

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 与动脉粥样硬化

胥雪莲¹ 综述 何川² 审校

(1. 重庆医科大学附属大学城医院心血管内科, 重庆 401331; 2. 成都大学附属医院心血管内科, 四川 成都 610081)

【摘要】 动脉粥样硬化是严重危害人类健康的重大疾病。新近的研究表明, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 作为降解低密度脂蛋白受体的重要分子, 影响前蛋白转化酶枯草溶菌素 9-低密度脂蛋白受体途径导致低密度脂蛋白代谢异常, 与动脉粥样硬化形成的关系密切。现就前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 影响动脉粥样硬化研究进展做一综述。

【关键词】 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 动脉粥样硬化; 低密度脂蛋白受体

【中图分类号】 R543

【文献标志码】 A

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2016.01.013

Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Atherosclerosis

XU Xuelian¹, HE Chuan²

(1. Department of Cardiology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital/Clinical Medical College of Chengdu University, Chengdu 610081, Sichuan, China)

【Abstract】 Atherosclerosis is a serious disease that is harmful to human health. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a newly recognized protein, which plays a key role in cholesterol homeostasis by enhancing the degradation of hepatic low-density lipoprotein receptor and causing marked increases in low-density lipoprotein cholesterol concentration and atherosclerosis. This review provides important links between PCSK9, low-density lipoprotein receptor and the mechanisms of atherosclerosis.

【Key words】 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Atherosclerosis; Low-density lipoprotein receptor

动脉粥样硬化是严重危害人类健康的重大疾病。新近的研究表明, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 作为降解低密度脂蛋白 (LDL) 受体的重要分子, 影响 PCSK9-LDL 受体途径导致 LDL 代谢异常, 与动脉粥样硬化形成的关系密切。

1 PCSK9 蛋白简介

PCSK9 基因位于染色体 1p3.32, 是一个有 5 个片段的 692 个氨基酸的蛋白。72 kD ($\approx 7.2 \times 10^4$) 的前 PCSK9 蛋白定位于内质网, 可自动剪切并转化成一个成熟的 62 kD ($\approx 6.2 \times 10^4$) 的 PCSK9 蛋白^[1]。PCSK9 是前蛋白转化酶的成员, 但 PCSK9 是唯一的底物, 具自我催化作用, 据此 PCSK9 可看作是结合蛋白作用^[2]。自动剪切对产生成熟的、可与 LDL 受体结合的 PCSK9 很关键。如果 PCSK9 不进行自动剪切, 它不会分泌到循环血中, 并且没有作用, 被看作丢失功能的 PCSK9。

2 PCSK9 的转录因子

PCSK9 主要是在肝细胞内表达, 在小肠及肾脏亦有表达^[3]。它的表达受转录因子胆固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol-responsive element-binding protein 2, SREBP2) 调节, 该转录因子就是上调羟甲基戊二酰辅酶 A 和 LDL 受体转录的^[4]。肝细胞核因子 1 α 加强 SREBP2 的转录活性^[5]。上述的因子调节肝细胞胆固醇浓度。当胆固醇浓度下降到一定水平, 这些转录因子就上调羟甲基戊二酰辅酶 A (增加细胞内胆固醇合成) 和 LDL 受体导致对循环中的载脂蛋白 B (apoB) 摄入增加, 包含 apoB 脂质颗粒向肝细胞转移。这两个机制均导致更多的胆固醇在肝细胞的脂质池中。

3 PCSK9 与 LDL 受体相互作用

PCSK9 是丝氨酸蛋白酶的枯草杆菌蛋白酶家族的第 9 个成员, 由肝脏分泌, 作为一个天然的 LDL 受体的抑制剂, 使 LDL 受体到溶酶体降解^[6]。

基金项目: 重庆市科委自然科学基金计划资助项目 (cstc2012jjA10045); 重庆市渝中区科委科技计划项目 (20130129)

作者简介: 胥雪莲 (1978—), 主治医师, 博士, 主要从事动脉粥样硬化研究。Email: 2480074@qq.com

通信作者: 何川, 副主任医师, 硕士, 主要从事电生理研究。Email: 1492043949@qq.com

通常情况下, LDL 受体与循环中的 LDL 颗粒结合, 内吞入肝细胞。随后 LDL 受体可自由回到细胞表面, 可以结合另外的循环中的 LDL 颗粒, 而在内吞入肝细胞内的内涵体中 LDL 颗粒被送到溶酶体降解, 释放胆固醇成分到胆固醇池中^[7]。当 LDL 受体与 PCSK9 结合后, 这个 LDL 受体不会再循环到细胞表面, 而是溶酶体降解的目标, 这样就减少了细胞表面的 LDL 受体数量, 减弱了从循环中摄取胆固醇的能力^[8]。此外它们相互作用在细胞外空间, PCSK9 也可以通过不完全性定义的细胞内通路增强 LDL 受体的降解, 这一途径不需要 PCSK9 的分泌^[9]。

可以看作, 这是一个动态的过程, 是根据细胞内胆固醇浓度来上调或下调这些分子的表达。当一个转录因子刺激, 新合成的 LDL 受体分泌出来携带更多的胆固醇到细胞内, 但同时新合成的 PCSK9 分泌出来限制这一过程。这一完整的系统提供一个有效的方式满足细胞对胆固醇的需要同时阻止 LDL 受体不受约束的消耗循环中的胆固醇^[10]。可以预见, 怎样干扰 PCSK9 活性, 而后允许 LDL 受体摄取更多的低密度脂蛋白的胆固醇 (LDL-C) 是降低血中胆固醇水平的一种有效方式, 这恰好就是新药作用靶点。

PCSK9 同样也与其他脂质受体结合 [极低密度脂蛋白 (VLDL) 受体、载脂蛋白 E 受体 2], 从而影响循环中 VLDL 和载脂蛋白的摄取。PCSK9 和 LDL 受体相互作用发生在细胞表面, 似乎不发生 (或很弱的发生) 在肾上腺或大脑的一些区域^[11-12]。于是这些细胞不会通过 PCSK9 的途径被剥夺胆固醇, 那些改变 PCSK9 活性的药物也不会有效果。就此没有其他的靶点, 和 PCSK9 结合的那些受体应该是抗 PCSK9 药物唯一的靶点。

体内实验表明, 用不同的方法使 PCSK9 超表达或者敲低 PCSK9 的表达对血浆胆固醇水平的影响。在腺病毒介导的 PCSK9 超表达小鼠, 在肝脏的 LDL 受体的表达水平急剧下降, 血浆胆固醇水平急剧升高, 然而 LDL 受体的 mRNA 水平没有明显变化^[13]。而后的发现表明 PCSK9 减少肝脏 LDL 受体表达是通过转录后调节。在 PCSK9 超表达的转基因小鼠的肝脏也观察到相同的结果。在转基因小鼠中产生的 PCSK9 可以降低正常小鼠肝脏的 LDL 受体水平。相反在 PCSK9 敲除小鼠, 肝脏 LDL 受体水平明显上调, 而血浆 LDL-C 水平显著下降, 由于肝脏 LDL 受体增加介导了对血浆中 LDL-C 的清除增加^[14]。最后在小鼠、大鼠和猴, 用 RNA 干扰敲低肝脏 PCSK9 表达, 显著升高肝脏 LDL 受体的表达, 降低血浆 LDL-C 水平^[15]。在反义寡核苷酸直接对抗 PCSK9 mRNA 的小鼠也得到相同的结果^[16]。综上所述, 这些结果表明 PCSK9 对胆固醇代谢的影响是通

过对肝脏 LDL 受体影响的结果。

4 PCSK9 与三酰甘油

PCSK9 与脂质组装和分泌, 有一些证据表明 PCSK9 对三酰甘油的影响, 高三酰甘油也被认为是冠状动脉粥样硬化性心脏病的危险因素^[17]。三酰甘油的残余物直接与动脉粥样硬化的形成相关, 它们被动脉中的巨噬细胞摄取, 导致大量的脂质负荷^[18-19]。新近的临床研究表明在人类 PCSK9 的浓度与三酰甘油的标志物相关。在大样本量人群中无论男女, 均提示血浆 PCSK9 的水平与三酰甘油水平相关^[19-20]。和这些观察一致的是携带 PCSK9 的突变体比正常人群有 apoB 100 生成率 3 倍增高^[21]。几个有关小鼠的研究表明: PCSK9 对三酰甘油的影响是基于肝脏特异性的; 在急性腺病毒转染 PCSK9 超表达空腹小鼠发现高三酰甘油血症, 源于肝脏 VLDL-三酰甘油、apoB 极大的生成速率^[22]。小鼠超表达人类 PCSK9 导致肝脏三酰甘油升高^[23]。

小肠是另一个三酰甘油的主要来源, 餐后乳糜微粒及 apoB 48 是乳糜微粒装配、分泌必须的^[24]。PCSK9 在小肠的表达从数量上仅次于肝脏, 排在第二。PCSK9 基因敲除减少 apoB 48 的分泌并且保护餐后小鼠的高三酰甘油血症^[25]。这是一个治疗靶点, PCSK9 抑制肠道三酰甘油的生成, 减少餐后高三酰甘油血症及降低血浆三酰甘油水平。在培养的人类肠细胞中, PCSK9 增加细胞及分泌型的 apoB 48 及 apoB 100-三酰甘油^[26-27]。LDL 受体能直接影响 apoB 的稳定, 在肝细胞中提高 apoB 的翻译后降解, 从而三酰甘油颗粒分泌减少。PCSK9 减少肠细胞中 LDL 受体水平, 直接增加 apoB 100-三酰甘油分泌^[28]。

5 PCSK9 抑制与临床

PCSK9 抑制是一个降低血浆胆固醇水平, 并且有助于减少动脉粥样硬化性心血管疾病的一个新靶点。临床上有两类抑制 PCSK9 的方式: PCSK9 单克隆抗体 (mAbs) 和 RNA 干扰技术。使用 RNA 干扰技术在 I 期临床研究中, 健康人群志愿者减少 PCSK9 达 70%, 减少 LDL-C 达 40%, 数据来源于超过 30 d 的观察, 并且这些减少呈剂量依赖性^[29]。PCSK9 的抑制剂 mAbs 提供敲除或敲低血液中 PCSK9 的活性, 并且不抑制肝细胞摄取循环中的 LDL 颗粒 (以及另一些包含 apoB 的颗粒)。动物实验已经证实这种机制, 并且这种干扰能持续性降低 LDL-C 水平。目前有 4 种 mAbs (PCSK9 抑制剂) 正在研究中, 最初的两个复合物 (alirocumab and evolocumab) 的研究已基本完成 III 期临床试验, 已经提交数据给 FDA, 可能会在 2015 年得到获准。第三个复合物 (bococizumab) 正在进行 III 期临床试验。最后一个复合物已经完成单剂量 I 期临床试

验,正在进行剂量变化的Ⅱ期临床试验。前两个复合物(alirocumab and evolocumab)是人类抗体;第三个复合物(bococizumab)是人类化的抗体^[30]。

PCSK9 抑制剂抑制动脉粥样硬化,提高他汀类药物的疗效^[31]。在急性心肌梗死的患者血浆中 PCSK9 浓度增加^[32]。PCSK9 在人类粥样斑块中有表达。PCSK9 的抑制可减少胆固醇水平及减少血管斑块的形成^[33]。PCSK9 影响心血管疾病是多个层面的,包括动脉粥样斑块形成,同时影响胰岛素抵抗和肥胖等危险因素。PCSK9 是调节血浆胆固醇的关键分子,从而影响动脉粥样硬化和药物的治疗靶点。PCSK9 是肝脏中调节 LDL 受体表达的分子,同时影响循环中 LDL-C 的浓度。失去 PCSK9 功能的突变体有低水平的 LDL-C 和低冠心病的发病率;然而得到 PCSK9 功能的突变体是家族性高胆固醇血症和早发冠心病患者;他汀类药物上调 PCSK9 的表达,使他汀类药物降低 LDL-C 的作用受限^[34]。

6 结语

PCSK9 作为一个新近发现的蛋白,影响 LDL 受体降解,从而影响体内 LDL-C 的代谢及动脉粥样硬化的进程。我们期待 PCSK9 的抑制剂早日应用于临床,成为一个除他汀类药物以外更强更好的调脂、抗动脉粥样硬化药物。

【参考文献】

- [1] Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein(LDL) receptor and LDL cholesterol[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47):48865-48875.
- [2] Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, et al. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health[J]. *Circ Res*, 2014, 114(6):1022-1036.
- [3] Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9(PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration[J]. *Hepatology*, 2008, 48(2):646-654.
- [4] Dong B, Wu M, Li H, et al. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(6):1486-1495.
- [5] Li H, Dong B, Park SW, et al. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(42):28885-28895.
- [6] Berger JM, Vaillant N, le May C, et al. PCSK9-deficiency does not alter blood pressure and sodium balance in mouse models of hypertension[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(1):252-259.
- [7] Io Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH[J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(12):1300-1305.
- [8] Tveten K, Holla ØL, Cameron J, et al. Interaction between the ligand-binding domain of the LDL receptor and the C-terminal domain of PCSK9 is required for PCSK9 to remain bound to the LDL receptor during endosomal acidification[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(6):1402-1409.

- [9] Poirier S, Mayer G, Poupon V, et al. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(42):28856-28864.
- [10] Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11):2995-3005.
- [11] Liu M, Wu G, Baysarowich J, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(9):2611-2618.
- [12] Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, et al. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(7):1383-1391.
- [13] Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11):2995-3005.
- [14] Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(15):5374-5379.
- [15] Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33):11915-11920.
- [16] Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(4):763-767.
- [17] Sun H, Samarghandi A, Zhang N, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(7):1585-1595.
- [18] Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis[J]. *JAMA*, 2012, 307(12):1302-1309.
- [19] Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(11):1345-1361.
- [20] Jänis MT, Tarasov K, Ta HX, et al. Beyond LDL-C lowering: distinct molecular sphingolipids are good indicators of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9(PCSK9) deficiency[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(2):380-385.
- [21] Kwakernaak AJ, Lambert G, Dullaart RP. Plasma proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 is predominantly related to intermediate density lipoproteins[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(7-8):679-682.
- [22] Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, et al. Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(10):4985-4995.
- [23] Tavori H, Fan D, Blakemore JL, et al. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation[J]. *Circulation*, 2013, 127(24):2403-2413.
- [24] Shojaae-Moradie F, Ma Y, Lou S, et al. Prandial hypertriglyceridemia in metabolic syndrome is due to an overproduction of both chylomicron and VLDL triacylglycerol[J]. *Diabetes*, 2013, 62(12):4063-4069.
- [25] le May C, Kourimate S, Langhi C, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(5):684-690.
- [26] Rashid S, Tavori H, Brown PE, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin

- type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein B lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and -independent mechanisms[J]. *Circulation*, 2014, 130(5):431-441.
- [27] Levy E, Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, et al. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2):297-306.
- [28] Olofsson SO, Borén J. Apolipoprotein B secretory regulation by degradation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(6):1334-1338.
- [29] Fitzgerald K, Frank-Kamentsky M, Shulga-Morskaya S, et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *Lancet*, 2014, 383(9911):60-68.
- [30] McKenney JM. Understanding PCSK9 and anti-PCSK9 therapies[J]. *J Clin Lipidol*, 2015, 9(2):170-186.
- [31] Kühnast S, van der Hoorn JW, Pieterman EJ, et al. Alirocumab inhibits atherosclerosis, improves the plaque morphology, and enhances the effects of a statin[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(10):2103-2112.
- [32] Almontashiri NA, Vilmundarson RO, Ghasemzadeh N, et al. Plasma PCSK9 levels are elevated with acute myocardial infarction in two independent retrospective angiographic studies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106294.
- [33] Stawowy P. Proprotein convertases in atherogenesis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(4):338-344.
- [34] Schwartz GG, Bessac L, Berdan LG, et al. Effect of alirocumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on long-term cardiovascular outcomes following acute coronary syndromes: rationale and design of the ODYSSEY outcomes trial[J]. *Am Heart J*, 2014, 168(5):682-689.
- 收稿日期:2015-08-12 修回日期:2015-09-17