

• 论 著 •

脓毒症外泌体 miR-1306-5p 对肠黏膜上皮细胞炎症、凋亡和氧化应激的影响*

宋婷婷, 柴瑞峰, 李 颖, 史星宇, 李 建[△]

新疆医科大学第一附属医院重症医学科, 新疆乌鲁木齐 830054

摘要:目的 研究脓毒症血浆源性外泌体微小 RNA-1306-5p(miR-1306-5p)对肠黏膜上皮细胞的炎症、凋亡和氧化应激损伤的调控作用,并探讨潜在机制。方法 分离脓毒症血浆源性外泌体和健康血浆外泌体,分为健康血浆外泌体组和脓毒症血浆源性外泌体组。用电镜观察外泌体,分析两组外泌体物理参数,并检测外泌体中 miR-1306-5p 的表达。将肠黏膜上皮细胞分为对照组、miR-1306-5p 模拟物的阴性对照组(mimic-NC 组)、miR-1306-5p 模拟物组(mimic 组)、mimic 联合过表达 Polo 样激酶 1(PLK1)的空载体组(mimic-PLK1-EV 组)、mimic 联合过表达 PLK1 组(mimic+PLK1-OE 组)。采用实时荧光定量 PCR 检测各组中 miR-1306-5p 和 PLK1 mRNA 的表达,蛋白质印记法检测 miR-1306-5p 的靶基因 PLK1、胱天蛋白酶(caspase)3、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl2-相关 X 蛋白(Bax)的表达,双荧光素酶报告基因法检测 miR-1306-5p 和 PLK1 的结合作用,采用流式细胞术检测细胞凋亡,酶联免疫吸附试验检测培养细胞的上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8 的表达,试剂盒法检测细胞中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)及超氧化物歧化酶(SOD)的表达。结果 脓毒症血浆源性外泌体和健康血浆外泌体均呈椭圆形,物理参数之间的差异无统计学意义($P>0.05$),与健康血浆外泌体组比较,脓毒症血浆源性外泌体组中的 miR-1306-5p 的表达上调($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因法证实,PLK1 是 miR-1306-5p 的靶基因。与 mimic-NC 组比较,mimic 组 miR-1306-5p、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 、caspase3、Bax、ROS、MDA 的表达上调,细胞凋亡率增加,PKL1、Bcl-2、GSH、SOD 的表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 mimic+PLK1-EV 组比较,mimic+PLK1-OE 组 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 、caspase3、Bax、ROS、MDA 的表达明显下调,细胞凋亡率降低,PKL1、Bcl-2、GSH、SOD 的表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 脓毒症血浆源性外泌体 miR-1306-5p 通过靶向抑制 PKL1 促进肠黏膜上皮细胞的炎症、凋亡和氧化应激损伤。

关键词:脓毒症; 外泌体; 微小 RNA-1306-5p; 肠黏膜上皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.20.004

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2024)20-2449-07

文献标志码:A

Effects of exosomal miR-1306-5p in sepsis on inflammation, apoptosis, and oxidative stress in intestinal mucosal epithelial cells*

SONG Tingting, CHAI Ruifeng, LI Ying, SHI Xingyu, LI Jian[△]

Department of Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China

Abstract: **Objective** To investigate the regulatory effects of plasma-derived exosomal microRNA-1306-5p (miR-1306-5p) on inflammation, apoptosis and oxidative stress in intestinal mucosal epithelial cells in sepsis, and to explore the potential mechanisms. **Methods** Sepsis plasma-derived exosomes and healthy plasma exosomes were separated and divided into healthy plasma exosomes group and sepsis plasma-derived exosomes group. The exosomes were observed by electron microscopy, the physical parameters of the two groups of exosomes were analyzed, and the expression of miR-1306-5p in the exosomes was detected. Intestinal mucosal epithelial cells were divided into control group, negative control group of miR-1306-5p mimic (mimic-NC group), miR-1306-5p mimic group (mimic group), mimic combined with overexpression of PLK1 empty vector group (mimic-PLK1-EV group), and mimic combined with overexpression of Polo-like kinase 1 (PLK1) group (mimic+PLK1-OE group). Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the mRNA expressions of miR-1306-5p and PLK1 in each group, and protein imprinting was used to detect the expressions of miR-1306-5p target genes PLK1, caspase 3, B lymphoblastoma-2 (Bcl-2) and Bcl2-associated X protein (Bax). Dual

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C306)。

作者简介:宋婷婷,女,医师,主要从事脓毒症及其脏器功能损伤相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: 97333469@qq.com。

luciferase reporter gene assay was used to detect the binding effect of miR-1306-5p and PLK1, and flow cytometry was used to detect apoptosis. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-8 in the supernatant of cultured cells were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) were detected by kit method. **Results** The plasma derived exosomes of sepsis and healthy plasma were ellipsoid in shape, and there was no significant difference in physical parameters ($P > 0.05$). Compared with the healthy plasma exosomes group, the expression of miR-1306-5p was up-regulated in the plasma derived exosomes of sepsis group ($P < 0.05$). PLK1 was identified as the target gene of miR-1306-5p by double luciferase reporter method. Compared with mimic-NC group, the expressions of miR-1306-5p, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , caspase3, Bax, ROS and MDA were up-regulated, the apoptosis rate was increased, and the expressions of PKL1, Bcl-2, GSH and SOD were down-regulated in mimic group (all $P < 0.05$). Compared with mimic + PLK1-EV group, the expressions of TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , caspase3, Bax, ROS, and MDA were significantly down-regulated, the apoptosis rate was decreased, and the expressions of PKL1, Bcl-2, GSH and SOD were up-regulated in mimic + PLK1-OE group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Plasma derived exosome miR-1306-5p in sepsis promotes inflammation, apoptosis and oxidative stress damage of intestinal mucosal epithelial cells by targeting PKL1 inhibition.

Key words: sepsis; exosome; microRNA-1306-5p; intestinal mucosal epithelial cells

脓毒症是一种危及生命的临床综合征,其特点是病原体感染和全身炎症反应的共存^[1]。肠道屏障功能障碍可导致继发于脓毒症和多种器官功能障碍患者的肠道细菌发生移位,加剧了脓症患者病情的恶化^[2]。此前有研究表明,靶向肠道屏障功能障碍及相关致病因素的抗炎基因可以减少细菌移位和炎症反应,从而延长脓毒症患者的生存时间^[3]。因此,探讨脓毒症的潜在基因对改善脓毒症患者的预后十分迫切。

Polo 样激酶 1 (PLK1) 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,可控制有丝分裂和细胞周期进程^[4]。敲低 PLK1 在一系列人类癌症中诱导细胞凋亡和有丝分裂终止^[5]。已知,肠黏膜上皮细胞增殖与凋亡之间的平衡决定了肠黏膜屏障的完整性^[6]。PLK1 对脂多糖 (LPS) 诱导的上皮损伤和肠道屏障功能障碍具有保护作用^[7]。然而,在肠黏膜上皮细胞中,调控 PLK1 的上游机制尚不清楚。

外泌体通过调节内皮细胞炎症反应、氧化应激和凋亡参与脓毒症的发生发展,脓毒症血浆源性外泌体中含有大量的微小 RNA (miRNA),可能是加快脓毒症发展的关键因素^[8-9]。研究表明,微小 RNA-1306-5p (miR-1306-5p) 在宿主抗感染反应中发挥重要作用,并促进 LPS 诱导的炎症反应^[10],而且 miR-1306-5p 在血浆源性外泌体中表达^[11]。然而,脓毒症血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 在肠黏膜上皮细胞中的具体作用尚不清楚。在此,本研究评估了脓毒症血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 的表达及其对肠黏膜细胞的凋亡、炎症、氧化应激的影响,并进一步探讨了分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2021—2022 年本院 5 例脓毒症患者及体检健康者的血浆标本。人结肠黏膜上皮细胞 NCM460 购自美国 ATCC 公司。

1.2 方法

1.2.1 外泌体分离 使用 exoEasy Maxi 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司),通过差速离心法分离血浆源性外泌体。为了观察外泌体的形态,将分离的外泌体在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中重悬,并放置在含有 0.125% formvar 的碳包覆的铜网格上。网格用 1% 醋酸铀酰染色。图像采用透射电镜拍摄 (日本日立公司)。外泌体粒径大小使用 NanoSight NS300 仪器通过纳米颗粒跟踪分析测定。此外,外泌体也通过表面标志物,包括 CD9 (抗-CD9,英国 Abcam 公司)、CD63 (抗-CD63,英国 Abcam 公司) 和 Calnexin (抗-Calnexin,,英国 Abcam 公司) 进行表征。采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测这些标志物的表达。本研究经本院医学伦理委员会的审核批准。

1.2.2 细胞培养与处理 将 NCM460 细胞放置含有 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养。培养基在湿润培养箱中培养,含 5% 的 CO₂,温度为 37 $^{\circ}$ C。对照组细胞用生理盐水处理。根据 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 说明书的提示,将 NCM460 细胞转染 miR-1306-5p 的模拟物 (mimic) 和 mimic 阴性对照 (mimic-NC),并进一步在转染 mimic 的基础上转染 pcDNA3.1/PLK1 空载体 (PLK1-EV) 或过表达 PLK1 的重组质粒 pcDNA3.1/PLK1 (PLK1-OE),继续培养 48 h。根据转染物不同分组: mimic 组, mimic-NC 组, mimic + PLK1-EV 组, mimic + PLK1-OE 组。转染序列由上海 GenePharma 有限公司合成。

1.2.3 实时荧光定量 (qPCR) RNA 提取按照 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 说明书进行。根据 PrimeScriptTM RT Master Mix (Takara) 的协议,合成 cDNA。在热循环 CFX6 系统 (美国 Bio-Rad 公司) 上,采用 SYBR Premix Ex TaqTM II (日本 Takara 公

司)进行 qPCR 反应。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达。检测 miR-1306-5p 表达使用 U6 作为内参基因,检测 PLK1 mRNA 表达的内参基因为 GAPDH。

1.2.4 Western blot 细胞用 PBS 洗涤后,在放射免疫沉淀裂解缓冲液中裂解。用蛋白测定试剂盒(美国 Bio-Rad)测定总蛋白浓度。采用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白样品转移到 PVDF 膜(美国 Millipore)上。然后,将 PVDF 膜用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 在室温下封闭 1 h,然后在 4 °C 下用 PLK1、胱天蛋白酶(caspase)3、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl2-相关 X 蛋白(Bax)一抗孵育过夜,然后用二抗室温孵育 1.5 h。采用 ECL 检测试剂显影,使用 Image J 软件分析各条带的灰度值。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测 用 Starbase 数据库预测 miR-1306-5p 和 PLK1 3'UTR 的碱基结合位点。分别将 PLK1 3'UTR 野生型序列(PLK1 3'UTR-WT)及 3'UTR 突变型序列(PLK1 3'UTR-MUT)克隆到 pmirGLO 载体中,构建 PLK1 3'UTR-WT/MUT 的报告基因,然后,将这些构建的报告基因与 miR-1306-5p 的 mimic 或 mimic-NC 共转染到 NCM460 细胞中。转染 48 h 后,用双荧光素酶报告基因检测试剂评估荧光素酶活性,并用 Western blot 检测 PLK1 3'UTR-WT/MUT 载体转染的 NCM460 细胞中 PLK1 蛋白表达变化。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA) 收集各组处理完成后的细胞的培养基,评估炎症因子的释放,采用人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8 的 ELISA 试剂盒(南京 KeyGen 公司)进行检测。每个样品 3 个复孔,ELISA 的所有程序均按说明书提供的方案进行。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 采用 Annexin V/FITC 试剂盒(美国 Neo Bioscience 公司),用 Annexin V-异硫氰酸荧光素和碘化丙啶双标记凋亡细胞,然后使用 BD™ LSR II 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)对细胞进行分析,通过 Annexin V 阳性细胞计数确定凋亡细胞情况。

1.2.8 氧化应激检测试验 根据活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)及超氧化物歧化酶(SOD)活性评估氧化应激情况。使用从上海碧云天公司购买的商业试剂盒对这些指标进行检测。所有程序均按说明书提供的方案进行,每个样品设置 3 个复孔。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据处理和分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 的表达变化 本研究分离了脓毒症血浆源性外泌体和健康血浆外泌体。脓毒症血浆源性外泌体和健康血浆外

泌体均呈现圆形膜结构,二者的直径分别在 92.24~120.36 nm,91.89~118.55 nm,粒径分布的峰尺寸分别为 106.28、109.36 nm。脓毒症血浆源性外泌体的 Zeta 电势为 (-23.06 ± 2.6) mV,健康血浆外泌体的 Zeta 电势为 (-23.15 ± 1.89) mV,二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组的外泌体标志物 CD9、CD63、Calnexin 的表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而与健康血浆外泌体比较,脓毒症血浆源性外泌体中的 miR-1306-5p 表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1A~E。

2.2 肠黏膜上皮细胞中 PLK1 是 miR-1306-5p 的靶基因 通过生物信息学分析,miR-1306-5p 可能与 PLK1 的 3'UTR 区有多个位点结合,提示 PLK1 可能是 miR-1306-5p 的靶基因。本研究在肠黏膜上皮细胞中检测发现,与 mimic-NC 组比较,mimic 组的 miR-1306-5p 表达升高($P < 0.05$),而 PLK1 mRNA 和蛋白表达均降低($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因检测发现,在野生型(PLK1 3'UTR-WT)中,与 mimic-NC 组比较,mimic 组的荧光素酶活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而在突变型(PLK1 3'UTR-MUT)中,与 mimic-NC 组比较,mimic 组的荧光素酶活性差异无统计学意义($P > 0.05$),而 PLK1 3'UTR-WT 转染的肠黏膜上皮细胞与 PLK1 3'UTR-MUT 转染的肠黏膜上皮细胞比较,PLK1 的蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2A~I。

2.3 过表达 miR-1306-5p 通过靶向抑制 PLK1 促进肠黏膜上皮细胞的炎症 与对照组比较,mimic-NC 组 miR-1306-5p、PKL1、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 mimic-NC 组比较,mimic 组 miR-1306-5p、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达明显上调,PKL1 的蛋白表达下调($P < 0.05$)。与 mimic 组比较,mimic+PLK1-EV 组 miR-1306-5p、PLK1、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 mimic+PLK1-EV 组比较,mimic+PLK1-OE 组 PLK1 表达上调,而 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),miR-1306-5p 的表达变化无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3A~F。

2.4 过表达 miR-1306-5p 通过靶向抑制 PLK1 促进肠黏膜上皮细胞的凋亡 与对照组比较,mimic-NC 组凋亡率、caspase3、Bax 和 Bcl-2 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 mimic-NC 组比较,mimic 组凋亡率增加及 caspase3、Bax 的表达上调,而 Bcl-2 表达下调($P < 0.05$)。与 mimic 组比较,mimic+PLK1-EV 组凋亡率、caspase3、Bax 和 Bcl-2 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 mimic+PLK1-EV 组比较,mimic+PLK1-OE 组凋亡率减少及 caspase3、Bax 的表达下调,而 Bcl-2 的表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4A~E。

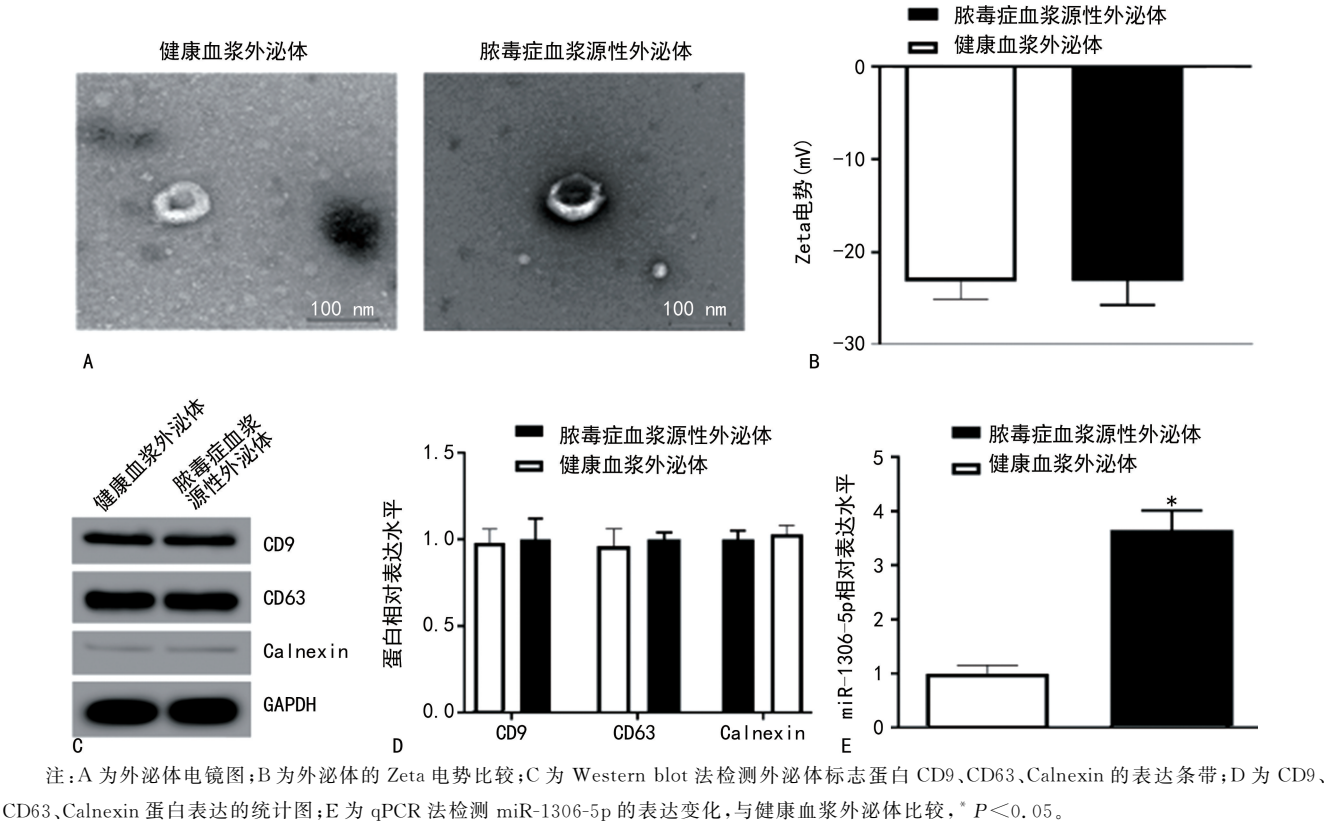


图 1 脓毒症血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 的表达变化

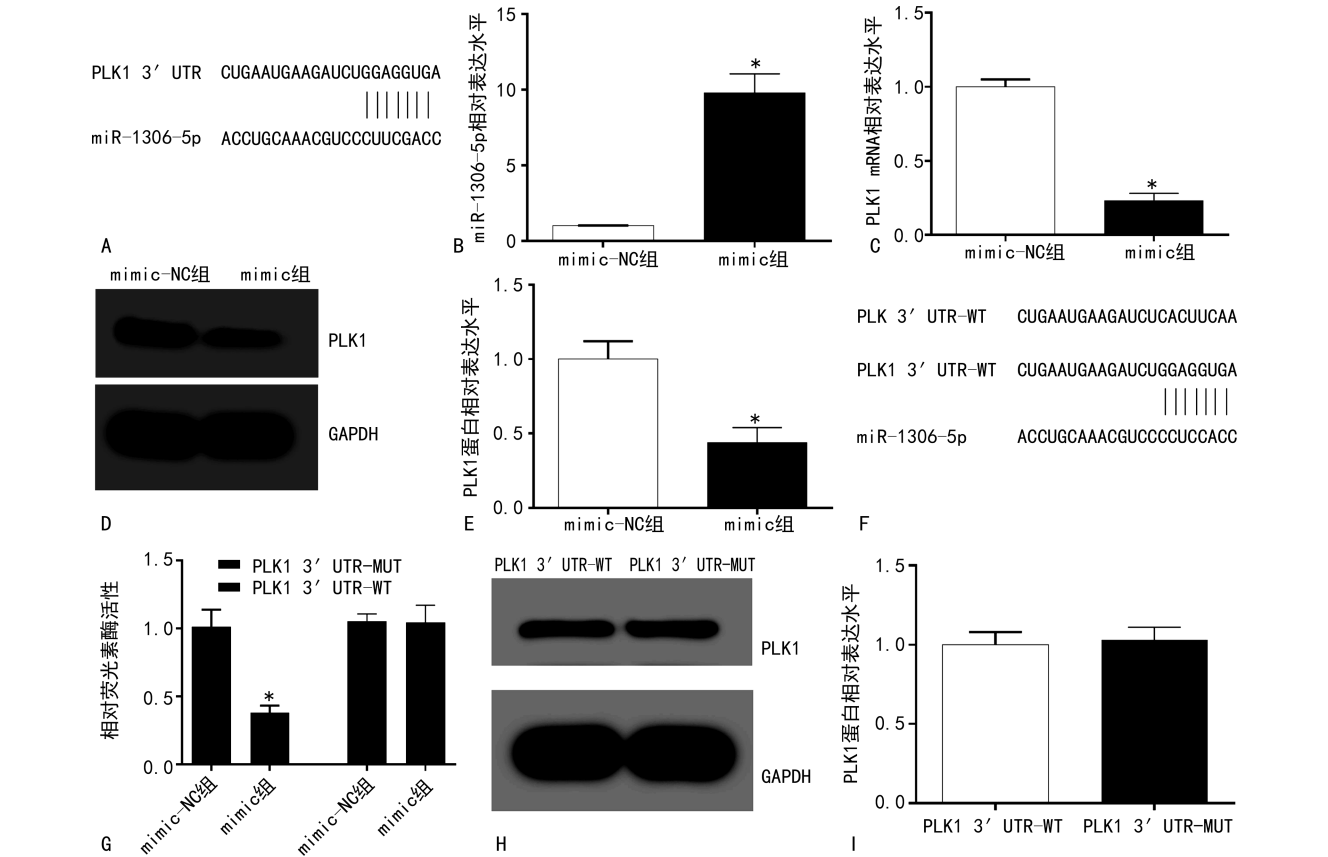
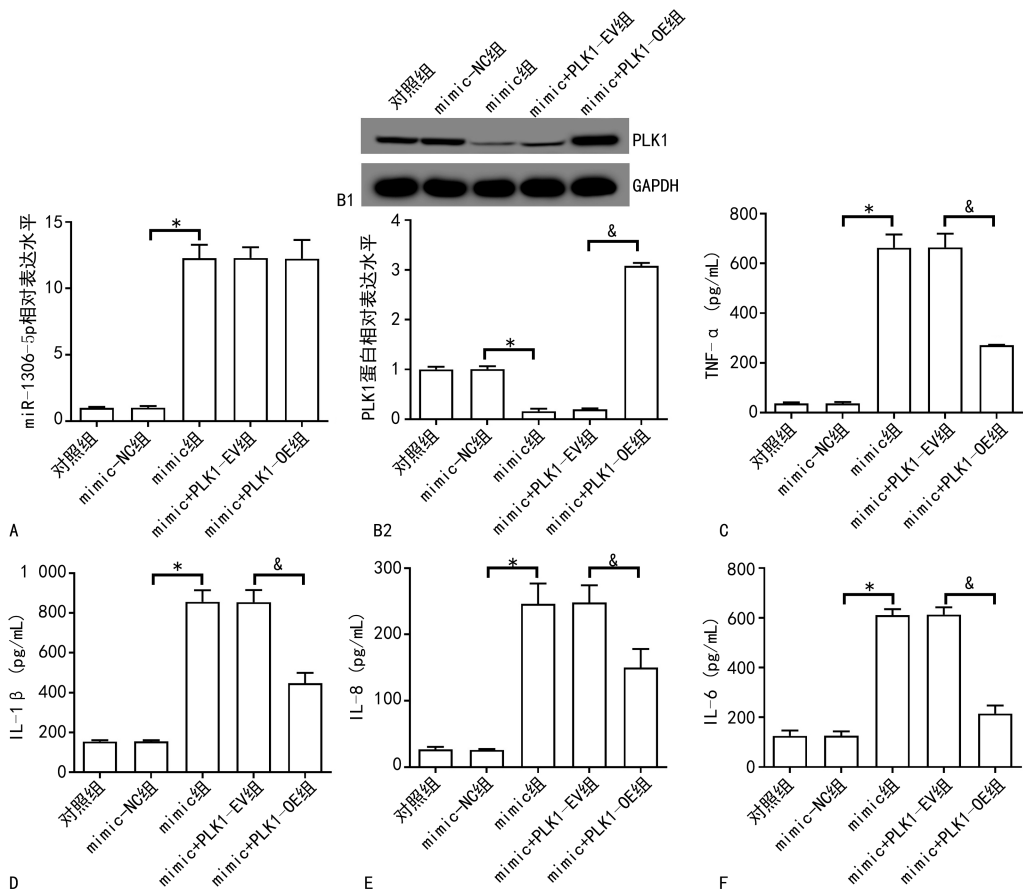
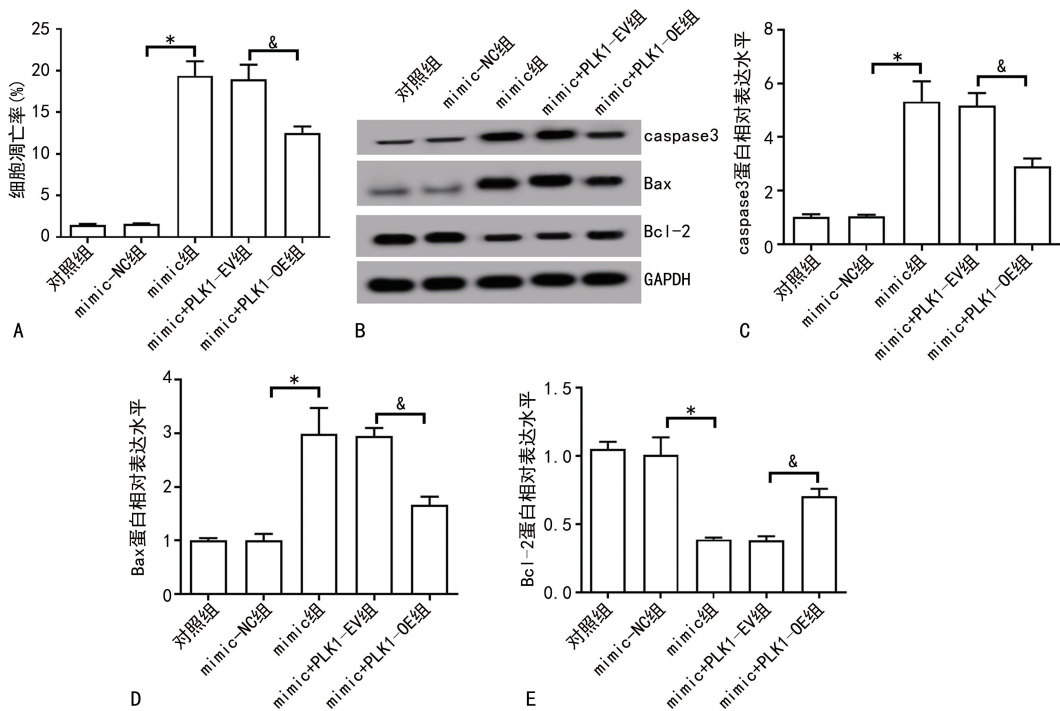


图 2 肠黏膜上皮细胞中 PLK1 是 miR-1306-5p 的靶基因



注:A为qPCR法检测miR-1306-5p的表达变化;B1为Western blot法检测PLK1蛋白的表达条带;B2为PLK1蛋白表达的统计图;C~F为ELISA法检测各组炎症因子TNF-α、IL-6、IL-8、IL-1β表达变化;与mimic-NC组比较,* $P<0.05$;与mimic+PLK1-EV组比较,& $P<0.05$ 。

图3 过表达miR-1306-5p通过靶向抑制PLK1促进肠黏膜上皮细胞的炎症



注:A为流式细胞术检测的细胞凋亡率统计图;B~E为Western blot法检测caspase3、Bax、Bcl-2蛋白的表达;与mimic-NC组比较,* $P<0.05$;与mimic+PLK1-EV组比较,& $P<0.05$ 。

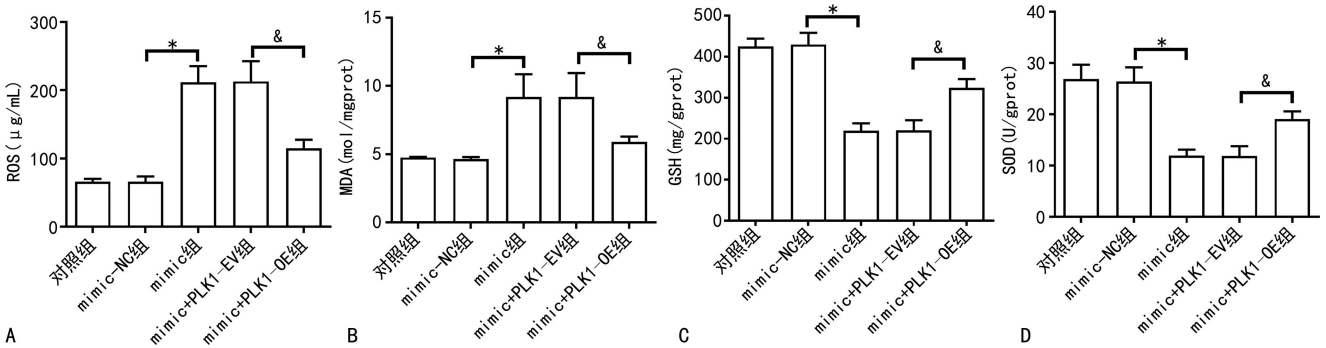
图4 过表达miR-1306-5p通过靶向抑制PLK1促进肠黏膜上皮细胞的凋亡

2.5 过表达miR-1306-5p通过靶向抑制PLK1促进肠黏膜上皮细胞的氧化应激损伤

与对照组比较, mimic-NC组ROS,MDA、GSH、SOD表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。与mimic-NC组比较,mimic

组 ROS、MDA 的表达上调,而 GSH、SOD 的表达下调($P<0.05$)。与 mimic 组比较,mimic+PLK1-EV 组 ROS、MDA、GSH、SOD 表达差异都无统计学意义($P>0.05$)。与 mimic+PLK1-EV 组比较,mimic+

PLK1-OE 组 ROS、MDA 的表达下调,而 GSH、SOD 的表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 5A~D。



注:A~D为试剂盒检测细胞中 ROS、MDA、GSH、SOD 的表达;与 mimic-NC 组比较,* $P<0.05$;与 mimic+PLK1-EV 组比较,& $P<0.05$ 。

图 5 过表达 miR-1306-5p 通过靶向抑制 PLK1 促进肠黏膜上皮细胞的氧化应激损伤

3 讨 论

脓毒症是一种危及生命的疾病,当机体对感染的反应导致自身组织和器官受损时即发生脓毒症,脓毒症可导致多种器官功能障碍,如肠道屏障功能障碍^[12]。黏膜上皮细胞是肠道屏障的主要组成部分,上皮细胞的氧化应激诱导的凋亡导致紧密连接的破坏,进而增加肠道通透性^[3]。而恢复肠道屏障功能是脓毒症的重要治疗方法^[13]。miRNA 是一类小型的非编码 RNA,通过与其靶基因 3'UTR 的碱基配对靶基因的转录和翻译发挥抑制作用^[14],它们在某些疾病如癌症和炎症中起关键作用,并参与管理几乎所有细胞过程的基因调节网络^[15-16]。值得注意的是,已有研究发现 miRNA 失调与临床表现和炎症相关,表明它们可能作为脓毒症的潜在治疗靶点^[17]。miRNA 与靶基因结合形成 RNA 诱导沉默复合物,从而调控这些靶基因的表达。有研究表明,miRNA 在脓毒症,特别是肠道功能障碍中发挥着重要作用^[17]。最近,已确认 miR-1306-5p 在免疫应答中发挥重要作用,并通过靶向 Tollip 促进 LPS 诱导的炎症^[10]。此外,miR-1306-5p 在脓毒症中被认为是不良临床结果的潜在标志物^[18]。在本研究中,发现脓症患者血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 表达高于健康者血浆源性外泌体,而且本研究发现 miR-1306-5p 与 PLK1 的 3'UTR 可能具有相互作用。

已知 PLK1 在有丝分裂纺锤体的组装、细胞质分裂、G₂/M 过渡期的中心体和姐妹染色单体的分离中发挥重要作用^[7,19]。PLK1 可以抑制细胞凋亡并促进 LPS 处理下 HT-29 细胞的增殖^[20],而且最新的研究表明,脓症患者血清中 PLK1 表达升高,与血清 D-乳酸和内毒素表达呈负相关,对患者 28 d 死亡率具有较高的预测价值^[21]。另外,该研究证实了脓毒症小鼠肠道中 PLK1 的表达降低,PLK1 的过表达减轻肠道屏障损伤,降低脓毒症小鼠的 72 h 死亡率^[21]。进一

步研究还发现 PLK1 与 IL-6 在患者中呈负相关,增加或干扰 PLK1 表达可降低或升高小鼠血清 IL-6 表达^[21],因此,PLK1 在脓毒症肠道屏障功能中发挥关键作用。本研究通过双荧光素酶报告基因试验发现,PLK1 是 NCM460 细胞中 miR-1306-5p 的靶基因。而且,PLK1 的过表达逆转 miR-1306-5p 的功能,减少了肠黏膜上皮细胞的凋亡,抑制 ROS、MDA 的表达,并促进了 GSH、SOD 的表达,而且还抑制了 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 的表达。这些结果表明 PLK1 可能是脓毒症引起的肠道屏障功能障碍潜在调控机制的新参与者。另外,研究还发现沉默 PLK1 可以明显促进肠黏膜上皮细胞凋亡和肠道屏障功能障碍^[18],说明沉默 PLK1 和 miR-1306-5p mimic 的功能一致。这进一步佐证了 PLK1 可作为 miR-1306-5p 在调控结肠黏膜上皮细胞中的功能性靶基因,从而调控了肠黏膜上皮细胞的炎症、凋亡和氧化应激损伤。

氧化应激是一种细胞内外环境因素导致的生物体内氧化还原平衡失调的过程^[8]。在炎症和感染状态下,身体的氧化应激水平会增加,导致细胞内产生大量的 ROS 自由基和其他氧化物质。这些 ROS 自由基可以引起细胞膜脂质过氧化、DNA 和蛋白质的氧化损伤,从而导致组织和器官的功能紊乱^[8]。本研究表明,miR-1306-5p 的上调致使与氧化应激相关的指标包括 ROS 和 MDA 表达升高,同时抗氧化物质 GSH 和 SOD 表达降低。这表明脓毒症状态下,miR-1306-5p 的高表达可能促进了氧化应激的发生。此外,细胞凋亡率的增加也可能与氧化应激有关,因为氧化应激可以激活凋亡通路,在脓毒症中可能导致细胞死亡增加。细胞内的氧化应激状态是由多种因素共同调节的^[9,13]。在本研究中,miR-1306-5p 的上调通过靶向 PLK1 来调控细胞的氧化应激水平。PLK1 是一种丝裂原活化蛋白激酶,它在细胞周期的调节中扮演重要角色^[5]。既往的研究表明,PLK1 在氧化应激中起着关键作用^[13]。本研究发现,在 miR-

1306-5p 上调的情况下,通过抑制 PLK1 的活性,氧化应激水平降低,从而减少了细胞的凋亡和炎症反应。这提示 miR-1306-5p 通过靶向 PLK1,负向调节氧化应激反应,并对脓毒症的肠道屏障功能进行调节。本研究发现了脓毒症血浆源性外泌体 miR-1306-5p 可通过靶向 PLK1 对肠黏膜上皮细胞的氧化应激状态产生调节作用。

本文研究了脓毒症血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 对肠黏膜上皮细胞的调节作用和潜在机制。本研究结果表明,miR-1306-5p 通过靶向 PLK1,积极调节肠黏膜上皮细胞的凋亡、炎症反应和氧化应激,表明脓毒症血浆源性外泌体 miR-1306-5p 是脓毒症肠道屏障功能障碍的潜在生物标志物和治疗靶点。

综上所述,本研究探讨了脓毒症血浆源性外泌体中 miR-1306-5p 和 PLK1 在肠黏膜上皮细胞凋亡、炎症和氧化应激损伤中的作用,并证实 PLK1 是 miR-1306-5p 的靶基因,其具有作为改善肠道屏障功能障碍和减轻上皮损伤的潜在靶标。这些发现可能对揭示脓毒症引起的肠道屏障功能障碍和上皮损伤的机制提供新的见解。

参考文献

[1] CHENG B, DU M, HE S, et al. Inhibition of platelet activation suppresses reactive enteric glia and mitigates intestinal barrier dysfunction during sepsis [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1):137.

[2] HAVEL E. Danger of bacterial translocation for a surgical patient [J]. *Rozhl Chir*, 2021, 100(1):4-9.

[3] ZHANG S, ZHOU Q, LI Y, et al. MitoQ modulates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction via regulating Nrf2 signaling [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020:3276148.

[4] DAVIES T, HARDWICK K G. Cell-cycle control: timing is everything for the Plk1-Bub1 partnership [J]. *Curr Biol*, 2023, 33(11):R447-R449.

[5] SRINIVAS U S, TAY N S C, JAYNES P, et al. PLK1 inhibition selectively induces apoptosis in ARID1A deficient cells through uncoupling of oxygen consumption from ATP production [J]. *Oncogene*, 2022, 41(13):1986-2002.

[6] ZHANG X, WU J, LIU Q, et al. mtDNA-STING pathway promotes necroptosis-dependent enterocyte injury in intestinal ischemia reperfusion [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12):1050.

[7] CAO Y, CHEN Q, WANG Z, et al. PLK1 protects against sepsis-induced intestinal barrier dysfunction [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):1055.

[8] GAO M, YU T, LIU D, et al. Sepsis plasma-derived exosomal miR-13p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1 [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(2):347-365.

[9] SUBRAMANI K, RAJU S P, CHU X, et al. Effect of plasma-derived extracellular vesicles on erythrocyte deformability in polymicrobial sepsis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65:244-247.

[10] SUN W, LIU R, LI P, et al. Chicken gga-miR-1306-5p targets Tollip and plays an important role in host response against *Salmonella enteritidis* infection [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2019, 10:59.

[11] MENG S, WANG B, LI W. CircAXL knockdown alleviates A β (1-42)-induced neurotoxicity in Alzheimer's disease via repressing PDE4A by releasing miR-1306-5p [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(6):1707-1720.

[12] HU Q, REN H, LI G, et al. STING-mediated intestinal barrier dysfunction contributes to lethal sepsis [J]. *EBio-Medicine*, 2019, 41:497-508.

[13] FILOS K S, PANTELI E S, FLIGOU F, et al. Clonidine pre-treatment prevents hemorrhagic shock-induced endotoxemia and oxidative stress in the gut, liver, and lungs of the rat [J]. *Redox Rep*, 2012, 17(6):246-251.

[14] LIU X, XIAO H, PENG X, et al. Identification and comprehensive analysis of circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks in osteoarthritis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:1050743.

[15] DING Y, WAN S, LIU W, et al. Regulation networks of non-coding RNA-associated ceRNAs in cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Cells*, 2022, 11(19):2971.

[16] LI S S, ZHU H J, LI J Y, et al. MiRNA-875-3p alleviates the progression of colorectal cancer via negatively regulating PLK1 level [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3):1126-1133.

[17] JIANG T, SUN L, ZHU J, et al. MicroRNA-23a-3p promotes macrophage M1 polarization and aggravates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating PLK1/STAT1/STAT3 signalling [J]. *Int J Exp Pathol*, 2022, 103(5):198-207.

[18] WANG Z, ZHONG C, CAO Y, et al. LncRNA DANCER improves the dysfunction of the intestinal barrier and alleviates epithelial injury by targeting the miR-1306-5p/PLK1 axis in sepsis [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(9):1935-1944.

[19] CAO Y Y, WANG Z, YU T, et al. Sepsis induces muscle atrophy by inhibiting proliferation and promoting apoptosis via PLK1-AKT signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(20):9724-9739.

[20] PARK S Y, SEO D, JEON E H, et al. RPL27 contributes to colorectal cancer proliferation and stemness via PLK1 signaling [J]. *Int J Oncol*, 2023, 63(2):93.

[21] CAO Y Y, LI J, CHEN Q, et al. PLK1 protects intestinal barrier function in sepsis: a translational research [J]. *Cytokine*, 2023, 162:156113.