

## 脓毒症患者血清 IL-35 与 miR-21 的表达及相互调控作用研究

彭文丽,王 惟,何 婷<sup>△</sup>

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院,重庆 400030)

**摘要:**目的 检测脓毒症患者血清白细胞介素(IL)-35 与微小 RNA-21(简称 miR-21) 的表达水平及相关性,探讨其相互调控在脓毒症中的作用。方法 收集脓毒症患者与健康对照者血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测血清 IL-35 与 miR-21 的表达,分析二者表达的相关性;小鼠腹腔注射脂多糖建立脓毒症模型,再分别腹腔注射 anti-IL-35 p35 抗体、IgG、脓毒症 miR-21 模拟物(agomir-21)、脓毒症 miR-21 阴性对照(agomir-21 NC)进行处理,real-time PCR 检测各组小鼠血清 miR-21 表达水平,ELISA 法检测各组小鼠血清 IL-35、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-6 水平。结果 脓毒症患者血清 IL-35 与 miR-21 的表达水平较健康对照组明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且二者的表达呈正相关( $P<0.05$ );脓毒症小鼠拮抗 IL-35 后,血清 miR-21 表达明显升高,同时炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达也明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );脓毒症小鼠经 agomir-21 处理后,血清 IL-35 的水平明显降低,而炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 血清 IL-35 与 miR-21 在脓毒症小鼠中通过相互调控作用共同参与脓毒症炎症反应。

**关键词:**脓毒症; 白细胞介素 35; 微小 RNA-21; 炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.019

中图法分类号:R459.7

文章编号:1673-4130(2018)01-0070-04

文献标识码:A

## Study on expression and mutual regulation of serum IL-35 and miR-21 in septic patients

PENG Wenli, WANG Wei, HE Ting<sup>△</sup>(Chongqing University Cancer Hospital/Chongqing Cancer Institute/  
Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Objective To detect the expression level and correlation of interleukin 35 (IL-35) and micro RNA-21 (miR-21) in septic patients and to explore the role of their mutual regulation in sepsis. **Methods** The serum was collected from the patients with sepsis and healthy controls. The expressions of serum IL-35 and miR-21 were detected by ELISA and real-time PCR, and their correlation was analyzed; mice were intraperitoneally injected by lipopolysaccharide (LPS) to establish the sepsis model, then the mice were given anti-IL-35 p35 antibody, IgG, sepsis miR-21 mimics (agomir-21) and sepsis miR-21 negative control (agomir-21 NC) by intraperitoneal injection, after that, the serum miR-21 expression level in each group was detected by real-time PCR and IL-35, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were detected by ELISA. **Results** The expression levels of serum IL-35 and miR-21 in sepsis patients were significantly increased compared with the healthy control group, the difference was statistical significance ( $P<0.05$ ), moreover their expression levels showed the positive correlation ( $P<0.05$ ); after septic mice antagonizing to IL-35, the serum miR-21 expression was significantly increased, meanwhile the expressions of inflammatory factor TNF- $\alpha$  and IL-6 were increased obviously, the difference was statistical significance ( $P<0.05$ ). After treating the septic mice by agomir-21, the serum IL-35 level was decreased significantly, while the expression of inflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-6 were increased significantly, the difference was statistical significance ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Serum IL-35 and miR-21 in the patients with sepsis are jointly participate in the septic inflammatory response by mutual regulation.

**Key words:** sepsis; interleukin 35; micro RNA-21; inflammatory response

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征,其发病率和病死率较高<sup>[1]</sup>。感染因素导致炎症信号通路的激活,产生并释放大量炎性介质,形成的炎症

“瀑布”反应是脓毒症发生发展的重要机制之一,因此有效地抑制炎症因子,调节促炎因子和抗炎因子之间的平衡,无疑有助于提高脓毒症患者生存率。白细胞

介素(IL)-35,主要由调节性 T 细胞分泌,广泛参与了体内的免疫应答,与感染及炎症、自身免疫病和肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相关,是一个具有潜在治疗前景的新型抗炎因子<sup>[2-5]</sup>。微小 RNA(miRNA)是一类由 19~24 个核苷酸组成的短小非编码 RNA,广泛存在于真核细胞中。miRNAs 通过调控多条重要炎症信号通路发挥抑炎或促炎的作用,miRNA-21(简称 miR-21)通过调控多种炎症相关性基因的表达,参与多种炎症疾病,在炎症损伤发生发展过程中发挥重要的作用<sup>[6-8]</sup>。基于 IL-35 与 miR-21 与炎症反应的重要相关性,本文检测了 IL-35 与 miR-21 在脓毒症患者血清中的表达水平及相关性,进一步的探讨了 IL-35 与 miR-21 相互调控的作用,为阐明 IL-35 与 miR-21 在脓毒症中重要作用提供新的实验依据,以及为脓毒症的抗炎治疗提供新的靶标。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2014 年 1 月至 2016 年 12 月在本院经临床确诊的脓毒症患者 30 例(脓毒症组)作为研究对象,均符合美国重症医学会(SCCM)与欧洲重症医学会(ESICM)联合发布脓毒症诊断标准<sup>[9]</sup>,其中男 17 例,女 13 例,平均年龄( $45 \pm 11$ )岁;另选同期本院体检中心体检健康者 30 例作为健康对照组,其中男 18 例,女 12 例,平均年龄( $48 \pm 9$ )岁,均无自身免疫病、肿瘤、糖尿病等疾病。两组研究对象性别、年龄比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

**1.2 实验动物** 无特定病原体级 C57BL/6 小鼠,雌性,6~8 周龄,体质量( $20 \pm 2$ )g,购自重庆医科大学实验动物中心。

**1.3 仪器与试剂** 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI 公司),-80℃低温冰箱(日本 Sanyo 公司),紫外分光光度(美国 Thermo 公司),全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),IL-35、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自 eBioscience 和 R&D 公司,血清 miRNA 提取试剂盒购自北京天根科技公司,anti-IL-35 p35 抗体、IgG 对照组购自美国 R&D 公司,miRNA 检测试剂盒购自美国 GeneCopeia 公司,agomir-16 及 agomir-16 对照组由上海吉玛制药公司合成,PCR 引物有广州复能基因公司合成。

## 1.4 方法

**1.4.1 标本采集** 采用带血清分离胶真空采集管收集空腹静脉血标本,4 000 r/min 离心 10 min 后收集血清。小鼠眼球取血,室温 30 min 后以 3 000 r/min 离心 10 min 后收集血清。所以血清标本-80℃低温冰箱保存备用。

**1.4.2 动物模型建立、分组与给药** 参考文献<sup>[10]</sup>方法,采用腹腔注射脂多糖(LPS)20 mg/kg 建立小鼠脓毒症模型,小鼠注射 LPS 后出现寒战、呼吸频率加快、活动力降低、毛发耸立等症状。将小鼠随机分为

健康对照组、脓毒症 anti-IL-35 p35 组、脓毒症 IgG 对照组、脓毒症 miR-21 模拟物组(agomir-21 组)、脓毒症 miR-21 阴性对照组(agomir-21 NC 组),每组 10 只。除健康对照组腹腔注射生理盐水 0.2 mL,其余各组脓毒症模型小鼠分别经尾静脉注射,anti-IL-35 p35 组 2.5 mg/kg、脓毒症 IgG 对照组 2.5 mg/kg、脓毒症 agomir-21 组 50 mg/kg,脓毒症 agomir-21 NC 组 50 mg/kg。

**1.4.3 血清 miRNA 提取** 根据 miRNA 提取试剂盒(北京天根科技公司)的操作程序提取所有血清标本的 miRNA,最终获得的 miRNA 溶解于无核酸酶溶液中,用紫外分光光度计测得浓度及纯度,-80℃低温冰箱保存备用。

**1.4.4 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)** 采用 miRNA 检测试剂盒将所得 miRNA 逆转录成 cDNA 链,具体操作按说明书进行,以小核 RNA U6 (snRNA U6)为内参,real-time PCR 检测 miR-21 的表达。miR-21 上游引物:5'-TAG TTA TCA GAC TGA TGT TGA-3';下游引物:5'-ACA ACA TCA GTC TTG ATA ACT A-3';snRNA U6 上游引物:5'-CGC TTC GGC AGC ACA TAT ACT AA-3';下游引物:5'-TAT GGA ACG CTT CAC GAA TTT GC-3'。反应条件为预变性:95℃,5 min;40 循环:95℃,10 s 变性,60℃,20 s 退火,72℃,20 s 延伸,仪器收集荧光值。

**1.4.5 检测方法** 采用 ELISA 检测各组血清中 IL-35、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平,严格按照试剂盒说明书要求操作。

**1.5 统计学处理** 采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组血清 IL-35 和 miR-21 的表达及相关性分析** 脓毒症组血清 IL-35 表达量明显高于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );脓毒症组血清 miR-21 的表达水平比健康对照组明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。经 Pearson 相关性分析显示,脓症患者血清中 IL-35 与 miR-21 的表达呈正相关( $r = 0.894, P < 0.05$ )。结果提示 IL-35 和 miR-21 与脓毒症相关,且二者可能有一定的表达调控关系。见图 1。

**2.2 脓毒症小鼠拮抗 IL-35 可诱导 miR-21 促进炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达** LPS 诱导的脓毒症小鼠分别经 anti-IL-35 p35 抗体或 IgG 对照处理,拮抗 IL-35 活性,检测小鼠血清 miR-21 和炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达,见表 2。拮抗 IL-35 小鼠的血清 miR-21 表达明显升高,同时炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达也明显增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 IL-35 可能通过调控 miR-21 参与炎症反应。

表 1 两组血清 IL-35 和 miR-21 表达水平比较(±s)

| 组别    | n  | IL-35(pg/mL)     | miR-21(2 <sup>-△△Ct</sup> ) |
|-------|----|------------------|-----------------------------|
| 脓毒症组  | 30 | 391.765±173.212* | 3.791±1.624*                |
| 健康对照组 | 30 | 62.262±20.132    | 1.032±0.345                 |

注:与健康对照组比较,\*P<0.05

2.3 miR-21 抑制脓毒症小鼠 IL-35 的表达与 TNF-α、IL-6 关系 LPS 诱导的脓毒症小鼠分别经 agomir-21 或 miR-21 阴性对照处理,检测小鼠血清 IL-35 和炎症因子 TNF-α、IL-6 的表达,见表 3。经 agomir-21 处理小鼠血清 IL-35 水平明显降低,而炎症因子 TNF-α、IL-6 的表达明显增加,差异均有统计学意义

表 2 各组血清 miR-21、TNF-α、IL-6 表达水平比较(±s)

| 组别                   | n  | miR-21(2 <sup>-△△Ct</sup> ) | TNF-α(ng/mL)   | IL-6(ng/mL)    |
|----------------------|----|-----------------------------|----------------|----------------|
| 脓毒症 anti-IL-35 p35 组 | 10 | 6.701±0.434*△               | 11.795±3.201*△ | 34.425±5.593*△ |
| 脓毒症 IgG 对照组          | 10 | 3.415±0.489                 | 5.791±1.873    | 19.070±3.998   |
| 健康对照组                | 10 | 1.121±0.145                 | 0.703±0.208    | 1.503±0.711    |

注:与健康对照组比较,\*P<0.05;与脓毒症 IgG 对照组比较,△P<0.05

表 3 各组血清 IL-35、TNF-α、IL-6 表达水平比较(±s)

| 组别                 | n  | IL-35(pg/mL)     | TNF-α(ng/mL)   | IL-6(ng/mL)    |
|--------------------|----|------------------|----------------|----------------|
| 脓毒症 agomir-21 组    | 10 | 154.199±38.368*△ | 20.035±3.866*△ | 45.713±6.550*△ |
| 脓毒症 agomir-21 NC 组 | 10 | 289.277±40.621   | 10.798±3.013   | 25.158±5.356   |
| 健康对照组              | 10 | 40.484±11.098    | 1.011±0.341    | 1.730±0.646    |

注:与健康对照组比较,\*P<0.05;与脓毒症 agomir-21 NC 组比较,△P<0.05

3 讨 论

脓毒症由于缺乏有效的救治手段,因此,脓毒症早期对炎症因子进行调节,是脓毒症治疗的关键点。IL-35 是 IL-12 家族的成员,被认为是一种具有潜在治疗前景的新型抗炎因子。IL-35 由 IL-12 的 α 链 IL-12A 亚基和 IL-27 的 β 链 EBI3 亚基组成的异源二聚体蛋白<sup>[11]</sup>。研究发现,IL-35 参与多种炎症疾病的免疫调节,在类风湿性关节炎中 IL-35 促进 IL-10 的分泌,并抑制 γ-干扰素(IFN-γ) 和 IL-17 的产生,从而有效抑制抗原特异性免疫应答、改善炎症状况<sup>[12]</sup>;在慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者外周血中 IL-35 水平明显高于正常对照组,IL-35 可能通过免疫调节机制在肝内炎症损伤中发挥自我保护作用<sup>[13]</sup>;大环内酯类药物治疗大鼠肺炎模型后,支气管肺泡灌洗液中检测到高浓度的 IL-35,推测通过增强 IL-35 的分泌发挥抑炎作用<sup>[14]</sup>。拮抗或促进 IL-35 的表达可能对维持机体免疫平衡具有重要意义,那么脓毒症中 IL-35 的表达如何,通过实验脓症患者血清 IL-35 的表达明显高于与健康对照组,提示 IL-35 可能与脓毒症的炎性反应相关。

越来越多的研究表明 miR-21 在调控组织炎症损伤发生发展过程中发挥重要的作用<sup>[15-16]</sup>。miR-21 通过抑制其各种靶基因的表达参与调控各种生物学过程,但其在脓毒症炎性反应与损伤过程中所发挥的具体作用仍然需要深入研究。通过实验脓症患者血

(P<0.05),提示 miR-21 可能通过调控 IL-35 发挥促炎作用。

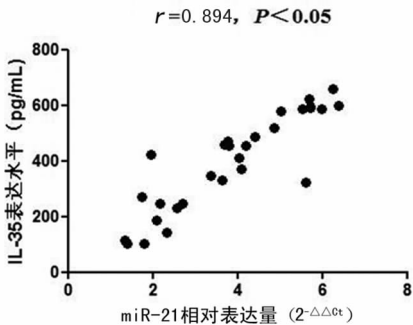


图 1 脓症患者血清中 IL-35 与 miR-21 表达相关性分析

清 miR-21 的表达明显高于与健康对照组,提示 miR-21 可能参与脓毒症的炎性反应。miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 特异性识别及结合,从而抑制靶基因 mRNA 的翻译过程或促进其降解,实现对基因表达的转录后调控。研究已经发现 miR-21 存在众多靶基因包括 PTEN, PDCD4, FasL, SOD3, Bcl-2, WNT1 等<sup>[17-20]</sup>。通过生物信息学分析发现 IL-35 的 3'-UTR 存在 miR-21 的特异性结合位点,在脓毒症小鼠模型上,发现 miR-21 可以抑制 IL-35 的表达,并进一步促进炎症因子 TNF-α、IL-6 的表达,这提示 miR-21 可能通过调控 IL-35 发挥促炎作用。疾病的发生发展通常是一个复杂的多因素调节过程,miR-21 可能通过调控 IL-35 发挥作用,那么 IL-35 是否通过调节炎症通路进而影响 miR-21,因此进一步深入研究发现,拮抗 IL-35 可诱导 miR-21 进而促进炎症因子 TNF-α、IL-6 的表达。研究结果提示,IL-35 与 miR-21 的相互调节作用,可能是 IL-35 与 miR-21 参与脓毒症炎性反应的新机制,但其相互调节的具体分子机制仍然需要深入探讨。

综上所述,本研究在发现脓症患者血清中的 IL-35 与 miR-21 表达水平明显升高且呈正相关的基础上,进一步探讨了 IL-35 与 miR-21 相互调控在脓毒症小鼠中的作用,为阐明 IL-35 与 miR-21 在脓毒症中重要作用提供新的实验依据,以及为脓毒症的抗炎治疗提供新的靶标。

参考文献

[1] SEHGAL C V,BAJWA S J,CONSALVO J A,et al. Clinical conundrums in management of sepsis in the elderly [J]. J Transl Int Med,2016,3(3):106-112.

[2] LIAQ K,ECKL J,GEIGER C,et al. A novel and effective method to generate human porcine-specific regulatory T cells with high expression of IL-10, TGF- $\beta$ 1 and IL-35 [J]. Sci Rep,2017,7(1):3974-3974.

[3] VENKATESHA S H,DUDICS S,ACHARYA B A. Cytokine-Modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy[J]. Int J Mol Sci,2015,16(1):887-906.

[4] PANDIYAN P,ZHU J F. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3(+) regulatory T cells[J]. Cytokine,2015,76(1):13-24.

[5] PENG G,ZHEN Z S,LV XUE J L,et al. Interleukin-35 in asthma and its potential as an effective therapeutic agent[J]. Mediators Inflamm,2017,59(3):1865-1868.

[6] HATLEY M E,PATRICK D M,GARCIA M R,et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21[J]. Cancer Cell,2010,18(3):282-293.

[7] MEDINA P P,NOLDE M,SLACK F J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma[J]. Nature,2010,46(7):86-90.

[8] THUM T,GROSS C,FIEDLER J,et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. Nature,2008,44(2):980-984.

[9] LEVY M M,FINK M P,MARSHALL J C,et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J]. Intensive Care Med,2003,29(4):530-538.

[10] KALBITZ M,FATTAHI F,HERRON T J,et al. Complement destabilizes cardiomyocyte function in vivo after polymicrobial sepsis and in vitro[J]. J Immunol,2016,197(6):2353-2361.

[11] VIGNALI D A,KUCHROO V K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers[J]. Nat Immunol,2012,13(8):722-728.

[12] KOCHETKOVA I,GOLDEN S,HOLDERNESS K,et al. IL-35 stimulation of CD39<sup>+</sup> regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10[J]. J Immunol,2010,184(12):7144-7153.

[13] ZHOU Y L,ZHANG H,LI Y M. IL-35 expression in peripheral blood CD4(+) T cells from chronic hepatitis B virus-infected patients directly correlates with virus load [J]. Cytokine,2015,73(1):169-175.

[14] BAI J,QIU S L,ZHONG X N,et al. Erythromycin enhances CD4 + Foxp3 + regulatory T-cell responses in a rat model of smoke-induced lung inflammation[J]. Mediators Inflamm,2012,79(5):4102-4132.

[15] LOBODA A,SOBCZAK M,JOZKOWICZ A,et al. TGF- $\beta$ 1/smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation [J]. Mediators Inflamm,2016,83(1):9283-9239.

[16] LATRUFFE N,LANÇON A,FRAZZI R,et al. Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation[J]. Ann Sci,2015,1348(1):97-106.

[17] WANG Z P,YAO W,LI K,et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation via PTEN/PDCD4 [J]. Oncol Lett,2017,13(6):4727-4733.

[18] HUANG J H,CAO Y,ZENG L,et al. Tetramethylpyrazine enhances functional recovery after contusion spinal cord injury by modulation of MicroRNA-21, FasL, PDCD4 and PTEN expression [J]. Brain Res,2016,64(8):35-45.

[19] ZHANG X M,NG W L,WANG P,et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive Oxygen species by targeting SOD3 and TNF $\alpha$ [J]. Cancer Res,2012,72(18):4707-4713.

[20] HASHIMI S T,FULCHER J A,CHANG M H,et al. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation[J]. Blood,2009,114(2):404-414.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-10-06)

(上接第 69 页)

[2] 王猛,刘金玲,密丛丛,等. NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er 上转换荧光纳米颗粒的合成及表面修饰[J]. 东北大学学报(自然科学),2010,20(2):232-235.

[3] WANG J,SONG H,XU W,et al. Phase transition, size control and color tuning of NaREF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Er<sup>3+</sup> (RE = Y,Lu) nanocrystals[J]. Nanoscale,2013,5(8):3412-3420.

[4] 姚海波. 纳米 SiO<sub>2</sub> 的表面改性研究及应用[J]. 化工新型材料,2015,43(8):244-246.

[5] LI Z,ZHANG Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence[J]. Nanotech,2008,19(34):345606.

[6] 李超辉. 胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿以及猪肉中的克伦特罗残留[D]. 南昌:南昌大学,2014.

(收稿日期:2017-06-20 修回日期:2017-09-21)