

鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠体内 miR-155 和 Th17 表达的关系

张夏子, 何先弟, 汪华学, 邹琪, 秦苏徽

蚌埠医学院第一附属医院重症医学科, 安徽 蚌埠 233004

摘要:目的 观察不同时间段鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠血清中 miR-155 的表达和 Th17 细胞所占的比例, 探究彼此之间关系。方法 将 32 只清洁级 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组(N组)、脓毒症 6 h 组、12 h 组和 24 h 组, 每组 8 只。鲍曼不动杆菌混悬液腹腔注射制作鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠模型, 对照组腹腔注射生理盐水, 外周血分离血清和淋巴细胞, 荧光定量 RT-PCR 法检测大鼠血清中 miR-155 的表达, 流式细胞术检测血液中 Th17 细胞比例, 酶联免疫吸附法(ELISA)测血清白介素 17(IL-17)的表达量。分析比较脓毒症 6 h 组、12 h 组、24 h 组和正常对照组的组间差异, Pearson 相关分析评估 miR-155 的表达和 Th17 之间的关系。结果 各时间段(6 h、12 h、24 h)脓毒症大鼠 miR-155、IL-17 和 Th17 细胞水平较正常对照组升高(均 $P < 0.05$)。Pearson 相关分析显示血清中 miR-155 表达与 Th17 比例水平和 IL-17 表达均呈正相关(均 $P < 0.05$)。结论 鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠血清 miR-155、IL-17 和血液中 Th17 水平与正常对照组之间差异有统计学意义, 血清 miR-155 表达与 Th17 比例水平和 IL-17 表达均呈正相关, miR-155 有可能会成为鲍曼不动杆菌脓毒症治疗的新靶点。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 脓毒症; miR-155; Th17

中图分类号: R631 R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2019)09-1478-04

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000974

Expression of microRNA-155 and Th17 in rats with sepsis caused by *Acinetobacter baumannii* and their relationship

ZHANG Xia-zi, HE Xian-di, WANG Hua-xue, et al.

Department of Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233004, China

Abstract: Objective To investigate the percentage of T helper 17 (Th17) and miR-155 level in peripheral blood of rats with sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*, and explore their relationships. **Methods** Total 32 clean SD rats were randomly divided into normal control group (N group), and 6 h, 12 h and 24 h sepsis group, with 8 rats in each group. The sepsis rat model was established by intraperitoneal injection with *Acinetobacter baumannii* suspension, while the rats in N group were injected with normal saline. The serum and lymphocyte were separated from peripheral blood of rats. The fluorescence quantitative rt-PCR was used to detect expression of miR-155. Flow cytometry was used to detect the ratios of Th17 cells over CD4⁺ T cells in peripheral, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the serum level of interleukin-10 (IL-10). The difference among N group and 6 h, 12 h and 24 h sepsis group were analyzed. Pearsons correlation analysis was used to evaluate the relationship between miR-155 and Th17. **Results** Serum level of miR-155 was significantly higher in rats with sepsis than that in normal group (all $P < 0.05$). Th17 cells was significantly higher in rats with sepsis than that in normal group (all $P < 0.05$). Pearsons correlation analysis showed that the serum level of miR-155 was positively correlated with Th17 cells (all $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Th17 and miR-155 is increased in *Acinetobacter baumannii* sepsis rats. The serum level of miR-155 is positively correlated with Th17 cells, which can used as the target in the early diagnosis and treatment of *Acinetobacter baumannii*.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Sepsis; miR-155; Th17

脓毒症是由感染导致的全身炎症反应, 是临床上重症患者危急的并发症。脓毒症的治疗是 ICU(重症监护室)中非常棘手的问题, 临床上病死率很高^[1-2]。近年来抗菌药物使用不合理使得医院内特别是 ICU 病房的鲍曼不动杆菌感染率迅速上升, 鲍曼不动杆菌现阶段已经升至院内感染多重耐药(multiple-drug resistant, MDR)菌的首位^[3-4], 鲍曼不动杆菌脓毒症临床发

病率也日渐增多, 是 ICU 的一大治疗难点。近十年来, 微小 RNA(miRNA) 在脓毒症病程的发生发展中所起到的作用逐渐受到关注, 多种 miRNA 参与脓毒症的病程发展^[5-6], 其在炎症反应中的多个节点中都发挥着难以替代的调节功能, 研究表明在炎症反应的多条信号通路中 miRNA 都起到了一定的作用, 在抗炎和促炎两个层面中均扮演着重要角色。微小 RNA-155(miR-155) 与机体的免疫炎症反应密切相关并参与了脓毒症发展, 是在脓毒症中研究较多的 miRNA^[7-9], 但是其具

基金项目: 安徽省科技攻关项目(1301042221)

通信作者: 何先弟, E-mail: byfyhxd@163.com

体的发生机制暂未明确。辅助性 T 细胞 17(Th17)是人体内淋巴细胞的亚群, Th17 可特异性分泌 IL-17 从而介导机体内炎症反应, miR-155 可以通过直接或间接调控 Th17 等炎性 T 细胞从而介导免疫炎症反应^[10]。本研究通过将鲍曼不动杆菌的混合液注射到大鼠腹腔内来建立脓毒症模型, 探讨 miR-155、Th17、IL-17 在脓毒症发病过程中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 清洁级 SD 大鼠、鲍曼不动杆菌(ATCC19606)、高速离心机(Thermo)、分光光度计(Eppendorf)、淋巴细胞分离液和红细胞裂解液(天津灏洋公司)、Bdverse 流式细胞仪、实时定量荧光 PCR 仪(BD 公司, 美国)、Anti-Rat CD4 FITC 50 μg (eBioscience)、Anti-Mouse/Rat IL-17A PE 50 μg (eBioscience)、离子霉素、PMA(佛波酯)。miRNA 提取分离试剂盒: TIANGEN DP501(北京天根生化科技有限公司)、SYBRGreen PCR 试剂盒(全式金, AQ131)、dNTP(takara, 4019)、M-MLV(takara, 2641A)、RRI(takara, 2313A)、IL-17 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(CUSABIO CBS-E04595r)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立与实验分组 造模: 鲍曼不动杆菌(ATCC19606)用 0.9% NaCl 调制成为细菌混悬液, 分光光度计将菌液浓度稀释至 7×10^8 CFU/ m^3 。选取 32 只清洁级雄性成年 SD 大鼠, 均重 200 ~ 220 g, 按随机数字表法分为 4 组(每组 8 只): 正常对照组(N 组)、脓毒症 6 h 组(6 h 组)、12 h 组(12 h 组)、24 h 组(24 h 组)。该模型建造参照文献[7], 将 6 h、12 h 和 24 h 组大鼠腹腔内注入细菌混合液, 浓度 10 mL/kg, 对照组大鼠腹腔注射同浓度生理盐水。

1.2.2 淋巴细胞的分离和流式检测 淋巴细胞分离: 将大鼠血液与样品稀释液 1:1 稀释然后加入等量的分离液, 移液器将稀释后的样本轻轻加于分离液上, $400 \times g$, 离心 30 min。离心后, 此时离心管中由上至下分为 4 层: 第 1 层为血浆层; 第 2 层为淋巴细胞层; 第 3 层为透明分离液层; 第 4 层为红细胞层。用枪吸取淋巴细胞层到另一离心管中再加入 10 mL 清洗液然后将细胞混匀。 $250 \times g$, 离心 10 min, 弃上清。再用 5 mL 清洗液重悬所得细胞。 $250 \times g$, 离心 10 min。重复上述步骤, 弃上清。以 1 mL 相应液体重悬细胞再按需等分。Th17 检测: 细胞分别取 50 μL 混匀分为 3 管用于空白对照及 2 个单标 PMA/Ionomycin/BFA/Monensin Mixture($250 \times$)用无血清的 DMEM 稀释成 1X, 细胞离心弃上清(转速 3 000 r/min, 离心半径 9.5 cm), 加入刺激物 500 μL /管, 敞开盖子, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 4 h。离心弃上清(转速 3 000 r/min, 离心

半径 9.5 cm), PBS 离心洗涤 2 次, 待测管及混样 1 分别加入 1 μL 的 FITC-抗 CD4 单抗, 对照加入 PBS(或者同型对照 FITC-IgG)。室温避光孵育 30 min。离心弃上清, PBS 洗涤 2 遍, 加入 0.5 mL 的 1X 的固定液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光过夜。去除固定液, PBS 洗涤 2 遍, 加入 0.5 mL 的 1X 的透膜液(Permeabilization Wash Buffer), 3 000 r/min, 离心 5 min(离心半径 9.5 cm), 弃上清。1 ~ 14 管及混样 1 混样 2 分别加入 2 μL PE-抗 IL17A 单抗, 混匀, 室温避光孵育 30 min。弃上清, PBS 洗涤 2 遍。0.3 mL PBS 重悬细胞, 上机检测。酶联免疫吸附法(ELISA)检测: 按照武汉 CUSABIO ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.3 qRT-PCR 的检测 总 RNA 的提取, 取血清 400 μL , 裂解液 MZ 400 μL 移入 EP 管中, 混匀 30 s, 静置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 9.5 cm), 吸取上清, 加氯仿 400 μL , 振荡、混匀 30 s, 静置 5 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 r/min 离心 15 min(半径 9.5 cm), 见样品分 3 层, 2 层无色水相, 吸出, 吸取无色水相 1/3 比例无水乙醇, 震荡混合, 混合物移进吸附柱 miRspin, 静置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 30 s(离心半径 9.5 cm), 弃吸附柱, 流出液备存, 吸 300 μL 流出液, 加入 2/3 体积无水乙醇, 震荡混匀, 移入吸附柱 miRelute, 静置 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min, 30 s(离心半径 9.5 cm), 弃流出液。漂洗液 RW 600 μL 加入吸附柱 miRelute 中, 静置 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 30 s(离心半径 9.5 cm), 弃流出液, 重复。吸附柱 miRelute EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 60 s(离心半径 9.5 cm), 弃流出液, 换 EP 管, 加 RNase-Free ddH₂O 30 μL , 静置 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 2 min, 保留流出液, 获得总 RNA。

反转录, 体系配置 RNA 11 μL , 随机引物 1 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 冰上 5 min, 5 \times buffer 4 μL , RNA 酶抑制剂 1 μL , dNTP 2 μL , 5-MLV 1 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。Real-time PCR, PCR 体系配置(20 μL 体系) qPCR Mix 10 μL , Forward Primer(10 μM) 0.5 μL , Reverse Primer(10 μM) 0.5 μL , cDNA 2 μL , 水, nuclease-free 7 μL , Total volume 20 μL 。混合均匀, 离心(转速 12 000 r/min, 离心半径 9.5 cm), 分到 8 联排管或者 96 孔 PCR 板里, 每个样品每个基因 3 个 PCR 平行反应。PCR 反应程序设置 Initial denaturation 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 1 循环, Denaturation 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 和 Annealing 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 40 循环, Dissociation 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 1 循环。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析比较各组数据间的组间差异, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。Pearson 相关分析评估 miR-155 的表达分别和 IL-17、

Th17 之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组 SD 大鼠外周血液中 Th17 细胞比例的比较, 与 N 组相比, 脓毒症 6 h、12 h 和 24 h 组 Th17 细胞占淋巴细胞的比例升高(均 $P < 0.01$); 6 h 组与 12 h 组, 6 h 组与 24 h 组 Th17 比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); 12 h 与 24 h 组 Th17 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见图 1 和表 1。各组 SD 大鼠血清中 IL-17 比较, 与 N 组相比, 脓毒症 6 h、12 h 和 24 h 组 IL-17 升高(均 $P < 0.01$); 6 h 组与 12 h 组, 6 h 组与 24 h 组 IL-17

表达差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); 12 h 与 24 h 组 IL-17 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见表 1。各组 SD 大鼠血清中 miR-155 的比较, 与 N 组相比, 脓毒症 6 h、12 h 和 24 h 组 miR-155 表达量升高(均 $P < 0.01$), 见表 1; 6 h 组与 12 h 组, 6 h 组与 24 h 组 miR-155 表达差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); 12 h 与 24 h 组 miR-155 差异无统计学意义($P > 0.05$)。Pearson 相关性分析显示, miR-155 与 Th17 和细胞比例均呈明显正相关($r = 0.781, P < 0.01$), miR-155 与 IL-17 的表达呈明显正相关($r = 0.703, P < 0.01$), 见图 2。

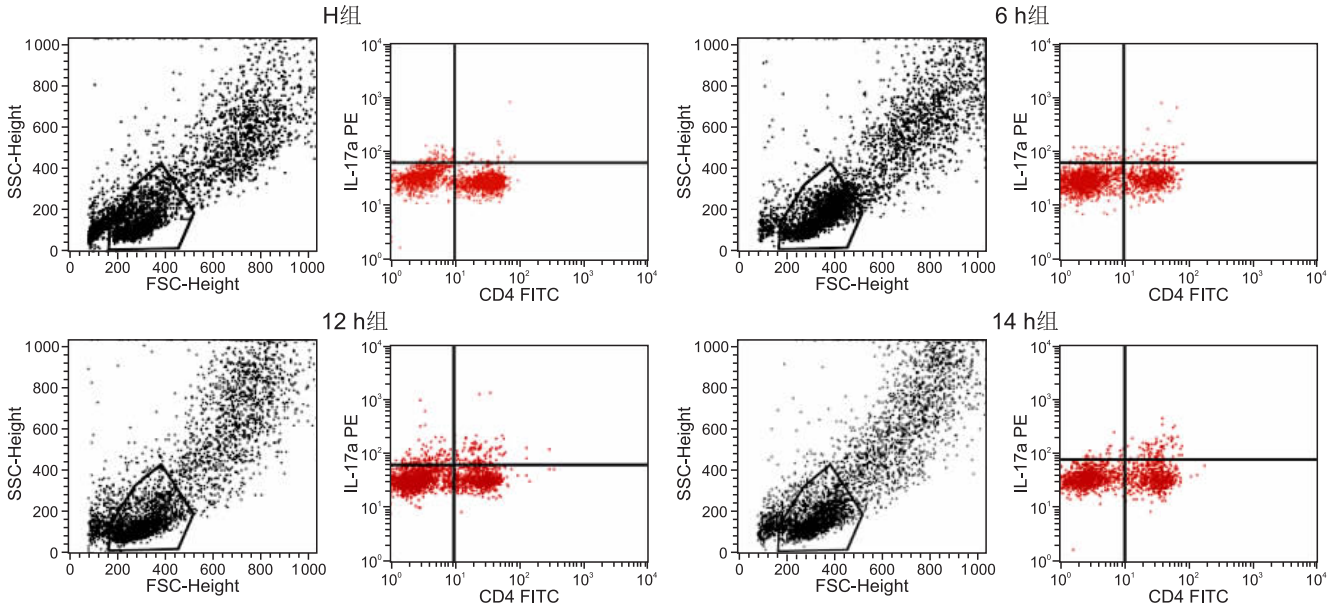


图 1 Th17 细胞占淋巴细胞比例

表 1 各组大鼠不同时间点 miR-155、Th17 及 IL-17 的比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	例数	MiR-155	IL-17	Th17
对照组	8	0.76 ± 0.24	354.18 ± 53.69	1.23 ± 0.31
脓毒症 6 h 组	8	2.63 ± 0.70 ^{ab}	615.92 ± 93.30 ^{ab}	3.17 ± 0.44 ^{ab}
脓毒症 12 h 组	8	3.44 ± 0.76 ^{ac}	770.27 ± 101.60 ^{ac}	3.76 ± 0.68 ^{ac}
脓毒症 24 h 组	8	4.11 ± 1.06 ^{ac}	772.13 ± 108.65 ^{ac}	4.12 ± 0.40 ^{ac}
F 值		30.237	36.745	58.581
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 采用 LSD-t 检验, 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 12 h 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 6 h 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

鲍曼不动杆菌是一种广泛分布于自然界的 G⁻ 杆菌, 细菌粘附力极强, 容易在医院的各种医疗器械上附着, 近年来因为抗菌药物使用不当和临床操作不规范导致其在医院内特别是 ICU 感染率大幅度上升, 而由其导致的脓毒症也是重症患者死亡的重要原因。脓毒症是机体过度炎症或炎症失衡所致, 病程最早炎症因子的过量释放到随后发生的抗炎反应最后导致晚期的淋巴细胞大量死亡, 使患者体内的免疫防御机能下降, 除外来病原体及其毒素等直接破坏组织细胞外, 免疫紊乱亦与其病程发生和演化紧密相连。

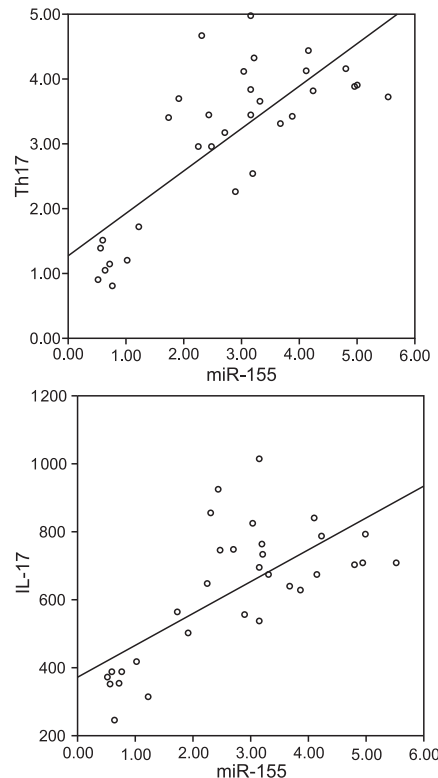


图 2 血清 miR-155 与 Th17、IL-17 水平的相关性分析

Th17是由CD4⁺T细胞分化而来的,当细菌入侵时,Th17参与机体的免疫应答过程,分泌IL-17,从而使中性粒细胞募集,动员兴奋单核细胞和内皮细胞产生多种细胞因子,介导机体的炎症反应,从而将细胞外的致病细菌清除。已有研究表明脓毒症患者的Th17较正常组明显升高^[11-12]。

最近已有研究试着将miRNA作为靶点来对脓毒症进行诊疗^[13-15],但是否可以在临床应用于患者还需对miRNA在脓毒症中的作用进行进一步的探索。有研究^[16]发现与正常细胞相比PI3K被抑制的细胞中miR-155有所降低,miR-155可以通过PI3K/AKT来应对LPS诱导的免疫炎症反应,还有研究^[17]表明miR-155可能参与脓毒症病程中提升或抑制TLR4表达,导致患者免疫状态的改变。miR-155敲除后的小鼠,其体内的炎症因子释放有所变化,整体的炎症水平受到影响^[18],故miR-155在调控炎症方面发挥着一定作用。有研究^[8]显示脓症患者血清miR-155的表达水平较未感染者明显升高,miR-155表达对脓毒症诊断起到警戒作用,有可能成为脓毒症病情标志物^[19]。ICU病房28d内死亡患者的miR-155平均水平比存活下来的患者要高得多,miR-155的水平与脓毒症的严重程度及患者的预后都密切相关^[8]。miR-155可以通过2种方式促诱导Th17,一种可以激活IL-6/STAT3通路使得Th17细胞分化加速,另一种是IL-17A影响miR-155从而抑制IL-10等因子的分泌进而使Th17细胞的表达增加^[20]。

本研究中6h、12h和24h的鲍曼不动杆菌脓毒症大鼠体内的Th17比例与正常对照组相比较均有上升,Th17可在体内诱导分泌大量促炎物质如IL-17、TNF- α 、IL-6等,主要引起机体的促炎反应。本研究中Th17细胞和IL-17在脓毒症各时间段中均有不同程度的提高,表明Th17确实在体内促炎中起到作用,各个时间段鲍曼脓毒症大鼠血清中的miR-155较正常组升高也印证其与脓毒症的相关性。同时在本研究中脓毒症的各个时间段中miR-155与Th17和IL-17均有较强的相关性,提示在脓毒症中miR-155有可能通过调节Th17来影响脓毒症病情的发生演化,但是miR-155是否可能会成为鲍曼不动杆菌脓毒症治疗的有效靶点,还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] REITH S, ORTLEPP J R. State of the art-intensive care therapy of septic patients[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2016, 141(15): 1082-1090.
- [2] KLAstrup V, HVASS A M, MACKENHAUER J, et al. Site of infection and mortality in patients with severe sepsis or septic shock A cohort study of patients admitted to a Danish general intensive care unit [J]. Infect Dis, 2016, 48(10): 726-731.
- [3] HSU L Y, APISARNTHANARAK A, KHAN E, et al. Carbapenem-resistant acinetobacter baumannii and enterobacteriaceae in south and southeast asia[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1): 1-22.
- [4] LYNCH J P, ZHANEL G G, CLARK N M. Infections due to acinetobacter baumannii in the ICU: treatment options[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2017, 38(3): 311-325.
- [5] ESSANDOH K, FAN G C. Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(11): 2155-2162.
- [6] 霍锐, 戴敏, 樊艺, 等. miRNA-29a和miRNA-10a-5p对脓毒症所致急性肾损伤患者28d死亡率的预测价值[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(5): 646-651.
- [7] 汪勤, 赵春辉, 蔡琴, 等. 脓症患者外周血微小RNA-155和调节性T细胞表达的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(3): 179-183.
- [8] 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.
- [9] LIU J, SHI K, CHEN M, et al. Elevated miR-155 expression induces immunosuppression via CD39(+) regulatory T-cells in sepsis patient [J]. Int J Infect Dis, 2015, 40: 135-141.
- [10] YAN L, HU F, YAN X, et al. Inhibition of microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th17/Treg immune response[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(9): 1063-1079.
- [11] 熊焱, 王健, 魏笛, 等. 脓症患者外周血Th17细胞水平的变化及其临床意义[J]. 现代预防医学, 2015, 42(23): 4287-4289, 4293.
- [12] 李国辉, 马纪林, 周红娟, 等. 调节性T细胞及辅助性T细胞17在严重脓症患者中的表达及对预后影响[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2014, 7(6): 9-13.
- [13] WANG H, YU B, DENG J, et al. Serum miR-122 correlates with short-term mortality in sepsis patients[J]. Crit Care, 2014, 18(6): 704.
- [14] JIANG Y, ZHOU H, MA D, et al. MicroRNA-19a and CD22 comprise a feedback loop for B cell response in sepsis [J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 1548-1555.
- [15] TACKE F, RODERBURG C, BENZ F, et al. Levels of circulating miR-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients [J]. Crit Care Med, 2014, 42(5): 1096-1104.
- [16] 武宇辉, 齐颖, 马伟科, 等. 微小RNA-155和微小RNA-21对脓毒症患儿Toll样受体4表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(6): 420-424.
- [17] 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.
- [18] ESCOBAR T M, KANELLOPOULOU C, KUGLER D G, et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA-binding protein Jarid2 to relieve polycomb-mediated repression [J]. Immunity, 2014, 40(6): 865-879.
- [19] 兰超, 史晓朋, 郭楠楠, 等. 血清miR-155-5p和miR-133a-3p对脓毒症诊断及预后的评估价值[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(8): 694-698.
- [20] MA L, XUE H B, WANG F, et al. MicroRNA-155 may be involved in the pathogenesis of atopic dermatitis by modulating the differentiation and function of T helper type 17 (Th17) cells [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 181(1): 142-149.