



氧化低密度脂蛋白通过 PCSK9/LRP1 信号途径 促神经细胞凋亡的双向调节*

何乃琪^{1)**} 赵雪珊^{1,2)**} 徐倩¹⁾ 张华玉¹⁾ 任重¹⁾ 唐志晗¹⁾ 向琼^{1)***} 刘录山^{1)***}

(¹⁾ 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,
南华大学衡阳医学院, 衡阳 421001; ²⁾ 榆林学院生命科学学院, 榆林 719000)

摘要 目的 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是多种危险因素引起的中枢神经系统退行性疾病, 其中神经细胞凋亡是其主要病理基础之一。高脂血症是 AD 发生的高危因素, 可导致脑组织内氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 水平增高。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9) 是一个与血脂代谢密切相关的蛋白酶, 但有研究显示其与 AD 发生可能相关。本研究旨在探索 PCSK9 在介导 ox-LDL 促神经细胞凋亡中的作用及其机制, 进一步阐述高脂血症导致 AD 等神经退行性疾病的发生机制。方法 首先用不同浓度 ox-LDL (0、25、50、75、100 mg/L) 处理 PC12 细胞 24 h, 油红 O 染色检测 PC12 细胞脂质蓄积, Hoechst33258 染色和流式细胞术检测 PC12 细胞凋亡, ELISA 检测 PC12 分泌的 β 淀粉样肽 (amyloid β -peptide, A β) 含量, 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测 SREBP2、PCSK9 和 LRP1 的表达。然后用 75 mg/L ox-LDL 处理 PC12 细胞不同时间 (0、6、12、24、48 h), Western blot 检测 SREBP2、PCSK9 和 LRP1 的表达情况。最后, 100 nmol/L PCSK9 siRNA 转染 PC12 细胞 48 h 后, 用 75 mg/L ox-LDL 处理 PC12 细胞 24 h, Hoechst33258 染色和流式细胞术检测 PC12 细胞的凋亡率, Western blot 检测 PCSK9、LRP1、PI3K、AKT、P-PI3K、P-AKT、NF- κ B、Bcl-2、Bax、Caspase-9 和 Caspase-3 的表达, ELISA 检测 PC12 细胞的 A β 分泌量。结果 ox-LDL 可以增加 PC12 细胞脂质蓄积, 促进 PC12 细胞凋亡和 A β 分泌, 同时增加 PC12 细胞中 SREBP2 和 PCSK9 的表达, 减少 LRP1 的表达。敲低 PCSK9 的表达可以通过 PI3K/AKT 通路和 NF- κ B-Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 通路减弱 ox-LDL 诱导的 PC12 细胞凋亡, 同时增加 PC12 细胞中 A β 的分泌。结论 ox-LDL 通过诱导 PC12 细胞中 PCSK9 表达增加, 降低 LRP1 的表达, 进而影响下游的不同信号途径, 从而在 ox-LDL 诱导 PC12 细胞凋亡中发挥双向调节作用。

关键词 氧化低密度脂蛋白, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9, 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1, 神经细胞, 细胞凋亡
中图分类号 R3 **DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0300

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以进行性痴呆为主要临床表现的神经退行性疾病, 是常见老年性疾病之一。AD 特征性病理改变包括 β 淀粉样肽 (amyloid β -peptide, A β) 沉积形成的神经细胞外老年斑 (senile plaque, SP)、tau 蛋白过度磷酸化形成的神经细胞内神经原纤维缠结和神经元丢失伴胶质细胞增生^[1-2]。虽然 AD 的病理表现有很多种, 但已有大量研究证实, 神经元凋亡是 AD 的重要病理改变, 在 AD 早期阶段就发现了神经元凋亡, 同时在 AD 患者的尸检中也发现了大脑皮层和海马中大量凋亡的神经元^[3]。 β 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 是一种单

次跨膜天冬氨酸蛋白质, APP 的代谢由 α 分泌酶、 β 分泌酶、 γ 分泌酶这 3 种水解酶介导。APP 在正常情况下仅产生具有营养作用的可溶性片段, 但当 APP 基因发生突变时, β 分泌酶和 γ 分泌酶裂解 APP 增加, 并释放出以 A β 40 和 A β 42 为主要形式的 A β 片段, 以上两种片段聚集在脑内被小胶质细胞

* 国家自然科学基金 (81370376) 和湖南省自然科学基金 (2018JJ2343) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

向琼 Tel: 15211473383, E-mail: xiangqiong@163.com

刘录山 Tel: 13975491473, E-mail: liuls2000@163.com

收稿日期: 2023-08-02, 接受日期: 2023-11-02

吞噬, 同时释放炎症因子损伤脑神经元, 产生慢性神经退行性病变, 最终导致AD的发生^[4]。

高脂血症是动脉粥样硬化的危险因素, 同时也被认为是AD等神经退行性疾病发生的高危因素^[5]。但高脂血症导致AD发生增加的具体机制还在持续深入探讨中。

前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9) 是脂质代谢调节的关键酶, 与血脂代谢密切相关。PCSK9主要通过降解肝细胞表面的低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR), 使得血液中脂质不能有效清除, 从而导致高脂血症。考虑到大脑是脂质含量最高的器官之一, PCSK9通过调节脂质代谢参与AD发生的潜在作用值得关注。Courtemanche等^[6]研究发现, 神经退行性疾病患者脑脊液中PCSK9水平明显增加, 也提示PCSK9可能与AD发生存在关联性。

大脑中参与脂质代谢的主要受体是低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1)。LRP1广泛表达于脑组织中各种细胞类型, 包括神经元细胞、脑微血管内皮细胞和胶质细胞等。除参与脂质代谢外, LRP1还能与APP等结合, 是清除A β 的重要转运体。LRP1在神经细胞表达丰富, 在AD患者的大脑中LRP1水平是减少的, 且LRP1功能降低促进认知性障碍^[7]。越来越多的体外和体内研究证据表明, LRP1参与AD发病机制的多种途径, 包括调节A β 的产生和清除、脂质运输和突触功能^[8-9]。A β 持续沉积诱导神经胶质细胞激活、启动神经炎症和导致神经细胞凋亡^[10]。Fu等^[11]已证实, PCSK9可以诱导LRP1降解^[11-12], 提示PCSK9可能通过降解LRP1, 进而影响A β 代谢从而导致AD发生。PI3K/AKT作为体内重要的信号通路, 在能量代谢及细胞代谢、增殖和凋亡中起到重要作用。大量文献证明, PI3K/AKT通路抑制细胞的凋亡。AKT通过下游多种途径对靶蛋白进行磷酸化而发挥抗凋亡作用。有文献证明, 小鼠大脑的神经细胞中, LRP1可以激活AKT通路, 起到抗细胞凋亡的作用^[13-14]。那么PCSK9是否可以通过LRP1影响PI3K/AKT通路进而调控神经细胞凋亡呢? 这值得进一步探究。

高脂血症可导致脑组织中氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 水平升高, 并主要导致细胞内氧化应激和脂质蓄积增加。因此本文研究了ox-LDL对PC12细胞脂质蓄积、凋

亡和分泌A β 的影响及其具体机制, 从而为AD的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PC12细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心; DMEM高糖培养基、胰酶细胞消化液购自美国Hyclone公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; ox-LDL购自广州奕源生物科技有限公司; DMSO购自北京索莱宝科技有限公司; 彩色预染蛋白购自长沙艾佳生物技术有限公司; 油红O干粉购自美国Sigma公司; Hoechst33258荧光染色试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司; siRNA和riboFECTTM CP转染试剂均购自广州市锐博生物科技有限公司; Annexin-V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司; A β 40、A β 42酶联免疫分析试剂盒购自上海丰翔生物科技有限公司; 一抗均购于Proteintech公司; 二抗均购自长沙艾佳生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

PC12细胞均培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。PCSK9 siRNA的PC12细胞模型的构建, 使用广州市锐博生物科技有限公司合成的siRNA成品冻干粉, 按照试剂盒的使用方法处理细胞后, 将培养板置于37℃的CO₂培养箱中培养48 h后用于后续实验。

1.2.2 油红O染色

按本实验室方法常规配制成油红O工作液。PC12细胞接种于放有盖玻片的6孔板内, 待细胞贴壁50%~70%后, 换无血清培养液并加入不同浓度ox-LDL培养细胞24 h。PC12细胞贴壁生长于培养板, 用PBS清洗3次, 再用4%的多聚甲醛固定30 min。用蒸馏水洗去甲醛后用油红O工作液染色15 min, 再用苏木素复染30 s, 最后使用水性封片剂封片, 最后在光镜下观察细胞的染色情况并进行拍照。

1.2.3 Hoechst33258染色

将PC12细胞培养于6孔板内, 待细胞贴壁70%后换无血清培养基并加入不同浓度ox-LDL培养24 h, PBS清洗3次。用4%的多聚甲醛固定20 min, PBS清洗3次。在避光条件下, 用Hoechst33258染色液染核30 min, PBS清洗3次。

加入适量的抗荧光淬灭封片剂,用荧光显微镜观察细胞密度并用紫外光激发拍照。

1.2.4 AnnexinV-FITC/PI双染

取生长状态良好的PC12细胞种于孔板内,待细胞贴壁后,用不同浓度的 ox-LDL 处理 48 h, PBS 清洗 3 次。加入 0.25% 的胰酶消化,然后用完全培养基终止消化,轻轻吹散细胞,并将转移至 15 ml 离心管中,室温,1 000 r/min,离心 10 min,弃去上清并收集细胞。然后根据凋亡试剂盒(美国 BD 公司)使用说明进行染色,避光室温孵 15 min。最后采用流式细胞仪进行上机检测以及数据分析和统计。

1.2.5 蛋白质印迹(Western blot, WB)检测

PC12 细胞用不同 ox-LDL 浓度处理后加裂解液裂解,用细胞刮棒刮下并收集细胞悬液装进 EP 管。4°C,1 000 r/min,离心 10 min,并收集上层蛋白质。用 BCA 法进行蛋白质定量后,用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶对细胞样品进行电泳,电泳结束后将蛋白质转移至 PVDF 膜,用 5% 的脱脂奶粉封闭 4 h,加入一抗 4°C 过夜,1×TBST 清洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,1×TBST 清洗 3 次。用化学发光检测系统检测。

1.2.6 ELISA 检测 Aβ40 及 Aβ42 含量

PC12 细胞接种于 6 孔板内,以不同浓度 ox-LDL 处理 24 h 后,2 000 r/min,离心 20 min,收集上清液。分别设立空白孔和待测样品孔,在酶标包被板

上加入样品稀释液 40 μl 到待测样品孔中,再加待测样品 10 μl,用封板膜封板后置于 37°C 温育 30 min。揭开封板膜,弃去液体,将板子甩干,每个孔中加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,重复 5 次,将板子拍干。除空白孔,每孔加入酶标试剂 50 μl,37°C 温育 30 min 后洗涤。随后每孔加入显色剂 A 50 μl,再加入显色剂 B 50 μl,37°C 避光显色 15 min,再加入终止液 50 μl,终止反应。以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A)值。依据标准曲线计算样品的实际浓度。

1.3 统计分析

所有实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较组间 *t* 检验(Student's *t* test)。统计分析、作图采用 GraphPad Prism 5 Project 软件, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ox-LDL 增加 PC12 细胞内脂质蓄积

为了探究 ox-LDL 对 PC12 细胞脂质蓄积的影响,采用不同浓度的 ox-LDL (0、25、50、75、100 mg/L) 处理 PC12 细胞 24 h,后续实验均采用此浓度梯度,用油红 O 染色检测 PC12 细胞的脂质蓄积。结果发现,随着浓度梯度的增加,细胞内红染的颗粒逐渐增多。结果提示,ox-LDL 呈浓度梯度依赖性增加细胞内的脂质蓄积(图 1)。

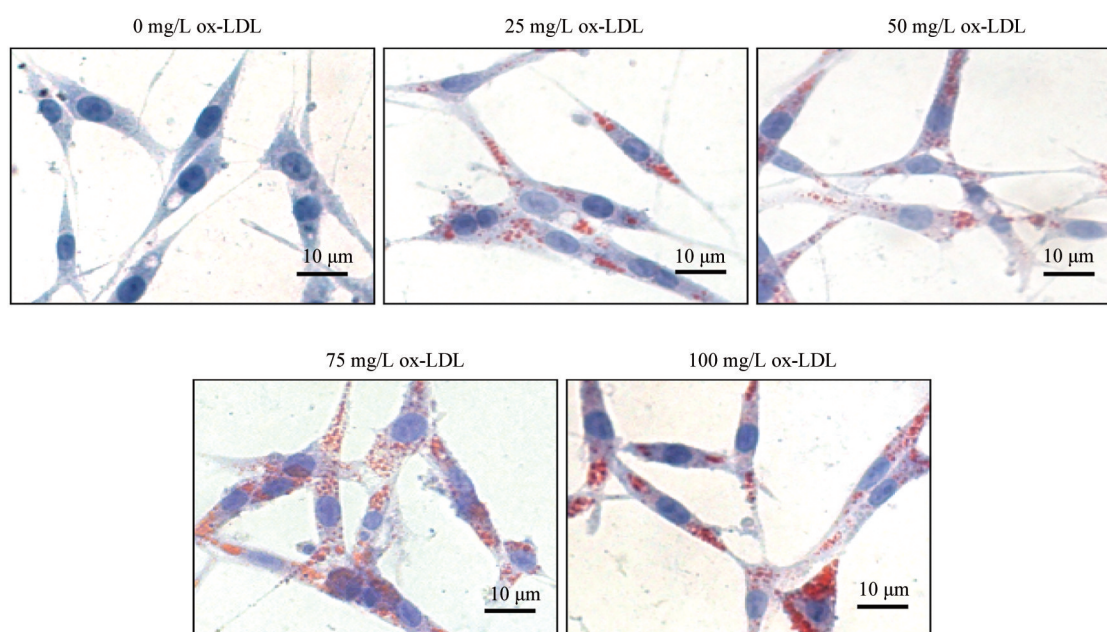


Fig. 1 ox-LDL increases lipid accumulation in PC12 cells in a concentration-dependent manner (oil red O staining)

2.2 ox-LDL促进PC12细胞的凋亡

为了探究ox-LDL对PC12细胞凋亡的影响, 采用不同浓度的 ox-LDL 处理 PC12 细胞 24 h 后用 Hoechst33258 染色, 随后在荧光显微镜下检测 PC12 细胞的凋亡情况。结果发现, 随着 ox-LDL 浓

度的增加, PC12 细胞中呈致密浓染或呈碎块状致密浓染的细胞核也逐渐增多, 呈现强荧光颗粒, 其中 75 mg/L ox-LDL 处理组增加最为明显。结果提示, ox-LDL 呈浓度梯度依赖性增加 PC12 细胞凋亡, 并在 75 mg/L 浓度时表现的最明显 (图2)。

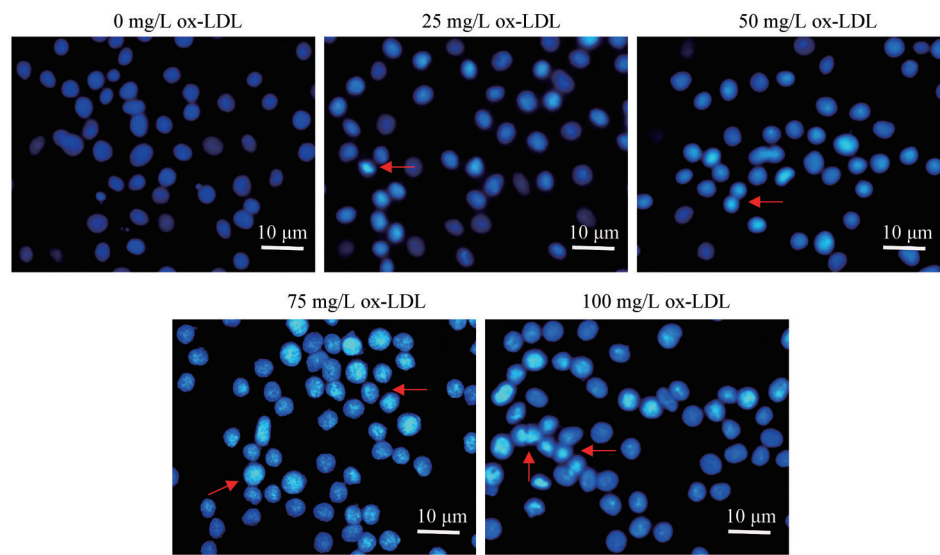


Fig. 2 ox-LDL concentration-dependent promotion of apoptosis of PC12 cells (Hoechst staining)
Arrow: Brighter fluorescence indicates apoptosis.

流式细胞术结果也发现, 随着 ox-LDL 浓度增加, PC12 细胞的凋亡数量也增加, 与 Hoechst33258 染色结果一致, 其中 75 mg/L ox-LDL

处理组凋亡增加最为明显。结果提示, ox-LDL 确实会促进 PC12 细胞凋亡 (图3)。

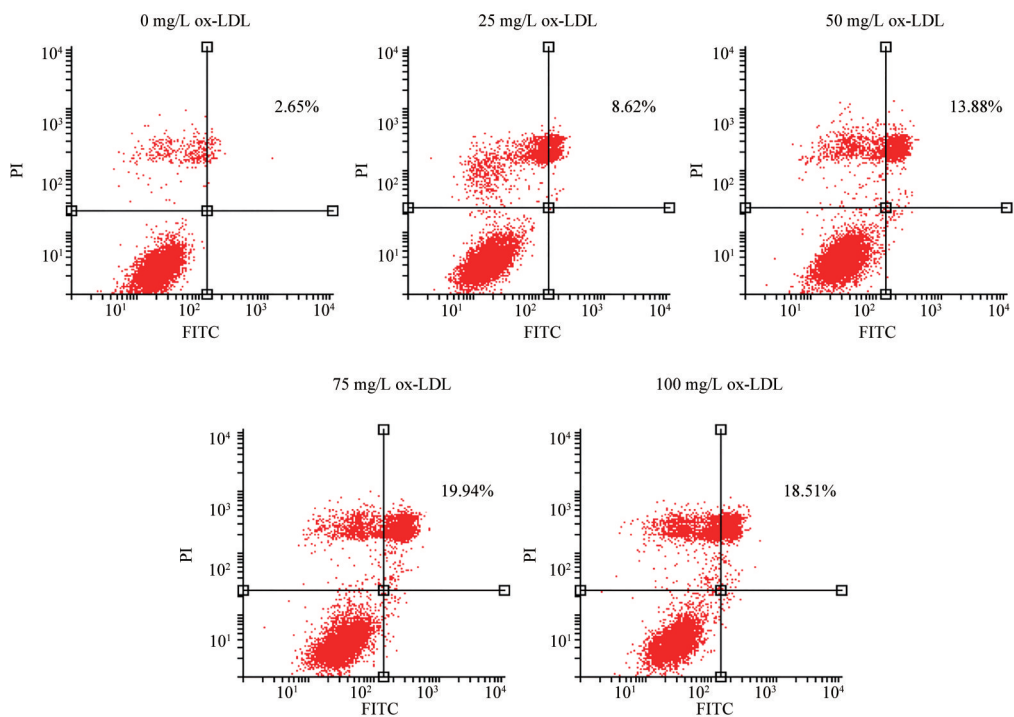


Fig. 3 ox-LDL increases the apoptosis rate of PC12 cells in a concentration-dependent manner (flow cytometry)

2.3 ox-LDL减少PC12细胞A β 的分泌

为了探究 ox-LDL 对 PC12 细胞 A β 分泌的影响, 采用不同浓度的 ox-LDL 处理 PC12 细胞 24 h 后, ELISA 试剂盒检测培养液中 A β 40 和 A β 42 含量。结

果发现, 随着 ox-LDL 浓度增大, A β 40 及 A β 42 含量明显降低, 其中 75 mg/L ox-LDL 处理组降低最为显著。结果提示, ox-LDL 可减少 PC12 细胞 A β 的分泌 (图4)。

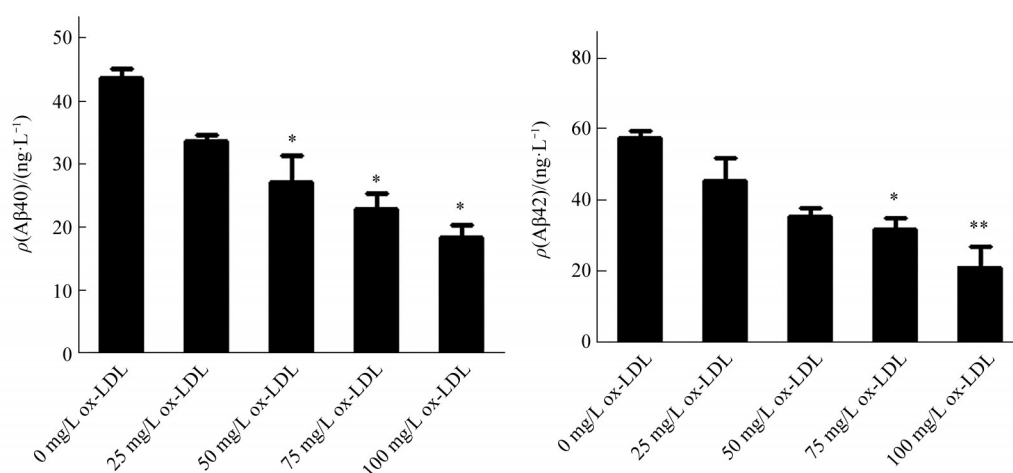


Fig. 4 Effects of different concentrations of ox-LDL on A β secretion from PC12 cells (ELISA, $n=3$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0 mg/L ox-LDL group.

2.4 ox-LDL增加PC12细胞SREBP2、PCSK9的表达, 降低LRP1的表达

为了探究 ox-LDL 能否通过调节 SREBP2、PCSK9、LRP1 的表达从而影响 PC12 神经细胞凋亡, 采用不同浓度的 ox-LDL 处理 PC12 细胞 24 h 后, Western blot 检测细胞中上述蛋白质的表达。结果发现, 随着 ox-LDL 浓度梯度的增加, PC12 细胞中 SREBP2 和 PCSK9 的表达也随之增加, 而 LRP1 的表达则是降低的。其中 75 mg/L ox-LDL 处理组最为显著, 后续 ox-LDL 均采用该浓度处理。结果提示, ox-LDL 可增加 SREBP2 和 PCSK9 的表达, 降低 LRP1 的表达 (图5)。

为了进一步确证该结果, 采用 75 mg/L ox-LDL 处理 PC12 细胞 0、6、12、24、48 h 后, Western blot 检测细胞中上述蛋白质的表达。结果发现, 随着 ox-LDL 处理时间的延长, PC12 细胞中 SREBP2 和 PCSK9 的表达也随之增加, 而 LRP1 的表达是随之降低的, 其中 24 h 时最为显著。结果进一步提示, ox-LDL 可增加 SREBP2 和 PCSK9 的表达, 降低 LRP1 的表达 (图6)。

2.5 敲低PCSK9的表达可以减弱ox-LDL诱导的PC12细胞中PCSK9表达增加和LRP1表达减少

将 100 nmol/L 浓度的 PCSK9siRNA 转染 PC12 细胞 48 h 后, 提取总蛋白质检测各组 PCSK9 蛋白

的表达量。结果显示, 与对照组 (Control) 相比, 转染浓度为 100 nmol/L siRNA 组 PCSK9 基因沉默效应显著, 说明转染模型构建成功, 后续实验均采用此浓度。与此同时发现, PCSK9siRNA 转染后 LRP1 的表达量显著增加 (图7)。结果提示, 敲低 PCSK9 的表达可以增加 ox-LDL 诱导的 PC12 细胞中 LRP1 的表达。

为了进一步确证结果, 设立不同组别 (Control 组、ox-LDL 处理组、NC (negative control) + ox-LDL 处理组、siPCSK9+ox-LDL 处理组) 进行实验, 后续实验均采用该分组。Western blot 检测 PC12 细胞 PCSK9 和 LRP1 的蛋白质表达。结果发现, 与 Control 组相比, ox-LDL 处理组 PCSK9 蛋白表达增加, 而 LRP1 蛋白表达减少。与 ox-LDL 处理组相比, NC+ox-LDL 处理组未见明显差异, siPCSK9+ox-LDL 处理组 PCSK9 蛋白表达减少, LRP1 蛋白表达增加, siPCSK9+ox-LDL 处理组与 NC+ox-LDL 处理组相比差异有显著性 ($P<0.05$)。结果提示, 敲低 PCSK9 的表达可以减弱 ox-LDL 诱导的 PC12 细胞中 PCSK9 表达增加和 LRP1 表达减少 (图8)。

2.6 敲低PCSK9的表达可以减弱ox-LDL诱导的PC12细胞凋亡

为了进一步明确 PCSK9 在 ox-LDL 诱导 PC12

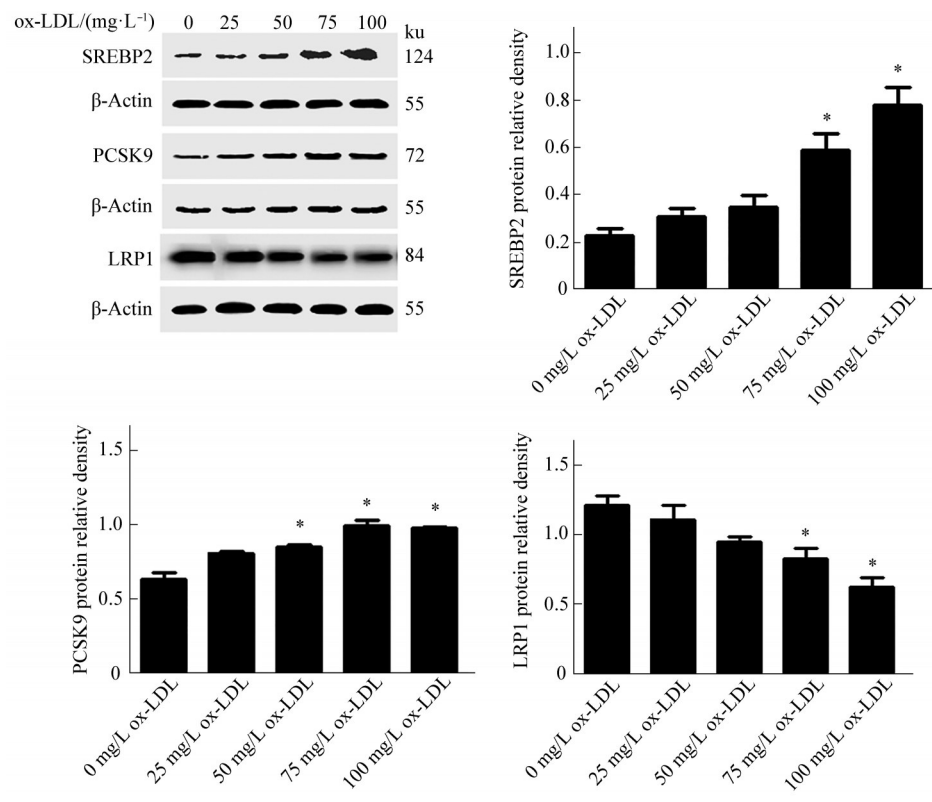


Fig. 5 Effects of different concentrations of ox-LDL on SREBP2, PCSK9, LRP1 expression in PC12 cells (Western blot, $n=3$)
* $P < 0.05$, compared to 0 mg/L ox-LDL group.

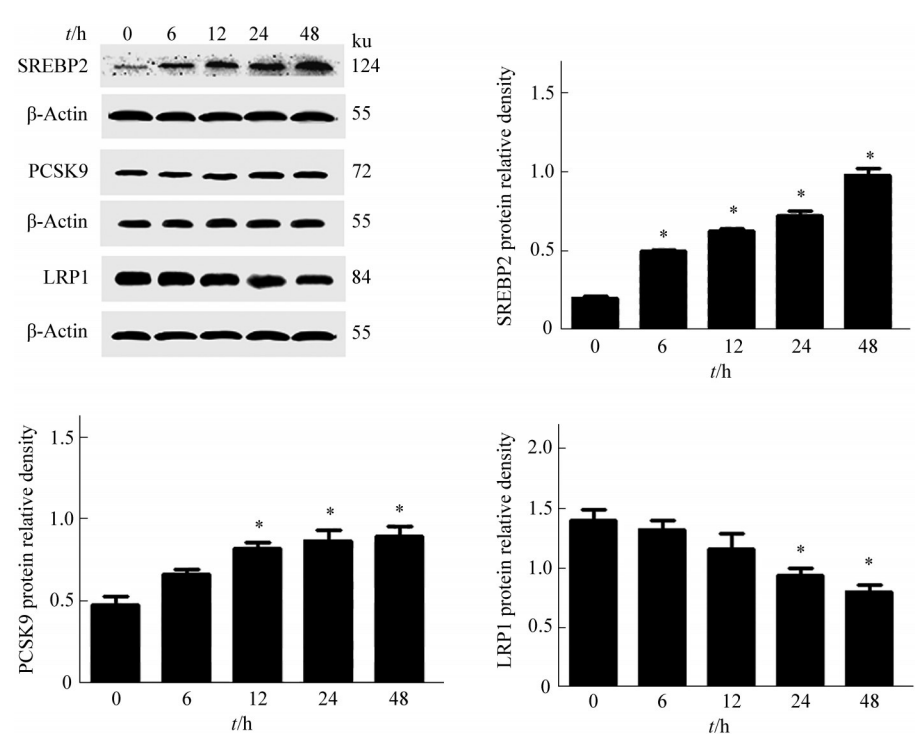


Fig. 6 Effects of 75mg/L ox-LDL treatment at different times on the expressions of SREBP2, PCSK9, and LRP1 in PC12 cells (Western blot, $n=3$)
* $P < 0.05$ compared to the 0 h group.

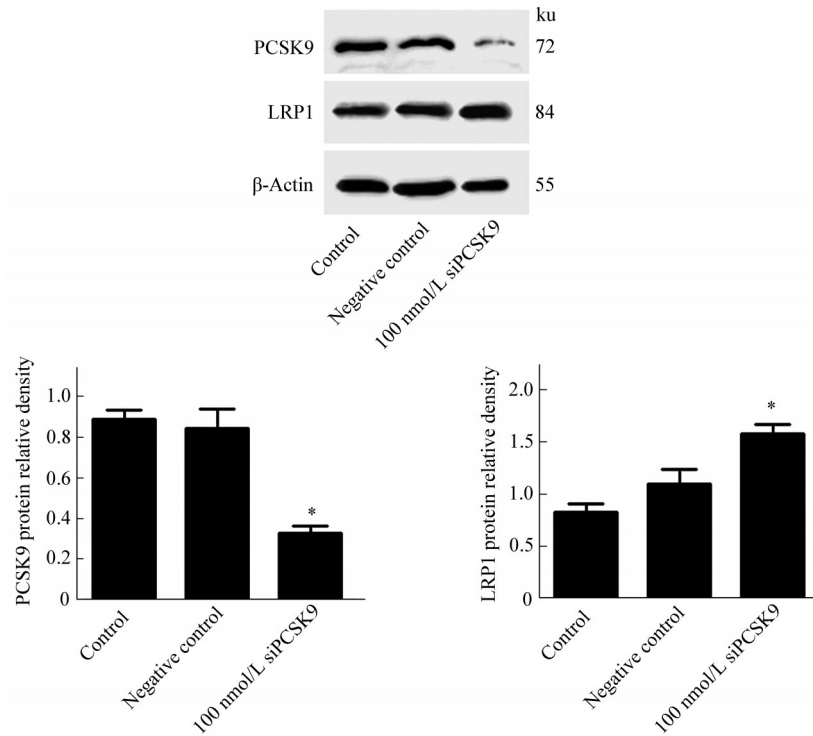


Fig. 7 siPCSK9 transfection effectively reduced PCSK9 expression and increased LRP1 expression (Western blot, $n=3$)

* $P<0.05$, compared to Control group.

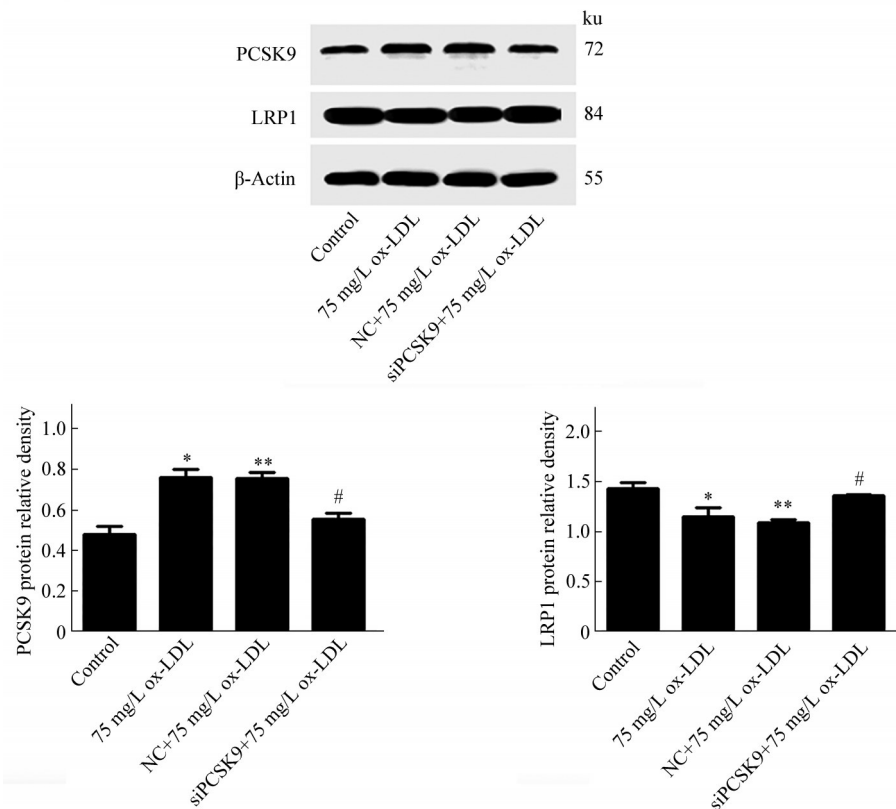


Fig. 8 Effects of siPCSK9 on PCSK9 and LRP1 expression in ox-LDL-induced PC12 cells (Western blot, $n=3$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared to Control group; # $P<0.05$, compared to NC+ox-LDL group.

凋亡中的作用, 本文采用siPCSK9, 并设立不同分组, 用Hoechst33258对不同组别进行检测。结果发现, 与Control组相比, ox-LDL处理组呈致密浓染或呈碎块状致密浓染的细胞核增多, 与ox-LDL处

理组相比, siPCSK9+ox-LDL处理组呈致密浓染或呈碎块状致密浓染的细胞核减少 (图9)。结果提示, 敲低PCSK9的表达可以减弱ox-LDL诱导的PC12细胞凋亡。

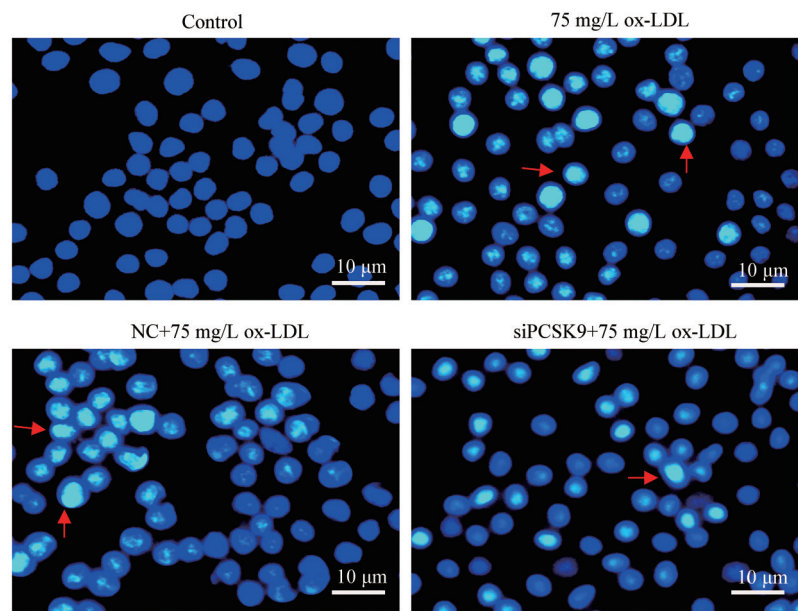


Fig. 9 Effects of siPCSK9 on ox-LDL-induced apoptosis of PC12 cells (Hoechst staining)
Arrow: Brighter fluorescence indicates apoptosis.

流式细胞术结果也发现, 与ox-LDL处理组相比, siPCSK9组细胞凋亡率明显减少。此结果进一

步说明了PCSK9介导了ox-LDL诱导的PC12细胞凋亡 (图10)。

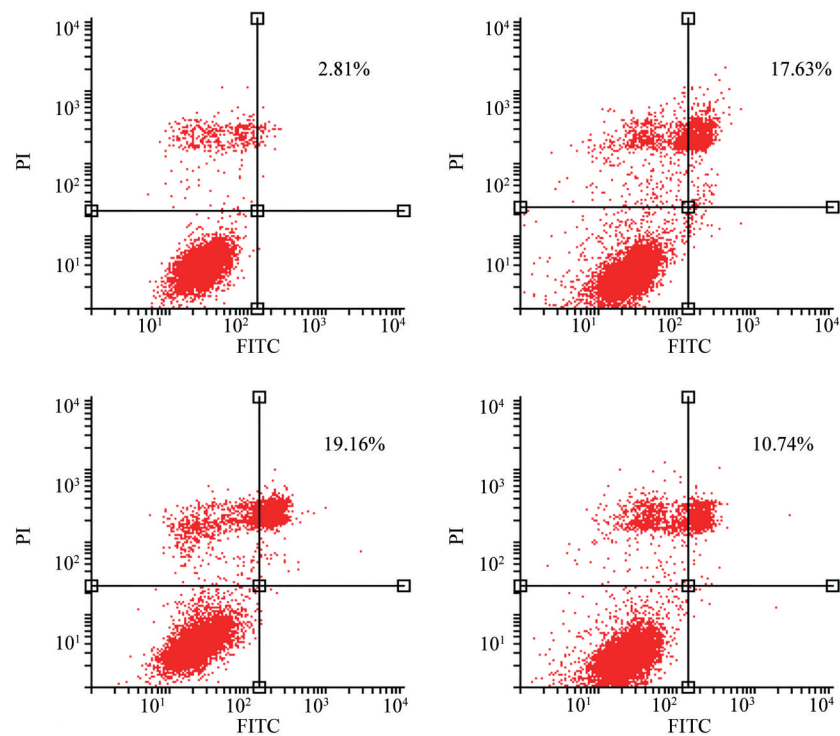


Fig. 10 Effect of siPCSK9 on ox-LDL-induced apoptosis in PC12 cells

2.7 敲低PCSK9的表达可以提高PC12细胞中PI3K及AKT的磷酸化水平

为了探究PCSK9促进PC12凋亡的机制, 本文设立不同组别, Western blot检测PC12细胞PI3K、AKT、P-PI3K及P-AKT蛋白的表达。结果发现, 与Control组相比, ox-LDL处理组P-PI3K及

P-AKT蛋白减少, 而与NC+ox-LDL组相比, siPCSK9+ox-LDL处理组P-PI3K及P-AKT蛋白增加(图11)。结果提示, 敲低PCSK9的表达可能是通过PIK3/AKT通路从而减弱ox-LDL诱导的PC12凋亡。

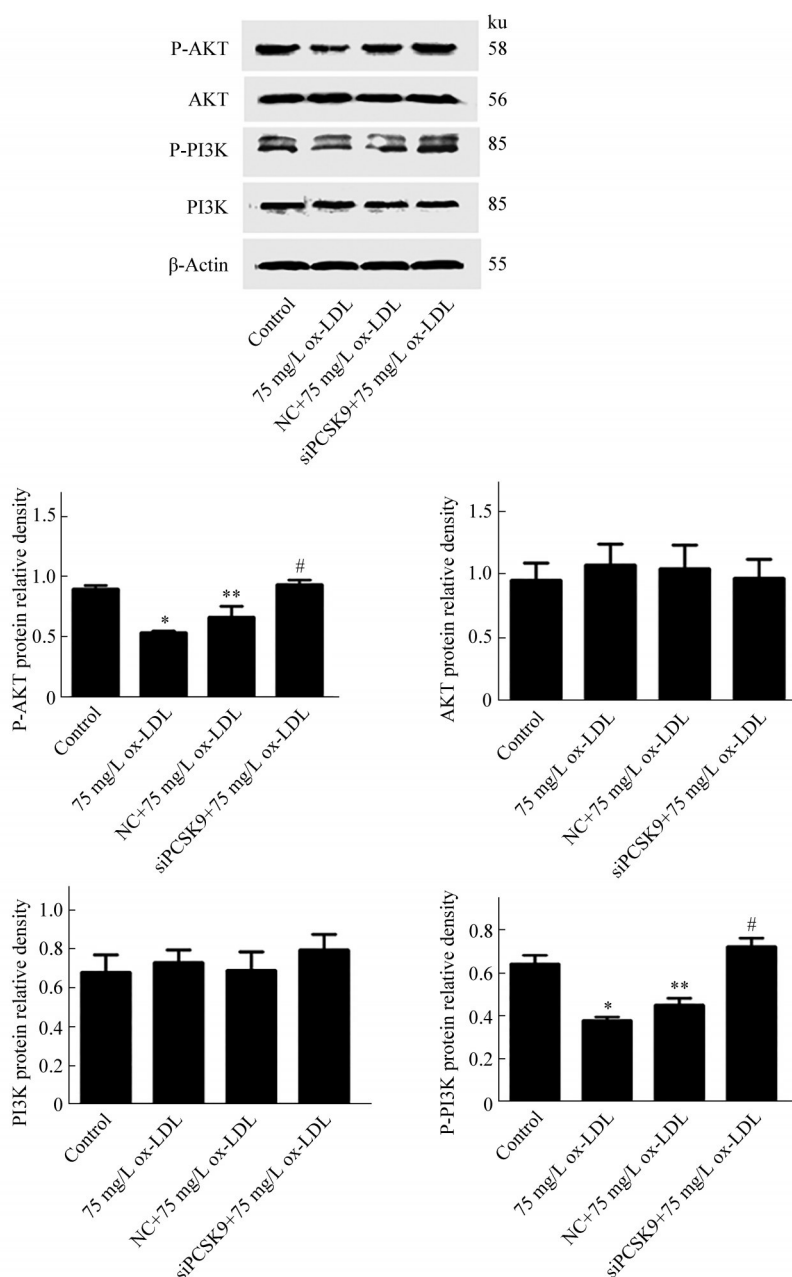


Fig. 11 Effects of siPCSK9 on PI3K, AKT expression and phosphorylation in PC12 cells (Western blot, $n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to Control group; # $P < 0.05$, compared to NC+ox-LDL group.

2.8 敲低PCSK9的表达可以减少PC12细胞中NF- κ B、Caspase-3、Caspase-9、Bax的表达, 增加Bcl-2的表达

为了进一步探究PCSK9促进PC12凋亡的机

制, 通过Western blot的方法检测PC12细胞NF- κ B、Caspase-3、Caspase-9、Bax及Bcl-2蛋白的表达。结果显示: 与Control组相比, ox-LDL处理组NF- κ B、Caspase-3、Caspase-9和Bax蛋白表

达增加, Bcl-2 蛋白表达减少; 而与 NC+ox-LDL 组相比, siPCSK9+ox-LDL 处理组 NF- κ B、Caspase-3、Caspase-9 和 Bax 蛋白表达减少, Bcl-2 蛋白表达

增加, 差异有显著性 ($P<0.05$) (图 12)。结果提示, 敲低 PCSK9 的表达可能是通过 Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 通路从而减弱 ox-LDL 诱导的 PC12 凋亡。

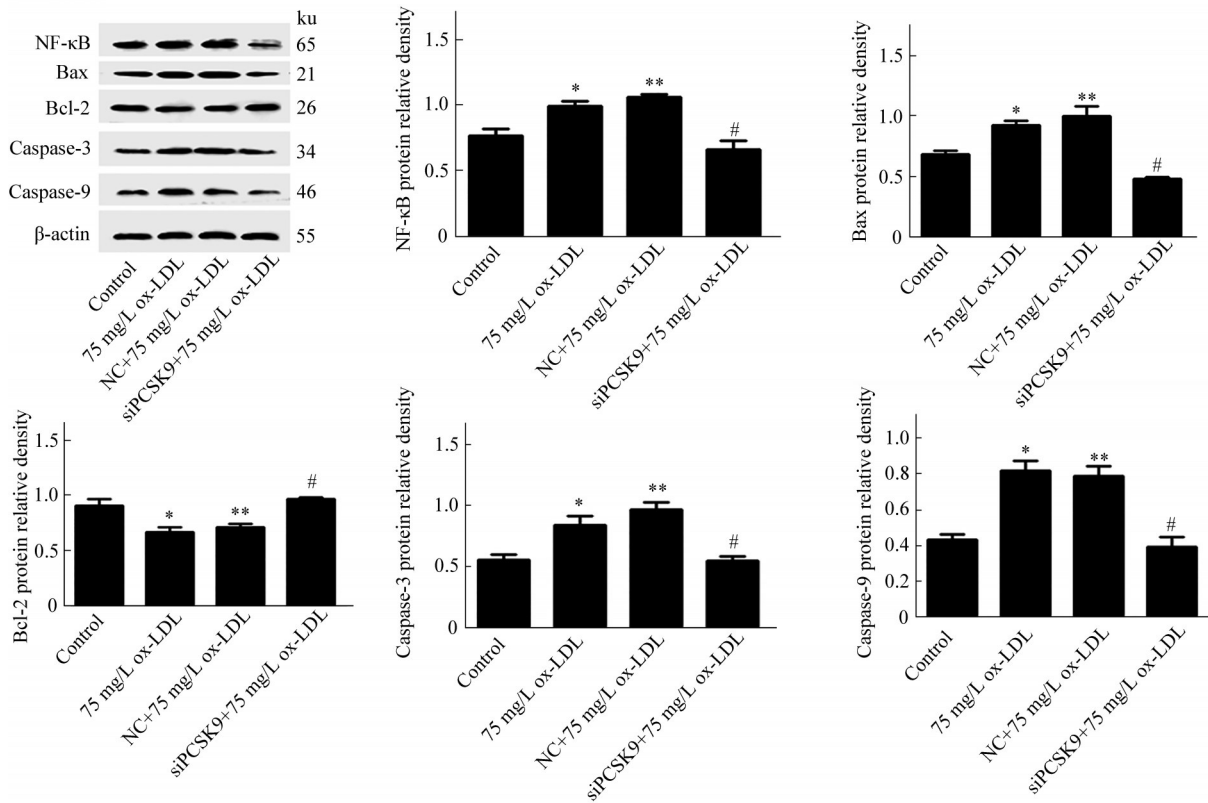


Fig. 12 Effects of siPCSK9 on the expression of NF- κ B, Caspase-3, Caspase-9, Bax, and Bcl-2 in PC12 cells (Western blot, $n=3$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared to Control group; # $P<0.05$, compared with NC+ox-LDL group.

2.9 敲低PCSK9的表达可以增加ox-LDL处理的PC12细胞A β 的分泌

为了探究 siPCSK9 对 PC12 细胞 A β 分泌的影响, 用 ELISA 方法检测培养液中 A β 40 及 A β 42 含量。结果发现: 与 Control 组相比, ox-LDL 处理组

A β 40 和 A β 42 含量减少; 而与 NC+ox-LDL 处理组相比, siPCSK9+ox-LDL 处理组 A β 40 和 A β 42 含量增加, 差异有显著性 ($P<0.05$) (图 13)。结果提示, 敲低 PCSK9 的表达可以增加 ox-LDL 处理 PC12 细胞分泌 A β 。

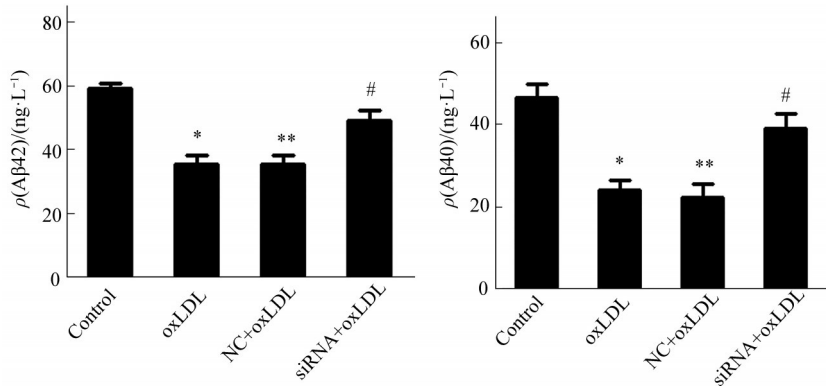


Fig. 13 Effects of siPCSK9 on A β 40 and A β 42 secretion in ox-LDL-treated PC12 cells (ELISA, $n=3$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared to Control group; # $P<0.05$, compared to NC+ox-LDL group.

3 讨 论

AD是神经退行性疾病的主要类型,患病率在老年人口中越来越高^[15]。AD病变部位主要累及双侧大脑额颞叶及海马,组织病理学典型改变为SP沉积、神经原纤维缠结和神经元丢失等。虽然现已有多种治疗方法如乙酰胆碱酯酶抑制剂、基因治疗等,但这些方法只是针对症状治疗并不能从根本上治疗AD^[16]。因此认识AD发病危险因素,并深入探讨其导致AD发生的分子机制是防治AD的重要基础。

高脂血症被认为是AD等神经退行性疾病发生的高危因素^[17],其证据支持来自流行病学、临床医学和动物实验三方面^[18]。高脂血症时常有ox-LDL水平的升高。ox-LDL的主要生理活性脂质溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)能破坏血脑屏障(blood brain barrier, BBB),诱导神经细胞凋亡导致AD发生^[19]。虽然高脂血症已经确定为AD的高危因素,但是高脂血症引发AD的机制并未完全阐明。本课题组前期研究发现,高脂血症能使海马脂质沉积增加,并通过影响Bcl-2/Bax-Caspase-3凋亡途径导致ApoE^{-/-}小鼠海马神经细胞凋亡,进而导致神经细胞病变,但具体的信号通路及分子机制尚未明确^[20]。

PCSK9是一个与血液胆固醇代谢调节相关的蛋白质,其主要生物学作用是降解肝细胞LDLR,与高脂血症发生密切相关。随着对其功能研究的深入,PCSK9调节脂质代谢以外的新功能被发现和重视,如参与调节炎症反应、糖尿病和细胞凋亡等^[21]。大脑是脂质含量最高的器官之一,因此PCSK9与大脑脂质代谢调节及相关疾病的关系受到关注。本课题组前期研究发现,与正常饮食组相比,高脂饮食组ApoE^{-/-}小鼠海马CA3区PCSK9表达明显增加并伴随有神经细胞凋亡增加,提示PCSK9在高脂饮食引起神经细胞凋亡中具有一定作用。Nakandakari等^[22]研究也证实,短期高脂喂养小鼠后,会引发凋亡蛋白和A β 表达增加并诱发急性海马神经炎症。而脑中大量A β 沉积是AD发生的一个重要因素^[23]。在A β 导致AD的多种作用机制中,导致神经细胞凋亡是其最重要的作用机制之一。本课题组也已经对比了对照组和实验组脑中SP的变化,发现高脂饮食组海马SP沉积略有增加,国外学者也证实高脂饮食能导致SP沉积增加^[24-25]。现已有大量研究证实,高脂饮食会导致

A β 沉积增加^[26],但是其机制尚未明确。LRP1与A β 的合成与降解有重要关系。PCSK9已被证明可以结合并增加LRP1的降解,且可以降低LRP1的表达。这提示PCSK9可能通过降解LRP1影响A β 最终的分泌。

本文选用不同浓度梯度ox-LDL处理PC12细胞,研究其对神经细胞凋亡以及PCSK9和LRP1表达的影响。油红O染色结果发现,ox-LDL呈浓度依赖性地增加PC12细胞荷脂。Hoechst33258染色结果发现,随着处理PC12细胞ox-LDL浓度的增加呈致密浓染或呈碎块状致密浓染的细胞核也逐渐增多,其中75 mg/L ox-LDL处理组增加最为显著。流式细胞计数结果和Hoechst33258染色结果相一致,表明ox-LDL诱导PC12细胞凋亡增加。用同样浓度梯度处理PC12细胞24 h后显示,胆固醇调节元件结合蛋白2(sterol-regulatory element binding proteins 2, SREBP2)和PCSK9蛋白表达随着ox-LDL浓度增大而增加,其中75 mg/L ox-LDL处理组增加最为显著,本课题组之前的研究也已经证实,在巨噬细胞中ox-LDL使PCSK9的表达增加且增加巨噬细胞的凋亡^[27]。LRP1蛋白表达随着ox-LDL浓度增大而减少,其中75 mg/L ox-LDL处理组减少最为显著。以上结果显示,随着ox-LDL浓度增加,PC12细胞脂质沉积增多,凋亡明显增加,同时PCSK9表达增加,LRP1表达减少,且趋势一致。这些结果在一定程度上证明,PCSK9与PC12细胞凋亡存在相关性,以及PCSK9与LRP1存在负相关性。为了进一步探讨PCSK9表达改变是否会影响LRP1表达和PI3K/AKT代谢途径,并明确PCSK9在调节ox-LDL诱导神经细胞凋亡中的正向促凋亡作用,本实验首先成功建立PCSK9 siRNA转染细胞模型有效地减弱PCSK9基因的表达。然后用75 mg/L ox-LDL处理PC12细胞24 h, Hoechst33258染色显示PCSK9沉默后,PC12细胞凋亡减少,与流式细胞计数结果一致, Caspase-3、Caspase-9、Bax蛋白表达下降, Bcl-2蛋白表达增加。上述实验结果表明,PCSK9通过激活Bcl-2/Bax-Caspase-9/3信号途径导致PC12细胞凋亡。Wu等^[28]也发现,ox-LDL能上调内皮细胞PCSK9表达,应用RNA干扰方法下调PCSK9表达,通过Bcl/Bax-Caspase-9/3途径明显抑制ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡。Kysenius等^[29]发现,干扰小脑颗粒神经元PCSK9后细胞凋亡减少, Caspase-3表达降低。用浓度梯度处理PC12细胞24 h后显示,随

着 ox-LDL 浓度增大, LRP1 蛋白表达减少。有趣的是, 研究发现 A β 40 及 A β 42 含量也随之减少, 以上结果都以 75 mg/L ox-LDL 处理组减少最为显著。以上结果显示, 随着 ox-LDL 浓度增加, PC12 细胞凋亡明显, 同时 PCSK9 表达增加, 而 LRP1 表达和 A β 含量下降。这些结果说明, PCSK9 与 LRP1 表达呈负相关。100 nmol/L PCSK9 siRNA 转染 PC12 细胞 48 h 后, 用 75 mg/L ox-LDL 处理 PC12 细胞 24 h 后发现 LRP1 表达和 A β 含量增加, 表示 PCSK9 能抑制 LRP1 的表达, 两者成负相关。

脑内 A β 的清除主要包括细胞外降解、细胞内吞和转运清除出脑等三大机制。A β 在大脑细胞外沉积形成的老年斑是 AD 的主要病理学特征。本课题组已证明, ox-LDL 通过增加 PCSK9 的表达降解 BACE1, 抑制 APP/A β 代谢途径, 减少 A β 生成, 从而抑制 A β 诱导的神经细胞凋亡。本实验在离体情况下亦证明, 随着 LRP1 减少, 分泌到细胞外的 A β 含量减少, 细胞的凋亡率减少。然而在体时, 有文献证明体内的 LRP1 表达下降, 可溶性 A β 水平和淀粉沉积增强。跨 BBB 外向转运被认为是脑内 A β 清除的最主要的方式。LRP1 位于 BBB 基底侧, 是介导 A β 外向转运的主要受体之一^[30]。综上所述发现, 在离体情况下, 高水平 ox-LDL 导致神经细胞中 SREBP2 和 PCSK9 表达增加, 而 LRP1 的表达随之减少, LRP1 表达减少一方面通过 NF- κ B-Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 和 PI3K/AKT 信号途径促使神经细胞凋亡, 另一方面却减少 A β 生成, 从而抑制 A β 诱导的神经细胞凋亡。PCSK9 作用的差异可能是由于在体和离体的环境差异所致。

综上实验结果得出, ox-LDL 诱导神经细胞 SREBP2 蛋白的表达增加, 从而增加 PCSK9 蛋白的表达, 增加的 PCSK9 进而又降低 LRP1 蛋白的表达, LRP1 表达减少一方面通过抑制 PI3K/AKT 通路和激活 Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 通路促进神经细胞凋亡, 另一方面通过减少细胞外 A β 含量抑制 PC12 细胞凋亡。这两条相互拮抗的通路中, 促进细胞凋亡的通路起主导作用。机体在面对高脂血症等危险因素时, 假如神经元具有高凋亡率, 势必会造成 AD 等发病年龄提前, 但实际上没有如此。主要原因是高脂血症上调 PCSK9 表达后, PCSK9 对神经细胞存在促凋亡和抗凋亡机制共同调节, 这种双向调节作用使得神经细胞凋亡维持在一个低水平, 只是有限度的增加。

4 结 论

ox-LDL 通过诱导 PCSK9 表达增加, 降解 LRP1, 进而影响下游的不同信号途径, 在 ox-LDL 诱导神经细胞凋亡中发挥双向调节作用: a. 抑制 PI3K/AKT 通路的激活, 抑制 PC12 细胞存活; b. 激活 NF- κ B-Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 通路, 促进 PC12 细胞凋亡; c. 降低 A β 分泌, 有可能抑制 A β 诱导的 PC12 细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] Silva M V F, Loures C M G, Alves L C V, *et al.* Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci*, 2019, **26**(1): 33
- [2] Lancini E, Haag L, Bartl F, *et al.* Cerebrospinal fluid and positron-emission tomography biomarkers for noradrenergic dysfunction in neurodegenerative diseases: a systematic review and meta-analysis. *Brain Commun*, 2023, **5**(3): ead085
- [3] Goel P, Chakrabarti S, Goel K, *et al.* Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: an insight. *Front Mol Neurosci*, 2022, **15**: 937133
- [4] Morris G P, Clark I A, Vissel B. Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 2018, **136**(5): 663-689
- [5] Barthold D, Joyce G, Diaz Brinton R, *et al.* Association of combination statin and antihypertensive therapy with reduced Alzheimer's disease and related dementia risk. *PLoS One*, 2020, **15**(3): e0229541
- [6] Courtemanche H, Bigot E, Pichelin M, *et al.* PCSK9 concentrations in cerebrospinal fluid are not specifically increased in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2018, **62**(4): 1519-1525
- [7] Cai Z, Qiao P F, Wan C Q, *et al.* Role of blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2018, **63**(4): 1223-1234
- [8] Liu C C, Hu J, Zhao N, *et al.* Astrocytic LRP1 mediates brain A β clearance and impacts amyloid deposition. *J Neurosci*, 2017, **37**(15): 4023-4031
- [9] Lillis A P, Van Duyn L B, Murphy-Ullrich J E, *et al.* LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*, 2008, **88**(3): 887-918
- [10] Zhou R, Chen L L, Yang H, *et al.* Effect of high cholesterol regulation of LRP1 and RAGE on A β transport across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2021, **18**(5): 428-442
- [11] Fu T, Guan Y, Xu J, *et al.* APP, APLP2 and LRP1 interact with PCSK9 but are not required for PCSK9-mediated degradation of the LDLR *in vivo*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, **1862**(9): 883-889
- [12] Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2011,

- 12(12): 723-738
- [13] He Y, Zheng Z, Liu C, *et al.* Inhibiting DNA methylation alleviates cisplatin-induced hearing loss by decreasing oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis *via* the LRP1-PI3K/AKT pathway. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(3): 1305-1321
- [14] Yang E, Zheng H, Peng H, *et al.* Lentivirus-induced knockdown of LRP1 induces osteoarthritic-like effects and increases susceptibility to apoptosis in chondrocytes *via* the nuclear factor- κ B pathway. *Exp Ther Med*, 2015, **10**(1): 97-105
- [15] Śliwińska S, Jeziorek M. The role of nutrition in Alzheimer's disease. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2021, **72**(1): 29-39
- [16] Se Thoe E, Fauzi A, Tang Y Q, *et al.* A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. *Life Sci*, 2021, **276**: 119129
- [17] Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*, 2015, **6**(4): 254-264
- [18] Popp J, Meichsner S, Kölsch H, *et al.* Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 2013, **86**(1): 37-42
- [19] Frisardi V, Panza F, Seripa D, *et al.* Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog Lipid Res*, 2011, **50**(4): 313-330
- [20] 吴琪. PCSK9 介导脂质对海马神经元及 PC12 细胞凋亡的影响及机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2014
- Wu Q. Effects and Mechanism of Lipid on Hippocampal Neurons and PC12 Cells Apoptosis Mediated by PCSK9[D]. Hengyang: University of South China, 2014
- [21] Mannarino M R, Sahebkar A, Bianconi V, *et al.* PCSK9 and neurocognitive function: should it be still an issue after FOURIER and EBBINGHAUS results?. *J Clin Lipidol*, 2018, **12**(5): 1123-1132
- [22] Nakandakari S, Muñoz V R, Kuga G K, *et al.* Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain Behav Immun*, 2019, **79**: 284-293
- [23] Ozben T, Ozben S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clin Biochem*, 2019, **72**: 87-89
- [24] Refolo L M, Malester B, Lafrancois J, *et al.* Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*, 2000, **7**(4): 321-331
- [25] Shie F S, Jin L W, Cook D G, *et al.* Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport*, 2002, **13**(4): 455-459
- [26] Ramos-rodriguez J J, Spires-jones T, Pooler A M, *et al.* Progressive neuronal pathology and synaptic loss induced by prediabetes and type 2 diabetes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2017, **54**(5): 3428-3438
- [27] 刘录山, 谢闵, 姜志胜, 等. PCSK9 siRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(3): 323-330
- Liu L S, Xie M, Jiang Z S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(3): 323-330
- [28] Wu C Y, Tang Z H, Jiang L, *et al.* PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL *via* Bcl/Bax-caspase9-caspase3 pathway. *Mol Cell Biochem*, 2012, **359**(1-2): 347-358
- [29] Kysenius K, Muggalla P, Mätlik K, *et al.* PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci*, 2012, **69**(11): 1903-1916
- [30] Wang X, Hu X, Yang Y, *et al.* Nicotinamide mononucleotide protects against β -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death. *Brain Res*, 2016, **1643**: 1-9

ox-LDL Promotes Bidirectional Regulation of Neuronal Apoptosis Through The PCSK9/LRP1 Signaling Pathway*

HE Nai-Qi^{1)**}, ZHAO Xue-Shan^{1,2)**}, XU Qian¹⁾, ZHANG Hua-Yu¹⁾, REN Zhong¹⁾, TANG Zhi-Han¹⁾,
XIANG Qiong^{1)***}, LIU Lu-Shan^{1)***}

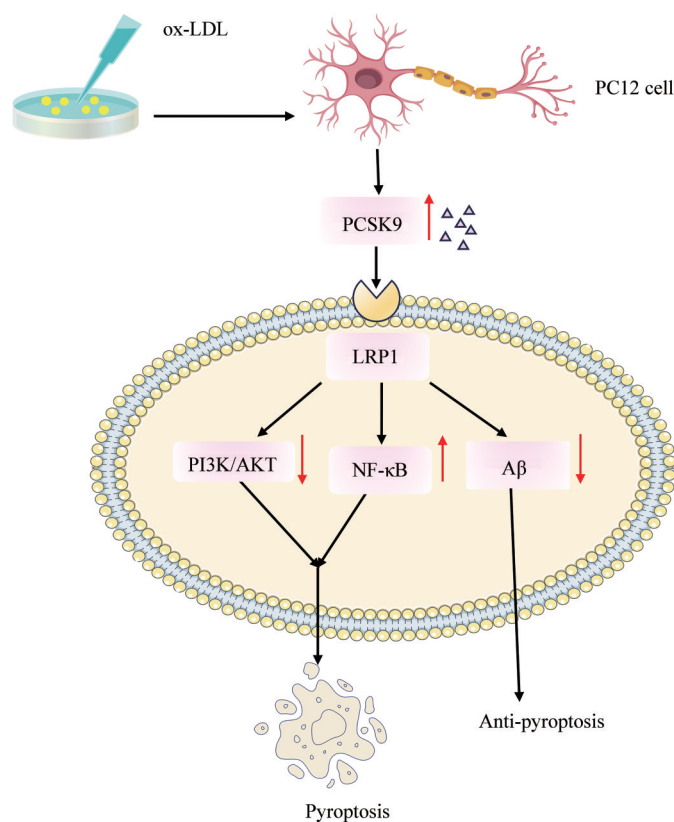
⁽¹⁾Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province,

Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, School of Basic Medical Sciences,

Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁽²⁾College of Life Sciences, Yulin University, Yulin 719000, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81370376) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (2018JJ2343).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

XIANG Qiong. Tel: 86-15211473383, E-mail: xiangqiong@163.com

LIU Lu-Shan. Tel: 86-13975491473, E-mail: liuls2000@163.com

Received: August 2, 2023 Accepted: November 2, 2023

Abstract Objective Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease of the central nervous system (CNS) caused by a variety of risk factors. There are various pathological changes, but apoptosis of the neurological meridian cells is one of the most important pathological bases. Hyperlipidemia is a high-risk factor for the development of AD, which can lead to increased levels of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) in brain tissues. PCSK9 is a protease closely related to lipid metabolism, but studies have shown that it may be related to the development of AD. LRP1 is abundantly expressed in neuronal cells, and it is an important transporter for the clearance of A β . There is now a large amount of literature confirming that PCSK9 can induce the degradation of LRP1. PI3K/AKT is an important signaling pathway *in vivo*, which plays an important role in apoptosis, and there is now a large amount of literature confirming that LRP1 activates the PI3K/AKT pathway, which has an anti-apoptotic effect. So can PCSK9 affect the PI3K/AKT pathway through LRP1 and thus regulate neuronal apoptosis? This deserves further investigation. The aim of this study was to explore the role of PCSK9 in mediating ox-LDL pro-apoptotic neuronal cell death and its mechanism, and then further elaborate the mechanism of hyperlipidemia leading to neurodegenerative diseases such as AD. **Methods** Firstly, PC12 cells were treated with different concentrations of ox-LDL (0, 25, 50, 75 and 100 mg/L) for 24 h. Oil red O staining was used to detect lipid accumulation in PC12 cells, Hoechst33258 staining and flow cytometry to detect apoptosis in PC12 cells, ELISA to detect the content of A β secreted by PC12, Western blot to detect expression of SREBP2, PCSK9 and LRP1. Then PC12 cells were treated with 75 mg/L ox-LDL for different times (0, 6, 12, 24, 48 h), and Western blot were performed to detect the expression of SREBP2, PCSK9 and LRP1. Finally, after transfecting 100 nmol/L PCSK9 siRNA into PC12 cells for 48 h, PC12 cells were treated with 75 mg/L ox-LDL for 24 h, Hoechst33258 staining and flow cytometry to detect apoptosis rate of PC12 cells, and Western blot to detect PCSK9, LRP1, PI3K, AKT, P-PI3K, P-AKT, NF- κ B, Bcl-2, Bax, Caspase-9 and Caspase-3 expression, and ELISA detected A β content secreted by PC12 cells. **Results** ox-LDL increased lipid accumulation and promoted apoptosis and A β secretion in PC12 cells, as well as increasing the expression of SREBP2 and PCSK9 and decreasing the expression of LRP1 in PC12 cells. pCsk9 siRNA could be inhibited through the PI3K/AKT pathway and the NF- κ B-Bcl-2/Bax-Caspase-9/3 pathway to inhibit ox-LDL-induced apoptosis in PC12 cells while increasing A β secretion in PC12 cells. **Conclusion** ox-LDL plays a bidirectional regulatory role in ox-LDL-induced apoptosis of PC12 cells by inducing an increase in PCSK9 expression and a decrease in LRP1 expression in PC12 cells, which in turn affects different signaling pathways downstream.

Key words ox-LDL, PCSK9, low density lipoprotein receptor-related protein 1, neurocyte, apoptosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0300