

miR-29b 抑制剂降低小鼠肝脏内胆固醇合成

蔡君艳*

(东南大学附属中大医院 心血管内科, 江苏 南京 210000)

摘要:目的 探究 miR-29b 对高胆固醇血症小鼠肝脏中胆固醇合成的影响及其可能的机制。方法 将 C57/BL6 小鼠随机分为正常饮食组(Con 组)、高脂饮食组(HF 组)、正常饮食+miR-29b 抑制剂对照组(Con+shRNA 组)、正常饮食+miR-29b 抑制剂组(Con+antago 组)、高脂饮食+miR-29b 抑制剂对照组(HF+shRNA 组)、高脂饮食+miR-29b 抑制剂组(HF+antago 组)。8 周后测定血浆、肝脏中总胆固醇。RT-qPCR 检测 miR-29b、沉默调节蛋白 1(sirtuin-1, SIRT1)的 mRNA 表达。Western blot 检测肝脏中胆固醇合成相关蛋白的表达。结果 1)与正常饮食组相比,高脂饮食组血浆和肝脏中 miR-29b 表达升高($P<0.01$)。2)与 HF+shRNA 组相比, HF+antago 组血浆和肝脏中总胆固醇降低,肝脏中 SIRT1 表达增加($P<0.01$),固醇反应元件结合蛋白(sterol response element binding protein 2, SREBP2) ($P<0.01$)和羟甲基戊二酸单酰 CoA 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, HMGCR) 表达减少($P<0.01$)。结论 高胆固醇血症小鼠血浆和肝脏中 miR-29b 表达增加,miR-29b 抑制剂可减少肝脏内胆固醇合成。

关键词: miR-29b;胆固醇合成;沉默调节蛋白 1

中图分类号:R339.6 文献标志码:A

miR-29b inhibitor reduces cholesterol synthesis of liver in mice

CAI Jun-yan*

(Department of Cardiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of miR-29b on the cholesterol synthesis in the liver of hypercholesterolemia mice. **Methods** C57/BL6 mice were divided into 6 groups: 10 in control group was fed with normal diet, 10 in HF group was fed with Paigen diet, 6 in Con+shRNA group, 6 in Con+antago group, 6 in HF+shRNA group and 6 in HF+antago group. The Con+shRNA group and HF+shRNA group were injected with scrambled shRNA (2.5 mg/kg); Con+antago group and HF+antago group were injected with miR-29b antagomir (2.5 mg/kg). Total cholesterol in the plasma and liver was measured after 8 weeks. RT-qPCR was used to detect expression of miR-29b and SIRT1. Western blot was used to detect the expression of proteins relating cholesterol synthesis in the liver. **Results** 1) Compared with the control group, the HF group showed increased expression of miR-29b in the plasma and liver. 2) Compared with the HF+shRNA group, the total cholesterol in the plasma and liver of the HF+antago group decreased. miR-29b antagomir increased SIRT1 mRNA and protein expression in the liver. Along with elevated SIRT1 expression, SREBP2 mRNA and protein expression were decreased. Consistently, the expression of HMGCR was reduced by miR-29b antagomir. **Conclusions** The expres-

收稿日期:2020-08-23 修回日期:2021-05-06

基金项目:国家自然科学基金(81600677)

* 通信作者 (corresponding author): caijunyanzi@126.com

sion of miR-29b is increased in liver tissue of hypercholesterolemia mice and miR-29b inhibitor can reduce cholesterol synthesis in the liver.

Key words: miR-29b; cholesterol synthesis; SIRT1

高胆固醇血症(hypercholesterolemia)是冠心病、脑梗死等心血管疾病的独立危险因素,严重威胁人类健康。控制高胆固醇血症能够有效降低心脑血管疾病的发生。目前临床上主要采用他汀类药物降低胆固醇,而口服他汀类药物时患者会出现乏力、肌肉酸痛、肝脏转氨酶升高甚至横纹肌溶解等不良反应。因此,探寻新型降低胆固醇的药物具有重要意义。microRNAs 是一类由内源基因编码、长度约 22 个核苷酸的小非编码单链 RNA 分子。它可与信使 RNA 的特定序列结合,参与转录后基因表达调控,在一系列生理、病生理过程中发挥重要作用^[1]。miR-29b 在高血压、心脏病等疾病中发挥重要作用,但对高胆固醇血症的作用尚未见报道^[2-3]。本研究以高脂喂养小鼠为研究对象,观察 miR-29b 对胆固醇代谢的影响,并探讨可能的机制,为发现新型降胆固醇药物提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:45 只 SPF 级 C57/BL6 雄鼠(体质量 20~22 g)(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:NO. 201807103)。

1.1.2 主要试剂:高脂饲料含 15% 脂肪,1.25% 胆固醇,0.5% 胆酸钠(北京维通利华实验动物技术有限公司);乱序无意义阴性序列(scrambled shRNA)、miR-29b 抑制剂(miR-29b antagomir)(广州锐博生物科技有限公司);总胆固醇测定试剂盒、三酰甘油测定试剂盒、RNA trip 和 BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);鼠抗 Actin 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司);兔抗 SIRT1 抗体(Cell Signaling Technology 公司);兔抗 SREBP2 抗体(Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及处理:将小鼠分为:正常饮食组(Con 组, $n=10$)、高脂饮食组(HF 组, $n=10$)、正常饮食+miR-29b 抑制剂对照组(Con+shRNA 组, $n=6$)、正常饮食+miR-29b 抑制剂组(Con+antago 组, $n=$

6)、高脂饮食+miR-29b 抑制剂对照组(HF+shRNA 组, $n=6$)、高脂饮食+miR-29b 抑制剂组(HF+antago 组, $n=6$)。Con+shRNA 组和 HF+shRNA 组按照 2.5 mg/kg 体质量通过尾静脉注射 scrambled shRNA, Con+antago 组和 HF+antago 组按照 2.5 mg/kg 体质量通过尾静脉注射 miR-29b 拮抗剂。小鼠共饲养 8 周,每周注射 1 次核酸以保证转染效果。

1.2.2 标本的收集:摘眼球取血,滴入肝素钠处理过的离心管中,在 4 °C 以 3 000×g 离心 10 min 分离血浆备用。

取新鲜肝脏置于冻存管中,经液氮迅速降温后,转移至-80 °C 冰箱中保存备用。

1.2.3 总胆固醇和三酰甘油的测定:使用总胆固醇、三酰甘油测定试剂盒按照说明书操作。将相应试剂盒中的 R1(含显色剂)与 R2(含酶)按 4:1 混匀,即为反应液。称取 50 mg 肝脏,按照 1 mg 肝脏加 30 μL 组织裂解液的比例,加入适量裂解液,冰上高速匀浆 1 min。将肝脏组织裂解液在 70 °C 水浴煮 10 min,然后转移至离心管中,室温 2 000×g 离心 10 min。弃组织碎片,取上清至新离心管中。向 96 孔板中加入 190 μL 反应液,再加入 10 μL 标准品或者肝脏裂解液,充分混匀。37 °C 反应 20 min,将 96 孔板置于酶标仪中,在 570 nm 处读取 A 值。

1.2.4 RT-qPCR 检测 mRNA 的表达:使用 RNA 提取试剂提取血浆及肝脏的总 RNA。实时定量 PCR 采用 Promega Go Taq qPCR Master Mix,20 μL 体系按照如下扩增条件操作:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环;95 °C 1 min,55 °C 变性 30 s,95 °C 30 s。数据分析使用 MxProMx3000 软件进行分析。引物见表 1。

1.2.5 Western blot 检测 SIRT1、SREBP2 表达水平:使用组织裂解液提取肝脏的总蛋白。BCA 试剂盒测定蛋白含量。10% SDS-PAGE 胶电泳分离 80~100 μg 蛋白。转膜,用 5% 脱脂牛奶封闭,4 °C 一抗孵育 NC 膜过夜,洗膜后室温孵育二抗 1~2 h,TBST 洗膜后暗室显色、曝光。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

genes	upstream primer (5'-3')	downstream primer (5'-3')
<i>SIRT1</i>	TACCAGAACAGTTTCATAGAGCCAT	CATTACTCTTAGCTGCTTGGTC
<i>SREBP2</i>	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
<i>HMGCR</i>	CTFTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
<i>HMGCS</i>	GCCGTGAACTGGGTCGAA	GCATATATAGCAATGTCTCCTGCAA
<i>GAPDH</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT
<i>U6</i>	CGCTTCGGCAGCACATATAC	AAATATGGAACGCTTCACGA
miR-29b		
loop primer:	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGTATCGACAACACTGA-3'	
F primer:	5'-TGCGCTAGCACCATTGAAATCA-3'	

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间数据统计分析使用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠血浆和肝脏中 miR-29b 的表达

高脂饮食小鼠血浆及肝脏中 miR-29b 表达升高,miR-29b 抑制剂可抑制高脂饮食小鼠血浆和肝脏中 miR-29b 的表达(表 2)。

表 2 各组小鼠血浆和肝脏中 miR-29b 的表达
Table 2 Expression of miR-29b in plasma and liver
($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

group	plasma	liver
Con	1.01±0.06	0.99±0.03
HF	1.61±0.07*	1.70±0.09*
Con+shRNA	1.05±0.05	1.01±0.08
Con+antago	0.69±0.04 [#]	0.68±0.03 [#]
HF+shRNA	1.71±0.09	1.67±0.11
HF+antago	0.72±0.04 [#]	0.54±0.02 [#]

* $P<0.01$ compared with control group; [#] $P<0.01$ compared with Con+shRNA group.

2.2 各组小鼠血浆和肝脏中总胆固醇和三酰甘油的含量

HF 组小鼠与对照组相比,血浆和肝脏中总胆固醇升高;HF+antago 组小鼠血浆和肝脏中总胆固醇较 HF+shRNA 组明显降低。而 Con+antago 组与 Con+shRNA 组小鼠相比,血浆和肝脏中的总胆固醇

和三酰甘油无明显变化(表 3,4)。

表 3 各组小鼠血浆中总胆固醇和三酰甘油的含量
Table 3 Total cholesterol and triglyceride in plasma
($\bar{x}\pm s$, mg/dL, $n=6$)

group	total cholesterol	triglyceride
Con	1 491±56	201±5
HF	2 146±112*	195±7.0
Con+shRNA	1 576±60	201±3
Con+antago	1 557±63	202±4
HF+shRNA	2 136±75	202±5
HF+antago	1 678±83 [#]	199±4

* $P<0.01$ compared with control group; [#] $P<0.01$ compared with Con+shRNA group.

表 4 各组小鼠肝脏中总胆固醇和三酰甘油的含量
Table 4 Total cholesterol and triglyceride in liver
($\bar{x}\pm s$, nmol/mg, $n=6$)

group	total cholesterol/ tissue weight	triglyceride/ tissue weight
Con	39±3	36±4
HF	57±3*	39±3
Con+shRNA	44±3	40±1
Con+antago	39±3	37±2
HF+shRNA	58±2	39±4
HF+antago	49±2 [#]	39±2

* $P<0.01$ compared with control group; [#] $P<0.01$ compared with Con+shRNA group.

2.3 各组小鼠肝脏中 SIRT1、SREBP2、HMGCR 的 mRNA 表达

HF 组与对照组小鼠相比,肝脏中 SIRT1 mRNA

表达降低,而胆固醇合成相关蛋白 SREBP2、HMGCR mRNA 表达增加。抑制 miR-29b 表达后,肝脏中 SIRT1 mRNA 表达增加,SREBP2、HMGCR mRNA 表达减少(表 5)。

表 5 各组小鼠肝脏中 SIRT1、SREBP2、HMGCR 的 mRNA 表达

Table 5 mRNA expression of SIRT1, SREBP2, HMGCR in liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

group	SIRT1	SREBP2	HMGCR
con	1.01±0.05	1.01±0.04	1.01±0.07
HF	0.51±0.03*	2.59±0.06*	1.69±0.10*
Con+shRNA	0.99±0.03	1.00±0.05	1.00±0.04
Con+antago	1.22±0.06 [#]	0.79±0.03 [#]	0.80±0.02 [#]
HF+shRNA	0.57±0.03	2.50±0.04	1.68±0.08
HF+antago	1.44±0.04 [#]	0.78±0.04 [#]	0.71±0.04 [#]

* $P < 0.01$ compared with control group; [#] $P < 0.01$ compared with Con+shRNA group.

2.4 各组小鼠肝脏中 SIRT1 和 SREBP2 的蛋白表达

与 Con 组相比, HF 组小鼠肝脏中 SIRT1 表达减少, SREBP2 表达增加。抑制 miR-29b 表达, 肝脏中 SIRT1 表达增加, SREBP2 表达减少(图 1)。

3 讨论

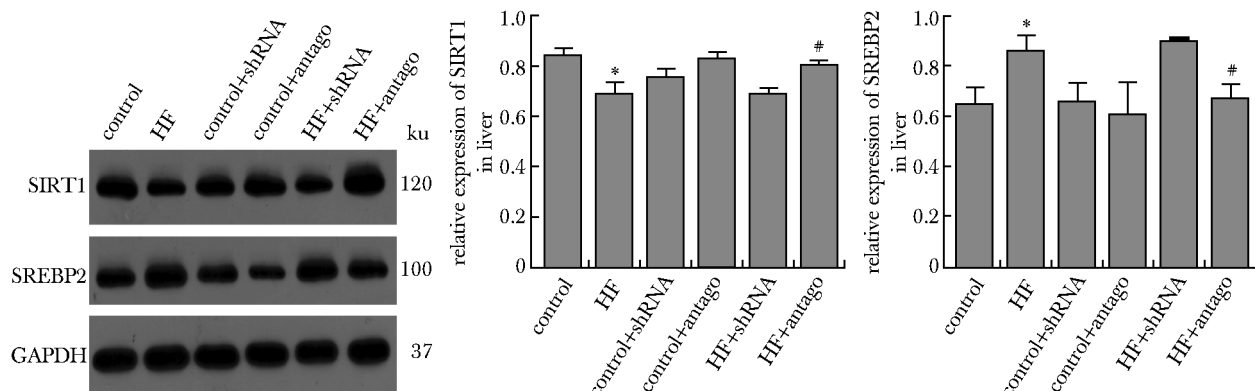
高胆固醇血症是多种疾病的危险因素, 而体内胆固醇主要有两个来源, 一是小肠从食物中摄取胆固醇, 二是体内以乙酰 CoA 为原料合成胆固醇^[4]。肝脏是合成胆固醇的主要场所。因此, 抑制肝脏内

胆固醇合成是治疗高胆固醇血症的重要方法。本研究以高脂喂养的小鼠为动物模型, 发现高胆固醇血症小鼠血浆中 miR-29b 显著升高; 尾静脉注射 miR-29b antagomir 后可降低血浆中总胆固醇, 说明 miR-29b 可作为调节胆固醇代谢的靶点。

miR-29b 是 miR-29 家族成员之一, 由染色体 7q32.3、染色体 1q32.2 编码转录, 在 2 型糖尿病、高血压、肿瘤等多种疾病中发挥重要作用^[5-6]。本实验发现高胆固醇血症的小鼠的血浆和肝脏中 miR-29b 表达升高; 而抑制 miR-29b 表达后, 高胆固醇血症小鼠血浆和肝脏中总胆固醇降低。这一结果提示 miR-29b 可参与调节胆固醇代谢。

SIRT1 是调节胆固醇代谢的重要蛋白^[7]。前期研究发现 miR-29b 通过位于 SIRT1 mRNA 3' 非翻译区的靶位点抑制 SIRT1 的表达^[8-9]。在血管平滑肌中, miR-29b 抑制剂可促进 SIRT1 的表达, 而 miR-29b 类似物可抑制 SIRT1 的表达^[10]。在本实验中, 给予高胆固醇血症小鼠注射 miR-29b 拮抗剂后, 肝脏中 SIRT1 表达显著增加。

SIRT1 是 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶, 可使 SREBP2 去乙酰化, 同时促进 SREBP2 降解, 从而降低胆固醇合成限速酶 HMGCR 和 HMGCS 的表达^[11-12]。本实验发现, 给予高胆固醇血症小鼠注射 miR-29b antagomir 后, 肝脏中 SREBP2 表达降低, 参与胆固醇合成的限速酶 HMGCR 表达亦降低, 从而抑制肝脏内胆固醇合成, 降低血清中总胆固醇。这给后他汀时代的降脂治疗带来新方案。目前已有通过 RNA 干扰技术特异性的沉默肝脏内编码前蛋白



* $P < 0.01$ compared with control group; [#] $P < 0.01$ compared with Con+shRNA group

图 1 各组小鼠肝脏中 SIRT1 和 SREBP2 的蛋白表达

Fig 1 Protein expression of SIRT1 and SREBP2 in liver

转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 蛋白的 mRNA 药物, 因而抑制 miRNA 表达的药物未来可期。另一方面, Con+ antagomir 组小鼠肝脏中 SREBP2 和 HMGCR 表达虽然减少, 但血浆中胆固醇表达未见明显下降, 提示在正常饮食情况下, 尾静脉注射 miR-29b 抑制剂后, 虽然肝脏内胆固醇合成减少, 但胆固醇的摄取可能增

加, 从而维持胆固醇的代谢平衡。

综上所述, 在高脂喂养的小鼠模型中, miR-29b 拮抗剂可使肝脏中 SIRT1 表达升高, 促进下游 SREBP2 的去乙酰化, 从而减少胆固醇合成限速酶 HMGCR 的表达, 抑制肝脏内胆固醇合成, 最终降低血浆中总胆固醇。

参考文献:

- [1] Li L, Li Y, Tang C. The role of microRNAs in the involvement of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43: 1102-1112.
- [2] Cai Y, Li Y. Upregulation of miR-29b-3p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting TRAF5 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 27-36.
- [3] Han X, Wang C, Li Y, *et al.* miR-29b in regulating blood pressure and cardiac function in the rat model of hypertension [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17: 3361-3366.
- [4] Aguilar-Ballester M, Herrero-Cervera A, Vinué Á, *et al.* Impact of cholesterol metabolism in immune cell function and atherosclerosis [J]. *Nutrients*, 2020, 12. doi: 10.3390/nu12072021.
- [5] Yan B, Guo Q, Fu FJ, *et al.* The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling [J]. *Oncotargets Ther*, 2015, 8: 539-548.
- [6] Dantas DA Costa E Silva ME, Polina ER, Crispim D, *et al.* Plasma levels of miR-29b and miR-200b in type 2 diabetic retinopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 1280-1287.
- [7] Feng T, Liu P, Wang X, *et al.* SIRT1 activator E1231 protects from experimental atherosclerosis and lowers plasma cholesterol and triglycerides by enhancing ABCA1 expression [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 274: 172-181.
- [8] Hou M, Zuo X, Li C, *et al.* miR-29b regulates oxidative stress by targeting SIRT1 in ovarian cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43: 1767-1776.
- [9] Xu Z, Zhang L, Fei X, *et al.* The miR-29b-Sirt1 axis regulates self-renewal of mouse embryonic stem cells in response to reactive oxygen species [J]. *Cell Signal*, 2014, 26: 1500-1505.
- [10] Sun QR, Zhang X, Fang K. Phenotype of vascular smooth muscle cells (VSMCs) is regulated by miR-29b by targeting sirtuin 1 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6599-6607.
- [11] Du C, Lin X, Xu W, *et al.* Sulfhydrylated sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by hydrogen sulfide [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30: 184-197.
- [12] Li Y, Wu S. Epigallocatechin gallate suppresses hepatic cholesterol synthesis by targeting SREBP-2 through SIRT1/FOXO1 signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 448: 175-185.