

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-01-003

· 专家论坛 ·  
· EXPERT FORUM ·

## MT1-MMP 和 PCSK9 的联合抑制上调 LDLR 表达的研究<sup>①</sup>

Adekunle Alabi<sup>1②</sup>, 顾红梅<sup>1</sup>, 夏晓丹<sup>1,2</sup>, 张子洋<sup>1</sup>, 王贵清<sup>2</sup>, 章大卫<sup>1③</sup>

(1. 加拿大阿尔伯塔大学健康科学学院医学和牙科学院儿科和脂质分子和细胞生物学组, 阿尔伯塔埃德蒙顿 T6G 2R3; 2. 广州医科大学附属第六医院清远市人民医院骨科, 广东 清远 511518)

**专家简介** 章大卫, 博士, 加拿大阿尔伯塔大学儿科系终身制教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为脂代谢和相关的人类疾病。曾获得加拿大国立卫生研究院、加拿大心脏和中风基金会、加拿大自然科学和工程研究委员会、中国国家自然科学基金委员会和辉瑞制药公司等多项国际及国内科研机构、基金会和制药公司的资助。以第一作者、通信作者在 *NAT COMMUN*, *P NATL ACAD SCI USA*, *ARTERIOSCL THROM VAS*, *J BIOL CHEM* 和 *J LIPID RES* 等国际知名杂志上发表 SCI 论文 74 篇。



**摘要** 目的: 探究 I 型膜基质金属蛋白酶 (MT1-MMP) 和  $\gamma$ -分泌酶或前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 对低密度脂蛋白受体 (LDLR) 表达的影响。方法: 应用 DsiRNA 分别沉默人肝细胞中 MT1-MMP 和 PCSK9 的表达并对细胞进行培养, 选择 DAPT 抑制细胞中的  $\gamma$ -分泌酶, 实时荧光定量 PCR 和免疫印迹法分别检测 mRNA 和蛋白质的表达水平。结果: MT1-MMP 与  $\gamma$ -分泌酶或 PCSK9 的联合抑制可较单独抑制组进一步提高原代肝细胞中 LDLR 的表达水平; PCSK9<sup>-/-</sup> 小鼠再感染靶向小鼠 MT1-MMP 的 shRNA 腺相关病毒 (AAV), 会增加肝脏 LDLR 水平, 降低血浆中的胆固醇浓度。结论: MT1-MMP 和  $\gamma$ -分泌酶或 PCSK9 协同调节 LDLR 的表达。联合抑制 MT1-MMP 和  $\gamma$ -分泌酶或 PCSK9 可提高 LDLR 表达, 并降低血浆中 LDL 胆固醇的水平, 从而降低因现有手段无法有效控制血浆胆固醇水平的患者发生心血管病的风险。

**关键词:** I 型膜基质金属蛋白酶; 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 低密度脂蛋白受体; 联合抑制

中图分类号: R54

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)01-0018-08

① 基金项目: 加拿大国立卫生研究院项目 (PS155994, PS178091); 加拿大自然科学和工程研究委员会项目 (RGPIN-2016-06479)。

② 第一作者简介: Adekunle Alabi, 博士, 研究方向为脂代谢和相关的人类疾病。

③ 通信作者: 章大卫, E-mail: dzhang@ualberta.ca。

**Study on combined inhibition of MT1-MMP and PCSK9 up-regulating LDLR expression<sup>①</sup>**

Adekunle Alabi<sup>1②</sup>, GU Hongmei<sup>1</sup>, XIA Xiaodan<sup>1,2</sup>, ZHANG Ziyang<sup>1</sup>, WANG Guiqing<sup>2</sup>,  
ZHANG Dawei<sup>1③</sup>

(1. Dept. of Pediatrics and Group on the Molecular and Cell Biology of Lipids, Faculty of Medicine and Dentistry, College of Health Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, T6G 2R3;  
2. Dept. of Orthopedics, Qingyuan People's Hospital of the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan 511518, China)

**Abstract** Objective: To investigate the effects of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and  $\gamma$ -secretase or proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) on the expression of low-density lipoprotein receptor (LDLR). Methods: DsiRNA was used to silence MT1-MMP and PCSK9 expression in cultured human hepatocytes, and the cells were cultured. DAPT was selected to inhibit  $\gamma$ -secretase in cells, and real-time fluorescence quantitative PCR and immunoblotting were used to measure mRNA and protein expression levels, respectively. Results: The combined inhibition of MT1-MMP and  $\gamma$ -secretase or PCSK9 further increased the expression level of LDLR in primary hepatocytes compared with the single inhibition group. The reinfection of PCSK9<sup>-/-</sup> mice with shRNA adeno-associated virus (AAV) targeting MT1-MMP in mice increased the level of LDLR in liver and reduced the concentration of cholesterol in plasma. Conclusion: MT1-MMP and  $\gamma$ -secretase or PCSK9 synergistically regulate LDLR expression. Combined inhibition of MT1-MMP and  $\gamma$ -secretase or PCSK9 has the potential to further increase the expression of LDLR and reduce the level of plasma LDL cholesterol, thereby reducing the risk of cardiovascular disease in patients whose plasma cholesterol levels can not be successfully controlled by currently available strategies.

**Keywords:** membrane type-1 matrix metalloproteinase; proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; low-density lipoprotein receptor; combined inhibition

血浆低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的水平高低与患动脉粥样硬化性心血管疾病的风险呈正相关<sup>[1-2]</sup>。低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)的N末端由7个富含半胱氨酸残基的重复序列构成,识别并结合胞膜上相应配体低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)或乳糜微粒残留物,由LDLR通过网格蛋白包被的小窝内吞,传递到胞内,从而对LDL的调节发挥关键作用<sup>[2-3]</sup>。LDLR在胞内低pH环境中发生构象变化,促进结合的LDL释放并进入溶酶体发生降解,而LDLR则将循环到细胞表面,进行新一轮LDL的内吞与清除<sup>[4]</sup>。

在细胞培养基和人血浆中都能检测到释放的可

溶性LDLR胞外结构域<sup>[5-6]</sup>。前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)经与LDLR结合,促进溶酶体降解<sup>[7-8]</sup>;  $\gamma$ -分泌酶则可切割LDLR的C-末端胞浆区域,降低细胞表面LDLR水平<sup>[6]</sup>。抑制PCSK9或 $\gamma$ -分泌酶可以增加LDLR的表达和血浆胆固醇清除率<sup>[6,9]</sup>。有研究发现<sup>[10-11]</sup>,膜型基质金属蛋白酶-1(membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)在LDLR的剪切和LDLR胞外结构域释放过程中起关键作用;而抑制MT1-MMP则可以显著提高人原代肝细胞和小鼠肝脏组织LDLR的水平,并降低小鼠血浆中胆固醇水平和减缓动脉粥样硬化的发展。同时,MT1-MMP中的功能区域MT-loop被证实对其切割LDLR的能

力至关重要,故目前亟须明确抑制 MT1-MMP 是否可以与其他增加 LDLR 水平的策略相结合,以发挥其降低血脂的效果。基于此,本研究旨在探讨 MT1-MMP 和 PCSK9 的联合抑制对 LDLR 表达的作用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验试剂

①主要试剂:Opti-MEM 培养基、青-链霉素、胰蛋白酶、Lipofectamine® RNAiMAX、TRIzol®、cDNA 逆转录试剂盒、定量 PCR 所需试剂和 BCA 法蛋白定量试剂盒(均购自 ThermoFisher Scientific 公司);总胆固醇检测试剂盒(购自日本 Wako 公司);DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、牛血清白蛋白(BSA)和 Complete™无 EDTA 蛋白酶抑制剂(均购自美国 Sigma 公司)。②抗体:抗 LDLR 的小鼠单克隆抗体 HL-1,结合序列在 LDLR 的 R4 与 R5 之间<sup>[12]</sup>;直接靶向 LDLR 羧基 C 端 14aa 的兔抗 LDLR 多克隆抗体 3143<sup>[12]</sup>;小鼠抗 PCSK9 单克隆抗体 15A6<sup>[12]</sup>;小鼠抗 MT1-MMP 单克隆抗体(购自美国 Millipore 公司);小鼠抗肌动蛋白和抗转铁蛋白受体单克隆抗体(购自美国 BD Biosciences 公司)。③重组蛋白提纯:从人胚肾(HEK)-293S 细胞中纯化获得的重组全长人 PCSK9(C 端含有 FLAG 标签)<sup>[13]</sup>;从昆虫细胞(Sf9)中纯化得到的重组人 LDLR 胞外域(C 端含有 His 标签)<sup>[4]</sup>。

### 1.2 实验动物

C57BL/6J 和 PCSK9<sup>-/-</sup>小鼠由 Jackson 实验室提供。小鼠可以在控制室温的装置中自由饮水,3~5 只/笼,以 20% 蛋白质、5% 脂肪和 48.7% 碳水化合物喂食。所有程序经阿尔伯塔大学动物护理和使用委员会批准,按照加拿大动物护理委员会的指南操作。

### 1.3 细胞培养

人肝癌细胞(Huh7)培养在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的加湿培养箱中,细胞实验在 II 级层流柜中无菌条件下进行。Huh7 细胞以 2 × 10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 6 孔培养板,每孔采用 2 ml 含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。

### 1.4 细胞转染和 DAPT 处理

由 IDT® 合成的 DsiRNA 分别为:MT1-MMP DsiRNA(5'-UCCGUGGAAACAAGUACUACCGUTT-3')、PCSK9 DsiRNA(5'-AGCACCCACACCCUAGAAGUUUCC-3')、Scrambled DsiRNA(5'-AUUAGUGUGCGAUGUACCCAGGAAC-3')。按说明书要求,使用 Lipofectamine® RNAiMAX 将 DsiRNA 分别转染后接种于 6 孔培养板的 Huh7 细胞中。转染 24 h 后,用 10 μmol/L DAPT 溶解于 DMSO 中,处理细胞 16 h 以抑制 γ-分泌酶,用全细胞裂解液裂解后,收集各组细胞。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

取禁食 10 h 的小鼠肝脏,采用 TRIzol 法提取总 RNA,参照试剂盒说明经逆转录 cDNA、实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测,以 GAPDH 为内参,检测基因的相对表达。MT1-MMP 引物:5'-TCACCCCAGTCACTCTCAG-3', GAPDH:5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'。

### 1.6 免疫印迹

参照课题组已发表论文<sup>[14]</sup>,在细胞转染 48 h 后,使用全细胞裂解液冰上裂解各组细胞 30 min,收集的样本在 4 ℃ 条件下,以离心半径 9.5 cm、14 000 r/min 的速度离心 10 min,收集上清液;或者将储存在 -80 ℃ 的肝组织样本解冻、移至 2 ml 离心管中,以组织体积 4 倍的匀浆缓冲液(250 μmol/L 蔗糖、50 μmol/L Tris-HCl、pH 7.4、1 μmol/L EDTA 和 1 × 蛋白酶抑制剂)匀浆。获得的蛋白质采用 BCA 试剂盒检测浓度,然后依次进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,使用相应一抗孵育,进而选择对应的山羊抗小鼠或抗兔二抗,通过 Li-Cor Odyssey 红外成像系统检测和量化,相对表达量是同一样品中全长 LDLR 与 TFR 的条带密度比。

### 1.7 腺相关病毒的制备

根据试剂说明书,使用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)-DJ/8 无辅助表达系统(美国 Cell Biolabs 公司)制备靶向小鼠 MT1-MMP 的 AAV-shRNA。MT1-MMP shRNA 引物:5'-GCTGTGCTGTTCCGGATAAGT-3',阴性对照组 scrambled shRNA:5'-GTATG

CAGCGGTATCGTGTTG-3'。将 PCSK9<sup>-/-</sup> 小鼠 (10~14 周龄) 随机分为两组, 分别通过眶后静脉注射 MT1-MMP shRNA 和 AAV-U6-scramble (阴性对照组)。小鼠正常喂食 2 周后, 再喂食 2 周含有 0.15% 胆固醇的饲料 (脂肪 40%、蛋白质 16% 和碳水化合物 44%)。小鼠禁食 10 h 后, 对其进行安乐死处理, 之后立即收集血液和肝脏。肝脏储存在 -80 °C 冰箱, 血样收集到含有 EDTA 的试管中, 以离心半径 9.5 cm、5 000 r/min 的速度离心 10 min 后收集血浆, 用于检测血浆中的总胆固醇含量。

### 1.8 LDLR 胞外域的抑制

将 4 μg PCSK9 分别与 0 μg、1 μg、2 μg、4 μg、8 μg 的重组 LDLR 在 1% BSA 中孵育 1 h, 然后添加到接种至 6 孔板的 Huh7 细胞中, 37 °C 培养过夜, 通过采用等量的全细胞裂解液, 进行蛋白质印迹检测。

### 1.9 统计学方法

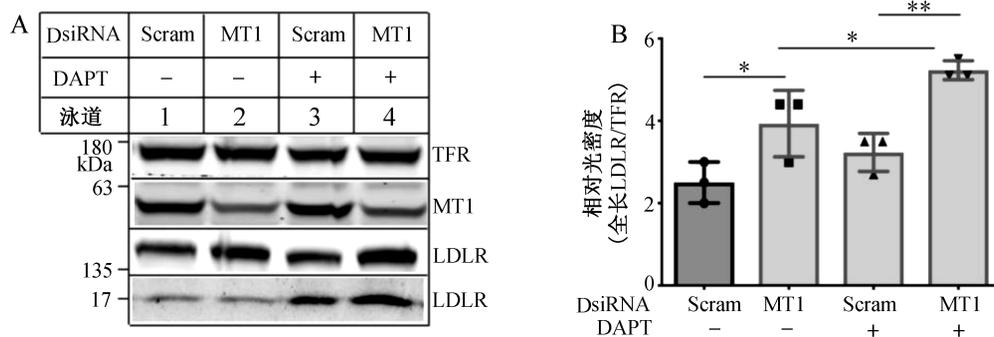
数据采用 GraphPad Prism 9.4 软件进行分析, 计

量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 *t* 检验。以 \**P* < 0.05、\*\**P* < 0.01 和 \*\*\**P* < 0.001 分别表示不同置信区间的统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 MT1-MMP DsiRNA 和 DAPT 协同上调肝细胞中 LDLR 的表达

MT1-MMP 和  $\gamma$ -分泌酶的联合抑制对 LDLR 表达的影响如图 1 所示。MT1-MMP DsiRNA 转染人原代肝细胞, 可显著提高细胞中 LDLR 的表达, 与之前的研究结果一致<sup>[15]</sup>。化合物 DAPT 抑制  $\gamma$ -分泌酶的同时, 略微增强 LDLR 的表达, 而降低细胞中转铁蛋白受体 TFR 的表达; 而两种蛋白酶的联合抑制则可进一步升高 LDLR 的表达水平; DAPT 还可增加被切割的 LDLR 的细胞浆 C 末端结构域片段。以上结果表明, MT1-MMP 介导的 LDLR 胞外域在细胞表面的切割会导致其细胞浆 C 末端部分被  $\gamma$ -分泌酶降解。



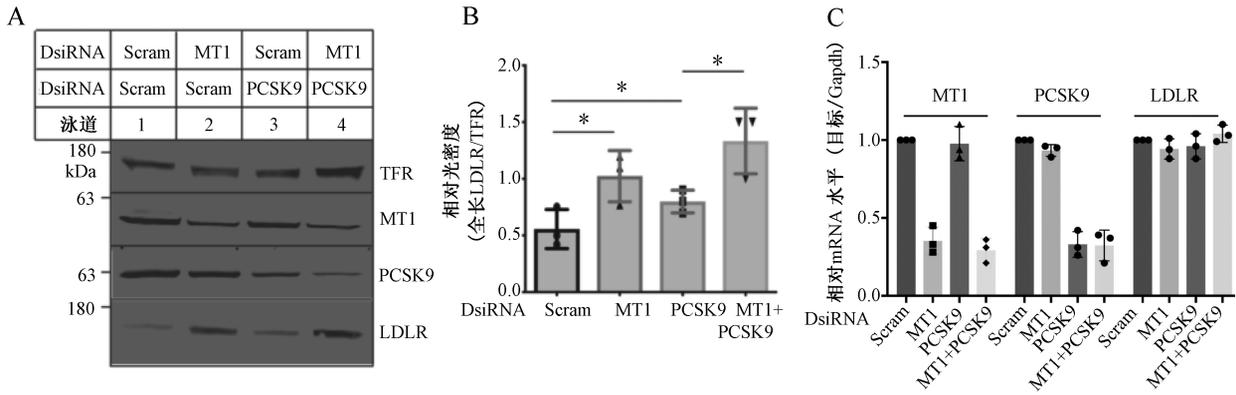
A. 免疫印迹法检测蛋白表达直观图; B. LDLR 的相对表达量。与对照组比较, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01

图 1 MT1-MMP 和  $\gamma$ -分泌酶的联合抑制对 LDLR 表达的影响

### 2.2 MT1-MMP 和 PCSK9 的联合抑制上调肝细胞中 LDLR 的表达

MT1-MMP 和 PCSK9 的联合抑制对 LDLR 表达的影响如图 2 所示。尽管采用 DsiRNA 单独敲低

MT1-MMP 或 PCSK9 可以增强 LDLR 的表达水平, 但联合敲低 PCSK9 和 MT1-MMP 会进一步增加 LDLR 的蛋白水平, 而对 LDLR mRNA 的改变未见明显差异。



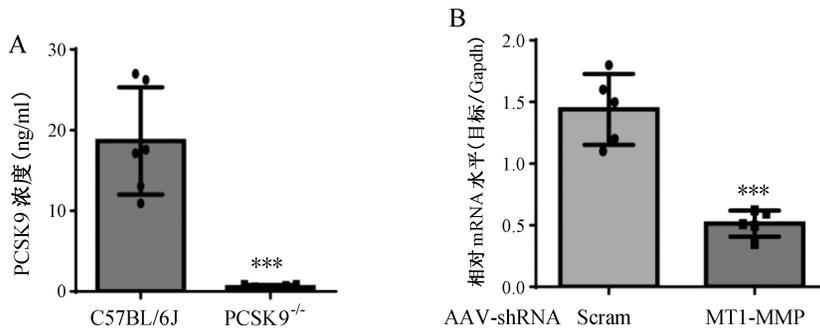
A.免疫印迹法检测蛋白表达直观图; B.LDLR 的相对表达量;C.mRNA 水平。与对照组比较, \*  $P < 0.05$

图 2 MT1-MMP 和 PCSK9 的联合抑制对 LDLR 表达的影响

### 2.3 体内联合抑制 PCSK9 与 MT1-MMP 可升高小鼠肝脏中 LDLR 的表达

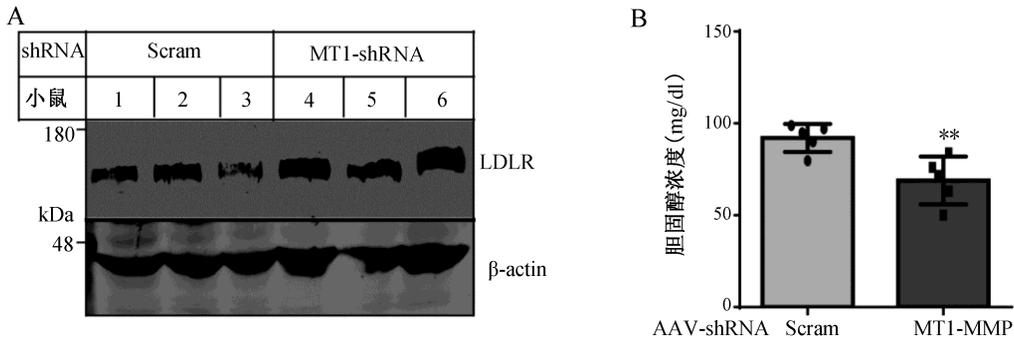
AAV-MT1-MMP shRNA 对 PCSK9<sup>-/-</sup>小鼠的血浆 PCSK9 浓度和 MT1-MMP 表达的影响,如图 3 所示。体内联合抑制 MT1-MMP 和 PCSK9 对小鼠 LDLR 蛋白表达和血浆胆固醇浓度的影响,如图 4 所示。与之前的发现一致<sup>[16]</sup>,在 PCSK9<sup>-/-</sup>小鼠的血浆中几乎

检测不到 PCSK9 的表达(图 3A)。AAV-MT1-MMP shRNA 接种的小鼠肝脏中 MT1-MMP 的 mRNA 表达水平显著降低(图 3B),而 LDLR 的蛋白表达水平明显增强(图 4A),血浆胆固醇浓度则相应降低(图 4B)。以上研究表明,联合抑制体内 MT1-MMP 和 PCSK9 对上调小鼠肝脏中 LDLR 的表达和清除血浆胆固醇均具有促进作用。



A.血浆 PCSK9 浓度测定(ELISA 法);B.各组小鼠肝脏中 MT1-MMP 的 mRNA 水平(RT-qPCR 检测)。与对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$

图 3 AAV-MT1-MMP shRNA 对 PCSK9<sup>-/-</sup>小鼠血浆中 PCSK9 浓度和 MT1-MMP 表达的影响



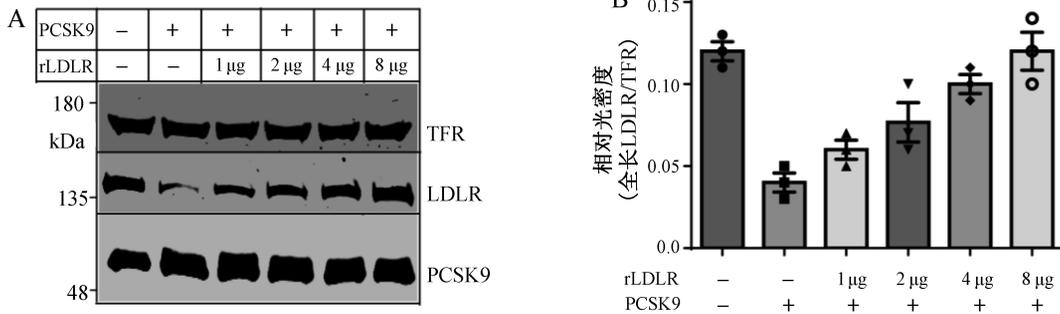
A.各组小鼠肝脏中 LDLR 的蛋白表达差异(免疫印迹检测);B.各组小鼠血浆胆固醇浓度的差异。与对照组比较,\*\*P<0.01

图 4 体内联合抑制 MT1-MMP 和 PCSK9 对小鼠 LDLR 蛋白表达和血浆胆固醇浓度的影响

### 2.4 LDLR 胞外域对 PCSK9 的影响

本研究发现,LDLR 胞外域 rLDLR 抑制由 PCSK9 促进的 LDLR 降解,且抑制强度随着 rLDLR

浓度的增加而升高,见图 5。此结果表明从 LDLR 剪切下的胞外域可能在循环中与 PCSK9 结合,并竞争性地阻止 PCSK9 与细胞表面 LDLR 的结合。



A.免疫印迹,Huh7 细胞用 PCSK9 与不同浓度的 rLDLR 处理后,全细胞裂解液用于印迹免疫;B.免疫印迹的量化

图 5 重组 LDLR 对 PCSK9 诱导的 LDLR 降解的影响

### 3 讨论

MT1-MMP 可剪切 LDLR 的胞外域并将其释放到细胞外环境中<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,MT1-MMP 与其他 LDLR 调节途径如 $\gamma$ -分泌酶和 PCSK9 的共同抑制可能对 LDLR 水平的增加具有促进作用。正常条件下,跨膜蛋白的胞外区域先被别的蛋白酶切割,剩余的膜结合及胞浆内羧基末端片段再被 $\gamma$ -分泌酶进一步切割降解<sup>[18]</sup>。MT1-MMP 切割 LDLR 的细胞外结构域,使其胞浆内羧基 C 末端区域被 $\gamma$ -分泌酶快速降解,因此 MT1-MMP 和 $\gamma$ -分泌酶可协同调节 LDLR 的表达。本研究结果显示,用选择性抑制剂抑

制 $\gamma$ -分泌酶显著增加了大约 17 kDa 的 LDLR 羧基 C 末端片段;且 MT1-MMP 和 $\gamma$ -分泌酶的共同抑制可进一步导致 LDLR 蛋白水平的增加,证明 MT1-MMP 和 $\gamma$ -分泌酶在翻译后协同调节 LDLR 的表达。值得注意的是, $\gamma$ -分泌酶可以切割许多功能重要的 I 型跨膜蛋白,抑制 $\gamma$ -分泌酶的同时可能会出现不良反应。DAPT 还可能影响 Huh7 细胞的生长,因此与其他降脂靶点(如 PCSK9)相比, $\gamma$ -分泌酶并不是一个值得推荐的降脂靶点。

PCSK9 在细胞表面结合 LDLR 后,导致 LDLR 在溶酶体中降解。PCSK9 的抑制显著增加细胞表面

的 LDLR, 而 MT1-MMP 促进 LDLR 的胞外域剪切<sup>[5,19]</sup>。本研究结果显示, 不仅在 MT1-MMP 和 PCSK9 共同沉默的细胞中观察到更高的 LDLR 水平, 而且在 PCSK9 敲除小鼠中, 联合敲低 MT1-MMP 会进一步增加肝脏 LDLR 表达并降低血浆胆固醇水平, 从而证实 PCSK9 与 MT1-MMP 均参与细胞表面 LDLR 剪切降解, 因此联合抑制对 LDLR 的累加效应可能是由于 LDLR 剪切减少的结果。

MT1-MMP 剪切下的 LDLR 胞外域保留其结合载脂蛋白 B-100 和载脂蛋白 E 的位点, 且血液中的 LDLR 胞外域保留了其结合 LDL 的能力<sup>[17]</sup>。同时, LDLR 胞外域也保留了其与 PCSK9 的结合位点。本实验表明, LDLR 胞外域 rLDLR 拥有与 PCSK9 结合并抑制其降解 LDLR 的能力, 而这种作用与 PCSK9 的抑制肽功能类似。另外, 有研究<sup>[20]</sup>发现 LDL 可直接或间接与 PCSK9 结合, 并抑制其降解 LDLR。X 射线晶体学模型显示, LDLR 上的 LDL 和 PCSK9 的结合位点不是很接近, 这表明两种蛋白质同时结合的空间位阻或变构位阻的可能性很低<sup>[21]</sup>。LDLR 胞外域保留了结合 LDL 和 PCSK9 的能力。

有文献报道<sup>[22]</sup>, LDL 在心血管中的沉积会显著增加心血管疾病甚至死亡的风险。LDLR 在转录水平受固醇调节元件结合转录因子 2 调节。常用的他汀类降胆固醇药物通过抑制胆固醇生物合成限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、上调固醇调节元件结合转录因子 2 的转录活性, 从而增加 LDLR 表达、降低血浆 LDL-C 水平<sup>[2,23]</sup>。同时, PCSK9 抑制剂联合他汀类药物降脂效果优于单用他汀类药物, 并减少约 15% 的心血管事件<sup>[5,24]</sup>。抑制 PCSK9 导致的 LDLR 增加可能受到 MT1-MMP 介导的剪切的影响。基于 PCSK9 和他汀类药物在心血管疾病治疗中的成功联合应用, 本实验结果再次表明 MT1-MMP 的抑制作用联合其他治疗在降低血浆胆固醇方面的潜力, 尤其是其与 PCSK9 抑制的联合。

#### 参考文献:

[1] LLOYD-JONES D M, WILSON P W, LARSON M G, et al. Lifetime risk of coronary heart disease by cholesterol levels at selected ages[J]. Arch Intern Med, 2003, 63(16):1966-

1972.

- [2] GOLDSTEIN J L, BROWN M S. The LDL receptor[J]. ArteriosclerThromb Vasc Biol, 2009, 29(4):431-438.
- [3] GOLDSTEIN J L, BROWN M S. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins[J]. Cell, 2015, 161(1):161-172.
- [4] RUDENKO G, HENRY L, HENDERSON K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH[J]. Science, 2002, 298(5602):2353-2358.
- [5] GOLDSTEIN J L, HOBBS H H, BROWN M S. Familial hypercholesterolemia[M]. New York: McGraw-Hill, 2001:2863-2913.
- [6] HORTON J D, SHAH N A, WARRINGTON J A, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(21):12027-12032.
- [7] HORTON J D, COHEN J C, HOBBS H H. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism[J]. J Lipid Res, 2009, 50 Suppl(Suppl):S172-S177.
- [8] SEIDAH N G, AWAN Z, CHRÉTIEN M, et al. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health[J]. Circ Res, 2014, 114(6):1022-1036.
- [9] GUO S D, XIA X D, GU H M, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9 and lipid metabolism[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1276:137-156.
- [10] LAGACE T A. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells[J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25(5):387-393.
- [11] XIA X D, PENG Z S, GU H M, et al. Regulation of PCSK9 expression and function: mechanisms and therapeutic implications [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8:764038.
- [12] KIM K, GOLDBERG I J, GRAHAM M J, et al.  $\gamma$ -Secretase inhibition lowers plasma triglyceride-rich lipoproteins by stabilizing the LDL receptor [J]. Cell Metab, 2018, 27(4):816-827.
- [13] BEGG M J, STURROCK E D, VAN DER WESTHUYZEN D R. Soluble LDL-R are formed by cell surface cleavage in response to phorbol esters [J]. Eur J Biochem, 2004, 271(3):524-533.
- [14] FISCHER D G, TAL N, NOVICK D, et al. An antiviral

- soluble form of the LDL receptor induced by interferon[J]. *Science*, 1993, 262(5131):250-253.
- [15] SHIMOHURO H, TANIGUCHI S, KODA M, et al. Association between serum soluble low-density lipoprotein receptor levels and metabolic factors in healthy Japanese individuals[J]. *J Clin Lab Anal*, 2015, 29(1):52-56.
- [16] ALABI A, XIA X D, GU H M, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase promotes LDL receptor shedding and accelerates the development of atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):1889.
- [17] XIA X D, ALABI A, WANG M, et al. Membrane-type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP), lipid metabolism and therapeutic implications [J]. *J Mol Cell Biol*, 2021, 13(7):513-526.
- [18] VAN DRIEL I R, DAVIS C G, GOLDSTEIN J L, et al. Self-association of the low density lipoprotein receptor mediated by the cytoplasmic domain [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(33):16127-16134.
- [19] ZHANG D W, GARUTI R, TANG W J, et al. Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35):13045-13050.
- [20] RUSSELL D W, SCHNEIDER W J, YAMAMOTO T, et al. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor[J]. *Cell*, 1984, 37(2):577-585.
- [21] LAGACE T A, CURTIS D E, GARUTI R, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11):2995-3005.
- [22] GU H M, ADIJIANG A, MAH M, et al. Characterization of the role of EGF-A of low-density lipoprotein receptor in PCSK9 binding [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(12):3345-3357.
- [23] ZHANG D W, LAGACE T A, GARUTI R, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(25):18602-18612.
- [24] GU H M, WANG F Q, ALABI A, et al. Identification of an amino acid residue critical for plasma membrane localization of ATP-Binding cassette transporter G1—brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(2):253-255.

[收稿日期:2022-09-28]

[责任编辑:郭海婷 英文编辑:阳雨君]