基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001245

乌司他丁下调 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 MiR-21 表达及初步机制研究

肖 玲[1],马 渝[2],周 巧[1],周发春[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院重症医学科,重庆 400016;2. 重庆市急救医疗中心 ICU,重庆 400014)

【摘 要】**目的**:观察在脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 产生炎症反应中微小 RNA-21(MicroRNA-21,miR-21)的表达情况,以及乌司他丁(Ulinastatin,UTI)在炎症反应中对 miR-21 的干预作用。**方法**:设置正常组、模型组(LPS 500 ng/mL 刺激组)、实验组(LPS 500 ng/mL+UTI 1 000 U/mL 组)和阴性实验对照组(UTI 1 000 U/mL),观察 RAW264.7 细胞生长状态;四甲基偶氮唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)法检测不同浓度 UTI 对 RAW264.7 细胞活性的影响;用不同浓度 UTI 预处理 2 h 后,LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞诱导炎症模型,RT-PCR 检测肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)mRNA、白介素-6(interleukin-6,IL-6)mRNA、miR-21 的表达。**结果**:①UTI 对 RAW264.7 细胞的毒性作用:UTI 浓度小于 1 000 U/mL 时对 RAW264.7 细胞无毒性作用,比较差异无统计学意义(P=0.117)。②与正常组相比,在不同浓度(100,250,500 ng/mL)LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,TNF-α mRNA 及 IL-6 mRNA 的分泌(1.311 ± 0.037,1.549 ± 0.039,1.667 ± 0.059;1.167 ± 0.019,1.518 ± 0.058,1.740 ± 0.071)与基础分泌量(1.000 ± 0.000)相比明显升高(P=0.000),且 miR-21 表达(1.082 ± 0.114,1.671 ± 0.087,2.789 ± 0.107)明显升高,并随 LPS 浓度升高而增加(P=0.000);③不同浓度 UTI(10,100,1 000 U/mL)能有效降低 TNF-α mRNA 及 IL-6 mRNA(1.000 ± 0.000,1.998 ± 0.212,1.421 ± 0.100,1.122 ± 0.154,0.991 ± 0.139;1.000 ± 0.000,1.880 ± 0.045,1.179 ± 0.108,1.053 ± 0.070,0.960 ± 0.088)的表达,并降低 miR-21(1.000 ± 0.000,2.789 ± 0.107,2.675 ± 0.135,2.258 ± 0.170,1.369 ± 0.279)的表达,差异有统计学意义(P_1=0.000,P_2=0.000,P_3=0.000)。**结论**:LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞可促进 miR-21 表达升高,其表达水平在一定程度上反映了细胞炎症反应状态;UTI 可通过下调 miR-21 抑制相关信号通路从而在免疫炎症反应中发挥保护作用。

【关键词】微小 RNA-21;乌司他丁;炎性反应

【中图分类号】R459.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-10-09

Ulinastatin down regulates MiR-21 expression in murine macrophages induced by LPS and its preliminary mechanism

Xiao Ling[1], Ma Yu[2], Zhou Qiao[1], Zhou Fachun[1]

(1. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of ICU, Chongqing Emergency Medical Center)

【Abstract】***Objective***: To detect the expression of microRNA-21 in lipopolysaccharide (LPS) induced injured models of mouse RAW264.7 macrophages and the influence of Ulinastatin(UTI) on the expression of miR-21. ***Methods***: The growth status of RAW264.7 cells was observed in the normal group, the model group (LPS), the experimental group (LPS + UTI) and the negative control group (drug-non-stimulation group). Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to determine the effect of different concentration of UTI on the activity of RAW264.7 cells. After pre-treatment with different concentrations of UTI for 2 h, the expressions of TNF-α mRNA, IL-6 mRNA and miR-21 were detected by RT-PCR in RAW264.7 cells induced by LPS. ***Results***: ①The toxic effects of UTI on RAW264.7 cell: it was non-toxic of UTI on RAW264.7 cells while the concentrations were less than 1 000 U/mL; there was no statistically significant difference(P=0.117). ②After RAW264.7 cells being treated by LPS with different concentrations (100, 250, 500 ng/mL), the expressions of miR-21 (1.000 ± 0.000, 1.082 ± 0.114, 1.671 ± 0.087, 2.789 ± 0.107) and TNF-α and IL-6(1.311 ± 0.037, 1.549 ± 0.039, 1.667 ± 0.059; 1.167 ± 0.019, 1.518 ± 0.058, 1.740 ± 0.071) were up-regulated respectively

作者介绍:肖 玲,Email:603143602@qq.com,研究方向:脓毒症。

通信作者:周发春,Email:zfc88@126.com。

基金项目:重庆市卫生计生委科研资助项目(编号:2016ZDXM030)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170426.1522.044.html (2017-04-26)

in a dose-dependent manner(P_1=0.000,P_2=0.000,P_3=0.000). ③And the effect could be attenuated by UTI in different concentrations (10,100,1 000 U/mL)(miR-21:1.000 ± 0.000,2.789 ± 0.107,2.675 ± 0.135,2.258 ± 0.170,1.369 ± 0.279,P=0.000;TNF-α:1.000 ± 0.000,1.998 ± 0.212,1.421 ± 0.100,1.122 ± 0.154,0.991 ± 0.139,P=0.000;IL-6:1.000 ± 0.000,1.880 ± 0.045,1.179 ± 0.108,1.053 ± 0.070,0.960 ± 0.088,P=0.000). ***Conclusion***: The expression of miR-21 is significantly changed after LPS stimulating RAW264.7 macrophages, indicated that it is related to the degree of inflammation. UTI could down-regulate the miR-21-related signaling pathway to play a protective role in immune and inflammatory response.

【Key words】microRNA-21; Ulinastatin; inflammation

脓毒症是临床危重患者死亡的主要原因之一。过度炎症反应和免疫功能紊乱是脓毒症的主要病理生理机制。研究表明：脂多糖(lipopolysaccharide，LPS)与细胞表面信号受体结合后，激活细胞质内一系列信号转导途径，产生一系列炎症介质，介导组织、器官损害[1]，诱导脓毒症发生。miRNA 是一系列单链非编码 RNA，其表达能够在细胞受到微生物刺激后迅速发生变化，参与机体固有免疫应答过程[2]。其中，微小 RNA-21(MicroRNA-21，miR-21)在多种炎性状态下表达都有升高，广泛参与调节机体抗炎免疫反应。

乌司他丁(Ulinastatin，UTI)是存在于健康成年男性新鲜尿液中一种糖蛋白，具有抑制炎症介质释放、清除氧自由基和改善免疫功能的作用[3-4]，近年来 UTI 对脓毒症的临床疗效都得到一定肯定，有研究表明 UTI 可通过减轻脓毒症患者的免疫反应，缩短患者住院时间，降低病死率，改善患者预后[5-6]，但其详细的作用机制还不十分明确。近来有研究表明，UTI 可能参与调节 miR-21 的表达[7]。

RAW264.7 细胞为小鼠单核巨噬细胞株，LPS 刺激后可在一定程度上模拟体内炎症反应过程，常用来观察炎症反应中炎症介质的表达及进行信号转导机制研究。为从细胞水平及分子机制角度探讨 UTI 在脓毒症中的作用，本实验以 RAW264.7 细胞株为研究对象，初步探讨 UTI 在 LPS 刺激 RAW264.7 细胞引起的炎症反应中是否通过参与调控 miR-21 的表达及相关信号机制从而发挥免疫保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

小鼠 RAW264.7 细胞(上海中国科学院细胞库)；UTI(广东天普生化医药股份有限公司，批号 031503133)；LPS(*E.coli* 055:B5，美国 sigma 公司)；高糖 DMEM(美国 Hyclone 公司)；胎牛血清(德国 PAN 公司)；Trizol 试剂(大连宝生物公司)、逆转录反应试剂盒及 PCR 扩增试剂盒(日本 TOYOBO 公司)；引物(上海生物工程技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 RAW264.7 细胞接种于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中，37 ℃、5%CO_2 恒温孵箱中培养，每 2 天更换 1 次培养液，根据细胞生长情况进行传代。

1.2.2 细胞形态观察 将细胞按每孔 6×10^5 个/孔接种到 6 孔板(2 mL)中，37 ℃、5%CO_2 恒温孵箱中培养 12 h 后，去掉旧培养基。设置正常组、模型组(LPS 刺激组)、实验组(UTI 1 000 U/mL)和阴性实验对照组(加药不刺激组)，UTI 孵育 2 h 后，加入终浓度为 500 ng/mL 的 LPS 刺激，12 h 后显微镜下拍照。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞活性 RAW264.7 细胞以 10^4 个/孔接种于 96 孔板中，置于 CO_2 孵箱中培养 24 h 待细胞贴壁后，加入不同浓度的 UTI(10、100、1 000 U/mL)孵育 24 h，PBS 洗 2 次，每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL，继续孵育 4 h 后弃上清，每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL，避光摇床摇匀 15 min，于 570 nm 波长测定吸光度(absorbance，A)值。

1.2.4 qRT-PCR RAW264.7 细胞按 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板(2 mL)中，37 ℃、5%CO_2 恒温孵箱中培养 12 h 后，去掉旧培养基。设置正常组，采用不同浓度 LPS(100、250、500 ng/mL)刺激 6 h，检测 TNF-α mRNA、IL-6 mRNA 表达水平，筛选出 LPS 最佳刺激浓度；设置正常组，采用 LPS 500 ng/mL 分别刺激 6、12、24 h，检测 TNF-α mRNA 表达水平，筛选出 LPS 最佳刺激时间；设置正常组，加入不同浓度 UTI(10、100、1 000 U/mL)(正常对照孔加入等体积的培养基) 孵育 2 h，再加入 500 ng/mL LPS 刺激 12 h 后弃上清，收集细胞。用 Trizol 法提取总 RNA，测定 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$>1.8，定量后取总 RNA，严格按照反转录试剂盒说明书进行逆转录。IL-6 引物上游：5'-CCCCTGACCCAACCACAAATG-3'；IL-6 下游：5'-TTGCCG-AAGAGCCCTCAGG-3'。TNF-α 引物上游：5'-GGCCCAGA-CCCTCACACTCACAAAC-3'；下游：5'-GCTGACGGTGTGGG-TGAGGAG-3'。β-actin 引物上游：5'-GTTTTGTTTTGGCG-CTTTTGAC-3'；下游：5'-CGCGACCATCCTCCTCTTAG-3。miR-21 逆转录引物：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-

TATTCGCACTGGATACGACTCAACA-3'。PCR 扩增引物上游：5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'；下游：5'-GCCGCTAGC-TTATCAGACTGATGT-3'。内参 U6 反转录引物序列：5'-AA-CGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 扩增引物上游：5'-CTC-GCTTCGGCAGCACA-3'，下游：5'-AACGCTTCACGAATTTG-CGT-3'。反应体系 20 μL，反应条件 96 ℃ 6 min，96 ℃ 15 s，57 ℃ 30 s，72 ℃延伸 30 s，循环 35 次。TNF-α、IL-6、β-actin PCR 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶跑电泳，凝胶电泳成像系统拍照，用Fusion 软件进行分析。各样品的目的 miR-21 和内参（U6）分别进行 qRT-PCR，数据采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法进行分析。

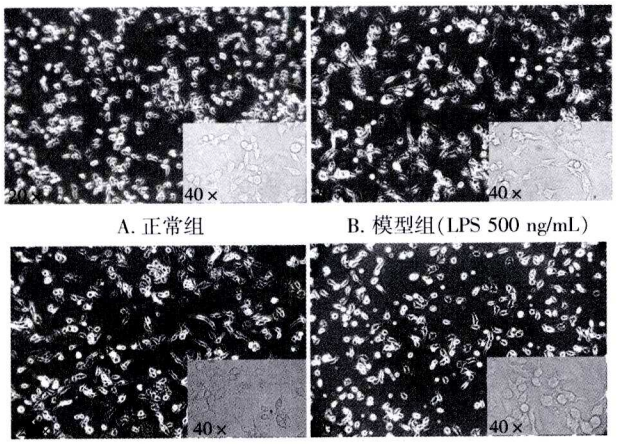
1.3 统计学处理

采用 GraphPad 5.0 及 SPSS 19.0 统计分析软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 RAW264.7 细胞在 LPS 刺激后的形态学改变

RAW264.7 是一类类单核细胞，具有很强的粘附能力和吞噬抗原的能力[8]。在微生物学、免疫学等中常作为实验性细胞，它的理想形态是小圆而透亮，较少有伪足和类似“触角”样的东西[9]。细胞在 UTI（1 000 U/mL）预处理 2 h，LPS（500 ng/mL）刺激 12 h 后，分别在 20/40 倍显微镜下观察（图 1）。从实验结果可以看出，正常组细胞分布均匀，细胞透亮，以小圆形居多，不规则形状较少；而模型组细胞则出现大量细长伪足，形态多不规则，呈梭形和不规则形，胞内呈大量“空泡状”；实验组细胞伸出细长伪足，胞内“空泡状”，形态虽有呈不规则状态，但较模型组少；阴性对照组和正常组类似。由此可见，RAW264.7 细胞在受到 LPS 刺激后，由于吞噬了外来物质，细胞形态发生明显变化。



A. 正常组　B. 模型组（LPS 500 ng/mL）

C. 实验组（LPS 500 ng/mL +UTI 1 000 U/mL）　D. 阴性实验对照组（UTI 1 000 U/mL）

图 1 20/40 倍显微镜下 RAW264.7 细胞形态

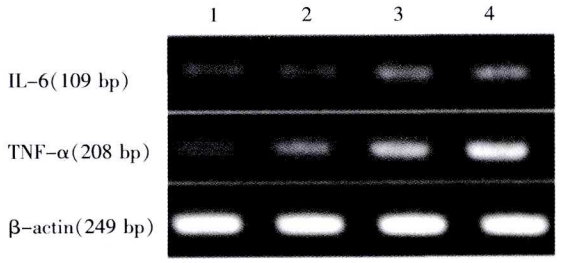
Fig.1 Morphology of the 20/40 times under microscope

2.2 UTI 对 RAW264.7 细胞的毒性作用

UTI 不同浓度组（10、100、1 000 U/mL）和对照组对 RAW264.7 细胞活性的影响的比较（88.42 ± 7.00、86.56 ± 8.23、100.00 ± 5.69、93.37 ± 3.73），差异无统计学意义（F=2.693，P=0.117）。

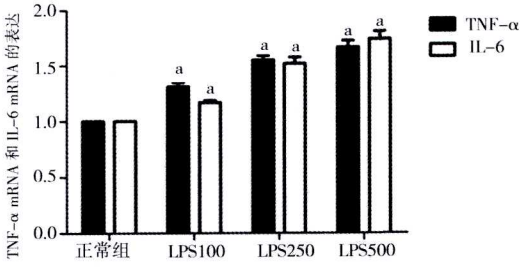
2.3 不同浓度 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达变化

采用 qRT-PCR 检测 6 h 时不同浓度 LPS 组和正常组 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达，结果表明，与正常组相比，LPS 浓度为 100、250、500 ng/mL 时，小鼠 RAW264.7 细胞中的 TNF-α mRNA 及 IL-6 mRNA 表达水平均升高（1.000 ± 0.000、1.311 ± 0.037、1.549 ± 0.039、1.667 ± 0.059；1.000 ± 0.000、1.167 ± 0.019、1.518 ± 0.058、1.740 ± 0.071），并在 500 ng/mL 时，TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达最高（1.667 ± 0.0592、1.740 ± 0.071）。各组比较差异有统计学意义（F=160.800，P=0.000；F=154.100，P=0.000）（图 2，表 1）。



1：正常组；2：LPS 100 ng/mL 组；3：LPS 250 ng/mL 组；4：LPS 500 ng/mL 组

A. 不同浓度 LPS 刺激细胞后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达



a：与正常对照组比较，P<0.05

B. 不同浓度 LPS 刺激细胞后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的相对表达分析

图 2 不同浓度 LPS 刺激细胞后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达

Fig.2 Expression of TNF-α mRNA and IL-6 mRNA induced by LPS under different concentrations

2.4 LPS 时间分析

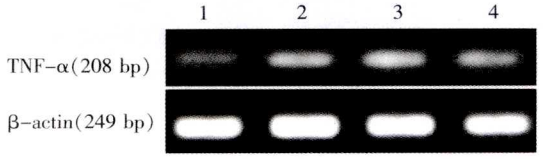
采用 LPS 500 ng/mL 刺激小鼠 RAW264.7 细胞，采用 PCR 检测不同时间 LPS 组和正常组的 TNF-α mRNA 表达，结果表明，与正常组相比，LPS 刺激 6、12、24 h 时，小鼠 RAW264.7 细胞中的 TNF-α mRNA 表达水平均升高（1.000 ±

表 1 不同浓度 LPS 刺激细胞后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达

Tab.1 Expression of TNF-α mRNA and IL-6 mRNA induced by LPS under different concentrations

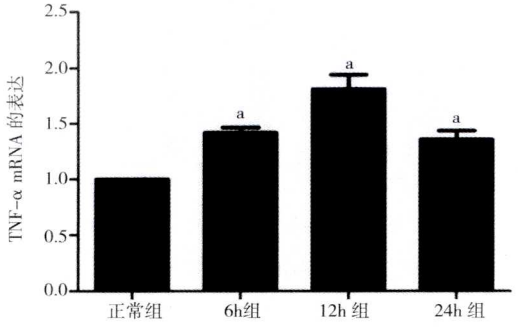
组别		TNF-α mRNA 表达	IL-6 mRNA 表达
正常组(A)		1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
LPS 100 ng/mL 组(B)		1.311 ± 0.037	1.167 ± 0.019
LPS 250 ng/mL 组(C)		1.549 ± 0.039	1.518 ± 0.058
LPS 500 ng/mL 组(D)		1.667 ± 0.059	1.740 ± 0.071
整体分析	F 值,P 值	160.800,0.000	154.147,0.000
A vs. B	LSD-t 值,P 值	9.488,0.000	4.378,0.002
A vs. C	LSD-t 值,P 值	16.725,0.000	13.595,0.000
A vs. D	LSD-t 值,P 值	20.316,0.000	19.403,0.000
B vs. C	LSD-t 值,P 值	7.237,0.000	9.217,0.000
C vs. D	LSD-t 值,P 值	3.592,0.007	5.808,0.000

0.000、1.417 ± 0.048、1.811 ± 0.129、1.354 ± 0.082），并在 12 h 时，TNF-α mRNA 表达最高（1.811 ± 0.129）。LPS组与正常组差异有统计学意义（整体分析：F=51.610，P=0.000；两两比较 t_D，P 值：正常组 vs. 6 h 组：6.370，0.000；正常组 vs. 12 h 组：12.399，0.000；正常组 vs. 24 h 组：5.413，0.001；6 h组 vs. 12 h组：6.028，0.000；6 h 组 vs. 24 h 组：0.957，0.367；12 h 组 vs. 24 h 组：6.985，0.000），如图 3 所示。



1：正常组；2：6 h 组；3：12 h 组；4：24 h 组

A. LPS 刺激细胞不同时间后 TNF-α mRNA 的表达



a：与正常对照组比较，P<0.05

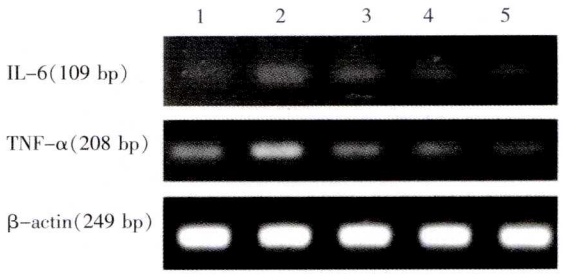
B. LPS 刺激细胞不同时间后 TNF-α mRNA 的相对表达分析

图 3 LPS 刺激细胞不同时间后 TNF-α mRNA 的表达

Fig.3 Expression of TNF-α mRNA induced by LPS for different hours

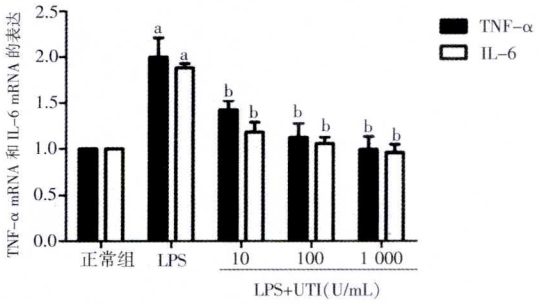
2.5 不同浓度 UTI 对 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞中 TNF-α mRNA 及 IL-6mRNA 表达的影响

采用 qRT-PCR 检测 12 h 时不同浓度 UTI 组和正常组的 TNF-α mRNA 表达，结果表明，与正常组相比，LPS 浓度为 500 ng/mL 时，小鼠 RAW264.7 细胞中的 TNF-α mRNA 及 IL-6 mRNA 表达水平明显升高，并随 UTI 浓度的升高而降低（1.000 ± 0.000、1.998 ± 0.212、1.421 ± 0.100、1.122 ± 0.154、0.991 ± 0.139；1.000 ± 0.000、1.880 ± 0.045、1.179 ± 0.108、1.053 ± 0.070、0.960 ± 0.088）。各组比较差异有统计学意义（F=27.550，P=0.000；F=82.540，P=0.000）（图 4，表 2）。



1：正常组；2：模型组；3：UTI 10 U/mL 组；4：UTI 100 U/mL 组；5：UTI 1 000 U/mL 组

A. 不同浓度 UTI 处理后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达



a：与正常对照组比较，P<0.05；b：与 LPS 组比较，P<0.05

B. 不同浓度 UTI 处理后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的相对表达分析

图 4 不同浓度 UTI 处理后 TNF-α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达

Fig.4 Expression of TNF-α mRNA and IL-6 mRNA treated with UTI under different concentrations

表 2 不同浓度 UTI 处理后 TNF-α mRNA、IL-6 mRNA 及 miR-21 表达及分析比较

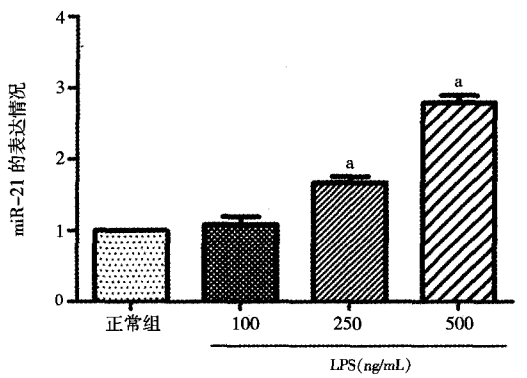
Tab.2 Expression of TNF-α mRNA, IL-6 mRNA and miR-21 treated with UTI under different concentrations

组别		TNF-α mRNA 表达	IL-6 mRNA 表达	miR-21表达
正常组（A）		1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
LPS（B）		1.998 ± 0.212[a]	1.880 ± 0.045[a]	2.789 ± 0.107[a]
LPS+UTI 10 U/mL（C）		1.421 ± 0.100[b]	1.179 ± 0.108[b]	2.675 ± 0.135[b]
LPS+UTI 100 U/mL（D）		1.122 ± 0.154[b]	1.053 ± 0.070[b]	2.258 ± 0.170[b]
LPS+UTI 1 000 U/mL（E）		0.991 ± 0.139[b]	0.960 ± 0.088[b]	1.369 ± 0.279[b]
整体分析	F 值，P 值	27.550，0.000	82.540，0.000	69.810，0.000
A vs. B	t_D 值，P 值	8.738，0.000	14.833，0.000	13.262，0.000
B vs. C	t_D 值，P 值	5.050，0.000	11.819，0.000	0.847，0.417
B vs. D	t_D 值，P 值	7.668，0.000	13.939，0.000	3.937，0.003
B vs. E	t_D 值，P 值	8.815，0.000	15.506，0.000	10.525，0.000
C vs. E	t_D 值，P 值	3.765，0.004	3.687，0.004	9.678，0.000
D vs. E	t_D 值，P 值	1.147，0.278	1.567，0.148	6.588，0.000

注：a，与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与 LPS 组比较，$P<0.05$

2.6 在 LPS 刺激后 miR-21 表达的变化

采用 qRT-PCR 检测不同浓度 LPS 组和正常组的 miR-21 表达，结果表明，与正常组相比，LPS 浓度为 100、250、500 ng/mL 时，小鼠 RAW264.7 细胞中的 miR-21 表达水平均升高，并随 LPS 浓度的升高而表达增加（1.000 ± 0.000，1.082 ± 0.114，1.671 ± 0.087，2.789 ± 0.107）。各组比较差异有统计学意义（整体分析：F=255.262，P=0.000；两两比较 t_D，P 值：正常组 vs. 100 ng/mL 组：1.120，0.295；正常组 vs. 250 ng/mL 组：9.180，0.000；正常组 vs. 500 ng/mL 组：24.496，0.001；100 ng/mL 组 vs. 250 ng/mL 组：8.059，0.000；100 ng/mL 组 vs. 500 ng/mL 组：23.376，0.367；250 ng/mL 组 vs. 500 ng/mL 组：15.316，0.000），如图 5 所示。



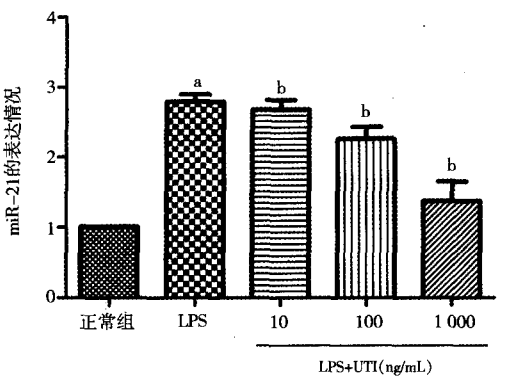
a：与正常对照组比较，$P<0.05$

图 5 不同浓度 LPS 刺激细胞后 miR-21 的表达

Fig.5 Expression of miR-21 induced by LPS under different concentrations

2.7 LPS 刺激后，不同浓度 UTI 对 miR-21 表达的影响

采用 qRT-PCR 检测不同浓度 UTI 组和正常组的 miR-21 表达，与 LPS 浓度为 500 ng/mL 相比时，小鼠 RAW264.7 细胞中的 miR-21 表达水明显升高，并随 UTI 浓度的升高而降低（分别为 1.000 ± 0.000，2.789 ± 0.107，2.675 ± 0.135，2.258 ± 0.170，1.369 ± 0.279），各组比较差异有统计学意义（整体分析：F=69.810，P=0.000）（图 6，表 2）。



a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与 LPS 组比较，$P<0.05$

图 6 不同浓度 UTI 处理后 miR-21 的表达

Fig.6 Expression of miR-21 treated with UTI under different concentrations

3 讨 论

研究表明，在机体受到 LPS 等外界刺激后巨噬细胞系统是启动炎症介质产生的中心细胞，同时也是调控机体免疫系统的主要细胞。小鼠单核-巨噬细胞 RAW264.7 细胞系是来源于小鼠腹腔中的巨噬细胞株，能够稳定传代培养。因此，可用 LPS 刺激 RAW264.7 建立免疫炎症调节过程的细胞模型。当巨噬细胞吞噬外来物质例如抗原后，就会释放出趋

化因子，趋化因子能促使细胞伪足进行延伸，增强细胞粘附攀爬能力，细胞形态也大多由小圆形变为长梭形类似泡状的大细胞[9]。由实验结果观察可知，正常组细胞和阴性对照组细胞在分布、形态和大小上差异不大，结合细胞毒性试验结果，表明只加 UTI（1 000 U/mL）对细胞形态和生长增殖均没有太大影响；模型组和实验组的细胞形态与正常组相比差异明显，有较多触角伪足，表明细胞在被 LPS 刺激后，即吞噬了外来物质，从而自身形态和生长状况发生了显著改变；实验组细胞形态与模型组细胞相比较，虽然两者均有较多触角和伪足，但是实验组细胞形态维持相对较模型组好，形态变异比模型组稍小，说明 UTI 作为一种外来物质，当与 LPS 同时作用于细胞时，有可能与 LPS 发生了拮抗作用，从而对细胞起着一定的保护作用。

TNF-α 是由单核-巨噬细胞合成的一种重要的早期炎症因子，早期炎症时过量的 TNF-α 释放通过信号级联反应，进一步激活细胞炎症反应，促进 IL-6、活性氧等有害物质释放，从而形成炎症反应瀑布效应。因此防止炎症因子过度释放，有望成为治疗脓毒症的可行方法。本实验在体外细胞水平研究证实，分别用不同浓度（100、250、500 ng/mL）LPS 刺激后，TNF-α mRNA、IL-6 mRNA 表达逐渐升高，并且在 LPS 刺激后 6、12、24 h 时间点检测 TNF-α mRNA，显示 12 h 时间点最高，说明在 LPS 以 500 ng/mL 刺激 12 h 时，RAW264.7 细胞的炎症反应最重。

MicroRNAs（miRNAs）是一种小的内源性非编码 RNA 分子，由 21~25 个核苷酸组成，主要通过与靶 mRNA 的 3'-端非转录区结合从而在转录后水平调节 mRNA 的表达，具有定量、精细调节的特点。miR-21 是 microRNA 家族中的一个亚型，位于 17q23.2 染色体 FRA17B 脆性区域上，是具有自主转录单位的 miRNA，并且有高度保守性。近来大量研究表明，miR-21 在多种炎性状态下表达水平都有升高[10-11]，可见 miR-21 广泛参与调节机体抗炎免疫反应中。研究发现 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因（phosphatase and tensin homolog，PTEN）是 miR-21 的下游靶基因[12-13]，可抑制 MAPK 信号通路[14]。miR-21 的高表达可负调控 PTEN 基因，使 PTEN 蛋白水平下降，导致 P38 MAPK 信号通路激活，活化的 P38 MAPK 通过上调某些转录因子基因的表达和生物活性，影响细胞炎性反应，促使炎症介质及细胞因子如 TNF-α、IL-6 等大量释放[15]。Sheedy 等[16]在细胞实验证实，LPS 刺激后能引起 miR-21 的表达上调，此研究结果在本课题组实验中也得到证实。同时，本课题实验结果还显示，在 LPS 刺激小鼠 RAW264.7 细胞后，miR-21 的表达水平对 LPS 的浓度具有一定梯度依赖性，在 LPS 浓度 100 ng/mL 时，miR-21 表达水平无明显升高（1.077 ± 0.106），差异无统计学意义；而在 LPS 浓度分别为（250、500 ng/mL）时，miR-21 表达水平分别为正常组的（1.670 ± 0.086，2.789 ± 0.107）倍，与 TNF-α 及 IL-6 的表达在一定程度上呈正相关，其可能机制与 miR-21 参与 P38MAPK 信号通路激活有关。

UTI 是广谱的丝氨酸蛋白水解酶抑制剂，是一类非特异性抗炎药物，可抑制炎症介质释放，具有改善患者免疫功能的作用。有研究中发现：UTI 在多种急危重症的治疗中作用显著，对其进一步研究后发现 UTI 可能通过下调严重脓毒症患者炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 水平，抑制过度炎症反应，从而改善患者心功能[17]，并能显著改善 ARDS 患者的血气指标及预后[18]。有动物试验也发现 UTI 可以通过减少促炎细胞因子 TNF-α、IL-6 等炎性介质释放减轻内毒素血症的炎症反应[19]。Zhang 等[20]发现 UTI 可阻止 p38MAPK 磷酸化，进而抑制 NF-κB 的活化，并下调 TNF-α 的表达。近来有研究表明，在 UTI 肺灌注液在深低温体外循环中，UTI 可调节 miR-21 的表达[7]。为进一步从细胞层面探讨 UTI 在脓毒症中所发挥的作用及 UTI 是否可在脓毒症中参与调节 miR-21 来减轻内毒素反应，本课题组采用小鼠 RAW264.7 细胞株为研究对象，结果显示，UTI 在（0~1 000 U/mL）浓度范围内对细胞无明显毒性作用。与 LPS 组相比，随着 UTI 各组浓度的升高，TNF-α mRNA 及IL-6 mRNA 表达水平逐渐降低。此外，实验结果显示，随着 UTI 浓度升高，细胞炎症反应逐渐减轻，miR-21 表达也逐渐降低，从细胞层面证实了在脓毒症中 UTI 可负性调节 miR-21，进一步参与抗炎保护作用。因此，推测 miR-21 可能在一定程度上反映了细胞炎症反应的状态，并通过P38MAPK 信

号通路参与免疫炎症反应的调节；UTI 在小鼠巨噬细胞炎症反应过程中起着明显的免疫保护作用，并且可能通过调节 miR-21 进一步调控 P38MAPK 信号通路参与调控炎症反应，其中具体机制仍需进一步探讨。

由于本研究结果是由体外培养的细胞实验获得，故需要在动物体内及脓毒症患者中进一步研究。明确 miR-21 在炎症反应发生过程中的角色以及进一步了解 UTI 通过 miR-21 参与调节免疫炎症反应的具体机制，将有助于了解脓毒症的发病机制并为脓毒症的治疗提供新思路。

参 考 文 献

[1] Lakshmikanth CL, Jacob SP, Chaithra VH, et al. Sepsis:in search of cure[J]. Inflamm Res, 2016, 65(8): 587-602.

[2] Das K, Garnica O, Dhandayuthapani S. Modulation of host mirnas by intracellular bacterial pathogens[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 79.

[3] Fries E, Blom AM. Bikunin--not just a plasma proteinase inhibitor [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(2): 125-137.

[4] Saji T. Clinical utility of ulinastatin, urinary pmtease inhibitor in acute Kawasaki disease[J]. Nippon Rinsho, 2008, 66(2): 343-348.

[5] Karnad DR, Bhadade R, Verma PK, et al. Intravenous administration of ulinastatin(human urinary trypsin inhibitor) in severe sepsis: a muhicenter randomized controlled study[J]. Intensive Care Med, 2014, 40(6): 830-838.

[6] Chen H, He MY, Li YM. Treatment of patients with severe sepsis using ulinastatin and thymosin α: a prospective, randomized, controlled pilot study[J]. Chin Med J, 2009, 122(8): 883-888.

[7] 李文雷，李守军. 乌司他丁肺灌注液在深低温体外循环中未成熟肺保护及表达谱研究[D]. 北京：北京协和医学院，2014.

[8] Lee SJ, Lim KT. Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1beta and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Arch Pharmacol, 2008, 377(1): 45-54.

[9] 方 瑶，毛旭虎. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的培养技巧及经验总结[J]. 现代生物医学进展，2012，12(22)：4358-4359.

[10] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H(2)O(2)-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(1): 5-14.

[11] Moschos SA, Williams AE, Perry MM, et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids[J]. *BMC genomics*, 2007, 8(1): 240.

[12] Liu CZ, Liu W, Zheng Y, et al. PTEN and PDCD4 are bona fide targets of microRNA-21 in human cholangiocarcinoma[J]. Chin Med Sci J, 2012, 27(2): 65-72.

[13] Qin X, Yan L, Zhao X, et al. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer[J]. Oncol Lett, 2012, 4(6): 1290-1296.

[14] Tamura M, Gu J, Danen EH, et al. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway[J]. J Biol Chem, 1999, 274(29): 20693-20703.

[15] Huang J, Lin Z, Luo M, et al. Sinomenine suppresses TNF-α-induced VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(2): 180-185.

[16] Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21[J]. Nature immunology, 2010, 11(2): 141-147.

[17] 陶 杨，马 渝，周发春. 氮末端-前脑钠肽对严重脓毒症患者心功能评估意义及乌司他丁干预的临床研究[J]. 重庆医科大学学报，2011，36(12)：1468-1471.

[18] 欧书钦，马 渝，文玉明，等. 乌司他丁治疗急性呼吸窘迫综合征临床研究[J]. 重庆医学，2008，27(12)：1336-1337.

[19] 谢 康，黄跃生. 乌司他丁对严重烧伤大鼠血清中致炎因子的影响及意义[J]. 第三军医大学学报，2004，26(18)：1643-1645.

[20] Zhang X, Liu F, Liu H, et al. Urinary trypsin inhibitor attenuates Urinary trypsin inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by blocking the activation of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Inflamm Res, 2011, 60(6): 569-575.

（责任编辑：冉明会）