

# 家族性高胆固醇血症新致病基因——枯草溶菌素转化酶 9 的研究进展

刘 舒 综述, 蔺 洁, 王绿娅 审校

(首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所, 北京市 100029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 枯草溶菌素转化酶 9; 综述; 家族性高胆固醇血症; 低密度脂蛋白胆固醇

[摘要] 家族性高胆固醇血症是一种常染色体显性遗传疾病, 患者低密度脂蛋白胆固醇大幅度升高, 严重者青少年时期可早发冠心病。研究发现该疾病的致病基因存在异质性, 其中人类枯草溶菌素转化酶 9 基因突变可导致严重的家族性高胆固醇血症。该基因属于蛋白转化酶家族, 其蛋白结构、功能及致病机制尚不清楚, 文章追踪最新研究进展, 对该基因导致家族性高胆固醇血症的机制进行综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)由于低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)基因突变, 导致血浆胆固醇大幅度增高、多部位肌腱黄色瘤和早发动脉粥样硬化(atherosclerosis, As), 严重者青少年时期可发生冠心病<sup>[1, 2]</sup>。新近发现人类枯草溶菌素转化酶 9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)基因错义突变也可导致严重的 FH。虽然 PCSK9 基因的功能尚未完全明确, 但其对低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)代谢的调节作用日益受到重视。本文对这一基因结构、功能及其与 FH 的关系的研究进展加以综述。

## 1 枯草溶菌素转化酶 9 的结构

哺乳动物体内已经发现 8 种蛋白转化酶, 可水解多种前体蛋白令其具有活性<sup>[3, 4]</sup>, 其中 7 种属于酵母枯草杆菌蛋白酶亚家族, 而第 8 种枯草菌素蛋白酶异构酶/一位酶(subtilisin/kexin isozyme/site-1 protease, SKI-1/SIP)属于另一亚家族<sup>[5]</sup>。最近, Seidah 等<sup>[6]</sup>以 SKI-1/SIP 保守序列发现另一蛋白转化酶 PCSK9。PCSK9 也被称作神经凋亡调节转化酶 1(neural apoptosis regulated convertase 1, NARG-1), 是原代培养的小脑神经元细胞血清饥饿诱导凋亡时表达的基因之一。PCSK9 分布于肝脏、小肠、小脑、肾脏, 在肝脏中表达量最高, 在肾脏上皮、端脑等组织为一过性表达; 该基因对胚胎时神经元分化及肝脏再生起重要的作用<sup>[6]</sup>。

枯草溶菌素转化酶 9(PCSK9)由 692 个氨基酸构成: 第 1~30 位氨基酸区域为信号肽; 第 31~82 位氨基酸是酶原所

含的前体肽; 第 76~152 位氨基酸是枯草杆菌蛋白酶家族特征性的 N 端结构; 第 149~155 位氨基酸(SSVFAQ<sub>152</sub>↓SIP)是其自身催化裂解酶原的前体肽, 152 位是断裂的位置; 第 153~473 位氨基酸为催化结构域, 含有丝氨酸蛋白酶共有的催化三联体(第 186D, 第 226H, 第 386S); 催化结构域之后存在可能与整合素结合的 RGE 模体; 第 533N 是糖基化位点; 第 38Y 和 142Y 是转录后的硫化位点, 此外推测还存在多个蛋白激酶 C、酪蛋白激酶 2、环磷酸腺苷磷酸化位点<sup>[6, 7]</sup>。PCSK9 与细菌蛋白转化酶类似, 但与其他成员不同, 并不含蛋白转化酶家族调节钙依赖且调节 pH 值的 P 结构域(P domain), 而含有对催化活性起重要作用的碳端的 C 结构域(Cys/His rich domain)<sup>[6, 8, 9]</sup>。

枯草溶菌素转化酶 9(PCSK9)作为酶原表达、合成并迅速进入内质网, 进而对蛋白分子进行自身催化。PCSK9 的特异性酶切位点为 SSVFAQ<sub>152</sub>↓SIP。研究发现 PCSK9 对底物突变体疏水性的 P4 位氨基酸(根据系统命名法, 酶切点氨基酸端最后一位称为 P1, 其氨基端上一个氨基酸为 P2; 酶切点后为 P1', 羧基端第二位为 P2')对酶切活性极为重要<sup>[4]</sup>。PCSK9 自身催化切除前体片段后, 该段肽链可能起抑制作用, 但 PCSK9 如何形成具有最大活性的成熟二级结构尚有待研究<sup>[5, 6, 10, 11]</sup>。

## 2 枯草溶菌素转化酶 9 与家族性高胆固醇血症

### 2.1 枯草溶菌素转化酶 9 导致家族性高胆固醇血症的证据

Haddad 等<sup>[12]</sup>人在连锁分析了 47 个具有显性遗传特征的 FH 样表型家系后发现, 一个犹他州的大家系的家族性高胆固醇血症并未与载脂蛋白 B 和 LDLR 基因连锁, 同时 Saint 等<sup>[13]</sup>人在法国也发现了同样的家系, 他们推测存在其他 FH 致病基因。通过基因组扫描后将该致病基因定位于 1p32-1p34 大约 7.5 Mb 的范围内, 该基因座多点的连锁似然率可达到 9.6, 最终该基因被确定为 PCSK9<sup>[14]</sup>。已在多个国家和地区被证实 PCSK9 基因突变可导致 FH。流行病学研究发

[收稿日期] 2005-10-13

[修回日期] 2006-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金(30470722)、北京市自然科学基金(7062010, 7052021)、北京市科技新星(04B27, 05A29)项目联合资助

[作者简介] 刘舒, 博士, 助理研究员, 研究方向为心血管病理生理, 联系电话为 010-64456436。蔺洁, 硕士, 副研究员, 研究方向为脂代谢异常与动脉粥样硬化。通讯作者王绿娅, 研究员, 研究方向为脂代谢异常与动脉粥样硬化, 联系电话为 010-64456436, E-mail 为 wangluya@sina.com。

现,日本人群中 PCSK9 的第 1 内含子 G-161T 与第 9 外显子 I474 V 多态性与血浆总胆固醇存在显著相关性<sup>[15]</sup>;美国犹他州的一个 FH 大家系 PCSK9 单核苷酸 G $\rightarrow$ T 突变可导致第 374 位 D374Y 的置换,而携带此单体型者均是 FH 患者<sup>[16]</sup>;挪威研究也发现 PCSK9 的 D374Y 和 N157K 突变与 FH 密切相关<sup>[17]</sup>;法国研究证明 PCSK9 的 S127R 和 F216L 突变可引起 FH<sup>[14]</sup>。

## 2.2 枯草溶菌素转化酶 9 对低密度脂蛋白受体的作用

最近,体外细胞实验与动物实验均发现,PCSK9 具有促进 LDLR 降解的功能。腺病毒介导的人 PCSK9 基因在野生型 C57BL/6 小鼠体内过表达时,与仅倒入空腺病毒载体的小鼠相比,血浆总胆固醇提高 2 倍,非 HDLC 提高 5 倍,其表型接近于 LDLR 基因敲除(LDLR<sup>-/-</sup>)小鼠;而给胆固醇水平原本较高的 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠注射相同剂量的人 PCSK9 基因重组腺病毒后,与注射空腺病毒对照组相比,血脂水平未见进一步增高,提示 PCSK9 基因过表达可增高血浆低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平,但此过程依赖于 LDLR 的存在<sup>[18]</sup>;但 PCSK9 对于 LDLR 的 mRNA 水平并未见显著影响。有报道转染含有 PCSK9 催化三联体中心位置 S386A 突变体的载体后均未见 LDLR 的蛋白水平显著降低,用 brefeldin A 处理后的细胞 LDLR 蛋白水平得到恢复,提示 LDLR 通过有“酶活性”的 PCSK9 于溶酶体中被降解,阻断了受体的再循环进而导致胆固醇水平的增高,且这种作用特异性很高,不会影响其他蛋白的再循环<sup>[8,19]</sup>。但是,PCSK9 并不直接作用于 LDLR。计算机二级结构预测并未发现 LDLR 存在 PCSK9 明显的酶切序列<sup>[6,20]</sup>;脉冲追踪 LDLR 发现:当 HepG2 转染野生型 PCSK9 后 20 min 至 6 h,内质网与高尔基体的 LDLR 水平未见显著降低,而培养过夜的细胞 LDLR 水平显著降低,提示 PCSK9 可能通过降解其他某个蛋白而起作用<sup>[8]</sup>。不同来源细胞(肝癌细胞、成纤维细胞等)转染 PCSK9 后,LDLR 表达并不都降低,提示 PCSK9 的底物蛋白具有组织特异性<sup>[19]</sup>。

## 2.3 枯草溶菌素转化酶 9 对低密度脂蛋白受体相关蛋白的影响

固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory elements binding proteins, SREBP)是碱性 H-L-H 二聚体转录因子家族成员,可调控含有固醇调节元件(sterol regulatory elements, SRE)序列的许多胆固醇代谢相关基因,包括 LDLR<sup>[21]</sup>。在形成成熟转录因子之前,它们构成发卡样结构镶嵌于内质网上,氮端和碳端朝向胞质侧,环形部分朝向内质网腔。SKF-1/S1P 可以酶切 SREBP 内质网腔的部分,再由其他酶(S2P)切下跨膜区,氮端肽链形成成熟的转录因子<sup>[22]</sup>。在蛋白转化酶家族中 SKF-1/S1P 与 PCSK9 最为相似,人们推测可能 PCSK9 有 SKF-1/S1P 的作用。但实验结果发现,用 RNAi 抑制 SKF-1/S1P 的转录后,野生型和突变体 PCSK9 均无法恢复成熟 SREBP 的产生,提示 PCSK9 与 SKF-1/S1P 对 SREBP 的作用完全不同<sup>[19]</sup>。

为了探讨 PCSK9 是否对 LDLR 内化的衔接子蛋白 ARH 有作用,用 ARH 敲除的小鼠作了一系列实验,结果发现 PCSK9 对基因敲除鼠和野生型小鼠的 LDLR 作用没有差别,提

示 PCSK9 不依赖于 ARH 蛋白,其作用过程在 LDLR 从内质网向细胞表面移动的过程中或作用发生在 LDLR 内化过程之前<sup>[19]</sup>。

载脂蛋白 B100 是 LDLR 的配体,对于脂蛋白组装与分泌具有重要作用。有研究表明,与正常对照相比,PCSK9 导致的 FH 患者极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)到中密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein, IDL)及 VLDL/IDL 到 LDL 的转换率均显著低于正常人,并推测 PCSK9 通过促进载脂蛋白 B100 大量生成,而继发高胆固醇血症<sup>[23]</sup>。Sun 等<sup>[24]</sup>也证实 PCSK9 某些致病突变中(D374Y),可导致载脂蛋白 B100 大量生成。但是体外研究发现,PCSK9 腺病毒感染的 LDLR 基因敲除小鼠血浆 VLDL 和 LDL 水平并未见进一步升高,提示 PCSK9 并没有大量促进载脂蛋白 B 的产生<sup>[19]</sup>,且有研究证明 LDLR 基因突变的 FH 患者可显著增加 LDLR 的产生<sup>[25]</sup>,其底物蛋白尚待明确。

## 3 枯草溶菌素转化酶 9 基因表达的调控与突变体的活性

### 3.1 枯草溶菌素转化酶 9 基因表达的调控

枯草溶菌素转化酶 9 基因定位于 1p34.1-p32,全长 29 kb,由 12 个外显子构成,编码区约为 2 kb。PCSK9 可被他汀类药物(羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂)诱导上调,这种作用可被甲羟戊酸抑制,LDLR、SREBP2 也呈现同样的变化趋势。在分析了人、小鼠、大鼠 PCSK9 启动子上游区域后发现他们都存在 SRE 调控元件(ATCACGCCAC)和 Sp1 调控元件(GGGGAGGGC),而这些元件也同样存在于 LDLR 的调控区<sup>[26]</sup>。PCSK9 很可能相同于 LDLR,也是 SREBP2 的一个靶基因。与胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶基因(cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase, CYP7A)等胆固醇代谢相关基因不同,PCSK9 不直接被肝 X 受体(liver X receptor, LXR)的激动剂调控,但可以通过含有 LXR 调控元件的转录因子 SREBP1-c 上调表达<sup>[27]</sup>。当给予他汀类药物时,LDLR 的蛋白水平可能由于 PCSK9 的表达增高而降低;同样,给予 LXR 激动剂诱导 SREBP1-c 表达时,也可能增加转录水平而成熟 LDLR 蛋白水平会降低<sup>[28]</sup>。这些转录与转录后调控的机制提示应重新评价 LDLR 在脂代谢环节中的地位<sup>[29]</sup>。

### 3.2 枯草溶菌素转化酶 9 突变体的活性

在枯草溶菌素转化酶 9(PCSK9)的底物蛋白尚不能确定时,人们对于突变体活性的研究主要关注于其酶原自身催化的影响。根据突变体的活性可以分为三类:一类降低酶原加工,如 S127R 可以降低 50%~60% 酶原的加工;第二类完全抑制酶原的加工过程,如 D374Y 的突变体无法进行酶原的加工;第三类不影响酶原的加工,如[D374Y+N157K]双突变和 F216L/R218S 等突变,第三类与前两类突变一样都影响 PCSK9 的分泌<sup>[6,8,18]</sup>。

枯草溶菌素转化酶 9(PCSK9)某些突变体具有降低 LDLC 水平的作用,如 E670G 单体型与血浆 LDLC 水平呈剂量相关(GG>EG>EE),是 LDLC 的独立决定因素<sup>[30]</sup>;一些可导致提前终止的无义突变体(Y142X 和 C679X)使 PCSK9 失去功

能,最终降低 LDLC 水平<sup>[31]</sup>。这些均为罕见的有益突变。

## 4 展望

虽然 PCSK9 基因对 LDLR 的特异性作用已经明确,但突变是引起了功能丢失还是获得了新的功能,以及是否通过顺式酶原的加工反式调节其他蛋白活性,尚未明确<sup>[20]</sup>。首先 PCSK9 与经典固醇调节元件调控不同,很可能是 LDLR 负反馈调节的一个重要蛋白,在转录后调控是可防止细胞过多摄入胆固醇的一种保护机制。其次,PCSK9 突变体具有与野生型相似的作用,不同突变可能导致 FH 的机制不同:某些突变可导致 PCSK9 具有了非生理性的作用;而某些突变却影响酶原加工从而而影响前体肽链对成熟蛋白的抑制作用;另一些突变影响 PCSK9 与相应结构蛋白结合,使其错误地出现于溶酶体。尽管 PCSK9 及其突变体的功能似乎难以捉摸<sup>[28]</sup>,但是学者们仍然不断尝试;阐明 PCSK9 的功能不仅有助于了解 LDL 的代谢通路,而且对于理解高胆固醇血症的其他发病机制具有重要意义<sup>[32]</sup>。

## [参考文献]

- [1] 王绿娅, 蒯洁, 刘舒. 家族性高胆固醇血症遗传异质性的分子基础 [J]. 遗传学报, 2005, **32** (7): 770-777
- [2] 王绿娅. 家族性高胆固醇血症 [M]. 见: 杨永宗主编. 动脉粥样硬化性心血管病的基础与临床. 北京: 科学出版社, 2004; 436-458
- [3] Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner DF. Proteolytic processing in the secretory pathway [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (30): 20 745-748
- [4] Seidah NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides [J]. *Brain Res*, 1999, **848** (1-2): 45-62
- [5] Elagöz A, Benjannet S, Mammarbassi A, Wickham L, Seidah NG. Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (13): 11 265-275
- [6] Seidah NG, Benjannet S, Wickham L. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100** (3): 928-933
- [7] Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs [J]. *Nat Genet*, 2004, **36** (1): 40-45
- [8] Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the LDLR and LDL cholesterol [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (47): 48 865-875
- [9] Zhou A, Martin S, Lipkind G, LaMendola J, Steiner DF. Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (18): 11 107-114
- [10] Thoma G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease [J]. *Nat Rev*, 2002, **3** (10): 753-766
- [11] Toure BB, Munzer JS, Basak A, Benjannet S, Rochemont J, Lazure C, et al. Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (4): 2 349-358
- [12] Haddad L, Day IN, Hunt S, Williams RR, Humphries SE, Hopkins PN. Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia: a nonLDLR, nonAPOB kindred [J]. *J Lipid Res*, 1999, **40** (6): 1 113-122
- [13] Saint JB, Varret M, Dacht C, Rabes JP, Devillers M, Erlich D, et al. Autosomal dominant type IIa hypercholesterolemia: evaluation of the respective contributions of LDLR and APOB gene defects as well as a third major group of defects [J]. *Eur J Hum Genet*, 2000, **8** (8): 621-630
- [14] Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia [J]. *Nat Genet*, 2003, **34** (2): 154-156
- [15] Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, Inamoto N, Takagi S, Goto Y, et al. Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese [J]. *J Hum Genet*, 2004, **49** (2): 109-114
- [16] Timms KM, Wagner S, Samuels ME. A mutation in PCSK9 causing autosomal dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree [J]. *Hum Genet*, 2004, **114** (4): 349-353
- [17] Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia [J]. *Clin Genet*, 2004, **65** (5): 419-422
- [18] Kara N, Maxwell, Jan L. Breslow adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101** (18): 7 100-105
- [19] Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of LDL receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a (PCSK9) in mouse liver [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (48): 50 630-638
- [20] Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, Purandare U, Lo CF, Huang Y, et al. Functional characterization of NARC 1, a novel proteinase related to proteinase K [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **420** (1): 55-67
- [21] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor [J]. *Cell*, 1997, **89** (3): 331-340
- [22] Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, et al. Molecular identification of the sterol regulated luminal protease that protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells [J]. *Mol Cell*, 1998, **2** (4): 505-514
- [23] Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1 448-453
- [24] Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, **14** (9): 1 161-169
- [25] Millar JS, Maugeais C, Ikewaki K, Kolansky DM, Barrett PH, Budreck EC, et al. Complete deficiency of the low-density lipoprotein receptor is associated with increased apolipoprotein B-100 production [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (3): 560-565
- [26] Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1 454-459
- [27] Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100** (21): 12 027-032
- [28] Attie AD. The mystery of PCSK9 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1 337-339
- [29] Attie AD, Seidah NG. Dual regulation of the LDL receptor—some clarity and new questions [J]. *Cell Metab*, 2005, **1** (5): 290-292
- [30] Chen SN, Ballantyne CM, Gotto AM Jr, Tan Y, Willerson JT, Marian AJ. A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **45** (10): 1 611-619
- [31] 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 [J]. *Nat Genet*, 2005, **37** (2): 161-165
- [32] 孙屏, 郭冬平, 李晓宇, 陈琪, 范乐明. 一家族性高胆固醇血症家系低密度脂蛋白受体基因突变分析 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (5): 577-580

(此文编辑 胡必利, 许雪梅)