

• 综述 •

cPLA₂α: 炎症反应中信号转导的“重量级”分子

王晓辉(综述) 颜光涛(审校)

【关键词】 磷脂酶 A₂α, 胞浆型; 炎症介质; 信号转导; 抗炎治疗

中图分类号: R364.5 文献标识码: A 文章编号: 1003-0603(2004)06-0378-03

许多疾病的发生过程中都伴有炎症反应。除感染性疾病(如中毒性休克、败血症)、移植排斥反应外,还包括多种与免疫异常相关的疾病,如类风湿性关节炎(RA)、克隆氏病(Crohn's disease)、过敏性疾病、多发性硬化(MS)以及银屑病等。这些疾病的发病机制虽然不同,但病程中往往伴随着炎症细胞浸润和炎症介质释放,同时产生多种细胞因子、趋化因子及氧自由基等活性物质。这些大量产生的活性物质可以直接成为发病的原因或加重因素,导致血管及组织的完整性破坏及功能异常。因此,对于这些疾病,抗炎治疗是一项极其重要的措施。然而,对炎症的治疗从最开始的甾体类非特异性药物的应用,到针对某些重要靶分子的特异性抑制,人们对炎症反应认识经历了漫长的道路。磷脂酶₂(PLA₂)就是在此过程中发现的、在多种炎症性疾病中均具有重要意义的一类蛋白酶。

1 PLA₂ 概述

PLA₂ 是一类具有甘油磷脂分解活性的酶类家族。通过催化细胞膜的磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)的 sn-2 位水解,产生以花生四烯酸(AA)为主的游离脂肪酸及溶血磷脂。PLA₂ 的生理功能包括改造磷脂结构,促进机体坏死组织自体消失,参与肺泡表面活性物质代谢等。在磷脂的分解、消化、脱酰基/再酰化途径及平衡细胞磷脂池过程中扮演着重要角色。炎症发生时,PLA₂ 活性升高,通过激活环氧合酶(COX-2)、脂氧化酶(LOX),进一步产生大量的廿碳烷酸类物质(eicosanoid),如前列腺素(PGs)、血栓素

(TX)、白三烯(LT)及血小板活化因子(PAF)等促炎细胞因子(pro-inflammatory cytokines)^[1]。这些活性物质通过各自的作用途径,继续诱导生成更多的炎症因子,形成级联瀑布效应,促进炎症的发展。因此,PLA₂ 将损伤因素、炎症细胞、脂类递质、细胞因子等细胞有形成分和可溶分子物质联系起来,成为该体系中极其关键的活性酶。

根据生物活性分类,PLA₂ 有 3 个家族^[2]:①分泌型磷脂酶 A₂(sPLA₂)家族:属于分泌型蛋白质,主要存在于血浆和外分泌液中,其分型较为复杂,对磷脂 sn-2 位的脂肪酸无选择特异性。②胞浆型磷脂酶 A₂(cPLA₂)家族:或 Group IV PLA₂,包括 cPLA₂α、cPLA₂β、cPLA₂γ 和 cPLA₂δ。cPLA₂α(Group IV A PLA₂)分子质量为 85 ku,广泛存在于体内各种组织的细胞中,活化时需要 Ca²⁺ 的参与和上游激酶的磷酸化作用,选择性地水解 sn-2 位为 AA 的磷脂。由于 cPLA₂α 发现得较早,目前对于 cPLA₂ 的认识主要来源于 cPLA₂α。而最新发现的 cPLA₂δ 则可能在银屑病的发病机制中有着重要的意义^[3]。③Ca²⁺ 非依赖型磷脂酶 A₂(iPLA₂)家族:又称 Group VI PLA₂,存在于各种组织细胞中,活化不需要 Ca²⁺ 的参与。普遍的观点认为 iPLA₂ 不直接参与激活剂诱导的 AA 释放,它通过对磷脂的恒定脱酰基作用,参与 AA 及其他脂肪酸合成膜磷脂的过程,维持机体磷脂的动态平衡,通过影响细胞内 AA 的分布,为其他 PLA₂ 的作用底物提供 AA 来源。此外,另有一类 PLA₂,由于可特异性水解 PAF 及氧化磷脂,因而被称为 PAF 乙酰水解酶(PAF-AHs)。

在众多 PLA₂ 的亚型中,cPLA₂α 和 sPLA₂ 在激动剂(如细胞因子、内毒素)诱导的 AA 和溶血磷脂,以及下游一系列炎症介质的释放中发挥着主导作用。现在多数的研究者认为,cPLA₂α 是调控这一过程的“阀门”^[4,5]。

2 cPLA₂α 是炎症反应中承上启下的信号分子2.1 cPLA₂α 对于 AA 产生的调控:

2.1.1 cPLA₂α 与 sPLA₂ 间的“对话”(cross-talk):炎症反应中 AA 的大量释放是通过 cPLA₂α 与 sPLA₂ 两者相互作用而产生的。越来越多的研究表明,炎症时大量 AA 的产生受 cPLA₂α 调控。实验结果显示,在同时表达 cPLA₂α、sPLA₂ 的细胞中,AA 的大量产生由 sPLA₂ 介导,但 sPLA₂ 的作用在某种程度上取决于 cPLA₂α 的活化^[6-8]。虽然其中的机制还有待进一步阐明,但已有报道推测,上述现象是因为 sPLA₂-II A(sPLA₂ 的一个重要亚型)的水解能力需要 12/15-脂氧化酶(12/15-LOX)的代谢产物来诱导(即通过 cPLA₂-12/15-LOX)途径,可能是通过活化转录因子来增加 sPLA₂-II A 的基因表达及提高膜的敏感程度来实现的^[6,9]。由此说明 sPLA₂ 产生 AA 的能力是 cPLA₂α 依赖性的。有趣的是,sPLA₂-II A 也可以通过激活 cPLA₂α 上游的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)使得 cPLA₂α 进一步活化。因此,以“对话”来比喻二者在此过程中的作用是最恰当不过的。

2.1.2 cPLA₂α 独特的活化方式:从分子角度分析,cPLA₂α 对于 AA 大量释放的调控作用是由于它独特的活化方式决定的。cPLA₂α 活化完全是通过受体后信号转导机制进行,并依靠多种因素的共同调节。因此,作为复杂的细胞内调节网络的一分子,cPLA₂α 可通过感受外界的信号来发出“指令”,引发下游一系列效应的产生,发挥承上启下的重要作用。

cPLA₂α 的活化需要激动剂引起胞内 Ca²⁺ 浓度增高以及磷酸化作用。激动剂与受体结合后,通过特定的转导通路使胞内 Ca²⁺ 浓度迅速增高。Ca²⁺ 与 cPLA₂α 氨基端的 C2 区域结合,使酶从胞浆转移到细胞内膜。这种转位可促使 cPLA₂α 与膜磷脂结合,同时产生的 AA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970717)

作者单位:100853 北京,解放军总医院基础所生化室

作者简介:王晓辉(1978-),女(汉族),河北省秦皇岛市人,医学硕士,实习研究员,主要从事炎症分子机制研究。

可被分布在核周围的 COX-2 及 5-脂氧化酶(5-LOX)非常方便地利用^[10]。

与此同时, cPLA₂ 的活化也需要 MAPK 的磷酸化作用。MAPK 三酶级联途径[MAPK 激酶的激酶(MKKK)-MAPK 激酶(MKK)-MAPK]是哺乳动物细胞中重要的信号通路。参与了多种神经递质、激素、生长因子、细胞因子、应激刺激对细胞生理活动的调节。主要分为 3 种:胞外信号调节激酶(ERK)1/2 途径, C-Jun 氨基终端激酶(JNK)途径, p38 MAPK 途径。MAPK 途径之间、MAPK 途径和胞内其他途径之间都存在特异性的交叉和整合作用, 构成了复杂的信号网络。cPLA₂ 正是处于这个庞大的调节网络下游的作用底物。邻近 cPLA₂ 两个催化中心连接区域的 Ser⁵⁰⁵、Ser⁷²⁷是影响 cPLA₂ 活性的最重要的两个磷酸化位点。在激动剂引起的 ERK 及 p38 MAPK 途径被激活后, 这两个位点被磷酸化, 从而激活 cPLA₂。

除此之外, 存在于质膜的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)可以与 cPLA₂ 的 PH 结构域, 特异性地活化 cPLA₂。PIP2 通过诱导 cPLA₂ 构象的改变来促使酶的活性中心与膜磷脂底物的结合。

通过以上途径的协同作用, 可使 cPLA₂ 长时间激活, 在 AA、溶血磷脂及下游多种炎症因子的释放中发挥着“轴心”作用。

2.2 cPLA₂ 在多种炎症介质生成中的作用:多种炎症介质直接或间接参与了炎症疾病的发病过程, 它们有些相互诱导, 有些彼此拮抗, 共同构建了一个复杂的网络。当促炎性因素占据主动时, 炎症就会进一步加重。而 cPLA₂ 就在这些促炎性介质的释放中发挥着极其重要的作用。

2.2.1 cPLA₂ 诱导促炎性细胞因子及趋化因子生成:我们前一阶段的实验以脂多糖(LPS)为激活剂, 通过反义寡核苷酸技术减少 Hela 细胞中的 cPLA₂ 表达, 同时检测细胞上清液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-6 的浓度。结果发现, cPLA₂ 含量与 IL-1 β 、IL-6 的产生具有明显的剂量依赖关系^[11]。加拿大 McGill 大学的科学家在 sPLA₂ 缺陷的 MS 模型——实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)小鼠中发现, 抑制 cPLA₂ 活性可使多种细胞因子如 IL-1 β 、IL-1 α 、 γ -干扰素(IFN- γ), 巨噬细胞集落刺激

因子(M-CSF), 趋化因子如巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及 COX-2、LT 表达下调。如果在构建 EAE 小鼠模型的同时抑制 cPLA₂ 的表达, 小鼠患 MS 的数量明显减少。即使在发病后再进行抑制, 也可以大大缓解已患 MS 小鼠的症状。因此他们得出结论: cPLA₂ 是引发小鼠 MS 的关键^[12]。

在明确了 cPLA₂ 在 AA 释放中所发挥的决定性调控作用后, cPLA₂ 对以上炎症因子生成的诱导作用似乎就变得更易理解了。因为它们的产生可能也是通过水解膜磷脂产生的 AA 和溶血磷脂酰胆碱(LPC, 溶血磷脂的一种)所介导的。近来有报道显示, AA 代谢生成的血栓素 A₂(TXA₂)可促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 IL-1 β 的合成; 白三烯 B₄(LTB₄)能够增加单核细胞、巨噬细胞生成 IL-1、IL-2、IFN- γ 的能力^[13]。LPC 可以诱导产生 TNF- α 等多种促炎性细胞因子, 以及 MIP-1 α 、MCP-1 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)。更为重要的是, 这些因素可通过正反馈方式继续上调 cPLA₂ 的表达, 导致更多的炎症因子产生^[14]。此外, LPC 之所以在 MS 中具有重要意义, 除了诱导生成炎症因子及炎症蛋白外, 其本身就具有水解髓鞘的作用, 而且在神经脱髓鞘后期还可以损坏轴索膜。

2.2.2 cPLA₂ 在氧自由基产生中的作用:在细菌感染时引发的中性粒细胞“呼吸爆发”以及缺血-再灌注损伤等炎症病理过程中, 伴有大量氧自由基的产生。这些物质可以损伤血管内皮及血管外组织, 促进其他炎症介质的释放, 造成微循环障碍或组织损伤。Dana 等^[15]在人骨髓细胞系中通过抑制 cPLA₂ 的表达, 阻断了 AA 的产生, 从而避免了“呼吸爆发”以及氧自由基的生成。因此证实了 cPLA₂ 在氧自由基产生中的重要作用。

还原型辅酶 I (NADPH) 氧化酶是诱导氧分子生成超氧化阴离子的关键酶, 活化后定位于质膜上。AA 是调节 NADPH 氧化酶活性的重要因素, 可能是通过含有受体酪氨酸激酶以及磷脂酶 C(PLC)的信号转导通路所介导。此外, 产生超氧化阴离子的同时会生成相同数量的 H⁺, 这些 H⁺ 必须经过 H⁺ 通道清除到细胞外, 如果 H⁺ 通道活性被抑制,

超氧化阴离子将无法生成。AA 可以激活 H⁺ 通道, 而 NADPH 氧化酶复合体中的 gp91^{phox} 恰恰参与了 H⁺ 通道的构成, 这也表明 NADPH 氧化酶的活性是 AA 依赖性的^[16]。于是, 在某些刺激因素的作用下, cPLA₂ 可以通过“cPLA₂-AA-NADPH 氧化酶-超氧阴离子”途径产生大量氧自由基, 促进病变进一步加剧。最新的研究提示, NADPH 氧化酶也可通过促进 cPLA₂ 向质膜聚集与其结合来激活 NADPH 氧化酶本身。但两者具体的结合位点及 AA 的作用靶点有待于进一步明确^[17]。

2.2.3 cPLA₂ 促进病理状态下诱导型一氧化氮合酶(iNOS)生成:炎症状态下, iNOS 表达的增多在多种脏器组织损伤中起着重要作用。这是由于在 iNOS 作用下产生的过量一氧化氮(NO)使血管扩张、通透性增加, 导致黏膜充血、水肿。同时还具有趋化中性粒细胞和单核细胞的作用。NO 为弱自由基, 与固有层的炎性细胞产生 O₂⁻ 发生反应, 生成具有高度细胞毒性的过氧化亚硝酸盐(OONO⁻), 导致细胞膜脂质过氧化, 蛋白质巯基氧化、亚硝基化, 芳香族氨基酸的硝基化, 及 DNA 链断裂^[18]等细胞毒作用。可能是由于 5-LOX 作为 cPLA₂ 下游的酶, 可通过产生中间介质活性氧(active oxygen)来激活核转录因子- κ B(NF- κ B), 而 iNOS 基因的启动子带有 NF- κ B 的结合元件。因此, 在炎症时 cPLA₂ 活化, 可以通过 5-LOX 上调 iNOS 的表达产生过量的 NO, 从而造成组织损伤。

3 针对 cPLA₂ 抗炎治疗的前景

综上所述, 动物或体外实验证明, 在多种炎症病变的发生发展过程中, 激活物通过细胞内信号转导激活 cPLA₂, 活化的 cPLA₂ 可以增加 AA 及溶血磷脂的生成, 提高 COX-2、5-LOX 活性, 使得甘油酸类物质(如 PGs、LT、TXA₂、PAF)和黏附分子[细胞间黏附分子-1(ICAM-1), 血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)]大量产生。同时伴有促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)、趋化因子以及包括氧自由基、NO 在内的其他生物活性物质的释放。其中的一些物质又会以正反馈方式激活 cPLA₂, 它们彼此诱导, 相互促进, 很大程度上破坏了细胞和组织的正常结构功能, 表现出不同的临床特征。不难发现,

cPLA₂α 这个炎性反应中细胞信号转导的“重量级”分子,像“扳机”(trigger)一样,在调控多种主要的炎性介质生成过程中发挥着举足轻重的作用。因此,从理论上讲,对炎性病变的治疗对策中,抑制 cPLA₂α 活性会是一项很有前途的方法。

目前的抗炎治疗除了应用皮质激素外,还包括 COX-2 抑制剂(解热镇痛药,NSAID)、5-LOX 抑制剂、细胞因子拮抗剂等在内的多种措施。以关节炎为例,目前一种新型的非甾体抗炎药物 Darbufelone 正处于 III 期临床研究阶段。它是一种 COX-2 和 5-LOX 的双重抑制剂,人们认为其效果会远远好于以前单纯针对 COX-2 进行抑制的 NSAID。通过这些药物的治疗效果说明,通过关闭上述多种炎性分子产生的“阀门”,即抑制 cPLA₂α 活性,可能为炎性疾病的治疗找到一个很好的切入点。

cPLA₂α 抑制剂是在离体及动物实验中研究 cPLA₂α 功能以及作用方式的重要手段之一。如应用最为广泛的类花生四烯酸三氟甲基酮(arachidonyl trifluoromethyl ketone, AACOCF₃),以及近年来新合成的、抑制功能更加强大的 Pyrrophenone 等^[4]。但目前尚未将 cPLA₂α 抑制剂用于临床评估,因为现有的 cPLA₂α 抑制剂毒性偏大,还无法用于体内实验。针对这一情况,国外专家现在正在进行新的特异性 cPLA₂α 抑制剂的开发,他们希望新的药物可以克服以往 cPLA₂α 抑制剂的体内毒性,在安全性及有效性上达到合理的平衡。许多专家乐观地认为,随着新型 cPLA₂α 抑制剂的出现,cPLA₂α 抑制剂极有可能成为治疗炎性疾病的一个很有前景的手段。

参考文献:

- Shimizu T, Wolfe L S. Arachidonic acid cascade and signal transduction [J]. J Neurochem, 1990, 55: 1-15.
- Six D A, Dennis E A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1488 (1-2): 1-19.
- Hiroaki C, Hideo M, Koji W, et al. Cloning of a gene for a novel epithelial-specific cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂δ, induced in psoriatic skin [J]. J Biol Chem, 2004, 279(13): 12890-12897.
- Takashi O N O, Katsutoshi Y, Yukiko C, et al. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A₂α, pyrrophenone [J]. Biochem J, 2002, 363: 727-735.
- Murakami M, Shimbara S, Kambe T, et al. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release [J]. J Biol Chem, 1998, 273(23): 14411-14423.
- Kuwata H, Nakatani Y, Murakami M, et al. Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type II A secretory phospholipase A₂ that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts [J]. J Biol Chem, 1998, 273(3): 1733-1740.
- Kuwata H, Yamamoto S, Miyazaki Y, et al. Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A₂ regulates the expression and function of type II A secretory phospholipase A₂ [J]. J Immunol, 2000, 165: 4024-4031.
- Morioka N, Takeda K, Kumagai K, et al. Interleukin-1β-induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A₂ enzymes: secretory type II A and cytosolic type IV [J]. J Neurochem, 2002, 80 (6): 989-997.
- Rao G N, Glasgow W C, Eling T E, et al. Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein (AP-1) activity [J]. J Biol Chem, 1996, 271(44): 27760-27764.
- Evans J H, Spencer D H, Zweifach A, et al. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 30150-30160.
- Wang Xiaohui, Yan Guangtao, Wang Luhan, et al. The mediating role of cPLA₂ in IL-1β and IL-6 release in LPS-induced HeLa cells [J]. Cell Biochem Funct, 2004, 22(1): 41-44.
- Kalyvas A, David S. Cytosolic phospholipase A₂ plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease [J]. Neuron, 2004, 41(3): 323-335.
- Rocha P N, Plumb T J, Coffman T M. Eicosanoids, lipid mediators of inflammation in transplantation [J]. Springer Semin Immunopathol, 2003, 25: 215-227.
- Ousman S S, David S. MIP-1α, MCP-1, GM-CSF, and TNF-α control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord [J]. J Neurosci, 2001, 21: 4649-4656.
- Dana R, Leto T L, Malech H L, et al. Essential requirement of cytosolic phospholipase A₂ for activation of the phagocyte NADPH oxidase [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 441-445.
- Brash A R. Arachidonic acid as a bioactive molecule [J]. J Clin Invest, 2001, 107 (11): 1339-1345.
- Shmelzer Z, Haddad N, Admon E, et al. Unique targeting of cytosolic phospholipase A₂ to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes [J]. J Cell Biol, 2003, 162(4): 683-692.
- Li Jun, Sun Mei, Han Mei. NO, SOD and NOS in injured liver of fetus rat with intrauterine asphyxia [J]. Word Chin J Digestol, 2002, 10: 177-181.

(收稿日期: 2004-04-15)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

中华-爱尔血液灌流研讨会暨学习班通知

为了解血液净化的最新进展,交流血液灌流经验,普及血液灌流知识,掌握并提高血液灌流技术,2004 年 10 月 15-19 日爱尔血液净化器材厂与中华医院管理学会血液净化管理专业委员会将在湖南张家界联合举办“中华-爱尔血液灌流研讨会暨学习班”。国内著名的血液净化专家于仲元教授等将亲自授课。5 日的会期中,前 3 日参加中华医院管理学会血液净化管理专业委员会的年会,后 2 日参加血液灌流学习班,授 I 类国家级学分 6 分。欲参加者请与我们联系! 厂名:廊坊市爱尔血液净化器材厂;地址:廊坊市新华路 37 号;联系人:王占仁;电话:0316-2097865 2025442;传真:0316-2025442;手机:13903269580;邮编:065000。

(廊坊市爱尔血液净化器材厂)