

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 致动脉粥样硬化的机制研究进展

乐健^{1,2} 何胜虎¹

(1. 江苏省苏北人民医院心内科, 江苏 扬州 225001; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044)

【摘要】 动脉粥样硬化是一种侵入血管壁的慢性炎症性疾病, 目前研究表明前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 具有抗动脉粥样硬化的能力, 除了常规途径, 还可能在前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抗动脉粥样硬化作用的新途径。现着重于综述前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 如何参与动脉粥样硬化的形成, 并重点描述免疫调节机制在前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抗动脉粥样硬化中的关键作用。

【关键词】 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 动脉粥样硬化; 免疫

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.07.009

Mechanism of PCSK9-induced Atherosclerosis

YUE Jian^{1,2}, HE Shenghu¹

(1. Department of Cardiology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; 2. Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China)

【Abstract】 Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that invades the blood vessel wall. Current studies have shown that proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) has anti-atherosclerotic ability, and in addition to conventional routes, there may be a new way of anti-atherosclerosis effect of PCSK9. This review focuses on how PCSK9 is involved in the formation of atherosclerosis and focuses on the key role of immune regulatory mechanisms in the anti-atherosclerosis of PCSK9.

【Key words】 PCSK9; Atherosclerosis; Immune

1 简介

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种侵入血管壁的慢性炎症性疾病, 包括大量活化的免疫细胞, 由单核细胞/巨噬细胞、T 细胞、树突细胞 (dendritic cells, DCs) 等组成^[1], 目前虽然有很多方法可以进行干预^[1], 但 AS 的死亡率仍然很高。在先前的研究中显示前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 可以通过影响低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 来影响 AS 的形成。最近, 越来越多的关于 PCSK9 的研究已经出现, 以探索它关于 AS 的潜在机制。研究提供了 PCSK9 在 AS 中的作用新的视角, 表明调控 PCSK9 的表达可以通过免疫机制直接影响 AS 和心血管疾病^[2-3]。因此, 通过对已知和新兴的科学证据进行评估, 总结 PCSK9 在 AS 治疗中的潜在影响, 这对于进一步研究具有重要意义。

这篇综述关注 PCSK9 在 AS 中的影响, 并重点描述免疫机制在 AS 上发挥的特殊作用。

2 PCSK9 的结构和功能

PCSK9 是 PCSK 家族的第九个成员, 表达产物为前蛋白转化酶, 这些蛋白酶底物将无活性的分泌前体转化为活性产物。低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDL-R) 是一种膜脂质颗粒受体, 它可以促进血浆中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 摄入肝脏和外周器官。LDL-R 的功能与 PCSK9 类似, 后者在溶酶体中诱导 LDL-R 降解, 从而限制 LDL-C 摄取。PCSK9 和 LDL-R 由元件结合蛋白 (SREBP-2) 协调和调节。当细胞中的胆固醇水平降低时, 甾醇调节 SREBP-2 的活性, 促进 LDL-R 的转录, 已经表明 PCSK9 在其中起主要作用。通过 LDL-R 中间细胞内降解的能力调整血浆 LDL-C 水平。PCSK9 与 LDL-R

基金项目: 江苏省卫生厅科研基金面上项目 (H201354)

通讯作者: 何胜虎, E-mail: yzhshys@163.com

结合,导致其细胞内降解,从而增强血浆 LDL-C 水平。在 PCSK9 与细胞表面的 LDL-R 结合后,LDL-R 和 PCSK9 复合物通过网格蛋白覆盖的凹陷内化。PCSK9 的循环与肝细胞表面的 LDL-R 相连,并在 LDL 内化后干扰 LDL-R 的再循环,引导 LDL-R 导致溶酶体失效,以上表明 PCSK9 通过参与 LDL-R 的调节,从而在 AS 中发挥作用。

3 PCSK9 在 AS 中发挥免疫调节机制的作用

已有大量实验证明 PCSK9 可以通过免疫细胞在 AS 过程中发挥重要作用。据报道,潜在的发病机制与几种不同的炎症细胞因子有关^[4]。首先,Giunzioni 等^[5]报道了 PCSK9 在来自巨噬细胞的 PCSK9 的嵌合小鼠中的局部作用,PCSK9 直接增加 AS 炎症并促进斑块单核细胞浸润和巨噬细胞炎症。其次,另一项实验证明血管内皮细胞凋亡是 AS 病因的重要原因,也是预防和延缓疾病的重要目标^[6]。第三,另一个发现是平滑肌细胞分泌 PCSK9,降低巨噬细胞中的 LDL-R 表达并可能对 AS 产生影响^[7]。最后,最近的实验证明氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)在 DCs 中诱导 PCSK9^[2]。通过促进炎症和内皮细胞功能障碍,PCSK9 可能加速 AS 的形成^[8],下一部分将集中讨论 PCSK9 如何在免疫细胞中发挥重要作用。

3.1 PCSK9 对单核细胞/巨噬细胞的影响

巨噬细胞对免疫系统具有重要意义,并在炎症反应中发挥非常重要的作用。单核细胞/巨噬细胞是炎症免疫激活级联的紧密部分。ox-LDL 在巨噬细胞极化中是非常有效的,本实验表明 PCSK9 可以影响巨噬细胞促炎状态^[9]。研究表明 PCSK9 存在于 AS 斑块中并对平滑肌细胞、巨噬细胞和内皮细胞有影响^[7]。据报道,有证据表明抗炎药和 LDL-C 之间可能存在联系,通过降低循环单核细胞对其产生影响^[10]。相反,两部分之间的相关性表明肿瘤坏死因子- α 促使 PCSK9 表达^[11]。另外,进一步的研究表明,人重组 PCSK9 通过诱导促炎细胞因子肿瘤坏死因子、白介素(IL)-1 和 IL-6 以及趋化因子-1 来加速对巨噬细胞的炎症反应。有证据表明 PCSK9 通过改善促炎细胞因子 IL-1b 和肿瘤坏死因子的表达以及降低抗炎 IL-10 和精氨酸酶-1 的表达来促进巨噬细胞对脂多糖的应答^[5]。天然 LDL-R 配体已被证明有助于单核细胞向巨噬细胞的分化^[12]。特别是 LDL 促进经典活化(M1)巨噬细胞的极化,干扰单核细胞极化成选择性活化(M2)巨噬细胞的潜力,并增加炎症 M1 反应^[12]。如先前的研究所示,PCSK9 在巨噬细胞中的过表达增

加了 ox-LDL^[13]。因此,ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症反应是 AS 发病机制中的一个重要因素^[14](图 1)。

3.2 PCSK9 对内皮细胞的影响

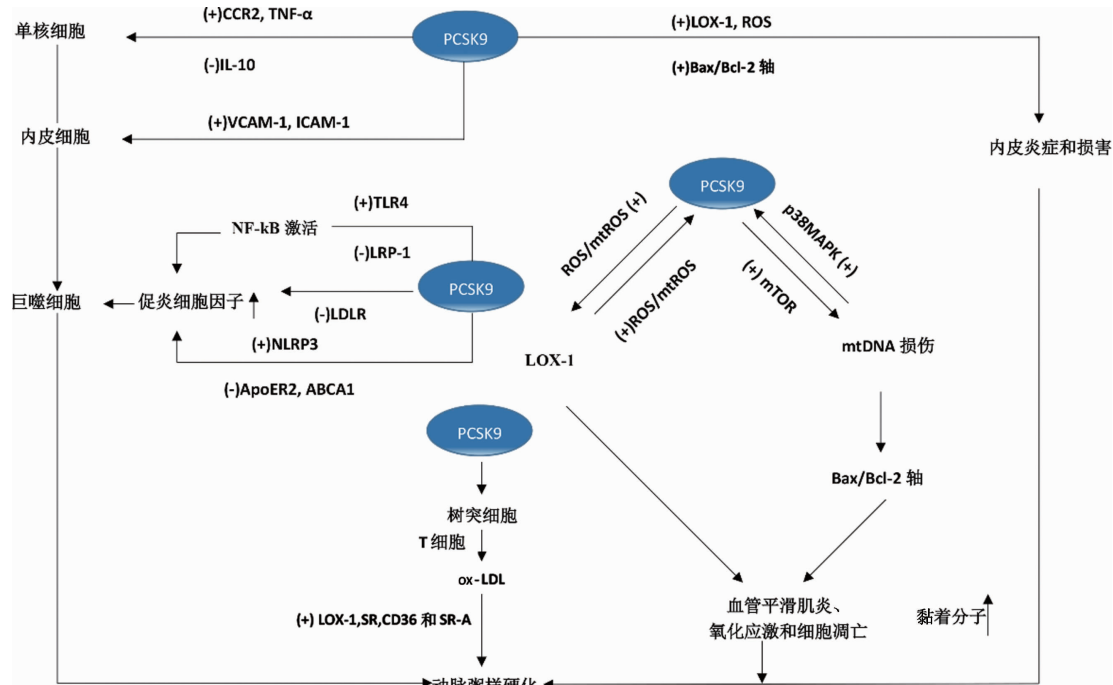
血管内皮细胞位于血管壁的内层中,并且是血液和组织之间非常重要的屏障。血管内皮细胞过度凋亡导致不稳定性斑块的形成和破裂,导致动脉壁异常。因此,细胞凋亡的作用不可忽视。细胞凋亡是一种导致自我毁灭的内部生理过程。血管内皮细胞凋亡是 AS 病因的重要原因,也是预防和延缓疾病的重要目标^[6]。促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的失衡,引起细胞凋亡。Bcl-2 家族蛋白主要调节线粒体膜通透性,Bax/Bcl-2 比值被认为是细胞凋亡的标准。此外,PCSK9 siRNA 增加了 Bax 含量并降低了 Bcl-2 含量,从而提高了 Bax/Bcl-2 比值。这项研究表明 PCSK9 siRNA 影响线粒体膜的稳定性。在该实验中,ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的凋亡,并且促凋亡蛋白 Bax 和胱天蛋白酶-3 表达显著增加^[15]。相反,Bcl-2 表达被抑制。同时,与正常细胞相比,HUVEC 的细胞凋亡中的 mRNA 和蛋白质水平的 PCSK9 表达显著增强^[15]。目前的实验发现,siRNA-PCSK9 转染的细胞抑制了 Bax 和 caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达,而 Bcl-2 则表现出相反的作用。在 ox-LDL 诱导的细胞凋亡中,PCSK9 缺乏增加了 Bcl-2/Bax 的比例^[15]。研究证实 PCSK9 siRNA 通过 Bcl/Bax-Cyt C-caspase-9-caspase-3 线粒体途径抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞凋亡以减少 Bcl-2/Bax 蛋白比例和抑制 ox-LDL 对 caspase-9 和 caspase-3 激活的影响^[16],这提示 PCSK9 可能直接作用于凋亡依赖性蛋白的降解以通过其他途径开始凋亡级联,并且影响凋亡相关因子的表达。研究进一步证实了 PCSK9 在 AS 中发挥不可或缺的作用,并且可能为 AS 的治疗提供新的方向(图 1)。

3.3 PCSK9 对血管平滑肌细胞的影响

如先前的研究所示,血管平滑肌细胞(VSMCs)在 AS 形成中起着不可或缺的作用^[17]。来自 VSMCs 分泌的 PCSK9 影响 LDL-R 在巨噬细胞中的表达^[7]。活性氧自由基是参与多种信号通路的氧化激活剂,例如核因子 κ B(NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶和线粒体 DNA 损伤。正如研究表明,VSMCs 中的活性氧自由基在 PCSK9 和血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)之间具有重要的作用。NF- κ B 和线粒体 DNA 损伤能够调节血管内皮细胞和 VSMCs 中 PCSK9 的分泌^[18-20]。众所周知,LOX-1 在血管内皮细胞和巨噬细胞中通过摄取 ox-LDL 发挥作用。有充分证据表明脂多糖通过 Toll 样受体-4 和应激活化蛋白激酶介导从 VSMCs 分泌 PCSK9。其他的研究表明,来自 VSMCs

的 PCSK9 可以降低 LDL-R 在单核细胞上的表达,从而影响 LDL-C 依赖性,细胞表面趋化因子受体-2 介导的单核细胞功能^[21]。靶向治疗 PCSK9 能够通过降低血清 LDL-C 水平影响单核细胞趋化因子受体表达。总之,这些研究表明 PCSK9 是主动的并且可以降低人

巨噬细胞中的 LDL-C 含量。因此,VSMCs 的 PCSK9 局部表达能够通过抑制单核细胞迁移来增加 AS 中的病变生长和炎症。然而,VSMC 在 AS 仍有许多未知领域值得探索,这需要进一步研究以确定 PCSK9 在 AS 病变进展中的作用^[7](图 1)。



注:CCR2:细胞表面趋化因子受体-2;TNF-α:肿瘤坏死因子-α;血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1);VCAM-1:血管细胞黏附因子-1;ICAM-1:细胞间黏附因子-1;TLR4:Toll 样受体 4;LRP-1:低密度脂蛋白受体-1;NLRP3:炎性小体 3;ApoER2:载脂蛋白 E 受体 2;ABCA1:结合盒转运子 A1;ROS:活性氧;miROS:线粒体活性氧;p38MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;mTOR:哺乳动物帕霉素靶蛋白;mtDNA:线粒体 DNA;A 类清道夫受体 (SR-A)。

图 1 PCSK9 在 AS 中的免疫调节机制作用

3.4 PCSK9 通过 ox-LDL 对 DCs 和 T 细胞的影响

DCs 和 T 细胞存在于 AS 区域,并在 AS 斑块形成中发挥重要作用^[22-24]。本研究报道了 ox-LDL 和 LDL-C,但不是天然 LDL 通过 DCs 促进 T 细胞活化^[25]。另一项研究仍然证明 ox-LDL 诱导增强的 LOX-1、SR、CD36 和 A 类清道夫受体。通过沉默 PCSK9,这些影响可以被恢复^[25-26]。它仍然可以表明蛋白质异戊二烯化抑制与 ox-LDL 诱导的 PCSK9 起始无关。类似地,如前所述,未用 DCs 处理的 ox-LDL 的 T 细胞产生独立的 IL-17 和 γ 干扰素,其被极化为 Th17 和/或 Th1 亚组^[25]。沉默 PCSK9 逆转 ox-LDL 对 DCs 活化的影响,同时下调孤儿核受体和 T 细胞转录因子的表达,并诱导产生 IL-10 的 T 调节细胞。虽然 AS 中的 IL-17 尚未阐明^[27],但 IL-17 和 Th17 细胞可能在 AS 的不同阶段中发挥影响^[28-29],而人 AS 通常具有炎性 T 细胞表型^[30]。这表明 PCSK9 抑制具有新的特异性免疫调

节作用。从上面可以看出,PCSK9 对 DCs 和 T 细胞具有一定的影响,但仍有许多问题需要解决,需要进一步研究来验证这一结果(图 1)。

4 结论

到目前为止,已发现 PCSK9 具有增加 AS 炎症,促进斑块单核细胞浸润和巨噬细胞炎症的能力,所有这些都有助于理解抗 AS 的影响。然而,PCSK9 在 AS 中的作用是复杂的,并且对 AS 的原因和过程的解释尚不清楚。此外,PCSK9 引发免疫调节及其后续影响对 AS 治疗具有重要意义。PCSK9 的免疫学作用使得从通过细胞内程序完全控制的系统到通过循环蛋白显著调节的系统改变了这种 AS 的识别。通过独立于 LDL-R 促进炎症、内皮功能障碍和高血压,PCSK9 加速 AS 的可能性值得进一步研究。正如人们所知,PCSK9 由于其对 AS 的特异性和更多可能性而对正常细胞没有不利影响,这可能使其成为有效的抗 AS 的

受体。了解 PCSK9 启动免疫细胞活化和成熟的途径可以帮助设计有效的治疗方案。无论如何,PCSK9 的积极目标或相关的信号通路将开启 AS 的最新时代。

参考文献

- [1] Frostegard J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. *BMC Med*, 2013,11(117):1-13.
- [2] Liu A, Frostegard J. PCSK9 plays a novel immunological role in oxidized LDL-induced dendritic cell maturation and activation of T cells from human blood and atherosclerotic plaque [J]. *J Intern Med*, 2018,284(2):193-210.
- [3] Sun H, Krauss RM, Chang JT, et al. PCSK9 deficiency reduces atherosclerosis, apolipoprotein B secretion, and endothelial dysfunction [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(2): 207-223.
- [4] Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. Microdomains, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016,118(4):679-691.
- [5] Giunzioni I, Tavori H, Covarrubias R, et al. Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion [J]. *J Pathol*, 2016,238(1):52-62.
- [6] Onat D, Brillou D, Colombo PC, et al. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis [J]. *Curr Diab Rep*, 2011,11(3):193-202.
- [7] Ferri N, Tibolla A, Pirillo A, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels [J]. *Atherosclerosis*, 2012,220(2):381-386.
- [8] Urban D, Poss J, Bohm M, et al. Targeting the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013,62(16):1401-1408.
- [9] Hirose K, Iwabuchi K, Shimada K, et al. Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages [J]. *Lipids Health Dis*, 2011,10(1):1-18.
- [10] Bernelot Moens SJ, Neele AE, Kroon J, et al. PCSK9 monoclonal antibodies reverse the pro-inflammatory profile of monocytes in familial hypercholesterolaemia [J]. *Eur Heart J*, 2017,38(20):1584-1593.
- [11] Ruscica M, Ricci C, Macchi C, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) expression in hepatic hepG2 cell line [J]. *J Biol Chem*, 2016,291(7):3508-3519.
- [12] Al-Sharea A, Lee MK, Moore XL, et al. Native LDL promotes differentiation of human monocytes to macrophages with an inflammatory phenotype [J]. *Thromb Haemost*, 2016,115(4):762-772.
- [13] Tang ZH, Peng J, Ren Z, et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF-kappaB pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2017,262(2):113-122.
- [14] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cell*, 2011,145(3):341-355.
- [15] Li J, Liang X, Wang Y, et al. Investigation of highly expressed PCSK9 in atherosclerotic plaques and ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2017,16(2):1817-1825.
- [16] Wu CY, Tang ZH, Jiang L, et al. PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-caspase9-caspase3 pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012,359(1-2):347-358.
- [17] Tellides G, Pober JS. Inflammatory and immune responses in the arterial media [J]. *Circ Res*, 2015,116(2):312-322.
- [18] Ding Z, Liu S, Wang X, et al. LOX-1, mtDNA damage, and NLRP3 inflammasome activation in macrophages: implications in atherogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2014,103(4):619-628.
- [19] Ding Z, Liu S, Wang X, et al. Cross-talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues [J]. *Cardiovasc Res*, 2015,107(4):556-567.
- [20] Ding Z, Liu S, Wang X, et al. Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015,22(9):760-771.
- [21] Grune J, Meyborg H, Bezhaeva T, et al. PCSK9 regulates the chemokine receptor CCR2 on monocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017,485(2):312-318.
- [22] Zernecke A. Dendritic cells in atherosclerosis: evidence in mice and humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015,35(4):763-770.
- [23] Ketelhuth DF, Hansson GK. Adaptive response of T and B cells in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016,118(4):668-678.
- [24] Cheng HY, Gaddis DE, Wu R, et al. Loss of ABCG1 influences regulatory T cell differentiation and atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9):3236-3246.
- [25] Liu A, Ming JY, Fiskesund R, et al. Induction of dendritic cell-mediated T-cell activation by modified but not native low-density lipoprotein in humans and inhibition by annexin A5: involvement of heat shock proteins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015,35(1):197-205.
- [26] Frostegard J, Zhang Y, Sun J, et al. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-treated dendritic cells promote activation of T cells in human atherosclerotic plaque and blood, which is repressed by statins; microRNA let-7c is integral to the effect [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016,5(9):e003976.
- [27] Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis [J]. *Thromb Haemost*, 2011,106(5):787-795.
- [28] Lim H, Kim YU, Sun H, et al. Proatherogenic conditions promote autoimmune T helper 17 cell responses in vivo [J]. *Immunity*, 2014,40(1):153-165.
- [29] Gistera A, Robertson AK, Andersson J, et al. Transforming growth factor-beta signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(196):196ra100.
- [30] Liu Z, Lu F, Pan H, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication [J]. *Atherosclerosis*, 2012,221(1):232-241.

收稿日期:2019-04-30