

脂蛋白相关磷脂酶 A₂及其抑制剂的研究进展

张福军^{1,2}, 王逸平^{1*} 综述

(1. 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203 ;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 脂蛋白相关磷脂酶 A₂(Lp-PLA₂)也称血浆血小板激活因子乙酰水解酶,是介导氧化低密度脂蛋白引起炎症和动脉粥样硬化的一个关键性酶。Lp-PLA₂作为一个动脉粥样硬化药物发现的新靶点,已发现了许多化合物对其具有选择性抑制作用。本文综述了 Lp-PLA₂的生物学性质、与动脉粥样硬化的关系及其抑制剂用于治疗动脉粥样硬化的研究进展。

关键词 : 磷脂酶 A₂ ; 动脉粥样硬化 ; 冠心病 ; 低密度脂蛋白

中图分类号 : R972+.6 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-0971(2006)04-0300-04

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的病理生理基础,防治动脉粥样硬化是目前医学领域急需解决的一个重要课题。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。氧化低密度脂蛋白(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(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一个关键性酶^[1]。Lp-PLA₂是 PLA₂超家族中的一员,属于Ⅶ型 PLA₂。Lp-PLA₂也称血浆血小板激活因子乙酰水解酶,该酶含有 441 个氨基酸,相对分子质量为 50 ku。人血浆中 70% 的 Lp-PLA₂与 LDL 结合,30% 与高密度脂蛋白(HDL)结合。Lp-PLA₂能水解 LDL 分子中氧化修饰的磷脂,产生溶血磷脂酰胆碱(Lyso-PC)和氧化的游离脂肪酸,后两者都具有很强的促炎症作用,导致血管内皮损伤,引起动脉粥样硬化。应用 Lp-PLA₂抑制剂是一种新的、非降脂策略的动脉粥样硬化治疗方法^[2,3]。

1 Lp-PLA₂的酶学特征

Lp-PLA₂能水解血小板激活因子(PAF) \ PAF 类

似的磷脂和氧化修饰的磷脂酰胆碱等,并对 PAF 有明显的特异性。以 PAF 和 1-癸酰基-2-(4-硝基苯戊二酰基)磷脂酰胆碱(DNGP)作为底物进行酶活性实验,Lp-PLA₂显示出典型的 Michaelis-Menten 动力学特征,这在磷脂酶中很不寻常,因为观察发现该类酶有界面活性的存在。Lp-PLA₂在分别以 PAF 和 DNGP 为底物时酶反应速率达到 50% 最大反应速率时的底物浓度(K_m)基本上相等,分别为 13 和 12 μmol·L⁻¹,最大反应速率(V_{max})分别为 170 和 112 U·mg⁻¹。两底物的 V_{max}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,用肽 N 糖苷酶对其去糖基化并不影响其酶活性。

Lp-PLA₂能被磷酸硝基苯基二乙酯和 3,4-二氯异香豆素抑制,对乙二胺四乙酸(EDTA) \ Ca²⁺ 和巯基试剂不敏感,表明该酶是一个丝氨酸依赖的水解酶。Lp-PLA₂酶活性不需要二价阳离子如钙离子的存在,这与其他许多 PLA₂不同。Lp-PLA₂对磷脂的 sn-2 位短链残基具有很强的特异性,当 sn-2 位残基为乙酰基时具有最大水解活性,并且 sn-2 位酰基链每延长一个亚甲基其水解活性就降低至 1/18。Lp-PLA₂对 sn-2 位为长链脂肪酸的磷脂底物没有酶活性。Lp-PLA₂是一种丝氨酸脂酶,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、谷氨酸组成的催化活性中心。定点突变已鉴定出 Lp-PLA₂中 Ser-273, Asp-296 和 His-351 构成其酶活性中心。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

收稿日期 : 2005-12-08

基金项目 : 中国科学院研究基金资助项目(KSCX1-SW-11-6)

作者简介 : 张福军,男,在读博士研究生,研究方向 : 心血管药理学、分子生物学、新药筛选, Tel : 021-50806600 转 2520, E-mail : zh97cn@yahoo.com.cn

* 通讯作者 : 王逸平,男,研究员,博士生导师,主要研究方向 : 心血管药理学, Tel : 021-50806733, E-mail : ypwang@mail.shcnc.ac.cn

酸是底物的亲和位点。这些序列特征也解释了 Lp-PLA₂ 为什么能被丝氨酸蛋白酶抑制剂二异丙基氟磷酸(DFP)所抑制。

2 Lp-PLA₂与动脉粥样硬化疾病的关系

Lp-PLA₂能水解 ox-LDL 中氧化的磷脂酰胆碱,产生 Lyso-PC 和氧化的不饱和脂肪酸,这两个水解产物能强烈地促进炎症发生,引起动脉粥样硬化^[1]。抑制 Lp-PLA₂酶活性可减少 ox-LDL 诱导人单核巨噬细胞的凋亡,具有抗动脉粥样硬化的作用^[4]。在家兔实验中发现 Lp-PLA₂抑制剂 SB-244323 能减少动脉粥样硬化斑的形成^[2]。另外,血浆脂蛋白(a)是近年来被确定的动脉粥样硬化形成危险因素,能促进动脉粥样硬化的形成与发展。与血浆脂蛋白(a)结合时,Lp-PLA₂酶活性较与 LDL 结合高3倍,提示 Lp-PLA₂可能在其中起着促进作用。在冠心病的风险研究中,发现部分病人 LDL 水平并不高,而 Lp-PLA₂和 C 反应蛋白水平都很高^[5]。原位杂交和免疫细胞化学结合实验发现,Lp-PLA₂在人和兔的动脉粥样硬化损伤处的巨噬细胞中表达,且 Lp-PLA₂的表达量及酶活性都显著升高。发生动脉粥样硬化的 WHHL 兔主动脉的 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 Lyso-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。因此,对这个酶的活性调控是一个潜在的治疗动脉粥样硬化的发展方向^[6]。

3 Lp-PLA₂水平与疾病诊断

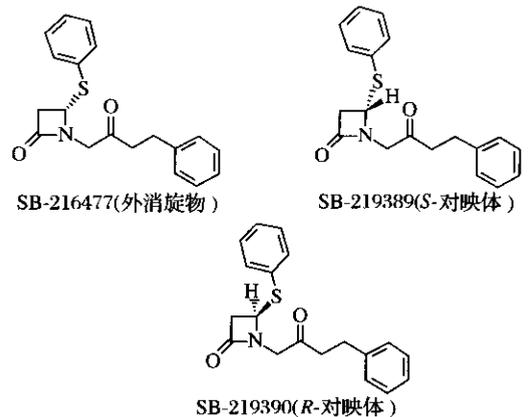
虽然部分冠心病病人血浆 LDL 水平与年龄相仿的正常人相比没有明显不同,但其血浆中 Lp-PLA₂水平显著升高。因此,除传统的脂类分析外,血浆 Lp-PLA₂的水平被视为一个有效的新的冠状动脉疾病(CAD)诊断指标^[7]。临床上,血浆中 C 反应蛋白、白细胞计数和血纤维蛋白原的水平都是很重要的 CAD 临床事件的预测因子,但这三种炎症指标对 CAD 临床事件的预测效果受其他因素的影响。Caslake 等^[7,8]发现,Lp-PLA₂水平是一个独立的冠心病风险预测因子,除与 LDL 呈正相关外,与血纤维蛋白原的相关性很小,与 C 反应蛋白、白细胞数和其他风险因子几乎都没有相关性,其水平也不受吸烟的影响。Lp-PLA₂的表达受炎症介质的调节,虽然

在随机挑选的女性中 Lp-PLA₂不是一个很强的心血管疾病临床事件预测因子,但在男性高胆固醇血症中,Lp-PLA₂水平被进一步确定为很重要的 CAD 临床事件的预测因子^[9,10]。最近,Brilakis 等^[11]报道了 Lp-PLA₂水平与冠心病的密切关系,高 Lp-PLA₂水平预示着高冠心病发病率。Lp-PLA₂的定量分析应作为 CAD 的临床诊断指标^[12~14],Lp-PLA₂不仅被确定为独立的冠心病风险预测因子,也是缺血性中风的风险预测因子^[15,16]。

4 Lp-PLA₂的抑制剂

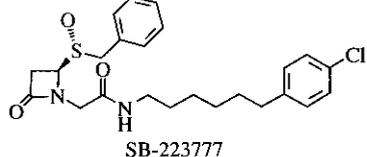
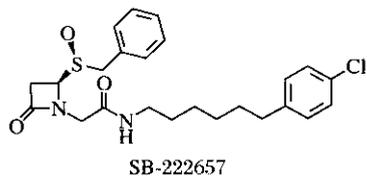
4.1 单环 β 内酰胺类

单环 β 内酰胺是 Lp-PLA₂的一种高度专一性的抑制剂,SB-216477 及其两个对映体 SB-219389 和 SB-219390 就属于这一类。Lp-PLA₂能以类似于 β 内酰胺酶水解 β 内酰胺的机制水解单环 β 内酰胺,SB-216477 被 Lp-PLA₂水解产生3个接近等摩尔浓度的产物,即硫醇、β 含氧酸和 1-氨基-4-苯基-2-丁酮。外消旋混合物 SB-216477 时间依赖性地抑制 Lp-PLA₂,此抑制活性主要归功于 R 对映异构体,其表观速率常数比抑制剂浓度($K_{obs}[I]$)为 $(46 \pm 10) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,而 S 对映异构体 SB-219389 的 $K_{obs}[I]$ 仅为 $(3.5 \pm 0.3) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。SB-219390 的抑制常数(K_i)为 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,而 SB-219389 的 K_i 要大于 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



此外,另一种 β-内酰胺类化合物 SB-222657 是这类抑制剂中发现较早的一个 Lp-PLA₂选择性抑制剂,SB-223777 是它的非对映异构体。SB-222657 的 K_i 为 $(40 \pm 3) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_{obs}[I]$ 为 $6.6 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;SB-223777 的 K_i 为 $(6.3 \pm 0.5) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_{obs}[I]$ 为 $1.6 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在家兔实验中,SB-222657 抑制 Lp-PLA₂的活性,明显减少由 Cu²⁺和 2,2'-偶氮(2-脒-丙烷)二盐酸(AAPH)诱导 LDL 氧化

而引起的 Lyso-PC 增加 ,但对 LDL 的氧化没有直接影响。SB-222657 抑制 Cu^{2+} 引起的 LDL 氧化生成 Lyso-PC 增加的 IC_{50} 为 $(11.7 \pm 1.0) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,而 SB-223777 在 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度对 Lyso-PC 生成的抑制作用较小。

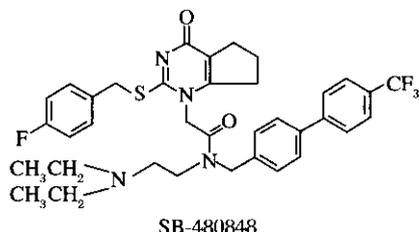


4.2 噻啉酮类及其衍生物

2-(烷基硫代)噻啉-4-酮是一类可逆性 Lp-PLA_2 抑制剂 ,它对 Lp-PLA_2 的抑制有很高的选择性。SB-222657 通过共价修饰 Lp-PLA_2 的活性位点起作用 ,而噻啉酮类是通过完全可逆的非共价形式竞争性抑制 Lp-PLA_2 。由 2-(烷基硫代)噻啉-4-酮衍生出了一系列的 1-(氨基链接的)-烷基]-噻啉酮化合物在分离的血浆中表现出很高的抑制活性 ,其中噻啉酮氮位 $(\text{CH}_2)_3 \text{CONH}(\text{CH}_2)_8 \text{CH} = \text{CHC}_8\text{H}_{17}$ 取代化合物和 $(\text{CH}_2)_3 \text{CONH}(\text{CH}_2)_8 \text{CH} = \text{CHC}_8\text{H}_{17}$ 取代化合物口服具有活性 ,且作用维持时间长。

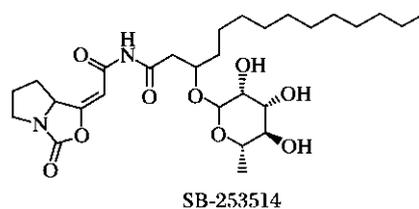
1-(氨基链接的)-烷基]-噻啉酮是亲脂性的 Lp-PLA_2 抑制剂 ,修饰其噻啉酮 5 位取代基可使其具有更强的效能和更好的物化特性。由 1-(氨基链接的)-烷基]-噻啉酮氮位 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 取代衍生而来的化合物是一个强效和高水溶性并能透过血脑屏障的抑制剂 ,适合于静脉注射 ,口服也有效。研究表明 ,WHHL 兔口服该化合物 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,5 h 后 Lp-PLA_2 的活性明显降低。化合物在大鼠和人肝脏微粒体中的转化率都很低 ,而噻啉酮氮位 $\text{CH}_2(2\text{-呋喃基})$ 取代化合物和噻啉酮氮位 $\text{CH}_2\text{CONHC}_8\text{H}_{17}$ 取代化合物均较高。

近年来 ,又设计出一系列的 1-(联苯甲基乙酰胺)-噻啉酮类化合物 ,SB-435495 就是其中一个口服效果很好的 Lp-PLA_2 抑制剂^[17]。进一步修饰 SB-435495 中噻啉酮的 5-取代基可产生一系列的具有低于毫摩尔级效能的 Lp-PLA_2 抑制剂 ,其中环戊烷基结合的 SB-480848 在体内和体外都显示出比 SB-435495 更高的抑制活性^[18]。



4.3 微生物来源化合物

SB-253514 及其类似物是由微生物荧光假单胞菌 DSM 11579 产生的代谢物 ,属于微生物来源的 Lp-PLA_2 抑制剂。SB-253514 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_9$,最大紫外吸收波长是 252 nm。SB-315021 是 SB-253514 的同分异构体 ,也是从 DSM11579 中分离的代谢物 ,最大紫外吸收波长是 280 nm。SB-315021 和 SB-253514 具有相同的烷基链 ,但在其二环部分的第二个环上存在差异。SB-311009 是由 SB-253514 进行生物学转化而来的类似物 ,它比 SB-253514 少一个糖基。这个非糖基化的类似物更易得到结晶 ,有利于进行 X 衍射研究。SB-253514 是高度选择性的 Lp-PLA_2 竞争性抑制剂 ,SB-253514 静脉注射时能有效抑制 Lp-PLA_2 ,但口服时无效。去糖基化可以显著延长 SB-311009 对 Lp-PLA_2 的抑制效应。



5 Lp-PLA_2 抑制剂的临床试验

目前 ,国外对治疗动脉粥样硬化的 Lp-PLA_2 抑制剂的开发研究正迅速进行。葛兰素史克公司开发研制的 Lp-PLA_2 抑制剂 SB-480848 作为抗动脉粥样硬化新药正处于临床试验中^[19] ,最近报道其 II 期临床试验已经完成 ,正进入 III 期临床试验。另一个 Lp-PLA_2 抑制剂 SB-435495 作为抗动脉粥样硬化新药进入 I 期临床试验。最近又有一个新的小分子 Lp-PLA_2 抑制剂 SB-659032 的研究取得重大进展 ,进入

临床试验。显示 Lp-PLA₂ 抑制剂作为抗动脉粥样硬化新药的研究开发具有巨大的潜力。

6 结语

综上所述, Lp-PLA₂ 是 PLA₂ 超家族中的一员, 有着与其他 PLA₂ 不同的酶学特性, 如酶活性不需要钙离子等。Lp-PLA₂ 不仅是炎症和冠心病的风险标记物, 而且促进炎症和动脉粥样硬化, 是动脉粥样硬化形成的一个关键性酶。寻找 Lp-PLA₂ 抑制剂对于研究该酶与炎症及动脉粥样硬化的确切关系作用重大, 应用 Lp-PLA₂ 抑制剂是一种新的、非降脂策略的动脉粥样硬化治疗方法。目前对 Lp-PLA₂ 的生物学功能仍未完全认识, 其与动脉粥样硬化的关系也需进一步深入研究。此外, 由于 Lp-PLA₂ 的蛋白三维结构还没有获得, 对该酶的抑制剂筛选也还不能大规模进行, 但已有 Lp-PLA₂ 诊断试剂盒和 Lp-PLA₂ 抑制剂筛选模型建立。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] Zalewski A, Macphee 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 .
- [2] Macphee CH , Nelson JJ , Zalewski A. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ as a target of therapy[J]. *Curr Opin Lipidol* , 2005 , 16(4) : 442 - 446 .
- [3] Macphee C , Benson GM , Shi Y , et al . Lipoprotein-associated phospholipase A₂ : a novel marker of cardiovascular risk and potential therapeutic target[J]. *Expert Opin Investig Drugs* , 2005 , 14(6) : 671 - 679 .
- [4] Carpenter KL , Challis IR , Arends MJ. Mildly oxidised LDL induces more macrophage death than moderately oxidised LDL : roles of peroxidation , lipoprotein-associated phospholipase A₂ and PPARγ[J]. *FEBS Lett* , 2003 , 553(1/2) : 145 - 150 .
- [5] 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 .
- [6] Khuseynova N , Imhof A , Rothenbacher D , et al . Association between Lp-PLA₂ and coronary artery disease : focus on its relationship with lipoproteins and markers of inflammation and hemostasis[J]. *Atherosclerosis* , 2005 , 183(1) : 181 - 188 .
- [7] Caslake MJ , Packard CJ. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ as a biomarker for coronary disease and stroke[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* , 2005 , 10(10) : 529 - 535 .
- [8] Iribarren C. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and cardiovascular risk : state of the evidence and future directions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2006 , 26(1) : 5 - 6 .
- [9] 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 .
- [10] Koenig W , Khuseynova N , Lowel H , et al . Lipoprotein-associated phospholipase A₂ adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population : results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany[J]. *Circulation* , 2004 , 110(14) : 1903 - 1908 .
- [11] Brilakis ES , McConnell JP , Lennon RJ , et al . Association of lipoprotein-associated phospholipase A₂ levels with coronary artery disease risk factors , angiographic coronary artery disease , and major adverse events at follow-up[J]. *Eur Heart J* , 2005 , 26(2) : 137 - 144 .
- [12] Kardys I , Oei HH , van der Meer IM , et al . Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and measures of extracoronary atherosclerosis : the Rotterdam Study[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2006 , 26(3) : 631 - 636 .
- [13] Ballantyne CM , Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance[J]. *Atheroscler Suppl* , 2005 , 6(2) : 21 - 29 .
- [14] Sudhir K. Clinical review : lipoprotein-associated phospholipase A₂ , a novel inflammatory biomarker and independent risk predictor for cardiovascular disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab* , 2005 , 90(5) : 3100 - 3105 .
- [15] 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 .
- [16] 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[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2005 , 25(1) : 216 - 221 .
- [17] Blackie JA , Bloomer JC , Brown MJ , 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 , 13(18) : 2603 - 2606 .
- [18] 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 , 14(6) : 1067 - 1070 .
- [19] Rotella DP. SB-480848. GlaxoSmithKline[J]. *Curr Opin Investig Drugs* , 2004 , 5(3) : 348 - 351 .