

本文引用: 吴玄霜, 赵伊梦, 孙玉慧, 等. PCSK9 通过线粒体凋亡途径介导硝基化 LDL 促 HUVEC 凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(3): 201-210. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.03.003.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-03-0201-10

• 实验研究 •

PCSK9 通过线粒体凋亡途径介导硝基化 LDL 促 HUVEC 凋亡

吴玄霜¹, 赵伊梦¹, 孙玉慧², 刘录山¹

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬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; 2. 江门国际旅行卫生保健中心, 广东省江门市 529030

[摘要] **[目的]** 探究前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 在硝基化低密度脂蛋白 (N-LDL) 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用及其分子机制。**[方法]** 利用公开可获得的转录组数据集开展差异表达分析, 以评估相关疾病中 N-LDL 水平与 PCSK9 表达的相关性。通过 N-LDL 处理人脐静脉内皮细胞诱导细胞凋亡, 并采用 Hoechst33342/碘化丙啶 (PI) 染色法进行检测。运用 Western blot 检测凋亡相关分子的表达情况。利用二氢乙啶 (DHE) 和 JC-1 探针分别检测活性氧 (ROS) 的生成水平及线粒体膜电位变化。采用油红 O 染色法评估人脐静脉内皮细胞内的脂质蓄积状况。通过 siRNA 技术实现 PCSK9 的敲低。**[结果]** N-LDL 处理人脐静脉内皮细胞后, 与对照组和 LDL 组相比, 细胞活力显著降低 ($P < 0.01$); Western blot 结果显示, 促凋亡蛋白 Caspase-9、Caspase-3 和 Bax 的表达显著升高 ($P < 0.05$), 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则显著降低 ($P < 0.01$); Hoechst33342/PI 荧光双染结果显示, PI 阳性细胞数量增多, 提示细胞发生凋亡。N-LDL 以剂量依赖性方式上调胆固醇代谢关键转录因子固醇调节元件结合蛋白 2 (SREBP2) 及其下游靶蛋白 PCSK9 的表达 ($P < 0.05$), 且二者变化趋势一致。油红 O 染色结果表明, 经 N-LDL 处理后, 细胞内脂质蓄积显著增加。流式细胞术和细胞荧光检测结果表明, 经 N-LDL 处理后, 细胞内 ROS 生成增多, 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$), 提示线粒体功能障碍的发生。沉默 PCSK9 后, N-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞线粒体功能障碍及凋亡均得到显著逆转; ROS 生成减少, 线粒体膜电位恢复; Caspase-9、Caspase-3 和 Bax 的表达下调, Bcl-2 的表达上调; PI 阳性细胞数减少 ($P < 0.05$)。**[结论]** N-LDL 通过上调 SREBP2 的表达, 促进 PCSK9 的表达, 进而激活线粒体凋亡通路, 最终诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 硝基化低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 线粒体凋亡途径; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

PCSK9 mediates N-LDL-induced apoptosis of HUVEC via the mitochondrial apoptotic pathway

WU Xuanshuang¹, ZHAO Yimeng¹, SUN Yuhui², LIU Lushan¹

1. 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; 2. Jiangmen International Travel Healthcare Center, Jiangmen, Guangdong 529030, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by nitrated low density lipoprotein (N-LDL) and its molecular mechanism. **Methods** Differential expression analysis was performed using publicly available transcriptome datasets to assess the correlation between N-LDL and PCSK9 expression in relevant diseases. Human umbilical vein endothelial cells were treated with N-LDL to induce apoptosis, which was detected by Hoechst33342/propidium iodide (PI) staining. Expression of apoptosis-related molecules was assessed by Western blot. Reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial membrane potential were measured using dihydroethidium (DHE) and JC-1 probes, respectively. Lipid accumulation in human umbilical vein endothelial cells was evaluated by oil red O staining. PCSK9 knockdown was achieved

[收稿日期] 2026-01-16

[修回日期] 2026-03-08

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (2021JJ30596)

[作者简介] 吴玄霜, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化及其发病机制, E-mail: 18274799745@163.com。刘录山, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及其发病机制, E-mail: liuls2000@163.com。

using siRNA. **Results** Following N-LDL treatment of human umbilical vein endothelial cells, CCK-8 assay results demonstrated a significant decrease in cell viability compared with both the control and LDL groups ($P < 0.01$). Western blot analysis showed markedly increased expression of the pro-apoptotic proteins Caspase-9, Caspase-3 and Bax, accompanied by a significant reduction in the anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.01$). Hoechst33342/PI double staining revealed an increased number of positive cells, indicating the occurrence of apoptosis. N-LDL upregulated the protein expression of the key cholesterol metabolism transcription factor sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) and its downstream target protein PCSK9 in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), with a consistent trend of both. Oil red O staining demonstrated that N-LDL treatment promoted intracellular lipid accumulation. Moreover, flow cytometry and fluorescence analyses showed that N-LDL increased intracellular reactive oxygen species (ROS) production and significantly reduced mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), indicating mitochondrial dysfunction. Notably, silencing PCSK9 significantly reversed these N-LDL-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic alterations in human umbilical vein endothelial cells, as evidenced by reduced ROS production, restoration of mitochondrial membrane potential, decreased expression of Caspase-9, Caspase-3 and Bax, upregulated Bcl-2 expression, and a decreased number of PI-positive cells ($P < 0.05$). **Conclusion** N-LDL upregulates SREBP2 expression, promotes the expression of PCSK9, thereby activating the mitochondrial apoptosis pathway, and ultimately inducing apoptosis in human umbilical vein endothelial cells.

[**KEY WORDS**] proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; nitrated low density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis; mitochondrial apoptosis pathway; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)被认为是大多数心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的关键病理机制与重要病理基础。As的发生发展与多种危险因素相关,其中,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的形成及其随后通过清道夫受体在动脉壁内被巨噬细胞摄取,被认为是As发病机制中最重要的因素之一^[1]。尽管多种抗氧化剂已在临床得到广泛应用,但其在降低CVD的发病率与死亡率方面并未显示出显著效果,这表明抗氧化药物在CVD临床治疗中尚未达到预期效果^[2]。研究发现,与普通人群相比,类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)和骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者的动脉粥样硬化性心血管疾病的发病率与死亡率均更高^[3-4]。同样,2型糖尿病患者发生CVD(包括心肌梗死、卒中和心力衰竭)的风险亦显著升高^[5]。硝基化低密度脂蛋白(nitrated low density lipoprotein, N-LDL)是一种非氧化修饰脂蛋白。研究发现,与健康个体相比,同时患有RA和OA的CVD患者,其血清N-LDL水平更高^[6];此外,2型糖尿病患者的硝基酪氨酸水平也显著高于对照组^[7]。上述发现提示,N-LDL可能与多种疾病中As发生率的升高相关,其具体机制有待进一步深入探讨。

血管内皮细胞损伤及功能改变是As的初始触发因素^[8],血管内皮细胞凋亡可破坏内皮的完整性,从而启动并加速As进展^[9]。细胞凋亡途径包括外源性途径、线粒体途径以及内质网途径^[10]。多种危险因素(包括高血糖、胆固醇过载和ox-LDL)均

可诱导血管内皮细胞凋亡^[11]。作为一种新型非氧化修饰的脂蛋白,N-LDL在内皮细胞凋亡中的作用仍不明确。因此,阐明N-LDL在As中内皮细胞凋亡的作用及机制,对于RA、OA和糖尿病相关CVD的预防与治疗具有重要意义。

前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)除通过固醇调节元件结合蛋白2(sterol regulatory element-binding protein 2, SREBP2)/PCSK9胆固醇调控途径参与As外^[12],还可参与细胞凋亡、炎症反应及感染相关过程^[13]。本研究团队既往研究显示,PCSK9 siRNA可抑制ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)凋亡^[14]。PCSK9是否通过介导N-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡,进而促进RA、OA及糖尿病患者中As的发生,仍有待进一步研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

HUVEC(Procell Life Science & Technology Co., Ltd.), RPMI-1640培养基(Gibco), siRNA(广州锐博), RIPA裂解液(Beyotime), 3-硝基酪氨酸抗体(Bioss), PCSK9抗体(ABclonal), Caspase-9、Caspase-3、Bax、Bcl-2、SREBP2和GAPDH抗体(ProteinTech), Hoechst33342染液(Solarbio), 碘化丙啶(propidium iodide, PI; Abiowell), 二氢乙啶(dihydroethidium, DHE; KeyGen Biotech), JC-1染料

(Bioscience)。

1.2 细胞培养与处理

HUVEC 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,培养条件为 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱。所有实验中,细胞均按所示接种密度接种于相应培养板,处理前需先过夜贴壁培养。HUVEC 转染 PCSK9 siRNA 后,在规定时间内继续培养,随后开展后续处理。

1.3 Western blot 检测

细胞用 PBS 清洗 3 次后,加入含蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30 min;裂解液以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液;蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜;膜在室温摇床条件下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,或于 4 ℃ 过夜封闭;随后,膜于 4 ℃ 与一抗孵育过夜;用 PBS 洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗孵育 90 min。采用增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)法检测蛋白表达。

1.4 细胞活力检测

将 HUVEC 以每孔 2×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内过夜培养;细胞分别用 LDL 或 N-LDL 处理 24 h;随后,每孔加入 10 μL CCK-8 工作液,于 37 ℃ 孵育 4 h。使用分光光度计在 450 nm 处测定吸光度。

1.5 Hoechst33342/PI 染色实验

将 HUVEC 接种于 24 孔板中培养,并用 LDL 或 N-LDL 处理 24 h。细胞用 PBS 清洗 3 次后,每孔加入 150 μL Hoechst33342 染液,于 37 ℃ 避光孵育 20 min;随后用 PBS 清洗,再加入 PI,于 37 ℃ 避光孵育 20 min;用 PBS 清洗 3 次后,在荧光显微镜下观察细胞染色情况。

1.6 活性氧检测

采用 DHE 检测活性氧(reactive oxygen species,ROS)生成。将 HUVEC 接种于 12 孔板中培养,并分别用 PCSK9 siRNA 或 N-LDL 处理;用 PBS 清洗后,加入 DHE 并于 37 ℃ 避光孵育 30 min;随后用 PBS 清洗 3 次,通过荧光显微镜采集荧光图像。

1.7 线粒体膜电位检测

采用 JC-1 染料,结合荧光显微镜观察与流式细胞术检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)。HUVEC 用 PBS 清洗后,于室温下以 1 000 r/min 离心 5 min;弃去上清液,将细胞重悬于 500 μL JC-1 工作液中,在 37 ℃、5% CO₂ 的条件下

孵育 15 min;随后以 1 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 重悬细胞,进行荧光显微镜观察及流式细胞术分析。

1.8 油红 O 染色

将 HUVEC 接种于 24 孔板中培养,并分别用 LDL 或 N-LDL 处理;细胞用 PBS 清洗 3 次后,采用 4% 多聚甲醛固定 30 min;再以双蒸水清洗 3 次后,每孔加入 300 μL 油红 O 染色工作液孵育 15 min;随后使用 60% 异丙醇分化 3~5 s 以去除背景染色;用苏木精复染细胞核,并在荧光显微镜下观察。

1.9 N-LDL 的制备与鉴定

N-LDL 按照既往报道的方法制备^[15]。将 -80 ℃ 保存的 85 mmol/L NaONaOONa 储备液置于冰上解冻,并按 40:1 的比例用 0.3 mmol/L NaOH 稀释,以获得稳定的 NaONaOONa/NaOH 混合液。采用紫外-可见分光光度法在 $\lambda_{\max} = 302$ nm 处测定 ONOO⁻ 浓度,计算约为 73.56 mmol/L。取过量上述混合液与天然 LDL 在 37 ℃ 孵育 90 min;随后,反应混合物通过半透膜在 PBS 中透析 24 h,透析液体积为样品体积的 100 倍以上;最终产物视为纯化的 N-LDL。将制备的 N-LDL 与 LDL 样品与上样缓冲液混匀,在 0.5×TBE 缓冲液中进行琼脂糖凝胶电泳(150 V, 30 min);电泳结束后,将凝胶置于室温摇床上用考马斯亮蓝染色 2 h,随后转入等体积脱色液中脱色;1~2 h 内即可观察到清晰的蛋白条带。

1.10 生物信息学分析

从 GEO 数据库下载 mRNA 表达数据集 GSE89408。首先提取 28 例健康对照组滑膜组织样本和 22 例 OA 组滑膜组织样本;经数据过滤与质量控制后,最终保留 23 例健康样本和 18 例 OA 样本。所有样本均基于 GPL11154 平台(Illumina HiSeq 2000, Homo sapiens)生成。原始 RNA-seq 计数数据通过 R 软件(4.5.1 版)及 Bioconductor 相关程序包进行处理,数据标准化与差异表达分析则由 DESeq2 完成。以 $|\log_2 FC| > 1$ 且校正后 P 值 < 0.05 为阈值筛选差异表达基因(differentially expressed gene,DEG)。火山图通过“ggplot2”程序包绘制。采用 Wilcoxon 秩和检验评估 OA 组与健康对照组滑膜组织中 PCSK9 的表达差异,并通过 R 软件绘制箱线图。

1.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 和 Image J 软件完成统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立组间比较采用双侧 t 检验,三组及以上比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。每项实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 N-LDL 诱导 HUVEC 凋亡

琼脂糖凝胶电泳结合考马斯亮蓝染色结果显示,LDL 经硝基化处理后,其电泳迁移率发生改变(图 1A);Western blot 分析进一步证实了 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine,3-NT)的存在(图 1B)。上述结果表明 N-LDL 制备成功。为确定合适的实验条件,依据文献[16]中 N-LDL 的处理剂量,将 HUVEC 分别用不同剂量的 N-LDL(0、40、80 及 120 mg/L)处理 12、24 和 48 h。CCK-8 检测结果显示,80 mg/L N-LDL 处理 24 h 可使细胞活力降低至对照组的 57.7% ($P<0.01$),40 mg/L N-LDL 处理 24 h 则可使细胞活力降低至对照组的 86.6% ($P<0.05$;图 1C-D)。因此,后续实验选用 40 mg/L 和 80 mg/L N-LDL 并孵育 24 h。为进一步探究 N-LDL 是否诱导 HUVEC 凋

亡,将细胞用不同剂量的 N-LDL 处理 24 h 后,采用 Hoechst33342/PI 双染法进行分析。结果显示,PI 阳性细胞数随着 N-LDL 剂量的升高而增加(图 1E)。Western blot 结果显示,与对照组相比,经 40 mg/L 和 80 mg/L N-LDL 处理的 HUVEC 中,Caspase-9 的表达水平分别上调 73.5% 和 125.0%,Caspase-3 的表达水平分别上调 67.1% 和 96.8%,Bax 的表达水平分别上调 100.5% 和 151.0%,Bcl-2 的表达水平分别下调 38.4% 和 48.4% (均 $P<0.05$);与 LDL 组相比,经 80 mg/L N-LDL 处理的 HUVEC 中,Caspase-9 的表达水平上调 97.6%,Caspase-3 的表达水平上调 84.8%,而经 40 mg/L 和 80 mg/L N-LDL 处理的 HUVEC 中,Bax 的表达水平分别上调 58.6% 和 99.2%,Bcl-2 的表达水平分别下调 34.6% 和 45.2% (均 $P<0.05$;图 1F-I)。上述结果表明,N-LDL 可诱导 HUVEC 发生凋亡。

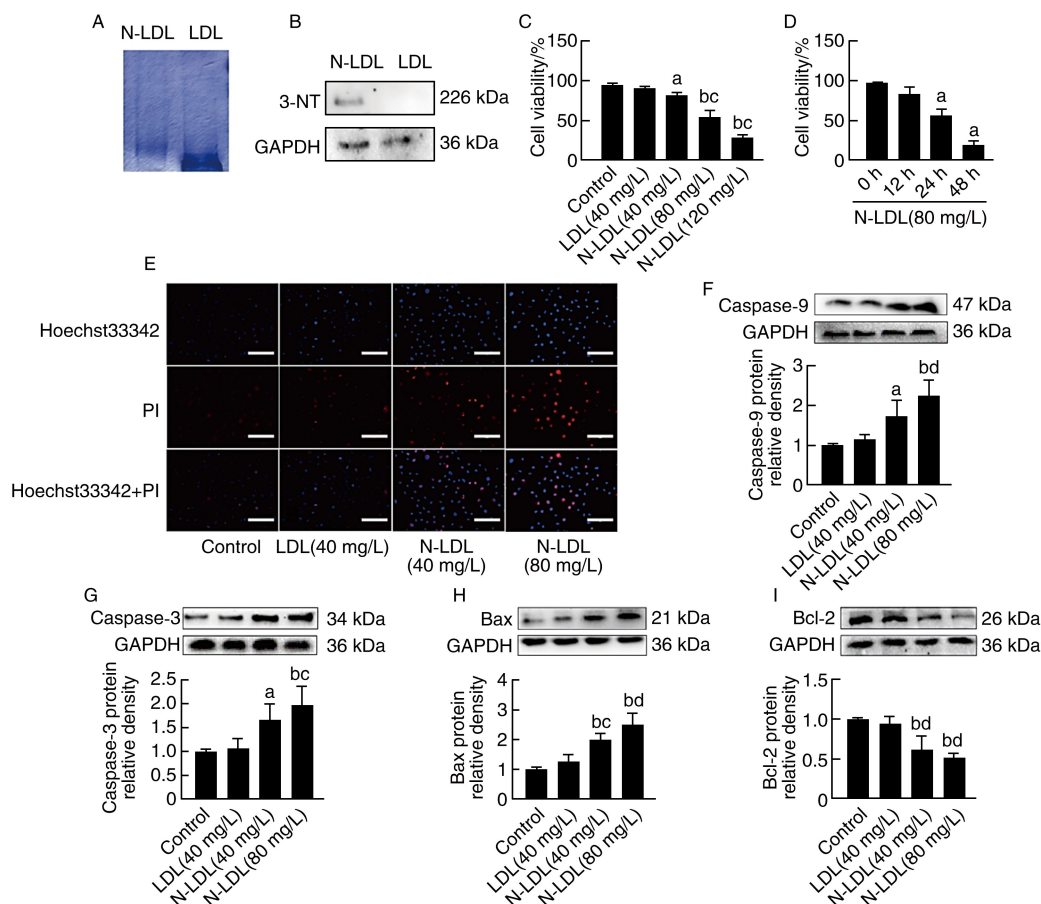


图 1. N-LDL 诱导 HUVEC 凋亡

A: 考马斯亮蓝染色显示 LDL 硝基化前后电泳迁移率的变化;B: Western blot 检测 LDL 硝基化前后 3-NT 的表达;C: CCK-8 检测不同浓度 N-LDL 处理 24 h 后细胞活力(a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.01$, 与 40 mg/L LDL 组比较);D: CCK-8 检测 80 mg/L N-LDL 处理不同时间后细胞活力(a 为 $P<0.01$, 与 0 h 比较);E: Hoechst33342/PI 染色显示不同浓度 N-LDL 处理后 HUVEC 的凋亡情况(比例尺=150 μm);F-I: Western blot 检测 HUVEC 在 LDL(40 mg/L)或 N-LDL(40、80 mg/L)处理 24 h 后凋亡相关蛋白 Caspase-9、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达(a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 40 mg/L LDL 组比较)。

Figure 1. N-LDL induces apoptosis in HUVEC

2.2 N-LDL 上调 SREBP2 和 PCSK9 表达并促进 HUVEC 脂质蓄积

为探讨 PCSK9 与 N-LDL 水平升高相关疾病 OA 之间的表达变化,首先利用 GEO 数据库公开的 OA 转录组数据集 GSE89408 检测滑膜组织中 PCSK9 的表达。将样本分为 OA 组与健康对照组,并对数据质量进行评估(图 2A)。差异表达分析显示,与健康对照组相比,OA 组滑膜组织中共有 1 461 个基因表达上调,1 714 个基因表达下调,相关火山图结果见图 2B。箱线图分析显示,OA 组滑膜组织中 PCSK9 的表达水平较健康对照组升高($P<0.05$;图 2C)。随后,为进一步明确 N-LDL 调控 PCSK9 表达的分子机制,将 HUVEC 分别用 40 mg/L 和 80 mg/L N-LDL 处理 24 h。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,经 40 mg/L 和 80 mg/L N-LDL 处理的 HUVEC 中,SREBP2 的表达水平分别上调 34.4% 和 63.6%,PCSK9 的表达水平则分别上调 95.6% 和 175.0% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 LDL 组相比,40 mg/L

和 80 mg/L N-LDL 处理的 HUVEC 中,SREBP2 的表达水平分别上调了 29.9% 和 58.1%,PCSK9 的表达水平分别上调了 38.4% 和 94.8% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图 2D-E)。研究表明,SREBP2 是已知的 PCSK9 转录调控因子^[17],这提示 N-LDL 可能通过激活 SREBP2 通路来上调 PCSK9 的表达。鉴于 SREBP2/PCSK9 途径可通过促进低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)降解调控胆固醇稳态,进一步检测了 LDLR 的表达水平及细胞内脂质蓄积情况。Western blot 结果显示,与对照组和 LDL 组相比,N-LDL 处理后 LDLR 蛋白表达无显著变化($P>0.05$;图 2F)。不过,油红 O 染色结果表明,与对照组和 LDL 组相比,经 N-LDL 处理的 HUVEC 内脂质蓄积有所增加(图 2G)。上述结果表明,尽管 N-LDL 可在 HUVEC 中上调 SREBP2 和 PCSK9 的蛋白表达,但并未降低 LDLR 的蛋白水平,这提示 HUVEC 对 N-LDL 的摄取可能并非主要依赖 LDLR 途径。

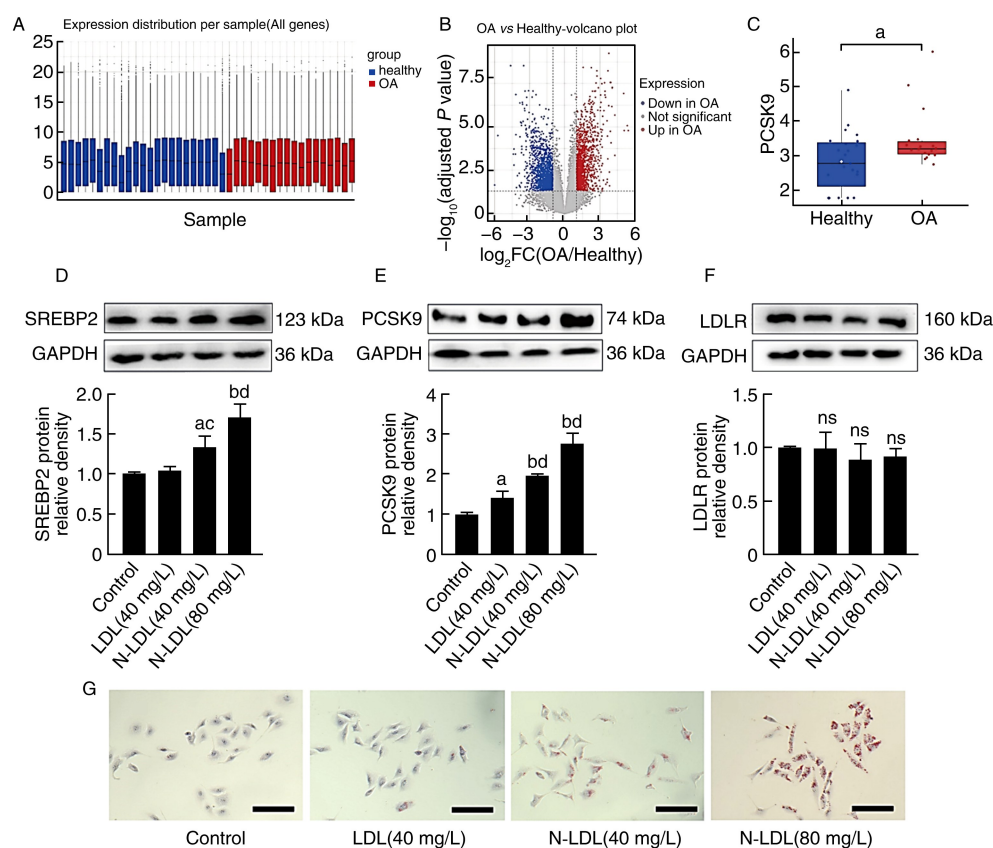


图 2. N-LDL 通过 SREBP2 上调 PCSK9 表达并促进 HUVEC 脂质蓄积

A: GSE89408 数据集中各样本总体基因表达分布的箱线图; B: OA 组与健康对照组滑膜组织差异表达基因的火山图; C: 滑膜组织中 PCSK9 的表达水平(a 为 $P<0.05$, 与健康对照组比较); D-F: Western blot 检测 HUVEC 经 LDL(40 mg/L) 或 N-LDL(40, 80 mg/L) 处理 24 h 后, SREBP2、PCSK9 和 LDLR 的蛋白表达(a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 40 mg/L LDL 组比较); G: 油红 O 染色检测 N-LDL 处理后, HUVEC 内脂质蓄积情况(比例尺 = 75 μm)。

Figure 2. N-LDL upregulates PCSK9 expression via SREBP2 and increases lipid accumulation in HUVEC

2.3 N-LDL 诱导 HUVEC 线粒体功能障碍

已有研究表明,PCSK9 能够对线粒体功能产生影响^[18]。因此,为明确 N-LDL 是否通过上调 PCSK9 表达,进而激活线粒体凋亡途径并损伤线粒体功能,将 HUVEC 分别用 40 mg/L 和 80 mg/L 的 N-LDL 处理 24 h。随后采用 JC-1 染色法,并结合荧光显微镜观察与流式细胞术检测,分析 MMP 的变化情况。流式细胞术结果显示,与对照组及

LDL (40 mg/L) 组相比,N-LDL 组 MMP 下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 3A-B)。荧光显微镜观察显示,与对照组及 LDL 组相比,N-LDL 组红色荧光减弱而绿色荧光增强,提示 MMP 降低 (图 3C); 经 N-LDL 处理后,线粒体 ROS 生成增加 (图 3D)。上述结果表明,N-LDL 可诱导 HUVEC 线粒体功能障碍。

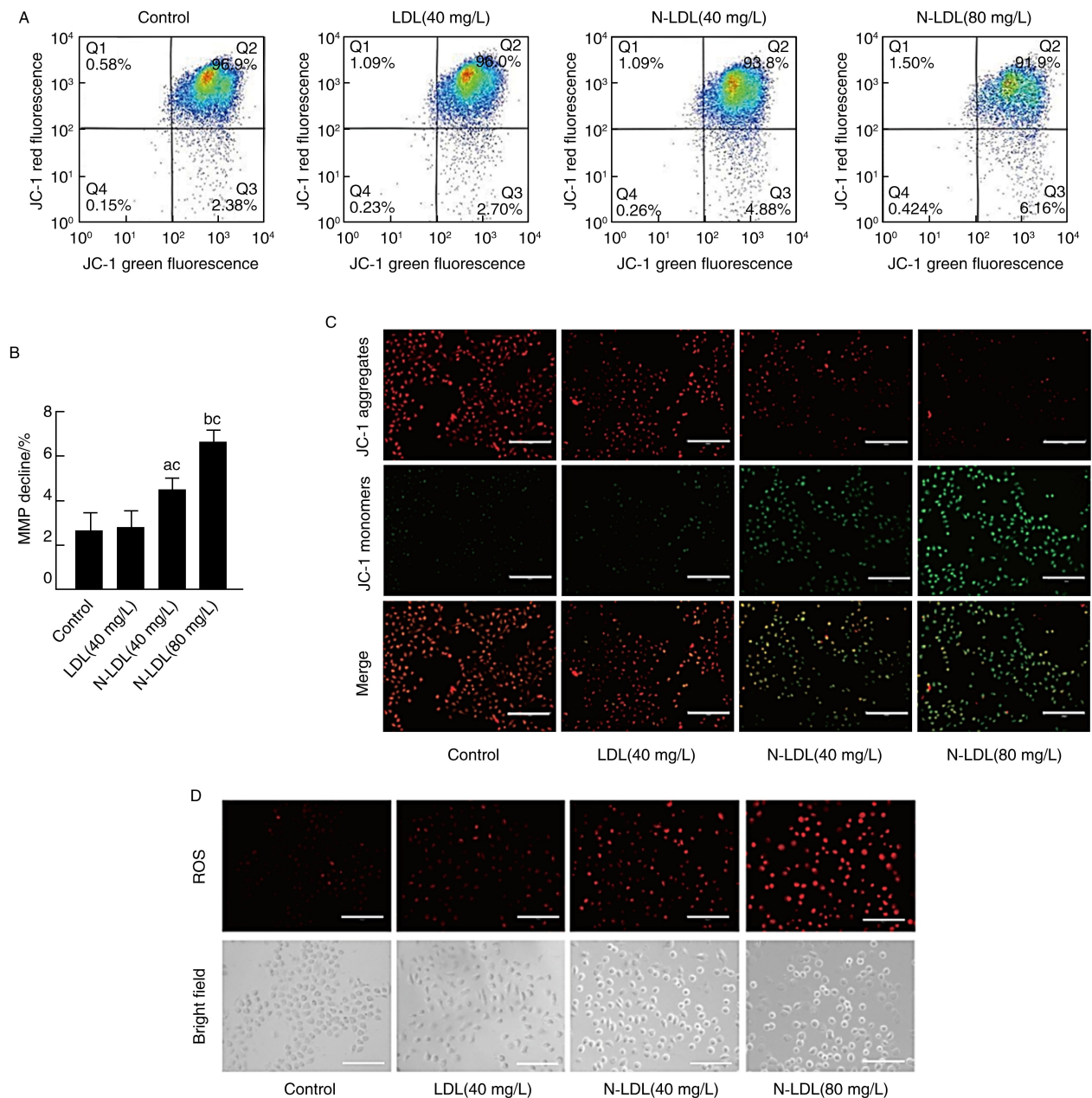


图 3. N-LDL 损伤 HUVEC 线粒体功能

A、B: 流式细胞术检测 HUVEC 经 LDL (40 mg/L) 或 N-LDL (40、80 mg/L) 处理 24 h 后的 MMP (a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 40 mg/L LDL 组比较); C: 荧光显微镜观察 HUVEC 经 LDL (40 mg/L) 或 N-LDL (40、80 mg/L) 处理 24 h 后的 MMP 变化 (比例尺 = 300 μm); D: 荧光显微镜观察 HUVEC 经 N-LDL 处理后线粒体 ROS 水平变化 (比例尺 = 150 μm)。

Figure 3. N-LDL impairs mitochondrial function in HUVEC

2.4 PCSK9 siRNA 可减轻 N-LDL 诱导的 HUVEC 线粒体功能障碍

为进一步评估在对细胞活力影响相对较小的条件下, N-LDL 是否通过上调 PCSK9 表达进而诱导线粒体功能障碍, 将 HUVEC 用 40 mg/L N-LDL 处理 24 h, 并采用 siRNA 沉默 PCSK9 表达。Western blot 结果证实 PCSK9 敲低效率达 52.7%, 沉默效果良好 ($P < 0.01$; 图 4A)。将 HUVEC 分为 4 组: 对照组、N-LDL (40 mg/L) 组、N-LDL (40 mg/L) + 阴性对照 (negative control, NC) siRNA 组及 N-LDL (40 mg/L) +

PCSK9 siRNA 组, 采用 JC-1 染色并结合荧光显微镜和流式细胞术检测 MMP。与对照组相比, N-LDL 组和 N-LDL + NC siRNA 组 MMP 均显著降低 ($P < 0.01$); 而在 N-LDL 处理的基础上, 沉默 PCSK9 可使 MMP 显著恢复 ($P < 0.05$; 图 4B-D)。进一步采用荧光显微镜检测线粒体 ROS 水平, 结果显示, 与对照组相比, N-LDL 处理可增强红色荧光强度, 而 PCSK9 siRNA 可减弱 N-LDL 诱导的红色荧光增强 (图 4E)。上述结果表明, 敲低 PCSK9 可减轻 N-LDL 诱导的 HUVEC 线粒体功能障碍。

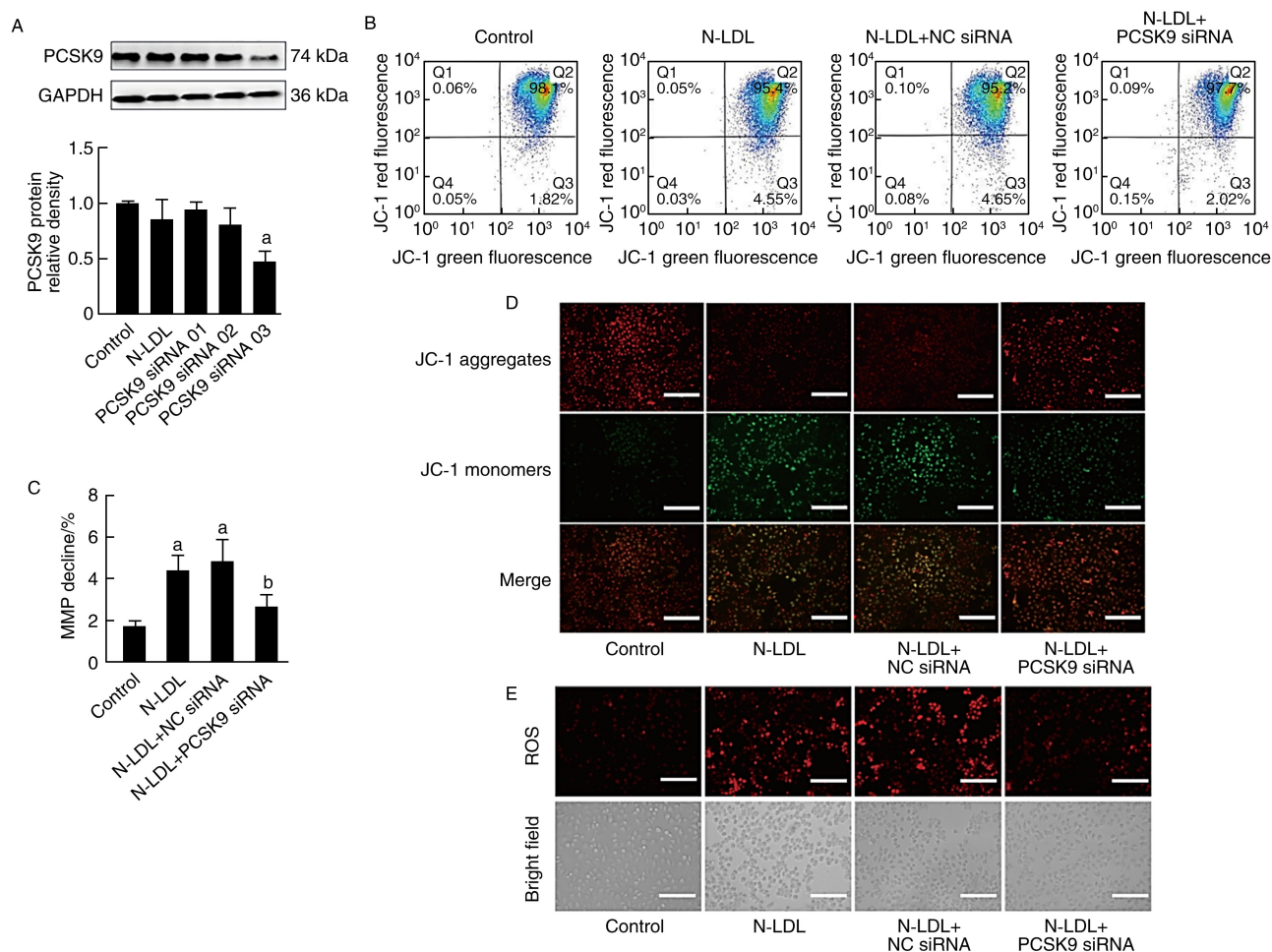


图 4. PCSK9 siRNA 减轻 N-LDL 诱导的 HUVEC 线粒体功能障碍

A: Western blot 检测 siRNA 干预后 PCSK9 蛋白的表达水平 (a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较); B, C: PCSK9 siRNA 干预并给予 N-LDL (40 mg/L) 处理后, 流式细胞术检测 MMP (a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 N-LDL 组比较); D: 荧光显微镜观察 PCSK9 siRNA 干预及 N-LDL 处理后 MMP 的变化 (比例尺 = 300 μm); E: 荧光显微镜观察 PCSK9 siRNA 干预及 N-LDL 处理后线粒体 ROS 水平的变化 (比例尺 = 150 μm)。

Figure 4. PCSK9 siRNA alleviates N-LDL-induced mitochondrial dysfunction in HUVEC

2.5 PCSK9 siRNA 通过调控线粒体凋亡途径抑制 N-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡

为进一步研究 PCSK9 siRNA 对 HUVEC 凋亡调控途径的影响, 将 HUVEC 分为 4 组: 对照组、N-LDL (40 mg/L) 组、N-LDL (40 mg/L) + NC siRNA 组及

N-LDL (40 mg/L) + PCSK9 siRNA 组。细胞转染 PCSK9 siRNA 72 h 后, 再以 N-LDL 继续处理 24 h。采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达。与对照组相比, N-LDL 组和 N-LDL + NC siRNA 组 Caspase-9 的表达水平分别上调了 73.7% 和 76.07%, Caspase-3

的表达水平分别上调了 77.6% 和 79.8%, Bax 的表达水平分别上调了 34.7% 和 44.3%, 而 Bcl-2 的表达水平分别降低了 26.7% 和 30.4% (均 $P < 0.01$)。相反, 敲低 PCSK9 后, 与 N-LDL 组相比, Caspase-9 的表达水平下调了 22.0%, Caspase-3 的表达水平下调了 21.3%, Bax 的表达水平下调了 17.3%, 而 Bcl-2

的表达水平上调了 27.7% (均 $P < 0.05$; 图 5A-D)。Hoechst33342/PI 双染结果显示, 与对照组相比, N-LDL 组和 N-LDL+NC siRNA 组 PI 阳性细胞数增加, 而 PCSK9 siRNA 可降低 PI 阳性细胞数 (图 5E)。上述结果表明, PCSK9 siRNA 可通过调控线粒体凋亡途径抑制 N-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡。

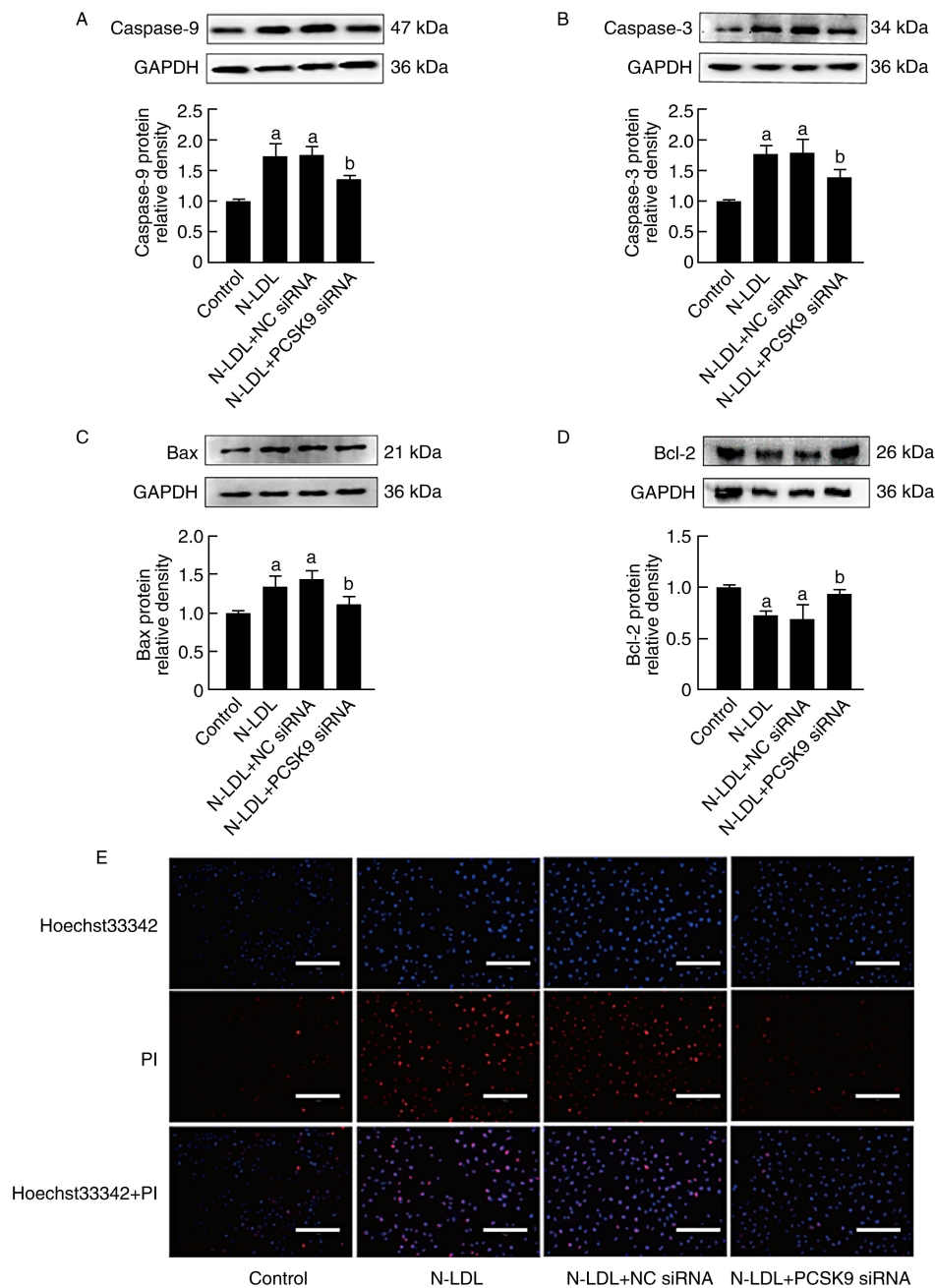


图 5. PCSK9 siRNA 通过调控线粒体凋亡途径抑制 N-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡

A-D: PCSK9 siRNA 干预并以 40 mg/L N-LDL 处理 24 h 后, Western blot 检测 HUVEC 中 Caspase-9、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 (a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 N-LDL 组比较); E: Hoechst33342/PI 染色检测 PCSK9 siRNA 对 N-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡的影响 (比例尺 = 150 μm)。

Figure 5. PCSK9 siRNA inhibits N-LDL-induced apoptosis in HUVEC by regulating the mitochondrial apoptotic pathway

3 讨 论

N-LDL 是一种长期未受关注的非氧化修饰脂蛋白,其生物学作用近年来逐渐受到重视。越来越多的研究表明,它参与 As 的发生与发展。在糖尿病、RA、OA 等合并 CVD 的患者中,循环 N-LDL 水平显著升高,且与这些疾病状态下 As 的高发密切相关^[6-7,19]。在已知的 As 危险因素中,ox-LDL 被认为是 As 进展的关键因子,可通过线粒体依赖性途径诱导内皮细胞凋亡,破坏内皮完整性、损害屏障功能并启动 As^[20]。相比之下,N-LDL 在 As 中的致病作用长期以来受到的关注较少。

N-LDL 促进 As 的作用主要涉及两种机制。其一,N-LDL 可促进泡沫细胞形成与脂质沉积^[21],这是 As 早期发展的关键事件;其二,N-LDL 能够刺激未分化的人单核细胞大量释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),进而在体内放大炎症反应。Kowalczyk 等^[22] 研究报道,硝基化反应可激活 NLRP3 炎症小体,并进一步通过 Caspase-1 与 Caspase-11 触发细胞焦亡。在本研究中,经 N-LDL 处理后,HUVEC 中线粒体凋亡相关蛋白 Caspase-9、Caspase-3 及促凋亡蛋白 Bax 的表达显著上调,同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则明显下调。Hoechst33342/PI 染色结果亦显示,PI 阳性细胞数有所增加。上述结果提示,N-LDL 可诱导 HUVEC 发生凋亡,且这一过程可能主要通过线粒体依赖性途径介导。

PCSK9 最初在家族性高胆固醇血症患者中被鉴定,参与脂质代谢与神经元凋亡过程^[23]。既往研究表明,PCSK9 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡中发挥关键作用^[24]。本研究结果显示,N-LDL 可上调 HUVEC 中 PCSK9 的蛋白表达,同时伴随 SREBP2 的蛋白表达升高。由于 SREBP2 是调控 PCSK9 表达的关键因子,这提示 N-LDL 诱导的 PCSK9 表达变化可能与 SREBP2 表达上调相关。此外,N-LDL 未显著改变 HUVEC 中的 LDLR 水平。鉴于 LDLR 是 LDL 摄取的主要受体,本研究进一步评估了细胞内脂质蓄积情况。尽管 LDLR 水平未发生改变,细胞内脂质负荷仍随 N-LDL 剂量的升高而增加。上述发现提示,N-LDL 进入 HUVEC 的过程可能并非主要依赖 LDLR,而或许是通过清道夫受体(与 ox-LDL 的摄取方式类似)或其他有待鉴定的受体所介导的。综上,这些结果表明,N-LDL 可通过上调 SREBP2 来促进 PCSK9 的表达,并在不影响 LDLR 蛋白水平的情况下增加细胞内脂质蓄积。

PCSK9 亦被发现参与线粒体功能调控。PCSK9

可通过下调线粒体复合体 III 核心亚基因 UQCRC1 的表达,抑制复合体 III 的功能,进而导致 ROS 生成增加^[18]。PCSK9 siRNA 可使血管平滑肌细胞和内皮细胞的线粒体 ROS 生成量分别降低约 50% 和 30%^[25]。此外,Laudette 等^[26] 的研究报道指出,PCSK9 可与转运蛋白发生相互作用,借此调控线粒体膜的胆固醇稳态,进而维持线粒体功能。本研究通过在 HUVEC 中构建 PCSK9 敲低模型,旨在探究其对 N-LDL 诱导线粒体功能障碍的影响。结果表明,PCSK9 敲低能显著减少 ROS 的生成,有效缓解 N-LDL 诱导的线粒体功能障碍;同时可下调 Caspase-9、Caspase-3 及 Bax 的表达,上调 Bcl-2 的表达,并降低 PI 阳性细胞数。上述结果提示,PCSK9 siRNA 可改善 HUVEC 的线粒体功能,并通过调控 Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 线粒体凋亡途径抑制 N-LDL 诱导的细胞凋亡。既往研究表明,PCSK9 过表达会增强氧化应激反应、损伤线粒体功能并促进细胞凋亡,这从侧面支持了上述推测^[27]。

本研究也存在一定局限性。首先,研究结论主要基于 HUVEC 体外实验;尽管该研究可为 N-LDL 通过调控 PCSK9 促进 CVD 发生的作用及机制提供线索,但难以完全反映体内环境的复杂性,仍需在动物模型和人群研究中进一步验证。其次,尽管数据提示 N-LDL 的摄取可能通过清道夫受体或其他非 LDLR 途径完成,但其确切的细胞进入机制仍未明确,有待进一步研究。同时,对于线粒体凋亡相关的针对性指标(如细胞色素 c 释放、线粒体形态改变等),后续还需开展进一步实验检测。最后,本研究主要采用 PCSK9 沉默策略探讨其在 N-LDL 诱导损伤中的作用,尚未直接验证 PCSK9 过表达条件下的效应,因此相关机制仍需在后续研究中进一步阐明。综上,本研究表明,N-LDL 可通过上调 SREBP2,进而促进 PCSK9 表达,并增加 ROS 生成、影响 MMP,导致线粒体功能障碍,最终诱导 HUVEC 凋亡;而敲低 PCSK9 能够阻断 N-LDL 诱导的 HUVEC 线粒体途径凋亡。上述发现为 N-LDL 及其他非氧化修饰 LDL 促进 As 的机制提供了新证据,也将 PCSK9 在 As 发病中的功能认知从胆固醇代谢拓展至线粒体功能与细胞凋亡调控领域。此外,本研究通过探究 As 相关疾病中常升高的 N-LDL 的生物学效应,为非氧化 LDL 修饰的机制研究提供了新视角,并为糖尿病、RA 与 OA 等疾病相关 As 的发生中,通过调控 PCSK9 和 N-LDL 水平进行干预提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] EL HADRI K, SMITH R, DUPLUS E, et al. Inflammation, oxidative stress, senescence in atherosclerosis; thioredoxine-1 as an emerging therapeutic target[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 77.
- [2] JENKINS D J A, KITTS D, GIOVANNUCCI E L, et al. Selenium, antioxidants, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Am J Clin Nutr*, 2020, 112(6): 1642-1652.
- [3] FRANCISCO V, RUIZ-FERNÁNDEZ C, PINO J, et al. Adipokines: linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 196-206.
- [4] AGCA R, BLANKEN A B, VAN SIJL A M, et al. Arterial wall inflammation is increased in rheumatoid arthritis compared with osteoarthritis, as a marker of early atherosclerosis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60(7): 3360-3368.
- [5] MARX N, HUSAIN M, LEHRKE M, et al. GLP-1 receptor agonists for the reduction of atherosclerotic cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes [J]. *Circulation*, 2022, 146(24): 1882-1894.
- [6] GRIFFITHS H R, ALDRED S, DALE C, et al. Homocysteine from endothelial cells promotes LDL nitration and scavenger receptor uptake[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(3): 488-500.
- [7] JAKUBIAK G K, CIEŚLAR G, STANEK A. Nitrotyrosine, nitrated lipoproteins, and cardiovascular dysfunction in patients with type 2 diabetes: what do we know and what remains to be explained? [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(5): 856.
- [8] 周慧, 于海霞, 张华屏. SIRT1/DRP1 在染料木素抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(8): 683-689.
- ZHOU H, YU H X, ZHANG H B. The role of SIRT1/DRP1 in genistein suppressing ox-LDL-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(8): 683-689.
- [9] KUANG L, CHEN Q, LIU Z, et al. Types, molecular mechanisms, and potential therapeutic targets of programmed endothelial cell death in atherosclerosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2025, 86(3): 214-226.
- [10] SHAN R, LIU N, YAN Y, et al. Apoptosis, autophagy and atherosclerosis: relationships and the role of Hsp27[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105169.
- [11] LI M, WANG Z W, FANG L J, et al. Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 467.
- [12] LIANG J, LI W, LIU H, et al. Di'ao Xinxuekang capsule improves the anti-atherosclerotic effect of atorvastatin by downregulating the SREBP2/PCSK9 signalling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 857092.
- [13] SEIDAH N G, PRAT A. The multifaceted biology of PCSK9[J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(3): 558-582.
- [14] WU C Y, TANG Z H, JIANG L, et al. PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-Caspase 9-Caspase 3 pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 359(1): 347-358.
- [15] HAMILTON R T, ASATRYAN L, NILSEN J T, et al. LDL protein nitration; implication for LDL protein unfolding[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 479(1): 1-14.
- [16] SMYTHE C D, SKINNER V O, BRUCKDORFER K R, et al. The state of macrophage differentiation determines the TNF alpha response to nitrated lipoprotein uptake[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 170(2): 213-221.
- [17] OU-YANG Y N, DENG F F, WANG Y J, et al. High-salt diet induces dyslipidemia through the SREBP2/PCSK9 pathway in dahl salt-sensitive rats[J]. *Biochimie*, 2024, 216: 34-45.
- [18] ZENG J, TAO J, XI L, et al. PCSK9 mediates the oxidative low-density lipoprotein-induced pyroptosis of vascular endothelial cells via the UQCRC1/ROS pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4): 53.
- [19] XU C, RODRÍGUEZ-CARRIO J, XIE Y, et al. Post-translational modifications of lipoproteins: emerging players linking inflammation and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis-a narrative review [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(17): 8514.
- [20] CHIU T H, KU C W, HO T J, et al. Schisanhenol attenuates ox-LDL-induced endothelial dysfunction via an AMPK-dependent mechanism[J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(6): 1459-1475.
- [21] MASTROGIOVANNI M, TROSTCHANSKY A, RUBBO H. Fatty acid nitration in human low-density lipoprotein[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 679: 108190.
- [22] KOWALCZYK P, SULEJCZAK D, KLECZKOWSKA P, et al. Mitochondrial oxidative stress-a causative factor and therapeutic target in many diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13384.
- [23] JAAFAR A K, TECHER R, CHEMELLO K, et al. PCSK9 and the nervous system: a no-brainer? [J]. *J Lipid Res*, 2023, 64(9): 100426.
- [24] WANG P, WANG H, YAN D, et al. Endothelial cell-derived PCSK9 in atherosclerosis: pathophysiological roles and therapeutic perspectives[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2025, 26(10): 44885.
- [25] TANG Y, LI S L, HU J H, et al. Research progress on alternative non-classical mechanisms of PCSK9 in atherosclerosis in patients with and without diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 33.
- [26] LAUDETTE M, LINDBOM M, CINATO M, et al. PCSK9 regulates cardiac mitochondrial cholesterol by promoting TSPO degradation [J]. *Circ Res*, 2025, 136(9): 924-942.
- [27] 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.

(此文编辑 文玉珊)