

降低致动脉粥样硬化性脂蛋白的VLDLR基因治疗研究

关桢婷^{1,2}, 胡小菁^{2*}, 尹显明^{1,2}

¹西安医学院研究生处, 陕西 西安

²西安市第九医院心血管内科, 陕西 西安

收稿日期: 2023年2月11日; 录用日期: 2023年3月6日; 发布日期: 2023年3月14日

摘要

目前大多数心血管疾病(CVD)的治疗和管理策略都围绕低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),但越来越多的研究发现,将LDL-C水平控制在目标靶点值后,部分患者心血管不良事件仍然存在,并将残余CVD风险归因于高甘油三酯(TG)和高脂蛋白(a)。VLDLR能够结合和内吞含apoE的富含TG的脂蛋白以及Lp(a),但它在肝脏中通常不表达。靶向肝VLDLR表达有可能促进这些致动脉粥样硬化颗粒的清除。这篇综述概述了VLDLR的功能以及开发靶向肝VLDLR表达的基因药物的潜力。

关键词

极低密度脂蛋白受体(VLDLR), 甘油三酯(TG), 基因治疗

Study on VLDLR Gene Therapy for Reducing Atherogenic Lipoprotein

Zhenting Guan^{1,2}, Xiaojing Hu^{2*}, Xianming Yin^{1,2}

¹Graduate Department of Xi'an Medical University, Xi'an Shaanxi

²Department of Cardiovascular Medicine, No. 9 Hospital of Xi'an City, Xi'an Shaanxi

Received: Feb. 11th, 2023; accepted: Mar. 6th, 2023; published: Mar. 14th, 2023

Abstract

At present, most treatment and management strategies for cardiovascular disease (CVD) revolve around low density lipoprotein cholesterol (LDL-C). However, more and more studies have found

*通讯作者。

that after the level of LDL-C is controlled at the target value, cardiovascular adverse events still exist in some patients, and the residual CVD risk is attributed to high triacylglycerol (TG) and high lipoprotein(a). VLDLR can bind to and swallow TG-rich lipoprotein and Lp(a) containing apoE, but it is usually not expressed in the liver. The expression of VLDLR in targeted liver may promote the clearance of these atherogenic granules. This review outlines the function of VLDLR and the potential for developing gene drugs targeting liver VLDLR expression.

Keywords

Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR), Triacylglycerol (TG), Gene Therapy

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近 30 年来, 中国人群的血脂水平逐步升高, 成人血脂异常患病率高达 40.40% [1], 人群血清胆固醇水平的升高将导致 2010~2030 年期间我国心血管病事件约增加 920 万[2]。此外, 血浆甘油三酯(TG)水平的大幅度升高可导致急性胰腺炎, 而重症急性胰腺炎病情凶险, 死亡率高。已有研究证实降低低密度脂蛋白胆固醇的临床获益, 中国成人血脂异常指南[3]明确推荐脂质代谢异常管控策略, 强调以降低 LDL-C (low-density lipoprotein, LDL)为目标靶点, 降低的目标值取决于 CVD 危险分级, 有越来越多的研究发现, 将 LDL-C 水平控制在目标靶点值后, 部分患者心血管不良事件仍然存在[4], 并将残余 CVD 风险归因于高甘油三酯(TG)和高脂蛋白(a)。有研究证据表明富含 TG 的脂蛋白也具有致动脉粥样硬化的特性, 包括极低密度脂蛋白(VLDL)和中密度脂蛋白, 以及 VLDL 和乳糜微粒的脂肪分解残留物[5]。尽管遗传学证据已经表明甘油三酯(TG)是心血管疾病的独立危险因素[6], 然而对于通过降低富含 TG 的脂蛋白水平来预防 CVD, 还未达成一致意见。仅对于严重高甘油三酯血症(TG > 500 mg/dL)的患者, 建议降低 TG 来预防胰腺炎。

2. 降低 TG 相关心血管病残余风险

2.1. 他汀类

他汀类药物是最广泛使用的降低 LDL-C 和心血管病二级预防药物, 有研究发现应用他汀类药物治疗在降低 TG 相关心血管残余风险中的作用。一项辛伐他汀(4S)存活试验研究发现, 高胆固醇血症患者的 CVD 事件发生率在高 TG 和低 HDL-C 亚组中最高, 而该组患者接受辛伐他汀治疗的效果优于仅 LDL-C 水平高的患者[7]。PROVE IT-TIMI22 试验评估他汀治疗后 TG 对急性冠状动脉综合征预后的影响, 研究显示治疗后甘油三酯 <150 mg/dl 与冠心病复发风险呈较低独立相关[8]。研究证据均提醒, 除了降低 LDL-C 外, 降低甘油三酯可以作为治疗心血管病残余风险和进一步减少 CVD 事件的一种手段。

2.2. 贝特类药物

使用贝特类药物(尤其是非诺贝特)降低甘油三酯的临床试验研究表明贝特类药物在降低 CVD 风险方面的获益[9]。然而, 最近的一项重要试验结果显示, 一种更有效的贝特类药物培马贝特, 能显著降低 TG、VLDL 胆固醇、残余胆固醇和载脂蛋白 C-III, 但对接受他汀类药物治疗的 2 型糖尿病、轻中度高甘油三

酯血症和低水平 HDL-C 患者的 CVD 主要终点事件没有影响[10]。Virani 指出培马贝特治疗后, 血浆 apoB₁₀₀ (一种代表所有致动脉粥样化颗粒水平的指标)没有降低, 为了有效降低 CVD 风险, 降低 TG 的治疗药物应该具有促进 VLDL 残余颗粒清除的机制, 而不是像培马贝特那样, 将它们转化为 LDL [11]。

2.3. 降低 TG 新疗法

有研究证实应用 ANGPTL3 的反义抑制剂(Vupanorsen)治疗能降低 TG 水平[12], 但目前仅被批准用于降低家族性纯合子高胆固醇血症患者的低密度脂蛋白。此外, 国外已经研发出通过抑制 apoC-III 的合成来降低 TG 的治疗方法[13], 但目前尚缺乏关于这些药物的 CVD 预后的研究。

3. 降低脂蛋白(a)

脂蛋白(a) [Lp(a)]是一种致动脉粥样硬化的脂蛋白颗粒, 其水平不会因他汀类药物治疗而降低, 这成为导致已接受他汀治疗的患者仍存在心血管病风险的另一重要因素。有研究表明, 高剂量烟酸[14]和 PCSK9 抑制剂[15]可适度降低 Lp(a), 但并不足以使高风险脂蛋白(a)水平正常化, 且至今也没有研究评估降低脂蛋白(a)对 CVD 预后的影响。目前正在开发新的 Lp(a)治疗方法, 包括用反义寡核苷酸和 siRNA 抑制 apo(a)合成, 但此类药物对 CVD 预后的影响仍有待研究。

4. VLDL 受体在肝脏表达降低致动脉粥样化脂蛋白水平

如上所述, 通过最大限度地降低致动脉粥样化的富含 TG 的脂蛋白和 Lp(a), 降低已接受他汀类药物治疗患者的残余 CVD 风险。虽然目前使用的药物和正在开发的药物在不同程度上具有这种潜力, 但应考虑其他治疗可能性, 包括使用基因药物, 以改善在临床实践中显著影响降脂药物疗效的服药依从性问题。实现 VLDL (Very Low-density Lipoprotein)受体(VLDLR)肝脏表达的靶向基因治疗作为降低致动脉粥样硬化性脂蛋白水平和由常规降脂药物治疗遗留的残余 CVD 风险的手段。

4.1. VLDLR 的结构特征及生理功能

VLDLR 由 846 个氨基酸组成, 与低密度脂蛋白受体(LDLR)基因结构同源: 配体结合结构域(同源性 55%)、上皮生长因子前体结构域(52%)、含糖基结构域(19%)、单跨膜结构域(32%)和胞质结构域(46%) [16]。

VLDLR 在心脏、骨骼肌、脂肪组织、大脑以及巨噬细胞中广泛表达, 虽然不是肝脏中通常不表达, 但可被特定条件诱导, 比如激活内质网和非诺贝特。与 LDLR 表达不同, VLDLR 的表达依赖于胰岛素, 而不受细胞胆固醇含量的调节[17]。VLDLR 是多功能受体, 通过它促进心脏和肌肉中的脂肪酸 β -氧化以及脂肪组织中甘油三酯的储存是它在脂蛋白摄取中的作用。apoE 是脂蛋白的 VLDLR 和 LDLR 结合的配体, 但 VLDLR 不结合 apoB, 因此, 它促进含 apoE 的富含 TG 脂蛋白的结合和内吞作用。VLDLR 上调脂蛋白酶(LPL)介导甘油三酯水解以及内皮细胞对富含甘油三酯的脂蛋白的直接摄取[18]。

4.2. VLDLR 可识别的致动脉粥样硬化脂蛋白

4.2.1. 极低密度脂蛋白(VLDL)

VLDL 主要功能是将内源性合成的 TG 和胆固醇从肝脏转运至血液和身体的其他部位。VLDL 是由磷脂、游离胆固醇和多种载脂蛋白组成的亲水层包覆疏水脂质核心(甘油三酯和胆固醇酯)构成, apoB₁₀₀ 为主要结构成分。与公认的 VLDL 是球形乳液状颗粒的模型不同, 低温电子显微镜衍生的 VLDL3D 结构重建揭示其多面体形状[19], 这一发现表明, 多面体结构有助于提高 VLDL 与受体的结合亲和力。甘油三酯在外周组织中被 LPL 水解, 形成游离脂肪酸和富含 apoE 的残余脂蛋白。apoE 与三种类型的受体 LDLR、LRP-1 和多配体蛋白聚糖的结合介导此类脂蛋白的肝脏摄取[20], 这些残余物进一步代谢导致低密度脂蛋

白的形成。极低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白残余脂蛋白(如低密度脂蛋白)水平升高,导致心血管疾病风险增加[21]。

4.2.2. 乳糜微粒

乳糜微粒负责将外源性(膳食)甘油三酯和胆固醇从肠道转运到循环系统中。它们结构上类似 VLDL, 具有更高的 TG 含量。乳糜微粒的代谢类似于 VLDL 的代谢, 其代谢的残余物被肝脏迅速清除而没有形成中间体 LDL。然而, 乳糜微粒残余物(如 VLDL 残余物)水平升高会导致动脉粥样硬化性心血管疾病的风险增加。

4.2.3. Lp(a)

Lp(a)是由低密度脂蛋白颗粒和载脂蛋白 A [apoA]两部分组成, 其中, 胆固醇、载脂蛋白 B₁₀₀ (apoB₁₀₀) 和氧化磷脂组成 LDL 颗粒, apoA 是一种与纤溶酶原具有高度同源性的蛋白质, 它通过位于两种蛋白质中的半胱氨酸残基经由共价二硫键连接至 apoB₁₀₀ 完成 Lp(a)的组装[22]。apoA 基因位点内的等位基因变异决定 Lp(a)水平。人类脂蛋白中发现的多达 90%的氧化磷脂携带在 Lp(a)上, Lp(a)在动脉粥样硬化形成(包括促炎症和促血栓形成)中起关键作用[23]。肝脏合成和分泌是血浆 Lp(a)水平的主要决定因素, 因为 Lp(a)血浆清除率低, 这可能与它对 LDLR 的亲合力相对较低有关, 这是他汀类药物未能显著降低 Lp(a)水平的原因[24]。VLDLR 对 Lp(a)具有高亲合力, 并能够通过与 apoE 结合之外的机制介导其细胞摄取[25], 巨噬细胞的 VLDLR 对 Lp(a)的内吞作用促进了富含脂质的泡沫细胞的形成。这种机制连同 VLDLR 介导的富含 TG 颗粒的摄取, 促进巨噬细胞 VLDLR 表达的致动脉粥样硬化作用。然而, 迄今为止, 在肝脏中特异性表达 VLDLR 通过促进其清除来降低血浆 Lp(a)水平的潜力还没被发现。

4.3. VLDLR 作为脂质代谢紊乱的治疗靶点

大量使用小鼠模型的研究表明, 通过腺相关病毒(AAV)或辅助细胞依赖性腺病毒载体递送的肝脏靶向 VLDLR 基因治疗能降低血浆脂质水平和动脉粥样硬化程度[26], 但这种方法在有效性和安全性方面存在一定的局限性, 因此, 有专家探索了其他基因递送系统的使用[27]。然而, VLDLR 并没有被进一步作为治疗目标, 原因可能有两个。首先, 正如 Rader 所评论的, AAV 介导的基因治疗存在缺乏长期表达和安全的病毒递送载体系统的缺陷[28]。使用 AAV 技术的其他待解决的问题包括: 1) AAV 衣壳的免疫原性, 其限制了病毒颗粒的给药量; 2) 不能重复和滴定治疗以达到脂质和脂蛋白的最佳水平; 3) 由于 AAV 转导的基因作为附加体存在于肝细胞中, 并且随着肝细胞经历分裂, 基因表达下降, 耐久性和临床疗效减弱[29]。第二, Hyunsun 等[30]研究提示 VLDLR 在肝细胞中过度表达可能促炎症, 从而增加内质网应激和肝脂肪变性风险。此外, 有研究发现巨噬细胞中 VLDLR 表达增加会促进肥胖小鼠的脂肪组织炎症和葡萄糖耐受受损[31]。

然而, Fuchs 等人发现, 缺乏脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)小鼠可能通过改变脂肪酸组成来保护肝脏在高 TG 水平下免受内质网(ER)应激[32]。Zarei 等人观察到, FGF21 可能通过减弱内质网应激诱导的 VLDLR 上调来预防肝脏脂肪变性[33]。一项 VLDLR 基因敲除小鼠的最新结果也表明, VLDLR 不是脂肪肝形成的主要因素[34]。因此, 尽管存在障碍, 靶向肝脏 VLDLR 表达的基因治疗仍然是有效治疗脂质代谢异常和改善致动脉粥样硬化性脂质疾病预后的有前景的方法。

5. AAV 基因技术改良

5.1. 提高处理效果持久性的综合技术

AAV 基因疗法在分裂肝细胞中观察到的缺乏持久治疗效果的缺陷, 可以通过使用基因整合或编辑技

术来避免。这些方法的主要潜在风险与基因整合的位点有关。例如,使用 CRISPR-Cas9 的一种基因编辑方法涉及双链断裂(DSB)的引入,这些 DSB 引起广泛的基因组重排(色丝菌属),可以同时驱动多个致癌基因突变[35]。也有一些利用基本编辑器或主要编辑器的基因编辑系统不引入 DSB,但这些系统的 DNA 编辑范围仅限于小的基因组区域。由 Cas9 蛋白本身诱导的免疫反应也可能是一个问题。

新一代的基因整合方法可能避免这些顾虑和限制。基于转座子的系统允许遗传物质转移到宿主生物染色体中的特定位点,这可能保证基因整合治疗在长期有效和安全方面的可行性[36]。目前可用的非哺乳动物转座子系统包括鱼类[37]“The Sleeping Beauty (SB)”和昆虫来源的 PiggyBac,这种方法的潜在缺点是 DNA 识别序列可以在整个人类基因组中找到,因此基因不能靶向特定位点。理想的转座子系统应该是哺乳动物来源的,没有免疫原性作用,能够在特定基因组位点靶位插入转座因子(TE)。

5.2. 基于 LNP 靶向肝脏 VLDLR 表达

VLDL 受体通过 LNP 靶向输送至肝脏是异位 VLDLR 表达的关键。AAV 载体通过不同的衣壳蛋白表现出对特定细胞类型或组织的嗜性,但其特异性低[29]。尽管脂质纳米粒(Lipid Nanoparticle, LNP)缺乏 AAV 载体的组织嗜性,但它们通过 apoE 依赖过程优先在肝脏中积累[38],是将 VLDLR 输送到肝脏以治疗高脂血症的理想选择。为了进一步增强这种靶向的特异性,LNP 中可掺入靶向肝细胞受体的特异性配体如 N-乙酰基-1d-半乳糖胺(GalNAc) [39]。

6. 结论

靶向肝脏 VLDLR 表达是降低 TG 和 Lp(a)水平的一项有前景的治疗方法。基因疗法通常用于纠正基因缺陷,然而,靶向肝脏 VLDLR 表达用于降低脂蛋白治疗的遗传学方法,未来可能将其替代成主要治疗脂质代谢紊乱或心血管疾病的传统药理学(小分子)药物。虽然需要进一步的研究来评估这种治疗剂在人体中的临床疗效和潜在的副作用,但它的成功开发和实施可能为降低致动脉粥样硬化脂蛋白水平和降低 CVD 风险提供新思路。

参考文献

- [1] 顾景范. 《中国居民营养与慢性病状况报告(2015)》解读[J]. 营养学报, 2016, 38(6): 525-529.
- [2] Moran, A., Gu, D., Zhao, D., et al. (2010) Future Cardiovascular Disease in China: Markov Model and Risk Factor Scenario Projections from the Coronary Heart Disease Policy Model-China. *Circulation Cardiovascular Quality and Outcomes*, **3**, 243-252. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.109.910711>
- [3] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016 年修订版) [J]. 中华健康管理学杂志, 2017, 16(1): 7-28.
- [4] Liu, H.H., Cao, Y.X., Jin, J.L., et al. (2020) Predicting Cardiovascular Outcomes by Baseline Lipoprotein(a) Concentrations: A Large Cohort and Long-Term Follow-Up Study on Real-World Patients Receiving Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of the American Heart Association*, **9**, e014581. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014581>
- [5] Ginsberg, H.N., Packard, C.J., Chapman, M.J., et al. (2021) Triglyceride-Rich Lipoproteins and Their Remnants: Metabolic Insights, Role in Atherosclerotic Cardiovascular Disease, and Emerging Therapeutic Strategies—A Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, **42**, 4791-4806. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab551>
- [6] Gill, P.K., Dron, J.S. and Hegele, R.A. (2021) Genetics of Hypertriglyceridemia and Atherosclerosis. *Current Opinion in Cardiology*, **36**, 264-271. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000839>
- [7] Ballantyne, C.M., Olsson, A.G., Cook, T.J., et al. (2001) Influence of Low High-Density Lipoprotein Cholesterol and Elevated Triglyceride on Coronary Heart Disease Events and Response to Simvastatin Therapy in 4S. *Circulation*, **104**, 3046-3051. <https://doi.org/10.1161/hc5001.100624>
- [8] Miller, M., Cannon, C.P., Murphy, S.A., et al. (2008) Impact of Triglyceride Levels beyond Low-Density Lipoprotein Cholesterol after Acute Coronary Syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 Trial. *Journal of the American College of Cardiology*, **51**, 724-730. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.038>

- [9] Marston, N.A., Giugliano, R.P., Im, K., *et al.* (2019) Association between Triglyceride Lowering and Reduction of Cardiovascular Risk across Multiple Lipid-Lowering Therapeutic Classes: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis of Randomized Controlled Trials. *Circulation*, **140**, 1308-1317. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041998>
- [10] Das Pradhan, A., Glynn, R.J., Fruchart, J.C., *et al.* (2022) Triglyceride Lowering with Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Risk. *The New England Journal of Medicine*, **387**, 1923-1934. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2210645>
- [11] Virani, S.S. (2022) The Fibrates Story—A Tepid End to a Prominent Drug. *The New England Journal of Medicine*, **387**, 1991-1992. <https://doi.org/10.1056/NEJMe2213208>
- [12] Nurmohamed, N.S., Dallinga-Thie, G.M. and Stroes, E.S.G. (2020) Targeting apoC-III and ANGPTL3 in the Treatment of Hypertriglyceridemia. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, **18**, 355-361. <https://doi.org/10.1080/14779072.2020.1768848>
- [13] Burdett, H. (2016) Antisense Inhibition of Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. *Annals of Clinical Biochemistry*, **53**, 415. <https://doi.org/10.1177/0004563216632658>
- [14] Sahebkar, A., Reiner, Ž., Simental-Mendía, L.E., *et al.* (2016) Effect of Extended-Release Niacin on Plasma Lipoprotein(a) Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. *Metabolism: Clinical and Experimental*, **65**, 1664-1678. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.08.007>
- [15] O'Donoghue, M.L., Fazio, S., Giugliano, R.P., *et al.* (2019) Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. *Circulation*, **139**, 1483-1492. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037184>
- [16] 张冰, 程玉宏, 刘洋, 等. 极低密度脂蛋白受体在肝脏脂类代谢中的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(21): 4177-4182.
- [17] Iwasaki, T., Takahashi, S., Takahashi, M., *et al.* (2005) Deficiency of the Very Low-Density Lipoprotein (VLDL) Receptors in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Insulin Dependency of the VLDL Receptor. *Endocrinology*, **146**, 3286-3294. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0043>
- [18] Goudriaan, J.R., Espirito Santo, S.M., Voshol, P.J., *et al.* (2004) The VLDL Receptor Plays a Major Role in Chylomicron Metabolism by Enhancing LPL-Mediated Triglyceride Hydrolysis. *Journal of Lipid Research*, **45**, 1475-1481. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400009-JLR200>
- [19] Yu, Y., Kuang, Y.L., Lei, D., *et al.* (2016) Polyhedral 3D Structure of Human Plasma Very Low Density Lipoproteins by Individual Particle Cryo-Electron Tomography. *Journal of Lipid Research*, **57**, 1879-1888. <https://doi.org/10.1194/jlr.M070375>
- [20] Ramms, B., Patel, S., Nora, C., *et al.* (2019) ApoC-III ASO Promotes Tissue LPL Activity in the Absence of apoE-Mediated TRL Clearance. *Journal of Lipid Research*, **60**, 1379-1395. <https://doi.org/10.1194/jlr.M093740>
- [21] Heidemann, B.E., Koopal, C., Bots, M.L., *et al.* (2021) The Relation between VLDL-Cholesterol and Risk of Cardiovascular Events in Patients with Manifest Cardiovascular Disease. *International Journal of Cardiology*, **322**, 251-257. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.08.030>
- [22] Jawi, M.M., Frohlich, J. and Chan, S.Y. (2020) Lipoprotein(a) the Insurgent: A New Insight into the Structure, Function, Metabolism, Pathogenicity, and Medications Affecting Lipoprotein(a) Molecule. *Journal of Lipids*, **2020**, Article ID: 3491764. <https://doi.org/10.1155/2020/3491764>
- [23] DeFilippis, A.P., Trainor, P.J., Thanassoulis, G., *et al.* (2022) Atherothrombotic Factors and Atherosclerotic Cardiovascular Events: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *European Heart Journal*, **43**, 971-981. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab600>
- [24] McCormick, S.P. (2004) Lipoprotein(a): Biology and Clinical Importance. *The Clinical Biochemist Reviews*, **25**, 69-80.
- [25] Takahashi, S. (2017) Triglyceride Rich Lipoprotein-LPL-VLDL Receptor and Lp(a)-VLDL Receptor Pathways for Macrophage Foam Cell Formation. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **24**, 552-559. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17004>
- [26] Oka, K., Pastore, L., Kim, I.H., *et al.* (2001) Long-Term Stable Correction of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice with a Helper-Dependent Adenoviral Vector Expressing the Very Low-Density Lipoprotein Receptor. *Circulation*, **103**, 1274-1281. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.9.1274>
- [27] Turunen, T.A., Kurkipuro, J., Heikura, T., *et al.* (2016) Sleeping Beauty Transposon Vectors in Liver-Directed Gene Delivery of LDLR and VLDLR for Gene Therapy of Familial Hypercholesterolemia. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, **24**, 620-635. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.221>
- [28] Rader, D.J. (2001) Gene Therapy for Familial Hypercholesterolemia. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, **11**, 40-44.
- [29] Colella, P., Ronzitti, G. and Mingozzi, F. (2018) Emerging Issues in AAV-Mediated *in Vivo* Gene Therapy. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, **8**, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.11.007>

- [30] Jo, H., Choe, S.S., Shin, K.C., *et al.* (2013) Endoplasmic Reticulum Stress Induces Hepatic Steatosis via Increased Expression of the Hepatic Very Low-Density Lipoprotein Receptor. *Hepatology (Baltimore, Md)*, **57**, 1366-1377. <https://doi.org/10.1002/hep.26126>
- [31] Shin, K.C., Hwang, I., Choe, S.S., *et al.* (2017) Macrophage VLDLR Mediates Obesity-Induced Insulin Resistance with Adipose Tissue Inflammation. *Nature Communications*, **8**, 1087. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01232-w>
- [32] Fuchs, C.D., Claudel, T., Kumari, P., *et al.* (2012) Absence of Adipose Triglyceride Lipase Protects from Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress in Mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*, **56**, 270-280. <https://doi.org/10.1002/hep.25601>
- [33] Zarei, M., Barroso, E., Palomer, X., *et al.* (2018) Hepatic Regulation of VLDL Receptor by PPAR β/δ and FGF21 Modulates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Molecular Metabolism*, **8**, 117-131. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.008>
- [34] Oshio, Y., Hattori, Y., Kamata, H., *et al.* (2021) Very Low-Density Lipoprotein Receptor Increases in a Liver-Specific Manner Due to Protein Deficiency but Does Not Affect Fatty Liver in Mice. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 8003. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87568-2>
- [35] Leibowitz, M.L., Papatianasiou, S., Doerfler, P.A., *et al.* (2021) Chromothripsis as an On-Target Consequence of CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Nature Genetics*, **53**, 895-905. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7>
- [36] Ivics, Z., Li, M.A., Mátés, L., *et al.* (2009) Transposon-Mediated Genome Manipulation in Vertebrates. *Nature Methods*, **6**, 415-422. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1332>
- [37] Wilber, A., Frandsen, J.L., Geurts, J.L., *et al.* (2006) RNA as a Source of Transposase for Sleeping Beauty-Mediated Gene Insertion and Expression in Somatic Cells and Tissues. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, **13**, 625-630. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.014>
- [38] Sebastiani, F., Yanez Arteta, M., Lerche, M., *et al.* (2021) Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles. *ACS Nano*, **15**, 6709-6722. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.0c10064>
- [39] Debacker, A.J., Voutilainen, J., Catley, M., *et al.* (2020) Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, **28**, 1759-1771. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.015>