

· 论著 ·

微小 RNA-294 靶向抑制髓系细胞触发受体 -1 对脓毒症炎症因子的影响

刘奕君 曹殿青 莫桂熙 张良清

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-294 (miR-294) 靶向抑制髓系细胞触发受体 -1 (TREM-1) 对脓毒症肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、白细胞介素 -6 (IL-6) 和高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的影响。**方法** 利用生物信息学预测 miR-294 可能靶向调控 TREM-1 基因。体外培养小鼠巨噬细胞株 RAW264.7, 分成非炎症期和炎症期, 每期各分为细胞对照组 (NC 组)、NC 拟似物 (mimic) 和抑制剂 (inhibitor) 转染组 (NCm 组、NCi 组)、miR-294 mimic 和 inhibitor 转染组 (miR-294m 组、miR-294i 组) 5 组。用双荧光素酶报告基因系统进行功能验证。以 TurboFect™ 小干扰 RNA 转染细胞 48 h (非炎症期) 后, 用逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测细胞 TREM-1 mRNA 表达; 以 1 mg/L 内毒素处理 6 h 后 (炎症期) 收集上清液, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 TNF- α 、IL-6、HMGB1 浓度; 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 TREM-1 蛋白表达。**结果** ① 双荧光素酶报告基因系统证实 TREM-1 是 miR-294 的靶点。② 非炎症期: miR-294m 组 TREM-1 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 较 NC 组、NCm 组明显降低 (0.673 ± 0.049 比 1.000 ± 0.003 、 0.915 ± 0.039 , $t_1=2.184$ 、 $t_2=5.421$, 均 $P<0.001$); miR-294m 组 TREM-1 蛋白表达 (灰度值) 为 NCm 组的 $(50.00 \pm 1.19)\%$ ($t=41.586$, $P<0.001$)。③ 炎症期: miR-294m 组 TNF- α (ng/L) 较 NC 组明显降低 ($1\ 547.18 \pm 47.18$ 比 $2\ 702.11 \pm 327.20$, $t=4.212$, $P=0.010$), IL-6 (ng/L) 较 NC 组、NCm 组明显降低 (505.28 ± 33.33 比 837.66 ± 69.43 、 918.72 ± 119.39 , $t_1=4.382$ 、 $P_1=0.015$ 、 $t_2=5.451$ 、 $P_2=0.021$); TREM-1 蛋白表达 (灰度值) 为 NCm 组的 $(51.33 \pm 0.88)\%$ ($t=63.368$, $P<0.001$); 各组 HMGB1 比较均无差异。**结论** miR-294 能靶向抑制 TREM-1 表达, 减少内毒素诱导的小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 分泌 TNF- α 和 IL-6。

【关键词】 髓系细胞触发受体 -1; 微小 RNA; 转染; 脓毒症

Effects of microRNA-294 on inflammatory factor of sepsis by targeting triggering receptor expressed on myeloid cells -1 Liu Yijun, Cao Dianqing, Mo Guixi, Zhang Liangqing. Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, China
Corresponding author: Zhang Liangqing, Email: zhanglq1970@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microRNA-294 (miR-294) on tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin -6 (IL-6) and high mobility group box 1 (HMGB1) secretion in sepsis by targeting triggering receptor expressed on myeloid cell-1 (TREM-1). **Methods** miRNA-294 was predicted to regulate TREM-1 specially through bioinformatics analysis. Mice macrophage cell lines RAW264.7 were cultured in vitro, the cells were divided into non-inflammatory stage and inflammatory stage, and the cells in the two stages were subdivided into five groups as follows: normal control (NC), NC mimic transfection (NCm), NC inhibitor transfection (NCi), miR-294 mimic transfection (miR-294m) and miR-294 inhibitor transfection (miR-294i) groups. The ability of miR-294 was confirmed with dual-luciferase activity assay. At non-inflammatory stage, the cells were transfected with mimic or inhibitor of miR-294 or NC using TurboFect™ siRNA Transfection Reagent for 48 hours, mRNA expression of TREM-1 was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). At inflammatory stage, 6 hours after stimulation by lipopolysaccharide (LPS, 1 mg/L), the concentrations of TNF- α , IL-6 and HMGB1 were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the protein expression of TREM-1 was determined by Western Blot. **Results** ① Dual-luciferase activity assay demonstrated that TREM-1 was the target of miR-294. ② In non-inflammatory stage, the expression of TREM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) in miR-294m group was significantly lower than that of the NC and NCm groups (0.673 ± 0.049 vs. 1.000 ± 0.003 , 0.915 ± 0.039 , $t_1=2.184$, $t_2=5.421$, both $P<0.001$), the expression of TREM-1 protein (gray scale) was $(50.00 \pm 1.19)\%$ of NCm group ($t=41.586$, $P<0.001$). ③ In inflammatory stage, the concentrations of TNF- α (ng/L) in miR-294m group was significantly lower than that of the NC group ($1\ 547.18 \pm 47.18$ vs. $2\ 702.11 \pm 327.20$, $t=4.212$, $P=0.010$), the concentrations of IL-6 (ng/L) was significantly lower than that of the NC and NCm groups (505.28 ± 33.33 vs. 837.66 ± 69.43 , 918.72 ± 119.39 , $t_1=4.382$, $P_1=0.015$; $t_2=5.451$, $P_2=0.021$), the level of TREM-1 protein (gray scale) was $(51.33 \pm 0.88)\%$ of NCm group ($t=63.368$, $P<0.001$). **Conclusion** miR-294 reduce TNF- α and IL-6 secretion in LPS-induced RAW264.7 through inhibiting the expression of TREM-1 specifically.

【Key words】 Triggering receptor expressed on myeloid cell-1; microRNA; Transfection; Sepsis

髓系细胞触发受体-1 (TREM-1) 是选择性表达于中性粒细胞、成熟单核/巨噬细胞的免疫球蛋白样受体, 2001 年 Bouchon 等^[1]首次报道 TREM-1 作为介导脓毒性休克的关键介质触发并扩大了炎症反应。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约为 22 个核苷酸的内在性非编码单链 RNA, 通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区 (3'UTR) 并与之结合, 阻止翻译或使 mRNA 降解, 抑制靶基因表达。研究显示, miRNA 在脓毒症炎症反应及免疫调理中起重要调节作用^[2-4]。我们利用生物信息学预测 miR-294 可能靶向调控 TREM-1 基因, 通过体外培养小鼠巨噬细胞株 RAW264.7, 将 miR-294 拟似物 (mimic) 或抑制剂 (inhibitor) 转染入细胞内, 上调或下调细胞内 TREM-1 表达, 进而观察脓毒症小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的变化, 为阐明 miRNA 在脓毒症中的作用及寻找脓毒症干预的新靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器: 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 (中国科学院上海生命科学院); miR-294 和巨噬细胞 (NC) 的 mimic / inhibitor 引物序列由上海吉玛公司合成。RPMI 1640 细胞培养液 (美国 Gibco 公司); 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒、TurboFectTM 小干扰 RNA (siRNA) 转染试剂、内切酶和连接酶 (美国 Fermentas 公司); 内毒素 (美国 Sigma 公司); TNF- α 、IL-6、HMGB1 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (美国 R&D 公司); 报告基因活性检测试剂盒 (美国 Promega 公司); psicheck II 双荧光素酶报告载体 (普洛麦格生物技术有限公司); 质粒提取试剂盒 (美国 Omega 公司); TREM-1 抗体、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、辣根过氧化物酶标记的多克隆山羊抗兔抗体 (碧云天生物科技有限公司)。

1.2 生物信息学: 查询美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库, 得到鼠 TREM-1 基因 ID 号, 代入 TargetScan、miRanda、miRDB、miRGen 4 种常用软件, 预测可能靶作用于 TREM-1 的 miRNA。

1.3 细胞培养与分组: 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 接种于含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI1640 培养瓶中, 于 37 °C、饱和湿度的 5%CO₂ 培养箱中常规培养。以细胞是否加入内毒素刺激分成非炎症期和炎症期, 每期再分为 5 组, 即 NC 组、NC mimic 转染组 (NCm 组)、NC inhibitor 转染组 (NCi 组)、

miR-294 mimic 转染组 (miR-294m 组)、miR-294 inhibitor 转染组 (miR-294i 组)。

1.4 载体构建: 根据 TREM-1 3'UTR 报告, 基因载体 psicheck II -TREM-1- 3'UTR-Wt 携带了野生型的 3'UTR, 而 psicheck II -TREM-1- 3'UTR-Mut 则携带了突变型的 3'UTR。野生型插入片段的模板是 TREM-1 基因的 3'UTR; 突变型以野生型载体为模板, 根据 TREM-1 3'UTR 序列信息设计突变扩增引物, 将 mmu-miR-294 的靶点序列突变掉。

1.5 细胞转染及处理: 细胞转染前 1 d 换成不含抗菌药物的培养基。细胞融合率达 70% 以上时, 吸去旧的培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次, 6 孔板中每孔加入 1.6 mL 无血清培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中。取 20 μ mol/L 的 siRNA/miRNA 2 μ L, 加入 400 μ L 无血清培养基中, 混匀后加入 4 μ L TurboFectTM siRNA 转染试剂室温孵育 15 ~ 20 min, 将孵育好的转染复合液 400 μ L 加入 6 孔板的各孔细胞中, 置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 4 ~ 6 h 后换成正常的完全培养基, 48 h 后按实验需要处理细胞。

1.6 检测指标及方法: 非炎症期收集各组细胞, 用 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 TREM-1 的 mRNA 和蛋白表达。炎症期各组细胞加入 1 mg/L 内毒素刺激 6 h, 收集上清液, 用于 ELISA 检测 TNF- α 、IL-6、HMGB1 水平; 同时收集各组细胞, 用 Western Blot 检测 TREM-1 蛋白表达。

1.6.1 转染 293T 细胞: 将 psicheck II -TREM-1-3'UTR 载体与 miRNA 共转染 293T 细胞, 分为 Wt + NC 组、Mut + NC 组、Wt + miR-294 组、Mut + miR-294 组, 分别以 psicheck II -TREM-1-3'UTR-Wt 或 psicheck II -TREM-1-3'UTR-Mut 与 NC mimic 或 miR-294 mimic 共转染, 每组设 3 个复孔。转染 24 h 后进行双荧光素酶检测, 按试剂盒说明书操作。

1.6.2 RT-PCR 测定 TREM-1 mRNA 表达: TRIzol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR。TREM-1 基因: 上游引物 5'-CTGCTGTGCGTGTTCTTTGTCTCA-3', 下游引物 5'-GCCTTCTGGCTGTTGGCAACTTCA-3'; 内参基因三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH): 上游引物 5'-ACCCCAATGTGTCCGTGT-3', 下游引物 5'-AGCCCAAGATGCCCTTCAGTGG-3'。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 62 °C 1 min, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 1 个循环。用荧光定量 PCR 仪和 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 相对定量法进行数据分析。

1.6.3 Western Blot 检测 TREM-1 蛋白表达: 提取细胞总蛋白, 用 BCA 法定量蛋白浓度, 然后进行凝胶

电泳,经转膜、洗膜、封闭后加入一抗杂交过夜,漂洗后加辣根过氧化物酶耦联的二抗室温下孵育 1 h,化学发光试剂盒显影,用 Uvipro 凝胶成像系统扫描胶片,IPP 6.0 软件分析灰度值,以目的蛋白和 β -actin 的灰度值比值表示目的蛋白的表达量。

1.6.4 ELISA 测定 TNF- α 、IL-6 和 HMGB1 浓度: 操作严格按照各试剂盒要求进行。

1.7 统计学方法: 用 SPSS 17.0 统计软件分析数据。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

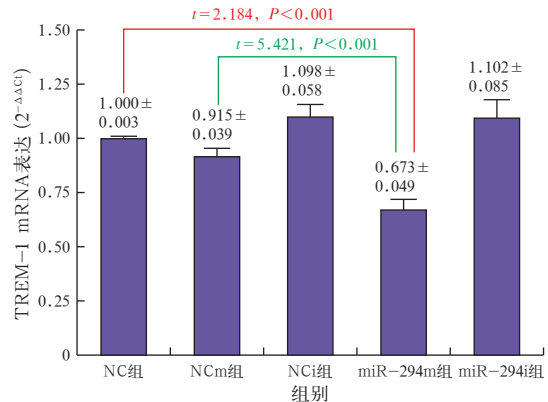
2 结果

2.1 生物信息学分析: 由 NCBI 数据库获得鼠 TREM-1 基因 ID 号 58217, 分别代入 TargetScan、miRanda、miRDB 和 miRGen 4 种软件, 预测可能作用于 TREM-1 基因的多种 miRNA。取各软件分析结果的交集作为研究目标, 最终预测 miR-294 可能靶作用于 TREM-1, mirSVR 分值为 -0.175 3, PhastCons 分值为 0.514 7; TargetScan 软件预测发现, miR-294 序列中 5'-UCGUGAA-3' 可以和 TREM-1 mRNA 3'UTR 序列中 5'-AGCACUU-3'(2163-2169nt) 结合。

2.2 双荧光素酶报告基因系统验证 miR-294 的靶基因: 与 Wt + NC 组比较, Wt + miR-294 组细胞荧光素酶活性由 1.00 ± 0.09 降至 0.42 ± 0.10 ($t = 6.430, P < 0.001$), Mut + miR-294 组较 Mut + NC 组未见明显变化 (0.91 ± 0.05 比 $1.00 \pm 0.08, t = 1.765, P = 0.166$)。提示 miR-294 能特异性地与 TREM-1 基因 3'UTR 种子序列结合, 降解 TREM-1 mRNA。

2.3 非炎症期各组细胞 TREM-1 mRNA 表达(图 1): 各组细胞间 TREM-1 mRNA 表达差异有统计学意义 ($F = 32.300, P < 0.001$)。其中 miR-294m 组 TREM-1 mRNA 表达较 NC 组 ($t = 2.184, P < 0.001$) 和 NCm 组 ($t = 5.421, P < 0.001$) 明显降低; miR-294i 组与 NCi 组无明显差异 ($t = 0.091, P = 0.929$)。

2.4 非炎症期和炎症期各组细胞 TREM-1 蛋白表达(表 1; 图 2): 非炎症期, miR-294m 组 TREM-1 蛋白的灰度值为 NCm 组的 (50.00 ± 1.19)% ($t = 41.586, P < 0.001$); miR-294i 组 TREM-1 蛋白的灰度值为 NCi 组的 (109.88 ± 2.47)% ($t = 7.921, P < 0.001$)。炎症期, miR-294m 组 TREM-1 蛋白的灰度值为 NCm 组的 (51.33 ± 0.88)% ($t = 63.368, P < 0.001$); miR-294i 组 TREM-1 蛋白的灰度值为 NCi 组的 (103.70 ± 0.92)% ($t = 4.224, P = 0.004$)。表明 miR-294 能下调 TREM-1 蛋白表达。



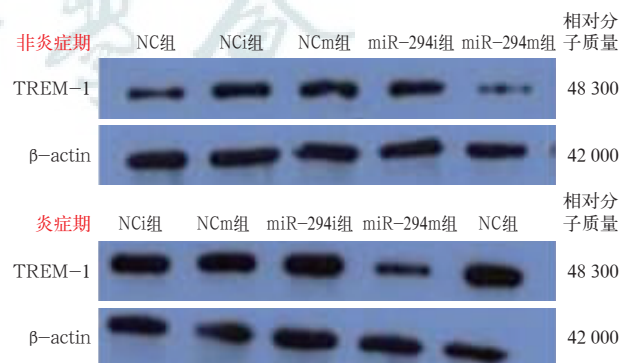
注: miR-294 为微小 RNA-294, TREM-1 为髓系细胞触发受体 -1, NC 组为巨噬细胞阴性对照组, NCm 组为 NC 拟似物 (mimic) 转染组, NCi 组为 NC 抑制剂 (inhibitor) 转染组, miR-294m 组为 miR-294 mimic 转染组, miR-294i 组为 miR-294 inhibitor 转染组

图 1 逆转录-聚合酶链反应检测 miR-294 对小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 转染 48 h 后 TREM-1 mRNA 表达的影响

表 1 各组小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 转染 48 h 后非炎症期和炎症期细胞 TREM-1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	TREM-1 蛋白表达(灰度值)	
		非炎症期	炎症期
NC 组	3	0.45 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.01
NCm 组	3	0.84 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.01
NCi 组	3	0.81 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.02
miR-294m 组	3	0.42 $\pm$ 0.01 ^a	0.58 $\pm$ 0.01 ^a
miR-294i 组	3	0.89 $\pm$ 0.02 ^b	1.12 $\pm$ 0.01 ^b
F 值		1 023.913	2 002.147
P 值		<0.001	<0.001

注: TREM-1 为髓系细胞触发受体 -1, NC 组为巨噬细胞阴性对照组, NCm 组为 NC 拟似物 (mimic) 转染组, NCi 组为 NC 抑制剂 (inhibitor) 转染组, miR-294 组为微小 RNA-294 (miR-294) mimic 转染组; miR-294i 组为 miR-294 inhibitor 转染组; 与 NCm 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 NCi 组比较, ^b $P < 0.01$



miR-294 为微小 RNA-294, TREM-1 为髓系细胞触发受体 -1, β -actin 为 β -肌动蛋白, NC 组为巨噬细胞阴性对照组, NCi 组为 NC 抑制剂 (inhibitor) 转染组, NCm 组为 NC 拟似物 (mimic) 转染组, miR-294i 组为 miR-294 inhibitor 转染组, miR-294m 组为 miR-294 mimic 转染组

图 2 蛋白质免疫印迹试验检测 miR-294 对小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 转染 48 h 后非炎症期和炎症期细胞 TREM-1 蛋白表达的影响

2.5 各组细胞上清液 TNF- α 、IL-6 和 HMGB1 的浓度(表 2):与 NC 组比较,miR-294 m 组细胞分泌 TNF- α 、IL-6 显著降低(TNF- α : $t=4.212$ 、 $P=0.010$, $t=4.382$ 、 $P=0.015$);与 NCm 组比较,miR-294m 组细胞分泌 IL-6 显著降低($t=5.451$ 、 $P=0.021$),而 TNF- α 仅轻度降低($t=3.599$ 、 $P=0.052$),各组细胞分泌 HMGB1 浓度差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 2 miR-294 对内毒素干预小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 分泌 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	HMGB1 (μ g/L)
NC 组	3	2 702.11 $\pm$ 327.20	837.66 $\pm$ 69.43	84.63 $\pm$ 11.15
NCm 组	3	2 534.03 $\pm$ 646.60	918.72 $\pm$ 119.39	82.94 $\pm$ 13.02
NCi 组	3	2 239.69 $\pm$ 169.17	769.10 $\pm$ 35.54	90.82 $\pm$ 13.81
miR-294m 组	3	1 547.18 $\pm$ 47.18 ^a	505.28 $\pm$ 33.33 ^{ab}	72.31 $\pm$ 24.28
miR-294i 组	3	2 606.74 $\pm$ 88.84	816.30 $\pm$ 147.30	92.85 $\pm$ 13.62
F 值		5.836	8.598	0.778
P 值		0.011	0.003	0.564

注:miR-294 为微小 RNA-294,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-6 为白细胞介素-6,HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1,NC 组为巨噬细胞阴性对照组,NCm 组为 NC 拟似物(mimic)转染组,NCi 组为 NC 抑制剂(inhibitor)转染组,miR-294m 组为 miR-294 mimic 转染组,miR-294i 组为 miR-294 inhibitor 转染组;与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 NCm 组比较,^b $P<0.05$

3 讨 论

脓毒症是创伤、烧伤、休克和感染等危重病的常见并发症^[5],发生率和病死率高,是目前临床危重患者主要死因之一^[6]。脓毒症发病机制尚不清楚,涉及炎症、感染、免疫功能障碍、凝血功能异常、组织损害和基因多态性等方面,失控性炎症反应可能是严重创伤和脓毒症的本质特征,适度调控过度炎症反应有助于控制脓毒症的发生发展^[7]。

炎症是机体对伤害性刺激的防御反应,机体遭受损伤短时间内即可分泌促炎细胞因子,TNF- α 、IL-1 是快速反应促炎因子,4~6 h 内可迅速达高峰,是启动“瀑布样”炎症反应最上游的细胞因子,在炎症发生发展中起重要作用,在一定程度上可反映病情变化及预后^[8]。IL-6 是由 TNF- α 、IL-1 诱导的促炎细胞因子,可诱导肝脏合成各种急性反应蛋白(如 C-反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A),是预测疾病严重程度的较敏感指标,可反映脓毒症和多器官功能障碍患者病情变化及预后^[9-10]。HMGB1 是单核/巨噬细胞受内毒素或促炎因子刺激后释放的一种核内蛋白,一般 8 h 后才能在血中检测到,16~32 h 达高峰。已明确 HMGB1 是脓毒症的晚期炎症因子,在

炎症发生和抗炎及组织修复中可能成为临床治疗脓毒症及多器官功能障碍的新靶点^[11-13]。

目前估计哺乳动物细胞中有 600 多个 miRNA,约 30%的基因受到 miRNA 的调节,其功能还没有完全阐明,但 miRNA 的多样性与进化保守性决定了其在生理生化功能上的重要性与普遍性。研究表明,miRNA 参与了生物的早期发育、细胞分化、细胞增殖和死亡、脂肪代谢等方面,可见,miRNA 的作用遍及生命体的发生、生长、发育、分化和死亡的过程^[14]。越来越多的证据表明,miRNA 在急性炎症反应中起重要作用,已成为控制急性炎症反应的新策略^[15]。miR-155、miR-147、miR-98、let-7、miR-9、miR-346 等均被证实在急性炎症反应联络通路中有重要的调节作用^[16-20]。刘芬等^[21]研究显示,脂多糖(LPS)诱导大鼠肺泡巨噬细胞发生炎症反应后,miR-132 的表达随时间上调,可能参与炎症反应的调控。在全身炎症反应综合征(SIRS)过程中,miRNA 参与调控多种致炎基因、转录因子的表达与抑制,多种炎性细胞的增殖、分化及凋亡,多种细胞因子及炎症介质的产生、释放和各种炎症因子受体的表达^[4]。在内毒素诱导脓毒症动物模型中观察到,miRNA 显著上调的同时,TNF- α 、角质化细胞衍生趋化因子及巨噬细胞炎性蛋白 2 等炎症因子减少^[22];在严重脓毒症患者中也观察到,miR-164a 能调节 TNF- α 、IL-1、IL-10 分泌^[23],提示 miRNA 在急性脓毒症反应中可发生广泛的、快速的变化,并可调节反应进程。

TREM-1 作为介导脓毒性休克的关键介质触发并扩大了炎症反应。在盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症动物模型研究中发现,LPS 能引起单核细胞和中性粒细胞 TREM-1 的表达明显增加^[24]。有研究发现,CLP 致脓毒症模型小鼠在给予能与 TREM-1 结合并抑制其转导通路的多肽后,可明显降低小鼠死亡率^[25];即使是在制模早期使用此多肽也可以降低 TNF- α 及 IL-1 β mRNA 的过度表达^[26]。在脓毒症发病早期可溶性 TREM-1 即明显升高,其动态变化联合序贯器官衰竭评分(SOFA)有助于判断预后^[27]。Wang 等^[28]研究显示,通过阻断 TREM-1 信号转导,可减少炎症因子如 IL-1、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和 γ -干扰素(IFN- γ)的释放,又不影响巨噬细胞的体外吞噬作用。可见,TREM-1 在急性炎症反应过程中起关键作用,有望成为治疗脓毒症的潜在靶点,调节 TREM-1 的信号转导通路以减缓炎症反应进展的同时,又不妨碍宿主清除病原体^[29]。本课题组前期实验发现,siRNA 可能通过抑制

TREM-1 基因表达减少内毒素诱导的小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 分泌 TNF- α 和 IL-1 β ^[30]。但 miRNA 对 TREM-1 的调控作用尚有待观察。

我们从生物信息学预测入手,筛选出可能靶向调控 TREM-1 基因的 miR-294,转染 miR-294 的拟似物或抑制剂入细胞,用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 TREM-1 的 mRNA 和蛋白表达,结果显示,转染 miR-294 拟似物后 TREM-1 的 mRNA 和蛋白表达明显降低;双荧光素酶实验结果提示,miR-294 能特异性地与 TREM-1 基因 3'UTR 种子序列结合,抑制 TREM-1 mRNA 的翻译水平,证明 TREM-1 是 miR-294 的靶基因。转染后用内毒素处理收集细胞上清液,用于 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的 ELISA 检测,并用 Western Blot 检测 TREM-1 的蛋白表达,结果显示,TREM-1 蛋白表达下调,TNF- α 和 IL-6 分泌减少,提示 miR-294 通过抑制脓毒症早、中期炎症因子分泌,阻碍 SIRS 和脓毒症发生发展。

综上所述,miRNA 参与了脓毒症炎症反应的调节;本研究证实 miR-294 能通过靶向抑制 TREM-1 来调控 TNF- α 、IL-6 等细胞因子的分泌,提示借助 miR-294 进行炎症因子的调控,有望成为脓毒症新的治疗手段。对 miR-294 的研究尚处于初级阶段,其临床价值尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock [J]. *Nature*, 2001, 410(6832): 1103-1107.
- [2] 葛晨,董士民.微小 RNA 在脓毒症临床实践中的应用[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(7): 522-524.
- [3] 杜林林,马中富. MicroRNA 与免疫反应及脓毒症[J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(8): 501-503.
- [4] 蔡国龙.微小 RNA 在脓毒症中的免疫调控 [J]. *中国危重病急救医学*, 2010, 22(9): 563-565.
- [5] 高戈,冯喆,常志刚,等. 2012 国际严重脓毒症及脓毒性休克诊疗指南[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(8): 501-505.
- [6] Martin JB, Wheeler AP. Approach to the patient with sepsis [J]. *Clin Chest Med*, 2009, 30(1): 1-16, vii.
- [7] 屈纪富,梁华平. 炎症调控与脓毒症研究进展[J]. *创伤外科杂志*, 2012, 14(5): 459-463.
- [8] 梁英健,张晓娟,李鑫,等. 脓症患者血中组织因子、血管性血友病因子与肿瘤坏死因子- α 改变的临床意义 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19(2): 104-106.
- [9] 邱泽亮,叶一萍,张宁,等. 参附注射液治疗严重脓毒症临床疗效及对血清 IL-6、IL-10 水平的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(3): 348-351.
- [10] 苗国辉,宋青,刘辉,等. 白细胞介素-6 对重症急性胰腺炎早期判别预后的作用研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(4): 238-241.
- [11] 王松柏,姚咏明. 高迁移率族蛋白 B1 的细胞生物学效应及其与脓毒症的关系[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(11): 701-704.
- [12] 姚咏明,林洪远. 高迁移率族蛋白 B1 在创伤免疫功能紊乱中的作用及其调节机制 [J]. *中国危重病急救医学*, 2008, 20(9): 513-515.
- [13] 张晓娟,栾正刚,马晓春. 高迁移率族蛋白 B1 对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移能力的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(12): 711-714.
- [14] Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2008, 452(7189): 896-899.
- [15] O'Neill LA. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(7): 549-563.
- [16] O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(5): 1604-1609.
- [17] Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(37): 15819-15824.
- [18] Hu G, Zhou R, Liu J, et al. MicroRNA-98 and let-7 confer cholangiocyte expression of cytokine-inducible Src homology 2-containing protein in response to microbial challenge [J]. *J Immunol*, 2009, 183(3): 1617-1624.
- [19] Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(13): 5282-5287.
- [20] Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, et al. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synovial cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 5088-5097.
- [21] 刘芬,江榕,李勇,等. 微小 RNA-132 在脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应中的表达变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(2): 80-83.
- [22] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [23] 茅尧生,李智鑫,吕铁. 高容量血液滤过对严重脓症患者微小 RNA-146a 及炎症介质的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(4): 277-280.
- [24] Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway [J]. *Immunol Lett*, 2008, 116(2): 111-116.
- [25] 杨其霖,黄红川,张彦峰,等. 人髓系细胞触发受体-1 模拟多肽的筛选和鉴定 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2008, 7(6): 506-510.
- [26] 张彦峰,莫红缨,刘晓青,等. 髓系细胞触发受体 1 结合多肽与脓毒症炎症反应[J]. *国际呼吸杂志*, 2009, 29(13): 769-771, 封 3.
- [27] 王洪霞,李真玉. 脓症患者血浆可溶性髓系细胞表达的触发受体-1 水平及意义 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(5): 283-285.
- [28] Wang F, Liu S, Wu S, et al. Blocking TREM-1 signaling prolongs survival of mice with *Pseudomonas aeruginosa* induced sepsis[J]. *Cell Immunol*, 2012, 272(2): 251-258.
- [29] Palazzo SJ, Simpson T, Schnapp LM. Triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 as a potential therapeutic target in sepsis[J]. *Dimens Crit Care Nurs*, 2012, 31(1): 1-6.
- [30] 邹海鹏,马晓鹏,张良清,等. 小分子干扰 RNA 沉默髓样细胞触发受体 1 对内毒素诱导小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 分泌炎症因子的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(9): 695-699.

(收稿日期:2014-03-03)

(本文编辑:李银平)