

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.13.003

## miR-155 通过促进炎症因子释放参与脓毒症肠道屏障功能障碍的发生发展\*

李志华 黄玮玮 马涛 王毅 于湘友<sup>△</sup>  
(新疆医科大学第一附属医院重症医学科 新疆 乌鲁木齐 830054)

**摘要 目的:**探讨 miR-155 在脓毒症致肠道功能障碍中的表达及作用。**方法:**(1)临床实验:以 2022 年 5 月至 2022 年 8 月入住新疆医科大学第一附属医院重症医学科的脓毒症患者和同期健康体检者为研究对象,根据急性胃肠损伤分级(AGI)将脓毒症患者分为 AGI 组和非 AGI 组。根据 28 d 生存情况分为存活组和死亡组,采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)法前瞻性观察各组外周血 miR-155 的变化。(2)体内实验:将 20 只雄性 S/D 大鼠按照随机数字表法分为假手术组(sham 组)和盲肠结扎穿孔术组(CLP 组),采用 qRT-PCR 及 Western blot 法检测 miR-155、肠道紧密连接蛋白(ZO-1、claudin-1)的表达,ELISA 法检测大鼠肠道组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 的表达水平。(3)体外实验:培养人结肠腺癌细胞(Caco-2),并分为正常对照组(完全培养基培养 48 h)、脂多糖组(完全培养基培养 24 h 后加入 10  $\mu$ g/mL LPS 处理 24 h)。采用 qRT-PCR 检测 miR-155 的表达。在倒置荧光显微镜下观察细胞形态的变化。采用 CCK-8 检测细胞活力。采用免疫荧光观察 Caco-2 细胞中紧密连接蛋白 ZO-1 分布的变化。并行细胞旁通透性实验,观察两组细胞旁通透性的变化。**结果:**(1)脓毒症组和健康对照组相比,脓毒症患者外周血 miR-155 较健康对照组明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。AGI 组患者外周血 miR-155 表达较非 AGI 组明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。脓毒症死亡患者外周血 miR-155 表达显著升高( $P<0.05$ )。(2)应用 CLP 模型进行体内动物实验,CLP 组大鼠肠道组织 miR-155 表达较假手术组(sham 组)明显升高。CLP 组大鼠肠道紧密连接蛋白(ZO-1、claudin-1)较 sham 组下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。ELISA 结果提示,CLP 大鼠肠道组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 水平较 sham 组显著升高 ( $P<0.05$ ),且肠道组织中 miR-155 水平与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 呈正相关( $r=0.542, r=0.906, r=0.868, P<0.05$ )。(3)与正常对照组相比,经 LPS 处理后细胞形态破坏、细胞间紧密连接破坏、细胞活力减弱、细胞旁通透性增加。**结论:**脓毒症发生时伴有肠道屏障功能障碍,miR-155 在脓毒症肠道屏障功能障碍中表达升高,并可能通过促进炎症因子的释放参与脓毒症肠道屏障功能障碍的发生发展。miR-155 异常表达对脓毒症患者早期肠道功能障碍诊断及预后的评估具有重要价值,可作为脓毒症早期肠道损伤诊断及预后情况的重要指标。

**关键词:**脓毒症;肠道屏障功能障碍;miR-155

中图分类号:R-33;R631.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)13-2412-07

## MiR-155 is Involved In The Occurrence and Development of Intestinal Barrier Dysfunction In Sepsis by Prompting The Release of Inflammatory Cytokines\*

LI Zhi-hua, HUANG Wei-wei, MA Tao, WANG Yi, YU Xiang-you<sup>△</sup>

(Department of critical medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the mechanism of MiR-155 in intestinal tissue injury caused by sepsis. **Methods:** (1) Clinical experiment: Sepsis patients admitted to the Department of Critical Care Medicine of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from May 2022 to August 2022 and healthy subjects during the same period were selected as the research objects. According to the grade of acute gastrointestinal injury (AGI), sepsis patients were divided into AGI group and non-AGI group. According to the 28-day survival, the patients were divided into survival group and death group. The changes of MiR-155 in peripheral blood of each group were prospectively observed by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). (2) In vivo experiment: Twenty male S/D rats were randomly divided into sham group (Sham group) and cecal ligation and perforation group (CLP group). The expressions of MiR-155 and intestinal tight junction proteins (ZO-1 and claudin-1) were detected by qRT-PCR and Western blot. The expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 in rat intestinal tissues were determined by ELISA. (3) In vitro experiment: human colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) were cultured and divided into normal control group (complete culture medium for 48 h) and LPS group (complete culture medium for 24 h and then add 10  $\mu$ g/mL LPS for 24 h). The expression of MiR-155 was detected by

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(82160360);新疆维吾尔自治区科技支疆项目(2021E02064)

作者简介:李志华(1987-),女,博士,主治医师,主要研究方向:脓毒症肠道屏障功能障碍,E-mail:lizhuhua19870907@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者:于湘友,男,博士,教授,主任医师,主要研究方向:脓毒症等危重症的防治,E-mail:yu2796@163.com

(收稿日期:2023-02-10 接受日期:2023-02-28)

qRT-PCR. The changes of cell morphology were observed under an inverted fluorescence microscope. Cell viability was detected by CCK-8. The changes of intestinal tight junction protein (ZO-1) were observed by immunofluorescence. Transwell chamber was used for paracellular permeability test to observe the changes of paracellular permeability between the two groups. **Results:** (1) Compared with healthy control group, peripheral blood miR-155 in sepsis group was significantly higher than that in healthy control group, with statistical significance ( $P<0.05$ ). The expression of miR-155 in peripheral blood of AGI group was significantly higher than that of non-AGI group, with statistical significance ( $P<0.05$ ). The expression of miR-155 in peripheral blood of patients with sepsis death was significantly increased ( $P<0.05$ ). (2) In vivo animal experiments using the CLP model showed that the expression of miR-155 in the intestinal tissues of rats in the CLP group was significantly higher than that in the sham group. Intestinal compact junction proteins (ZO-1 and claudin-1) in CLP group were decreased compared with those in sham group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). ELISA results indicated that the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 in the intestinal tissue of CLP rats were significantly higher than those of the sham group ( $P<0.05$ ), and the level of miR-155 in the intestinal tissue was positively correlated with IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 ( $r=0.542$ ,  $r=0.906$ ,  $r=0.868$ ,  $P<0.05$ ). (3) Compared with the control group, the cell morphology was damaged, the tight connections between cells were damaged, the cell viability was weakened, and the paracellular permeability was increased after LPS treatment. **Conclusions:** The occurrence of sepsis is accompanied by intestinal barrier dysfunction. The level of miR-155 in septic intestinal barrier dysfunction is increased, and may participate in the occurrence and development of septic intestinal barrier dysfunction by promoting the release of inflammatory factors. The abnormal expression of miR-155 is of great value for the diagnosis and prognosis of early intestinal dysfunction in patients with sepsis, and can be used as an important indicator for the diagnosis and prognosis of early intestinal damage in sepsis.

**Key words:** Sepsis; Intestinal barrier dysfunction; MiR-155

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R631.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)13-2412-07

## 前言

脓毒症是由宿主全身炎症和对感染的免疫反应失调引起的危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>。目前流行病学调查研究发现,全球每年脓毒症发病为 4890 万例,脓毒症相关死亡达到 1100 万例,占全球死亡人数的五分之一,是目前 ICU 的主要死亡原因<sup>[2]</sup>。近年来,随着对脓毒症发病机制的深入研究,肠道损伤的研究逐渐成为热点。脓毒症发生后肠上皮细胞受损,黏膜通透性增加,肠道菌群易位,进而进一步发生肠道感染<sup>[3,4]</sup>,因此肠道功能障碍被认为是脓毒症"多器官衰竭的发动机"<sup>[5]</sup>。但是,脓毒症引起肠道屏障损伤的确切机制尚不明确。

miRNAs 是近年来研究较多的内源性非编码小 RNA (sncRNA),它在真核生物中大量存在,长度在 20-25nt 之间<sup>[6]</sup>。miRNAs 已被证明是基因表达的调节因子<sup>[7]</sup>,miRNAs 在包括炎症和细菌感染在内的各种生理和病理生理过程中发挥着关键作用<sup>[8]</sup>。然而,对于危重症和脓症患者肠道屏障功能障碍中 miRNAs 的调控知之甚少。miR-155 是一种典型的 miRNA,具有多种功能,在调节各种细胞和器官的炎症过程中发挥关键作用<sup>[9-11]</sup>。但 miR-155 在脓毒症诱导的肠道屏障功能障碍中的作用尚不清楚。本研究拟通过前瞻性研究检测脓症患者循环血中 miR-155 水平,并通过体内动物和体外细胞实验探讨其在脓毒症诱导的肠道屏障功能障碍中的表达及作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人结肠腺癌细胞株 (Caco-2)(武汉普诺赛生命科技公司);Caco-2 细胞专用培养基 (武汉普诺赛生命科技公司);1% 双抗 (100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素),0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司);脂多糖 (LPS)(北京索莱宝公司);兔抗 ZO-1 抗体、免疫荧光二抗 (Coralite488-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG

(H+L))及 CCK-8 试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司);反转录试剂盒及荧光定量试剂盒(赛默飞公司);miR-155 和 U6 引物设计及合成(上海吉玛公司);ZO-1、claudin-1 引物设计及合成(上海生工);FD-4(Sigma)。

### 1.2 研究对象的选择和样本的收集

选择 2022 年 5 月至 2022 年 8 月新疆医科大学第一附属医院 ICU 收治的 40 例脓症患者(脓毒症组)和 40 例同期健康体检者(正常对照组)为研究对象。入选标准:(1)符合 sepsis3.0 的诊断标准<sup>[1]</sup>,有明确的感染灶;(2)年龄 $\geq 18$  岁。排除标准:(1)妊娠或哺乳期;(2)合并恶性肿瘤、自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病。所有患者在诊断脓毒症后 24 h 内采集外周静脉血。患者亲属全程知情同意并签署知情同意文书,该研究经过新疆医科大学伦理审查委员会通过(审批号:220525-01)。

收集所有脓症患者以及同期健康体检者的相关临床资料,包括性别、年龄、BMI、机械通气时间等一般资料,并对其进行比较分析发现两组之间性别、年龄以及基础疾病(高血压病、2 型糖尿病)无显著差异(均  $P>0.05$ ),认为两组具有可比性。根据 ESICM 提出的 AGI 诊断标准对胃肠功能损伤进行分级和评分<sup>[12]</sup>。0 级纳入非 AGI 组(12 例),I-IV 级纳入 AGI 组(28 例)。随访 28 d 的预后情况,将所有研究对象分为存活组(10 例)和死亡组(30 例)。

### 1.3 动物实验

以健康雄性 S/D 大鼠为研究对象,8~12 周龄 (160 g~220 g),由新疆医科大学动物实验中心提供,并经由新疆医科大学动物实验中心动物伦理审查委员会审核批准(审批号:IACUC-20220728-09)。实验动物以普通饲料在清洁级标准下适应性喂养 7 天,模拟自然界 12 h 昼夜模式,正常进食水。实验动物分为 CLP 组( $n=10$ )和 sham 组( $n=10$ )。

### 1.4 细胞实验

以 Caco-2 细胞为研究对象,加入专用培养基,置于 37 °C、

5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,待其长至 70%左右用 0.25%胰酶消化,2:1 传代培养。培养 2 代后,在培养皿中以 6×10<sup>5</sup> 密度进行铺板培养,分别作为正常组和 LPS 组。正常组在恒温培养箱中培养 48 h,LPS 组培养 24 h 后加入 10 μg/mL LPS 继续培养 24 h。随后收集各组细胞进行后续实验。

### 1.5 检测指标及方法

**1.5.1 总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR** 采用 Trizol 提取总 RNA,采用逆转录酶试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。反转录条件为:42℃ 60 min,70℃ 5 min,4℃ 永远。后进行 qRT-PCR,其反应程序为:95℃ 2 min 变性,95℃ 5 s 退火,60℃ 10 s 延伸,共 40 个循环。以 2<sup>-ΔΔCT</sup> 计算基因的相对表达水平。每例重复测量三次取平均值。

**1.5.2 脓毒症动物模型的建立** 采用盲肠结扎穿孔术制作脓毒症动物模型,术前禁食 8 h,腹腔注射 2%戊巴比妥(0.03 mL/kg)进行麻醉,大鼠腹部剃毛备皮消毒,铺手术洞巾,在下腹中线位置做 2 cm 纵行切口,逐层分离出盲肠并找到其末端,距离盲肠远端 1/3 处用 3 号手术线结扎盲肠,用无菌 50 mL 注射器针头穿刺盲肠末端两次,并挤出少量粪便,还纳盲肠于腹腔,逐层缝合腹壁。术后 0.9%温生理盐水(30 mL/kg,皮下注射)进行液体复苏。

**1.5.3 Western Blot 检测肠道紧密连接蛋白** 向装有肠道组织标本的 EP 管内加入细胞裂解液,充分研磨匀浆后置于冰上裂解。4℃,12000 rpm 离心机离心 10 min,留取上清液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒,检测蛋白浓度。取 20 μL 样品蛋白,加入配置好的分离胶及浓缩胶,使用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,加入 5%脱脂牛奶封闭 2 h,然后相应的一抗 4℃过夜,TBST 液充分清洗 3 次,每次 10 min。加入二抗稀释液,室温封闭 60 min,化学发光检测试剂盒显色,以 β-actin 为内参蛋白,计算紧密连接蛋白 ZO-1,claudin-1 相对值。

**1.5.4 ELISA 法检测动物肠道组织炎症因子(IL-1β、IL-6、IL-18)水平** 采用酶联免疫吸附法检测大鼠肠道组织匀浆中 IL-1β、IL-6、IL-18 水平。具体操作按照试剂盒说明书进行操作(江莱生物,上海)。

**1.5.5 CCK-8 法检测细胞活力** 将 Caco-2 细胞(6×10<sup>3</sup> 细胞/孔)

接种于 96 孔板上,每组 3 个复孔,在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 加入不同浓度 LPS(0.1、1、10、100、500 μg/mL)继续培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,在 37℃ 温箱中孵育 2 h。使用多功能微孔板检测仪检测 450 nm 波长下的吸光度值(OD450)。

**1.5.6 细胞旁通透性的测定** Caco-2 细胞接种于 Transwell 小室并连续培养 21 d,形成单层肠上皮屏障,上下室内分别加入 LPS 继续培养 24 h,将生长良好的 Caco-2 单分子层与异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FD4)共同孵育 2 h,从下室取 100 μL 培养液置于 96 孔板并制作标准曲线。采用荧光分光光度计(日立,东京,日本)检测在激发波长和发射波长分别为 485 nm 和 535 nm 时的 OD 值。

**1.5.7 免疫荧光** Caco-2 细胞(6×10<sup>4</sup> 细胞/孔)置于 24 孔板中培养 24 h 后加入不同浓度 LPS(2 μg/mL,4 μg/mL,10 μg/mL)作用 24 h,用冰 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min,4%甲醛固定 15 min,并用 0.5%TritonX-100PBS 在室温下渗透 5 min,然后用山羊血清封闭 1 h,一抗(ZO-1,1:500,21773-1-AP,proteintech)4℃过夜。第二天在避光环境下孵育荧光二抗(三鹰,武汉,中国),然后用 DAPI(40,6-二苯胺基-2-苯)染色细胞核 15 min。在倒置荧光显微镜下(莱卡,德国)观察染色蛋白并获得图像。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 27.0 及 Graphpad Prism 9.0 进行数据统计分析。分类变量以频数(百分位数)表示,组间比较采用 χ<sup>2</sup> 检验;计量资料采用均数±标准差表示,组间比较采用单因素分析或 t 检验;P<0.05 被认为差异具备统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脓毒症组患者外周血 miR-155 表达量升高

为了探索脓症患者外周血 miR-155 的表达情况,本研究比较了脓症患者与健康体检者外周血 miR-155 的表达量,发现与对照组比较,脓毒症组患者外周血 miR-155 表达量较高,差异有统计学意义(P<0.05),见图 1A;同时根据 AGI 分级和 28 d 生存情况将分别将脓症患者进行分组,发现 AGI 组与死亡组患者 miR-155 水平亦显著升高(P<0.05),见图 1B、1C。

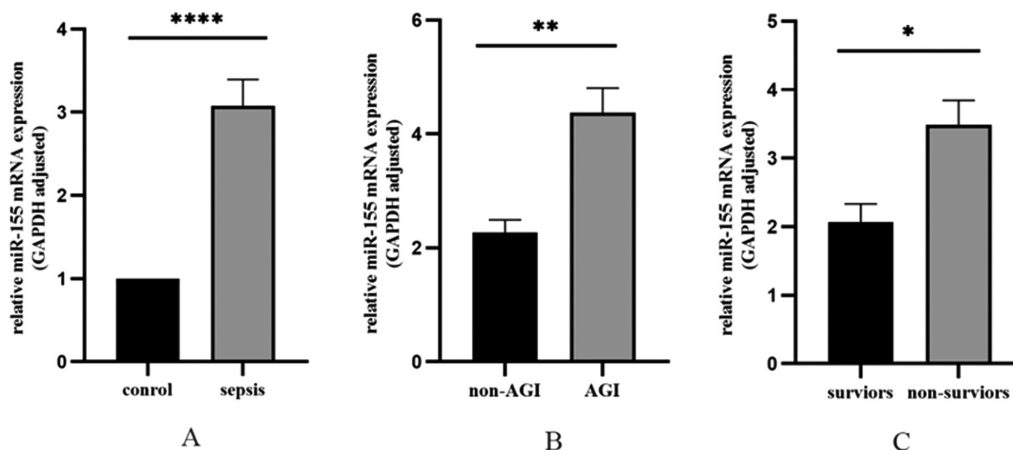


图 1 不同组别外周血 miR-155 表达量的对比。A. 健康体检组和脓毒症组;B. 非 AGI 组和 AGI 组;C. 存活组和死亡组。\*\*P<0.01。

Fig.1 Comparison of MiR-155 expression in peripheral blood of different groups. A, healthy group and sepsis group; B, non-AGI group and AGI group; C, survival group and non-survival group. \*\*P<0.01.

### 2.2 miR-155 在 CLP 组大鼠中表达升高

我们通过体内动物实验进行验证,如图 2 所示,与 sham 组相比,CLP 组大鼠肠道组织 miR-155 水平显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

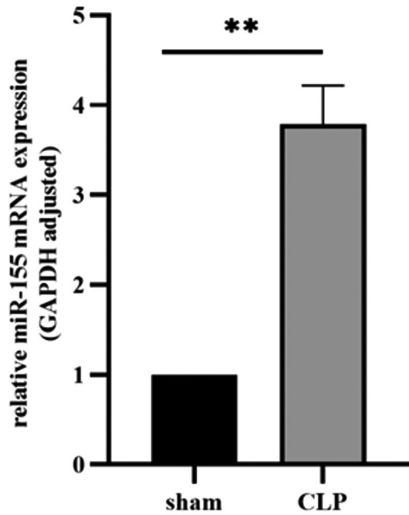


图 2 sham 组和 CLP 组间肠道组织 miR-155 的表达量。 \*\* $P<0.01$   
Fig.2 Expression of Mir-155 in intestinal tissues between Sham group and CLP group. \*\* $P<0.01$

### 2.3 CLP 组大鼠肠道紧密连接破坏

为了明确脓毒症发生时肠道屏障功能的变化情况,采用 qRT-PCR 及 Western blot 方法比较两组大鼠肠道紧密连接的变化,结果如图 3 所示 CLP 组大鼠肠道紧密连接相关指标 ZO-1 和 claudin-1 mRNA 和蛋白水平较 sham 组下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),由此说明脓毒症发生时伴有肠道屏障功能损伤的发生。

### 2.4 CLP 大鼠肠道组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 升高

以 sham 组大鼠作为对照,实验结果提示 CLP 组大鼠肠道组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 水平较 sham 组明显升高,差异具有统计学意义(表 1)。

### 2.5 miR-155 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 在 CLP 大鼠肠道组织中表达的相关性分析

如图 4 所示,miR-155 表达水平与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 呈正相关( $r=0.542, r=0.906, r=0.868, P<0.05$ )。结果表明,miR-155 表达水平的上调与炎症因子释放有关,并进而导致脓毒症肠道屏障功能障碍。

### 2.6 LPS 导致 Caco-2 细胞活力下降

体外细胞实验可见低浓度的 LPS 对细胞活力没有明显影响,但随着 LPS 浓度的增加以及作用时间的延长,细胞活力逐渐下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),如图 5。

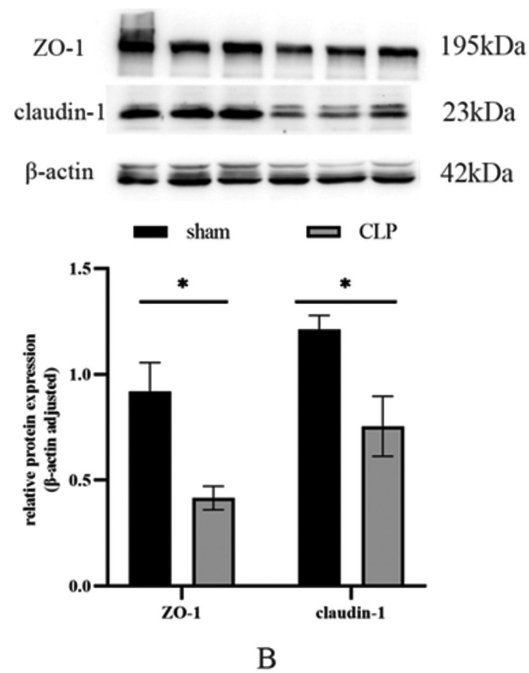
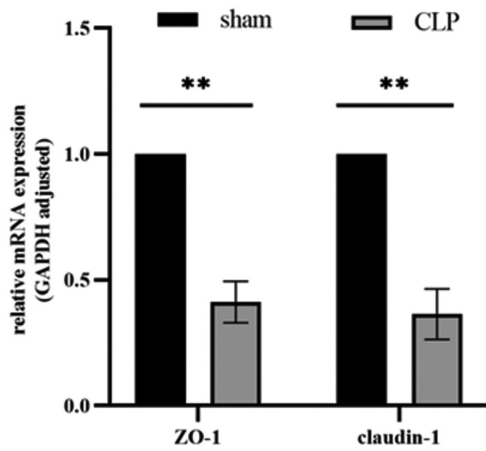


图 3 sham 组和 CLP 组肠道紧密连接蛋白 ZO-1 mRNA、claudin-1 mRNA 和蛋白差异表达。 \*\* $P<0.01, *P<0.05$ 。  
Fig.3 Intestinal tight junction protein ZO-1 mRNA and claudin-1 mRNA and protein level were differentially expressed between Sham group and CLP group. \*\* $P<0.01, *P<0.05$ 。

表 1 各组炎症因子的表达及对比

Table 1 Expression and comparison of inflammatory factors in each group

Groups	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-18
Sham group	304.14 $\pm$ 148.21	169.42 $\pm$ 104.38	128.45 $\pm$ 52.35
CLP group	1139.52 $\pm$ 819.18	268.40 $\pm$ 91.89	522.33 $\pm$ 194.15
<i>P</i>	<0.001	0.003	<0.001

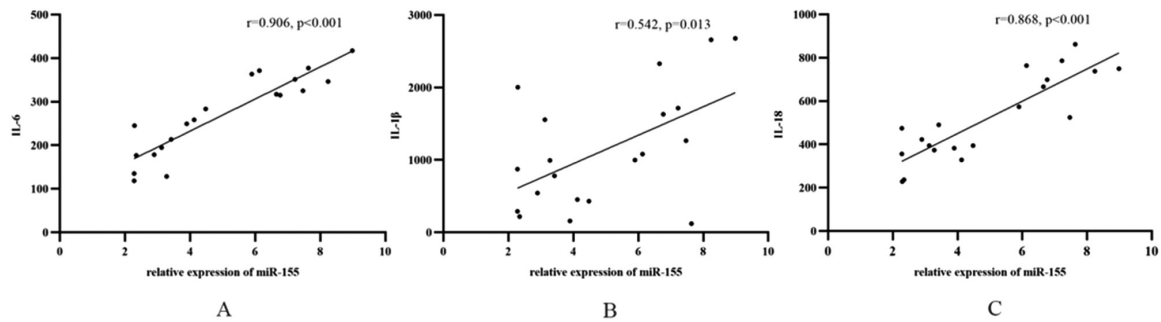


图 4 miR-155 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 的相关性分析  
Fig. 4 Correlation analysis of miR-155 with IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18

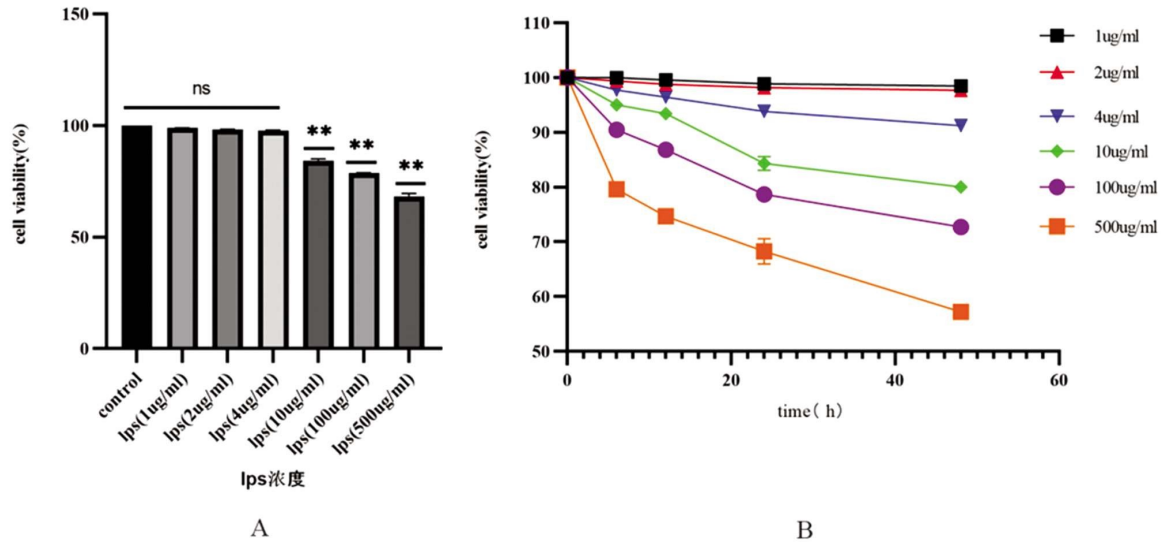


图 5 CCK-8 检测。A. 不同浓度 LPS 作用 24 h 后细胞活力的变化; B. 不同浓度的 LPS 分别作用 6 h、12 h、24 h 和 48 h 后细胞活力的变化。  
\*\* $P<0.01$ 。

Fig. 5 CCK detection. A. changes of cell viability after 24 h treatment with different concentrations of LPS; B. changes in cell viability after 6 h, 12 h, 24 h and 48 h treatment with different concentrations of LPS. \*\* $P<0.01$ .

### 2.7 LPS 导致 Caco-2 细胞间紧密连接破坏以及细胞旁通透性增加

根据 CCK-8 结果,我们选择 LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,作用 24 h 来进行后续的实验,采用免疫荧光法检测 Caco-2 细胞中紧密连接蛋白 ZO-1 分布的变化,如图 6A 所示,在对照组中,ZO-1 染色

在 Caco-2 细胞的顶膜周围呈连续的带状染色。而 LPS 处理的细胞中 ZO-1 的分布发生了显著变化,呈不规则波动,染色强度下降。在 LPS 刺激后 Caco-2 细胞收缩和固缩,细胞间紧密连接破坏,细胞凋亡增加(图 5A)以及随着 LPS 浓度的增加,细胞旁通透性升高(图 6B)。

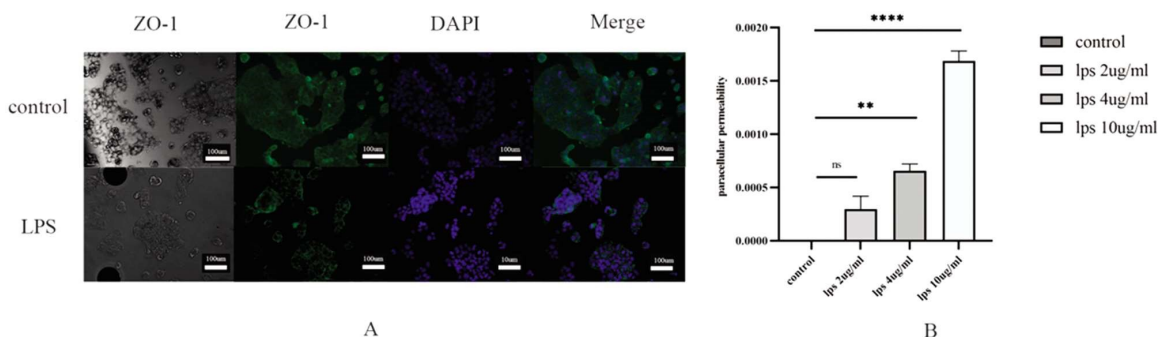


图 6 A.采用免疫荧光法检测 ZO-1 的分布和表达情况。ZO-1(绿色)用荧光二抗标记,细胞核(蓝色)用 DAPI 标记(比例尺,100  $\mu\text{m}$ )。B.正常对照组和不同浓度 LPS 组细胞旁通透性的变化。 \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

Fig.6 A. The distribution and expression of ZO-1 were detected by immunofluorescence assay. ZO-1 (green) was labeled with flurescent secondary antibodies and nuclei (blue) were labeled with DAPI (scale bar, 100  $\mu\text{m}$ ). B. Changs of paracellular permeability in normal control group and LPS group with different concentrations. \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

### 3 讨论

脓毒症引起的肠道屏障功能障碍是 ICU 患者常见的并发

症,虽然各种治疗手段及水平不断提高,但病死率仍较高,且发病机制复杂。肠道既是脓毒症发生过程中极易受损的器官之一,同时也是脓毒症病情进展恶化的动力器官<sup>[13]</sup>。既往的研究认为在脓毒症全身炎症状态下肠道免疫紊乱生成大量炎症因子并发生肠上皮细胞凋亡,破坏细胞间固有的有效连接,从而导致肠道通透性增加,肠道屏障功能受损,导致肠腔内有害内容物移位,加剧脓毒症的发生发展<sup>[14]</sup>。miRNAs 作为一类小分子核糖核酸,在很多疾病的发生中有预测作用<sup>[15]</sup>,并在炎症、感染和脓毒症发生时从细胞中分泌并释放到血液中<sup>[16]</sup>。miR-155 是其中一种关键的 miRNA,参与炎症反应的调节,在脓毒症中表达升高<sup>[17-19]</sup>。然而,miR-155 在脓毒症诱导的肠道屏障功能障碍中的作用机制尚不清楚。

近年来研究结果显示<sup>[20-22]</sup>,脓毒症患者外周血 miRNA 表达量的变化在一定程度上可以反映机体炎症情况,从而用于预测疾病发生的严重程度和转归。为了明确 miR-155 在脓毒症肠道屏障功能障碍中的表达情况,我们采用 RT-qPCR 技术检测了各组 miR-155 的表达。研究发现,脓毒症患者外周血 miR-155 的水平显著高于对照组,同时与非 AGI 相比,AGI 组 miR-155 水平亦显著升高,差异均有统计学意义,进一步证实了 miR-155 水平有助于反映脓毒症患者早期肠道损伤程度。我们通过体内动物实验及体外细胞实验证实,在脓毒症肠道损伤发生的情况下,CLP 组和 LPS 组 miR-155 的水平显著高于对照组,且在体外细胞实验中发现随着 LPS 浓度的升高及作用时间的延长,肠道损伤逐渐加重,表现为免疫荧光实验中肠道紧密连接的破坏和细胞旁通透性的升高,而在动物实验中表现为肠道紧密连接蛋白的表达下降。以上研究结果提示 miR-155 水平上调可能与脓毒症肠道屏障功能障碍有关。既往学者的研究发现,miR-155 在溃疡性结肠炎的发生中表达升高,进一步的机制研究发现其主要是通过靶向结合 Est-1 调控 IL-23/17/6 介导的 Th-17 信号通路加重肠道损伤<sup>[23]</sup>。同时在脑外伤后肠道屏障功能障碍的研究中发现 miR-155 主要通过靶向结合紧密连接蛋白 claudin-1 参与肠道损伤的发生发展<sup>[24]</sup>。与上述研究一致,本研究也发现 miR-155 表达升高,但其在脓毒症肠道损伤中发挥作用的机制仍待进一步研究。

既往研究表明,脓毒症肠道屏障功能障碍的发生与多种因素有关,包括缺血再灌注损伤<sup>[25]</sup>、神经内分泌介质失调<sup>[26]</sup>、炎症风暴<sup>[27]</sup>、肠上皮细胞死亡<sup>[28]</sup>以及遗传因素<sup>[29]</sup>等,其中炎症因子的释放是导致 MODS 发生的主要原因<sup>[30]</sup>,在各种细胞因子和炎症介质的作用下,肠道紧密连接蛋白降解增多,合成减少,上皮间紧密连接复合体降解,上皮完整性破坏,通透性增加<sup>[31]</sup>。为明确 miR-155 在脓毒症肠道屏障功能障碍中的机制,本研究检测了肠道组织中炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6 以及 IL-18)的表达,发现 CLP 术后 IL-1 $\beta$ 、IL-6 以及 IL-18 水平显著升高。进一步分析 miR-155 与炎症因子的相关性,发现 miR-155 与以上三种炎症因子呈正相关,说明 miR-155 的升高可能与炎症因子释放有关,从而导致脓毒症肠道屏障功能障碍的发生发展。研究显示,miRNA 是一类内源性的、进化高度保守的小分子非编码 RNA,主要与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 相结合,在转录和转录后水平上调调控基因表达<sup>[32]</sup>。因此,miR-155 可能通过与下游炎症因子相关靶基因结合来参与调控脓毒症肠道屏障功能障碍。我

们将在后续的研究中进一步寻找 miR-155 的靶基因,探索其在脓毒症肠道屏障功能障碍中的作用机制。

综上所述,脓毒症发生时伴有肠道屏障功能障碍,miR-155 的异常表达对脓毒症患者早期肠道组织损伤诊断及预后的评估具有重要价值,可作为脓毒症早期肠道损伤的诊断及预后情况的重要指标。但 miR-155 参与脓毒症肠道屏障功能障碍的具体机制仍需进一步研究,以明确脓毒症状态下肠道损伤的原因,并寻求进一步的治疗靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810
- [2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10219): 200-211
- [3] Perner A, Rhodes A, Venkatesh B, et al. Sepsis: frontiers in supportive care, organisation and research [J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(4): 496-508
- [4] Fay KT, Ford ML, Coopersmith CM. The intestinal microenvironment in sepsis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(10): 2574-2583
- [5] Otani S, Coopersmith CM. Gut integrity in critical illness [J]. *J Intensive Care*, 2019, 7: 17
- [6] Wigard P, Kloosterman, Ronald H.A. Plasterk. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Developmental Cell*, 2006, 11(4): 441-450
- [7] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 209-218
- [8] Schueller F, Roy S, Vucur M, et al. The Role of miRNAs in the pathophysiology of liver diseases and toxicity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 261
- [9] Essandoh K, Li Y, Huo J, et al. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response[J]. *Shock*, 2016, 46(2): 122-131
- [10] Woodbury ME, Freilich RW, Cheng CJ, et al. miR-155 Is Essential for Inflammation-Induced Hippocampal Neurogenic Dysfunction[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(26): 9764-9781
- [11] Wang H, Bei Y, Huang P, et al. Inhibition of miR-155 Protects Against LPS-induced Cardiac Dysfunction and Apoptosis in Mice[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5(10): e374
- [12] Reintam Blaser A, Malbrain ML, Starkopf J, et al. Gastrointestinal function in intensive care patients: terminology, definitions and management. Recommendations of the ESICM Working Group on Abdominal Problems[J]. *Intensive Care Med*. 2012, 38(3): 384-394
- [13] Simovic MO, Falabella MJ, Le TD, et al. Decay-Accelerating Factor Creates an Organ-Protective Phenotype after Hemorrhage in Conscious Rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13563
- [14] Lechuga S, Ivanov AI. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(7): 1183-1194
- [15] Galluzzo A, Gallo S, Pardini B, et al. Identification of novel circulating microRNAs in advanced heart failure by next-generation

- sequencing[J]. ESC Heart Fail, 2021, 8(4): 2907-2919
- [16] Benz F, Roy S, Trautwein C, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for sepsis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 78
- [17] Marques-Rocha JL, Garcia-Lacarte M, Samblas M, et al. Regulatory roles of miR-155 and let-7b on the expression of inflammation-related genes in THP-1 cells: effects of fatty acids [J]. J Physiol Biochem, 2018, 74(4): 579-589
- [18] Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients [J]. Clin Lab, 2016, 62(12): 2355-2360
- [19] Ma F, Liu F, Ding L, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin are associated with down regulating microRNA-155 in LPS-treated macrophages and mice[J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 1263-1273
- [20] Jiang K, Yang J, Guo S, et al. Peripheral Circulating Exosome-mediated delivery of miR-155 as a novel mechanism for acute lung inflammation[J]. Mol Ther, 2019, 27(10): 1758-1771
- [21] Fabri-Faja N, Calvo-Lozano O, Dey P, et al. Early sepsis diagnosis via protein and miRNA biomarkers using a novel point-of-care photonic biosensor. Anal Chim Acta. 2019, 1077: 232-242
- [22] Formosa A, Turgeon P, Dos Santos CC. Role of miRNA dysregulation in sepsis[J]. Mol Med, 2022, 28(1): 99
- [23] Hou J, Hu X, Chen B, et al. miR-155 targets Est-1 and induces ulcerative colitis via the IL-23/17/6-mediated Th17 pathway [J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(10): 1289-1295
- [24] Pan P, Bai L, Hua X, et al. miR-155 Regulates claudin1 Expression in Humans With Intestinal Mucosa Dysfunction After Brain Injury[J]. Transplant Proc, 2019, 51(10): 3474-3480
- [25] Wang Z, Sun R, Wang G, et al. SIRT3-mediated deacetylation of PRDX3 alleviates mitochondrial oxidative damage and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101343
- [26] 许晓娟,刘亮,姚树坤,等.腹泻型肠易激综合征患者内脏敏感性、肠屏障功能及自主神经功能的评价[J].中南大学学报(医学版),2017, 42(05): 522-528
- [27] Liu X, Chen Y, You B, et al. Molecular mechanism mediating enteric bacterial translocation after severe burn: the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [J]. Burns Trauma, 2021, 9: tkaa042
- [28] Xu S, Li L, Wu J, et al. Melatonin Attenuates Sepsis-Induced Small-Intestine Injury by Upregulating SIRT3-Mediated Oxidative-Stress Inhibition, Mitochondrial Protection, and Autophagy Induction [J]. Front Immunol, 2021, 12: 625627
- [29] Tanoue T, Morita S, Plichta DR, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity [J]. Nature, 2019, 565(7741): 600-605
- [30] Xu S, Li L, Wu J, et al. Melatonin Attenuates Sepsis-Induced Small-Intestine Injury by Upregulating SIRT3-Mediated Oxidative-Stress Inhibition, Mitochondrial Protection, and Autophagy Induction [J]. Front Immunol, 2021, 12: 625627
- [31] Liu Y, Wang L, Lin XY, et al. Anti-apoptotic effect of claudin-1 on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Tumour Biol, 2012, 33(6): 2307-2315
- [32] Ferrante M, Conti GO. Environment and Neurodegenerative Diseases: An Update on miRNA Role[J]. Microna, 2017, 6(3): 157-165