

miR-31-5p 通过靶向抑制胰岛素降解酶 发挥促进动脉粥样硬化作用

吴春艳, 吴婕翎, 王馨, 林少勇

(广东省妇幼保健院儿童保健科, 广东省广州市 511442)

[关键词] miR-31-5p; 胰岛素降解酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨 miR-31-5p 是否通过靶向抑制胰岛素降解酶(IDE)发挥促进动脉粥样硬化作用。方法 应用生物信息学和双荧光素酶技术筛选并验证 miR-31-5p 与 IDE 3' UTR 靶向结合情况。miR-31-5p mimic 和 inhibitor 转染 THP-1 巨噬细胞及 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞;采用 miR-31-5p agomir 处理高脂饮食的 ApoE^{-/-}小鼠;Western blot 检测 IDE 蛋白表达;ELISA 检测 ApoE^{-/-}小鼠血浆脂质水平;油红 O 染色检测小鼠肝脏脂质蓄积及主动脉粥样硬化斑块病变。结果 miR-31-5p 靶向结合 IDE 3' UTR 并引起转录抑制;miR-31-5p 可下调 THP-1 细胞、小鼠肝脏和主动脉组织中 IDE 蛋白表达($P < 0.05$),同时引起泡沫细胞和小鼠血清中脂质含量增加($P < 0.05$),小鼠主动脉窦和主动脉树病变面积明显增加($P < 0.05$)。结论 miR-31-5p 可通过靶向抑制 IDE 发挥促进动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

miR-31-5p Promotes Progression of Atherosclerosis via Inhibiting Insulin-degrading Enzyme

WU Chun-Yan, WU Jie-Ling, WANG Xin, and LIN Shao-Yong

(Child Healthcare Department, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong 511442, China)

[KEY WORDS] miR-31-5p; Insulin-degrading Enzyme; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether miR-31-5p could promote progression of atherosclerosis via inhibiting insulin-degrading enzyme (IDE). **Methods** To establish the effect of miR-31-5p on the 3' UTR of human IDE, the bioinformatics analysis and dual luciferase assay were performed. To investigate the impact of miR-31-5p on IDE expression and cholesterol homeostasis, cultured THP-1 macrophages and THP-1 macrophage-derived foam cells were transfected with miR-31-5p mimic or inhibitor. ApoE^{-/-} mice administered high-fat diet (HFD) were treated by miR-31-5p agomir. The IDE protein levels were measured by Western blot analysis. The plasma lipid levels in ApoE^{-/-} mice were measured by ELISA kit. The hepatic lipid deposition and atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice were measured by oil red O.

Results IDE was a potential target of miR-31-5p according to the results of bioinformatics analysis and dual luciferase assay. IDE protein levels were remarkably down-regulated by miR-31-5p in THP-1, hepatic and aortic tissue($P < 0.05$). The lipid levels in THP-1 macrophage-derived foam cells and ApoE^{-/-} mice plasma were significantly up-regulated by miR-31-5p($P < 0.05$). Meanwhile, a significant increase of hepatic lipid deposition and atheromatous plaque formation in ApoE^{-/-} mice were induced by miR-31-5p($P < 0.05$). **Conclusion** miR-31-5p promotes progression of atherosclerosis via inhibiting insulin-degrading enzyme.

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为 17~25 个核苷酸的非编码 RNA,在进化中具有高度保守性,它主要通过与其 mRNA 3' UTR 端或特异序列结合发挥作用,可以促进靶基因 mRNA 降解或者抑

制其翻译进而调节基因的表达^[1-2]。大量研究表明,miRNA 广泛表达于多种组织和器官,并在多种疾病的发生发展过程中发挥重要的作用^[3]。近年来,miRNA 在动脉粥样硬化(As)等心血管疾病中的

作用也受到了广泛的关注,已有多种 miRNA 被确认在 As 的发病环节中可以起到重要调控作用^[4]。例如,研究表明 miR-19b^[5] 和 miR-93^[6] 可与三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1) 3' UTR 靶向结合并抑制其表达,通过阻断巨噬细胞内胆固醇外排及胆固醇逆向转运等过程发挥促进 As 作用。另有研究表明,miR-33 可通过抑制巨噬细胞中 ABCA1 和三磷酸腺苷结合盒转运体 G1 (ABCG1) 表达进一步下调高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平及胆固醇逆向转运能力,对 As 的发生具有促进作用^[7]。多种研究表明,miR-31-5p 在多种肿瘤组织中表达上调并发挥促癌作用,包括结肠直肠癌^[8]、肝细胞癌^[9] 和肺癌^[10] 等。另有研究表明 miR-31 可上调基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase, MMP-2) 表达进而促进肝星状细胞迁移,并通过靶向调节缺氧诱导因子抑制因子 (factor inhibiting HIF, FIH1) 改变肝星状细胞活性,具有促进肝脏纤维化形成的作用^[11]。而 miR-31-5p 对体内肝脏脂质代谢是否有影响,进而是否对 As 发生发展产生影响目前未见报道。

胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE) 是一种含有 Zn²⁺ 结合位点的金属蛋白水解酶^[12-15]。研究表明,IDE 的突变与多种疾病的发生发展都密切相关,如 2 型糖尿病、阿尔茨海默病及癌症等^[16-18]。IDE 在心血管疾病的研究中也得到越来越多的关注。Caravaggio 等^[19] 报道在低密度脂蛋白受体基因敲除 (LDLR^{-/-}) 小鼠模型中,将敲除 IDE 基因 (IDE^{-/-}) 的骨髓移植入小鼠体内,观察发现小鼠出现较大范围的动脉硬化病变,同时血清胆固醇含量及 β 淀粉样蛋白含量明显增加。这一研究结果提示 IDE 具有抑制 As 发生的作用。

由此可见,IDE 发挥抗 As 的作用,miRNA 是否可通过调节 IDE 表达而参与 As 的病理过程尚不清楚,因此,深入探讨 miRNA 对 IDE 基因表达的调控机制及其对 As 发病机制的影响具有重要意义。本实验拟通过生物信息学技术和双荧光素酶实验证实 miR-31-5p 可与 IDE 基因的 3' UTR 结合,以及 miR-31-5p 可能通过抑制 IDE 表达发挥促进 As 发生的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

THP-1 巨噬细胞购自 ATCC; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; ECL 购自凯基生物公司; IDE

单克隆抗体购自 Abcam 生物公司; RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自 Nest 公司; miR-31-5p mimic/inhibitor/agomir 购自锐博生物公司。

1.2 细胞培养和转染

THP-1 巨噬细胞接种细胞数 1×10^5 至含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 6 孔板培养基中培养 24 h, 分别设定处理组为 miR-31-5p mimic (5'-AG-GCAAGAUGCUGGCAUAGCU-3', R: 3'-UCCGUUC-UACGACCGUAUCGA-5')/inhibitor (5'-AGCUAUGC-CAGCAUCUUGCCU-3'), 对照组为 non-targeting control mimic sequence/non-targeting control inhibitor sequence, 用脂质体 5 μ L Lipofectamine 2000 将 50 nmol/L miR-31-5p mimic/inhibitor 或 non-targeting control mimic sequence/non-targeting control inhibitor sequence 转染 THP-1 巨噬细胞,并用每孔 2 mL 体系 Opti-MEM 液体孵育,48 h 后进行蛋白提取。

1.3 miR-31-5p agomir 处理 ApoE^{-/-} 小鼠

20 只雄性 ApoE^{-/-} 小鼠被随机分为对照组 ($n = 10$) 和处理组 (miR-31-5p agomir, $n = 10$), 各组小鼠均给予高脂饲料喂养。按照每只小鼠每日注射剂量 20 mg/kg, 将 scrambled miR-31-5p agomir 和 miR-31-5p agomir 溶解于 0.2 mL 生理盐水, 对照组小鼠给予尾静脉注射 scrambled miR-31-5p agomir, 处理组小鼠给予尾静脉注射 miR-31-5p agomir, 每 2 周注射一次, 同时给予高脂饮食 12 周^[20]。[miR-31-5p agomir 序列和 miR-31-5p mimics 序列相一致, 差别在于 agomir 需要经过特殊的化学修饰 (如甲基化、胆固醇修饰等)、脱盐处理、in vivo 纯化才能用于动物体内。]

1.4 Western blot 检测 IDE 蛋白表达

取小鼠主动脉组织、肝脏组织以及对数生长期的 THP-1 巨噬细胞,用蛋白裂解液进行裂解,收集组织或细胞,并用 BCA 法进行蛋白定量。取 50 μ g 蛋白样本在 SDS-PAGE 上电泳;5% 脱脂牛奶封闭 3 h; IDE 一抗孵育过夜, TBST 洗膜 5 min \times 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次。用 ECL 发光液检测试剂于 Syngene 凝胶成像仪白光下采集图像, Quantity one 软件分析条带的光密度值并进行半定量分析。

1.5 荧光素酶报告实验

利用生物信息学分析发现 miR-31-5p 可与 IDE 的 3' UTR 结合, 并联合 NCBI 获取 IDE mRNA 3' UTR 序列, 设计带有酶切位点的特异引物进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、靶标克隆载体 pMIR-

REPORT™连接,并以 pMIR-REPORT™ β -半乳糖苷酶空载作为参照,挑取阳性克隆测序,构建 IDE mRNA 3' UTR 野生型 (IDE 3' UTR Wild-type) 报告质粒。根据种子区序列设计突变序列,利用化学合成的方法获取 IDE mRNA 3' UTR 突变型片段载体 Mut1、Mut2、Mut3 及 Mut1 + Mut2 + Mut3。使用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂,每孔分别转染 100 ng IDE mRNA 3' UTR 荧光素酶报告载体和 100 nmol hsa-miR-31-5p 或 miR-NC 于 293T 细胞。实验分为如下 5 组:miR-NC + pMIR-IDE-Wt、hsa-miR-31-5p + pMIR-IDE-Wt; miR-NC + pMIR-IDE-Mut1、hsa-miR-31-5p + pMIR-IDE-Mut1; miR-NC + pMIR-IDE-Mut2、hsa-miR-31-5p + pMIR-IDE-Mut2; miR-NC + pMIR-IDE-Mut3、hsa-miR-31-5p + pMIR-IDE-Mut3; miR-NC + pMIR-IDE-Mut1 + Mut2 + Mut3、hsa-miR-31-5p + pMIR-IDE-Mut1 + Mut2 + Mut3; miR-NC 为 non-targeting control mimic sequence)。转染 16 h 后,弃去原培养基,换成含 5% FBS 的新鲜培养基再继续培养 48 h,然后检测荧光素酶的表达情况。

1.6 细胞内胆固醇含量测定及 ApoE^{-/-}小鼠血浆脂质含量测定

收集已处理的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞,并用 PBS 洗 10 min \times 3 次,加入细胞裂解液 200 μ L,BCA 法定量蛋白,7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,1500 r/min 离心 10 min,以豆甾醇为内标,取上清在高效液相色谱仪进行总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 和胆固醇酯 (CE) 含量检测。ApoE^{-/-}小鼠摘除眼球取血后,3000 r/min 离心 5 min,吸取上层血浆。ELISA 法试剂盒检测小鼠血浆中甘油三酯 (TG)、TC、低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC)、极低密度脂蛋白胆固醇 (VLDLC) 及高密度脂蛋白胆固醇 (HDLC) 水平。

1.7 油红 O 染色观察肝脏脂质蓄积和主动脉 As 病变

取小鼠肝脏组织标本在 -30°C 条件进行包埋并制备肝脏冰冻切片,60% 异丙醇条件下固定 10 min,在含 0.3% 油红 O 染色液的异丙醇中孵育 30 min,60% 异丙醇洗净后用苏木素复染并进行组织形态定量分析。将预先剥离的主动脉树纵向剪开,用油红 O 染色观察整个主动脉树的病变。取小鼠心脏放入 30% 明胶,蔗糖 PBS 溶液 4°C 、24 h。以 OCT compound 包埋剂包埋,心尖朝下、将心脏垂直固定于冰冻切片仪,自主动脉根部 (或心底) 向心尖方向进行低温冰冻连续 $10\mu\text{m}$ 切片,制备主动脉窦冰冻切

片,并对冰冻切片进行油红 O 染色,以 IMAGEPRO PLUS 软件计算 As 病变面积。

1.8 统计学处理方法

所有实验均独立重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,独立样本比较采用 *t* 检验,各组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐性采用 Bonferroni 法,方差不齐时分别采用 Welch 方法或 Dunnett's T3 法,以 SPSS 19.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-31-5p 靶向抑制 IDE 的表达

生物信息学预测结果发现 miR-31-5p 可能靶向调节 IDE 表达,我们通过将 miR-31-5p mimic 或 inhibitor 转染 THP-1 巨噬细胞和 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞,观察 miR-31-5p 对 IDE 的调控作用,结果发现,miR-31-5p mimic 转染 THP-1 巨噬细胞后 IDE 表达下调 66.06% ($P < 0.05$;图 1)。此外,miR-31-5p inhibitor 转染 THP-1 巨噬细胞后则引起 IDE 表达上调 133.66% ($P < 0.05$;图 2)。为验证 miR-31-5p 对 IDE 3' UTR 的靶向调节作用,我们通过分别构建 IDE 3' UTR 序列突变载体 Mut1、Mut2、Mut3 及 Mut1 + Mut2 + Mut3,将其分别与 IDE 3' UTR 互补配对的 hsa-miR-31-5p 共转染 293 T 细胞并检测 IDE 3' UTR 荧光素酶活性,结果发现转染 hsa-miR-31-5p 可使 IDE 3' UTR 野生型 (Wt) 载体的荧光素酶活性降低 57.00%,仅使 IDE 3' UTR 突变型 Mut1、Mut2 和 Mut3 分别降低 31.00%、37.00% 和 22.00% ($P < 0.05$),而 IDE 3' UTR 突变型 Mut1 + Mut2 + Mut3 则可逆转 hsa-miR-31-5p 的这一作用 ($P < 0.05$;图 3)。因此,根据以上荧光素酶实验结果分析,miR-31-5p 对 IDE 3' UTR 野生型载体的荧光具有明显下调作用。

2.2 miR-31-5p 促进 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞内胆固醇蓄积

为观察 miR-31-5p 对泡沫细胞内胆固醇蓄积是否有影响,本研究将 miR-31-5p mimic 和 inhibitor 转染到经处理好的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中,发现 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞转染 miR-31-5p mimic 后,细胞内 TC、FC 和 CE 含量分别增加 20.49%、17.79% 和 22.22% ($P < 0.05$)。相反,miR-31-5p inhibitor 组细胞内 TC、FC 和 CE 含量分别减少 38.53%、34.62% 和 41.5% ($P < 0.05$;表 1)。

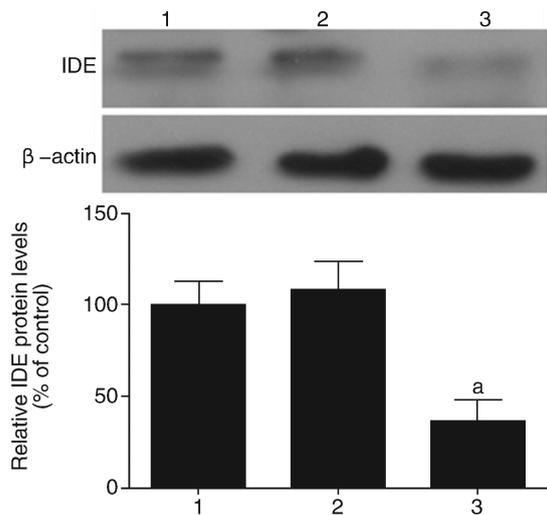


图 1. miR-31-5p mimic 对 THP-1 巨噬细胞中 IDE 表达的影响 ($n=9$) 1 为空白组 (未加任何处理), 2 为阴性对照组 (non-targeting control mimic sequence), 3 为 miR-31-5p mimic 组。a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

Figure 1. Effect of the mimic of miR-31-5p on the expression of IDE in THP-1 macrophages ($n=9$)

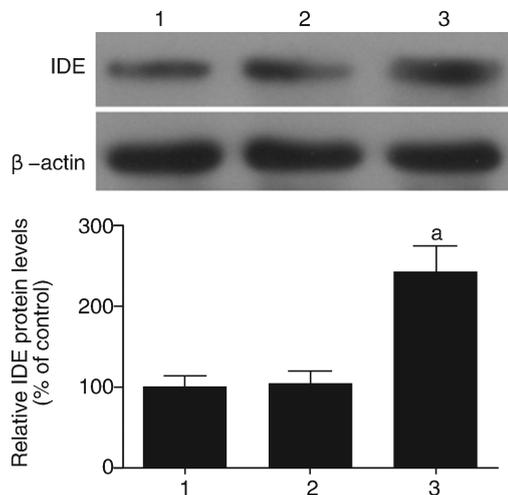


图 2. miR-31-5p inhibitor 对 THP-1 巨噬细胞中 IDE 表达的影响 ($n=9$) 1 为空白组 (未加任何处理), 2 为阴性对照组 (non-targeting control inhibitor sequence), 3 为 miR-31-5p inhibitor 组。a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

Figure 2. Effect of the inhibitor of miR-31-5p on the expression of IDE in THP-1 macrophages ($n=9$)

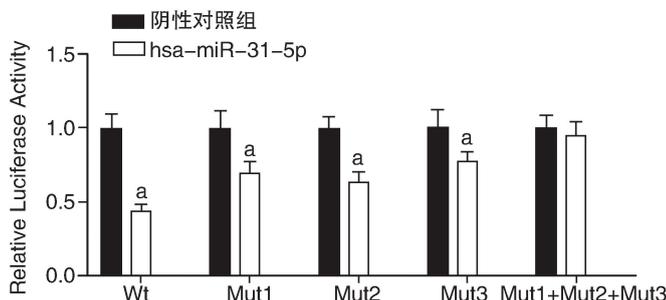
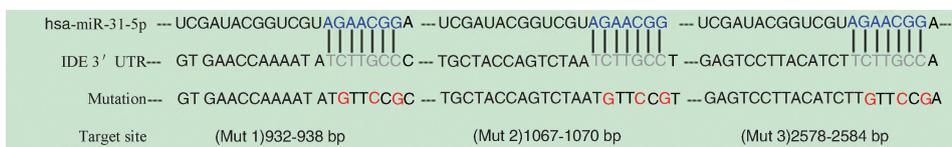


图 3. hsa-miR-31-5p 对 IDE 启动子活性的影响 ($n=9$) Wt 代表野生型, Mut 代表突变型。a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

Figure 3. Effect of hsa-miR-31-5p on regulating the activity of IDE promoter ($n=9$)

表 1. miR-31-5p mimic 和 inhibitor 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞内胆固醇蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1. Effects of miR-31-5p mimic and miR-31-5p inhibitor on the cholesterol deposition in THP-1 macrophage-derived foam cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	TC (mg/g)	FC (mg/g)	CE (mg/g)	CE/TC
对照组	532 ± 27	208 ± 13	324 ± 23	60.9%
miR-31-5p mimic 组	641 ± 33 ^a	245 ± 10 ^a	396 ± 31 ^a	61.8%
miR-31-5p inhibitor 组	327 ± 12 ^a	136 ± 11 ^a	191 ± 13 ^a	58.5%

a 为 $P < 0.05$, 与对照组 (未加任何处理) 相比。

2.3 miR-31-5p 下调 ApoE^{-/-} 小鼠中 IDE 表达并促进肝脏脂质蓄积

为观察 miR-31-5p 对动物肝脏组织中 IDE 表达及肝脏脂质蓄积的影响, 采用 miR-31-5p agomir 尾静脉注射 ApoE^{-/-} 小鼠。miR-31-5p agomir 处理组小鼠肝脏组织中 IDE 蛋白表达下调 40.81% ($P < 0.05$; 图 4)。miR-31-5p agomir 处理组小鼠肝脏中脂质沉积明显增加, 定量结果显示 TC 和 TG 含量分别增加 36.41% 和 29.11% ($P < 0.05$; 图 5 和表 2)。

2.4 miR-31-5p 增加 ApoE^{-/-} 小鼠血浆中脂质水平

为观察 miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠血浆中脂质水平的影响, 收集对照组和 miR-31-5p agomir 组小

鼠血浆。发现 miR-31-5p agomir 组血浆中 TG 和 LDLC 含量分别增加 21.66% 和 19.61% ($P < 0.05$), TC 和 VLDLC 含量分别增加 8.26% 和 2.30%, 而 HDLC 含量则减少 8.19% (表 3)。

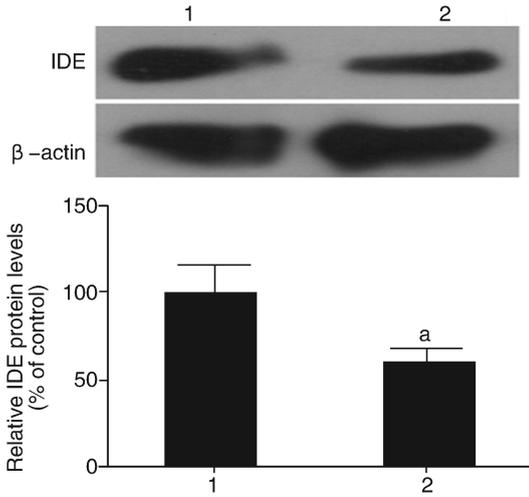


图 4. miR-31-5p 对小鼠肝脏组织中 IDE 表达的影响 ($n = 10$) 1 为对照组 (scrambled miR-31-5p agomir), 2 为 miR-31-5p agomir 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 4. Effect of miR-31-5p on the IDE protein expression in liver tissue in ApoE^{-/-} mice ($n = 10$)

2.5 miR-31-5p 抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉组织 IDE 表达并促进主动脉 As 病变发生

为进一步观察 miR-31-5p 对小鼠主动脉组织 IDE 表达及 As 病变的影响, 取对照组和 miR-31-5p

agomir 组小鼠主动脉组织, 发现 miR-31-5p agomir 组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉组织中 IDE 蛋白表达下调 46.74% ($P < 0.05$; 图 6), miR-31-5p agomir 组小鼠主动脉树 As 病变面积增加 42.45% ($P = 0.0002$; 图 7 和图 8)。

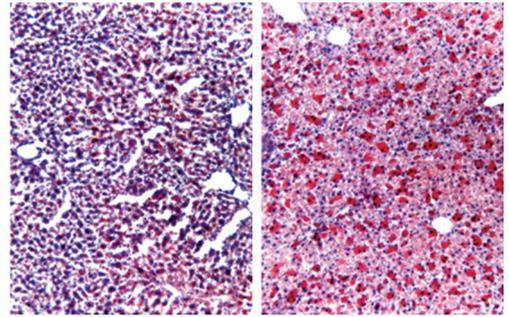


图 5. miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏脂质蓄积的影响 ($100 \times, n = 10$) 左为对照组 (scrambled miR-31-5p agomir), 右为 miR-31-5p agomir 组。

Figure 5. Effect of miR-31-5p on the hepatic lipid deposition in ApoE^{-/-} mice ($100 \times, n = 10$)

表 2. miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏脂质蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2. Effect of miR-31-5p on hepatic lipid deposition in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分 组	TC (mg/g)	TG (mg/g)
对照组	11.15 ± 2.17	20.78 ± 2.97
miR-31-5p agomir 组	15.21 ± 2.96 ^a	26.83 ± 3.62 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

表 3. miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠血浆脂质水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3. Effect of miR-31-5p on plasma lipid in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分 组	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	VLDLC (mmol/L)
对照组	1.57 ± 0.43	26.77 ± 3.69	7.69 ± 1.53	13.87 ± 2.38	5.21 ± 1.15
miR-31-5p agomir 组	1.91 ± 0.46 ^a	28.98 ± 3.91	7.06 ± 1.87	16.59 ± 2.53 ^a	5.33 ± 1.26

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

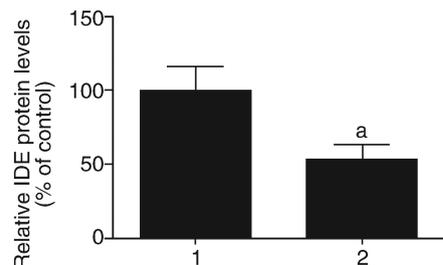
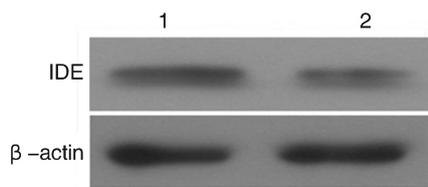


图 6. miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉组织 IDE 表达的影响 ($n = 10$) 1 为对照组, 2 为 miR-31-5p agomir 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 6. Effect of the miR-31-5p on the IDE protein levels in aortic tissue of ApoE^{-/-} mice ($n = 10$)

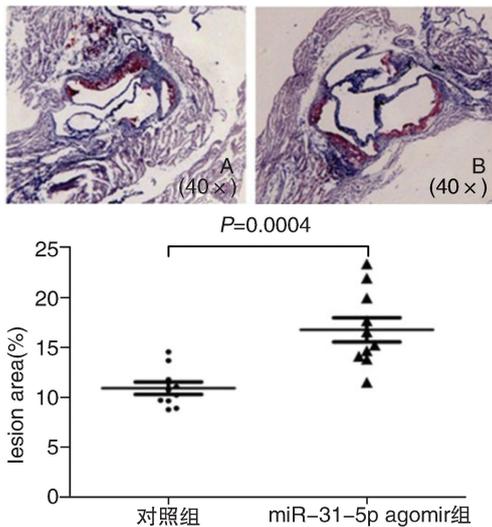


图 7. miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉窦 As 病变的影响 (n = 10) A 为对照组 (scrambled miR-31-5p agomir), B 为 miR-31-5p agomir 组。

Figure 7. Effect of miR-31-5p on the atherosclerotic lesion of aortic sinus in ApoE^{-/-} mice (n = 10)

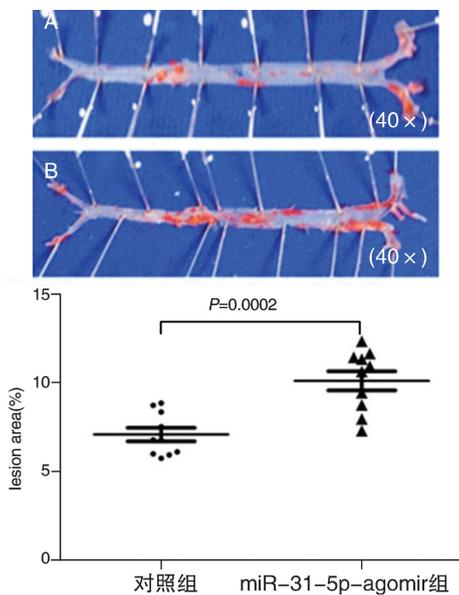


图 8. miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉树 As 病变的影响 (n = 10) A 为对照组, B 为 miR-31-5p agomir 组。

Figure 8. Effect of miR-31-5p on the atherosclerotic lesion of aortic valves in ApoE^{-/-} mice (n = 10)

3 讨论

As 可通过诱发心血管疾病而严重威胁人类的生命和健康,其发病机制包含多个步骤并受多种因素的影响。但是,As 的病理机制目前尚未完全阐明,目前已有的研究认为,脂质代谢紊乱而导致的血管壁脂质沉积是 As 的重要发病环节^[21-22]。作为

一类重要的非编码 RNA,miRNA 主要通过促进靶基因 mRNA 降解或者抑制其翻译发挥调节作用^[1]。越来越多的研究证据表明 miRNA 的异常表达与 As 在内的多种心脑血管疾病的病理生理过程密切相关。miRNA 可通过参与调节脂质代谢平衡在 As 中发挥重要作用^[23]。研究表明,miR-93 通过靶向抑制 ABCA1 表达而导致冠状动脉硬化患者血清中胆固醇含量增加^[6]。此外,miR-19b、miR33 等 miRNA 也可通过结合靶基因 ABCA1 3' UTR 进而抑制其表达,影响胆固醇逆向转运等关键环节,在 As 的发病过程发挥重要作用^[5,7]。本研究证实 miR-31-5p 是一种与 As 发病机制相关的 miRNA,可通过调节胆固醇脂质代谢过程参与 As 的发生发展。

大量研究表明,巨噬细胞及其吞噬脂质所形成的泡沫细胞是参与 As 发生发展的关键细胞^[20]。本研究中我们通过将 miR-31-5p mimic 和 inhibitor 转染 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞后发现,miR-31-5p 可促进细胞内 TC、FC、CE 等脂质蓄积。流行病学和遗传学表明,LDLC 和 VLDLC 是心血管疾病的致病风险因素,而 HDLC 具有对抗心血管疾病发生胆固醇蓄积。同时,肝脏作为机体脂质代谢和降解的重要器官,在维持脂质平衡中发挥不可替代的作用。因此,为进一步观察 miR-31-5p 对 ApoE^{-/-} 小鼠血浆脂质水平及肝脏组织脂质代谢的影响,本研究采用 miR-31-5p agomir 处理高脂饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠,发现小鼠血浆中 TG、TC、LDLC 和 VLDLC 明显增加,而 HDLC 明显减低。此外,miR-31-5p agomir 组小鼠肝脏组织中脂质沉积明显增加。大中动脉血管壁脂质沉积及病变形是形成 As 常见临床事件,本研究进一步发现 miR-31-5p 组小鼠主动脉窦和主动脉树 As 病变面积明显增多。以上结果均提示 miR-31-5p 可加重脂质代谢紊乱,具有促进 As 等心血管疾病发生的风险。

miRNA 主要通过与靶基因 mRNA 3' UTR 结合发挥促进靶基因降解或者抑制其翻译的作用。本研究通过生物信息学预测结果发现,miR-31-5p 可能与 IDE 的 3' UTR 存在互补结合进而抑制其表达。为进一步验证生物信息学预测结果,本研究采用双荧光素酶实验进行验证,结果显示,miR-31-5p 可使 IDE 3' UTR 野生型 (Wt) 载体的荧光素酶活性降低,说明 miR-31-5p 对 IDE 3' UTR 产生靶向调节作用,与生物信息学预测结果相一致。此外,又通过检测转染 miR-31-5p mimic 和 inhibitor 的 THP-1 巨噬细胞、miR-31-5p agomir 组小鼠肝脏和主动脉组织中的 IDE 蛋白水平表达,结果发现,miR-31-5p 可

明显抑制巨噬细胞和组织中 IDE 表达,进一步说明 miR-31-5p 可靶向抑制 IDE 表达。

IDE 作为一种含有巯基的金属蛋白水解酶^[13-15],已被证实与 2 型糖尿病、阿尔茨海默病及癌症等多种疾病的发生有关^[16-18]。而 IDE 在心血管疾病中的认识目前报道甚少,有研究表明,将 IDE 基因敲除(IDE^{-/-})的骨髓移植到 LDLR^{-/-} 小鼠体内,移植 6 周后进行高脂/高胆固醇饮食,发现雄性小鼠的主动脉根部 As 病变明显增加,血清胆固醇含量也出现明显增加^[19],同时 IDE^{-/-} LDLR^{-/-} 小鼠模型中出现 β -淀粉样蛋白含量增加,进一步增加了 As 斑块形成的风险^[19],这一研究表明 IDE 具有抑制 As 发生的作用。在本研究中,我们已通过生物信息学及双荧光素酶实验证实 miR-31-5p 可靶向抑制 IDE 表达。同时,miR-31-5p 可通过调节脂质代谢明显促进 As 病变的形成,还可抑制小鼠肝脏和主动脉组织中 IDE 表达,这些结果提示 miR-31-5p 可能通过抑制 IDE 表达进而促进 As 的发生发展。

综上所述,本研究证明了 miR-31-5p 可通过靶向抑制 IDE 表达从而促进 As 形成的作用。因此,抑制 miR-31-5p 表达可能具有防治 As 的潜在应用价值,同时这一结论为临床上找到早期诊断和治疗 As 的有效手段提供坚实的理论基础。

[参考文献]

- [1] 朱霓,秦永文,荆清. microRNAs: 心血管疾病重要的调控因子[J]. 生命科学, 2008, 20(2): 218-221.
- [2] 施冰,郭艳红,高伟. microRNA: 心血管疾病的重要调控因子[J]. 中国临床保健杂志, 2009, 12(3): 328-331.
- [3] Hammond SM. An overview of microRNAs [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015.
- [4] Andreou I, Sun X, Stone PH, et al. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(5): 307-318.
- [5] Lv YC, Tang YY, Peng J, et al. MicroRNA-19b promotes macrophage cholesterol accumulation and aortic atherosclerosis by targeting ATP-binding cassette transporter A1 [J]. Atherosclerosis, 2014, 236(1): 215-26.
- [6] He Y, Lin L, Cao J, et al. Up-regulated miR-93 contributes to coronary atherosclerosis pathogenesis through targeting ABCA1 [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(1): 674-681.
- [7] Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis [J]. Science, 2010, 328(5985): 1570-573.
- [8] Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, et al. Over- and under-ex-

pressed microRNAs in human colorectal cancer [J]. Int J Oncol, 2009, 34(34): 1069-075(7).

- [9] Wong QW, Lung RW, Law PT, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1 [J]. Gastroenterology, 2008, 135(1): 257-269.
- [10] Liu X, Sempere LF, Ouyang H, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors [J]. J Clin Invest, 2010, 120(4): 1298-309.
- [11] Hu J, Chen C, Liu Q, et al. The role of the miR-31/FIH1 pathway in TGF- β -induced liver fibrosis [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129(4): 305-317.
- [12] 马亚东,宋红雄,贺晓龙,等. 胰岛素降解酶基因单核苷酸多态性与前列腺癌的关系研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2014, 19(9): 615-617.
- [13] Haque R, Nazir A. Insulin-degrading enzyme: a link between Alzheimer's and type II diabetes mellitus [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(2): 259-264(6).
- [14] Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Insulin-degrading enzyme [J]. Clin Invest Med, 1996, 19(3): 149-160.
- [15] 王世涛. 胰岛素降解酶和胰岛素降解酶基因与阿尔茨海默病的相关性[J]. 医学综述, 2013, 19(22): 4057-059.
- [16] Fakhrai-Rad H, Nikoshkov A, Kamel A, et al. Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats [J]. Human Mol Genet, 2000, 9(14): 2149-158(10).
- [17] Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, et al. Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein [J]. J Bio Chem, 2013, 288(4): 2281-289.
- [18] Li G, Kim C, Kim J, et al. Common Pesticide, dichlorodiphenyl-trichloroethane (ddt), increases amyloid- β levels by impairing the function of abca1 and ide: implication for alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Disease, 2015, [Epub ahead of print].
- [19] Caravaggio JW, Hasu M, Maclaren R, et al. Insulin-degrading enzyme deficiency in bone marrow cells increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice [J]. Cardiovasc Pathol, 2013, 22(6): 458-464.
- [20] Hu YW, Hu YR, Zhao JY, et al. An agomir of miR-144-3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production [J]. Plos One, 2014, 9(4): e94997.
- [21] 陈孔,曾高峰,唐朝克. 巨噬细胞增殖和凋亡与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(9): 965-969.
- [22] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-241.
- [23] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting [J]. Cell Metab, 2006, 3(2): 87-98.

(此文编辑 许雪梅)