-PLA2

[收稿日期] 2007-06-19 [修回日期] 2007-12-13

[作者简介] 梁江红, 硕士研究生, 研究方向脑血管病的诊治, 联系电话为 0734-8802650, E-mail 为 liangjianghong110@163.com。通讯作者 魏麓云, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病的发病机制及治疗, 联系电话为 0734-8281504, E-mail 为 black1950@sina.com。

失去催化活性。Yamada 和 Yokota 在日本人群中发现血浆型 Lp-PLA2 第 9 外显子 1001(A $\rightarrow$ G) 突变(错义 Gln281Arg), 导致该酶活性下降。Stafforini 等报道健康的日本人杂合子和纯合子个体 V279F 突变发生率分别为 27% 和 4%。过去的研究认为 V279F 突变仅仅只发生在日本人群中, 然而 Balta 等^[10] 人发现吉尔吉斯人和土耳其人也存在这种基因突变。通过认识基因突变导致 Lp-PLA2 活性丧失, 有助于了解该酶在疾病的发生发展中所起的作用。事实上, 许多研究已经表明 Lp-PLA2 基因突变与一些以炎症为基础的疾病相关联, 如动脉粥样硬化、心肌梗死、哮喘、扩张性心肌病等。

1.3 脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性及影响因素

脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 与其它 PLA2 不同的是: 其催化活性不需要钙离子; ④其底物为甘油骨架 C2 位乙酰基或短链(含氧化) 脂肪酸。Lp-PLA2 能水解 PAF, 对磷脂的 sn2 位短链残基具有很强的特异性, 当 sn2 位残基为乙酰基时具有最大水解活性, 使其成为无活性的 1-O-烷基-2-乙酰-Sn 甘油-3-磷酸胆碱(lysor-PAF)。在生理和病理条件下, 人的血浆 Lp-PLA2 的 Km 常数比 PLA2 的 Km 常数值要大, 其 Vmax 为 170 mol/min/mg, 即使在很低浓度水平 Lp-PLA2 仍然能够水解 PLA2。以 PAF 和 1-癸酰基-2-(4-硝基苯基) 磷脂酰胆碱(DNGP) 作为底物进行酶活性实验, Lp-PLA2 显示出典型 Michaelis-Menten 动力学特征, 两底物的 Vmax 对 pH 的依赖性都不大, 最适 pH 值为 7~7.5, 在 pH 值大于 8.5 时酶活性有较大下降。Lp-PLA2 是丝氨酸依赖的磷脂酶, 其 N-端被广泛糖基化, 能够被二异丙基氟磷酸、磷酸硝基苯基二乙酯和 3,4,2 二氯异香豆素抑制, 对乙二胺四乙酸(EDTA)、Ca²⁺ 和巯基试剂不敏感。

2 脂蛋白相关磷脂酶 A2 在缺血性卒中风险评估中的作用

2.1 脂蛋白相关磷脂酶 A2 促进动脉粥样硬化

炎症是动脉粥样硬化的一个组成特征及构成心血管疾病的基础, 动脉粥样硬化斑块中存在炎症介质如血小板活化因子、血小板活化因子类脂质、氧化磷脂、溶血卵磷脂等生物活性脂。ox-LDL、单核细胞移行入血管壁、巨噬细胞活化、泡沫细胞形成被认为是动脉粥样硬化形成的重要原因。在动脉粥样硬化病变中, 有两个主要 Lp-PLA2 来源, 一种来源是 Lp-PLA2 由血液循环进入内膜的 LDL, 另一种来源是由斑块中的炎性细胞直接合成。原位杂交和免疫细胞化学结合实验发现, 在颈动脉斑块中 Lp-PLA2 mRNA 表达和酶活性水平都显著升高^[11]。冠状动脉粥样硬化病变, 免疫染色正染的 Lp-PLA2 在薄纤维帽的粥样斑块的巨噬细胞中格外明显, 而这种斑块存在于大约 60% 突发心源性死亡的病人^[12]。Watanabe 遗传性高脂血症兔主动脉粥样硬化斑块中 Lp-PLA2 酶活性水平是正常兔的 6 倍多。同时, 在动脉粥样硬化损伤处也发现 Lp-PLA2 水解 ox-LDL 的产物 Lysor-PC 水平显著升高, 表明该酶在促进炎症发生和引起动脉粥样硬化形成过程中起着重要的作用^[13]。尽管 Lp-PLA2 能水解氧化的磷脂而抗炎, 但其释放的产物氧化卵磷脂生成溶血卵磷脂(lysophos-

phatidyl choline, Lysor-PC) 和氧化型游离脂肪酸(oxidized free fatty acids, ox-FFA), 能引起单核巨噬细胞主导的慢性炎症而增强动脉粥样硬化病变的进展。

2.2 脂蛋白相关磷脂酶 A2 可能是缺血性卒中独立的预测因子

现有的研究表明可以通过测量体内一些炎症反应标记物来识别卒中高危或中危个体, 从而采取相应的预防策略以减少卒中的发生。而 Lp-PLA2 对于缺血性卒中的这种预测价值最近也被发现。

鹿特丹^[14] 的前瞻性病例队列研究, 目的是评估 7 983 例 ≥ 55 岁的鹿特丹市郊居民慢性致残疾病的发生率和危险因素。随机抽取 1 822 例进行 Lp-PLA2 活性测定, 评估 Lp-PLA2 活性与冠心病事件及缺血性卒中发生率的关系。平均随访 7.2 年, 有 308 例发生冠心病; 平均随访 6.4 年, 有 110 例缺血性脑卒中。Cox 风险比例回归模型分析, 调整传统危险因素和高敏 C-反应蛋白(hs-CRP) 后, 位于 Lp-PLA2 活性最高四分位数者与最低四分位数者相比, 发生冠心病事件及缺血性卒中的风险显著增加, 首次证明了 Lp-PLA2 是缺血性卒中新的独立预测指标。Elkind^[15] 以 467 例初次发生缺血性卒中的患者为研究对象, 评估 hs-CRP 和 Lp-PLA2 水平是否可预测卒中复发、其他血管事件和死亡危险。结果显示, hs-CRP 与 Lp-PLA2 水平之间呈弱相关性($r = 0.09$, $P = 0.045$); hs-CRP 水平与卒中严重程度相关, 而 Lp-PLA2 水平则与卒中严重程度无关; 经年龄、性别、吸烟和 hs-CRP 水平等因素校正后, Lp-PLA2 水平为最高四分位数者的卒中复发危险为最低四分位数者的 2.08 倍, 其复合转归(包括卒中复发、心肌梗死和心脑血管病死亡)危险为后者的 1.86 倍; 经混杂因素校正后, hs-CRP 水平与卒中复发和复合转归危险均无关, 但与死亡危险相关, hs-CRP 水平为最高四分位数者的死亡危险为最低四分位数者的 2.11 倍。研究提示: 对于首次发生缺血性卒中的患者, hs-CRP 水平与卒中严重程度和死亡危险相关, 而 Lp-PLA2 可很好地预测卒中复发风险。

Ballantyne 等^[16] 对 Lp-PLA2 和 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP) 水平与传统危险因素进行了评价以探讨其与缺血性卒中的关系。应用比例风险模型, 对社区动脉硬化风险(atherosclerosis risk in communities, ARIC) 研究中包括 12 762 例健康受试者的前瞻性病例队列进行分析(观察期为 6 年)。研究结果显示, 在校正性别、种族和年龄后, 194 例卒中病例的平均 Lp-PLA2 和 CRP 水平显著高于 766 例非卒中病例, 而低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平无显著差异。在校正年龄、性别和种族后, Lp-PLA2 和 CRP 水平均与缺血性卒中显著相关: 与 Lp-PLA2 水平最低的 1/3 患者相比, 水平最高的 1/3 患者的风险比为 2.23; 与 CRP 水平 < 1 mg/L 者相比, > 3 mg/L 者的风险比为 2.70。在包括吸烟、收缩期高血压、脂质水平和糖尿病的模式中, Lp-PLA2 和 CRP 水平在最高级别中的风险比分别为 1.91(95% CI, 1.15~3.18; $P = 0.01$) 和 1.87(95% CI, 1.13~3.10; $P = 0.02$)。在校正传统危险因素后, Lp-PLA2 和 CRP 同时处于高

水平的个体,相比两者都低的个体对中风有极显著的危险度增加(大约是8倍),Ballantyne等得出结论,在识别缺血性卒中风险增加的中年患者方面,Lp-PLA2和CRP水平可能是传统危险因素的补充。

2.3 脂蛋白相关磷脂酶A2可能是缺血性卒中的一个新的治疗目标

缺血性卒中的病人中有60%~80%病例与动脉粥样硬化有关。动脉粥样硬化是一种炎症相关性疾病,抑制动脉粥样硬化的炎症因子是治疗该疾病的新途径。临床前试验的数据提示对Lp-PLA2的抑制有抗动脉粥样硬化的效应^[17,18]。给细胞培养系统加入Lp-PLA2抑制剂,可以消除 α -LDL诱导的对单核细胞的化学吸引作用,减弱Lp-PLA2诱导人类单核细胞凋亡的能力。还可以观察到Lys-PC和 α -FFA浓聚物的显著减少。另外,在Watanabe遗传性高血脂兔中,Lp-PLA2抑制剂SB-244323能减少动脉粥样硬化斑的形成^[19]。目前,有关Lp-PLA2抑制剂的临床试验正在迅速进行,葛兰素史克公司正在开发的一种新型化合物480848,是一类显著降低动脉粥样硬化斑中Lp-PLA2活性的化合物中的第一个候选药物,可靶向作用于参与动脉栓塞斑块形成过程,通过抑制Lp-PLA2,阻止动脉内炎症的发生,减少心肌梗死和卒中的发作^[20]。其Ⅲ期临床试验已经完成,2005年上半年已经开始Ⅳ期临床试验。一份初步数据分析报告透露了该化合物480848正在临床对103例患者试用。这些患者颈动脉都有显著的病灶,一旦这些病灶恶化,动脉血栓就可形成而造成卒中。这些患者被分为3组,其中2组分别接受14天的40 mg和80 mg的该化合物治疗,另一组被给予安慰剂。结果表明服用高剂量的患者病灶处Lp-PLA2降低了80%,服用低剂量的患者Lp-PLA2降低了52%。

3 结论与展望

脂蛋白相关磷脂酶A2(Lp-PLA2)是一种在动脉粥样硬化形成过程中有重要作用的炎症标志物,促进动脉粥样硬化的形成。Lp-PLA2可能是缺血性卒中中独立的预测因子,测定Lp-PLA2水平可提供传统危险因子评估以外的预测信息,对已经有卒中高或低危险因子的患者可能不特别有用,但对有中度危险因子的患者,测定Lp-PLA2水平有助于指导预防策略。当前对动脉粥样硬化的治疗仍以降脂药物为主,Lp-PLA2作为一个非降脂药物发现的新靶点,其抑制剂对动脉粥样硬化疾病的预防和治疗具有着广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] Libby P, Paul M, Ridker, et al. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (9): 1135-143.
- [2] Zalewski A, Macphée C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (5): 923-931.
- [3] Cao Y, Diana M, Stafforini, et al. Expression of Plasma Platelet-activating

Factor Acetylhydrolase Is Transcriptionally Regulated by Mediators of Inflammation [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (7): 4012-020.

- [4] Diana M, Stafforini, Larry W, et al. Molecular Basis of the Interaction between Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase and Low Density Lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (11): 7018-024.
- [5] Larry W, Tjoelker, Chris Eberhardt, et al. Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Is a Secreted Phospholipase A with a Catalytic Triad [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270** (43): 25481-487.
- [6] Cao Y, Diana M, Stafforini, et al. Expression of Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Is Transcriptionally Regulated by Mediators of Inflammation [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (7): 4012-020.
- [7] Xiaoqing Wu, Guy A, Zimmerman, et al. The p38 MAPK pathway mediates transcriptional activation of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages stimulated with lipopolysaccharide [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (34): 36158-165.
- [8] Katherine M, Howard, Joseph E, et al. Cell-specific regulation of expression of plasmatype platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (44): 27543-548.
- [9] Diana M, Stafforini, Kei Satoh, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97** (12): 2784-791.
- [10] Balta G, Gurgey A, Kudayarov DK, et al. Evidence for the existence of the PAF acetylhydrolase mutation (Val279Phe) in non-Japanese populations: a preliminary study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan [J]. *Thromb Res*, 2001, **101** (4): 231-234.
- [11] Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (12): 2909-917.
- [12] Kolodziej F, Burke A, Taye A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is highly expressed in macrophages of epoxycholesterol-containing oxidized phospholipids restore endothelial barrier function via Cdc42 and Rac [J]. *Circ Res*, 2004, **95** (9): 892-901.
- [13] Leach CA, Hickey DM, Iffe RJ, et al. Lipoprotein-associated PLA2 inhibitor—a novel, nonlipid lowering strategy for atherosclerosis therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, **56** (1-2): 45-50.
- [14] Oei HH, Sayegh-Tatabaie FA, Hofman A, et al. The association between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and coronary calcification. The Rotterdam Coronary Calcification Study [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **182** (1): 169-173.
- [15] The Lp-PLA2 Studies Collaboration, Ballantyne C, Cushman M, et al. Collaborative meta-analysis of individual participant data from observational studies of Lp-PLA2 and cardiovascular diseases [J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2007, **14** (1): 3-11.
- [16] Christie M, Ballantyne, Ron C, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [J]. *Circulation*, 2004, **109** (7): 837-842.
- [17] Macphée CH, Moores KE, Boyd HF, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor [J]. *Biochem J*, 1999, **338** (Pt2): 479-487.
- [18] Carpenter KL, Dennis IF, Challis IR, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidized LDL on human monocyte-macrophages [J]. *FEBS Lett*, 2001, **505** (3): 357-363.
- [19] Macphée CH, Nelson JJ and Zalewski A. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a target of therapy [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2005, **16** (4): 442-446.
- [20] Rotella DP. SB-480848. GlaxoSmithKline [J]. *Curr Opin Invest Drug*, 2004, **5** (3): 348-351.

(此文编辑 陈临溪)