

MiR-224-5p 靶向沉默前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 影响 HepG2 细胞脂质摄取与蓄积

何倩¹, 高亚², 唐惠芳¹

(1. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 岳阳市第二人民医院病理科, 湖南省岳阳市 414000)

[关键词] miR-224-5p; 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 低密度脂蛋白受体; 高脂血症; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨 miR-224-5p 对前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9) 表达及对 HepG2 细胞摄脂能力的影响。方法 运用生物信息学方法对 miR-224-5p 基因位置、保守性、种子序列进行分析。在 Targetscan、miRanda、miRDB、RNAhybrid 等多个数据库分析 miR-224-5p 与 PCSK9 结合位点及结合自由能。双荧光素酶报告基因验证 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 直接靶向结合。Western blot 检测 miR-224-5p 模拟物和 miR-224-5p 抑制剂对 PCSK9 和低密度脂蛋白受体(LDLR)蛋白的影响。细胞免疫荧光直接观察细胞膜上的 LDLR。油红 O 染色和 DiI-LDL 分别观察 miR-224-5p 对 HepG2 细胞脂滴含量和脂质摄取能力的影响。结果 生物信息学分析发现人的 miR-224-5p 基因定位于 Xq28, 不同物种间高度保守。miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 存在靶向结合的基础, 结合自由能较低。双荧光素酶报告基因显示, miR-224-5p 模拟物能抑制 PCSK9-WT 3'UTR 荧光素酶活性, 而对 PCSK9-Mut 3'UTR 没有抑制作用, 表明 PCSK9 mRNA 3'UTR 是 miR-224-5p 的靶点。进一步实验发现 miR-224-5p 模拟物能够明显抑制 PCSK9 蛋白表达, 增加 LDLR 蛋白含量。miR-224-5p 下调后则表现为 PCSK9 表达增加, 细胞 LDLR 水平降低。此外, 油红 O 染色可见 miR-224-5p 模拟物组 HepG2 细胞内的脂滴明显减少, 而 miR-224-5p 抑制剂组 HepG2 细胞内的脂滴明显增多。miR-224-5p 高表达后明显促进 HepG2 细胞对 LDLC 的摄取。结论 miR-224-5p 靶向结合 PCSK9 mRNA 3'UTR, 抑制 PCSK9 表达, 进而降低 HepG2 细胞内脂滴含量, 增加 HepG2 细胞对脂质的摄取。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

MiR-224-5p affects lipid uptake and accumulation in HepG2 cells by targeting silence of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

HE Qian¹, GAO Ya², TANG Huifang¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Pathology, the Second People's Hospital of Yueyang, Yueyang, Hunan 414000, China)

[KEY WORDS] miR-224-5p; proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; low density lipoprotein receptor; hyperlipidemia; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of miR-224-5p on the expression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the lipid uptake of HepG2 cells. **Methods** The position, conservativeness and seed sequence of miR-224-5p gene were analyzed by bioinformatics method. The binding sites and binding free energies of miR-224-5p to PCSK9 were analyzed in databases such as Targetscan, miRanda, miRDB and RNAhybrid. Direct targeted binding of miR-224-5p to PCSK9 mRNA 3'UTR was verified by double luciferase reporter gene. Western blot was used to detect the effects of miR-224-5p mimic and miR-224-5p inhibitor on PCSK9 and low density lipoprotein receptor (LDLR) proteins. LDLR on the cell membrane was directly observed with cellular immunofluorescence. Oil red O staining and DiI-LDL were respectively used to observe the effects of miR-224-5p on lipid droplet content and lipid uptake in HepG2 cells. **Results** Bioinformatics analysis revealed that the human miR-224-5p gene was located in Xq28 and highly conserved among different species. MiR-224-5p and PCSK9 mRNA 3'UTR had the basis of targeted binding, and the binding free energy was low. The double luciferase reporter gene assay showed that miR-224-5p mimic could inhibit the luciferase

[收稿日期] 2019-01-16

[修回日期] 2019-03-06

[作者简介] 何倩, 硕士研究生, 研究方向为心血管基础与临床, E-mail 为 570694833@qq.com。通信作者唐惠芳, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管基础与临床, E-mail 为 1132226235@qq.com。

activity of PCSK9-WT 3'UTR, but not PCSK9-Mut 3'UTR, suggesting that the PCSK9 mRNA 3'UTR was the target of miR-224-5p. Further experiments showed that the miR-224-5p mimic could significantly inhibit the expression of PCSK9 protein and increase the content of LDLR protein. The expression of PCSK9 increased and the level of LDLR decreased after the down-regulation of miR-224-5p. In addition, oil red O staining showed that lipid droplets in HepG2 cells decreased significantly in the miR-224-5p mimic group, while lipid droplets in HepG2 cells increased significantly in the miR-224-5p inhibitor group. High expression of miR-224-5p significantly promoted LDLC uptake by HepG2 cells. **Conclusion** miR-224-5p targeting PCSK9 mRNA 3'UTR inhibits the expression of PCSK9, thereby reducing the content of lipid droplets in HepG2 cells and increasing the uptake of lipid by HepG2 cells.

高脂血症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性心血管疾病的一个重要危险因素,其能促进As的发生发展,增加斑块的不稳定性,而As斑块破裂又可以导致血管内血栓形成,阻塞血液流动,并导致心肌梗死和中风的发生^[1-2]。其中血浆低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)在As的发生和发展中起关键作用,降低血浆LDLC能减少As性心血管事件的发生。前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)能有效与肝细胞膜上低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)结合,使其进入胞内溶酶体降解,减少LDLR介导的胆固醇清除,进而增加血浆LDLC。PCSK9抑制剂被认为是继他汀类药物后新一代的降脂药物^[3]。微小RNA(micro RNA, miRNA)是一类小分子非编码RNA,在哺乳动物体内主要通过靶序列结合,在转录后水平抑制基因的表达。miRNA与机体正常的新陈代谢、疾病发生关系密切。大量文献报道miRNA可以参与调控脂质代谢,是治疗高胆固醇血症潜在的新靶点^[4-5]。而PCSK9在脂质代谢中具有重要作用,PCSK9在体内的调节机制和抑制剂的研究受到极大关注;但miRNA对PCSK9的调控鲜有报道。通过生物信息学方法分析发现PCSK9 mRNA的非编码区域存在一些miRNA可能结合的位点。其中miR-224-5p是唯一一个在人、大鼠和小鼠都可能是潜在的调节PCSK9表达的miRNA,而且结合区都是高度保守的。基于此,本文研究了miR-224-5p能否通过靶向结合PCSK9 mRNA 3'UTR,在转录后水平下调PCSK9的表达,从而增加LDLR表达,进而调控脂质代谢。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司;PCSK9、LDLR、 β -actin的一抗及羊抗兔二抗均购

自Proteintech公司;Cy3荧光标记的二抗购自美国EarthOx Life Sciences公司;油红O粉末购自Sigma-Aldrich公司;riboFECTTM CP转染试剂、microONTM miRNA模拟物、microOFFTM miRNA抑制剂、pGL-3-PCSK9-3'UTR载体均购自锐博生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega公司;DiI-LDL购自广州奕源生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

HepG2细胞、HEK-293T细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养于含0.1 U/L青霉素、100 g/L链霉素、10%胎牛血清的DMEM高糖培养基。5%CO₂、37℃培养箱培养。1~2天换液,待细胞长满后,0.25%胰酶消化,1:3传代。

1.3 细胞转染

采用riboFECTTM CP转染试剂转染miR-224-5p模拟物到24孔板。转染浓度以200 nmol/L为例。首先,在转染前1天将HepG2接种到含完全培养基的24孔板中,待细胞密度达到30%~50%后进行转染;用30 μ L riboFECTTM CP缓冲液稀释5 μ L 20 μ mol/L的miR-224-5p模拟物,并混合均匀;接着加入3 μ L riboFECTTM CP试剂,轻轻混匀,室温孵育不超过15 min,注意不要用力吹打;将riboFECTTM CP混合液加入至原培养基中,轻轻吹打混匀。把转染好的培养板放入37℃的细胞培养箱培养。

1.4 双荧光素酶报告基因分析

用pGL-3-PCSK9-3'UTR载体,将PCSK9基因的3'UTR克隆至载体的海肾荧光素酶基因(hRluc)下游位点,用hRluc作为报告基因,用萤火虫荧光素酶基因(hluc)作内参基因。实验步骤如下:转染前一天将293T细胞接种到96孔板中,使细胞长到50%~80%时再进行转染;将miRNA miR-224-5p模拟物和PCSK9 3'UTR双荧光素酶载体质粒共转染到细胞中,转染完成后放到培养箱继续培养;共转染48 h后将培养基小心吸出,用100 μ L的1×PBS清洗2

遍,吸干 PBS;每孔加入 50 μ L 的 1 \times PLB (passive lysis buffer) 覆盖住细胞,将 96 孔板放在摇床上摇 20 min,使细胞充分裂解;将 10 μ L 细胞裂解液加入到 96 孔白色酶标板中,再加入 100 μ L 准备好的荧光素酶检测试剂 II,用多功能酶标仪测量数据;读数后每孔添加 100 μ L 的 Stop&Glo[®] 试剂,再次测数据。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

收集裂解的细胞提取蛋白。经 BCA 法定量检测蛋白浓度后,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电转至硝酸纤维素滤膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入相应的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤后加入 HRP 标记的二抗于室温孵育 2 h。最后 ECL 化学发光试剂 A 液、B 液按 1:1 混匀,均匀加至膜上,避光显色,全自动凝胶成像分析仪 (Proteinsimple 公司) 采集信息分析。

1.6 细胞免疫荧光实验

将 HepG2 细胞接种到 24 孔板内,待细胞密度达到 30% ~ 50% 后,向细胞内转染 200 nmol/L miR-224-5p 模拟物。转染 48 h 后将细胞从培养箱拿出,进行细胞免疫荧光实验。

1.7 细胞脂内吞实验

转染前一天将 HepG2 细胞接种到 96 孔板中,待细胞密度达到 50% ~ 80% 时,再向细胞内转染 200 nmol/L miR-224-5p 模拟物。转染 24 h 后细胞用 PBS 洗 2 次,换无血清培养基,继续培养 24 h。再进行如下操作 (注意避光):无血清培养基中加入 DiI-LDL,使 DiI-LDL 的终浓度为 30 mg/L,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 4 h;吸出原培养基,用 1 \times PBS 洗涤 3 遍,清除残余的 DiI-LDL;用 3% 多聚甲醛室温下固定 20 min,1 \times PBS 清洗 3 遍;DAPI 复染细胞核 8 min,1 \times PBS 清洗 2 次;滴加荧光抗淬灭封片剂,荧光显微镜下观察拍照。

1.8 油红 O 染色

将 HepG2 细胞接种到 24 孔板内,待细胞长到 30% ~ 50% 后,向 HepG2 细胞内转染 200 nmol/L miR-224-5p 模拟物。转染 24 h 后更换为无血清培养基,转染 48 h 后进行油红 O 染色。

1.9 生物信息学靶标分析网站

TargetsScan 6.2, http://www.targetsScan.org/vert_61/; miRanda, <http://www.microrna.org/microrna/home.do>; MicroCosm Targets Version 5, <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>; DIANA-microT-CDS (v5.0), http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index; DIANA-TarBase v7.0, [\[ana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index\]\(http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index\); miRDB, <http://www.mirdb.org/miRDB/>; miRSystem, <http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>; mirbase \(miRNA 数据库\), <http://www.mirbase.org/>; RNAhybrid, <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>。](http://di-</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.10 统计分析

所有实验均重复 3 次以上,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验。统计分析、作图采用 GraphPad Prism 6、Image Pro Plus v6 软件, *P* < 0.05 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学预测结果

2.1.1 miR-224 序列保守性分析 登陆 miRBase 数据库对 miR-224 的基本信息进行分析,发现人染色体定位于 Xq28。在 miRBase 数据库中可获得多个物种的 miR-224,部分物种因成熟部位的不同可分为 miR-224-5p 和 miR-224-3p,但部分物种暂时只发现了一种,直接命名 miR-224。通过对比不同物种间的成熟序列,分析发现 miR-224-5p 在不同物种间高度保守,其种子序列为“**AAGUCAC**”,而 miR-224-3p 在物种间并不保守 (表 1)。提示 miR-224-5p 在物种进化和靶标基因调控中起重要作用。

表 1. miR-224-5p 在不同物种间高度保守

Table 1. miR-224-5p is highly conserved across species

物种	miR-224	成熟序列
人	hsa-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
猕猴	mmI-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA
小鼠	mmu-miR-224-5p	UAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
大鼠	rno-miR224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
山羊	chi-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
大猩猩	ggo-miR224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA
黑猩猩	ptr-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA
豚尾猴	mne-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA
家犬	cfa-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
猪	ssc-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA
牛	bta-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA

2.1.2 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 结合位点的预测 在 TargetsScan、miRanda 等多个网站上预测分析多个物种 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'

UTR的靶向结合情况,结果均发现 miR-224-5p 具有靶向结合 PCSK9 的生物学基础,且位点只有一个人 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 结合位点

于 PCSK9 mRNA 3'UTR 的 1230-1236,预测的结合位点序列为:5'... AUUUUUUAUAAUAUGGUGACUU... (图 1、表 2)。

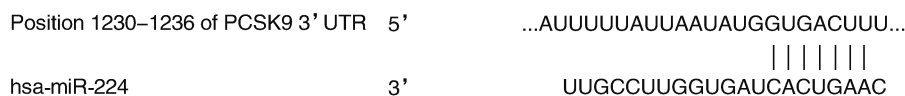


图 1. miR-224-5p 与 PCSK9 3'UTR 的结合

Figure 1. Combination of miR-224-5p and PCSK9 3'UTR

表 2. 不同物种间 miR-224-5p 与 PCSK9 3'UTR 结合情况

Table 2. Binding of miR-224-5p to PCSK9 3'UTR between different species

物种	位点	预测结果	miR-224	成熟序列
人	1230-1236 of PCSK9 3'UTR	5'... AUUUUUUAUAAUAUGGUGACUUU...	hsa-miR-224-5p	3'UUGCCUUGGUGAUCACUGAAC
小鼠	920-926 of PCSK9 3'UTR	5'... AGUUUUUAUUAUGUAGUGACUUU...	mmu-miR-224-5p	3'UUGCCUUGGUGAUCACUGAAU
恒河猴	1207-1213 of PCSK9 3'UTR	5'... AUUUUUUAUAAUAUGGUGACUUU...	mml-miR-224-5p	3'AUUUGCCUUGGUGAUCACUGAAC
大鼠	947-953 of PCSK9 3'UTR	5'... AGUUUUUAUUAUGUAGUGACUUU...	rno-miR-224-5p	3'UUUGCCUUGGUGAUCACUGAAC
黑猩猩	1227-1233 of PCSK9 3'UTR	5'... AUUUUUUAUAAUAUGGUGACUUU...	ptr-miR-224	3'AUUUGCCUUGGUGAUCACUGAAC
牛	1175-1181 of PCSK9 3'UTR	5'... CAGUUUUUAUUAUGGUGACUUU...	bta-miR-224	3'AUUUGCCUUGGUGAUCACUGAAC

2.1.3 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 结合自由能分析 接下来我们利用 RNAhybrid 分析人 PCSK9 与 miR-224-5p 的结合自由能,在 RNAhybrid 网站上输入人 PCSK9 mRNA 3'UTR 序列和 miR-224-5p 成熟序列,结果显示结合自由能为-18.4 kcal/mol,结合自由能较低。进一步提示人 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 结合稳定性较高。

2.2 双荧光素酶报告基因检测 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3'UTR 的结合情况

为了验证生物信息学分析的结果,我们构建了 PCSK9-WT 3'UTR 质粒(野生型)和 PCSK9-Mut 3'UTR 质粒(突变型),突变型是对 pGL-3-PCSK9-3'UTR 载体上带有的 miR-224-5p 靶点序列中种子序列的结合位点进行 GUGACUU 到 AUCAAUG 的点突变(图 2)。

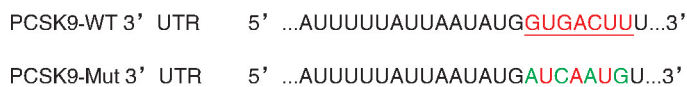


图 2. miR-224-5p 种子序列突变示意图

Figure 2. Schematic diagram of miR-224-5p seed sequence mutation

将状态良好的 HEK-293T 细胞接种到 96 孔板中,细胞长到 50% ~ 80% 时再进行转染。将 PCSK9-WT 3'UTR 质粒、PCSK9-Mut 3'UTR 质粒与 miR-224-5p 模拟物共转染到细胞中。继续培养 48 h 后,用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组双荧光数值。结果发现 miR-224-5p 模拟物对 PCSK9-WT 3'UTR 荧光素酶活性有显著抑制作用,当对 PCSK9 的 3'UTR 突变后,miR-224-5p 模拟物对突变质粒没有影响(图 3)。说明 miR-224-5p 通过靶向结合到 PCSK9 3'UTR 抑制野生型质粒的表达,

即 PCSK9 是 miR-224-5p 的靶基因。

2.3 miR-224-5p 对 HepG2 细胞 PCSK9 表达的影响

转染前一天将 HepG2 细胞接种到 6 孔板内,待细胞密度达到 50% ~ 70% 后,向细胞内转染 miR-224-5p 模拟物,浓度分别为 0、50、100、200 nmol/L,48 h 后提取蛋白质,Western blot 检测细胞内蛋白质的变化情况。结果显示,200 nmol/L miR-224-5p 模拟物对 HepG2 细胞内的 PCSK9 蛋白有明显抑制作用(图 4)。

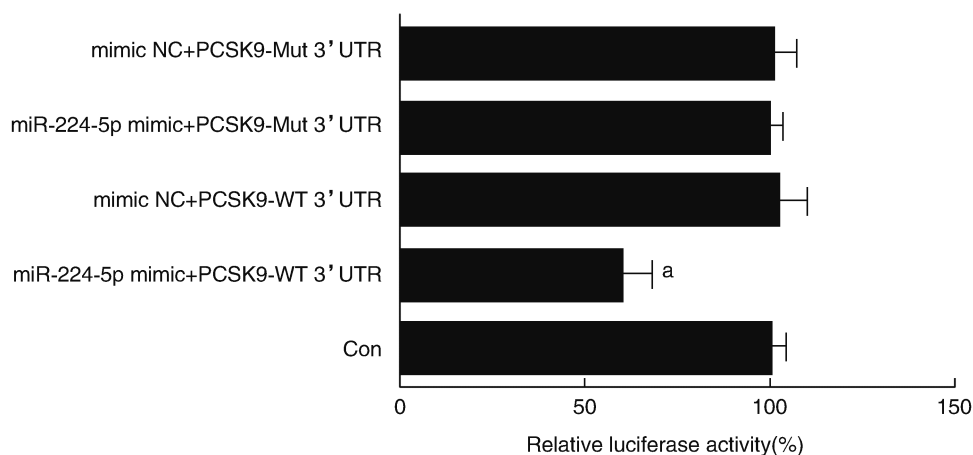


图 3. 双荧光素酶报告基因分析($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 mimic NC+PCSK9-WT 组相比。

Figure 3. Dual luciferase reporter gene analysis ($n=3$)

为了更好地观察 miR-224-5p 上调和下调对 PCSK9 的影响,我们向 HepG2 细胞中分别转染了 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂,48 h 后提取蛋白。Western blot 检测发现,与正常对照(normal control, NC)组相比,miR-224-5p 上调后可以显著降低 HepG2 细胞 PCSK9 蛋白水平,抑制剂下调 miR-224-5p 后,PCSK9 蛋白表达明显增多(图 5)。表明 miR-224-5p 能够抑制 PCSK9 表达。

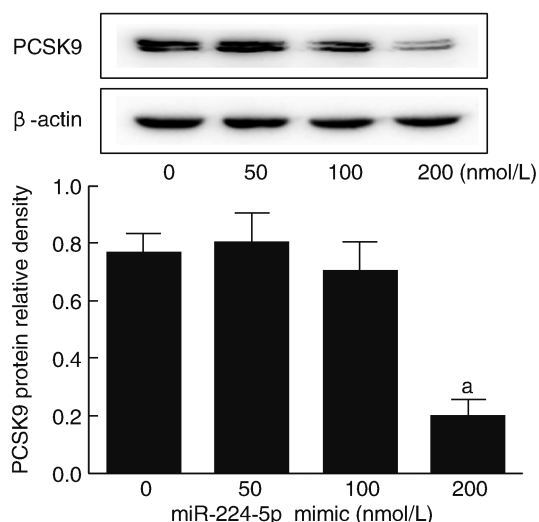


图 4. miR-224-5p 对 HepG2 细胞 PCSK9 蛋白水平的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 0 nmol/L 组相比。

Figure 4. Effect of miR-224-5p on PCSK9 protein level in HepG2 cells ($n=3$)

2.4 miR-224-5p 对 HepG2 细胞 LDLR 的调控

PCSK9 能够与 LDLR 的表皮生长因子 A 的结构域结合,使 LDLR 进入溶酶体降解,影响血浆 LDLC 水平。理论上 miR-224-5p 靶向抑制 PCSK9

表达也会间接引起 LDLR 上调。我们也通过生物信息学分析发现 LDLR 3' UTR 没有 miR-224-5p 的靶点。接下来,我们向 HepG2 细胞内转染 miR-224-5p 模拟物,浓度分别为 0、50、100、200 nmol/L,48 h 后提取蛋白质,Western blot 检测细胞内 LDLR 蛋白质的变化情况。发现 200 nmol/L 组 LDLR 蛋白明显增多,说明 miR-224-5p 模拟物能够增加 LDLR 蛋白水平(图 6)。

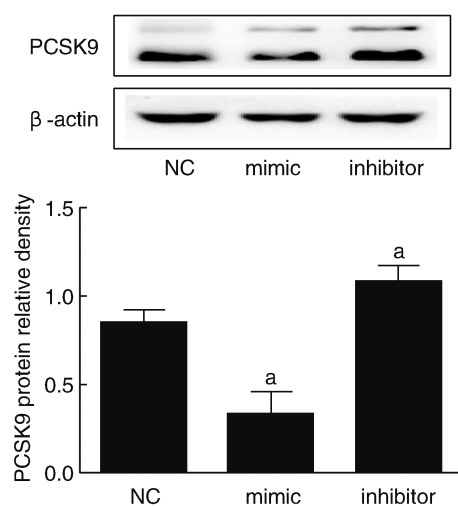


图 5. miR-224-5p 上调和下调对 PCSK9 蛋白水平影响的比较($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 NC 组相比。

Figure 5. Comparison of the effects of up-regulation and down-regulation of miR-224-5p on PCSK9 protein levels ($n=3$)

为了进一步观察 miR-224-5p 对 LDLR 蛋白水平的影响,我们向 HepG2 细胞中分别转染了 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂,48 h 后提取蛋

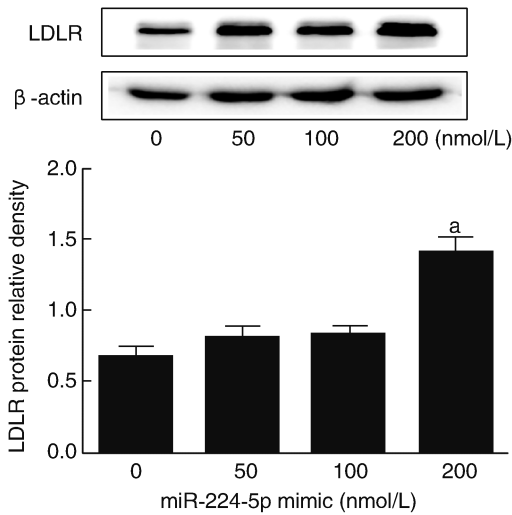


图 6. miR-224-5p 对 HepG2 细胞 LDLR 蛋白水平的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 0 nmol/L 组相比。

Figure 6. Effect of miR-224-5p on LDLR protein levels in HepG2 cells ($n=3$)

白, Western blot 检测 LDLR 蛋白改变。实验发现, 与 NC 组相比 miR-224-5p 模拟物组细胞的 LDLR 蛋白水平明显增加, 而 miR-224-5p 抑制剂组细胞的 LDLR 蛋白水平明显降低(图 7)。说明 miR-224-5p 可以增加 LDLR 蛋白水平。

此外, 采用细胞免疫荧光方法观测 HepG2 细胞膜上 LDLR 蛋白情况。将 HepG2 细胞接种到 24 孔板内, 在细胞密度达到 30% ~ 50% 后, 分别向细胞内转染 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂, 48 h

后进行细胞免疫荧光检测。LDLR 为红色荧光标记。通过荧光显微镜观测发现, 转染了 miR-224-5p 模拟物组的荧光明显强于 NC 组。而转染 miR-224-5p 抑制剂后, LDLR 荧光强度要比 NC 组弱(图 8)。表明 miR-224-5p 能增加细胞膜上的 LDLR 蛋白含量。结合 miR-224-5p 对 PCSK9 表达和对 LDLR 蛋白的影响, 可以说明 miR-224-5p 上调降低 PCSK9 的表达, 进而增加 LDLR 蛋白水平。

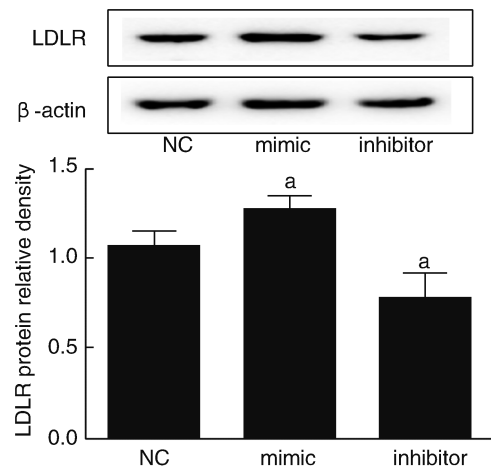


图 7. miR-224-5p 上调和下调对 LDLR 蛋白水平影响的比较 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 NC 组相比。

Figure 7. Comparison of the effects of up-regulation and down-regulation of miR-224-5p on LDLR protein levels ($n=3$)

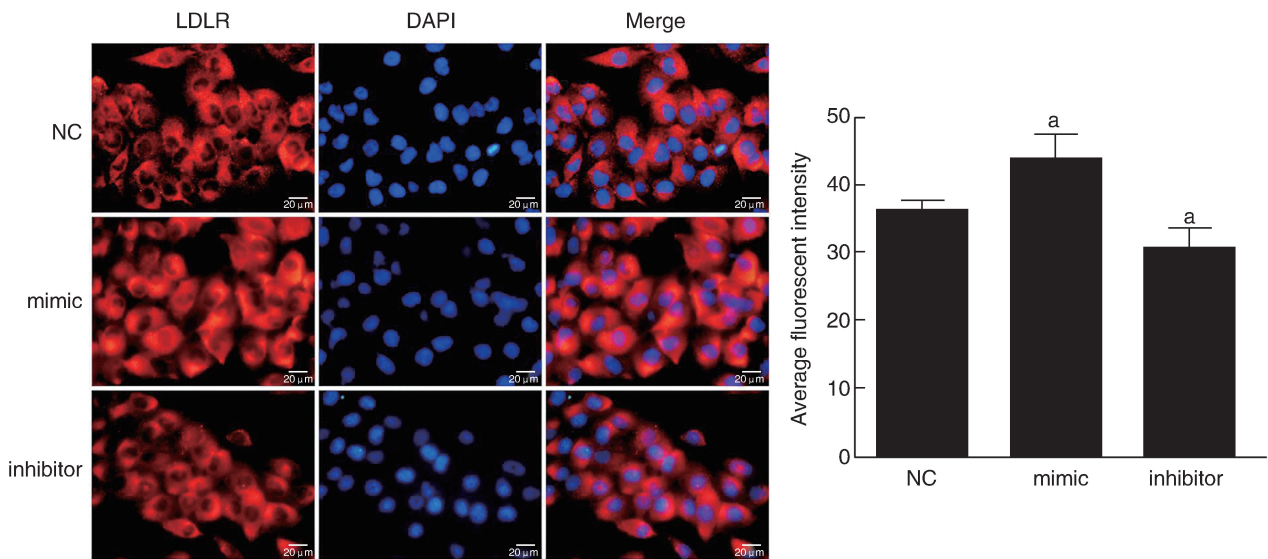


图 8. miR-224-5p 对 HepG2 细胞膜上 LDLR 的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 NC 组相比。

Figure 8. Effect of miR-224-5p on LDLR in HepG2 cell membrane ($n=3$)

2.5 miR-224-5p 对 HepG2 细胞内脂滴含量的影响
将 HepG2 细胞接种到 24 孔板内, 细胞密度达

到 30% ~ 50% 后, 向细胞内分别转染 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂。转染 24 h 后更换为无血

清培养基,转染 48 h 后进行油红 O 染色。结果显示,与 NC 组比较,miR-224-5p 模拟物组细胞内的脂滴含量明显减少,miR-224-5p 抑制剂组则表现为脂

滴含量增多(图 9)。表明 miR-224-5p 能够降低细胞内的脂滴含量,使细胞处于低脂状态。

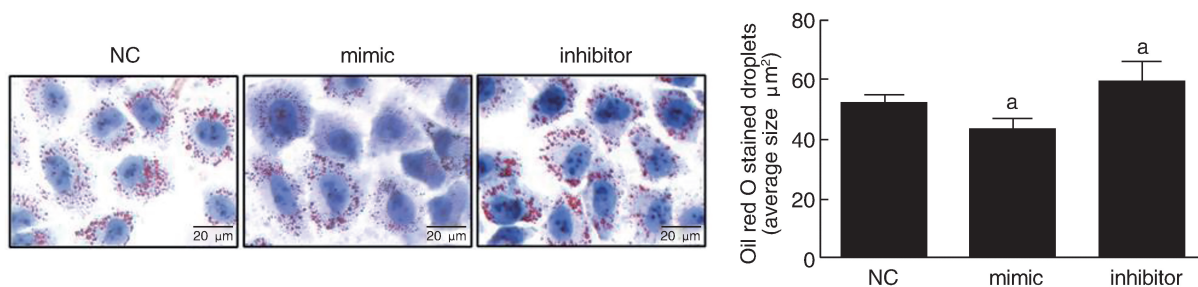


图 9. miR-224 对 HepG2 细胞内脂滴的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$,与 NC 组相比。

Figure 9. Effect of miR-224 on lipid droplets in HepG2 cells ($n=3$)

2.6 miR-224-5p 对 HepG2 脂质摄取能力的影响

DiI-LDL 是标记荧光探针 DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate) 的 LDL,是研究细胞内吞作用的标记物。将 HepG2 细胞接种到 96 孔板中,待细胞密度达到 50% ~ 80% 时,再向 HepG2 细胞内分别转染 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂。转染 24 h 后细胞用 PBS 洗 2 次,更换成无血清培养基,继续培养 24 h。再将 DiI-LDL 加入细胞中,使 DiI-LDL 的最终浓度为 30 mg/L,置于 37 °C 培养箱孵育 4 h。孵育完成后吸出

原培养基,用 PBS 洗 3 遍,清除残余的 DiI-LDL。再用 3% 多聚甲醛室温下固定 20 min,PBS 清洗 3 遍。DAPI 复染细胞核 8 min,PBS 清洗 2 次。滴加封片剂后到荧光显微镜下观察拍照(以上操作注意避光)。通过对比发现,miR-224-5p 模拟物组细胞对 LDL 的摄取量明显增多于 NC 组,miR-224-5p 抑制剂组细胞对 LDL 摄取要明显少于 NC 组(图 10)。以上结果表明,miR-224-5p 上调可以导致 HepG2 细胞在一段时间内对 LDL 摄取增加。提示 miR-224-5p 在脂质代谢中具有重要作用。

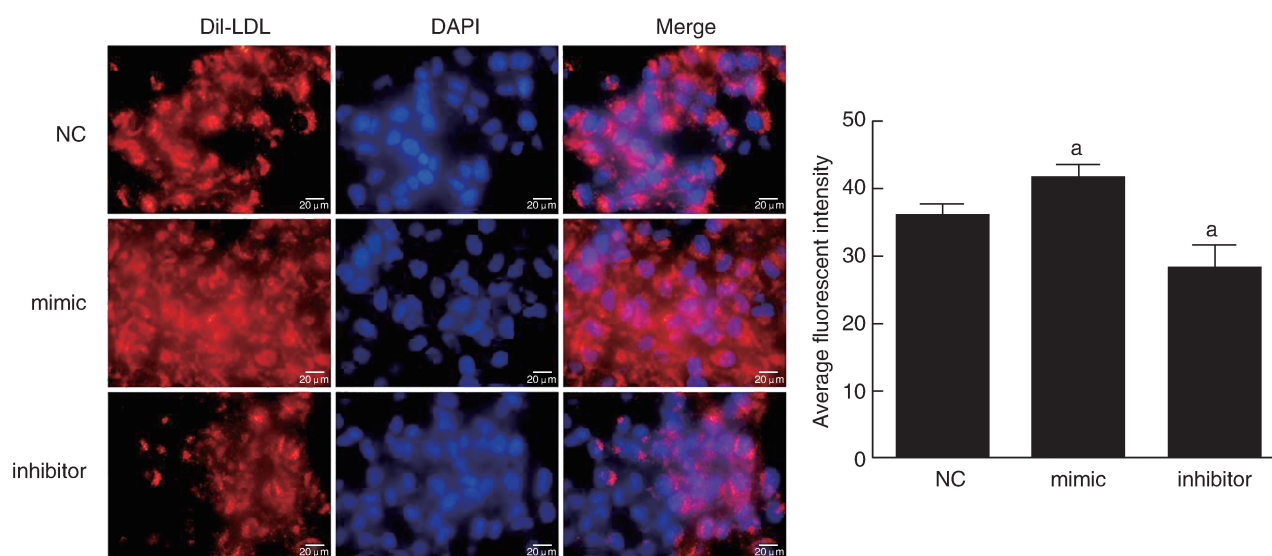


图 10. HepG2 细胞脂质内吞实验($n=3$) a 为 $P<0.05$,与 NC 组相比。

Figure 10. Lipid endocytosis in HepG2 cells ($n=3$)

3 讨论

高脂血症严重危害人体健康,可引起肥胖、脂

肪肝、As 等,严重的高脂血症可以加速 As 的进展并引发心肌梗死或卒中^[6]。高脂血症病因复杂,受到环境因素和遗传因素共同影响,如 LDLR、载脂蛋白

B、PCSK9、低密度脂蛋白受体衔接蛋白 1 等突变可引起家族性高胆固醇血症。

PCSK9 是一种丝氨酸蛋白酶类,主要在肝脏表达并分泌到血液循环中去,能有效地与肝细胞膜上的 LDLR 结合,使其进入胞内溶酶体降解,导致肝脏 LDLR 水平降低^[7]。高水平的循环 PCSK9 通过阻止 LDLR 介导的胆固醇清除,进而增加血浆 LDLC。而低水平的循环 PCSK9 通过增加 LDLR 介导的胆固醇清除,从而降低血浆 LDLC。PCSK9 对 LDLC 的调节在 PCSK9 功能获得型突变的个体中也得到明显体现,这些突变个体表现出较高的循环 LDLC 和高心血管疾病风险。此外,研究发现 PCSK9 功能丧失型突变个体循环 LDLC 比正常人低 15% ~ 30%,并且心血管事件发生风险降低 47% ~ 88%,LDLC 的降低与心血管事件发生风险的降低并不成比例^[8]。PCSK9 功能丧失型突变引起的这种不成比例的风险减少,目前原因还不清楚。但这些研究表明 PCSK9 抑制剂能够作为一种新的治疗方式来减少循环 LDLC 和降低相关心血管疾病风险。

miRNA 是长约为 22 个核苷酸的单链 RNA,主要在转录后水平调控基因表达。虽然已有大量文献报道了 miRNA 与脂质代谢的关系^[9-12],但研究 miRNA 与 PCSK9 间关系的文献较少。通过生物信息学分析网站发现了多个可能与 PCSK9 mRNA 3' UTR 结合的 miRNA,经过筛选,认为 miR-224-5p 的可能性比较大。随后,我们在 Targetscan、miRanda、miRDB 等多个网站上预测 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3' UTR 的靶向结合情况,发现人 miR-224-5p 与 PCSK9 mRNA 3' UTR 结合稳定性较高。为了验证生物信息学分析的结果,我们进行了双荧光素酶报告基因检测;结果发现,miR-224-5p 模拟物只对 PCSK9-WT 3' UTR 质粒的表达产生抑制作用,对 PCSK9-Mut 3' UTR 没有抑制作用。也就是说我们突变的序列就是 miR-224-5p 结合的部分,PCSK9 mRNA 3' UTR 是 miR-224-5p 的靶点,且 miR-224-5p 对 PCSK9 发挥抑制作用依赖于其种子序列。

目前关于 miR-224 的研究大部分与肿瘤有关,如肝癌、直肠癌、肺癌等。近期 Bai 等^[13]发现 miR-224 能够靶向抑制 PCSK9,对神经内分泌瘤内 BON-1 细胞具有促进凋亡和抑制增殖、侵袭的作用。也有研究报道 miR-224 参与了脂质代谢^[14-16]。本文中探讨了 miR-224-5p 在 HepG2 内对脂质代谢的作用。结果显示,200 nmol/L 的 miR-224-5p 模拟物能够明显抑制 PCSK9 的表达,增加 LDLR 蛋白水平。为了排除 miR-224-5p 对 LDLR mRNA 3' UTR 的直接靶

向作用,通过生物信息学分析发现 LDLR 3' UTR 没有 miR-224-5p 的靶点。接下来通过对细胞内 miR-224-5p 上调和下调对比,进一步证实了 miR-224-5p 上调抑制 PCSK9 表达,增加细胞 LDLR 水平,miR-224-5p 下调促进 PCSK9 表达,降低细胞 LDLR 水平。采用细胞免疫荧光的方法直接观测细胞膜上的 LDLR,也进一步证实了 miR-224-5p 能够显著提高细胞膜上的 LDLR。

LDLR 增多可以增加 HepG2 细胞对 LDLC 的摄取,这预示着 miR-224-5p 能够提高 HepG2 细胞的脂质摄取能力。分别向 HepG2 细胞转染 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂,转染 24 h 后发现,miR-224-5p 能够减少细胞内的脂滴含量,使得细胞处于一个相对低脂的状态。但具体机制并不明确。Adorni 等^[17]发现 PCSK9 能抑制巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 蛋白表达和胆固醇流出,从而影响细胞内的胆固醇含量。此外,有研究表明 PCSK9 可通过载脂蛋白 E 和 LDLR 依赖途径增加肝脏脂肪合成。Tavori 等^[18]发现,高脂饮食下,PCSK9 转基因小鼠体内的固醇调节元件结合转录因子 1、乙酰辅酶 A 羧化酶和脂肪酸合酶与野生小鼠相比,分别增加 1.5、1.7 和 2.6 倍。我们推测,miR-224-5p 过表达使细胞内脂滴含量减少,原因可能与 miR-224-5p 通过抑制 PCSK9 增加 ABCA1 的表达进而促进细胞内胆固醇流出有关;也可能与 miR-224-5p 抑制 PCSK9 后减少了甘油三酯合成有关。其具体原因还有待进一步探讨。

最后,就 miR-224-5p 模拟物对 HepG2 细胞的脂质摄取能力进行实验观察。HepG2 细胞内分别转染 miR-224-5p 模拟物、miR-224-5p 抑制剂 24 h 后发现 miR-224-5p 能够显著增加 HepG2 细胞对 LDL 的摄取;这也与 miR-224-5p 增加细胞膜上 LDLR 相吻合。近期,有研究^[19]发现 miR-24 也能够靶向 PCSK9,抑制 PCSK9 的表达,增加细胞膜上的 LDLR 水平;过表达 miR-24 可促进人类肝来源细胞(如 HepG2 细胞、BEL-7402 细胞)对 LDL 的摄取作用;我们研究的结果与此一致。

总之,我们研究发现 miR-224-5p 能够靶向作用于 PCSK9 mRNA 的 3' UTR,在转录后水平抑制 PCSK9 表达,进而增加细胞 LDLR 蛋白水平;此外,miR-224-5p 能降低细胞内脂滴含量,使细胞处于一个相对低脂的状态;LDLR 增多和细胞内脂质减少又促进了 HepG2 细胞对 LDLC 的摄取。

[参考文献]

- [1] Okopien B, Buldak L, Boldys A. Current and future trends in the lipid lowering therapy [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(4): 737-747.
- [2] Dandapat S, Robinson JG. Guidelines for management of hyperlipidemia; Implications for treatment of patients with stroke secondary to atherosclerotic disease [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16(3): 24.
- [3] Stoekenbroek RM, Lambert G, Cariou B, et al. Inhibiting PCSK9--biology beyond LDL control [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 15(1): 52-62.
- [4] Bar C, Blasco MA. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases [J]. *F1000Res*, 2016, 89(5): 1-9.
- [5] Li M, Chen SM, Chen C, et al. microRNA2993p inhibits laryngeal cancer cell growth by targeting human telomerase reverse transcriptase mRNA [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4645-4649.
- [6] Jiang L, Wang LY, Cheng XS. Novel approaches for the treatment of familial hypercholesterolemia: Current status and future challenges [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25(8): 665-673.
- [7] Fitzgerald G, Kiernan T. PCSK9 inhibitors and LDL reduction: pharmacology, clinical implications, and future perspectives [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2018, 16(8): 567-578.
- [8] Ason B, Van Der Hoorn JW, Chan J, et al. PCSK9 inhibition fails to alter hepatic LDLR, circulating cholesterol, and atherosclerosis in the absence of ApoE [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(11): 2370-2379.
- [9] Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, et al. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1 alpha and affects lipid metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(6): 1513-1523.
- [10] Karunakaran D, Thrush AB, Nguyen MA, et al. Macrophage mitochondrial energy status regulates cholesterol efflux and is enhanced by anti-miR33 in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2015, 117(3): 266-278.
- [11] Alvarez ML, Khosroheidari M, Eddy E, et al. MicroRNA-27a decreases the level and efficiency of the LDL receptor and contributes to the dysregulation of cholesterol homeostasis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(2): 595-604.
- [12] Goedeke L, Rotllan N, Ramirez CM, et al. miR-27b inhibits LDLR and ABCA1 expression but does not influence plasma and hepatic lipid levels in mice [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(2): 499-509.
- [13] Bai J, Na H, Hua X, et al. A retrospective study of NENs and miR-224 promotes apoptosis of BON-1 cells by targeting PCSK9 inhibition [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6929-6939.
- [14] Peng Y, Xiang H, Chen C, et al. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(8): 1585-1593.
- [15] Shen B, Pan Q, Yang Y, et al. miR-224 affects mammary epithelial cell apoptosis and triglyceride production by down-regulating ACADM and ALDH2 genes [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(1): 26-33.
- [16] Li Q, Wang G, Shan JL, et al. MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells and involved in cellular migration and invasion [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(1): 164-171.
- [17] Adorni MP, Cipollari E, Favari E, et al. Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 256(1): 1-6.
- [18] Tavori H, Giunzioni I, Predazzi IM, et al. Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE- and LDLR-mediated mechanisms [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 110(2): 268-278.
- [19] Hyrina A, Olmstead AD, Steven P, et al. Treatment-induced viral cure of hepatitis C virus-infected patients involves a dynamic interplay among three important molecular players in lipid homeostasis: Circulating microRNA (miR)-24, miR-223, and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 [J]. *EBioMedicine*, 2017, 23(9): 68-78.

(此文编辑 曾学清)