

对氧磷酶的生理功能及其与动脉粥样硬化的关系

杜玮南

温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 石家庄 050017)

摘要 对氧磷酶是存在于高密度脂蛋白分子中的一种酶, 它能水解对氧磷类有机磷化合物和高密度脂蛋白上的氧化型磷脂, 因其具有抗动脉粥样硬化作用而日益受到重视。本文就对氧磷酶的生物化学性质、生理功能及其在动脉粥样硬化发生中的作用进行综述。

关键词 对氧磷酶; 动脉粥样硬化; 高密度脂蛋白

早在五十年代人们就发现生物体内存在一种能水解有机磷化合物的酶类, 称为对氧磷酶(paraoxonase, PON), 当时对此酶的功能不甚了解而未受到足够的重视。近年来的研究表明, PON 广泛存在于人类和多种哺乳动物的体内, 除能解除有机磷化合物的毒性外, 还与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生密切相关。

1 对氧磷酶的生物化学特性

血清中的 PON(又称芳香基二烷基磷酸酯酶, aryl-dialkylphosphatase)与载脂蛋白 AI 紧密结合, 共同参

与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的构成^[1]。目前认为, PON 由肝脏合成, 与之相关的 HDL 和载脂蛋白 AI 也产生于肝脏^[2]。因此推测, PON 产生后立即与载脂蛋白 AI 结合, 然后共同参与 HDL 的组装并释放入血。在对肝、肾、心、脾和肺等器官的 PON 表达活性进行检测时发现, 只有肝脏中存在 PON mRNA^[3]。除人类以外, 在鸟类及兔、鼠等哺乳动物的体内也发现了 PON, 其中以兔血清中的 PON 活性最高^[4,5]。

对氧磷酶分子量为 43 kDa, 是一种含有三条糖链的糖蛋白, 该酶的等电点为 5.1。有 A 型和 B 型两种同工酶, 两种同工酶的等电点相同^[6]。在两种同工酶中 A 型同工酶的活性低于 B 型, 高盐浓度可增加 B 型同工酶的活性^[7,8]。PON 活性在不同的人种及个体间相差可达 10~40 倍^[9,10]。这种差异可能与两种因素有关: 一是与酶蛋白第 191 位氨基酸的置换有关^[10,11]; 另一个是与酶蛋白含量下降有关^[12]。文献[13]报道, 在芳香酯酶 A 假性缺陷的个体, 芳香酯酶基因 3'端多聚腺苷酸发

生了附加信号突变,可使酶蛋白含量及酶活性下降90%。

除对氧磷是PON的底物外,该酶还可水解乙酸苯酯、有机磷酸酯、芳香羧酸和氨基甲酸酯等物质。不过在这些底物中,乙酸苯酯是最佳底物,对氧磷是唯一能区分两种同工酶的底物^[6]。通常,以对氧磷作底物时,该酶表现为PON活性;以乙酸苯酯作底物时,该酶表现为芳香酯酶活性。因此,从这个意义上说,PON的命名并不确切。

对氧磷酶基因是单拷贝,小鼠PON基因位于第6号染色体上^[3],人PON基因位于第7号染色体上^[10],其遗传受两个等位基因所控制。1991年,Hassett C等^[12]首先从兔肝cDNA文库中克隆了PON cDNA,证实该基因包括一个编码359个氨基酸的开放阅读框。然后,以兔cDNA探针从人肝cDNA文库中克隆了人类PON cDNA,该cDNA比兔cDNA编码的PON少4个氨基酸,为355个。两种PON的同源性大于85%,其cDNA分子第637~823位核苷酸的186个碱基序列完全一致,根据这一特点,可用该片段作探针筛选其它物种的PON基因。进一步的研究发现,人和兔的PON都保留有信号肽序列,仅有氨基酸末端的蛋氨酸残基被切除。二者保留信号肽的意义还不完全清楚,但它们的N末端序列与其它分泌蛋白的信号肽序列具有相似性,说明此信号肽与PON的分泌有关。

2 对氧磷酶的生理功能

对氧磷酶的功能与HDL密切相关,PON可以水解低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在氧化修饰过程中产生的氧化型磷脂,使之变成对人体无害的物质^[14,15]。因此,由氧化型磷脂所介导的炎症反应、单核-内皮细胞的相互作用及单核细胞聚集粘附并分化为巨噬细胞的作用均可被PON所阻断^[16]。已经证实,轻度修饰低密度脂蛋白被纯化的PON处理后,它诱导单核-内皮细胞相互作用的能力大大减小,经加热或用EDTA处理后,可显著降低HDL抗LDL氧化的能力^[17]。

对氧磷酶的活性无论在体内或体外均依赖于 Ca^{2+} 的存在^[17]。将 Ca^{2+} 络合剂EDTA或EGTA加入血清后所测得的PON活性比未加络合剂的对照组血清明显下降,可从 $6.50 \pm 0.22 \text{ ku/g 蛋白}$ 下降到 $0.59 \pm 0.12 \text{ ku/g 蛋白}$,其原因在于EDTA络合 Ca^{2+} 后,PON发生了构象改变,从而影响了酶与底物的结合,这种构象改变使特异性抗PON的单克隆抗体无法识别PON表面特异抗原决定簇而不能与之结合,因此酶联免疫吸附

法测得的酶浓度下降一半左右。但目前尚不十分清楚 Ca^{2+} 究竟是如何影响酶的活性及结构的。

除了 Ca^{2+} 以外,载脂蛋白AI与PON活性也密切相关。实际上PON与HDL上的载脂蛋白AI和载脂蛋白AII都能紧密结合,但以前者为主。经抗载脂蛋白AI抗体免疫吸附可除去血清中90%的PON,抗载脂蛋白AII抗体只能除去PON的10%,可见在HDL的蛋白成分中占70%的载脂蛋白AI是PON的主要结合者,除去载脂蛋白AI后,PON很容易失活。因此认为载脂蛋白AI对PON的活性发挥是至关重要的^[1]。

由于PON在HDL中与载脂蛋白AI紧密结合,故分离提纯PON比较困难。目前常采用加入 Ca^{2+} 、甘油及乳化剂911的方法来纯化酶蛋白,在此基础上可以对PON的其它性质进行研究^[1,18]。

3 对氧磷酶与动脉粥样硬化的关系

动脉粥样硬化是一种由多种因素所致的动脉血管壁脂质沉着形成粥样状病灶及纤维增生,导致血管壁变粗变硬及弹性下降的病变^[19]。在As形成过程中,LDL尤其是氧化型LDL(oxidized LDL OLDL)起着重要作用^[20]。HDL有抗As形成的作用,这一作用是通过多种机制发挥的。尽管人们通常都把注意力集中在HDL能反向转运胆固醇上,但越来越多的证据表明,PON的功能也是不能忽视的。

对氧磷酶在As发病中所起作用的研究始于1986年。当时的一项流行病学调查发现,患有心肌梗塞的病人血清中的PON活性明显低于正常对照组^[21],这一结果首次引起人们对PON的兴趣。进一步研究证实,家族性杂合子型高胆固醇血症和糖尿病患者血清中的PON活性也都比正常对照组低^[22],由于这两类病人都易患As,因而推测PON与As的发生发展有密切联系。

在 Cu^{2+} 的存在下,LDL可氧化为OLDL,即分子中产生包括氧化型磷脂在内的过氧化脂质。实验证明,若将HDL与LDL共同孵育,可使其过氧化脂质的产生下降50%^[23],这种作用依赖于HDL的浓度,且有饱和性,表明其中可能有PON的参与。不过需提及的是HDL分子中能水解氧化型磷脂的酶类并非仅有PON一种,HDL微粒上所含的血小板激活因子乙酰水化酶也有此作用^[24],它们共同构成HDL的抗氧化作用屏障。用EDTA灭活PON后,HDL抗LDL氧化的功能只有部分丧失,但若经加热处理,则完全失去抗氧化功能^[25]。

各种生物体内存在的PON有明显的量的差异,即

使同是人类个体间也有较明显的不同。这说明, PON 在遗传方式上可能存在着差异。Shin 等^[3]研究发现, 小鼠 PON 的表达同时受遗传和食物两种因素的影响。作者用 As 易感性小鼠 C57BL/6J (B6) 和不易感性小鼠 C3H/HeJ (C3H) 进行实验, 结果发现, 当以普通饲料喂养这两种小鼠时, 来自两系小鼠的 HDL 都具有抗 LDL 氧化及抑制单核细胞迁移的能力, 以对氧磷为底物测得的 PON 活性相差不大, 而且 B6 小鼠的 PON mRNA 水平比 C3H 小鼠还稍高些。但是当饲以致 As 的高脂肪或高胆固醇饲料时, 情况就发生了明显变化。此时从 C3H 小鼠分离得到的 HDL 仍然具有同等程度的抗氧化修饰的作用, 而从 B6 小鼠分离得到的 HDL 其抗 LDL 氧化及抑制单核细胞迁移的能力都大大下降, 明显低于喂以普通饲料的 B6 小鼠。C3H 小鼠经同样喂养后, 其 PON mRNA 水平反而较前略有上升。以上说明致 As 的高脂肪或高胆固醇饲料对 B6 小鼠的 PON 基因表达产生了明显的抑制作用, 而对 C3H 小鼠则没有影响, 目前还不清楚造成这种明显区别的原因。另外, 作者还发现, PON mRNA 水平越低, 小鼠血管壁形成的脂肪斑纹越多; 反之, PON mRNA 水平越高, 则脂肪斑纹越少。

综上所述, PON 是一种 Ca^{2+} 依赖的存在于 HDL 的酶, 靠与载脂蛋白 AI 结合发挥活性。高水平的 PON 可以通过水解 LDL 氧化修饰过程中产生的氧化型磷脂而起到抗 LDL 氧化修饰的作用, 从而阻抑 As 的发生; 低水平的 PON 则难以发挥此种作用。人群中 PON 活性的高低可能预示着人们罹患 As 可能性的大小。尽管 PON 在 HDL 抗 As 的全部作用只占一部分, 但仍为 As 的预防及治疗措施开辟了新的思路。

目前对 PON 的性质及基因表达调控的研究尚在探索之中。食物成份如何影响体内 PON 的活性? 不同种属的 PON 基因表达调控机制有何不同? 载脂蛋白 AI 如何影响 PON 的活性发挥? 这些都有待于进一步研究。

参考文献

- Blatter MC, James RW, Moser M, et al. Identification of a distinct human high-density lipoprotein sub species defined by a lipoprotein associated protein, K-45. *Eur J Biochem*, 1993, **211**: 871~879.
- La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: *Pharmacogenetics of Drug Metabolism* (Kalow W editor). New York: Pergamon press Inc, 1992; 51~91.
- Shih DM, Gu LJ, Hama S, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in athero-

- genesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 1 630~639.
- Chemnitz JM, Losch H, Losch K, et al. Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate. *Comp Biochem Physiol C*, 1983, **76**: 85~93.
- Saha N, Roy AC, Teo SH, et al. Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoprotein. *Clin Genet*, 1991, **40**: 277~282.
- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, et al. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase, evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 1991, **19**: 100~106.
- Eckerson HW, Romson J, Wyte C, et al. The human serum paraoxonase polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1983, **35**: 214~227.
- Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1983, **35**: 1 126~138.
- Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, et al. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos paraoxon. *Am J Hum Genet*, 1988, **43**: 230~238.
- Humbert R, Adler DA, Distech CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*, 1993, **3**: 73~76.
- Adkins S, Gan KN, Mody M, et al. Molecular basis for polymorphic forms of serum paraoxonase/arylesterase, glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*, 1993, **52**: 598.
- Hassett C, Richter RJ, Humbert R, et al. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: The mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 1991, **30**: 10 141~149.
- Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, et al. Arylsulfatase A pseudodeficiency: Loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 9 436~440.
- Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of HDL associated paraoxonase inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2 882~891.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington RN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FENW Lett*, 1991, **286**: 191.
- Mackness MI, Arrol S, Abbott C, et al. Protection of

- low density lipoprotein against oxidative modification by HDL-associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 1993, **104**: 129~135.
- 17 Blatter MC, Abbott C, Messmer S, et al. Quantitation of human paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population difference in protein concentrations. *Biochem J*, 1994, **304**: 549~554.
- 18 Furlong CE, Richter R, Chapline C, et al. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry*, 1991, **30**: 10 133~140.
- 19 Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, 1995, **91**: 2 488~496.
- 20 Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Rev Med*, 1992, **43**: 219~225.
- 21 Mcelveen J, Mackness MI, Colley CM, et al. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 1986, **32**: 671.
- 22 Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 1991, **86**: 193.
- 23 Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, et al. The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low density lipoprotein oxidation. *Biochem J*, 1993, **294**: 829.
- 24 Stremier KE, Stafforini DM, Prescott SM, et al. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 11 095.
- 25 Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 1995, **115**: 243~253.

(1997-05-18 收到, 1997-09-06 修回)