

# 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与动脉粥样硬化的关系

刘建辉 综述, 张春妮 审校

(中国人民解放军南京军区南京总医院检验科 全军检验医学研究所, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 病理学与病理生理学; 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 脂蛋白; 炎症; 动脉粥样硬化; 抑制剂

[摘要] 脂蛋白相关磷脂酶 A2 是一种炎性细胞分泌的能促使氧化磷脂水解的磷脂酶, 血液循环中该酶的活性与年龄、性别、血脂水平及基因多态性等多种因素有关。脂蛋白相关磷脂酶 A2 主要以与脂蛋白结合的形式存在, 它既能通过水解血小板活化因子、氧化磷脂等炎症介质达到抗动脉硬化的效果, 又能通过水解氧化低密度脂蛋白分子中的氧化磷脂, 使其产生促炎症物质溶血卵磷脂和氧化型游离脂肪酸而起到促动脉粥样硬化作用, 因此与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关。脂蛋白相关磷脂酶 A2 的特异性抑制剂已被证实具有抗动脉硬化作用, 脂蛋白相关磷脂酶 A2 正被作为动脉粥样硬化治疗的一个新靶点而受到广泛关注。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

对血管生理学及动脉粥样硬化(athrosclerosis, As)的发病机制研究加深了人们对心血管疾病的认识。最近的研究表明, As 是一种炎症疾病, 炎症反应参与了 As 发生的各个环节, 在动脉粥样斑块形成的起始、发展以及稳定性丧失和斑块破裂脱落过程中均起着重要的作用, 所以循环中的炎症标志物作为心血管危险预测的指标而引起了人们的关注。一些炎症标志物, 如: 白细胞介素 1、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子、纤维蛋白原和 C 反应蛋白等物质的流行病学研究都表明了炎症过程与急性心血管事件的关系。

脂蛋白相关磷脂酶 A2(lipoprotein associated phospholipase A2, LpPLA2), 是一种炎性细胞来源的磷脂酶类, 该酶的作用机制及其抑制剂的研究正成为热点。现将与其相关的基本理论和最新的研究进展综述如下。

## 1 脂蛋白相关磷脂酶 A2 的生物学特性

脂蛋白相关磷脂酶 A2 简介(LpPLA2) 因能水解血小板活化因子故曾被称为血小板活化因子乙酰水解酶, 它是磷脂酶 A2 超家族的一个亚类, 相对分子质量为 45.4 kDa(441 个氨基酸), 编码 LpPLA2 的基因位于染色体的 6p21.2-p12。

人血浆 LpPLA2 主要由几种在 As 中起关键作用的炎症细胞(如成熟的巨噬细胞、T 淋巴细胞、单核细胞和肥大细胞等)合成和分泌<sup>[1]</sup>。释放入血后, LpPLA2 以与脂蛋白颗粒结合的形式存在, 其中 80% 通过载脂蛋白 B(apolipoprotein B, apoB)与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)结合, 其余的 20% 则通过其他的载脂蛋白与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)以及极低密度脂蛋白结合。

作为磷脂酶 A2 家族的一个亚类, LpPLA2 的基本功能是催化多种氧化磷脂 sn-2 位上酯键水解, 产生游离脂肪酸和溶血磷脂。此外, LpPLA2 还能水解血小板活化因子等致炎因子。LpPLA2 的酶活性属丝氨酸依赖性, 但不需要二价阳离子如钙离子等, 这是它与其他多种磷脂酶的不同之处。LpPLA2 对水溶性磷脂的 sn-2 位短链残基具有强特异性, 当磷脂的 sn-2 位残基为氧化了的截短脂肪酸残基时, LpPLA2 具最大水解活性<sup>[2]</sup>。作为一种依赖丝氨酸的脂酶, LpPLA2 与丝氨酸蛋白酶具有相同的催化机制, 都有一个由组氨酸、丝氨酸和谷氨酸组成的催化活性中心。通过定点突变已鉴定其酶活性中心由 Ser-273, Asp-296 和 His-351 构成。

通常据其水解血小板活化因子的能力来测定循环中 LpPLA2 的活性, 即用血清中该酶对用同位素标记过的标准血小板活化因子进行水解, 通过高通量放射活性分析方法测定 LpPLA2 水解血小板活化因子的速率, 并以之作为该酶活性的量度, 通常以每升血清样本每分钟水解血小板活化因子的微摩尔数( $\mu\text{mol}$  血小板活化因子/min/L)来表示<sup>[3]</sup>。也有报道使用以 1-肉豆蔻酰-2-(4-琥珀酰硝基苯)磷酸卵磷脂作为底物的商品试剂盒来测定其活性<sup>[4]</sup>。

循环中 LpPLA2 活性与多种因素有关<sup>[5-7]</sup>。该酶与年龄呈正相关关系( $r = 0.11, P < 0.0001$ ), 在女性中年年龄因素较之男性更加突出( $r = 0.15/r = 0.06$ )。同时也与性别相关, 男性明显高于女性( $P < 0.0001$ )。可能与雌激素水平有关, 这也为年龄因素对男、女性别影响程度的不同以及女性心血管危险因素较少的临床现象做了一定的解释<sup>[5]</sup>。并且, 该酶活性与其浓度相关( $r = 0.57, P < 0.0001$ ), 且当浓度较高时, 酶活性的变异性有明显的增大趋势。另外, 也是各因素中最重要的, 血脂水平包括总胆固醇(total cholesterol, TC)、LDL-C 以及 LDL-C/HDL-C 比值对该酶活性有显著影响, 可明显提高其活性。甘油三酯(triglyceride, TG)也能起到一定的活化作用( $r = 0.24$ ); HDL 则能较显著地降低活性( $r = -0.23$ )。ox-LDL/LDL 比值越高, LpPLA2 活性越低<sup>[8]</sup>。除此之外, 该酶的活性与吸烟、受教育时间长短、罹患过心脏病或中风/糖尿病/高

[收稿日期] 2008-02-18

[修回日期] 2008-05-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30471649); 江苏省六大人才高峰基金(20050203)

[作者简介] 刘建辉, 硕士研究生, 联系电话为 13814178079, E-mail 为 southernlake@163.com。通讯作者张春妮, 博士, 主任技师, 硕士研究生导师, 主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化关系的基础和临床研究, 联系电话为 025-80863082, E-mail 为 zchunni27@hotmail.com。

血压与否以及肥胖等因素也存在关联<sup>[6,7]</sup>。有研究认为 HDL 对 Lp-PLA2 活性的抑制作用更强( $r = -0.37$ )。同时还发现了一些新的影响因素,如人种、他汀类药物和雌激素使用等。但该研究认为糖尿病与 Lp-PLA2 水平没有关系,而女性 Lp-PLA2 活性则与超敏 C 反应蛋白有关<sup>[9]</sup>。基因单核苷酸多态性也是影响该酶活性的因素之一。9 号外显子上的 Val279Phe, G994T<sup>[4,6]</sup>, 十一号外显子上的 Ala379Val 的变化都对该酶活性有较大影响。研究者应用最大似然方差分析方案的方法分析猕猴 13 号染色体上 PHA13 和 PHA20 两个数量性状遗传位点(quantitative trait locus, QTL)的基因多态性,发现对应于人类 2p24.3-p23.2 上的 QTL,其多态性也对人血清 Lp-PLA2 活性有明显影响<sup>[10]</sup>。

## 2 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与动脉粥样硬化的关系

脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)既与抗 As 的 HDL 结合,也与促 As 作用的 LDL 结合,因此在 As 的研究中一直存在两种观点,即它的抗 As 作用和促 As 作用,目前就其促 As 作用的研究较多。

### 2.1 脂蛋白相关磷脂酶 A2 的抗动脉粥样硬化作用

可能由于人 Lp-PLA2 氨基端的高度糖基化阻碍了其 HDL 的结合<sup>[10]</sup>,在人类中只有大约 10% 的 Lp-PLA2 与 HDL 结合。假设认为炎症是由 Lp-PLA2 的水解底物(如氧化的磷脂)引起的,而不是水解产物溶血卵磷脂和氧化游离脂肪酸(oxidized non-esterified fatty acids, ox-NEFA)<sup>[11]</sup>。氧化磷脂在炎症的消退过程中通过上调亚铁血红素(凝血第十因子)和抑制内毒素反馈回路的方式起作用。此外在 Lp-PLA2 的流行病学研究中发现, Lp-PLA2 的活性与 HDL 呈明显负相关性<sup>[7,9]</sup>,但具体的机制还不清楚。动物实验发现与 HDL 结合的 Lp-PLA2 的过量表达减少了 As 的形成,说明与 HDL 结合的 Lp-PLA2 可能具有抗 As 作用<sup>[12]</sup>。Lp-PLA2 能将血小板活化因子水解为无活性的溶血—血小板活化因子,故能减少炎症和血栓的形成,此外, Lp-PLA2 还被认为具有减轻血管平滑肌细胞受氧化磷脂侵害的作用<sup>[13]</sup>。在对编码 Lp-PLA2 基因单核苷酸多态性的研究中发现,当编码该酶基因的第 9 个外显子上发生 Val279Phe 变异时,罹患心血管疾病的危险随之增加<sup>[14]</sup>。另有报道<sup>[15]</sup>在编码该酶的第 11 个外显子发生 Ala379Val 变异的纯合子人群中,其血清 Lp-PLA2 对血小板的水解活性明显增强。以上证据都间接地支持 Lp-PLA2 的抗 As 作用。

### 2.2 脂蛋白相关磷脂酶 A2 的促动脉粥样硬化作用

富含载脂蛋白 B 的脂蛋白(特别是 LDL)在动脉血管壁下的贮留及之后的氧化修饰是 As 起始的一个关键步骤,这对 Lp-PLA2 来说是有重要意义的,因为人类血液循环中的 Lp-PLA2 约 80% 是通过载脂蛋白 B 连接到 LDL 上的结合在 LDL 上的 Lp-PLA2 随 LDL 被运送到了血管壁上易受损伤的区域。

在 LDL 生成氧化磷脂之后, Lp-PLA2 就迅速将其水解生成有生物活性的促炎物质 lys-PC 和 ox-NEFA。这些促炎介质在血管损伤的区段溶解渗入,通过几条细胞途径引发促

As 效应。这些效应包括对黏附分子和化学趋化素表达的正调节,诱导炎症细胞因子(如白细胞的活化和分泌)、氧化应激、趋化作用、细胞的渗透性增高以及细胞凋亡等;同时促进单核细胞由管腔向内膜聚集。随后引起分化的巨噬细胞的清除反应形成泡沫细胞以及血管壁中的平滑肌增生,坏死的泡沫细胞聚集成 As 斑块。细胞因子和蛋白酶降解纤维帽的平滑肌细胞和胶原基质,使斑块变得脆弱、破裂和脱落,最终导致血栓形成和心血管事件的发生<sup>[16]</sup>。关于动脉内膜中 Lp-PLA2 与炎症介质的正反馈回路理论又被提出: Lp-PLA2 由活化的内膜粒细胞(主要是巨噬细胞)分泌,在此部位, Lp-PLA2 将 ox-LDL 水解成 lys-PC 和 ox-NEFA,而这些促 As 作用的产物再进一步活化粒细胞,导致产生更多 Lp-PLA2,最终导致循环血液粘稠和促炎物质的持续正调节,从而促进了粥样斑块的进展和稳定性的减弱<sup>[17]</sup>。Lp-PLA2 第一次被认为是独立于传统的心血管危险因素和 C-反应蛋白的一个新的危险因子<sup>[18]</sup>。之后的流行病学研究均显示 Lp-PLA2 活性升高与心血管疾病独立相关,支持了 Lp-PLA2 的促 As 作用<sup>[19-25]</sup>。

此外该基因的十一号外显子上发生 Ala379Val 变异的纯合子人群罹患心血管疾病的概率明显降低<sup>[26]</sup>。之后又有相关研究证实了 Ala379Val 变异对冠心病发展过程的抑制和保护作用,这些证据从单核苷酸多态性的角度间接证明了 Lp-PLA2 的促 As 作用。

## 3 脂蛋白相关磷脂酶 A2 抑制剂与动脉粥样硬化的治疗

Leach 等<sup>[27]</sup>通过对沃登纳勃遗传性高血脂症兔的研究发现, Lp-PLA2 的抑制剂能抑制 As 斑块的发展。越来越多的证据表明 Lp-PLA2 抑制剂的抗 As 作用, Lp-PLA2 特异性抑制剂的研制和应用逐渐发展起来。作为一种区别于传统的降脂策略的新的治疗方法,以 Lp-PLA2 作为治疗靶位的研究有着广阔的前景<sup>[28]</sup>。Lp-PLA2 抑制剂主要有人工合成的单环  $\beta$  内酰胺类、嘧啶酮类及其衍生物、天然微生物来源的化合物以及最近的甾体的衍生物类抑制剂:单环  $\beta$  内酰胺类抑制剂是 Lp-PLA2 的高度专一性抑制剂,主要有 SB-216477 及其两个对映体 SB-219389 和 SB-21939 以及 SB-222657,其原理是通过诱导 Lp-PLA2 类似于  $\beta$  内酰胺酶水解该类抑制物的单环  $\beta$  内酰胺环以及通过共价修饰 Lp-PLA2 的活性位点来达到抑制 Lp-PLA2 的活性<sup>[29]</sup>。嘧啶酮类抑制剂通过可逆的非共价形式竞争性地抑制 Lp-PLA2 来实现其对 Lp-PLA2 的高选择性抑制。SB-43549<sup>[30]</sup>、SB-48084<sup>[31]</sup> 等都属于该类药物。

还有来源于微生物的化合物类抑制剂如 SB-253514、SB-315021 是从荧光假单胞菌 DSM11579 产生的代谢物中分离出来的。猜测可能是由于其氨基甲酸烯醇化作用而作为一种酰化剂起效<sup>[32]</sup>。

一种甾体的衍生物((E)-phenyl- and heteroaryl-substituted O-benzoyl (or acyl) oximes)。在体外实验中与 SB-381320 相比,其半抑制浓度更低<sup>[33]</sup>。在此基础上,通过减少亲脂性取代基的方法,又得到了抑制性活性更强的另一种甾体的衍生物(Benzaldehyde O-heterocycle-4-carbonyl oxime),该物质的半抑

制浓度较之前又有较大的下降<sup>[34]</sup>,表现出很好的应用前景,但在体内的作用效果仍在研究之中。

#### 4 展望

对 Lp-PLA2 的相关研究已有很多,但仍然还存在着一些未解的问题,比如: Lp-PLA2 的三维空间结构、与 HDL 结合的 Lp-PLA2 的具体抗炎 抗 As 的作用机制、Lp-PLA2 水解氧化的 LDL 所得产物的具体致病机制、合适的与人类相近的动物模型的建立以及基因多态性对 Lp-PLA2 的具体影响等。这些问题的解决必将能使 Lp-PLA2 更好地运用到 As 性心血管疾病的研究和治疗中来。

#### [参考文献]

- Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, et al. Cellular source(s) of platelet activating factor acetylhydrolase activity in plasma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **261** (2): 511-514.
- Min JH, Jain MK, Wilder C, et al. Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase [J]. *Biochemistry*, 1999, **38** (39): 12 935-942.
- Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam study [J]. *Circulation*, 2005, **111** (5): 570-575.
- Zhang SY, Shibata H, Karino K, et al. Comprehensive evaluation of genetic and environmental factors influencing the plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity in a Japanese population [J]. *Hypertens Res*, 2007, **30** (5): 402-409.
- Blake GJ, Dada N, Fox JC, et al. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels and the risk of future cardiovascular events in women [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **38** (5): 1 302-306.
- 张绍艳, 王滨有. 老年人血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与其基因型、性别和年龄的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (11): 854-856.
- Persson M, Nilsson Jarr Åke, Nelson JJ, et al. The epidemiology of Lp-PLA2: Distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **190** (2): 388-396.
- Wootton PTE, Stephens JW, Hurel SJ, et al. Lp-PLA2 activity and PLA2G7 A379V genotype in patients with diabetes mellitus [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **189** (1): 149-156.
- Brilakis ES, Khera A, McGuire DK, et al. Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: Observations from the Dallas Heart Study [J]. *Atherosclerosis*, 2008, **199** (1): 110-115.
- Vinson A, Mahaney MC, Cox LA, et al. A pleiotropic QTL on 2p influences serum Lp-PLA2 activity and LDL cholesterol concentration in a baboon model for the genetics of atherosclerosis risk factors [J]. *Atherosclerosis*, 2008, **196** (2): 667-673.
- Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, et al. Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, **11** (3-4): 142-147.
- Caslake MJ, Packard CJ. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, **14** (4): 347-352.
- Theilmeyer G, De Geest B, Van Veldhoven PP, et al. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *FASEB J*, 2000, **14** (13): 2 032-039.
- Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, et al. Identification of the G994→T missense in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men [J]. *Metabolism*, 1998, **47** (2): 177-181.
- Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasma PAF-acetylhydrolase impair catalytic activities and are associated with atopy and asthma [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, **66** (5): 1 522-530.
- Zalewski A, Macphee CH. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (5): 923-931.
- Macphee CH, Nelson J, Zalewski A. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a target of therapy [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2005, **16** (4): 442-446.
- Packard CJ, O'Reilly DSJ, Caslake MJ, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease [J]. *N Engl J Med*, 2000, **343** (16): 1 148-155.
- Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, 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.
- Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [J]. *Arch Intern Med*, 2005, **165** (21): 2 479-484.
- Iribarren C, Gross MD, Darbinian JA, et al. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity with calcified coronary plaque in young adults: The CARDIA Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (1): 216-221.
- Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam study [J]. *Circulation*, 2005, **111** (5): 570-575.
- Kardys I, Oei HH, van der Meer IM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and measures of extracoronary atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (3): 631-636.
- Yang EH, McConnell JP, Lennon RJ, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is an independent marker for coronary endothelial dysfunction in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (1): 106-111.
- McKel M, McKel R, Vollert JO, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 for early risk stratification in patients with suspected acute coronary syndrome: a multi-marker approach. The North Württemberg and Berlin Infarction Study-II (NOBIS-II) [J]. *Clin Res Cardiol*, 2007, **96** (9): 604-612.
- Abuzeid AM, Hawe E, Humphries SE, et al. Association between the Ala379Val variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of myocardial infarction in the north and south of Europe [J]. *Atherosclerosis*, 2003, **168** (2): 283-288.
- Boyd HF, Hammond B, Hickey DMB, et al. The identification of a patent, water soluble inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, **11** (5): 701-704.
- Macphee CH, Nelson J, Zalewski R. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and its potential as a therapeutic target [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006, **6** (2): 154-161.
- 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 Letters*, 2001, **505** (3): 357-363.
- Blackie JA, Bloomer JC, Brown MJB, et al. The discovery of SB-435495, a potent, orally active inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2 for evaluation in man [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, **12** (18): 2 603-606.
- Blackie JA, Bloomer JC. The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13** (6): 1 067-070.
- Pinto IL, Boyd HF, Hickey DMB. Natural product derived inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A2: synthesis and activity of analogues of SB-253514 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, **10** (17): 2 015-017.
- Jeong TS, Kim MJ, Yu H, et al. (E)-Phenyl and heteroaryl-substituted O-benzoyl (or acyl) oximes as lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15** (5): 1 525-527.
- Jeong HJ, Park YD, Park HY, et al. Potent inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A2: Benzaldehyde O-heterocycle-4-carboxyoxime [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16** (21): 5 576-579.

(此文编辑 李玲玲)