

网络出版时间:2022-12-26 17:21:15 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1523.015.html

基于单核巨噬细胞外泌体/microRNA-92a 探讨 AGEs 对糖尿病内皮细胞损伤的作用机制

李 雁¹, 张新菊¹, 刘 武¹, 李金峰¹, 孙 燕¹, 李 辉², 程洁萍¹

摘要 **目的** 基于单核巨噬细胞外泌体(Exos)/microRNA-92a(miR-92a)探讨晚期糖基化终产物(AGEs)对糖尿病内皮细胞损伤的作用机制。**方法** 20只载脂蛋白E缺乏(ApoE^{-/-})小鼠随机均分为两组:损伤组和损伤+STZ组。损伤+STZ组建立链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病模型。所有动物都接受了部分左颈动脉(PLCA)结扎手术。收集颈动脉,采用免疫组化检测M1巨噬细胞数量,并使用ELISA分析AGEs水平。用AGEs处理RAW264.7细胞的条件培养基(CM)或AGEs刺激巨噬细胞来源Exos处理微血管内皮细胞系bEnd.3细胞,然后评估细胞屏障功能和线粒体功能。**结果** 糖尿病小鼠颈动脉粥样硬化组织和AGEs处理的RAW264.7细胞中M1巨噬细胞数量增加。CM或Exos在体外诱导了血管内皮细胞的屏障功能障碍、活性氧(ROS)积累和线粒体功能障碍。此外,生物信息学分析表明miR-92a在AGEs刺激巨噬细胞来源Exos中上调。实验上,Exos通过转移miR-29a参与了bEnd.3细胞中CM诱导的屏障功能障碍、ROS积累和线粒体功能障碍。最后,一系列拯救实验进一步证实Exos通过miR-92a调节血管内皮细胞的屏障功能障碍和线粒体功能。**结论** 糖尿病ApoE^{-/-}小鼠AGEs表达和M1巨噬细胞数量增加,并且AGEs刺激巨噬细胞来源Exos通过体外递送miR-92a诱导bEnd.3细胞的屏障功能和线粒体功能障碍。

关键词 巨噬细胞;外泌体;microRNA-92a;晚期糖基化终产物;糖尿病;内皮细胞损伤

中图分类号 R 725.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0085-10
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.015

在糖尿病患者中,长期高血糖会促进晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)的形成和积累^[1]。AGEs在各种类型的细胞中引起炎症和血栓形成反应^[2]。研究^[3-4]发现AGEs可以增

强巨噬细胞向M1表型的极化,但AGEs如何通过调节巨噬细胞M1极化促进糖尿病内皮细胞(endothelial cells, ECs)损伤的确切机制尚不清楚。最近,外泌体(exosomes, Exos)的功能引起了广泛关注^[5]。巨噬细胞来源的Exos占据血液中循环Exos的很大一部分^[6],但很少探索巨噬细胞来源的Exos在糖尿病ECs损伤中的作用。多种microRNA(miRNA)参与Exos介导的细胞间相互作用,已发现巨噬细胞来源的Exos通过向糖尿病ECs转运miR-92a,形成动脉粥样硬化病变^[7]。假设AGEs刺激巨噬细胞来源的Exos通过递送miR-92a诱导糖尿病ECs损伤,最终形成动脉粥样硬化病变。该研究分析了糖尿病载脂蛋白E缺乏(apolipoprotein-E deficient, ApoE^{-/-})小鼠AGEs表达和M1巨噬细胞数量情况,并探讨了AGEs处理的巨噬细胞是否通过Exos递送miR-92a损害血管ECs,旨在为治疗动脉粥样硬化提供一个有希望的靶点。

1 材料与方法

1.1 动物 4周龄雄性ApoE^{-/-}小鼠($n=20$)购自南京大学模式动物遗传研究中心。小鼠维持西式饮食(在以谷物为基础的食物中添加高水平的脂肪和胆固醇),并随机分为两组:损伤组($n=10$)和损伤+STZ组($n=10$)。损伤+STZ组通过腹腔内连续5次每天注射40 mg/kg新鲜制备的链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(溶解在柠檬酸盐缓冲液,浓度为0.05 mol/L, pH 4.5, 美国Sigma-Aldrich公司)诱发糖尿病^[8]。损伤组仅接受缓冲液。两周后,测量血糖水平,12 h空腹血糖水平大于或等于13.9 mmol/L的动物认为患有糖尿病。两周后,所有动物都接受了部分左颈动脉(partial left carotid artery, PLCA)结扎手术^[8]。通过腹腔内注射戊巴比妥麻醉ApoE^{-/-}小鼠,并暴露左颈总动脉。分离左颈外动脉、左颈内动脉和枕动脉,然后用7-0丝线结扎。对侧颈动脉作为内部对照。手术后30 d处死小鼠。收集颈动脉用于进一步实验。

1.2 组织学检查 立即取出颈动脉并固定在4%

2022-09-10 接收

基金项目:兵团科技攻关项目(编号:2018AB024)

作者单位:新疆生产建设兵团医院(石河子大学医学院第二附属医院)¹ 内分泌科、² 行政机关, 乌鲁木齐 830092

作者简介:李 雁,女,副主任医师;

张新菊,女,主任医师,责任作者, E-mail: nbw201709@163.com

多聚甲醛中。将组织横切,石蜡包埋,切成 4 mm 的切片。动脉切片用苏木精和伊红(HE)染色。在光学显微镜(日本 Nikon 公司)下检查 HE 染色的切片。

1.3 免疫荧光 对于组织分析,在颈动脉上进行抗 CD68(1:200,美国 Affinity 公司)和抗 iNOS(1:200,美国 Affinity 公司)一抗孵育。分别使用异硫氰酸荧光素(fluoresceine isothiocyanate, FITC)和别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)偶联的二抗。细胞核用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,美国 Sigma-Aldrich 公司)复染。对于细胞分析,细胞用 4% 聚甲醛固定并用 0.3% Triton X-100 透化,然后用 5% BSA 封闭,最后与抗 Occludin(1:500,美国 Proteintech 公司)或抗 ZO-1(1:500,美国 Proteintech 公司)一抗在 4 °C 下孵育过夜。第二天使用相应的二抗和 DAPI 试剂处理细胞和切片,并通过 IX-71 荧光显微镜(日本 Olympus 公司)观察这些切片的特异性荧光。

1.4 细胞培养与分组 RAW264.7 鼠巨噬细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司。细胞接种在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM,美国 HyClone 公司)中。将细胞与 400 µg/ml 牛血清白蛋白(BSA,美国 Sigma-Aldrich 公司)或不同浓度(0、50、100、200 和 400 µg/ml)AGEs 孵育处理 24 h,或用 200 µg/ml AGEs 孵育不同时间(0、12、24、48 和 72 h)。BSA 用作对照载体。bEnd.3 脑微血管内皮细胞系购自中国科学院典型培养物保藏中心。细胞接种在含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 中培养。

1.5 小鼠原代心肌细胞的分离培养及分组 bEnd.3 细胞以 4×10^4 个/孔接种于 96 孔板,进行以下实验。实验 1 分为对照组、条件培养基(conditioned medium, CM)组、CM + GW4869(一种 Exos 分泌抑制剂)组。CM 组加入 200 µg/ml AGEs 处理 RAW264.7 细胞 48 h 的 CM,CM + GW4869 组加入 200 µg/ml AGEs 和 20 mmol/L GW4869(美国 Sigma-Aldrich 公司)处理 RAW264.7 细胞 48 h 的 CM。实验 2 分为 miR-92a 过表达(miR-92aOE)组和相应对照组(miR-NCOE)以及 miR-92a 敲低(miR-92aKD)组和阴性对照组(miR-NCKD)。RAW264.7 细胞在用 AGEs 处理前,分别使用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)将 miR-92a 过表达质粒或短干扰 RNA 及各自对照(上海 GenePharma 公司)转染 RAW264.7 细胞 24 h,然后加入 200 µg/ml

AGEs 处理 RAW264.7 细胞 48 h。实验 3 分为 miR-NCOE-Exos 组、miR-92aOE-Exos 组、miR-92aKD-Exos 组和 miR-NCKD-Exos 组。分别收集实验 2 对应组项下的 Exos,加入 bEnd.3 细胞中处理 24 h。

1.6 AGEs 的制备 将 BSA 添加到 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS、pH 7.4、5 g/L)中,将其与 50 mmol/L D-葡萄糖在 95% 空气、5% CO₂ 中在 37 °C 下孵育 12 周,然后用 PBS 透析去除未掺入的 D-葡萄糖,获得 AGEs。取未修饰的 BSA 在不含 D-葡萄糖的相同条件下温育作为对照。AGEs 通过高效液相色谱检测器(美国 Waters 公司)进行鉴定。通过 BCA 蛋白测定试剂盒(上海 Beyotime 公司)估算 AGEs 的浓度。将 AGEs 储存在 -20 °C 下直至使用。

1.7 Exos 分离鉴定 从用和不用 AGEs 预处理的 RAW264.7 的培养上清液中提取 Exos。在收集培养基之前,用 PBS 洗涤 RAW264.7 两次,并在 AGEs 刺激后用不含 Exos 的培养基替换培养基。24 h 后收集条件培养基(CM),并以 300 r/min 离心 10 min 和 2 000 r/min 离心 10 min。离心后,将细胞上清液通过 0.22 µm 过滤器过滤以去除细胞碎片。随后将上清液转移到 Amicon Ultra-15 离心过滤器(美国 Millipore 公司)并以 4 000 r/min 离心,直到上室中的体积减少到大约 200 µl。对于 Exos 纯化,将上腔室中的液体装载在 30% 蔗糖/D₂O 垫上,并在 4 °C 下以 100 000 r/min(德国 Beckman Coulter 公司)超速离心 60 min。然后将托盘悬浮在 PBS 中用于进一步鉴定和给药。

使用 Tecnai 12 透射电子显微镜(TEM,荷兰 Philips 公司)观察 Exos 的形态。纳米粒子追踪分析(NTA,美国 Nanosight Ltd 公司)测量 Exos 的直径。通过 Western blot 分析 Exos 的表面阳性标志物,包括 CD63 和 TSG101,和阴性标志物 Calnexin 的表达。

1.8 bEnd.3 细胞对 Exos 的摄取 将 Dil 溶液(4 mg/ml,美国 Molecular probe 公司)与含有 Exos 的 PBS 溶液一起孵育以进行荧光标记。通过在 4 °C 下以 100 000 r/min 离心去除过量染料,并将标记的 Exos 洗涤 3 次。这些 Dil 标记的 Exos 与 bEnd.3 细胞共培养 24 h,然后用 PBS 洗涤细胞并固定在 4% 多聚甲醛中。使用激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss Microscopy GmbH 公司)光学检查 bEnd.3 细胞对 Exos 的摄取。

1.9 跨上皮电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER) 测量 bEnd.3 细胞接种在具有 0.4

μm 孔的插入物(美国 Millipore 公司)中,并使其达到汇合状态。在每次测量之前,将细胞用 HBSS 预平衡 30 min,并使用 Millicell[®] ERS 仪器(美国 Millipore 公司)测量电阻。TEER 值使用以下公式计算: $\text{TEER}(\Omega \cdot \text{cm}) = (\text{TEER}_{\text{总数}} - \text{TEER}_{\text{空白}}) \times \text{膜面积}$ 。

1.10 渗透性测定 使用 FITC-葡聚糖(4 ku,美国 Sigma Aldrich 公司)测量跨上皮渗透性。将细胞接种在上述插入物中并使其汇合,将 100 μl FITC-葡聚糖培养基(1 mg/ml)添加到顶端室,并将 500 μl 培养基添加到基底室。孵育 2 h 后,收集基底室中的培养基并使用荧光分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司)进行荧光测量。

1.11 线粒体 ROS 检测和形态学分析 使用 MitoSOX[™] Red Mitochondrial Superoxide Indicator(美国 Molecular Probes 公司)检测线粒体 ROS,并在共聚焦显微镜下观察。对于线粒体的形态学分析,将 bEnd. 3 细胞与 100 nmol/L Mitotracker Red CMXRos(美国 Invitrogen 公司)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。使用共聚焦显微镜获得荧光图像。

1.12 实时定量 PCR 分析 用 miRNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司)从细胞和 Exos 中提取总 RNA。使用 TaqMan MicroRNA 逆转录试剂盒(美国 ThermoFisher Scientific 公司)在 S1000[™] 热循环 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)合成 cDNA。然后通过 TaqMan(美国 Life Technologies 公司)的 miR-92a 探针进行实时 PCR 以定量 miR-92a 的表达。U6 作为内源性对照用于标准化。使用标准的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (周期阈值)方法测定 miR-92a 的相对表达水平。用于实时 PCR 的引物序列如下: miR-92a 正向: 5'-CTTGAAGGTAATGGAACCCGG-3', 反向: 5'-GTGATACCCGTGGTA GTACCTC-3'; U6 正向: 5'-AGGAC-TATCGTCCGATCAAC-3', 反向: 5'-GCCCTCACACCTGC ACTGTGTC-3'。

1.13 Exos 的全转录组文库制备和测序 对于测序分析,将从对照组、CM 组 Exos 中分离的 RNA 样品用不含 TURBO DNA(美国 Thermo Fisher 公司)的 DNase 处理,然后用 Zymo RNA Clean & Concentrator-5(美国 Zymo Research 公司)纯化和浓缩。使用 Quant-iT Ribogreen RNA Assay(美国 Thermo Fisher 公司)测量 RNA 的数量,使用安捷伦高灵敏度 RNA Screen Tape 和缓冲液(美国 Agilent 公司)测量质量。使用 Takara Bio 的 SMARTer Stranded Total RNA-Seq kit v2 Pico Input Mammalian(日本 Takara 公司)从 10 ng 总 RNA 合成 Illumina 兼容的双链

cDNA 全转录组文库,并经高灵敏度 D1000 Screen-Tape 试剂(美国 Agilent 公司)测量文库的大小,使用 KAPA SYBR FAST 通用 qPCR 试剂盒(美国 Kapa Biosystems 公司)测量浓度。然后在 Illumina 的 NovaSeq 6000 上对文库进行测序。SMARTer Total RNA pico v2 读数按照 Takara Bio 的建议进行质量过滤和修剪,去除 read2 的前 3 个碱基。修剪和过滤读取后,使用 STAR(v. 2.5.3a)映射基因组和转录组。在 R(3.5.0 版)中使用 DESeq2 包(1.20.0)对所有基因表达分析进行差异表达。使用中值比方法(DESeq2 中的默认值)对样本的原始读取计数进行标准化。使用 R 中的 pheatmap(v. 1.0.10)包创建热图。

1.14 Western blot 分析 通过 RIPA 裂解(上海 Beyotime 公司)提取 Exos 的蛋白质,并经 BCA 检查蛋白质浓度。在 SDS-PAGE 凝胶中变性和分离后,将蛋白质转移到 PVDF 膜上;然后在室温下用封闭缓冲液(Beyotime)封闭膜 1 h,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与抗 CD63 抗体(1:1 000,美国 Santa Cruz 公司)、抗 Tsg101 抗体(1:1 000,Santa Cruz)和抗 Calnexin 抗体(1:1 000,Santa Cruz)孵育过夜。洗涤后,PVDF 膜用 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000,美国 CST 公司)在室温下孵育 1 h。洗涤后,PVDF 膜与 ECL 底物一起孵育以在印迹上产生化学发光,由 ChemiDoc MP 成像系统(美国 Bio-Rad 公司)捕获图像并通过 Image J 软件进行标准化。

1.15 酶联免疫吸附试验(ELISA) TNF- α 和 IL-6 反映 M1 巨噬细胞,而 IL-10 反映 M2 巨噬细胞。通过 ELISA(美国 Proteintech Group 公司)测试肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin 6,IL-6)和 IL-10 水平。AGEs ELISA 试剂盒购自武汉优尔生命科学装备有限公司。

1.16 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。两组数据比较采用 Student's t 检验,多因素分析采用单因素或双因素 ANOVA 检验。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 AGEs 表达和 M1 巨噬细胞数量增加 HE 染色显示损伤组和损伤 + STZ 组的左颈动脉中都有动脉粥样硬化斑块形成。与损伤组相比,损伤 + STZ 组颈动脉直径的减小更为明显(图 1A)。与损伤组小鼠相比,损伤 + STZ 组小鼠表现出更高的 AGEs、TNF- α 和 IL-6 水平($t =$

18.365、22.582、11.426, 均 $P < 0.001$), 并且 IL-10 水平降低 ($t = 4.973$, $P = 0.005$) (图 1B ~ E)。此外, 颈动脉切片的免疫荧光图像显示, 损伤 + STZ 组小鼠巨噬细胞中 M1 巨噬细胞的比例高于损伤组小鼠 ($P < 0.001$) (图 1F)。

2.2 AGEs 增强巨噬细胞向 M1 表型的极化

ELISA 结果显示 TNF- α 和 IL-6 的表达较对照组升高 ($F = 40.564$ 、 42.172 , 均 $P < 0.001$), 而 IL-10 的

表达降低 ($F = 26.275$, $P < 0.001$)。TNF- α 和 IL-6 的表达随着 AGEs 浓度和孵育时间的增加而增加 ($F = 32.614$ 、 38.742 , 均 $P < 0.001$)。此外, IL-10 表达以浓度和时间依赖性方式降低 ($F = 23.568$, $P < 0.001$) (图 2)。这些结果表明 AGEs 主要诱导巨噬细胞极化为 M1 表型。本研究选择 200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 处理 48 h 作为最佳处理。

2.3 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 在体外损伤

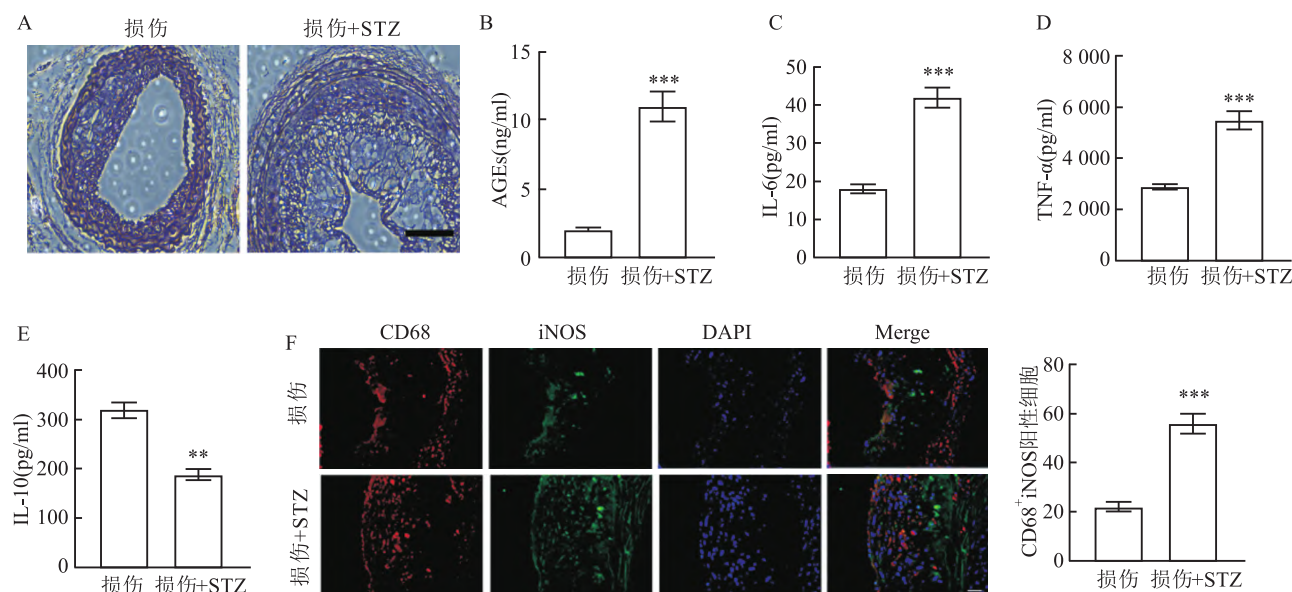


图1 糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 AGEs 表达和 M1 巨噬细胞数量增加

A: 通过 H&E 染色分析颈动脉 $\times 50$; B、C、D、E: ELISA 测定血浆 AGEs、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平; F: 颈动脉切片中巨噬细胞组成的免疫荧光染色的代表性照片及定量分析 $\times 100$; DAPI: 一种核标记; CD68: 一种泛巨噬细胞标志物; iNOS: M1 巨噬细胞标记; 与损伤组比较: * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

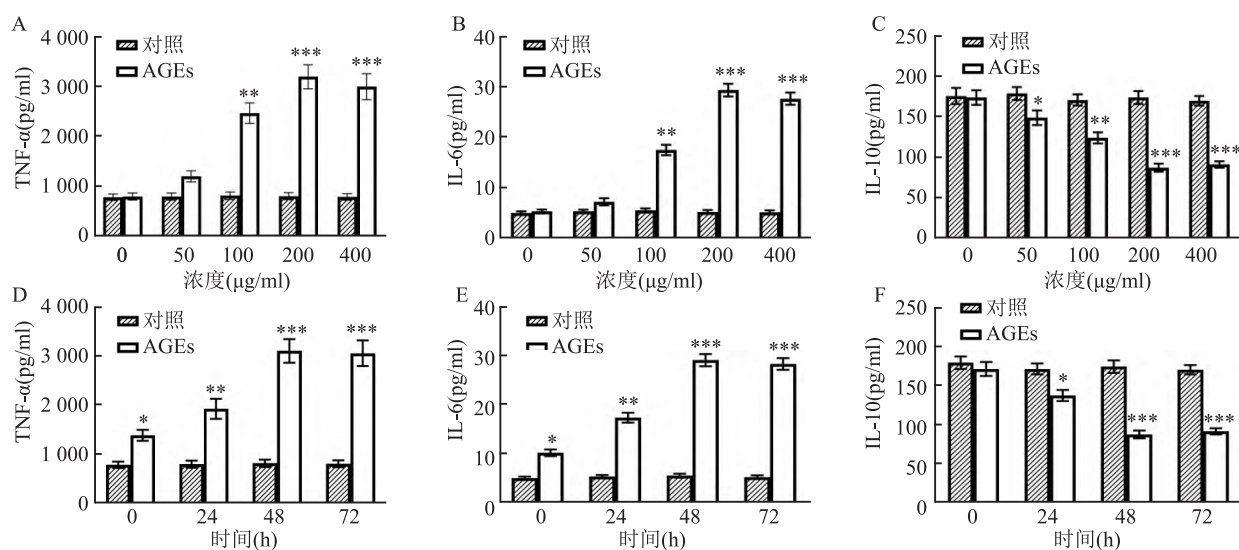


图2 AGEs 增强了巨噬细胞对 M1 表型的极化

A、B、C: ELISA 分析用不同浓度的 AGEs 处理的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平; D、E、F: ELISA 分析用 AGEs (200 $\mu\text{g/ml}$) 处理不同时间的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

bEnd. 3 细胞屏障功能 AGEs 刺激巨噬细胞的 CM 降低了 bEnd. 3 细胞的 TEER 值(图 3A)并增加了 FITC-葡聚糖通透性(图 3B)。此外,TJs 蛋白的荧光染色表明,用 CM 处理降低了 bEnd. 3 细胞膜中 ZO-1 和 Occludin 的表达(图 3C 和 D)。考虑到 Exos 参与两个细胞之间的旁分泌作用以介导细胞间通讯,研究用 GW4869 预处理 RAW264.7。结果显示 GW4869 部分逆转了 CM 诱导的 TEER 值下降(图 3A)和 FITC-葡聚糖通透性增加(图 3B);TJs 蛋白的荧光强度降低也被 GW4869 逆转(图 3C、D)。

2.4 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 在体外上调 bEnd. 3 细胞的 ROS 水平并损害线粒体功能 CM 处理增加了 bEnd. 3 细胞中线粒体超氧化物水平, GW4869 可以部分逆转这种增加(图 4A、B)。此外, CM 处理缩短了线粒体长度并使其膨胀,并且线粒体碎片化的细胞百分比也增加。GW4869 可以部分逆转线粒体形态变化(图 4C ~ E)。

2.5 miR-92a 在 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中上调 为了进一步研究 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 对血管内皮细胞的潜在影响,随后提取并鉴定了 Exos(图 5)。分析暴露于正常或 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中 microRNA 表达谱,观察到 11 个 microRNA 的下调和 22 个 microRNA 的上调。其中, miR-92a 表达在 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中增强(图 6A)。此外,RT-qPCR 分析显示,miR-92a 表达在 AGEs 刺激巨噬细胞中、AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中和用 Exos 处理的 bEnd. 3 细胞中均增强(图 6B ~ D),表明 miR-92a 可以通过 Exos 从巨噬细胞转移到 bEnd. 3 细胞。

2.6 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 通过体外递送 miR-92a 损伤 bEnd. 3 细胞 研究构建了 miR-92a 过表达(miR-92aOE)和敲低(miR-92aKD) RAW264.7,然后分离 Exos 以治疗 bEnd. 3 细胞。转染效率如图 7A、B 所示,与阴性对照相比,在分别源

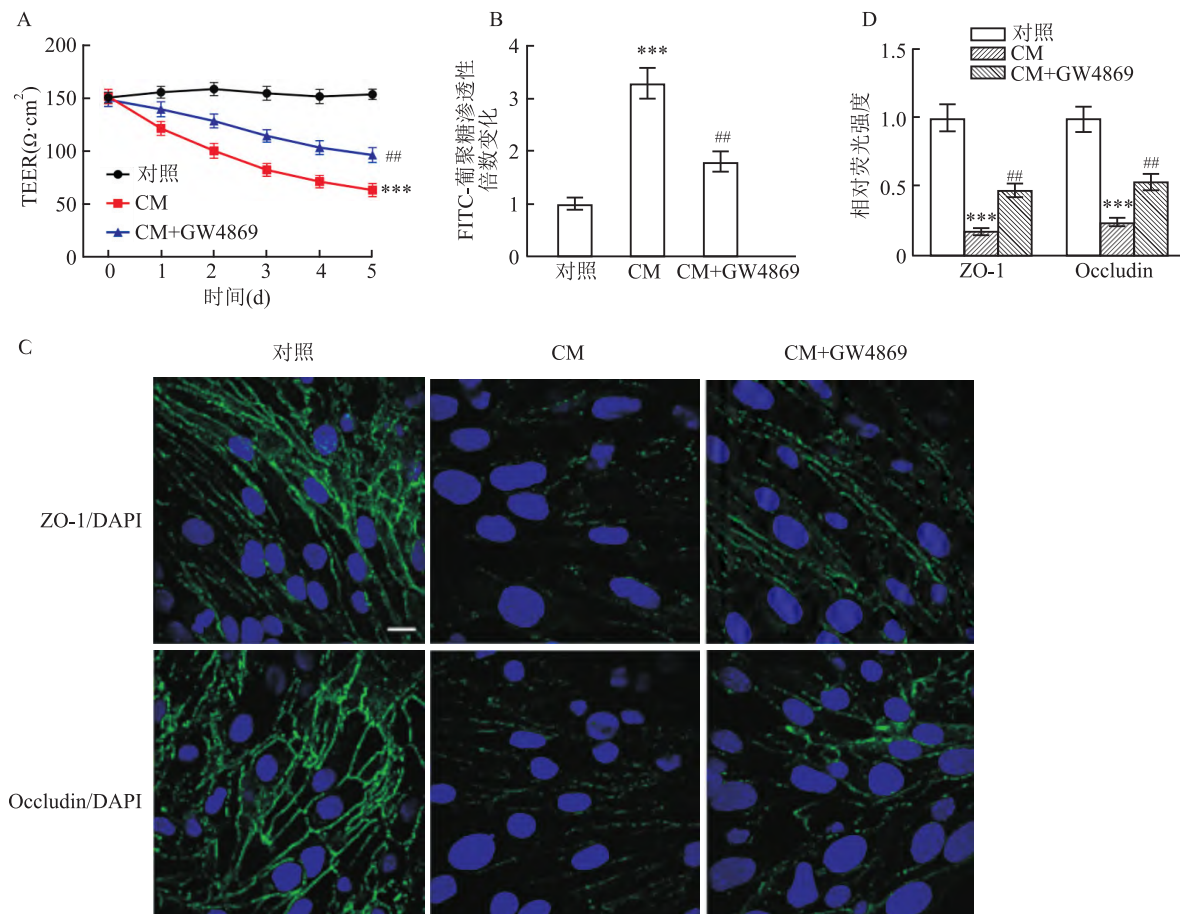


图 3 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 在体外损伤 bEnd. 3 细胞屏障功能

A、B: TEER 值和 FITC-葡聚糖泄漏用于确定 GW4869 预处理对 AGEs 刺激巨噬细胞的条件培养基 (CM) 诱导 bEnd. 3 细胞屏障功能障碍的影响; C、D: 免疫荧光检测 bEnd. 3 细胞中 ZO-1 和 Occludin 的表达和定量分析 $\times 100$; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 CM 组比较: ## $P < 0.01$

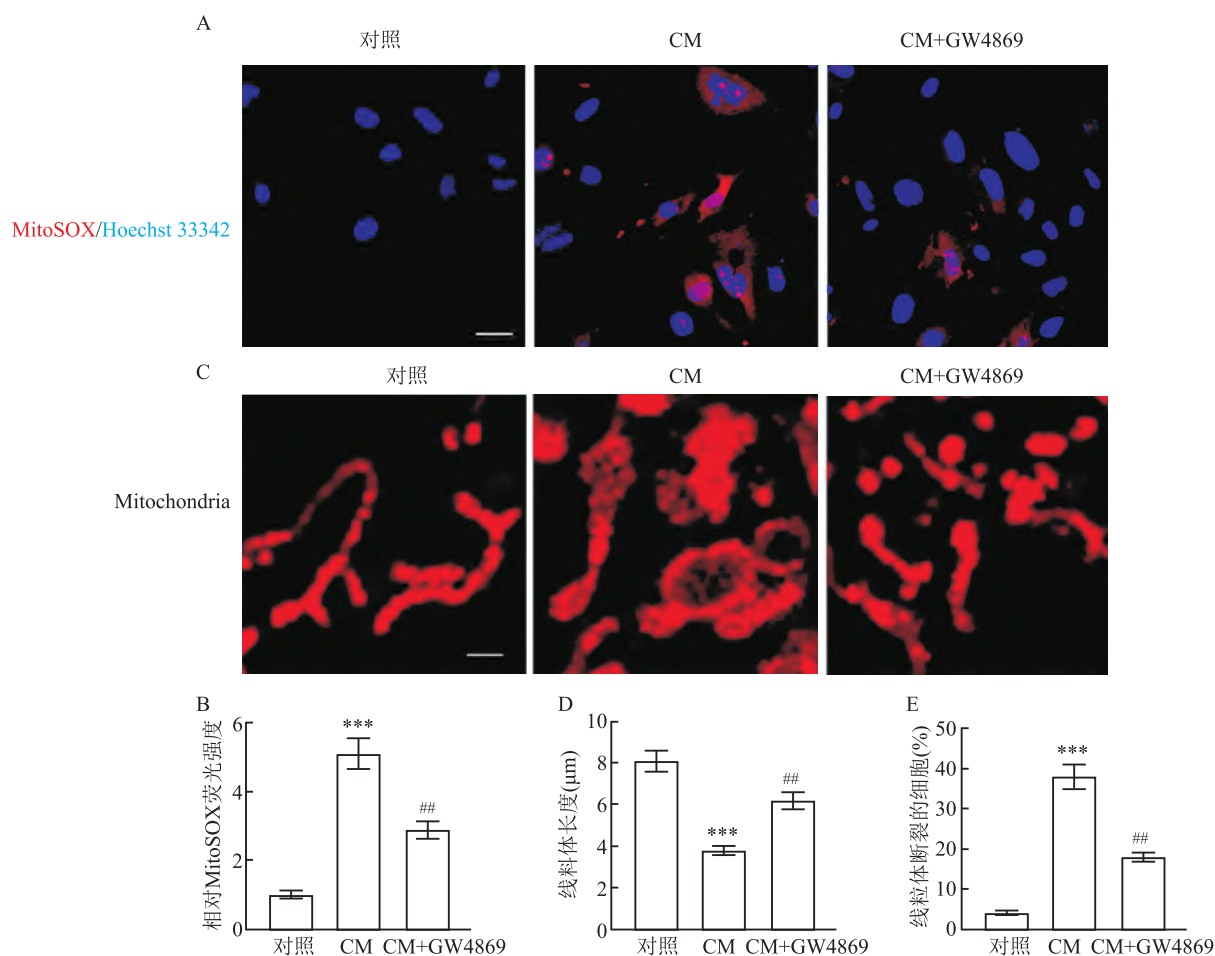


图4 AGEs刺激巨噬细胞来源Exos在体外上调bEnd.3细胞的ROS水平并损害线粒体功能

A、B:在指定组中通过免疫荧光检测和量化bEnd.3细胞中的MitoSOX水平 ×200;C、D、E:指定组中线粒体形态的代表性图像和线粒体长度的量化以及线粒体碎片化细胞的百分比 ×200倍;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与CM组比较:## $P < 0.01$

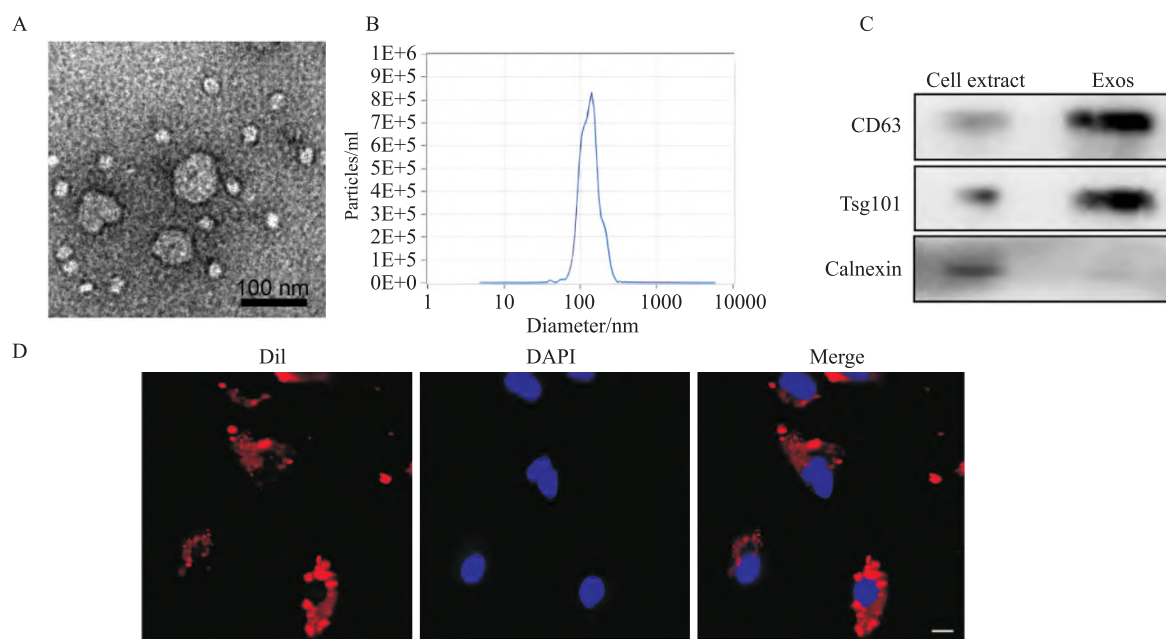


图5 AGEs刺激巨噬细胞来源Exos的鉴定和bEnd.3细胞对Exos的摄取

A:TEM下源自RAW264.7的Exos形态 ×10 000;B:Exos的NTA分析;C:Exos蛋白标志物的Western blot分析;D:bEnd.3细胞对Dil标记的Exos的摄取 ×200

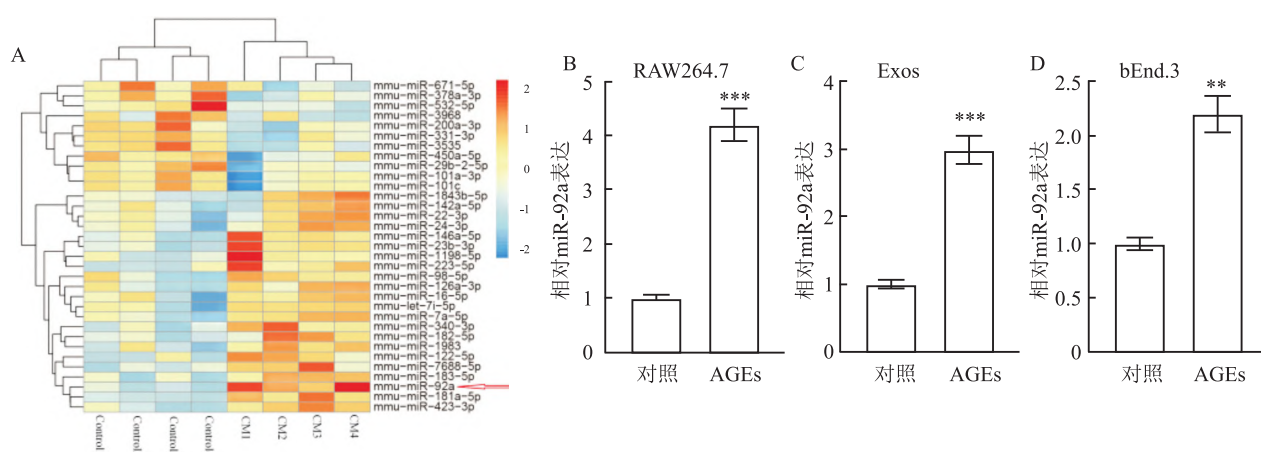


图6 miR-92a 可以通过 Exos 转移到 bEnd.3 细胞

A: 热图显示 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中 microRNA 的差异表达, 箭头标记 miR-92a; B、C、D: 通过 RT-qPCR 确定 AGEs 刺激巨噬细胞中、AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中和用 Exos 处理的 bEnd.3 细胞中 miR-92a 表达; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

自 miR-92aOE 和 miR-92aKD 的 RAW264.7 细胞和 Exos 中观察到 miR-92a 表达增加和降低。此外, 与 miR-NCOE-Exos 相比, 用 miR-92aOE-Exos 处理靶标 bEnd.3 细胞中 miR-92a 表达上调, 而与 miR-NCKD-Exos 相比, 用 miR-92aKD-Exos 处理则下调 (图 7C)。然后进行了几个功能实验。如图 7D 和 E 所示, 在 miR-92aOE-Exos 组中, TEER 值降低, FITC-葡聚糖通透性增加, 而在 miR-92aKD-Exos 组中观察到相反的结果。加入 miR-92aOE-Exos 后, ZO-1 和 Occludin 的荧光强度降低, 而 miR-92aKD-Exos 处理强烈增强了 ZO-1 和 Occludin 的表达 (图 7F、G)。此外, 与 miR-NCOE-Exos 给药相比, 用 miR-92aOE-Exos 治疗可上调线粒体超氧化物水平 (图 7H、I), 并在线粒体中诱导更多的肿胀和更短形态, 线粒体碎片化的细胞百分比更高 (图 7J ~ L); 然而, miR-92aKD-Exos 给药显示出相反的结果。

3 讨论

M1 巨噬细胞在动脉粥样硬化进展中占主导地位, 而 M2 巨噬细胞在消退中发挥作用^[5]。AGEs 在糖尿病患者动脉粥样硬化斑块的形成中起重要作用, 其通过增强巨噬细胞极化进入 M1 表型来介导动脉粥样硬化^[4]。本研究观察到糖尿病小鼠的血浆 AGEs 水平较高, 颈动脉粥样硬化组织中 M1 巨噬细胞数量增加, 这与之前的研究一致。此外, 本研究显示 AGEs 在体外诱导巨噬细胞极化为 M1 表型。

在过去几年中, Exos 作为一种治疗策略或细胞串扰介质在糖尿病中进行了研究^[9]。最新证据^[10]表明, 巨噬细胞 Exos 通过传递高血糖的有害特性,

以加速糖尿病中的动脉粥样硬化。此外, 巨噬细胞来源的 Exos 通过抑制自噬诱导高血糖对肾小球足细胞的损伤作用^[11]。本研究中, Exos 可能介导巨噬细胞和血管内皮细胞之间的相互作用, 并且可能是巨噬细胞诱导血管内皮细胞屏障功能损伤的原因。Exos 中 miRNA 已成为众多细胞过程的关键调节因子, 在疾病和组织修复中发挥重要作用^[5]。此外, 本研究显示 miR-92a 表达在 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 中增强, 并且 miR-92a 可以通过 Exos 从巨噬细胞转移到 bEnd.3 细胞。研究^[12]显示, 抑制 miR-92a 通过上调 db/db 小鼠的血红素加氧酶-1 来抑制氧化应激并改善内皮功能。此外, 抑制内皮中 miR-92a-3p 可减少肾损伤相关的动脉粥样硬化^[13]。将这些报道的研究和本研究结合起来, AGEs 刺激的巨噬细胞可以通过 Exos 转移 miR-92a 以诱导血管内皮细胞屏障功能损伤。

在血管内皮细胞中, 线粒体 ROS 是耗氧过程中的代谢产物, 高水平的 ROS 可通过调节炎症、增殖和线粒体自噬来损害血管功能, 这决定了其在血管完整性中的破坏作用^[12]。本研究验证了 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 诱导的线粒体 ROS 是通过转移 miR-92a 介导的, 并且 Exos 中 miR-92a 敲低有效降低了 ROS 产生并减少了线粒体损伤。通过旁分泌作用, Exos 可以通过传递遗传物质来构建细胞间通讯, 近年来它们的“信使”作用已得到广泛研究^[6]。研究^[14]显示, miR-92a 在 M1 极化巨噬细胞中上调以诱导炎症。据报道巨噬细胞来源的 Exos 中 miR-92a 转移到心脏成纤维细胞中以诱导心脏炎症, 抑制 miR-92a 可以减轻巨噬细胞在溃疡性结肠

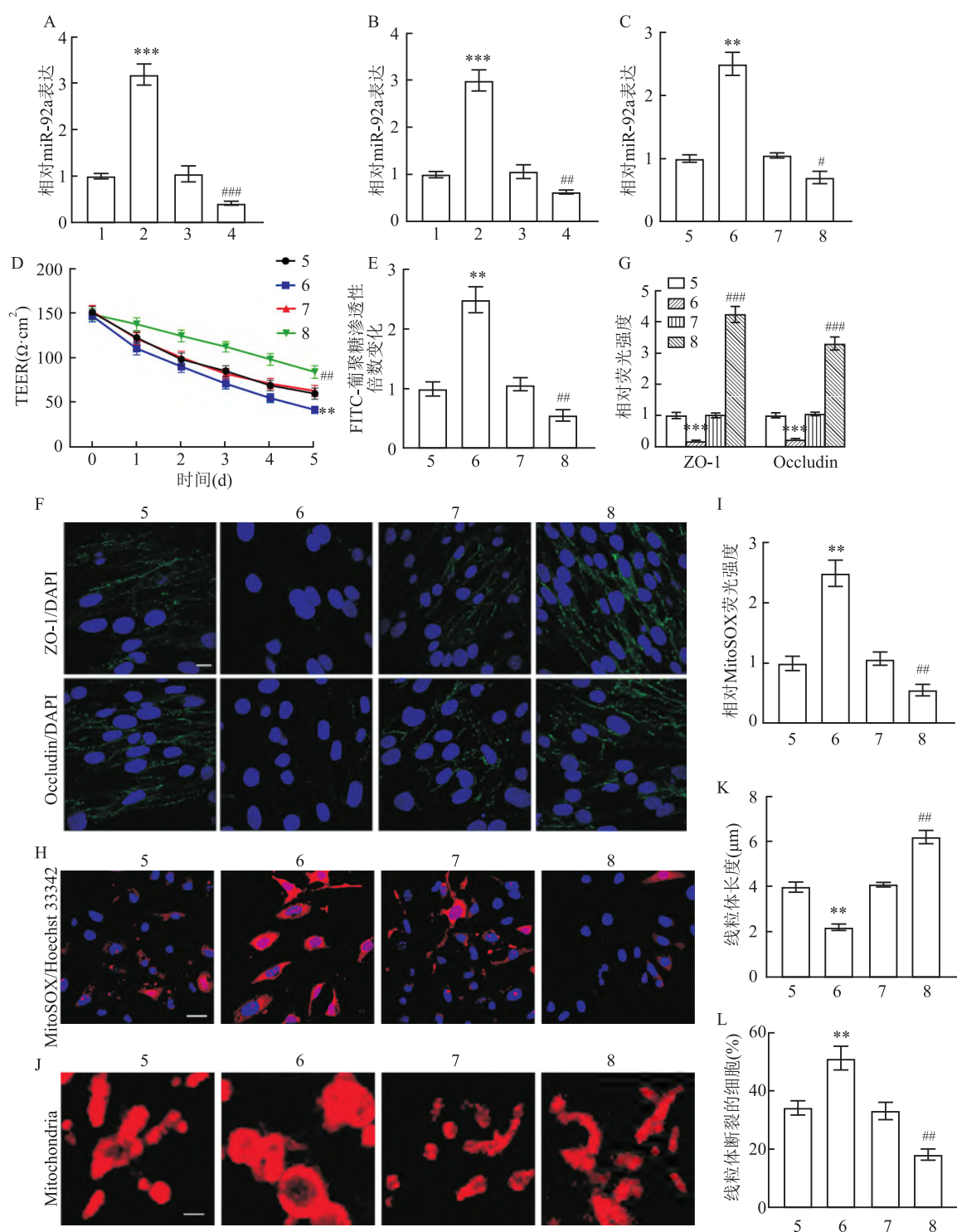


图7 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 通过体外递送 miR-92a 损伤 bEnd.3 细胞

A、B、C: 在 RAW264.7、Exos 和 bEnd.3 细胞中过表达和沉默 miR-92a 的效率; D、E: TEER 值和 FITC-葡聚糖泄漏用于评估 Exos 中 miR-92a 过表达和敲低对 bEnd.3 细胞屏障功能的影响; F、G: 指定组中 ZO-1 和 Occludin 荧光强度的代表性免疫染色图像和量化; H、I: 免疫荧光检测 Exos 中 miR-92a 过表达和敲低对 bEnd.3 细胞中 MitoSOX 的表达影响 $\times 200$; J、K、L: 线粒体形态的代表性图像和线粒体长度的量化以及具有碎片化线粒体的细胞百分比 $\times 200$; 1: miR-NCOE; 2: miR-92aOE; 3: miR-NCKD; 4: miR-92aKD; 5: miR-NCOE-Exos; 6: miR-92aOE-Exos; 7: miR-NCKD-Exos; 8: miR-92aKD-Exos; 与 miR-NCOE 组或 miR-NCOE-Exos 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 miR-NCKD 组或 miR-NCKD-Exos 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

炎中的促炎作用^[15]。因此,下调 miR-92a 或阻止其转移可能有助于保护 AGEs 对糖尿病内皮细胞损伤的作用。

本研究中,糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠 AGEs 表达和 M1 巨噬细胞数量增加,并证明了 AGEs 刺激巨噬细胞来源 Exos 通过体外递送 miR-92a 诱导 bEnd.3 细胞的屏障功能和线粒体功能障碍。本实验揭示了 AGEs 诱导糖尿病内皮细胞损伤的潜在机制,这将有助于治疗糖尿病动脉粥样硬化。

参考文献

- [1] 郑晓茂,茹 琴,陈 琳,等. 晚期糖基化终产物对糖尿病及其并发症的影响和干预的研究进展[J]. 重庆医学, 2019, 48(13): 2292-6.
- [2] 徐 新,章 秋. 晚期糖基化终末产物及其受体与糖尿病视网膜病变关系的研究进展[J]. 中华糖尿病杂志, 2019, 11(1): 66-9.
- [3] Senatus L, López-Díez R, Egaña-Gorroño L, et al. RAGE impairs murine diabetic atherosclerosis regression and implicates IRF7 in macrophage inflammation and cholesterol metabolism[J]. JCI Insight, 2020, 5(13): e137289.
- [4] Jin X, Yao T, Zhou Z, et al. Advanced glycation end products enhance macrophages polarization into M1 phenotype through activating RAGE/NF-κB pathway[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 732450.
- [5] 黄小抗,朱启金,吴永贵. 高糖刺激的巨噬细胞源外泌体对小鼠肾组织中 TGF-β1/Smad3 通路的影响作用[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 1-6.
- [6] 晏子友,魏志鑫,罗富里,等. 尿毒症毒素通过刺激巨噬细胞外泌体分泌 miR-22 促进心肌细胞自噬[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 1014-9.
- [7] Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, et al. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions[J]. Hypertens Res, 2017, 40(4): 353-60.
- [8] Pennig J, Scherrer P, Gissler M C, et al. Glucose lowering by SGLT2-inhibitor empagliflozin accelerates atherosclerosis regression in hyperglycemic STZ-diabetic mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 17937.
- [9] Yu M, Liu W, Li J, et al. Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via AKT/eNOS pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 350.
- [10] Bouchareychas L, Duong P, Covarrubias S, et al. Macrophage exosomes resolve atherosclerosis by regulating hematopoiesis and inflammation via MicroRNA cargo[J]. Cell Rep, 2020, 32(2): 107881.
- [11] 饶超峰,薛笑楠,朱明英,等. 巨噬细胞外泌体通过抑制自噬诱导高血糖对肾小球足细胞的损伤作用[J]. 天津医药, 2021, 49(2): 119-25.
- [12] Gou L, Zhao L, Song W, et al. Inhibition of miR-92a suppresses oxidative stress and improves endothelial function by upregulating heme oxygenase-1 in db/db mice[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(5): 358-70.
- [13] Wiese C B, Zhong J, Xu Z Q, et al. Dual inhibition of endothelial miR-92a-3p and miR-489-3p reduces renal injury-associated atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2019, 282: 121-31.
- [14] Khoury M K, Yang H, Liu B. Macrophage biology in cardiovascular diseases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(2): e77-e81.
- [15] Chang Y J, Li Y S, Wu C C, et al. Extracellular microRNA-92a mediates endothelial cell-macrophage communication[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(12): 2492-504.

To explore the mechanism of AGEs on diabetic endothelial cell damage based on monocyte-macrophage exosomes/microRNA-92a

Li Yan¹, Zhang Xijun¹, Liu Wu¹, Li Jinfeng¹, Sun Yan¹, Li Hui², Cheng Jieping¹

[¹Dept of Endocrinology, ²Administrative Organ, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital (The Second Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine), Urumqi 830092]

Abstract Objective To explore the mechanism of advanced glycation end products (AGEs) on diabetic endothelial cell damage based on monocyte-macrophage exosomes (Exos)/microRNA-92a (miR-92a). **Methods** Twenty apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice were randomly divided into two groups: injury group ($n=10$) and injury + STZ group ($n=10$). The injury + STZ group established a diabetes model induced by streptozotocin (STZ). All animals underwent partial left carotid artery (PLCA) ligation. The carotid arteries were collected, the number of M1 macrophages was detected by immunohistochemistry, and the level of AGEs was analyzed by ELISA. Microvascular endothelial cell line bEnd.3 cells were treated with conditioned medium (CM) of AGEs treated

网络出版时间:2022-12-26 17:08:31 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1523.017.html

PPP5C 对人肺腺癌 H1299 细胞迁移侵袭及肿瘤干性的影响及机制研究

曾莉莉^{1,2}, 陈微微¹, 马向瑞², 董洪亮¹, 杜静¹

摘要 **目的** 探讨磷酸蛋白磷酸酶催化亚基(PPP5C)对人肺腺癌 H1299 细胞迁移侵袭能力及肿瘤干性的影响及机制。**方法** 构建 PPP5C-pcDNA3.1 过表达载体, 转染 PPP5C-pcDNA3.1 和 pcDNA3.1 至 H1299 细胞, 遗传霉素(G418)筛选 H1299 稳转细胞系。qRT-PCR 和 Western blot 法鉴定 PPP5C mRNA 和蛋白的表达水平, 细胞生长曲线绘制和克隆形成实验检测细胞增殖活性; 划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力; 诱导干细胞成球实验检测细胞干性。**结果** 成功构建 PPP5C-pcDNA3.1 真核表达载体, 转染 H1299 细胞后 PPP5C 的表达水平显著升高。H1299 细胞过表达 PPP5C 后, 生长曲线和克隆形成实验结果显示细胞增

殖能力无变化; 划痕和 Transwell 实验显示细胞迁移和侵袭能力显著增强, 基质金属蛋白酶 9(MMP9)的表达升高; 干细胞成球结果显示细胞干性显著增强, 性别决定区 Y-box 2(SOX2)的表达升高。**结论** 人肺腺癌细胞 H1299 中过表达 PPP5C 不影响细胞增殖, 但可通过调控 MMP9 和 SOX2 来增强其迁移侵袭能力及肿瘤干性。

关键词 PPP5C; 细胞增殖; 迁移和侵袭; 肿瘤干性; 基质金属蛋白酶 9; SOX2

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0094-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.016

2022-10-10 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31900441); 山东省自然科学基金面上项目(编号:ZR2019MC026); 山东省中医药发展计划(编号:2019-0514); 泰山学者青年专家、齐鲁卫生与健康杰出青年人才和外专双百项目资金(编号:WSG2018019)

作者单位:滨州医学院附属医院¹ 医学研究中心、² 口腔颌面外科, 滨州 256600

作者简介:曾莉莉, 女, 硕士研究生;

董洪亮, 男, 主管技师, 责任作者, E-mail: hongliang.234@163.com;

杜静, 女, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: djedith@126.com

肺癌是世界上高发的恶性肿瘤之一, 死亡率高达 18%, 治愈难度高, 患者术后生存率较低^[1]。PPP5C 是目前已鉴定的磷酸蛋白磷酸酶催化亚基(phosphoprotein phosphatase catalytic subunit, PPPCs)家族成员之一, 它广泛参与了一些癌症的生理病理过程, 已被证明在各种恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用。研究^[2]表明 PPP5C 通过与 AMP 活化蛋白激酶的相互作用可以促进肝癌的发生。PPP5C 高转录水平的胰腺癌患者预后较好^[3]。MiR-520a-5p/PPP5C 调控模式也被确定为胰腺癌吉西他滨耐药的关键^[4]。这些为 PPP5C 在癌症的发生发展、预后

RAW264.7 cells or Exos derived from RAW264.7, followed by evaluations of the cell barrier function and mitochondrial function. **Results** There was an increased number of M1 macrophages in carotid atherosclerotic tissues of diabetic mice and in AGEs treated RAW264.7 cells. CM or Exos significantly induced barrier dysfunction, reactive oxygen species (ROS) accumulation and mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells *in vitro*. In addition, bioinformatics analysis showed that miR-92a was up-regulated in Exos derived from macrophages stimulated by AGEs. Experimentally, Exos participated in CM-induced barrier dysfunction, ROS accumulation and mitochondrial dysfunction in bEnd.3 cells by transferring miR-92a. Finally, a series of rescue experiments further confirmed that Exos regulated the barrier dysfunction and mitochondrial function in vascular endothelial cells through miR-92a. **Conclusion** The expression of AGEs and the number of M1 macrophages in diabetic ApoE^{-/-} mice increase, and AGEs stimulates Exos from macrophages could impair the barrier function and mitochondrial function in vascular endothelial cells by delivering miR-92a *in vitro*.

Key words macrophages; exosomes; microRNA-92a; advanced glycation end products; diabetes; endothelial cell damage