

临床细胞生物学

microRNA-129-5p在脓毒症患者血清中的表达及对肺内皮细胞的影响

袁江汉 袁媛 周发春*

(重庆医科大学附属第一医院重症医学科, 重庆 400016)

摘要 该研究旨在探讨miR-129-5p(microRNA-129-5p)在脓毒症患者血清中的表达及对肺内皮细胞的影响。收集临床脓毒症患者的血液样本, 通过荧光实时定量PCR(RT-qPCR)检测miR-129-5p的水平并分析其表达水平与患者临床特征的关系。在肺微血管内皮细胞(HPMEC)中过表达miR-129-5p后, 用Transwell和ELISA实验检测其对细胞迁移以及炎症因子释放的影响。RT-qPCR结果显示, 与对照组相比, 脓毒症组miR-129-5p的表达水平降低($P<0.05$); 与脓毒症组相比, 脓毒性休克组miR-129-5p的表达水平更低($P<0.05$)。miR-129-5p的表达与氧合指数呈正相关, 与降钙素原、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平呈负相关($P<0.001$), 且脓毒性休克组的28天死亡率较脓毒症组高($P<0.05$)。过表达miR-129-5p可以明显促进细胞的迁移, 减少炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的释放。综上所述, miR-129-5p在脓毒症模型中低表达, 病情越重其水平越低, 且与氧合指数、降钙素原水平相关。过表达miR-129-5p可以明显促进细胞的迁移并减少炎症因子的释放。

关键词 microRNA-129-5p; 脓毒症; 脓毒性休克; 炎症; 迁移

Expression of MicroRNA-129-5p in Serum of Sepsis Patients and Its Effect on Pulmonary Endothelial Cells

YUAN Jianghan, YUAN yuan, ZHOU Fachun*

(Department of Intensive Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study was aimed to investigate the expression of miR-129-5p (microRNA-129-5p) in serum of sepsis patients and its effect on pulmonary endothelial cells. Blood samples from patients with sepsis were collected, RT-qPCR (real-time quantitative PCR) was used to detect the level of miR-129-5p and the relationship between its expression level and clinical characteristics of patients was analyzed. miR-129-5p was overexpressed in HPMEC (pulmonary microvascular endothelial cell), the effects of miR-129-5p on cell migration and the release of inflammatory cytokines were detected by Transwell and ELISA assay. RT-qPCR results showed that the expression level of miR-129-5p was decreased in the sepsis group compared with the control group ($P<0.001$), and the expression level of miR-129-5p in the septic shock group was lower than that in the sepsis group ($P<0.05$). The ex-

收稿日期: 2021-03-07 接受日期: 2021-04-19

重庆市自然科学基金面上项目(批准号: cstc2020jcyj-msxmX1096)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18502388799, E-mail: cyzfc1966@126.com

Received: March 7, 2021 Accepted: April 19, 2021

This work was supported by the General Project of Chongqing Natural Science Foundation of China (Grant No. cstc2020jcyj-msxmX1096)

*Corresponding author. Tel: +86-18502388799, E-mail: cyzfc1966@126.com

pression of miR-129-5p was positively correlated with oxygenation index and negatively correlated with PCT, IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels ($P<0.001$), and the 28-day mortality in the septic shock group was higher than that in the sepsis group ($P<0.05$). Overexpression of miR-129-5p could significantly promote cell migration and reduce the release of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . In conclusion, miR-129-5p was low expressed in the sepsis model. The more severe the disease was, the lower the level of miR-129-5p was. It was correlated with oxygenation index and PCT. Overexpression of miR-129-5p can significantly promote cell migration and reduce the release of inflammatory cytokines.

Keywords microRNA-129-5p; sepsis; septic shock; inflammation; migration

脓毒症(sepsis)是由机体对感染反应失调引起的严重危及生命的器官功能障碍^[1], 是临床上常见的急危重症。脓毒症感染引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)常常发展为多器官功能障碍, 继而引起死亡^[2]。脓毒症也是ICU患者死亡最常见的原因之一, 全球每年约有3 150万人发病, 530万人因此死亡, 脓毒症的高死亡率给人类健康带来巨大威胁^[3-5]。脓毒症的病理生理机制包括机体失控的炎症反应、凝血抗凝血和免疫功能障碍, 涉及细胞内多条信号传导通路的活化和分子机制^[6]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长约22 nt的内源性非编码RNA, 在细胞质中合成, 主要以微囊泡形式进入循环, 并且能够稳定存在于循环中, 可以被快速检测^[7-8]。有报道称, miRNA对炎症反应过程的各个环节都有重要调控作用, miRNA异常可能导致炎症反应失衡^[9]。近年研究表明, 在脓毒症和脓毒性休克患者血液中可检测到miRNA表达失调^[10]。

miR-129-5p是miR-129家族的主要功能型产物^[11], 既往的研究和文献报道发现其主要与肿瘤抑制有关, 在多种常见的肿瘤组织细胞中表达异常^[12-16]。WU等^[17]研究发现, 小鼠肺上皮细胞株中miR-129-5p的表达较低, 过表达miR-129-5p可导致鼠肺上皮细胞株细胞周期停滞。WAN等^[18]近期研究发现, miR-129-5p通过HMGB1/TLR4/NF- κ B通路减轻小鼠的炎症反应。有学者提出, miR-129-5p参与小鼠体内的炎症反应过程, 甚至能减轻小鼠脓毒症相关肺损伤^[19]。虽然已有部分研究证实, miR-129-5p能够抑制小鼠炎症反应, 但在人体中miR-129-5p的表达情况和作用尚不明确, 因此本研究拟通过检测脓毒症患者血清中miR-129-5p的水平, 分析其表达水平和脓毒症临床特征以及预后的关系, 并探讨其对

肺内皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2018年4月至2019年6月在重庆医科大学附属第一医院和陆军军医大学大坪医院ICU入住的脓毒症患者67例进行研究, 脓毒症的诊断按照Sepsis 3.0指南标准。随访至患者院内死亡或康复出院, 最终纳入64名患者进行分析。纳入标准: (1) 临床诊断为脓毒症或脓毒性休克并入住ICU的患者; (2) 入院确诊不超过6 h; (3) 年龄18~80岁; (4) 依从性好, 能定期随访的患者。排除标准: (1) 年龄<18岁, 或>80岁; (2) 免疫功能低下患者; (3) 孕产妇; (4) 外院转入; (5) 不愿或不能提供书面知情同意的患者; (6) 不愿或不能进行随访, 以及失访患者。本研究通过重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审核批准[2019年科伦药审(20192301)号]。

1.2 样本收集和处理

患者确诊入院3 h抽取静脉血10 mL, 4℃ 3 000 r/min离心10 min, 将上清吸入1.5 mL无酶离心管中, 之后在4℃ 12 000 r/min条件下离心5 min, 吸取上清于1.5 mL无酶离心管中, 即可得到血清。取200 μ L血清用于提取血清总miRNA, 将RNA置于-20℃冻存以便进行RT-qPCR检测, 剩余血清置于-80℃保存。

1.3 研究分组

根据临床诊断, 所有患者入选时分为两组, 即脓毒症组($n=24$, 男性13例, 女性11例)和脓毒性休克组($n=40$, 男性28例, 女性12例)。选择健康志愿者作为对照组($n=20$, 男性12人, 女性8人)。本研究均经受试者同意并且签署知情同意书。根据研究目的, 记录患者的一般资料和检查结果, 包括性别、年龄、氧合指数(PaO₂/FiO₂)、WBC、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、动脉

血乳酸(Lactate)和28天死亡率等。

1.4 细胞培养

人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMEC)于美国 ScienCELL 公司购买, 使用含有10%的胎牛血清(Gibco, 英国)和1%双抗(Solarbio, 中国)的高糖培养基(DMEM, Gibco, 美国)于37℃、5% CO₂培养箱中培养细胞。过表达miR-129-5p模拟物(mimic)以及miR-129-5p模拟物阴性对照(mimic NC)由上海吉玛制药技术有限公司构建。用10 μg/mL浓度的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS; Sigma, 美国)刺激细胞24 h并检测miR-129-5p的表达水平。

1.5 细胞转染

将HPMEC细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中, 在37℃、5% CO₂、高糖完全培养基中培养48 h。使用Lipofectamine 2000促转剂(Invitrogen, 美国)将miR-129-5p mimic或miR-129-5p mimic NC按照说明书转染到细胞中。培养48 h, 用于后续实验。

1.6 Transwell实验

用0.25%胰蛋白酶处理细胞, 重悬于无血清培养基中, 按 1×10^4 个/孔密度接种于Transwell小室中, 加入200 μL含10 μg/mL LPS或等体积PBS的无血清培养基, 下室加入500 μL完全DMEM。连续培养24 h, 取出小室, 在4%多聚甲醛(Boster, 中国)中固定30 min, 然后在5%结晶紫溶液(Solarbio, 中国)中室温染色10 min。用棉签擦拭上室细胞, 用显微镜拍照和计数细胞, 每个样本随机选择三个高倍视野计数, 每组重复3次。

1.7 RT-qPCR检测

血清/血浆分离试剂盒(Tiagen, 中国)用来提取血液中的总miRNA, 总RNA提取试剂盒(TaKaRa, 日本)用来提取细胞中的RNA, 采用分光光度计(Nano-Drop 2000; Thermo Fisher, 美国)测定RNA的浓度和纯度。通过反转录试剂盒(638313, TaKaRa, 日本)将RNA反转录成互补的cDNA, RT-qPCR检测使用SYBR Premix试剂盒(RR820A, TaKaRa, 日本), 使用CFX96 RT-qPCR(应用生物系统公司, 美国)仪器进行PCR反应。miRNA-129-5p的引物序列为: 5'-GCG GTC TGGGC-3'(正向引物), 3'-CGG GTC TGG CG-5'(反向引物)。反应条件如下: 95℃预变性30 s; 95℃变性5 s, 60℃退火和延伸30 s, 此步骤进行40个循环; 最后进行熔解曲线分析。所有样本检测重复3次, PCR结果

分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.8 ELISA检测

将冻存于-80℃的三个分组(脓毒症组、脓毒症休克组、对照组)的血清样本取出, 冰上溶解。收集四组细胞(对照组、LPS组、mimic NC+LPS组、mimic+LPS组)培养液, 4℃ 3 000 r/min离心10 min。采用ELISA试剂盒(Multi Sciences, 中国)检测血清中白介素IL-1β、IL-6以及肿瘤坏死因子TNF-α的水平。实验操作按ELISA试剂盒说明书执行。

1.9 统计学分析

采用SPSS 24.0软件和GraphPad Prism 7.0进行统计分析和图像处理, 连续正态分布数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 非正态分布数据以中位数及四分位数[M, (Q1, Q3)]表示。对于正常对照组、脓毒症组及脓毒性休克组三组比较, 正态分布数据组间差异比较采用单因素方差分析, 事后比较采用Bonferroni矫正; 非正态数据组间差异使用Kruskal-Wallis秩和检验; 率的比较使用卡方检验。所有实验结果均重复3次。统计学差异显著性水平为* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 基本资料

2018年4月至2019年6月收集临床样本, 从纳入研究开始, 随访至病人康复出院或者院内死亡。统计脓毒症和脓毒性休克患者存活、死亡以及失访的病例数并计算28天死亡率。结果显示: 脓毒症休克组28天死亡率为27.5%, 明显高于脓毒症组($P < 0.05$, 表1)。

对照组、脓毒症组、脓毒性休克组的一般资料如表2所示, 三组资料在性别和年龄上差异无统计学意义, PaO₂/FiO₂、WBC、CRP、PCT、Lactate和miR-129-5p差异均有统计学意义($P < 0.001$)。三组组间差异事后校验两两比较后发现, 脓毒症组和脓毒症休克组组间差异有统计学意义的指标只有PaO₂/FiO₂、PCT和miR-129-5p($P < 0.05$, 表3)。miR-129-5p在对照组、脓毒症组、脓毒性休克组的中位表达水平分别为1.02、0.36、0.28($P < 0.001$); 三组中PaO₂/FiO₂的平均数值分别为451.50、287.75、230.43($P < 0.001$); 而三组中PCT中位表达水平分别为0.20、6.44、41.47($P < 0.001$)。炎症指标如WBC、CRP、Lactate在脓毒症组和脓毒性休克组中差异无统计学

表1 脓毒症组和脓毒性休克组患者随访情况

Table 1 Follow up of patients in the sepsis group and septic shock group

组别 Group	数量 No.	随访人数 Number of follow up	纳入 Inclusion	存活 Survival	28天死亡 Death at 28 days	统计检验 Statistical tests
Sepsis	25	1	24	23 (95.83%)	1 (4.16%)	3.938
Septic shock	42	2	40	29 (72.50%)	11 (27.50%)	0.023*

期望频数 <5 时两组28天死亡率之比用Fisher确切概率法计算。 $*P<0.05$, 和脓毒症组相比。

Fisher's exact probability method was used for the ratio of 28-day mortality between the two groups when the expected frequency was less than five.

* $P<0.05$ compared with the sepsis group.

表2 患者一般资料和临床特征

Table 2 General data and clinical characteristics of the patients

参数 Parameter	正常对照 ($n=20$) Control ($n=20$)	脓毒症组 ($n=24$) Sepsis ($n=24$)	脓毒性休克组 ($n=40$) Septic shock ($n=40$)	统计量 Statistic	P 值 P value
Gender (male/female)	12/8	13/11	28/12	1.723	0.423 ^a
Age	59.00 (53, 65)	64.00 (52, 72)	63.00 (50, 67)	1.15	0.56 ^b
WBC ($\times 10^9/L$)	7.16 $\pm$ 1.93	13.70 $\pm$ 5.51	16.13 $\pm$ 7.29	15.37	$<0.001^{c***}$
CRP/mg·L ⁻¹	3.64 (2.30, 5.77)	90.00 (40.50, 127.95)	90.00(74.58, 151.80)	41.37	$<0.001^{b***}$
PaO ₂ /FiO ₂	451.50 $\pm$ 27.09	287.75 $\pm$ 111.73	230.43 $\pm$ 84.52	45.84	$<0.001^{c***}$
PCT/ng·mL ⁻¹	0.20 (0.11, 0.39)	6.44 (2.52, 39.48)	41.47 (4.20, 100.00)	38.10	$<0.001^{b***}$
Lactate /mmol·L ⁻¹	0.93 (0.66, 1.27)	1.30 (1.10, 2.35)	1.93 (1.40, 3.33)	26.68	$<0.001^{b***}$
miR-129-5p	1.02 (0.95, 1.03)	0.36 (0.29, 0.47)	0.28 (0.20, 0.35)	51.32	$<0.001^{b***}$

a: R $\times$ C卡方检验, b: Kruskal-Wallis秩和检验, c: 单因素方差分析。*** $P<0.001$ 。

a: R $\times$ C Chi-square test, b: Kruskal-Wallis rank sum test, c: One-Way ANOVA. *** $P<0.001$.

表3 三组组间差异事后检验两两比较

Table 3 Pairwise comparison of the differences between the three groups by post test

参数 Parameter	正常对照组vs脓毒症组(t, P) Control vs Sepsis (t, P)	正常对照组vs脓毒性休克组(t, P) Control vs Sepsis shock (t, P)	脓毒症组vs脓毒性休克组(t, P) Sepsis vs Sepsis shock (t, P)
WBC($\times 10^9/L$)	-3.65, $<0.001^{b***}$	-5.53, $<0.001^{b***}$	-1.59, 0.38 ^b
CRP/mg·L ⁻¹	36.30, $<0.001^{a***}$	41.64, $<0.001^{a***}$	-5.33, 1.000 ^a
PaO ₂ /FiO ₂	6.39, $<0.001^{b***}$	9.54, $<0.001^{b***}$	2.62, 0.031 ^{b*}
PCT/ng·mL ⁻¹	31.28, $<0.001^{a***}$	46.75, $<0.001^{a***}$	-15.47, 0.045 ^{a*}
Lactate /mmol·L ⁻¹	23.55, 0.004 ^{**}	34.49, $<0.001^{a***}$	-10.94, 0.28 ^a
miR-129-5p	32.29, $<0.001^{a***}$	47.83, $<0.001^{a***}$	-15.53, 0.041 ^{a*}

a: Kruskal-Wallis秩和检验事后两两比较, b: 单因素方差分析事后Bonferroni矫正两两比较。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。性别及年龄组间差异无统计学意义, 不进行事后两两比较。

a: pairwise comparison after Kruskal-Wallis rank sum test; b: pairwise comparison after Bonferroni correction of One-Way ANOVA. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$. There was no differences in gender and age groups, and no pairwise comparison was performed.

意义($P>0.05$, 表3)。

2.2 血清中miR-129-5p的表达

为了探究miR-129-5p在脓毒症中的作用, 我们分析了其与临床指标的相关性, 通过斯皮尔曼和皮尔逊相关性分析发现, miR-129-5p与氧合指数呈正相关, r 值为0.69, 与PCT、IL-1 β 、IL-6以及TNF- α 呈负相关($P<0.001$, 表4)。RT-qPCR实验结果显示, 与对照组相比, miR-129-5p表达水平明显降低

($P<0.001$); 与脓毒症组相比, 脓毒症休克组miR-129-5p水平更低($P<0.05$, 图1A和图1B)。

本研究中还分析了氧合指数 ≤ 250 组和氧合指数 >250 组患者血清中的miR-129-5p表达水平, 发现和氧合指数 >250 组相比, 氧合指数 ≤ 250 组患者血清中miR-129-5p的表达水平明显降低($P<0.01$, 图1C)。最后, 本研究比较了降钙素原 ≤ 10 组和降钙素原 >10 组患者血清中的miR-129-5p表达水平,

结果显示与降钙素原 ≤ 10 组相比, 降钙素原 > 10 组患者血清中miR-129-5p表达水平降低($P<0.05$, 图1D)。

2.3 血清中炎症因子的表达水平

ELISA试剂盒检测血清样本中相关炎症因子的水平, 结果如图2所示, 和对照组相比, 脓毒症组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平升高($P<0.05$); 脓毒性休克组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平也升高($P<0.05$, $P<0.01$); 且与脓毒症组相比, 脓毒性休克

组炎症因子表达水平更高($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.4 miR-129-5p对HPMEC迁移的影响

如图3所示, 使用LPS处理HPMEC之后, 和对照组相比, miR-129-5p的表达水平明显降低($P<0.01$), 细胞的迁移数量也显著减少($P<0.05$), 而使用mimic转染过表达miR-129-5p之后, 与NC组相比, miR-129-5p的表达水平升高, 细胞迁移数量也增多($P<0.05$)。

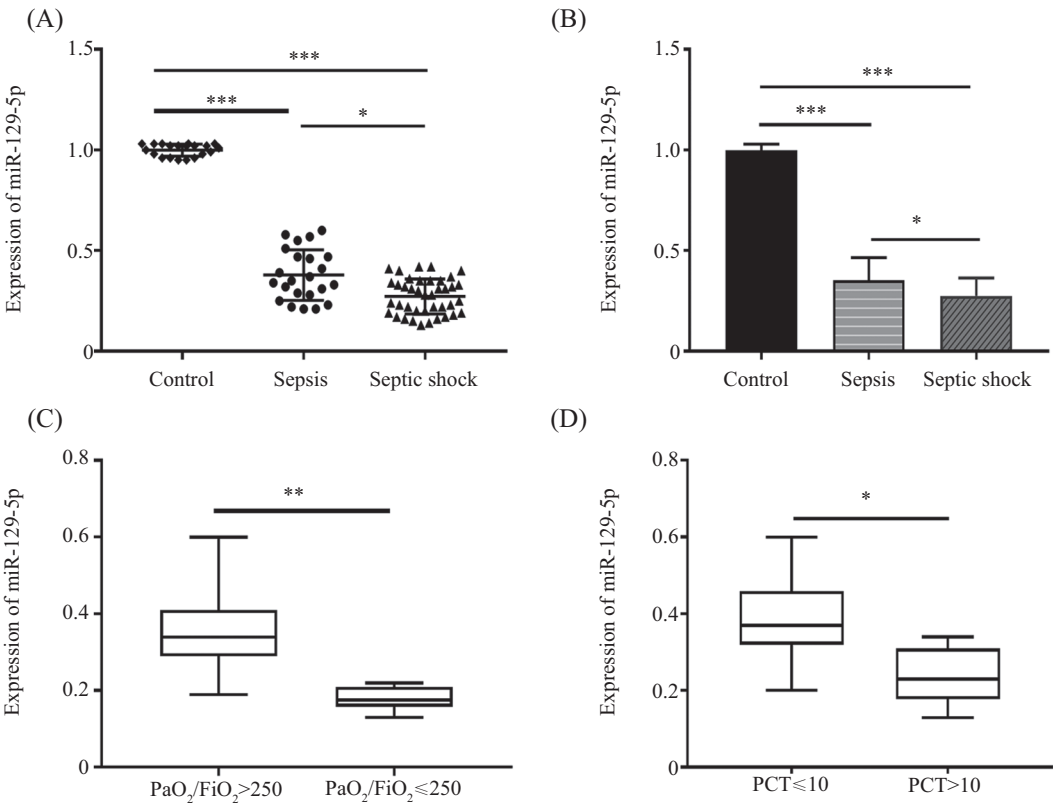
2.5 miR-129-5p对细胞因子的影响

ELISA试剂盒检测四组细胞培养液中细胞炎

表4 miR-129-5p与临床指标的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of miR-129-5p and clinical indicators

参数 Parameter		<i>r</i> 值 <i>r</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
miR-129-5p	PCT	-0.433	0.001
	PaO ₂ /FiO ₂	0.690	0.001
	IL-1 β	-0.935	0.001
	IL-6	-0.831	0.001
	TNF- α	-0.852	0.001

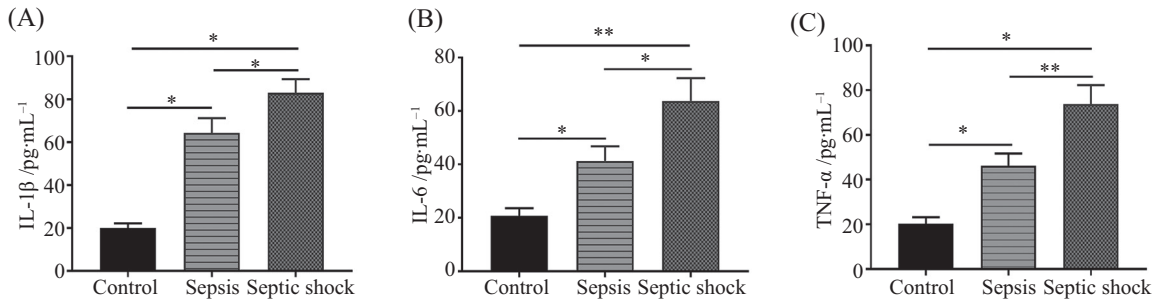


A、B: 对照组($n=20$)、脓毒症组($n=24$)、脓毒性休克组($n=40$)血清miR-129-5p的水平; C: 按氧合指数分组的患者血清miR-129-5p水平; D: 按降钙素原分组的患者miR-129-5p水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,B: serum miR-129-5p levels in the control group ($n=20$), sepsis group ($n=24$), and septic shock group ($n=40$); C: serum miR-129-5p level of patients grouped according to PaO₂/FiO₂; D: miR-129-5p level of patients grouped according to PCT. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图1 ICU患者血清miR-129-5p的水平

Fig 1 The level of serum miR-129-5p in ICU patients

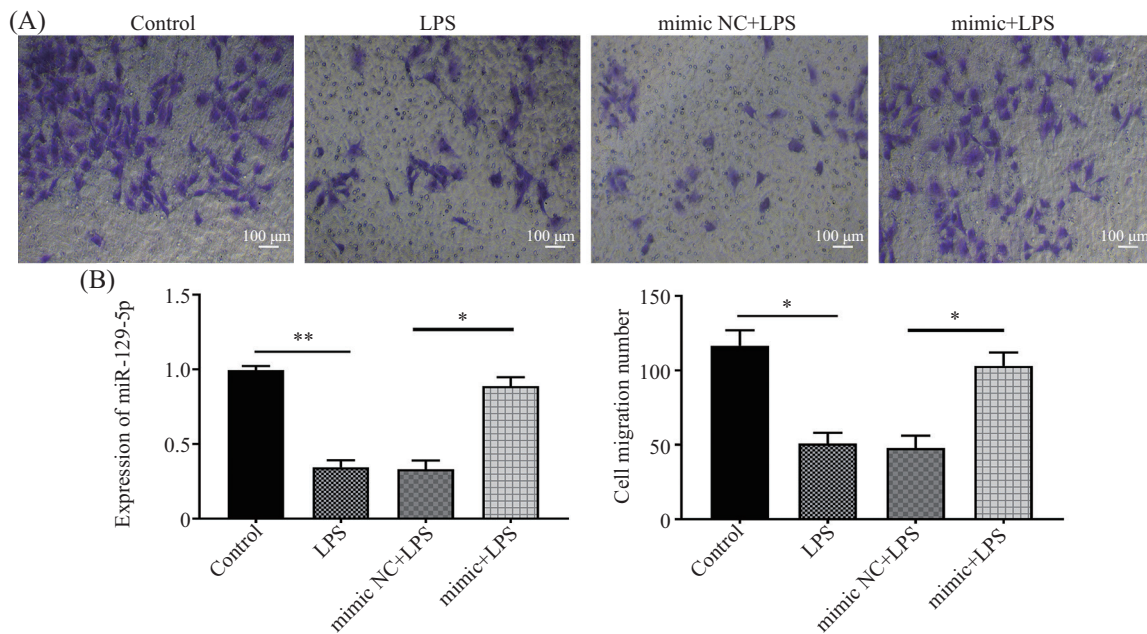


A: 血清中IL-1β的表达水平; B: 血清中IL-6的表达水平; C: 血清中TNF-α的表达水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: expression level of IL-1β in serum; B: expression level of IL-6 in serum; C: expression level of TNF-α in serum. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 血清中炎性因子的表达水平

Fig.2 Expression levels of inflammatory cytokines in serum



A: 过表达miR-129-5p增加HPMEC迁移细胞的数量; B: 转染之后HPMEC中miR-129-5p表达水平的变化; C: 转染之后HPMEC迁移细胞数量变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: overexpression of miR-129-5p increased the migrated number of HPMEC; B: changes in expression level of miR-129-5p in HPMEC after transfection; C: changes in the migratory number of HPMEC after transfection. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图3 过表达miR-129-5p促进HPMEC细胞的迁移

Fig.3 Overexpression of miR-129-5p promoted the migration of HPMEC

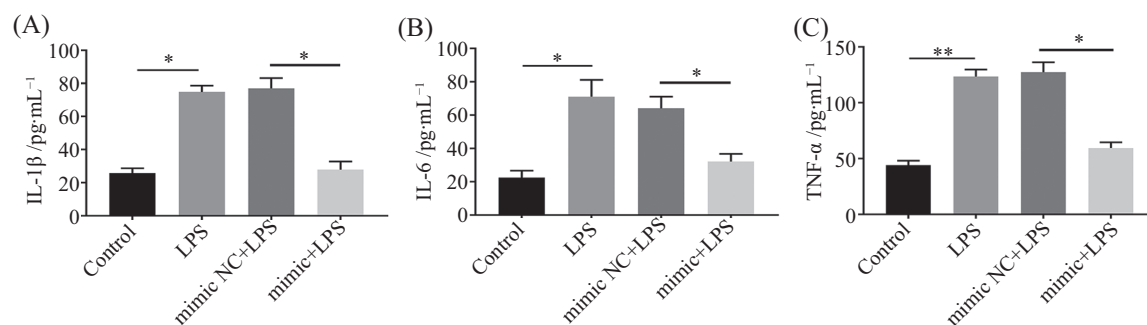
性因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达水平(图4)。与对照组相比, LPS处理的HPMEC培养液中IL-1β、IL-6、TNF-α的表达水平均升高($P<0.05$, $P<0.01$); 与过表达阴性对照NC组相比, miR-129-5p过表达组IL-1β、IL-6、TNF-α的表达水平显著降低($P<0.05$)。这些结果表明, 过表达miR-129-5p能够减轻细胞的炎症反应。

3 讨论

脓毒症发病率高、死亡率高, 给全球医疗卫生系统带了巨大负担^[4]。目前临床上尚无治疗脓毒症的特效药物, 因此早期识别诊断脓毒症、早进行干

预是提高患者存活率的关键。寻找早期诊断脓毒症的生物标志物尤为重要。在感染早期, 机体释放多种促炎因子和炎症介质, 引起炎症反应。与此同时, 机体也合成各种抗炎因子, 两者之间的平衡维持机体内环境稳定。当抗炎因子与促炎因子表达水平失衡, 就会引起病情加重。

临床上反映感染和早期诊断脓毒症的指标如WHB、CRP、Lactate等都和炎症反应密切相关, 且与感染程度呈正相关。但是它们都不能有效鉴别非感染性SIRS、脓毒症以及脓毒性休克, 这可能会耽误治疗和引起抗生素滥用。本研究结果显示, 对照



$n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 miR-129-5p mimic对炎性细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 释放的影响

Fig.4 Effect of miR-129-5p mimic on the release of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α

组、脓毒症和脓毒性休克组中WBC、CRP、Lactate差异均有统计学意义,但是事后分析中,脓毒症和脓毒性休克组间差异无意义,表明这些指标无法区别脓毒症与脓毒性休克。而miR-129-5p、PCT和氧合指数在脓毒症和脓毒症性休克组中差异有统计学意义,即可以对脓毒症和脓毒性休克进行区分。

在相关性分析中发现,miR-129-5p与氧合指数呈正相关,与PCT呈负相关,表明miR-129-5p与临床指标密切相关,可以作为一种标志物,氧合指数虽然能反映疾病状态和炎症程度,但是不能区分感染和其他肺部疾病。2001年,PCT在国际脓毒症会议上被确定为脓毒症诊断指标之一^[20]。HARBARTH等^[21]研究表明,PCT与疾病严重程度相关,其对细菌感染早期诊断有较高特异度。但是最近研究表明,PCT不能鉴别早期脓毒症和SIRS的发生。因此开发其他的标志物很有必要。

miRNAs是非编码RNAs,miRNAs水平在健康和疾病状态之间动态变化,因此在疾病进展过程中,miRNAs可以提供细胞状态和功能的实时信息^[22]。与传统标志物相比,miRNAs具有体积小、化学结构简单、无转录后加工修饰等优点^[23],同时在临床上可被快速检测,处理样本误差小。如本研究中,在患者入院3 h内即可检测到miR-129-5p的差异表达。这些是其他标志物不具备的,miR-129-5p适合作为脓毒症诊断和判断预后的生物标志物。

在本研究中,miR-129-5p表达水平在脓毒症患者血清中和HPMEC细胞模型中均降低,且脓毒性休克患者miR-129-5p表达水平比脓毒症患者低,表明miR-129-5p水平和脓毒症感染严重程度呈负相关,可以识别脓毒症和脓毒性休克。miR-129-5p区别脓毒症或脓毒性休克的临界值范围尚需要更多的研究

来证实。脓毒症患者血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症因子的表达上调,相关性分析发现,miR-129-5p与IL-1 β 、IL-6和TNF- α 呈负相关,再次说明miR-129-5p能反映疾病或者感染的状态。在HPMEC中,LPS刺激使miR-129-5p水平降低,IL-1 β 、IL-6和TNF- α 表达上调,这说明LPS诱导的脓毒症模型是可信的,与人体炎症状态一致。

用LPS刺激HPMEC细胞,迁移细胞减少,迁移能力降低。过表达miR-129-5p之后,迁移细胞增多,迁移能力增强。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症细胞因子的释放减少。HPMEC既是肺损伤主要的靶细胞,也是活跃的炎症和效应细胞,迁移能力的降低是其功能受损的体现。而血管内皮屏障功能在肺损伤过程中十分重要,内皮细胞迁移能力与内皮屏障功能的修复密切相关^[24],减轻内皮细胞的损伤对缓解肺损伤有重要意义。过表达miR-129-5p能够减轻HPMEC细胞的炎症反应,由此可见,miR-129-5p在脓毒症的发生发展中起到了重要的作用,有可能成为诊断脓毒症的分子标记物,或成为治疗脓毒症的靶点,但其具体机制尚有待研究。

既往研究表明,miRNAs可作为多种疾病的生物标志物,如血清miR-150可预测脓毒症和危重症患者的生存预后^[25],miR-146和miR-222在分化型甲状腺癌的治疗和随访中可能有预后价值^[26]。另外,有研究表明在小鼠脓毒症模型中,miR-129-5p表达水平降低,产生一定的抗炎作用,这与本研究的研究结果一致^[19]。miR-129-5p能靶向高迁移率族蛋白1(high mobility group protein box1, HMGB1)减轻细胞损伤,但miR-129-5p在HPMEC损伤中的作用和机制尚不明,细胞的迁移能力与整合素家族的表达密切相关,我们前期的研究显示,miR-92a能够调节

整合素A5的表达从而影响细胞的迁移和侵袭^[27]。因此,在后续研究中,我们将密切关注miR-129-5p对整合素家族的影响和作用机制。

综上所述,miR-129-5p在脓毒症或脓毒性休克患者血清中和HPMEC细胞模型中低表达,可能作为早期诊断脓毒症的标志物,过表达miR-129-5p能够使细胞迁移能力增强,减少炎症因子的释放,深入研究其作用机制有重要意义,可能为脓毒症的治疗提供新的靶点。

参考文献 (References)

- [1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 775-87.
- [2] ANGUS D C, POLL T V D. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(9): 840-51.
- [3] WENG L, ZENG X Y, YIN P, et al. Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis [J]. *Intensive Care Med*, 2018, 1-10.
- [4] REINHART K, DANIELS R, KISSOON N, et al. Recognizing sepsis as a global health priority-a WHO resolution [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(5): 414-7.
- [5] DELLINGER R P, LEVY M M, RHODS A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012 [J]. *Intensive Care Med*, 2013, 39(2): 165-228.
- [6] ANGUS D C, LINDE-ZWIRBLE W T, LIDICKER J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(7): 1303-10.
- [7] 林海焕, 莫泽珣, 苏和毅, 等. 循环微小RNA作为脓毒症生物标志物的研究进展[J]. 中华危重病急救医学(LIN H H, MO Z X, SU H Y, et al. The research progress of circulating microRNA as a biomarker for sepsis [J]. *Chin J Crit Care Med*), 2016, 28(8): 752-5.
- [8] OKAMURA K, PHILLIPS M, TYLER D M, et al. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(4): 354-63.
- [9] REBANE A, AKDIS C A. MicroRNAs: essential players in the regulation of inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(1): 15-26.
- [10] 常虹, 卢祖能. miR-151a-3p在急性脑梗死患者血清中的表达及与炎症因子的相关性研究[J]. 中华危重病急救医学(CHANG H, LU Z N. Expression of miR-151A-3p in serum of patients with acute cerebral infarction and its correlation with inflammatory factors [J]. *Chin J Crit Care Med*), 2016, 28(3): 272-6.
- [11] YU X, SONG H, XIA T, et al. Growth inhibitory effects of three miR-129 family members on gastric cancer [J]. *Gene*, 2013, 532(1): 87-93.
- [12] ZHANG Y, WANG Y, WEI Y, et al. MiR-129-3p promotes docetaxel resistance of breast cancer cells via CP110 inhibition [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15424.
- [13] YU Y, YING Z, SUN X H, et al. Down-regulation of miR-129-5p via the Twist1-Snail feedback loop stimulates the epithelial-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34423-36.
- [14] WU Q, YANG Z, XIA L, et al. Methylation of miR-129-5p CpG island modulates multi-drug resistance in gastric cancer by targeting ABC transporters [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11552-63.
- [15] TSAI K W, WU C W, HU L Y, et al. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(11): 2600-10.
- [16] ZENG H, WANG L, WANG J, et al. microRNA-129-5p suppresses Adriamycin resistance in breast cancer by targeting SOX2 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 651: 52-60.
- [17] WU J, QIAN J, LI C, et al. miR-129 regulates cell proliferation by downregulating Cdk6 expression [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(9): 1809-18.
- [18] WAN G, AN Y, TAO J, et al. MicroRNA-129-5p alleviates spinal cord injury in mice via suppressing the apoptosis and inflammatory response through HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biosci Rep*. 2020, 40(3): BSR20193315.
- [19] PENG Y A, WEI X A, XC A, et al. Overexpression of miR-129-5p mitigates sepsis-induced acute lung injury by targeting High Mobility Group Box 1 [J]. *J Surg Res*, 2020, 256: 23-30.
- [20] LEVY M M, FINK M P, MARSHALL J C, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4): 1250-6.
- [21] HARBARTH S, HOLECKOVA K, FROIDEVAUX C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(3): 396-402.
- [22] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 141(4): 1202-7.
- [23] VICKERS K C, REMALEY A T. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(2): 91-7.
- [24] WARE L B, MATTHAY M A. The acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2012, 332(8): 27-37.
- [25] CHRISTOPH R, MARK L, DAVID V C, et al. Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with Critical Illness and sepsis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54612.
- [26] GOMEZ A M, CORNEJO I M, GARCIA J, et al. New molecular biomarkers in differentiated thyroid carcinoma: impact of miR-146, miR-221 and miR-222 levels in the evolution of the disease [J]. *Clin Endocrinol*, 91(1): 187-94.
- [27] XU F, ZHOU F. Inhibition of microRNA-92a ameliorates lipopolysaccharide-induced endothelial barrier dysfunction by targeting ITGA5 through the PI3K/Akt signaling pathway in human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106060.