

# MicroRNA 在胆固醇逆转运中的调节作用

梁斌<sup>1</sup>, 蒋晓<sup>2</sup> 综述, 边云飞<sup>1</sup>, 肖传实<sup>3</sup> 审校

(1. 山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030001; 2. 太原钢铁集团有限公司总医院, 山西省太原市 030003;  
3. 山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] MicroRNA; 胆固醇逆转运; 动脉粥样硬化; 脂质代谢

[摘要] 胆固醇逆转运是体内清除胆固醇的唯一机制, 对维持体内胆固醇稳态有重要意义。MicroRNA 与体内诸多病理生理过程关系密切, 如肿瘤、脂质代谢、免疫功能等, 并逐渐成为新的药物靶点。最近发现 MicroRNA 对胆固醇逆转运有调节作用。本文综述了可调节胆固醇逆转运的 MicroRNA, 主要包括 miR-33、miR-758、miR-106b、miR-26、miR-27。这些研究结果表明, MicroRNA 对胆固醇逆转运及动脉粥样硬化有重要意义, 为临床防止动脉粥样硬化提供新的药物靶点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Role of MicroRNA in Reverse Cholesterol Transport

LIANG Bin, JIANG Xiao, BIAN Yun-Fei, and XIAO Chuan-Shi

(1. The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. General Hospital of TISCO, Taiyuan, Shanxi 030003; 3. The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] MicroRNA; Reverse Cholesterol Transport; Atherosclerosis; Lipid Metabolism

[ABSTRACT] Reverse cholesterol transport (RCT) is the only mechanism of cholesterol efflux in the body. It is important to maintain the cholesterol homeostasis. MicroRNAs have a close relationship with many pathophysiological processes in vivo, such as tumor, lipid metabolism and immune function. MicroRNAs gradually become new drug targets. The recent studies indicate that MicroRNAs play important roles in RCT. This paper reviews the MicroRNAs that can regulate the RCT process, including miR-33, miR-758, miR-106b, miR-26, miR-27. These findings show that MicroRNAs play important roles in RCT and atherosclerosis, and provide new drug targets for clinical prevention Atherosclerosis.

脂质代谢异常, 胆固醇稳态失衡可导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)。泡沫细胞是 As 形成的中心环节, 胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 可促进巨噬细胞内胆固醇清除, 减少泡沫细胞形成而阻断 As 发生, 所以调节 RCT 对防治 As 至关重要<sup>[1,2]</sup>。MicroRNA 是一类非常重要的转录后调节因子, 与体内病理生理调节有非常密切的关系, 已经成为了新的药物靶点。目前发现 MicroRNA 可对胆固醇逆转运起调节作用。本文就对胆固醇逆转运有调节作用的 MicroRNA 做一综述, 以加快 MicroRNA 在脂质代谢方面的应用研究。

## 1 胆固醇内稳态和胆固醇逆转运

哺乳动物必须严格控制细胞内胆固醇水平, 才能维持其正常功能, 主要通过胞内合成、肠道吸收和胆固醇清除来维持胞内胆固醇相对恒定。而胆固醇清除主要通过 RCT 来实现, 所以 RCT 对胆固醇内稳态的维持起着重要的积极作用。RCT 具体过程如下, 肝脏和小肠合成富含载脂蛋白 AI (aopAI) 而少量脂质的新生高密度脂蛋白 (HDL), 其中的 aopAI 与细胞表面的三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1) 相结合, 使细胞内的胆固醇和磷脂通过

[收稿日期] 2013-10-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81341025)

[作者简介] 梁斌, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 tyliangbin@163.com。蒋晓, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 lyjxls@126.com。边云飞, 教授, 博士, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 yun-feibian@sina.com。通讯作者肖传实, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。

ABCA1 转运至贫脂或无脂的 aopAI, 从而形成新生盘状高密度脂蛋白颗粒, 即前  $\beta$ -HDL。在卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 的催化下, HDL 中游离胆固醇酯化形成胆固醇酯, 前  $\beta$ -HDL 逐步形成成熟的 HDL, 成熟 HDL 可进一步接受三磷酸腺苷结合转运体 G1 (ABCG1) 介导的胆固醇流出。最后 HDL 通过 2 条途径将胆固醇转运至肝脏, 一条途径是胆固醇酯经 B 族 I 型清道夫受体 (SR-B I) 转运至肝脏代谢为胆汁酸, 排出体外。另一条是经胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 介导将 HDL 中的胆固醇酯转移到低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 和中密度脂蛋白 (IDL), 然后胆固醇酯通过低密度脂蛋白受体 (LDLR) 转运至肝脏代谢为胆汁酸<sup>[3-5]</sup>。

## 2 MicroRNA: 人类疾病重要因素

MicroRNA (miRNA) 最早于 1993 年在线虫细胞中发现其可调节线虫细胞的生长发育, 但未受重视。直至发现他们在其他生物中的作用特别是在人类疾病中的作用才备受关注。人类基因组中已发现 1000 种 miRNA 的基因位点, 并认为总基因的 1/3 受其调控。概括来说, miRNA 是一类广泛存在于生物体内、长约 22 个核苷酸、进化上高度保守的单链成熟非编码 RNA。miRNA 主要通过形成 RNA 诱导沉默复合体与靶标 mRNA 的 3' 非编码区 (UTR) 互补结合, 在转录后水平直接降解靶标 mRNA 或抑制蛋白质翻译<sup>[6]</sup>。一个 miRNA 平均可以调控 200 多个靶基因, 同时, 一个靶基因也可有多个 miRNA 与其 3'UTR 特异结合来调节<sup>[7,8]</sup>, 这些现象可以降低特定 miRNA 正常细胞稳态时的重要性。从进化的角度来看, miRNA 在进化中起调节基因突变的作用, 主要作用可能是“微调”基因表达。然而, 即使 miRNA 对许多靶 mRNA 作用有限, 但同一生物过程的调节因素的叠加可致受某一表型表达增强<sup>[9]</sup>。最新研究发现, 应激时 miRNA 发挥很重要的调节作用, 并且提出几种在应激条件下 miRNA 的调节模式, 包括压力信号调解和/或调制通路, 负反馈或正反馈和缓冲作用<sup>[10]</sup>。总之, miRNA 的复杂性不仅增加了现代人类疾病分子原因的另一层复杂性, 同时也开启了基于 miRNA 的治疗疾病的可能性。

## 3 miRNAs: 药物靶点

虽然 miRNAs 的生物学功能和调节机制仍不是很清楚, 但作为潜在的治疗药物已受到科研和临床

工作者的重视。第一, 现代诸多疾病的病因都是多方面的, 单靶点的药物很难治疗。第二, miRNA 的基本生物学功能是在一个生物学过程或疾病中可以针对不同的基因, 为多靶点治疗疾病提供了一个独特的机会。第三, 现有的反义技术和基因治疗方法促进体内调节 miRNA 水平的治疗方法的开发。迄今为止, 从治疗角度看, 已经开发了很多方法来研究 miRNA 如何用于治疗<sup>[11-12]</sup>。原则上, 通常 miRNA 被认为是基因表达的抑制剂, 应用 miRNA 类似物治疗即增加 miRNA 的表达, 将导致他们靶 mRNA 的表达减少。相反, 应用 miRNA 抑制剂治疗即减少 miRNA 的表达, 能抑制的 miRNA 的活性, 从而增加他们的靶 mRNA 表达。一种 miRNA 通过调节复杂疾病的不同组成部分, 表现出与经典靶向药物治疗不同, 提出一种新的革命性的治疗新方法。

## 4 miRNAs 与胆固醇逆转运

### 4.1 miR-33 与胆固醇逆转运

miR-33a/b 由 SREBP 基因的内含子编码, 主要调节胆固醇和脂质代谢。从果蝇到人类, miR-33 家族在进化上具有高度保守性, 但 miR-33b 只在某些大型哺乳动物和灵长类动物中表达。miR-33a/b 在人类中有 3 个不同的结合位点, 可以直接与 ABCA1 基因 3'UTR 结合, 抑制 ABCA1 mRNA 和蛋白的表达, 调节胆固醇逆转运, 改变 miR-33a/b 水平可引起巨噬细胞和其它细胞系中的细胞内胆固醇外流改变<sup>[13]</sup>。ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠模型中, 缺乏 miR-33 可以延缓动脉粥样硬化。此外, miR-33 抑制剂在动脉粥样硬化小鼠体内应用 4 周可增强 RCT, 降低炎症因子的表达, 增加斑块稳定性, 改善动脉粥样硬化。另有研究表明 anti-miR-33 治疗除了增加肝脏 ABCA1 的表达, 可直接作用于斑块中的巨噬细胞, 促进 ABCA1 表达和胆固醇外流<sup>[14,15]</sup>。

除了 ABCA1 外, ABCG1 和尼曼-匹克 (NPC1) 也被证实是 miR-33 的靶基因, 但这两个靶基因在人和小鼠体内有所区别。小鼠 ABCG1 基因的 3'UTR 有 2 个 miR-33 结合位点, 而人 ABCG1 基因却没有, 小鼠的巨噬细胞内 miR-33 过表达可减少 ABCG1 表达, 在人体内却没有这样的改变, 这说明 miR-33 对 ABCG1 的调控具有种属特性。NPC1 具有与 ABCA1 相似的功能, 可将胆固醇转运到 aopAI。在人 NPC1 基因 3'UTR 有 2 个 miR-33 结合位点, 因此人巨噬细胞和肝细胞中的 miR-33 可抑制 NPC1 蛋白表达<sup>[16]</sup>。

虽然 miR-33 抑制剂很有前景, 可以增加胆固

醇外流和改善脂代谢,但其安全性应仔细评估,由于其也可作用于与细胞增殖、细胞周期和炎症反应的相关靶点,包括:细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (Cdk6),细胞周期蛋白 D1 (CCND1),肿瘤抑制基因 p53 及核受体辅助调节蛋白 140 (RIP140)<sup>[17-19]</sup>。

#### 4.2 miR-758 与胆固醇逆转运

与 miR-33 主要研究基因定位不同,miR-758 被发现在富含胆固醇的巨噬细胞中。研究发现,miR-758 可以直接与 ABCA1 的 3'UTR 结合调节胆固醇外流。因此,miR-758 主要调节细胞内胆固醇流出到 apoAI,不流向 HDL<sup>[20]</sup>。虽然 miR-758 的基因的表达调控并不清楚,但高胆固醇血症和细胞内胆固醇水平增加可促进其表达,这将最终导致胆固醇外流减少,细胞内胆固醇含量增加,因此可对其进行抑制性治疗。另外,在大脑和心脏 miR-758 的表达都较高,特别是在大脑中。miR-758 似乎不仅能调节 ABCA1 表达,还能调节其他重要的具有神经系统功能的蛋白质,包括 SLC38A1,IGF1,NTM,XTXBP1 和 EPHA1。在心血管疾病的治疗中,抑制 miR-758 可以增加胆固醇外流和 RTC,这最终有利于 As 的治疗。

#### 4.3 miR-106b 与胆固醇逆转运

通过对靶目标 ABCA1-3'UTR 的生物信息学分析寻找保守 miRNA,发现 miR-106b 可以靶向结合 ABCA1。且在神经细胞株中,不论在生理还是 LXR 刺激条件下 miR-106b 都可以减少胆固醇流向 apoAI<sup>[21]</sup>。阿尔茨海默氏病 (AD) 是一种常见的老年痴呆的原因,产生淀粉样蛋白  $\beta$  ( $A\beta$ ) 单体或聚合体被认为是 AD 发病的核心机制。 $A\beta$  聚合体可以由淀粉样前体蛋白 (APP) 降解产生。因此,促进  $A\beta$  生成和低聚化或减少消除的因素可以使 AD 发生的风险增加。认为增加细胞内胆固醇水平可诱导  $A\beta$  生成,因此清除神经元细胞内过量的胆固醇是治疗 AD 的潜在治疗靶点。miR-106b 已证实可抑制 ABCA1 表达,促进  $A\beta$  的分泌和清除。这种对细胞的作用可以被 ABCA1 的表达抵消,表明这一作用直接与 miR-106b 作用于 ABCA1 相关,而与神经元细胞中其它靶基因无关<sup>[22]</sup>。另外,APP 也是 miR-106b 的靶点,因此 miR-106b 抑制剂可促进 APP 生成和 ABCA1 介导的胆固醇外流<sup>[23]</sup>。综上,miR-106b 在控制神经元细胞胆固醇过量上是一个值得研究的靶点。

#### 4.4 miR-26 与胆固醇逆转运

Sun 等<sup>[24]</sup>研究表明,LXR 激动剂可导致 ABCA1 表达增加及 miR-26 的表达减少。而 miR-26 可与

ABCA1 的 3'UTR 结合,靶向沉默 ABCA1 表达,抑制胆固醇逆转运。细胞内胆固醇过量激活了 LXR,不仅增加促进胆固醇流出的关键基因表达,同时减少了抑制相同关键基因的 miRNA 的表达,这将最终大大促进细胞内胆固醇流出。因此,这些分子机制,一方面增加 ABCA1、ABCG1 和其它相关胆固醇流出的基因表达,另一方面抑制 miR-26 的表达促进 LXR 激动剂发挥药理作用。LXR 激活也促进其他的 miRNA 表达,如 miR-613,其作用靶点为 LXR- $\alpha$ ,形成 LXR 自身介导的反馈调节。

#### 4.5 miR-27 与胆固醇逆转运

我国的唐朝克团队应用荧光素酶报告基因检测 miR-27a/b 与 ABCA1 的结合情况,并且体外培养 THP-1 细胞、RAW264.7 细胞核 HepG 细胞,将 miR-27a/b mimics 或 miR-27a/b inhibitor 转染入细胞内,实时荧光定量 PCR 检测 ABCA1 mRNA 表达水平,Western blotting 检测 ABCA1 蛋白水平,油红 O 染色观察细胞脂滴情况,高效液相色谱分析细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量,液体闪速计数器检测细胞内胆固醇流出。结果显示,miR-27a/b 能显著抑制荧光素酶活性,证明其可与 ABCA1 mRNA 3'UTR 特异结合。并且 miR-27a/b 剂量依赖性和时间依赖性抑制 ABCA1 mRNA 和蛋白表达,增加细胞内脂滴和胆固醇蓄积,抑制细胞内胆固醇流出。而 miR-27a/b inhibitor 刚好出现相反结果。最终证明了 miR-27a/b 可靶向沉默 ABCA1 进而调节胆固醇逆转运<sup>[25]</sup>。

## 5 展望未来:胆固醇从进化到 miRNA 革新

胆固醇使细胞膜具有一定的物理特性,并使不同蛋白质、通道等具有特殊功能。为保持这些独特的功能,细胞内有多分子机制参与其调节。过去几十年中,调控胆固醇合成及血浆脂蛋白摄取的机制已明确,而对调控胆固醇排出的机制了解较少。miRNA 就是一种可调节胆固醇清除的机制,特别是对于 ABCA1 的调节,其 3'UTR 与其他参与胆固醇代谢的常见基因相比较长 (>3.3 kb),增加了 miRNA 对其作用的可能性,进而影响胆固醇逆转运。不同的预测算法表明有 100 种 miRNA 具有潜在调节 ABCA1 的功能。这些 miRNAs 在生理和病理过程中对胆固醇外流、RCT 和心血管疾病的重要性仍然有待阐明。

虽然抑制胆固醇生物合成的药物 (他汀类) 或抑制其吸收的药物 (依折麦布,树脂) 已广泛使用,

大大降低了 CAD 发生率,但心脑血管疾病仍然是全球发病率和死亡率的首要原因。直到目前为止,在标准治疗基础上,提高 HDL 水平的药物对降低心血管疾病的危险无明显作用。HDL 水平的高低可能无法反映 HDL 的生理功能,尤其是调节 RCT 的功能<sup>[26]</sup>。由于胆固醇外流是 RCT 的第一步,也可能是最重要的一步,所以针对增加胆固醇外流和 RCT 的治疗将是治疗心血管动脉粥样硬化疾病很有前景的治疗方法。在某种意义上提出了与经典靶向治疗药物不同的独特的疾病治疗方法。此外,由于 miRNA 药理作用的“非特异性”,可能不易引起组织失敏感,而这常在经典靶向治疗药物治疗中观察到。

miRNA 靶向结合某一复杂疾病不同基因的特性,提供了疾病治疗的新思路。临床试验前期研究表明,靶向作用于调控胆固醇外流的 miRNA 需应用 anti-miR 技术,如抑制 miR-33 可以显著促进胆固醇外流、RCT 和 HDL 水平,使得治疗心血管动脉粥样硬化疾病的新型方法迅速发展。尽管开发 miRNA 相关药物较为艰难,但几家公司正在开发以 miRNA 为基础的治疗和诊断方法<sup>[27]</sup>,尤其是 Santaris Pharma 公司进行的 Miravirsin III 期临床试验是发展以 miRNA 为基础治疗的质的飞跃,给 miRNA 的治疗带来希望。

#### [参考文献]

[1] Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis[J]. *Protein Cell*, 2012, 3(3): 173-181.

[2] 唐朝克. 以 ABCA1 为靶点防治动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(11): 879-884.

[3] Escola-Gil JC, Rotllan N, Julve J, Blanco-Vaca F. In vivo macrophage-specific RCT and antioxidant and antiinflammatory HDL activity measurements: New tools for predicting HDL atheroprotection [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 206(2): 321-327.

[4] Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamahiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2): 361-370.

[5] Schmitz G, Langmann T. Structure, function and regulation of the ABC1 gene product[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2001, 12: 129-140.

[6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136: 215-233.

[7] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-269.

[8] 王昊, 彭道泉. microRNA 与胆固醇代谢[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(4): 367-371.

[9] Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(11): 831-842.

[10] Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease[J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1 172-187.

[11] van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics[J]. *Circ Res*, 2012, 110(3): 496-507.

[12] van Rooij E, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(11): 860-872.

[13] Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, et al. MiR-33 contributes to theregulation of cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 2010, 328 (5 985): 1 570-573.

[14] Horie T, Baba O, Kuwabara Y, et al. MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE<sup>-/-</sup> Mice [J]. *Journal of American Heart Association*, 2012, 1: e003 376.

[15] Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121 (7): 2 921.

[16] Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, et al. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 12 228-232.

[17] Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, et al. Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11: 922-933.

[18] Herrera-Merchan A, Cerrato C, Luengo G, et al. Mir-33-mediated downregulation of p53 conttols hematopoietic stemcell self-renewal [J]. *Cell cycle*, 2010, 9: 3 277-285.

[19] Ho PC, Chang KC, Chuang YS, et al. Cholesterol regulation of receptor-interacting protein 140 via microma-33 in inflammatory cytokine production[J]. *FASEB J*, 2011, 50: 357-371.

[20] Cristina M. Ramirez, Alberto Dávalos, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through post transcript -tional repression of ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(11): 2 707-714.

[21] Kim J, Yoon H, Ramirez CM, et al. Mir-106b impairs cholesterol efflux and increases abeta levels by repressing abca1 expression [J]. *Exp Neurol*, 2012, 235: 476-483.

[22] Fonseca AC, Resende R, Oliveira CR, et al. Cholesterol and statins in Alzheimer's disease: current controversies[J]. *Experimental Neurology*, 2010, 223: 282-293.

[23] Hebert SS, Horre K, Nicolai L, et al. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 33: 422-428.

[24] Sun D, Zhang J, Xie J, et al. MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7 [J]. *FEBS Letters*, 2012, 586: 1 472-479.

[25] 陈五军, 路倩, 匡海军, 等. miR-27a/b 靶向沉默 ABCA1 对胆固醇流出的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, (11): 2 017.

[26] Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome[J]. *The New England journal of medicine*, 2012, 367 ( 22 ): 2 089-099.

[27] van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microma therapeutics[J]. *Circulation Research*, 2012, 110: 496-507.