

酸性鞘磷脂酶在急性肺损伤中的作用

王 会, 刘 丹, 胡长平

(中南大学药学院药理学系, 湖南 长沙 410078)

摘 要: 酸性鞘磷脂酶与多种肺部疾病的发病机制相关。急性肺损伤是一种与血氧不足、弥漫性肺泡损伤、炎症以及肺功能缺失有关的危及生命的疾病。炎症性肺部疾病的特征是酸性鞘磷脂酶活性增强导致神经酰胺产量增加, 进而使血管渗透性增强, 细胞凋亡增多以及肺表面活性剂改变。酸性鞘磷脂酶能够通过增加内皮通透性进而加速急性肺损伤的发病过程。本文对酸性鞘磷脂酶在急性肺损伤中的作用及其靶向治疗的应用价值进行了综述。

关键词: 急性肺损伤; 酸性鞘磷脂酶; 鞘磷脂
中图分类号: R974 **文献标识码:** A

酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, ASM) 是鞘脂类物质代谢的关键酶, 能够催化鞘磷脂产生神经酰胺。鞘磷脂是细胞膜和脂蛋白中一种重要的脂质成分, 其体内平衡能够维持细胞的正常结构和功能^[1]。鞘磷脂是由神经酰胺和磷酸胆碱在鞘磷脂合成酶的作用下生成, 也能够在这几种鞘磷脂酶的催化作用下水解为神经酰胺和磷酸胆碱^[2]。

神经酰胺通常可以通过以下方式生成: (1) 通过鞘磷脂酶活性对鞘磷脂进行水解; (2) 通过抑制神经酰胺酶, 这种酶可以水解神经酰胺产生鞘氨醇和脂肪酸; (3) 通过激活从头合成路径^[3]。

鞘脂类神经酰胺是一种重要的第二信号分子, 可以调节多种信号通路^[4]。神经酰胺及其代谢物影响多种细胞过程, 包括凋亡、衰老、分化、迁移等^[5]。

鞘磷脂酶可根据它们的最适 pH 值分为酸性、中性和碱性鞘磷脂酶。ASM 是酶家族中重要一员。目前, 这种酶被发现存在于几乎所有的细胞类型和人类组织中^[2]。中性鞘磷脂酶 (NSM) 存在多种亚型, 这些亚型由 3 种不同的基因 (NSM 1、NSM 2、NSM 3) 来编码, 并且需要 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 来保持活性^[6]。ASM 与 NSM 1、NSM 2 被认为是应激性细胞

凋亡的关键调节者。碱性鞘磷脂酶在肠道里分泌, 并且以一种特殊的胆汁盐依赖的方式吸收食物中的鞘磷脂。碱性鞘磷脂酶在结肠里可以调节神经酰胺的形成, 具有抗增殖和抗炎的功能^[7]。

1 酸性鞘磷脂酶的分子生物学特性

ASM 执行其代谢功能之前需要进行多个水平的细胞调节, 需要一系列的转录、翻译、转录后修饰、以及适当的运输才能形成成熟且具有功能性的酶。ASM 的活性受多种因素的影响, 包括脂质、阳离子、pH、氧化还原反应、和其他蛋白的影响^[5]。

尼曼-匹克病 (Niemann-Pick disease) 是由德国儿科医生 Albert Niemann 在 1914 年首次提出, 随后研究发现尼曼-匹克病患者体内鞘磷脂堆积, 之后又有研究指出尼曼-匹克病是由 ASM 缺陷引起的, 这些研究成果促使人们对 ASM 及其编码基因进行更广泛深入的研究^[1]。

1.1 编码基因

编码 ASM 的基因是 SMPD1。SMPD1 基因位于 11 号染色体短臂 (11p15.1 ~ 11p15.4) 上, 其 cDNA 全长约 2.5 kb, 包括 1890 bp 的开放阅读框, 能够编码 629 个氨基酸^[8-10]。鼠和人的 SMPD1 基因在 cDNA 和蛋白水平上具有 82% 的序列一致性, 这表明 SMPD1 基因在哺乳类动物中是高度保守的^[11]。有趣的是, 秀丽线虫有两种独立的基因, 它们能够编码功能性的 ASM (ASM-1 和 ASM-2), 这两种基因表现出截然不同的时间表达特征, 这与它们独特的生长

收稿日期: 2014-02-04

基金项目: 国家自然科学基金 (81273512)。

作者简介: 王会, 硕士研究生, 研究方向: 呼吸药理学。通讯作者胡长平, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 呼吸药理学, E-mail: huchangping@yahoo.com。

发育阶段相一致^[12]。人类 SMPD1 基因能够编码两种 ASM,分别为溶酶体型 ASM(L-ASM)和分泌型 ASM(S-ASM)^[13]。

1.2 转录后修饰和细胞内转运

最初翻译的 ASM 蛋白含有一个信号肽和 4 个功能结构域(鞘脂类激活蛋白/SAP 结构域、富含脯氨酸的结构域、金属磷酸酯酶结构域和 C-端结构域)。转录后,ASM 在内质网中经历蛋白水解过程。在内质网中,ASM 前体的 N-端信号序列被信号肽酶水解,形成一种成熟的形式^[1]。

1.3 N-糖基化

有研究人员预测在 ASM 多肽链中有 6 个 N-糖基化位点,其中有 5 个是具有功能性的(Asn86、Asn175、Asn335、Asn395、Asn520)^[14]。ASM 的糖基化能够使其适当的折叠和转运,同时在溶酶体处于有害环境时其糖基化能够阻止对 ASM 的破坏,起到保护作用^[5]。这些低聚糖侧链含有甘露糖-6-磷酸残基(M6P),能被 M6P 受体识别,或者与分拣蛋白(分拣蛋白是一种 I 型跨膜受体糖蛋白,含有与 M6P 受体相似的结构)相互作用,进而将 ASM 转运至溶酶体。同时,ASM 在高尔基体中的碳水化合物处理过程能够产生不含 M6P 残基的 ASM,此时的 ASM 会进入分泌途径^[1]。

1.4 磷酸化

Hannun 等研究发现,PKC 可选择性地促使 ASM 上丝氨酸残基 508 的磷酸化,导致 ASM 的活化并向质膜上转移^[15]。脂多糖能够导致 ASM 的活化、神经酰胺的积累和磷酸化以及 PKC 的活化,进而激活 Toll 样受体 4(TLR4)^[16]。这些结果表明磷酸化作为 ASM 活化的生物化学机制有助于理解 ASM 在正常发育和疾病状态下的功能。但是其磷酸化机制仍需进一步的研究。

1.5 阳离子需求

ASM 在组织提取物中首次作为一种酶被识别,它能够水解鞘磷脂产生神经酰胺和脂肪酸,最适 pH 值为:4.5 ~ 5.0。ASM 有两种存在形式:L-ASM 和 S-ASM。S-ASM 活化需要外源性的锌离子,而 L-ASM 活化不需要外源性锌离子^[17]。S-ASM 和 L-ASM 成熟后会到达各自细胞内的靶点,但是他们要受各种调节因素的支配,这些调节因素会影响其与底物的亲和力或催化速度^[5]。值得一提的是 S-ASM 也能够在中性环境中水解鞘磷脂,这能够揭示其在溶酶体外的脂蛋白修饰功能^[18]。

1.6 鞘脂酶激活蛋白样结构域

鞘脂酶激活蛋白(saposins,SAPs)是一种非酶活性的糖蛋白,主要是在酸性环境中发现,SAPs 能够促进多种鞘脂类物质的降解。ASM 一级结构的 N 端含有鞘脂酶激活蛋白(SAP)样结构域。ASM 中的 SAP 样结构域被认为是分子内的活化区域,起到促进鞘磷脂水解的功能,同时与富含脯氨酸的结构域作为铰链区^[5]。人鞘脂激活蛋白原的突变可导致所有 SAPs 的缺失,但这一缺失并未导致鞘磷脂的积累,这表明 SAP 样结构域在体内是起作用的。另有实验表明,ASM 中 SAP 样结构域中各种保守氨基酸的突变能够导致 L-ASM 活性降低,加入外源性的 SAPs 能够改善这一状况。但是,在微胞系统中,并不是所有这些突变都能导致 L-ASM 活性的降低^[19]。

2 酸性鞘磷脂酶与急性肺损伤

细胞脂质自体平衡中 ASM 活性起到重要作用。应激刺激时,ASM 可能通过 PKC 磷酸化或 syntaxin4 介导的信号通路迅速转移至质膜外小叶处,催化鞘磷脂水解为神经酰胺,形成富含神经酰胺的结构域,这一结构域能够增强膜信号转导并诱导细胞凋亡。有多种因素能够影响 ASM 的活性。ASM 的异常表达可导致多种疾病:尼曼-匹克病、心血管疾病、糖尿病、肺部疾病、肝部疾病、神经系统疾病等。本文主要围绕急性肺损伤进行论述。

急性肺损伤是应激状况的重要并发症,最严重的形式就是急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)。急性肺损伤有较高的死亡率,因此需要研究降低病死率的治疗方法。ARDS 是一种常见的发病迅速的致命性疾病,其特征为严重缺氧、双侧胸部浸润和呼吸衰竭。过度炎症期间增加的血管通透性能够导致 ARDS。过度炎症是指固有免疫系统的过度活化,通过中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞的过分兴奋引起 ARDS。ARDS 的典型诱因(败血症、肺炎、酸吸入)能够引起固有免疫系统的过度活化^[20]。

越来越多的证据表明,由 ASM 催化产生的神经酰胺和鞘氨醇-1-磷酸是急性肺损伤发病过程中宿主防御机制的重要调节者。一些能够诱导急性肺损伤的刺激因素(例如 LPS、PAF、TNF- α 、大量灌洗、或硫芥毒素)是促炎的,它们可以激活 ASM 产生大量的神经酰胺。

2.1 脂多糖诱导的急性肺损伤

脂多糖(LPS)能够导致多器官损伤,其中包括急性肺损伤。腹腔注射 LPS 是一种常见的诱导急性肺损伤的方法。LPS 激活 Toll 样受体 4 介导的信号转导通路诱导炎性介质的产生,从而产生急性肺损伤。脂多糖诱导的肺部炎症可导致 ASM 活性显著增强。丙咪嗪对 LPS 诱导的急性肺损伤起保护作用,能够改善肺组织损伤、降低炎症反应^[21]。

在分子水平,小窝蛋白-1(Cav-1)是多种信号通路的基本组成部分,包括 TGF- α 诱导的 Smad、Stat 和 ASM 神经酰胺信号通路。这些信号通路参与呼吸道的炎症和重塑。Cav-1 也能够调节血红素加氧酶-1(HO-1),进而调节肺部的氧化和炎症防御。在 LPS 诱导的早产羊的肺部炎症和呼吸道重塑中,早产羊肺部的炎症反应可降低 Cav-1,激活 Stat、Smad 和 ASM,增强神经酰胺和 HO-1 的表达^[22]。

LPS 处理动物能够增加细胞的凋亡,这表明 LPS 能够促进 TNF 的上调以及 ASM 依赖性神经酰胺的产生。但随后有研究指出 ASM 的确与 ARDS 有关,但是作用机制独立于内皮细胞凋亡。有文献指出神经酰胺诱导的内皮细胞高渗透性也是独立于凋亡的。同时也有文献报道载体实验中 LPS 诱导的肺水肿与血小板激活因子(PAF)有关^[20]。

2.2 血小板激活因子诱导的急性肺损伤

PAF 是一种促炎性的脂质调节因子,可以导致肺部疾病(哮喘或 ARDS)的多种炎症的形成。此外,肺部以外的病变(例如:肠缺血再灌注)能够通过 PAF 导致肺部产生损伤。PAF 的使用可导致支气管狭窄、肺高压、肺水肿、粘液分泌等。PAF 是急性肺损伤中肺水肿的调节者,能够在数分钟内增加血管渗透性。PAF 的活化是通过脂质修饰酶的介导,这些酶包括:1)环氧酶和脂氧合酶,通过产生血栓素和白三烯来调节血管收缩和支气管收缩;2)环氧酶和 ASM,通过形成前列腺素(PG)E₂ 和 33 神经酰胺来增强血管渗透性^[23]。

内皮型一氧化氮合酶(eNOS)位于小窝内,以一种非活性状态和 Cav-1 结合。eNOS 位于细胞膜上,eNOS 与鞘脂类物质的结合被认为是其信号转导和功能实施的重要方面。PAF 处理的 SD 大鼠中能够发现 ASM 活性增强、小窝中 eNOS 含量增加等。丙咪嗪和 D609 是两种结构不同的 ASM 通路抑制剂,能够抑制 PAF 诱导的肺水肿、抑制 Cav-1 向小窝膜的移动、增强内皮型一氧化氮的产生。PAF 能够通

过 ASM 依赖性的方式将 Cav-1 召集到小窝中来抑制 eNOS 的活性^[24]。

2.3 酸滴注诱导的肺损伤

用生理盐水进行反复的持续 24 h 呼吸道灌洗后,肺组织中的 ASM 和神经酰胺含量增加,使用表面活性剂或者表面活性剂与丙咪嗪的混合物能够抑制 ASM 和神经酰胺含量的增加^[25]。

2.4 TNF- α 诱导的急性肺损伤

在 A549 和 BEAS-2B 细胞中,ASM 抑制剂丙咪嗪能够增加 TNF- α 诱导的 IL-8 的产量,而中性鞘磷脂酶抑制后 IL-8 却没有变化。TNF- α 刺激 IL-8 水平的增加使中性粒细胞浸润这一必需宿主反应增强,这使得 ASM 迅速活化并产生大量的神经酰胺^[26]。TNF- α 处理 HT-29 人结肠细胞 12 h 后,细胞生存率下降,ASM 和神经酰胺含量均增加,用 ASM 抑制剂丙咪嗪可阻碍 TNF- α 对 ASM 的刺激,同时细胞生存率也增加^[27]。TNF- α 诱导 SD 大鼠产生的急性肺损伤模型中,ASM 的活性是增强的^[28]。以上这些信息表明,ASM 参与 TNF- α 诱导的急性肺损伤的致病过程。

3 酸性鞘磷脂酶的靶向治疗

从理论上讲,ASM 抑制剂在一些临床治疗领域可能具有较好的应用前景。ASM 抑制剂具有细胞保护、抗凋亡、抗炎和神经保护的作用,因此可用于多种疾病的治疗(包括脑缺血、中风、阿尔兹海默病、帕金森病等)。

ASM 逐渐成为多种疾病的重要药物治疗靶标。ASM 的抑制能够阻碍囊肿性纤维化大鼠模型以及内毒素、酸滴注或者 PAF 所致急性肺损伤的细菌感染。ASM 的抑制能够阻碍威尔逊疾病(Wilson disease)小鼠模型中肝细胞的凋亡和变性^[29]。ASM 的各种功能性抑制剂是可得到的,但是具有非特异性。选择性的抑制剂非常罕见。研究 ASM 抑制剂最合理的方法是底物类似物的合成,在底物类似物中磷酸盐离子是关键成分。由于磷酸盐能够抑制 ASM 的活性,因此检测 ASM 活性时不使用磷酸盐缓冲液作为溶剂。磷酸化的核苷和鞘脂类物质(鞘氨醇-1-磷酸、神经酰胺-1-磷酸)能够抑制 ASM,但是它们同时是其他多种磷酸酶和磷酸酯酶的底物,因此在细胞培养和体内试验中不能作为抑制剂使用。

三环类抗抑郁药(去甲丙咪嗪、丙咪嗪、阿米替

林) 是 ASM 的间接功能性抑制剂。在细胞培养中, 三环类抗抑郁药通过屏蔽带负电荷的溶酶体膜脂质、bismonoacylglycerophosphate (BMP) 和将 ASM 从溶酶体膜中分离出等方式有效地降低 ASM 的活性, 使其更易被蛋白水解降解。目前已有多种 ASM 抑制剂在试验中使用, 但是依然需要研究活性及特异性较强的抑制剂^[1]。

4 结论与展望

本文概述了 ASM 的结构和特性, 并对不同方式诱导的急性肺损伤模型进行分析。目前的研究表明 ASM 与急性肺损伤有密切的关系, 由 ASM 催化产生的神经酰胺是急性肺损伤发病过程中宿主防御的重要调节者。然而, ASM 在急性肺损伤发生和发展中的作用和分子机制尚需进一步的研究。根据目前已发表的研究结果, 相信 ASM 有望成为一个新的急性肺损伤药物靶标以及急性肺损伤预测因子。

参考文献:

- [1] He X, Schuchman EH. Potential role of acid sphingomyelinase in environmental health [J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2012, 37(2): 109-125.
- [2] Yang Y, Uhlig S. The role of sphingolipids in respiratory disease [J]. Ther Adv Respir Dis, 2011, 5(5): 325-344.
- [3] Husari AW, Dbaibo GS, Bitar H, et al. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia [J]. Respir Res, 2006, 7(1): 100.
- [4] Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress [J]. Science, 1996, 274(5294): 1855-1859.
- [5] Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase [J]. Cell Signal, 2009, 21(6): 836-846.
- [6] Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA. The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections [J]. Adv Enzyme Regul, 2011, 51(1): 51.
- [7] Duan RD. Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761(3): 281-291.
- [8] Schuchman EH, Levran O, Pereira LV, et al. Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1) [J]. Genomics, 1992, 12(2): 197-205.

- [9] Da Veiga Pereira L, Desnick RJ, Adler DA, et al. Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15. 1→ p15. 4 [J]. Genomics, 1991, 9(2): 229-234.
- [10] Schuchman EH, Suchi M, Takahashi T, et al. Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs [J]. J Biol Chem, 1991, 266(13): 8531-8539.
- [11] Newrzella D, Stoffel W. Molecular cloning of the acid sphingomyelinase of the mouse and the organization and complete nucleotide sequence of the gene [J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1992, 373(2): 1233-1238.
- [12] Lin X, Hengartner MO, Kolesnick R. Caenorhabditis elegans contains two distinct acid sphingomyelinases [J]. J Biol Chem, 1998, 273(23): 14374-14379.
- [13] Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, et al. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene [J]. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18250-18259.
- [14] Ferlinz K, Hurwitz R, Moczał H, et al. Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis [J]. Eur J Biochem, 1997, 243(1-2): 511-517.
- [15] Zeidan YH, Wu BX, Jenkins RW, et al. A novel role for protein kinase Cδ-mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in UV light-induced mitochondrial injury [J]. FASEB J, 2008, 22(1): 183-193.
- [16] Cuschieri J, Bulger E, Billgrin J, et al. Acid sphingomyelinase is required for lipid raft TLR4 complex formation [J]. Surg Infect (Larchmt), 2007, 8(1): 91-106.
- [17] Truman JP, Al Gadban MM, Smith KJ, et al. Acid sphingomyelinase in macrophage biology [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(20): 3293-3305.
- [18] Tabas I. Secretory sphingomyelinase [J]. Chem Phys Lipids, 1999, 102(1): 123-130.
- [19] Kölzer M, Ferlinz K, Bartelsen O, et al. Functional characterization of the postulated intramolecular sphingolipid activator protein domain of human acid sphingomyelinase [J]. Biol Chem, 2004, 385(12): 1193-1195.
- [20] Uhlig S, Yang Y. Sphingolipids in acute lung injury [M]. Handb Exp Pharmacol, 2013, (216): 227-246.
- [21] Yang J, Qu J, Summah H, et al. Protective effects of imipramine in murine endotoxin-induced acute lung injury [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 638(1): 128-133.

(上接第 521 页)

- [22] Kunzmann S, Collins JJP, Yang Y, et al. Antenatal inflammation reduces expression of caveolin-1 and influences multiple signaling pathways in preterm fetal lungs [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45 (5) : 969-976.
- [23] Göggel R, Hoffman S, Nuüsing R, et al. Platelet-activating factor-induced pulmonary edema is partly mediated by prostaglandin E₂, E-prostanoid 3-receptors, and potassium channels [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(5) : 657-662.
- [24] Yang Y, Yin J, Baumgartner W, et al. Platelet-activating factor reduces endothelial nitric oxide production; role of acid sphingomyelinase [J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(2) : 417-427.
- [25] Von Bismarck P, García Wistaädt CF, Klemm K, et al. Improved pulmonary function by acid sphingomyelinase inhibition in a newborn piglet lavage model [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(11) : 1233-1241.
- [26] Cornell TT, Hinkovska-Galcheva V, Sun L, et al. Ceramide-dependent PP2A regulation of TNF α -induced IL-8 production in respiratory epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(5) : 849.
- [27] Colell A, Morales A, Fernández-Checa JC, et al. Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipids formation: Possible role of ganglioside GD3 [J]. *FEBS Lett*, 2002, 526(1) : 135-141.
- [28] Ryan AJ, McCoy DM, McGowan SE, et al. Alveolar sphingolipids generated in response to TNF- α modifies surfactant biophysical activity [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 94(1) : 253-258.
- [29] Roth AG, Drescher D, Yang Y, et al. Potent and selective inhibition of acid sphingomyelinase by bisphosphonates [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48 (41) : 7560-7563.

(此文编辑:秦旭平)