

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.14.003

# miR-34c 对巨噬细胞极化、晶体吞噬和迁移能力的调控研究<sup>\*</sup>

瞿根义,徐 勇<sup>△</sup>,阳 光

中南大学湘雅医学院附属株洲医院泌尿外科,湖南株洲 412007

**摘要:****目的** 探讨 miR-34c 对小鼠巨噬细胞极化、晶体吞噬和迁移能力的影响及机制研究。**方法** 应用含 miR-minics 和 miR-inhibitor 及其相应空白对照(pre-miR-NC 和 anti-miR-NC)的慢病毒重组质粒转染小鼠巨噬细胞(Ana-1 细胞),将细胞分为 miR-minics 组、miR-inhibitor 组、pre-miR-NC 组和 anti-miR-NC 组,采用免疫印迹法检测 Ana-1 细胞相关标志蛋白的表达水平,光学显微镜下计数含吞噬晶体的 Ana-1 细胞数量,采用 Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力。**结果** 过表达 miR-34c 后,M1 型相关蛋白 CD80 和 CD86 表达减少,M2 型相关蛋白 CD163 和 CD206 表达升高,含吞噬晶体的 Ana-1 细胞比例为 $(45.38 \pm 4.93)\%$ ,Ana-1 细胞迁移数量为 $(80.29 \pm 5.18)$ 个;沉默 miR-34c 后,M1 型相关蛋白 CD80 和 CD86 表达升高,M2 型相关蛋白 CD163 和 CD206 表达减少,含吞噬晶体的 Ana-1 细胞比例为 $(6.71 \pm 1.56)\%$ ,Ana-1 细胞迁移数量为 $(17.63 \pm 4.34)$ 个。**结论** miR-34c 可促进巨噬细胞向 M2 型极化,并能促进巨噬细胞晶体吞噬和迁移。

**关键词:**miR-34c; 巨噬细胞; 极化; 晶体; 吞噬

中图分类号:R691.4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)14-1993-04

## Study on the regulation of miR-34c on the polarization,crystal phagocytosis and migration of macrophages<sup>\*</sup>

QU Genyi,XU Yong<sup>△</sup>,YANG Guang

Department of Urology,Zhuzhou Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University,Zhuzhou,Hunan 412007,China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of miR-34c on the polarization,crystal phagocytosis and migration of mouse macrophages and its mechanism. **Methods** The lentiviral recombinant plasmids containing miR-minics and miR-inhibitor and their corresponding blank controls (pre-miR-NC and anti-miR-NC) were used to transfect mouse macrophages (Ana-1 cell),the cells were divided into miR-minics group,miR-inhibitor group,pre-miR-NC group and anti-miR-NC group. Western blot was used to detect the expression level of Ana-1 cell-related marker proteins. The number of Ana-1 cells that swallowed the crystals were measured by the Transwell migration test. **Results** After overexpression of miR-34c,the expression of M1 type related proteins CD80 and CD86 decreased,while the expression of M2 type related proteins CD163 and CD206 increased. The proportion of Ana-1 cells with phagocytic crystals was $(45.38 \pm 4.93)\%$ ,and the migration number of Ana-1 cells was $(80.29 \pm 5.18)$ . After silencing miR-34c,the expression of M1 type related proteins CD80 and CD86 increased,while the expression of M2 type related proteins CD163 and CD206 decreased. The proportion of Ana-1 cells with phagocytic crystals was $(6.71 \pm 1.56)\%$ ,and the migration number of Ana-1 cells was $(17.63 \pm 4.34)$ . **Conclusion** miR-34c promotes the polarization of macrophages to M2 type,and can promote the crystals phagocytosis and migration of macrophage.

**Key words:**miR-34c; macrophages; polarization; crystals; phagocytosis

肾结石是我国最常见的泌尿外科疾病之一,而湖南省是我国肾结石发病率最高的省份之一。草酸钙结石是最常见的肾结石类型,所占比例为 $70\% \sim 80\%$ <sup>[1]</sup>,目前草酸钙结石的发病机制尚未完全阐明且

缺乏有效的预防措施,治疗后复发率也很高。因此,深入探讨草酸钙结石的发病机制,寻找新的有效干预靶点,仍是肾结石治疗和预防的重点,且具有重要的科研和临床意义。

<sup>\*</sup> 基金项目:湖南省自然科学基金项目(2017JJ4067);湖南省株洲市科技计划项目(2019-001)。

作者简介:瞿根义,男,医师,主要从事泌尿系统结石基础与临床相关研究。 <sup>△</sup> 通信作者,E-mail:tigerhnlxu@126.com。

本文引用格式:瞿根义,徐勇,阳光. miR-34c 对巨噬细胞极化、晶体吞噬和迁移能力的调控研究[J]. 检验医学与临床,2021,18(14):1993-

研究发现,巨噬细胞可明显促进细胞的晶体吞噬作用并减少肾脏晶体数量<sup>[2]</sup>。OKADA 等<sup>[3]</sup>在草酸钙结石大鼠模型中发现草酸钙晶体诱导肾小管上皮细胞损伤后,巨噬细胞在骨桥蛋白、CD44、纤维连接蛋白介导下,吞噬并消化晶体。并且研究证实草酸钙晶体可以诱导人肾小管上皮细胞 miRNA 表达谱发生明显的改变,且 miRNA 在调节巨噬细胞极化过程中扮演着重要角色<sup>[4]</sup>。同时有研究表明 miR-34c 对巨噬细胞形成具有调控作用<sup>[5]</sup>。因此,本研究拟探讨 miR-34c 对巨噬细胞极化分型、晶体吞噬作用和迁移能力的影响及其作用机制,为临床预防和治疗肾结石提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 小鼠巨噬细胞(Ana-1 细胞)和小鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E 细胞)购自上海中科院细胞库;miR-minics 和 miR-inhibitor 及其相应空白对照(pre-miR-NC 和 anti-miR-NC)慢病毒重组质粒购自上海吉玛制药技术有限公司;miR-34c、GAPDH 试剂盒购自美国 Ambion 公司;CD80、CD86、CD163 和 CD206 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司;DMEM 培养基和胎牛血清购自德国 Sigma 公司;反转录试剂盒、Transwell 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 NRK-52E 细胞和 Ana-1 细胞置于含 10% 胎牛血清的完全培养基中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养,选取对数生长期的细胞进行实验。并且取 NRK-52E 细胞接种于细胞培养皿并培养至细胞融合度在 70%~80% 后,加入终浓度为 20 μg/cm<sup>2</sup> 的一水草酸钙晶体处理 24 h,收集细胞上清培养液用于后续实验。

1.2.2 慢病毒转染实验 取对数生长期的 Ana-1 细胞接种到 6 孔板中,培养至细胞融合度达 70%~80%,用枪头取 5 μL 含 miR-minics 和 miR-inhibitor 及其相应空白对照(pre-miR-NC 和 anti-miR-NC)慢病毒重组质粒的慢病毒液,分别与 Lipofectamine2000 转染试剂混合于培养基中,静置于室温下 20 min 后,将转染复合物加入 6 孔板中,每孔加入 2 mL 培养基,前后轻摇细胞板使溶液混合均匀,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4~6 h 后,弃去原培养基,更换为 2 mL 含 NRK-52E CM 的培养基继续培养 48 h。

1.2.3 免疫印迹法(Western blot)检测 Ana-1 细胞极化 将慢病毒转染后培养的各组 Ana-1 细胞离心,于 4℃、13 000 r/min 离心 15 min,取上清液置于新的小型离心管中。取 2 μL 样品,使用 BCA 法测定蛋白浓度。加缓冲液将样品蛋白浓度调至一致,加热至 95℃变性 5 min。将样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过转膜,封闭,一抗、二抗孵育,显影,分析条带灰度。M1 型巨噬细胞的表面标志物为 CD80 和 CD86, M2 型巨噬细胞的表面标志物为 CD163 和 CD206,内

参为 GAPDH,标志物与 GAPDH 比值代表 Ana-1 细胞极化情况。

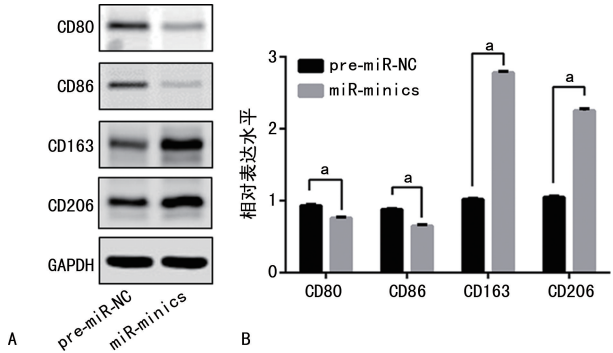
1.2.4 晶体吞噬作用检测 以上述慢病毒重组质粒分别感染 Ana-1 细胞 24 h 后,加入 NRK-52E CM 培养基处理 36 h,添加丽春红标记的 COM 晶体(20 μg/cm<sup>2</sup>)继续处理 48 h,普通光学显微镜下计数吞噬晶体的 Ana-1 细胞数量。

1.2.5 Transwell 迁移实验 将慢病毒转染后培养的各组 Ana-1 细胞以 1×10<sup>5</sup> 个/孔的数量接种于 Transwell 小室的上室,上室为无血清培养基,下室分别以同体积 DMEM 和 NRK-52E CM 的培养基孵育 24 h,多聚甲醛固定后进行结晶紫染色,置于显微镜下观察 Ana-1 细胞的迁移数量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理和分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

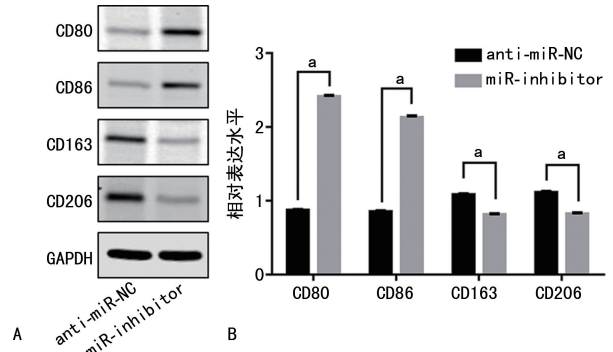
2 结果

2.1 miR-34c 对 Ana-1 细胞极化的影响 Western blot 结果显示,miR-minics 组 CD163 和 CD206 相对表达水平明显高于 pre-miR-NC 组,miR-inhibitor 组 CD80、CD86 相对表达水平明显高于 anti-miR-NC 组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1、2。



注:A 为 Western blot 显影图;B 为各指标相对表达水平统计图;\**P* < 0.05。

图 1 miR-34c 过表达对 Ana-1 细胞极化的影响

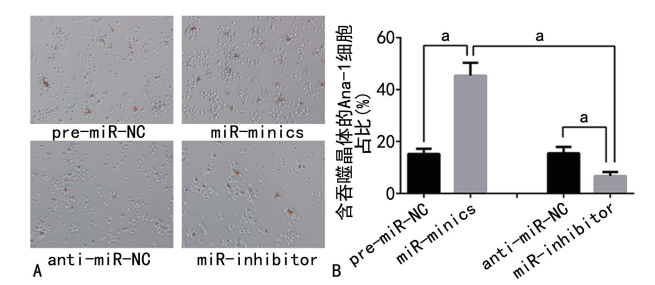


注:A 为 Western blot 显影图;B 为各指标相对表达水平统计图;\**P* < 0.05。

图 2 miR-34c 沉默对 Ana-1 细胞极化的影响

2.2 miR-34c 的过表达和沉默对 Ana-1 细胞晶体吞

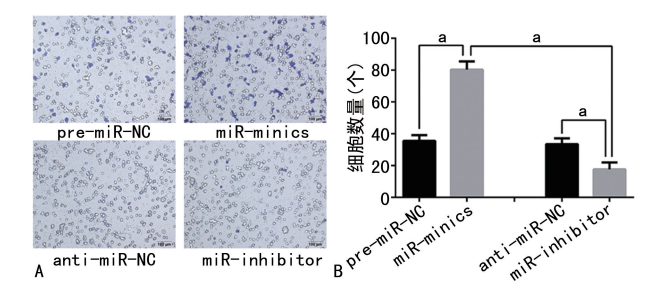
噬能力的影响 普通光学显微镜下计数各组含吞噬晶体的 Ana-1 细胞数量,结果显示 pre-miR-NC 组含吞噬晶体的 Ana-1 细胞占比为  $(15.21 \pm 2.02)\%$ , miR-minics 组含吞噬晶体的 Ana-1 细胞占比为  $(45.38 \pm 4.93)\%$ , anti-miR-NC 组含吞噬晶体的 Ana-1 细胞占比为  $(15.49 \pm 2.45)\%$ , miR-inhibitor 组含吞噬晶体的 Ana-1 细胞占比为  $(6.71 \pm 1.56)\%$ 。miR-minics 组中含吞噬晶体的 Ana-1 细胞比例明显高于 miR-inhibitor 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。



注:A为镜下含吞噬晶体的 Ana-1 细胞;B为含吞噬晶体的 Ana-1 细胞占比的统计图;<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 miR-34c 的过表达和沉默对 Ana-1 细胞晶体吞噬能力的影响

2.3 miR-34c 的过表达和沉默对 Ana-1 细胞迁移能力的影响 Transwell 迁移实验检测 Ana-1 细胞迁移能力,显微镜下观察 Ana-1 细胞的迁移数量,结果显示 pre-miR-NC 组 Ana-1 细胞的迁移数量为  $(35.58 \pm 3.57)$  个, miR-minics 组 Ana-1 细胞的迁移数量为  $(80.29 \pm 5.18)$  个, anti-miR-NC 组 Ana-1 细胞的迁移数量为  $(33.42 \pm 3.73)$  个, miR-inhibitor 组 Ana-1 细胞的迁移数量为  $(17.63 \pm 4.34)$  个。miR-minics 组中 Ana-1 细胞迁移数量明显高于 miR-inhibitor 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注:A为镜下 Ana-1 细胞迁移数量;B为 Ana-1 细胞迁移数量的统计图;<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 miR-34c 的过表达和沉默对 Ana-1 细胞迁移能力的影响

### 3 讨论

miRNA 是在真核生物中发现的一类长度为 20~25 个核苷酸的具有调控功能的内源性非编码 RNA。研究表明 miRNA 参与了包括生长发育、病毒防御、肿瘤发生及转移、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等多种生物学进程的调节<sup>[6]</sup>。有研究表明,草酸钙晶体刺激可以诱导人肾小管上皮细胞 miRNA 表达谱发生明显改变,而且发生表达变化的 miRNA 多与细胞炎性损伤、

凋亡、线粒体功能及代谢功能密切相关<sup>[7]</sup>。HU 等<sup>[8]</sup>研究发现,miRNA 可能通过影响炎症因子的表达调控肾结石的形成。

巨噬细胞是一类不均一的由多个亚群组成的免疫细胞,在机体抵抗和组织修复等过程中发挥重要作用,是免疫系统的重要组成部分。巨噬细胞由血液中的单核细胞分化而来,并且普遍存在于血液、淋巴和组织中。近年研究发现,在实验性肾结石模型大鼠及肾结石患者的肾脏中,均发现晶体沉积的周围有大量单核/巨噬细胞浸润,提示单核/巨噬细胞也参与了肾脏内晶体沉积的过程<sup>[9-10]</sup>。并且有研究表明草酸钙晶体能够诱导人巨噬细胞发生剧烈的免疫反应,肾脏内的一水草酸钙晶体可被巨噬细胞降解并清除<sup>[11]</sup>。此外,基因芯片的分析结果也发现肾结石小鼠肾脏组织中巨噬细胞相关基因的 mRNA 表达明显增加,巨噬细胞细胞分为 M1 及 M2 2 种亚型,其中 M1 型具有促炎作用,而 M2 型具有抗炎作用,M1 型巨噬细胞以分泌炎症因子为主,发挥促炎功能。常见的 M1 型巨噬细胞的表面标志物有 HLA、CD80、CD86 等。M2 型巨噬细胞则以降低炎症反应和发挥组织修复功能为主,常见的 M2 型巨噬细胞的表面标志物有 CD163 和 CD206 等。本研究通过慢病毒转染过表达 miR-34c,发现小鼠 Ana-1 细胞 CD163 和 CD206 表达增加,而 CD80、CD86 表达减少,并且在沉默 miR-34c 后,巨噬细胞表面标志物表达相反,证实了 miR-34c 可促进 Ana-1 细胞向 M2 型极化。巨噬细胞的极化现象广泛存在于肿瘤、肥胖、心血管疾病、自身免疫性疾病等疾病的发生发展过程中。巨噬细胞极化的平衡失调能反映局部组织的微环境炎症状态。最近有研究发现小鼠 M2 型巨噬细胞数量减少,肾脏草酸钙晶体的形成增加,而给小鼠注射 M2 型巨噬细胞后可明显减少肾脏晶体数量,证实了 M2 型巨噬细胞对结石形成有抑制作用<sup>[12]</sup>。本研究通过慢病毒转染,发现过表达 miR-34c 可促进巨噬细胞向 M2 型极化,并促进 Ana-1 细胞晶体的吞噬能力和迁移能力,而沉默 miR-34c 则抑制 Ana-1 细胞晶体的吞噬能力和迁移能力。KUSMARTSEV 等<sup>[13]</sup>也证实 M2 型巨噬细胞可促进细胞的晶体吞噬作用,进一步证实了 M2 型巨噬细胞对结石形成的抑制作用。

综上所述,本研究通过慢病毒转染发现 miR-34c 调控巨噬细胞极化,促进巨噬细胞向 M2 型极化,通过慢病毒转染过表达 miR-34c 可以促进巨噬细胞吞噬晶体及迁移,表明 miR-34c 具有调控巨噬细胞极化,促进吞噬晶体及迁移的作用。

### 参考文献

[1] PIETROW P K, KARELLAS M E. Medical management of common urinary calculi[J]. Am Fam Physician, 2006, 74(1):86-94. (下转第 2001 页)



重要的院内感染菌,其致病性、耐药性逐渐增强的同时伴随的是治疗难度的增加,因此,临床和实验室应注意监测其毒力变化趋势,为临床治疗提供依据。

参考文献

[1] LEE C R, LEE J H, PARK M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 55.

[2] ALIRAMEZANI A, SOLEIMANI M, FARD R M N, et al. Virulence determinants and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients [J]. *Germs*, 2019, 9(3): 148-153.

[3] KIM S W, OH M H, JUN S H, et al. Outer membrane protein A plays a role in pathogenesis of *Acinetobacter nosocomialis*[J]. *Virulence*, 2016, 7(4): 413-426.

[4] 周华, 周建英, 俞云松. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识解读[J]. *中国循证医学杂志*, 2016, 16(1): 26-29.

[5] 陆仁飞, 孙嘉瑶, 黄新祥. 伤寒沙门菌 sRNA S2959 增强细菌动力和生物膜形成能力[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(10): 774-778.

[6] 何小庆, 尹珍, 杨均均, 等. 广泛耐药鲍曼不动杆菌 ST238 克隆株毒力及适应性特征[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(6): 779-784.

[7] 赵祝香, 李裕军, 潘楚芝, 等. 耐碳青霉烯类多重耐药鲍曼不动杆菌的毒力特征研究[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2017, 23(3): 199-203.

[8] 黄妙毅, 刘安. 鲍曼不动杆菌生物膜形成能力与耐药性相关性研究[J]. *陕西医学杂志*, 2015, 44(10): 1373-1374.

[9] BADA VE G K, KULKARNI D. Biofilm producing multi-drug resistant *acinetobacter baumannii*: an emerging challenge[J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(1): 8-10.

[10] MALEKZADEGAN Y, KHASHEI R, SEDIGH E H, et al. Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 572.

[11] LEONG C G, BLOOMFIELD R A, BOYD C A, et al. The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e182139.

[12] 郭通, 刘雄, 王德慧, 等. pilO 基因对鲍曼不动杆菌运动能力的影响[J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(3): 321-324.

[13] BARDBARI A M, ARABESTANI M R, KARAMI M, et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. *Microb Pathog*, 2017, 108: 122-128.

[14] QI L, LI H, ZHANG C, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 483.

(收稿日期: 2020-12-16 修回日期: 2021-04-08)

(上接第 1995 页)

[2] 关晓峰, 邓耀良, 黎承扬, 等. 巨噬细胞在高草酸尿症大鼠肾内结晶晶体形成过程中的作用[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2010, 31(2): 88-91.

[3] OKADA A, YASUI T, FUJII Y, et al. Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice: detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(12): 2701-2711.

[4] 陈康, 蓝创歆, 杨东, 等. 草酸钙结石模型大鼠肾脏 miRNA 差异表达谱的分析研究[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(5): 380-384.

[5] CONG F, WU N, TIAN X, et al. MicroRNA-34c promotes osteoclast differentiation through targeting LGR4 [J]. *Gene*, 2017, 15(8): 6101-6108.

[6] CAI Y, YU X, HU S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2009, 7(4): 147-154.

[7] 陶芝伟, 邓耀良. 巨噬细胞在肾钙化斑介导草酸钙结石形成中的调控作用研究进展[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2015, 36(10): 795-797.

[8] HU Y Y, DONG W D, XU Y F, et al. Elevated levels of

miR-155 in blood and urine from patients with nephrolithiasis[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 20(11): 295-302.

[9] TAGUCHI K, OKADA A, HAMAMOTO S, et al. Proinflammatory and metabolic changes facilitate renal crystal deposition in an obese mouse model of metabolic syndrome[J]. *J Urol*, 2015, 194(6): 1787-1796.

[10] ZUO L, TOZAWA K, OKADA A, et al. A paracrine mechanism involving renal tubular cells, adipocytes and macrophages promotes kidney stone formation in a simulated metabolic syndrome environment [J]. *J Urol*, 2014, 191(6): 1906-1912.

[11] HAMAMOTO S, TAGUCHI K, FUJII Y. Molecular mechanism of renal stone formation [J]. *Clin Calcium*, 2011, 21(10): 1481-1487.

[12] TAGUCHI K, OKADA A, KITAMURA H, et al. Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(8): 1680-1697.

[13] KUSMARTSEV S, DOMINGUEZ-GUTIERREZ P R, CANALES B K, et al. Calcium oxalate stone fragment and crystal phagocytosis by human macrophages [J]. *J Urol*, 2016, 195(4): 1143-1151.

(收稿日期: 2020-10-22 修回日期: 2021-03-28)