

本文引用: 吕萍, 潘杭雨, 林荣湛, 等. 长链非编码 RNA lncLEPIS 对血脂和动脉粥样硬化的影响及机制研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(6): 483-489.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-06-0483-07

· 实验研究 ·

长链非编码 RNA lncLEPIS 对血脂和动脉粥样硬化的影响及机制研究

吕萍¹, 潘杭雨¹, 林荣湛¹, 李钦贤¹, 郭凯², 郭志刚¹

(1. 南方医科大学南方医院心内科, 广东省广州市 510515; 2. 广东省第二人民医院心内科, 广东省广州市 510310)

[关键词] 长链非编码 RNA; lncLEPIS; 血脂; 动脉粥样硬化; 脯氨酸/丝氨酸丰富卷曲螺旋蛋白 1

[摘要] 目的 探究脯氨酸/丝氨酸丰富卷曲螺旋蛋白 1 介导的长链非编码 RNA(lncLEPIS)过表达对血脂水平以及动脉粥样硬化发生发展的影响。方法 16 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为对照组(NC 组)和 lncLEPIS 过表达组(lncLEPIS 组), 构建肝脏过表达 lncLEPIS 的高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠模型。采用油红 O 染色评估小鼠主动脉粥样硬化斑块, 用酶标法检测血脂水平, 用实时荧光定量 PCR 检测胆固醇代谢相关基因的 mRNA 表达水平。结果 NC 组和 lncLEPIS 组的斑块面积/主动脉面积分别为(18.6%±0.3%)、(28.0%±1.3%), 斑块面积/主动脉根部横截面积分别为(7.5%±0.2%)、(17.8%±0.3%), 两组比较, 差异具有显著性($P<0.05$)。NC 组和 lncLEPIS 组小鼠血浆甘油三酯水平分别为(0.65±0.07) mmol/L、(0.96±0.21) mmol/L, 总胆固醇水平分别为(3.56±0.71) mmol/L、(7.36±0.65) mmol/L, 高密度脂蛋白胆固醇水平分别为(1.46±0.05) mmol/L、(1.95±0.38) mmol/L, 低密度脂蛋白胆固醇水平分别为(2.59±0.35) mmol/L、(5.59±0.59) mmol/L, 两组比较, 差异具有显著性($P<0.05$)。与 NC 组相比, lncLEPIS 组小鼠肝脏低密度脂蛋白受体(LDLR)表达水平下调 48.4%, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)表达水平上调 62.8% ($P<0.05$)。结论 lncLEPIS 过表达降低 LDLR 表达, 促进 PCSK9 表达, 升高血浆 LDLC 水平, 促进动脉粥样硬化发生发展。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Effect and mechanism of long non-coding RNA lncLEPIS on blood lipids and atherosclerosis

LYU Ping¹, PAN Hangyu¹, LIN Rongzhan¹, LI Qinxian¹, GUO Kai², GUO Zhigang¹

(1. Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China;

2. Department of Cardiology, Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510310, China)

[KEY WORDS] long non-coding RNA; lncLEPIS; blood lipid; atherosclerosis; proline/serine rich coiled coil protein 1

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of proline/serine rich coiled coil protein 1-mediated long non-coding RNA (lncLEPIS) overexpression on blood lipid levels and the occurrence and development of atherosclerosis. **Methods** 16 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into control group (NC group) and lncLEPIS overexpression group (lncLEPIS group), and ApoE^{-/-} mice fed with high-fat diet with liver lncLEPIS overexpression were constructed. Atherosclerotic plaques in mouse aorta were assessed by oil red O staining. Blood lipid levels were detected by enzyme labeling method. The mRNA expression levels of cholesterol metabolism-related genes were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The plaque area/aortic area in the NC group and the lncLEPIS group were (18.6%±0.3%) and (28.0%±1.3%), and the plaque area/aortic root cross-sectional area were (7.5%±0.2%) and (17.8%±0.3%), the differences between the two groups was significant ($P<0.05$). The plasma triglyceride levels of the mice in the NC group and the lncLEPIS group were (0.65±0.07) mmol/L and (0.96±0.21) mmol/L, the total cholesterol levels were (3.56±0.71) mmol/L and (7.36±0.65) mmol/L, the high density lipoprotein cholesterol levels were (1.46±0.05) mmol/L and (1.95±

[收稿日期] 2021-07-31

[修回日期] 2021-12-22

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81900398); 广东省自然科学基金面上项目(2019A1515010666)

[作者简介] 吕萍, 博士研究生, 研究方向为胆固醇与动脉粥样硬化, E-mail 为 mangmang_2019@126.com。通信作者郭志刚, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 guozhigang126@126.com。通信作者郭凯, 博士, 研究方向为长链非编码 RNA 与动脉粥样硬化, E-mail 为 guokai154556@i.smu.edu.cn。

0.38) mmol/L, and the low density lipoprotein cholesterol levels were (2.59±0.35) mmol/L and (5.59±0.59) mmol/L, the differences between the two groups were significant ($P<0.05$). Compared with the NC group, the expression level of low density lipoprotein receptor (LDLR) in the liver of mice was down-regulated by 48.4% in the lncLEPIS group, and the expression level of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) was up-regulated by 62.8% ($P<0.05$).

Conclusion Overexpression of lncLEPIS reduces the expression of LDLR, promotes the expression of PCSK9, increases the level of plasma LDLC, and promotes the occurrence and development of atherosclerosis.

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是导致死亡的主要原因,尤其在西方发达国家^[1]。在进行最佳生活方式干预和强化降脂治疗后,CVD 的残余风险仍然较高^[2],因此寻求全新的降脂治疗新靶点迫在眉睫。越来越多的研究表明,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 虽然不编码蛋白质,但是在许多生物学过程中发挥重要的调控作用,也是 CVD 的重要调控靶点^[3-5]。人类全基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS) 认为脯氨酸/丝氨酸丰富卷曲螺旋蛋白 1 (proline/serine rich coiled coil protein 1, PSRC1) 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 疾病的风险有关,其主要与血浆低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平有关^[5]。Guo 等^[5] 的前期研究揭示了 PSRC1 过表达通过影响肝脏胆固醇代谢和减少炎症反应发挥抗 As 作用,因此 PSRC1 介导的 lncRNA 可能会成为调节肝脏胆固醇代谢和抑制 As 发生发展的新靶点。上述过表达 PSRC1 的小鼠肝脏全转录组测序显示 64 个 lncRNA 上调和 25 个 lncRNA 下调^[6],将其中下调最显著的 lncRNA 命名为 lncLEPIS (liver expressions by PSRC1 induce specifically)。本研究重点探讨 lncLEPIS 对小鼠肝脏胆固醇代谢及主动脉 As 的影响及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

小鼠购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 (动物合格证编号:2020228Abzz0619000815);高脂高胆固醇饲料 (胆固醇含量 1.2%) 委托加工单位为广东省实验动物中心 (加工编号:20200616);油红 O 染色试剂购自上海源叶生物科技有限公司 (货号:S19039-10g);过表达 lncLEPIS 的腺相关病毒 8 (AAV8-lncLEPIS) 技术包装委托单位为上海联峰/广州尤茗生物科技有限公司 (合同编号:YMSW20201030001);甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、LDLC、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 试剂盒购自南京建成生物公司 (货号分别为 CV-002-200-EX-

1_430639、FSA02-500_3548);Trizol 试剂购自赛默飞世尔科技公司 (货号:15596018);Evo M-MLV 反转录试剂预混液购自广州瑞真生物科技有限公司 (货号:AG11706);SYBR Green Pro Taq HS 预混型实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RQ-PCR) 试剂盒购自广州瑞真生物科技有限公司 (货号:AG11701)。

1.2 动物与饮食

20 只 8 周龄的载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠用普通饲料过渡饲养 1 周后,再以高脂饲料喂养 2 个月,随机取 4 只 ApoE^{-/-} 小鼠,分离主动脉后用油红 O 染色。确认 As 模型构建成功后,将其余的 16 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为对照组 (NC 组) 和 lncLEPIS 过表达组 (lncLEPIS 组),NC 组小鼠尾静脉注射 200 μ L 对照病毒 (将 10¹¹ PFU 的对照病毒稀释在 200 μ L 生理盐水中),lncLEPIS 组小鼠尾静脉注射过表达 lncLEPIS 的腺相关病毒 8 (AAV8-lncLEPIS) (将 10¹¹ PFU 的 AAV8-lncLEPIS 病毒稀释在 200 μ L 生理盐水中),两组小鼠都继续高脂喂养 6 周。6 周后,取上述小鼠,用 0.5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,取主动脉根部做横截面的冰冻切片;取心尖血检测血脂;取肝脏冻于 -80 $^{\circ}$ C 或用于检测胆固醇代谢相关基因的 mRNA 表达水平;在显微镜下分离出小鼠的主动脉 (升主动脉到髂动脉部分),取出的主动脉放在 4% 多聚甲醛溶液中固定。

1.3 油红 O 染色评估动脉粥样硬化

上述主动脉在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,取出用于油红 O 染色。将 1 g 油红 O 粉剂充分溶解在 100 mL 60% 异丙醇溶液中,避光充分混匀并缓慢过滤。从多聚甲醛溶液中取出主动脉,在上述配制好的油红 O 工作液中浸染 15 min,待主动脉斑块部分被染成红色后取出,在 60% 异丙醇溶液中分化 1 ~ 2 min,直至除斑块外背景呈白色为止,取出主动脉置于磷酸盐缓冲液中终止分化。在蓝色背景下,用相机记录斑块的油红 O 染色结果。取上述小鼠的主动脉根部的横截面冰冻切片,在 4% 多聚甲醛中固定 10 min,流水缓慢冲洗后用 60% 异丙醇浸染,后用上述油红 O 工作液染色 10 min,蒸馏水洗干净

后苏木精染色,再用自来水洗至返蓝,封片后显微镜下观察。

1.4 血脂水平测定

上述小鼠暴露心脏后,用 1 mL 注射器穿刺左心室心尖部,缓慢抽取 0.6~1.0 mL 血液,3 000 r/min 离心 15 min 后缓慢抽取上清,保存在-80 ℃或者直接用于测量血浆中血脂的水平。按照南京建成血脂检测试剂盒说明书操作,酶标仪测定分光光度值并校正。

1.5 通过 GeneCards 初步筛选与高脂血症相关的基因

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>),以“高胆固醇血症 (hypercholesterolemia)”为关键词,检索到与“高胆固醇血症”相关的 1 730 条结果,根据数据库自动计算显示的相关性评分,分数越高,相关性越强,初步筛选出了与高胆固醇血症相关性排名前 25 的基因(包括只转录 RNA 的基因、可编码蛋白质的基因以及一些生物区域)。后续在这 25 个基因中选择部分基因来验证其在 lncLEPIS 过表达情况下的变化。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测胆固醇代谢相关基因表达水平

取上述小鼠的肝脏,加入适量 Trizol,用研磨仪研碎后加入适量氯仿溶液(Trizol 与氯仿溶液体积比为 5:1),充分震荡混匀后冰上静置 10 min,12 000 r/min 低温离心 15 min,抽取上清,并加入等量异丙醇,振荡混匀后 4 ℃静置 15 min,12 000 r/min 低温离心 15 min,弃去上清后加入适量 75% 冷乙醇,

7 500 r/min 低温离心 10 min 后弃去上清,待残余乙醇挥发后加入适量无酶水。采用 Evo M-MLV 反转录试剂预混液将 RNA 反转录为更为稳定的 cDNA,采用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 RQ-PCR 试剂盒进行定量。

1.7 数据分析

主动脉斑块面积采用 Image J 进行评估,主动脉斑块面积、主动脉根部斑块横截面积、血脂水平等数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有统计数据用 Graphpad 8.0 分析,两组之间的比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncLEPIS 过表达小鼠的主动脉斑块更显著

首先,取 NC 组和 lncLEPIS 组小鼠的肝脏验证模型效果,RQ-PCR 结果显示 lncLEPIS 组小鼠肝脏 lncLEPIS 表达水平较 NC 组上调 163% ($P < 0.05$;图 1A)。通过主动脉大体油红 O 染色可以看到,与 NC 组相比,lncLEPIS 组 ApoE^{-/-} 小鼠 As 斑块更显著(图 1B);NC 组和 lncLEPIS 组的斑块面积/主动脉面积分别为(18.6% ± 0.3%)、(28.0% ± 1.3%),差异具有显著性($P < 0.05$;图 1D 左)。通过主动脉根部横截面油红 O 染色可见,与 NC 组相比,lncLEPIS 组 As 斑块更为显著(图 1C);NC 组和 lncLEPIS 组的斑块面积/主动脉根部横截面积分别为(7.5% ± 0.2%)、(17.8% ± 0.3%),差异具有显著性($P < 0.05$;图 1D 右)。

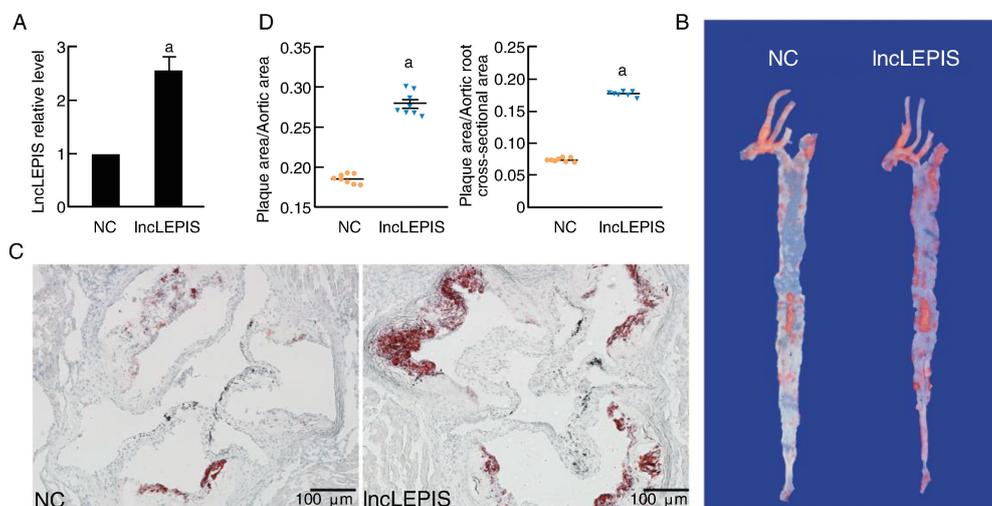


图 1. 主动脉和主动脉根部的油红 O 染色

图 A 为小鼠肝脏 lncLEPIS 表达水平;图 B 为主动脉斑块油红 O 染色;图 C 为主动脉根部横截面油红 O 染色;图 D,左为斑块面积/主动脉面积的统计结果,右为斑块面积/主动脉根部横截面积的统计结果。a 为 $P < 0.05$,与 NC 组相比。

Figure 1. Oil red O staining of aorta and aortic root

2.2 lncLEPIS 过表达小鼠的血脂水平

NC 组和 lncLEPIS 组小鼠血浆 TG 水平分别为 (0.65 ± 0.07) mmol/L、 (0.96 ± 0.21) mmol/L, TC 水平分别为 (3.56 ± 0.71) mmol/L、 (7.36 ± 0.65) mmol/L,

HDLC 水平分别为 (1.46 ± 0.05) mmol/L、 (1.95 ± 0.38) mmol/L, LDLC 水平分别为 (2.59 ± 0.35) mmol/L、 (5.59 ± 0.59) mmol/L, 两组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$; 图 2)。

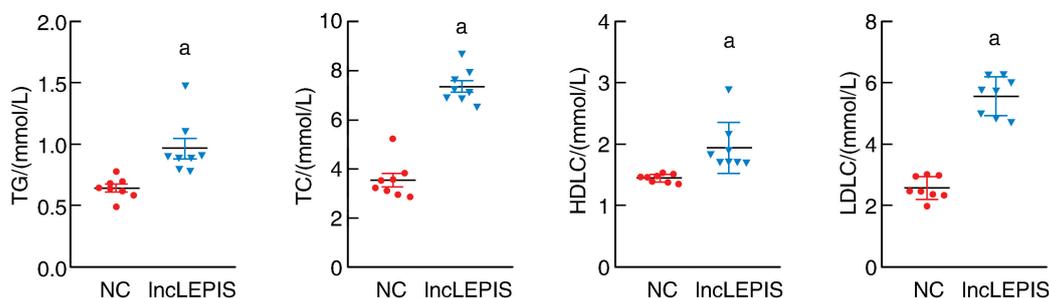


图 2. 两组血浆 TG、TC、HDLC、LDLC 水平比较

a 为 $P < 0.05$, 与 NC 组相比。

Figure 2. Comparison of plasma TG, TC, HDLC and LDLC levels between the two groups

2.3 与高胆固醇血症相关的基因

上一部分的研究结果表明, lncLEPIS 过表达导致小鼠循环中血脂水平升高, 促进小鼠 As。众所周知, 高胆固醇血症是 As 的重要影响因素, 为了进一步探究本研究中上述现象的可能原因, 首先在 CeneCards 数据库中以“高胆固醇血症”为关键词, 初步筛选出与之相关的基因并按照相关性排序 (表 1); 然后结合胆固醇代谢的相关文献, 筛选出相关性排序前 25 的部分基因进行 RQ-PCR 验证, 从而初步探索 lncLEPIS 过表达小鼠中肝脏胆固醇代谢相关基因的变化, 为上述现象的机制探索提供思路。

2.4 lncLEPIS 影响小鼠肝脏胆固醇代谢相关基因 mRNA 的表达

通过查阅胆固醇代谢的经典文献得知, 低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 介导的 LDL 的内吞作用在机体的胆固醇稳态中发挥着重要作用, 而前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9) 对 LDLR 的降解具有调控作用; 同时, 载脂蛋白 A2 (apolipoprotein A2, ApoA2)、ATP 结合盒转运体 (ATP-binding cassette transporter, ABC) A1、ABCG5、ABCG8、清道夫受体 B1 (scavenger receptor-B1, SR-B1) 等在胆固醇转运的过程中具有重要作用^[7]。因此, 结合上述 CeneCards 中筛选出的相关基因, 筛选出了部分与胆固醇代谢相关的基因进行 RQ-PCR 验证, 引物序列见表 2。

表 1. 与高胆固醇血症相关的基因

Table 1. Genes related to hypercholesterolemia

基因	描述	相关性
LDLR	低密度脂蛋白受体	153.328 277 60
ApoB	载脂蛋白 B	139.924 057 00
PCSK9	前蛋白转化酶枯草溶菌素 9	103.470 977 80
LDLRAP1	低密度脂蛋白受体衔接蛋白 1	68.861 831 67
LDLR-AS1	低密度脂蛋白受体反义 RNA1	50.786 098 48
LOC106560211	载脂蛋白 B5'调节区域	39.402 446 75
miR-6886	microRNA-6886	37.194 309 23
ApoA2	载脂蛋白 A2	33.723 873 14
GHR	生长激素受体	28.945 926 67
DOCK6	DOCK6 (与细胞分裂相关)	28.377 841 95
EPHX2	环氧化物水解酶 2	28.229 448 32
SMARCA4	SWI/SNF 相关的基质相关的染色质肌动蛋白依赖性调节剂	27.756 637 57
ApoE	载脂蛋白 E	25.700 126 65
ABCG5	ATP 结合盒转运体 G5	25.081 382 75
ABCG8	ATP 结合盒转运体 G8	24.785 804 75
PPP1R17	蛋白磷酸酶 1 调节因子亚基 17	21.084 278 11
HMGCR	3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶	19.627 059 94
LPL	脂蛋白脂肪酶	19.557 273 86
CYP7A1	细胞色素 P450 家族 7 亚家族 A 成员 1	16.812 513 35
CETP	胆固醇酯转移蛋白	14.961 018 56
ApoA1	载脂蛋白 A1	12.599 190 71
ABCA1	ATP 结合盒转运体 A1	12.520 278 93
EGID-106632268	ApoB 3' 支架/基质附着区域	12.305 828 09
Lp(a)	脂蛋白 (a)	11.855 033 87
COG2	低聚高尔基复合体 2 的成分	11.576 935 77

表 2. 部分基因的引物序列
Table 2. Primer sequences of partial genes

基因	引物序列(5'-3')
LDLR	F:GCAGCCACATGGTATGAGGTTCC R:TGATGTTCTTCAGCCGCCAGTTC
PCSK9	F:AGCAGCCAGGTGGAGGTGTATC R:GCCTGTCTGTGGAAGCGTGC
ApoA2	F:CCTGCGGCTAAGTGAGATGTGC R:AAACAGGCAGAAGGTAGGGAGAGG
ABCA1	F:CGAGGGCTCATCGACATGGT R:AGAACACCACCCCTTCCACG
ABCG5	F:GACAGGCAGGAAAGGGTTAATGGG R:CACAAGGGTCGCAGATGGAATCC
ABCG8	F:ACGGTGGCAAGATGAAATCAGGAC R:GGTCAGGTTGGCAGCAGTTG
SR-B1	F:GCAAATTTGGCCTGTTTGT R:GATCTTGCTGAGTCCGTTCC

与 NC 组相比,IncLEPIS 组小鼠肝脏 LDLR 表达水平下调 48.4%,PCSK9 上调 62.8%,ApoA2 上调 65.0%,ABCA1 下调 47.6%,ABCG5 下调 64.2%,

ABCG8 下调 62.9%,SR-B1 下调 52.6% ($P<0.05$;图 3)。

3 讨论

PSRC1 作为与 As 密切相关的基因已经为人所知,关于其介导的 lncRNA 的研究却仍较为匮乏。lncRNA 虽然不具备蛋白编码功能,但是作为分子信号调节基因的表达和功能同样在 As 过程中发挥重要作用。Zhou 等^[8]使用来自死于心脏病发作的受试者的冠状动脉作为样本,通过 RNA 测序鉴定出 68 个决定不同 As 程度的差异表达的 lncRNA。除此之外,lncRNA H19 通过调节丝裂原活化蛋白激酶和核因子 κ B 通路促进 As^[9];lncRNA TUG1 可以促进血管平滑肌细胞的增殖和 As 的进展^[10]。本研究重点探究了 lncLEPIS 对血脂水平的影响和在 As 中的作用,结果表明,在高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠模型中,lncLEPIS 过表达升高血脂水平,促进 As 的发展,这可能与促进肝脏 PCSK9 的表达、降低 LDLR 的表达进而影响胆固醇的代谢有关。

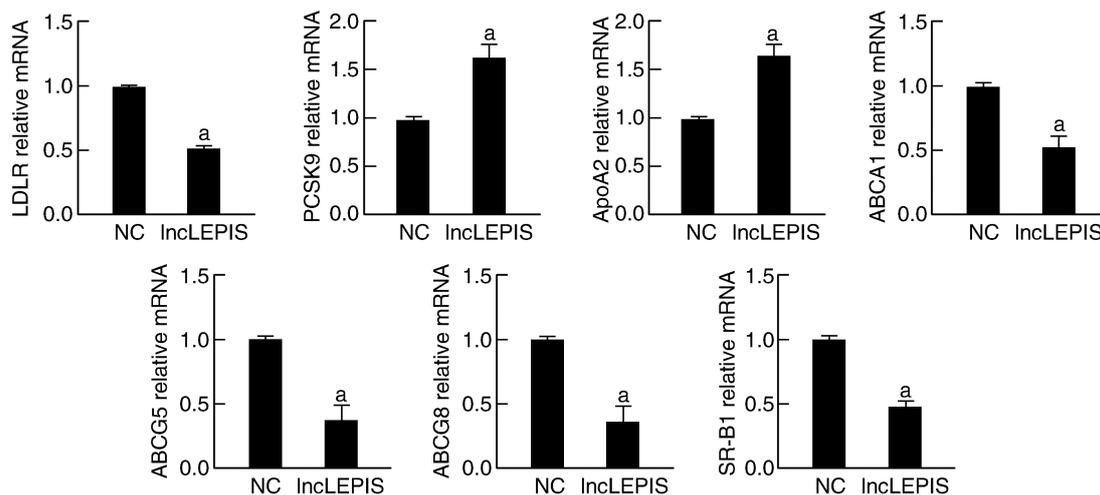


图 3. 小鼠肝脏胆固醇代谢相关基因的 mRNA 表达水平

a 为 $P<0.05$,与 NC 组相比。

Figure 3. The mRNA expression levels of genes related to cholesterol metabolism in mouse liver

在 As 的病理过程中,LDLC 一直是研究的重点。研究表明,氧化型低密度脂蛋白胆固醇在血管壁沉积,促进血管平滑肌细胞的增殖、迁移及泡沫细胞的形成,这是 As 形成的核心过程^[11-12]。在本研究中,IncLEPIS 组高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠血浆中更高的 LDLC 水平导致更显著的 As 斑块。PCSK9 主要是由肝脏细胞分泌的蛋白,它可以与肝细胞表面的 LDLR 结合,PCSK9-LDLR 复合物通过网格蛋

白包被的囊泡被内吞,PCSK9 与 LDLR 的相互作用随着体内 pH 值的降低而加强,阻止 LDLR 回到细胞表面,PCSK9-LDLR 复合物最终在溶酶体中被降解^[7],从而抑制 LDLR 的再循环,导致原本与 LDLR 结合并被清除的 LDLC 滞留在循环中,造成血浆中 LDLC 水平的升高,进而促进 As。目前大多数 GWAS 并未报告 ABCA1 与 TG,LDLC 水平相关的基因座,虽然有少数独立研究指出了 ABCA1 遗传变异

与二者水平相关,但是目前尚未得到一致认可^[13]。ABCG家族中,除ABCG2外,几乎所有成员在胆固醇外排中具有重要作用,ABCG5和ABCG8主要表达在肝脏和肠道中,介导胆固醇经胆汁和肠道排泄^[14]。本研究中,lncLEPIS组小鼠肝脏ABCG5和ABCG8的表达水平降低,这与其更显著的As程度是一致的。因此,lncLEPIS组小鼠更为显著的As除了归因于PCSK9及其引起的LDLR水平的变化,还与肝脏ABCG5、ABCG8表达水平的降低相关。

流行病学研究及分子机制研究均已证实,HDL通过逆向转运胆固醇从而起到抗As的作用^[5,15-16]。在既往认知中,循环中HDL(通常认为是“好的胆固醇”)与CVD的风险呈负相关^[17],但是在本研究中,高脂喂养的lncLEPIS组ApoE^{-/-}小鼠表现出循环中HDL的显著升高。通过文献研究发现,循环中HDL的水平并非预测CVD病变程度及风险的良好指标。有研究指出,胆固醇酯转移蛋白抑制剂可以将循环中HDL的浓度提升30%~70%,但Torcetrapib和Dalcetrapib在3期临床试验中被证明对减少急性冠状动脉综合征患者的复发性心血管事件无效^[18-20]。Madsen等^[21]在2017年发表了一项纳入52268名男性和64240名女性的前瞻性研究,结果显示HDL极高或者极低都与全因死亡率升高有关,其中男性、女性的HDL浓度分别为1.9mmol/L、2.4mmol/L时全因死亡率最低。Ronsein等^[22]报道,在SR-B1基因中携带P376L错义突变的纯合子受试者中,尽管循环中HDL的水平增加,但该突变与冠心病风险增加相关。有临床研究指出,HDL/ApoA1比值与合并糖尿病的急性冠状动脉综合征患者狭窄的冠状动脉数量呈正相关^[17]。这些研究都表明,单用HDL水平预测CVD并不准确,这可能与HDL功能障碍与重塑相关。因此,lncLEPIS组ApoE^{-/-}小鼠更严重的As病变的形成可能与循环中升高的LDLC水平有关,升高的HDL水平发挥的抗As作用似乎不大。

本研究检测了HDL依赖性胆固醇逆向转运过程中重要的蛋白SR-B1,结果显示lncLEPIS组小鼠肝脏SR-B1的水平较NC组显著降低。研究证实,SR-B1具有介导HDL相关脂质选择性摄取的能力。肝细胞上表达的SR-B1通过选择性摄取HDL来清除循环中的胆固醇,而被摄取的胆固醇在肝脏合成胆汁酸,进而随胆汁排泄^[21,23]。对基因敲除小鼠的研究表明,无论是全身SR-B1的敲除,还是靶向肝脏SR-B1的特异性敲除,均会导致循环中HDL水平的增加,随后动脉壁内滞留的胆固醇增加,进

而促进小鼠As的发展^[24-25]。对人SR-B1生理功能的研究并不充分而确定,其基因多态性会影响HDL的水平,但是对As的影响却比较小^[24]。本研究中显著降低的SR-B1是循环中HDL水平升高的重要因素,但是造成两组小鼠之间肝脏SR-B1表达水平差异的原因尚有待探索。

此外,两组高脂喂养的ApoE^{-/-}小鼠的部分肝脏胆固醇代谢相关基因的差异或许可以为血浆HDL水平的升高提供依据。在本研究中,过表达lncLEPIS的高脂喂养的ApoE^{-/-}小鼠肝脏PCSK9水平较NC组明显升高。目前关于小鼠和非灵长类动物的多项研究表明,PCSK9与HDL的代谢相关。Choi等^[26]的研究证明,PCSK9失活会降低血清中HDL浓度和胆固醇流出能力,但是这一现象对As的早期发展没有显著影响。有研究证实,ApoA2过度表达会提高动物模型中HDL的水平,但是这种升高对冠状动脉疾病并没有起到拮抗的作用^[27]。一项对伊朗人的横断面研究显示,ApoA2的一种突变(Ala98Pro)会导致极高水平的HDL^[28]。本研究中lncLEPIS组升高的ApoA2水平或许是其HDL升高的另一大原因。

ABCA1在胆固醇逆向转运和HDL代谢过程中的作用已得到公认。在丹吉尔病(Tangier氏病)中,ABCA1的突变和血浆中极低HDL水平相关^[13]。ABCA1在各种细胞中表达,而ApoA1主要在肝脏和肠道合成。有研究证实,在肠道ABCA1缺失的小鼠模型中,血浆HDL水平显著降低,这表明除肝脏外,肠道ABCA1成为了HDL生成过程中第二关键的参与者,其对血浆HDL水平有30%的贡献^[29-30]。本研究中,肝脏ABCA1表达降低的同时,血浆HDL水平升高,这表明升高的HDL可能是由于肠道ABCA1介导的胆固醇流出导致的。一项针对墨西哥高脂血症患者的研究报告显示^[13],在携带ABCA1/R230C变异的绝经前妇女中,碳水化合物摄入量与HDL水平之间的负相关性更高;携带ABCA1/R230C变异体的患者对旨在增加血浆HDL浓度的膳食组合治疗有更好的反应;表明基因-饮食相互作用在个体间脂质水平变化中发挥着重要作用。除了肝脏ABCA1及其遗传变异外,膳食方案及肠道ABCA1水平亦对循环中HDL水平具有关键性作用,这部分解释了本研究中肝脏ABCA1和循环中HDL水平的不一致性。

综上所述,PSRC1介导的lncLEPIS过表达促进了PCSK9的表达,抑制了LDLR的表达,提升了循环中LDLC的水平,因此促进了As的发生发展。同

时,循环中 HDLC 水平也表现出升高,其升高的原因考虑与 SR-B1、ApoA2、ABCA1 等有关。本研究局限于 lncLEPIS 过表达带来的部分胆固醇代谢相关基因的变化以及生物学效应,具体机制有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] KONG W J, LIU J, JIANG J D. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2006, 84(1): 29-36.
- [2] BAIGENT C, BLACKWELL L, EMBERSON J, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a Meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomized trials[J]. *Lancet*, 2010, 376(9753): 1670-1681.
- [3] REN K, XU X D, YU X H, et al. LncRNA-modulated autophagy in plaque cells: a new paradigm of gene regulation in atherosclerosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(21): 22335-22349.
- [4] SIMION V, ZHOU H, HAEMMIG S, et al. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6135.
- [5] GUO K, HU L, XI D, et al. PSRC1 over-expression attenuates atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice by modulating cholesterol transportation and inflammation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 116: 69-80.
- [6] WEI M Q, LI P, GUO K, et al. The impact of PSRC1 overexpression on gene and transcript expression profiling in the livers of ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 465(1-2): 125-139.
- [7] LUO J, YANG H, SONG B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 225-245.
- [8] ZHOU Y Q, ZHANG S, JI W F, et al. LncRNA landscape of coronary atherosclerosis reveals differentially expressed lncRNAs in proliferation and migration of coronary artery smooth muscle cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 656636.
- [9] PAN J X. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2): 322-328.
- [10] LI F P, LIN D Q, GAO L Y. LncRNA TUG1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cell and atherosclerosis through regulating miRNA-21/PTEN axis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7439-7447.
- [11] 冯若男, 周华. PCSK9 与动脉粥样硬化性心血管疾病的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(12): 1095-1099.
- [12] 姚雅洁, 蔡恒. PCSK9 抑制剂 Evolocumab 与动脉粥样硬化性心血管疾病的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2020, 41(12): 1285-1289.
- [13] JACOBO-ALBAVERA L, DOMÍNGUEZ-PÉREZ M, MEDINA-LEYTE D J, et al. The role of the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) in human disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1593.
- [14] LIU X D. ABC family transporters[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 13-100.
- [15] 吕昕儒, 魏伟, 王夏蕾, 等. 基于胆固醇逆转探讨论泽泻白术配伍改善 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 286-294.
- [16] 王冲, 李月红, 王贵松. 血清淀粉样蛋白 A 与冠心病合并糖尿病患者高密度脂蛋白胆固醇外流能力的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(5): 417-422.
- [17] SUN L Z, GUO M Y, XU C B, et al. HDL-C/ApoA-I ratio is associated with the severity of coronary artery stenosis in diabetic patients with acute coronary syndrome [J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 6689056.
- [18] SCHWARTZ G G, OLSSON A G, ABT M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(22): 2089-2099.
- [19] BARTER P J, CAULFIELD M, ERIKSSON M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(21): 2109-2122.
- [20] DAS NEVES M F, BATUCA J R, ALVES J D. The role of high-density lipoprotein in the regulation of the immune response: implications for atherosclerosis and autoimmunity [J]. *Immunology*, 2021, 164(2): 231-241.
- [21] MADSEN C M, VARBO A, NORDESTGAARD B G. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(32): 2478-2486.
- [22] RONSEIN G E, VAISAR T. Inflammation, remodeling, and other factors affecting HDL cholesterol efflux [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(1): 52-59.
- [23] KAJANI S, CURLEY S, MCGILLICUDDY F C. Unravelling HDL-looking beyond the cholesterol surface to the quality within [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1971.
- [24] SHEN W J, AZHAR S, KRAEMER F B. SR-B1: a unique multifunctional receptor for cholesterol influx and efflux [J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 95-116.
- [25] ZHANG W, YANCEY P G, SU Y R, et al. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, 108(18): 2258-2263.
- [26] CHOI S, ALJAKNA A, SRIVASTAVA U, et al. Decreased APOE-containing HDL subfractions and cholesterol efflux capacity of serum in mice lacking PCSK9 [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 112.
- [27] BANDARIAN F, DANESHPOUR M S, HEDAYATI M, et al. Identification of sequence variation in the apolipoprotein A2 gene and their relationship with serum high-density lipoprotein cholesterol levels [J]. *Iran Biomed J*, 2016, 20(2): 84-90.
- [28] PATHTHINIGE C S, SIRISENA N D, DISSANAYAKE V. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia: a comprehensive literature review [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 103.
- [29] TIMMINS J M, LEE J Y, BOUDYGUINA E, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of ApoA-I [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1333-1342.
- [30] BRUNHAM L R, KRUIT J K, IQBAL J, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(4): 1052-1062.

(此文编辑 曾学清)