

miR-19b 靶向沉默 ABCA1 调控巨噬细胞胆固醇流出

吕运成<sup>1,2</sup>, 杨靖<sup>3</sup>, 张熠<sup>3</sup>, 姚峰<sup>1</sup>, 彭超<sup>3</sup>, 王佐<sup>1</sup>, 唐艳艳<sup>1</sup>, 徐菁<sup>2</sup>, 刘政海<sup>2</sup>, 唐朝克<sup>1</sup>

( 南华大学 1. 心血管疾病研究所 动脉硬化湖南省重点实验室, 2. 临床应用解剖研究室, 3. 附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001 )

[关键词] miR-19b; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 巨噬细胞; 胆固醇流出

[摘要] 目的 探讨 miR-19b 对三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1) 介导巨噬细胞胆固醇流出的影响及其机制。方法 将 miR-19b mimic 或 miR-19b inhibitor 转染入 THP-1 源性巨噬细胞, 液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出, 油红 O 染色观察细胞内脂滴情况, 生物信息学分析 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 的结合关系, 荧光素酶报告基因检测 miR-19b 与 ABCA1 的结合情况, Western blot 检测 ABCA1 蛋白水平。结果 miR-19b 抑制巨噬细胞胆固醇流出, 增加胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成, 而 anti-miR-19b 则刚好出现相反的结果。miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 的 3110-3116 位结合, 且二者结合的自由能较低。miR-19b 显著抑制荧光素酶活性及其巨噬细胞中 ABCA1 蛋白的表达。结论 miR-19b 靶向沉默 ABCA1 进而抑制其介导的胆固醇流出, 增加巨噬细胞内脂质蓄积。

[中图分类号] Q7 [文献标识码] A

MiR-19b Targets ABCA1 and Regulates Intracellular Cholesterol Efflux in THP-1 Derived Macrophages

LV Yun-Cheng<sup>1,2</sup>, YANG Jing<sup>3</sup>, ZHANG Yi<sup>3</sup>, YAO Feng<sup>1</sup>, PENG Chao<sup>3</sup>, WANG Zuo<sup>1</sup>, TANG Yan-Yan<sup>1</sup>, XU Jing<sup>2</sup>, LIU Zheng-Hai<sup>2</sup>, and TANG Chao-Ke<sup>1</sup>

( 1. Institute of Cardiovascular Research & Key Laboratory for Atherosclerology of Hunan Province, 2. Laboratory of Clinical Anatomy, 3. The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China )

[KEY WORDS] MiR-19b; ATP Binding Cassette Transporter A1; Macrophage; Cholesterol Efflux

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect and mechanism of miR-19b on ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) mediated intracellular cholesterol efflux. Methods After transfected miR-19b mimic and inhibitor into THP-1 derived macrophage, cholesterol efflux was detected with liquid scintillator, and intracellular lipid droplet was stained with oil red O. The binding of miR-19b with ABCA1 3'UTR was analyzed with bioinformatics websites. MiR-19b binding to ABCA1 3'UTR was confirmed with luciferase reporter assay. ABCA1 expression was measured by Western bolt. Results MiR-19b dramatically suppressed macrophage cholesterol efflux, resulting in excessive lipid accumulation and foam cells formation. The exactly opposite results were observed by anti-miR-19b in THP-1 macrophage. MiR-19b bound to the 3110-3116 sites within ABCA1 3'UTR, and their binding free energy was very low. MiR-19b potently inhibited the luciferase activity and macrophage ABCA1 expression. Conclusions MiR-19b targets ABCA1 and inhibits intracellular cholesterol efflux, causing excessive lipid accumulation in macrophage.

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 为膜整合蛋白, 以 ATP 为能源将胞内游离胆固醇和磷脂转运到胞膜, 最终与附在细胞表面的载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I, ApoA I) 结合<sup>[1]</sup>。这一过程对高密度脂蛋白颗粒的形成至关重要, 也是促进巨噬细胞内过量胆固醇流出及胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 的关键步骤<sup>[2,3]</sup>。ABCA1 蛋白在巨噬细胞中的表达和活性受到转录和转录后水平的严密调控<sup>[4]</sup>。多种促动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的炎症因子和代谢产物通过下调 ABCA1 的表达, 从而促进巨噬细胞内脂质蓄积和 As 性疾病的发

展<sup>[5]</sup>。因此,寻找调控 ABCA1 表达和促进巨噬细胞脂质流出的潜在机制对于 As 的防治具有重要意义。

microRNA 是一类内源性、长约 22 个核苷酸的单链非编码 RNA,互补结合靶标 mRNA 的 3'UTR,导致 mRNA 降解或翻译抑制,从而在转录后水平调控靶基因的表达<sup>[6]</sup>。研究表明,一些 microRNA 通过调控其靶基因 ABCA1 的表达,促进巨噬细胞脂质蓄积和泡沫细胞形成,介导 As 的发生发展<sup>[4,7]</sup>。目前,已有文献显示 miR-19b 与体内脂质代谢及 As 的进展密切相关。miR-19b 在 As 密切相关的单核细胞、淋巴细胞及血管内皮细胞中均有表达<sup>[8,9]</sup>。miR-19b 在人和鼠的 As 斑块中过量表达<sup>[8,10,11]</sup>,高脂饮食诱导 miR-19b 表达上调<sup>[12]</sup>。我们利用 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型,发现 miR-19b 可以明显促进 THP-1 细胞内的胆固醇蓄积。生物信息学分析显示 miR-19b 可靶向结合 ABCA1 的 3'UTR。据此,我们推测 miR-19b 可能通过靶向沉默 ABCA1 抑制胆固醇流出,导致泡沫细胞形成和脂质代谢紊乱,发挥致 As 作用。

为证实 miR-19b 通过靶向沉默 ABCA1 来促进巨噬细胞内脂质蓄积,本研究观察了 miR-19b 对巨噬细胞 ABCA1 的表达、胆固醇流出、胆固醇含量的影响,从而明确 miR-19b 促进巨噬细胞胆固醇蓄积及 As 进展的分子机制,为 As 的防治提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养与处理

THP-1 细胞与 293T 细胞分别用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 和 DMEM 高糖培养液培养,37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中静置培养。实验前 THP-1 细胞需用 160 nmol/L 佛波酯孵育 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。处理前所有细胞换用含 2 g/L 牛血清白蛋白的 RPMI 1640 培养液,同时加入 50 mg/L ox-LDL 或 1 mCi/L [<sup>3</sup>H] 标记胆固醇共孵育。

### 1.2 液体闪烁计数法检测细胞内胆固醇流出

THP-1 细胞用 24 孔板培养,用佛波酯诱导分化为巨噬细胞后,用 PBS 液洗涤细胞,加 1 mCi/L [<sup>3</sup>H] 标记胆固醇孵育标记 24 h,用 PBS 洗涤细胞,再用含 2 g/L 牛血清白蛋白 RPMI 1640 培养液培养细胞 24 h。同时将细胞分为 5 组:空白对照组,培养液中不加任何其他物质;阳性对照组,培养液中加入 10 μmol/L 肝 X 受体激动剂 T0901317;阴性对照

组,培养液中加入 100 nmol/L ABCA1 siRNA; miR-19b mimic 组,培养液中加入 40 nmol/L miR-19b mimic; miR-19b inhibitor 组,培养液中加入 80 nmol/L miR-19b inhibitor。处理 24 h 后,再用 PBS 液洗涤细胞,在无血清含 10 mg/L ApoA I 新培养液中培养细胞 12 h,用闪烁计数法分别检测培养液和细胞的 [<sup>3</sup>H] 标记胆固醇,胆固醇流出用培养液每分钟记数 (counts per minute, CPM) 除以总 CPM (培养液 CPM + 细胞 CPM),再乘以 100% 来表示。

### 1.3 油红 O 染色观察细胞内脂滴

取无菌 6 孔培养板,每孔均放入消毒盖玻片,每孔加 THP-1 细胞悬液 2 mL,分别用佛波酯和 ox-LDL 诱导形成 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞,将其细胞分为 3 组:空白对照组,培养液中不加任何其他物质; miR-19b mimic 组,培养液中加入 40 nmol/L miR-19b mimic; miR-19b inhibitor 组,培养液中加入 80 nmol/L miR-19b inhibitor。处理 24 h 后,在无血清含 10 mg/L ApoA I 新培养液中孵育细胞 12 h,用 PBS 溶液轻轻洗涤细胞 2 次,加 4% 多聚甲醛固定细胞 5 min,以 PBS 溶液清洗 1 min 后,加稀释好的油红 O 工作液 60℃ 烤箱染色 15~20 min,以去离子水清洗 2~3 次,每次 1~2 min,50% 异丙醇镜下分色后,用苏木素染核 5~7 min 后去离子水清洗 5 min,用 0.5% 盐酸酒精快速分色并以流水返蓝后,在显微镜下观察并拍照,显示的鲜红色颗粒即为脂滴。

### 1.4 荧光素酶报告基因载体构建及荧光测定

参照 Genebank 收录的 ABCA1 序列,登录号为 NM-005502,利用引物分析软件 Primer Premier 5.0 针对 ABCA1 3'UTR 设计引物;以 THP-1 细胞基因组 DNA 为模板行 PCR 扩增,并构建成野生型 psi-CHECK<sup>TM</sup>-2-ABCA1-WT 3'UTR 载体,同时对 psi-CHECK<sup>TM</sup>-2-ABCA1-3'UTR 载体上带有的 miR-19b 靶点序列中的 seed sequence 进行 UUUGCAC 到 UUGAAGC 的点突变,构建突变型 psiCHECK<sup>TM</sup>-2-ABCA1-Mut 3'UTR 表达载体。按实验分组进行转染,48 h 后裂解细胞,根据荧光素酶检测试剂盒提供的方法检测 hRluc 及 hLuc + 的荧光强度,二者的比值反映 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 的结合情况。

### 1.5 Western blot 检测 ABCA1 蛋白

THP-1 细胞用佛波酯诱导分化为巨噬细胞后,用 50 g/L ox-LDL 诱导形成泡沫细胞,分组同 1.2。处理 24 h 后,再用 PBS 液洗涤细胞,加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,4℃ 离心 10 min,弃去沉淀。以 4:1 加入 5 × SDS 凝胶加样缓冲液,100℃ 加热 10

min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,12 V 恒压半干转膜 45 min 后,丽春红染色 5 min 观察转膜效果。5% 脱脂牛奶封闭 2 h,按 1:1000 加入羊抗人 ABCA1 一抗,4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,1:1000 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠抗羊二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次,用 Tanon 5500 免疫荧光检测系统激发荧光,Tanon MP 软件摄取图像,Tanon CAL 软件分析获取各条带的光密度值。

1.6 统计学方法

所有实验均重复 3 次。实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-19b 抑制巨噬细胞胆固醇流出

miR-19b mimic 组 THP-1 巨噬细胞胆固醇流出较空白对照组明显降低,较阳性对照组降低更为显著,而与阴性对照组比较无差异。miR-19b inhibitor 组细胞胆固醇流出与空白对照组比较明显上调。这就表明 miR-19b 可抑制巨噬细胞胆固醇流出(图 1)。

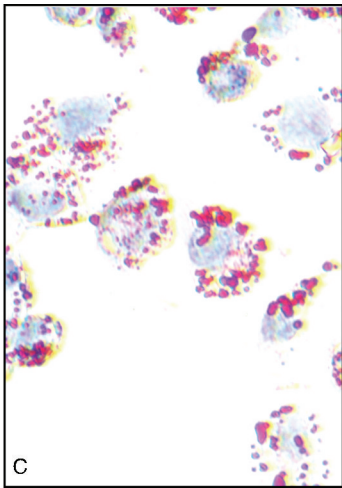
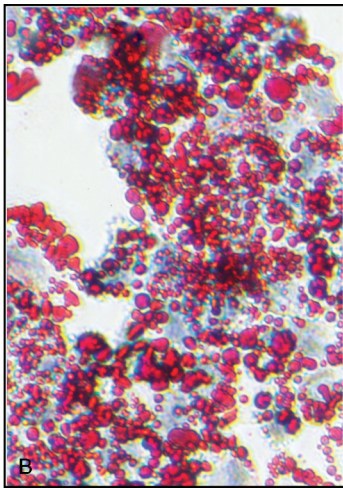
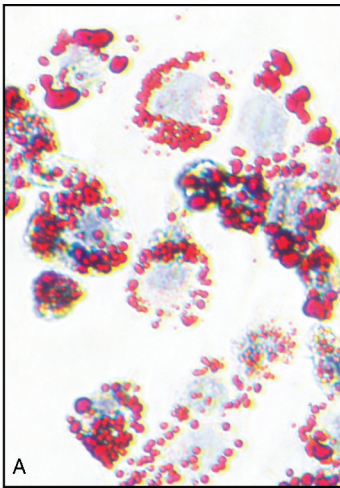


图 2. 转染 miR-19b mimic 和 miR-19b inhibitor 24 h 后巨噬细胞内脂滴变化 A 为空白对照组,B 为 miR-19b mimic 组,C 为 miR-19b inhibitor 组。

Figure 2. Macrophage lipid droplet after transfection with miR-19b mimic and inhibitor for 24 hours

2.3 生物信息学预测 miR-19b 靶向结合 ABCA1 3'UTR

多个 microRNA 靶标预测网站显示 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 靶向结合(图 3),提示 miR-19b 与 ABCA1 可能存在生理调控作用。使用 RNAhybrid 在线网站分析人/鼠 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 结合自由能情况,结果显示 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 结

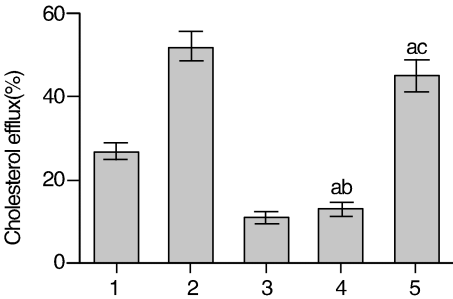


图 1. 转染 miR-19b mimic 和 miR-19b inhibitor 24 h 后巨噬细胞胆固醇流出情况 1 为空白对照组,2 为阳性对照组,3 为阴性对照组,4 为 miR-19b mimic 组,5 为 miR-19b inhibitor 组。a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与阳性对照组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与阴性对照组比较。

Figure 1. Cholesterol efflux in macrophage after transfection with miR-19b mimic and inhibitor for 24 hours

2.2 miR-19b 促进巨噬细胞内脂质蓄积

miR-19b mimic 组巨噬细胞内脂质蓄积明显增加,油红 O 染色显示胞内脂滴数量多、体积大,有大量泡沫细胞形成。miR-19b inhibitor 组巨噬细胞脂质蓄积较空白对照组明显减少,胞内脂滴稀少、体积也小。这些结果提示 miR-19b 可促进巨噬细胞内脂质蓄积(图 2)。

合自由能较低(一般认为自由能低于  $-10$  kcal/mol),表明 microRNA 具有较强的体内结合靶基因的能力(图 4)。

2.4 miR-19b 靶向结合 ABCA1 3'UTR 情况

构建 ABCA1 3'UTR 的野生型及其突变型荧光素酶报告基因表达质粒与 miR-19b 共转染到 293T 细胞,发现 miR-19b 显著抑制 psiCHECK™-2-AB-



CA1-WT 3' UTR 的表达,对 psiCHECK™-2-ABCA1-Mut 3'UTR 表达无影响,表明 miR-19b 可靶向结合胞内 ABCA1 mRNA 的 3'UTR,从而抑制 ABCA1 蛋白表达(图 5)。

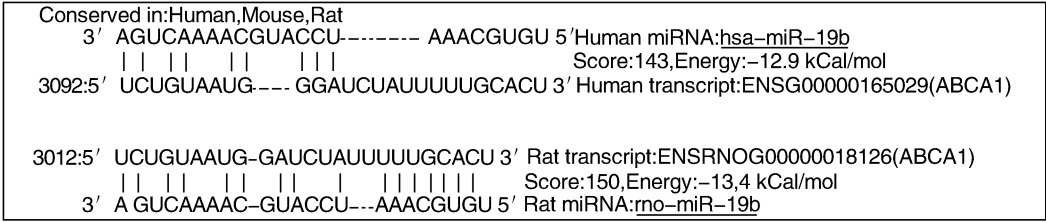


图 3. 人和鼠 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 结合情况 上部为人 miR-19b,下部为鼠 miR-19b。  
Figure 3. Predicted annealing of human and murine miR-19b to the ABCA1 3'UTR

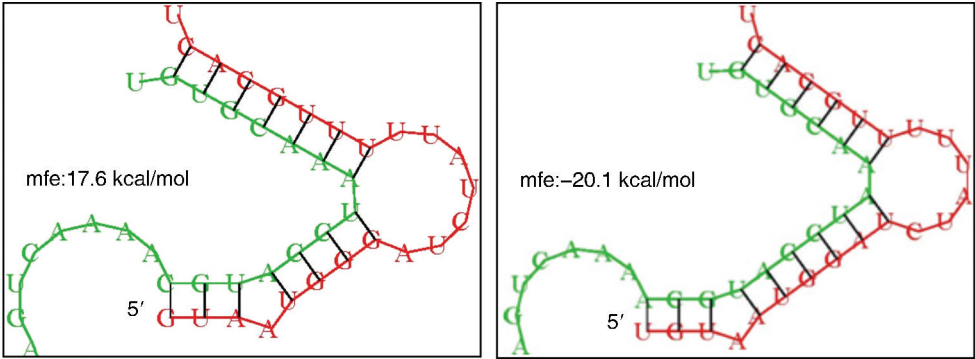


图 4. 人/鼠 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 结合自由能情况 左图为人 miR-19b,结合位点为 3110-3116 位;右图为鼠 miR-19b,结合位点为 2951-2957 位。  
Figure 4. Schematic alignment of the free energy scores for miR-19b-ABCA1 hybrids

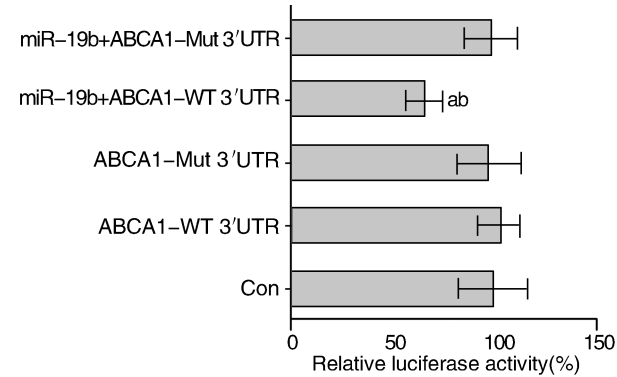


图 5. 人 miR-19b 与 ABCA1 3'UTR 荧光素酶报告基因载体共转染 293T 细胞后的相对荧光强度 a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 ABCA1-WT 3'UTR 组比较。  
Figure 5. Luciferase activity assay of 293T cells cotransfected with a luciferase reporter plasmid containing the ABCA1 3' UTR (including wide type and mutation) and miR-19b mimic for 24 h

2.5 miR-19b 下调巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达

miR-19b mimic 组 ABCA1 蛋白表达较空白对照组明显降低,较阳性对照组降低更为显著,而与阴性对照组比较无差异。miR-19b inhibitor 组 ABCA1 蛋

白表达与空白对照组比较明显上调。这就表明 miR-19b 可抑制巨噬细胞 ABCA1 蛋白的表达(图 6)。

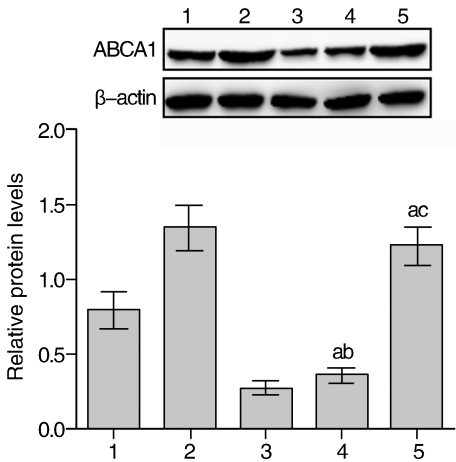


图 6. 转染 miR-19b mimic 和 miR-19b inhibitor 24 h 后巨噬细胞 ABCA1 蛋白的表达 1 为空白对照组,2 为阳性对照组,3 为阴性对照组,4 为 miR-19b mimic 组,5 为 miR-19b inhibitor 组。a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与阳性对照组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与阴性对照组比较。  
Figure 6. Expression of ABCA1 protein in macrophage after transfection with miR-19b mimic and inhibitor for 24 hours

3 讨 论

本研究通过观察 miR-19b 对 ABCA1 3'UTR 靶向结合作用,对巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达、胆固醇流出及其胞内脂质蓄积的影响,证实 miR-19b 通过靶向沉默 ABCA1 的表达抑制其介导的胆固醇流出,促进巨噬细胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成。

miR-19b 互补结合 ABCA1 3'UTR,从而抑制巨噬细胞 ABCA1 的表达。多个生物信息学在线网站分析表明 miR-19b 与人 ABCA1 3'UTR 存在 3 个结合位点,与鼠 ABCA1 3'UTR 存在 2 个结合位点。在人 ABCA1 3'UTR 的 3 个结合位点中,以 3110-3116 为保守结合位点、结合自由能最低且网站综合评分最高,故本研究选取该位点为目标位点进行研究。以该位点构建的野生型和突变型荧光素酶报告基因载体与 miR-19b 共转染 293T 细胞,结果发现 miR-19b 明显抑制野生型 ABCA1 3'UTR 载体的表达,据此推测 miR-19b 可以在生理或病理条件下对活体细胞 ABCA1 的表达发挥调控作用。我们在 THP-1 源性巨噬细胞中转染 miR-19b mimic 及其 inhibitor 检测 ABCA1 蛋白的表达变化,发现 miR-19b mimic 显著降低 ABCA1 蛋白的表达,而 miR-19b inhibitor 则上调其表达,从而进一步验证了这一推测。同时,我们还检测了胞内 ABCA1 mRNA 变化,发现 miR-19b 对 mRNA 水平无影响(数据未列出)。故巨噬细胞中 ABCA1 蛋白表达的下调是缘于 miR-19b 靶向结合其 mRNA 3'UTR 而发挥转录后水平的调控作用所致。

miR-19b 靶向沉默 ABCA1,抑制其介导的胆固醇流出,从而促进巨噬细胞脂质蓄积和泡沫细胞形成。ABCA1 的主要功能是介导细胞内胆固醇和磷脂流出,结合至细胞表面贫脂或无脂的 ApoA I,进而形成高密度脂蛋白而参与后续的 RCT 过程<sup>[13]</sup>。这一过程对于减少血管壁脂质蓄积及泡沫细胞形成均具有重要意义。本研究在巨噬细胞中转染 miR-19b mimic 发现 miR-19b 可沉默 ABCA1 的表达。ABCA1 表达的沉默必然阻碍巨噬细胞内脂质流出,继而引起过量的胆固醇沉积于胞内,逐步发展成为泡沫细胞。故本研究转染 miR-19b mimic 的巨噬细胞胆固醇流出受抑,胞内脂滴显著增多,形成的泡沫细胞也明显增多。而转染 miR-19b 的巨噬细胞则刚好出现相反的结果。此外,Bidzhekov 等<sup>[8]</sup>在研究人 As 斑块 microRNA 表达变化时发现 miR-19b 表达上调,这就意味 miR-19b 可能在 As 发生发展的病理过程中对 ABCA1 的表达持续发挥负调控

作用,从而导致巨噬细胞内过量脂质蓄积。Boon 等<sup>[9]</sup>在研究血流剪切应力对血管壁 microRNA 表达影响时将 miR-19b 初步归为促 As 类的 microRNA,本研究进一步验证了这一观点。

miR-19b 沉默 ABCA1 的表达,促进巨噬细胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成,从而导致 As 性疾病的发生发展。抑制 miR-19b 水平,促进巨噬细胞内 ABCA1 表达,从而促进巨噬细胞内胆固醇流出和抑制 As 的进展。本研究将深入观察 miR-19b 对 As 动物模型血管壁内的脂质蓄积及其 As 病变的影响,并进一步探寻如何在体内有效调控 miR-19b 的方法,从而为防止脂质在血管壁蓄积以及治疗 As 性疾病提供新的靶点。

[参考文献]

[1] Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport[J]. Circulation, 2012, 125 (15): 1 905-919.

[2] 胡炎伟,唐朝克. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 研究的最新进展[J]. 生物化学与生物物理学进展, 2008, 35 (4): 373-379.

[3] Hellerstein M, Turner S. Reverse cholesterol transport fluxes[J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25 (1): 40-47.

[4] Lv YC, Yin K, Fu YC, et al. Posttranscriptional regulation of ATP-binding cassette transporter A1 in lipid metabolism[J]. DNA Cell Biol, 2013, 32 (7): 348-358.

[5] 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.

[6] Moore KJ, Rayner KJ, Suarez Y, et al. microRNAs and cholesterol metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21 (12): 699-706.

[7] Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function[J]. Circ Res, 2014, 114 (1): 183-192.

[8] Bidzhekov K, Gan L, Denecke B, et al. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans[J]. Thromb Haemost, 2012, 107 (4): 619-625.

[9] Boon RA, Hergenreider E, Dimmeler S. Atheroprotective mechanisms of shear stress-regulated microRNAs[J]. Thromb Haemost, 2012, 108 (4): 616-620.

[10] 胡孜阳,罗建方,钟诗龙,等. 应用基因芯片初步分析主动脉夹层与正常动脉微小 RNA 的差异表达[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40 (5): 406-410.

[11] Han H, Wang YH, Qu GJ, et al. Differentiated miRNA expression and validation of signaling pathways in apoE gene knockout mice by cross-verification microarray platform [J]. Exp Mol Med, 2013, 45: e13.

[12] Romao JM, Jin W, He M, et al. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet[J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e40605.

[13] Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: A cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease [J]. Physiol Rev, 2005, 85 (4): 1 343-372.

(此文编辑 文玉珊)