

本文引用: 李曼, 陈彦宇, 夏梦蝶, 等. PCSK9 促进线粒体功能障碍加速腹主动脉瘤的进程[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(3): 209-218. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.03.004.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-03-0209-10

· 实验研究 ·

PCSK9 促进线粒体功能障碍加速腹主动脉瘤的进程

李曼, 陈彦宇, 夏梦蝶, 徐倩, 周雅婷, 张华玉, 刘录山, 唐志晗, 彭娟

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 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探讨前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)影响腹主动脉瘤(AAA)的进展及机制。**[方法]** 选取 6~8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠构建小鼠 AAA 模型;通过皮下植入微型渗透泵,持续输注血管紧张素 II(Ang II),高脂喂养 28 天后处死。收集人和小鼠正常腹主动脉血管和 AAA 标本,用免疫组织化学和免疫荧光检测 PCSK9 在腹主动脉平滑肌细胞中的表达。不同浓度的 Ang II 处理原代培养的 C57BL/6 小鼠血管平滑肌细胞(mVSMC)24 h 后,检测 PCSK9 mRNA 和蛋白表达。建立 PCSK9 过表达和敲低细胞模型,检测线粒体活性氧(mtROS)、线粒体膜电位(MMP)、线粒体通透性转换孔(MPTP)开放及 Z-DNA 结合蛋白 1(ZBP1)蛋白表达。通过生物信息学对多个单细胞测序的数据集进行差异表达分析来获取关键差异表达基因,并探讨其在 AAA 中的表达及作用。**[结果]** 免疫组织化学和免疫荧光结果显示,在人和小鼠的 AAA 组织中 PCSK9 的表达增加($P<0.01$),并与平滑肌存在共定位。Ang II 呈浓度依赖性促进 mVSMC 中 PCSK9 的表达,2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 组 PCSK9 mRNA 和蛋白的表达分别增加 2.9 倍和 1.1 倍($P<0.01$),这一效应最为显著。成功构建 PCSK9 过表达和 PCSK9 干扰 mVSMC 模型后,PCSK9 过表达导致细胞内 mtROS 增加,MMP 下降,MPTP 开放增加,细胞活性下降($P<0.01$);PCSK9 敲低可以减少 Ang II 引起的 mtROS 增加,MMP 下降和 MPTP 开放;与 siNC+Ang II 组相比,siPCSK9+Ang II 组 mtROS 减少,MMP 和 MPTP 的荧光亮度增加($P<0.05$)。生物信息学分析发现,ZBP1 是 AAA 中核心差异表达基因。免疫组织化学和免疫荧光结果显示,在人和小鼠的 AAA 组织中 ZBP1 的表达增高,并与平滑肌存在共定位;Western blot 结果显示,过表达 PCSK9 或 2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 处理均可增加 ZBP1 蛋白表达($P<0.01$),敲低 PCSK9 可减轻 Ang II 引起的 ZBP1 表达增高($P<0.05$)。**[结论]** PCSK9 可能通过诱导平滑肌细胞中的线粒体损伤,激活下游分子 ZBP1 导致细胞损伤,从而促进 AAA 的发展。

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 腹主动脉瘤; 血管平滑肌细胞; Z-DNA 结合蛋白 1; 线粒体功能障碍

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

PCSK9 promotes mitochondrial dysfunction to accelerate the process of abdominal aortic aneurysm

LI Man, CHEN Yanyu, XIA Mengdie, XU Qian, ZHOU Yating, ZHANG Huayu, LIU Lushan, TANG Zhihan, PENG Juan

Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the impact and mechanism of proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) on the progression of abdominal aortic aneurysm (AAA). **Methods** 6~8 week old ApoE^{-/-} mice were selected to establish the AAA model. Angiotensin II (Ang II) was continuously infused through subcutaneous implantation of a micro-osmotic pump. The mice were fed with high-fat diet and killed after 28 days. The expression of PCSK9 in abdominal aortic smooth muscle cells was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence in normal abdominal aortic blood vessels and AAA samples in human and mice. Primary cultured murine vascular smooth muscle cells (mVSMC) of

[收稿日期] 2025-01-20

[修回日期] 2025-02-27

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30510);湖南省卫生健康委员会高层次人才基金项目(R2023046)

[作者简介] 李曼,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础,E-mail:lm1209560515@163.com。通信作者彭娟,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础,E-mail:pengjuan98@sina.com。

C57BL/6 mice were treated with different concentrations of Ang II for 24 h, and the expression of PCSK9 mRNA and protein was detected. PCSK9 overexpression and knockdown cell models were established, and mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), mitochondrial membrane potential (MMP), mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening, and Z-DNA binding protein 1 (ZBP1) protein expression were detected. Bioinformatics was used to analyze the differential expression of multiple single-cell sequencing datasets to obtain the key differentially expressed genes, and to study their expression and role in AAA. **Results** Immunohistochemistry and immunofluorescence results showed that PCSK9 expression in human and mouse AAA increased ($P < 0.01$), and co-localized with smooth muscle. Ang II promoted PCSK9 expression in mVSMC in a concentration-dependent manner, the 2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II group showed a 2.9-fold and 1.1-fold increase in the expression of PCSK9 mRNA and protein, respectively ($P < 0.01$), with the most significant effect observed. After successfully constructing PCSK9 overexpression and PCSK9 interference mVSMC models, PCSK9 overexpression led to an increase in intracellular mtROS, a decrease in MMP, an increase in MPTP opening, and a decrease in cellular activity ($P < 0.01$); PCSK9 knockdown could reduce Ang II induced increase in mtROS, decrease in MMP and MPTP opening; compared with the siNC+Ang II group, the siPCSK9+Ang II group showed a decrease in mtROS and an increase in the fluorescence brightness of MMP and MPTP ($P < 0.05$). Bioinformatics analysis revealed that ZBP1 was a core differentially expressed gene in AAA. Immunohistochemistry and immunofluorescence results showed that ZBP1 expression in human and mouse AAA tissues increased, and co-localized with smooth muscle. Western blot results showed that PCSK9 overexpression or treatment with 2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II could increase ZBP1 protein expression ($P < 0.01$), while PCSK9 knockdown could alleviate the increased ZBP1 expression caused by Ang II ($P < 0.05$). **Conclusion** PCSK9 may induce mitochondrial damage in smooth muscle cells, activate downstream molecule ZBP1 to cause cell damage, and promote the development of AAA.

[**KEY WORDS**] proprotein convertase subtilisin kexin 9; abdominal aortic aneurysm; vascular smooth muscle cell; Z-DNA binding protein 1; mitochondrial dysfunction

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)是以血管壁弹性减弱后向外形成瘤状凸起为特征的退行性心血管疾病^[1]。AAA的发生发展与炎症、细胞外基质降解及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)丢失密切相关^[2-3],其发病率和致死率逐年增高^[4],严重危及人类健康,深入研究影响AAA发生发展的分子机制具有重大意义。有研究通过全基因组Meta分析和孟德尔随机化发现非高密度脂蛋白胆固醇在AAA中发挥重要作用^[5]。

前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9)主要由肝细胞分泌,也可由平滑肌细胞、巨噬细胞和内皮细胞等多种细胞分泌^[6]。PCSK9主要通过促进肝细胞低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)降解引发高脂血症,参与多种心血管疾病的发生发展^[7],还可通过非脂质调节作用影响包括AAA等疾病的进程^[8],但具体分子机制有待探讨。

线粒体功能障碍与多种退行性疾病和急性疾病的发生发展密切相关^[9]。在病理状态下,线粒体的结构和功能容易受到损伤,受损的线粒体不仅会产生大量线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS),导致线粒体膜通透性改变,长时间开放的线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)还会将mtROS、线

粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)等释放入胞质引起细胞损伤^[10-11],线粒体严重受损还会触发细胞凋亡影响疾病进程^[12],这无疑会对包括AAA在内的疾病的进程产生重大影响。

研究显示,PCSK9可通过促进线粒体功能障碍诱导细胞凋亡增加颈动脉斑块的脆弱性及加重慢性心肌缺血^[13-14]。PCSK9是否能通过促进线粒体损伤来影响AAA的进程呢?本研究旨在对此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 人腹主动脉组织样本收集

人AAA和正常血管组织均从南华大学法医鉴定中心获得,均经南华大学医学伦理委员会批准(批准号:20240097)。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基和胎牛血清(Gibco公司); PCSK9 siRNA及转染试剂(广州市锐博生物科技有限公司);HBAD-Adeasy-mPCSK9-Null-EGFP腺病毒(上海汉恒公司);MitoSOXm试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司);MPTP试剂盒(GENMED公司),线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测试剂盒(碧云天生物技术公司);CCK-8

试剂盒 (Abiowell 公司); 兔抗 PCSK9、GAPDH、Z-DNA 结合蛋白 1 (Z-DNA binding protein 1, ZBP1) 和 α -SMA 一抗及山羊抗兔 IgG 二抗 (Proteintech 公司); 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 ApoE^{-/-}小鼠 AAA 模型的构建

6~8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠, 体质量为 26~28 g, 皮下植入微型渗透泵, 持续以 1 000 ng/(kg·min) 输注血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II), 高脂饮食喂养 28 天后处死小鼠, 验证 AAA 形成并取材, 所有动物实验均经南华大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: USC2023XS098)。

1.4 小鼠 VSMC 原代培养与处理

分离培养 C57BL/6 小鼠 VSMC (mouse VSMC, mVSMC), 待细胞生长到 80% 融合时传代备用。选取生长状态良好的第 3~8 代 mVSMC, 进行 PCSK9 siRNA 转染敲低 PCSK9 或 PCSK9 腺病毒感染过表达 PCSK9 处理, PCSK9 siRNA 转染细胞后孵育 72 h 或 PCSK9 腺病毒感染细胞后孵育 24 h。用 0、0.5、1.0 和 2.0 μ mol/L Ang II 孵育细胞 24 h, 或在转染 PCSK9 siRNA 48 h 后直接加入 2.0 μ mol/L Ang II 共同孵育细胞 24 h, 按照处理方法将其分为不同浓度的 Ang II 处理组: siNC (小干扰空载体) 组、siPCSK9 组、siNC + Ang II 组、siPCSK9 + Ang II 组以及 AdGFP 组 (过表达 PCSK9 腺病毒空载体)、AdPCSK9 组, 并检测相关指标。

1.5 Western blot 检测

PBS 漂洗后, 蛋白酶抑制剂和裂解液处理细胞 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 进行 BCA 蛋白定量; 加蛋白上样缓冲液, 混匀, 96 $^{\circ}$ C 变性 8 min, 冰上冷却; 制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离, 再转移至 PDVF 膜上, 转膜结束后用快速封闭液封闭, 再分别加入相应一抗, 摇床摇动孵育 12 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 漂洗 3 次, 加入相应的二抗室温孵育 90 min, PBST 漂洗 3 次, 显影。

1.6 RT-qPCR 检测

提取各组细胞总 RNA, 按照反转录试剂盒反转录成 cDNA, 再使用 qPCR 仪扩增, 并测定实时荧光曲线。以 GAPDH 为内参照, 通过 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.7 免疫组织化学

组织切片脱水脱蜡, 浸入柠檬酸盐修复液中微波修复 150 s, 冷却至室温后画圈, 加入内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次, 加入非特

异染色阻断剂孵育 10 min, 加入对应一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 48 h, PBS 漂洗 3 次, 加入生物素标记的羊抗小鼠/兔聚合物孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次, 加入链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次, 使用 DAB 染色, 然后经苏木精染核, 流水冲洗返蓝, 烘干, 中性树脂封片, 拍照后进行统计分析。

1.8 免疫荧光

脱水脱蜡、微波修复并冷却画圈, 用 10% FBS 封闭 1 h, 加入对应不同源的两种一抗进行荧光双染, 4 $^{\circ}$ C 孵育 48 h, PBS 漂洗 3 次, 避光加入对应来源荧光二抗孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, DAPI 孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次, 加入甘油封片, 拍照后进行统计分析。

1.9 CCK-8 检测细胞活性

向 96 孔板中加入 100 μ L F12 和 10 μ L CCK-8 试剂, 并设置空白对照孔, 即无细胞的空白孔中加入相同量的 F12 和 CCK-8, 培养箱孵育 4 h, 用酶标仪检测每孔吸光度, 根据公式计算细胞活性。

1.10 mtROS、MMP、MPTP 检测

mtROS、MMP、MPTP 检测按试剂盒操作说明书进行, 荧光显微镜下拍摄图片。

1.11 mtDNA 检测

将平滑肌细胞分为两份, 一份加入 500 μ L DNA 提取液, 离心, 得到不含核、线粒体和内质网的细胞质, 分离出细胞质 DNA, 使用 mtDNA 引物 (5'-CCC AGC TAC TAC CAT CAT TCA AGT-3' 和 5'-GAT GGT TTG GGA GAT TGG TTG ATG T-3', 扩增产物 117 bp) 通过 PCR 检测获得完整 mtDNA 含量; 另一份加入 500 μ L 含有 150 mmol/L NaCl、50 mmol/L HEPES (pH 7.4) 和 25 mg/L 洋地黄皂苷的缓冲液, 分离出 mtDNA, 使用受损 mtDNA 引物 (5'-GCC AGC CTG ACC CAT AGC CAT AAT AT-3' 和 5'-GAG AGA TTT TAT GGG TGT AAT GCG G-3', 扩增产物 10 kb) 通过 PCR 检测获得受损 mtDNA 含量。

1.12 生物信息学分析

使用 R 语言, 通过生物信息学对多个单细胞测序的数据集进行差异表达分析, 最后将数据进行可视化处理。

1.13 统计学分析

利用 Graph Pad Prism 9.0、Image J、Image Pro Plus 软件统计并分析所得数据。实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCSK9 在人和小鼠 AAA VSMC 中表达升高

免疫组织化学结果显示,与人或小鼠正常腹主动脉组织相比,人和小鼠 AAA 组织中棕褐色染色分别升高约 10 倍、13.5 倍($P<0.01$),提示 PCSK9 表达明显升高。免疫荧光结果显示,AAA 组织中表达增加的 PCSK9 荧光与 VSMC 标志物存在共定位。Western blot 和 RT-qPCR 结果显示,Ang II 处理可增

加 PCSK9 的 mRNA 及蛋白表达,2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 组最明显,与 0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 组相比 mRNA 表达增加 2.9 倍、蛋白表达增加 1.1 倍($P<0.01$;图 1)。后续实验中 Ang II 的处理浓度采用 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 。以上结果表明,PCSK9 在 AAA VSMC 中表达升高,且 Ang II 可诱导 mVSMC 中 PCSK9 表达,提示 PCSK9 可能通过影响 VSMC 在 AAA 的发生发展中发挥作用。

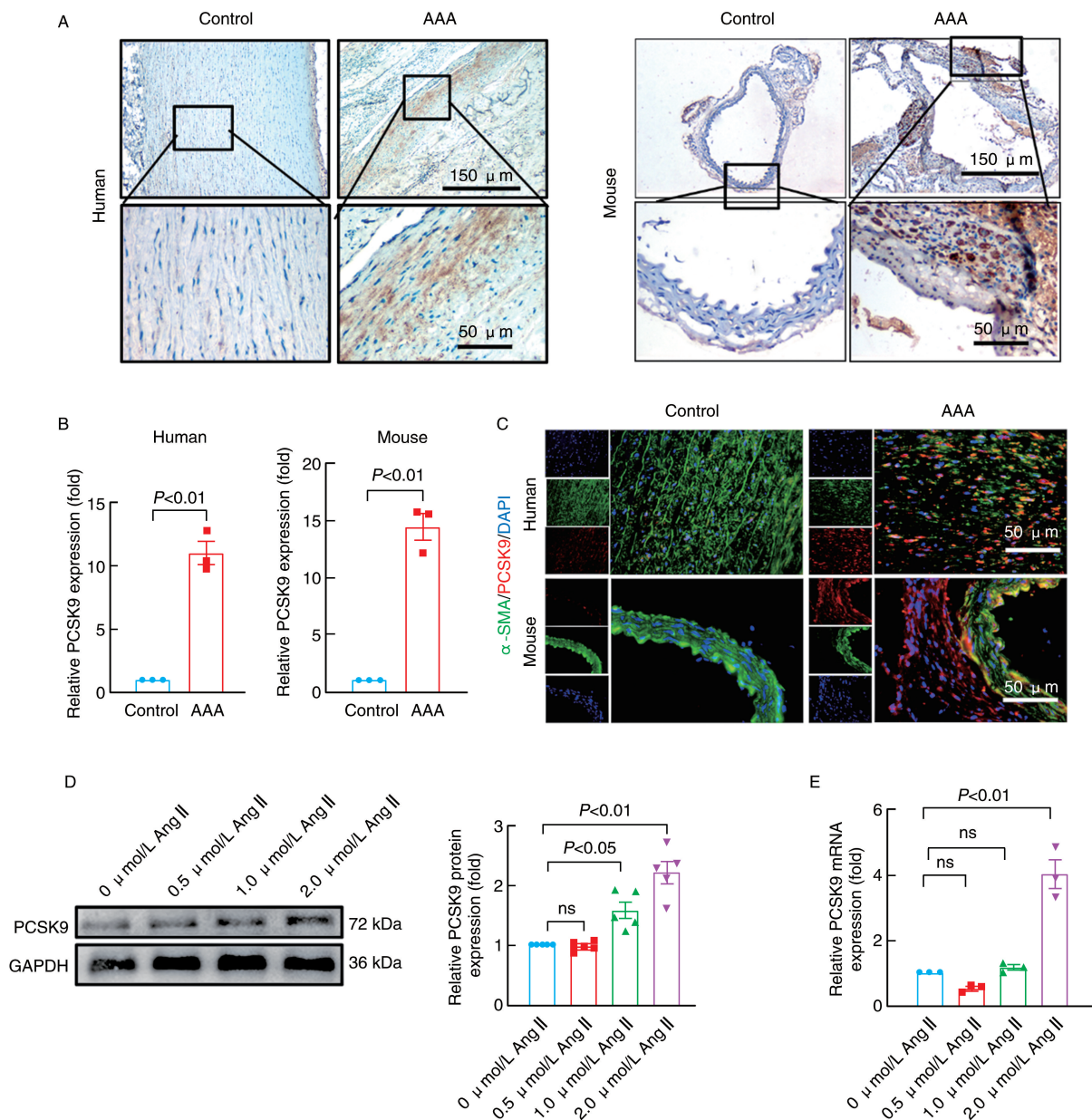


图 1. PCSK9 在 AAA VSMC 中表达升高

A、B 为人和 ApoE^{-/-}小鼠 AAA 组织中 PCSK9 表达增加($n=3$),C 为人和 ApoE^{-/-}小鼠 AAA 组织中 PCSK9 和 α -SMA 存在共定位, D 为 Ang II 呈浓度依赖性增强 PCSK9 蛋白表达($n=5$),E 为 Ang II 引起 PCSK9 mRNA 表达增加($n=3$)。

Figure 1. The expression of PCSK9 increased in VSMC of AAA

2.2 PCSK9 过表达引起 mVSMC 线粒体损伤

Western blot 和 RT-qPCR 结果显示,与 AdGFP 组相比,AdPCSK9 组 PCSK9 的 mRNA 和蛋白表达增加($P<0.05$ 或 $P<0.001$),提示 PCSK9 过表达的 mVSMC 模型构建成功。与 AdGFP 组相比,PCSK9 过表达 mVSMC 中 mtROS 的红色荧光增强($P<0.01$),表明 mtROS 明显增加;MMP 红色荧光减弱($P<0.01$),表明 MMP 降低,线粒体膜被破坏;

MPTP 红色荧光减弱($P<0.01$),表明 MPTP 开放。另外,与 AdGFP 组相比,PCSK9 过表达 mVSMC 胞质中 mtDNA 和受损 mtDNA 增加($P<0.05$),细胞活性降低($P<0.01$;图 2)。以上结果表明,PCSK9 过表达可引起 mVSMC 线粒体损伤。

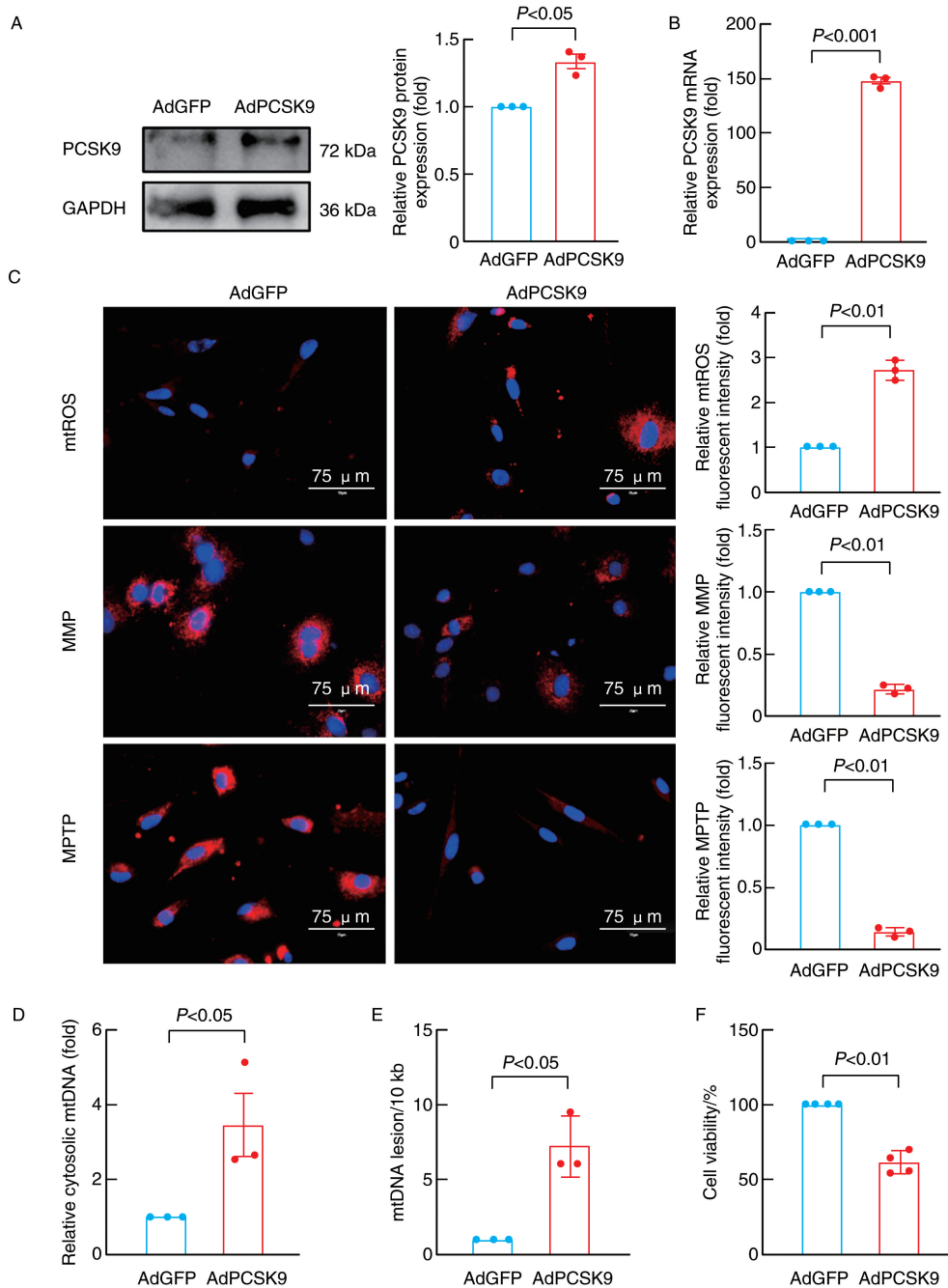


图 2. PCSK9 过表达引起 mVSMC 线粒体损伤

A、B 为转染后 mVSMC 中 PCSK9 蛋白和 mRNA 表达增加;C 为转染后 mVSMC 中 mtROS 荧光增加, MMP 和 MPTP 荧光减少; D 为转染后 mVSMC 胞质中 mtDNA 含量增加;E 为转染后 mVSMC 中受损 mtDNA 含量增加($n=3$);F 为转染后 mVSMC 活性降低($n=4$)。

Figure 2. PCSK9 overexpression caused mitochondrial damage of mVSMC

2.3 Ang II 通过 PCSK9 引起 mVSMC 线粒体损伤

Western blot 和 RT-qPCR 结果显示,与 siNC 组相比,siPCSK9 组 PCSK9 的 mRNA 和蛋白表达减少 ($P<0.05$),说明 PCSK9 敲低 mVSMC 模型构建成功。与 siNC 组相比,siNC + Ang II 组 mVSMC 中 mtROS 的红色荧光增强 ($P<0.05$),表明 mtROS 增加;MMP 与 MPTP 的荧光强度减弱 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 MMP 下降,MPTP 开放。以上结果提示 Ang II 可诱导 mVSMC 线粒体损伤。与 siNC+Ang II 相

比,siPCSK9 + Ang II 组 mVSMC 中 mtROS 的红色荧光减弱 ($P<0.05$),MMP 和 MPTP 的荧光强度增加 ($P<0.05$),表明 PCSK9 敲低可明显减轻 Ang II 引起的线粒体损伤。CCK-8 结果显示,与 siNC 组相比,siNC + Ang II 组细胞活性降低 ($P<0.01$);与 siNC+Ang II 组相比,siPCSK9 + Ang II 组细胞活性升高 ($P<0.01$;图 3)。以上结果表明,PCSK9 介导了 Ang II 引起的 mVSMC 线粒体损伤。

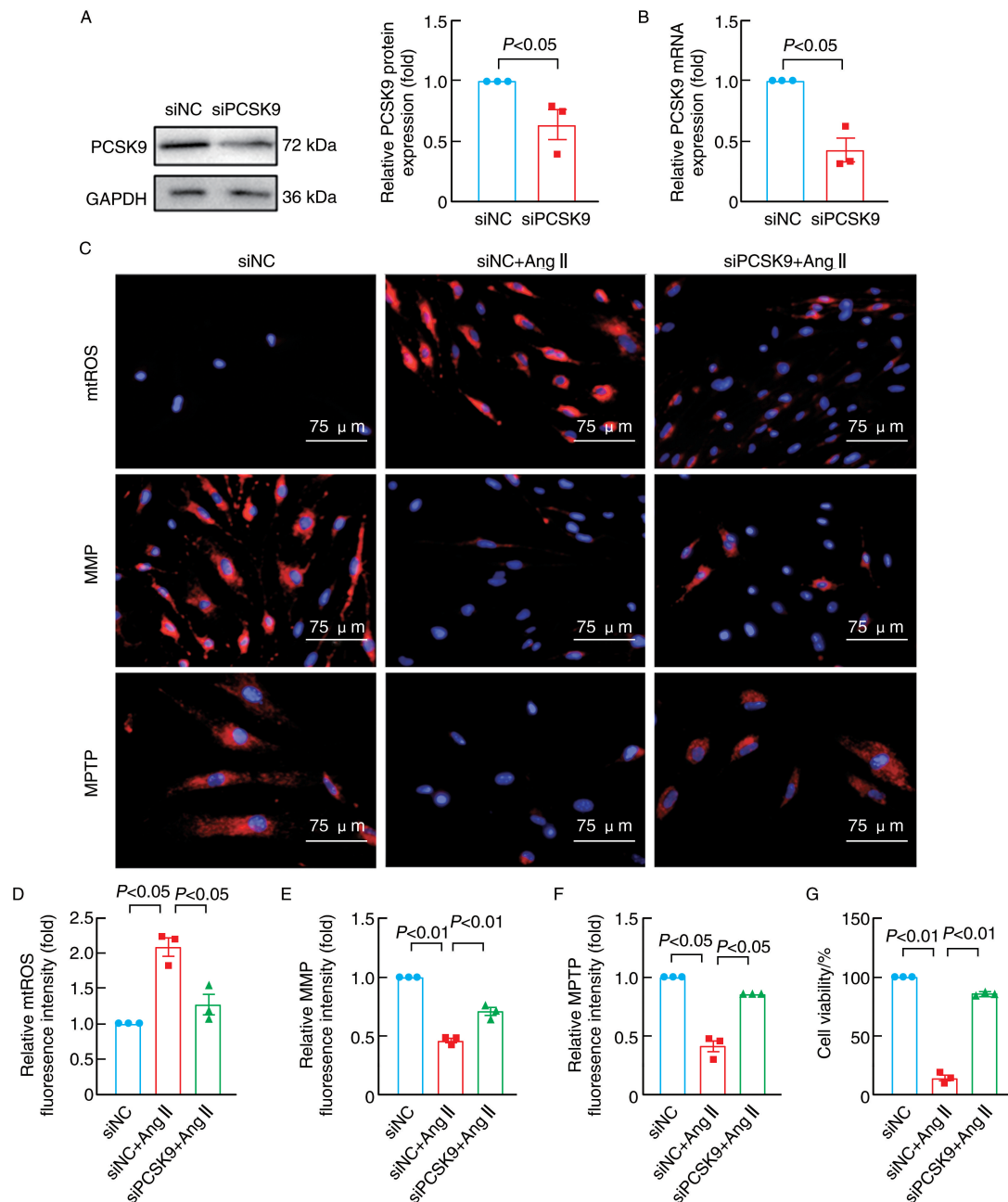


图 3. Ang II 通过 PCSK9 引起 mVSMC 线粒体损伤 ($n=3$)

A、B 为 siRNA 转染后 mVSMC 中 PCSK9 蛋白和 mRNA 表达减少;C、D、E、F 为 siRNA 转染后 Ang II 引起的 mVSMC 中 mtROS 荧光增加, MMP 和 MPTP 荧光减少被逆转;G 为 siRNA 转染后 Ang II 引起的 mVSMC 活性降低被逆转。

Figure 3. Ang II caused mitochondrial damage of mVSMC via PCSK9 ($n=3$)

2.4 ZBP1 可能是 PCSK9 介导的 Ang II 引起 mVSMC 线粒体损伤的下游效应分子

单细胞测序结果显示,在 AAA 中 VSMC 占比明显改变。提取相应平滑肌细胞群进行差异分析,得到 5 019 个差异表达基因。5 019 个差异基因与 Ad-PCSK9、AdGFP 两组分析得到的 1 813 个差异基因

以及排名前 300 的细胞内 DNA 响应基因取交集后筛选出 8 个关键基因。对这 8 个关键基因的分析发现,与对照组相比,ZBP1 在 AAA 中的表达明显增高(图 4)。以上结果表明,ZBP1 可能是 PCSK9 介导的 Ang II 引起 mVSMC 线粒体损伤的下游效应分子。

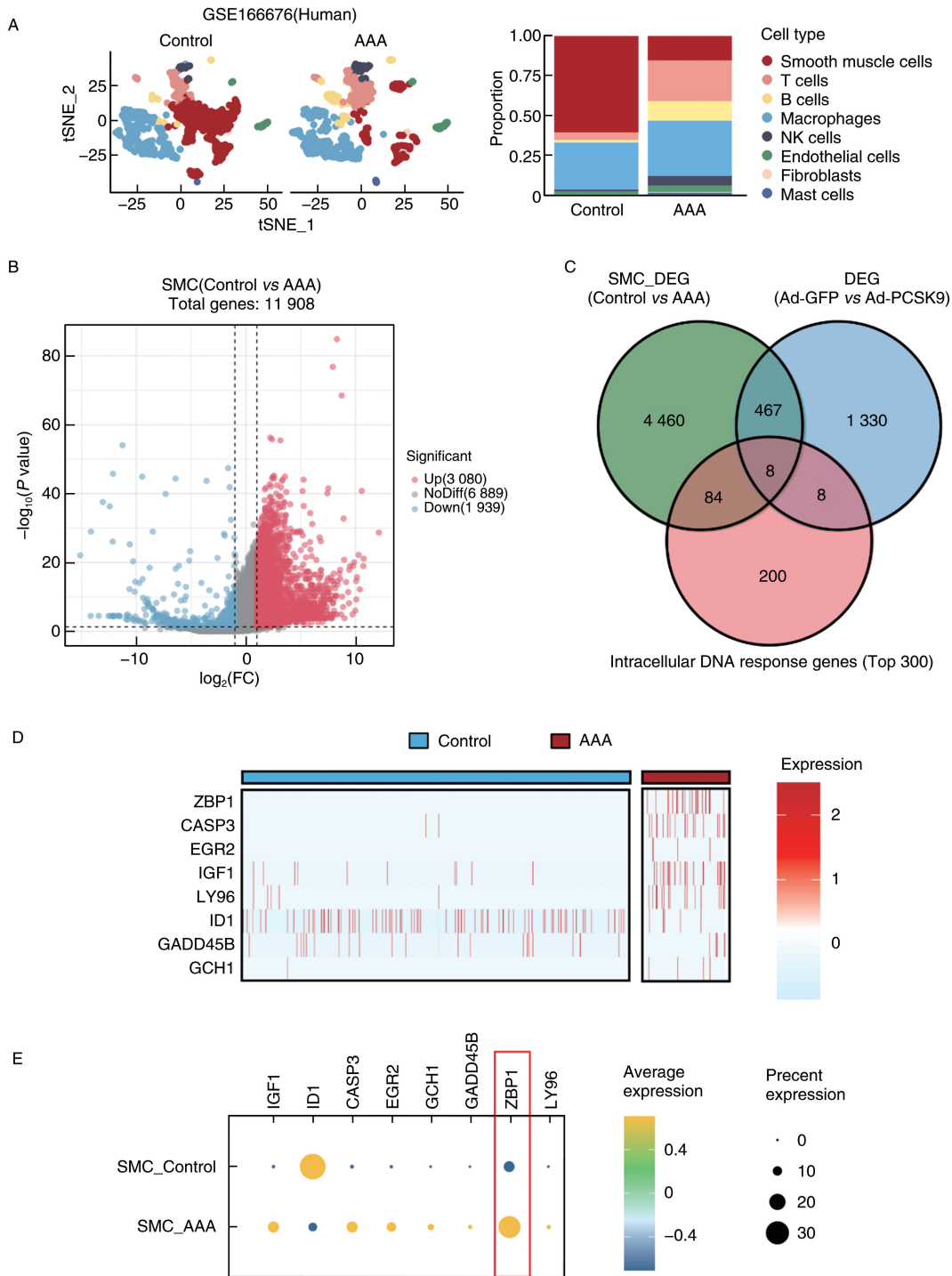


图 4. ZBP1 可能是 PCSK9 介导 mVSMC 线粒体损伤的下游效应分子

A 为细胞聚类投影及统计,B 为火山图,C 为韦恩图,D 为热图,E 为基因气泡图。

Figure 4. ZBP1 may be a downstream effector of PCSK9 mediated mitochondrial damage in mVSMC

2.5 ZBP1 在人和小鼠 AAA 中表达增高且与 VSMC 存在共定位

为了进一步验证 ZBP1 的可能作用,从 GEO 数据库下载了 4 个外部数据集 GSE7084、GSE57691、GSE140947 和 GSE183464 进行验证。结果发现,与对应对照组相比,AAA 中 ZBP1 均显著上调。免疫

组织化学结果显示,与人或小鼠正常腹主动脉组织相比,人和小鼠 AAA 中 ZBP1 表达升高($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示,ZBP1 在人和小鼠 AAA VSMC 中的表达明显增高,且两者存在共定位(图 5)。以上结果表明,ZBP1 可能是 Ang II 引起 mVSMC 线粒体损伤的下游效应分子。

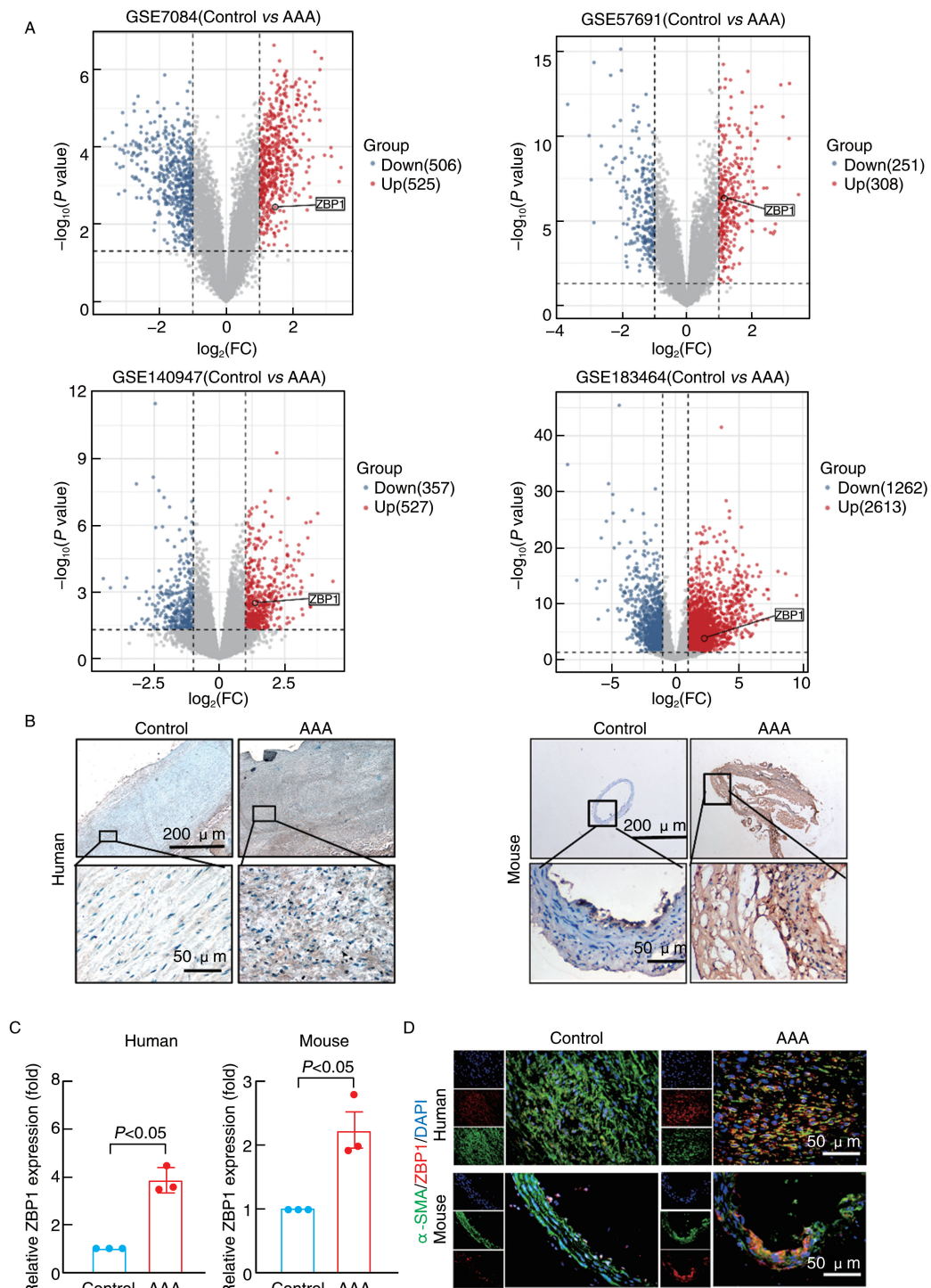


图 5. ZBP1 在 AAA 中的表达增加并与 VSMC 存在共定位($n = 3$)

A 为差异分析火山图,B,C 为人和小鼠 AAA 中 ZBP1 表达增加,D 为人和小鼠 AAA 中 ZBP1 和 α -SMA 存在共定位。

Figure 5. The expression of ZBP1 increased in AAA and colocalized with VSMC($n = 3$)

2.6 Ang II 促进 mVSMC 中 ZBP1 表达并由 PCSK9 介导
用 0、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 处理 mVSMC 24 h, 结果发现, Ang II 呈浓度依赖性促进 ZBP1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 PCSK9 过表达 mVSMC 模型中, 与 AdGFP 组相比, PCSK9 过表达组 ZBP1 蛋白表达增加 ($P < 0.01$), 表明 PCSK9 可促进

mVSMC 中 ZBP1 表达。在 PCSK9 敲低 mVSMC 模型中, 与 siNC 组相比, siNC+Ang II 组 ZBP1 蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 与 siNC+Ang II 相比, siPCSK9+Ang II 组 ZBP1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$; 图 6), 表明 PCSK9 可调控 ZBP1 的表达。以上结果表明, Ang II 增加 mVSMC 中 ZBP1 表达可能由 PCSK9 介导。

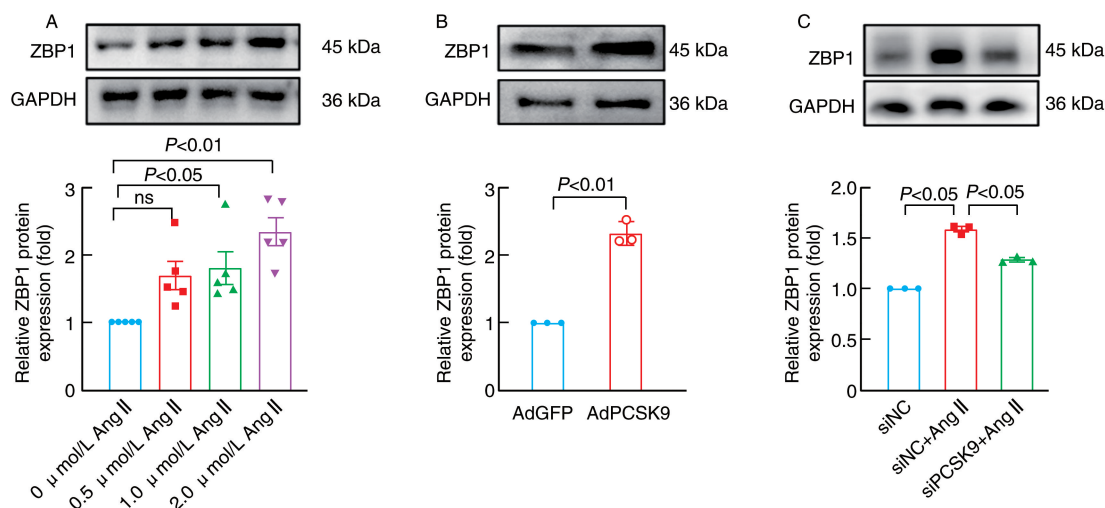


图 6. Ang II 通过 PCSK9 促进 mVSMC 中 ZBP1 蛋白表达

A 为 Ang II 呈浓度依赖性增加 mVSMC 中 ZBP1 蛋白表达 ($n=5$), B、C 为过表达或敲低 PCSK9 增加或降低 mVSMC 中 ZBP1 蛋白表达 ($n=3$)。

Figure 6. Ang II promoted the expression of ZBP1 protein in mVSMC via PCSK9

3 讨论

AAA 可由氧化应激、炎症、动脉粥样硬化、遗传因素、自身免疫等多因素诱发^[15], AAA 破裂是一种 30 天内死亡率大于 70% 的心血管急症^[16], 严重危及人类生命健康。线粒体是机体供能的主要细胞器, 通过调节能量代谢维持细胞稳态, 参与机体各项生命活动, 线粒体损伤可引起细胞稳态失衡, 导致细胞凋亡, 加速多种疾病进程^[17-19], 其中也包括心血管疾病^[20]。目前, 多项研究发现线粒体功能障碍与 AAA 的发生发展存在密切联系, 恢复 VSMC 中的线粒体代谢是 AAA 治疗的有效手段^[21]。PCSK9 被认为可能是一种治疗 AAA 的新型药物靶点^[22]。有研究发现 PCSK9 可通过促进 VSMC 线粒体功能障碍和凋亡降低颈动脉斑块稳定性^[13]。PCSK9 还可通过与受损的 mtDNA 相互作用引起 VSMC 凋亡^[14]。由此推测 PCSK9 通过引起 VSMC 线粒体损伤加速 AAA 的疾病进程。

本研究分别检测了人和小鼠腹主动脉组织中 PCSK9 的表达, 免疫组织化学和免疫荧光结果显示, 在 AAA 的 VSMC 中存在 PCSK9 表达升高。使

用 Ang II 处理构建细胞 AAA 模型, 结果发现, 在 mVSMC 中 PCSK9 表达明显增高。这些结果提示, PCSK9 可能在 AAA 的发生发展中发挥作用, 并与 VSMC 有关。本研究进一步探讨了 PCSK9 对 VSMC 线粒体功能的影响, 通过检测各项线粒体功能指标, 发现过表达 PCSK9 可引起 mVSMC 线粒体功能损伤, 使用 Ang II 处理 mVSMC 后发现线粒体功能明显受损, 在此基础上 PCSK9 敲低处理可以明显减轻线粒体功能障碍。进一步验证了 Ang II 通过 PCSK9 引起 VSMC 线粒体损伤。

此外, 本研究还对 PCSK9 介导 VSMC 线粒体损伤的下游效应分子进行了探讨, 通过单细胞测序和差异分析筛选出 ZBP1 可能是其下游效应分子。ZBP1 是一种先天免疫传感器^[23], 研究显示 ZBP1 可调节炎性小体激活和促炎反应, 是炎症反应的中心调节因子^[24]。而炎症正是 AAA 的主要发病机制之一, 这为 ZBP1 是 AAA 组织中 PCSK9 介导 VSMC 线粒体损伤的下游效应分子的猜测提供了佐证。研究还发现, ZBP1 在多种细胞的凋亡中发挥关键作用^[25], 而线粒体损伤与细胞凋亡存在着密切联系^[12], 并且 mtDNA 受损可促进心肌细胞中 ZBP1 表

达,从而加重心肌毒性^[26],这为上述猜想提供了又一佐证,提示 PCSK9 介导 VSMC 线粒体损伤后可能通过促进 ZBP1 基因表达诱发 VSMC 凋亡,从而参与 AAA 的发生发展。本研究通过对多个不同 AAA 相关数据集进行差异分析,结果发现,在 AAA 中 ZBP1 基因均上调,免疫荧光及免疫组织化学结果也显示在 AAA 的 VSMC 中 ZBP1 表达明显增加,过表达 PCSK9 以及 Ang II 处理均可促进 ZBP1 蛋白表达,敲低 PCSK9 可减少 Ang II 引起的 ZBP1 蛋白表达增高。这些为 PCSK9 可能通过介导 VSMC 线粒体损伤促进 ZBP1 表达加速 AAA 的疾病进程这一猜想提供了依据。

综上所述,Ang II 可引起 mVSMC 线粒体损伤并由 PCSK9 介导,Ang II 还可促进 mVSMC 中 ZBP1 蛋白表达并同样由 PCSK9 介导,并且 PCSK9 可能是通过介导 VSMC 线粒体损伤激活下游分子 ZBP1 引起细胞损伤影响 AAA 的发展。这可能成为 AAA 新的治疗靶点,为 AAA 的治疗提供新方向。

[参考文献]

- [1] SAKALIHASAN N, LIMET R, DEFAWE O D. Abdominal aortic aneurysm[J]. *Lancet*, 2005, 365(9470): 1577-1589.
- [2] DAUGHERTY A, CASSIS L A. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2002, 4(3): 222-227.
- [3] LÓPEZ-CANDALES A, HOLMES D R, LIAO S, et al. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms[J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(3): 993-1007.
- [4] GOLLEDGE J, DALMAN R L, NORMAN P E. Developments in non-surgical therapies for abdominal aortic aneurysm[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009, 7(2): 153-158.
- [5] HUMMELGAARD S, VILSTRUP J P, GUSTAFSEN C, et al. Targeting PCSK9 to tackle cardiovascular disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 249: 108480.
- [6] DING Z, POTHINENI N V K, GOEL A, et al. PCSK9 and inflammation: role of shear stress, pro-inflammatory cytokines, and LOX-1[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5): 908-915.
- [7] MELENDEZ Q M, KRISHNAJI S T, WOOTEN C J, et al. Hypercholesterolemia: The role of PCSK9[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 625-626: 39-53.
- [8] ZHANG M, CHEN Y, QIU Y, et al. PCSK9 promotes hypoxia-induced EC pyroptosis by regulating Smac mitochondrion-cytoplasm translocation in critical limb ischemia[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2023, 8(9): 1060-1077.
- [9] GREEN D R, GALLUZZI L, KROEMER G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging[J]. *Science*, 2011, 333(6046): 1109-1112.
- [10] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909-950.
- [11] LYU Y, WANG T, HUANG S, et al. Mitochondrial damage-associated molecular patterns and metabolism in the regulation of innate immunity[J]. *J Innate Immun*, 2023, 15(1): 665-679.
- [12] SINGH K K. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability[J]. *FEMS Yeast Res*, 2004, 5(2): 127-132.
- [13] XU R, LI T, LUO J, et al. PCSK9 increases vulnerability of carotid plaque by promoting mitochondrial dysfunction and apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(2): e14640.
- [14] WANG X, LI X, LIU S, et al. PCSK9 regulates pyroptosis via mtDNA damage in chronic myocardial ischemia[J]. *Basic Research in Cardiology*, 2020, 115(6): 66.
- [15] NORDON I M, HINCHLIFFE R J, HOLT P J, et al. Review of current theories for abdominal aortic aneurysm pathogenesis[J]. *Vascular*, 2009, 17(5): 253-263.
- [16] TCHANA-SATO V, SAKALIHASAN N, DEFRAIGNE J O. Ruptured abdominal aortic aneurysm[J]. *Rev Med Liege*, 2018, 73(5-6): 296-299.
- [17] WIKRAMANAYAKE T C, CHÉRET J, SEVILLA A, et al. Targeting mitochondria in dermatological therapy: beyond oxidative damage and skin aging[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2022, 26(3): 233-259.
- [18] LI A L, LIAN L, CHEN X N, et al. The role of mitochondria in myocardial damage caused by energy metabolism disorders: from mechanisms to therapeutics[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 208: 236-251.
- [19] ROSSI A, ASTHANA A, RIGANTI C, et al. Mitochondria transplantation mitigates damage in an in vitro model of renal tubular injury and in an *ex vivo* model of DCD renal transplantation[J]. *Ann Surg*, 2023, 278(6): e1313-e26.
- [20] ALI M A, GIOSCIA-RYAN R, YANG D, et al. Cardiovascular aging: spotlight on mitochondria[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 326(2): H317-H333.
- [21] SUN L Y, LYU Y Y, ZHANG H Y, et al. Nuclear receptor NR1D1 regulates abdominal aortic aneurysm development by targeting the mitochondrial tricarboxylic acid cycle enzyme aconitase-2[J]. *Circulation*, 2022, 146(21): 1591-1609.
- [22] GOLLEDGE J, LU H S, SHAH S. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as a drug target for abdominal aortic aneurysm[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2024, 35(5): 241-247.
- [23] HAO Y, YANG B, YANG J, et al. ZBP1: A powerful innate immune sensor and double-edged sword in host immunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10224.
- [24] KURIAKOSE T, KANNEGANTI T D. ZBP1: innate sensor regulating cell death and inflammation[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(2): 123-134.
- [25] CHEN X Y, DAI Y H, WAN X X, et al. ZBP1-mediated necroptosis: mechanisms and therapeutic implications[J]. *Molecules*, 2022, 28(1): 52.
- [26] LEI Y, VANPORTFLIET J J, CHEN Y F, et al. Cooperative sensing of mitochondrial DNA by ZBP1 and cGAS promotes cardiotoxicity[J]. *Cell*, 2023, 186(14): 3013-32. e22.