

· 综 述 ·

胞浆型磷脂酶 A₂ 与细胞增殖的关系

齐菲 颜光涛

磷脂酶 A₂ (phospholipase, PLA₂) 是存在于几乎所有有核细胞的活性酶蛋白, 是花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 代谢的限速酶^[1]。PLA₂ 分为依赖钙离子的分泌型的 PLA₂ (sPLA₂) 和胞浆型 PLA₂ (cPLA₂) 及非钙依赖型 PLA₂ (iPLA₂)。而 cPLA₂ 又包括 cPLA₂α、cPLA₂β、cPLA₂γ、cPLA₂δ。其中研究最广泛的是 85 ku 的 cPLA₂α, 目前对于 cPLA₂ 的认识主要来源于 cPLA₂α, 它是细胞内迅速产生 20 酸类脂质介质的 PLA₂ 主要亚型, 对 AA 具有优先选择性^[2], 激活需微摩尔级的 Ca²⁺, 通过特异性水解甘油磷脂 Sn-2 位的脂酰键, 产生 AA 和溶血磷脂, 进一步代谢生成前列腺素 (prostaglandins, PGs)、白三烯 (leukotiene, LT)、血栓素 (thromboxane, TX) 及血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 而释放大量的炎性介质, 导致炎症的进一步发生^[3]。近年来的一些研究中发现 cPLA₂ 除了在炎症中的重要作用, 与细胞的增殖也有密切的关系, 于是许多研究人员对此产生了浓厚的兴趣, 以试图通过对 cPLA₂ 与细胞增殖关系的深入了解找到临床上与增殖有关的疾病 (肿瘤、血管术后再狭窄等) 治疗的新方法, 为人类攻克某些疾病提供新的思路。

1 cPLA₂ 的活化

细胞内 cPLA₂ 的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。cPLA₂ 的活化需要激动剂引起胞内 Ca²⁺ 浓度增高以及磷酸化作用^[4]。

1.1 胞内 Ca²⁺ 浓度增高 激动剂与受体结合后, 通过特定的转导通路使胞内 Ca²⁺ 浓度瞬时迅速升高。Ca²⁺ 与 cPLA₂ 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 cPLA₂ 与膜磷脂结合, 同时产生的 AA 可被分布在核周围的环加氧酶 2 (cyclooxygenase, COX-2) 及 5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LOX) 非常方便的利用^[5]。

1.2 cPLA₂ 的磷酸化作用 与此同时, cPLA₂ 的活化也需要磷酸化作用。根据细胞类型和激动剂的不同, cPLA₂ 的磷酸化主要是通过两条途径, 即: 丝裂素活化蛋白激酶家系 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs) 信号转导途径和 CaM kinase II 信号转导途径, 大多数细胞类型是经 MAPKs 信号转导途径活化 cPLA₂ 的, MAPKs 是一组广泛分布于胞浆内具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶, 在哺乳动物 MAPKs 主要由 3 个成员组成, 即①细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated protein kinase, ERKs); ②应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK), 又称 JNK (c-Jun N-terminal kinase); ③蛋白激酶 p38/PK^[6]。现今研究最广泛的级联反应系统是 ERK1/2MAPK。一般激活过程包括受体酪氨酸激酶被一些生长因子 (例如表皮生长因子) 激活, 为应答蛋白 Grb₂ 提供结合位点, Grb₂ 随即将 Sos 蛋白定位于质膜上。Sos 通过 GTP 与 GDP 的交换激活 Ras 蛋白 (Ras 蛋白为小分子单体 GTP 结合蛋白, 由原癌基因 ras 编码而得名, 因其分子量为 21ku, 故又名 p21 蛋白), 激活的 Ras 蛋白可进一步活化 Raf 蛋白, Raf 蛋白具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性, 它可激活丝裂素活化蛋白激酶家系 (MAPKs), 从而磷酸化 cPLA₂ 的两个 MAPKs 磷酸化的位点 (S505 和 S727), 激活 cPLA₂, 使其对细胞的分化和增殖产生调节作用^[7,8]。但在人髓性白血病细胞系 U-937 及血管平滑肌细胞等细胞类型中, 是通过 CaM kinase II 对 cPLA₂ 的 Ca²⁺/CaM 磷酸化位点 (S515) 的磷酸化作用激活 cPLA₂ 的。人髓性白血病细胞系 U-937 被当作研究控制调节增殖和分化及癌变过程中信号转导机制的细胞模型, 以前的研究表

收稿日期: 2004-07-12

作者单位: 100853 北京市, 解放军总医院基础所生化室

作者简介: 齐菲, 女, 1980 年 2 月生, 河北省河间市人, 在读硕士研究生。

通讯作者: 颜光涛, Tel: 010-66937521

明 MAPK 特别是 ERKs 主要参与控制了很多种细胞类型的增殖和分化。最近, Ajenjo 等(2000)证明在没有 ERK 的活性和阻止 ERK 被激活的情况下, 髓性白血病细胞仍然会对促有丝分裂的刺激有反应, 不会影响细胞的增殖和分化。这主要是由于 U-937 细胞在胎牛血清的作用下促进了 CaM kinase II 的磷酸化和活化, CaM kinase II 活化后通过一个磷酸化的机制介导调控了 cPLA₂ 的活化。从而产生溶血磷脂, 促进了细胞的增殖^[9,10]。

1.3 其它活化途径 除此之外, 存在于质膜的磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP₂) 可以与 cPLA₂α 的 pH 结构域, 特异性的活化 cPLA₂α。PIP₂ 通过诱导 cPLA₂α 构象的改变来促使酶的活性中心与膜磷脂底物的结合。并且 sPLA₂ 通过与 cPLA₂α 间的 crosstalk 作用激活 MAPKs 从而使 cPLA₂α 进一步活化^[11]。

2 cPLA₂ 促进细胞增殖

通过以上途径的协同作用, 可使 cPLA₂ 长时间激活, 作用于膜磷脂产生 AA 和溶血磷脂等代谢产物, 在炎症过程和细胞的增殖分化过程中发挥着重要作用。

2.1 cPLA₂ 及其代谢产物对细胞增殖的促进作用

cPLA₂ 活化后通过特异性水解甘油磷脂 Sn-2 位的脂酰键, 产生 AA 和溶血磷脂, AA 通过 COX-2、LOX, 进一步产生大量的甘碳烷酸类物质 (eicosanoid), 如 PGs、TX、PAF 及 LT, 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性介质, 如 TXA₂ 可促进肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor α, TNF-α) 和白介素 (interleukin, IL)-1β 的合成; LTB₄ 能够增加单核细胞、巨噬细胞生成 IL-1、IL-2、干扰素 (interferon, IFN)-γ 的能力。溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 可以诱导产生 TNF-α 等多种促炎性细胞因子, 以及巨噬细胞炎性蛋白-1α (MIP-1α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF), 其中的一些炎性分子在炎症过程中发挥着重要的作用^[3], 在促细胞增殖过程中也承担着重要角色。游离的 AA 在细胞增殖中具有促进作用, 其代谢产物前列腺素 E₂ 能通

过增加环腺苷酸水平和 DNA 合成而导致表皮细胞增殖, 脂氧酶产物 LT 也能刺激 DNA 的合成。由此瀑布式反应引起的细胞因子——TNFα、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、PAF 等, 通过促进炎症反应或促进巨噬细胞而影响肝星状细胞的增殖和活化; IL-2 作为生长因子通过使细胞由细胞周期 G₀ 期进入 S 期促进淋巴细胞的增殖与分化; GM-CSF 等作为未成熟免疫细胞生长分化的刺激因子。溶血磷脂能增加内皮细胞生长因子和单核细胞生长因子的基因表达, 并促进巨噬细胞增殖。此外, 在鼠主动脉平滑肌细胞培养中 2~25 mg/L LPC 能使胞浆钙浓度提高 560%, 同时 LPC 能增加 [³H] 胸腺嘧啶的整合^[12]。

为更好地说明问题, 研究人员在细胞的增殖过程中应用了 cPLA₂ 及其代谢途径中某些物质的抑制剂, 如: cPLA₂ 的抑制物 (AACOCF₃) 或 cPLA₂ 的反义寡核苷酸; COX 抑制剂 (塞来昔布和阿司匹林) 等^[13], 研究发现在不同的细胞周期 (M, G₁ 和 S 期) cPLA₂ 的活性是不同的, 在细胞周期的最初阶段, 相对高活性的 cPLA₂ 抑制剂能大大减少细胞进入 S 期, 这个发现说明, cPLA₂ 在细胞周期的调控中扮演着一个非常重要的角色^[14]。在成神经细胞瘤细胞系的细胞周期的 G₁ 早期应用 cPLA₂ 活性抑制剂或脂加氧酶抑制剂能明显减少 DNA 的合成, 在 S 早期脂加氧酶抑制剂可阻断细胞周期的继续, 这说明在成神经细胞瘤细胞系的分化增殖过程中需要经脂加氧酶的代谢产物^[15]。一些细胞类型中, 如: 血管平滑肌细胞、3T6 纤维原细胞^[16] 和很多类型的肿瘤细胞 (如: 结肠癌、肝细胞癌、乳腺癌、非小细胞型肺癌、胃癌、胰腺癌等) 中发现 AA 和 COX 及其表达产物 PGE₂ 的增加促进了细胞的增殖和减少了细胞的凋亡。应用 cPLA₂ 的抑制剂 (AACOCF₃) 或 cPLA₂ 的反义寡核苷酸和 COX 抑制剂 (舒林酸和阿司匹林) 后发现肿瘤的增殖受到了抑制。

2.2 cPLA₂ 在基因水平和蛋白质水平对细胞增殖的影响 研究显示 cPLA₂ 活化后在细胞增殖中的作用主要有: ① AA 增加了即刻早期基因 c-myc, c-fos, 和 c-jun 的表达及 MAPK 的活性, 它们介导细胞增殖信号的传递, 这已在体内外的动脉损伤实验模型中得到证实。应用 PLA₂ 的抑制剂 (如米帕林) 可抑制上述 AA 的作用并抑制血清和生长因子所引起的增

殖(serum-and growth factor-induced proliferation)^[17]。② AA 可刺激蛋白激酶 C 的激活。AA 的上述作用有可能是通过刺激蛋白激酶 C 活化产生的。蛋白激酶 C 对基因的活化过程可分为早期反应和晚期反应两个阶段,蛋白激酶 C 能使即刻早期基因(如上)的反式作用因子磷酸化,加速立早基因的表达,它们表达的蛋白质寿命短暂(半衰期为 1~2 h)具有跨越核膜传递信息之功能,因此,称为第三信使,第三信使受磷酸化修饰后,最终活化晚期反应基因并导致细胞增生或核形变化。促癌剂——佛波酯(phorbol ester)正是作为蛋白激酶 C 的强激活剂而引起细胞持续增生,诱导癌变。

3 与增殖有关的临床疾病

人类很多疾病都与细胞的增殖有着密切的关系,下边笔者介绍几种与增殖有关的常见病。

3.1 动脉粥样硬化 近年,人们认为动脉粥样硬化病变始于内皮损伤。多种因素(包括机械的、化学的、免疫的等)的刺激对内皮细胞造成损伤,使动脉内膜的平滑性和完整性受到破坏。加上脂质代谢紊乱,沉积,引起平滑肌细胞的增生。同时,血小板又可迅速黏附、聚集于受损处,并被暴露的胶原等激活,释放出一些物质,包括能促使血小板进一步聚集和血管收缩的 TXA₂ 及多种促使细胞生长分裂的生长因子。内皮细胞的损伤、血脂的沉积和血小板黏附所释放多种生长因子的作用,可激活内皮细胞和动脉中层的平滑肌细胞,使之大量合成并分泌多种生长因子,使自身和周围细胞大量增殖。增殖的平滑肌细胞还可迅速合成胶原等细胞外基质,通过以上多种因素复杂的相互作用,最终形成动脉粥样硬化,cPLA₂ 在此过程中起到了关键作用^[17,18]。

3.2 恶性肿瘤的形成 恶性肿瘤的形成过程中细胞是失控过度增殖的,且往往涉及到多个基因的改变。刺激细胞增殖相关的基因发生了改变,基因产物或活性增强,但是只要抑制细胞增殖和抑制细胞迁移的基因不发生改变,则不可能形成恶性肿瘤。肿瘤的形成与原癌基因和抑癌基因的突变均有关。原癌基因(oncogene)是细胞内与细胞增殖相关的基因,是维持机体正常生命活动所必须的,在进化上高等保守。当原癌基因的结构或调控区发生变异,基因产物增多或活性增强时,使细胞过度增殖,从而形

成肿瘤。抑癌基因的产物是抑制细胞增殖,促进细胞分化,和抑制细胞迁移,因此起负调控作用,它们的丢失、突变或失去功能,使激活的癌基因发挥作用而致癌。

3.3 增生性瘢痕或瘢痕疙瘩 增生性瘢痕或瘢痕疙瘩是在创伤修复时由于表皮细胞、成纤维细胞的过度增殖及胶原蛋白、纤连蛋白(fibronectin, FN)、氨基多聚糖(glucosamino glucoside, GAG)等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的异常沉积而形成,在此过程中,许多细胞因子,如转化生长因子-β(transforming growth factor, TGF-β)、表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)、血小板衍化生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等作为潜在介质参与其调节活动,其中 TGF-β 在创伤愈合过程中是关键生物活性因子^[19]。有可能是经过 AA 刺激 PKC 活化再进一步激活 ERK 从而诱导 TGF-β 基因表达。

3.4 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE) SLE 属于自身免疫性疾病,病理变化涉及全身多种脏器,最常见者为广泛中小血管炎性改变,所以 SLE 组织损伤特征是炎症,以血管炎或血管病变为主。各处小动脉的病变非常明显,脾脏小动脉周围可见环状纤维增生,肾小球毛细血管基底膜增厚,上皮细胞及内皮细胞增殖,重者发生坏死。在狼疮性肾炎的系膜病变型及局灶增殖型发现弥漫性系膜细胞增生,弥漫性增殖型肾小球肾炎中肾小球系膜和内皮细胞均呈弥漫性增生。

还有与增殖密切相关的疾病,如骨髓增殖性疾病、银屑病、血管术后再狭窄^[17]等。以上所述均为增殖对机体的不利影响。在临床实例中,细胞的增殖也可对机体产生有利的一面,像免疫细胞的增殖可对抗异物侵袭。

4 总结和展望

cPLA₂ 的活化主要通过 MAPKs 途径或 CaM kinase II 途径的磷酸化作用及胞内 Ca²⁺ 浓度增高,活化的 cPLA₂ 特异性水解甘油磷脂 Sn-2 位的脂酰键产生 AA 和溶血磷脂及其代谢产物,促进细胞的增殖。在一些生长因子(例如 EGF)激活作用下,AA 可增加即刻早期基因 c-myc, c-fos, 和 c-jun 的表达,它们介导细胞增殖信号的传递,经过一系列的反应

最终引起细胞增殖。cPLA₂也可能通过刺激 PKC 活化以刺激细胞增殖和诱导癌变。

细胞的增殖和临床有着密切的联系,在与增殖有关的疾病(如:肿瘤)的临床治疗中,如何抑制增殖促进凋亡成为研究的重点,而 cPLA₂ 又通过不同的路径影响着细胞的增殖与凋亡,所以 cPLA₂ 将成为治疗相关疾病的新靶点,进一步弄清 cPLA₂ 促增殖与促凋亡的具体过程,及如何通过调节 cPLA₂ 及其代谢物的活性,使机体向有益的一面发展是至关重要的,也是需进一步努力研究的。近来,在实验中利用 cPLA₂ 的抑制剂,cPLA₂ 代谢路径中上游或下游某一关键酶的抑制剂(阻止 cPLA₂ 的激活或其代谢物的产生)已达到治疗肿瘤的目的。这为人类攻克肿瘤提供了新的思路。

参考文献

- 1 Longo WE, Grossmann EM, Erickson B, et al. The effect of phospholipase A₂ inhibitors on proliferation and apoptosis of murine intestinal cells. *J Surg Res*, 1999, 84: 51-56.
- 2 陈莉延(综述),梁标(审校). 磷脂酶 A₂ 的研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2000, 20: 473-476.
- 3 王晓晖(综述),颜光涛(审校). cPLA₂ α: 炎症反应中信号转导的“重量级”分子. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 378-380.
- 4 Das S, Rafter JD, Kim KP, et al. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A₂ activation by phosphorylation. *J Biol Chem*, 2003, 278: 41431-41442.
- 5 Evans JH, Spencer DH, Zweifach A, et al. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30150-30160.
- 6 Van Putten V, Refaat Z, Dessev C, et al. Induction of cytosolic phospholipase A₂ by oncogenic ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial Cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 1226-1232.
- 7 Yoo MH, Woo CH, You HJ, et al. Role of the cytosolic phospholipase A₂-linked cascade in signaling by an oncogenic, constitutively active Ha-Ras isoform. *J Biol Chem*, 2001, 276: 24645-24653.
- 8 Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, et al. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem*, 2000, 275: 37542-37551.
- 9 Muthalif MM, Ljuka F, Roaten JB, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A₂ contribute to mitogenic signaling in myeloblastic leukemia U-937 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298: 272-278.
- 10 Sun GY, Xu J, Jensen MD, et al. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res*, 2004, 45: 205-213.
- 11 Han WK, Sapirstein A, Hung CC, et al. Cross-talk between cytosolic phospholipase A₂ alpha (cPLA₂ alpha) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA₂ regulates cPLA₂ alpha activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem*, 2003, 278: 24153-24163.
- 12 Prokazova NV, Zvezdina ND, Korotaeva AA. Effect of lysophosphatidylcholine on transmembrane signal transduction. *Biochemistry (Mosc)*, 1998, 63: 31-37.
- 13 Leahy KM, Ormberg RL, Yu Wang, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*. *Cancer Res*, 2002, 62: 625-631.
- 14 Boonstra J, Van Rossum GS. The role of cytosolic phospholipase A₂ in cell cycle progression. *Prog Cell Cycle Res*, 2003, 5: 181-190.
- 15 Van Rossum GS, Bijvelt JJ, Van Den Bosch H, et al. Cytosolic phospholipase A₂ and lipoxygenase are involved in cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 181-188.
- 16 Sanchez T, Moreno JJ. The effect of high molecular phospholipase A₂ inhibitors on 3T6 fibroblast proliferation. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61: 811-816.
- 17 Anderson KM, Roshak A, Winkler JD, et al. Cytosolic 85-kDa phospholipase A₂-mediated release of arachidonic acid is critical for proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997, 272: 30504-30511.
- 18 Wang XL, Wang J, Shi Q, et al. Arterial wall-determined risk factors to vascular diseases: a nonhuman primate model. *Cell Biochem Biophys*, 2004, 40: 371-388.
- 19 Bayat A, Bock O, Mrowietz U, et al. Genetic susceptibility to keloid disease: transforming growth factor beta receptor gene polymorphisms are not associated with keloid disease. *Exp Dermatol*, 2004, 13: 120-124.