

磷脂酸和溶血磷脂酸的生理功能*

江 波 江林涌[△] 周汉良 (浙江大学医学院药理学教研室, 杭州 310031)

摘要 磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)是细胞内和细胞外信号转导的重要磷脂信号分子。它们主要通过磷脂酶 D 和磷脂酶 C 两条途径产生,并且 PA 在磷脂酶 A₂ 的催化下可水解生成 LPA。越来越多证据表明,PA 和 LPA 在细胞诸多生理功能中起重要作用。本文主要介绍 PA 和 LPA 的生理功能及作用机制的研究进展。

关键词 磷脂酸; 溶血磷脂酸

学科分类号 R967

近年来,随着细胞内信号转导研究的不断深入,磷脂信号分子的作用日益受到重视。越来越多的研究表明磷脂代谢的中间产物磷脂酸(PA)和溶血磷脂酸(LPA)是重要的第二信使,在细胞诸多功能中发挥作用。PA 的来源主要有两个:(1) 磷脂酶 D 途径,即 PLD(Phospholipase D, PLD)水解磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)产生 PA 和胆碱;(2) 磷脂酶 C/二脂酰甘油激酶途径,即磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)水解磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PIP₂)产生 IP₃ 和二脂酰甘油(diacylglycerol, DAG), DAG 在 DAG 激酶的作用下生成 PA。LPA 的来源也有两个:(1) PA 在磷脂酶 A₂(phospholipase A₂, PLA₂)的催化下生成 LPA;(2) lys_o-PC 在 lys_o-PLD 的催化下直接生成 LPA。其中 PA 是 LPA 的主要来源。两者在体内受多种因素调节,作用复杂,本文主要综述两者主要的生理功能及作用机制。

一、磷脂酸(PA)的生理功能

PA 是 PLD 作用的直接产物,在细胞激活状态下,PA 能引起钙离子动员,激活或协同激活细胞内各种酶,如磷酸二酯酶(PDE)、蛋白激酶 C(PKC)、还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶等。在此基础上 PA 产生各种细胞效应。

(一) 促进细胞有丝分裂 PA 在有丝分裂原诱导的多种细胞(肝星形细胞、B 淋巴细胞等)有丝分裂中起作用,不仅如此,PA 在体外直接诱导乳腺上皮细胞、成骨细胞、T 淋巴细胞增殖。PA 促进细胞有丝分裂主要通过两方面作用:

1. 丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号转导途径:血小板生长因子(PDGF)是最强的肝星形细胞的有丝分裂原,与 PDGF 受体结合后,受体中的酪

氨酸激酶使酪氨酸残基发生自体磷酸化,一些含有 SH2 区域的分子(如 Grb2)即与其结合。Grb2 又与 Ras 活化蛋白、Sos 蛋白(Ras 的 GDP/GTP 转化反应促进蛋白)作用从而引起一个激酶链的活化,即 Raf-1、MAPKK 和细胞外信号调节激酶 ERK 的活化。其中 ERK 活性的维持相是细胞周期运转中重要成分的持续表达所必需的。Reeves^[1]在 PDGF 诱导肝星形细胞增殖的研究中发现 PDGF(50ng/ml)通过激活 PLD 产生 PA 延长 ERK 活化的维持相,从而 PDGF 产生比其它有丝分裂原强得多的作用。同时,PA(0~200 μmol/L)与肝星形细胞共育 4 小时能引起肝星形细胞 DNA 合成呈剂量依赖性增加。

2. cAMP-PDE 信号转导途径: cAMP 在多个位点阻断有丝分裂原诱发的有丝分裂作用,对细胞增殖起负面调控作用。PDE 能水解 cAMP,调节或终止环核苷酸的作用。Bawab 在 ConA(concanavalin A)诱发大鼠胸腺细胞增殖的研究中发现 PA(10~60ng/3 × 10⁶ cell)能激活 PDE,降低细胞内 cAMP 水平,使细胞由 G₀ 期转入 G₁ 期。甘油基 C₂ 为不饱和脂肪酸的 PA 对 PDE 的激活能力明显高于甘油基 C₂ 为饱和脂肪酸的 PA,提示 PA 的疏水成分在 PA 激活 PDE 中起较重要的作用。另外,许多研究表明钙离子、PKC 等也参与 PA 介导的有丝分裂。

PA 也具有抗细胞增殖效应。Gilbert 在大鼠和人类 B 淋巴细胞中首次发现 PA 有抗增殖作用。在百日咳杆菌及酪氨酸激酶抑制剂抑制抗原诱导的 B 淋巴细胞增殖过程中,PA 量有升高。在 ATP(1 μmol/L)激活 B 淋巴细胞表面的 P₂ 嘌呤受体而抑制 B 淋巴细胞增殖过程中 PA 量亦有升高。上述

*国家自然科学基金资助课题(39670836)
浙江省杭州市第一人民医院

结果提示 PA 在拮抗成熟 B 淋巴细胞增殖中有作用。

(二) 促进细胞内超氧化物的形成 中性粒细胞是宿主先天性免疫反应的主要成员, 这些吞噬细胞主要靠呼吸爆发产生超氧阴离子起杀菌作用。NADPH 氧化酶由胞质和膜结合蛋白共同组成。膜结合成分为细胞色素 b558, 包括 p22^{phox} (22kDa phagocyte oxidase component) 和 gp91^{phox}, 胞质成分为 Rac-GTP (Rac1, Rac2), 磷酸蛋白 p47^{phox}, p40^{phox} 和 p67^{phox}。当 NADPH 氧化酶多个成分被磷酸化时, 胞质成分转移到胞膜与胞膜成分组装成有活性的酶^[2]。目前认为 p47^{phox} 可被磷酸化, 导致构象改变, 首先转移至膜与 b558 结合, 然后 p67^{phox}、p40^{phox} 和 Rac1 相继转移至膜。其中 p40^{phox}、Rac1 的转移又依赖于 p67^{phox}。Rac2 转移不依赖于 p67^{phox}。研究表明 PA 能激活多种蛋白激酶, 包括 PKC 同工酶, P21 (Cdc42/Rac) 活化蛋白激酶, MAPK 从而磷酸化 p47^{phox}。Waite 发现了一种新的 PA (30μmol/L) 激活的胞浆蛋白激酶能磷酸化 p47^{phox}。Regier^[2] 发现 PA 还能通过一种新的丝/苏氨酸激酶磷酸化 p22^{phox}。磷酸化作用可能是 PA 激活 NADPH 氧化酶的主要原因。另外, 静息细胞中, Rac2 大多与 GDP 解离抑制蛋白(GDI) 相结合存在于胞质中, 当细胞激活时, Rac2 与 GDI 分离转移至膜参与 NADPH 氧化酶的激活。PA 能促进 Rac2 与 GDI 分离, 这可能是 PA 激活 NADPH 氧化酶的另一原因(李平, 1997)。

(三) 引起肌肉的收缩 近年来发现激动剂引起血管平滑肌、气道平滑肌收缩伴有 PA 含量的明显升高, 且与激动剂呈剂量依赖关系。PA (1~100μmol/L) 本身还能引起豚鼠回肠平滑肌收缩。与 PA 引起平滑肌收缩相似, Dhalla 还发现 PA 参与心肌肥大的病理机制, 使心肌收缩力增强。一些正性肌力药也能使心肌细胞中 PA 含量增加。上述结果均提示 PA 与肌肉的收缩有密切联系。同时各项研究均发现 PA 引起细胞收缩的功能都与其引起钙离子动员有密切关系。目前普遍认为钙离子动员可分为两相: 第一相主要机制为磷脂酶 C 分解 PIP₂ 产生 IP₃ 和 DAG, IP₃ 能引起内质网中钙离子的释放, 快速而短暂, 其第二相为外钙内流相, 缓慢而持久。PA 被认为与外钙内流有关, 而且酪氨酸激酶或磷酸肌醇(3) 激酶(PI₃K) 的抑制剂对 PA 引起的钙内流并无影响, 提示 PA 引起的钙内流不依赖于第一相的钙离子移动, 而是一个独立的过程^[3]。

早在 1980 年有学者认为 PA 是一个钙离子载体, 后又认为 PA 能通过自身结构的改变引起膜形成翻转的分子团或其他穿膜结构, 使钙离子由胞外流入。目前, 有人在中性粒细胞上发现 PA 能结合于脂质双层的钙离子通道来引起钙离子内流, 该通道可被维拉帕米阻滞^[3]。

(四) 促进激素分泌 激素的胞外释放是一个复杂的过程, 调节分泌的因素除钙离子和 ATP 外, 还需要多种胞质蛋白的参与, 各种脂类具有一定的调节作用。

PA 在 GH3 细胞(大鼠垂体前叶细胞)的小泡运输和分泌中起重要作用。首先, GH3 细胞与 PA 共育可部分降低酒精对小泡运输的抑制作用。其次, 将可通透 GH3 细胞与 1-丁醇共育抑制高尔基体分泌小泡的产生。另外, 将可通透的 GH3 细胞与催化 PA 产生的酶共育导致高尔基体产生分泌小泡。Siddhanta^[4] 发现 ARF-1 可激活 GH3 细胞 PLD1 导致 PA 产生增加, PA 介导衣蛋白(coat proteir I) 聚集至高尔基体膜, 并且促使高尔基体新生分泌小泡的形成。加入外源 PA (100~ 500μmol/L) 也可增加 GH3 分泌小泡生成。上述结果表明, PA 在内分泌细胞分泌中具有重要作用。其作用的机制可能为: (1) PA 可与衣蛋白 I、II, clathrin 和 dynamin 形成脂质体, 在小泡包被的形成中起蛋白和脂的连接作用; (2) PA 是 PIP₂ 合成的中间体, 而 PIP₂ 起蛋白和脂的连接作用。近来, PIP₂ 被提示在细胞运输小泡与目标靶膜的融合中起作用。

(五) 诱发血小板聚集 血小板的聚集与 PLC 途径的激活有密切联系。许多文献表明, 激动剂所致血小板聚集伴有 PA 水平的增高。惊厥状况下病人血小板反应性降低, 其 PA 的产生量也减少(Korner, 1998)。PLC 抑制剂 U 73122 能抑制胶原和 U46619(血栓素 A₂ 的类似物) 引起的血小板聚集, 同时 PA 的产生也受到抑制(Lockhart, 1999)。另外, PI₃K 抑制剂 wortmannin 和 LY294002 都能抑制胶原引起的 IP₃ 和 PA 的产生及钙离子的内流, 从而抑制血小板的聚集^[5]。由此可见, PA 在血小板的聚集中起一定作用。

二、溶血磷脂酸(LPA) 的生理功能

LPA 主要来源于血小板, 具有生长激素样效应, 在各项细胞效应中起重要的信号转导作用。大量证据表明 LPA 主要通过细胞表面特异性的 G 蛋白偶联受体发挥作用, 称为 EDG/LP (endothelial differentiation gene/ lysophospholipid) 受体家族。目

前已发现四条 G 蛋白介导的信号转导途径: (1) 磷脂酶 C 和磷脂酶 D 活化途径; (2) 腺苷酸环化酶抑制途径; (3) Ras 和下游 Raf/MAP 激酶活化途径; (4) Rho 信号途径, 调控粘着斑蛋白 (adhesion proteins) 的酪氨酸磷酸化和肌动蛋白细胞骨架的重组。LPA 在这些信号转导途径的基础上调控细胞各项生理活动。

(一) 促进细胞有丝分裂 LPA 能引起多种细胞增殖, 其中对成纤维细胞的研究最多。Cook 在大鼠成纤维细胞中发现 LPA (100 μ mol/L) 能诱导 ERK 的延迟相。Dunlop 在人胰岛细胞上进一步证明 LPA (10ng/ml) 能激活 CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4), 促进 CDK4 与 cyclin D1 形成复合物, 使细胞从 G1 期转入 S 期。近来 G 蛋白偶联受体的发现使 LPA 促有丝分裂的研究重点转入 Gi-Ras-MAPK 途径。LPA 激活 MAPK 后, 协同其他 MAPK 活化后基因及 Raf 反应后基因的作用共同引起早期基因 *c-fos* 和 *c-jun* 的转录 (Cook, 1999)。

随着分子生物学技术的不断发展, 对 LPA 引起细胞增殖的研究逐步进入到核内。NF- κ B 是转录因子 Rel 家族成员, 是重要的转录调节蛋白。静息状态下其与 I κ B 抑制蛋白结合以非活性状态存在。Shahrestanifar^[6]发现 LPA 能激发成纤维细胞 I κ B 降解, 活化 NF- κ B 引起 DNA 合成和 SRE (serum response element) 活化。LPA 活化 NF- κ B 的 EC₅₀ 值为 1~ 5 μ mol/L。

Gaite 发现 LPA 对肾小球细胞的增殖有双重作用。低剂量 (10~ 20 μ mol/L) LPA 能促进肾小球细胞增殖, 但大剂量 LPA (100 μ mol/L) 有轻微的抑制作用 (Gaite, 1997)。这可能与大剂量的 LPA 产生毒性作用有关。

(二) 抗细胞凋亡 LPA (1 μ mol/L) 是促进施旺细胞 (一种神经胶质细胞) 存活的有力因子, 具有抗细胞凋亡的作用。其发挥抗凋亡效应通过 Gi 依赖途径, PI₃K 活化及下游的 Akt/PKB 激酶的激活 (Moolenaar, 1999)。目前认为 LPA 对施旺细胞的抗凋亡作用参与一些脊髓疾病的病理机制。Koh 发现 LPA (50~ 7700nmol/L) 对外周血巨噬细胞也有抗凋亡作用 (Koh, 1998)。Goetzl^[7]研究证明 LPA 通过降低细胞内 Bax 的水平来拮抗 Fas、CD2、CD3、CD28 复合抗体引起的 T 淋巴细胞的凋亡。LPA 对抗这两种细胞的凋亡可能在人体免疫功能中起作用。LPA 拮抗肾小管远曲小管细胞凋亡可能参与肾小管损伤后肾脏疾病发展的病理机制。

LPA 本身具有细胞毒性, 在高浓度 (0.1mmol/L) 情况下, LPA 可诱导大鼠神经细胞凋亡, 更高浓度 LPA (10mmol/L) 可诱导 PC12 细胞凋亡。初步研究表明 LPA 通过作用于线粒体引起细胞凋亡, 而一些胰岛素样生长因子对此有保护作用。

(三) 影响神经细胞形态 LPA 能诱导许多神经细胞发生形态变化, 还能诱导成纤维细胞和神经细胞产生氯离子介导的快速膜去极化 (Dubin, 1999), 提示 LPA 具有神经调节因子作用, 甚至可能是一种神经递质。

LPA/S1P (sphingosine 1-phosphate) 诱导细胞形态改变已经在大鼠 N1E-115 成纤维细胞上广泛开展研究。这些来源于周围神经系统的细胞在迁移、增殖或分化上都表现成神经细胞样特点。在 LPA (10~ 100nmol/L) 作用下, 这些细胞生长锥 (growth cone) 崩溃, 生长突触回缩, 继而退化, 伴随短暂的细胞体变圆。一些含有 EDG2 受体的细胞, 如 PC12 细胞, 皮层神经纤维细胞, 中枢神经系统来源的 B103 神经纤维瘤细胞等在 LPA 诱导下亦可发现同样的改变, 可能通过小 G 蛋白 RhoA 及其下游因子 Rho 激酶 (ROK) 介导, 引起肌球蛋白轻链磷酸化导致细胞骨架收缩。Kranenburg^[8]发现 LPA 诱导的神经突触回缩和细胞变圆是通过 G α 12/13 亚单位而不是其他 G α 亚单位。目前, G α 12/13 亚单位如何引起 RhoA 的活化和神经突触的回缩仍在进一步研究中, 酪氨酸激酶活化可能在其中起作用。近来有文献报道, 在体外 G α 12/13 亚单位与一种 Rho 特异性交换因子 (Rho specific exchange factor) 有直接作用。LPA 通过 G α 12/13-RhoA-ROK 链影响神经元形态, 这在体内的神经生理和病理中有重要意义。

(四) 影响星形胶质细胞形态 LPA 对星形胶质细胞同样具有 RhoA 介导的细胞形态改变的作用。中枢神经系统的星形细胞通常表现为星形并不断变化的形态。当血脑屏障被破坏, 星形胶质细胞接触到血液中因子, 其形态发生改变, 并增殖形成胶质疤痕。这种被称为“反应性神经胶质增生”是一个神经元损伤的敏感指标, 并且被认为是中枢神经系统损伤后神经元再生的障碍。培养的神神经胶质细胞表现为扁平的上皮或成纤维细胞样形态, 而增加 cAMP 水平的药物作用后, 星形胶质细胞表现为星形, 相似于其在体内的表现。LPA 和其他的激动剂, 尤其是凝血酶, 除了促 DNA 合成外, 还能逆转星形细胞的星形, 刺激细胞变为扁平。Ramakers^[9]发现 LPA (1 μ mol/L) 通过 RhoA 介导星形细胞细胞

骨架收缩, 张力纤维和局部粘附分子集聚。通过改变星形细胞的星形, 刺激星形细胞增殖, LPA 和凝血酶共同作用促进神经损伤后反应性神经胶质增生和胶质疤痕。介导星形细胞形态改变的 LPA 受体亚型有待于进一步研究。

(五) 促进细胞迁移和浸润 LPA 能促进大鼠腹水肝细胞瘤和其他肿瘤细胞转移, 侵入单层未发生转变的细胞。这些肿瘤细胞在浸润同时伴有细胞表面小泡, 伪足形成等形态改变, 而 Rho 信号转导途径在其中起重要作用。LPA 在(25 μ mol/L) 引起肿瘤细胞迁移和浸润过程中, 除激活 Rho-ROK 链引起肌动蛋白多聚化和肌球蛋白磷酸化外, 还能协同纤维粘蛋白(FN) 引起局部粘附分子和肌动蛋白束形成, 局部粘附分子激酶(FAK) 和小柱体(paxillin) 的酪氨酸磷酸化(Imamura, 2000)。

除肿瘤细胞外, LPA 还能引起正常内皮的迁移, 在伤口的愈合、溃疡愈合以及血管再生中均起重要的作用。Hines^[10] 在 IEC-6(intestinal endothelial cell) 细胞中观察到 LPA(0.05 μ mol/L) 能引起一个典型的细胞内钙离子动员的峰和一个平台相。15 分钟后肌动蛋白纤维形成, 在 2 小时达到一个高潮。反应中伴有高水平的肌动蛋白和 FAK。这些反应均可被百日咳毒素(PTX) 抑制, 提示 G_i 在其中起作用。Panetti 对多种细胞(包括内皮细胞和非内皮细胞) 的迁移现象进行研究, 归纳出三种较为普遍的可以影响迁移的信号分子(G_i, Rho 和 PI₃K)。尽管干扰这三种信号分子均可以减少迁移, 但其影响迁移的机制各不相同(Panetti, 2000)。阐明细胞迁移和浸润的分子机制将有助于我们更好地了解癌症的转移过程。

三、结语

PA 和 LPA 都是脂质代谢的重要中间产物, 两者是互相联系, 密不可分的。PA 在 PLA₂ 的催化下能生成 LPA, 是 LPA 的主要来源。而 LPA 生成量的多少也能通过各种途径反馈影响 PA。正常情况下, 细胞内的各项生理活动总处于一个不断变化的动态平衡过程中, 两者之间不断地在相互转变。所以, 上述的一些生理功能均不能说是 PA 或 LPA 所特有的, 许多研究表明 LPA 也具有引起平滑肌收缩, 血小板聚集功能, 而也有文献报道 PA 能引起细胞形态改变, 细胞迁移。大部分文献均未对两者加以明确的区分。因此, PA 与 LPA 究竟存在怎样的

联系尚需进一步探讨, 这对于防止某些病理变化, 而又不影响正常的生理功能具有重要意义。另外, 目前大部分关于 PA 和 LPA 生理功能的研究尚处于现象阶段, 对于其中的机制仍不清楚, 有待于进一步深入。

参 考 文 献

- 1 Reeves HL, Thompson MG, Dack GL, et al. The role of phosphatidic acid in platelet derived growth factor induced proliferation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000, 31:95~100.
- 2 Regier DS, Greene DAG, Sergeant S, et al. Phosphorylation of P22phox is mediated by phospholipase D dependent and - independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2000, 275:28406~28412.
- 3 Lee ZW, Kweon SM, Kim BC, et al. Phosphatidic acid induced elevation of intracellular Ca²⁺ is mediated by RhoA and H₂O₂ in Rat 2 fibroblasts. *J Biol Chem*, 1998, 273:12710~12715.
- 4 Siddhanta A, Backer JM, Shields D. Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem*, 2000, 275:12023~12031.
- 5 Pasquet JM, Gross BS, Gratacap MP, et al. Thrombopoietin potentiates collagen receptor signalling in platelets through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Blood*, 2000, 95:3429~3434.
- 6 Shahrestanifar M, Fan X, Manning DR, et al. Lysophosphatidic acid activates NF- κ B in fibroblasts. *J Biol Chem*, 1999, 274:3828~3833.
- 7 Goetzl EJ, Kong Y, Mei B, et al. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of BAX. *J Immunol*, 1999, 162:2049~2056.
- 8 Kranenburg O, Poland M, Van Horck FP, et al. Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and G α 12/13 subunits in neuronal cells: Induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell*, 1999, 10:1851~1857.
- 9 Ramakers GJ, Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res*, 1998, 245:252~262.
- 10 Hines OJ, Ryder N, Chu J, et al. Lysophosphatidic acid stimulates intestinal restitution via cytoskeletal activation and remodeling. *J Surg Res*, 2000, 92:23~28.