

PCSK9 降解低密度脂蛋白受体分子机制研究进展

吴玉娴, 王琰

武汉大学生命科学学院, 细胞稳态湖北省重点实验室, 武汉 430072

摘要: 血清低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平的升高是导致心血管疾病发生的主要危险因素。低密度脂蛋白受体(LDL receptor, LDLR)介导的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)清除是决定循环中 LDL-C 水平的主要因素。LDL 与细胞表面的 LDLR 结合后通过经典的网格蛋白小窝(clathrin-coated vesicles)内化进入细胞。在酸性核内体中, LDLR 与 LDL 解离并循环回到细胞表面, 释放的 LDL 将被运送到溶酶体中降解。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9)编码一种肝脏分泌型蛋白, 其突变与 LDL-C 水平密切相关。前期研究已经证明, PCSK9 直接与细胞表面的 LDLR 相互作用, 二者一起通过网格蛋白小窝内化进入细胞。然而, 在酸性核内体中, PCSK9 和 LDLR 形成紧密的复合物, 并进入溶酶体中进行降解, 从而减少肝细胞表面 LDLR 的水平, 降低肝脏对 LDL-C 的清除, 该过程对于维持血浆中 LDL 在相对恒定的水平具有重要作用。因此, 阻断 PCSK9 功能已成为治疗高胆固醇血症的新策略。本文综述了 PCSK9 的功能和机制研究的最新进展, 并着重介绍了 PCSK9 抑制剂的研究进展, 旨在为 PCSK9-LDLR 通路的研究和胆固醇代谢的调控提供参考。

关键词: LDL-C; LDL 受体; PCSK9; 囊泡内吞; PCSK9 抑制剂

Progress on the molecular mechanisms of PCSK9-mediated degradation of low density lipoprotein receptor

Yuxian Wu, Yan Wang

Hubei Province Key Laboratory of Cell Homeostasis, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: Elevated serum level of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is the leading risk factor for cardiovascular disease. LDL receptor (LDLR)-mediated LDL clearance is the major factor determining the LDL-C level in the circulation. LDL binds to the LDLR on the cell surface and enters the cells through classical clathrin-coated vesicles. In the acidic endosome, LDLR is uncoupled from LDL and recycles back to the cell surface. The released LDL is transported to the lysosome for degradation. The proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) gene encodes a hepatic secretory protein, and its mutations are strongly associated with levels of LDL-C. We and others have shown that PCSK9 directly

收稿日期: 2020-04-06; 修回日期: 2020-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 91754101)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91754101)]

作者简介: 吴玉娴, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 2017202040140@whu.edu.cn

通讯作者: 王琰, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 脂类代谢。E-mail: Wang.y@whu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-065

网络出版时间: 2020/5/22 14:31:00

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200522.1111.001.html>

interacts with LDLR on the cell surface and both are internalized through the clathrin-coated vesicles. However, in the acidic endosome, PCSK9 and LDLR form a tight complex and are targeted to lysosome for degradation, thereby reducing the level of LDLR on the surface of hepatocytes and decreasing hepatic clearance of LDL-C, which plays an important role in maintaining a relatively constant level of LDL in the plasma. Thus, blocking PCSK9 function has become a new strategy to treat hypercholesterolemia. In this review, we will summarize the latest progress in the functional and mechanistic studies of PCSK9 and also highlight the research progress of PCSK9 inhibitors. It aims to provide a reference for the study of PCSK9-LDLR pathway and the regulation of cholesterol metabolism.

Keywords: LDL-C; LDL receptor; PCSK9; endocytosis; PCSK9 inhibitor

胆固醇是人体生命活动必不可少的脂类物质^[1,2]。血浆中胆固醇水平的升高会引发动脉粥样硬化性心血管疾病,同时大大增加心肌梗死和卒中的风险^[3,4]。人体中 60%~70% 的血浆胆固醇由低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)运输^[5],而血浆中 75% 左右的 LDL 通过肝脏细胞的低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)内吞进入肝脏细胞被清除^[6],其余 25% 左右被外周组织器官吸收利用。LDLR 介导的 LDL 内吞途径被认为是机体清除血浆 LDL 最为重要和高效的方式^[7]。

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9)可结合 LDLR 并介导其降解,从而调节血浆低密度脂蛋白胆固醇水平(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)^[7,8]。研究发现,PCSK9 的一些突变体会造成常染色体显性高胆固醇血症(autosomal dominant hypercholesterolemia, ADH)^[9-12]。PCSK9 介导 LDLR 降解通路的发现使得 PCSK9 成为心血管疾病治疗的新靶点,也促使人们迅速研究 PCSK9 的生物学机制^[13]。本文主要对 LDLR 和 PCSK9 的蛋白结构、生物学功能及 PCSK9 降解 LDLR 的分子机制及相关抑制剂的开发等方面的研究进展进行了综述,为胆固醇代谢调控的分子机制的研究和高血脂症的治疗提供参考。

1 LDLR 结构与功能

美国西南医学中心的两位科学家 Brown 和 Goldstein 等^[14,15]于 1974 年在研究家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)时发现了

LDLR 的存在,这一发现对脂蛋白、载脂蛋白的深入研究有巨大的推进作用。

LDLR 是一个单链单次跨膜糖蛋白,广泛分布于肝脏、动脉壁平滑肌、血管内皮细胞和白细胞。LDLR 成熟体由 839 个氨基酸组成,在结构上分为 5 个功能区,包括:配体结合结构域(ligand binding domain)、表皮生长因子前体结构域(EGF precursor structure domain)、含 O-连接糖链结构域(O-linked sugars structure domain)、跨膜结构域(transmembrane domain)和胞浆结构域(cytoplasmic structure domain)^[16,17],其中配体结合结构域由 7 个配体结合重复序列 LR1-LR7 (ligand binding repeat)组成,EGF 前体结构域包括 3 个 EGF 样重复序列(EGF-A、B、C)和一个 6 个 YWTD 模体组成的 β 螺旋结构^[18]。

LDLR 的主要功能是摄入血浆胆固醇,人体血浆中大约 75% 的 LDL 是通过介导的内吞作用进入各组织细胞所清除(图 1),其余由清道夫受体(scavenger receptor)摄取、氧化以及由周围组织进行非受体介导途径所摄取^[16,19]。在 LDLR 介导 LDL 内吞的过程中,LDL 中的载脂蛋白 ApoB100 与 LDLR 结合形成复合体,同时,在常染色体隐性高胆固醇血症衔接蛋白(autosomal dominant hypercholesterolemia, ADH)和 AP-2 (adaptin protein 2)以及网格蛋白介导下启动内吞作用^[20]。随着核内体中 pH 值的降低,LDLR 从开放构象转变为封闭构象,释放结合的 LDL,LDLR 循环回到细胞膜表面^[21,22],而 LDL 被运送到溶酶体水解^[16,23]。由此可见,LDLR 介导的 LDL 内吞途径对于维持血浆 LDL 在相对恒定的水平有重要作用。

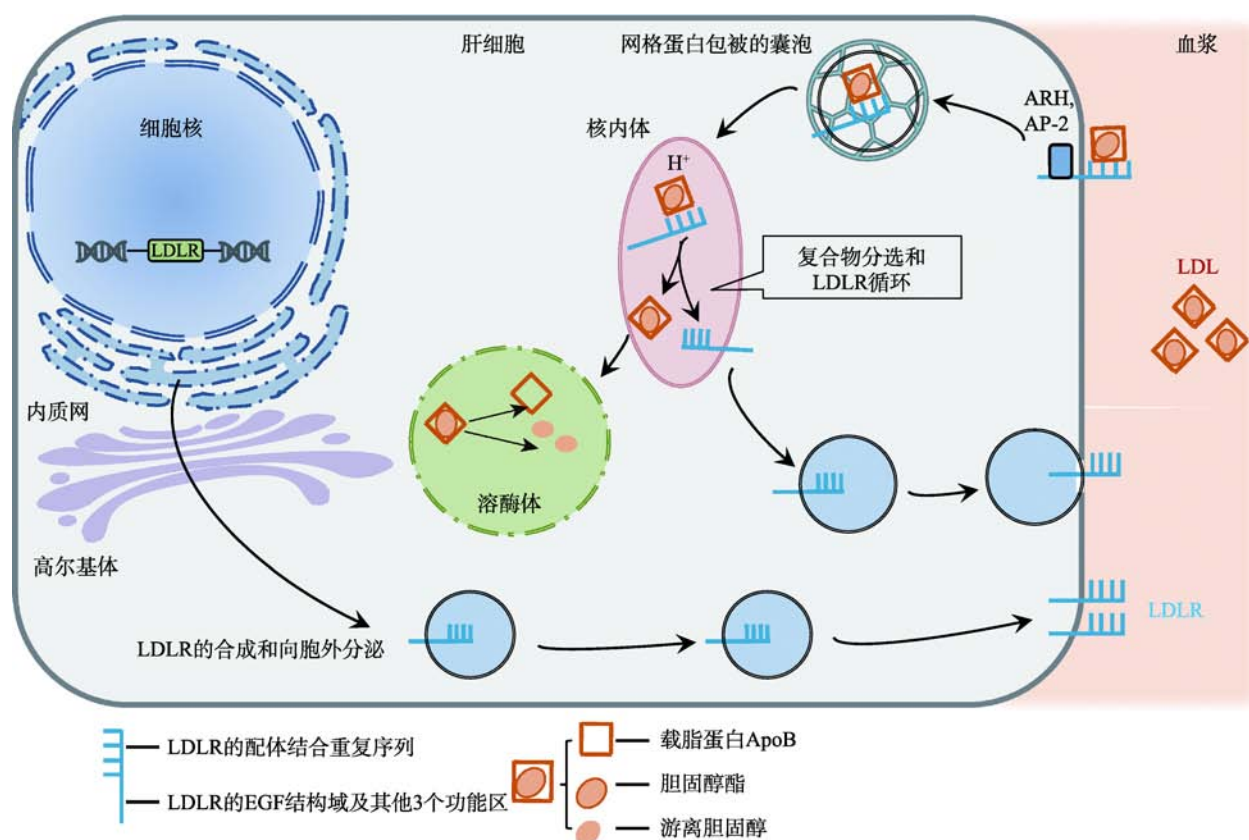


图 1 LDLR 介导 LDL 的内吞及 LDLR 循环

Fig. 1 LDLR mediates LDL endocytosis and LDLR circulation

LDLR 与血液中的 LDL 在膜上结合成 LDL/LDLR 复合物, 后被合并到包含网格蛋白的囊泡中, 囊泡在核内体内解离, LDLR 自由地返回到细胞表面(循环), 而 LDL 则被运送到溶酶体, 在溶酶体中被降解。

2 PCSK9 蛋白结构与功能

2003 年, Marianne 等^[9]在两个常染色体显性形式的 FH 的法国家庭中发现两种 PCSK9 基因突变——S127R 和 F216L 可导致严重的家族性高胆固醇血症。这是继 LDLR 和 ApoB 之后第 3 个被发现的与高胆固醇血症有关的基因^[24,25]。

2.1 PCSK9 蛋白的结构

PCSK9 是枯草溶菌素蛋白酶 K 亚家族的第 9 个成员, 该基因编码的蛋白质由 692 个氨基酸残基组成, 包含 N 端信号肽序列、前结构域、催化结构域、枢纽域和富含半胱氨酸的 C 端结构域^[26,27]。PCSK9 蛋白主要表达于肝脏, 也在小肠、肾脏、胰腺 β 细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞甚至脂肪细胞中表达^[28,29], 以分泌性蛋白的形式随血液循环。不同于

原蛋白转化酶家族的其他成员, PCSK9 在合成后被导向内质网, 其中信号肽在内质网上被剪切, 在 152 位残基处经历一次自催化剪切激活, 形成一个 14 kDa 的前结构片段和一个 60 kDa 的糖基化成熟体。剪切后的前结构域仍然以非共价键结合在成熟体上, 与成熟片段形成一个复合体^[30], 前结构域通过结合在催化结构域上来抑制蛋白酶催化活性, 这一步骤是 PCSK9 转运至高尔基体和以不活跃的二聚体复合物分泌所必需的^[31]。随后复合体离开内质网转运至高尔基体中, 在高尔基体中经过乙酰化等一系列修饰后最终分泌到血液中^[32,33]。

2.2 PCSK9 降解 LDLR 的分子机制

自 2003 年 PCSK9 被发现与家族性高胆固醇血症有关联后, 时隔 2 年后人们确立了 PCSK9 中两种相对常见的“功能缺失型”突变和低血浆 LDL-C 水平之间的因果关系^[34]。此后的数年间, 研究人员开

始研究 PCSK9 和 LDLR 的互作。随着实验方法和技术的更新换代,人们对 PCSK9 介导 LDLR 降解的分子机制有了更多的发现。2012, Wang 等^[35]发现结合 PCSK9 的 LDLR 依然通过经典的网格蛋白(clathrin)内吞囊泡途径进入细胞,最终在溶酶体被降解,而这一过程完全不需要泛素化与蛋白酶体途径、细胞自噬途径和 ESCRT 途径,这一发现对理解 PCSK9 的作用机制提供了新的思路。

目前发现 PCSK9 介导 LDLR 的降解有两种机制:胞内途径和胞外途径(图 2)。因此,PCSK9-LDLR 复合物的结合和形成既可以发生在细胞内,也可以发生在细胞表面。由于这些里程碑式的观察和发现,PCSK9 已经成为一个非常有吸引力的药物靶点和深入研究的课题。

2.2.1 PCSK9 介导 LDLR 降解的胞内途径

2004 年, Park 等^[36]首次发现,在 *Arh* 敲除小鼠

中过表达 *PCSK9* 后,肝脏的 *LDLR* 水平依然降低,人家据此推断 PCSK9 降解 LDLR 存在一种不依赖于 ARH 的细胞内途径,后来 Homer 等^[37]在南非人群中发现两种 *PCSK9* 突变体——S127R 和 D129G,这两种突变体的自催化和向胞外分泌过程被强烈抑制,却依旧能降低 *LDLR* 的表达和活性^[37],进一步证实了“胞内途径”的猜想。2009 年, Poirier 等^[38]发现:通过敲低网格蛋白轻链(clathrin light chain, CLCs)阻断从高尔基体网络到溶酶体的囊泡运输, HepG2 细胞内的 LDLR 水平以 PCSK9 剂量依赖的方式迅速上升,而外源性 PCSK9 增强 LDLR 降解的能力不受影响。由此确定了内源水平上 PCSK9 诱导的 LDLR 降解的细胞内路径的存在。分泌前的成熟的 PCSK9 在从内质网进入高尔基体网络后,与包裹着 LDLR 的囊泡结合,并直接介导 LDLR 直接进入溶酶体降解^[38]。在肝脏中, PCSK9 主要通过细胞外途径促进 LDLR 的降解,推断可能是当胞外途径被人为阻断或 PCSK9

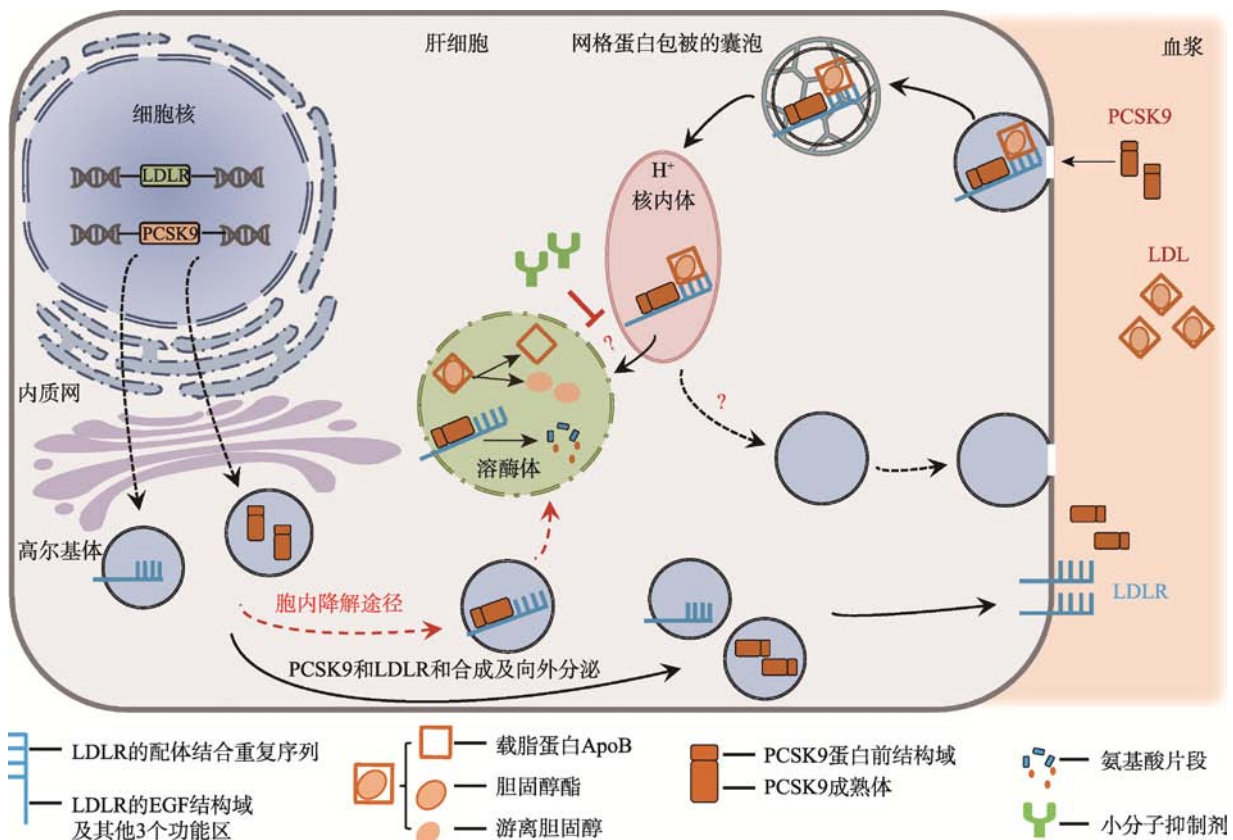


图 2 PCSK9 介导 LDLR 降解的两种途径

Fig. 2 Two pathways of PCSK9-mediated LDLR degradation

PCSK9 降解 LDLR 的两种途径:胞内途径(红色虚线箭头)和胞外途径(黑色实线箭头)。胞内途径—PCSK9 在分泌前与细胞内的 LDLR 相遇,直接进入溶酶体降解;胞外途径—分泌到胞外的 PCSK9 与 LDLR 通过网格蛋白介导的内吞方式进入细胞内,最终在溶酶体降解。

过表达时,这种代偿性的不依赖于网格蛋白的胞内途径就被激活^[7]。关于 PCSK9 降解 LDLR 的胞内途径的具体分子机制尚需要更深一步的研究,但这一发现为治疗高胆固醇血症和冠心病提供了一个新的指导方向。

2.2.2 PCSK9 介导 LDLR 降解的胞外途径

一系列联体共生动物实验清楚地表明,PCSK9 降解 LDLR 的生理过程主要是通过胞外途径^[39,40]。

分泌到肝细胞外的 PCSK9 蛋白与 LDLR 结合,其中 PCSK9 的催化结构域和 LDLR 的 EGF-A 区域是二者结合的关键结构。PCSK9 的催化结构域以钙依赖的方式特异性结合到位于细胞膜上的 LDLR 的 EGF-A 的 N 端区域,由此形成 PCSK9/LDLR 复合体^[41-44]。ARH 与 LDLR 的胞浆结构域相互作用,从而介导 PCSK9/LDLR 复合体通过网格蛋白介导的胞吞途径一起内吞进入核内体。由于核内体中 pH 值降低,带正电荷的 PCSK9 的 C 端结构域与带负电荷的 LDLR 的配体结合结构域上的 LR_s 发生静电相互作用,LDLR 的配体结合重复域中的 Asp 残基(Asp172 和 Asp203)参与了互作^[43],进一步增强了 PCSK9 与 LDLR 的亲合力^[45,46],由此提升了复合物的稳定性,抑制 LDLR 恢复闭合构象,使其不能释放配体也无法离开内体返回细胞表面。接下来 PCSK9/LDLR 复合物进入溶酶体,PCSK9 和 LDLR 均被降解^[47]。

一些 PCSK9 突变体如 D374Y 和 S127R 以及 LDLR 的突变体 H306Y 会导致家族性高胆固醇血症^[17],突变体通过增强 PCSK9/LDLR 复合物内的分子相互作用来破坏 LDLR,进而影响 LDL-C。如 PCSK9 D374Y 突变体通过与 LDLR 的 EGFA 结构域之间形成氢键,从而使得其与 LDLR 结合的亲和性相比于野生型 PCSK9 提高了 6~30 倍^[48],从而促进 LDLR 降解,增加循环的 LDL-C 水平^[42-44,49,50],因此,这些突变体携带者也会比其他 FH 患者更早地受到心血管疾病的影响。

PCSK9 介导 LDLR 降解的过程中是否有其他分子参与调节,是一直以来研究的热点,人们对此也有诸多猜想和发现。一方面立足于 PCSK9 降解 LDLR 的生理过程具有的组织特异性,在肝脏中其效果最为明显,在肾上腺和成人脑部分区域中 PCSK9 不能(或几乎不能)调节 LDLR 水平^[51,52]。由于衔接蛋

白 ARH 是肝细胞中 PCSK9/LDLR 复合物内化所必需的,在其他类型的细胞中则不是必需的^[40,53,54],所以由此人们推测:PCSK9 降解 LDLR 需要组织特异性的分子伴侣,且分子伴侣可能与 PCSK9 的 C 端结构域相互作用来参与调控^[30,55]。最新的一项研究发现了一种参与 PCSK9 结合并降解 LDLR 过程的重要因子—肝素硫酸酯蛋白聚糖(heparin sulfate proteoglycans, HSPG)。HSPG 是一种大量存在于多种细胞表面及细胞外基质的蛋白聚糖,在脂蛋白代谢尤其是结合配体的内吞过程中起着重要的生理作用^[56]。不同于其他组织和细胞,肝细胞上的 HSPG 的乙酰肝素链化学性质特殊,其中含有较丰富的 N-位硫酸化的氨基葡萄糖(GlcN)和 2-O-位硫酸化的艾杜糖醛酸(IDoA),并且三硫酸双糖单位在全链中所占的比例较高。PCSK9 对由 GlcN 和 IDoA 组成的三硫酸乙酰肝素二糖重复结构表现出高度的选择性和亲和性。由此,肝细胞表面上 HSPG 可大量招募血液中的 PCSK9 蛋白并通过 PCSK9 前结构域的 6 个暴露的氨基酸位点与之紧密结合,这种结合对于体内和体外 PCSK9/LDLR 复合体的形成及降解至关重要^[57]。因此,针对 HSPG 结合位点的单克隆抗体和肝素类似物等是有效的 PCSK9 抑制剂,可作为潜在的 CAD 治疗手段。

2019 年, Huang 等^[58]发现了 PCSK9 和 LDLR 结合及降解过程中的一个新的参与者——黄体酮和脂质受体 3(progestin and AdipoQ receptor 3, PAQR3)。PAQR3 主要定位于高尔基体,主要通过抑制 Raf 激酶和 PI3K/AKT 介导的促生长信号通路发挥抑癌作用^[58,59]。研究发现当 PAQR3 过表达时可剂量依赖性地增强 LDLR 与 PCSK9 的相互作用。相反,当肝脏 PAQR3 被敲除时内源性 PCSK9 与 LDLR 的相互作用减少。活体实验也证明了 PAQR3 的缺失导致肝脏中 LDLR/PCSK9 复合物的形成减少,LDLR 水平升高,导致血浆 LDL-C 和胆固醇水平下降。通过免疫共沉淀进一步发现 PAQR3 可在早期核内体中与 LDLR 的 β 螺旋结构域结合,又能与 PCSK9 的前结构域互作,并且 PAQR3 可通过这种中间体的互作来增强 LDLR/PCSK9 复合体的相互作用,从而调节 LDLR 的降解。

关于 PCSK9 降解 LDLR 的分子机制的另一猜想是蛋白质的翻译后修饰。PCSK9 蛋白转录后会经

历一系列修饰,包括糖基化^[60]、硫化^[32]和磷酸化修饰^[61]。Ben Djoudi Ouadda 等^[62]首次发现:Fam20C/Fam20A 复合体作为 PCSK9 的主要的分泌激酶,可在 PCSK9 蛋白的第 47、666、668 和 688 位丝氨酸位点对其进行磷酸化修饰,且这种磷酸化修饰在体内和体外都被证实不仅增强了 PCSK9 从高尔基体向细胞表面的转运及分泌,还使得 PCSK9 与 LDLR 结合亲和力均提升了约 2 倍,由此最大化诱导 PCSK9 降解 LDLR^[62]。此外有研究发现:向表达 LDLR 的细胞加入 PCSK9 共培养时 LDLR 出现了泛素化,同时发现当 LDLR 分子 C 端上的两个泛素化位点发生突变时,LDLR 不能被 PCSK9 诱导降解。因此推测,PCSK9 介导的 LDLR 的降解需要 LDLR 的泛素化^[55]。

2.3 PCSK9 蛋白的其他功能

PCSK9 在多种器官和细胞中的表达意味着它除了控制 LDL 代谢之外可能还发挥多种生物学功能。多项研究发现 PCSK9 在中枢神经系统发育、动脉粥样硬化发病、免疫应答和肿瘤发生等多种生物学功能中发挥作用^[63]。

PCSK9 最显著的功能是通过降解肝细胞表面的 LDLR 来调节血脂代谢^[64]。除此之外,有研究发现 PCSK9 可能通过上调凝集素型氧化低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 的表达介导巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白,从而直接促进动脉粥样硬化的形成^[65],这表明 PCSK9 也可能以非胆固醇依赖的方式直接发挥促动脉粥样硬化作用。

除了与 LDLR 结合外,PCSK9 还与其他受体相互作用并控制其降解,如载脂蛋白 E 受体(apolipoprotein receptor 2)^[66]、LDLR 相关蛋白 1 (lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1)^[67]、VLDLR (very low density lipoprotein receptors)^[68]、CD36^[69]、CD81^[70]和上皮细胞 Na⁺通道^[71]。

PCSK9 最早被发现参与皮层神经元的分化,因此被称为神经凋亡调节的转化酶 1 (NARC-1)^[60]。研究发现:斑马鱼(*Danio rerio*) *Narc-1/Pcsk9* 的特异性敲除导致小脑神经元的普遍紊乱和后脑中脑边界的丢失,受精后 96 h 胚胎死亡,说明 NARC-1/PCSK9 在中枢神经系统发育中起着至关重要的作用^[72]。

PCSK9 与机体感染也有一定关联,其在脓毒症中有调节炎症的作用^[73],PCSK9 过表达可加重早期脓毒症的多器官病理和促炎状态^[74]。抑制 PCSK9 的表达还能有效抑制神经元、胶质瘤细胞的凋亡^[75,76]。已有证据表明,PCSK9 可能通过调节 LDLR 的表达来调节亲脂性病原体相关分子模式的识别参与对某些病原体的免疫应答^[73]。

PCSK9 信号通路是分子生物学面临的重大挑战,除了脂质代谢外,PCSK9 其他的生理功能仍知之甚少,需要进一步地深入探索 and 发现。

3 PCSK9 与人类疾病

PCSK9 多种生物学功能决定了其可能与多种疾病的发生发展有关。截至目前研究较为清晰的是 PCSK9 在高胆固醇血症和脓毒症中的调节作用,其余多种相关的生理病理机制尚有待探索。

3.1 人群中 PCSK9 基因多态性和血脂异常

PCSK9 基因的某些突变可以改变蛋白质的氨基酸结构,从而改变其酶活、功能和对 LDLR 的亲合力。根据 PCSK9 基因突变对血浆胆固醇水平的影响,将其分为功能获得型突变(gain-of-function, GOF)和功能缺失型突变(loss-of-function, LOF)。功能获得型突变的 PCSK9 与高胆固醇血症密切相关,会引起动脉粥样硬化^[12];2003 年,在两个患常染色体高胆固醇血症的法国家庭中发现两种 PCSK9-GOF 突变——S127R 和 F216L。此后,引起高胆固醇血症的其他 PCSK9 GOF 突变如 D374Y、E32K、D374H、R469W 和 D129G 被陆续发现^[10,32,42,63,77]。功能缺失型突变的 PCSK9 能减少 LDLR 的内吞,使 LDLR 不容易被清除,从而降低血液胆固醇^[28,78]。在 2005 年, Cohen 等^[34]描述了两种 PCSK9 LOF 突变——Y142X 和 C679X,这两种突变携带者在非洲裔美国人群中出现频率更高,LDL-C 水平只有 (100 ± 45) mg/dL,与正常人的 (138 ± 42) mg/dL 相比减少了 28%,患冠心病的风险可下降 88%^[11,28]。此后又陆续在南非和新西兰人群中以及欧洲白种人分别发现了两种 PCSK9 LOF 突变——R237W 和 R46L^[37,61]。基于这些发现,笔者猜想:与胆固醇血症有关的 PCSK9 突变型与地

域及饮食习惯可能有一定规律性和关联性。

3.2 PCSK9 与其他疾病

有证据表明, PCSK9 可能由炎症刺激诱导, 本身可能是炎症介质^[79], 其在脓毒症的调节作用最为突出。脓毒症特点是炎症和凝血的系统激活, 严重脓毒症伴有至少一个器官功能障碍, 在美国每年有 0.3% 的人受感染, 死亡率为 30%^[80]。遗传数据表明, 在人类中 PCSK9 LOF (R46L) 多态性与脓毒症患者的生存率升高和降低细胞因子水平相关, 而 PCSK9 GOF (E670G) 多态性则具有相反的效果, 并且给健康志愿者静脉注射内毒素后 R46L 携带者中细胞因子水平明显更低^[81]。研究表明内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与脂蛋白结合, 通过 LDLR 以及包括 VLDLR 在内的受体内化于肝细胞清除^[82]。这说明 PCSK9 通过降低肝细胞上的 LDLR 水平, 从而在感染脓毒症时降低肝脏对 LPS 的 LDLR 依赖性摄取, 加剧局部或全身炎症^[73]。还有研究发现, PCSK9 可通过 MAPK 通路促进氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导血管内皮细胞凋亡, 由此减弱斑块氧化应激和炎症, 提示 PCSK9 可能通过非 LDLR 途径直接参与动脉粥样硬化的调控^[83]。

有研究发现 PCSK9 的 LOF 基因变异与乳腺癌发病率降低相关, 而 PCSK9 的 GOF 基因变异与乳腺癌风险增加相关, PCSK9 的表达可抑制肝癌、前列腺癌和黑色素瘤等肿瘤的发生发展^[84-86], 表明 PCSK9 可能对肿瘤生长有一定影响^[87]。除此之外, 前人提出 PCSK9 对血糖代谢和肾功能的调节作用的猜想, 但遗传学研究和观察性研究的结果与临床数据往往相悖, 并且分子机制未明, 所以相关猜想仍存在争议^[71,88-93]。PCSK9 在某些神经退行性疾病中发挥的作用尚未在人体得到最终验证^[63,94]。

总体而言, PCSK9 与这些疾病的观察和猜想尽管是初步的且分子机制未明, 但也提供了关于 PCSK9 抑制剂在调节血脂之外的安全性的重要信息。

4 PCSK9 抑制剂

PCSK9 抑制剂通过抑制 PCSK9 的表达或 PCSK9 降解 LDLR 的结合, 起到提升肝细胞膜上

LDLR 水平, 减少血液中 LDL-C 积累的作用。根据作用机制的不同, PCSK9 抑制剂可分为单克隆抗体、RNA 干扰(small interfering RNA, siRNA)和多肽抑制物等。

4.1 单克隆抗体

目前市场上已有两种 FDA 批准的药用的人类单克隆抗体: Alirocumab 和 Evolocumab^[95]。单克隆抗体通过中和 PCSK9 来抑制 PCSK9 与 LDLR 的相互作用, 导致 LDLR 数量增加, 最终增强 LDL 的吸收。在高胆固醇血症和非家族性胆固醇升高的血脂异常患者中, 当单独使用 Alirocumab 或 Evolocumab 或者将单克隆抗体与其他降脂药物联合使用时, 均可显著降低高达 60% 的 LDL^[96-98]。PCSK9 单抗可减轻不良反应, 降低心血管事件和肝功能异常的发生率, 逆转动脉粥样硬化斑块, 但静脉给药及抗体制备所导致的成本过高使得其难以推广使用。

4.2 RNA 干扰药物

目前很有前景的一类的 PCSK9 抑制药物是通过类脂纳米颗粒(lipidoid nanoparticle)包裹着 siRNA 来抑制 PCSK9 的表达^[99]。这种方法不仅可以降低循环的 PCSK9 水平, 还可以有效降低细胞内的 PCSK9 水平。2 期临床研究表明, siRNA 降脂药物 inclisiran 在第 1 天和第 90 天注射可使得健康志愿者的 LDL-C 水平降低 52.6%, 达到与 PCSK9 单抗相似的降脂效果^[100]。siRNA 作为药物的优点在于其选择性相对较高, 有利于降低脱靶率, 几乎无不良反应发生, 到目前为止 inclisiran 尚未发现副作用, 但也需要更多的数据来科学评估其是否可以应用于临床^[101,102]。

4.3 模拟肽

模拟 LDLR 的 EGF-A 结构域的短肽通过与 PCSK9 竞争性结合 LDLR 的 EGF-A 结构域, 从而抑制 LDLR 的降解, 增加 LDL 的吸收。第一个有效抑制 PCSK9-LDLR 结合的 EGF-A 类似小分子肽是 EGF66, 其与 PCSK9 结合并在 HepG2 细胞和小鼠中均可抑制 PCSK9 诱导的 LDLR 降解^[103]。此后又设计出了第一代含 16 个残基的线性肽 MESFPGWNLV (homoR) IGLLR, 它可以拮抗 PCSK9 活性, 目前正在改进结构并产生一种有效的口服活性小分子抑制

剂^[104]。如果能解决肽在血浆中不稳定、口服后难以被吸收等问题,模拟肽将是一种有前途的、经济有效的 PCSK9 单抗替代药物。

4.4 疫苗

基于 PCSK9 肽的疫苗消除内源性循环的 PCSK9 是一种新的抑制 PCSK9 的手段。疫苗的一期临床数据显示:在健康受试者中,诱导免疫是安全的且具有良好耐受性;超过 90%的免疫受试者产生 PCSK9 特异性抗体反应,在首次诱导后 70 周时 LDL-C 平均下降 13.3%,并在加强免疫后持续至少 30 周^[105]。虽然这种方法看起来更为简单易行,效果也更持久,但关键是仍然无法排除成人肝脏中由于没有 PCSK9 表达而产生任何严重的意外副作用的危险性,特别是在肝功能受损的情况下。

4.5 其他

除了以 PCSK9 或 LDLR 作为药物靶点外,人们也尝试通过阻断 PCSK9 的合成和分泌达到抑制 LDLR 降解的功效。Sortilin 可协助 PCSK9 转运至高尔基体而促使其从肝细胞分泌。在 Sortilin 敲低时 PCSK9 的表达降低,由此减弱 PCSK9 对 LDLR 的降解^[106]。此外,Sec24a、SRT3025 和 Q125H 等蛋白能抑制 PCSK9 分泌^[107]。硫酸肝素可介导 PCSK9 和 LDLR 之间的结合,且这种作用对于 LDLR 进入溶酶体降解是不可或缺的。小分子肝素类似物可干扰 PCSK9 与 LDLR 的关联,增加质膜中 LDLR 的数量^[57]。天然产物槲皮素-3-O-葡萄糖苷(quercetin-3-b-D-glucoside, Q3G)可减少 PCSK9 的分泌,同时增加 LDLR 的表达^[108]。这些观察结果为开发治疗高脂血症的新方法提供了新思路。

5 结语与展望

近 20 年的实验和临床研究表明 PCSK9 LOF 突变与 LDL-C 水平降低、心血管并发症发生率降低和全因死亡率降低相关^[109]。人们也确定了 PCSK9 通过介导 LDLR 降解来影响 LDL-C 的生理过程。PCSK9 主要通过胞外途径来影响 LDL 水平,血浆中循环的 PCSK9 通过自身催化结构域与肝细胞表面的 LDLR 的 EGF-A 域结合,形成 PCSK9/LDLR 复合体,

在 ARH 和网格蛋白介导下启动内吞。复合体内吞后进入核内体,酸性的环境使得 LDLR 的构象发生改变,无法与 PCSK9 解离,由此导致 LDLR 无法循环到细胞膜表面,而是进入溶酶体降解,进一步降低肝脏对 LDL-C 的清除,循环 LDL-C 随之上升^[7,8,42-44]。

迄今为止,PCSK9 介导 LDLR 降解的通路才刚刚建立“框架”,而其中的作用过程及作用机制仍然未知。比如,胞内途径的作用甚微,其在什么生理状况下才被触发?具体又有哪些分子调控?胞外途径中 PCSK9 是如何阻止 LDLR 循环到质膜上?PCSK9/LDLR 复合体又是如何被分选到溶酶体中?笔者通过对 PCSK9-LDLR 复合物的分子作用方式的研究,猜想 PCSK9/LDLR 复合物内吞进入细胞后到内化至 LDLR 的溶酶体内降解过程中,可能有一些新的未知基因的参与其中,形成目前未知的通路。另一方面,如若能找到一个可抑制 PCSK9/LDLR 复合物向 lysosome 的转运即可作为有效的 PCSK9 抑制剂。

除了脂质代谢外,PCSK9 的其他生物学功能仍知之甚少。并且,PCSK9 的基因多效性的生理作用可能会引发到目前为止进行的试验中尚未描述的各种副作用^[63]。PCSK9 在糖尿病、慢性肾病以及癌症等多种疾病中的作用和机制存在多种猜想和数据,具体机制也尚无定论。深入研究 PCSK9 的多效性生理功能和 PCSK9 决定 LDLR 命运的分子机制有望为抑制 PCSK9 的活性提供新的作用靶点,对于高脂血症和冠心病的预防和治疗及开发新的降脂药物具有十分重要的意义。

参考文献(References):

- [1] Xiao X, Tang JJ, Peng C, Wang Y, Fu L, Qiu ZP, Xiong Y, Yang LF, Cui HW, He XL, Yin L, Qi W, Wong CC, Zhao Y, Li BL, Qiu WW, Song BL. Cholesterol modification of smoothened is required for hedgehog signaling. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 154–162.e10. [DOI]
- [2] Chen LG, Chen XW, Huang X, Song BL, Wang Y, Wang YG. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(11): 1420–1458. [DOI]
- [3] Klein-Szanto AJP, Bassi DE. Keep recycling going: new approaches to reduce LDL-C. *Biochem Pharmacol*,

- 2019, 164: 336–341. [DOI]
- [4] Barkas F, Elisaf M, Milionis H. Statins decrease the risk of stroke in individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 2015, 243(1): 60–64. [DOI]
- [5] Tibolla G, Norata GD, Artali R, Meneghetti F, Catapano AL. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): from structure-function relation to therapeutic inhibition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011, 21(11): 835–843. [DOI]
- [6] Bays HE, Jones PH, Orringer CE, Brown WV, Jacobson TA. National lipid association annual summary of clinical lipidology 2016. *J Clin Lipidol*, 2016, 10(Suppl.1): S1–S43. [DOI]
- [7] Lambert G, Sjouke B, Choque B, Kastelein JJ, Hovingh GK. The PCSK9 decade. *J Lipid Res*, 2012, 53(12): 2515–2524. [DOI]
- [8] Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(5): 387–393. [DOI]
- [9] Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 2003, 34(2): 154–156. [DOI]
- [10] Timms K, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, Skolnick MH, Hopkins PN, Hunt SC, Shattuck DM. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*, 2004, 114(4): 349–353. [DOI]
- [11] Zhang Y, Ma KL. Research progress on the role of PCSK9 in the Regulation of Lipid Metabolism. *J Southeast Univ(Med Sci Ed)*, 2013, 32(4): 473–478. 张洋, 马坤岭. PCSK9 在脂代谢调节中作用的研究进展. 东南大学学报(医学版), 2013, 32(4): 473–478. [DOI]
- [12] Wang L, Xu YM, Cheng ZJ, Xiong ZP, Deng LB. The progress of genetics of cholesterol metabolism disorder. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(9): 857–863. 王立, 徐颜美, 程竹君, 熊招平, 邓立彬. 胆固醇代谢紊乱的遗传学研究进展. 遗传, 2014, 36(9): 857–863. [DOI]
- [13] Seidah NG. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin Ther Tar*, 2009, 13(1): 19–28. [DOI]
- [14] Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme a reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70(10): 2804–2808. [DOI]
- [15] Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *The J Biol Chem*, 1974, 249(3): 789–796. [DOI]
- [16] Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(4): 431–438. [DOI]
- [17] Dai YF, Sun LY, Zhang XB, Wang LY. Research progression of LDLR mutations in chinese familial hypercholesterolemia. *Hereditas(Beijing)*, 2011, 33(1): 1–8. 代艳芳, 孙立元, 张新波, 王绿娅. 中国人群家族性高胆固醇血症 LDLR 基因突变研究进展. 遗传, 2011, 33(1): 1–8. [DOI]
- [18] Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(6): 499–504. [DOI]
- [19] Soutar AK. Familial hypercholesterolaemia: Mutations in the gene for the low-density-lipoprotein receptor. *Mol Med Today*, 1995, 1(2): 90–97. [DOI]
- [20] Lin L, Shi AB. Endocytic recycling pathways and the regulatory mechanisms. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(6): 451–468. 林珑, 史岸冰. 细胞内吞循环运输通路及其分子调控机制. 遗传, 2019, 41(6): 451–468. [DOI]
- [21] Bartuzi P, Billadeau DD, Favier R, Rong S, Dekker D, Fedoseienko A, Fieten H, Wijers M, Levels JH, Huijckman N, Kloosterhuis N, van der Molen H, Brufau G, Groen AK, Elliott AM, Kuivenhoven JA, Plecko B, Grangl G, Mcgaughran J, Horton JD, Burstein E, Hofker MH, van de Sluis B. CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nat Commun*, 2016, 7(10961): 10961. [DOI]
- [22] Fedoseienko A, Wijers M, Wolters JC, Dekker D, Smit M, Huijckman N, Kloosterhuis N, Klug H, Schepers A, Willems VDK, Levels J, Billadeau DD, Hofker MH, van Deursen J, Westerterp M, Burstein E, Kuivenhoven JA, van de Sluis B. The COMMD family regulates plasma LDL levels and attenuates atherosclerosis through stabilizing the CCC complex in endosomal

- LDLR trafficking. *Circ Res*, 2018, 122(12): 1648–1660. [DOI]
- [23] Yang HX, Zhang M, Long SY, Tuo QH, Tian Y, Chen JX, Zhang CP, Liao DF. Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 81–86. [DOI]
- [24] Henderson R, O’Kane M, McGilligan V, Watterson S. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1): 39. [DOI]
- [25] Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4(4): 214–225. [DOI]
- [26] Reiss AB, Shah N, Muhieddine D, Zhen J, Yudkevich J, Kasselmann LJ, Deleon J. PCSK9 in cholesterol metabolism: from bench to bedside. *Clin Sci (London)*, 2018, 132(11): 1135–1153. [DOI]
- [27] Lambert G, Charlton F, Rye KA, Piper DE. Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis*, 2009, 203(1): 1–7. [DOI]
- [28] Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*, 2006, 354(12): 1264–1272. [DOI]
- [29] Bordicchia M, Spannella F, Ferretti G, Bacchetti T, Vignini A, Di Pentima C, Mazzanti L, Sarzani R. PCSK9 is expressed in human visceral adipose tissue and regulated by insulin and cardiac natriuretic peptides. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 245. [DOI]
- [30] Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, Spraggon G. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(37): 14604–14609. [DOI]
- [31] Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, Varghese AH, Ammirati MJ, Culp JS, Hoth LR, Mansour MN, McGrath KM, Seddon AP, Shenolikar S, Stutzman-Engwall KJ, Warren LC, Xia D, Qiu X. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(5): 413–419. [DOI]
- [32] Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, Hamelin J, Varret M, Allard D, Trillard M, Abifadel M, Tebon A, Attie A D, Rader D J, Boileau C, Brissette L, Chréien M, Prat A, Seidah NG. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48865–48875. [DOI]
- [33] Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, Purandare U, Lo CF, Huang Y, Chiang LW, Grenier JM, Ozenberger BA, Jacobsen JS, Kennedy JD, Distefano PS, Wood A, Bingham B. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 420(1): 55–67. [DOI]
- [34] Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*, 2005, 37(2): 161–165. [DOI]
- [35] Wang Y, Huang Y, Hobbs HH, Cohen JC. Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR. *J Lipid Res*, 2012, 53(9): 1932–1943. [DOI]
- [36] Park SW, Moon Y, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 50630–50638. [DOI]
- [37] Homer VM, Marais AD, Charlton F, Laurie AD, Hurndell N, Scott R, Mangili F, Sullivan DR, Barter PJ, Rye K, George PM, Lambert G. Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis*, 2008, 196(2): 659–666. [DOI]
- [38] Poirier S, Mayer G, Poupon V, Mcpherson PS, Desjardins R, Ly K, Asselin MC, Day R, Duclos FJ, Witmer M, Parker R, Prat A, Seidah NG. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem*, 2009, 284(42): 28856–28864. [DOI]
- [39] Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*, 2006, 116(11): 2995–3005. [DOI]
- [40] Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res*, 2008, 49(6): 1303–1311. [DOI]
- [41] Momtazi AA, Banach M, Pirro M, Stein EA, Sahebkar A. PCSK9 and diabetes: is there a link? *Drug Discov Today*, 2017, 22(6): 883–895. [DOI]
- [42] Bottomley MJ, Cirillo A, Orsatti L, Ruggeri L, Fisher

- TS, Santoro JC, Cummings RT, Cubbon RM, Lo Surdo P, Calzetta A, Noto A, Baysarowich J, Mattu M, Talamo F, De Francesco R, Sparrow CP, Sitlani A, Carfi A. Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J Biol Chem*, 2009, 284(2): 1313–1323. [DOI]
- [43] Lo Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, Settembre EC, Cirillo A, Pandit S, Ni YG, Hubbard B, Sitlani A, Carfi A. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep*, 2011, 12(12): 1300–1305. [DOI]
- [44] Fisher TS, Lo Surdo P, Pandit S, Mattu M, Santoro JC, Wisniewski D, Cummings RT, Calzetta A, Cubbon RM, Fischer PA, Tarachandani A, De Francesco R, Wright SD, Sparrow CP, Carfi A, Sitlani A. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20502–20512. [DOI]
- [45] Leren TP. Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 76–81. [DOI]
- [46] Schulz R, Schlüter KD, Laufs U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(2): 1–19. [DOI]
- [47] Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(2): 71–77. [DOI]
- [48] Ni YG, Condra JH, Orsatti L, Shen X, Di Marco S, Pandit S, Bottomley MJ, Ruggeri L, Cummings RT, Cubbon RM, Santoro JC, Ehrhardt A, Lewis D, Fisher TS, Ha S, Njmoluh L, Wood DD, Hammond HA, Wisniewski D, Volpari C, Noto A, Lo Surdo P, Hubbard B, Carfi A, Sitlani A. A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem*, 2010, 285(17): 12882–12891. [DOI]
- [49] Holla ØL, Cameron J, Berge KE, Ranheim T, Leren TP. Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. *BMC Cell Biol*, 2007, 8(1): 9. [DOI]
- [50] Poirier S, Mamarbachi M, Chen WT, Lee AS, Mayer G. GRP94 regulates circulating cholesterol levels through blockade of PCSK9-induced LDLR degradation. *Cell Rep*, 2015, 13(10): 2064–2071. [DOI]
- [51] Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, Zhou A, Hatten ME, Prat A, Seidah NG. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. *J Lipid Res*, 2011, 52(7): 1383–1391. [DOI]
- [52] Lambert G. Unravelling the functional significance of PCSK9. *Curr Opin Lipidol*, 2007, 18(3): 304–309. [DOI]
- [53] Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res*, 2009, 50 (Suppl): S172–A177. [DOI]
- [54] Piper DE, Jackson S, Liu Q, Romanow WG, Shetterly S, Thibault ST, Shan B, Walker NPC. The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-Cholesterol. *Structure*, 2007, 15(5): 545–552. [DOI]
- [55] Chen YQ, Wang H, Yu L, Yu XH, Qian YW, Cao GQ, Wang J. Role of ubiquitination in PCSK9-mediated low-density lipoprotein receptor degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(3): 515–518. [DOI]
- [56] Foley EM, Esko JD. Hepatic heparan sulfate proteoglycans and endocytic clearance of triglyceride-rich lipoproteins. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010, 93: 213–233. [DOI]
- [57] Gustafsen C, Olsen D, Vilstrup J, Lund S, Reinhardt A, Wellner N, Larsen T, Andersen CBF, Weyer K, Li JP, Seeberger PH, Thirup S, Madsen P, Glerup S. Heparan sulfate proteoglycans present PCSK9 to the LDL receptor. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 503. [DOI]
- [58] Huang MQ, Zhao ZL, Cao QQ, You X, Wei SY, Zhao JY, Bai MJ, Chen Y. PAQR3 modulates blood cholesterol level by facilitating interaction between LDLR and PCSK9. *Metabolism*, 2019, 94: 88–95. [DOI]
- [59] Guo WW, You X, Wang X, Wang L, Chen Y. A synthetic peptide hijacks the catalytic subunit of class I PI3K to suppress the growth of cancer cells. *Cancer Lett*, 2017, 405: 1–9. [DOI]
- [60] Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chrétien M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(3): 928–33. [DOI]
- [61] Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, Seidah NG, Mbikay M, Chrétien M, Mayne J. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase *ex vivo* and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J*, 2008, 275(13): 3480–3493. [DOI]

- [62] Ben Djoudi Ouadda A, Gauthier MS, Susan-Resiga D, Girard E, Essalmani R, Black M, Marcinkiewicz J, Forget D, Hamelin J, Evagelidis A, Ly K, Day R, Galarneau L, Corbin F, Coulombe B, Çaku A, Tagliabracci VS, Seidah NG. Ser-Phosphorylation of PCSK9 (Proprotein convertase Subtilisin-Kexin 9) by Fam20C (Family with sequence similarity 20, member c) kinase enhances its ability to degrade the LDLR (Low-Density lipoprotein receptor). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(10): 1996–2013. [DOI]
- [63] Cesaro A, Bianconi V, Gragnano F, Moscarella E, Fimiani F, Monda E, Scudiero O, Limongelli G, Pirro M, Calabrò P. Beyond cholesterol metabolism: the pleiotropic effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Genetics, mutations, expression, and perspective for longterm inhibition. *Biofactors*, 2020 Jan 30. doi: 10.1002/biof.1619. [DOI]
- [64] Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-Mediated expression of pcsk9 in mice results in a Low-Density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(18): 7100–7105. [DOI]
- [65] Ding ZF, Liu SJ, Wang XW, Deng XY, Fan YB, Shahanawaz J, Shmookler RR, Varughese KI, Sawamura T, Mehta JL. Cross-talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(4): 556–567. [DOI]
- [66] Kysenius K, Muggalla P, Mätlik K, Arumäe U, Huttunen HJ. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(11): 1903–1916. [DOI]
- [67] Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A, Seidah NG. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PLoS One*, 2013, 8(5): e64145. [DOI]
- [68] Shan LX, Pang L, Zhang RM, Murgolo NJ, Lan H, Hedrick JA. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Bioph Res Co*, 2008, 375(1): 69–73. [DOI]
- [69] Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Ngo Sock E, Ong H, Mayer G. PCSK9 induces CD36 degradation and affects long-chain fatty acid uptake and triglyceride metabolism in adipocytes and in mouse liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(12): 2517–25. [DOI]
- [70] Labonté P, Begley S, Guévin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, Prat A, Seidah NG. PCSK9 impedes hepatitis c virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology*, 2009, 50(1): 17–24. [DOI]
- [71] Sharotri V, Collier DM, Olson DR, Zhou R, Snyder PM. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *J Biol Chem*, 2012, 287(23): 19266–19274. [DOI]
- [72] Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, Paquin J, Chitramuthu BP, Baranowski D, Cadieux B, Bennett HP, Seidah NG. Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J Neurochem*, 2006, 98(3): 838–850. [DOI]
- [73] Paciullo F, Fallarino F, Bianconi V, Mannarino MR, Sahebkar A, Pirro M. PCSK9 at the crossroad of cholesterol metabolism and immune function during infections. *J Cell Physiol*, 2017, 232(9): 2330–2338. [DOI]
- [74] Dwivedi DJ, Grin PM, Khan M, Prat A, Zhou J, Fox-Robichaud AE, Seidah NG, Liaw PC. Differential expression of PCSK9 modulates infection, inflammation, and coagulation in a murine model of sepsis. *Shock*, 2016, 46(6): 672–680. [DOI]
- [75] Piao MX, Bai JW, Zhang PF, Zhang YZ. PCSK9 regulates apoptosis in human neuroglioma u251 cells via mitochondrial signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2787–2794. [DOI]
- [76] Wu Q, Tang ZH, Peng J, Liao L, Pan LH, Wu CY, Jiang ZS, Wang GX, Liu LS. The dual behavior of PCSK9 in the regulation of apoptosis is crucial in Alzheimer's disease progression (Review). *Biomed Rep*, 2014, 2(2): 167–171. [DOI]
- [77] Dron JS, Hegele RA. Complexity of mechanisms among human proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 variants. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(2): 161–169. [DOI]
- [78] Cameron J, Holla ØL, Ranheim T, Kulseth MA, Berge KE, Leren TP. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(9): 1551–1558. [DOI]
- [79] Momtazi-Borojeni AA, Sabouri-Rad S, Gotto AM, Pirro M, Banach M, Awan Z, Barreto GE, Sahebkar A. PCSK9 and inflammation: a review of experimental and clinical evidence. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2019, 5(4): 237–245. [DOI]
- [80] Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the united states. *Crit Care Med*, 2013, 41(5): 1167–1174. [DOI]
- [81] Walley KR, Thain KR, Russell JA, Reilly MP, Meyer NJ, Ferguson JF, Christie JD, Nakada TA, Fjell CD,

- Thair SA, Cirstea MS, Boyd JH. PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. *Sci Transl Med*, 2014, 6(258): 258ra143. [DOI]
- [82] Topchiy E, Cirstea M, Kong HJ, Boyd JH, Wang Y, Russell JA, Walley KR. Lipopolysaccharide is cleared from the circulation by hepatocytes *via* the low density lipoprotein receptor. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155030. [DOI]
- [83] Li J, Liang X, Wang YY, Xu Z, Li GP. Investigation of highly expressed PCSK9 in atherosclerotic plaques and ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1817–1825. [DOI]
- [84] Gan SS, Ye JQ, Lei W, Qu FJ, Chu CM, Tian YJ, Yang W, Cui XG. Inhibition of PCSK9 protects against radiation-induced damage of prostate cancer cells. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 2139–2146. [DOI]
- [85] Athavale D, Chouhan S, Pandey V, Mayengbam SS, Singh S, Bhat MK. Hepatocellular carcinoma-associated hypercholesterolemia: involvement of proprotein-convertase-subtilisin-kexin type-9 (PCSK9). *Cancer Metab*, 2018, 6(1): 16. [DOI]
- [86] Sun X, Essalmani R, Day R, Khatib AM, Seidah NG, Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia*, 2012, 14(12): 1122–1231. [DOI]
- [87] Nowak C, Årnlöv J. A Mendelian randomization study of the effects of blood lipids on breast cancer risk. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3957. [DOI]
- [88] Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(7): 2537–2543. [DOI]
- [89] Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, Luan JA, Ardanaz E, Arriola L, Balkau B, Boeing H, Deloukas P, Forouhi NG, Franks PW, Gioni S, Kaaks R, Key TJ, Navarro C, Nilsson PM, Overvad K, Palli D, Panico S, Quirós J, Riboli E, Rolandsson O, Sacerdote C, Salamanca EC, Slimani N, Spijkerman AMW, Tjønneland A, Tumino R, van der A DL, van der Schouw YT, McCarthy MI, Barroso I, O'Rahilly S, Savage DB, Sattar N, Langenberg C, Scott RA, Wareham NJ. Association between low-density lipoprotein cholesterol-lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes: A Meta-analysis. *JAMA*, 2016, 316(13): 1383–1391. [DOI]
- [90] Bonnefond A, Yengo L, Le May C, Fumeron F, Marre M, Balkau B, Charpentier G, Franc S, Froguel P, Cariou B, DESIR study group. The loss-of-function PCSK9 p.R46L genetic variant does not alter glucose homeostasis. *Diabetologia*, 2015, 58(9): 2051–2055. [DOI]
- [91] Nekaies Y, Baudin B, Kelbousi S, Sakly M, Attia N. Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 is associated with Lp(a) in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(8): 1165–1170. [DOI]
- [92] Konarzewski M, Szolkiewicz M, Sucajtyś-Szulc E, Blaszak J, Lizakowski S, Swierczynski J, Rutkowski B. Elevated circulating PCSK9 concentration in renal failure patients is corrected by renal replacement therapy. *Am J Nephrol*, 2014, 40(2): 157–163. [DOI]
- [93] Morena M, Le May C, Chenine L, Arnaud L, Dupuy AM, Pichelin M, Leray-Moragues H, Chalabi L, Canaud B, Cristol JP, Cariou B. Plasma PCSK9 concentrations during the course of nondiabetic chronic kidney disease: relationship with glomerular filtration rate and lipid metabolism. *J Clin Lipidol*, 2017, 11(1): 87–93. [DOI]
- [94] Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C, Prat A. The proprotein convertases in hypercholesterolemia and cardiovascular diseases: emphasis on proprotein convertase subtilisin/kexin 9. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(1): 33–52. [DOI]
- [95] Tomlinson, Hu M, Zhang Y, Chan P, Liu ZM. Alirocumab for the treatment of hypercholesterolemia. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, (17): 115–128. [DOI]
- [96] Cicero AF, Colletti A, Borghi C. Profile of evolocumab and its potential in the treatment of hyperlipidemia. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3073–3082. [DOI]
- [97] Valerio MG, Velayati A, Jain D, Aronow WS. Promising new therapies for the treatment of hypercholesterolemia. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(5): 609–618. [DOI]
- [98] Wiciński M, Żak J, Malinowski B, Popek G, Grześk G. PCSK9 signaling pathways and their potential importance in clinical practice. *EPMA J*, 2017, 8(4): 391–402. [DOI]
- [99] Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, Butler D, Charisse K, Dorkin R, Fan YP, Gamba-Vitalo C, Hadwiger P, Jayaraman M, John M, Jayaprakash KN, Maier M, Nechev L, Rajeev KG, Read T, Röhl I, Soutschek J, Tan P, Wong J, Wang G, Zimmermann T, de Fougerolles A, Vornlocher HP, Langer R, Anderson DG, Manoharan M, Kotliansky V, Horton JD, Fitzgerald K. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33):

- 11915–11920. [DOI]
- [100] Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, Dufour R, Karakas M, Hall T, Troquay RPT, Turner T, Visseren FLJ, Wijngaard P, Wright RS, Kastelein JJ. Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol. *N Engl J Med*, 2017, 376(15): 1430–1440. [DOI]
- [101] Lindholm MW, Elmén J, Fisker N, Hansen HF, Persson R, Møller MR, Rosenbohm C, Ørum H, Straarup EM, Koch T. PCSK9 LNA antisense oligonucleotides induce sustained reduction of LDL cholesterol in nonhuman primates. *Mol Ther*, 2012, 20(2): 376–381. [DOI]
- [102] Schulz R, Schlüter KD. PCSK9 targets important for lipid metabolism. *Clin Res Cardiol Suppl*, 2017, 12(S1): 2–11. [DOI]
- [103] Zhang YN, Eigenbrot C, Zhou LJ, Shia S, Li W, Quan C, Tom J, Moran P, Di Lello P, Skelton NJ, Kong-Beltran M, Peterson A, Kirchhofer D. Identification of a small peptide that inhibits PCSK9 protein binding to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 2014, 289(2): 942–955. [DOI]
- [104] Seidah NG. Insights into a PCSK9 structural groove: a harbinger of new drugs to reduce LDL-cholesterol. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(10): 785–786. [DOI]
- [105] Seidah NG, Prat A, Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. Novel strategies to target proprotein convertase subtilisin kexin 9: Beyond monoclonal antibodies. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(3): 510–518. [DOI]
- [106] Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, Mattheisen M, Lundhede J, Buttenschøn H, Mors O, Bentzon JF, Madsen P, Nykjaer A, Glerup S. The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab*, 2014, 19(2): 310–318. [DOI]
- [107] Xia Huasong, Wu Yanqing. Research progress of PCSK9 inhibitors. *J Clin Cardiol*, 2018, 2 (34): 108–112.
夏华松, 吴延庆. PCSK9 抑制剂研究进展. 临床心血管病杂志, 2018, 34(2): 108–112. [DOI]
- [108] Mbikay M, Sirois F, Simoes S, Mayne J, Chrétien M. Quercetin-3-glucoside increases low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression, attenuates proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) secretion, and stimulates LDL uptake by Huh7 human hepatocytes in culture. *FEBS Open Bio*, 2014, 4(1): 755–762. [DOI]
- [109] Giugliano RP, Pedersen TR, Park J, De Ferrari GM, Gaciong ZA, Ceska R, Toth K, Gouni-Berthold I, Lopez-Miranda J, Schiele F, Mach F, Ott BR, Kanevsky E, Pineda AL, Somaratne R, Wasserman SM, Keech AC, Sever PS, Sabatine MS. Clinical efficacy and safety of achieving very low LDL-cholesterol concentrations with the PCSK9 inhibitor evolocumab: a prespecified secondary analysis of the FOURIER trial. *Lancet*, 2017, 390(10106): 1962–1971. [DOI]

(责任编辑: 史岸冰)