

抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 6 研究进展

张成林 李建远

Peroxiredoxins (Prdxs) 是新近发现的一类非硒依赖过氧化物酶家族蛋白,广泛存在于各种生物体内。根据 Prdxs 蛋白保守 cys 不同(1 个或 2 个),进一步分为 1-Cys 或 2-Cys 亚类。迄今,已在哺乳动物组织中发现了 6 个 Prdxs 家族蛋白。其中 Prdx 1-5 为 2-Cys 酶,以硫氧还蛋白作为电子供体;Prdx6 蛋白是哺乳动物中唯一的 1-Cys 酶,以谷胱甘肽(GSH)为电子供体(还原剂)。Shichi 等在牛眼睫状体中首先分离获得 Prdx6 蛋白,对 N-端氨基酸测序鉴定,并称为非硒依赖谷胱甘肽过氧化物酶^[1]。Nagase 等用随机克隆方法获得编码人 Prdx6 蛋白 cDNA (ORF6),表达蛋白序列与 Prdxs 同源^[2]。同一蛋白随后作为钙-不依赖磷脂酶 A₂ 蛋白从大鼠肺中分离,蛋白序列与 ORF6 翻译氨基酸序列具有同源性。进一步确认蛋白具有钙-不依赖磷脂酶 A₂ 和过氧化物酶活性。作为 1-Cys 酶,这一蛋白过去曾被称为 LTW4、抗氧化蛋白 2、Clara 细胞蛋白 26、p67 吞噬细胞氧化酶(phox)结合蛋白。因为基因表达受角质化细胞生长因子(KGF)调控,所以又被叫做 KGF 调节基因 1。现在已经清楚,上述蛋白为同一个蛋白。

一、Prdx6 蛋白与相关疾病

大量研究证明 Prdx 6 蛋白与一定疾病相关。Trudel S 等^[3]研究表明 Prdx6 蛋白是纤维囊泡症(CF)抗氧化失效的关键因素,蛋白缺失引起氧化还原失衡。受损的磷脂氢过氧化物氧化损伤修复机制促进了氧化损伤,放大了氧化应激信号,促进了肺纤维囊泡症(CF)炎症应答。Prdx6 蛋白或 mRNA 在动脉粥样硬化实验小鼠中表达明显下降^[4],在突变的超氧化物歧化酶小鼠脊髓中明显上调^[5]。帕金森病、雅各病、匹克病、肺恶性间皮细胞瘤、鳞状上皮细胞癌、皮肤伤口愈合区、实验性早衰细胞等都发现与 Prdx6 蛋白相关。另外,Prdx6 蛋白与 p67 吞噬细胞氧化酶结合参与嗜中性 NADPH 氧化酶活性^[6],在红细胞溶血产物中保护高铁血红蛋白形态,在决定植物种子发芽中,也发挥一定作用^[7,8]。

二、Prdx6 蛋白质结构与功能

Prdx6 蛋白是一个双功能蛋白,具有 GSH 过氧化物酶和磷脂酶 A₂ 活性。蛋白有 224 个氨基酸组成,相对分子质量 25.1 kDa。蛋白结构呈现 Prdxs 家族的螺旋管状的硫氧还蛋白折叠。Fisher 等用 NADPH 为底物检测蛋白 GSH 过氧化物酶活性,酶能还原 H₂O₂,短链氢过氧化物、脂肪酸氢过氧化物、磷脂氢过氧化物^[9]。Akiba 等通过标记棕榈酸盐方法检测蛋白的磷脂酶 A₂ 活性^[10]。两种酶活性主要不同是最适 pH 不同,在 pH 4 磷脂酶 A₂ 活性最大,适合于溶酶体定位;而过氧化物酶最适 pH 值 7,适合于细胞质环境^[11]。重组人 Prdx6 蛋白晶体是由单体头尾相接组成同源二聚体结构。Choi 等把蛋白非保守表面 Cys91 氨基酸残基突变为 Ser,利用 H₂O₂ 将保守的 Cys47 氧化为半胱次磺酸得到结晶^[12]。蛋白主要结构特点是一个由 80 个氨基酸组成硫氧还蛋白折叠,有 4 个 β 折叠,两个 α 螺旋。硫氧还蛋白折叠结构已经在硫氧还蛋白、谷氧还蛋白、GPx1 蛋白、谷胱甘肽 S-转移酶等参与氧化还原反应蛋白中发现^[12,13]。Prdx6 和 GPx1 蛋白尽管在一级结构具有较低同源性(17%),但在 3 级结构同源。两种酶结构主要不同点在于 GPx1 蛋白催化位点 Se-cys 在蛋白质表面,而 Prdx6 蛋白活性 Cys47 在球蛋白窄口袋内。Prdx6 蛋白过氧化物酶活性催化区是 PVCTTE,这一序列是 Prdx6 蛋白仅有的。与 Prdxs 家族保守的 FVCPTE 区是同源的。Prdx6 蛋白有一个保守的 Cys47,在大鼠与牛 Prdx6 蛋白中只有一个 Cys,而人与小鼠则有另一个非保守的 Cys。Cys47 定点突变导致蛋白过氧化物酶活性失活,表明这一氨基酸是电子转移位点,而磷脂酶 A₂ 活性不受影响^[11]。对应蛋白质晶体结构,过氧化物酶活性区是 Cys47-His39-Arg132, Cys47 与 His39 形成氢键,与 Arg132 通过静电作用^[14]。Prdx6 蛋白序列 GDSWG 也称为脂酶基序(GXSXG),Ser32 是磷脂酶 A₂ 活性催化中心。Ser32 定点突变为 Ala,则磷脂酶 A₂ 活性失活,而过氧化物酶活性保持完整。对照 Prdx6 蛋白结构,磷脂酶 A₂ 活性区是 Ser32-His26-Asp140。在晶体结构中,蛋白表面

Ser32 与 Cys47 距离为 25Å, 因此两个活性中心不可能相互作用。用巯基抑制剂巯基琥珀酸可以显著抑制蛋白的过氧化物酶活性, 而磷脂酶 A₂ 活性不受影响, 这一研究也证明两个活性中心是分离的。

三、Prdx6 蛋白物种与组织分布

Prdx6 蛋白 cDNA 已经获得鉴定, 如人 (GenBank Accession No. D14662)、大鼠 (AF014009)、小鼠 (AF004670)、牛 (AF090194)、猪 (AJ243849)。这些 cDNA 及其翻译后蛋白质的核苷酸与氨基酸的同源性均大于 95%^[15]。这一高度保守性表明 Prdx6 蛋白在哺乳动物细胞新陈代谢中的重要性。在果蝇、诸虫、酵母、植物 (大麦、水稻、长生草) 研究中发现, 同源 Prdx6 蛋白都有共同的过氧化物酶活性序列 PVCTTE。不同于哺乳动物, 酵母 Prdx6 蛋白以硫氧还蛋白作为电子供体。植物酶与哺乳动物酶相比有 40% 同源性, 但没有磷脂酶 A₂ 催化区及活性。Prdx6 基因 mRNA 与蛋白在哺乳动物各个器官中都有发现, 其中在肺的表达为最高; 在组织分布中, Prdx6 蛋白在上皮中表达为最高, 包括嗅觉的心尖区、呼吸上皮、表皮。在肺中, 肺泡上皮 II 型细胞和细支气管克拉拉细胞都有高表达。在肺的亚细胞器中, Prdx6 蛋白存在于细胞质、溶酶体和板层状小体中, 肺灌洗后细胞外液中也检测到 Prdx6 蛋白。按照 pH 差异, 推测细胞质蛋白主要参与过氧化物酶活性, 而溶酶体和板层状小体中蛋白参与磷脂酶 A₂ 活性。

四、Prdx6 蛋白抗氧化功能

从初期细胞实验到近年来动物体内实验, 越来越多研究证明 Prdx6 蛋白在体内具有抗氧化功能。过表达 Prdx6 蛋白 - GFP 绿色荧光蛋白的肺上皮细胞系 H441 细胞 (自身不表达 Prdx6 蛋白), 在过氧化物 (过氧化氢、丁基氢过氧化物) 及羟自由基介导氧化应急中能明显减少脂质过氧化作用, 降低细胞质膜损伤^[16]。用吗啉代反义寡核苷酸处理 L2 细胞 (大鼠肺上皮细胞系, 表达 Prdx6 蛋白), Prdx6 蛋白表达下降 60%^[17], 羟自由基介导氧化应急处理后, 可观察到明显的脂质过氧化、脂膜损伤及凋亡。Prdx6 蛋白的腺病毒载体转染反义寡核苷酸处理细胞后, 细胞损伤明显减轻。在动植物体内过表达 Prdx6 蛋白也已进行研究。用腺病毒转染 Prdx6 基因到小鼠肺中, 提高蛋白在肺中表达, 可明显提高小鼠的高氧损伤^[18]。在 100% 氧中, 小鼠 50% 致死率 (LT50) 平均时间由 78.2h 提高到 92.4h。解剖发现相比对照组, 高氧生存 72h 后过表达小鼠肺部脂质过氧化、蛋白氧化、肺

水肿、肺炎症明显减轻。将小鼠置于 100% 氧中一段时间, 可明显看到 Prdx6 基因表达蛋白、mRNA、酶活均提高 1 倍^[19]。过表达小鼠 Prdx6 基因的烟草在 H₂O₂ 环境中生长, 对照发现明显降低烟叶的损伤^[20]。Manevich 等^[21]研究证明 GSH 是生理性电子供体, 与被氧化的 Prdx6 蛋白反应。从牛肺中部分纯化的 Prdx6 蛋白质在 GSH 中能够还原过氧化氢, 具有过氧化物酶活性。SDS - PAGE 电泳分析表明有两种蛋白存在, 质谱鉴定为谷胱甘肽 S 转移因子 π (π GST) 和 Prdx6 蛋白。进一步分离纯化, 在 GSH 中 Prdx6 蛋白失去氧化活性。体外, 纯化的 Prdx6 和 π GST 蛋白反应形成 π GST - Prdx6 异源二聚体形式, 成为谷胱甘肽化的 Prdx6 聚集体, 产生谷胱甘肽依赖的过氧化物酶活性。为了进一步研究 π GST 作用, 利用 H441 细胞缺失 Prdx6 蛋白表达, 但表达 π GST 蛋白, 结果细胞的过氧化物酶活性提高; 利用 MCF7 细胞表达 Prdx6 蛋白缺失 π GST 蛋白, 对细胞的过氧化物酶活性无影响。两蛋白一起表达, 则活性显著升高。体外实验表明, Prdx6 和 π GST 蛋白 1:1 摩尔比时活性最高, 也表明 Prdx6 蛋白过氧化物酶活性位点是 Cys47。

五、Prdx6 蛋白磷脂酶 A₂ 功能

Prdx6 蛋白的 PLA₂ 活性研究不像其过氧化物酶活性那样广泛, PLA₂ 活性研究底物是肺表面活性物质。肺表面活性物质是由肺泡上皮分泌的用于稳定肺泡张力的物质。二棕榈酰磷脂酰胆碱 (dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC) 是肺表面活性物质的主要磷脂成分, 它同其他脂类和蛋白一起发挥功能。DPPC 和肺表面活性物质的其他成分一起通过内吞作用从肺泡腔进入细胞, 参与再分泌或被降解。使用 Prdx6 的 PLA₂ 活性竞争抑制剂 MJ33 可以证明 Prdx6 参与 DPPC 循环。灌注后的肺及原代培养的肺泡上皮 II 型细胞研究证明, DPPC 内吞后, 明显抑制了放射性标记的 DPPC 的降解速率^[22,23]。在肺及肺颗粒状细胞研究中, MJ33 明显抑制了标记的棕榈酸盐参与 DPPC 的合成^[24]。肺泡上皮 DPPC 来源于自身合成或中间体重新利用, 后一步所需溶血磷脂胆碱来源于 PLA₂ 产物。在中间体重新利用过程中, MJ33 降低棕榈酸盐合成 DPPC 路径, 而不改变胆碱合成路径, 证明溶血磷脂胆碱来源于 Prdx6 蛋白活性产物。

六、总结

Prdx6 蛋白具有 GSH 过氧化物酶和 PLA₂ 的双重活性, 在机体抗氧化保护及肺表面物质代谢过程中具有重要作用。尽管 Prdx6 蛋白作为 peroxiredoxins 家

族中的一员在蛋白质结构上具有同源性,但在蛋白功能特点上明显不同于家族中其他哺乳动物类蛋白。Prdx6 蛋白作为 1 - Cys 酶与 π GST 介导 GSH 形成二硫键,而 2 - Cys 酶二硫键在 Prdx1 - 4 由分子间形成,Prdx5 在分子内形成。Prdx1 - 5 使用硫氧还蛋白作为生理还原体,而 Prdx6 使用 GSH 作为生理还原体。Prdx6 可以降解脂质氢过氧化物,而其他的 Prdxs 还没有发现有这样的功能。Prdx6 蛋白具有 PLA₂ 功能,而其他的 Prdxs 没有相应结构与功能。Prdx6 主要作为一种抗氧化酶,而其他的 Prdxs 在细胞信号传导中也有重要作用。总之,对 Prdx6 与家族中其他成员的相似与区别以及它与其他 GSH 过氧化物酶比较的详尽了解仍需要更多的实验研究来证实。

参考文献

- Shichi H, Demar JC. Non - selenium glutathione peroxidase without glutathione S - transferase activity from bovine ciliary body [J]. Exp Eye Res, 1990,50(5):513 - 520
- Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes; III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081 - KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG - 1 (supplement) [J]. DNA Res, 1995,2(1):51 - 59
- Trudel S, Kelly M, Fritsch J, *et al.* Peroxiredoxin 6 fails to limit phospholipid peroxidation in lung from Cfr - knockout mice subjected to oxidative challenge [J]. Plos One, 2009, 4(6):60 - 75
- Wang X, Phelan SA, Petros C, *et al.* Peroxiredoxin 6 deficiency and atherosclerosis susceptibility in mice: significance of genetic background for assessing atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2004, 177(1):61 - 70
- Strey CW, Spellman D, Stieber A, *et al.* Dysregulation of stathmin, a microtubule - destabilizing protein, and up - regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. Am J Pathol, 2004, 165(5):1701 - 1718
- Leavey PJ, Gonzalez - Aller C, Thurman G, *et al.* A 29 - kDa protein associated with p67phox expresses both peroxiredoxin and phospholipase A₂ activity and enhances superoxide anion production by a cell - free system of NADPH oxidase activity [J]. J Biol Chem, 2002, 277(47):45181 - 45187
- Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, *et al.* Antioxidant protein prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates [J]. Eur J Biochem, 2003, 270(2):334 - 341
- Haslekas C, Viken MK, Grini PE, *et al.* Seed 1 - cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress [J]. Plant Physiol, 2003, 133(3):1148 - 1157
- Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, *et al.* Phospholipid hydroperoxides are substrates for non - selenium glutathione peroxidase [J]. J Biol Chem, 1999, 274(30):21326 - 21334
- Akiba S, Dodia C, Chen X, *et al.* Characterization of acidic Ca²⁺ - independent phospholipase A₂ of bovine lung [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1998, 120(2):393 - 404
- Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, *et al.* 1 - Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities [J]. J Biol Chem, 2000, 275(37):28421 - 28427
- Choi HJ, Kang SW, Yang CH, *et al.* Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution [J]. Nat Struct Biol, 1998, 5(5):400 - 406
- Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(1):32 - 40
- Hamza A. Homology modeling and docking mechanism of the mercaptosuccinate and methotrexate to P. falciparum 1 - Cys peroxiredoxin: a preliminary molecular study [J]. J Biomol Struct Dyn, 2002, 20(1):7 - 20
- Leyens G, Donnay I, Knoops B. Cloning of bovine peroxiredoxins - gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003, 136(4):943 - 955
- Manevich Y, Sweitzer T, Pak JH, *et al.* 1 - Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation - mediated membrane damage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(18):11599 - 11604
- Pak JH, Manevich Y, Kim HS, *et al.* An antisense oligonucleotide to 1 - cys peroxiredoxin causes lipid peroxidation and apoptosis in lung epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(51):49927 - 49934
- Wang Y, Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB. Adenovirus mediated transfer of the 1 - cys peroxiredoxin gene to mouse lung protects against hyperoxic injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(6):L1188 - L1193
- Kim HS, Manevich Y, Feinstein SI, *et al.* Induction of 1 - cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(2):L363 - L369
- Lee KO, Jang HH, Jung BG, *et al.* Rice 1 - Cys peroxiredoxin overexpressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity [J]. FEBS Lett, 2000, 486(2):103 - 106
- Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB. Activation of the antioxidant enzyme 1 - CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(11):3780 - 3785
- Fisher AB, Dodia C. Lysosomal - type PLA₂ and turnover of alveolar DPPC [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 280(4):L748 - L754
- Fisher AB, Dodia C. Role of phospholipase A₂ enzymes in degradation of dipalmitoyl phosphatidyl choline by granular pneumocytes [J]. J Lipid Res, 1996, 37(5):1057 - 1064
- Fisher AB, Dodia C. Role of acidic Ca²⁺ - independent phospholipase A₂ in synthesis of lung dipalmitoyl phosphatidylcholine [J]. Am J Physiol, 1997, 272(2):L238 - L243 (收稿:2010 - 01 - 13)