

血管生成素样蛋白 3 抑制剂研究进展

于洋杰 谢坤 施海明

(复旦大学附属华山医院心内科, 上海 200040)

【摘要】 家族性高胆固醇血症是一种常染色体显性遗传病, 传统调脂药物对于这类患者的效果非常不理想。血管生成素样蛋白 3 单克隆抗体的出现为这些患者带来了希望。现综述血管生成素样蛋白 3 相关研究进展。

【关键词】 血管生成素样蛋白 3; 低密度脂蛋白胆固醇; 动脉粥样硬化; 心血管疾病

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.06.013

Angiotensin-Like Protein 3 Inhibitors

YU Yangjie, XIE Kun, SHI Haiming

(Department of Cardiology, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Familial hypercholesterolemia is an autosomal dominant hereditary disease. Traditional lipid regulating drugs have less effect on these patients. The appearance of monoclonal antibody against angiotensin-like protein 3 brings hope to these patients. In this review, we will summarize the most recent studies of angiotensin-like protein 3.

【Key words】 Angiotensin-like protein 3; Low-density lipoprotein cholesterol; Atherosclerosis; Cardiovascular disease

血脂异常是动脉粥样硬化性心血管疾病 (arteriosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 的重要危险因素之一。在众多血脂指标当中, 降低低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 是目前治疗动脉粥样硬化最有效的手段。主要针对 LDL-C 的调脂药物包括他汀类药物、依折麦布和前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 抑制剂, 其均已写入最新的指南并应用于临床治疗中^[1]。这些药物均能在大部分人群中有效地降低 LDL-C, 并改善 ASCVD 患者的预后。用于控制 LDL-C 的新型药物的研发也从未停止。2019 年的 CLEAR Harmony 研究 ($n=2\ 230$) 中应用的贝培多酸是一种可降低 LDL-C 的三磷酸腺苷柠檬酸裂解酶抑制剂^[2]。2020 年的 ORION-10 ($n=1\ 561$) 和 ORION-11 ($n=1\ 617$) 研究中应用的 Inclisiran 则是一种小干扰 RNA, 它可抑制 PCSK9 合成从而发挥降低 LDL-C 的作用^[3]。然而, 对于家族性高胆固醇血症患者, 这些药物的治疗效果并不理想。而近期研究表明, 血管生成素样蛋白 3 (angiotensin-like protein 3, ANGPTL3) 的单克隆抗体可显著降低家族性高胆固醇血症患者的 LDL-C。现围绕 ANGPTL3 对血脂和冠心病的影响进行综述。

1 家族性高胆固醇血症患者的困境

家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是一种常染色体显性遗传病。FH 患者由于基因突变导致低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR) 缺陷, 其临床特征主要表现为 LDL-C 水平升高以及早发冠状动脉疾病风险增加^[4]。LDLR 存在于肝细胞表面, 可清除血液内的 LDL-C^[5]。杂合子 FH (HeFH) 患者的血液中 LDL-C 的水平通常会比普通高 1~2 倍, 其 ASCVD 风险也会增加 3.5~16.0 倍^[6]。传统降脂药物发挥其降脂作用均在某种程度上需 LDLR 的参与^[7]。由于 HeFH 患者仍存在一条编码 LDLR 的染色体, 传统的降脂药物对他们仍有一定的效果。然而对于纯合子 FH (HoFH) 患者, 其肝细胞表面的 LDLR 完全缺陷, 传统调脂药物对于这类患者的效果非常不理想。因此, 研发通过非 LDLR 途径降低 LDL-C 的药物对于 HoFH 患者至关重要。

2 ANGPTL3 概述

1999 年 Conklin 等^[8]最早从人的胎儿肝/脾 cDNA 库分离出了 ANGPTL3 cDNA。他们发现 ANGPTL3 蛋白由 460 个氨基酸组成, 且与血管生成素有类似的结构。Conklin 等^[8]同时在小鼠体内也找到了由 455 个氨基酸

组成的 ANGPTL3 蛋白,该蛋白与人的 ANGPTL3 有 76% 的氨基酸序列相同。人类 ANGPTL3 基因定位于 1 号染色体短臂(1p30.3),包含 7 个外显子。ANGPTL3 主要在肝脏表达,人体组织的 Northern 印记杂交显示肝脏中有 4 种 ANGPTL3 的转录产物,大小分别为 4.5 Kb、3.0 Kb、2.8 Kb 和 1.7 Kb,其中 1.7 Kb 的 ANGPTL3 mRNA 在人肾脏足细胞中也有微量表达。该研究还发现,人类 ANGPTL3 和小鼠 ANGPTL3 通过可逆地抑制脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)的催化活性,升高血浆甘油三酯(triglyceride, TG)水平,该结构域的过表达也可提高小鼠的血浆 TG 水平。

2002 年 Yoshida 等^[9]在具有肥胖、高血糖和高血脂的 KK 小鼠中发现了低血脂表现的 KK/San 小鼠,并最早提出了 ANGPTL3 与血脂的相关性。这一亚群小鼠的血浆 TG、总胆固醇(total cholesterol, TC)和游离脂肪酸水平均低于 KK 小鼠。该研究通过基因测序发现 KK/San 小鼠几乎不表达 ANGPTL3。而诱导 KK/San 小鼠 ANGPTL3 基因过表达,或静脉注射纯化的 ANGPTL3 蛋白则会提高小鼠血浆 TG、TC 和游离脂肪酸的水平,从而证实了 ANGPTL3 基因是 KK/San 小鼠低血脂表现的原因。

人群中也存在 ANGPTL3 基因(OMIM:604774)的天然突变个体,ANGPTL3 基因突变会导致家族性低 β 脂蛋白血症 2 型。这是一种以极低的血浆 TG、LDL-C 和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平为特征的常染色体隐性遗传病。Musunuru 等^[10]对低 β 脂蛋白血症家族的两个成

员进行了基因组测序,发现这两个患者 ANGPTL3 基因的第二个外显子上携带无义突变 S17X 和 E129X,且两人血液中几乎检测不到 ANGPTL3,进而提出了 ANGPTL3 基因的功能缺失型突变为家族性低 β 脂蛋白血症 2 型的病因。随后,有研究者观察并随访了数名家族性低 β 脂蛋白血症 2 型患者,发现他们均长期处于健康状态,且未患脂肪肝、严重颈动脉硬化或狭窄和肝功能异常等疾病,提示家族性低 β 脂蛋白血症 2 型本身对人体健康无明显不良影响^[11]。

后续研究发现,ANGPTL3 可通过抑制脂 LPL 和内皮脂肪酶(endothelial lipase, EL)的活性从而调节 TG 和 HDL-C 的水平,而对于 LDL-C 的调节机制目前尚不明晰^[12]。LPL 位于肝外组织的毛细血管内皮细胞表面,能使极低密度脂蛋白和乳糜微粒中携带的 TG 逐步水解并产生甘油和非酯化脂肪酸(non-esterified fatty acid, NEFA)(图 1)^[12-13]。ANGPTL3 能使具有催化活性的 LPL 二聚体解离成无活性的 LPL 单体,从而导致血浆 TG 水平升高。EL 位于血管内皮细胞的表面,可通过水解 HDL 磷脂降低 HDL 水平,阻碍胆固醇逆向转运^[14]。ANGPTL3 通过抑制 EL 的活性来升高血浆 HDL-C 水平。因此 ANGPTL3 缺失可导致 TG 和 HDL-C 水平的降低。ANGPTL3 缺失也可导致 LDL-C 水平降低,但其机制目前尚未研究透彻,目前可明确的是 ANGPTL3 缺失导致的 LDL-C 降低与 LDLR 无关^[15]。最新的研究发现,同时敲除小鼠的 LDLR 和 EL 后,ANGPTL3 抑制剂并不能降低 LDL-C,因此 ANGPTL3 抑制剂很可能是通过 EL 依赖的途径降低 LDL-C^[16]。

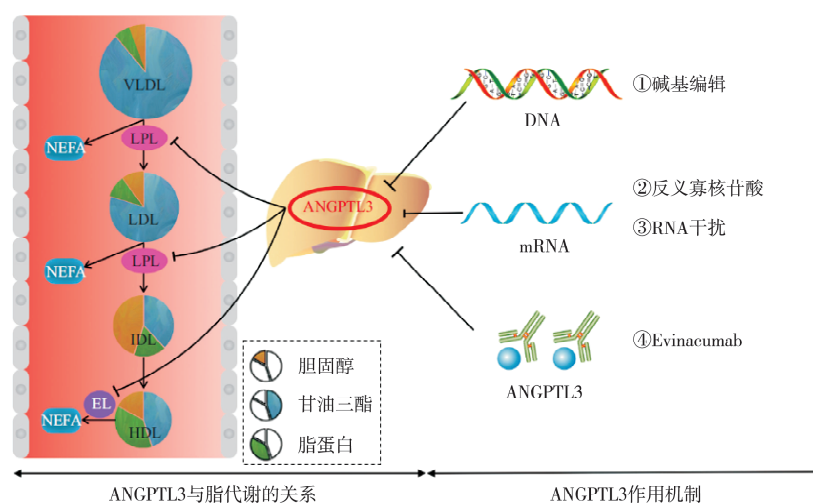


图 1 ANGPTL3 对脂质代谢的影响及降脂治疗方法

3 ANGPTL3 抑制剂的临床研究进展

众所周知, TG 和 LDL-C 的升高均可增加 ASCVD 的发病风险。由于 ANGPTL3 的缺失可导致 TG 和

LDL-C 水平的降低, ANGPTL3 抑制剂应运而生。目前一共有 4 种方法针对性地抑制 ANGPTL3 基因或 ANGPTL3 蛋白: 基因编辑技术、单克隆抗体、反义寡核

苷酸和 RNA 干扰^[17]。真正进入临床研究阶段的方法目前仅有两种——单克隆抗体和反义寡核苷酸。

3.1 基因编辑技术

从基因层面诱导 ANGPTL3 基因的功能失活的方法被称为基因编辑技术。2018 年 Chadwick 等^[18]利用碱基编辑器 3 使 C57BL/6J 小鼠产生 ANGPTL3 无义突变。他们发现,与对照组相比,基因编辑组 ANGPTL3、TG 和 TC 分别下降了 49%、31% 和 19%,从而证实了在小鼠体内基因编辑技术是靶向抑制 ANGPTL3 的有效策略,但该技术能否应用于人体目前尚无研究。因此基因编辑技术进入临床研究阶段还有很长的路要走。

3.2 单克隆抗体

Evinacumab 是 ANGPTL3 的单克隆抗体。2015 年 Gusarova 等^[19]的研究表明,在血脂正常或异常小鼠中,Evinacumab 能增加 LPL 活性,并降低血浆 TG、LDL-C 和 HDL-C 水平。2017 年,Dewey 等^[20]在高胆固醇血症小鼠中发现 Evinacumab 在显著降低血浆 TG 和 TC 的同时,还能减小动脉粥样硬化病变面积和坏死物质含量。同年,Evinacumab 在对 HoFH 患者的一期临床试验中显示出了卓越的疗效。经过 Evinacumab 治疗 4 周后,入选的 9 例 HoFH 患者 LDL-C 和 TG 水平降低了近 50%,HDL-C 水平降低了 40%^[21]。2020 年 Evinacumab 的三期临床研究得到了令人振奋的结果。该研究最终纳入了 65 例 HoFH 患者,他们均接受了标准的传统降脂药物治疗,然而其 LDL-C 基线水平的均值仍为 6.6 mmol/L。在此基础上,经过 24 周的治疗后,Evinacumab 组患者($n=43$)相较于安慰剂组患者($n=22$)LDL-C 水平降低 49%,TG 降低 50%,HDL-C 降低 30%^[22]。并且在整个研究过程中,Evinacumab 组的患者未发现明显的不良反应。

3.3 反义寡核苷酸

ANGPTL3 反义寡核苷酸可介导 ANGPTL3 mRNA 在细胞内的灭活。2017 年 Graham 等^[23]的研究表明,在各种高胆固醇血症小鼠模型中,ANGPTL3 反义寡核苷酸可有效降低肝源性 ANGPTL3 mRNA 的表达和血浆 ANGPTL3 的浓度,并剂量依赖性地减少了血浆 TG、LDL-C 和 HDL-C 水平,延缓小鼠动脉粥样硬化的进程。2017 年,ANGPTL3 的反义寡核苷酸的一期临床研究也得到了令人兴奋的结果。经过不同剂量的 IONIS-ANGPTL3-LR₁ 治疗 6 周后,患者的 LDL-C 降低幅度为 1.3%~32.9%,TG 降低幅度为 33.2%~63.1%^[23]。而在 2020 年 ANGPTL3 反义寡核苷酸的二期临床研究中,Vupanorsen 显示出了良好的降脂作用。该研究选择的人群并非 HoFH 的患者,而是有高

TG 血症、2 型糖尿病合并脂肪肝的患者。与安慰剂组相比,每四周给予患者 80 mg 的 Vupanorsen 可使患者的 TG 降低 44%,LDL-C 降低 7%,HDL-C 降低 24%^[24]。整个研究过程中,Vupanorsen 组的患者同样未发现明显的不良反应。

3.4 RNA 干扰

RNA 干扰技术可对目标 mRNA 进行高效和特异的抑制,引导基因的转录后沉默。Xu 等^[25]在多种小鼠模型及人肝癌细胞中利用 RNA 干扰介导 ANGPTL3 基因沉默,发现 RNA 干扰能降低野生型和肥胖小鼠的血浆 TG、HDL-C 和 LDL-C 水平。目前关于 ANGPTL3 的 RNA 干扰技术相关研究较少,其作用强度和生物安全性也需更多研究进一步的补充及验证。

4 ANGPTL3 抑制剂可能存在的问题

既往的重大研究,如 IMPROVE-IT、FOURIER 和 DYSSEY OUTCOMES 研究,均证实 LDL-C 的降低导致的 ASCVD 风险的降低源自 LDL-C 降低本身^[26-28]。所以虽然 Evinacumab 的三期临床研究并未对患者的远期预后进行随访,但从 LDL-C 的降低幅度和降低的绝对值来看,可预测患者远期的 ASCVD 风险会大幅降低。但 Evinacumab 降低 LDL-C 的同时也会导致 HDL-C 的水平降低,幅度为 30%。HDL-C 可从动脉硬化斑块中转运走多余的胆固醇,故 HDL 被认为是“有益的”脂蛋白。到目前为止,大量相关研究也已证实 HDL-C 的水平与 ASCVD 患者的预后有明显的相关性^[29-30]。因此难免会对 HDL-C 的降低有所担心。

除此之外,还需思考另外的问题——Evinacumab 能否用于非 FH 患者? 是否能用于他汀类药物、依折麦布和 PCSK9 抑制剂治疗效果不佳的患者? 或是否比传统药物的使用优先级更高? 对于 TG 的降低幅度,ANGPTL3 的单克隆抗体和反义寡核苷酸均表现出了类似的效果。然而 Vupanorsen 对于 LDL-C 的降低幅度并没有 Evinacumab 那么高,其原因可能是两个研究所纳入的人群不同,基线 LDL-C 水平不同。这也提示 ANGPTL3 抑制剂在正常人群中并不能替代传统的调脂药物,或并不优于传统调脂药物。这一系列问题还有待未来研究阐明。

5 结语

ANGPTL3 单克隆抗体抑制剂三期临床试验的成功使家族性高胆固醇血症的患者看到了希望。研究人员也期待 ANGPTL3 的反义寡核苷酸制剂在未来能获得良好的临床效果。当然,关于 ANGPTL3 还有一系列问题有待未来的研究阐明。首先,目前尚且不清楚 ANGPTL3 影响 LDL-C 水平的具体机制;其次,抑制 ANGPTL3 导致的致动脉粥样硬化脂蛋白减少的获益

是否能弥补 HDL-C 降低的影响,长期应用是否真的能降低 ASCVD 风险;此外,长期使用 ANGPTL3 抑制剂的安全性尚不明确。相信随着对 ANGPTL3 的深入研究,上述问题将逐渐被解开。

参考文献

- [1] Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(1): 111-188.
- [2] Ray KK, Bays HE, Catapano AL, et al. Safety and efficacy of bempedoic acid to reduce LDL cholesterol [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(11): 1022-1032.
- [3] Ray KK, Wright RS, Kallend D, et al. Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1507-1519.
- [4] Li JJ, Li S, Zhu CG, et al. Familial hypercholesterolemia phenotype in Chinese patients undergoing coronary angiography [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(3): 570-579.
- [5] Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(32): 2146-2157.
- [6] Lee SH. Update on familial hypercholesterolemia: diagnosis, cardiovascular risk, and novel therapeutics [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2017, 32(1): 36-40.
- [7] Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines [J]. *Circulation*, 2019, 139(25): e1046-e1081.
- [8] Conklin D, Gilbertson D, Taft DW, et al. Identification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specifically in liver [J]. *Genomics*, 1999, 62(3): 477-482.
- [9] Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, et al. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase [J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(11): 1770-1772.
- [10] Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(23): 2220-2227.
- [11] Minicocci I, Montali A, Robciuc MR, et al. Mutations in the ANGPTL3 gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(7): E1266-E1275.
- [12] Arca M, Minicocci I, Maranghi M. The angiopoietin-like protein 3: a hepatokine with expanding role in metabolism [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(4): 313-320.
- [13] 王静巧,王双双,王建安,等. 血管生成素样蛋白 3 与脂质代谢及动脉粥样硬化的关系 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(5): 985-991.
- [14] Pisciotto L, Favari E, Magnolo L, et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3 [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012, 5(1): 42-50.
- [15] Wang Y, Gusarova V, Banfi S, et al. Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(7): 1296-1307.
- [16] Adam RC, Mintah IJ, Alexa-Braun CA, et al. Angiopoietin-like protein 3 governs LDL-cholesterol levels through endothelial lipase-dependent VLDL clearance [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(9): 1271-1286.
- [17] Lupo MG, Ferri N. Angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and atherosclerosis: lipid and non-lipid related effects [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2018, 5(3): 39.
- [18] Chadwick AC, Evitt NH, Lv W, et al. Reduced blood lipid levels with in vivo CRISPR-Cas9 base editing of ANGPTL3 [J]. *Circulation*, 2018, 137(9): 975-977.
- [19] Gusarova V, Alexa CA, Wang Y, et al. ANGPTL3 blockade with a human monoclonal antibody reduces plasma lipids in dyslipidemic mice and monkeys [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(7): 1308-1317.
- [20] Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, et al. Genetic and pharmacologic inactivation of ANGPTL3 and cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(3): 211-221.
- [21] Gaudet D, Gipe DA, Pordy R, et al. ANGPTL3 inhibition in homozygous familial hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(3): 296-297.
- [22] Raal FJ, Rosenson RS, Reeskamp LF, et al. Evinacumab for homozygous familial hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(8): 711-720.
- [23] Graham MJ, Lee RG, Brandt TA, et al. Cardiovascular and metabolic effects of ANGPTL3 antisense oligonucleotides [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(3): 222-232.
- [24] Gaudet D, Karwowska-Prokopczuk E, Baum SJ, et al. Vupanorsen, an N-acetyl galactosamine-conjugated antisense drug to ANGPTL3 mRNA, lowers triglycerides and atherogenic lipoproteins in patients with diabetes, hepatic steatosis, and hypertriglyceridaemia [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(40): 3936-3945.
- [25] Xu YX, Redon V, Yu H, et al. Role of angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) in regulating plasma level of low-density lipoprotein cholesterol [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 268: 196-206.
- [26] Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(25): 2387-2397.
- [27] Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(18): 1713-1722.
- [28] Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, et al. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(22): 2097-2107.
- [29] Hirayama K, Ota T, Harada K, et al. Impact of paradoxical decrease in high-density lipoprotein cholesterol levels after statin therapy on major adverse cardiovascular events in patients with stable angina pectoris [J]. *Clin Ther*, 2017, 39(2): 279-287.
- [30] Park JS, Cha KS, Lee HW, et al. Predictive and protective role of high-density lipoprotein cholesterol in acute myocardial infarction [J]. *Cardiol J*, 2019, 26(2): 176-185.

收稿日期: 2020-11-13