

分类号:

密级:

UDC:

学号: 406521817149

南昌大学硕士研究生

学位论文

microRNA-140-5p 对脓毒症树突状细胞 表型及功能的影响

Effects of microRNA-140-5p on phenotype
and function of septic dendritic cells

廖乐泰

培养单位(院、系): 南昌大学第一附属医院

指导教师姓名、职称: 陈海鸣 副教授 主任医师

申请学位的学科门类: 医学硕士

学科专业名称: 急诊医学

论文答辩日期: 2020年7月

答辩委员会主席: 徐方云

评阅人: 盲审

盲审

2020年7月

摘要

目的:

探究 microRNA-140-5p (miR-140-5p) 对脓毒症树突状细胞(Dendritic cell, DC)表型及功能的影响。

方法:

(1)取人外周血提取单核细胞,以人重组细胞因子白介素 4 (IL-4)及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 诱导分化体外培养单核细胞来源树突状细胞 (monocyte-derived dendritic cells, MoDC)。

(2)实验分组及细胞处理方法: 对照组: 在 MoDC 体外诱导培养的第五天加入 1ug/ml 的 LPS 培养 48 小时; 脓毒症模型组: 培养全过程以 1ug/ml 的 LPS 给与持续刺激; 脓毒症+转染处理组: 同脓毒症模型组处理, 在培养的第 5 天转染 (miR-140-5p mimics、inhibitor 及相应的对照 miR-NC)培养 12 小时后再加 1ug/ml 浓度的 LPS 处理 48 小时。

(3)细胞流式检测不同处理组树突状细胞表面共刺激分子 (CD80、CD86 及 HLA-DR) 的表达及细胞凋亡情况

(4)荧光显微镜检测细胞转染后的胞内荧光信号; 荧光定量 PCR (q-PCR) 检测不同处理组 DC miR-140-5P 表达情况。

(5)酶标仪检测不同处理组 DC 促 T 细胞增殖作用的变化; q-PCR 检测不同处理组 DC TLR-4、NF- κ b mRNA 的表达变化; 蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测不同处理组 DC TLR-4、NF- κ b 及 Bcl-2 蛋白的表达变化。

结果:

(1)相较于对照组 LPS 短期刺激的处理, 持续的 LPS 刺激即体外脓毒症模型树突状细胞 miR-140-5P 表达明显降低 ($p < 0.01$); 表面共刺激分子 CD80、CD86、HLA-DR 的表达明显降低 ($p < 0.05$), 凋亡明显增加 ($p < 0.01$); 刺激 T 细胞增殖的作用减弱 ($p < 0.01$)。

(2)转染 mimics 及 inhibitor 能很好地操控树突状细胞 miR-140-5P 表达; 过表达 miR-140-5P 可抑制脓毒症 DC 表面共刺激分子 CD80、CD86、HLA-DR 表达下调的情况 ($p < 0.05$), 树突状细胞凋亡减少 ($p < 0.01$), 刺激 T 细胞增殖的作用增强 ($p < 0.05$)。

摘要

(3)TLR-4 及 NF- κ B (p65) mRNA 及蛋白在体外脓毒症模型 DC 的表达量均上调 ($p < 0.05$); 过表达 miR-140-5p 能抑制其表达 ($p < 0.05$)。bcl-2 在体外脓毒症模型 DC 的表达受抑制 ($p < 0.05$); 过表达 miR-140-5p 脓毒症树突状细胞 bcl-2 表达上调 ($p < 0.05$)。

结论:

脓毒症树突状细胞 miR-140-5P 表达量减少, 成熟受抑制, 细胞凋亡增加, 刺激 T 细胞增殖的作用减弱。过表达 miR-140-5P 可改善脓毒症 DC 成熟受抑制的情况, 减少细胞凋亡, 增强刺激 T 细胞增殖的作用。作用机制可能是靶向 TLR-4 调控 TLR-4 /NF- κ B 信号通路及调控凋亡相关蛋白 bcl-2 的表达对 DC 的表型及功能产生影响。实验结果为通过外源性 miRNA 调控 DC 功能逆转脓毒症免疫抑制的脓毒症早期治疗策略提供了实验依据。

关键词: 脓毒症; 树突状细胞; miR-140-5P; TLR-4

ABSTRACT

Objective:

To observe the effect of sepsis on the expression of surface molecules and apoptosis of DC, and to detect the changes of miR-140-5p expression in sepsis DC.

Methods:

(1) Mononuclear cells were extracted from human peripheral blood, and monocyte-derived dendritic cells (monocyte-derived dendritic cells, MoDC) were cultured in vitro induced by recombinant human cytokine interleukin-4 (IL-4) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF).

(2) Experimental grouping and cell treatment methods: ① NC group: On the fifth day of MoDC culture in vitro, LPS with 1ug/ml was added for 48 hours; ② sepsis model group: Continuous stimulation was given by LPS of 1ug/ml in the whole process of culture; ③-⑥ sepsis + miRNA-transfected group: same as sepsis model group, transfection (miR-140-5p mimics, inhibitor and corresponding control) on the fifth day of culture for 12 hours and then treated with 1ug/ml concentration of LPS for 48 hours.

(3) Flow cytometry was used to detect the expression of DC surface molecules (CD80, CD86 and HLA-DR) and apoptosis in different treatment groups.

(4) The intracellular fluorescence signal after transfection was detected by fluorescence microscope and the expression of miR-140-5p was detected by q-PCR to verify the transfection effect.

(5) Enzyme labeling instrument to detect the effect of DC on T cell proliferation in different treatment groups, q-PCR to detect the expression of TLR-4 and NF- κ B mRNA, and Western blot to detect the expression of TLR-4, NF- κ B and Bcl-2.

Results:

(1) Compared with the control group treated with LPS short-term stimulation, the expression of miR-140-5p and the expression of CD80, CD86 and HLA-DR on dendritic cells of septic model in vitro after continuous LPS stimulation decreased significantly, while apoptosis increased significantly ($p < 0.01$), and the effect of stimulating T cell proliferation was weakened ($p < 0.01$).

(2) Transfection of mimics and inhibitor could well interfere with the expression of miR-140-5P, overexpression of miR-140-5p could improve the down-regulated expression of CD80, CD86 and HLA-DR on septic DC ($p<0.05$), decrease the apoptosis of dendritic cells ($p<0.01$) and enhance the effect of stimulating T cell proliferation ($p<0.05$).

(3) The expressions of TLR-4 and NF- κ B (p65) mRNA and protein were up-regulated in septic dendritic cells ($p<0.05$), and overexpression of miR-140-5p could inhibit its expression ($p<0.05$). The expression of bcl-2 in septic dendritic cells was inhibited ($p<0.05$), and overexpression of miR-140-5p could improve the inhibition ($p<0.05$).

Conclusion:

In sepsis, the expression of miR-140-5P in dendritic cells was decreased, the maturation of dendritic cells was inhibited, the apoptosis of dendritic cells was increased, and the effect of stimulating T cell proliferation was weakened. Overexpression of miR-140-5p can improve the inhibition of DC maturation in sepsis, reduce the apoptosis of dendritic cells and enhance the effect of stimulating T cell proliferation. The mechanism may be that targeted TLR-4 affects the phenotype and function of DC through TLR-4/NF- κ B signal pathway and regulation of apoptosis-related protein bcl-2. The purpose of this study is to provide experimental basis for the early treatment strategy of sepsis through regulating DC function by exogenous miRNA to reverse the immunosuppression of sepsis.

Keywords: Sepsis; dendritic cells; miR-140-5P; Toll-like receptor 4.

目 录

引 言	1
一、脓毒症 DC miR-140-5p 表达变化及其表型、功能改变	4
1.1 实验材料和方法	4
1.1.1 实验试剂	4
1.1.2 实验器材	5
1.1.3 实验方法	6
1.1.4 统计学处理	10
1.2 实验结果	10
1.2.1 人外周血单核细胞来源树突状细胞培养	10
1.2.2 脓毒症 DC miR-140-5P 表达明显降低	11
1.2.3 脓毒症 DC 表面共刺激分子的表达受抑制，细胞凋亡增加	12
1.3 讨论	13
1.4 结论	15
二、miR-140-5P 对 DC 表型及功能的影响及其作用机制	16
2.1 实验材料和方法	16
2.1.1 实验试剂	16
2.1.2 实验仪器	18
2.1.3 实验方法	19
2.2 实验结果	23
2.2.1 树突状细胞转染效果检测	23
2.2.2 过表达 miR-140-5p 能改善脓毒症 DC 成熟受抑情况及减少细胞凋 亡	23
2.2.3 过表达 miR-140-5p 能改善脓毒症 DC 促 T 细胞增殖作用受抑情况	25
2.2.4 过表达 miR-140-5p 能改善脓毒症 DC TLR-4、NF-κB mRNA 表达 受抑情况	26

目 录

2.2.5 miR-140-5p 可能通过靶向 TLR-4/NF- κ B 通路影响脓毒症 DC 表型及功能	27
2.3 讨论	28
2.4 结论	30
全文总结	31
致 谢	32
参考文献	33
攻读学位期间的研究成果	37
综 述	38

中英文缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
DC	Dendritic cell	树突状细胞
MoDC	monocyte-derived dendritic cells	单核细胞来源树突状细胞
TLR-4	Toll-liked receptor 4	Toll 样受体 4
qPCR	Real-time Quantitative PCR Detecting System	实时荧光定量核酸扩增检测系统
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒-8
Bcl2	B-cell lymphoma 2	B 细胞淋巴瘤 2 基因
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction	混合淋巴细胞反应
NF- κ B	nuclear factor kappa-B	核因子 κ B
ox-LDL	Oxidized Low Density Lipoprotein	氧化低密度脂蛋白
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸缓冲盐溶液
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
OD	Optical Density	吸光度值
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride	乙二胺四乙酸
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜

引 言

脓毒症是机体对感染免疫反应紊乱所致的一种器官功能障碍，是临床危重病患者的严重并发症之一，常由严重创伤、烧伤、大手术、感染等因素诱发，进而发展为脓毒性休克和多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[1,2]。虽然通过改进诊疗技术和监测手段对脓毒症患病率和病死率有所控制，但仍数目庞大，是全球死亡原因的一个主要组成部分^[3,4]。2002年10月在西班牙巴塞罗那，欧洲危重病医学会、美国危重病医学会和国际感染论坛携手发起了救援脓毒症的全球性行动(surviving sepsis campaign, SSC)，并发表了世界脓毒症宣言^[5]。2017年，世界卫生大会和世界卫生组织(WHO)将脓毒症列为全球卫生优先事项，并决议策动会员国和世卫组织采取具体行动，通过改善预防、诊断和管理手段，减轻脓毒症负担^[6,7]。据流行病学分析，全球预计每年有3150万脓毒症病例和1940万严重脓毒症病例，并有530万人死于脓毒症相关疾病^[8]。脓毒症作为严重的公共卫生问题，对社会经济亦造成很大影响及负担^[9]。脓毒症发病机制复杂，SSC推进远较人们预想的艰巨，虽然在过去数十年中，脓毒症的发病机制研究在病原微生物、细胞免疫学、病理生理学、基因/蛋白质组学等领域取得了一定进展，然而仍未阐明致脓毒症免疫紊乱的具体机制。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是存在于血液、上皮和淋巴组织中的一种骨髓源性细胞，作为功能强大的抗原提呈细胞，能通过内化细胞外抗原并递呈给初始T细胞，启动免疫反应^[10,11]。如病原体(如脂多糖)、炎性介质、细胞因子(如TNF- α 和IL-1 β)和神经肽的许多信号都能使DC向成熟状态发展^[11-14]。受抗原刺激后，DC可对Toll样受体(TLRs)、MHC(MHC)分子、共刺激分子(CD40、CD80和CD86)的表达做出调剂，亦可相应调剂细胞因子(TNF α 、IL-6、IL-10和IL-12)的生成。作为联接固有免疫和适应性免疫的桥梁，DC可以向T细胞提呈抗原，并提供活化T细胞所需的共刺激分子和细胞因子，DC数量和功能的改变对脓毒症免疫紊乱具有重大意义^[15-17]。

microRNA是小片段的内源性非编码RNA，可靶向性降解目的mRNA或抑制其翻译过程，从而在转录后或翻译阶段调剂蛋白的表达，在细胞增殖、分化和凋亡过程发挥作用，并可介导多种炎症和免疫疾病的发生、发展^[19]。随着对microRNA的深入研究发现microRNA在脓毒症的诊断、治疗以及预后中皆有重

大作用^[20-22]。不仅可以在 DC 中改变 microRNA 表达来调控其细胞功能，还可以被分泌至胞外与旁细胞或远端细胞交流。microRNA 在 DC 上的表达变化能调控 DC 的增生、分化、抗原呈递能力，改变细胞免疫应答能力及凋亡情况，并且不同免疫阶段 DC 及其他免疫细胞分泌的含 microRNA 的外泌体可对 DC 功能产生不同调控作用^[22-24]。

TLR-4 是机体非特异性免疫过程中不可或缺蛋白，作为跨膜受体蛋白 Toll 样受体(TLR)家族中的重要组成部分，能识别与病原体相关的分子模式激活炎症介质的生成。TLR-4 能够识别脂多糖(LPS)，并促进炎症因子的分泌，常常会导致脓毒症发生^[25,26]。它主要表达于巨噬细胞、树突状细胞和上皮细胞表面，是革兰氏阴性菌外壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的主要受体，当外源性 LPS 通过机体物理屏障后，可被 TLR-4 识别并结合，释放大量炎症因子，使中性粒细胞生成大量活性氧簇，损伤肺组织毛细血管内皮细胞，形成肺水肿等，而由于肺内皮屏障的全面破坏所致急性肺损伤是细菌性脓毒症死亡的主要原因^[27-29]。关于 LPS 转移至 TLR-4 的级联反应的结构决定因素的定义使针对 LPS 引起的脓毒症的干预性靶向治疗药物的开发成为可能^[30]。大量研究已证实：抑制 TLR-4 可通过调控 NF- κ B 信号通路在脓毒症中起保护作用^[28,31,32]。脓毒症的重要特点是免疫功能紊乱及免疫抑制^[33]，而免疫功能紊乱主要体现于：一、抗炎细胞因子/促炎介质比值上升，表现为 Th 细胞分化 Th2 占比上调，抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 等分泌增多；二、细胞凋亡及免疫麻痹，表现为凋亡增加所致的 T、B 淋巴细胞及树突状细胞数量减少，以及体内生存的免疫细胞不能正常发挥免疫作用^[34,35]。而 TLR-4 是 DC 表面大量表达的信号转导蛋白之一，有研究表明：TLR-4 在内毒素诱发的脓毒症肺损伤中起重要作用，其 mRNA 表达随严重程度增加而增高^[36]，而 TLR-4 能调控 DC 功能参与脓毒症肺损伤过程^[37]。由此可见，通过外源性 miRNA 参与调控 DC，形成 miRNA-TLR-4-DC 功能的序贯作用链来介导脓毒症免疫治疗具有一定可行性。

据文献报道 miR-140-5p 可通过 TLR-4 / MyD88 /NF- κ B 信号通路减少急性肺损伤 (ALI) 中的炎症因子分泌，降低炎症水平^[38]；在动脉粥样硬化模型中发现 miR-140-5p 可通过靶向巨噬细胞 TLR-4 抑制氧化应激和细胞凋亡^[39]。

基于以上研究，本研究拟通过体外诱导单核细胞分化培养树突状细胞，LPS (1 μ g/ml)持续刺激构建体外脓毒症模型，探讨脓毒症树突状细胞 miR-140-5p 表达量的变化以及脓毒症 DC 表型及功能的改变；并通过转染技术改变脓毒 DC

miR-140-5p 的表达，探究 miR-140-5p 对 DC 表型及功能的影响。试图为通过外源性 miRNA 调控 DC 功能逆转脓毒症免疫抑制的脓毒症早期治疗策略提供实验依据。

一、脓毒症 DC miR-140-5p 表达变化及其表型、功能改变

作为联接固有免疫和适应性免疫的重要枢纽, DC 可识别并为 T 细胞呈递抗原, 提供 T 细胞活化必需的共刺激分子和细胞因子, 其数量及功能改变在脓毒症在免疫紊乱中影响深远^[15-17]。TLR-4 是 DC 表面大量表达的信号转导蛋白之一, 有研究表明: TLR-4 在脓毒症肺损伤中意义重大, 且随着脓毒症的严重性增加, 其 mRNA 表达水平升高; TLR-4 能通过调控 DC 功能介入脓毒症肺损伤过程^[37]; 而 miR-140-5p 可通过 TLR-4 / MyD88 /NF- κ B 信号通路减少急性肺损伤 (ALI) 中的炎症因子分泌, 降低炎症水平^[38]; 在动脉粥样硬化疾病模靶向巨噬细胞 TLR-4 参与抑制氧化应激和细胞凋亡^[39]。在此部分我们将探究脓毒症 DC miR-140-5p 表达变化及脓毒症表型及功能的改变。

1.1 实验材料和方法

1.1.1 实验试剂

实验试剂名称	生产公司
Lymphoprep 单个核细胞梯度离心液	加拿大 STEM CELL 公司
SepMate-50 RUO 离心管	加拿大 STEM CELL 公司
RoboSep Buffer	加拿大 STEM CELL 公司
EasySep Human CD14 Pos Sel Kit	加拿大 STEM CELL 公司
EasySep 磁极	加拿大 STEM CELL 公司
重组人 IL-4 蛋白	美国 R&D SYSTEMS 公司
重组人 GM-CSF 蛋白	美国 R&D SYSTEMS 公司
FC 段封闭液 Human TruStain FcX™	美国 BIOLEGEND 公司
CD80、CD86、HLA-DR 流式抗体	美国 BIOLEGEND 公司
CD45、CD14 流式抗体	美国 BIOLEGEND 公司
凋亡检测试剂盒	美国 BD 公司
miRcute miRNA 提取试剂盒 (离心柱型)	北京天根生物技术公司
miR-140-5P 引物	北京天根生物技术公司

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

实验试剂名称	生产公司
革兰氏阴性菌脂多糖 (LPS)	美国 sigma 公司
4%多聚甲醛	上海碧云天公司
qPCR 试剂盒	日本 TAKARA 公司
逆转录试剂盒	日本 TAKARA 公司
异丙醇	美国 Corning 公司
氯仿	美国 Sigma 公司
RPMI 1640 培养基	美国 Gibico 公司
胎牛血清	美国 Gibico 公司
青霉素-链霉素双抗	美国 Gibico 公司
PBS 溶液	碧云天生物科技有限公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Sigma Aldrich 公司

1.1.2 实验器材

仪器	仪器厂家
移液器	德国 Eppendorf 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
超净工作台	上海博讯实业有限公司
恒温水浴箱	上海浦东荣丰科学仪器有限公司
台式高速离心机	德国 Heraeus 公司
二氧化碳恒温培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
4°C高速离心机	德国 Eppendorf 公司
4°C冰箱	韩国三星公司
血球计数板	上海医药工业研究院
倒置光学显微镜	日本 Nikon 公司
超纯水仪	美国 Millipore 公司
FA1104 型电子天平	上海天平仪器厂
NanoDrop2000 超微量分光光度计	美国 Thermo Fisher 公司
生物安全柜	美国 Thermo Fisher 公司
-80 超低温冰箱	日本 SANYO 公司

1.1.3 实验方法

1.1.3.1 培养外周血单个核细胞来源树突状细胞 (MoDC)

(1) 外周血单个核细胞的分离

①实验准备: 健康人体外周抗凝血 30ml; 血液及细胞分离液、自制 Sep Buffer 【配制细胞分离中用 Sep Buffer (成分为 2%FBS+1mM EDTA 的 PBS 溶液): 0.186gEDTA 粉末溶于 400ML PBS 中, 用 10N NAOH 溶液 (溶解 400gNAOH 于 0.9L 水中, 定容至 1L) 调节 PH 至 7.2-7.3 左右, 加入 10ml FBS 定容至 500 ml】、磷酸盐缓冲液(PBS)均复温至 22℃左右; 水平转子离心机温度预设到 22℃; 15ml 及 50ml 离心管若干; 1000ul、200ul 及 10ul 枪头灭菌备用; 电子移液枪及 5ml 移液管; 细胞计数板及盖玻片;

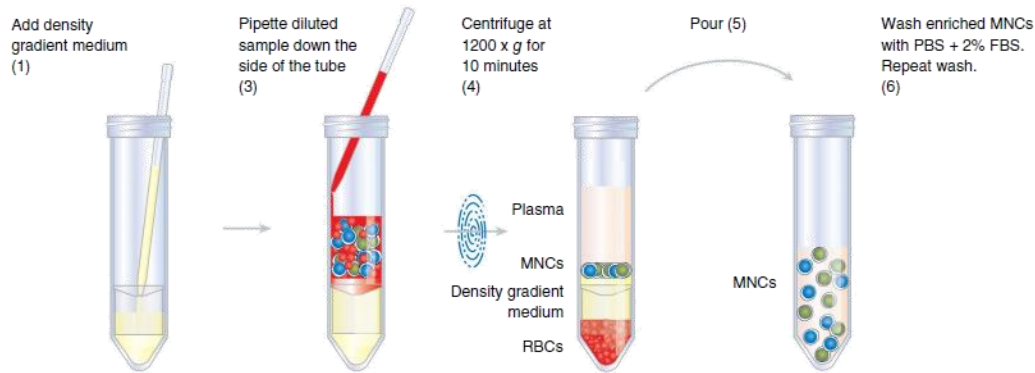


图 1-1.SEPMATE 梯度离心的演示图例

②按图 1-1 的演示方法, 取 2 支 SepMate-50 RUO 离心管, 向管中加 15ml Lymphoprep 单个核细胞梯度离心液, 水平旋子离心机 1000 转离心 1 分钟取出备用;

③外周血 30ml 加等量自制 Sep Buffer 稀释后用电子移液枪往上一备用离心管中贴壁缓慢加入各 30ml; 水平转子离心机预温 22℃后放入上一步的离心管, 设置启动速度 7、制动速度 6、1200 g 离心 12 分钟;

④离心完成后, 吸弃上层部分血浆后将离心管隔板上层细胞倒至一新备离心管, 适量自制 Sep Buffer 洗涤细胞;

⑤离心机 800g 离心 5 分钟后弃上清, 细胞沉淀中添加 3 ml 红细胞裂解液做裂红处理 5 分钟, 添 6 ml PBS 稀释后 800 g 离心 3 分钟收集细胞;

⑥RoboSep Buffer 稀释细胞后用细胞计数板计数。

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

(2) CD14 单核细胞的磁珠分选

①实验准备：备灭菌 5 ml 圆底管若干；分选试剂盒及分选磁极；1000ul、200ul 及 10ul 枪头灭菌备用；细胞计数板

②单个核细胞分选计数完毕后，调整细胞密度为 1×10^8 cells/ml 后移至 5 ml 圆底管；按 100 ul/ml 细胞样本加入分选试剂盒中的 Cocktail 轻柔吹打后室温孵育 10 分钟；

③移液枪轻柔混匀 RapidSpheres™，上一步孵育完成后按 100 ul/ml 细胞样本加入 RapidSpheres™ 轻柔吹打后室温孵育 3 分钟；

④上一步孵育完成后添加 RoboSep Buffer 至 2.5 ml 体积；轻柔吹打混匀后放置到分选磁极，室温孵育 3 分钟；带磁极倾倒出圆底管中 Buffer，从磁极中取出圆底管得到细胞；

⑤重复步骤④两次，获得阳选 CD14 单核细胞；

⑥10% FBS-RPMI 1640 培养基重悬细胞后用细胞计数板计数。

(3) 单核细胞来源树突状细胞的诱导分化及培养

①实验准备：12 孔板；人重组蛋白 IL-4、GM-CSF；1000ul、200ul 及 10ul 枪头灭菌备用；

②阳选 CD14 单核细胞计数完成后调整密度至 1×10^6 cells/ml；添加人重组蛋白 IL-4 35ng/ml、GM-CSF 50ng/ml；铺于 12 孔板，每孔 1 ml；

③培养过程的第 3 天、第 5 天半量换液,并补充 IL-4、GM-CSF，培养至第 7 天收集细胞。

1.1.3.2 DC 表面共刺激分子表达及凋亡情况的检测

(1) LPS 不同处理组对 DC 表面共刺激分子表达变化的影响

①实验准备：革兰氏阴性菌脂多糖（LPS）；流式抗体；自制 Sep Buffer；FC 段封闭液 Human TruStain FcX™；备灭菌 5 ml 圆底管若干；1000ul、200ul 及 10ul 枪头灭菌备用；1.5 ml 灭菌 EP 管若干备用；

②单核细胞来源树突状细胞分不同处理组处理后收取细胞，检测 DC 表面共刺激分子表达的情况；

③每管流式管收取约 1×10^6 个 DC 并用预冷自制 Sep Buffer 清洗两遍；

④用 100 ul 4℃自制 Sep Buffer 分散悬浮细胞，添加 5 μl Human TruStain FcX™，混合后在室温下孵育 10 分钟，然后再进行目标抗体染色。

⑤分组加入不同荧光标记的流式抗体：CD80、CD86、HLA-DR，每管加入

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

抗体 5ul 避光 4℃孵育 20 分钟；孵育完成后加入 5ml 4℃自制 Sep Buffer 清洗 2 遍；加入 300ul 预冷自制 Sep Buffer 重悬上机。

(2) LPS 不同处理组对 DC 凋亡的影响

①实验准备：BD 凋亡检测试剂盒；备灭菌 5 ml 圆底管若干；1000ul、200ul 及 10ul 枪头灭菌备用；1.5 ml 灭菌 EP 管若干备用；

②用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，室温 2000rpm 离心 5 分钟收集细胞；预冷 PBS 重悬细胞，2000rpm 离心 5 分钟；

③以 300ul 的 Binding Buffer 重悬细胞；加 5ul 的 Annexin V-FITC 混匀，避光室温孵育 15 分钟染色；上机检测前 5 分钟再加入 5ul 的 PI 染色；染色完成后添 200ul 的 Binding Buffer 吹散细胞然后上机检测。

1.1.3.3 DC miR-140-5P 表达情况的检测

(1) DC 中 Total RNA 的提取

①实验准备：天根公司 miRNA 提取试剂盒；VORTEX 仪器；氯仿；1000ul、200ul 及 10ul 枪头灭菌备用；1.5 ml 灭菌 EP 管若干备用；离心机 4℃遇冷备用。

②细胞收集后离心（400×g，5 分钟），弃上清收取细胞。加入 1 ml 裂解液 MZ，VORTEX 振荡 15 秒。室温下放置 5 分钟后加入 200 ul 氯仿，手持大力摇晃十数次后室温下放置 5 分钟。

③4℃离心（12000 转，15 分钟）后，转移分层后含有 RNA 的无色水相 500ul 到新的 EP 管中，缓慢加入 750ul 无水乙醇，轻柔吹打混匀后分两次移入吸附柱中，离心（12000 转，30 秒）后保留吸附柱。

④将 500 ul 去蛋白液 MRD 加入吸附柱中，室温静置 2 分钟，离心（12000 转，30 秒）后保留吸附柱。

⑤将 500 ul 漂洗液 RW 加入吸附柱中，室温静置 2 分钟，离心（12000 转，30 秒）后保留吸附柱；再次执行一遍漂洗操作。

⑥将吸附柱移至 2 ml 收集管中，12000 转离心 1 分钟，去除吸附柱残余液体，稍稍晾干沉淀。

⑦将吸附柱移至一个新的 RNase-Free 管中，加 30ul RNase-Free ddH₂O，室温放置 2 分钟溶解 RNA 沉淀，12000 转离心 2 分钟收集 RNA 溶液。RNA 溶液于-80℃保存。

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

(2) miRNA 的反转录及 DC 中 miR-140-5P 表达的检测

①去除基因组 DNA:按下表(表 1-1)于 200 ul TUBE 中混匀下列样本及试剂,在 PCR 仪中 37°C 孵育 30 分钟,然后加入 1ul 0.5M EDTA 溶液,80°C 加热 2 分钟使 DNA 酶 I 失活。

表 1-1. DNase I Reaction

Reagent	Volume (μl)
RNA sample (3.5–10 μg)	≤44
DNase I Buffer (10X)	5
DNase I (5 U/ul)	0.5
RNase-free ddH ₂ O	Up to 50ul
Total volume	50

②加尾和反转录:按下表(表 1-2)于 200 ul TUBE 中混匀下列样本及试剂,在 PCR 仪中,37°C 1 小时,然后加热至 85°C 5 分钟,使酶失活。加 90ul ddH₂O 稀释 cDNA 至 100 ul 体积。

表 1-2. Poly(A)/cDNA Synthesis Reaction

Reagent	Volume (μl)
mRQ Buffer (2x)	5
RNA sample (0.25–8 μg)	3.75
mRQ Enzyme	1.25
Total volume	10

③miR-140-5P 的荧光定量 PCR:按下表(表 1-3, 1-4)分别混匀两不同系列的样本及试剂(miR-140-5P 引物购自北京天根公司), Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR 仪器按反应条件为 95°C 10 秒;扩增 40 个循环:95°C 5 秒、60°C 20 秒;溶解曲线:95°C 60 秒、55°C 30 秒、95°C 30 秒完成作业,保证溶解曲线为单峰排除非特异性扩增感干扰。以 miR-140-5P 与内参 U6 的 CT 值进行比较行相对定量, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值【 $\Delta Ct = CT(\text{miR-140-5p}) - CT(\text{u6})$ 】计算 miR-140-5P 相对定量表达(RQ)值。

表 1-3. Sample qPCR Reaction

Reagent	Volume (μl)
ddH ₂ O	9
TB Green Advantage Premix (2X)	12.5
ROX Dye (50X)	0.5
miRNA-specific primer (10 μM)	0.5
mRQ 3' Primer (10 μM)	0.5
cDNA	2
Total volume	25

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

表 1-4. U6 qPCR Reaction

Reagent	Volume (μ l)
ddH ₂ O	9
TB Green Advantage Premix (2X)	12.5
ROX Dye (50X)	0.5
U6 Forward Primer (10 μ M)	0.5
U6 Reverse Primer (10 μ M)	0.5
cDNA	2
Total volume	25

(3) 核酸电泳：30 ml TAE 缓冲液溶解 0.3g 琼脂糖，微波炉加热 2 分钟以溶解完全。待胶液稍冷却后加入 3ul Gel-Red 显色剂混匀，缓慢倒入准备好的制胶槽位（10 孔梳子）内，30 分钟胶可凝固；把胶准确放入电泳槽中（样品孔位于负极），加 TAE 缓冲液作为电泳缓存液，将 miRNA 反转扩增的产物与上样缓冲液（6 \times ）按比例混匀，加入样品槽中。接通电源后，调节电压 100V 电泳，直至样本蓝色指示带接近胶边缘停止电泳。将胶取出后，于凝胶成像系统中观察凝胶中发荧光的条带并拍照记录。

1.1.4 统计学处理

以 GraphPad 8.0 软件处理数据，所有的数据均以平均值 \pm 标准差表示，采用两独立样本 t 检验比较计量资料，以 P 值 < 0.05 为差异具有统计学意义。

1.2 实验结果

1.2.1 人外周血单核细胞来源树突状细胞培养

经磁珠分选得到外周血单核细胞，流式检测鉴定 CD14⁺单核细胞纯度在 95% 以上，符合细胞实验要求，见图 1-2 (A、B、C)；树突状细胞培养过程中，第 5 天收获 iDC 流式检测鉴定其细胞纯度，光镜下观察细胞形态见图 1-3。

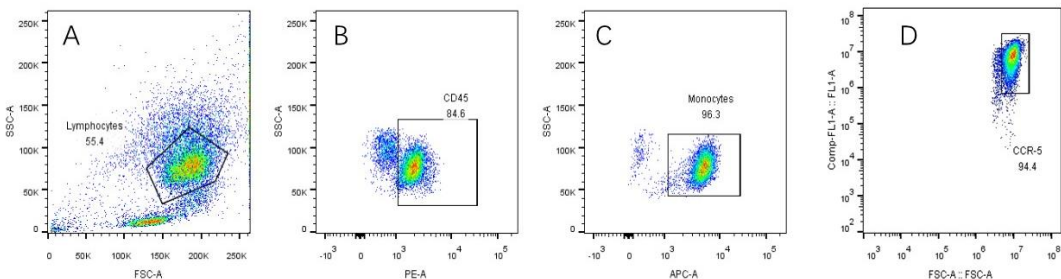


图 1-2 流式检测 CD14⁺细胞纯度图

注:A: 流式圈定单个核细胞；B: CD45⁺细胞；C: CD45⁺/CD14⁺细胞；D: CCR5⁺细胞

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

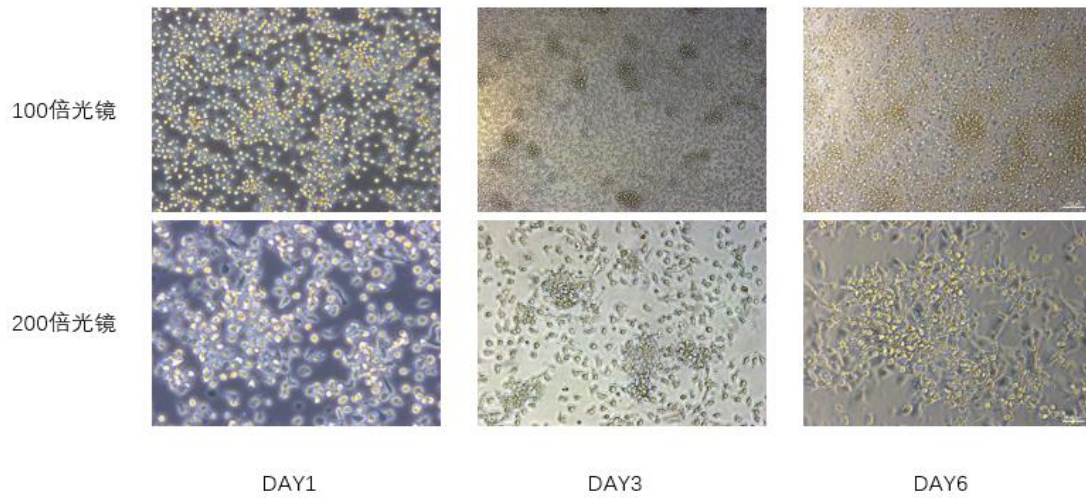


图 1-3 树突状细胞培养过程中的光镜下观察图片

1.2.2 脓毒症 DC miR-140-5P 表达明显降低

对提取的总 RNA 加尾反转后，进一步扩增 miRNA 反转得到的 DNA 片段，核酸电泳显示在 100 bp 之下可见 miR-140-5P 的目的条带，q-PCR 的进一步检测对照组及体外脓毒症模型两组间的 miR-140-5P 的表达情况发现：与对照组相比，体外脓毒症模型 miR-140-5P 表达明显降低 ($p < 0.01$)。每次 q-PCR 实验均保证溶解曲线峰的单一性以排除非特异性扩增产物的干扰。见图 1-4，图 1-5。

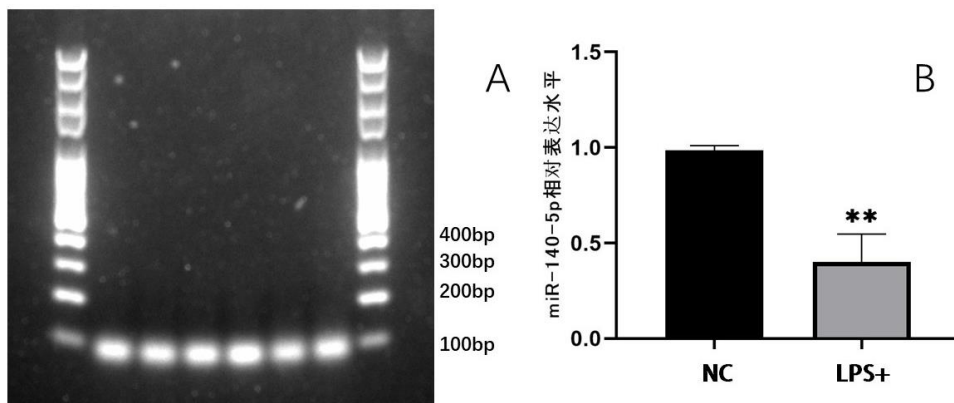


图 1-4 A: miR-140-5P 扩增产物核酸电泳图

B: 对照组(NC)及脓毒症组(LPS+)DC miR-140-5P 的表达

**表示与对照组相比，脓毒症组（LPS 刺激组）miR-140-5P 表达有显著差异 ($p < 0.01$)

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

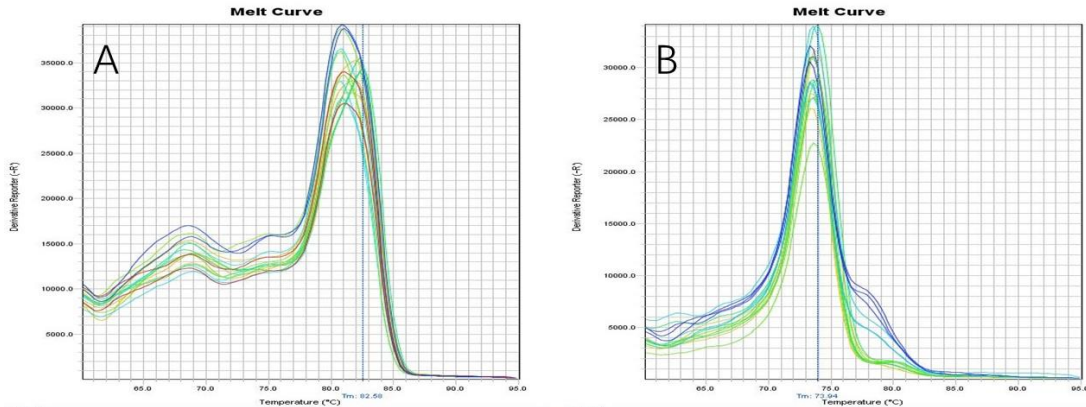


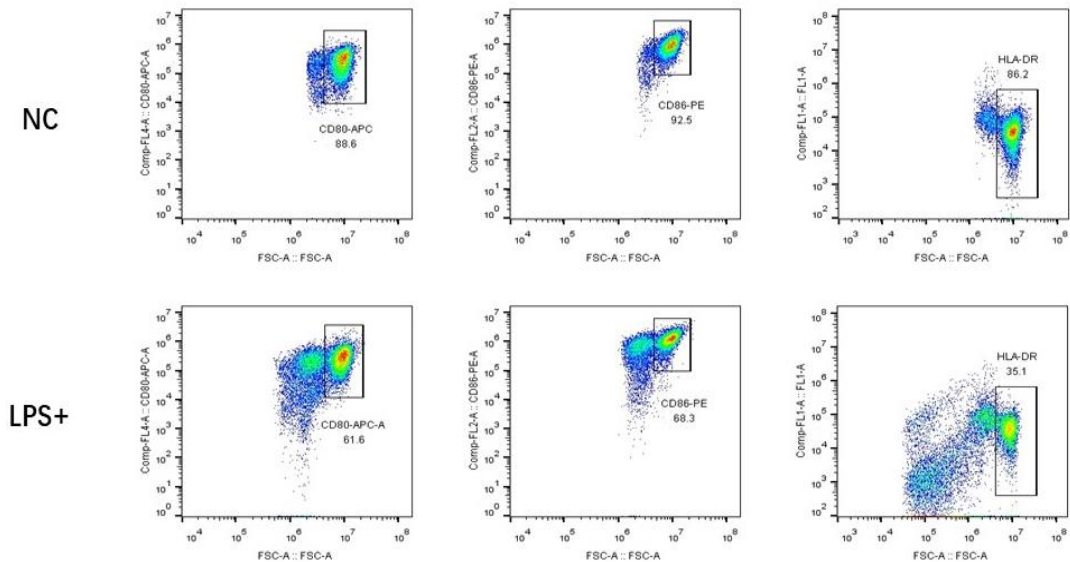
图 1-5 A: 内参 U6 溶解曲线 B: miR-140-5P 溶解曲线

1.2.3 脓毒症 DC 表面共刺激分子的表达受抑制，细胞凋亡增加

树突状细胞表面共刺激分子表达情况：体外脓毒症模型 CD80 (60.8%±0.99%)、CD86(67.7%±0.62%)、HLA-DR(37.0%±3.39%)较对照组 CD80 (90.2%±1.80%)、CD86(94.2±1.24%)、HLA-DR(89.6%±4.67%)均有显著降低 (p < 0.05)，见图 1-6。

树突状细胞凋亡情况：体外脓毒症模型凋亡细胞比例 (61.3%±3.38%) 较对照组 (32.6%±2.91%) 有显著增加 (p < 0.01)，图 1-7。

以上结果差异均有统计学意义。



一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

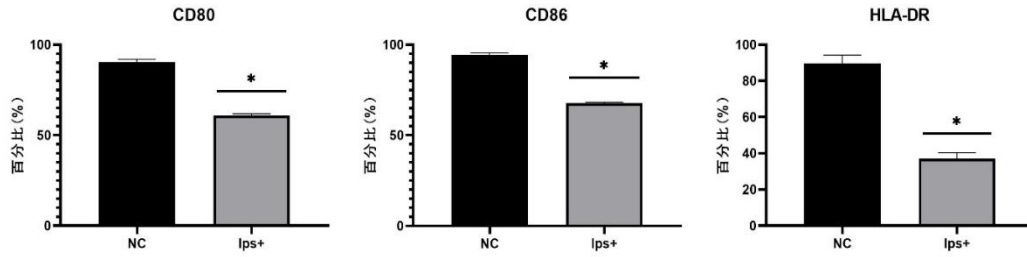


图 1-6 对照组(NC)及脓毒症组(LPS+)树突状细胞表面共刺激分子 CD80、CD86、HLA-DR 表达情况

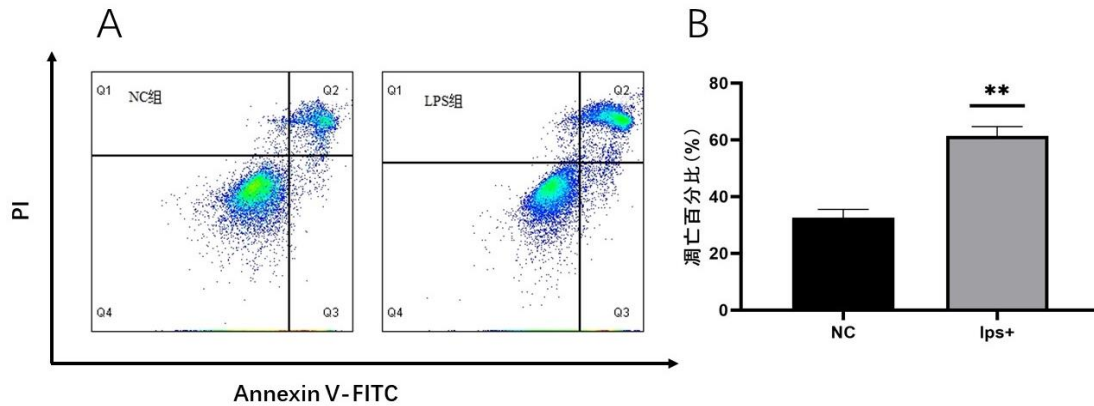


图 1-7 A:凋亡检测流式图 B: 对照组(NC)及脓毒症组(LPS+)树突状细胞凋亡率
**表示对照组与脓毒症组树突状细胞凋亡情况有显著差异($p < 0.01$)

1.3 讨论

脂多糖(LPS)作为革兰氏阴性细菌的胞壁所属成分常见的外源性致病因子之一,持续大量的 LPS 刺激是诱发脓毒症和脓毒症休克的重要因素。使用持续 LPS 刺激可在体外模拟脓毒症感染^[40,41]; 有文献报道体外培养 DC 发现短期的 LPS 刺激能诱导 DC 的成熟, 而使用 1 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 LPS 持续刺激能抑制 DC 的成熟及炎症因子的分泌, 减弱其刺激初始 T 细胞增殖的能力^[42], 亦有报道 1 $\mu\text{g/ml}$ 浓度持续 LPS 刺激与脓毒症对 DC 的效应一致, 均为抑制效果, 而更大浓度的 LPS 则会增加 DC 的凋亡^[43]。

DC 发育成熟程度影响其调节免疫状态的能力, 而 DC 功能多样性与其亚型之间存在密切关系^[44]。重症脓毒症时脾脏和淋巴结 DC 数量持续下降, 功能紊乱

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

且伴有成熟障碍致抗原提呈能力下降，MHC-II 及共刺激分子表达下调，阻碍 T 细胞激活，形成免疫抑制^[45]。DC 在受到微生物抗原或危险信号的刺激后，可以迅速成熟并通过淋巴系统转移到淋巴器官，刺激 T 细胞参与的免疫反应。DC 会增加细胞表面蛋白包括 MHC、CD40、CD80 和 CD86 的表达，介入 T 细胞启动。脓毒症患者 DC 发生了许多变化包括细胞凋亡导致细胞丢失，但单核细胞分化速度加快；DC 功能相关的表面共刺激分子发生了改变。DC 分泌异常的细胞因子，可导致免疫耐受^[46]。见图 1-8。

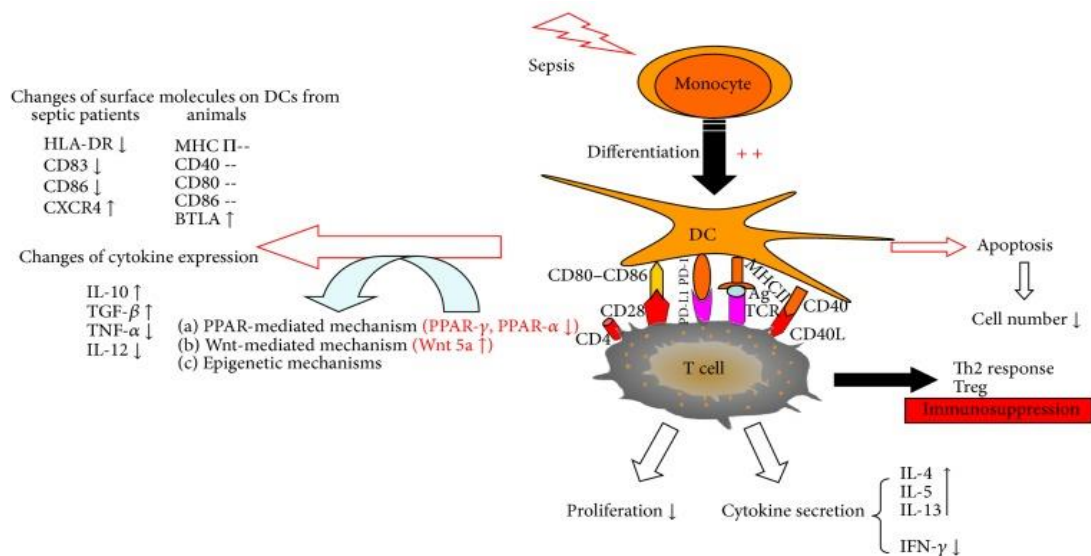


图 1-8 脓毒症期间 DC 的变化 引自 Fan Xia,Liu Zheng,Jin He et al. Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis.[J] .Biomed Res Int, 2015, 2015: 903720.

microRNAs(miRNAs)是以信使 RNA(mRNA)为靶标并降解或抑制其翻译的非编码内源性 RNA。有研究团队借助微阵列表达谱探究 miRNA 调控网络，分析证实了 miRNA 作为脓毒症生物标志物参与脓毒症诊断过程具有可行性^[47]。miRNA 亦能调控脓毒症免疫状态：脓毒症在最初的急性期伴有促炎细胞因子的过度分泌，这会导致严重的损害，如 Toll 样受体介导的信号通路在脓毒症和感染性休克的发生发展过程中意义重大；TLR-4 介导的 NF-κB 活化与多菌脓毒症的炎症反应失控息息相关，miRNAs 能调控 Toll 样受体信号通路以调节炎性细胞因子的分泌^[48]。

我们本次实验采用人单核细胞来源树突状细胞：通过密度梯度分离法及免疫磁珠分选得到人外周血单核细胞，IL-4 及 GM-SF 刺激下体外诱导培养未成熟树突状细胞(Immature dendritic cell, iDC)^[49]，使用 LPS (1ug/ml) 持续刺激在体

一、LPS 刺激对树突状细胞表面共刺激分子表达、凋亡 及胞内 miR-140-5p 表达的影响

外模拟脓毒症感染^[40,41]。我们发现相较于 LPS 短期刺激的处理, 持续的 LPS 刺激模拟的体外脓毒症模型 DC miR-140-5P 表达明显降低 ($p < 0.01$), 树突状细胞的表面共刺激分子 CD80、CD86、HLA-DR 的表达下调 ($p < 0.05$), 树突状细胞的凋亡增多 ($p < 0.01$)。

据文献报道 miR-140-5p 可通过 TLR-4/MyD88/NF- κ B 信号通路减少急性肺损伤 (ALI) 的炎症因子分泌, 进而降低炎症水平^[38]; miR-140-5p 可靶向巨噬细胞中的 TLR-4 抑制氧化应激和细胞凋亡^[39]。因此下一部分拟通过转染技术改变脓毒症 DC miR-140-5p 表达, 进一步探究 miR-140-5p 对脓毒症 DC 表面共刺激分子表达、细胞凋亡及其对 T 细胞增殖作用的影响; 并探讨 miR-140-5p 是否通过靶向 TLR4 调控 TLR-4 /NF- κ B 信号通路对 DC 的表型及功能产生影响。

1.4 结论

相较于对照组 LPS 短期刺激的处理收获的成熟 DC, 持续的 LPS 刺激即脓毒症模型树突状细胞 miR-140-5P 的表达明显降低, 其成熟受抑制, 细胞凋亡增加。

二、miR-140-5P 对 DC 表型及功能的影响及其作用机制

miRNA 能介入调控脓毒症免疫状态：脓毒症在最初的急性期伴有促炎细胞因子的过度分泌导致机体严重受损，Toll 样受体所在的信号通路于脓毒症及感染性休克的发病过程中不可或缺；miRNAs 能负向调节 Toll 样受体信号通路，进而调剂炎性细胞因子的分泌^[48]，且 miRNAs 作为转录后调控机制具有精确性、高效性以及更高的稳定性和组织相容性的优点。有文献报道 miR-140-5p 可经由 TLR-4/NF- κ B 信号通路减少急性肺损伤（ALI）的炎症因子分泌，下调炎症水平；miR-140-5p 调控巨噬细胞中的 TLR-4 抑制氧化应激和细胞凋亡。TLR-4 作为刺激 DC 的外源性病原相关分子模式（PAMPs）的主要膜识别受体，是 DC 表面大量表达的信号转导蛋白之一，有研究证实 TLR-4 在内毒素诱发的脓毒症肺损伤中意义重大，其 mRNA 表达与严重程度呈正相关，TLR-4 能借由调控 DC 功能参与脓毒症肺损伤过程。

上部分研究证实相较于 LPS 短期刺激的处理，持续的 LPS 刺激即脓毒症模型 DC miR-140-5P 表达下调；DC 成熟受抑制，DC 凋亡增加。我们在此部分将通过转染技术改变脓毒症 DC miR-140-5p 表达，进一步探究 miR-140-5p 对脓毒症 DC 表型及功能的影响；并研究 miR-140-5p 是否通过 TLR-4 /NF- κ b 信号通路对 DC 的表型及功能产生影响；以期为通过外源性 miRNA 调控 DC 功能逆转脓毒症免疫抑制的脓毒症早期治疗策略提供实验依据。

2.1 实验材料和方法

2.1.1 实验试剂

实验试剂名称	生产公司
Lymphoprep 单个核细胞梯度离心液	加拿大 STEM CELL 公司
SepMate-50 RUO 离心管	加拿大 STEM CELL 公司
RoboSep Buffer	加拿大 STEM CELL 公司
EasySep Human CD14 Pos Sel Kit	加拿大 STEM CELL 公司
EasySep 磁极	加拿大 STEM CELL 公司
重组人 IL-4 蛋白	美国 R&D SYSTEMS 公司

二、miR-140-5P 对树突状细胞功能及凋亡的影响

实验试剂名称	生产公司
重组人 GM-CSF 蛋白	美国 R&D SYSTEMS 公司
FC 段封闭液 Human TruStain FcX™	美国 BIOLEGEND 公司
CD80、CD86、HLA-DR 流式抗体	美国 BIOLEGEND 公司
CD 4 ⁺ T 细胞磁珠提取试剂盒	加拿大 STEM CELL 公司
凋亡检测试剂盒	美国 BD 公司
miRcute miRNA 提取试剂盒（离心柱型）	北京天根生物技术公司
miR-140-5P 引物	北京天根生物技术公司
革兰氏阴性菌脂多糖（LPS）	美国 sigma 公司
4%多聚甲醛	上海碧云天公司
qPCR 试剂盒	日本 TAKARA 公司
逆转录试剂盒	日本 TAKARA 公司
异丙醇	美国 Corning 公司
氯仿	美国 Sigma 公司
RPMI 1640 培养基	美国 Gibico 公司
胎牛血清	美国 Gibico 公司
青霉素-链霉素双抗	美国 Gibico 公司
PBS 溶液	碧云天生物科技有限公司
二甲基亚砷（DMSO）	美国 Sigma Aldrich 公司
TLR-4 抗体	美国 ABCAM 公司
NF-Kb、BCL-2 抗体	美国 CST 公司
β-ACTIN 抗体、兔二抗	上海碧云天公司
PCR 引物	上海华津生物科技有限公司
TRIzol	北京鼎国生物公司
PMSF	上海碧云天公司
RIPA 裂解液	美国 Biorad 公司
蛋白预染 Marker	美国 Invitrogen 公司
TBST	美国 Gibico 公司
AP	上海碧云天公司
甘氨酸	美国 Amreso 公司
Tris-base	美国 Amreso 公司

二、miR-140-5P 对树突状细胞功能及凋亡的影响

实验试剂名称	生产公司
SDS	上海碧云天公司
RFect 小核酸转染试剂	常州百代生物科技有限公司
5×蛋白上样缓冲液	上海碧云天公司
吐温 20	上海碧云天公司
脱脂奶粉	美国 Biorad 公司
CCK-8	上海吉玛生物有限公司
无水乙醇	南京化学试剂有限公司
PVDF	美国 NEB 公司
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物科技有限公司

2.1.2 实验仪器

仪器	设备厂家
超净工作台	上海实验设备有限公司
恒温水浴箱	上海浦东荣丰科学仪器有限公司
台式高速离心机	德国 Heraeus 公司
二氧化碳恒温培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
TS100/100-F 荧光倒置显微镜	德国 Leica 公司
微量可调节移液器	德国 Eppendorf 公司
荧光实时定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
超纯水仪	美国 Millipore 公司
FA1104 型电子天平	上海天平仪器厂
NanoDrop2000 超微量分光光度计	美国 Thermo Fisher 公司
生物安全柜	美国 Thermo Fisher 公司
-80 超低温冰箱	日本 SANYO 公司
酶标仪	瑞士 Tecan 公司
免疫印迹电泳转膜仪	美国 Bio-Red 公司
PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
4℃高速离心机	德国 Eppendorf 公司
4℃冰箱	韩国三星公司
血球计数板	上海医药工业研究院

仪器	设备厂家
凝胶成像系统	法国 Vilber 公司
凝胶扫描仪	法国 Vilber 公司
倒置光学显微镜	日本 Nikon 公司
稳压稳流电泳仪	上海精密科学仪器有限公司
AF100 制冰机	美国 Scotsman 公司
稳压稳流电泳仪	上海精密科学仪器有限公司
SDS-PAGE 蛋白电泳仪	美国 Pharmacia Biotech 公司

2.1.3 实验方法

2.1.3.1 体外培养外周血单核细胞来源树突状细胞 (MoDC): 同第一部分。

2.1.3.2 DC 表面共刺激分子表达及凋亡情况检测: 同第一部分。

2.1.3.3 DC miR-140-5p 的表达情况检测: 同第一部分。

2.1.3.4 CD4⁺T 细胞的分选获取及混合淋巴细胞反应 (MLR):

以 CD4⁺T 细胞磁珠提取试剂盒从第一部分 CD14⁺ 单核细胞阳选后的 CD14⁻ 细胞中提取 CD4⁺T 细胞。于 96 孔板中混合孵育不同处理组的 DC 与磁珠纯化的 CD4⁺T 细胞 (比例为 1: 50、1: 100 及 1: 200), 每组设计 3 个复孔, 每孔培养 2×10⁵ 个 CD4⁺T 细胞及相应比例的 DC。培养 72 小时后以 CCK8 试剂检测细胞数目以反映 T 细胞增殖活性, 酶标仪于 450 nm 波长下检测各组吸光度值 (OD 值)。

2.1.3.5 转染后 miR-140-5p 表达效果检测:

由吉玛公司设计合成 miR-140-5p mimics、inhibitor 和相应的阴性对照如表 2-1 所示, 100ul Opti-MEM 无血清培养基分别加目的转染物 (mimics、inhibitor 以及各自的阴性对照) 和转染试剂 (R-Fect) 混匀室温孵育 5 分钟; 按 miR(20 uM) 与 R-Fect 为 1: 2 的比例混和, 室温孵育 15 分钟。孵育完成后加入到相应分组的细胞培养板中, 经过 12 h 的培养后收集细胞, PBS 洗涤两次, 荧光显微镜下观察胞内荧光信号, 初次转染按梯度浓度摸索转染试剂 R-Fect 与 miRNA 的浓度以获得最佳转染效果。完成转染后, 通过荧光定量 PCR 技术进一步验证转染前后 miR-140-5p 在 DC 中的表达。

二、miR-140-5P 对树突状细胞功能及凋亡的影响

表 2-1 转染 miRNA 序列

miRNA 设计产物	序列
miR-140-5p mimics	正义链 5'-CAGUAGUUUUACCCUAUGGUAG-3' 反义链 5'-ACCAUAGGGUAAAACCACUGUU-3'
miR-140-5p mimics 阴性对照	正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
miR-140-5p inhibitor	5'-CUACCAUAGGGUAAAACCACUG-3'
miR-140-5p inhibitor 阴性对照	5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'

2.1.3.6 蛋白的提取及定量

①收取不同处理组的树突状细胞约 5×10^6 预冷 PBS 清洗两遍，加入 100 ul 细胞裂解液（细胞裂解液加蛋白酶抑制剂 PMSF 配备）充分吹打混匀，冰上放置 30 分钟做细胞裂解处理（期间多次吹打细胞悬液使细胞充分裂解）。

②12000 g, 4℃, 20 分钟低温高速离心，收取上清得树突状细胞蛋白溶液。

③以 50:1 比例充分混匀 BCA A 液与 B 液配制 BCA 工作液。

④将 1mg/ml BSA 溶液按 0、1、2、4、8、12、16、20ul 加到 96 孔板的标准曲线绘制孔中，加 1ul 样本到样品孔中，设置复孔去除加样误差。所有孔添加 PBS 补足到 20ul。

⑤每孔加入 200ul BCA 工作液震荡混匀，置于 37℃ 温箱反应 30 分钟。

⑥酶标仪测定 562nm 波长下各孔的吸光度，绘制标准曲线以计算待测样品的蛋白浓度。

⑦煮样：向提取的蛋白溶液中加入 ddH₂O 和 5×SDS 上样缓冲液混成相同的上样浓度，100℃ 金属浴煮 10 分钟，-20℃ 保存备用。

2.1.3.7 Total RNA 的提取

①收取不同处理组的树突状细胞约 5×10^6 ，加入 1ml Trizol。用枪吹打数次，室温下放置 5 分钟以充分裂解细胞。

②加入 200 ul 氯仿，vortex 震荡混匀，室温下放置 3 分钟。

③离心（12000g、4℃）15 分钟，分层后移取含 RNA 的上层无色水相 500 ul 至新的离心管中。

④加 500 ul 异丙醇后上下颠倒混匀，室温沉淀 10 分钟。

⑤离心（12000g、4℃）10 分钟后可在管底可见 RNA 沉淀，弃上层液体。

⑥加 1ml DEPC 水配制的 75%乙醇，vortex 震荡混匀后（4℃、7500 g）离心 5 分钟，弃上层液体。离心机快离一次，小心吸尽液体后置于超净台通风晾干。

⑦待 RNA 沉淀稍干燥成胶状后，加入 25 ul RNA-free 水溶解，以 NANO 2000 检测 RNA 溶液浓度及纯度，溶液-80℃ 冻存。

2.1.3.8 TLR-4 及 NF- κ B mRNA 表达情况的检测

①去除基因组 DNA: 按表 2-2 于冰上混匀各反应成分并分装到每个反应管中 (RNA 样品最后加入), 42°C 2 分钟完成反应。

表 2-2. 去除基因组 DNA 反应

Reagent	Volume (μ l)
5 \times gDNA Eraser Buffer	2
gDNA Eraser	1
Total RNA	1 μ g RNA
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l
Total volume	10

②反转录反应: 按表 2-3 在冰上混匀各反应成分并分装到每个反应管中。与步骤①反应液轻柔混匀后立即进行反转录反应。37°C 15 分钟, 85°C 5 秒钟完成反应。

表 2-3. 反转录反应

Reagent	Volume (μ l)
步骤 1 的反应液	10
PrimeScriptRT Enzyme Mix I	1
RT Primer Mix	1
5 \times PrimeScriptBuffer2	4
RNase Free dH ₂ O	4
Total volume	10

③q-PCR: 按表 2-4 在冰上进行 PCR 反应液配制。TLR-4 及 NF- κ B 引物购于上海华津生物科技公司, TLR-4 及 NF- κ B 引物序列如表 2-5 所示。PCR 反应条件为 95°C 30 秒; 40 个循环: 95°C 5 秒、60°C 30 秒; 溶解曲线: 95°C 15 秒、60°C 60 秒、95°C 15 秒。PCR 结果保证溶解曲线峰单一排除产生非特异性扩增产物造成的干扰。

表 2-4 Real Time PCR 反应

Reagent	Volume (μ l)
TB GreenPremix (2X)	10
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4
ROX Reference Dye (50X)	0.4
cDNA	2
RNase Free dH ₂ O	6.8
Total volume	20

表 2-5 q-PCR 引物序列

基因	序列
TLR-4	Forward Primer 5'-AACAGAGAGGATTTTCGTTCCG -3'
	Reverse Primer 5'-TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT -3'
NF-Kb	Forward Primer 5'-AGACCTGTCCCTGAACCCTAT-3'
	Reverse Primer 5'-CGATGGACTTCTAAACCAGCCA-3'

2.1.3.9 Western blot 检测 TLR-4/NF- κ B 及 Bcl-2 的表达变化

①以雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒配制 Western blot 蛋白电泳凝胶。以 1.5mm 梳子规格胶板配制凝胶为例，取 4ml 下层胶溶液和下层胶缓冲液混匀；向上一步的混合溶液中加入 80ul 的改良型促凝剂混匀；将配制好的混合溶液灌入制胶玻璃板中，加入 1ml 乙醇覆盖；待胶凝后倒去上层乙醇。取 1.0 ml 上层胶溶液和彩色上层胶缓冲液混匀；向上一步的混合溶液中加入 20 ul 的改良型促凝剂混匀；将配制好的混合溶液灌入制胶玻璃板中，插入梳齿；待胶凝固后即可用于电泳。

②蛋白上样及电泳：以 1.5mm、10 孔梳子所配制的 10%电泳凝胶为例，每个加样孔加样 20ug 待测蛋白样本，于样本孔两侧孔道加入 4ul 蛋白上样 ladder 于转膜后提示不同大小蛋白分布，连接电源 80V 电压开始跑胶，待蛋白溴酚蓝指示带跑出上层胶时调整电压到 120V 跑胶，电泳全程耗时间约 100 分钟。

③转膜及封闭：于乙醇中浸泡以活化 PVDF 膜，并将转膜夹板中海绵及滤纸板泡在电转液中润湿，夹子打开后阴极电极(黑色)为底平放，按海绵垫片、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫的顺序如三明治逐次叠放，每一层皆用玻棒擀去气泡，盖上阳极板(白色)后固定牢靠。电转装置放置于冰水浴中降温以防止电转过程中过热导致凝胶变形。100V 电压,100 分钟转膜。转膜结束后为洗去膜上的 SDS 成分漂洗 3 次,每次 10 分钟，以防止影响后续与抗体的结合，随后用 5%的脱脂奶粉溶液封闭 1h。

④一抗及二抗的孵育：PVDF 膜加 TBST 涮洗 2 分钟后按说明书加入相应浓度的 TLR-4、NF- κ b 及 BCL-2 一抗,置于冰箱孵育过夜。一抗孵育完成后以 TBST 洗涤 3 遍，每遍 10 分钟，选择相应的二抗室温孵育 1 小时，孵育完成后以 TBST 洗涤 3 遍，每遍 10 分钟。

⑤显影：配制显影液，将显影液均匀覆盖在膜上，稍待反应后，通过凝胶成像系统将条带曝光显影，拍照记录，并以 Quantity One 软件读取各条带灰度值以分析各组蛋白相对表达量。

2.1.3.10 统计学处理：

以 GraphPad 8.0 软件处理数据，所有的数据均以平均值 \pm 标准差表示，采用两独立样本 t 检验比较计量资料，以 P 值 < 0.05 为差异具有统计学意义。

2.2 实验结果

2.2.1 树突状细胞转染效果的检测

以 100uM 浓度的 miR-140-5p mimics、mimics NC 及 120uM 浓度的 miR-140-5p inhibitor、inhibitor NC 转染树突状细胞，转染组荧光显微镜下可见明显荧光信号，图 2-1；通过 q-PCR 检测验证转染效果发现：mimics 组对比 NC 组 miR-140-5p 表达相对比值为 197.0 ± 27.54 ，inhibitor 组对比 NC 组 miR-140-5p 表达相对比值为 0.21 ± 0.16 ；mimics NC 及 inhibitor NC 组对比对照组 miR-140-5p 表达无明显差异，见图 2-2。

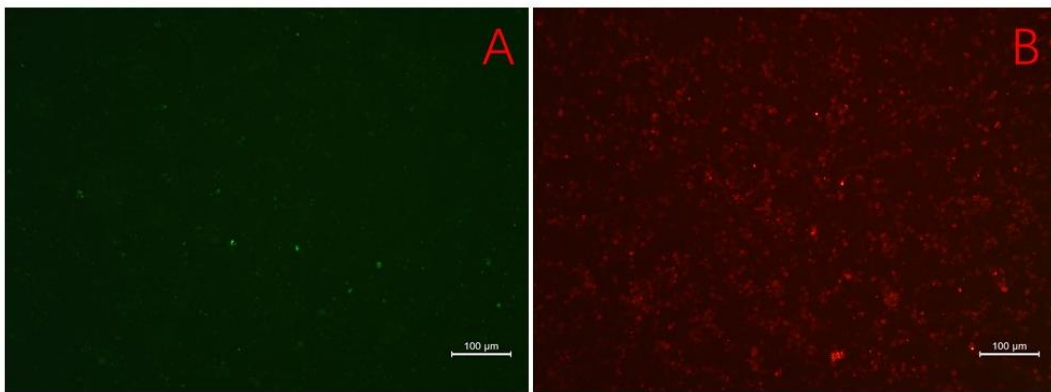


图 2-1 转染后荧光显微镜观察图片 A: mimics 转染组 B: inhibitor 转染组

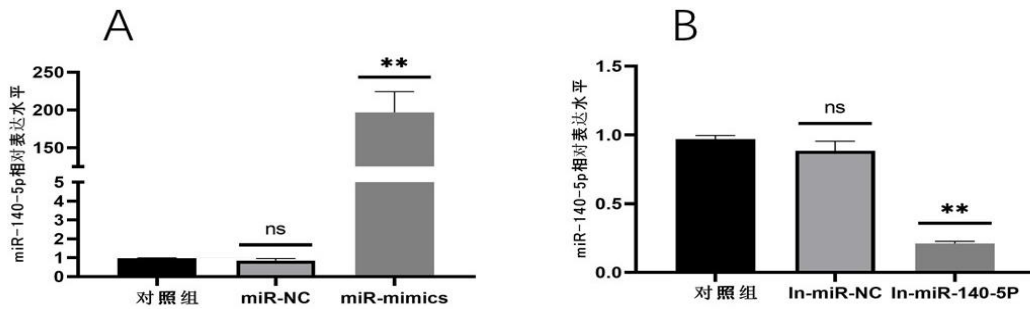


图 2-2 转染后 q-PCR 检测结果 A: mimics 转染组 B: inhibitor 转染组 **代表转染组与对照组相比 miR-140-5p 表达有显著差异 ($p < 0.01$)，ns 代表差异无统计学意义

2.2.2 过表达 miR-140-5p 能改善脓毒症 DC 成熟受抑情况以及减少细胞凋亡

树突状细胞表面共刺激分子表达情况：体外脓毒症模型 CD80 ($60.8\% \pm 0.99\%$)、CD86($67.7\% \pm 0.62\%$)、HLA-DR($37.0\% \pm 3.39\%$)较对照组 CD80 ($90.2\% \pm 1.80\%$)、CD86($94.2 \pm 1.24\%$)、HLA-DR($89.6\% \pm 4.67\%$)均有显著降低($p < 0.05$)；

二、miR-140-5P 对树突状细胞功能及凋亡的影响

mimics 转染处理组 CD80 (90.9%±0.48%)、CD86(92.9%±1.17%)、HLA-DR(90.4%±4.10%)较体外脓毒症模型均有显著提高($p < 0.05$); inhibitor 转染处理组 CD80、CD86、HLA-DR 的表达较体外脓毒症模型相比无统计学意义, 见图 2-3。树突状细胞凋亡情况: 体外脓毒症模型凋亡细胞比例 (61.3%±3.38%) 明显高于对照组 (32.6%±2.91%) ($p < 0.01$); mimics 转染处理组凋亡细胞比例 (28.3%±2.51%) 明显低于体外脓毒症模型凋亡细胞比例 ($p < 0.01$); inhibitor 转染处理组凋亡细胞比例与体外脓毒症模型相比无统计学意义, 见图 2-4。

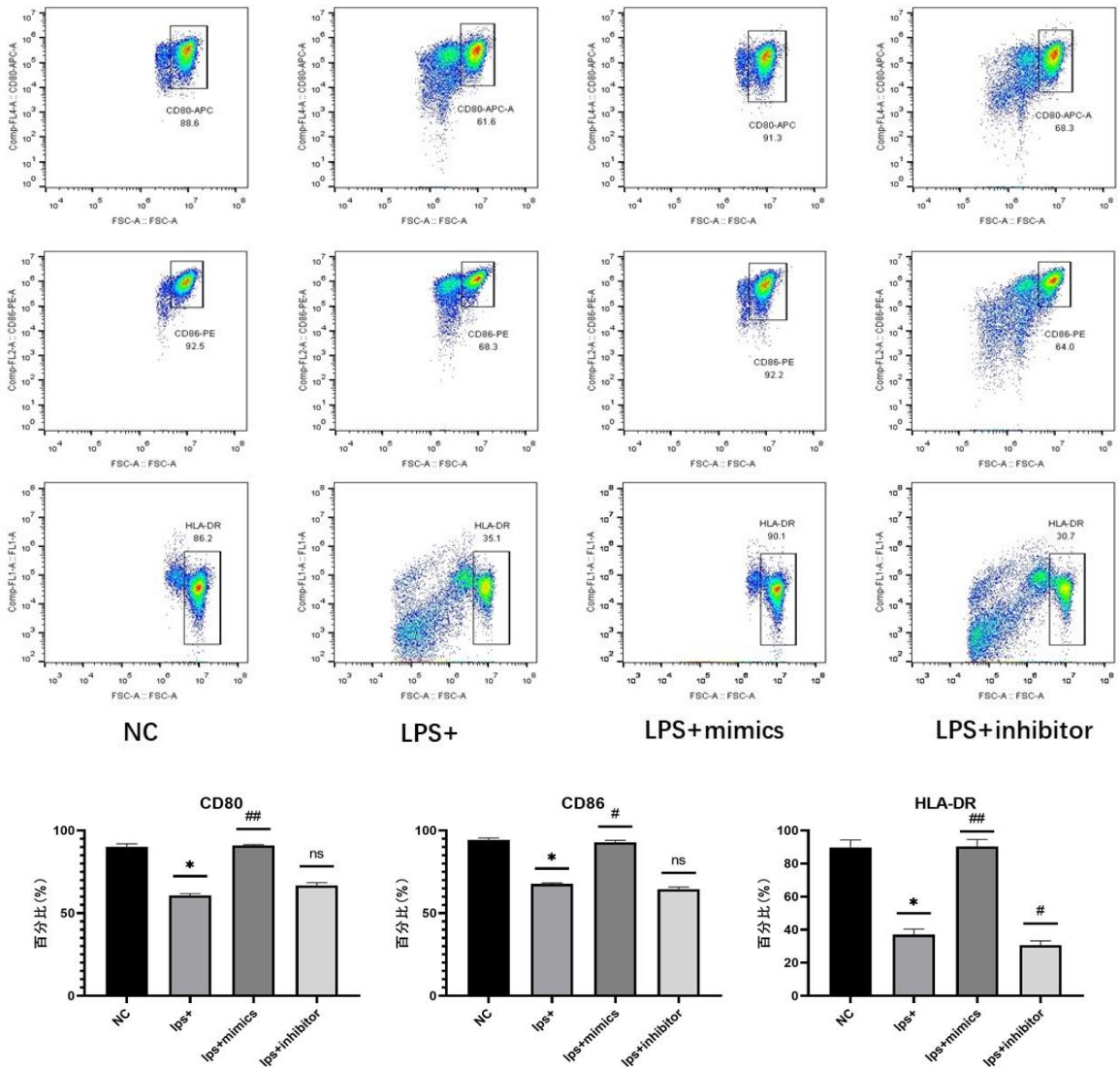


图 2-3 miR-140-5p 不同转染处理组树突状细胞表面共刺激分子表达的情况

脓毒症模型组 (LPS+) 与对照组 (NC) 相比较: *为 ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义; 转染处理组(LPS+mimics / LPS+inhibitor)与脓毒症模型组 (LPS+) 相比较: #为 ($p < 0.05$), ##为 ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义

二、miR-140-5P 对树突状细胞功能及凋亡的影响

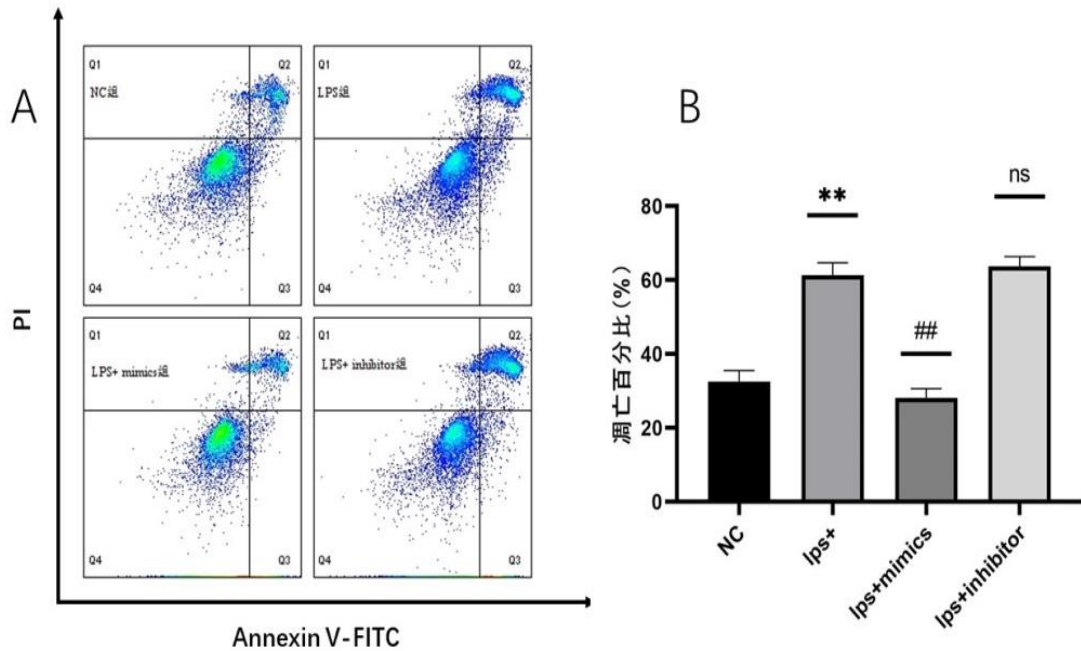


图 2-4 miR-140-5p 不同转染处理组树突状凋亡情况

注：A:凋亡检测流式图 B: 凋亡细胞比例统计图

脓毒症模型组 (LPS+) 与对照组 (NC) 相比较：*为 ($p < 0.05$)，** ($p < 0.01$)，ns 表示差异无统计学意义；转染处理组(LPS+mimics / LPS+inhibitor)与脓毒症模型组 (LPS+) 相比较：#为 ($p < 0.05$)，##为 ($p < 0.01$)，ns 表示差异无统计学意义

2.2.3 过表达 miR-140-5p 能改善脓毒症 DC 促 T 细胞增殖作用受抑情况

4 组处理组的 DC 与 $CD4^+$ T 细胞以 1:50、1:100 及 1:200 的比例共培养 72 h, 结果显示不同处理组 DC 对 T 细胞的增殖作用均在 1:100 比例下最有效。CCK8 检测发现 1: 100 比例下于 450nm 波长处测的 A (450) 值体外脓毒症模型 (0.48 ± 0.06) 较对照组 (0.66 ± 0.11) 有显著降低 ($p < 0.01$), 即刺激 T 细胞增殖的作用明显减弱; 脓毒症+ miR-140-5p mimics 转染处理组 (0.65 ± 0.06) 较体外脓毒症模型有显著提高 ($p < 0.05$), 即刺激 T 细胞增殖的作用显著增强; miR-140-5p inhibitor 转染处理组 (0.34 ± 0.02) 较体外脓毒症模型有显著降低, 即刺激 T 细胞增殖的作用明显减弱 ($p < 0.05$), 见图 2-5。

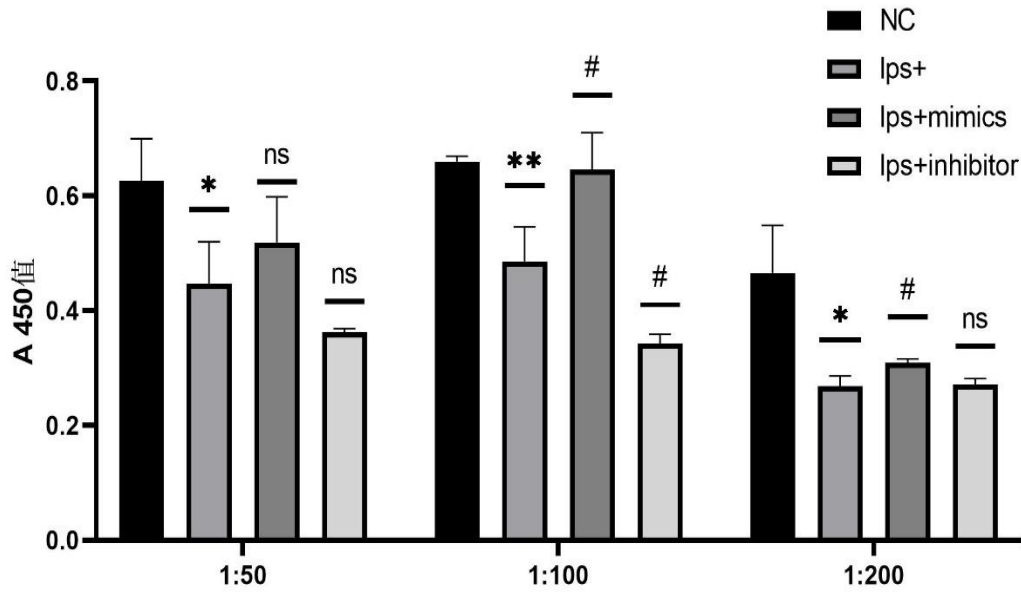


图 2-5. miR-140-5p 不同转染处理组树突状细胞对 T 细胞增殖的影响

脓毒症模型组 (LPS+) 与对照组 (NC) 相比较: *为 ($p < 0.05$), **为 ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义; 转染处理组(LPS+mimics / LPS+inhibitor)与脓毒症模型组 (LPS+) 相比较: #为 ($p < 0.05$), ##为 ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义

2.2.4 过表达 miR-140-5p 能改善脓毒症 DC TLR-4、NF- κ B mRNA 表达受抑情况

TLR-4 及 NF- κ B (p65) mRNA 在体外脓毒症模型 DC 的表达均明显高于对照组 ($p < 0.05$), 相对表达量分别为 TLR-4 mRNA (1.67 ± 0.22) 及 NF- κ B (p65) mRNA (1.60 ± 0.21); 脓毒症+ miR-140-5p mimics 转染处理组明显均低于脓毒症+ miR-140-5p mimics NC 转染处理组 ($p < 0.05$), 相对表达量分别为 TLR-4 mRNA (0.29 ± 0.05) 及 NF- κ B (p65) mRNA (0.44 ± 0.16); 脓毒症+miR-140-5p inhibitor 转染处理组均明显高于脓毒症+ miR-140-5p inhibitor NC 转染处理组 ($p < 0.05$), 相对表达量分别为 TLR-4 mRNA (2.48 ± 0.32) 及 NF- κ B (p65) mRNA (1.71 ± 0.36), 见图 2-6。

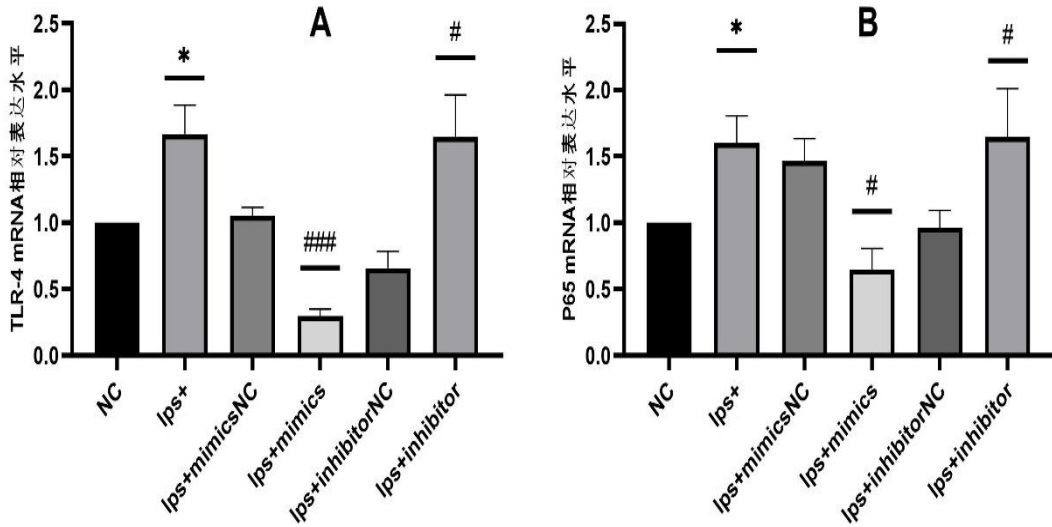


图 2-6 不同处理组树突状细胞 TLR-4(A)及 NF-Kb(B) mRNA 的表达情况

脓毒症模型组 (LPS+) 与对照组 (NC) 相比较: *为 ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义; 转染处理组(LPS+mimics / LPS+inhibitor)与转染 miRNA 对照处理组(LPS+mimics NC/ LPS+inhibitor NC)相比较: #为 ($p < 0.05$), ##为 ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义

2.2.5 miR-140-5p 可能通过靶向 TLR-4/NF-κ B 通路影响脓毒症 DC 表型及功能

体外脓毒症模型 DC 的 TLR-4 及 NF-κB (p65) 蛋白表达量均明显高于对照组 ($p < 0.01$); 在 miR-140-5p mimics 转染处理组 DC 中的表达量明显低于 miR-140-5p mimics NC 转染处理组 ($p < 0.01$), 在 miR-140-5p inhibitor 转染处理组 DC 的表达量均高于脓毒症+ miR-140-5p inhibitor NC 转染处理组 ($p < 0.01$)。体外脓毒症模型 DC bcl-2 的蛋白表达量明显低于对照组 ($p < 0.05$); 在 miR-140-5p mimics 转染处理组 DC 的表达量明显高于 miR-140-5p mimics NC 转染处理组 ($p < 0.05$), miR-140-5p inhibitor 转染处理组 DC 对比 miR-140-5p inhibitor NC 转染处理组差异无统计学意义。结果见图 2-7。

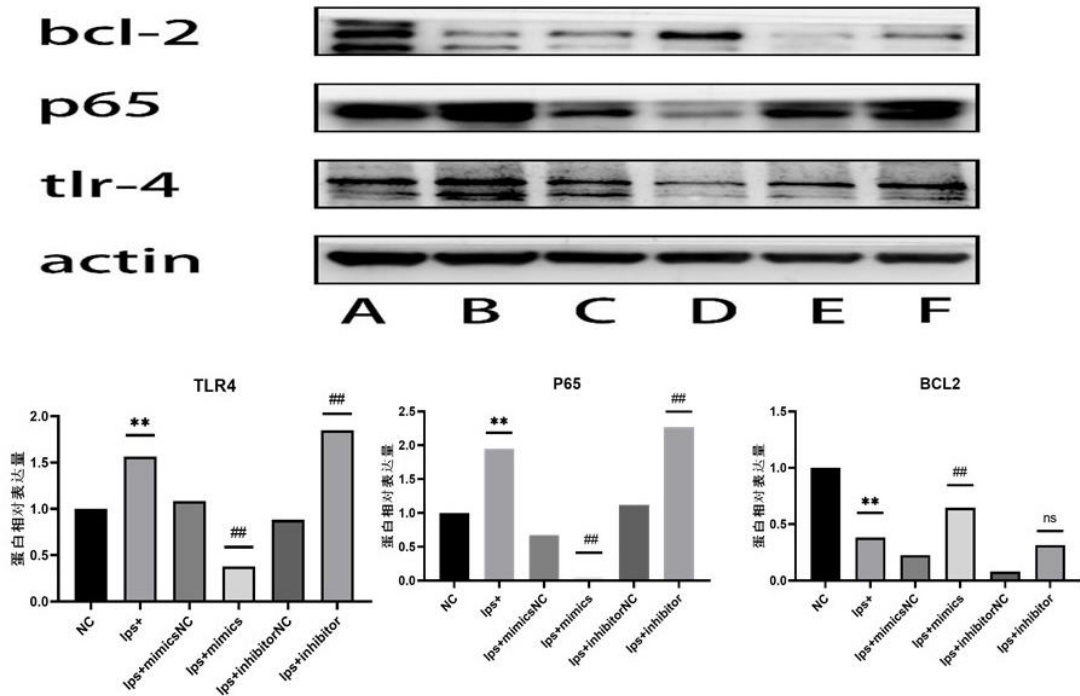


图 2-7 不同处理组树突状细胞 TLR-4 及 NF- κ B 和凋亡相关蛋白 bcl-2 的表达情况
 脓毒症模型组 (LPS+) 与对照组 (NC) 相比较: *为 ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义; 转染处理组(LPS+mimics / LPS+inhibitor)与转染 miRNA 对照处理组(LPS+mimics NC/ LPS+inhibitor NC)相比较: #为 ($p < 0.05$), ##为 ($p < 0.01$), ns 表示差异无统计学意义

2.3 讨论

小片段内源性非编码 RNA-microRNA, 可靶向性降解目的 mRNA 或抑制其翻译, 从而在转录后或翻译阶段调节蛋白的表达, 在细胞增殖、分化和凋亡过程中发挥作用, 并可调节多种炎症和免疫疾病的发生、发展^[19]。目前对 microRNA 的研究发现 microRNA 在脓毒症的诊断、治疗以及预后中都能发挥重大作用^[20-22]。不仅可以在 DC 中改变 microRNA 表达来调控其细胞功能, 还可以经旁分泌至远端行细胞间对话。microRNA 在 DC 上的表达变化能操控 DC 的增生、分化、抗原呈递过程, 改变细胞免疫应答能力及凋亡情况, 并且在不同的免疫阶段 DC 及其他免疫细胞分泌的含 microRNA 的外泌体又能对多样的改变 DC 功能^[22-24]。我们通过文献检索、筛选以及进一步的 q-PCR 验证发现使用持续 LPS 刺激在体外模拟脓毒症感染相较于 LPS 短期刺激的处理, 树突状细胞 miR-140-5P 表达明显降低 ($p < 0.01$)。基于检索得到的文献报道^[38,39], 进一步验证 miR-140-5p 是

否通过靶向 TLR-4 经由 TLR-4 /NF- κ B 信号通路对 DC 的表型及功能产生影响。

经 q-PCR 检测验证转染技术改变 DCmiR-140-5p 表达的效果：mimics 组对比 NC 组 miR-140-5p 表达相对表达量为 197.0 ± 27.54 ，inhibitor 组对比 NC 组 miR-140-5p 表达相对量为 0.21 ± 0.16 ；转染 miR-140-5P mimics 及 inhibitor 及相应对照后发现 miR-140-5P 能影响树突状细胞表面共刺激分子表达及细胞凋亡，体外脓毒症模型表面共刺激分子 CD80、CD86、HLA-DR 的表达明显低于对照组；对比体外脓毒症模型组发现 mimics 转染处理组表面共刺激分子表达回复上调，inhibitor 转染处理组差异无统计学意义。树突状细胞凋亡情况：体外脓毒症模型凋亡细胞比例明显高于对照组；对比体外脓毒症模型组发现 mimics 转染处理组细胞凋亡情况有很大改善，inhibitor 转染处理组差异无统计学意义。作为 DC 表面重要的共刺激分子，CD80 和 CD86 的表达水平对激活 T 细胞，促进增殖作用重大。4 组不同处理组的 DC 与 CD4⁺T 细胞以 1:50、1:100 及 1:200 的比例共培养 72 小时后，结果显示不同处理组 DC 对 T 细胞的增殖作用均在 1:100 比例下最明显。在此比例下 T 细胞的增殖活性脓毒症模型组明显低于对照组，对比脓毒症模型组 mimics 转染处理组 T 细胞增殖活性显著回复上调；而 inhibitor 转染处理组增殖活性却明显降低。

据文献报道 miR-140-5p 可通过 TLR-4 / MyD88 /NF- κ B 信号通路减少急性肺损伤 (ALI) 的炎症因子分泌，降低炎症水平^[38]；靶向巨噬细胞 TLR-4 抑制氧化应激和细胞凋亡^[39]。TLR-4 是 DC 表面大量表达的信号转导蛋白之一，有研究表明：TLR-4 在内毒素诱发的脓毒症肺损伤中意义重大，其 mRNA 表达与严重程度呈正相关^[36]，TLR-4 能通过调控 DC 功能介入脓毒症肺损伤过程^[37]。本部分实验数据证实：体外脓毒症模型对比对照组发现 TLR-4 及 NF- κ B (p65) 的表达明显上调；转染 mimics 处理组对比转染 mimics-NC 处理组表达明显下调，转染 inhibitor 处理组对比转染 inhibitor-NC 处理组表达明显上调。体外脓毒症模型对比对照组发现 Bcl-2 的表达明显下调，转染 mimics 处理组对比转染 mimics-NC 处理组表达明显上调。即脓毒症能上调 TLR-4 及 NF- κ B (p65) 的表达，下调 bcl-2 的表达以改善表面共刺激分子的表达及细胞凋亡情况，增强对 T 细胞增殖的促进作用。有文献报道，CLP 后 24 小时，通过膜联蛋白 V 染色，在肠系膜和腹股沟淋巴结中发现了凋亡和死亡 DC 的显著增加^[50]，Bcl-2 的过度表达可以消除脓毒症诱导的 DC 消耗，此外，Bim^{-/-}小鼠在 DC 群体中表现出明显较少的

脓毒症诱导的丢失,这些促凋亡和抗凋亡蛋白在脓毒症过程中的 DC 丧失起着核心作用^[51,52]。

DC 表型、功能及凋亡情况的改变在脓毒症免疫功能紊乱及免疫抑制过程中占据重要地位,严重免疫紊乱不仅表现为炎症应答失调所导致的多脏器损伤,更进展为无法正常激活免疫防御所导致的严重免疫抑制和免疫麻痹。脓毒症的死亡常出现在初发病期液体复苏不充分造成心肺功能衰竭的早高峰和疗程后半段持续多脏器功能损伤或多脏衰的晚高峰。脓毒症的 30 d 存活率随着早期诊断、目标靶向疗法、抗生素使用、器官功能支持等综合治疗得到极大改善,而由免疫抑制导致的脓毒症远期死亡成为第三高峰^[53,54]。因此阐明影响脓毒症中 DC 表型、功能及凋亡的机制在改善患者预后方面具有重大意义。

本部分研究发现过表达 miR-140-5p 能改善持续 LPS 刺激在体外模拟脓毒症感染所致的树突状细胞功能表面共刺激因子 (CD80、CD86、HLA-DR) 表达的受抑情况及减少细胞凋亡,增强刺激 T 细胞增殖的作用; miR-140-5p 可能通过靶向 TLR-4 经由 TLR-4 /NF- κ B 信号通路及调控凋亡相关蛋白 bcl-2 的表达对 DC 的表型及功能产生影响。此次实验为通过外源性 miRNA 调控 DC 功能逆转脓毒症免疫抑制的脓毒症早期治疗策略提供实验依据。

2.4 结论

1.过表达 miR-140-5p 能修复脓毒症树突状细胞成熟受抑制的情况;减少细胞凋亡;增强促 T 细胞增殖的作用。

2.miR-140-5p 可能通过靶向 TLR-4 调控 TLR-4 /NF- κ B 信号通路及调控抗凋亡蛋白 bcl-2 影响细胞凋亡对 DC 的表型及功能产生影响。

全文总结

脓毒症是机体对抗感染后免疫反应紊乱所致的器官功能障碍，是临床危重症病人的严重并发症之一。据流行病学分析，全球预计每年有 3150 万脓毒症病例和 1940 万严重脓毒症病例，并有 530 万人死亡病例。脓毒症作为一个重大的公共卫生问题，对社会经济亦造成很大影响及负担。树突状细胞(DC)在机体抗原提呈、免疫防御、获得性免疫应答激活、诱导自身抗原免疫耐受等过程中具有重大作用，并参与调控脓毒症的免疫紊乱过程。因此，阐明脓毒症时 DC 免疫紊乱机制，进一步有针对性的研制新的免疫调控药物或探寻新的免疫治疗方法意义重大。

通过查阅文献及预实验推测 miR-140-5p 可能通过靶向 TLR-4 影响 DC 表型及功能，调节脓毒症免疫抑制及免疫耐受的情况。本研究通过体外诱导单核细胞分化培养树突状细胞，培养全程以 1ug/ml LPS 持续刺激构建体外脓毒症模型，检测脓毒症 DC miR-140-5P 表达变化，以转染技术操控 DC miR-140-5P 表达探究 miR-140-5P 对树突状细胞表型及功能的影响及其作用机制。

研究发现脓毒症模型树突状细胞 miR-140-5P 表达量下降，其成熟受抑制，细胞凋亡增加，促 T 细胞增殖作用减弱；过表达 miR-140-5P 可修复脓毒症 DC 成熟受抑制的情况，减少细胞凋亡，增强其促 T 细胞增殖的作用。miR-140-5p 的作用机制可能是通过靶向 TLR-4 调控 TLR-4 /NF-κB 信号通路及调控抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达对 DC 的表型及功能产生影响。此次实验数据结果为通过外源性 miRNA 调控 DC 功能逆转脓毒症免疫抑制的脓毒症早期治疗策略提供实验依据。

本实验虽然发现过表达 miR-140-5P 可修复脓毒症 DC 成熟受抑制的情况，减少细胞凋亡，增强促 T 细胞增殖的作用，从而改善脓毒症所致免疫抑制及免疫耐受的情况，但未通过体内实验证实外源性 miR-140-5P 是否可调控树突状细胞功能改善脓毒症免疫抑制状态及预后情况，这将是我們之后的研究需要完善的部分。

致 谢

白驹过隙，时光荏苒，三年硕士求学生活即将结束，在步入下一段人生旅程之际，对各位老师、家人和同学朋友们三年来的照顾表示衷心感谢，这段快乐的求学时光将是我一生铭记的精彩回忆。

师恩似海，感谢我的导师、师父陈海鸣副教授及师母王联群教授，两位老师专业知识渊博、治学态度严谨、临床经验丰富，学业上给予的谆谆教诲我将感怀终生，生活中，两位老师也给予我无微不至的关心和照顾，我非常感谢两位老师在学习和科研上提供的学习和科研机会，和实验设计和科研思维方面的启迪，令我受益匪浅，今后的日子我将发奋努力，以奋斗成果来回报道师的培养之恩。

感谢南昌大学第一附属医院急诊科，刘承远老师及李佳伟、陈翔、温志超、沈健、邓陶等师兄弟对我的无私帮助，三年来收获满满。

感谢上海交通大学医学院附属新华医院的刘颖斌教授和上海市胆道疾病研究重点实验室的宋晓玲师姐、蒋程恺师兄、刘立果师兄、杨洋师兄、李洋师兄、陈晨师姐、张一鉴师姐、李永盛师兄、耿亚军师兄、李霖、李雪川、党伟、崔旭雅、王子逸、任泰等师兄弟对我的帮助，让我在一年来的相处中于科研及生活上收益颇丰，很高兴收获了你们的真挚友谊，衷心感谢你们一路相伴，期待大家都有美好前程！

人生旅途，喜得良师益友相伴。感谢我求学路上的小伙伴和好兄弟汤文建、许佳成、陈泽旭及李国强，于彷徨困惑之际给与的陪伴和鼓励，祝愿你们学业有成，工作顺利！同时也感谢室友的三年陪伴，愿大家都能前程似锦，拥抱美好生活！

感谢父母在我一路求学岁月中的包容和付出，感恩父母对我多年的培养与支持，你们永远是我前进的不竭动力和坚强后盾。

最后感谢江西省教育厅重点项目 GJJ160040、江西省科技厅自然科学基金资助项目 2017BAB205030 及江西省教育厅重点项目 GJJ160017 对本研究的资助，让本研究得以完成。

参考文献

- [1] Lamontagne Francois,Rochweg Bram,Lytvyn Lyubov et al. Corticosteroid therapy for sepsis: a clinical practice guideline.[J] .BMJ, 2018, 362: k3284.
- [2] Chou Hsien-Ling,Han Shih-Tsung,Yeh Chun-Fu et al. Systemic inflammatory response syndrome is more associated with bacteremia in elderly patients with suspected sepsis in emergency departments.[J] .Medicine (Baltimore), 2016, 95: e5634.
- [3] Chaurasia Suman,Sivanandan Sindhu,Agarwal Ramesh et al. Neonatal sepsis in South Asia: huge burden and spiralling antimicrobial resistance.[J] .BMJ, 2019, 364: k5314.
- [4] Fattahi Fatemeh,Ward Peter A,Complement and sepsis-induced heart dysfunction.[J] .Mol. Immunol., 2017, 84: 57-64.
- [5] Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock [published correction appears in Crit Care Med. 2004 Jun;32(6):1448. Dosage error in article text] [published correction appears in Crit Care Med. 2004 Oct;32(10):2169-70]. Crit Care Med. 2004;32(3):858-873.
- [6] Singer Mervyn,Deutschman Clifford S,Seymour Christopher Warren et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).[J] .JAMA, 2016, 315: 801-10.
- [7] Fleischmann Carolin,Scherag André,Adhikari Neill K J et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. [J] .Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2016, 193: 259-72.
- [8] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S.Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. N Engl J Med. 2017 Aug 3;377(5):414-417.
- [9] Tiru Bogdan,DiNino Ernest K,Orenstein Abigail et al. The Economic and Humanistic Burden of Severe Sepsis.[J] .Pharmacoeconomics, 2015, 33: 925-37.
- [10] Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annu Rev Immunol 2012; 30: 1–22.
- [11] Collin ML et al. Human dendritic cell subsets. Immunology 2013; 140: 22–30.
- [12] Banchereau J et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000; 18: 767–811.
- [13] Brunner C et al. Enhanced dendritic cell maturation by TNF- α or cytidinephosphate - guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. J Immunol 2000; 165: 6278–6286.
- [14] Ding X et al. TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms. J Immunol 2011; 187: 1184–1191.
- [15] Bouras Marwan,Asehnoune Karim,Roquilly Antoine,Contribution of Dendritic Cell Responses to Sepsis-Induced Immunosuppression and to Susceptibility to Secondary Pneumonia.[J] .Front Immunol, 2018, 9: 2590.

- [16] Fan Xia,Liu Zheng,Jin He et al. Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis.[J] .Biomed Res Int, 2015, 2015: 903720.
- [17] Li Caiyi C,Munitic Ivana,Mittelstadt Paul R et al. Suppression of Dendritic Cell-Derived IL-12 by Endogenous Glucocorticoids Is Protective in LPS-Induced Sepsis.[J] .PLoS Biol., 2015, 13: e1002269.
- [18] Cambronne Xiaolu A,Shen Rongkun,Auer Paul L et al. Capturing microRNA targets using an RNA-induced silencing complex (RISC)-trap approach.[J] .Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2012, 109: 20473-8.
- [19] Rogobete AF, Sandesc D, Bedreag OH, et al. MicroRNA Expression is Associated with Sepsis Disorders in Critically Ill Polytrauma Patients. Cells. 2018;7(12):271.
- [20] Seeley John J,Baker Rebecca G,Mohamed Ghait et al. Induction of innate immune memory via microRNA targeting of chromatin remodelling factors.[J] .Nature, 2018, 559: 114-119.
- [21] Li R, Fang L, Pu Q, et al. MEG3-4 is a miRNA decoy that regulates IL-1 β abundance to initiate and then limit inflammation to prevent sepsis during lung infection. Sci Signal. 2018;11(536)
- [22] Sun Yaping,Varambally Sooryanarayana,Maher Christopher A et al. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality.[J] .Blood, 2011, 117: 6172-83.
- [23] Zhu Jing,Wang Fu-Li,Wang Hai-Bin et al. TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein.[J] .Sci Rep, 2017, 7: 12239.
- [24] Dix Andreas,Czakai Kristin,Leonhardt Ines et al. Specific and Novel microRNAs Are Regulated as Response to Fungal Infection in Human Dendritic Cells.[J] .Front Microbiol, 2017, 8: 270.
- [25] Tang Alan T,Choi Jaesung P,Kotzin Jonathan J et al. Endothelial TLR-4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations.[J] .Nature, 2017, 545: 305-310.
- [26] Schappe Michael S,Szteyn Kalina,Stremska Marta E et al. Chanzyme TRPM7 Mediates the Ca Influx Essential for Lipopolysaccharide-Induced Toll-Like Receptor 4 Endocytosis and Macrophage Activation.[J] .Immunity, 2018, 48: 59-74.e5.
- [27] Cheng Kwong Tai,Xiong Shiqin,Ye Zhiming et al. Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury.[J] .J. Clin. Invest., 2017, 127: 4124-4135.
- [28] Feng G, Sun B, Li TZ.Daidzein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway. Int Immunopharmacol. 2015;26(2):392-400.
- [29] Gill Sean E,Rohan Marta,Mehta Sanjay,Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo.[J] .Respir. Res., 2015, 16: 109.
- [30] Ryu Je-Kyung,Kim Soo Jin,Rah Sang-Hyun et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR-4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer.[J] .Immunity, 2017, 46: 38-50.
- [31] Tauseef Mohammad,Knezevic Nebojsa,Chava Koteswara R et al. TLR-4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and

- inflammation.[J] .J. Exp. Med., 2012, 209: 1953-68.
- [32] Gao Wei,Wang Lu,Wang Kun et al. Enhanced Anti-inflammatory Activity of Peptide-Gold Nanoparticle Hybrids upon Cigarette Smoke Extract Modification through TLR Inhibition and Autophagy Induction.[J] .ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11: 32706-32719.
- [33] Schuetz Philipp,Mueller Beat,The role of immune and metabolic biomarkers for improved management of sepsis patients.[J] .Expert Rev Clin Immunol, 2014, 10: 1255-62.
- [34] King Robert S,Tuthill Cynthia,Evaluation of thymosin α 1 in nonclinical models of the immune-suppressing indications melanoma and sepsis.[J] .Expert Opin Biol Ther, 2015, null: S41-9.
- [35] Hutchins Noelle A,Unsinger Jacqueline,Hotchkiss Richard S et al. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression.[J] .Trends Mol Med, 2014, 20: 224-33.
- [36] Li Qi,Wu Chenyi,Liu Zhenlong et al. γ Increased TLR-4 Expression Aggravates Sepsis by Promoting IFN- Expression in CD38 Mice.[J] .J Immunol Res, 2019, 2019: 3737890.
- [37] Deng Meihong,Ma Tao,Yan Zhengzheng et al. Toll-like Receptor 4 Signaling on Dendritic Cells Suppresses Polymorphonuclear Leukocyte CXCR2 Expression and Trafficking via Interleukin 10 During Intra-abdominal Sepsis.[J] .J. Infect. Dis., 2016, 213: 1280-8.
- [38] Yang Y, Liu D, Xi Y, Li J, Liu B, Li J. Upregulation of miRNA-140-5p inhibits inflammatory cytokines in acute lung injury through the MyD88/NF- κ B signaling pathway by targeting TLR-4. *Exp Ther Med*. 2018 Nov;16(5):3913-3920. doi:10.3892/etm.2018.6692.
- [39] Liu H, Mao Z, Zhu J, Shen M, Chen F. MiR-140-5p inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and cell apoptosis via targeting toll-likereceptor 4. *Gene Ther*. 2020 Mar 12.
- [40] Song Yuxian,Dou Huan,Gong Wei et al. Bis-N-norgliovictin, a small-molecule compound from marine fungus, inhibits LPS-induced inflammation in macrophages and improves survival in sepsis.[J] .Eur. J. Pharmacol., 2013, 705: 49-60.
- [41] 申健,何阳胜,张巍巍,张瑞环,刘芃,缪绯,刘映峰.细菌脂多糖对人树突状细胞分化成熟及表达 PD-L1 的影响及意义[J].实用医学杂志,2012,28(08):1239-1241.
- [42] 季海峰, 孙卫民, 陈杰,等. LPS 持续刺激对小鼠骨髓树突状细胞成熟的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 024(001):6-9.
- [43] Lutz M B,Kukutsch N A,Menges M et al. Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro.[J] .Eur. J. Immunol., 2000, 30: 1048-52.
- [44] Sun Jung Kim,Betty Diamond. Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity[J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*,2015,41.
- [45] 李秀花,姚咏明.脓毒症中树突状细胞调节机制与免疫效应研究进展[J].中华急诊医学杂志,2015,24(07):804-806.
- [46] Fan Xia,Liu Zheng,Jin He et al. Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis.[J] .Biomed Res Int, 2015, 2015: 903720.

- [47] Huang J, Sun Z, Yan W, et al. Identification of microRNA as sepsis biomarker based on miRNAs regulatory network analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:594350.
- [48] O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(3):163-175.
- [49] 朱娜,王海桃,李昌,李海僖,郭焱,金宁一.未成熟树突状细胞快速分离与体外诱导培养及其鉴定研究[J].*中国免疫学杂志*,2017,33(07):1043-1047.
- [50] Efron Philip A,Martins Antonio,Minnich Douglas et al. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis.[J] .*J. Immunol.*, 2004, 173: 3035-43.
- [51] Peck-Palmer Octavia M,Unsinger Jacqueline,Chang Katherine C et al. Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages.[J] .*Shock*, 2009, 31: 359-66.
- [52] Kushwah Rahul,Wu Jing,Oliver Jordan R et al. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg.[J] .*Eur. J. Immunol.*, 2010, 40: 1022-35.
- [53] Delano Matthew J,Ward Peter A,The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome.[J] .*Immunol. Rev.*, 2016, 274: 330-353.
- [54] Gaieski David F,Edwards J Matthew,Kallan Michael J et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States.[J] .*Crit. Care Med.*, 2013, 41: 1167-74.

攻读学位期间的研究成果

待发表文章

- [1] 《microRNA-140-5p 对树突状细胞表型及功能的影响》在投
- [2] 《NETO2 promotes esophageal cancer progression by inducing proliferation and metastasis via PI3K/AKT and ERK pathway》在投

综 述

microRNA 以树突状细胞为靶点在脓毒症免疫治疗中的作用

廖乐泰 综述 陈海鸣 审校

脓毒症是机体对感染发生后的免疫应答反应失调，最终可进展为器官功能障碍危及生命，是临床上急危重症患者的严重并发症之一。尽管目前诊疗技术及监护措施有很大改善，但脓毒症发病率及病死率仍数目庞大，是全球死亡原因的主要组成部分。流行病学统计学估计每年有 3150 万脓毒症病例、1940 万严重脓毒症病例及 530 万人死亡病例^[1]。脓毒症是一个重要的公共卫生问题，免疫抑制导致的远期死亡成为脓毒症的第三死亡高峰^[2]。树突状细胞（DC）可连通机体固有免疫和适应性免疫，其表型、功能及凋亡改变是脓毒症免疫功能紊乱及免疫抑制过程中占据重要地位。microRNAs（miRNAs）为短链的内源性非编码 RNA，在结合目的 mRNA 后能降解或抑制其翻译过程，转录后或翻译水平对蛋白的表达起调控作用，从而介导细胞的增殖、分化和凋亡过程，调控多种炎症和免疫疾病的发病过程^[3]。microRNA 于脓毒症的诊断、治疗以及预后过程中均有潜在价值，现就 microRNA 以树突状细胞为靶点在脓毒症免疫治疗中的作用进行综述。

1. 树突状细胞在脓毒症中的作用

树突状细胞（DC）在免疫系统中起着至关重要的作用，可检测病原体并呈递其抗原以引发适应性免疫反应，受病原体刺激后 DC 被激活并向成熟态发展，随之发生表型和功能上的变化，并受促向淋巴结迁移，分泌细胞因子，诱导 T 细胞的活化^[4]。脓毒症早期，活化的 DC 以抗原提呈能力下降和免疫原性细胞因子的产生减少为特征，免疫抑制产生的主要原因是成熟态 DC 的耗尽；而在后一阶段，由于新形成的未成熟 DC 被炎症遗留的免疫恐慌局部编程，导致出现免疫耐受，DC 产生抑制性细胞因子（如 TGF- β ）并参与维持局部的耐受环境，其显著特征是 Treg 细胞的聚集^[5]。脓毒症通过诱导脾脏和淋巴结中的 DC 凋亡，阻断其成熟过程，导致细胞功能紊乱，从而导致脾脏、淋巴结以及循环中成熟 DC 的数量缺失；循环和靶器官中树突状细胞的缺失导致 IL-10 和 TGF- β 水平升高，导

致免疫抑制树突状细胞上调, NK 细胞、CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的活化受损, 从而导致免疫抑制的形成^[6]。因此, 通过靶向 DC 的免疫治疗或基于免疫调节的方法治疗脓毒症有着光明的前景。

2. microRNA 在脓毒症中的作用

microRNAs(miRNAs)是以信使 RNA(mRNA)为靶标并降解或抑制其翻译的非编码内源性 RNA。有研究团队借助微阵列表达谱探究 miRNA 调控网络, 分析证实了 miRNA 作为脓毒症生物标志物参与脓毒症诊断具有可行性^[7]。miRNAs 可以更好地诊断脓毒症, 并有助于鉴别脓毒症的不同阶段, 使治疗措施的确立更快捷有效。有许多研究评估 miRNA 作为脓毒症生物标志物的价值: 在脓毒症患者的外周血单个核细胞(PBMC)中发现了几种 miR-143、miR-145、miR-146a、miR-150、miR-155、miR-182 和 miR-584 等 miRNAs 的失调^[8]; 脓毒症患者的血清 miR-143 水平也被发现明显高于全身炎症反应综合征(SIRS)和健康对照组^[9]。由于 miRNAs 分泌在细胞外, 很容易在体液中检测到, 如血液和尿液, 血清中循环中的 miRNAs 在不同条件下表现出不同的表达模式, 也让其成为便利有效的检测方式。miRNA 亦能参与脓毒症免疫状态的调控: 脓毒症在最初的急性期伴有促炎细胞因子的过度分泌, 这会导致严重的损害, 如 Toll 样受体介导的信号通路在脓毒症和感染性休克的发生发展中意义重大; TLR-4 诱导的 NF- κ B 活化与多菌脓毒症的炎症反应息息相关。在脓毒症过程中, miRNAs 负向调节 Toll 样受体信号通路, 调节炎性细胞因子的分泌^[10]。同样, 在脓毒症中, microRNAs 被证明可以调节血管屏障和内皮功能。脓毒症时, 过多炎性细胞因子的分泌增加血管通透性致组织水肿, 进而发展为多器官功能障碍^[11]。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和可溶性 E-选择素等黏附分子在脓毒症中的水平升高, 可促进炎症细胞浸润和器官损伤, 内皮细胞表达的 miR-126 与 VCAM-1 的表达相反, 内源性 miR-126 水平的降低增加了白细胞与内皮细胞的粘附致多器官损失^[12]。脓毒症时血管内皮细胞 miR-23b 表达上调, 导致 ICAM-1、E-选择素和 VCAM-1 等炎症因子表达减少, 因此 miR-23b 通过调节血管内皮细胞炎症因子在脓毒症的发生发展中发挥重要作用^[13]。随着脓毒症的发展, 血管内皮生长因子(VEGF)水平升高增加血管通透性, 参与脓毒症的发病。已发现 miR-34a 靶向抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 SIRT-1, 其在脓毒症中的高表达可能促进血管内皮细胞凋

亡,导致内皮功能障碍^[14]。它们还介导脓毒症后期的细胞凋亡、免疫抑制和器官功能障碍的调节^[15]。microRNAs 用来区分脓毒症的不同阶段,将加强及时和适当的治疗^[16]。此外,循环中 miRNAs 的特异性表达模式可以帮助识别脓毒症的更具体的特征,如感染的病原体和细菌的类型^[17]。这可以帮助及时准确地诊断脓毒症,并进行更具体的治疗,而不需要等待血培养结果。

3. microRNA 以树突状细胞为靶点脓毒症的免疫治疗

树突状细胞对于维持免疫稳态和防止自身免疫对自身抗原的反应至关重要。miRNA 的主要功能是调节 mRNA 靶标的基因表达,这种机制在细胞生理学和细胞发育,分化,代谢过程中都发挥着关键作用^[18],且 miRNA 是先天免疫和适应性免疫的重要转录后调节因子,参与了影响许多炎症途径的调控^[19]。在 157 个筛选的 miRNA 中,其中 27 个在单核细胞,稳态 DC 和受激 DC 之间差异表达,对来自不同供体的相同细胞类型中已鉴定的 miRNA 的分析表明,其中一些是差异表达的,这证实了 DC 的发育和成熟也受到 miRNA 的严格调控^[20]。miRNAs 也大量介入免疫细胞的代谢控制,而树突状细胞的成熟或激活与细胞内代谢重新编程密切相关^[21]。

miR-148a 靶向 MAFB 介导单核细胞分化过程,获得更多的 MoDC^[22]。miR-181d 本身的过表达足以促进 DC 的成熟,并在没有 LPS 的情况下上调 CD 80 和 CD 83 的表达;此外 miR-181d 通过激活 NF- κ B 通路抑制 DC 的成熟,并促进了促炎性细胞因子 IL-12 和 TNF- α 的分泌^[23]。miR-155 参与单核细胞和骨髓源性树突状细胞 (BMDC) 的成熟,在 GM-CSF 生长因子介导的树突状细胞分化中表达 MHC-II 过程是重要调控因子^[24];miR-155 在控制人类 DC 中对微生物的炎症反应强度中起着至关重要的作用,它调节 IL-1 β 的产生,可刺激 LPS 介导的 DC 活化并通过 TAB2 调节 TLR / IL-1 信号通路^[25];miR-155 影响树突状细胞脂质代谢抑制 miR-155 显著诱导脂质摄取,而其过表达则降低脂质摄取^[26]。miR-22 靶向因子 p38 在 DC 成熟中产生负面影响,并降低 IL-6 在 DC 中的表达^[27]。miR-181a 和 miR-150 通过 JAK1-STAT1 / c-Fos 信号传导减弱 DC 免疫炎症反应,并在缺氧条件下保护心肌细胞免于细胞死亡^[28];miR-181a-5p 可能在调节 DC 对 HMGB1 的反应中发挥作用,并作为证据表明靶向 miRNA 的新疗法可用于治疗脓毒症情况下的免疫功能障碍^[29]。

间充质基质细胞 (MSC) 目前已在临床试验中用于治疗与免疫失调相关的多种疾病, MSC 在很大程度上是通过旁分泌信号传导来调节免疫反应。MSC 分泌的细胞外囊泡 (MSC-EVs) 被认为是负责 MSC 生物学和治疗功能的关键旁分泌因子。MSC-EVs 对树突状细胞 (DC) 成熟和功能的免疫调节作用, 下调树突状细胞的成熟和功能: MSC-EV 治疗会损害未成熟 DC 吸收抗原并终止 DC 成熟, 从而导致成熟和活化标记 CD83, CD38 和 CD80 的表达降低, 促炎性细胞因子 IL-6 和 IL-12p70 的分泌减少以及抗- β 细胞的产生增加炎症细胞因子 TGF- β ^[30]。骨髓间充质干细胞通过 miR-23b 过表达影响 NF- κ B 途径的激活, 导致 DC 的成熟和分化受到抑制^[31]。

细胞代谢塑造了免疫细胞的表型和功能, 在免疫细胞从静止状态到激活状态的转变过程中, 代谢状态发生了显著的变化, 细胞代谢异常会导致免疫细胞功能障碍^[32]。根据免疫细胞的命运和功能, 在细胞分化或激活过程中代谢途径和代谢物水平的变化也称为代谢重编程^[33]。DC 经历代谢重编程, 从主要的氧化磷酸化 (OXPHOS) 到糖酵解, 以产生免疫原性应答; miR-142 缺乏会增加 DC 中的氧化磷酸化, miR-142 是代谢重编程的关键, 而代谢重编程有利于 DC 的糖酵解和免疫原性反应^[34]。

4.小结与展望

脓毒症是由全身宿主对感染的反应改变引起的生理, 病理和生化异常综合症, 已成为危重症患者的主要死亡原因^[35]。北京城区脓毒症人群流行病学研究表明, 脓毒症, 严重脓毒症和脓毒症休克的标准发生率分别为每 10 万人口 461、68 和 52 例^[36]。DC 可连通先天免疫和适应性免疫, 作为功能强大的抗原提呈细胞, 在机体免疫反应中占据独特地位, 在脓毒症免疫病理生理进程的调控中具有重大意义。因此了解脓毒症免疫紊乱及免疫抑制中重要调节者——DC 的数量、功能、凋亡变化及其可能干预措施, 深化对 DC 免疫功能障碍本质的认识, 能够为脓毒症以及多器官损害等致伤性并发症的免疫治疗开辟新途径。miRNAs 分泌在细胞外, 极易在体液中检测到, 如血液和尿液, 血清中循环中的 miRNAs 在不同条件下表现出不同的表达模式, 也使其成为便利有效的检测方式; 而且通过改变针对关键代谢酶基因或营养物质的必要转运蛋白的 miRNAs 水平, 可以相应地改变免疫细胞的细胞内代谢, 从而可能操纵免疫细胞的代谢

重编程，改变其免疫功能。目前仍无标准化的数据能支撑证明特定 miRNAs 作为脓毒症的生物标志物并达成共识，距离 miRNAs 在临床诊断和治疗上施以应用仍有许多问题需要解决，希望未来的深化研究能让 miRNAs 应用早日标准化。

参考文献

- [1] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):414-417.
- [2] Delano Matthew J, Ward Peter A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. [J]. *Immunol. Rev.*, 2016, 274: 330-353.
- [3] Rogobete AF, Sandesc D, Bedreag OH, et al. MicroRNA Expression is Associated with Sepsis Disorders in Critically Ill Polytrauma Patients. *Cells*. 2018;7(12):271.
- [4] Wu DD, Li T, Ji XY. Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications. *J Immunol Res*. 2017;2017:3591248.
- [5] Bouras M, Asehnoune K, Roquilly A. Contribution of Dendritic Cell Responses to Sepsis-Induced Immunosuppression and to Susceptibility to Secondary Pneumonia. *Front Immunol*. 2018;9:2590.
- [6] Kumar V. Dendritic cells in sepsis: Potential immunoregulatory cells with therapeutic potential. *Mol Immunol*. 2018;101:615-626.
- [7] Huang J, Sun Z, Yan W, et al. Identification of microRNA as sepsis biomarker based on miRNAs regulatory network analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:594350.
- [8] Zhou J, Chaudhry H, Zhong Y, et al. Dysregulation in microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients is associated with immunopathology. *Cytokine*. 2015;71(1):89-100.
- [9] Han Y, Dai QC, Shen HL, Zhang XW. Diagnostic value of elevated serum miRNA-143 levels in sepsis. *J Int Med Res*. 2016;44(4):875-881.
- [10] O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(3):163-175.
- [11] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-3777.
- [12] Fu X, Niu T, Li X. MicroRNA-126-3p Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Blood-Brain Barrier Disruption by Regulating VCAM-1 Expression. *Front Neurosci*. 2019;13:866. Published 2019 Aug 16.
- [13] Wu M, Gu JT, Yi B, Tang ZZ, Tao GC. microRNA-23b regulates the expression of inflammatory factors in vascular endothelial cells during sepsis. *Exp Ther Med*. 2015;9(4):1125-1132.
- [14] Yang F, Li QJ, Gong ZB, et al. MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human

- hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment. *Technol Cancer Res Treat.* 2014;13(1):77-86.
- [15] Kingsley SMK, Bhat BV. Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm Res.* 2017;66(7):553-569.
- [16] Wu SC, Yang JC, Rau CS, et al. Profiling circulating microRNA expression in experimental sepsis using cecal ligation and puncture. *PLoS One.* 2013;8(10):e77936.
- [17] Wang JF, Yu ML, Yu G, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(1):184-188.
- [18] Scalavino V, Liso M, Serino G. Role of microRNAs in the Regulation of Dendritic Cell Generation and Function. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1319.
- [19] Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(1):15-26.
- [20] Jansen BJ, Sama IE, Eleveld-Trancikova D, et al. MicroRNA genes preferentially expressed in dendritic cells contain sites for conserved transcription factor binding motifs in their promoters. *BMC Genomics.* 2011;12:330.
- [21] Yao Q, Song Z, Wang B, Zhang JA. Emerging roles of microRNAs in the metabolic control of immune cells. *Cancer Lett.* 2018;433:10-17.
- [22] Meng Y, Li J, Ye Z, et al. MicroRNA-148a facilitates inflammatory dendritic cell differentiation and autoimmunity by targeting MAFB. *JCI Insight.* 2020;5(8):e133721.
- [23] Su XW, Lu G, Leung CK, et al. miR-181d regulates human dendritic cell maturation through NF- κ B pathway. *Cell Prolif.* 2017;50(5):e12358.
- [24] So EY, Winchester T, Ouchi T. The screening of a microRNA expression during development of human macrophages and mouse dendritic cells. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(3):152-157.
- [25] Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(8):2735-2740.
- [26] Chen T, Yan H, Li Z, et al. MicroRNA-155 regulates lipid uptake, adhesion/chemokine marker secretion and SCG2 expression in oxLDL-stimulated dendritic cells/macrophages. *Int J Cardiol.* 2011;147(3):446-447.
- [27] Liang X, Liu Y, Mei S, et al. MicroRNA-22 impairs anti-tumor ability of dendritic cells by targeting p38. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121510. Published 2015 Mar 31.
- [28] Zhu J, Yao K, Guo J, et al. miR-181a and miR-150 regulate dendritic cell immune inflammatory responses and cardiomyocyte apoptosis via targeting JAK1-STAT1/c-Fos pathway. *J Cell Mol Med.* 2017;21(11):2884-2895.
- [29] Zhu J, Wang FL, Wang HB, et al. TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein. *Sci Rep.* 2017;7(1):12239.
- [30] Reis M, Mavin E, Nicholson L, Green K, Dickinson AM, Wang XN. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Dendritic Cell Maturation and Function. *Front Immunol.* 2018;9:2538. Published 2018 Nov 9.

- [31] Wu J, Ji C, Cao F, Lui H, Xia B, Wang L. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit dendritic cells differentiation and maturation by microRNA-23b. *Biosci Rep.* 2017;37(2):BSR20160436.
- [32] Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL. Metabolic Instruction of Immunity. *Cell.* 2017;169(4):570-586.
- [33] O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):553-565.
- [34] Sun Y, Oravec-Wilson K, Bridges S, et al. miR-142 controls metabolic reprogramming that regulates dendritic cell activation. *J Clin Invest.* 2019;129(5):2029-2042.
- [35] Zhang TN, Li D, Xia J, et al. Non-coding RNA: a potential biomarker and therapeutic target for sepsis. *Oncotarget.* 2017;8(53):91765-91778.
- [36] Zhou J, Tian H, Du X, et al. Population-Based Epidemiology of Sepsis in a Subdistrict of Beijing. *Crit Care Med.* 2017;45(7):1168-1176.