

对氧磷酶 1 与动脉粥样硬化的研究进展

于碧莲 综述, 赵水平 审校

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 对氧磷酶 1; 综述; 动脉粥样硬化; 基因多态性

[摘要] 对氧磷酶 1 是一种高密度脂蛋白相关性酯酶, 能催化磷酸酯键水解, 降解有机磷酸酯, 芳香羧基酯和氧化磷脂等多种物质。它能保护低密度脂蛋白使其不受氧化修饰, 降低体内氧化型低密度脂蛋白的水平。因此, 目前认为, 对氧磷酶 1 在有机磷中毒和抗动脉粥样硬化中起着重要的作用。目前, 在对氧磷酶 1 基因多态性, 抗动脉粥样硬化机制和血清活性的可能调节因素等研究方向取得了重大进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

对氧磷酶 1 (paraoxonase 1, PON1) 是一类钙离子依赖性高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 相关性且具有心血管保护作用的酯酶。对氧磷酶家族由 3 个成员组成: PON1、PON2 和 PON3。近几年来, 对对氧磷酶 1 的基因多态性、抗动脉粥样硬化机制以及活性调节展开了大量的研究, 取得了很大的进展。但迄今为止, 仍然对 PON2 和 PON3 知之甚少。

1 对氧磷酶 1 的生物化学特性

对氧磷酶 1 是一种分子量约 44 kDa 的糖蛋白, 含 355 个氨基酸残基, 通过疏水性极强的 N 端与 HDL 的载脂蛋白 AI 紧密结合并固定于 HDL 颗粒上, 由肝脏合成后分泌入血。Harel 等^[1]报道其晶体结构类似于 1-6 叶螺旋桨, 每叶均由 4 条链组成, 两个钙离子位于螺旋桨结构的中心孔道部位, 因分别与 PON1 的结构和水解活性有关, 而被称为“结构钙”和“水解钙”。

对氧磷酶 1 能水解多种底物, 包括对氧磷和对硫磷等一些有机磷复合物、甲氟磷酸异己酯和沙林等神经毒物以及丁内酯、高半胱氨酸硫代内酯等脂肪族内酯^[2]。通常血清中 PON1 活性是以测定其水解对氧磷、重氮磷或乙酸苯酯的能力来定量的^[3]。但是, 目前尚未明确 PON1 的生理性底物, 因此, 对于哪种底物能更好地用于 PON1 与动脉粥样硬化关系的研究尚无统一意见。

2 对氧磷酶 1 的抗动脉粥样硬化作用机制

对氧磷酶 1 抗动脉粥样硬化作用在敲除或过度表达 PON1 基因的小鼠上得到证实。载脂蛋白 E 基因缺失 (E⁰) 鼠在敲除 PON1 基因后, 可加速动脉粥样硬化发展^[4], 而使其表达人类 PON1 基因后, 粥样硬化病变缩小^[5]。关于其作用机制, 目前研究认为: PON1 可水解特异性胆固醇酯和磷脂

等脂质过氧化物, 保护低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 和 HDL 免受氧化修饰, 降低体内氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL) 水平。④PON1 可通过多方面作用抑制巨噬细胞源性泡沫细胞形成: 水解在氧化应激状态下发生氧化修饰的巨噬细胞脂质过氧化物; 减少巨噬细胞介导的 LDL 氧化修饰; PON1 磷脂酶 A₂ 活性可作用于巨噬细胞多不饱和脂肪酸产生溶血磷脂胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC), LPC 可能与 PON1 介导的巨噬细胞对 ox-LDL 摄取减少有关; 抑制巨噬细胞内胆固醇的生物合成; 此外, 尚可增强 HDL 介导的巨噬细胞胆固醇流出, 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter 1, ABCA1) 可能参与了这种机制 (图 1)^[6]。

3 对氧磷酶 1 基因多态性与动脉粥样硬化

对氧磷酶 1 基因位于染色体 7q21.3~q22.1, 全长约为 259 kb, 含有 9 个外显子和 8 个内含子。PON 是一个多基因家族, 包含 PON1、PON2 和 PON3 三个相邻且高度同源的基因^[7]。迄今为止, 通过 DNA 测序发现 PON1 基因多态性位点已将近 200 种, 其中, 171 个位于内含子, 5 个位于外显子, 5' 端和 3' 端非翻译区分别含有 7 个和 5 个^[8]。

3.1 对氧磷酶 1 编码区和启动子区基因多态性

在对氧磷酶 1 基因编码区存在两种常见的基因多态性, 分别是 CGA/CAA 置换导致 192 位 Arg/Gln 多态性 (Q192R) 和 ATG/TTG 颠换导致 54 位 Met/Len 多态性 (L55M)。前者研究得更为广泛, 因为其同工酶对各种底物的亲和力和水解活性存在差异。例如, PON1192R 水解对氧磷的能力是 PON1192Q 的 6 倍, 而 PON1192Q 对沙林具有更高的水解活性。对 PON1 晶体结构的研究揭示了两种同工酶水解活性的差异在于酶活性位点的结构不同, 精氨酸是酶活性位点的重要氨基酸残基。体外实验已经证明, PON1192Q 具有更强的保护 LDL 免受氧化修饰的作用。L55M 多态性不影响 PON1 与底物的相互作用, 但是 M 等位基因携带者具有降低的 PON1 血清浓度和活性。基因分析发现 L55M 与启动子区多态性 T(-107)C 存在连锁不平衡, 但并不能完全解释 L55M 多态性对 PON1 血清状态的影响^[2]。

[收稿日期] 2004-11-25 [修回日期] 2005-09-27

[作者简介] 于碧莲, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化与血脂。赵水平, 教授, 博士研究生导师。

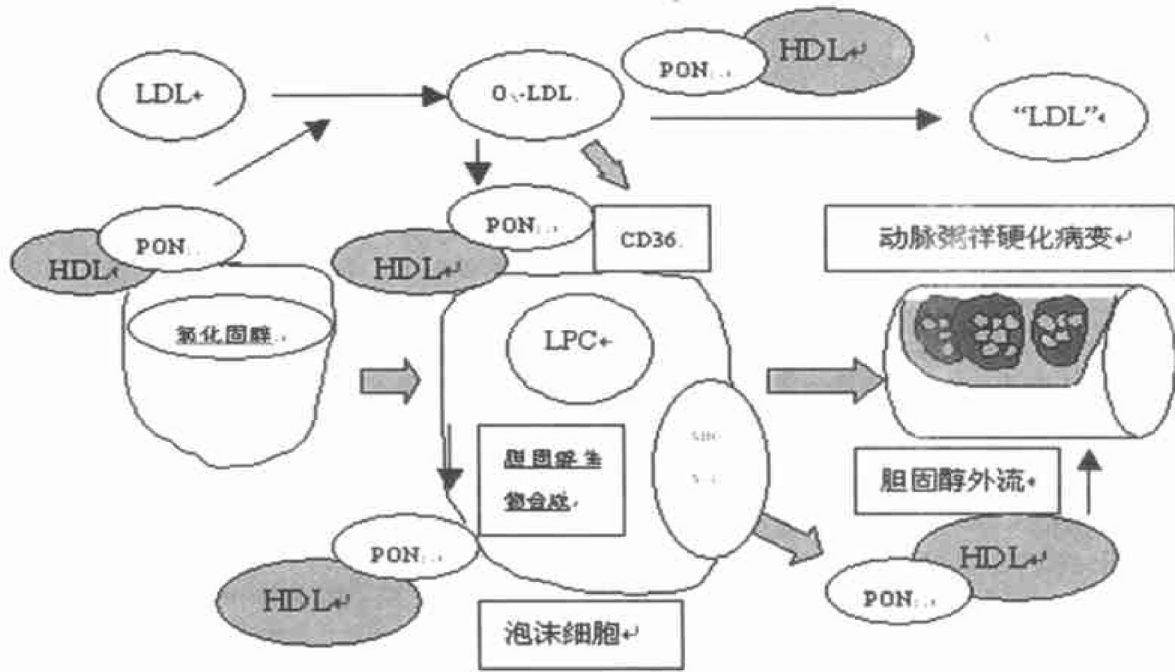


图 1. 对氧磷酶抗动脉粥样硬化机制示意图

最近对对氧磷酶 1 启动子区核苷酸序列的分析确定了五种多态性, 分别是-107C/T、-126G/C、-162G/A、-831G/A 和 908G/C^[9,11]。这些多态性导致了不同的启动子活性, 因而具有不同的基因表达水平和 PON1 血清活性。Brophy 等^[12]在白种人中研究发现-107C/T 多态性对人群 PON1 基因表达水平变异度影响最大, 达 22.8%, -162G/A 多态性影响较小, -908G/C 与其他多态性存在连锁不平衡, 其影响很小或不存在独立的影响。在中国汉族人群中也发现了-107C/T 的这种调节作用^[3]。启动子区多态性对 PON1 基因表达水平和血清活性的影响及其机制还在进一步研究中。

3.2 对氧磷酶 1 基因多态性与动脉粥样硬化

对氧磷酶 1 基因多态性与动脉粥样硬化危险度的相关性尚存在争议。尽管有大量研究认为 PON1 基因多态性是冠心病的独立危险因素^[13,15], 但也有一些实验得出了相反的结论^[16]。Jeremy 等^[17]荟萃分析了 43 项已发表的研究结果, 涉及到 PON1、Q192R、L55M 和 T(-107)C 三种基因多态性, 以及 PON2 S311C 多态性, 总共包括 11 212 名冠心病病人和 12 786 名对照。与以往研究结果不一致的是, 这项 Meta 分析显示 PON1 L55M 和 T(-107)C 多态性以及 PON2 S311C 多态性与冠心病并无明显相关, 尽管结果发现 PON1 Q192R 多态性与冠心病存在弱相关: 192R 等位基因相对危险度为 1.12 (1.07~ 1.16), 但这种弱相关并不见于样本量最大的五项研究中。有人提出 PON1 血清浓度和活性是冠心病更好的预测因子^[18, 19], 更多的研究应转向 PON1 血清状态的调节。对 PON1 基因的进一步研究应以发现对其基因表达和血清状态起关键作用的点突变和多态性位点为重点研究方向。

4 对氧磷酶 1 活性的非基因调节

进两年来, 有大量实验研究了 PON1 活性的非基因调节。影响血浆 PON1 活性的因素是多方面的, 许多内源性因素、药物以及环境因素等通过某些尚不确切的机制影响 PON1 活性。

4.1 内源性因素

在一项体外实验中, Nguyen 等^[20]发现多烯脂肪酸(C18:2-C20:5)能显著抑制 PON1 活性。饱和脂肪酸(C6-C18)和单烯酸(C16:1-C20:1)均可保护 PON1 免受多种物质的氧化失活, 且单烯酸显示了更强的保护作用(Emax, 70%~ 82%)。这种保护作用可能与脂肪酸分子结构中的阴性基团有关。在一项类似的研究中, Su 等^[21]报道共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)两种异构体均可保护 PON1 免受氧化失活, 油酸有类似的作用, 而亚油酸可通过非竞争性抑制对抗 CLA 的这种保护作用。关于内源性脂质对 PON1 活性的影响及其作用机制尚有待进一步研究。

炎症反应在冠状动脉粥样硬化发生发展中起枢纽性作用。致炎因子可能通过调节肝细胞 PON1 mRNA 表达影响 PON1 抗氧化特性进而影响粥样硬化病变发展。Kumon 等^[22, 23]报道白细胞介素 1β 和肿瘤坏死因子 α 可下调 HepG2 细胞 PON1 基因表达, 而白细胞介素 6 可上调其表达, 针对致炎因子调节 PON1 表达的研究可能进一步揭示 PON1 抗动脉粥样硬化机制。

4.2 降脂治疗对对氧磷酶 1 活性的影响

近来一些实验研究了降脂治疗对 PON1 活性和浓度的影响并试图探讨其机制。分别以对氧磷和乙酸苯酯为底物检测 PON1 活性时, 氟伐他汀(每天 20 mg/kg)可降低该酶活性分别达 23.6% 和 17.4%, 而低剂量的氟伐他汀(每天 2 mg/kg)以及两种剂量的普伐他汀均对血清 PON1 活性无影

响^[24]。Gouedard 等^[25]发现贝特类降脂药物可显著增加 HuH7 细胞 PON1 分泌型酶活性和 mRNA 水平,而三种他汀类药物——氟伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀则相反。这种调节的差异在于两类药物对 PON1 基因启动子活性的调节差异。Deakin 等^[26]报道辛伐他汀可显著增加血清 PON1 活性及浓度。此外,通过体外实验作者提出了其可能的分子机制。辛伐他汀可上调 PON 基因的启动子活性,且呈剂量依赖方式。这种调节可能通过一种核转录因子——胆固醇调节元件结合蛋白 2 来实现。最近的一项研究通过对 PON 基因上游序列的缺失分析发现显性启动子元件位于序列-269~ -97 之间,这一区域存在有胆固醇调节元件结合蛋白 1 结合位点,其过度表达能增强 PON1 启动子活性,这种上调作用可被光辉霉素所抑制^[27]。

4.3 环境因素及其他

在法国人群中进行的一项队列研究调查了性别、年龄、体质指数、酒精摄入量、是否吸烟以及口服避孕药对 PON1 活性的影响。研究结果发现,各种因素对 PON1 活性的影响呈现出性别差异性^[28]。Ali 等^[29]进一步研究了性别对 PON1 活性的影响。研究发现,雌性大鼠肝脏 PON1 mRNA 水平高于雄性大鼠,切除睾丸可增加肝脏 mRNA 水平达 170%,而切除卵巢对雌性大鼠肝脏 mRNA 水平无影响。

Seres 等^[30]研究了 129 例健康人群(年龄 22~89 岁) PON1 活性与年龄的关系,发现其对氧磷酶活性随年龄增长而降低($r = -0.38$, $P < 0.0001$),而芳香酯酶活性及其血清浓度维持稳定。另外的一项研究得出了相同的结论^[31]。PON1 活性的下降不能用载脂蛋白 A1 浓度的降低来解释,因此其机制尚有待进一步探讨^[30]。

一些研究致力于探讨生活方式对 PON1 活性的影响。Rao 等^[32]发现轻度嗜酒者(13~39 g/天,至少 6 个月) PON1 活性较不饮酒者增高 395%,重度嗜酒者(≥ 80 g/天)则降低了 45% ($P < 0.001$),且酶活性的改变与基因多态性无关。这与动物实验结果一致。在芬兰的一项死亡病例研究中则得出了不同的结论。Rontu 等^[33]通过对 700 名中年猝死患者进行尸解发现冠状动脉左前降支动脉粥样硬化病变程度与酒精摄入量 and M55L 基因多态性有关,相对于节制者(0~1 g/天)和适度饮酒者(1~36 g/天),嗜酒者(> 36 g/天)其脂纹和复合病变面积显著缩小,且这种相关性在 M55 等位基因携带者中更明显。一些研究认为吸烟可明显降低血清 PON1 活性^[34-36],Boemi 等^[36]通过多变量分析提出吸烟是血清 PON1 状态的一项独立决定因素。

关于环境毒物对 PON1 活性的影响也有报道。长期接触电离放射线的人群(> 5 年) PON1 对氧磷酶活性较对照组降低了 25%~30%^[37]。长期慢性接触杀虫剂也有可能导致 PON1 活性的降低^[38]。

5 总结

对氧磷酶 1 是一种钙离子依赖性 HDL 相关性酯酶,因能水解氧化脂质保护 HDL 和 LDL 免受氧化修饰以及抑制巨噬细胞源性泡沫细胞形成而具有抗动脉粥样硬化作用。尽

管有大量研究认为 PON1 基因多态性与动脉粥样硬化危险度之间存在相关性,但近年有学者提出 PON1 血清浓度和活性是冠心病更好的预测因子。关于其血清浓度和活性调节的研究已大量开展,进一步阐明其作用机制及其影响因素是 PON1 研究的方向,这可能为冠心病提供新的诊断和治疗途径。

[参考文献]

- [1] Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshstein B, Khersonsky O, Meged R. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11** (5): 412-419
- [2] Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase 1. *Clin Sci*, 2004, **107** (5): 435-447
- [3] Wang X, Huang J, Fan Z, Su S, Zhao J, Shen Y. Genetic and environmental factors associated with plasma paraoxonase activity in healthy Chinese. *Int J Mol Med*, 2004, **13** (3): 445-450
- [4] Shih DM, Xia YR, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*, 2000, **275** (23): 17 527-535
- [5] Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 2002, **106** (4): 484-490
- [6] Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*, 2004, **37** (9): 1 304-316
- [7] Mackness B, Durrington DN, Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet*, 1999, **353** (9151): 468-469
- [8] La Du BN. Future studies of low-activity pon1 phenotype subjects may reveal how pon1 protects against cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (8): 1 317-318
- [9] Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y. A polymorphism upstream from the human paraoxonase gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*, 2000, **150** (2): 295-298
- [10] Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (2): 516-521
- [11] Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*, 2001, **11** (1): 77-84
- [12] Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5 regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*, 2001, **68** (6): 1 428-436
- [13] Chen Q, Rels SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet*, 2003, **72** (1): 13-22
- [14] Watzinger N, Schmidt H, Schumacher M, Schmidt R, Eber B, Fruhwald FM. Human paraoxonase 1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community based study. *Cardiology*, 2002, **98** (3): 116-122
- [15] Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J. Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (2): 328-334
- [16] Robertson KS, Have E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Northwick Park Heart Study II. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1 639** (3): 203-212
- [17] Wheeler JC, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11, 212 cases of coronary heart disease and 12, 786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*, 2004, **363** (9410): 689-695

- [18] Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (9): 1451-457
- [19] Jarvik GP, Hatsukami, TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage Paraoxonase activity, disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (8): 1465-471
- [20] Nguyen SD, Sok DE. Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J*, 2003, **375** (Pt 2): 275-285
- [21] Su ND, Liu XW, Kim MR, Jeong TS, Sok DE. Protective action of CLA against oxidative inactivation of paraoxonase 1, an antioxidant enzyme. *Lipids*, 2003, **38** (6): 615-622
- [22] Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T, Shiinoki T, Tanimoto N, Inoue M. Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid*, 2002, **9** (3): 160-164
- [23] Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y, Hashimoto K. Human paraoxonase 1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin 1beta and tumor necrosis factor alpha, but is upregulated by interleukin 6. *Life Sci*, 2003, **73** (22): 2807-815
- [24] Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) on tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, **43** (1): 121-127
- [25] Gouedard C, Kourm-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase 1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol*, 2003, **63** (4): 945-956
- [26] Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (11): 2083-089
- [27] Osaki F, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Tsuzura S, Arai K. Roles of Sp1 and protein kinase C in regulation of human serum paraoxonase 1 (PON1) gene transcription in HepG2 cells. *Atherosclerosis*, 2004, **176** (2): 279-287
- [28] Vincent-Viry M, Sass C, Bastien S, Aguilon D, Siest G, Visvikis S. PON1-P192 phenotype and genotype assessments in 918 subjects of the Stanislas cohort study. *Clin Chem Lab Med*, 2003, **41** (4): 535-540
- [29] bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. Expression of major HDL-associated antioxidant PON1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med*, 2003, **34** (7): 824-829
- [30] Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop Jr, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol*, 2004, **39** (1): 59-66
- [31] Milochevitch C, Khalil A. Study of the paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2001, **65** (5-6): 241-246
- [32] Rao MN, Marmillot P, Gong M, Palmer DA, Seeff LB, Strader DB. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism*, 2003, **52** (10): 1287-294
- [33] Rontu R, Lehtimäki T, Ilveskoski E, Mikkelsen J, Kajander O, Goebeler S. Association of paraoxonase 1 M55L genotype and alcohol consumption with coronary atherosclerosis: the Helsinki Sudden Death Study. *Pharmacogenetics*, 2004, **14** (8): 479-485
- [34] Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem*, 2003, **49** (9): 1491-497
- [35] Senti M, Tomas M, Anglada R, Elosua R, Marrugat J, Covas MI. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population based study. *Eur J Intern Med*, 2003, **14** (3): 178-184
- [36] Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P, James RW. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*, 2004, **21** (5): 423-427
- [37] Serhatlioglu S, Gursu MF, Gulcu F, Canatan H, Godekmerdan A. Levels of paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde in workers exposed to ionizing radiation. *Cell Biochem Funct*, 2003, **21** (4): 371-375
- [38] Hernandez AF, Mackness B, Rodrigo L, Lopez O, Pla A, Gil F. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol*, 2003, **22** (11): 565-574