

对氧磷酶 1 在高密度脂蛋白结构与功能中的意义

商亮, 曹佳, 喻红

(武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 对氧磷酶 1; 高密度脂蛋白; 抗氧化; 动脉粥样硬化

[摘要] 高密度脂蛋白(HDL)的抗氧化抗炎活性很大程度上归因于对氧磷酶 1(PON1)的存在。PON1 主要由肝脏合成入血,经极低密度脂蛋白运输结合于 HDL 上,并在不同 HDL 亚型间转移,可与 HDL 组成蛋白相互作用而发挥高活性,对于维持 HDL 基本结构及抗氧化抗炎功能具有重要作用。PON1 的量及活性变化与 HDL 结构异常密切相关,并在一定程度上反映 HDL 抗动脉粥样硬化功能的改变。本文就 PON1 与 HDL 的结合、相互作用及与 HDL 功能的相关性作一综述。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Role of Paraoxonase 1: Implication in the Structure and Function of High Density Lipoprotein

SHANG Liang, CAO Jia, and YU Hong

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

[KEY WORDS] Paraoxonase 1; High Density Lipoprotein; Antioxidant; Atherosclerosis

[ABSTRACT] The anti-oxidative and anti-inflammatory activities of high density lipoproteins (HDL) are largely due to the paraoxonase 1 (PON1) located on it. PON1 is mainly synthesized in the liver and secreted into the circulation, using very low density lipoprotein (VLDL) as a vehicle to bind with HDL, and transferred between in the HDL subclasses. PON1 possesses a higher activity through interacting with other protein components in HDL, and plays an important role for HDL structure and its anti-oxidative and anti-inflammatory activities. The change in quantity and activity of PON1 is associated with abnormal structure and the atherogenic "dysfunction" of HDL. In this review we summarize data on the role played by PON1 on HDL structure and function, focusing on the relationship between their binding and interaction and function of HDL.

血液中高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 具有介导胆固醇逆向转运、抗氧化、抗炎、抗血小板聚集、抗纤溶及保护内皮等作用,被公认为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 及相关心脑血管疾病的重要防御因素^[1]。近年已有相当的研究报道, HDL 可在炎症、氧化应激、血脂紊乱、高糖等状态下转变成致 As 的“失功能”脂蛋白^[2]。人们已逐步认识, HDL 是具有组成、大小、性质异质性的脂蛋白,其功能取决于结构组成。HDL 的胆固醇水平可提示 HDL 代谢池大小,但胆固醇组成并不是 HDL

功能活性的执行者,升高血浆 HDL 胆固醇水平不能完全体现 HDL 防御 As 相关心血管事件的能力,故目前反映 HDL 质量和功能的新靶标成为基础与临床研究的热点; HDL 蛋白组成与功能的相关性研究将为“失功能性”HDL 的早期检测及干预奠定基础,对 As 的防治具有重要的临床意义^[3-4]。

本文将针对 HDL 结构中的一种抗氧化性的功能蛋白——对氧磷酶 1 (paraoxonase 1, PON1) 与 HDL 结构和功能的联系作一综述。

[收稿日期] 2015-07-18

[修回日期] 2015-11-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30770850, 81201335, 81270364) 资助

[作者简介] 商亮, 博士, 研究方向为脂代谢与代谢性疾病, E-mail 为 shangl@whu.edu.cn。曹佳, 博士研究生, E-mail 为 caojia1115@whu.edu.cn。通讯作者喻红, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制与防治, E-mail 为 yu.hong@whu.edu.cn。

1 PON1 的结构与抗氧化功能

PON1 为对氧磷酶基因家族中成员之一,是血液循环中一种与 HDL 紧密结合的钙依赖性酯酶,其相对分子量在 43 ~ 45 kDa 之间,最初因其水解有机磷农药中的对氧磷作用而被命名。PON1 的空间结构呈六叶螺旋体状,螺旋体的中央通道可结合 2 个钙离子,分别维系 PON1 的结构稳定性及催化活性;螺旋结构的顶部有 3 个 α -单环,其中 2 个单环在活性位点上形成 1 个独特的帽子结构,使 PON1 准确地与细胞膜或与 HDL 结合^[5]。研究发现,PON1 的第 284 位半胱氨酸 (Cys284) 的游离巯基可能是其抗氧化酶活性的关键位点^[6]。

现发现 PON1 在体内还有内酯酶、芳香酯酶、磷脂酶 A2 等多种生物活性,可作用于不同底物,分解过氧化氢、氧化磷脂、溶血磷脂酰胆碱、氧化游离脂肪酸、血小板活化因子、同型半胱氨酸硫代内酯等^[7-8],故认为 PON1 为循环中结合于 HDL 上最重要的抗氧化酶之一,是维系 HDL 结构完整性和功能的重要结构基础^[9]。研究证实,PON1 基因敲除小鼠体内氧化低密度脂蛋白 (oxidative low density lipoprotein, ox-LDL) 升高,血管壁 As 敏感性增高;而 PON1 高表达的转基因小鼠增强了其 HDL 抗氧化能力,明显降低动脉壁炎症状态及斑块形成^[10]。我们前期以对氧磷为底物建立血浆 PON1 活性的检测方法,在 As 模型的载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 基因敲除小鼠及清道夫受体 BI 基因敲除小鼠中,发现 PON1 的活性降低与 As 的发生密切相关^[11-12]。同时,流行病学调查也表明,人群中可因 PON1 基因多态性、高脂、高糖等异常代谢性因素出现血 PON1 活性降低,与冠心病发生风险的增加密切相关^[13];我们对冠心病的调研也认为,血清低 PON1 活性可作为评估冠心病事件发生及严重程度的独立危险因素^[11]。尽管 PON1 的作用机制有待进一步研究,但显然 PON1 抗氧化抗炎活性对于抗 As 效应功不可没^[14-15]: (1) 通过水解氧化磷脂等,降低体内 ox-LDL 含量,减少巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取而抑制细胞泡沫化^[10]; (2) 降低单核细胞对内皮细胞的黏附力和趋化性,抑制单核-巨噬细胞的分化并直接抑制巨噬细胞炎症因子的分泌^[16-17]; (3) 保护 HDL 免于体内各种氧化因素氧化^[15],维系 HDL 结构的完整与抗 As 功能的发挥。

2 PON1 分布与 HDL 的关系

PON1 可在肝、心、肺、脑、肾、肠、皮肤等多种组

织细胞内表达^[18],主要由肝脏合成分泌入血,由极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 携带在循环中转移结合于 HDL。其约 95% 存在于 HDL 中,少量存在于 VLDL 和乳糜微粒,在低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 中尚未发现^[5]。正常人动脉的 PON1 水平较低,分布于平滑肌细胞中,而 As 进程中的斑块, PON1 含量明显增高,可在血管的内膜及中膜层积聚^[15]。

2.1 游离型 PON1 和结合型 PON1

虽然 PON1 绝大多数结合于 HDL、VLDL 等脂蛋白上,但正常生理状态下 PON1 也可与 HDL 脱离,成为血循环中的游离型 PON1。有结构学分析发现,正常生理环境中 PON1 结合型或游离型的状态主要与 192 位 R (精氨酸)/Q (谷氨酰胺) 的多态性相关,RR 型人群中, PON1 与 HDL 紧密结合,而在 QQ 和 RQ 人群中,游离型 PON1 的比例更高^[19]。在非生理状态下存在 PON1 的游离状态,则与氧化应激性疾病的发生有关^[19-20]。研究提示,在糖尿病患者中游离型 PON1 增加与 PON1 活性降低相关^[19];而饮用抗氧化的石榴汁试验研究中,摄入石榴汁使结合型 PON1 显著增加 32%;采用脂蛋白缺陷型血清进行研究显示, PON1 因不能结合脂蛋白而引起含量下降 62%^[21]。因此与 HDL 的结合能使 PON1 维持高活性,提示促进 PON1 与 HDL 结合水平可能作为疾病预防的一种新手段。

2.2 PON1 在 HDL 及其亚类中的结合及分布

研究证实,结合于 HDL 上的 PON1 有利于维系 HDL 结构完整性和功能,而 HDL 的组成也影响 PON1 与 HDL 的结合。PON1 主要是通过 PON1 的疏水性 N 端与 HDL 的磷脂结合, HDL 上的 ApoAI、ApoJ 在其中起着重要的联系作用。HDL 中通常有 ApoAI 与 ApoAII 两种,它们在 PON1 结合中起着相反作用:含 ApoAI 的 HDL 可明显增强 PON1 结合的稳定性,相反, ApoAII 使 HDL-PON1 复合物不稳定^[22]。

血循环中 HDL 从新生的无脂状态到接受外周细胞脂质并转运至肝脏,历经了不断成熟的代谢过程,因此血中 HDL 是一高度异质性的脂蛋白复合体,依据其大小、密度、蛋白和脂质含量/比例,可以分为不同亚型,通过梯度凝胶电泳将 HDL 颗粒由大到小分为 HDL3c、HDL3b、HDL3a、HDL2b 和 HDL2a。研究报道, HDL 最初并不含有 PON1,在 HDL 成熟过程中, PON1 可在不同 HDL 亚型间转移,但 PON1 并非随机或均匀分布于 HDL 亚型中,随着 HDL 在脂质/蛋白成分改变而呈现分布的变

化, PON1 含量差异可达 100 ~ 1000 倍^[23-24]。尽管 PON1 在 HDL 中转运机制研究甚少, 但 PON1 可逐步转移到小颗粒 HDL2 和大颗粒 HDL3 中的含量明显增高, 并使酶活性达最大化; 这种转移和活化过程常伴有 HDL 其它蛋白组分的同时转移, 如 ApoE、ApoAI 和 ApoAII 等^[5, 25]。研究也显示, HDL 的代谢过程如被胆固醇酯转移蛋白抑制剂等所阻抑, PON1 也会被快速灭活^[26]。

3 PON1 活性与 HDL 的功能联系

3.1 PON1 以 HDL 为支架发挥抗氧化功能

PON1 的蛋白晶体结构分析提示 PON1 结构易弹性变化, 具有界面活化能力, 结合 HDL 后在其表面易于活化, 因此 HDL 作为 PON1 的接受体和运载体, 可促进 PON1 的分泌并稳定酶结构^[5, 27]; 同时, PON1 的完全活化也需要 HDL 的 ApoAI 参与, 有报道提出 PON1 的对氧磷酶活性和芳香酯酶活性可不依赖 HDL 的载脂蛋白成分, 而 ApoAI 高亲和力结合 PON1, 可很大程度上稳定 PON1 的结构, 上调其内酯酶活性, 促进抑制 LDL 氧化的作用^[27], 因此 HDL 被认为是 PON1 的功能支架, 是 PON1 酶活性体现的基础^[5]。

血管内抗氧化/氧化的平衡对于维持血管健康至关重要, 随着人们对氧化应激、炎症状态下“失功能性”HDL 的认识, 越来越重视 HDL 上氧化与抗氧化组分的协调对血管壁细胞功能的影响。研究报道, 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 由髓系细胞 (主要是中性粒细胞和单核细胞) 合成分泌, 可产生自由基和多种反应性物质, 能够选择性诱导 HDL 中 ApoAI 的氧化, 使“好”HDL 转变为“坏”HDL, 通过损伤 HDL 的抗 As 保护功能, 加重氧化应激及炎症而造成血管病变, 加速 As 进展。PON1 可与 MPO 在 HDL 上互相作用, 形成 PON1-HDL-MPO 复合物, 彼此调控, 以 HDL 为平台进行氧化和抗氧化的动态平衡, 调节血管壁的氧化还原状态^[28-29]。一方面, PON1 可直接抑制 MPO 活性; 另一方面, PON1 的第 71 位酪氨酸是 PON1 功能及与 HDL 连接的重要位点, 此位点又可被 MPO 氧化, 故 MPO 升高又会降低 PON1 活性以及抑制 HDL 上 ApoAI 的功能^[28]。

3.2 PON1 抗氧化保护 HDL 的功能

正常生理性 HDL 中 PON1 能抑制过氧化脂质如丙二醛以及氧化载脂蛋白的形成^[30], PON1 酶活性降低, 可导致 ox-LDL 水平增加, HDL 被氧化修

饰, 诱发血管内皮失功能, 减少 NO 释放^[31], 单核细胞趋化及巨噬细胞泡沫化, 促发 As 的发生发展, 这些表现均是“失功能性”HDL 的特征^[2, 4]。利用 PON1 基因敲除小鼠的研究表明, 从该小鼠中分离的 HDL 并不能阻止 LDL 氧化和单核细胞趋化作用, 但从野生型小鼠中分离的 HDL 能阻止 LDL 中脂质过氧化物的形成, 并降低单核细胞的趋化作用^[5]。因此, PON1 对维持 HDL 的结构完整性及功能有着重要的意义。

介导胆固醇逆向转运被认为是 HDL 抗 As 的主要功能, 氧化修饰的 HDL 一定程度丧失该作用, PON1 能够有效抗氧化修复 HDL, 可促使巨噬细胞胆固醇外流作用显著增强^[20], 因此, PON1 作为 HDL 的重要组成对机体的脂代谢平衡具有极为重要的意义。

Efrat 等^[32]指出 PON1、HDL 和抗氧化剂是机体抗 As 早期的三大主要成分, PON1 既能够抗 HDL 氧化, 也能上调 HDL 的受体。研究发现, PON1 过表达不仅能增强抑制 HDL 的氧化, 并可使胆固醇酰基转移酶的活性增强, 活化的胆固醇酰基转移酶可促进 HDL 中游离胆固醇的酯化, 影响 HDL 的成熟代谢状态及抗氧化作用的发挥^[5]。

另有报道称, PON1 并不是 HDL 中固定的组分, 其可以活化的形式从 HDL 转移到细胞膜外表面直接发挥作用^[33], 故仅以 PON1 活性评估 HDL 抗氧化、抗 As 功能并不一定全面, 有待结合的 PON1 含量、HDL 的状态才能更准确反映 PON1 对 HDL 功能体现的意义。

4 小 结

HDL 是携带 PON1 的主要脂蛋白, PON1 因其显著的抗氧化作用对于 HDL 的结构完整性及其功能体现具有重要意义。PON1 最初经 VLDL 运输并交换至 HDL 后, 在不同 HDL 亚型间转移, 主要分布于 HDL3 和 HDL2 中, 因与 HDL 上的 ApoAI 紧密结合而表现出高的抗氧化酶活性, 并以 PON1-HDL-MPO 复合物形式调控着 HDL 的氧化/抗氧化平衡, 因此 HDL 是 PON1 的功能平台, 同时, PON1 的抗氧化作用对于 HDL 的正常代谢及功能发挥着积极的意义, PON1 的量及酶活性变化也是 HDL“失功能性”的体现。进一步深入研究 PON1 与 HDL 的结合、相互作用及调控机制, 可为 HDL 正常功能的维持、修复及防治 As 的措施提供新思路。

[参考文献]

- [1] Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease[J]. *Lancet*, 2014, 384(9943): 618-625.
- [2] Ragbir S, Farmer JA. Dysfunctional high-density lipoprotein and atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2010, 12(5): 343-348.
- [3] Otrocka-Kmieciak A, Mikhailidis DP, Nicholls SJ, et al. Dysfunctional HDL: a novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, 51(4): 314-324.
- [4] Riwanto M, Rohrer L, von Eckardstein A, et al. Dysfunctional HDL: from structure-function-relationships to biomarkers [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 224: 337-366.
- [5] Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 439: 5-13.
- [6] Tavori H, Aviram M, Khatib S, et al. Human carotid lesion linoleic acid hydroperoxide inhibits paraoxonase 1 (PON1) activity via reaction with PON1 free sulfhydryl cysteine 284 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(1): 148-156.
- [7] Devarajan A, Shih D, Reddy ST. Inflammation, infection, cancer and all that the role of paraoxonases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 824: 33-41.
- [8] Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans[J]. *Faseb J*, 2010, 24(3): 931-936.
- [9] Mackness M, Mackness B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(7): 829-837.
- [10] Mackness B, Quarck R, Verreth W, et al. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(7): 1545-1550.
- [11] Zhou C, Cao J, Shang L, et al. Reduced paraoxonase 1 activity as a marker for severe coronary artery disease [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(2): 97-103.
- [12] Yu H, Zhou CY, Li Y, et al. Effect of scavenger receptor class BI on high-density lipoprotein structure and function[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: pp e204.
- [13] Mackness B, Turkie W, Mackness M. Paraoxonase-1 (PON1) promoter region polymorphisms, serum PON1 status and coronary heart disease[J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(1): 8-13.
- [14] Kowalska K, Socha E, Milnerowicz H. Review: the role of paraoxonase in cardiovascular diseases[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(2): 226-233.
- [15] Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases[J]. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(11): 523-532.
- [16] Rosenblat M, Volkova N, Ward J, et al. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 49-56.
- [17] Aharoni S, Aviram M, Fuhrman B. Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(2): 353-361.
- [18] Marsillach J, Mackness B, Mackness M, et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(2): 146-157.
- [19] Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, et al. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(11): 2492-502.
- [20] Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum; relevance to diabetes[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187(1): 74-81.
- [21] Rosenblat M, Ward S, Volkova N, et al. VLDL triglycerides inhibit HDL-associated paraoxonase 1 (PON1) activity: in vitro and in vivo studies[J]. *Biofactors*, 2012, 38(4): 292-299.
- [22] Maiga SF, Kalopissis AD, Chabert M. Apolipoprotein A-II is a key regulatory factor of HDL metabolism as appears from studies with transgenic animals and clinical outcomes[J]. *Biochimie*, 2014, 96: 56-66.
- [23] Rosenson RS, Brewer HB, Jr, Chapman MJ, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(3): 392-410.
- [24] Heinecke JW. HDL's protein cargo: friend or foe in cardioprotection? [J]. *Circulation*, 2013, 127(8): 868-869.
- [25] Gugliucci A, Kinugasa E, Ogata H, et al. Activation of paraoxonase 1 after hemodialysis is associated with HDL remodeling and its increase in the HDL2 fraction and VLDL [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 430: 9-14.
- [26] Gugliucci A. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 429: 38-45.
- [27] Gaidukov L, Tawfik DS. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(35): 11843-854.
- [28] Huang Y, Wu Z, Riwanto M, et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3815-828.
- [29] Aviram M, Vaya J. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(4): 339-344.
- [30] Gordon SM, Hofmann S, Askew DS, et al. High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2011, 22(1): 9-15.
- [31] Speer T, Rohrer L, Blyszczek P, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2[J]. *Immunity*, 2013, 38(4): 754-768.
- [32] Efrat M, Aviram M. Paraoxonase 1 interactions with HDL, antioxidants and macrophages regulate atherogenesis--a protective role for HDL phospholipids[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 660: 153-166.
- [33] Deakin SP, Bioletto S, Bochaton-Piallat ML, et al. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(1): 102-109.