

本文引用: 陈佳琳, 唐志晗, 刘录山, 等. PCSK9 通过诱导血管平滑肌细胞表型转换促进动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(4): 287-296. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.04.002.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-04-0287-10

· 实验研究 ·

## PCSK9 通过诱导血管平滑肌细胞表型转换促进动脉粥样硬化

陈佳琳, 唐志晗, 刘录山, 向琼, 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)在动脉粥样硬化(As)发生发展中的作用及分子机制。**[方法]** 采用血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)对小鼠原代血管平滑肌细胞(VSMC)进行不同时间的处理,通过划痕实验评估细胞迁移能力,并利用 Western blot 检测表型转换标志物及 PCSK9 的表达。使用 Ad-PCSK9 腺病毒感染小鼠原代 VSMC,检测收缩型与合成型标志蛋白的表达情况,以及细胞增殖与迁移能力。通过腺病毒过表达或小干扰 RNA(siRNA)抑制 PCSK9 表达,检测核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、Krüppel 样因子 4(KLF4)和心肌素(MYOCD)的表达水平。采用免疫组织化学、免疫荧光、油红 O 染色和苏木精-伊红(HE)染色,分析 VSMC 特异性过表达 PCSK9(PCSK9<sup>sm OE</sup>)小鼠与对照组(PCSK9<sup>flax/flax</sup>)小鼠主动脉斑块中相关分子的表达、脂质沉积及斑块面积。**[结果]** PCSK9 与血管中膜及 As 斑块内的 VSMC 共定位;与中膜收缩型 VSMC 相比,其在斑块合成型 VSMC 中表达显著升高。PDGF-BB 以时间依赖方式上调 PCSK9 及合成型标志蛋白骨桥蛋白(OPN)、表皮调节素(EREG)表达,下调收缩型标志蛋白平滑肌肌球蛋白重链(SMMHC)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、钙调蛋白、平滑肌 22 $\alpha$ (SM22 $\alpha$ )表达,并增强细胞迁移能力。Ad-PCSK9 可促进 VSMC 由收缩型向合成型转换,显著增强 DNA 复制活性与细胞迁移能力,同时,下调 MYOCD 表达,上调 KLF4 与 NF- $\kappa$ B p65 表达;而 siRNA 抑制 PCSK9 则呈现相反效应。组织学分析表明,VSMC 过表达 PCSK9 可促进 As 小鼠主动脉斑块形成并增加斑块不稳定性。**[结论]** PCSK9 可诱导 VSMC 由收缩型向合成型转换,加剧小鼠 As 病变,该机制可能与 NF- $\kappa$ B、KLF4 及 MYOCD 之间的信号串扰有关。

**[关键词]** 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 表型转换

**[中图分类号]** R5;R363

**[文献标识码]** A

### PCSK9 promotes atherosclerosis by inducing phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells

CHEN Jialin, TANG Zhihan, LIU Lushan, XIANG Qiong, PENG Juan

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

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the role and molecular mechanism of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in the occurrence and development of atherosclerosis (As). **Methods** Mouse primary vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) for different durations. Cell migration ability was evaluated by scratch assay, and the expression of phenotypic transition markers and PCSK9 was detected by Western blot. Mouse primary VSMCs were infected with Ad-PCSK9 adenovirus to examine the expression of contractile and synthetic marker proteins, as well as cell proliferation and migration capabilities. PCSK9 expression was overexpressed via adenovirus or inhibited by small interfering RNA (siRNA), and the expression levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Krüppel-like factor 4 (KLF4), and myocardin (MYOCD) were detected. Immunohistochemistry, immunofluorescence, Oil Red O staining, and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to analyze the expression of related molecules, lipid deposition, and plaque area in aortic plaques of VSMC-specific PCSK9 overexpression (PCSK9<sup>sm OE</sup>) mice and

[收稿日期] 2026-01-07

[修回日期] 2026-02-15

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30510);湖南省教育厅科研项目(20C1612)

[作者简介] 陈佳琳,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:chenjialin459@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。通信作者向琼,博士,实验师,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础,E-mail:xiangqiong\_05@163.com。

PCSK9 conditional knockout (PCSK9<sup>flax/flax</sup>) mice. **Results** PCSK9 was colocalized with VSMCs in the medial layer and atherosclerotic plaques. Compared with contractile VSMCs in the medial layer, PCSK9 expression was significantly elevated in synthetic VSMCs within the plaques. PDGF-BB upregulated PCSK9 in a time-dependent manner, along with the synthetic phenotypic marker proteins osteopontin (OPN) and epiregulin (EREG), while downregulating the contractile marker proteins smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), calponin, and smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ), and enhanced cell migration capacity. Ad-PCSK9 promoted the phenotypic transformation of VSMCs from contractile to synthetic phenotype, significantly enhanced DNA replication activity and cell migration ability, downregulated MYOCD expression, and upregulated KLF4 and NF- $\kappa$ B p65 expression. Conversely, siRNA-mediated PCSK9 inhibition showed opposite effects. Histological analysis revealed that VSMC-specific overexpression of PCSK9 promoted aortic plaque formation and increased plaque instability in atherosclerotic mice. **Conclusions** PCSK9 can induce VSMC phenotypic transformation from the contractile to synthetic phenotype, exacerbating the atherosclerotic lesions in mice. This mechanism may involve the signaling crosstalk among NF- $\kappa$ B, KLF4, and MYOCD.

[**KEY WORDS**] proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; atherosclerosis; vascular smooth muscle cells; phenotypic transformation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是多种心脑血管疾病的共同病理基础,也是全球范围内该类疾病发病和死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。As病变的形成是脂质、炎症细胞、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和坏死细胞碎片在血管内膜下长期沉积与动态演变的结果<sup>[2]</sup>。因此,深入阐明As的血管生物学机制具有重要的科学意义。

在As的复杂病理过程中,VSMC作为血管中膜结构与功能的核心成分,发挥着关键作用。成熟的VSMC具有高度的表型可塑性,在生理状态下维持收缩表型(分化状态),而在病理刺激下向合成表型(去分化状态)转换<sup>[3]</sup>。在多种致As因素的持续作用下,VSMC由收缩表型向合成表型转换<sup>[4-5]</sup>。在此过程中,收缩型标志蛋白如 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、钙调蛋白、平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain, SMMHC)和平滑肌22 $\alpha$ (smooth muscle 22 $\alpha$ , SM22 $\alpha$ )等的表达降低或缺失,而合成型标志蛋白如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和表皮调节素(epiregulin, EREG)等的表达则相应升高<sup>[6]</sup>。在分子调控层面,VSMC表型转换受多条信号通路精密调控,心肌素(myocardin, MYOCD)特异性表达于VSMC,作为血清反应因子(serum response factor, SRF)的协同转录因子,可激活多种收缩型标志基因的转录,从而维持VSMC的收缩表型<sup>[7-8]</sup>。研究表明,MYOCD可能在抑制VSMC增殖及抗As中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。与之相对,Krüppel样因子4(Krüppel-like factor 4, KLF4)作为表型转换的关键负调控因子,可下调MYOCD的表达,促使VSMC由收缩表型向合成表型转换<sup>[10]</sup>。此外,研究证实核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)可与KLF4结合并激活其转录,从而间接抑制MYOCD功能,推动VSMC表型转换进程<sup>[11]</sup>。上

述分子间的调控关系揭示了KLF4与MYOCD构成的分子枢纽在VSMC表型转换中的核心地位。

近年来,一种关键脂质代谢调控分子——前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)被发现As进程中扮演重要角色。PCSK9于2003年被发现,主要通过促进肝细胞低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的降解,减少血浆中低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的清除,从而增加心脑血管疾病风险<sup>[12-14]</sup>。然而,新近研究表明,除调节脂质代谢外,PCSK9对血管壁的直接作用在加剧As病变中也具有不可忽视的影响<sup>[15]</sup>。值得注意的是,PCSK9在VSMC中的表达水平显著高于其他血管细胞,尤其在人类易损As斑块“肩”区的VSMC中高表达,并与收缩型标志蛋白的表达呈负相关<sup>[6,16-17]</sup>。此外,多种诱导VSMC向合成表型转换的因素均可上调细胞中PCSK9的表达。这些证据提示,PCSK9可能通过调控VSMC的表型转换参与As的病理进程。本研究旨在阐明PCSK9通过诱导VSMC表型转换在As进展中的作用,并揭示其潜在的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

DMEM/F12培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自Hyclone公司;胶原酶II型、弹性蛋白酶及大豆胰蛋白酶抑制剂购自Worthington Biochemical公司;抗PCSK9、抗OPN兔源多克隆抗体购自ABclonal公司;抗SMMHC兔源多克隆抗体购自Abcam公司;抗 $\alpha$ -SMA、抗钙调蛋白、抗 $\beta$ -微管蛋白的兔源单克隆抗体、抗基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、抗MMP-9、抗NF- $\kappa$ B的兔源多克隆抗体及

辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自 Proteintech 公司;抗 KLF4、抗 MYOCD、抗 EREG 及抗 SM22 $\alpha$  兔源多克隆抗体购自 Affinity 公司;靶向 PCSK9 的 siRNA 由锐博生物科技有限公司合成;表达小鼠 PCSK9 的 HBAD-Adeasy-mPCSK9-Null-EGFP 腺病毒由汉恒生物科技有限公司构建。

### 1.2 免疫荧光组织化学检测

组织样本经石蜡包埋和连续切片后,依次进行脱蜡及抗原修复处理。使用免疫组化笔圈定组织区域,以 10% 胎牛血清室温封闭 30 min,随后加入一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。避光条件下,滴加荧光标记的二抗,室温孵育 30 min,PBS 洗涤后,使用 DAPI 室温复染细胞核 10 min。再次洗涤后,以甘油封片,于荧光显微镜下观察并采集图像。

### 1.3 免疫组织化学检测

操作按即用型免疫组化试剂盒说明书进行。切片经柠檬酸钠抗原修复液热修复并冷却后,以 PBS 洗涤。依次滴加内源性过氧化物酶阻断剂和非特异性反应阻断剂处理组织。加入一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,PBS 洗涤后,依次加入高敏酶标 IgG 聚合物及链霉亲和素-过氧化物酶复合物孵育。DAB 显色后,苏木精复染,流水返蓝,中性树脂封片,于显微镜下观察并拍照。

### 1.4 小鼠原代 VSMC 的提取

使用胶原酶 II 型、大豆胰蛋白酶抑制剂、弹性蛋白酶与 DMEM/F12 培养基配制混合消化酶。取小鼠胸主动脉,剥除外膜与内膜后,将血管中膜剪碎,置于混合消化酶中,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内消化 4 h。以 3 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基重悬,接种于 25  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养 7 天。

### 1.5 小鼠原代 VSMC 的培养及药物处理

原代 VSMC 使用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM/F12 完全培养基,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。待细胞贴壁生长后,根据实验需求,用  $1.0 \times 10^4$  ng/L 血小板源性生长因子-BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 处理不同时间,收集细胞进行后续检测。

### 1.6 Western blot 检测

使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,于冰上裂解细胞 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,取上清。按 4:1 (体积比) 加入 5 $\times$  上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 8 min 使蛋白变性。样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。膜经 5% 脱脂牛奶室温封闭 1~2 h,与一抗于 4  $^{\circ}\text{C}$

孵育过夜。洗涤后,与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1.5 h,再次洗涤后进行化学发光显影。

### 1.7 RT-qPCR

实验全程使用无核酸酶耗材并采取防污染措施。提取细胞总 RNA 并反转录合成 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

### 1.8 EdU 细胞增殖检测

将细胞以适当密度接种于 96 孔板,待融合度达约 60% 时,按实验分组进行处理。处理结束后,参照 YF $^{\circ}$  594 Click-iT EdU 成像试剂盒 (红色荧光) 说明书进行操作,于荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.9 划痕实验

将细胞接种于 6 孔板,待融合度达约 80% 时,用 10  $\mu\text{L}$  枪头尖端在单层细胞表面划出均匀划痕,更换为无血清培养基继续培养。分别于 0、12、24 及 48 h 在光学显微镜下观察并拍照,计算划痕愈合面积。

### 1.10 Transwell 小室迁移实验

将细胞接种于 Transwell 小室 (置于 24 孔板内) 的上室,上室加入 200  $\mu\text{L}$  无血清培养基,下室加入 500  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的培养基。培养 48~72 h 后,移除上室培养基,PBS 漂洗细胞。用 4% 多聚甲醛固定细胞,甲醇通透,结晶紫染色。用棉签轻轻擦除上室膜内表面的细胞,于倒置显微镜下观察并计数迁移至膜下表面的细胞。

### 1.11 构建 VSMC 条件性过表达 PCSK9 小鼠模型

利用 Cre 重组酶介导的 loxP 位点特异性重组系统,构建条件性过表达模型。PCSK9<sup>lox/lox</sup> (以下简称 PCSK9<sup>fl/fl</sup>) 小鼠的基因组在 Rosa26 位点插入了两侧带有 loxP 位点的转录终止序列及 PCSK9 基因。SM22 $\alpha$ -Cre 小鼠中,由 SM22 $\alpha$  启动子驱动的 Cre 重组酶在 VSMC 中特异性表达。将 SM22 $\alpha$ -Cre 小鼠与 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 小鼠进行杂交,子代小鼠体内的 Cre 重组酶介导终止序列的敲除,从而激活 PCSK9 的表达,成功构建了 VSMC 特异性过表达 PCSK9 的小鼠 (PCSK9<sup>smOE</sup>)。

### 1.12 动物模型的复制及实验分组

实验选取 8~10 周龄雄性 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 和 PCSK9<sup>smOE</sup> 小鼠各 10 只,分别设为对照组 (PCSK9<sup>fl/fl</sup>) 和 PCSK9<sup>smOE</sup> 组。所有小鼠均饲养于 SPF 级实验动物房,适应性喂养 1 周后,经尾静脉单次注射 AAV8-D377Y-mPCSK9,注射剂量为  $5 \times 10^{14}$  vg/L,0.1 mL/只。随后,两组小鼠均予高脂高胆固醇饮食 (Research Diets USA, D12108C) 喂养,自由饮水,干预持续 12 周后处死动物,收集组织样本进行后续检测分析。

### 1.13 统计学分析

使用 Graph Pad Prism 6 软件进行统计学分析

与作图。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *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。

### 1.14 伦理申明

本研究涉及到的动物实验得到南华大学伦理委员会批准(批准号: USC202004XS133)。

## 2 结果

### 2.1 PDGF-BB 促进原代 VSMC 向合成表型转换并上调 PCSK9 表达

从 5~6 周龄雄性野生型 C57BL/6J 小鼠中分离原代主动脉 VSMC。免疫荧光染色结果显示, 超过 95% 的细胞表达  $\alpha$ -SMA, 表明细胞纯度高且呈收缩表型, 满足实验要求。

使用  $1.0 \times 10^4$  ng/L PDGF-BB 处理原代 VSMC 不同时间(0、12、24 及 48 h)。Western blot 结果显示, 与 0 h 组(Control)相比, 处理 12、24 及 48 h 后, 收缩型标志蛋白 SMMHC 的表达分别下降 46.47%、

89.41% 及 84.68%;  $\alpha$ -SMA 的表达分别下降 26.06%、56.60% 及 18.12%; 钙调蛋白的表达分别下降 33.79%、14.03% 及 48.85%; SM22 $\alpha$  的表达分别下降 57.37%、37.65% 及 44.62% ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。而与 0 h 组相比, 处理 24 和 48 h 后合成型标志蛋白 OPN 的表达则相应增加 33.27% 及 34.98%; 处理 48 h 后 EREG 的表达增加 51.41% ( $P < 0.01$ ), 提示 PDGF-BB 可诱导 VSMC 由收缩表型向合成表型转换。划痕实验结果表明, 与 0 h 组相比, PDGF-BB 处理 24 h 后细胞迁移能力增加了 123.75% ( $P < 0.05$ )。同时, Western blot 检测显示, 与 0 h 相比, PDGF-BB 处理 12、24 和 48 h 后, 细胞中 PCSK9 蛋白的表达分别增加 12.65%、19.26% 及 30.42% ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。此外, Western blot 结果显示, 与 0 h 相比, PDGF-BB 处理 48 h 后, 细胞中 MMP-2 的表达增加 87.60% ( $P < 0.05$ ; 图 1), 而 MMP-9 的表达无明显变化。以上结果提示, PDGF-BB 诱导的 VSMC 表型转换伴随着 PCSK9 表达的上调。

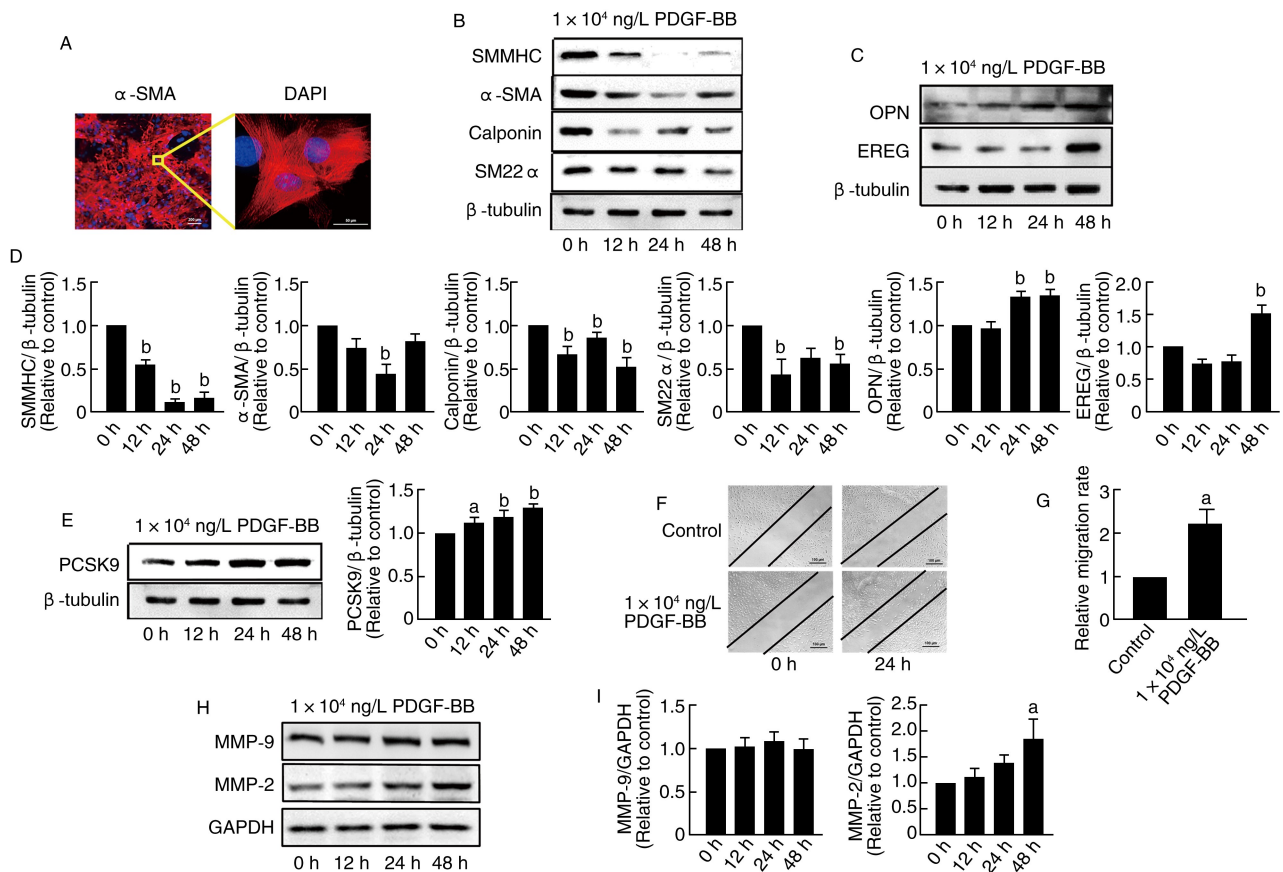


图 1. PDGF-BB 促进原代 VSMC 向合成表型转换并上调 PCSK9 表达 ( $n=3$ )

A 中红色为  $\alpha$ -SMA 阳性细胞, 蓝色为 DAPI 染核 (IF,  $40 \times, 400 \times$ ); B、C、D 为 PDGF-BB 处理小鼠原代 VSMC 不同时间对收缩型标志蛋白及合成型标志蛋白表达的影响; E 为 PDGF-BB 处理小鼠原代 VSMC 不同时间对 PCSK9 蛋白表达的影响; F、G 为 PDGF-BB 对小鼠原代 VSMC 迁移能力的影响(划痕实验,  $100 \times$ ); H、I 为 PDGF-BB 处理小鼠原代 VSMC 不同时间对 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响。

a 为  $P < 0.05$ , 与 0 h 组比较或与 Control 组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 0 h 组比较。

Figure 1. PDGF-BB promotes the transformation of primary VSMC to a synthetic phenotype and upregulates PCSK9 expression ( $n=3$ )

2.2 过表达 PCSK9 促进 VSMC 向合成表型转换

采用腺病毒载体 (Ad-PCSK9) 感染小鼠原代 VSMC 以过表达 PCSK9, 荧光显微镜下感染效率超过 90%。Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, Ad-PCSK9 感染组细胞中 PCSK9 蛋白表达增加 152.30% ( $P < 0.01$ ), 收缩型标志蛋白 SMMHC、 $\alpha$ -SMA 及 SM22 $\alpha$  的表达分别减少 52.58%、67.08% 及 75.74% ( $P < 0.01$ ), 而合成型标志蛋白 EREG 表达增加 493.79% ( $P < 0.01$ )。EdU 实验显示, 与空白对照组相比, Ad-PCSK9 感染组细胞的 EdU 阳性率

升高 865.19% ( $P < 0.01$ )。划痕实验结果表明, 与空白对照组相比, Ad-PCSK9 感染组细胞的迁移能力增加 56.98% ( $P < 0.01$ )。Transwell 实验进一步证实, 与空白对照组相比, Ad-PCSK9 感染组细胞的迁移能力增加 159.24% ( $P < 0.01$ )。此外, Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, Ad-PCSK9 感染组 MMP-2 的表达增加 46.59% ( $P < 0.05$ ; 图 2), 而 MMP-9 的表达无明显变化。这些结果表明, PCSK9 过表达能增强 VSMC 的增殖与迁移能力, 并推动其由收缩表型向合成表型转换。

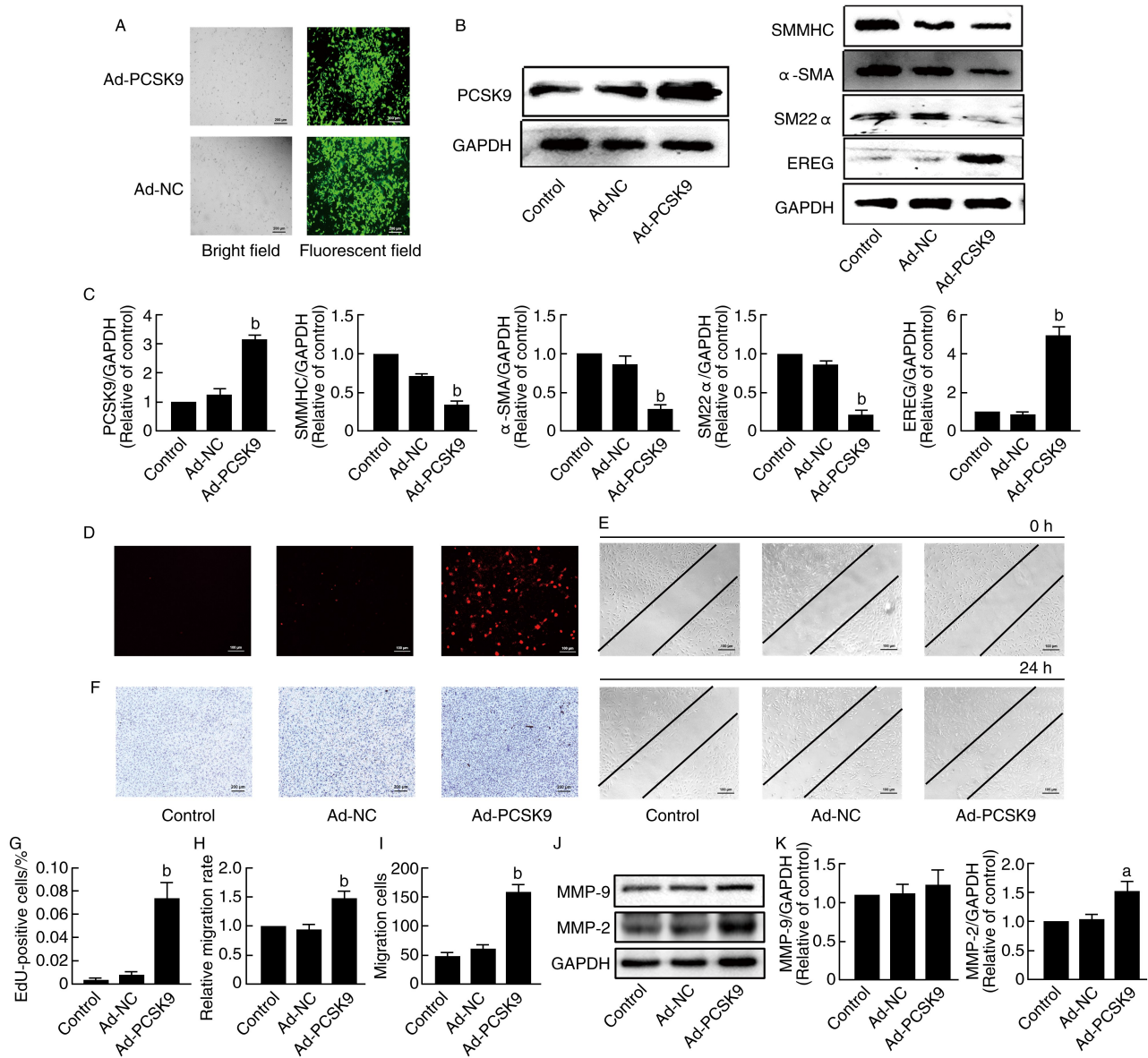


图 2. 过表达 PCSK9 促进 VSMC 向合成表型转换 ( $n = 3$ )

A 为 Ad-PCSK9 感染小鼠原代 VSMC 情况 (40 $\times$ ); B、C 为 Ad-PCSK9 对小鼠原代 VSMC 中 PCSK9 及表型标志蛋白表达的影响; D、G 为 PCSK9 对小鼠原代 VSMC 增殖能力的影响 (EdU 实验, 100 $\times$ ); E、H 为 PCSK9 对小鼠原代 VSMC 迁移能力的影响 (划痕实验, 100 $\times$ ); F、I 为 PCSK9 对小鼠原代 VSMC 迁移能力的影响 (Transwell, 40 $\times$ ); J、K 为 Ad-PCSK9 对小鼠原代 VSMC 中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 Ad-NC 感染组比较。

Figure 2. Overexpression of PCSK9 promotes the transformation of VSMC to a synthetic phenotype ( $n = 3$ )

### 2.3 PCSK9 调控 VSMC 表型转换涉及 NF- $\kappa$ B 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰

通过 siRNA PCSK9 或 Ad-PCSK9 分别下调和上调小鼠原代 VSMC 中 PCSK9 的表达,并利用 Western blot 检测 MYOCD、KLF4 和 NF- $\kappa$ B p65 的蛋白水平。

在 PDGF-BB 诱导的模型中,与空白对照组相比,PDGF-BB 处理组细胞 MYOCD 表达降低 43.67% ( $P < 0.05$ ),而 KLF4 表达增加 40.38% ( $P < 0.01$ ),NF- $\kappa$ B p65 表达增加 29.76% ( $P < 0.01$ )。而与 siRNA NC+PDGF-BB 处理组相比,siRNA PCSK9+PDGF-BB 组的 MYOCD 表达回升 49.25% ( $P < 0.05$ ),

同时 KLF4 和 NF- $\kappa$ B p65 的表达分别降低 31.23% 和 19.59% ( $P < 0.05$ ),提示转染 siRNA PCSK9 可部分逆转 PDGF-BB 的上述效应。

在过表达模型中,与对照组相比,Ad-PCSK9 感染组 MYOCD 表达减少 60.68% ( $P < 0.01$ ),而 KLF4 表达增加 72.24% ( $P < 0.05$ ),NF- $\kappa$ B p65 表达增加 47.55% ( $P < 0.01$ ;图 3)。

以上结果初步提示,PCSK9 促进 VSMC 增殖、迁移及表型转换的作用可能与调控 NF- $\kappa$ B 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰有关。

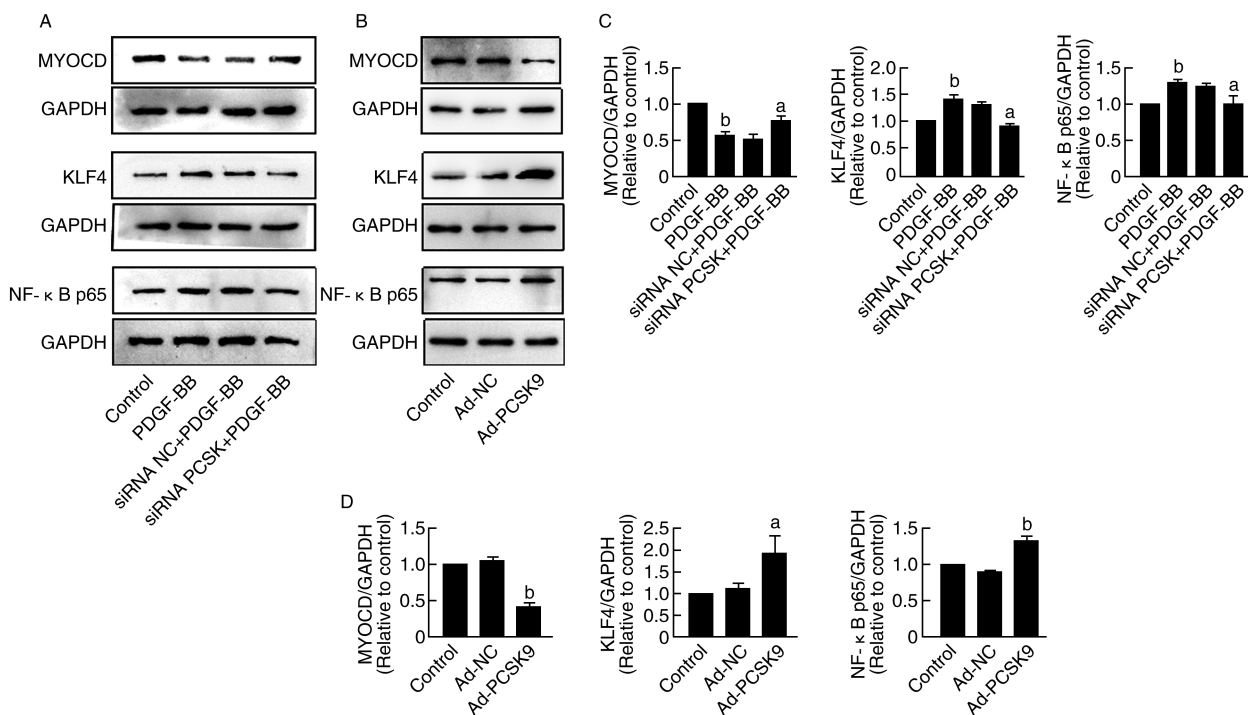


图 3. PCSK9 调控 VSMC 表型转换涉及 NF- $\kappa$ B 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰 ( $n = 3$ )

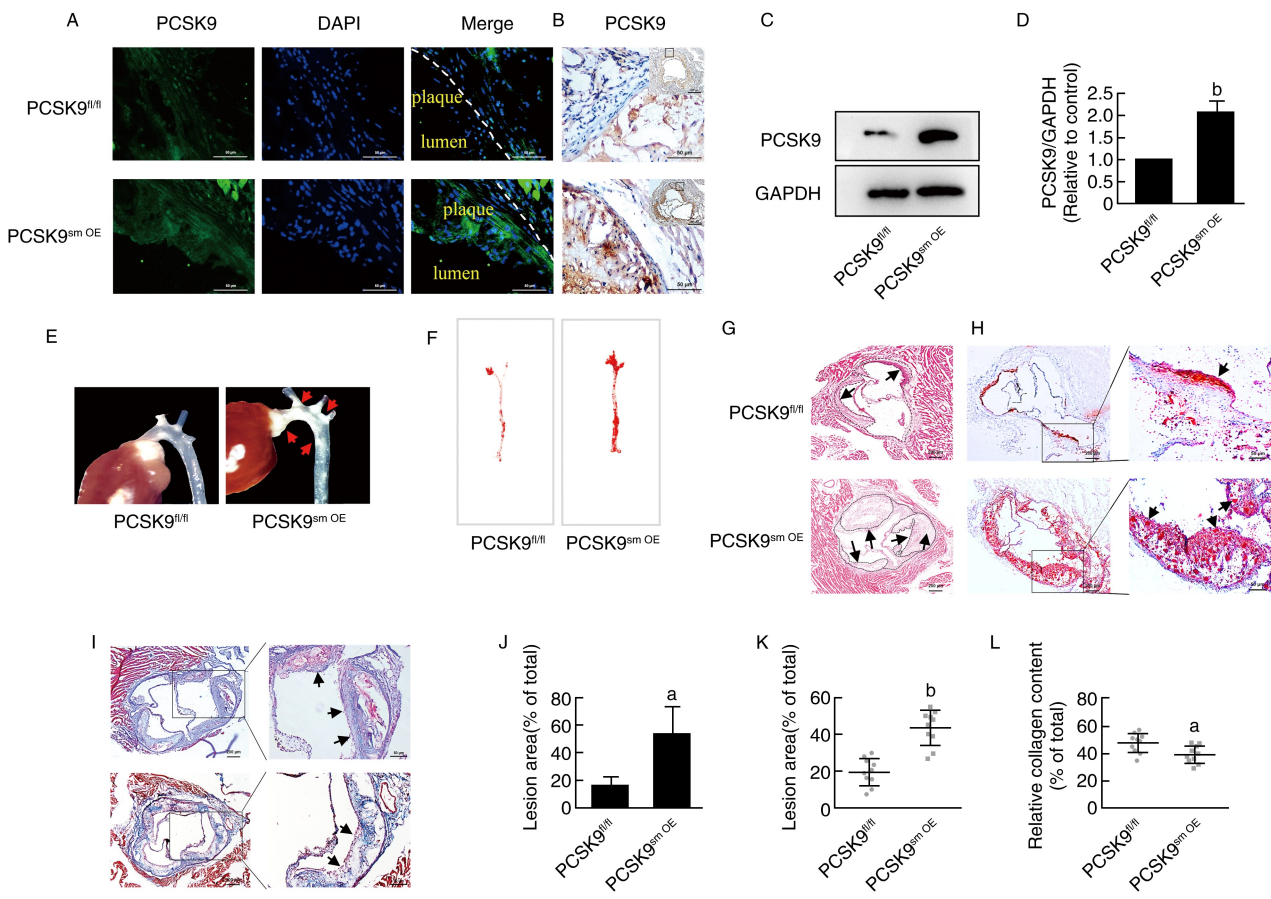
A、C 为 siRNA PCSK9 对小鼠原代 VSMC 中 MYOCD、KLF4 及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响;B、D 为 Ad-PCSK9 对小鼠原代 VSMC 中 MYOCD、KLF4 及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响。a 为  $P < 0.05$ ,b 为  $P < 0.01$ ,PDGF-BB 处理组与 Control 组比较或 siRNA PCSK9+PDGF-BB 处理组与 siRNA NC+PDGF-BB 处理组比较,Ad-PCSK9 感染组与 Ad-NC 感染组比较。

Figure 3. The regulation of VSMC phenotypic transformation by PCSK9 involves the signal crosstalk between NF- $\kappa$ B and KLF4, MYOCD ( $n = 3$ )

### 2.4 VSMC 特异性过表达 PCSK9 加剧 As 小鼠主动脉斑块形成而不影响血脂水平

成功构建 VSMC 条件性过表达 PCSK9 的小鼠模型 (PCSK9<sup>smOE</sup>),并以 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 小鼠作为对照。Western blot 结果证实,与 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 小鼠相比,PCSK9<sup>smOE</sup> 小鼠主动脉中 PCSK9 蛋白表达升高 107.59% ( $P < 0.01$ )。对两组小鼠进行 As 造模后,体视显微镜观察发现,PCSK9<sup>smOE</sup> 组小鼠主动脉弓及腹主动脉分叉处的斑块数量明显多于对照组。

免疫组化与免疫荧光检测显示,PCSK9<sup>smOE</sup> 小鼠主动脉窦组织中 PCSK9 表达升高。油红 O 染色显示,PCSK9<sup>smOE</sup> 组小鼠主动脉整体脂质沉积面积较 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组小鼠增加 231.38% ( $P < 0.05$ )。对主动脉窦切片的进一步分析显示,与 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组相比,PCSK9<sup>smOE</sup> 组斑块面积增大 122.89% ( $P < 0.01$ ),脂质蓄积更多,荷脂细胞数量增加。Masson 染色表明,相比于 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组,PCSK9<sup>smOE</sup> 组斑块内胶原纤维含量减少 17.63% ( $P < 0.05$ ;图 4)。



**图 4. VSMC 特异性过表达 PCSK9 加剧 As 小鼠主动脉斑块形成**

A 为免疫荧光法检测的 PCSK9 在 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 与 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠主动脉根部斑块中的阳性染色情况(400×); B 为免疫组化法检测的 PCSK9 在 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 与 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠主动脉根部斑块中的表达情况(40×, 400×); C、D 为 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 与 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠主动脉中 PCSK9 蛋白的表达情况(n=3); E 为体视显微镜下 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 与 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠主动脉中 As 斑块情况(1.5×); F、J 为 VSMC 过表达 PCSK9 对小鼠主动脉的荷脂情况和斑块面积的影响(油红 O 染色, 2×, n=3); G 为 VSMC 过表达 PCSK9 对小鼠主动脉窦 As 斑块面积的影响(HE 染色, 40×); H、K 为 VSMC 过表达 PCSK9 对小鼠主动脉窦壁斑块面积的影响, 黑色箭头指向斑块(油红 O 染色, 40×, 200×, n=10); I、L 为 VSMC 过表达 PCSK9 对小鼠主动脉窦 As 斑块胶原纤维含量的影响, 黑色箭头指向胶原纤维区(Masson 染色, 40×, 200×, n=10)。a 为 P<0.05, b 为 P<0.01, PCSK9<sup>sm OE</sup> 组与 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组比较。

**Figure 4. Specific overexpression of PCSK9 in VSMC aggravates atherosclerotic plaque formation in As mouse**

为了解 VSMC 特异性过表达 PCSK9 对 As 模型小鼠血脂的影响,对两组小鼠进行 As 造模后,分别在第 0 周和第 12 周采用直接法检测两组小鼠的血脂水平。结果显示,第 12 周时 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 小鼠的血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)及 LDLC 水平较第 0 周时分别升高 412.65%、111.81% 和 365.83% (P<0.05), TG 的水平无明显变化;同样,第 12 周时 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠的血清 TC、HDLC 及 LDLC 水平较第 0 周时分别升高 261.23%、74.08% 和 458.77% (P<0.01), TG 的水平无明显变化。但第 12 周时两组间各项血脂指标差异均无显著性(表 1),提示 VSMC 特异性过表达 PCSK9 不影响小鼠血脂水平。

以上结果表明, VSMC 特异性过表达 PCSK9 可

促进 As 小鼠主动脉斑块形成,并可能增加斑块不稳定性,但不影响小鼠血脂水平。

**2.5 PCSK9 促进斑块内 VSMC 向合成表型转换可能和 NF-κB 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰相关**

免疫荧光与免疫组化检测结果显示,与 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组相比, PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠主动脉斑块处收缩型标志蛋白 α-SMA 的阳性信号显著减弱,而合成型标志蛋白 OPN 的阳性信号显著增强,提示 PCSK9 过表达促进了斑块内 VSMC 向合成表型转换。

同时, PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠主动脉斑块处 NF-κB 与 KLF4 的阳性染色显著增加,而 MYOCD 的阳性染色显著减弱(图 5)。该结果在体内水平进一步证实, PCSK9 促进 VSMC 表型转换的作用可能和 NF-κB 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰有关。

表 1. PCSK9<sup>fl/fl</sup> 和 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠在第 0 周和第 12 周时的 4 项血脂指标水平Table 1. The levels of four lipid indicators in PCSK9<sup>fl/fl</sup> and PCSK9<sup>sm OE</sup> mice at week 0 and week 12

单位:mg/L

项目	第 0 w		第 12 w	
	PCSK9 <sup>fl/fl</sup>	PCSK9 <sup>sm OE</sup>	PCSK9 <sup>fl/fl</sup>	PCSK9 <sup>sm OE</sup>
TC	1 699.00±664.00	2 417.00±578.80	8 710.00±4 844.00 <sup>a</sup>	8 731.00±4 304.00 <sup>b</sup>
TG	2 932.00±629.90	3 310.00±471.80	3 953.00±1 943.00	3 448.00±1 235.00
HDLC	760.60±177.30	892.70±223.10	1 611.00±398.50 <sup>a</sup>	1 554.00±374.40 <sup>b</sup>
LDLC	1 448.60±547.70	1 191.00±429.60	6 748.00±4 505.00 <sup>a</sup>	6 655.00±3 710.00 <sup>b</sup>

注:a 为  $P < 0.05$ , 第 12 周 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组与第 0 周 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 组比较;b 为  $P < 0.01$ , 第 12 周 PCSK9<sup>sm OE</sup> 组与第 0 周 PCSK9<sup>sm OE</sup> 组比较 ( $n = 10$ )。

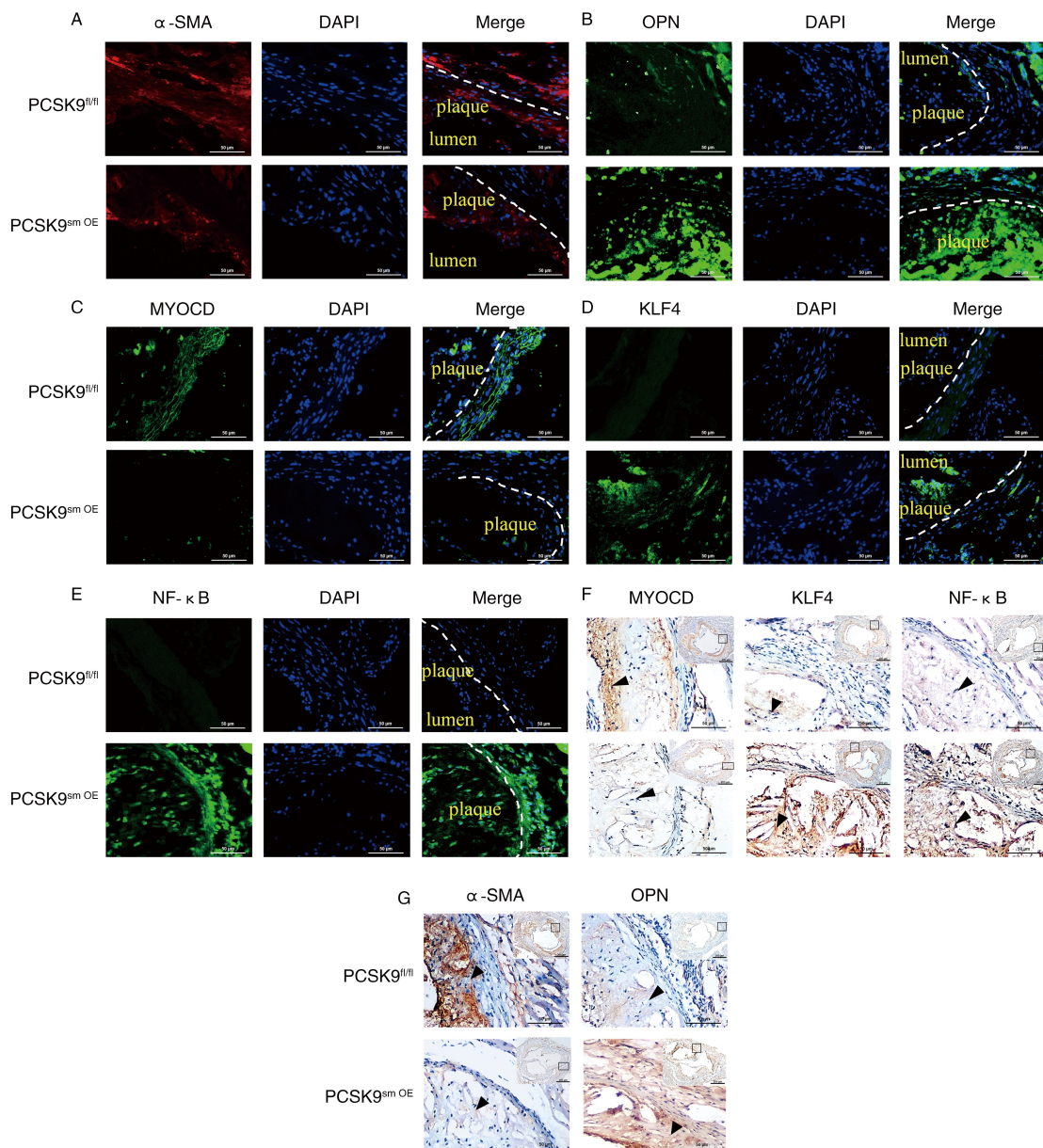


图 5. PCSK9 促进斑块内 VSMC 向合成表型转换可能和 NF-κB 与 KLF4, MYOCD 之间的信号串扰相关 A、B、C、D、E 为免疫荧光检测的阳性染色情况(400×); F、G 为免疫组化法检测的阳性染色情况, 黑色箭头指向斑块(40×, 400×)。

Figure 5. The promotion of intraplaque VSMC phenotypic transformation by PCSK9 may be related to the signal crosstalk between NF-κB and KLF4, MYOCD

### 3 讨论

尽管 PCSK9 主要通过调节胆固醇稳态在 As 的发生发展中发挥主导作用,但越来越多的证据表明,其独立于脂质代谢的生物学效应,尤其是对血管壁的直接作用,同样不容忽视。PCSK9 参与血管炎症反应、调控斑块形成与血栓发生,同时影响多种血管细胞的功能,这些机制与急性冠脉综合征及脑卒中密切相关<sup>[18]</sup>。因此,深入研究 PCSK9 的血管局部效应,对于全面理解其生物学功能及进一步阐明 As 发病机制具有重要意义。

基于这一背景,本研究首先在细胞实验中发现,PDGF-BB 诱导的 VSMC 向合成表型转换伴随 PCSK9 表达的时间依赖性上调,提示 PCSK9 可能与 VSMC 的表型转换过程相关。为了验证这一关联,我们通过分子技术调控 VSMC 中 PCSK9 的表达水平,结果显示过表达 PCSK9 可驱动 VSMC 由收缩表型向合成表型转换,并增强其增殖与迁移能力。这一发现与国内外多项研究结果相互印证:例如,PCSK9 在主动脉夹层钙化区域的合成型 VSMC 中高表达<sup>[19]</sup>;在颈动脉损伤模型中,PCSK9 缺失有助于维持 VSMC 收缩表型并抑制新生内膜形成<sup>[20]</sup>。这些证据共同提示,PCSK9 调控 VSMC 表型转换在血管病理重塑中扮演着关键角色。

值得注意的是,本研究在体内外实验中观察到看似矛盾的现象:细胞实验证实 PCSK9 过表达可诱导 VSMC 向合成表型转换,理论上应促进胶原合成;而动物模型却显示斑块内胶原含量显著减少。这一体内外结果的差异,恰恰揭示了 PCSK9 在 As 斑块微环境中作用的复杂性。斑块胶原含量是合成与降解动态平衡的综合结果,而非单一细胞功能的简单叠加。我们推测,这一现象可能由多重机制共同导致:首先,PCSK9 虽可促进 VSMC 表型转换,但同时也能诱导 VSMC 发生线粒体功能障碍和凋亡,导致斑块内具有胶原合成能力的效应细胞总数减少<sup>[21]</sup>;其次,本研究发现 PCSK9 可上调 MMP-2 的表达(而 MMP-9 无明显变化),该酶活性的增强可加速已形成胶原的降解。因此,在复杂的体内微环境中,由细胞凋亡和 MMP-2 介导的胶原降解与细胞丢失效应,超过了由表型转换带来的胶原合成效应,最终表现为斑块胶原含量的净减少。这一发现不仅合理解释了本研究的实验现象,也进一步提示 PCSK9 存在独立于血脂调节作用之外的促 As 新机制。在分子机制探索方面,本研究聚焦于 NF- $\kappa$ B 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰。MYOCD 是 VSMC

收缩表型的主调控因子,其与 SRF 形成的复合物可激活收缩型标志基因的转录<sup>[9]</sup>。KLF4 则能抑制 MYOCD-SRF 复合物的功能,并促进合成表型相关基因的表达<sup>[22]</sup>。NF- $\kappa$ B 可进一步通过结合 KLF4 启动子激活其转录<sup>[23]</sup>。我们的研究表明,PCSK9 过表达可下调 MYOCD、上调 KLF4 和 NF- $\kappa$ B p65 的表达,而抑制 PCSK9 则产生相反效应。在 PCSK9<sup>sm OE</sup> As 小鼠模型的主动脉斑块中,我们也观察到 NF- $\kappa$ B 与 KLF4 表达上调、MYOCD 表达下调的协同变化。这些结果在细胞与动物模型层面一致表明,PCSK9 很可能通过激活 NF- $\kappa$ B 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰来调控 VSMC 的表型转换。既往研究也为这一观点提供了支持:例如,抑制 PCSK9 可通过阻断 Toll 样受体 4/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻 As 病变,且该作用独立于血浆胆固醇水平的变化<sup>[24]</sup>。然而,本研究仍存在一定局限性,首先,由于未检测 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 小鼠和 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠的血浆 PCSK9 水平,无法量化 VSMC 来源的 PCSK9 对循环 PCSK9 的实际贡献,因而不能完全排除其对全身脂质代谢的潜在间接影响。其次,体重和血压是评估代谢与心血管模型表型的重要参数,而本研究未能提供 PCSK9<sup>fl/fl</sup> 小鼠和 PCSK9<sup>sm OE</sup> 小鼠的相应数据,限制了从整体代谢角度对模型进行更全面评估的可能。此外,NF- $\kappa$ B 作为核转录因子,需从胞质易位至核内才能发挥转录调控作用,而本研究仅检测了细胞中 NF- $\kappa$ B p65 的总蛋白水平,未能充分反映其转录活性。上述问题有待后续研究通过更精细的实验设计加以补充验证。

综上所述,本研究证实 PCSK9 能够促进 VSMC 由收缩表型向合成表型转换,并增强其增殖与迁移能力,揭示其分子机制可能和调控 NF- $\kappa$ B 与 KLF4、MYOCD 之间的信号串扰有关。这些发现为深入理解 PCSK9 在 As 中的作用提供了新的视角,同时提示,靶向 VSMC 中 PCSK9 或其下游信号通路,可能成为稳定斑块及延缓 As 进展的潜在新途径。

#### [参考文献]

- [1] KOBIYAMA K, LEY K. Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [2] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [3] FRAUSTO L, SCOTT M L, ORR A W, et al. Smooth muscle cell phenotypic modulation during atherosclerosis [J]. *Vascul Pharmacol*, 2026, 162: 107570.
- [4] WU G, FAN Q, CHEN M, et al. Activation of AMP-acti-

- vated protein kinase by metformin inhibits dedifferentiation of platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cells to improve arterial remodeling in cirrhotic portal hypertension[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2025, 19(6): 101487.
- [5] TIAN L, HUANG C K, DING F, et al. Galectin-3 mediates thrombin-induced vascular smooth muscle cell migration[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 686200.
- [6] XU S, LYU Q R, ILYAS I, et al. Vascular homeostasis in atherosclerosis: a holistic overview[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 976722.
- [7] SONG J, CAO C, WANG Z, et al. Mechanistic insights into the regression of atherosclerotic plaques[J]. *Front Physiol*, 2024, 15: 1473709.
- [8] 王佳, 彭蒙娜, 高洁, 等. 血管平滑肌细胞表型转化与动脉粥样硬化血管重塑[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(3): 269-276.
- WANG J, PENG M N, GAO J, et al. Atherosclerotic vascular remodeling induced by phenotypic switching of vascular smooth muscle cell[J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(3): 269-276.
- [9] JIANG Y, QIAN H Y. Transcription factors: key regulatory targets of vascular smooth muscle cell in atherosclerosis[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 2.
- [10] YAP C, MIEREMET A, DE VRIES C J M, et al. Six shades of vascular smooth muscle cells illuminated by KLF4(Krüppel-Like factor 4)[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(11): 2693-2707.
- [11] JAIN M K, SANGWUNG P, HAMIK A. Regulation of an inflammatory disease: krüppel-like factors and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(3): 499-508.
- [12] HUMMELGAARD S, VILSTRUP J P, GUSTAFSEN C, et al. Targeting PCSK9 to tackle cardiovascular disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 249: 108480.
- [13] PUNCH E, KLEIN J, DIABA-NUHOHO P, et al. Effects of PCSK9 targeting: alleviating oxidation, inflammation, and atherosclerosis[J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(3): e023328.
- [14] 王琳, 杨旋, 樊晋泽, 等. 靶向 PCSK9 治疗在心血管领域的最新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(10): 892-900.
- WANG L, YANG X, FAN J Z, et al. The latest advances in targeting PCSK9 therapy in the cardiovascular field[J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(10): 892-900.
- [15] SHIN D, KIM S, LEE H, et al. PCSK9 stimulates Syk, PKC $\delta$ , and NF- $\kappa$ B, leading to atherosclerosis progression independently of LDL receptor[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2789.
- [16] LI Z, ZHU H, LIU H, et al. Evolocumab loaded bio-liposomes for efficient atherosclerosis therapy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 158.
- [17] GUO Y, TANG Z, YAN B, et al. PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) triggers vascular smooth muscle cell senescence and apoptosis: implication of its direct role in degenerative vascular disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(1): 67-86.
- [18] SOTLER T, ŠEBEŠTJEN M. PCSK9 as an atherothrombotic risk factor[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1966.
- [19] ZHUANG J, ZHU H, CHENG Z, et al. PCSK9, a novel immune and ferroptosis related gene in abdominal aortic aneurysm neck[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 6054.
- [20] SHAPIRO M D, FAZIO S. PCSK9 and atherosclerosis-lipids and beyond[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24(5): 462-472.
- [21] 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.
- [22] HWANG K C. The role of MicroRNAs in vascular diseases; smooth muscle cell differentiation and de-differentiation[J]. *Korean Circ J*, 2014, 44(4): 218-219.
- [23] KE B, ZHANG A, WU X, et al. The role of krüppel-like factor 4 in renal fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 327.
- [24] WANG Y, FANG X, LIU J, et al. PCSK9 in T-cell function and the immune response[J]. *Biomark Res*, 2024, 12(1): 163.

(此文编辑 王颖)