

## miR-34a 对高糖状态下 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 极化及炎症因子分泌的影响

张风云, 赵志浩, 张卓琦\*

徐州医科大学附属医院 心内科, 江苏 徐州 221000

**摘要:**目的 探讨微小 RNA-34a(miR-34a)对高糖条件下小鼠巨噬细胞系极化和炎症因子表达的影响。方法 将小鼠巨噬细胞在高糖条件下(25 mmol/L)下培养 3 至 28 d, RT-qPCR 检测高糖培养时巨噬细胞中 miR-34a 表达及 M1 巨噬细胞标志物(iNOS 和 MCP-1)和 M2 巨噬细胞标志物(Arg-1)的基因表达。转染 miR-34a 模拟物或抑制剂后, ELISA 检测炎症相关因子(IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ )的分泌。Western blot 检测 miR-34a 靶蛋白 1 型跨膜糖蛋白 Notch1 的表达。结果 在高糖条件下,巨噬细胞中 miR-34a 以及 M1 型巨噬细胞标志物(iNOS 和 MCP-1)基因表达量逐渐增长。过表达 miR-34a 后,促炎因子 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌增加,iNOS 和 MCP-1 基因表达量也明显增加,而沉默 miR-34a 的表达后,炎症因子(IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ )分泌及 M1 型巨噬细胞标记物(iNOS 和 MCP-1)的表达量降低( $P<0.05$ )。沉默 Notch1 表达后,miR-34a 及 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌及 iNOS 和 MCP-1 表达量下降。结论 慢性高糖刺激 miR-34a 表达,后者促进巨噬细胞向 M1 型极化和促炎因子的分泌。

**关键词:** miR-34a;巨噬细胞;高糖;极化;炎症反应

中图分类号:R587.1 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.12.1808

## Effects of miR-34a on polarization and inflammatory factor content of mouse macrophage cell line RAW264.7 under high glucose conditions

ZHANG Fengyun, ZHAO Zhihao, ZHANG Zhuoqi\*

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China

**Abstract: Objective** To detect the role of miR-34a on macrophage inflammation and polarization under high glucose conditions. **Methods** Mouse macrophages were collected and cultured during high glucose for 3–28 days. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-34a, iNOS, MCP-1 and Arg-1 mRNA. Then miR-34a was over-expressed or silenced, ELISA was used to detect the expression of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and qRT-PCR was used to detect the expression of iNOS and MCP-1 mRNA. Western blot was used to detect the expression of Notch1. **Results** Expression of miR-34a increased under high glucose conditions in RAW264.7 cells continuously. Over-expression of miR-34a promoted the expression of MCP-1 and iNOS observed by RT-qPCR and increased the expression of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  detected by ELISA. Further studies showed that siRNA-Notch1 down-regulated the expression of miR-34a, MCP-1, iNOS, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Conclusions**

收稿日期:2022-05-15 修回日期:2022-12-31

基金项目:徐州市推动科技创新项目(KC19062)

\*通信作者(corresponding author):zhuoqizhang@sina.com

Chronic high glucose condition stimulates the expression of miR-34a which promotes M1 macrophage polarization and releasing of pro-inflammatory factors.

**Key words:** miR-34a; macrophage; high glucose; polarization; inflammation

糖尿病是多种心血管疾病的独立危险因素,糖尿病患者发生心血管并发症的风险是非糖尿病患者的 2~5 倍。据统计,2017 年全球有 4.51 亿糖尿病患者(年龄在 18~99 岁之间),预计到 2045 年,该数字将增加至 6.93 亿<sup>[1]</sup>,庞大的患者量加剧了健康和经济负担。尽管在过去的十几年中糖尿病得到了广泛的关注和研究,但目前仍存在许多未知的潜在机制。

慢性高糖状态可以上调炎性标志物的表达,促进氧化活性类物质的产生,最终导致血管内皮功能障碍<sup>[2]</sup>。在众多炎性细胞中,巨噬细胞是多种炎性疾病的主要反应者<sup>[3]</sup>。有报道称高血糖可使巨噬细胞过度产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),进一步诱导巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞极化并刺激炎性因子分泌<sup>[4]</sup>。

近年来在治疗炎性相关的疾病,包括肥胖、糖尿病和糖尿病并发症时,miRNA 逐渐成为新靶点。研究表明 miR-34a 在巨噬细胞参与炎性反应过程中起关键作用,可以加剧肥胖引起的全身炎性反应和代谢失调<sup>[5]</sup>。

本研究旨在探讨高糖条件下 miR-34a 表达变化及其对巨噬细胞极化和炎性因子的影响,为糖尿病抗炎治疗的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和细胞

DMEM/高糖(high glucose, HG)和 DMEM/正常糖(normal glucose, NG)培养基和胎牛血清(Gibco 公司); miR-34a-5p 模拟物/抑制剂、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒和小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(江苏凯基生物技术有限公司);Lipofectamine 3000(In-vitrogen 公司);Notch1 抗体和抗 GAPDH 兔多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 Raw264.7 细胞的分组及处理:将细胞分别置于正常浓度(5.5 mmol/L)或高浓度(25 mmol/L)的葡萄糖下 3、7、14 和 28 d。分别向巨噬细胞转染

miR-34a 模拟物或 miR-34a 抑制剂或 100 nmol/L siRNA-Notch1。采用空转染(NC)作为对照。所有的 miRNAs 和 siRNAs 都根据转染试剂盒说明书转染到巨噬细胞中。

1.2.2 RT-qPCR 检测 mRNA 表达:用 Trizol 试剂提取巨噬细胞总 RNA,并反转录成 cDNA。用 miRcute miRna 第一链 cDNA 合成试剂盒和 miRcute miRNA qPCR 检测试剂盒检测 miR-34a 水平。miR-34a, iNOS, MCP-1, Arg-1 和 GAPDH 上下游引物(表 1)。通过比较各 PCR 靶点的对照和实验条件下  $\Delta\text{Ct}$  值,计算相对基因表达水平,方程如下:相对基因表达 =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算。

表 1 RT-qPCR 的引物序列和寡核苷酸序列  
Table 1 Primer sequence for RT-qPCR

gene	sequence (5'-3')
miR-34a	F: AAGGCCACGGATAGGTCCATA
NOTCH1	F: TGTGGCTTCCTTCTACTGCG R: CTTGCCCTTGACAGGGTTG
ARG-1	F: ACATTGGCTTGCAGACGTA R: ATCACCTTGCCAATCCCAG
INOS	F: AGAGCCACAGTCTCTTTGC R: CTGGTCCATGCAGACAACCT
MCP1	F: CAGGTCCCTGTATGCTTCT R: GTGGGGCGTTAACTGCATCT
GAPDH	F: GAAGTGGTGAAGCAGGCATCT R: CGGCATCGAAGGTGAAGAGTG
U6	F: CGTTCGTGAAGCGTTCCA R: AGTGCAGGCTCCGAGGTATT

1.2.3 Western blot 检测蛋白质表达:使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度,实验中总蛋白质上样量为 50  $\mu\text{g}$ 。用 8% 的脱脂牛奶加 0.5% Tween-20 的 TBS 阻断非特异性蛋白。用 TBST(含 0.5% Tween-20)稀释的一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,后将膜 10 min/次,共洗 3 次,室温放置 1 h。再用 TBST 清洗 3 次,孵育二抗后再次洗膜,增强化学发光法显色。用 Image J 图像分析软件进行半定量分析,GAPDH 作为内参照。

表 2 寡核苷酸序列  
Table 2 Sequence for oligonucleotide

oligonucleotide	sequence (5'-3')
miR-34a mimic	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU CAACCAGCUAAGACACUGCCAUU
negative control (NC) mimic	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT
miR-34a inhibitor	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU
NC inhibitor	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA
siRNA-NOTCH1	GUACAGAGGAUGUGGACGATT UCGUCCACAUCCUCUGUACTT
siRNA-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.4 ELISA 检测炎症因子释放:取 500  $\mu$ L 细胞培养上清。根据说明书,用 ELISA 法测定 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 检测的灵敏性为 2 pg/mL。

### 1.3 统计学分析

采用 Graphpad prism 5.0 统计分析软件对实验数据进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组之间的比较采用单因素方差分析(One-way Anova),两组比较采用 Student-*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 在高糖培养条件下 miR-34a 表达增加

与正常葡萄糖培养条件相比,在高糖条件下培养 28 d 时巨噬细胞中 miR-34a 的表达水平增高 7 倍以上( $P<0.05$ ) (图 1)。

### 2.2 慢性高糖导致 M1 巨噬细胞表型标志物表达

### 增加

高糖培养 28 d 后,M1 型巨噬细胞标记物 iNOS 和 MCP-1 的表达增加( $P<0.01$ ) (图 2B 和 C)。而 M2 型巨噬细胞标记物 ARG-1 有所下降(图 2D)。

### 2.3 miR-34a 增加巨噬细胞炎症因子含量

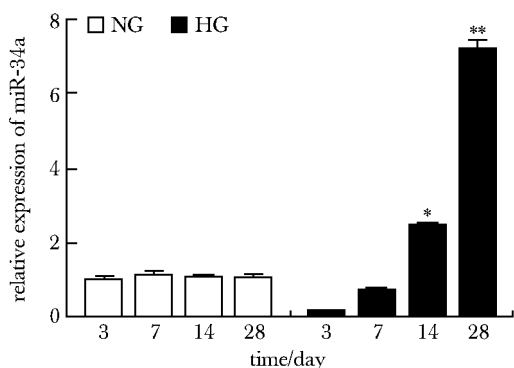
与对照组相比,miR-34a 模拟物组炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的分泌增加。同时该组细胞 M1 型巨噬细胞标记物 iNOS 和 MCP-1 mRNA 分泌也增加( $P<0.01$ )。与对照组相比,miR-34a 抑制剂组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的分泌下降,iNOS 和 MCP-1 mRNA 表达亦下降( $P<0.01$ ) (图 3)。

### 2.4 miR-34a 通过靶向 Notch1 调节巨噬细胞的极化

生物信息学提示 Notch1 是 miR-34a 的潜在靶点(图 4A)。与 NC 转染细胞相比,miR-34a 模拟物转染细胞中 Notch1 蛋白表达增加(图 4B)。此外,在 miR-34a 抑制剂组,Notch1 的表达减少(图 4B, C)。沉默 Notch1 表达后,miR-34a 表达量下降(图 4D),且巨噬细胞的 M1 型巨噬细胞标记物(iNOS 和 MCP-1)的表达下降(图 4E)。与对照组相比,沉默 Notch1 表达后巨噬细胞的 IL-6, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量降低(图 4F)。

## 3 讨论

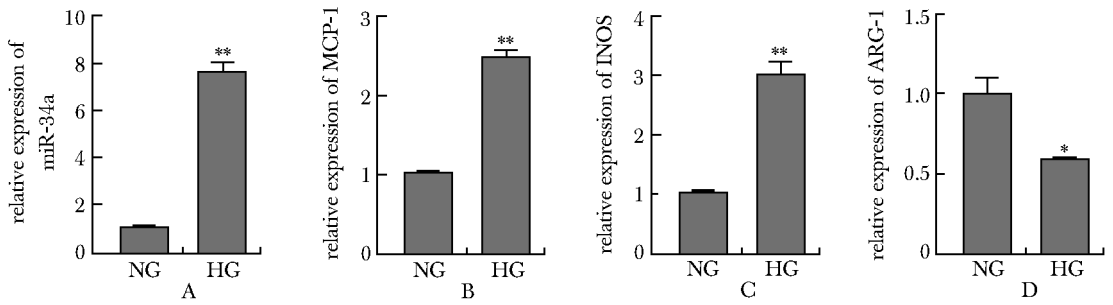
糖尿病目前极大威胁公共健康,增加社会卫生保健和治疗成本,加重了患者死亡率和其他多种疾病的发生率。体外高糖培养常用于模拟糖尿病的体内高糖微环境。既往许多研究提出高糖损害机体可能的 3 种主要机制:细胞内葡萄糖毒性、糖化终产物的产生和蛋白激酶 C (protein kinases C, PKC) 激活<sup>[6]</sup>。最近的数据表明,巨噬细胞炎症激活作为一



The expression of miR-34a in macrophages was determined by RT-qPCR in normal glucose (NG) and high glucose (HG) cultures; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with NG.

图 1 高糖培养的巨噬细胞 miR-34a 表达增多

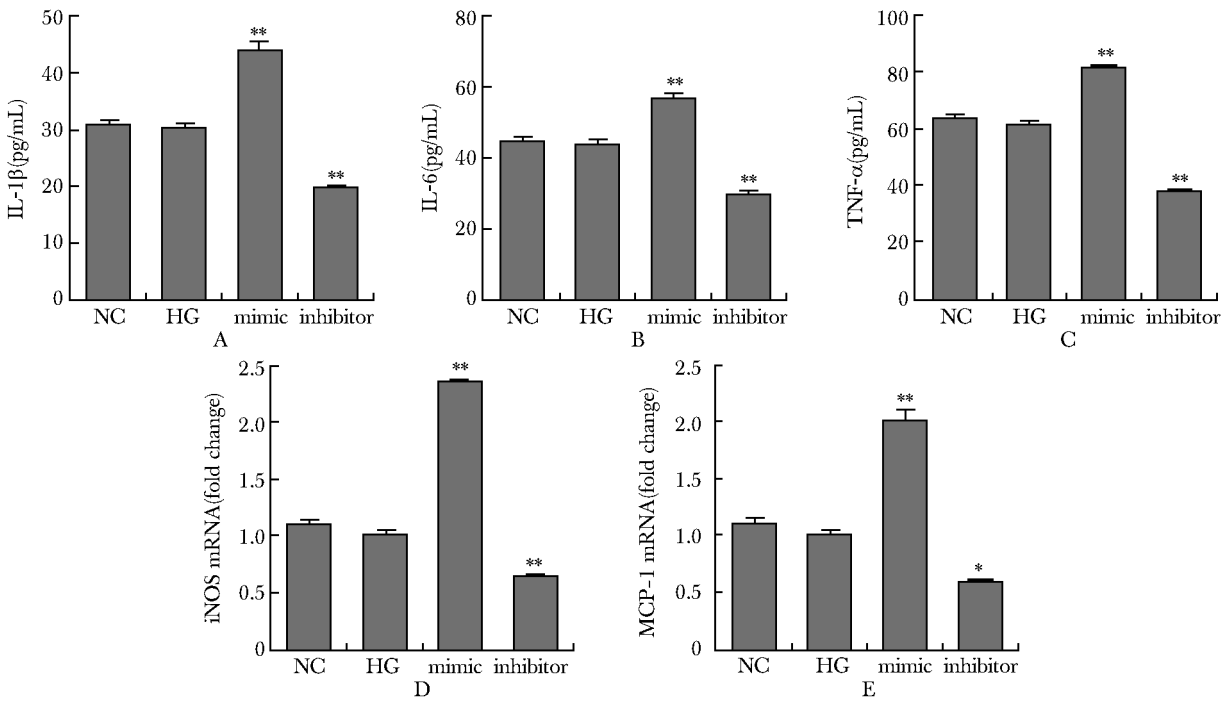
Fig 1 miR-34a expression increases under high glucose conditions ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )



Macrophages were cultured under high glucose for 28 days; qRT-PCR was used to detect the expression of miR-34a (A), M1 marker genes(B,C) and M2 related marker genes(D); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with NC.

图2 慢性高糖导致 M1 巨噬细胞表型标志物基因表达增加

Fig 2 Chronic high glucose culture leads to an increased expression of M1 phenotype marker genes( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



To further detect the role of miR-34a on macrophage polarization, NC, miR-34a mimic, and miR-34a inhibitor was transferred into macrophage under high glucose conditions; A-C. ELISA was used to detect the pro-inflammation factor release (including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ); D, E. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of iNOS and MCP-1; \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$  compared with NC.

图3 miR-34a 增加巨噬细胞炎症因子表达

Fig 3 miR-34a increased inflammation level of macrophage( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

种可能的额外机制,通过高糖损害血管内皮<sup>[7]</sup>。

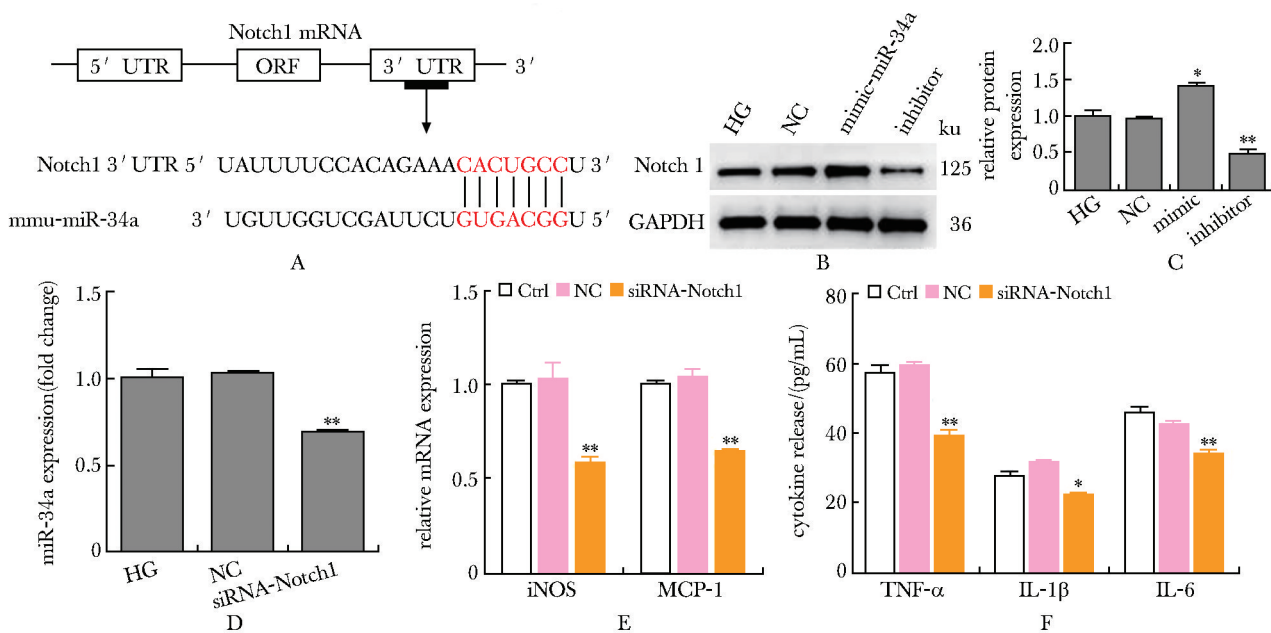
本研究发现高糖培养下,炎症因子(IL-6、IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ )表达及 M1 型巨噬细胞标记物(iNOS 和 MCP-1)表达随着培养时间增加而增加。这提示慢性高糖培养对巨噬细胞是一种持续的炎症损害。

微小 RNA (miRNA)是短的非编码 RNA,可以调节靶基因表达,进而影响下游靶蛋白的表达,从而参

与几乎所有的细胞反应。已经证明,miRNA 可以调节巨噬细胞的极化,从而影响炎症反应<sup>[8-9]</sup>。

过表达 miR-34a 促进了 M1 型巨噬细胞标记物表达和炎症因子的分泌。进一步研究表明,Notch1 可作为 miR-34a 的下游靶蛋白,可能参与调节巨噬细胞极化和促炎因子分泌。

Notch1 被广泛研究于炎症疾病的发病机制和进



A. binding sites of Notch1 mRNA and mmu-miR-34a; B, C. the cells were transferred with indicated siRNAs, Western blot was used to detect the expression of Notch1; D. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-34a; E. qRT-PCR was used to detect the expression of iNOS and MCP-1; F. ELISA was used to detect the secretion of pro-inflammation factors (including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ); \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$  compared with NC.

#### 图4 miR-34a 通过靶向 Notch1 调节巨噬细胞的极化

Fig 4 miR-34a regulated macrophage polarization by targeting Notch1 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

展<sup>[10]</sup>。有研究表明 Notch1 能促进巨噬细胞向 M1 表型极化<sup>[11]</sup>。另一项研究表明,在 LPS 刺激下,人脐静脉内皮细胞 Notch-1/NF-K $\kappa$ B 信号通路被激活<sup>[12]</sup>。本研究证明 miR-34a 通过与 Notch1 的 3-UTR 结合,减少蛋白表达。当沉默 Raw264.7 细胞中 Notch1 基因表达后,M1 巨噬细胞标记物的表达减少,巨噬细胞炎症反应减轻。

本项研究尚存在如下不足之处:1) 本研究采

用 Raw264.7 细胞系在高糖及 LPS 刺激进行,无法完全模拟体内环境,尚需进一步体内实验支撑;2) 本研究通过生物信息库寻找 miR-34a 下游靶点,无法全面了解 miR-34a 的可能的多靶点作用网络。

综上所述,长期高糖刺激 miR-34a 表达,后者促进巨噬细胞向 M1 型极化和促炎因子的分泌。本研究为改善高糖状态下炎症反应提供可能的靶点。

#### 参考文献:

- [1] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [2] Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, *et al.* Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70: 10.26402. doi:10.26402/jpp.2019.6.01.
- [3] Hulsmans M, Sam F, Nahrendorf M. Monocyte and mac-

rophage contributions to cardiac remodeling [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 93: 149-155.

- [4] Zhang B, Yang Y, Yi J, *et al.* Hyperglycemia modulates M1/M2 macrophage polarization via reactive oxygen species overproduction in ligature-induced periodontitis [J]. *J Periodontal Res*, 2021, 56: 991-1005.
- [5] Pan Y, Hui X, Hoo RLC, *et al.* Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflam-

- mation[J]. *J Clin Invest*, 2019,129: 834-849.
- [6] Ishibashi Y, Matsui T, Maeda S, *et al.* Advanced glycation end products evoke endothelial cell damage by stimulating soluble dipeptidyl peptidase-4 production and its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 125. doi:10.1186/1475-2840-12-125.
- [7] Wen Y, Gu J, Li SL, *et al.* Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages [J]. *Endocrinology*, 2006, 147: 2518-2525.
- [8] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 6425-6440.
- [9] Raucci A, Macrì F, Castiglione S, *et al.* MicroRNA-34a: the bad guy in age-related vascular diseases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78:7355-7378.
- [10] 游慧, 康海军, 陈方, 等. 高血压视网膜病变患者外周血单个核细胞 Notch1 水平及其与血管内皮功能的相关性[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42: 1528-1532.
- [11] Xu J, Chi F, Guo T, *et al.* NOTCH reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125:1579-1590.
- [12] Ge Y, Huang M, Ma YF. The effects of microRNA-34a regulating Notch-1/NF- $\kappa$ B signaling pathway on lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells[J]. *World J Emerg Med*, 2017, 8: 292-296.

## 本刊稿件格式要求(1)

**1.1 题名:**应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过 20 个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第 1 个词的首字母大写,其他均小写。

**1.2 基金:**在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

**1.3 作者:**应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般 $\leq 7$ 个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“\*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第 1 个字拼音的首字母大写,后面均用小写。

例:WANG Xiaohong。

**1.4 作者单位:**

1.4.1 中文:写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

1.4.2 英文:由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省份略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology; 2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China