

• 论 著 •

基于高通量测序分析多巴胺受体 DRD5 缺失小鼠肠道菌群的变化^{*}

刘 璐¹, 吴昱青^{2,3△}

1. 南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏南京 211100; 2. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029; 3. 国家医学检验临床医学研究中心分中心, 江苏南京 210029

摘 要:目的 探讨多巴胺受体 DRD5 缺失小鼠肠道菌群结构的变化和多样性。方法 通过基因敲除技术构建 DRD5 敲除小鼠模型, 根据小鼠基因型分为两组: 野生型小鼠作为对照组, DRD5 敲除小鼠作为敲除组。8 周龄时, 收集 5 只对照组小鼠和 5 只敲除组小鼠的粪便标本, 利用 Illumina MiSeq 测序平台对细菌的 16S rRNA 进行高通量测序, 对测序结果进行生物信息学分析。结果 敲除组与对照组小鼠的肠道菌群结构存在差异。在门水平上, 敲除组与对照组优势菌门拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 变形菌门和蓝细菌门两组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在属水平上, 敲除组与对照组比较, 罗姆布茨菌属、真杆菌属、脱硫弧菌属、XIII_UCG-001 属、胃嗜气科菌属、Rs-E47_termite 属、双歧杆菌属、ASF356 属、布劳特菌属、毛螺菌属的相对丰度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步对菌群进行分析, 敲除组的罗姆布茨菌属、真杆菌、脱硫弧菌属、XIII_UCG-001 属、Rs-E47_termite 属、双歧杆菌属、ASF356 属和毛螺菌科 NK4A136 组的相对丰度均低于对照组 ($P < 0.05$), 胃嗜气科菌属和布劳特菌属的相对丰度均高于对照组 ($P < 0.05$)。结论 两组小鼠的菌群构成及构成比皆存在差异, DRD5 缺失后会引发小鼠肠道微生态失调。

关键词: 多巴胺受体; 肠道菌群; 高通量测序

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.13.001

中图法分类号: Q939.93; R446.5

文章编号: 1673-4130(2023)13-1537-05

文献标志码: A

Analysis on changes of gut microbiota in DRD5 knockout mice based on high-throughput sequencing^{*}

LIU Lu¹, WU Yuqing^{2,3△}

1. Department of Immunology of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 211100, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 3. National Key Clinical Department of Laboratory Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes in the structure and diversity of intestinal flora in dopamine receptor DRD5-deficient mice. **Methods** The DRD5 knockout mouse model was constructed by gene knockout technology and the mice were divided into two groups according to the genotype: wild type mice as the control group and DRD5 knockout mice as the knockout group. At 8 weeks of age, fecal samples of 5 control group mice and 5 knockout group mice were collected, and 16S rRNA of bacteria was sequenced by Illumina MiSeq sequencing platform, and the sequencing results were analyzed bioinformatically. **Results** There was difference in gut microbiota between control and knockout group. At the phylum level, there was no significant difference in the relative abundance of Bacteroidetes and Firmicutes ($P > 0.05$). There was significant difference in the structure of Proteobacteria and Cyanobacteria between the 2 groups ($P < 0.05$). At the genus level, there were significant differences in the relative abundance of Romboutsia, Eubacterium, Desulfovibrio, Family XIII_UCG-001, Gastranaerophilales, Rs-E47_termite, Bifidobacterium, ASF356, Blautia and Lachnospiraceae NK4A136 between the 2 groups ($P < 0.05$). Further analysis of gut microbiota showed that the relative abundance of Romboutsia, Eubacterium, Desulfovibrio, Family XIII_UCG-001, Rs-E47_termite, Bifidobacterium, ASF356 and Lachnospiraceae NK4A136 in the knockout group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), but the relative abundance of Gastranaerophilales and Blautia in the knockout group were higher

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(82103328)。

作者简介: 刘璐, 女, 在读博士研究生, 主要从事肠道微生物与稳态的研究。△ 通信作者, E-mail: iwuyuqing@njmu.edu.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1176.R.20230629.1819.008.html\(2023-06-30\)](https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1176.R.20230629.1819.008.html(2023-06-30))

than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** There were differences in the composition and composition ratio between the two groups of mice, and DRD5 deletion caused intestinal microecological disorders in mice.

Key words: dopamine receptor; intestinal microbiota; high-throughput sequencing

肠道菌群是定植在肠道内复杂且丰富的微生物群落。研究表明,肠道菌群在生物体内的新陈代谢、免疫系统发育、炎症反应等方面发挥着重要作用,肠道菌群的紊乱与消化系统、免疫系统、呼吸系统、神经系统等疾病的发生密切相关^[1-2]。目前研究发现帕金森患者肠道菌群紊乱并伴随有肠道功能异常的出现^[3],多巴胺的水平及其受体表达的异常与帕金森病的发生密切相关^[4]。小鼠肠腔内含有由肠道多巴胺能神经元分泌产生的高浓度的多巴胺^[5],多巴胺可通过多巴胺受体调控胃肠道功能,胃肠道中多巴胺水平的下降也可导致肠道微生态失衡^[6],而多巴胺受体 DRD5 在肠道微生物稳态中扮演的角色并不十分明确。本研究拟采用高通量测序分析 DRD5 缺失小鼠粪便样本的肠道菌群变化,探讨 DRD5 在肠道微生态调控中的作用,以期为临床诊断和治疗肠道菌群紊乱提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5 只野生型无特定病原体级(SPF 级)C57BL/6J 小鼠作为对照组(购于南京医科大学医药实验动物中心)。5 只 DRD5 敲除小鼠作为对照组(购于广州赛业生物科技有限公司)。两组小鼠均饲养于南京医科大学医药实验动物中心 SPF 级环境,实验动物饲养设施合格证号为 SYXK(苏)2021-0023。光暗每日各半,室温控制在 $(23\pm2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 45%~70%。本研究已通过南京医科大学动物实验伦理委员会审查(批准编号:1707029)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠粪便标本及肠道组织的收集 粪便标本的采集采取立取、立存(取样后立即保存)原则,用无菌 1.5 mL EP 管收集饲养至 8 周龄的小鼠粪便,取样前洗手,戴无菌手套、口罩,连续收集 3 次粪便,混匀。标本采集后,标记好小鼠品系、编号、采样日期等。收集同期小鼠肠道组织,进行大体观察,测量结肠长度,同时制备常规石蜡切片,进行 HE 染色,于镜下观察组织形态。

1.2.2 DNA 提取 采用粪便 DNA 组快速提取试剂盒进行粪便基因组 DNA 提取,按照试剂盒说明书操作,并检测 DNA 浓度。

1.2.3 DNA 16S rRNA 检测 对 16S rRNA 的 DNA 序列进行高通量测序,高通量测序及测序文库构建由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

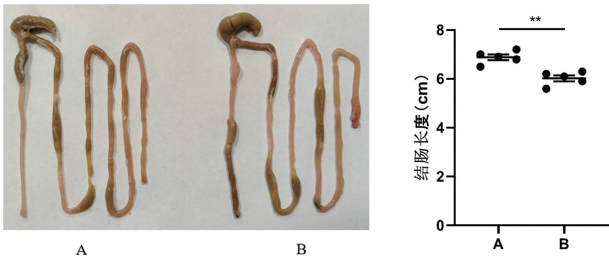
1.2.4 生物信息学分析 原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控,使用 FLASH 软件进行拼接。通常将相似度在 97% 以上的序列聚类作为 1 个操作分

类单元(OTU),并在聚类过程中去除单序列和嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 数据库(SSU123),比对阈值设置为 70%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,采用 Kolmogorov-Smirnov 法对计量资料进行正态性检验,采用 Bartlett 法检验方差齐性,数据均呈正态分布,服从正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组之间比较采用两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肠组织的大体形态观察 对照组小鼠肠组织长度、大体形态正常;敲除组小鼠肠组织水肿,长度缩短,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



注:A 为对照组;B 为敲除组。

图 1 两组小鼠肠组织大体形态学观察

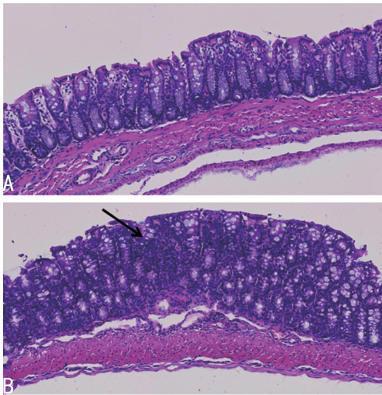
2.2 小鼠肠组织的镜下观察 结肠肠壁由内至外依次为黏膜层、黏膜肌层、黏膜下层、肌层和浆膜层。对照组小鼠肠道组织形态正常,可见明显的隐窝和大量杯状细胞,无炎性细胞浸润。敲除组小鼠肠道组织结构紊乱,肠道黏膜层轻微增生,有少量淋巴细胞浸润,见图 2。

2.3 OTU 分析 对照组小鼠和敲除组小鼠共产生 OTU 443 个,共有 OTU 273 个,其中对照组小鼠 OUT 326 个,敲除组小鼠 390 个,对照组小鼠特有 OTU 为 53 个,敲除组小鼠特有 OTU 为 117 个,明显高于对照组小鼠,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),满足归类分析要求,见图 3。

2.4 物种及其丰度分析

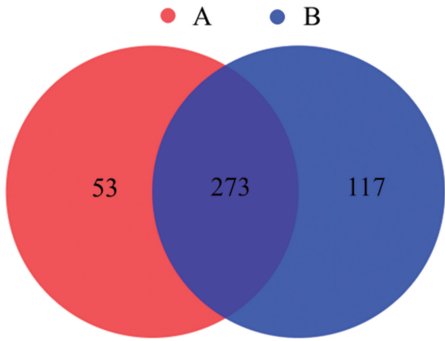
2.4.1 门分类水平比较 门分类水平主要检测出 10 个菌门,其中两组小鼠均以拟杆菌门和厚壁菌门为优势菌门,对照组和敲除组优势菌门的相对丰度百分比分别为 93.06% 和 95.10%。两组间优势菌门的相对丰度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组小鼠比较,敲除组小鼠中变形菌门显著减少,蓝细菌门显著增多,差异均有统计学意义($P<0.05$),见

图 4。



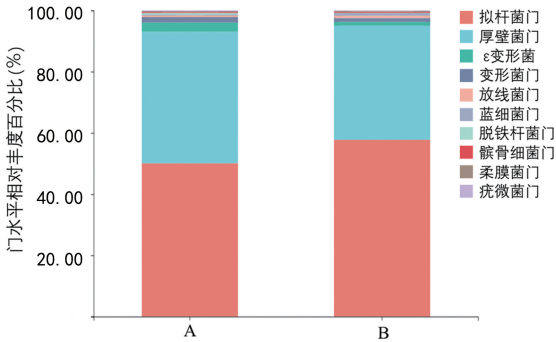
注:A 为对照组;B 为敲除组;箭头表示淋巴细胞浸润。

图 2 各组小鼠肠组织 HE 染色(×20)



注:A 为对照组;B 为敲除组。

图 3 肠道菌群的 OTU 交叠 Venn 图

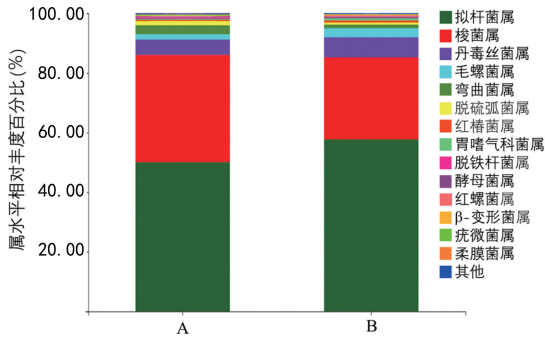


注:A 为对照组;B 为敲除组。

图 4 两组小鼠粪便样本中的肠道菌群门水平分布

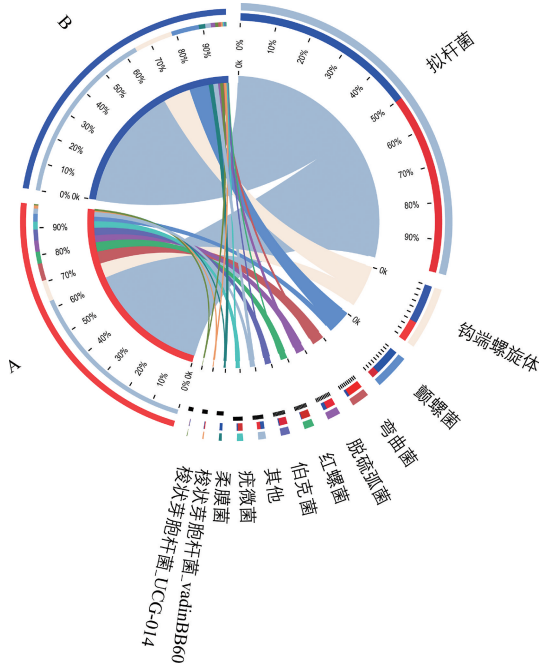
2.4.2 属分类水平比较 敲除组小鼠与对照组小鼠之间罗姆布茨菌属、真杆菌属、脱硫弧菌属、X III _ UCG-001 属、胃嗜气科菌属、Rs-E47_termite 属、双歧杆菌属、ASF356 属、布劳特菌属、毛螺菌属丰度比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 但除毛螺菌属外, 其他菌属相对丰度都很低。相对丰度居于前 5 位的分别为拟杆菌属、梭菌属、丹毒丝菌属、毛螺菌属和弯曲菌属, 见图 5。

2.5 差异细菌种类 对照组小鼠肠道菌群中弯曲菌、脱硫弧菌、红螺菌、伯克菌以及疣微菌相对丰度较高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而敲除组小鼠中颤螺菌和柔膜菌的相对丰度较高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 6。



注:A 为对照组;B 为敲除组。

图 5 2 组样本肠道菌群属水平分布



注:A 为对照组;B 为敲除组。

图 6 两组小鼠粪便样本中有差异的细菌种类

3 讨 论

多巴胺又名 3,4-二羟基苯乙胺, 是中枢神经系统中一种重要的儿茶酚胺类神经递质, 负责机体的重要功能, 包括情绪、认知、行为、运动控制、心血管功能和内分泌调节等, 其缺失可导致帕金森病的发生^[7]。多巴胺主要通过其受体发挥生物学功能, 多巴胺受体包括 D1 类受体和 D2 类受体; D1 类受体包括 DRD1 和 DRD5, D2 类受体包括 DRD2、DRD3 和 DRD4^[8]。目前针对多巴胺-DRD5 信号的研究主要集中在其对炎症和肿瘤等疾病的调控作用。

肠道菌群是定植在肠道内的庞大微生物群落。肠道菌群失调可导致微生物丰度、微生物构成和微生物代谢产物等发生变化, 从而影响肠道或远端器官的免疫功能, 甚至影响疾病的发生发展, 如“菌群-肠-脑轴”“菌群-肠-肝轴”的提出说明肠道菌群与脑、肝脏等器官及相关疾病存在密切联系^[9-10]。随着微生物分析技术和生物信息学的发展, 如高通量微生物 16S rDNA 基因测序技术极大地丰富了微生物的检测手段, 肠道菌群的研究进入一个新的阶段^[11]。本研究

通过检测对照组小鼠和敲除组小鼠肠道菌群的变化,探讨 DRD5 与肠道菌群紊乱的关系。

本研究结果显示,对照组小鼠和敲除组小鼠 OTU 数存在差异。进一步菌群差异分析发现,两组肠道菌群在门、纲、目、科、属、种水平存在差异。敲除组小鼠与对照组小鼠相比,蓝细菌门显著增加,其数目增多可导致神经系统疾病空泡性髓鞘病的发生^[12]。本研究结果发现,与对照组小鼠相比,敲除组小鼠中罗姆布茨菌丰度明显降低。有研究报道,80% 以上的肥胖患者肠道菌群中都存在罗姆布茨菌,提示罗姆布茨菌可能是超重人群中一种普遍的致病菌^[13]。对照组小鼠中真杆菌的丰度显著高于敲除组小鼠,真杆菌是属于后壁菌门、梭菌目、真杆菌科的一类革兰阳性菌,是人体肠道的重要组成部分。目前研究认为真杆菌可通过产生短链脂肪酸缓解宿主肠道炎症、2 型糖尿病和肥胖等症状,而且短链脂肪酸中的丁酸可修复肠道黏膜,抑制结直肠癌的发生^[14-15]。脱硫弧菌属增多是肠息肉和溃疡性结肠炎的一个重要特征^[16],本研究结果发现,DRD5 缺失后,脱硫弧菌属的丰度显著下降,提示靶向抑制 DRD5 可降低肠息肉和溃疡性结肠炎的发生风险。梭菌家族的 *XIII*_UCG-001 菌属相对丰度与血清总胆固醇、甘油三酯、血清低密度脂蛋白均呈正相关^[17],DRD5 缺失小鼠中 *XIII*_UCG-001 菌属的相对丰度均低于对照组小鼠。报道指出,在帕金森病患者中 *Gastranaerophilales* 菌属的丰度显著增加,提示 *Gastranaerophilales* 菌属可能参与了帕金森病的发病过程^[18]。本研究结果显示,DRD5 缺失后 *Gastranaerophilales* 菌属的丰度明显增加,提示 DRD5 的表达可影响帕金森病的发生发展。本研究结果显示,敲除组小鼠中双歧杆菌属丰度明显降低。双歧杆菌有助于肠道微生态平衡,促进肠上皮细胞分泌黏蛋白,促进潘氏细胞分泌 sIgA,在肠道局部产生免疫作用,对全身免疫反应也有一定调节作用^[19]。梭状芽孢杆菌 ASF356 的丰度与脂多糖(LPS)水平呈负相关,而与短链脂肪酸呈正相关^[20]。本研究结果发现,敲除组小鼠中梭状芽孢杆菌 ASF356 的相对丰度明显降低。布劳特菌属是一种具有抗炎特性的肠道共生菌,肠道中布劳特菌属的丰度与移植宿主病的病死率降低和总存活率提高有关^[21]。敲除组小鼠中,布劳特菌属的丰度明显增加。

本研究初步揭示 DRD5 缺失小鼠和野生型小鼠肠道菌群结构和多样性具有明显差异,未来在临床中可通过选择 DRD5 激动剂或抑制剂治疗相关疾病,如 DRD5 激动剂可通过提高双歧杆菌的相对丰度,促进肠道微生态的平衡,治疗肠道炎症。但本研究尚存在一定的局限性:由于 16S rRNA 基因测序技术的局限性及小鼠样本量不足,后续将增大样本量并采用宏基因组测序技术找出差异基因,进一步探讨 DRD5 影响肠

道菌群结构和多样性的内在机制,为不同疾病的诊治提供依据。

参考文献

- [1] SANCHEZ B, DELGADO S, BLANCO-MIGUEZ A, et al. Gut microbiota, and their influence on host health and disease[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(1): 1600240.
- [2] SHEN T D. Diet and gut microbiota in health and disease [J]. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 2017, 88: 117-126.
- [3] CHEN Z J, LIANG C Y, YANG L Q, et al. Association of Parkinson's disease with microbes and microbiological therapy[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 619354.
- [4] THOBOIS S, VINGERHOETS F, FRAIX V, et al. Role of dopaminergic treatment in dopamine receptor down-regulation in advanced Parkinson disease: a positron emission tomographic study[J]. *Arch Neurol* 2004, 61(11): 1705-1709.
- [5] HAMAMAH S, AGHAZARIAN A, NAZARYAN A, et al. Role of microbiota-gut-brain axis in regulating dopaminergic signaling[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 436.
- [6] SITTIPO P, CHOI J, LEE S, et al. The function of gut microbiota in immune-related neurological disorders: a review[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 154.
- [7] VALLONE D, PICETTI R, BORRELLI E. Structure and function of dopamine receptors [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000, 24(1): 125-132.
- [8] MARTEL J C, GATTI M S. Dopamine receptor subtypes, physiology and pharmacology: new ligands and concepts in schizophrenia[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1003.
- [9] ALBILLOS A, DE GOTTARDI A, RESCIGNO M. The gut-liver axis in liver disease: pathophysiological basis for therapy[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 558-577.
- [10] LYTE M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior [J]. *Plos Pathog*, 2013, 9(11): e1003726.
- [11] WOO P C, LAU S K, TENG J L, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(10): 908-934.
- [12] BREINLINGER S, PHILLIPS TJ, HARAM B N, et al. Hunting the eagle killer: a cyanobacterial neurotoxin causes vacuolar myelinopathy[J]. *Science*, 2021, 371(6536): eaax9050.
- [13] LIU J, YUE S, YANG Z, et al. Oral hydroxysafflor yellow A reduces obesity in mice by modulating the gut microbiota and serum metabolism[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 134: 40-50.
- [14] MUKHERJEE A, LORDAN C, ROSS R P, et al. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1802866. (下转第 1546 页)

• 论 著 •

血清 miR-92a-3p、miR-147 水平与脓毒症患者病情严重程度、炎症反应的关系及对预后的评估价值*

张艳敏¹, 王倩倩¹, 杨 珍¹, 刘海丽², 王晓艳³

邯郸市中心医院: 1. 急诊科; 2. 神经内科, 河北邯郸 056000; 3. 邯郸市邯山区疾病预防控制中心, 河北邯郸 056005

摘要:目的 探讨血清微小核糖核酸(miR)-92a-3p、miR-147 与脓毒症患者病情严重程度、炎症反应以及预后的关系, 分析 miR-92a-3p、miR-147 预测脓毒症患者预后的价值。方法 将 2018 年 3 月至 2022 年 6 月邯郸市中心医院急诊科收治的 157 例脓毒症患者(患者组)和 107 例体检健康者(对照组)纳入研究。患者组又根据脓毒症病情分为脓毒症组(66 例)和脓毒症休克组(91 例)。检测纳入研究者血清 miR-92a-3p、miR-147 以及炎症因子水平, 追踪临床结局。采用 Pearson 相关分析 miR-92a-3p、miR-147 水平与序贯器官衰竭(SOFA)评分、急性生理和慢性健康状态 II (APACHE II) 评分和炎症因子水平的相关性。采用多因素 Logistic 回归分析影响脓毒症患者预后的因素, 受试者工作特征(ROC)曲线分析 miR-92a-3p、miR-147 在脓毒症患者预后判断中的价值。结果 患者组血清 miR-92a-3p 水平高于对照组($P < 0.05$), miR-147 水平低于对照组($P < 0.05$)。脓毒症休克组血清 miR-92a-3p 水平高于脓毒症组($P < 0.05$), miR-147 水平低于脓毒症组($P < 0.05$)。脓毒症患者血清 miR-92a-3p 水平与白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、降钙素原(PCT)、C 反应蛋白(CRP)水平, APACHE II 评分、SOFA 评分均呈正相关($P < 0.05$), miR-147 水平与上述指标均呈负相关($P < 0.05$)。脓毒症休克、miR-92a-3p 水平升高是脓毒症患者预后不良的危险因素($P < 0.05$), miR-147 水平升高是保护因素($P < 0.05$)。miR-92a-3p、miR-147 联合用于预测脓毒症患者预后不良的曲线下面积(AUC)为 0.855, 高于两者单独使用(AUC 分别为 0.711、0.723)。结论 脓毒症患者血清 miR-92a-3p 水平增高, miR-147 水平降低, 而且与病情加重、炎症反应加剧以及预后不良有关。

关键词: 脓毒症; miR-92a-3p; miR-147; 炎症反应; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.13.002

中图法分类号: R446.11

文章编号: 1673-4130(2023)13-1541-06

文献标志码: A

The relationship between serum miR-92a-3p, miR-147 and severity of illness, inflammatory response in patients with sepsis and their value for prognosis*

ZHANG Yanmin¹, WANG Qianqian¹, YANG Zhen¹, LIU Haili², WANG Xiaoyan³

1. Department of Emergency; 2. Department of Internal Medicine-Neurology, Handan Central Hospital, Hebei 056000, China; 3. Hanshan District Center for Disease Control and Prevention, Handan, Hebei 056005, China

Abstract: Objective To explore the relationship between serum micro ribonucleic acid (miR)-92a-3p and miR-147 and the severity of illness, inflammatory response and prognosis of patients with sepsis, and to analyze the prognostic value of miR-92a-3p and miR-147 in patients with sepsis. **Methods** A total of 157 patients with sepsis (experimental group) who were admitted to the emergency department of Handan Central Hospital and 107 healthy people who underwent physical examination in outpatient service (control group) from March 2018 to June 2022 were enrolled in the study. According to the severity of illness of sepsis, they were divided into sepsis group (66 cases) and septic shock group (91 cases). The level of serum miR-92a-3p and miR-147 and the level of serum inflammatory factors were detected, and the clinical outcome was tracked. Pearson correlation was used to analyze the correlation between miR-92a-3p and miR-147 and sequential organ failure (SOFA) score, acute physiological and chronic health status II (APACHE II) score and inflammatory factors. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the prognostic factors of patients with

* 基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划(20181678)。

作者简介: 张艳敏, 女, 副主任医师, 主要从事急诊医学的相关研究。

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1176.R.20230629.1647.004.html> (2023-06-30)

sepsis. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the prognostic value of miR-92a-3p and miR-147 in patients with sepsis. **Results** The level of serum miR-92a-3p in the experimental group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and the level of miR-147 was lower than that in the control group ($P<0.05$). The level of serum miR-92a-3p in the septic shock group was higher than that in the sepsis group ($P<0.05$), and the level of miR-147 was lower than that in the sepsis group ($P<0.05$). The level of serum miR-92a-3p in patients with sepsis was positively correlated with the levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), APACHE II score and SOFA score ($P<0.05$), the level of miR-147 was negatively correlated with the above indexes ($P<0.05$). Septic shock and elevated miR-92a-3p were risk factors for poor prognosis in patients with sepsis ($P<0.05$), and elevated miR-147 was protective factor ($P<0.05$). The area under curve (AUC) that combined miR-92a-3p and miR-147 to predict the poor prognosis of patients with sepsis was 0.855, which was higher than 0.711 and 0.723 predicted by single index. **Conclusion** The expression of serum miR-92a-3p is increased, and the expression of miR-147 is decreased in patients with sepsis, which are related to the aggravation of the disease, the aggravation of inflammatory reaction and the poor prognosis.

Key words: sepsis; miR-92a-3p; miR-147; inflammatory response; prognosis

脓毒症是宿主对感染反应失调引起的全身多器官功能障碍性疾病, 尽管近年来抗感染治疗的医疗技术取得了长足进步, 但脓毒症发病率仍持续上升, 病死率一直居高不下^[1]。微小核糖核酸(miRNAs)作为一类小型单链非编码调控核糖核酸(RNA), 广泛参与细胞增殖、分化、发育、代谢和凋亡等生物过程, 越来越多的证据表明, miRNAs 具有免疫和炎症反应调控作用, 其在脓毒症患者中存在差异性表达, 是脓毒症诊断、治疗、预后评估的潜在标志物^[2-3]。研究显示, miR-92a-3p 可通过激活核因子- κ B(NF- κ B)及其下游炎症通路促进炎症反应, 参与糖尿病患者心血管疾病进展过程^[4]。miR-147 被证实可通过 Toll 样受体-4 (TLR4)调节巨噬细胞功能和炎症, 与冠状动脉粥样硬化和炎症性肠病发病有关^[5]。然而, miR-92a-3p、miR-147 在脓毒症的报道十分少见, 是否与脓毒症炎症反应和预后有关尚不清楚, 鉴于此, 本研究尝试检测脓毒症患者血清 miR-92a-3p、miR-147 水平, 评估其与脓毒症患者炎症细胞因子水平及住院期间临床结局的关系, 以期对脓毒症的临床诊治和预后分析提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2018 年 3 月至 2022 年 6 月邯郸市中心医院急诊科收治的 157 例脓毒症患者纳入研究作为患者组, 男 97 例、女 60 例, 年龄 41~63 岁、平均(52.77 $\pm$ 6.03)岁, 体重指数 19~26 kg/m²、平均(23.41 $\pm$ 2.11)kg/m², 脓毒症病因: 感染(97 例)、烧伤(23 例)、创伤(34 例)、其他(3 例)。纳入标准: (1)存在微生物学证实的感染, 序贯器官衰竭(SOFA)评分较基线上升 $\geq$ 2 分, 而且符合《第三次国际共识: 脓毒症和脓毒性休克新定义》中脓毒症的诊断标准^[6]; (2)住院时间 $>$ 24 h。排除标准: (1)血液肿瘤或实体肿瘤; (2)人类免疫缺陷病毒感染或自身免疫性疾病;

(3)妊娠期患者。脓毒症休克的诊断标准: 出现持续性低血压, 充分容量复苏后仍需血管活性药来维持平均动脉压($\geq$ 65 mm Hg), 血乳酸水平 $>$ 2 mmol/L^[6]。根据是否合并脓毒症休克将患者分为脓毒症休克组(66 例)和脓毒症组(91 例)。另选择 107 例同期邯郸市中心医院体检健康且自愿加入本研究者作为对照组, 男 59 例、女 48 例, 年龄 40~65 岁、平均(52.95 $\pm$ 6.71)岁, 体重指数 20~26 kg/m²、平均(23.15 $\pm$ 2.03)kg/m²。患者组和对照组性别、年龄、体重指数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。纳入研究者或家属对本研究知情同意并签署知情同意书。本研究获得邯郸市中心医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 miR-92a-3p、miR-147 的检测 受试者入组后当日采集静脉血 3 mL, 取血液凝固后上层液体离心 5 min(2 000 r/min, 离心半径 10 cm)分离得到待测血清标本, 于-80℃保存。标本检测时, 室温复融, 采用 Trizol 试剂(美国 Ambion 公司)提取总 RNA, 取 50 ng 总 RNA, 采用 High-Capacity cDNA RT 试剂盒(赛默飞世尔科技公司)逆转录为 cDNA。StepOne-Plus™ 实时荧光定量 PCR 系统(赛默飞世尔科技公司)上进行三次重复实时荧光定量 PCR(qPCR)检测。反应体系: DNA 模板 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, SYBR Green Real-time PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司)2 μ L, RNase-Free dd H₂O 21 μ L。反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 2 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。miR-92a-3p、miR-147 和 U6 的引物均由广州瑞博生物有限公司合成, 引物序列如下。miR-92a-3p: 正向 5'-CGCGTATTGCACTTGTCCC-3', 反向 5'-AGTGCAGGGTCCGAGG-TATT-3'; miR-147: 正向 5'-GTGTGCGGAAATGCTT-3', 反向 5'-TCAACTGGTGTCGTGG-3'; U6:

flammation and diseases[J]. *Microna*, 2021, 10(2): 91-96.

[6] 罗红敏. 第三次国际共识:脓毒症和脓毒性休克新定义[J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28(5): 400.

[7] 金银,顾金华,钱福初. 降钙素原及 APACHE II 评分对脓毒症的临床价值[J]. *放射免疫学杂志*, 2013, 26(5): 638-640.

[8] VINCENT J L, MORENO R, TAKALA J, et al. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure; on behalf of the working group on sepsis-related problems of the european society of intensive care medicine[J]. *Intensive Care Med*, 1996, 22(7): 707-710.

[9] TAEB A M, HOOPER M H, MARIK P E. Sepsis: current definition, pathophysiology, diagnosis, and management[J]. *Nutr Clin Pract*, 2017, 32(3): 296-308.

[10] HUANG M, CAI S, SU J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5376.

[11] MAHESH G, BISWAS R. MicroRNA-155: a master regulator of inflammation[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2019, 39(6): 321-330.

[12] MARQUES-ROCHA J L, SAMBLAS M, MILAGRO F I, et al. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases[J]. *FASEB J*, 2015, 29(9): 3595-3611.

[13] 孙丹,周文婷,吴绪峰,等. miR-92a-3p 靶向 LATS2 对宫颈癌细胞的增殖、凋亡和侵袭的影响和分子机制[J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(10): 1784-1790.

[14] WU H, LI S. Long non-coding RNA MT1JP exerts anti-cancer effects in breast cancer cells by regulating miR-92-3p[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(1): 59-67.

[15] MAO Q Q, CHEN J J, XU W J, et al. MiR-92a-3p promotes the proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting KLF2[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(4): 1333-1341.

[16] ZHANG X, GAO B, HUANG Y, et al. MiR-92a-3p regulates trypsinogen activation via Egr1 in AR42J cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4140-4150.

[17] XU F, ZHOU F. Inhibition of microRNA-92a ameliorates lipopolysaccharide-induced endothelial barrier dysfunction by targeting ITGA5 through the PI3K/Akt signaling pathway in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106060.

[18] 彭巍. 脂多糖诱导肺泡上皮细胞分泌体通过 miR-92a-3p 调控肺泡巨噬细胞炎症反应[D]. 南昌:南昌大学, 2020.

[19] ZUO X, WANG L, BAO Y, et al. The ESX-1 virulence factors downregulate miR-147-3p in mycobacterium marinum-infected macrophages[J]. *Infect Immun*, 2020, 88(6): e00088-20.

[20] WU C G, HUANG C. MicroRNA-147 inhibits myocardial inflammation and apoptosis following myocardial infarction via targeting HIPK2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6279-6287.

[21] QIU P, LIU Y, ZHANG J. Review: the role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis[J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 6-19.

[22] KIM B, GUAREGUA V, CHEN X, et al. Characterization of a murine model system to study MicroRNA-147 during inflammatory organ injury[J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1426-1440.

(收稿日期:2022-10-09 修回日期:2023-02-10)

(上接第 1540 页)

[15] JONES R B, ALDERETE T L, KIM J S, et al. High intake of dietary fructose in overweight/obese teenagers associated with depletion of Eubacterium and Streptococcus in gut microbiome[J]. *Gut Microbes*, 2019, 10(6): 712-719.

[16] KUSHKEVYCH I, DORDEVIC D, KOLLAR P. Analysis of physiological parameters of *Desulfovibrio* strains from individuals with colitis[J]. *Open Life Sci*, 2018, 13: 481-488.

[17] SONG X, ZHONG L, LYU N, et al. Inulin can alleviate metabolism disorders in OB/OB mice by partially restoring leptin-related pathways mediated by gut microbiota[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2019, 17(1): 64-75.

[18] ROSARIO D, BIDKHORI G, LEE S, et al. Systematic analysis of gut microbiome reveals the role of bacterial folate and homocysteine metabolism in Parkinson's disease[J]. *Cell Rep*, 2021, 34(9): 108807.

[19] KIM S W, KIM H M, YANG K M, et al. Bifidobacterium lactis inhibits NF-kappaB in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(9): 1514-1525.

[20] ZHANG X Y, CHEN J, YI K, et al. Phlorizin ameliorates obesity-associated endotoxemia and insulin resistance in high-fat diet-fed mice by targeting the gut microbiota and intestinal barrier integrity[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1-18.

[21] JENQ R R, TAUR Y, DEVLIN S M, et al. Intestinal blautia is associated with reduced death from graft-versus-host disease[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(8): 1373-1383.

(收稿日期:2022-09-10 修回日期:2023-03-11)