

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2015)23-08-0774-05

miR-152 通过抑制低密度脂蛋白受体表达 减少肝细胞的脂质摄取

方勇¹, 曾海燕², 吕运成³

(南华大学 1. 附属第二医院病理科, 2. 附属第二医院心内科, 3. 临床应用解剖研究室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] miR-152; 低密度脂蛋白受体; 肝细胞; 脂质摄取; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨 miR-152 对 HepG2 细胞低密度脂蛋白受体(LDLR)表达及其脂质摄取能力的影响。**方法** 生物信息学预测 miR-152 与 LDLR 3' UTR 的结合关系, 荧光素酶报告基因检测 miR-152 与 LDLR 的结合情况。HepG2 细胞中转染 miR-152 mimic 或 inhibitor 后, Western Blot 检测 LDLR 蛋白水平, 油红 O 染色观察 HepG2 细胞内脂滴情况。**结果** 生物信息学预测表明 miR-152 与人 LDLR 3' UTR 的 872-878 位结合, 且二者结合的自由能较低。miR-152 显著抑制荧光素酶的活性及 HepG2 细胞 LDLR 蛋白的表达。miR-152 明显抑制 HepG2 细胞对脂质的摄取, 而 anti-miR-152 则刚好出现相反的结果。**结论** miR-152 通过沉默 LDLR 表达抑制肝细胞的脂质摄取。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

MiR-152 Inhibits Hepatocyte Lipid Uptake by Targeting Low Density Lipoprotein Receptor

FANG Yong¹, ZENG Hai-Yan², and LV Yun-Cheng³

(1. Pathology Department of the Second Affiliated Hospital, 2. Cardiology Department of the Second Affiliated Hospital, 3. Laboratory of Clinical Anatomy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] miR-152; Low Density Lipoprotein Receptor; Hepatocyte; Lipid Uptake; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of miR-152 on low density lipoprotein receptor (LDLR) expression and hepatocyte lipid uptake. **Methods** Bioinformatics websites predicted the combination of miR-152 with LDLR 3' UTR. Luciferase reporter assay confirmed the binding of miR-152 to LDLR 3' UTR. LDLR expression was measured by Western Bolt, and intracellular lipid droplet stained with oil red O in HepG2 cells transfected miR-152 mimic and inhibitor. **Results** MiR-152 was bound to the 872-878 sites within human LDLR 3' UTR, furthermore, their binding free energy was very low. MiR-152 obviously inhibited the luciferase activity and hepatocyte LDLR expression. Lipid uptake was dramatically suppressed in HepG2 cells treated with miR-152. The exactly opposite results were observed by anti-miR-152 treatment. **Conclusions** MiR-152 targets LDLR expression and inhibits hepatocyte lipid uptake.

血液中低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平增高是冠心病主要的独立危险因素之一, 血液 LDLC 水平升高不需要其他危险因素协同就足以促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展^[1]。因此, 维持血液中 LDLC 的正常水平对于动脉粥样硬化的防治具有重要意义。目前认为, 血液中 LDLC 水平主要是受到肝细胞表面低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein re-

ceptor, LDLR)调节^[2]。LDL 在一般情况下, 由肝细胞 LDLR 识别, 结合并内吞入细胞内, 到达溶酶体从而降解, 因此, 肝细胞 LDLR 表达量的改变对血液中 LDLC 水平起着关键作用。microRNA 是一类内源性长约 22 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA, microRNA 通过与靶基因的 3' 非翻译区(3' untranslated region region, 3' UTR)互补结合, 从而促进靶基因 mRNA 的降解和翻译的抑制, 在转录后水平调控靶

[收稿日期] 2015-04-28

[修回日期] 2015-06-15

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(14JJ2091); 湖南省教育厅资助科研项目(12C0339)

[作者简介] 方勇, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的病因及发病学, E-mail 为 5147698@qq.com。通讯作者吕运成, 博士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的病因及发病学, E-mail 为 anthony0723@163.com。

基因表达。多个文献表明,microRNA 通过调节脂质代谢相关蛋白在机体胆固醇动态平衡中发挥重要作用^[3,4]。本研究通过生物信息学分析预测出 miR-152 可与 LDLR 3' UTR 结合,并通过实验进一步观察了 miR-152 对 LDLR 表达的调控及其对肝细胞脂质摄取的影响,以期 microRNA 在动脉粥样硬化发生发展中的作用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与处理

HepG2 细胞与 293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养,37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中静置培养。HepG2 细胞处理前换用含 2 g/L 牛血清白蛋白的 DMEM 培养基,同时加入 50 mg/L ox-LDL 或 1 mCi/L [³H] 标记的胆固醇共孵育。

1.2 荧光素酶报告基因载体构建及荧光测定

获取 Genebank 收录的 LDLR 序列(登录号为 NM-000527),利用引物分析软件 Primer Premier 5.0 针对 LDLR 3' UTR 设计引物;以 HepG2 基因组 DNA 为模板行 PCR 扩增,并构建野生型 psiCHECK™-2-LDLR-WT 3' UTR 载体,同时对 psiCHECK™-2-LDLR-3' UTR 载体上带有的 miR-152 靶点序列进行 UGCACUG 到 UUACACC 的点突变,构建突变型 psiCHECK™-2-LDLR-Mut 3' UTR 表达载体。按实验分组进行转染,48 h 后裂解细胞,根据荧光素酶检测试剂盒提供的方法检测 hRluc 及 hLuc 的荧光强度,二者的比值反映 miR-152 与 LDLR 3' UTR 的结合情况。

1.3 Western Blot 检测 LDLR 表达

收集处理后的 HepG2 细胞,加入 RIPA 裂解液[主要成分为 50 mmol/L Tris (pH 7.4),150 mmol/L NaCl,1% NP-40,0.5% 脱氧胆酸钠,0.1% SDS,以及原钒酸钠、氟化钠、EDTA、Leupeptin 等多种抑制剂]

置冰上裂解 30 min,4℃ 离心 10 min,弃去沉淀。以 4:1 加入 5 × SDS 凝胶加样缓冲液,100℃ 加热 10 min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,200 mA 恒流湿转膜 2 h 后,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,按 1:1000 加入羊抗人 LDLR 一抗,4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,1:1000 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠抗羊二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次,用 Tanon 5500 免疫荧光检测系统激发荧光,Tanon MP 软件摄取图像,Tanon CAL 软件分析获取各条带的光密度值。

1.4 油红 O 染色

取无菌 6 孔培养板,每孔均放入消毒盖玻片,加 HepG2 细胞悬液 2 mL/孔,加入 50 mg/L ox-LDL 及相应处理因素共孵育 48 h,用 PBS 溶液轻轻洗涤细胞 2 次,加 4% 多聚甲醛固定细胞 5 min,以 PBS 溶液清洗 1 min 后,加稀释好的油红 O 工作液染色 15~20 min,以去离子水清洗 2~3 次,每次 1~2 min,50% 异丙醇镜下分色后,用苏木素染核 5~7 min 后去离子水清洗 5 min,用 0.5% 酒精快速分色并以流水返蓝后,在显微镜下观察并摄影,显示的鲜红色颗粒即为脂滴。

1.5 统计学分析

所有实验均重复 3 次。实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,由 SPSS 18.0 统计软件完成。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 生物信息学预测 miR-152 靶向结合 LDLR 3' UTR

多个 microRNA 靶标预测网站显示 miR-152 与 LDLR 3' UTR 靶向结合(图 1),提示 miR-152 与 LDLR 可能存在稳定的生理调控作用。RNAhybrid 网站分析人/鼠 miR-152 与 LDLR 3' UTR 结合自由能情况,结果显示 miR-152 与 LDLR 3' UTR 结合自由能较低(图 2)。

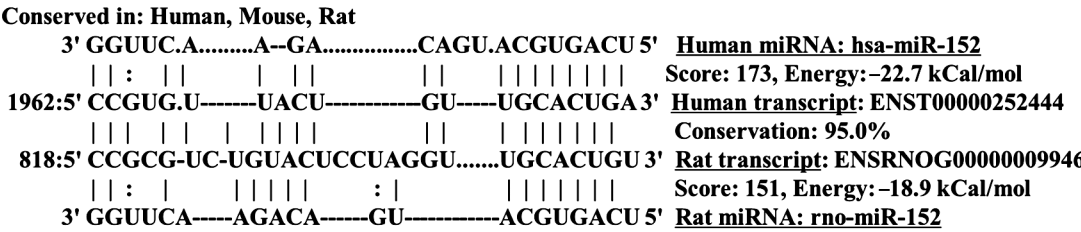


图 1. 人和鼠 miR-152 与 LDLR 3' UTR 结合情况 上部为人 miR-152,下部为鼠 miR-152。

Figure 1. Predicted annealing of human and murine miR-152 to the LDLR 3' UTR

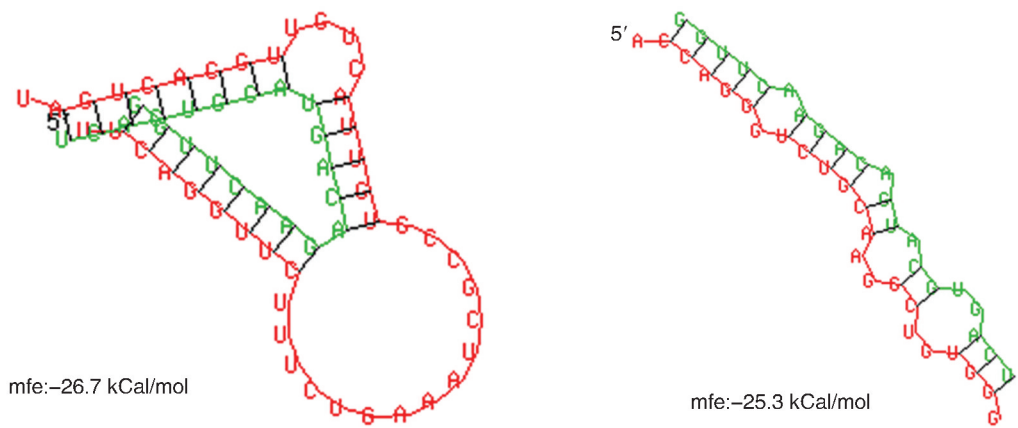


图 2. 人/鼠 miR-152 与 LDLR 3' UTR 结合自由能情况 左图为人 miR-152,结合位点为 872-878 位;右图为鼠 miR-152,结合位点为 757-764 位。

Figure 2. Schematic alignment of the free energy scores for miR-152-LDLR hybrids

2.2 荧光素酶报告基因分析 miR-152 靶向结合 LDLR 3' UTR

构建野生型及其突变型的 LDLR 3' UTR 荧光素酶报告基因表达质粒与 miR-152 mimic 共转染到 293T 细胞,发现 miR-152 明显抑制 psiCH™-2-LDLR-WT 3' UTR 的表达,对 psiCHECK™-2-LDLR-Mut 3' UTR 表达无影响,表明 miR-152 可靶向结合胞内 LDLR mRNA 的 3' UTR,从而抑制 LDLR 蛋白表达(图 3)。

2.3 miR-152 下调 HepG2 细胞 LDLR 蛋白表达

将 HepG2 细胞分为 3 组:在加入 50 mg/L ox-LDL 同时,(1)空白对照组,培养液中加入空脂质体;(2)miR-152 mimic 组:培养液中加入脂质体包裹的 40 nmol/L miR-152 mimic;(3)miR-152 inhibitor 组:培养液中加入脂质体包裹的 80 nmol/L miR-152 inhibitor。24 h 后 Western Blot 检测发现,miR-152 mimic 组 LDLR 蛋白表达较空白对照组明显降低,miR-152 inhibitor 组 LDLR 蛋白表达与空白对照组比较明显上调。表明 miR-152 可抑制肝细胞 LDLR 蛋白的表达(图 4)。

2.4 miR-152 抑制肝细胞脂质摄取

各组 HepG2 细胞用 50 mg/L 的 ox-LDL 孵育 24 h 后,油红 O 染色显色胞内脂滴。与空白对照组比较,miR-152 mimic 组 HepG2 细胞内脂滴稀少、体积也小,miR-152 inhibitor 组 HepG2 细胞内脂滴数量多、体积大。提示 miR-152 抑制肝细胞的脂质摄取(图 5)。

3 讨论

研究表明,miR-152 在肿瘤发生发展及糖尿病肾病形成等多种病理生理过程中扮演重要角色^[5-7]。

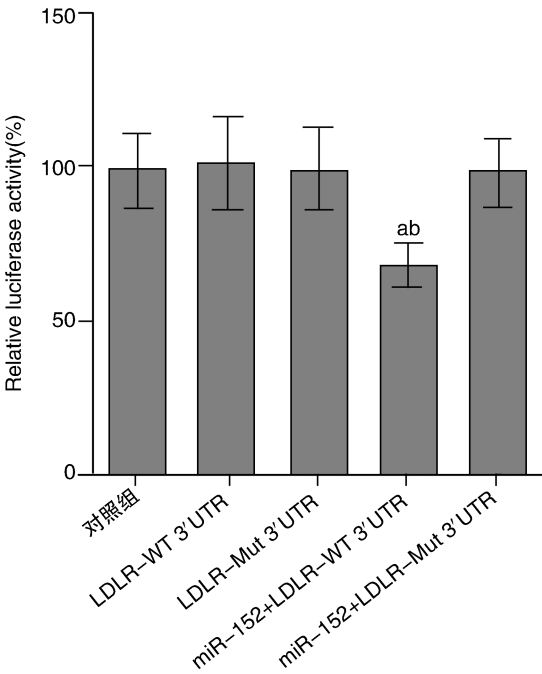


图 3. 人 miR-152 mimic 与 LDLR 3' UTR 荧光素酶报告基因载体共转染 293T 细胞后的相对荧光强度 a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 LDLR-WT 3' UTR 组比较。

Figure 3. Luciferase activity assay of 293T cells cotransfected with a luciferase reporter plasmid containing the LDLR 3' UTR (including wild type and mutation) and miR-152 mimic for 24 h

Bidzhekov 等^[8]发现 miR-152 在人动脉粥样硬化斑块中的表达明显高于正常血管,并提示 miR-152 的表达与动脉粥样硬化的发生发展相关。miR-152 在动脉粥样硬化中到底有何具体作用,取决于它所结合调控的靶标基因在动脉粥样硬化中的功能。为此,本研究采用生物信息学方法,利用多个在线数

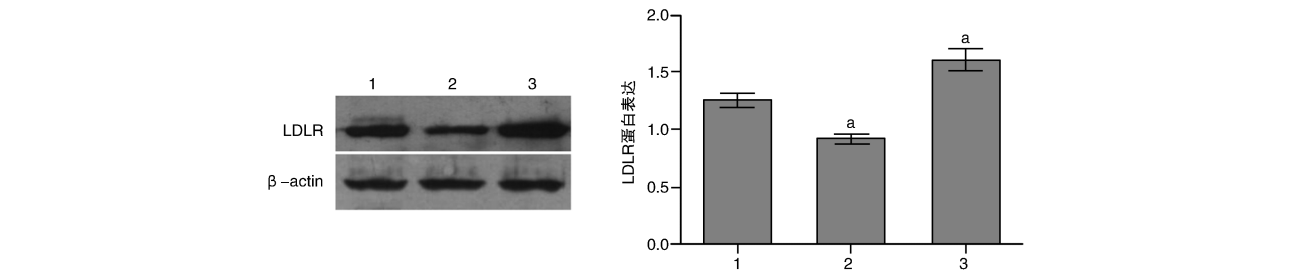


图 4. 转染 miR-152 mimic 及其 inhibitor 24 h 后 HepG2 细胞 LDLR 蛋白表达的变化 1 为空白对照组,2 为 miR-152 mimic 转染组,3 为 miR-152 inhibitor 转染组。a 为 $P < 0.05$,与空白对照组比较。

Figure 4. LDLR protein levels are assayed in HepG2 cells transfected with miR-152 mimic and inhibitor by Western Blot

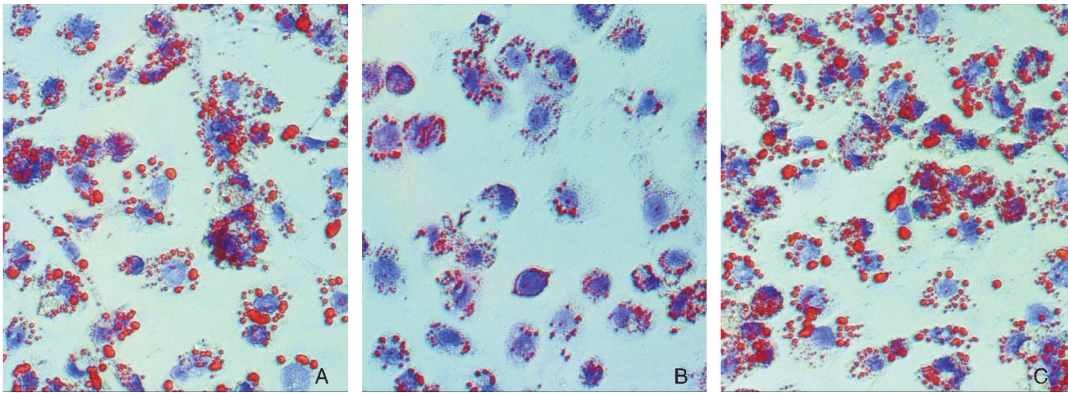


图 5. 转染 miR-152 mimic 及其 inhibitor 24 h 后 HepG2 细胞内脂滴的情况 A 为空白对照组,B 为 miR-152 mimic 转染组,C 为 miR-152 inhibitor 转染组。

Figure 5. Hepatocellular lipid droplet is dying with oil red O after transfected with miR-152 mimic and inhibitor

据库预测了 miR-152 的靶标基因,结果显示人、小鼠 LDLR 3' UTR 均存在 miR-152 的结合位点。进一步分析 miR-152 与 LDLR 3' UTR 的结合情况则发现 miR-152 与其结合位点互补配对较好,与人、小鼠的结合自由能较低,分别为 -26.7 kCal/mol、 -25.3 kCal/mol,明显低于 -10 kCal/mol。上述结果表明 miR-152 与 LDLR 3' UTR 具有结合的生物学基础,提示 miR-152 对 LDLR 的表达可能具有调控作用。

LDLR 的表达受到多个因素的调节。在转录水平,胆固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, SREBP)是 LDLR 主要的调节因子^[9],此外,有文献报道 DNA 甲基转移酶通过对 LDLR 启动子的甲基化修饰也可调节其表达^[10]。在转录后水平,近年来研究发现枯草溶菌素转化酶 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9)可靶向作用 LDLR 溶酶体降解途径,减少 LDLR 蛋白水平表达^[11],也有文献报道 IDOL 蛋白(inducible degrader of the low-density lipoprotein receptor)可以介导 LDLR 的泛素化,并在溶酶体降解^[12]。本课题组在生物信息学预测结果提示 miR-152 具有靶向调控

LDLR 3' UTR 的生物学基础上,利用荧光素酶报告基因系统进一步分析了 miR-152 对 LDLR 3' UTR 活性的影响,结果证实 miR-152 可以靶向结合 LDLR 3' UTR。随后,我们将 miR-152 mimic、miR-152 inhibitor 分别转入肝细胞,Western Blot 检测细胞 LDLR 表达情况,结果发现 miR-152 可以调控 LDLR 蛋白的表达。这一结果表明 miR-152 是 LDLR 转录后水平的一个调节因子,其可能通过靶向结合 LDLR 3' UTR,抑制 LDLR 蛋白的翻译过程,从而减少细胞 LDLR 蛋白表达水平。

LDLR 的主要生理功能是摄取血液中的 LDL,课题组也观察了 miR-152 对肝细胞 LDL 摄取能力的影响。油红 O 染色结果表明,上调肝细胞 miR-152 表达可以抑制细胞的脂质摄取能力,而下调 miR-152 表达则起相反作用。然而,有研究表明 miR-152 在酒精诱导的肝脂肪变小鼠的肝脏高表达^[13]。因此,miR-152 在整体水平对 LDLR 表达的调控以及对肝脏脂质摄取能力和动脉粥样硬化发生发展的确切作用还需进一步探讨。目前,我们的结果则表明 miR-152 可以与 LDLR 3' UTR 靶向结

合,并下调 LDLR 蛋白的表达,miR-152 有可能成为脂质代谢一个新的干预靶点。

[参考文献]

[1] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M](第二版). 北京: 科学出版社, 2009; 12.

[2] Pieper-Fürst U, Lammert F. Low-density lipoprotein receptors in liver: old acquaintances and a newcomer[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(7): 1 191-198.

[3] Nazari-Jahantigh M, Egea V, Schober A, et al. MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 28(14): 342-343.

[4] Norata GD, Sala F, Catapano AL, et al. MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis[J]? Atherosclerosis, 2013, 227(2): 209-215.

[5] Ma J, Yao Y, Wang P, et al. MiR-152 functions as a tumor suppressor in glioblastoma stem cells by targeting Krüppel-like factor 4[J]. Cancer Lett, 2014, 355(1): 85-95.

[6] Huang H, Hu M, Li P, et al. Mir-152 inhibits cell proliferation and colony formation of CD133(+) liver cancer stem cells by targeting KIT[J]. Tumour Biol, 2015, 36(2): 921-928.

[7] Haque R, Hur EH, Farrell AN, et al. MicroRNA-152 represses VEGF and TGFβ1 expressions through post-transcriptional inhibition of (Pro)renin receptor in human reti-

nal endothelial cells [J]. Mol Vis, 2015, 7(21): 224-235.

[8] Bidzhekov K, Gan L, Denecke B, et al. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans[J]. Thromb Haemost, 2012, 107(4): 619-625.

[9] Soufi M, Ruppert V, Kurt B, et al. The impact of severe LDL receptor mutations on SREBP-pathway regulation in homozygous familial hypercholesterolemia (FH) [J]. Gene, 2012, 499(1): 218-222.

[10] Adaikalakoteswari A, Finer S, Voyias PD, et al. Vitamin B12 insufficiency induces cholesterol biosynthesis by limiting sadenosylmethionine and modulating the methylation of SREBF1 and LDLR genes [J]. Clin Epigenetics, 2015, 7(1): 14.

[11] Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells [J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25(5): 387-393.

[12] 高明明, 刘国庆. Idol: 一个新的通过转录后途径调节低密度脂蛋白受体的蛋白[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(10): 946.

[13] Kutay H, Klepper C, Wang B, et al. Reduced susceptibility of DNA methyltransferase 1 hypomorphic (Dnmt1N/+) mice to hepatic steatosis upon feeding liquid alcohol diet[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41 949.

(此文编辑 许雪梅)