

[文章编号] 1007-3949(2010)18-10-0787-05

• 实验研究 •

## 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 参与 Caspase-3 活化的生物信息学分析

唐志晗, 王佐, 姜志胜, 刘录山

(南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9, 半胱天冬氨酸蛋白酶 3, 半胱天冬氨酸蛋白酶 9, 细胞凋亡; 生物信息学

[摘要] 目的 研究前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 促凋亡的作用是否与活化凋亡通路 Caspase-3 相关。方法 用 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育人脐静脉内皮细胞 24 h, 同时设空白对照组、转染试剂组、阴性对照组和 80 nmol/L 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 sRNA + 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组, 流式细胞术测定细胞凋亡率, 免疫印迹法和酶联免疫吸附法分别检测 Caspase-3 的表达及活性。然后通过生物信息学方法对前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 与 Caspase-8 和 Caspase-9 进行比较, 找出它们之间的序列相似程度, 以及是否存在共同的功能结构域。结果 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 sRNA 能抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 Caspase-3 蛋白表达和活性增加。生物信息学分析表明, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9、Caspase-8、Caspase-9 三者的序列同源性高达 22.14%, 三者在 C 端的二级结构十分接近, 特别是前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 和 Caspase-9 的螺旋、片层、转角、无规则卷曲含量十分接近, 三级结构分析发现前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 和 Caspase-9 的外观轮廓相近, 且在腹部中央都有一个裂口, 显示前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 和 Caspase-9 可能具有相同的酶切活性。结论 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 具有与 Caspase-9 相似的功能结构域, 可能具有激活 Caspase-3 的功能。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

### Bioinformatics Analysis of Proprotein Convertase Cubtilisin/Kexin 9 Involved in Caspase-3 Activation

TANG Zhihan, WANG Zuo, JIANG ZhiSheng and LIU Lu-Shan

(Institute of Cardiovascular Disease, University of South China &amp; Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Proprotein Convertase Cubtilisin/Kexin 9, Caspase-3, Caspase-9, Cell Apoptosis, Bioinformatics

[ABSTRACT] **Aim** To determine whether the proapoptotic effect of proprotein-convertase cubtilisin/kexin 9 (PCSK9) is related to its effect on Caspase-3 activation by bioinformatics analysis. **Methods** HUVEC-12 were incubated with 80 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for 24 h, and groups of blank control, transfection reagent control, negative control, and 80 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 mg/L ox-LDL were established. Apoptosis rate was measured by flow cytometry. Western blotting and ELISA were used to measure Caspase-3 protein expression and activity, respectively. Bioinformatics methods were used to compare PCSK9, Caspase-8 and Caspase-9, in order to find the similarity of sequence and whether a common conservative motif existed. **Results** An inhibitory effect of PCSK9 sRNA on both expression and activity of Caspase-3 was observed. The sequence similarity of PCSK9, Caspase-8 and Caspase-9 was 22.14%, there was a similar second structure in C-terminal of the three proteins, the content of helix, strand, turn and coil was nearly the same in PCSK9 and Caspase-9, the profile of PCSK9 and Caspase-9 was similar, and there was common cleft in their abdomen, this cleft may be related to their similar enzyme activity. **Conclusion** There are similar motif in PCSK9 and Caspase-9. The proapoptotic capacity of PCSK9 is related to its effect on Caspase-3 activation.

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 作为一种神经细胞凋亡调节转化酶, 参与肝脏再生, 调节神经细胞凋亡, 还能通过降低肝细胞上低密度脂蛋白受

体 (LDLR) 的数量影响低密度脂蛋白 (LDL) 内化, 使血液中 LDL 不能清除, 从而导致高胆固醇血症<sup>[1, 2]</sup>。研究发现, 凋亡调节因子 Caspase-3 和死亡受体 6 的

[收稿日期] 2010-08-07 [修回日期] 2010-10-03

[基金项目] 湖南省应用基础研究计划重点项目 (2008FJ2006)、湖南省科技厅计划项目 (2009TP4057-2)、湖南省教育厅重点科研项目 (10A105) 及湖南省高校科技创新团队支持计划资助

[作者简介] 唐志晗, 博士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 tangzhihan98@yahoo.com.cn。王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 wnz121101@163.com。通讯作者姜志胜, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。

共同调节增加 PCSK9/NARC-1 参与神经元凋亡信号传递的可能性<sup>[3]</sup>。本课题组的前期研究表明, PCSK9 参与了氧化型 LDL (ox-LDL) 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡, 但其机制不清<sup>[4]</sup>。PCSK9 促凋亡的作用是否与激活凋亡执行酶 Caspase-3 有关呢? 本研究首先在 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 凋亡模型中运用 RNA 干扰技术将 PCSK9 基因沉默, 观察其对 Caspase-3 表达及活性的影响, 然后通过生物信息学工具分析 PCSK9 与 Caspase-3 上游的 Caspase-8 和 Caspase-9 在一级结构、二级结构和三级结构上的相似性, 从而为进一步探索 PCSK9 促凋亡作用的机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC-12 产品编号 CRL-2480) 购自中科院上海细胞生物所细胞中心; DMEM 培养基、OptiMEM I 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; ox-LDL 购自广州中山大学; 兔抗人 Caspase-3 一抗购自美国 ABZOOM 生物公司;  $\beta$ -actin 一抗购自北京博奥森生物公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国联科生物公司; Caspase-3 活性检测试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司; sRNA 由广州市锐博生物科技有限公司合成。

### 1.2 细胞培养及实验分组

HUVEC 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。在每次实验前换无血清培养基培养 12 h 后, 将内皮细胞接种于 6 孔板内, 用 80 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h 同时设空白对照组、转染试剂组、阴性对照组和 80 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 mg/L ox-LDL 组。

### 1.3 PCSK9 sRNA 的设计制备

在 GeneBank 中查到人 PCSK9 mRNA 序列 (编号 NM\_174936), PCSK9 sRNA 正义链 5'-GGC AGA GAC UGA UCC ACU U dTdT-3', 反义链 3'-dTdT CCG UCU CUG ACU AGG UGA A-5', 阴性对照 sRNA 由该公司提供。sRNA 成品为已退火的冻干粉, 使用前用稀释缓冲液将其溶解成 20  $\mu$ mol/L 的工作母液。所有 sRNA 均经过变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 去除未配对单链。

### 1.4 脂质体介导细胞转染

在 5 nmol sRNA 中加入 250  $\mu$ L 无 RNA 酶水 (公司配送), 得到浓度为 20  $\mu$ mol/L sRNA 母液。转染前 24 h 将细胞接种至 6 孔板, sRNA 用 Opti-

MEM I 稀释, 待加入细胞后, 终浓度达 20 nmol/L、40 nmol/L 及 80 nmol/L。将 Lipo2000 轻轻摇匀, 对于每孔, 取 5  $\mu$ L 在另一管与 250  $\mu$ L OptiMEM I 混合, 室温下孵育 5 min。把稀释的 Lipo2000 试剂与稀释后的 sRNA 进行混合, 用手指轻弹, 室温下温育 20 min 以便形成 sRNA 与 Lipo2000 稀释液的转染复合物。把 sRNA 与 Lipo2000 的混合液加入培养细胞, 轻柔前后摇动 6 孔板以混合液体, 然后将培养板送入细胞培养箱。

### 1.5 Annexin V-FITC 染色流式细胞术检测细胞凋亡率

用筛选好的有效 PCSK9 sRNA 转染 HUVEC 后 ox-LDL 处理 24 h 用 0.25% 胰酶消化贴壁的内皮细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 2000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 加入 500  $\mu$ L 结合缓冲液悬浮细胞, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 混匀后, 再加入 5  $\mu$ L Propidium Iodide 混匀, 室温避光反应 5~15 min 上流式细胞仪检测 (激发波长为 488 nm, 发射波长为 530 nm)。按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。

### 1.6 免疫印迹法检测 Caspase-3 的表达

收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入细胞裂解液裂解细胞, 置于冰上 20 min 后, 于 4°C、10000 r/min 离心 10 min 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白定量, 取 50  $\mu$ g 蛋白质/泳道加入等体积的 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸使蛋白变性。蛋白上样后进行电泳, 80 V 积层胶, 120 V 分离胶, 电泳分离蛋白质, 200 mA 1.5~2 h 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭摇床 3~4 h 加入一抗, 4°C 过夜,  $\beta$ -actin、Caspase-3 抗体均为兔多克隆抗体。TBST 溶液洗膜 15 min  $\times$  3 次, 然后与过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 溶液洗膜 20 min  $\times$  3 次, 然后进行增强化学发光检测, 显示于 X 光片上, 显影, 定影后蛋白条带的相对强度用 AlphaImager2200 进行分析。

### 1.7 Caspase-3 活性检测

HUVEC 经 PCSK9 sRNA 处理后, 再加入 ox-LDL 作用 24 h 用 PBS 洗涤细胞 2 次 (2000 r/min 离心 5 min), 收集细胞, 尽量去除 PBS 上清, 在收集的沉淀细胞中加入 50  $\mu$ L 冰冷 Lysis Buffer (使用前每 50  $\mu$ L Lysis Buffer 加入 0.5  $\mu$ L DTT) 吹打均匀, 置冰上裂解 20~60 min 其间涡旋振荡 3~4 次, 每次 10 s 4°C、10000 r/min 离心 1 min 小心吸取上清 (含裂解的蛋白质) 转移至新的管中, 并放置冰上待用, 取 1~2  $\mu$ L 上清, 常规方法测定蛋白质浓度, 吸取 500  $\mu$ L 含 100~200  $\mu$ g 蛋白的细胞或组织裂解上清, 加

入 50 μL 2×Reaction Buffer, 加入 5 μL Caspase-3 底物并于 37°C 避光孵育 4 h, 用酶标仪在 λ= 405 nm 测定吸光值。

### 1.8 生物信息学分析

多序列同源性比对采用汉化版 H an-DNA-MAN6 0-Raindy 软件, 二级结构比较采用 Anthepr-m5 0 软件, 三级结构从 PDB 中免费获得。

### 1.9 统计学方法

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间采用方差分析及 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCSK9 sRNA 抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 HUVEC 凋亡

80 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 后, 细胞凋亡率显著增加, 转染 PCSK9 sRNA 后用 80 mg/L ox-LDL 处理则细胞凋亡率明显减少 (*P* < 0.01), 表明转染 PCSK9 sRNA 后可抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡 (图 1)。

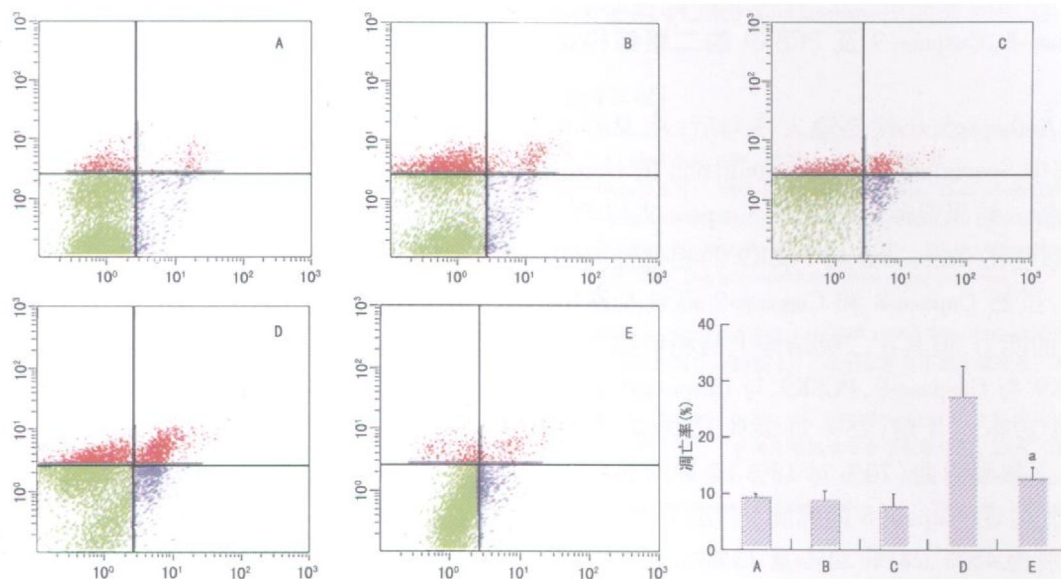


图 1 流式细胞术检测 HUVEC 凋亡 A-E 分别为空白对照组、转染试剂组、阴性对照组、80 mg/L ox-LDL 组和 80 nmol/L sRNA + 80 mg/L ox-LDL 组。a 为 *P* < 0.01, 与 80 mg/L ox-LDL 组比较。

### 2.2 PCSK9 sRNA 对 Caspase-3 蛋白表达和活性的影响

PCSK9 sRNA 明显抑制 Caspase-3 蛋白的表达 (*P* < 0.05, 图 2)。80 mg/L ox-LDL 组 Caspase-3 活性明显上调, 转染 PCSK9 sRNA 后 Caspase-3 活性明显下调 (图 3)。

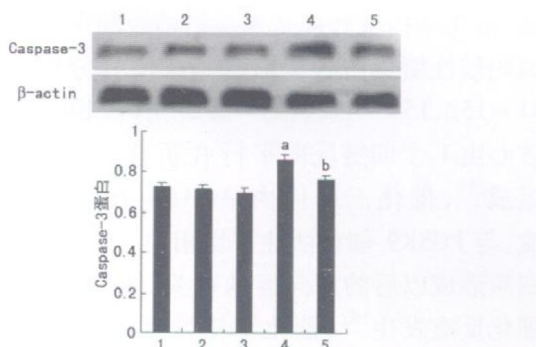


图 2 PCSK9 sRNA 对 Caspase-3 表达的影响 (*n* = 3) 1-5 分别为空白对照组、转染试剂组、阴性对照组、80 mg/L ox-LDL 组和 80 nmol/L sRNA + 80 mg/L ox-LDL 组。a 为 *P* < 0.05 与空白对照组比较; b 为 *P* < 0.05 与 80 mg/L ox-LDL 组比较。

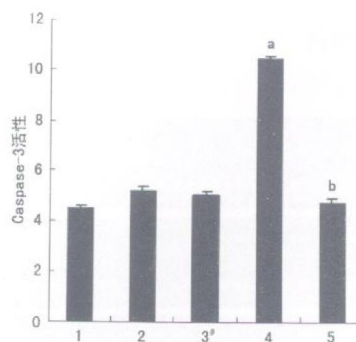


图 3 PCSK9 sRNA 对 Caspase-3 活性的影响 (*n* = 3) 1-5 分别为空白对照组、转染试剂组、阴性对照组、80 mg/L ox-LDL 组和 80 nmol/L sRNA + 80 mg/L ox-LDL 组。a 为 *P* < 0.05 与空白对照组比较; b 为 *P* < 0.05 与 80 mg/L ox-LDL 组比较。

### 2.3 Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 的同源性比对

采用汉化版 H an-DNAMAN6 0-Raindy 软件, 从“序列”的“多序列比对”进去, 输入要比对的序列, 确认后显示 Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 三者之间的同源性为 22.14% (图 4), 三者之间的较高同源

性主要是由于 C 末端的同源性较高所引起的, N 末端的同源性明显低于 C 末端, 因此三者可能在 C 末

端存在共同的保守结构域。

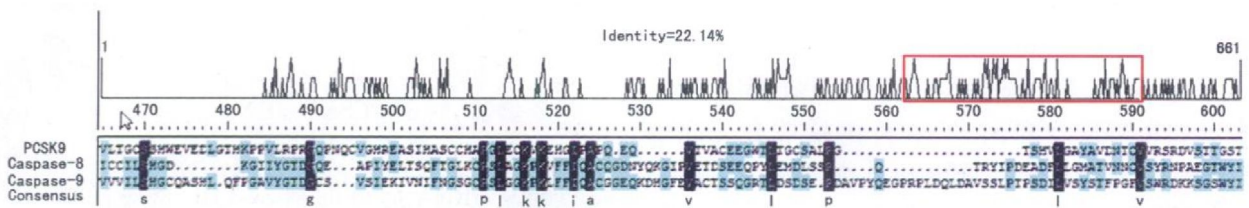


图 4 Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 间 C 末端氨基酸序列比较

同源性最高的地方 (三个蛋白为同一种氨基酸) 涂成黑色, 两两相似涂成浅蓝色, 没有相似性的地方不涂颜色。图中的氨基酸序列为红色方框部分的放大。

### 2.4 Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 的二级结构比较

采用 AnthePro5.0 软件输入序列后, 从 Method 进去, 选其中 Secondary structure prediction 的 Gamier 进行分析。结果显示三者之中 Caspase-9 与 PCSK9 的相似性比 Caspase-8 与 PCSK9 的相似性要明显多一些, 虽然 Caspase-8 和 Caspase-9 都具有激活 Caspase-3 的能力, 但其在二级结构上的相似程度还不如 PCSK9 与 Caspase-9。PCSK9 与 Caspase-9 在螺旋 (32% 对 29%)、片层 (23% 对 28%)、转角 (23% 对 25%)、无规则卷曲 (20% 对 18%) 4 种二级结构的比例十分接近 (Caspase-8 的螺旋、片层、转角、无规则卷曲分别为 43%、28%、24% 及 13%), 且 PCSK9 与 Caspase-9 二级结构对应的序列分布较为一致。更为突出的是, Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 三者 C 末端的二级结构确有一定的相似性, 故该结果显示 C 末端的保守结构可能是三者激活 Caspase-3 的共同的结构基础 (图 5)。

### 2.5 PCSK9 与 Caspase-9 的三维结构比较

PCSK9 上有 2 个大的裂口, 背部和腹部各一个, 背部的裂口比较靠前, 腹部的裂口位于中间; Caspase-9 的腹部也有一个裂口 (且只有一个裂口), 其位置与 PCSK9 一样位于中间, 裂口在很多酶蛋白上一般是作为切割工作部位, 故 PCSK9 腹部的裂口可能具有与 Caspase-9 腹部裂口相同的功能, 即切割 Caspase-3 前体成其活化形式。而由其背部裂口完成对 LDLR 的裂解 (图 6)。

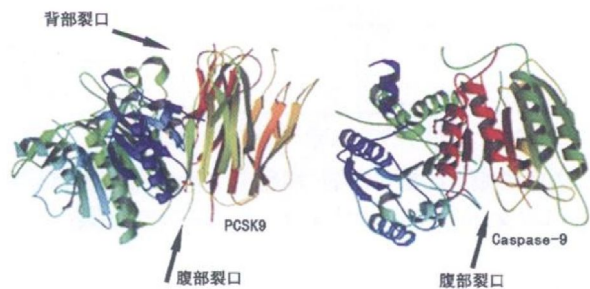


图 6 Caspase-9、PCSK9 的三级结构比较

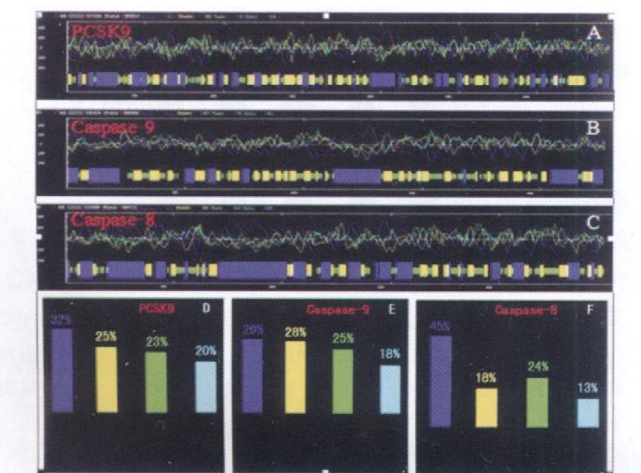


图 5 Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 的二级结构分析 深蓝代表螺旋, 黄色代表片层, 绿色代表转角, 浅蓝代表无规则卷曲, A 和 D、B 和 E、C 和 F 分别为 PCSK9、Caspase-9、Caspase-8 的二级结构线性分布图与二级结构含量图。

## 3 讨论

从结构上来看, 人类 PCSK9 由信号肽、前结构域、催化结构域和羧基末端结构域顺次连接而成, 所编码酸性糖蛋白各区域氨基酸序号分别为 1~ 30、31~ 152、153~ 452、453~ 692<sup>[5]</sup>, PCSK9 催化结构域核心由 1 个四链反向平行  $\beta$  折叠及其两侧  $\alpha$  螺旋组成<sup>[6]</sup>, 催化三联体由 Asp186、His226、Ser386 构成, 与 PCSK9 催化活性密切相关。信号肽主要与蛋白质形成以后的定向运送有关, 前结构域抑制自身催化反应发生<sup>[6]</sup>, 催化结构域具有蛋白酶活性, 其具有特异结合 LDLR 的结构和水解 LDLR 的能力, 羧基末端结构域的功能目前尚不清楚, 其是否具有蛋白酶活性尚无任何报道。

Caspase-8 和 Caspase-9 是半胱天冬氨酸蛋白酶

中参与凋亡启动的 2 个酶, Caspase-3 属于 Caspase 家族中的效应子 Caspase, 主要作用是对底物蛋白质进行酶解, 直接介导凋亡实施, 处于凋亡通路的核心位置, 被称为“死亡蛋白酶”。研究发现 PCSK9 具有促凋亡作用, 我们的研究结果也表明 PCSK9 sRNA 能有效抑制由 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡, 且能明显抑制 Caspase-3 蛋白的表达和活性, 这提示 PCSK9 的促凋亡作用与 Caspase-3 活化相关。Caspase-3 主要是受其上游的 Caspase-8、Caspase-9 作用而活化的, PCSK9 既然是一种蛋白酶, 能裂解 LDLR, 其是否具有与 Caspase-8 或 Caspase-9 相同的功能, 通过切割 Caspase-3 前体, 而激活 Caspase-3 呢? 生物信息学为分析这种可能性提供了有力的工具。

一般认为蛋白的同源性超过 20% 就有可能是同一家族的蛋白, Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 三者之间的同源性达到了 22.14%, 且同源性主要集中在 C 末端, 因此三者单从序列来看就有可能在 C 末端存在共同的保守结构域。二级结构分析证实, PCSK9 与 Caspase-9 在螺旋、片层、转角、无规则卷曲 4 种二级结构的比例十分接近, 而且在靠近 C 末端约占全序列三分之一的范围内, Caspase-8、Caspase-9 及 PCSK9 三者二级结构的相似性更大, 这与一级结构分析的结构是一致的, 进一步预示三者存在相同的功能结构域的可能性。三级结构分析的结果则更加直观显示出这种可能性。一般来说, 酶蛋白负责水解的基团位于裂口部分<sup>[7]</sup>, PCSK9 在背部和腹部各有一个裂口, 这 2 个裂口很可能具有不同底物切割能力, 即切割裂解 LDLR 的能力, 和参与 Caspase

凋亡通路, 发挥与 Caspase-9 相同的功能, 通过裂解 Caspase-3 的前提而激活 Caspase-3。从位置分布来看, 这个功能可能由腹部裂口来完成 (腹部裂口的氨基酸序列位置恰好位于 PCSK9 的羧基末端, 即 453~692 的位置), 而 PCSK9 的背部裂口在氨基酸序列位置上恰好对应 PCSK9 催化结构域的位置 (153~452), 因此背部裂口很可能参与对 LDLR 蛋白的催化裂解。

然而, 生物信息学虽能为实验提供指针, 但其代替不了实验, 我们下一步需要寻找更直接的实验证据来证明 PCSK9 对 Caspase-3 的激活作用。

#### [参考文献]

- [1] Peterson AS, Fong LG, Young SG. PCSK9 function and physiology [J]. *J Lipid Res* 2008; **49** (7): 1595-599
- [2] Morawietz H. LOX-1 and atherosclerosis: Proof of concept in LOX-1 - knockout mice [J]. *Circ Res* 2007; **100** (11): 1534-536
- [3] Bingham B, Shen R, Kotnis S, et al. Proapoptotic effects of NARC 1 (PCSK9), the gene encoding a novel serine proteinase [J]. *Cytometry A*, 2006; **69** (11): 1123-131
- [4] 刘录山, 谢 闯, 姜志胜. PCSK9 sRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009; **36** (3): 323-330
- [5] 谢 闯, 潘利红, 杨 琼, 等. PCSK9/NARC-1 在脂质代谢和神经系统中的作用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008; **24** (1): 6-10
- [6] Piper DE, Jackson S, Liu Q, et al. The crystal structure of PCSK9, a regulator of plasma LDL-cholesterol [J]. *Structure* 2007; **15** (5): 545-552
- [7] Nukui M, Taylor KB, McPherson DT, et al. The function of hydrophobic residues in the catalytic cleft of streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. Kinetic characterization of mutant enzyme forms [J]. *J Biol Chem*, 2003; **278** (5): 3079-088

(此文编辑 文玉珊)