

• 综 述 •

microRNAs: 高密度脂蛋白胆固醇干预治疗心血管疾病的新靶标*

刘梦迪¹, 李金容^{2,3}, 吴 冰^{2,3}, 石 璐^{2,3} 综述, 周云涛^{2,3}, 田 卫^{1,2,3△} 审校

(1. 河北医科大学研究生学院, 石家庄 050011; 2. 河北省唐山市工人医院 063000;

3. 河北省唐山市临床分子诊断与治疗重点实验室 063000)

关键词: 心血管疾病; 高密度脂蛋白胆固醇; miRNAs

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)20-2867-04

《中国心血管病报告 2014》指出“心血管病已成为仅次于脑卒中危害我国居民健康的第 2 大病死原因, 冠心病的发病率和病死率呈持续性增长趋势”。这一现状使心血管事件的“残留风险问题”变得更为突出。“残留风险问题”是低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平控制达标情况下, 心血管事件再发生的临床实践问题。强化他汀类药物治疗能够进一步减低心血管事件和病死风险, 但仍未完全解决与高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、高三酰甘油(TG)密切相关的残留风险问题。“提高 HDL-C 水平”为心血管事件残留风险的防控提供了一种解决方案^[1]。然而, 一项汇集 117 411 例标本的荟萃分析显示, 在广泛使用他汀类药物治疗背景下, 提高 HDL-C 水平的药物, 如烟酸、贝特类、CETP 抑制剂等, 未能降低心血管病的病死率, 说明这类药物未能达到改善 HDL-C 功能的作用^[2]。microRNAs 介导的胆固醇代谢精细调控理论为“HDL-C 功能改善”的假说提供了新的契机。现对 miRNA 在胆固醇代谢调控机制的研究进展综述如下。

1 microRNAs 生物学特点与功能

microRNAs 是一类长约 22 个核苷酸的非蛋白编码的 RNA。通过转录后翻译抑制作用, 参与基因表达调控。miR-Base 数据库已收录人类基因组 miRNAs 前体 1 881 个, miRNAs 成熟体 2 588 个, 有超过 60% 的人类基因受到 miRNAs 调控^[3]。miRNA 信号通路的生物信息学预测分析和功能验证表明, miRNAs 与 mRNAs 形成错综复杂的信号调控网^[4]。miRNA 的优势特征是能够以蛋白质与 miRNA 复合体、微泡、外泌体、HDL 颗粒等形式稳定存在于血清、血浆、尿液及其他体液中, 参与细胞间信号通讯, 调节机体生命活动^[5]。

2 经典 HDL 的合成、转运、摄取及代谢过程

HDL 的合成发生在肝脏和小肠, ATP 结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)是一个以 ATP 为能源进行物质转运的膜蛋白家族成员, 它促进胆固醇和磷脂从细胞内转移至细胞外, 再与乏脂的载脂蛋白 A1(ApoA-I)结合, 形成 HDL 的前体。该过程是合成 HDL 的第 1 步, 同时也是胆固醇逆向转运(RCT)的关键调控点。HDL 前体中游离的胆固醇在卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(LCAT)作用下发生酯化, 最终形成成熟的 HDL 颗粒。

成熟的 HDL 胆固醇酯有 3 条途径: (1)约 20% 的 HDL 胆固醇酯直接经 B 族 I 型清道夫受体(SR-BI)作用而被肝脏摄取。(2)约 70% 胆固醇酯在胆固醇酯转移蛋白(CETP)作用下, 与 VLDL、LDL 完成胆固醇酯交换, 间接地通过 VLDL 和

LDL 与肝细胞表面 LDL 受体(LDLR)结合, 被肝脏摄取。(3)剩余 10% 经由 ApoE 受体清除。

LXR 信号通路在调节胆固醇的合成与转运过程发挥主导作用。肝 X 受体(LXR)是核激素受体家族的成员, 存在 LXR α 和 LXR β 2 种类型。LXR α 作为胆固醇的敏感器, 当细胞内胆固醇过多时, 通过与固醇调节元件结合蛋白(SREBP)的协调作用, 上调与 RCT 过程相关的靶基因, 如 ABCA1/G1、ABCG5、ABCG8、磷脂转运蛋白、ApoE 等, 促进胆固醇外流, 在胆固醇合成与转运过程中发挥重要作用。

3 miRNAs 与 HDL-C 精细调控网络

miRNAs 靶向调节 HDL 合成、转运、摄取和代谢过程及信号调控网路中关键基因, 如 ABCA1、LDLR、LXR α 和 SR-BI 等基因的表达水平与活性^[6-24]。目前, HDL 胆固醇酯主要清除途径中的关键节点是 CETP, 然而由于该基因 3' 非编码区的长度相对较短(<200 bp), 尚无证据表明 miRNA 参与调节 CETP 基因表达。见表 1。

3.1 靶向调控 ABCA1 基因表达的 miRNAs 10 多种 miRNAs 已被证实参与靶向抑制 ABCA1 基因表达。其中 miR-33 在胆固醇稳态的调节机制和抗动脉粥样硬化作用中的研究颇为全面。

miR-33 是一种内含子型的 miRNA, 存在 miR-33a 和 miR-33b 2 种形式, 分别定位于编码固醇调节元件结合蛋白 2(SREBF2)和 1(SREBF1)基因内。miR-33 通过与其宿主基因 SREBF 共转录方式, 靶向抑制 ABCA1, 调控细胞内胆固醇含量。SREBP 作为细胞内胆固醇的另一敏感器, 通过 Insig-Srebp-Scap 途径对细胞内胆固醇进行反馈性调节。在低胆固醇的环境下, SREBP 被激活, 调控细胞膜 LDLR 或 HMG CoA 还原酶, 提高胞内胆固醇水平, 共转录的 miR-33 靶向抑制 ABCA1 基因表达, 进一步阻止细胞内胆固醇的外流。见表 2。

多种 miRNAs, 如 miR-144、miR-758、miR-106b、miR-19b、miR-145、miR-10b、miR-26 和 miR-27b 等, 均可通过经典的转录后翻译抑制作用, 负向调节 ABCA1 基因表达, 调控 HDL-C 的合成与转运过程。研究证实第 1 个正向调控 ABCA1 基因表达的 RNA 分子, miR-28-5p 通过靶向抑制 ERK2, 从转录和翻译水平上调 ABCA1^[16]。miR-28-ERK2-ABCA1 正向信号通路的证实, 提示靶向抑制 ERK2 的 miRNAs, 作为天然的 ABCA1 激动剂, 可能均具有上调 ABCA1 的作用, 为改善 HDL-C 功能提供了新的思路与干预手段。

* 基金项目: 河北省人社厅留学人员科技活动资助项目(2013)。

△ 通讯作者, E-mail: tianwei0@hotmail.com。

表 1miRNAs 调控 HDL-C 靶向作用基因和作用部位			
miRNA	靶向基因	作用部位	文献
miR-33	ABCA1、ABCG1、SREBP1、CYP7A1、ATP8B1、ABCB11、NPC1、CROT、HADHB、IRS2、RIP140、CPT1A	肝细胞、巨噬细胞、内皮细胞	[6-10]
miR-144	ABCA1	肝细胞、巨噬细胞、内皮细胞、胰岛 β 细胞	[11]
miR-19b	ABCA1	巨噬细胞	[12]
miR-758	ABCA1	肝细胞、巨噬细胞、神经元细胞	[13]
miR-106b	ABCA1	小鼠神经元细胞、海马神经元细胞	[14]
miR-145	ABCA1	肝癌细胞	[15]
miR-28	ABCA1	肝癌细胞	[16]
miR-10b	ABCA1、ABCG1	巨噬细胞	[17]
miR-26	ABCA1、ARL7	巨噬细胞	[18]
miR-27	ABCA1、LDLR、PPAR γ 、RXR α	巨噬细胞	[19]
miR-148a	ABCA1、LDLR	肝细胞	[20]
miR-1	LXR α	巨噬细胞	[21]
miR-206	LXR α	巨噬细胞	[21-22]
miR-613	LXR α	肝细胞	[23]
miR-185	SR-B I	肝细胞、巨噬细胞	[24]
miR-96	SR-B I	肝细胞、巨噬细胞	[24]
miR-223	SR-B I	肝细胞、巨噬细胞	[24]
miR-125a	SR-B I	肝细胞、生成类固醇细胞系	[25]
miR-455	SR-B I	肝细胞、生成类固醇细胞系	[25]
miR-122		肝细胞	[26]

表 2抑制 miR-33 表达的相关实验研究				
研究对象	miR-33 抑制剂	饮食	实验效果	参考文献
非洲绿猴	2'F/MOE	CD	ABCA1 $\uparrow$, HDL-C $\uparrow$	[6]
非洲绿猴	2'F/MOE	WD	ABCA1 $\uparrow$, HDL-C $\uparrow$	[6]
Ldr ^{-/-} 小鼠	2'F/MOE	WD	ABCA1 $\uparrow$, HDL-C $\uparrow$	[7]
miR-33 ^{-/-} + Apoe ^{-/-} 小鼠	无	WD(0. 15%)	ABCA1 $\uparrow$, HDL-C $\uparrow$ AS $\downarrow$	[8]
miR-33 ^{+/++} Apoe ^{-/-} 小鼠	无	WD(0. 15%)	—	[8]
Ldr ^{-/-} 小鼠	2'F/MOE	CD	HDL-C $\uparrow$	[9]
Ldr ^{-/-} 小鼠	2'F/MOE	WD(0. 3%)	ABCA1 $\uparrow$, AS $\downarrow$	[9]
Ldr ^{-/-} 小鼠	LNA	CD	HDL-C $\uparrow$	[10]
Ldr ^{-/-} 小鼠	LNA	WD(1. 25%)	—	[10]

注:2'F/MOE(miR-33 抑制剂),LNA 锁核酸(miR-33 抑制剂),CD 素食饮食,WD 高胆固醇饮食,“—”无效果。

3.2 靶向调控 LXR α 基因表达的 miRNAs LXR α 是胆固醇合成与转运过程的关键调节子。已证实肝脏细胞中 miR-1、miR-206、miR-613 靶向调控 LXR α ,进而影响其下游靶基因如 ABCA1、ABCG1、SREBP 和乙酰辅酶 A 羧化酶等基因的表达,产生级联效应^[21]。巨噬细胞中过表达 miR-206,反而激活 LXR α 的活性,上调 LXR α 信号通路关键基因^[22]。miR-206 的特性可能在维系肝脏与外周组织间的胆固醇稳态中发挥作用。miR-613 受到 SREBP-1c 的转录激活,同时靶向抑制 LXR α 的活性与表达,形成 LXR-SREBP-miR-613 负反馈调节回路,调节细胞内胆固醇稳态^[23]。

3.3 靶向调控 B 族 I 型清道夫受体的 miRNAs SR- B I 是胆固醇反向转运过程的重要成员,参与肝脏 HDL 胆固醇酯选择性摄取过程。在肝细胞中 miR-185、miR-96、miR-223 靶向抑制 SR-B I 的基因表达,调节 HDL-C 选择性摄取过程^[24]。miR-125a 和 miR-455 可直接靶向作用 SR-B I ,负向调控 HDL 胆固醇摄取过程,以及减少以胆固醇为原料的固醇类激素的合成^[25]。尽管以靶向抑制 SR-B I 的 miRNAs 为干预手段,能够促使机体 HDL-C 水平升高,但由于限制了肝细胞对 HDL-C 的选择性摄取过程,反而阻碍了胆固醇的反向转运过程,加速动脉粥样硬化进程,说明应侧重于 miRNA 介导的 HDL-C 功

能改善的作用,而不能盲目性强调 HDL-C 水平的变化程度。

3.4 肝脏特异性 miRNA 与胆固醇代谢调控 miR-122 在肝脏中含量最多,占肝脏所有 miRNAs 的 80%,是肝脏特异性 miRNA 分子。尽管 miR-122 靶向抑制基因与信号途径尚未被证实,但已有证据显示 miR-122 正向调控胆固醇合成相关分子,如 3-羟基-3-甲基-辅酶 A 合成酶 1、7-脱氢胆固醇还原酶和鲨烯环氧酶等^[26]。在小鼠和非人灵长类动物高脂模型中证实,应用 miR-122 抑制剂能够大幅降低血浆总胆固醇水平,而胆红素、转氨酶和肌酐等肝功能生化指标未发生显著变化,说明 miR-122 抑制剂的靶向干预具有一定的安全性^[27]。

4 小结与展望

在 miRNA 介导的胆固醇代谢精细调控网络中,既有以靶向抑制胆固醇代谢关键基因的负向调节性 miRNA 分子,又有通过 RNA 激活或间接激活方式作用的正向调节性 miRNA 分子。相对烟酸、贝特类、CETP 抑制剂等药物而言,胆固醇代谢调节性 miRNA 抑制剂或模拟物具有改善 HDL-C 功能的预期效果,为心血管事件残留风险问题提供了一种全新的解决方案。作为一种新型的干预策略,其临床应用的有效性与安全性,尚需充分利用生物信息学技术,剖析其调控网络的多样性与复杂性,并通过科学系统性的临床前试验进行重复性功能验证。

参考文献

- [1] Shah PK. Apolipoprotein A-I/HDL infusion therapy for plaque stabilization-regression; a novel therapeutic approach[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(10):1031-1038.
- [2] Keene D, Price C, Shun-Shin MJ, et al. Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors; meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients[J]. *BMJ*, 2014, 349(349):g4379.
- [3] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- [4] Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive Atlas of microRNA-target interactions[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(8):697.
- [5] Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, et al. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? [J]. *Front Genet*, 2013, 4(6):119.
- [6] Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides[J]. *Nature*, 2011, 478(7369):404-407.
- [7] Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7):2921-2931.
- [8] Horie T, Baba O, Kuwabara Y, et al. MicroRNA-33 defi-

ciency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6):e003376.

- [9] Rotllan N, Ramírez CM, Aryal B, et al. Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice — brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8):1973-1977.
- [10] Marquart TJ, Wu J, Lusis AJ, et al. Anti-miR-33 therapy does not alter the progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(3):455-458.
- [11] De Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor [J]. *Circ Res*, 2013, 112(12):1602-1612.
- [12] Lv YC, Tang YY, Peng J, et al. MicroRNA-19b promotes macrophage cholesterol accumulation and aortic atherosclerosis by targeting ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 236(1):215-226.
- [13] Ramirez CM, Dávalos A, Goedeke L, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(11):2707-2714.
- [14] Kim J, Yoon H, Ramírez CM, et al. MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases A β levels by repressing ABCA1 expression [J]. *Exp Neurol*, 2012, 235(2):476-483.
- [15] Kang MH, Zhang LH, Wijesekara N, et al. Regulation of ABCA1 protein expression and function in hepatic and pancreatic islet cells by miR-145 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(12):2724-2732.
- [16] Liu J, Liu XQ, Liu Y, et al. MicroRNA 28-5p regulates ATP-binding cassette transporter A1 via inhibiting extracellular signal-regulated kinase 2 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1):433-440.
- [17] Wang D, Xia M, Yan X, et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b [J]. *Circ Res*, 2012, 111(8):967-981.
- [18] Sun D, Zhang J, Xie J, et al. MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7 [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(10):1472-1479.
- [19] Goedeke L, Rotllan N, Ramírez 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.
- [20] Goedeke L, Rotllan N, Canfrán-Duque A, et al. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression

to control circulating lipoprotein levels [J]. Nat Med, 2015, 21(11):1280-1289.

[21] Zhong D, Huang G, Zhang Y, et al. MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR α -induced lipogenesis in hepatocytes[J]. Cell Signal, 2013, 25(6):1429-1437.

[22] Vinod M, Chennamsetty I, Colin S, et al. miR-206 controls LXR α expression and promotes LXR-mediated cholesterol efflux in macrophages[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(6):827-835.

[23] Ou Z, Wada T, Gramignoli R, et al. MicroRNA hsa-miR-613 targets the human LXR α gene and mediates a feedback loop of LXR α autoregulation[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(4):584-596.

[24] Wang L, Jia XJ, Jiang HJ, et al. MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(10):1956-1964.

[25] Hu Z, Shen WJ, Kraemer FB, et al. MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(24):5035-5045.

[26] Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates [J]. Nature, 2008, 452(7189):896-899.

[27] Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis[J]. Science, 2010, 328(5985):1566-1569.

(收稿日期:2016-04-07 修回日期:2016-06-05)

• 综 述 •

新兴肿瘤标志物及其临床应用的研究进展

申绯翡¹综述, 李姣锋¹, 吕会茹¹, 王玉霞¹, 郜乐乐¹, 马雷雷^{2△}审校

(1. 洛阳职业技术学院, 河南洛阳 471000; 2. 北京中医药大学东直门医院 100700)

关键词: 肿瘤标志物; 临床应用; 诊断

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 20. 026 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)20-2870-04

根据最新数据显示,我国 2015 年癌症新发病例数及病死例数分别为 429.2 万例和 281.4 万例^[1]。治疗癌症所花费的医疗支出给家庭和社会造成沉重的公共卫生负担。中国人确诊癌症时,往往病情已进展至中晚期,预后均较差,生存期较短。因此,癌症的早期诊断和早期治疗对提高临床治疗疗效及降低癌症病死率非常重要。目前实验室多用肿瘤标志物检测,以期能更早发现和诊断。近年来,随着对肿瘤的研究及检测手段的提高,更多的新兴肿瘤标志物被应用于临床,提高了肿瘤诊断的准确性。现对该研究进展综述如下。

1 肾癌标志物

肾癌属于较沉默且预后较差的一种泌尿系统癌症,由于缺乏早期检测手段,大约 80% 的肾癌患者多数是在腹部影像学检查时偶然发现。肾癌病理类型中,透明细胞癌和乳突状癌占了 90%。新近研究发现,水通道蛋白-1 (AQP-1) 和 PLIN2 可作为早期诊断肾脏透明细胞癌和乳突状细胞癌的肿瘤标志物^[2-6]。AQP-1 存在于细胞膜上的一种内在膜蛋白,是对水专一的通道蛋白,是体内自由水快速跨生物膜转运进出细胞的主要途径。现已明确 AQP-1 主要存在于肾脏肾小管细胞,参与肾脏对水重吸收及浓缩尿液等功能,对于维持机体水平衡起着至关重要的作用。脂滴包被蛋白(perilipin)包被在脂肪细胞和甾体生成细胞脂滴表面。主要参与人体内脂肪分解的病理生理过程。有研究者研究 AQP-1 和 PLIN2 在肾细胞癌患者中的表达,720 例患者进行 CT 筛查,分为 80 例正常对照组及 19 例肾细胞癌患者组,通过 ELISA 方法和 Western-blot 检测患

者尿液 AQP-1 和 PLIN2 蛋白水平,提示肾细胞癌患者组尿液内 2 种蛋白比正常对照组高出 12 倍,AQP-1 和 PLIN2 蛋白的 ROC 曲线下面积大于或等于 0.92,诊断肾细胞癌的敏感性大于或等于 85%,特异性大于或等于 87%^[2]。另一项研究对比健康者、肾癌、泌尿系感染、糖尿病肾病及肾小球肾炎尿液 AQP-1 和 PLIN2 的蛋白水平,与健康者比较,肾癌患者 AQP-1 蛋白平均高出 23 倍,PLIN2 蛋白高出 4 倍,与其他肾脏病患者比较,AQP-1 蛋白高出 11~23 倍,PLIN2 蛋白高出 17~25 倍,且当肾脏肿瘤切除后,两者较基线下降 83%~84%,统计结果表明,2 种蛋白水平与肿瘤大小呈线性相关,而与肿瘤的分级无关^[3]。目前关于 AQP-1 和 PLIN2 是否可以监测肿瘤的复发仍无相关研究报道。但上述研究提示,AQP-1 和 PLIN2 作为早期非侵入性诊断肾细胞癌肿瘤标志物具有重要的临床价值,可作为常规筛查肾癌的一种检测手段。

2 非小细胞肺癌标志物

非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌总数的 80%。NSCLC 主要包括腺癌、鳞状细胞癌即肺鳞癌、大细胞未分化癌 3 类,传统化疗敏感性较差,预后不良。早期发现和诊断可以通过手术切除治疗。目前认为 Cyfra21-1 是 NSCLC 的首选标志物,对诊断和预测 NSCLC 的治疗预后都具有重要价值。

Cyfra21-1 是细胞角质蛋白 19 的片段物质,CK-19 广泛分布在正常组织表面,如支气管树、肺泡的层状或鳞状上皮细胞胞质中,当上皮细胞恶化时,激活的蛋白酶加速细胞降解,使大量细胞角蛋白片段释放入血,其可溶性片段可与 2 株单克隆抗

△ 通讯作者, E-mail: maleilei0606@126. com。