

# 微小 RNA-1270 靶向调控血管生成素样蛋白 7 抑制巨噬细胞炎症和脂质蓄积

杜艾家,张曼,陈鹤,王丽新,尚应殊

(沈阳医学院附属中心医院心血管内科,辽宁 沈阳 110024)

**摘要:**目的 应用氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导的小鼠巨噬细胞株制备动脉粥样硬化模型,观察微小 RNA-1270(miRNA-1270, miRNA-1270)是否经血管生成素样蛋白 7(angiotensin-like protein 7, ANGPTL7)/p38 途径干预巨噬细胞炎症及血脂代谢。方法 培养小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7),并加入 ox-LDL 构建动脉粥样硬化模型。根据干预条件不同分为空白组、ox-LDL 组、ANGPTL7 组、p38 蛋白抑制组、p65 蛋白抑制组、miR-1270 模拟物组、miR-1270 模拟物阴性对照组、miR-1270 抑制物组和 miR-1270 抑制物阴性对照组。采用实时定量 PCR 法检测 mRNA 表达水平,采用 Western blotting 法检测蛋白质表达水平,采用油红染色法检测脂质蓄积。结果 ox-LDL 暴露的巨噬细胞中含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量增加,ANGPTL7 高表达,p38 高表达,白介素-6(interleukin-6, IL-6)高表达,白介素-10(interleukin-10, IL-10)低表达,且 ANGPTL7 与 p38 及脂质蓄积呈正相关( $P<0.01$ )。与 ox-LDL 组相比,ANGPTL7 组 ANGPTL7、p38 及 IL-6 蛋白相对表达量增加,IL-10 蛋白相对表达量减少,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量增加( $P<0.01$ )。与 ANGPTL7 组相比,p38 蛋白抑制组 ANGPTL7 和 p38 蛋白相对表达量无明显差异,IL-6 蛋白相对表达量减少,IL-10 蛋白相对表达量增加,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量减少( $P<0.01$ )。与 ANGPTL7 组相比,p65 蛋白抑制组各项指标表达量、含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与空白组相比,ox-LDL 组 miR-1270 基因相对表达量减少,ANGPTL7 基因及蛋白相对表达量增加,miR-1270 与 ANGPTL7 基因相对表达量呈负相关( $P<0.01$ )。与 ox-LDL 组相比,miR-1270 模拟物组 miR-1270 基因相对表达量增加,ANGPTL7 基因及蛋白相对表达量减少,p38 及 IL-6 蛋白相对表达量减少,IL-10 蛋白相对表达量增加,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量减少( $P<0.01$ );miR-1270 抑制物组 miR-1270 基因相对表达量减少,ANGPTL7 基因及蛋白相对表达量增加,p38 及 IL-6 蛋白相对表达量增加,IL-10 蛋白相对表达量减少,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量增加( $P<0.01$ );与 ox-LDL 组相比,阴性对照物组各项指标表达量无明显差异,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 在 ox-LDL 暴露的巨噬细胞模型中,ANGPTL7 促进巨噬细胞内的炎症和脂质蓄积必经 p38 途径实现,是促进动脉粥样硬化的发生发展新机制。miR-1270 作为保护性因子,可靶向抑制 ANGPTL7 基因转录表达,经 p38 途径减轻巨噬细胞炎症及脂质蓄积,可逆调控动脉粥样硬化发生发展,是动脉粥样硬化潜在的早期筛查靶点。

**关键词:**基因表达遗传学;动脉粥样硬化;微小 RNA-1270;血管生成素样蛋白 7;p38 蛋白;炎症反应;脂质蓄积

中图分类号:R543.5

文献标志码:A

## miR-1270-targeted regulation of angiotensin-like protein 7 inhibits macrophage inflammation and lipid accumulation

DU Aijia, ZHANG Man, CHEN He, WANG Lixin, SHANG Yingshu

(Department of Cardiology, Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning, China)

**Abstract: Objective** To prepare an atherosclerosis (As) model employing an oxidised low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced mouse macrophage cell line, so as to see whether microRNA-1270 (miRNA-1270) interfered with macrophage inflammation and lipid metabolism via the angiopoietin-like protein 7 (ANGPTL7)/p38 pathway. **Methods** Mouse mononuclear macrophages (RAW264.7) were cultured and ox-LDL was added to construct macrophage models. According to the different intervention conditions, the groups were as follows: blank group, ox-LDL group, ANGPTL7 group, p38 protein inhibition group, p65 protein inhibition group, miR-1270 mimic group, miR-1270 mimic negative control group, miR-1270 inhibitor group, and miR-1270 inhibitor negative control group. The mRNA expression level was detected by real-time quantitative PCR, the protein expression level was detected by Western blotting, and the lipid accumulation was detected by oil red staining. **Results** The number of macrophages containing red fat particles was increased in ox-LDL-exposed macrophages, with high expressions of ANGPTL7, p38, and IL-6, and low expression of IL-10, and a positive correlation between ANGPTL7 and p38 and lipid accumulation ( $P < 0.01$ ). Compared with the ANGPTL7 group, there was no significant difference in the relative expression of ANGPTL7 and p38 proteins in the p38 protein inhibition group, a decrease in the relative expression of IL-6 protein, an increase in the relative expression of IL-10 protein, and a decrease in the number of red adipose microparticle-containing macrophages ( $P < 0.01$ ). Compared with the ANGPTL7 group, there was no statistically significant difference in the expression of the indicators in the p65 protein inhibition group, and there was no statistically significant difference in the number of macrophages containing red fat particles ( $P > 0.05$ ). Compared with the blank group, the relative expression of miR-1270 gene was decreased and the relative expression of ANGPTL7 gene and protein was increased in the ox-LDL group, and miR-1270 was negatively correlated with the relative expressions of ANGPTL7 gene ( $r^2 = 0.6657$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the ox-LDL group, the miR-1270 mimic group had increased relative expression of the miR-1270 gene, decreased relative expression of the ANGPTL7 gene and protein, decreased relative expression of the p38 and IL-6 proteins, increased relative expression of the IL-10 protein, and decreased number of red adipose microparticle-containing macrophages ( $P < 0.01$ ). The miR-1270 inhibitor group had a decrease in the relative expression of the miR-1270 gene, an increase in the relative expression of the ANGPTL7 gene and protein, an increase in the relative expressions of the p38 and IL-6 proteins, a decrease in the relative expression of the IL-10 protein, and an increase in the number of macrophages containing red adipose microparticles ( $P < 0.01$ ). Compared with the ox-LDL group, there was no significant difference in the expression of the indicators in the negative control group, and there was no statistically significant difference in the number of macrophages containing red fat particles ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** In the ox-LDL-exposed macrophage model, ANGPTL7 promotes inflammation and lipid accumulation in macrophages via the p38 pathway, which is a new mechanism to promote the development of atherosclerosis. miR-1270, as a protective factor, can target and inhibit the transcriptional expression of the ANGPTL7 gene, reduce macrophage inflammation and lipid accumulation via the p38 pathway, and reversibly control the development of atherosclerosis, and is a potential early screening target for atherosclerosis. It is a potential target for early screening of atherosclerosis.

**Key words:** Gene epigenetics; Atherosclerosis; microRNA-1270; Angiopoietin-like protein 7; p38 protein; Inflammatory response; Lipid accumulation

动脉粥样硬化作为动脉壁内的一种慢性炎症性疾病,是心肌梗死、脑血管和外周动脉疾病的主要危险因素<sup>[1]</sup>。目前有研究认为,动脉粥样硬化是一种脂质驱动的血管炎症性疾病,其中巨噬细胞炎症反应和脂质蓄积是两个关键因素<sup>[2]</sup>。

血管生成素样蛋白7(angiopoietin-like protein 7, ANGPTL7)是ANGPTLs家族的成员之一,它是一种分泌性糖蛋白脂肪细胞因子,由346个氨基酸组成,含有多个潜在的磷酸化位点及糖基化位点,参与氧化应激应答过程,在眼部、脂肪、神经及循环组织等表达<sup>[3]</sup>。ANGPTL7基因位于编码哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的内含子中,mTOR-ANGPTL7基因

位点在早期肥胖的遗传机制中发挥作用<sup>[4]</sup>。Abu-Farha等<sup>[5]</sup>研究发现,肥胖者血中ANGPTL7表达水平增加,且与三酰甘油(triglyceride, TG)呈显著正相关,提示ANGPTL7参与脂质代谢。Li等<sup>[6]</sup>研究发现,抑制ANGPTL7表达可显著逆转肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导的氧化应激和内皮细胞黏附。Zhao等<sup>[7]</sup>研究发现,下调ANGPTL7可减弱血管平滑肌细胞增殖和细胞炎症反应。ANGPTL7与动脉粥样硬化的炎症反应、脂质代谢息息相关,值得深入探讨。

近年来随着对基因组学领域的不断深入研究,基因表观遗传学成为动脉粥样硬化机制研究的前沿

焦点<sup>[8]</sup>。微小 RNA(microRNA, miRNA)由 18~23 个核苷酸组成,广泛存在于真核生物中,属于非编码 RNA,不编码蛋白质,但可通过影响下游 mRNA 表达参与生理过程和疾病发生发展<sup>[9-10]</sup>。miR-1270 的靶基因参与免疫应答、抗原受体介导的信号通路调节、单核细胞趋化性等生物学过程,从而进一步调节动脉粥样硬化的炎症和凋亡<sup>[11-12]</sup>。Wang 等<sup>[13]</sup>在氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导的急性单核巨噬细胞模型中发现,上调 miR-1270 表达可显著抑制白介素-6(interleukin-6, IL-6)和 TNF- $\alpha$  表达。miR-1270 可能是动脉粥样硬化在基因表观遗传学水平的潜在靶点。

本研究在前期工作中进行基因芯片检测,发现在富集分析中动脉粥样硬化与 ANGPTL7 具有差异表达,随后在 TargetScan, miRWalk 等基因库预测信息中发现,ANGPTL7 可能是 miR-1270 的靶基因之一,两者具有潜在的结合位点。因此本实验采用 ox-LDL 刺激巨噬细胞为研究对象,应用基因沉默、细胞功能获得或缺失实验等方法,观察 miR-1270 是否通过调控 ANGPTL7/p38 信号通路影响巨噬细胞炎症反应及脂质蓄积,完善动脉粥样硬化新机制,为动脉粥样硬化的早期筛查及靶向治疗提供新的方向及数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验对象

小鼠单核巨噬细胞系,购自湖南丰晖生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自美国 Clark 公司;DMEM 培养液购自美国 Abclonal 公司;ox-LDL 购自广州奕源生物科技有限公司;油红 O 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;ANGPTL7 抗体购自美国赛默飞公司;p38、IL-6、白介素-10(interleukin-10, IL-10)抗体、兔抗鼠  $\beta$ -actin、羊抗兔二抗购自美国 BOSTER 公司;miR-1270 模拟物、miRNA-1270 抑制物及其阴性对照物购自广州锐博生物技术有限公司;p38 蛋白抑制剂 SB203580、p65 蛋白抑制剂 PDTC 购自美国赛默飞公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;转染试剂购自广州锐博生物技术有限公司;引物由北京鼎国生物技术责任有限公司设计并合成;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞培养箱购

自美国赛默飞公司;光学显微镜与照相系统购自德国徕卡公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳垂直电泳槽、凝胶成像仪购自美国 BIO-RAD 公司;MX3000P 型实时荧光定量 PCR 扩增仪购自美国 BIO-RAD 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

将巨噬细胞 RAW 264.7 接种于 10%胎牛血清、1%青霉素和 1%链霉素配置 DMEM 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养,2 d 后在显微镜下观察细胞的生长密度,达到 80%~90%时进行传代培养。

#### 1.2.2 分组

根据干预条件不同将细胞分为空白组、ox-LDL 组、ANGPTL7 组(ox-LDL+ANGPTL7 重组蛋白)、p38 蛋白抑制组(ox-LDL+ANGPTL7 重组蛋白+p38 蛋白抑制剂)、p65 蛋白抑制组(ox-LDL+ANGPTL7 重组蛋白+p65 蛋白抑制剂);miR-1270 模拟物组(ox-LDL+miR-1270 模拟物)、miR-1270 模拟物阴性对照组(ox-LDL+miR-1270 模拟物阴性对照组)、miR-1270 抑制物组(ox-LDL+miR-1270 抑制物)、miR-1270 抑制物阴性对照组(ox-LDL+miR-1270 抑制物阴性对照组)。

#### 1.2.3 采用实时荧光定量 PCR 法检测 mRNA 表达

根据 RNA 提取试剂盒说明书进行各组总 RNA 提取,用分光光度计测定 RNA 浓度。采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup>  法计算目的基因的表达量。QRT-PCR 反应参数分别为:94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s、55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 40 个循环。本研究采用的引物如下:miR-1270:F: 5'-GGGCTGGAGATATGGAAGA-3', R: 5'-CAGTGC GTGTCGTGGAGT-3'; ANGPTL7: F: 5'-AACACCG TCTTCAGCACCA -3', R: 5'-TACCAGTAGCCACCTTTTCG-3';  $\beta$ -actin F: 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3', R: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3';进行 3 次实验后取平均值。

#### 1.2.4 采用 Western blotting 法检测蛋白表达

分别提取各组细胞中的蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,一抗孵育(一抗滴度 1:1000),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,二抗孵育(滴度 1:10 000),37  $^{\circ}\text{C}$  1 h,使用 ECL 发光液显色,以  $\beta$ -actin 为内参,采用 Image J 软件分析灰度值并计算目标蛋白的相对表达水平。每组进行 3 次实验取平均值。

#### 1.2.5 采用油红 O 染色法检测细胞脂质蓄积

选取生长状态良好的空白组细胞,胰酶消化后接种于 6 孔板中,接种密度为  $1 \times 10^5$  个细胞/孔。诱

导贴壁后,换用含有血清的细胞 DMEM 培养基后加入 50 mg/mL ox-LDL 培养 24 h, PBS 洗涤,油红 O 固定液固定 30 min,经异丙醇及蒸馏水漂洗,油红 O 染色液浸染 20 min,再经异丙醇及蒸馏水漂洗,苏木精-伊红染色,蒸馏水漂洗,油红 O 缓冲液固定,显微镜下观察,定量检测细胞内红色脂滴颗粒巨噬细胞数目,代表巨噬细胞脂质沉积情况,实验重复 3 次取平均值。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.3.0 进行处理,符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,满足正态分布且满足方差齐的数据中,两组均值比较采用 *t* 检验,多组间均值比较采用单因素方差分析,两两多重比较采用 SNK 检验。不符合正态分布的数据,采用非参数检验。

相关性分析采用 Pearson 方法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ox-LDL 对巨噬细胞的影响

与空白组相比,ox-LDL 组含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量增加;ANGPTL7、p38、IL-6 蛋白相对表达量增加,IL-10 蛋白相对表达量减少( $P < 0.01$ )。ox-LDL 组中,ANGPTL7 与 p38 蛋白相对表达量呈正相关( $r^2 = 0.8384$ ,  $P < 0.01$ ),ANGPTL7 蛋白相对表达量与含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量呈正相关( $r^2 = 0.7180$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1。

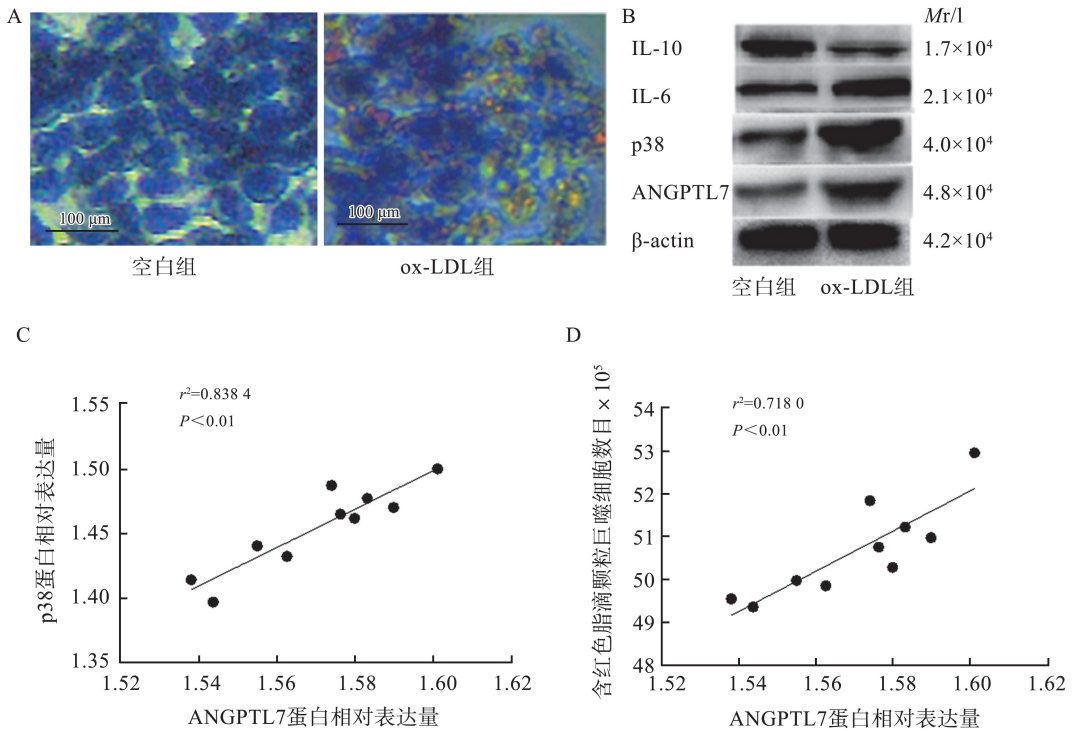


图 1 空白组与 ox-LDL 组巨噬细胞脂质蓄积、IL-6、IL-10、ANGPTL7 和 p38 蛋白相对表达

A: 空白组与 ox-LDL 组含红色脂肪微粒的巨噬细胞; B: 空白组与 ox-LDL 组 ANGPTL7、p38、IL-6 和 IL-10 蛋白表达;

C: ANGPTL7 与 p38 蛋白相对表达量相关性分析; D: ANGPTL7 与含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量相关性分析。

Figure 1 Relative expression of macrophage lipid accumulation, IL-6, IL-10, ANGPTL7 and p38 proteins in blank and ox-LDL groups

A: Macrophages containing red fat particles in blank group and ox-LDL group; B: Protein expressions of ANGPTL7, p38, IL-6, and IL-10 in blank group and ox-LDL group; C: Correlation analysis of the relative expressions of ANGPTL7 and p38 proteins; D: Correlation analysis of the relative expression of ANGPTL7 and the number of macrophage containing red fat particle.

### 2.2 ANGPTL7 经 p38 路径对巨噬细胞的影响

与 ox-LDL 组相比, ANGPTL7 组 ANGPTL7、p38 和 IL-6 蛋白相对表达量增加, IL-10 蛋白相对表达量减少, 含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量增加 ( $P < 0.01$ )。与 ANGPTL7 组相比, p38 蛋白抑制组 ANGPTL7 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ( $P >$

0.05), p38 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), IL-6 蛋白相对表达量减少, IL-10 蛋白相对表达量增加, 含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量减少 ( $P < 0.01$ ); 与 ANGPTL7 组相比, p65 蛋白抑制组各项指标表达量无明显差异, 含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

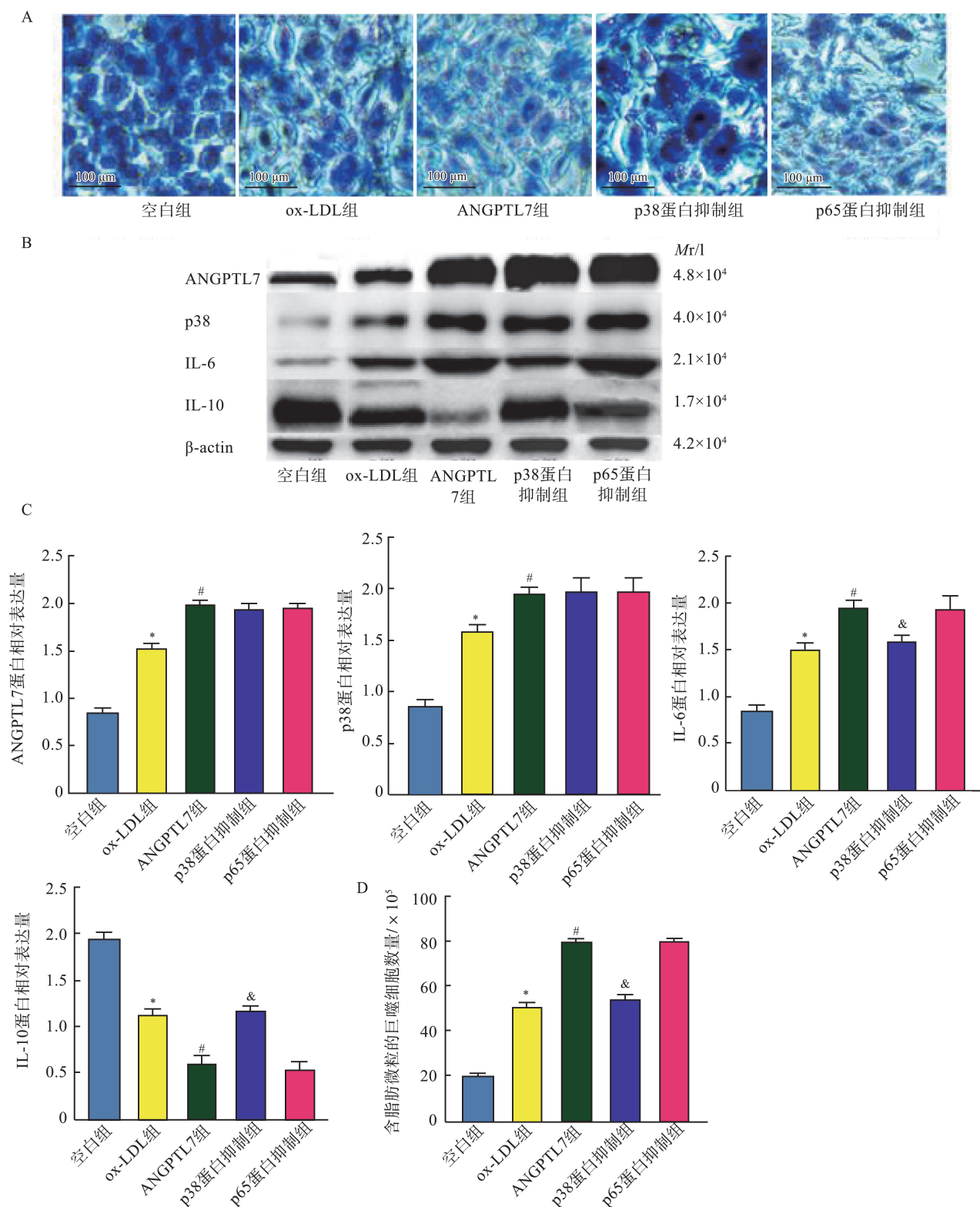


图2 空白组、ox-LDL组、ANGPTL7组、p38蛋白抑制组、p65蛋白抑制组巨噬细胞脂质蓄积、IL-6、IL-10、ANGPTL7和p38蛋白相对表达(\* $P < 0.01$  vs. 空白组; # $P < 0.01$  vs. ox-LDL组; & $P < 0.01$  vs. ANGPTL7组)

A: 各组巨噬细胞脂质蓄积; B: 各组 ANGPTL7、p38、IL-6、IL-10 蛋白表达; C: 各组 ANGPTL7、p38、IL-6、IL-10 蛋白相对表达量; D: 各组含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量。

Figure 2 Macrophage lipid accumulation, relative expressions of IL-6, IL-10, ANGPTL7 and p38 proteins in blank, ox-LDL, ANGPTL7, p38 protein inhibition and p65 protein inhibition groups (\* $P < 0.01$  vs. blank group; # $P < 0.01$  vs. ox-LDL group; & $P < 0.01$  vs. ANGPTL7 group)

A: Macrophage lipid accumulation in each group; B: ANGPTL7, p38, IL-6, and IL-10 protein expressions in each group; C: Relative expressions of ANGPTL7, p38, IL-6, and IL-10 proteins in each group; D: The number of macrophages containing red fat particles in each group.

### 2.3 TargetScan、miRWalk 等基因库预测 ANGPTL7 与 miR-1270

本研究在前期工作中进行基因芯片检测,发现在富集分析中动脉粥样硬化与 ANGPTL7 具有差异

表达,随后在 TargetScan、miRWalk 等基因库预测信息中发现 ANGPTL7 可能是 miR-1270 的靶基因之一,两者具有潜在的结合位点。见图 3。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>	Predicted relative K <sub>D</sub>
Position 115-122 of ANGPTL7 3' UTR	5' ... GAGAAACAGCCUAUAUCUCCAA... hsa-miR-1270 3' UGUCGCAGAGGUAUAGAGGUC	8mer	-0.45	99	-0.45	0	N/A	-5.089
Position 115-122 of ANGPTL7 3' UTR	5' ... GAGAAACAGCCUAUA---AUCUCCAA... hsa-miR-620 3' UAAAGAUUAGAUAGAGGUA	8mer	-0.48	99	-0.48	0	N/A	-4.824
Position 135-141 of ANGPTL7 3' UTR	5' ... CAAAGAAAGAAUAAGUCUCAAG... hsa-miR-620 3' UAAAGAUUAGAUAGAGGUA	7mer-A1	-0.16	90	-0.16	0	N/A	-3.554
Position 135-141 of ANGPTL7 3' UTR	5' ... CAAAGAAAGAAUAAGUCUCAAG... hsa-miR-1270 3' UGUCGCAGAGGUAUAGAGGUC	7mer-A1	-0.13	87	-0.13	0	N/A	-3.350

图3 基因库预测 miR-1270 与 ANGPTL7 结合位点

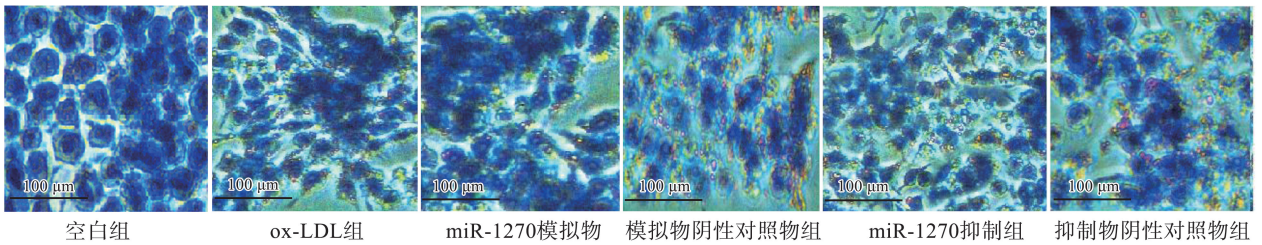
Figure 3 Genetic library prediction of miR-1270 binding site to ANGPTL7

### 2.4 miR-1270 经 ANGPTL7/p38 路径对巨噬细胞的影响

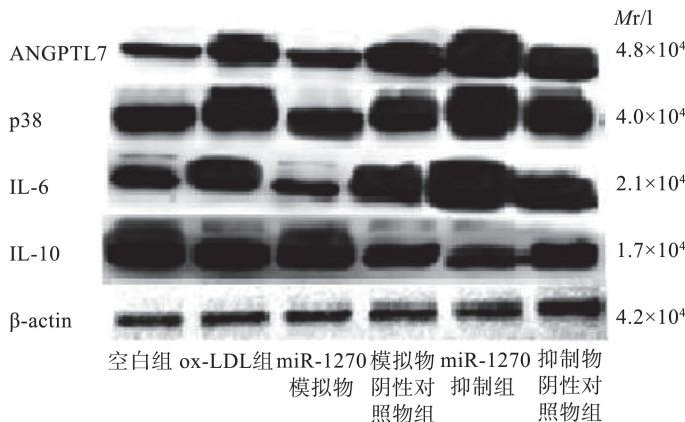
与空白组相比,ox-LDL 组 miR-1270 基因相对表达量减少,ANGPTL7 基因相对表达量增加( $P < 0.01$ ),且 ox-LDL 组中 miR-1270 与 ANGPTL7 基因相对表达量呈负相关( $r^2 = 0.6657$ ,  $P < 0.01$ )。与 ox-LDL 组相比,ANGPTL7 组、p38 蛋白抑制剂组、p65 蛋白抑制剂组 miR-1270 基因相对表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 ox-LDL 组相比,miR-1270 模拟物组 miR-1270 基因相对表达量增加,

ANGPTL7 基因及蛋白相对表达量减少,p38 及 IL-6 蛋白相对表达量减少,IL-10 蛋白相对表达量增加,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量减少( $P < 0.01$ ); miR-1270 抑制物组 miR-1270 基因相对表达量减少,ANGPTL7 基因及蛋白相对表达量增加,p38 及 IL-6 蛋白相对表达量增加,IL-10 蛋白相对表达量减少,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量增加( $P < 0.01$ );与 ox-LDL 组相比,miR 阴性对照组各项指标表达量无明显差异,含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 4。

A



B



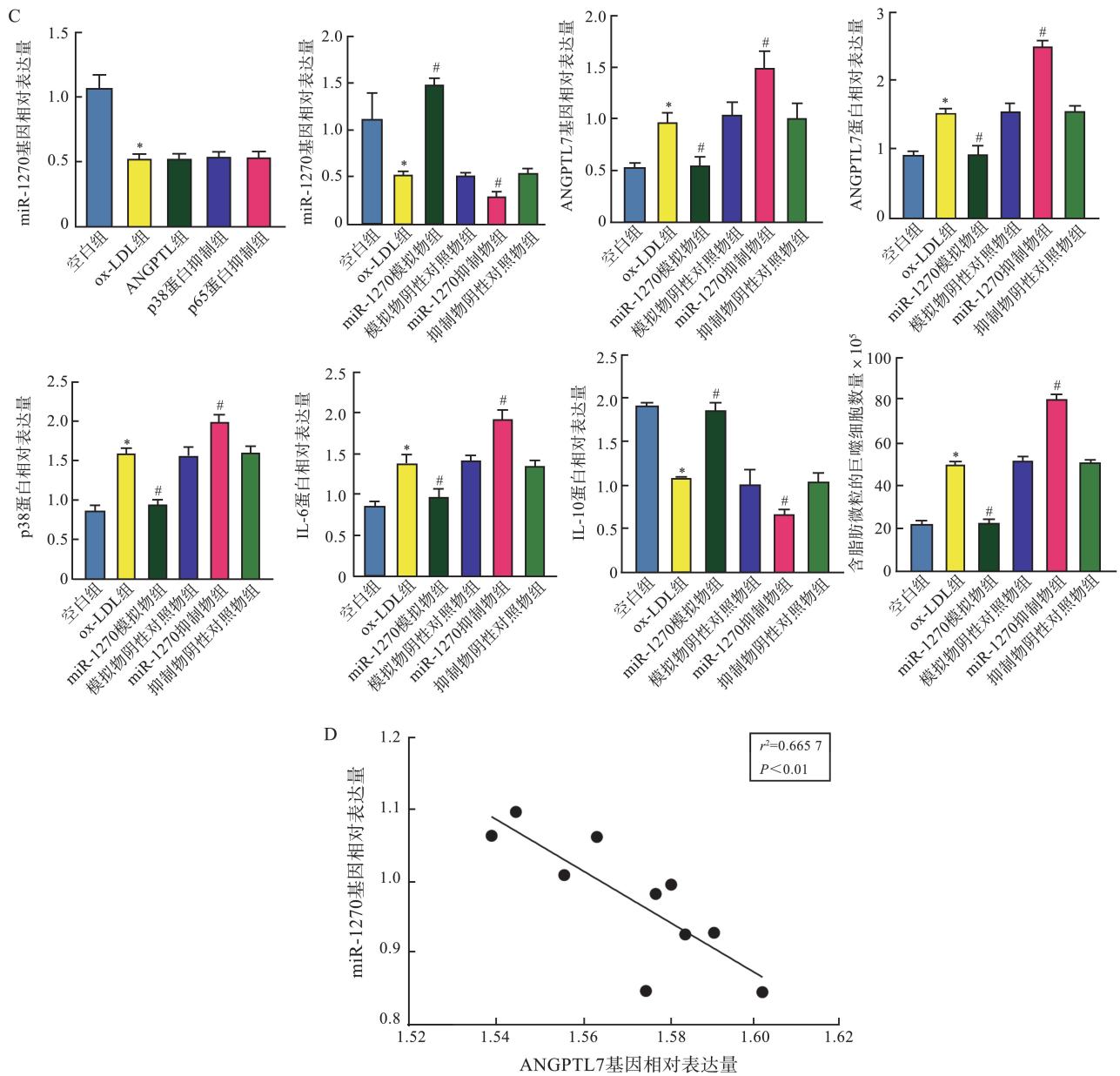


图 4 空白组、ox-LDL 组、miR-1270 模拟物组、miR-1270 模拟物阴性对照组、miR-1270 抑制物组、miR-1270 抑制物阴性对照组巨噬细胞脂质蓄积、miR-1270、IL-6、IL-10、ANGPTL7 和 p38 基因及蛋白相对表达 ( $P < 0.01$  vs. 空白组;  $P < 0.01$  vs. ox-LDL 组)

A: 各组巨噬细胞脂质蓄积; B: 各组 ANGPTL7、p38、IL-6、IL-10 蛋白表达; C: 各组基因及蛋白相对表达量、含红色脂肪微粒的巨噬细胞数量; D: miR-1270 基因相对表达量与 ANGPTL7 基因相对表达量相关性分析。

Figure 4 Relative expressions of macrophage lipid accumulation, miR-1270, IL-6, IL-10, ANGPTL7 and p38 genes and proteins in blank group, ox-LDL group, miR-1270 mimic group, miR-1270 mimic negative control group, miR-1270 inhibitor group, and miR-1270 inhibitor negative control group ( $P < 0.01$  vs. blank group;  $P < 0.01$  vs. ox-LDL group)

A: Macrophage lipid accumulation in each group; B: Protein expressions of ANGPTL7, p38, IL-6, IL-10 in each group; C: Relative expressions of genes and proteins, and the number of macrophages containing red fat particles in each group; D: Correlation analysis between the relative expressions of miR-1270 gene and ANGPTL7 gene.

### 3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAD) 又称冠心病,主要是指冠状动脉发生粥样硬化引起管腔狭窄或闭塞,导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病。作为 CAD

的病理基础,动脉粥样硬化好发于大、中等动脉,是一种以炎症反应激活和脂质代谢紊乱为特征的血管壁慢性病变<sup>[1]</sup>。在正常情况下,血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 由三酰甘油和胆固醇酯组成,外层由磷脂、游离胆固醇和载脂蛋白 B 组成。在动脉粥样硬化的发生发展过程中,局部组织内的巨噬细胞浸润增加,分泌大量促炎因子、趋化

因子,并进一步产生活性氧和氮物质,从而维持局部炎症反应不断发生。与此同时,LDL与活性氧结合形成氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL),被动脉血中的巨噬细胞吞噬摄取,形成泡沫细胞。此外,巨噬细胞与血管平滑肌细胞互相影响,通过产生额外的促炎因子和细胞外基质成分放大炎症反应,进一步促进 ox-LDL 的蓄积。由此可见,深入探讨炎症反应和脂质蓄积是防治动脉粥样硬化的关键靶点。

本研究构建成功 ox-LDL 暴露的巨噬细胞模型后,发现巨噬细胞中红色脂滴颗粒数目增加,且促炎因子 IL-6 表达增加,抗炎因子 IL-10 表达减少,表明巨噬细胞炎症反应及脂质蓄积与动脉粥样硬化息息相关。同时本研究还发现,在此模型中 ANGPTL7 及 p38 表达增加,两者呈正相关,且 ANGPTL7 与含红色脂滴的巨噬细胞数目呈正相关,提示 ANGPTL7 可能参与巨噬细胞炎症反应及脂质蓄积,是促进动脉粥样硬化形成发展的新机制。

ANGPTLs 是一类分泌性糖蛋白家族,包括 ANGPTL1-8 八个亚型<sup>[14]</sup>,在肝脏、血管系统和造血系统等组织中广泛表达,参与调节主动脉脂质蓄积、血管生长、血管通透性和重塑、血管炎症、斑块失稳、糖脂代谢紊乱等过程<sup>[15-16]</sup>。目前已有研究证实,ANGPTL2、3、4、8 与动脉粥样硬化密切相关<sup>[17-18]</sup>。近年来,ANGPTL3、4 被发现通过抑制 LPL 表达调节血脂代谢<sup>[19]</sup>。2023 年中国血脂管理指南中提出在现有的降脂治疗基础上,应用 ANGPTL3 抑制剂的患者血清中的 LDL 进一步下降<sup>[20]</sup>。罗庭等<sup>[21]</sup>研究发现,急性冠脉综合征患者的血清 ANGPTL3 水平与 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平呈正相关。作为 ANGPTL3 的同源亚型,ANGPTL7 蛋白质大小约为 40~50 kDa,结构中存在跨膜结构及信号肽,含有潜在的磷酸化位点、N-糖基化位点及 O-糖基化位点,蛋白功能主要参与氧化应激应答过程<sup>[22]</sup>。Leentjens 等<sup>[23]</sup>在阻塞性睡眠呼吸暂停的患者血中发现,ANGPTL7 表达与 TG、ox-LDL 含量呈显著正相关。Zhao 等<sup>[7]</sup>研究发现,下调 ANGPTL7 表达可抑制血管炎诱导的细胞增殖和炎症反应。Qian 等<sup>[24]</sup>研究发现,ANGPTL7 可通过促使 p38 蛋白磷酸化增强,促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达增加,诱导炎症反应增强,增强细胞的吞噬和迁移的能力,以上均提示 ANGPTL7 可能参与脂质代谢和炎症反应。为进一步证实 ANGPTL7 参与动脉粥样硬化发生发展机制的具体途径,本研究采用 ANGPTL7 重组蛋白刺激 ox-LDL 暴露的巨噬细胞,发现巨噬细胞脂质蓄积

增加,p38 及 IL-6 蛋白表达进一步增加,IL-10 蛋白表达进一步减少。随后在采用 ANGPTL7 重组蛋白的巨噬细胞中分别加入 p38 和 p65 蛋白抑制剂,发现在 ANGPTL7 表达不变的基础上,应用 p38 蛋白抑制剂后 IL-6 表达减少,IL-10 表达增加,脂质蓄积被抑制;而应用 p65 蛋白抑制剂后炎症及脂质蓄积未见明显变化,表明在 ox-LDL 暴露的巨噬细胞模型中 ANGPTL7 是加速动脉粥样硬化的新机制,其通过促进 p38 蛋白表达增加进一步实现促进巨噬细胞炎症反应及脂质蓄积。

近年,基因表观遗传学已成为抗动脉粥样硬化的新靶点<sup>[25]</sup>。其中,非编码 RNA 对转录后基因的表达调控、突变和单核苷酸多态性一直是国内外研究热点<sup>[26]</sup>。miRNA 主要存在于真核生物体内,长度在 18~23 个核苷酸之间,可参与机体生长与疾病发生发展,机制主要是识别互补碱基对,与靶 mRNA 的 3'UTR 结合并抑制或阻断靶 mRNA 的翻译,干扰基因转录后表达过程<sup>[27]</sup>。在 miRNA 家族中,miR-1270 位于 19 号染色体,长度 23bp,研究发现与癌症相关,并参与调节骨代谢和先天免疫系统。有研究证实,miR-1270 的靶基因包括人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)、核因子 1A(nuclear factor 1A, NF1A)等<sup>[13,28]</sup>,这些靶基因都被证实参与动脉粥样硬化发生发展过程,陈煜等<sup>[29]</sup>研究发现,PTEN 基因表达增加可抑制动脉粥样硬化炎症反应,Chen 等<sup>[11]</sup>研究发现,上调 NF1A 表达可减少 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子表达水平,上述均提示 miR-1270 可能靶向抑制下游 ANGPTL7 基因转录表达,可作为早期筛查因子,参与动脉粥样硬化发生发展。

本研究结果显示,ox-LDL 暴露的巨噬细胞模型中 miR-1270 表达明显减少,与 ANGPTL7 表达呈负相关;上调 miR-1270 表达后,ANGPTL7 表达减少,p38 及 IL-6 表达减少,IL-10 表达增加,巨噬细胞脂质蓄积减少;下调 miR-1270 表达后,ANGPTL7 表达增加,p38 及 IL-6 表达增加,IL-10 表达减少,巨噬细胞脂质蓄积提高;而给予其阴性对照物干预后,ANGPTL7、p38、IL-6 及 IL-10 表达水平无明显差异变化,表明 miR-1270 作为一种新的动脉粥样硬化保护性因子,靶向抑制 ANGPTL7 转录表达,经 ANGPTL7/p38 途径减轻炎症反应及脂质蓄积,延缓动脉粥样硬化发生发展,经基因表观遗传学方式可逆参与动脉粥样硬化调控。

综上所述,本研究发现在 ox-LDL 暴露的巨噬

细胞模型中,ANGPTL7 作为一个新的促炎因子,经 p38 途径促进巨噬细胞炎症反应和脂质蓄积,加速动脉粥样硬化发生发展。而 miR-1270 作为一种新的保护性因子,经基因表观遗传学机制靶向抑制下游 ANGPTL7/p38 路径,可逆调控巨噬细胞脂质蓄积及炎症反应,减轻动脉粥样硬化早期炎症及血脂蓄积,抑制动脉粥样硬化发生发展,可作为一种新的动脉粥样硬化早期筛查因子,值得深入研究。

## 参考文献:

- [1] Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: an updated review[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2020, 20(1): 21-30.
- [2] 秦超师,牛晓琳. PCSK9 促进动脉粥样硬化的机制进展[J]. *心脏杂志*, 2021, 33(4): 447-451.  
QIN Chaoshi, NIU Xiaolin. Mechanisms of PCSK9 on development of atherosclerosis[J]. *China Industrial Economics*, 2021, 33(4): 447-451.
- [3] 胡斌,牛志伟,李琳. 人 ANGPTL7 蛋白生物信息学分析[J]. *山西医科大学学报*, 2018, 49(6): 636-643.  
HU Bin, NIU Zhiwei, LI Lin. Bioinformatics analysis of human ANGPTL7 protein[J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2018, 49(6): 636-643.
- [4] Bradfield JP, Taal HR, Timpson NJ, et al. A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(5): 526-531.
- [5] Abu-Farha M, Cherian P, Al-Khairi I, et al. Plasma and adipose tissue level of angiotensin-like 7 (ANGPTL7) are increased in obesity and reduced after physical exercise[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173024.
- [6] Li J, Liang T, Wang Y, et al. Angiotensin-like protein 7 mediates TNF- $\alpha$ -induced adhesion and oxidative stress in human umbilical vein epithelial cell[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(3): 285-292.
- [7] Zhao Y, Liu K, Yin D, et al. Angiotensin-like 7 contributes to angiotensin II-induced proliferation, inflammation and apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. *Pharmacology*, 2019, 104(5-6): 226-234.
- [8] Allayee H, Farber CR, Seldin MM, et al. Systems genetics approaches for understanding complex traits with relevance for human disease[J]. *Elife*, 2023, 12: e91004. doi:10.7554/elife.91004.
- [9] 余琴,梁丽艳,刘超群,等. 急性心肌梗死患者血清 miR-133a,miR-499-5p 表达与 PCI 术后冠状动脉无复流的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(9): 1059-1063.  
YU Qin, LIANG Liyan, LIU Chaoqun, et al. Relationship between serum miR-133 a, miR-499-5 p expression in patients with acute myocardial infarction and no coronary reflow after PCI[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2023, 44(9): 1059-1063.
- [10] 郭丽婷,郑辉. MicroRNAs 在动脉粥样硬化发病机制中的调控作用[J]. *医学理论与实践*, 2022, 35(13): 2188-2189.  
GUO Liting, ZHENG Hui. Regulatory role of microRNAs in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *The Journal of Medical Theory and Practice*, 2022, 35(13): 2188-2189.
- [11] Chen L, Hu L, Zhu X, et al. MALAT1 overexpression attenuates AS by inhibiting ox-LDL-stimulated dendritic cell maturation via miR-155-5p/NFIA axis[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(19): 2472-2485.
- [12] Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 22, 8(1): 207.
- [13] Wang K, Bai X, Mei L, et al. CircRNA\_0050486 promotes cell apoptosis and inflammation by targeting miR-1270 in atherosclerosis[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(16): 905.
- [14] Liu YZ, Zhang C, Jiang JF, et al. Angiotensin-like proteins in atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 521: 19-24. doi: 10.1016/j.cca.2021.06.024.
- [15] Mazidi M, Wright N, Yao P, et al. Plasma proteomics to identify drug targets for ischemic heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 82(20): 1906-1920.
- [16] Ehrlich KC, Lacey M, Ehrlich M. Tissue-specific epigenetics of atherosclerosis-related ANGPT and ANGPTL genes[J]. *Epigenomics*, 2019, 11(2): 169-186.
- [17] Luo M, Peng D. ANGPTL8: an important regulator in metabolic disorders[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 169. doi: 10.3389/fendo.2018.00169. eCollection 2018.
- [18] Xu F, Shen L, Yang Y, et al. Association between plasma levels of ANGPTL3, 4, 8 and the most common additional cardiovascular risk factors in patients with hypertension[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2023, 16: 1647-1655. doi: 10.2147/DMSO.S411483. eCollection 2023.
- [19] Thorin E, Labbé P, Lambert M, et al. Angiotensin-like proteins: cardiovascular biology and therapeutic targeting for the prevention of cardiovascular diseases[J]. *Can J Cardiol*, 2023, 39(12): 1736-1756.
- [20] 中国血脂管理指南修订联合专家委员会. 中国血脂管理指南(2023 年)[J]. *中国循环杂志*, 2023, 38(3): 237-271.