

hsa-miR-206 负调控核受体 LXR α mRNA 的表达水平

韩莹, 宋秀宇*

(厦门大学附属第一医院检验科, 福建 厦门 361003)

摘要: MicroRNA(miRNA)是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA. 在动物细胞内, miRNA 通常引起目的 mRNA 的切割或阻碍其翻译过程, 从而抑制目的基因的表达. 本研究发现, hsa-miR-206 通过与 LXR α 3' UTR 直接相互作用, 以抑制细胞中 LXR α 的 mRNA 水平, 下调 LXR α 的转录活性, 并最终使 LXR α 配体 GW3965 对 LXR 的目的基因 *SCD-1* 的诱导作用受到抑制. 这些结果表明, hsa-miR-206 能够负调控 LXR α 的表达及转录活性.

关键词: miRNA; 基因表达; 调控

中图分类号: Q 291

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2013)06-0846-05

肝核 X 受体(liver X receptor, LXR), 属于核受体家族中的类甲状腺激素受体亚家族(thyroid hormone receptor-like subfamily). *LXR* 基因包含了两个亚型, 其中一个亚型是 *LXR α* (NR1H3), 其编码基因位于染色体 11p11.2 的位置, 在肝脏、肾脏、小肠、脂肪组织、巨噬细胞、肺脏和脾脏中有着较高的表达水平; 另一个亚型是 *LXR β* (NR1H2), 其编码基因位于染色体 19q13.3 的位置, 在体内各器官中均能检测到其表达^[1]. LXR 需要与配基结合后方能激活, 在未与配基结合前, LXR 与共抑制子(co-repressor)结合并存在于细胞质中; 在与配基结合后, LXR 与 Retinoid X Receptor(RXR)形成异源二聚体, 并与共激活子(co-activator)相结合, 进入细胞核内与其目的基因启动子上的特殊结合元件 LXR Response Elements(LXREs)结合, 调节其目的基因的表达. LXR 是机体内一种非常重要的调控因子, 其调控的目的基因相当广泛^[2-4]. 目前, 已发现的 LXR 目的基因主要与胆固醇和脂类代谢调控相关, 具体包括了: 三磷酸腺苷结合盒转运体(ABC-ATP binding cassette transporter isoforms A1, G1, G5, and G8), 载脂蛋白 E(ApoE-apolipoprotein E), 胆固醇酯转运蛋白(CETP-cholesterol ester transfer protein), 胆固醇 7-羟化酶(CYP7A1-Cyto-

chrome P450 isoform 7A1-cholesterol 7-hydroxylase), 脂肪酸合成酶(FAS-fatty acid synthase), 脂蛋白脂酶(LPL-lipo protein lipase)以及固醇调节元件结合蛋白(SREBP-1c-sterol regulatory element binding protein 1c)等^[5]. 由于其广泛的调控作用, LXR 参与了许多生理过程的调节, 如脂类物质与胆固醇的代谢^[2-4]、抗炎作用^[6-7]、甾体类激素的合成与代谢^[8-9]等.

MicroRNA(miRNA)是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA, 其大小约为 20~25 个核苷酸^[10-12]. miRNA 属于转录后修饰分子, 它们通常与目的 mRNA 序列中的互补序列相结合, 从而引起转录的抑制和基因沉默. 在动物细胞内, miRNA 通常与 mRNA 3'UTR (untranslated region)中的互补序列相结合, 从而引起目的 mRNA 的切割或阻碍其翻译过程, 最终抑制目的基因的表达^[13]. 异常的 miRNA 表达情况通常会引起生理功能的异常以及疾病的出现. 近年来, miRNA 与核受体之间相互关系的研究亦逐渐增多. 根据已有报道, 在核受体家族中, PXR、ER α 与 Tailless 分别受到了不同 miRNA 分子的调控^[14-16]. 而 LXR α 也被证实受到了 hsa-miR-613 的调控^[17].

我们利用 Microcosm targets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5>) 分析软件对可能作用于 LXR α 的一系列 miRNA 分子进行了分析预测, 获得多个有可能作用于 LXR α 3'UTR 的 miRNA 分子. 本研究中, 通过实验证明, 该分析软

件所预测到的 miRNA 分子 hsa-miR-206 能够通过 LXR α 3'UTR 产生直接的相互作用而抑制 LXR α 的表达水平及其转录活性,为 miRNA 对 LXR α 的调控作用提供了新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

本课题中所使用的过表达质粒及报告基因质粒均从美国匹兹堡大学药学院所获取;报告基因实验中所用到的化学试剂均购自美国 Sigma Aldrich 公司;细胞转染实验所用的 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;RNA 提取分离所使用试剂盒购自于国内 Tiangen 公司;RNA 逆转录试剂盒及 Real-time PCR 定量分析所使用的试剂盒购自日本 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞共转染实验

HepG2 细胞以 0.5×10^5 /孔接种于 24 孔板中培养过夜后,按照使用说明书,使用 Lipofectamine 2000,根据不同的实验需要,将质粒共转染至细胞,并进行后续实验。各部分实验所转染质粒的含量及后续处理如下:1) LXR α 3'UTR 报告基因实验:CMX-Luc-LXR α 3'UTR/Empty/ hsa-miR-206 CS、CMX-miR-206 与 CMX- β -gal 分别为 0.5, 1.0 与 0.2 μ g/孔,转染 12 h 后进行荧光素酶活性测定;2) hsa-miR-206 过表达实验:CMX-miR-206 1.0 μ g/孔,转染 12 h 后加入 GW3965 (10 μ mol/L)处理 24 h,提取总 RNA 进行逆转录及 Real-time-PCR 分析;3) LXR α 报告基因实验:tk-LXRE-Luc、CMX-miR-206 与 CMX- β -gal 分别为 0.5, 1.0 与 0.2 μ g/孔,转染 12 h 后,加入 GW3965 (10 μ mol/L)再处理 24 h 并进行荧光素酶活性测定。

1.2.2 荧光素酶活性测定

根据参考文献[16],对细胞中荧光素酶的活性进行测定,并以细胞中共转染过表达的 β -半乳糖苷酶的活性对荧光素酶活性进行校正,分析细胞中荧光素酶的相对活性。

1.2.3 总 RNA 的提取、逆转录及 Real-time PCR 分析

细胞总 RNA 的提取及逆转录均根据所使用试剂盒中的使用说明书进行,Real-time PCR 分析采用 SYBR Green 染料法,使用 Roche LC480 实时定量荧光 PCR 仪进行分析,获取的 mRNA 含量经由看家基

因 *Cyclophilin* 进行校正后,分析 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 数据分析

各组实验结果均已在不少于 3 次的独立实验中得到重复。实验数据均以 Mean $\pm$ SEM 表示,根据资料性质分别进行方差分析及组间 *t* 检验, $p < 0.05$ 为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 hsa-miR-206 能够作用于 LXR α 3'UTR 序列

首先采用 LXR α 3'UTR 报告基因实验,对 hsa-miR-206 能否与 LXR α 3'UTR 产生直接的相互作用进行了探讨。在转染了 CMX-Luc-LXR α 3'UTR 报告基因质粒的 HepG2 细胞内,共转染 CMX-miR-206 能够显著抑制荧光素酶基因的表达,其抑制率约为 71%;而在转染了 CMX-Luc-empty 阴性报告基因质粒的 HepG2 细胞内,过表达 hsa-miR-206 对荧光素酶基因的表达无影响;另一方面,作为阳性对照,在转染了 CMX-Luc-206 CS 报告基因质粒的 HepG2 细胞内,共转染 CMX-miR-206 能够显著抑制荧光素酶基因的表达,其抑制率约为 70%(图 1)。

2.2 hsa-miR-206 下调 LXR α 的 mRNA 表达水平

在证明 hsa-miR-206 能够与 LXR α 3'UTR 直接进行相互作用后,在细胞中,观察 hsa-miR-206 能否影响内源性 LXR α 的表达。在 HepG2 细胞内转染 CMX-miR-206 过表达 hsa-miR-206 后,可观察到细胞内 LXR α mRNA 表达水平受到明显的抑制,其表达水平下降至对照组的 59%(图 2)。

2.3 hsa-miR-206 下调 LXR α 与其目的基因启动子的结合

为了进一步证明 hsa-miR-206 对 LXR α 表达水平的抑制作用,在 HepG2 细胞中共转染了 hsa-miR-206 的表达质粒以及含有能够与 LXR 结合的启动子序列的报告基因 tk-LXRE-Luc,并用 LXR 配基 GW3965 (10 μ mol/L)处理 24 h 后,观察细胞中内源性 LXR α 与其目的基因启动子的结合情况。从结果可见,经 GW3965 处理后,细胞内荧光素酶的活性有明显升高;而当在细胞内过表达 hsa-miR-206 后, GW3965 处理对 tk-LXRE-Luc 的荧光素酶活性无影响(图 3)。结果表明, hsa-miR-206 能下调 LXR α 与其目的基因启动子的结合,进一步证明 hsa-miR-206 对 LXR α 的抑制作用。

3 讨论

miRNA 作为一种重要的调控因子,受到了越来越多的关注. 由于其广泛的调控功能,miRNA 的表达水平与多种生理或病理状态都有着密切的联系. 近年来,miRNA 在代谢中的作用也受到了更多的重视. LXR α 作为肝脏中的一种重要的核受体,在机体的糖脂代谢过程中发挥着重要的调控作用. 目前,已有报道证实,人源性 LXR α 受到了 miRNA hsa-miR-613 的调控. 本课题研究发现了另一种能够调控人源性 LXR α 的 miRNA 分子 hsa-miR-206.

在动物体内,我们已知 miRNA 对其目标基因的调控方式为成熟的 miRNA 分子与该基因的 3' UTR 部分相结合,进而使该 mRNA 分子降解,或影响该 mRNA 分子的翻译等,从而抑制该基因的表达水平. 基于这一作用机制,将 LXR α 的 3' UTR 序列克隆到荧光素酶的下游部分,对 hsa-miR-206 与 LXR α 3' UTR 序列间的相互作用进行了验证. 而在分别引入了 CMX-Luc 与 CMX-Luc-206 CS 2 种报告基因系统作为阴性与阳性对照后,也排除了假阴性与假阳性结果对本部分实验结果的影响. 而在其后的细胞实验中,也证明了,在细胞中过表达 hsa-miR-206 后,LXR α 的 mRNA 表达水平及其转录活性均受到了显著的抑制,而且,LXR α 下游目的基因 *SCD-1* 的表达水平也出现明显的下调.

近来有文献指出,miR-206 能够在肝细胞中抑制 LXR α 诱导的脂质合成,并且该作用是由于 miR-206 对 LXR α 及其下游目的基因 *SREBP-1c* 和 *FASN* 的抑制所导致^[18]. 该研究与我们的实验结果相一致,均证明了 hsa-miR-206 能够通过与 LXR α 3' UTR 的直接作用而抑制细胞内 LXR α 的 mRNA 表达水平. 此外,我们的实验结果表明,hsa-miR-206 能够抑制 LXR α 在细胞内的相关调控功能. 同时,还证明了,作为脂质合成的另外一个重要的基因,*SCD-1* 的表达水平同样受到了 hsa-miR-206 的抑制,这可能也与 hsa-miR-206 能够在肝细胞中抑制 LXR 诱导的脂质合成有关.

综上所述,本研究结果表明,hsa-miR-206 能够抑制 LXR α 的表达及转录活性. hsa-miR-206 对 LXR α 的抑制作用是通过与 LXR α 3' UTR 序列的直接相互作用而实现的. hsa-miR-206 与 LXR α 3' UTR 序列产生相互作用后,可能通过加速 LXR α mRNA 的降解,从而下调细胞中 LXR α mRNA 及其蛋白水平,进而明

显抑制了 LXR α 的调控功能. 这一观点也在相应的 LXR α 报告基因及 LXR α 下游目的基因表达水平的变化中获得了证实. 本研究为与机体代谢密切相关的重要的核受体 LXR α 提出了一种新的调控通路,为将来研究与 LXR α 相关的生理作用提供了新的参考和思路.

参考文献:

- [1] Tontonoz P, Mangelsdorf D J. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease[J]. *Mol Endocrinol*, 2003,17:985-993.
- [2] Repa J J, Mangelsdorf D J. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2002,8:1243-1248.
- [3] Repa J J, Liang G, Ou J, et. al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (*SREBP-1c*) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β [J]. *Genes Dev*, 2000,14:2819-2830.
- [4] Schultz J R, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis[J]. *Genes*, 2000,14:2831-2838.
- [5] Edwards P A, Kennedy M A, Mak P A. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2002,38:249-56.
- [6] Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling[J]. *J Clin Invest*, 2006,116:607-614.
- [7] Michael D R, Ashlin T G, Buckley M L, et al. Liver X receptors, atherosclerosis and inflammation. [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2012,14:284-293.
- [8] Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism[J]. *J Endocrinol*, 2010,204:233-240.
- [9] Gong H, Guo P, Zhai Y, et al. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor[J]. *Mol Endocrinol*, 2007,21:1781-1790.
- [10] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004,431:350-355.
- [11] Bartel D P. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004,116:281-297.
- [12] He L, Hannon G J. MicroRNAs; small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004,5:522-531.
- [13] Wang X J, Reyes J L, Chua N H, et. al. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets[J]. *Genome Biol*, 2004,5:R65.
- [14] Takagi S, Nakajima M, Mohri T, et al. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by mi-

- cro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4 [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 9674-9680.
- [15] Di Leva G, Gasparini P, Piovan C, et al. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102: 706-721.
- [16] Zhao C, Sun G, Li S, et al. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 1876-1881.
- [17] 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: 584-596.
- [18] Zhong D, Huang G, Zhang Y, et al. MicroRNA-1 and miRNA-206 suppress LXR α -induced lipogenesis in hepatocytes[J]. Cell Signal, 2013, 25: 1429-1437.

hsa-miR-206 Negatively Regulates Nuclear Receptor LXR α mRNA Expression

HAN Ying, SONG Xiu-yu *

(Clinical Laboratory Department, The First Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, China)

Abstract: Liver X receptor (LXR) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. LXRs exhibit regulatory effects on diverse physiological functions, ranging from cholesterol and lipid metabolism to anti-inflammation, hepatobiliary diseases, and steroid hormone biosynthesis and metabolism. miRNAs are endogenous non-coding RNAs found in eukaryotes. In mammalian cells, miRNAs usually inhibit target genes expression by splicing their target messenger RNA or blocking mRNA translations. In our present study, we found hsa-miR-206 could interact with LXR α 3' untranslated region through direct binding with its response element. hsa-miR-206 inhibited cellular LXR α mRNA level and its regulatory functions. hsa-miR-206 also abolished the induction on LXR target gene *SCD-1* by LXR ligand GW3965 treatment. Collectively, hsa-miR-206 negatively regulated LXR α mRNA level and its regulatory function. Our findings provides new insight to the regulation on endogenous LXR α by a novel mechanism, which implies potential interventions on LXR α related physiological functions.

Key words: miRNA; gene expression; regulation