

## 母体表达基因 3 通过 miR-125a-5p/TET2 途径抑制 HepG2 细胞载脂蛋白(a)的表达

何 谨<sup>1</sup>, 王 艳<sup>1,2</sup>, 孟 军<sup>1</sup>, 曾召林<sup>2</sup>, 陈姣姣<sup>2</sup>, 刘亚密<sup>1,2</sup>, 陶 军<sup>2</sup>, 桂培根<sup>1</sup>, 王 佐<sup>2</sup>

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

[关键词] HepG2 细胞; 母体表达基因 3; miR-125a-5p; 载脂蛋白(a); 十一转位酶

[摘要] 目的 研究发现母体表达基因 3(MEG3)对 HepG2 细胞载脂蛋白(a)[Apo(a)]表达的调控作用及其机制。方法 用荧光素酶报告系统分析 MEG3 与 miR-125a-5p 的靶向性结合。采用实时定量 PCR(qRT-PCR)检测高表达 Apo(a)的 HepG2 细胞和低表达 Apo(a)的 SMMC7721 细胞中 MEG3 的表达情况;向 HepG2 细胞转染 MEG3, Western blot 和 qRT-PCR 检测 Apo(a)、TET2 表达情况;采用小干扰 RNA 技术沉默 TET2 的表达。结果 ① MEG3 与 hsa-miR-125a-5p 能互补性结合, 荧光素酶报告基因系统分析结果证实了 MEG3 与 hsa-miR-125a-5p 结合的存在。② miR 芯片结果表明, 在 HepG2 细胞中, hsa-miR-125a-5p 表达水平升高, 是对照组的近 1.5 倍, MEG3 在 HepG2 细胞和 SMMC7721 细胞中均有表达, 但前者 MEG3 的表达水平显著低于后者。③ MEG3 抑制 Apo(a)表达。④ MEG3 下调 miR-125a-5p 的表达, 上调 TET2 的表达; miR-125a-5p 的 mimics 可逆转 MEG3 对 Apo(a)的下调作用及 TET2 的表达, 但可被 miR-125a-5p 的抑制剂逆转; TET2 沉默可逆转 MEG3 对 Apo(a)的下调作用。结论 MEG3 通过 miR-125a-5p/TET2 途径下调 HepG2 细胞 Apo(a)的表达。

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

### MEG3 inhibits apolipoprotein(a) expression in HepG2 cells through the miR-125a-5p/TET2 pathway

HE Jin<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1,2</sup>, MENG Jun<sup>1</sup>, ZENG Zhaolin<sup>2</sup>, CHEN Jiaojiao<sup>2</sup>, LIU Yami<sup>1,2</sup>, TAO Jun<sup>2</sup>, GUI Peigen<sup>1</sup>, WANG Zuo<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital, 2. Institute of Cardiovascular Diseases, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] HepG2; maternally expressed gene 3; miR-125a-5p; apolipoprotein(a); ten-eleven-translocation enzyme 2

[ABSTRACT] **Aim** To study the regulatory effect of apolipoprotein(a) (Apo(a)) expression in HepG2 cells by maternal gene 3 (MEG3) and its mechanism. **Methods** The targeted binding of MEG3 to miR-125a-5p was analyzed using the luciferase reporter enzyme system. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of MEG3 in HepG2 cells with high expression of Apo(a) and SMMC7721 cells with low expression of Apo(a); MEG3 was transfected into HepG2 cells, and expression of Apo(a) and TET2 were detected by Western blot and qRT-PCR. TET2 expression was silenced using small interfering RNA technology. **Results** MEG3 and hsa-miR-125a-5p could complement each other. Systematic analysis of luciferase reporter gene confirmed the presence of MEG3 binding to hsa-miR-125a-5p. miRNA microarray results showed that the expression level of hsa-miR-125a-5p increased in HepG2 cells, which was nearly 1.5 times higher than that in the control group. Both HepG2 cells and SMMC7721 cells expression MEG3, but the expression level of MEG3 in HepG2 cells is significantly lower than SMMC7721. MEG3 transfection inhibited Apo(a) expression. Mechanism study found that, MEG3 downregulated the expression of miR-125a-5p and upregulated TET2 expression; miR-125a-5p mimics reversed the effect of MEG3, but can be reversed by inhibitors of miR-125a-

[收稿日期] 2018-07-26

[修回日期] 2018-09-01

[基金项目] 湖南省卫生计生委科研计划课题(B2016139, B2016133), 湖南省教育厅课题(16C1392)

[作者简介] 何谨, 硕士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 13875730693@163.com。通信作者王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化, E-mail 为 346102151@qq.com。

5p; TET2 silencing can reverse the downregulation Apo(a) expression effect of MEG3. **Conclusion** MEG3 downregulates the expression of Apo(a) in HepG2 cell through miR-125a-5p/TET2 pathway.

高密度脂蛋白(a) [lipoprotein(a), Lp(a)] 是心血管疾病的独立危险因素<sup>[1-2]</sup>, 然而其血浆浓度主要由遗传因素控制, 几乎不受食物和药物的影响, 因此采取从调控其基因表达入手的策略, 即抑制载脂蛋白(a) [apolipoprotein(a), Apo(a)] 的表达成为降低高密度脂蛋白(a) 血浆浓度的必然选择。母体表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 为母体表达的印记基因中一个。其编码 RNA, 属于一种 RNA 基因, 已经从该基因转录了多个可变剪接的转录物变体, 并且它们都是长的非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。该基因在许多正常组织中表达, 参与多种多样病理生理过程中的表观遗传调控。我们最近发现 miR-125a-5p 靶向抑制去甲基化酶 10, 11 转位酶 2 (ten-eleven-translocation enzyme 2, TET2) 的表达<sup>[3]</sup>, 而 TET2 可抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 的表达<sup>[4]</sup>, 生物信息学分析表明, MEG3 可与 miR-125a-5p 互补性结合, 故 MEG3 存在通过 MEG3/miR-125a-5p/TET2 调控 Apo(a) 表达的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

HepG2 细胞株购于中国上海细胞生物所细胞中心; 总的 RNA 提取试剂购于普洛麦格生物技术有限公司; 反转录试剂盒为赛默飞世尔科技公司产品; qPCR master mix 试剂盒为普洛麦格生物技术有限公司产品; 人 Apo(a) ELISA 试剂盒为厦门慧嘉生物有限公司产品; 用于蛋白分析的 ECL 化学发光试剂盒购于上海 BestBio 贝博生物; Apo(a) 兔抗人一抗及人抗兔二抗均购于台湾 Abnova 公司;  $\beta$ -actin 兔抗人一抗、人抗兔二抗均购于美国 Proteintech Group 公司; 过表达 MEG3 质粒构建于上海吉凯基因; Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 MEG3 转染

MEG3 转染参考试剂盒上的试剂说明书进行: (1) 先用胰酶消化处于对数生长期的细胞, 然后用 1 mL 培养液稀释并计数, 在 24 孔培养板中按  $8 \times 10^4$ /孔的密度接种细胞, 并加入 500  $\mu$ L 培养液, 于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  下进行培养; (2) 取 0.4 g 浓度大于 0.1 kg/L 的质粒溶于 TE 缓冲液, 再依次加入 60  $\mu$ L 的无血清培养基和 1.5  $\mu$ L 的转染试剂, 混匀; (3) 室

温下静置 10~15 min, 促使转染复合物形成; (4) 于 24 孔板中将转染复合物加入细胞中并充分混匀, 细胞培养 48 h 后, 在共聚焦显微镜下观察效果。

### 1.3 荧光素酶报告分析

使用 psi-CHECK2 载体 (Promega, Madison, WI, USA) 构建含有野生型或突变 MEG3 质粒的荧光素酶报告载体。使用 miR-125a-5p 模拟物、miR-125a-5p 抑制物或阴性对照 (miR-125a-5p 的扰乱序列) 将含有 pcDNA3.1-MEG3 质粒的荧光素酶载体 (100 ng) 与人胚肾 293 (HEK293) 细胞共转染 Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 10 ng Renilla 荧光素酶报告基因用作内部对照。48 h 后, 收集细胞并裂解。根据制造商的说明使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) 测定荧光素酶活性。

### 1.4 miR 芯片分析

将培养的 HepG2 细胞 ( $5 \times 10^7$  个/L) 和 SMMC7721 细胞 ( $5 \times 10^8$  个/L) 分为 2 组, 无菌条件下提取总 RNA 后, 送公司进行 miRNA 谱分析。

### 1.5 小干扰 RNA 转染

选出生长状态良好的细胞。转染的前一天, 将密度为  $(4 \sim 5) \times 10^7$  个/L 的细胞接种到 24 孔板, 然后用含胎牛血清和抗生素 0.5 mL 的 DMEM 培养基培养细胞, 当在 24 h 内细胞汇合达到 70%~90% 时, 于 50  $\mu$ L 无血清的 DMEM 培养基加入 20 pmol 的 siRNA, 轻柔混匀。加入 Lipofectamin2000, 用 50  $\mu$ L 无血清的 DMEM 稀释 1  $\mu$ L Lipofectamin2000 试剂并混匀, 室温下 5 min。这些准备工作做好以后, 再将稀释好的 siRNA 和 Lipofectamin2000 试剂混合、混匀并置室温下, 促使 siRNA/Lipofectamin2000 复合物的形成, 约 20 min 后将 siRNA/Lipofectamin2000 复合物 100  $\mu$ L 加到有细胞的培养板中, 轻柔摇晃细胞培养板。于 37  $^{\circ}$ C  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中温育 24~48 h 完成转染。

### 1.6 实时荧光定量 PCR

细胞处理完成后, 用 Eastep<sup>®</sup> Super 总 RNA 提取试剂盒提取 HepG2 细胞总 RNA。提取方法严格遵循试剂盒说明进行操作。获取细胞总 RNA 后, 紫外分光光度计测定 OD260/OD280 的值介于 1.8~2.0 之间。取细胞总 RNA 2  $\mu$ L, 用赛默飞世尔科技公司反转录试剂盒反转录合成 cDNA。反应体系如下: RNase free  $\text{dH}_2\text{O}$  9.5  $\mu$ L,  $5 \times 5 \times$  RT Buffer (含 25

mmol/L  $Mg^{2+}$ ) 4  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L each) 2  $\mu$ L, RNase Inhibitor ( $10^7$  U/L) 0.5  $\mu$ L, Oligo (dT) 20 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 总 RNA 模板 2  $\mu$ L, ReverTra Ace 1  $\mu$ L, 总体积 20  $\mu$ L。反应条件: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后冰浴 5 min。反转录产物一部分进一步扩增, 其他的 -80 $^{\circ}$ C 保存待用。PCR 扩增用 qPCR master mix 试剂盒以及 StepOne™ Real-Time PCR System, 操作方法严格按照说明书进行。引物为上海生工设计并合成, 引物序列如下: GAPDH 上游 5'-TGCCATCAACGACCCCTTCA-3', 下游 5'-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3'; Apo(a) 上游 5'-CAGCACGTTTCATTCCAGGGA-3', 下游 5'-CACCAGGACCATTGATGTCA-3'; MEG3 上游 5'-GCTCTACTCCGTGGAAGCAC-3', 下游 5'-CAAACCAGGAAGGAGACGAG-3'; TET2 上游 5'-ACTCACCCATCGCATACTC-3', 下游 5'-TCAGCATCATCAGCATCACA-3'。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 35 个循环; 最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。然后开始溶解曲线, 每 0.5 $^{\circ}$ C 一个梯度, 从 55 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 每个梯度延续 10 s。统计 Ct 值, 以 GAPDH 作为内参, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 RNA 的相对表达量。

### 1.7 miR-125a-5p 表达分析

总 RNA 的提取按照试剂盒中的操作说明书进行, 将冰冻细胞溶解于 700 mL Qiazol 试剂中, 并用 miRNeasy 试剂盒提取总小分子 RNA。将总 RNA 样本储存在 -80 $^{\circ}$ C 中。miRNA 的反转录使用 TaqMans microRNA Reverse Transcription Kit 转录试剂盒 (Applied Biosystems by Life Technologies, USA)。PCR 使用 Taq-Mans Universal PCR Master Mix system (Applied Biosystems by Life Technologies, USA)。50 ng 小 RNA 转换为互补的 DNA, 加入 miRNA 引物, miRNA 的转录水平高低通过与内参 U6B 比较而得到其相对含量, 重复 3 次。

### 1.8 蛋白质免疫印迹

按说明书提取蛋白, 以 40  $\mu$ g 蛋白上样量上样。浓缩胶 80 V 电泳 30 min、分离胶 120 V 电泳 80 min。对应的蛋白标准 Marker 的位置按照蛋白的分子量切下凝胶, 转膜 (转膜条件为 220 mA 2 h)。丽春红染色观察转膜效果。将含目的蛋白 PVDF 膜置于 1% BSA 和 5% 脱脂奶粉溶液封闭 6 h。按 1 : (2500~5000) 稀释比例加一抗和 1 : (1000~2000) 的稀释比例加  $\beta$ -actin 的一抗, 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜后用 TBST 洗涤 3 次, 每 15 min 换液。按照 1 : 2000 的稀释比例加入二抗, 按照 1 : (2500~5000) 的稀释

比例加入用辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗, 再在摇床上室温孵育约 2 h 后用 TBST 洗涤 3 次 (每隔 15 min 换液 1 次)。用 ECL 发光剂发光, 成像系统中观察蛋白条带摄像, 目的蛋白相对表达 = 目的蛋白灰度值 - 背景灰度值 /  $\beta$ -actin 灰度值。

### 1.9 细胞免疫荧光

细胞爬片后, 取出载有细胞的玻片, 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 0.1% Triton X-100 透膜 10 min; 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 10% 血清 37 $^{\circ}$ C 下封闭 1 h; 完全移除血清, 不再漂洗, 直接滴加按适量比例稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 第二天 37 $^{\circ}$ C 下复温 1 h; 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加按适量比例稀释的荧光二抗 (二抗的稀释、孵育以及以后的步骤需避光), 室温孵育 2 h; 孵育完成后, 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 使用 DAPI 室温染色 30 min, 孵育完成后, 1 $\times$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 移除残留液体, 滴加抗荧光猝灭剂封片, 按相应的二抗选择适当的波长, 于荧光显微镜下观察并拍照保存结果。应用 Image-pro Plus 图像处理软件分析并统计图像。

### 1.10 统计学分析结果

所有结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验的统计学方法, GraphPad Prism 5.1 和 SPSS17.0 统计软件进行分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hsa-miR-125a-5p 对 TET2 靶向性的生物信息学分析及验证

#### 2.1.1 hsa-miR-125a-5p 在 HepG2 细胞中高表达

miR 芯片分析结果表明, 在 HepG2 细胞中, hsa-miR-125a-5p 表达水平升高, 是对照组 (SMMC7721 细胞) 的近 1.5 倍 (表 1)。

#### 2.1.2 MEG3 与 miR-125a-5p 结合的生物信息学分析及荧光素酶报告验证

生物信息学分析结果表明, MEG3 全序列长度为 1730 bp, 在 1633~1644 位点共 21 bp 之间, 与 miR-125a-5p 有较多的碱基 (14 个) 互补, 提示 MEG3 可与 miR-125a-5p 靶向性结合 (图 1)。验证性实验结果表明, MEG3 与 miR-125a-5p 有结合的位点 (图 1)。构建 MEG3 的荧光素酶报告载体及 3 个不同的点突变载体, 发现野生型 MEG3 与 miR-125a-5p 结合后其荧光值显著下降, 但种子序列点突变以后使 MEG3 与 miR-125a-5p

有结合受到不同程度的影响,MEG3-a 的突变位点位于种子序列的非互补结合点,故对 MEG3 与 miR-125a-5p 结合影响不大。MEG3-c 的突变位点位于种子序列的互补结合点,且是 5' 端的第二个碱基,故对 MEG3 与 miR-125a-5p 结合影响很大,其突变

后几乎导致二者之间结合能力的丧失。MEG3-b 的突变位点位于种子序列的互补结合点,但是 3' 端的碱基,故对 MEG3 与 miR-125a-5p 结合影响不是很大。这个实验验证了 MEG3 与 miR-125a-5p 之间能够靶向性结合。

表 1. miR 芯片分析差异表达 miRNA

Table 1. Results of microRNA chip analysis of differentially expressed miRNA

ID	Name	Fold change		ForeGround		ForeGround-BackGround		Normalized	
		2 vs 1	1	2	1	2	1	2	
10977	hsa-miR-183-5p	2.674174142	346.5	446	176	282.5	0.400911162	1.072106262	
10997	hsa-miR-19a-3p	1.653068909	287	273.5	128.5	127.5	0.292710706	0.483870968	
147506	hsa-miR-21-5p	2.118401046	1819	2252	1661	2112	3.783599089	8.015180266	
10928	hsa-miR-125a-5p	1.478839307	570.5	511	400.5	355.5	0.912300683	1.34914611	

注:“2”为 HepG2,“1”为 SMMC7721;“Name”:每个 miRNA 的名字;“ID”:芯片探针;“Fold change”:2 组标准化光密度比值(使用标准化数据和规定比率);“ForeGround”:每个探针的 foreground 光密度;“ForeGround-BackGround”:校正后的探针信号强度;“Normalized”:microRNA 的平均标准化光密度值;Normalized Data=(前背景-后背景)/均值。所有样品探针的平均光密度值大于或等于 50;表中的数据来自于 4 个平行复孔的均值。

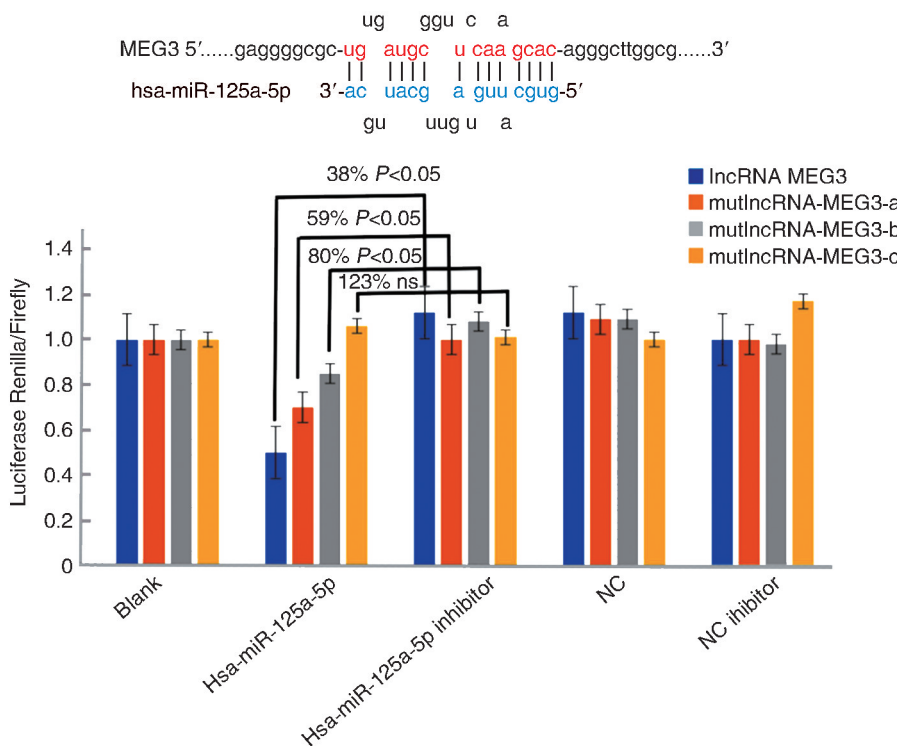


图 1. MEG3 与 miR-125a-5p 结合的荧光素酶报告验证 MEG3:tgatgctgggtccaagcac;MEG3-a:tgtaatgcgggtccaagcac;MEG3-b:tgatgctgggtccaagaac;MEG3-c:tatgatgcgggtccaagcac。红色字母表示突变位点。

Figure 1. Fluorescent reporter enzyme validation of MEG3 binding to miR-125a-5p

2.2 HepG2 细胞 MEG3 表达分析

HepG2 为 Apo(a) 高表达的肝癌细胞株,其是否表达 MEG3 尚不清楚,结果表明,与低表达 Apo(a) 的 SMMC7721 肝癌细胞株相比较,前者 MEG3 表达显著低于后者(图 2)。

2.3 MEG3 对 HepG2 细胞 Apo(a) 表达水平的影响

通过向 HepG2 细胞转染 MEG3 的质粒载体,采用 Western blot 和 qRT-PCR 技术检测 Apo(a) 的表达水平,结果发现,转染 MEG3 后,Apo(a) 的蛋白及 mRNA 表达水平均显著下降(图 3)。

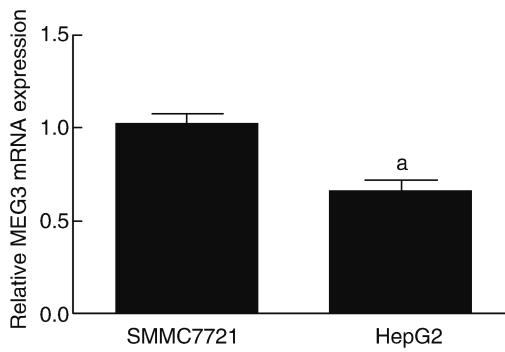


图 2. HepG2 细胞 MEG3 表达情况 a 为  $P < 0.05$ , 与 SMMC7721 细胞相比。

Figure 2. The expression of MEG3 in HepG2 cells

2.4 MEG3 抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 表达的机制

2.4.1 MEG3 抑制 miR-125a-5p 的表达, miR-125a-5p 逆转 MEG3 对 Apo(a) 表达的下调作用, 并下调 TET2 MEG3 显著下调 miR-125a-5p 的表达水平 (图 4), 向 HepG2 细胞加入 miR-125a-5p 的 mimics (模拟物), 结果发现, MEG3 抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 表达的作用被部分逆转 (图 4), 证实 miR-125a-5p 参与了 MEG3 抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 表达。

miR-125a-5p 能抑制 TET2 的表达, 使用 miR-125a-5p 的抑制剂 (inhibitor) 可逆转 miR-125a-5p 对 TET2 表达的抑制作用 (图 4)。

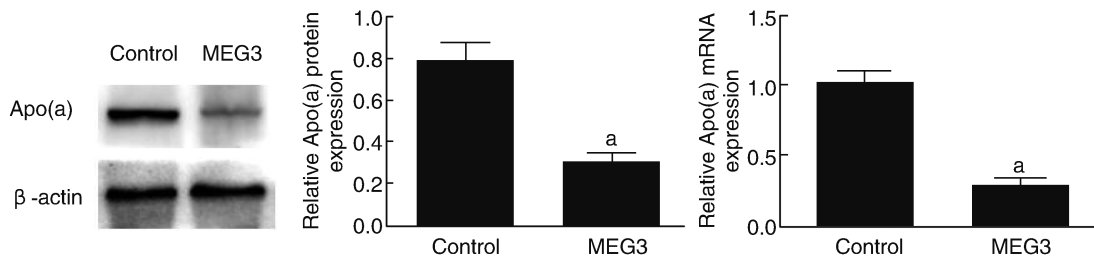


图 3. MEG3 抑制 HepG2 细胞 Apo(a) 的表达 (n=3) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Figure 3. MEG3 inhibited the expression of Apo(a) in HepG2 cells

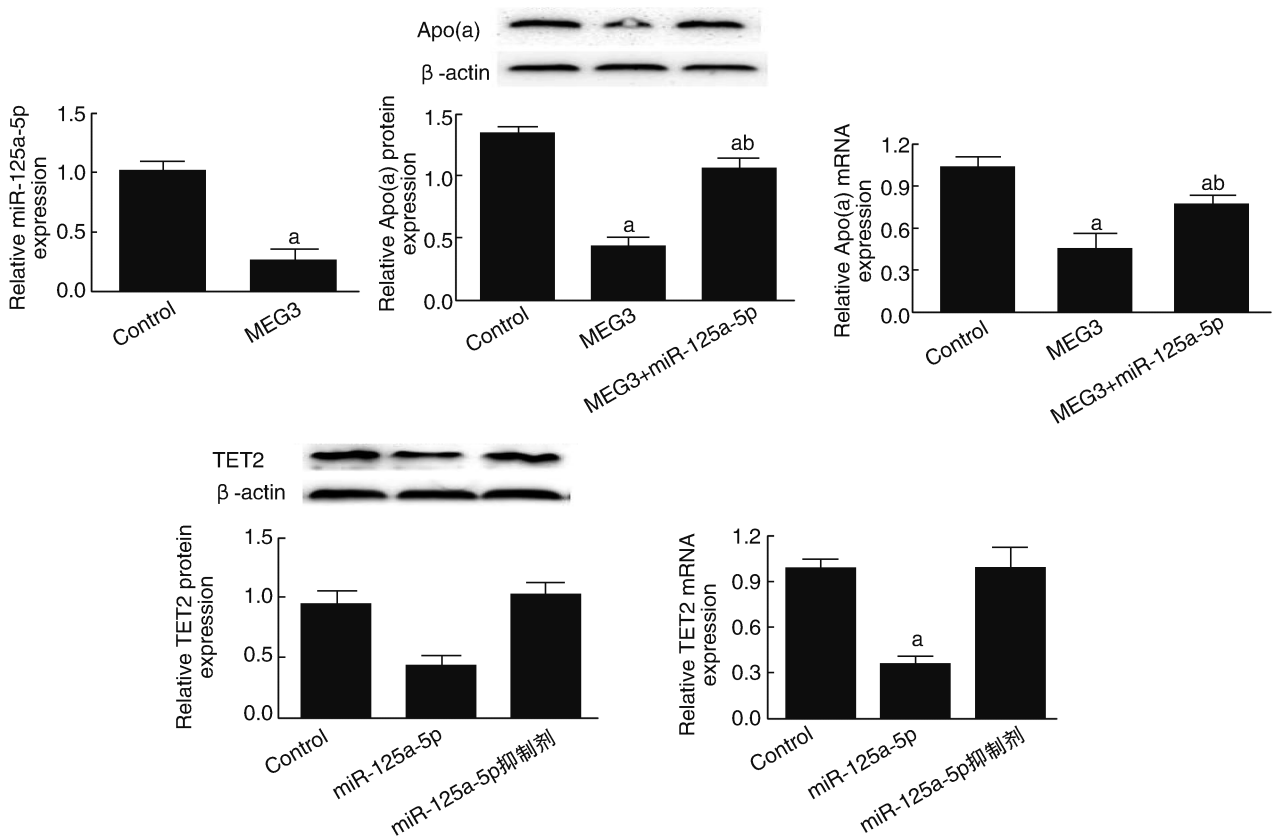


图 4. MEG3 抑制 miR-125a-5p 的表达, miR-125a-5p 逆转 MEG3 对 Apo(a) 表达的下调作用, 并下调 TET2 (n=3) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 MEG3 组比较。

Figure 4. MEG3 inhibited the expression of miR-125a-5p, miR-125a-5p reversed the downregulation of Apo(a) expression by MEG3, and downregulated TET2

2.4.2 MEG3 上调 HepG2 细胞 TET2 的表达, TET2 沉默逆转 MEG3 对 Apo(a) 表达的下调作用 转染 MEG3 后, TET2 的表达水平显著上调, 活性显著增加(图 5), 而使用小干扰 RNA 技术沉默 TET2 后,

MEG3 下调 HepG2 细胞 Apo(a) 表达的作用被逆转(图 5)。以上结果说明 MEG3 通过 miR-125a-5p/TET2 途径下调 HepG2 细胞 Apo(a) 表达。

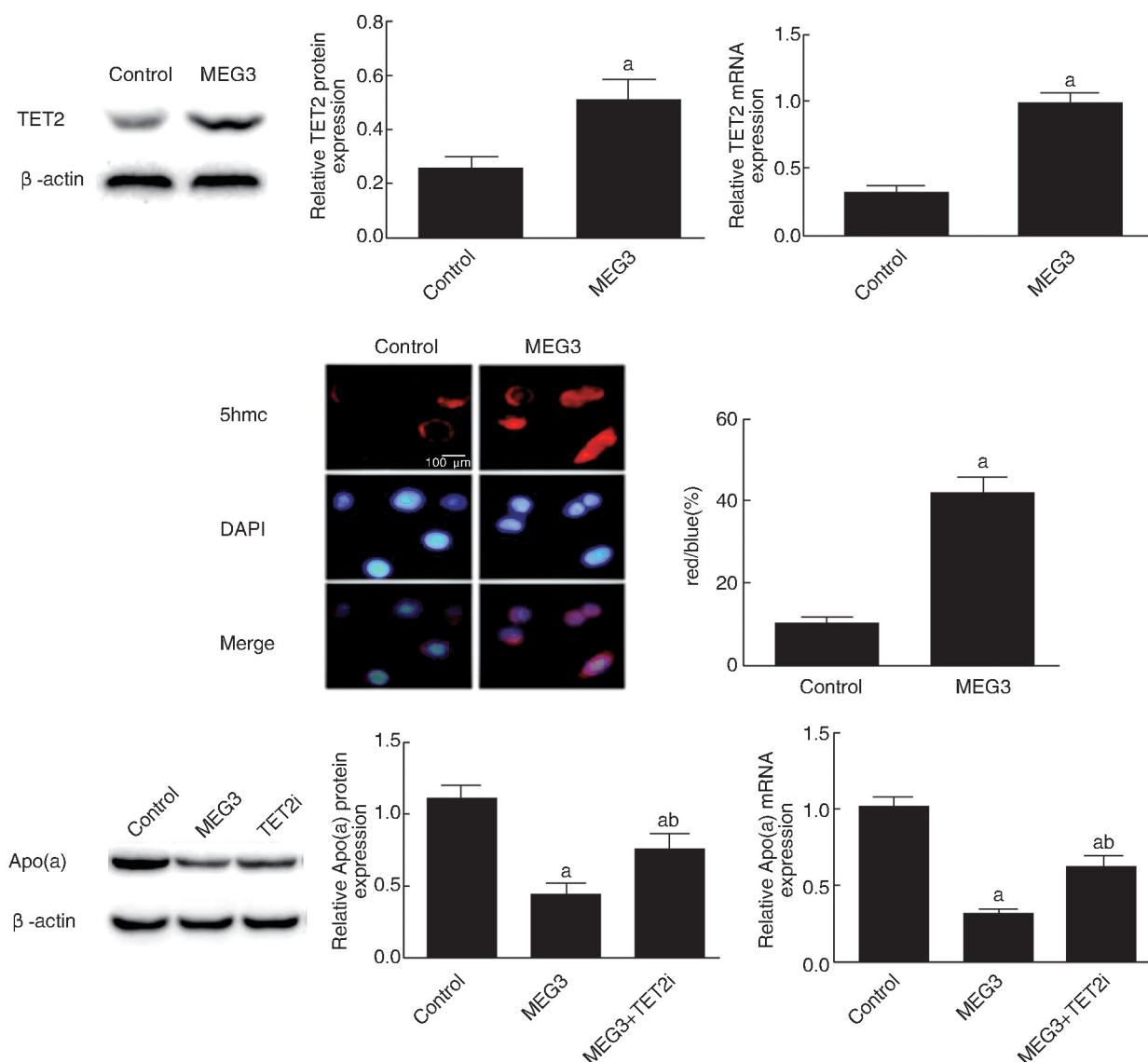


图 5. MEG3 上调 HepG2 细胞 TET2 的表达及活性, TET2 沉默逆转 MEG3 对 Apo(a) 表达的下调作用 ( $n=3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 MEG3 组比较。

Figure 5. MEG3 upregulated the expression and activity of TET2 in HepG2 cells, and TET2 silencing reversed the downregulation of MEG3 on Apo(a) expression

### 3 讨论

MEG3 是一种印记基因, 位于人类染色体 14q32.3 上的印迹 DLK1-MEG3 基因座, 包含 12 个基因亚型, 编码与肿瘤发生相关的 lncRNA。它的小鼠直系同源基因 Meg3 也被称为基因诱捕基因座 2 (Gtl2), 位于第 12 号染色体远端, MEG3 基因编码

lncRNA, 并在许多正常组织中表达, 其缺失或表达异常与多种疾病有关, 如肿瘤<sup>[5]</sup>、糖尿病相关微血管功能障碍<sup>[6]</sup>, MEG3 起着 miRNA 海绵的作用, 其负调控 miR-9 在血管内皮细胞血管生成中起作用<sup>[7]</sup>。在 Meg3-KO 小鼠中由血管内皮生长因子调节的基因表达增加<sup>[8]</sup>。最新的研究发现 MEG3 通过序列互补作用, 以内源性海绵的形式, 抑制 miR-

223 的功能并增加 NLRP3 表达诱导内皮细胞的焦亡<sup>[9]</sup>。提示 MEG3 这种 miRNA 吸附海绵可能涉及更多心血管病发生机制。

TET2 是一种 DNA 去甲基化酶,其在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用。研究发现,低血流剪切应力可通过抑制 TET2 引起内皮功能障碍<sup>[10]</sup>,这与 TET2 抑制炎症因子的表达有关<sup>[11]</sup>,TET2 还通过影响血管平滑肌细胞的分化与动脉粥样硬化发生发展相关联<sup>[12]</sup>。因此,TET2 可能成为动脉粥样硬化干预的新靶点。深入研究 TET2 的表达调控意义重大。

调控 TET2 的因子众多,但参与 TET2 表达调控的 miRNA 所知甚少,miR-125a-5p 是我们近来发现的可下调 TET2 表达的非编码 RNA,因 lncRNA 是 miRNA 的吸附海绵,本研究证实,MEG3 可吸附 miR-125a-5p,由于 MEG3 对于 miRNA 的独特调控作用,而 miRNA 又参与了 Apo(a) 基因表达的调控,故深入研究 MEG3 对 Apo(a) 基因表达的调控机制意义重大。hsa-miR-125a-5p 在 HepG2 细胞中高表达,MEG3 与前二者相反,其在 HepG2 细胞中低表达,TET2 也是如此,而 HepG2 细胞高表达 Apo(a),即 hsa-miR-125a-5p 与 Apo(a) 存在正相关的关系,而 MEG3 与 TET2 存在负相关的关系,但这些因素之间的内部联系并不清楚。我们的研究结果证实 MEG3 可抑制 Apo(a) 的表达,并证实其通过一种表观调控的方式起作用,即 MEG3 通过 miR-125a-5p/TET2 途径下调 HepG2 细胞 Apo(a) 表达,这进一步丰富了 Apo(a) 表达的调控机制,为干预高脂蛋白(a) 的心血管毒害作用提供了新的干预模式和干预靶点。

#### [参考文献]

- [1] Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Extreme lipoprotein (a) levels and improved cardiovascular risk prediction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(11): 1146-1156.
- [2] Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, et al. PROCARDIS Consortium. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease [J]. *N Engl J Med*,

2009, 361(26): 2518-2528.

- [3] 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.
- [4] 张凯, 邓智敏, 曾召林, 等. ox-Lp(a) 通过上调 miR-125a-5p 靶向抑制 10,11-转位酶 2 增加单层血管内皮细胞通透性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(11): 1107-1113.
- [5] Sun Z, Nie X, Sun S, et al. Long non-coding RNA MEG3 downregulation triggers human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration via the p53 signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2569-2581.
- [6] Qiu GZ, Tian W, Fu HT, et al. Long noncoding RNA-MEG3 is involved in diabetes mellitus-related microvascular dysfunction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(1): 135-141.
- [7] He C, Yang W, Yang J, et al. Long noncoding RNA MEG3 negatively regulates proliferation and angiogenesis in vascular endothelial cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(6): 475-481.
- [8] Ruan W, Zhao F, Zhao S, et al. Knockdown of long non-coding RNA MEG3 impairs VEGF-stimulated endothelial sprouting angiogenesis via modulating VEGFR2 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Gene*, 2018, 649: 32-39.
- [9] Zhang Y, Liu X, Bai X, et al. Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis[J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(2). doi: 10.1111/jpi.12449.
- [10] Yang Q, Li X, Li R, et al. Low shear stress inhibited endothelial cell autophagy through TET2 downregulation[J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44(7): 2218-2227.
- [11] Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy [J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(3): 147-151.
- [12] Liu R, Jin Y, Tang WH, et al. Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity[J]. *Circulation*, 2013, 128(18): 2047-2057.

(此文编辑 许雪梅)