

论著 · 基础研究

利拉鲁肽对高糖诱导内皮细胞 miRNA-146b-3p、炎症因子及环氧酶 -2 表达的影响

苏征佳，潘晓茜，曹久妹，吴方

上海交通大学医学院附属瑞金医院老年病科，上海 200025

[摘要] 目的 · 探讨利拉鲁肽对高糖诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) miR-146b-3p 及白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、环氧酶 -2(cyclooxygenase-2, COX-2) 表达的影响。

方法 · 高糖组和对照组 HUVECs 分别以高浓度葡萄糖 (25 mmol/L) 及正常浓度葡萄糖 (7 mmol/L) 处理 24 h，再以利拉鲁肽分别干预上述 2 组细胞。定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测各组 miR-146b-3p、IL-6、TNF- α 、COX-2 的表达变化。抑制 miR-146b-3p 后观察炎症因子及 COX-2 的表达变化。**结果** · 在高糖诱导的 HUVECs 中，miR-146b-3p 的表达下降，IL-6、TNF- α 及 COX-2 的表达均升高。抑制 miR-146b-3p 表达会显著升高高糖诱导的 HUVECs 中 IL-6、TNF- α 及 COX-2 的表达。利拉鲁肽可显著升高高糖诱导的 HUVECs 中 miR-146b-3p 的表达，降低 IL-6、TNF- α 及 COX-2 的表达。**结论** · 在高糖环境下，利拉鲁肽可能通过升高 miR-146b-3p 的表达而降低 IL-6、TNF- α 及 COX-2 的表达，从而改善炎症和血管内皮功能。

[关键词] 利拉鲁肽；miR-146b-3p；炎症因子；环氧酶 -2；糖尿病

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.12.004 **[中图分类号]** R587.1 **[文献标志码]** A

Effects of liraglutide on glucose induced expression of miRNA-146b-3p, inflammatory factors and COX-2 in human umbilical vein endothelial cells

SU Zheng-jia, PAN Xiao-qian, CAO Jiu-mei, WU Fang

Department of Geratology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] Objective · To investigate the effects of liraglutide on glucose induced expression of miRNA-146b-3p, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and cyclooxygenase-2 (COX-2) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Methods · HUVECs were grown in the medium with glucose of high concentration (25 mmol/L) or normal concentration (7 mmol/L) for 24 h, then stimulated with liraglutide. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed to detect the expression of miR-146b-3p, IL-6, TNF- α and COX-2. The expression of IL-6, TNF- α and COX-2 were detected after HUVECs were transfected with anti-miR-146b-3p. Results · The expression of miR-146b-3p was decreased in high glucose induced cells, while the expression of IL-6, TNF- α and COX-2 were increased. Silenced expression of miR-146b-3p increased the expression of IL-6, TNF- α and COX-2. Liraglutide increased the expression of miR-146b-3p and decreased the expression of IL-6, TNF- α and COX-2 in high glucose induced cells. Conclusion · Liraglutide may relieve inflammation and improve vascular endothelial function in hyperglycemia condition through regulating miR-146b-3p to decrease expression of IL-6, TNF- α and COX-2.

[Key words] liraglutide; miR-146b-3p; inflammatory factor; cyclooxygenase-2 (COX-2); diabetes

动脉血栓性疾病如冠状动脉粥样硬化性心脏病、动脉粥样硬化、缺血性脑血管病等，是威胁人类健康的主要疾病。近年来的研究^[1-2]发现，糖尿病是动脉血栓性疾病的高危因素；高浓度葡萄糖诱导的慢性炎症也被认为是导致血管内皮功能障碍的关键因素之一，可加速血栓的形成。胰高血糖素样肽 -1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 类似物利拉鲁肽是一种新型降糖药物，有改善内皮细胞功

能紊乱、降低炎症反应等作用，但其具体机制目前尚不清楚，可能并不完全依赖经典的 GLP-1 受体途径^[3]。miR-146b-3p 是近年来发现的与炎症反应相关的 miRNA^[4]。前期研究^[5]发现，miR-146b-3p 在糖尿病动脉血栓性疾病的患者中表达下调。利拉鲁肽抑制内皮细胞中的炎症反应是否与 miR-146b-3p 相关是一个值得深入研究的问题。因此，本研究旨在通过观察高糖诱导的内皮细胞中，利拉鲁

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (2016Y0233)；上海市科学技术委员会课题 (16ZR1430900) (Research Project of Shanghai Health and Family Planning Commission, 2016Y0233; Subject of Shanghai Municipal Committee of Science and Technology, 16ZR1430900)。

[作者简介] 苏征佳 (1985—)，女，主治医师，硕士；电子信箱：szj11699@rjh.com.cn。

[通信作者] 吴方，电子信箱：wf10428@rjh.com.cn。



肽对 miR-146b-3p 及白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL-6*)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、环氧酶-2 (cyclooxygenase-2, *COX-2*) 表达的影响, 探讨其改善炎症和内皮功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM) 购于 ScienCell 公司; Opti-MEM 培养基购于 Gibco-BRL 公司, 按说明书配制, 于 4℃ 保存; Lipofectamine 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司; 葡萄糖 (100 g/L) 及 TRIzol 试剂盒购于 Sigma 公司; 利拉鲁肽购于诺和诺德公司; SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒购于 EZBioscience 公司; microRNA 反转录试剂盒及 qPCR SYBR Green 检测试剂盒购于 BioTNT 公司; miR-146b-3p 类似物及抑制物, *IL-6*、*TNF- α* 、*COX-2* 引物均由上海生工生物工程公司合成。

miR-146b-3p 抑制物: 5'-ACCAGAACUGAGUCCCCUA GGGC-3'。miR-146b-3p 类似物: 反义链为 5'-CAGAACUG AGUCCCUAGGGCUU-3', 正义链为 5'-GCCCUAGGGAC UCAGUUCUGGU-3'。

1.2 构建高糖人脐静脉内皮细胞模型

新生儿脐带由上海交通大学医学院附属瑞金医院妇产科提供, 提取内皮细胞^[6]。人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 培养于 ECM 中, 隔日换液。ECM 包含 500 mL 基础培养基、25 mL 胎牛血清、5 mL 内皮细胞生长添加物 (endothelial cell growth supplement, ECGS) 和 5 mL 青霉素 / 链霉素溶液。

取第 3 代 HUVECs 用于实验, 设为高糖组和对照组。分别用高浓度葡萄糖 (25 mmol/L) 及正常浓度葡萄糖 (7 mmol/L) 处理 HUVECs 24 h, 再经利拉鲁肽 (10 nmol/L) 分别干预上述 2 组细胞 2 h。

1.3 qPCR 检测各组 *IL-6*、*TNF- α* 、*COX-2* 表达变化

采用 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒进行定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)。其反应体系为 20 μ L, 由 10 μ L SYBR Green qPCR Master Mix、0.5 μ L 正向引物、0.5 μ L 反向引物、0.4 μ L 参比染料 ROX、4 μ L cDNA 和 4.6 μ L 灭菌双蒸水组成。

PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环。溶解曲线分析: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。每

个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法分析并比较各组 miR-146b-3p、*IL-6*、*TNF- α* 、*COX-2* 的表达水平。

PCR 引物序列: *IL-6* 正向引物 5'-CAATGAGGAGACT TGCCTGG-3' 及反向引物 5'-GCACAGCTCTGGCTTGTTC C-3'; *TNF- α* 正向引物 5'-TGGGCTCCCTCTCATCAGTT-3' 及反向引物 5'-TCCGCTTGGTGGTTGCTAC-3'; *COX-2* 正向引物 5'-CAAAGGTAAAAGCAGCTCCT-3' 及反向引物 5'-CTGGGGATCAGGGATGAAC-3'。

1.4 miRNA 反转录及 qPCR 检测各组 miR-146b-3p 表达变化

按照 microRNA 反转录试剂盒说明书要求加入各组分后, 混匀, 进行反转录。反应条件: 42℃ 60 min, 95℃ 5 min。反转录完成后, 按照 microRNA qPCR SYBR Green 检测试剂盒说明书要求进行 qPCR, 其反应体系为 20 μ L, 由 10 μ L 荧光染料、2 μ L 上游引物、2 μ L 下游引物、1 μ L 样本、5 μ L 灭菌双蒸水组成。反应体系: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 5 min, 60℃ 退火 60 s。溶解曲线分析: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。每个样品重复 3 次。

1.5 miRNA 转染 HUVECs

HUVECs 培养于 24 孔板, 更换为新鲜培养基 (400 μ L/孔)。将小分子 RNA (miR-146b-3p 类似物、抑制物) 稀释于 50 μ L Opti-MEM 培养基中, 再将 1 μ L Lipofectamine 2000 稀释于 50 μ L Opti-MEM 培养基, 室温放置 5 min 后, 轻柔混匀, 室温放置 20 min。再将混合液加入 24 孔板 (100 μ L/孔), 培养 6 h。

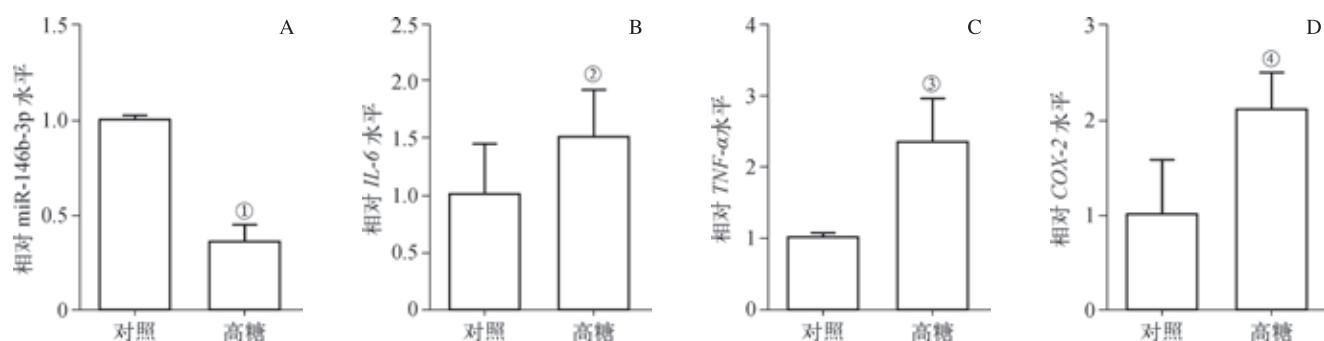
1.6 统计学分析

定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 2 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖对 miR-146b-3p 和炎症因子、*COX-2* 表达的影响

用高浓度葡萄糖 (25 mmol/L) 及正常浓度葡萄糖 (7 mmol/L) 处理 HUVECs 24 h, 即为高糖组和对照组。与对照组相比, 高糖组中 miR-146b-3p 的表达显著下降 ($P=0.000$) (图 1A)。高糖组中 *IL-6* 的表达较对照组升高, 但差异无统计学意义 ($P=0.149$) (图 1B)。高糖组中 *TNF- α* 、*COX-2* 的表达均显著升高 ($P=0.018$, $P=0.008$) (图 1C、D)。



注: A. 高糖对 miR-146b-3p 表达的影响; B. 高糖对 IL-6 表达的影响; C. 高糖对 TNF- α 表达的影响; D. 高糖对 COX-2 表达的影响。^① $P=0.000$, ^② $P=0.149$, ^③ $P=0.018$, ^④ $P=0.008$, 与对照组比较。

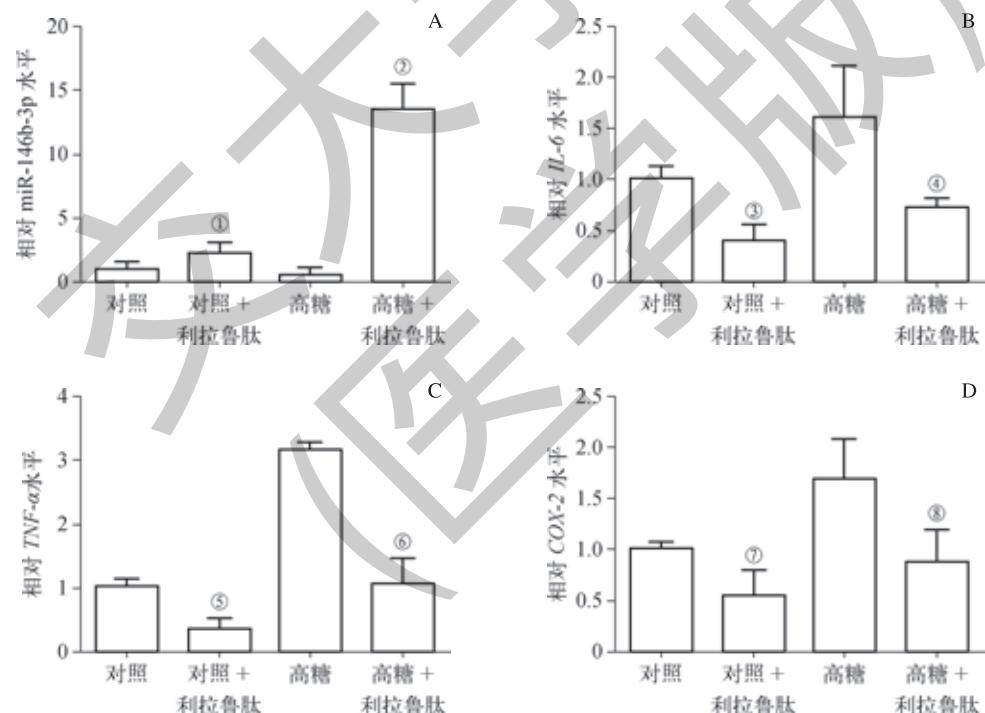
图 1 高糖对 miR-146b-3p 以及 IL-6、TNF- α 、COX-2 表达的影响

Fig 1 Effect of high glucose on the expression of miR-146b-3p, IL-6, TNF- α and COX-2

2.2 利拉鲁肽对高糖诱导 HUVECs 中 miR-146b-3p 和炎 症因子、COX-2 表达的影响

用利拉鲁肽分别干预高糖组和对照组 HUVECs, 结果发现, 2 组中 miR-146b-3p 的表达经利拉鲁肽干预后均显著升高 ($P=0.000$, $P=0.039$), 而高糖组中 miR-146b-3p 升高的情况较对照组更明显 (图 2A)。继而经利拉鲁肽

干预后, 检测高糖组和对照组 HUVECs 中 IL-6、TNF- α 、COX-2 的表达, 结果显示, IL-6、TNF- α 、COX-2 在高糖组和对照组中的表达均显著下降 (均 $P<0.05$) (图 2B ~ D)。结果提示, 利拉鲁肽可升高 miR-146b-3p 的表达, 且有降低炎症因子水平的作用。



注: A. 利拉鲁肽对 miR-146b-3p 表达的影响; B. 利拉鲁肽对 IL-6 表达的影响; C. 利拉鲁肽对 TNF- α 表达的影响; D. 利拉鲁肽对 COX-2 表达的影响。^① $P=0.039$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.008$, ^④ $P=0.039$, ^⑤ $P=0.039$, ^⑥ $P=0.016$, ^⑦ $P=0.001$, ^⑧ $P=0.037$, ^⑨ $P=0.049$, 与相应的对照组或高糖组比较。

图 2 利拉鲁肽对 HUVECs 中 miR-146b-3p 以及 IL-6、TNF- α 、COX-2 表达的影响

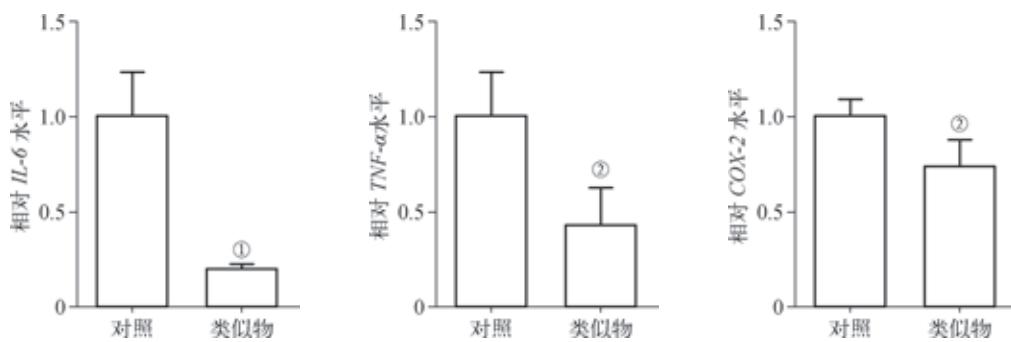
Fig 2 Effect of liraglutide on the expression of miR-146b-3p, IL-6, TNF- α and COX-2

2.3 miR-146b-3p 对炎症因子、COX-2 表达的影响

为进一步阐明利拉鲁肽干预后 HUVECs 的炎症反应是否与 miR-146b-3p 相关, 我们用 miR-146b-3p 类似物转染 HUVECs, 通过 qPCR 检测炎症因子和 COX-2 的表

达变化情况。结果显示, IL-6、TNF- α 、COX-2 的表达均明显下降 ($P=0.000$, $P=0.003$, $P=0.003$) (图 3), 表明 miR-146b-3p 有抑制炎症反应的作用。





注: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.003$, 与对照组比较。

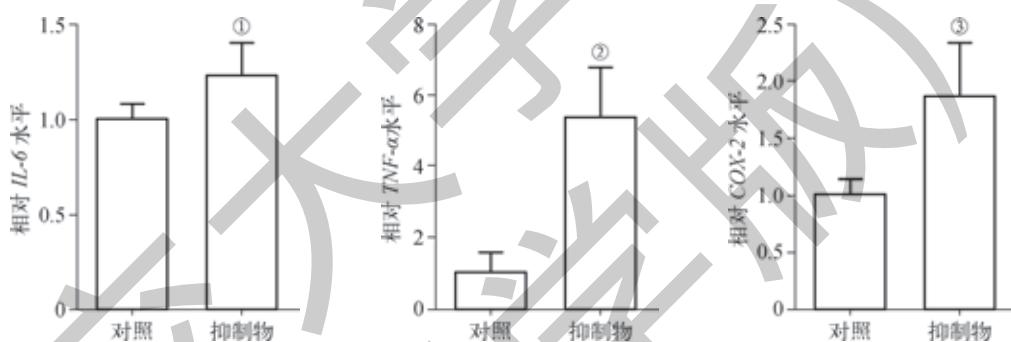
图 3 miR-146b-3p 对 *IL-6*、*TNF-α*、*COX-2* 表达的影响

Fig 3 Effect of miR-146b-3p on the expression of *IL-6*, *TNF-α* and *COX-2*

2.4 抑制 miR-146b-3p 表达对炎症因子、*COX-2* 表达的影响

将 miR-146b-3p 抑制剂转染 HUVECs 后, qPCR 检测炎症因子和 *COX-2* 的表达变化情况。结果显示, *IL-6*、*TNF-α*、*COX-2* 的表达均明显升高 ($P=0.032$, $P=0.000$,

$P=0.002$), 其中 *TNF-α* 及 *COX-2* 的升高幅度更显著 (图 4)。结果提示, 抑制 miR-146b-3p 的表达可能会促进炎症反应。



注: ^① $P=0.032$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.002$, 与对照组比较。

图 4 抑制 miR-146b-3p 对 *IL-6*、*TNF-α*、*COX-2* 表达的影响

Fig 4 Effect of inhibiting miR-146b-3p on the expression of *IL-6*, *TNF-α* and *COX-2*

3 讨论

动脉血栓性疾病是糖尿病的并发症。糖尿病可导致血管内皮细胞功能障碍, 而慢性炎症是介导这一过程的主要机制。局部炎症细胞浸润、炎症相关信号转导通路激活、炎症因子合成增加等均是导致内皮损伤及血栓生成的主要原因^[2]。已有研究^[7]证实, *IL-6*、*TNF-α* 等炎症相关因子是 2 型糖尿病的危险因素。本研究亦发现, 高糖环境下 *IL-6*、*TNF-α*、*COX-2* 表达显著升高, 进一步支持了这一观点。

利拉鲁肽是一种新型降糖药, 不仅具有降低血糖的作用, 对炎症过程也有调节作用, 可延缓或防止动脉硬化的发生。符兰芳等^[8]发现利拉鲁肽能显著降低糖尿病患者炎症因子及血清脂联素水平, 具有保护患者心脑血管健康的作用。另有研究^[9]发现, 利拉鲁肽可降低 2 型糖尿病

合并颈动脉粥样硬化的颈动脉内膜中层厚度。体外研究^[10]表明, 处于高糖环境的内皮细胞在经 *TNF-α* 诱导后, 其促动脉粥样硬化改变更为显著, 而利拉鲁肽可减弱 *TNF-α* 的效应, 并对高血糖和炎症激发的内皮功能障碍提供保护作用。本实验以 HUVECs 为研究对象, 模拟高糖环境, 发现利拉鲁肽可显著降低 *IL-6*、*TNF-α* 的水平, 该结果与既往研究结果一致, 说明利拉鲁肽具有抑制炎症反应的作用。而 *COX-2* 可通过有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路促进动脉血栓形成^[11]。本研究发现利拉鲁肽亦可显著降低 *COX-2* 的水平, 提示利拉鲁肽可能具有潜在的抗动脉血栓的作用。

然而, 目前对于利拉鲁肽抗炎作用的机制尚不清楚。有研究^[12]认为, 利拉鲁肽可通过抑制烟酰胺腺嘌呤



吟二核苷酸磷酸氧化酶活性，减少 TNF- α 引发的氧化应激反应。另有研究^[13]发现，利拉鲁肽可能通过抑制高糖对 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun NH2-terminal protein kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2) 的活化，减少 JNK 与 ERK1/2 激活，下调核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的表达，从而对 NF- κ B 下游的 IL-6 和 TNF- α 等发挥抑制作用。

微小 RNA (miRNA) 是近年来发现的一类保守、短序列、非编码的单链小分子 RNA。miR-146 是其中一个典型的多功能 miRNA，在其下游基因的介导下参与免疫、炎症、造血和肿瘤等多种生理病理过程的发生、发展^[14]。有研究^[15]证实，过表达 miR-146a 可抑制内皮细胞的炎症反应，而 miR-146a 敲除的小鼠则发生了严重的炎症反应。2 型糖尿病患者外周血单核细胞中 miR-146 的表达下降，伴随着肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF-6) mRNA 的表达显著上升；miR-146 的表达与 TRAF-6 和 NF- κ B 的 mRNA 水平及循环中 TNF- α 、IL-6 的含量呈负相关^[4]。

前期研究^[5]发现，miR-146b-3p 的表达在动脉血栓性疾病中有改变。本实验从细胞水平发现，高糖可显著降低 miR-146b-3p 的表达，而在抑制 miR-146b-3p 的表达后，

IL-6、TNF- α 、COX-2 的表达均显著升高；之后，我们用 miR-146b-3p 类似物干预，发现 IL-6、TNF- α 、COX-2 的表达均显著下降。miR-146b-3p 具有降低炎症因子的作用，而抑制 miR-146b-3p 表达可能会促进炎症反应。

为了进一步探究利拉鲁肽的抗炎作用是否与 miR-146b-3p 相关，我们观察了利拉鲁肽对高糖刺激后的 HUVECs 中 miR-146b-3p 表达的影响。结果发现，经高糖刺激后 HUVECs 中 miR-146b-3p 的表达下降，但经利拉鲁肽干预后，miR-146b-3p 的水平较前升高近 10 倍，提示利拉鲁肽可以显著逆转高糖对 miR-146b-3p 的抑制作用。因此，我们推测利拉鲁肽可能通过升高 miR-146b-3p 的表达，从而减少 IL-6、TNF- α 等炎症因子及 COX-2 的表达，发挥改善内皮细胞炎症反应的作用。但其具体作用机制尚需进一步研究明确。

总之，对 miR-146b-3p 在利拉鲁肽抑制炎症、减少血栓形成中的作用机制的研究，为糖尿病血栓形成性疾病提供了新的研究方向。我们的研究发现，在高糖状态下 HUVECs 中 miR-146b-3p 的表达显著降低，继而促进了内皮细胞的炎症反应。利拉鲁肽可显著升高 miR-146b-3p 的水平，并抑制炎症因子的水平。而 miR-146b-3p 可能作为药物靶点，介导了利拉鲁肽改善炎症及内皮损伤的作用。

参·考·文·献

- [1] Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(11): 1478-1493.
- [2] Zhao Q, Gao C, Cui Z. Ginkgoflida A reduces inflammatory response in high-glucose-stimulated human umbilical vein endothelial cells through STAT3-mediated pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(2): 242-248.
- [3] Cantini G, Mannucci E, Luconi M. Perspectives in GLP-1 research: new targets, new receptors[J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27(6): 427-438.
- [4] Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(7): 1017-1034.
- [5] Cai F, Wu F, Cao J, et al. MicroRNA-146b-3p regulates the development and progression of cerebral infarction with diabetes through RAF1/P38MAPK/COX-2 signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(2): 618-628.
- [6] Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells[J]. Nat Protoc, 2007, 2(3): 481-485.
- [7] 王微, 王露, 郭丹, 等. 利拉鲁肽对肥胖 2 型糖尿病患者 MDA、GSH-PX 水平的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(1): 84-86.
- [8] 符兰芳, 蒙绪标, 熊青, 等. 利拉鲁肽对 2 型糖尿病患者炎症反应及血清脂联素的影响 [J]. 中国老年医学杂志, 2016, 4(36): 1603-1604.
- [9] 潘敬芳, 刘云涛, 简磊. 利拉鲁肽对 2 型糖尿病合并颈动脉粥样硬化患者颈动脉内膜中层厚度的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(15): 127-128.
- [10] Di Tomo P, Lanuti P, Di Pietro N, et al. Liraglutide mitigates TNF- α induced pro-atherogenic changes and microvesicle release in HUVEC from diabetic women[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2017, 33(8). DOI: 10.1002/dmrr.2925.
- [11] Bao M, Zhang Y, Lou X, et al. Puerarin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein induced injuries via the suppression of LOX-1 and induction of eNOS[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(4): 299-306.
- [12] Fujita H, Morii T, Fujishima H, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential[J]. Kidney Int, 2014, 85(3): 579-589.
- [13] Xu WW, Guan MP, Zheng ZJ, et al. Exendin-4 alleviates high glucose-induced rat mesangial cell dysfunction through the AMPK pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(2): 423-432.
- [14] Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1[J]. Nat Med, 2014, 20(4): 368-376.
- [15] Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the role of immune cells[J]. World J Clin Cases, 2015, 3(4): 345-352.

[收稿日期] 2018-08-07

[本文编辑] 崔黎明

