

miR-626 下调 HepG2 细胞载脂蛋白(a)的表达

孟军¹, 杨简², 何谨¹, 杜阳晒², 王佐²

(1. 南华大学附属第一医院功能科, 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 载脂蛋白(a); HepG2 细胞; miR-626

[摘要] **目的** 筛选高效调控 LPA 基因表达的 miRNA。**方法** 用在线预测工具预测作用于 LPA 基因 3'UTR 的 miRNA, RT-PCR 和 Western blot 检测转染预测所得 miRNA mimic 后 HepG2 细胞载脂蛋白(a) [Apo(a)] mRNA 和蛋白表达水平。实验分为对照组、miR-626 mimic 组、miR-626 mimic+miR-626 inhibitor 组和 miR-626 inhibitor 组共 4 组。使用荧光素酶报告系统进行 miR-626 靶标验证实验。**结果** 可作用于 LPA 基因 3'UTR 的 miRNA 有 9 个。mimic 转染组与对照组相比, Apo(a) 的 mRNA 表达水平差异不显著, 但 miR-626 能显著下调 Apo(a) 蛋白的表达。使用 miR-626 inhibitor 后, miR-626 对 Apo(a) 蛋白的下调作用减弱。转染 miR-626 后细胞裂解液的荧光强度显著下降。**结论** miR-626 能显著下调 Apo(a) 蛋白表达水平, 其通过与 LPA mRNA 3'UTR 序列结合, 抑制 LPA mRNA 翻译实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hsa-miR-626 down-regulates expression of apolipoprotein(a) in HepG2 cells

MENG Jun¹, YANG Jian², HE Jin¹, DU Yang-Shai², WANG Zuo²

(1. The First Affiliated Hospital, University of South China; 2. Research Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein(a); HepG2 cell; MiR-626

[ABSTRACT] **Aim** To screen miRNA for efficient regulation of LPA gene expression. **Methods** The miRNA of LPA gene 3'UTR were predicted by on-line prediction tools. The mRNA and protein expression of apolipoprotein(a) (Apo(a)) were detected by RT-PCR and Western blot after transfection. The experiment was divided into 4 groups: control group, miR-626 mimic group, miR-626 mimic+miR-626 inhibitor group and miR-626 inhibitor group. The miR-626 target validation assay was performed using a luciferase reporter system. **Results** There were 9 miRNA binding 3'UTR of LPA gene. Compared with the control group, the expression of Apo(a) mRNA was not significantly different between the mimic transfected group and the control group, but miR-626 significantly down-regulated the expression of Apo(a) protein. MiR-626 attenuated Apo(a) protein down-regulation by miR-626 inhibitor. The fluorescence intensity of the miR-626 cells was significantly lower than that of the control group after cell lysis. **Conclusion** MiR-626 down-regulates the expression of Apo(a) in HepG2 cells. MiR-626 down-regulates the expression of Apo(a) protein in LPA mRNA by direct binding to LPA mRNA 3'UTR.

高脂蛋白(a) [lipoprotein(a), Lp(a)] 是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的独立危险因素^[1]。研究表明, Lp(a) 可破坏动脉壁的抗氧化机制以及凝血与抗凝之间的平衡, 并且抑制由一氧化氮介导的血管舒张、促进单核细胞向内皮下迁移和黏附, 促使炎症细胞向 As 斑块部位迁移, 促进 As 的发生和发展^[2]。Lp(a) 通过抑制转录生长因子 β 的活性可

刺激血管平滑肌细胞的生长, 从而使血管变窄和 As 的发生发展^[3]。Lp(a) 也能影响人静脉内皮细胞和动脉内皮细胞的细胞骨架重排, 引起细胞渗透性增加、细胞收缩和功能紊乱^[4], 产生心血管系统的毒害作用, 因此需要寻找安全有效的降 Lp(a) 的药物。然而, 血浆 Lp(a) 的水平主要是由遗传因素决定, 并且 Lp(a) 对大多数现有的降脂药物或食物不敏感。

[收稿日期] 2017-05-08

[修回日期] 2017-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81070221)

[作者简介] 孟军, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管相关疾病研究, E-mail 为 381104519@qq.com。通讯作者王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 smt121101@163.com。

烟酸被发现能够降低 Lp(a) 水平,但是仅能降低 20%~30% 的范围,这远远不能满足临床上控制高 Lp(a) 水平的需求,并且烟酸只能抑制 Lp(a) 的配装,并不能抑制 Lp(a) 的核心蛋白成份载脂蛋白(a) [apolipoprotein(a), Apo(a)] 的生成,而 Apo(a) 本身对心血管有毒害作用^[4]。其他的药物,诸如阿司匹林、左旋肉碱、PCSK9 和胆固醇转移蛋白抑制剂有降 Lp(a) 作用。但是,这些降 Lp(a) 的药物对治疗心血管疾病和降低死亡率还没有显现出效果。近年来,一些研究表明 miRNA 在脂质代谢中扮演着重要角色^[5-6]。miR-122 是肝细胞中表达最高的 miRNA,并与脂质的代谢有关^[5],miR-33a 和 miR-33b 对维持体内胆固醇的平衡有重要作用^[7]。肝细胞中可能存在参与 Lp(a) 调控的 miRNA。本研究拟通过生物信息学方法分析可能作用于 Apo(a) mRNA 的 miRNA,然后在 HepG2 细胞中验证它对 Apo(a) 表达的影响,并确定 hsa-miR-626 在 Apo(a) 基因 LPA 转录 mRNA 上的作用靶点。从基因表达调控入手,从源头阻止 Apo(a) 生成,真正意义上实现对 Lp(a) 水平的有效控制。

1 材料和方法

1.1 生物信息学预测

从蛋白质引用数据库 (HPRD, <http://www.hprd.org>) 获取基因 LPA 的 mRNA 3'端非编码区(3' UTR)。然后用 RNAdraw 软件(版本为 v1.1 b2)分析 LPA 基因的 mRNA 3'UTR 的二级结构。最后用 Targetscan、miRanda、MiRBD 和 PITA 分别预测 LPA 基因的 mRNA 3'UTR 与 miRNA 的结合位点。

1.2 主要试剂

HUVEC-12 细胞由中南大学湘雅细胞中心提供;SMMC-7721 细胞来自于上海中科院细胞所;HepG2 细胞为上海复旦大学生命科学学院馈赠;胎牛血清是杭州四季青生物公司产品;DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司;羊抗人 Apo(a) 一抗购自 Abnova 公司;HRP 标记链霉亲和素和小鼠抗人 β -actin 一抗均为北京康为世纪生物科技有限公司的产品;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 和 ECLPlus 化学发光试剂均购自碧云天生物技术研究;Hi PeFect 转染试剂购于 QIAGEN 公司;miRNA mimic 合成于广州锐博生物科技有限公司;PCR Super Mix、Fse I 和 Xba I 限制性内切酶购于 Invitrogen 公司;快速连接试剂盒、JM109 感受态细胞、双荧光酶报告基因检测试剂盒及 pGL4 质粒均

购自 Promega 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞培养和蛋白质提取

SMMC-7721 和 HepG2 细胞均使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养,而 HUVEC-12 细胞则使用含 10% 小牛血清的 DMEM 低糖培养基进行培养。37℃、5%CO₂ 下细胞培养箱培养。

蛋白提取全程均在冰上进行操作。弃细胞培养基,然后用冰冷 PBS 洗 3 遍,采用室温下自然晾干。在裂解液充分均匀覆盖细胞的前提下,按 10 cm²加 100 μ L 裂解液(终浓度为 1 μ mol/L)的比例加裂解液,裂解 30 s 后,刮取细胞裂解混合物至 1.5 mL 离心管,冰上继续裂解 20 min,期间约每隔 5 min 用手指轻弹离心管使其混合均匀。在 12000 r/min 下离心 10 min,用微量取样器吸取上清液转移至 1.5 mL 新离心管中,蛋白电泳上样:蛋白与上样缓冲液的比例 4:1,漩涡 10 s 后离心 1 min,沸水浴 5 min 后,冷却。

1.4 PCR 分析

按 Fermenta 逆转录试剂盒操作说明书,获得目的基因 cDNA。反应体系总体积 20 μ L,操作分为以下步骤。①在冰上操作,把 0.1 ng~5 μ g 总 RNA 模板、1 μ L Oligo(dT)18 引物、10 μ L 无核酸酶水加到 100 μ L PCR 管中,漩涡震荡 10 s,离心 30 s。②65℃、5 min 后将 PCR 管插入冰块中。③依次加入 5 \times 反应缓冲液 4 μ L、Ribo LockTM RNase 抑制剂 1 μ L(20000 kU/L)、10 mmol/L dNTP Mix 2 μ L、Rever AidTMM- μ LV 逆转录酶 1 μ L(20000 kU/L)。漩涡 10 s,离心 30 s。④42℃、60 min。⑤70℃、5 min 并终止反应。GAPDH 引物序列为 sense 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3', antisense 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3',产物长度大小为 496 bp。LPA 引物序列为 sense 5'-GACGGGAGACAGAGTGAAGC-3', antisense 5'-TCAAAATCAAAATAAGTGCAGAGTT-3',产物长度大小为 243 bp;50 μ L PCR 反应体系为引物 2 μ L、 λ DNA 2 μ L、2 \times PCR Mix 25 μ L、超纯水体积 15 μ L。采用的反应条件为 94℃预变性 5 min,然后 94℃30 s、56℃30 s、72℃40 s,共 35 个循环后 72℃延伸 5 min。通过 2%琼脂糖凝胶电泳来检测 PCR 产物片段的大小。

1.5 Western blot 分析

总蛋白上样量为 20 μ g。80 V 恒压电泳 30 min,然后再转换为 150 V 恒压电泳 40 min。电泳完成后将胶放在转膜液中浸泡,时间为 15 min。同时将 PVDF 膜进行预处理:甲醇中 15 s、去离子水中 2 min、转膜液中 5 min。在 200 mA 恒流条件下转移 2 h(冰水浴)。转膜完成后,所用 PVDF 膜用去

离子水清洗 30 s、甲醇 15 s、滤纸上晾 15~20 min。膜充分晾干后,移至甲醇 15 s、去离子水清洗 30 s、丽春红染色 1 min,然后以去离子水清洗,检查转膜效果。PBST 洗膜 5 min 重复 2 次,以便洗去丽春红。在含 1%BSA 的封闭液中室温下封闭 2 h,室温下用 1:1000 比例 PBST 稀释的一抗孵育 2 h,然后 PBST 洗膜 10 min 重复洗 3 次。1:1000 比例 PBST 稀释二抗室温孵育 1 h,然后用 PBST 清洗膜 10 min 重复 3 次。用去离子水洗去膜上 PBST,加入足量 ECL Plus 孵育 1 min 后,放上胶片,适当曝光后,显影、定影。

1.6 靶基因验证实验

实验分为三组,即 LPA mRNA 3'UTR、LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic 和 LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic+miR-626 inhibitor。LPA 引物 sense:5'-TGGACGGGAGACAGAGTGAAGCAT-3', antisense:5'-GGCATAGCTGCTAGCTGGGAACA-3',其产物片段长度为 123 bp。逆转录反应后,以逆转录所得 cDNA 为模板对 PCR 目的片段进行扩增,PCR 条件为 94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 RCR 产物片段。

目的 DNA 片段纯化和回收均按试剂盒说明书进行。采用 2000 kU/L Fse I 和 20000 kU/L Xba I 双酶切,PCR 扩增片段与 pGL3 载体的连接采用 Promega 快速连接系统。吸取 2 μL 连接反应产物和 50 μL JM109 转化感受态细胞。转染 48 h 后,倒掉培养基,用 PBS 洗 3 遍。将转染后的细胞用 100 μL 细胞裂解液裂解充分后,加入萤光素酶检测试剂 II 以便产生萤火虫萤光信号,从而监测萤火虫萤光素酶报告基因表达情况,并对萤火虫萤光强度进行定量分析,加终止试剂猝灭上述荧光,同时启动海肾萤光素酶的反应,进行第 2 次测量。

1.7 统计学分析

用 $\bar{x} \pm s$ 表示实验数据,采用标准差分析和配对 *t* 检验的统计学方法,实验数据分析和作图采用 Graphpad Prism5.0.1 软件,选取 95% 可信区间, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 结合 LPA mRNA 3'UTR 的 miRNA 预测

综合 Targetscan、miRanda、MiRBD 和 PITA 4 个生物信息学网站的分值分析结果,选出高分值的

miR-626、miR-519a、miR-519-b-3p、miR-425、miR-519c-3p、miR-590-5p、miR-338-3p、miR-655、miR-590-3p 作为潜在结合 LPA mRNA 3'UTR 的 miRNA。

2.2 筛选高表达 Apo(a) 的细胞株

在 HepG2、SMMC-7721、HUVEC 三种细胞株中,HepG2 细胞表达 Apo(a) 的水平最高(图 1)。因此,我们用 HepG2 细胞做进一步的实验。

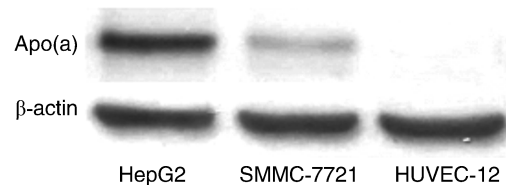


图 1. HepG2、SMMC-7721 和 HUVEC-12 三种细胞株中 Apo(a) 表达水平的比较

Figure 1. Comparison of Apo(a) expression level in HepG2, SMMC-7721 and HUVEC-12 cells

2.3 miRNA 抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 表达

与对照组相比,所有 miRNA mimic 处理 24 h,其 Apo(a) mRNA(即 LPA)表达水平差异不显著(图 2A)。蛋白分析结果表明,miR-655 mimic 和 miR-590-5p mimic 均能下调 Apo(a) 表达,其中以 miR-626 mimic 的下调作用最明显(图 2B)。

2.4 不同时间点 Apo(a) 蛋白表达水平

用蛋白质印记分别检测转染 miR-626 mimic 0 h、24 h、36 h、48 h 后 Apo(a) 蛋白水平的差异,结果发现,转染 miR-626 mimic 36 h 组 Apo(a) 蛋白水平显著低于 24 h 处理组,而 48 h 处理组和 36 h 处理组之间 Apo(a) 蛋白水平差异无显著性(图 3)。

2.5 miR-626 inhibitor 逆转 miR-626 对 HepG2 细胞 Apo(a) 表达的抑制作用

miR-626 mimic+miR-626 inhibitor 组的 Apo(a) 表达水平,显著高于 miR-626 mimic 组和对照组(图 4)。这表明 miR-626 抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 的表达具有特异性。

2.6 靶基因验证实验

实验发现,LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic 组的荧光强度显著低于 LPA mRNA 3'UTR 组,LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic+miR-626 inhibitor 组荧光强度则显著高于 LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic 组(图 5)。结果表明,miR-626 与 LPA mRNA 3'UTR 能靶向性结合。

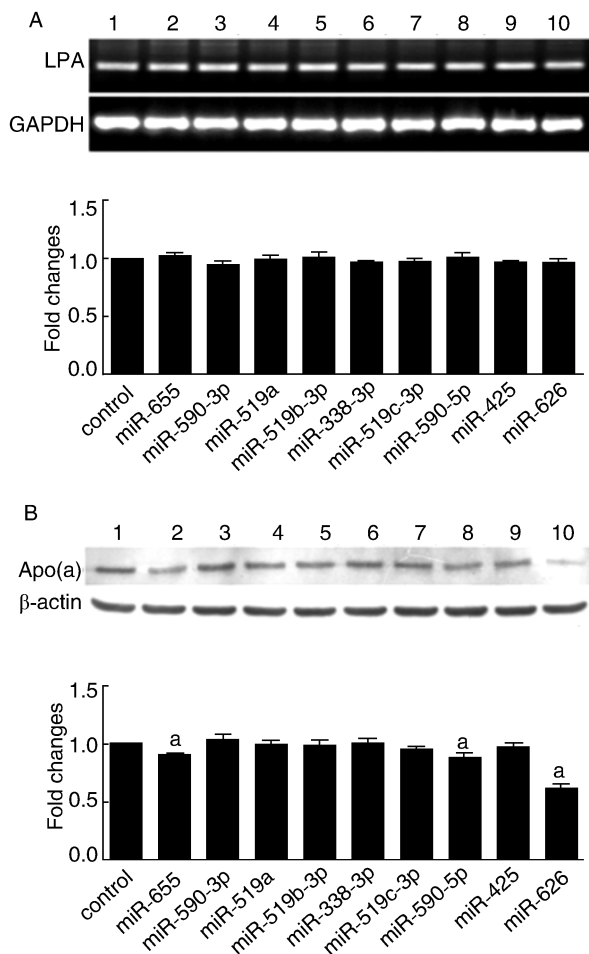


图 2. HepG2 细胞在转染 miRNA mimic 24 h 后 Apo (a) mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达情况 ($n=3$) 1 为对照组, 2~10 依次为 miR-655、miR-590-3p、miR-519a、miR-519b-3p、miR-338-3p、miR-519c-3p、miR-590-5p、miR-425、miR-626 mimic 组。a 为 $P<0.05$, 与对照组比较。

Figure 2. Apo(a) level in HepG2 of miRNA mimic groups and control group after post-transfection ($n=3$)

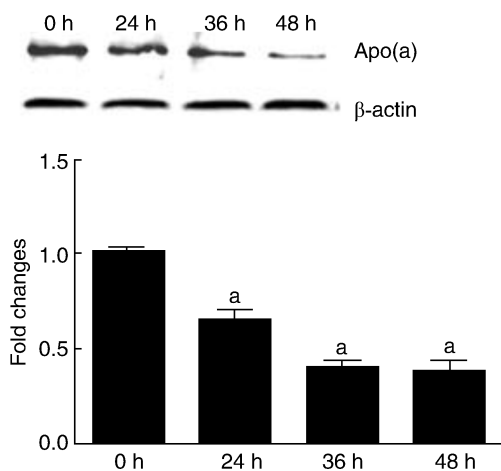


图 3. miR-626 抑制 Apo(a) 蛋白表达的时间效应 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 0 h 比较。

Figure 3. Time related effect of miR-626 on Apo(a) protein expression ($n=3$)

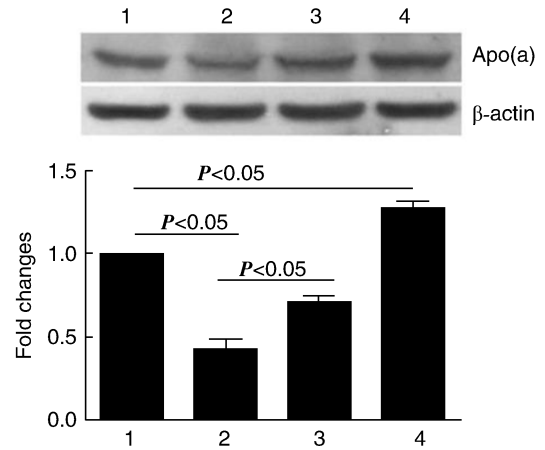


图 4. miR-626 inhibitor 对 HepG2 Apo(a) 表达的影响 ($n=3$) 1 为对照组, 2 为 miR-626 mimic 组, 3 为 miR-626 mimic + miR-626 inhibitor 组, 4 为 miR-626 inhibitor 组。

Figure 4. Effect of miR-626 inhibitor on Apo(a) expression ($n=3$)

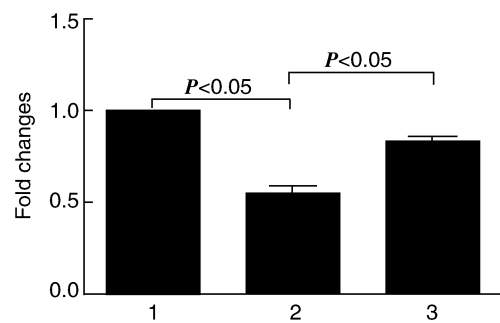


图 5. 荧光素酶基因报告系统 miRNA-626 靶基因验证 ($n=3$) 1 为 LPA mRNA 3'UTR 组, 2 为 LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic 组, 3 为 LPA mRNA 3'UTR+miR-626 mimic+miR-626 inhibitor 组。

Figure 5. The target of miRNA-626 was confirmed by luciferase assay ($n=3$)

3 讨论

降 Lp(a) 研究已经成为目前该领域新的热点。但 Lp(a) 的血浆水平主要受遗传因素的影响, 受食物和药物的影响很小。在遗传因素中, 影响其血浆水平主要是 LPA 等位基因差异性及其单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 两个因素^[8-10]。但自从发现胆道堵塞患者较正常人血浆 Lp(a) 水平低很多以来, 证实胆酸可通过激活法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR), 而抑制 Lp(a) 的生物合成, 从而显著降低胆道堵塞患者的血浆水平, 使得从 LPA 基因表达调控入手降 Lp(a) 成为一条崭新的途径。应用反义寡核苷酸作用于 ApoB100 mRNA 也能显著降低血浆 Lp(a) 的水平^[11-12], 烟酸

的部分降 Lp(a)作用是通过促使 FXR 结合到 LPA 基因启动子上游的-826 bp 到-814 bp 区域,从而抑制 LPA 基因转录,-826 bp 到-814 bp 区域同时也能竞争性地结合肝核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha, HNF4 α),但 HNF4 α 促进 LPA 基因转录^[13]。硫化氢即是通过上调 FXR、下调 HNF4 α 而抑制肝细胞 Apo(a)的表达水平^[14],而维生素 C 则是通过影响 FXR 基因启动子的甲基化水平发挥抑制肝细胞 Apo(a)表达水平^[15]。

本研究发现,miR-655、miR-590-5p 和 miR-626 均能对 HepG2 细胞 Apo(a)表达起负性调控作用。其中,以 miR-626 的作用最显著,并具有时间依赖性。miR-626 作用 24 h 开始表现出明显抑制效应,而处理 36 h 和 48 h 后,Apo(a)的蛋白水平进一步降低,且显著低于 24 h 处理组,但 48 h 与 36 h 之间差异无显著性,提示在 LPA 基因恒定的情况下,肝细胞 Apo(a)的表达水平可能存在一个调控阈值,当达到这个阈值后,细胞内 Apo(a)的表达量维持在一个相对较稳定的水平,而当肝细胞内 Apo(a)水平低于阈值后,细胞内启动负性反馈,增加 LPA 基因的转录,或减少 Apo(a)的分泌,从而使胞内 Apo(a)处于一个相对稳定的水平。同时转染 miR-626 和 miR-626 抑制剂,Apo(a)表达水平显著高于单独转染 miR-626,说明当 miR-626 的作用受到抑制后 Apo(a)的表达水平可部分恢复,反证了 miR-626 对 Apo(a)表达的抑制作用。而单独转染 miR-626 抑制剂与对照组相比,Apo(a)表达水平则明显上升,提示在 HepG2 细胞中 miR-626 有一定水平的基础表达。

[参考文献]

- [1] Nasr N, Ruidavets JB, Farghali A, et al. Lipoprotein (a) and carotid atherosclerosis in young patients with stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42: 3 616-618.
- [2] Sotiriou SN, Orlova VV, Al-Fakhri N, et al. Lipoprotein (a) in atherosclerotic plaques recruits inflammatory cells through interaction with Mac-1 integrin [J]. *FASEB J*, 2006, 20: 559-561.
- [3] Ichikawa T, Unoki H, Sun H, et al. Lipoprotein(a) promotes smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation in atherosclerotic lesions of human apo(a) transgenic rabbits [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160: 227-236.
- [4] Pellegrino M, Furmaniak-Kazmierczak E, LeBlanc JC, et al. The apolipoprotein (a) component of lipoprotein (a) stimulates actin stress fiber formation and loss of cell-cell contact in cultured endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 6 526-533.
- [5] 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: 87-98.
- [6] Chen S, Wen X, Zhang W, et al. Hypolipidemic effect of oleanolic acid is mediated by the miR-98-5p/PGC-1 β axis in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice [J]. *FASEB J*, 2017, 31(3): 1 085-096.
- [7] Fernandez-Hernando C, Moore KJ. MicroRNA modulation of cholesterol homeostasis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 2 378-382.
- [8] Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361: 2 518-528.
- [9] Lanktree MB, Anand SS, Yusuf S, et al. Comprehensive analysis of genomic variation in the LPA locus and its relationship to plasma lipoprotein(a) in South Asians, Chinese, and European Caucasians [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 39-46.
- [10] Catalano M, Cortelazzo A, Yilmaz Y, et al. The LPA gene C93T polymorphism influences plasma lipoprotein (a) levels and is independently associated with susceptibility to peripheral arterial disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 387: 109-112.
- [11] Merki E, Graham MJ, Mullick AE, et al. Antisense oligonucleotide directed to human apolipoprotein B-100 reduces lipoprotein(a) levels and oxidized phospholipids on human apolipoprotein B-100 particles in lipoprotein(a) transgenic mice [J]. *Circulation*, 2008, 118: 743-753.
- [12] Merki E, Graham M, Taleb A, et al. Antisense oligonucleotide lowers plasma levels of apolipoprotein (a) and lipoprotein (a) in transgenic mice [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57: 1 611-621.
- [13] Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121: 3 724-734.
- [14] Qu K, Liu YM, He XL, et al. H₂S inhibits apo(a) expression and secretion through PKC α /FXR and Akt/HNF4 α pathways in HepG2 cells [J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(8): 906-916.
- [15] Qu K, Ma XF, Li GH, et al. Vitamin C down-regulate apo(a) expression via Tet2-dependent DNA demethylation in HepG2 cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98: 637-645.

(此文编辑 许雪梅)