

脓毒症患者外周血中 lncRNA 和 miRNA 表达谱及功能分析

李兴¹ 宋春梅² 卢文辉² 穆根华¹ 卢仲谦¹ 邓义军¹

¹徐州医科大学附属盐城临床学院重症医学科, 盐城 224055; ²盐城市第三人民医院重症医学科, 盐城 224008

通信作者: 邓义军, Email: dengyj2003@163.com

【摘要】目的 本研究利用二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术, 对脓毒症患者外周血液进行测序分析, 探讨非编码小 RNA (microRNA, miRNA) 和长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 的差异表达及其功能网络。**方法** 本研究采集 2021 年 6 月至 9 月在盐城市第一人民医院招募的重症医学科 7 例泌尿系统感染的脓毒症患者和 3 例健康职工志愿者的全血进行 NGS 分析, 筛选差异表达的 mRNA、lncRNA 和 miRNA, 并对差异表达进行生物信息学分析 (差异倍数 FC>2, P<0.01)。本研究筛选并下载 GEO 数据库中 4 个脓毒症患者基因组数据集, 筛选共同差异表达基因, 对筛选基因进行京都基因组百科全书分析。使用 Cytoscape 3.7.0 进行构建 miRNA-mRNA 和 lncRNA-miRNA-mRNA 网络。**结果** 差异表达 mRNAs 主要富集于炎症反应相关通路。131 个差异基因显著富集在 PD-1/PD-L1 信号通路, 发现调控 PD-1/PD-L1 信号通路的 TLR2、LAT 和 CD247 等靶基因, 以及参与调控的 miRNA (hsa-miR-370-3p、hsa-miR-3619-3p、hsa-miR-4488)。初步发现 lncRNA (TCONS-0026560、TCONS-00234402、TCONS-00260914、TCONS-00265581、TCONS-00360886) 通过竞争性抑制 miRNA (hsa-miR-370-3p、hsa-miR-3619-3p、hsa-miR-4488) 参与调控 TLR2、LAT 和 CD247 表达。**结论** PD-1/PD-L1 通路在启动和促进免疫抑制中发挥的重要作用, 为脓毒症的治疗确定新的目标和治疗靶点。

【关键词】 脓毒症; 微小 RNA; 长链非编码 RNA; 二代测序; PD-1/PD-L1

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2024.01.016

脓毒症是重症监护室最常见的疾病, 也是最主要的死亡原因之一, 早期的过度炎症反应和晚期的免疫抑制是其发病机制^[1]。在过去的 30 年里, 脓毒症的发病机制在分子、细胞和完整器官水平上都取得了很大的进展, 但仍具有较高的发病率和死亡率^[2-3]; 然而, 脓毒症的发病机制复杂, 缺乏有效的治疗药物。因此, 探究脓毒症的发病机制, 寻找新的治疗靶点尤其重要。目前有数据表明, miRNAs 和 lncRNAs 参与脓毒症病理生理过程的调控, 具有发展成为脓毒症新型诊断标志物的潜力^[4]。本研究对脓毒症患者全血进行 miRNAs 和 lncRNAs 的初步筛查及功能分析, 为脓毒症的机制研究提供了一个从分子水平入手, 研究其发病机制的思路。

1 资料与方法

1.1 RNA 的提取和 mRNAs、lncRNAs 和 miRNAs 的微阵列

本研究在 2021 年 6 月至 9 月间招募盐城市第一人民医

院重症医学科 7 例泌尿系统感染的脓毒症患者和 3 例健康职工志愿者为对照者 (表 1), 并取得所有参与者的知情同意后收集每个人的外周血 2.5 mL 以获取 mRNAs、lncRNAs 和 miRNAs 表达谱。将血液分别置于 PAX 基因 @RNA 血管 (PreAnalytiX GmbH, 瑞士) 中, -80 °C 保存。使用 TRIzol Reagent (Invitrogen, 美国)/RNeasy Mini Kit (Qiagen, 美国) 提取各样品的总 RNAs。通过安捷伦 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, 美国)、微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific Inc, 美国) 对每个样本的总 RNAs 进行定量和鉴定。数据分析使用安捷伦图像分析软件 (11.0.1.1) 提取原始数据。使用 R 软件的 limma 包执行了一系列数据处理步骤, 包括分位数归一化和低强度过滤。通过火山图过滤鉴定两组之间的 DE mRNAs、lncRNAs 或 miRNAs, 并通过倍数变化过滤进行评估。

1.2 差异基因分析

使用 R 软件对原始数据进行过滤、归一化处理得到标准化数据。以 log₂ 差异倍数 (fold change, FC) 的绝对

表 1 纳入研究者的一般资料

| 编号 | 年龄 | 性别 | WBC ($\times 10^9/L$) | CRP (mg/dL) | PCT (ng/mL) | 内毒素 (pg/mL) | 感染类型 |
|------|----|----|----------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| 患者 1 | 58 | 男 | 15.4 | 58.86 | >100.00 | 5.09 | G ⁻ 杆菌 |
| 患者 2 | 36 | 女 | 21.3 | 213.08 | 89.03 | 26.00 | G ⁻ 杆菌 |
| 患者 3 | 51 | 女 | 14.7 | 110.12 | 56.78 | 23.58 | G ⁻ 杆菌 |
| 患者 4 | 41 | 男 | 11.5 | 134.58 | 64.34 | 34.05 | G ⁻ 杆菌 |
| 患者 5 | 56 | 男 | 24.0 | 230.13 | 78.23 | 18.02 | G ⁻ 杆菌 |
| 患者 6 | 66 | 男 | 15.6 | 97.06 | 34.09 | 9.85 | G ⁻ 杆菌 |
| 患者 7 | 50 | 女 | 23.4 | 158.53 | 60.53 | 19.98 | G ⁻ 杆菌 |
| 对照 1 | 36 | 男 | 6.4 | 3.86 | <0.50 | <5.00 | - |
| 对照 2 | 28 | 女 | 6.8 | 4.08 | <0.50 | <5.00 | - |
| 对照 3 | 30 | 女 | 8.7 | 2.12 | <0.50 | <5.00 | - |

注: WBC 为白细胞计数, CRP 为 C-反应蛋白, PCT 为降钙素原

值 ≥ 2 以及错误发现率 (false discovery rate, FDR) 校正的 $P < 0.05$ 为条件, 筛选出 DE mRNAs、lncRNAs 以及 miRNAs, 并绘制聚类热图及火山图。

1.3 DE mRNAs KEGG 分析

对 DE mRNAs 的基因进行 KEGG 通路富集分析, 同时使用 ggplot 对通路富集分析的结果进行可视化。

1.4 GEO 数据集的筛选

本研究在 GEO 中下载了 4 套脓毒症疾病相关的表达谱数据 (表 2) 并使用 R 软件对表达谱数据进行差异表达处理, 使用的方法为 limma 算法, 在得到不同数据集的差异表达基因之后, 将多个差异表达基因集进行交集筛选, 绘制韦恩图。最终共得到 131 个差异表达基因。

表 2 GEO 数据集样本

| 数据库 ID | 平台 | 脓毒症患者 | 健康对照者 |
|----------|----------|-------|-------|
| GSE26378 | GPL570 | 82 | 21 |
| GSE26440 | GPL570 | 98 | 32 |
| GSE57065 | GPL570 | 82 | 25 |
| GSE69528 | GPL10558 | 83 | 55 |

1.5 miRNAs-mRNAs 联合分析

编码和非编码共表达分析基于单个基因的标准化信号强度来识别 mRNA 和 miRNA 之间的任何相互作用。在相关性分析的基础上, 使用 Cytoscape 软件 (3.7.0) 构建了 131 个 DE mRNAs 和相关 DE miRNAs 之间的 miRNAs-mRNAs 网络, 并对靶向 mRNAs 进行了 KEGG 分析。

1.6 lncRNAs-miRNAs-mRNAs 联合分析

已知 lncRNAs 能够竞争性抑制 miRNA 参与调控靶基因, 使用 Cytoscape 软件 (3.7.0) 构建了 lncRNAs-miRNAs-mRNAs ceRNA 网络。为完全了解 ceRNA 网络, 对靶向 mRNAs 进行了 KEGG 分析。

2 结果

2.1 脓毒症患者外周血中 mRNAs、lncRNAs 和 miRNAs 的差异表达

对 7 例脓毒症患者和 3 例健康对照组的外周血样本

进行二代测序。与对照组相比, 脓毒症患者外周血中总共检测出 4 934 个上调和 4 395 个下调的 mRNAs、375 个上调和 474 个下调的 lncRNAs 以及 74 个上调和 77 个下调 miRNAs (图 1)。

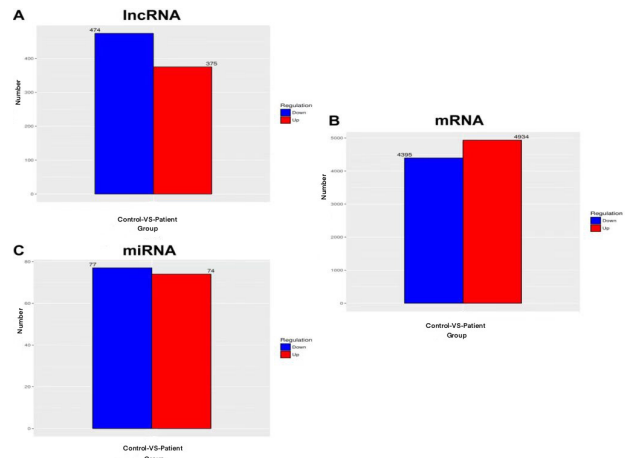


图 1 脓毒症患者外周血中差异表达的 mRNAs、lncRNAs 和 miRNAs

2.2 mRNAs、lncRNAs 和 miRNAs 的聚类分析

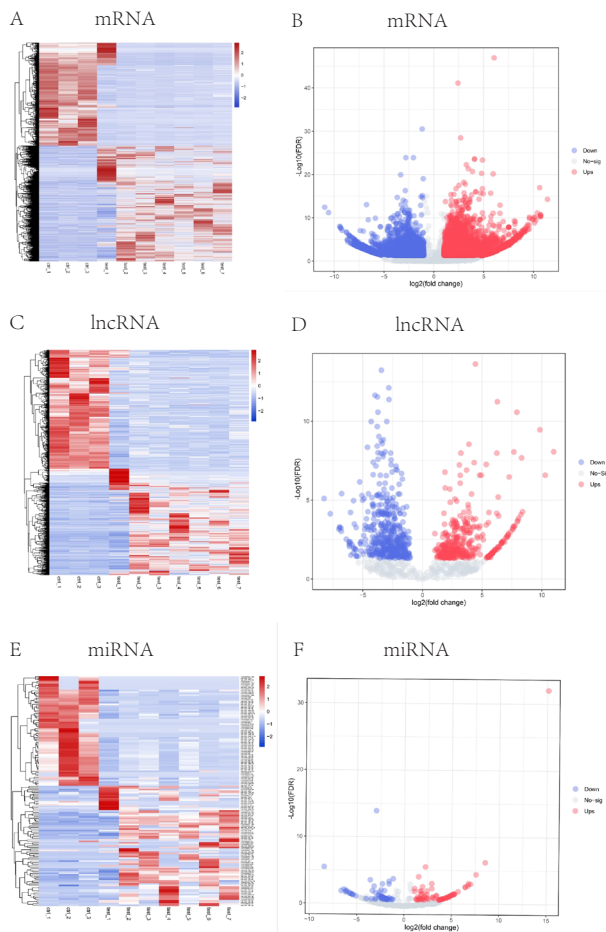
进一步将差异表达的 mRNAs、miRNAs 和 lncRNAs 进行可视化分析, 经过归一化及相似性的聚类分析处理, 并进行绘制基因热图和火山图。如图 2A~F 所示, 对照组与脓毒症患者组的外周血基因表达水平差异具有统计学意义, 提示 mRNAs、lncRNAs 和 miRNAs 在脓毒症发生发展过程中发挥重要作用。

2.3 KEGG 分析差异表达 mRNAs

根据 KEGG 分析差异表达的 mRNAs 主要富集于炎症和免疫反应相关通路 (图 3), 而且其中富集数量在 100 个基因以上的通路有 13 条 (表 3)。如 Th17 细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化以及 T 细胞受体信号通路。这些通路在机体免疫调控中具有重要作用, 免疫调控在脓毒症发生发展过程中有着重要的功能。

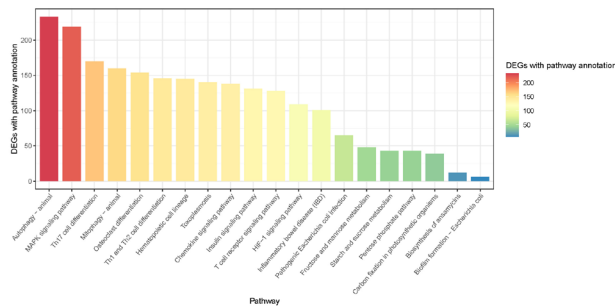
2.4 GEO 数据库脓毒症数据集与差异表达的 mRNAs 进行交叉筛选

从 GEO 数据库中下载了 GSE26378 (脓毒症患者 82 例, 对照组 21 例)、GSE26440 (脓毒症患者 98 例, 对照组 32 例)、GSE57065 (脓毒症患者 82 例, 对照组 25 例)、GSE69528 (脓毒症患者 83 例, 对照组 55 例) 等 4 个脓毒症患者表达谱数据 (图 4A~D)。结合 GEO 数据库中脓毒症患者的数据集和本研究数据进行交联分析, 筛选出 131 个共同差异表达的 mRNAs (图 4E)。



热图显示 A 为 mRNA 的表达谱, C 为 lncRNA 的表达谱, E 为 miRNA 的表达谱; 火山图显示 B 为 mRNA 的表达, D 为 lncRNA 的表达, F 为 miRNA 的表达

图 2 mRNA、lncRNA 和 miRNA 表达谱的变化



横坐标代表着富集程度最高的 20 条通路; 纵坐标代表着富集在该条通路差异基因的个数; 不同的颜色代表富集的数量差异

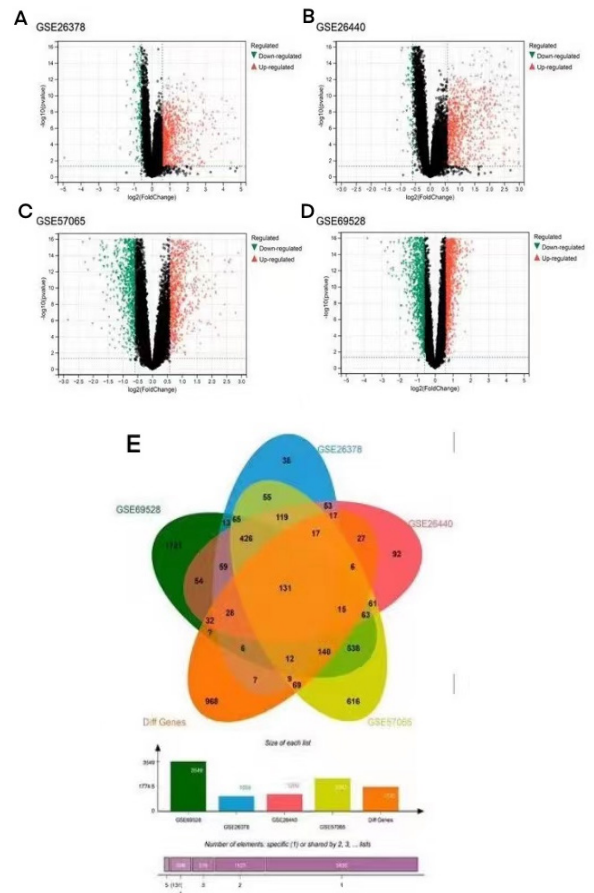
图 3 KEGG 分析: 京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通过富集差异表达的 mRNAs

2.5 131 个差异表达 mRNAs 的 KEGG 分析和 mRNA-miRNA 网络

为了进一步探索该基因集的调控作用和相关信号通路, 对 131 个差异表达基因进行 KEGG 功能分析 (图 5A)。本研究发现差异基因集在 PD-1/PD-L1 通路中显著富集。参与调控 PD-1/PD-L1 信号通路的差异基因分别有 TLR2、

表 3 富集数量在 100 个基因以上的通路

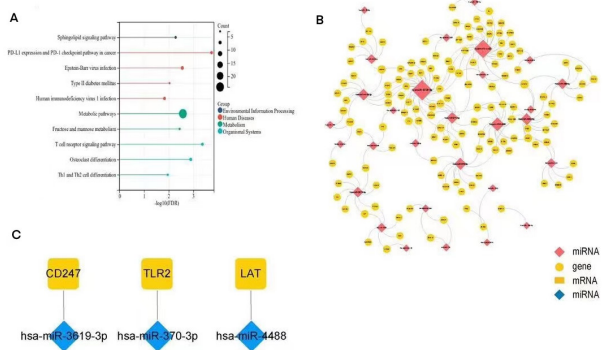
| 通路编号 | 通路名称 | 差异基因通路数 (占总基因的百分比) | 调控方向 |
|---------|-----------------------------------|--------------------|------|
| ko04140 | Autophagy - animal | 233(5.33%) | 上调 |
| ko04010 | MAPK signaling pathway | 219(5.01%) | 上调 |
| ko04659 | Th17 cell differentiation | 170(3.89%) | 下调 |
| ko04137 | Mitophagy - animal | 160(3.66%) | 上调 |
| ko04380 | Osteoclast differentiation | 154(3.52%) | 上调 |
| ko04658 | Th1 and Th2 cell differentiation | 146(3.34%) | 下调 |
| ko04640 | Hematopoietic cell lineage | 145(3.31%) | 上调 |
| ko05145 | Toxoplasmosis | 140(3.20%) | 上调 |
| ko04062 | Chemokine signaling pathway | 138(3.15%) | 上调 |
| ko04910 | Insulin signaling pathway | 131(2.99%) | 上调 |
| ko04660 | T cell receptor signaling pathway | 128(2.93%) | 下调 |
| ko04066 | HIF-1 signaling pathway | 109(2.49%) | 上调 |
| ko05321 | Inflammatory bowel disease (IBD) | 101(2.31%) | 下调 |



A~D: 火山图代表了不同数据集的差异基因可视化情况, 红色代表上调, 绿色代表下调; E: 韦恩图为 4 组 GEO 芯片与本研究所得到的差异基因的重叠情况, 韦恩图下方代表了不同数据集所包含的差异基因数量以及在所有基因总和中所占比例, 不同的颜色代表不同的数据集

图 4 差异基因的筛选与整合

CD247、LAT (表 4)。此外, 对该 131 个差异基因以及调控这些基因的差异表达 miRNAs (图 5B) 进行了网络可视化, 并找到调控 TLR2、CD247、LAT 的 miRNAs, 分别是 hsa-miR-370-3p、hsa-miR-3619-3p 和 hsa-miR-4488 (图 5C)。



A : KEGG 分析, x 轴代表 FDR 的 $-\log_2$ 值, y 轴代表通路名称, 圆圈的大小代表不同的基因数量, 线条的颜色代表通路的类型; B : miRNA-mRNA 网络, 其中红色菱形代表 miRNAs, 黄色圆形代表 mRNAs ; C : 调控 PD-1/PD-L1 相关的基因和 miRNAs

图 5 131 个差异基因的功能分析和 mRNA-miRNA 网络构建

表 4 参与调控 PD-1/PD-L1 信号通路的 miRNAs 及调控的基因

| 指标 | Log ₂ FC | 调控方向 |
|-----------------|---------------------|------|
| miRNA | | |
| hsa-miR-370-3p | -4.9461 | 下调 |
| hsa-miR-3619-3p | 4.0428 | 上调 |
| hsa-miR-4488 | 3.7187 | 上调 |
| mRNA | | |
| TLR2 | 5.7708 | 上调 |
| CD247 | -3.3817 | 下调 |
| LAT | -3.4401 | 下调 |

2.6 LncRNAs 的 KEGG 分析和 lncRNA-miRNA-mRNA 网络

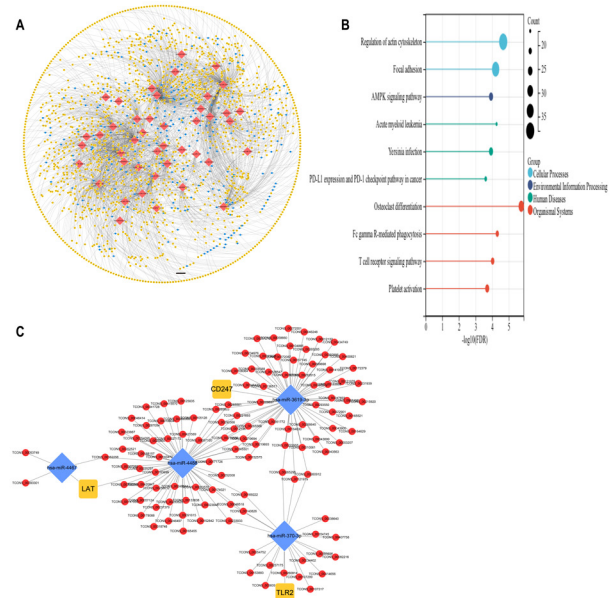
将差异表达的 lncRNAs 构建 ceRNA (图 6A) 进行靶基因预测, 对 lncRNAs 预测的靶基因进行 KEGG 分析, 结果显示靶基因集同样富集在 PD-1/PD-L1 通路 (图 6B)。并且发现 80 个 lncRNAs 在 PD-1/PD-L1 通路富集 (图 6C), 初步发现 TCONS_00265603、TCONS_00234402、TCONS_00260914、TCONS_00265581、TCONS_0036088 通过竞争性抑制 hsa-miR-3619-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-4488 参与调控 TLR2、LAT 和 CD247 的表达 (表 5)。

表 5 lncRNAs 涉及 ceRNA 网络

| LncRNA_ID | Log ₂ FC | miRNA | Log ₂ FC | 基因 |
|----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-------|
| TCONS_00265603 | 11.0014 | hsa-miR-3619-3p | 4.0428 | CD247 |
| TCONS_00234402 | 7.6583 | hsa-miR-370-3p | -4.9461 | TLR2 |
| TCONS_00265581 | -5.9945 | hsa-miR-4488 | 3.7187 | LAT |

3 讨论

miRNA 和 lncRNA 在各种生物过程中的重要功能, 这些分子引起了研究人员的关注 [5-6]。RNA 测序是一种强大的工具, 能够揭示特定特异性 RNA 的差异表达谱 [7]。为了探索 miRNA 和 lncRNA 在脓毒症中的潜在作用, 本研究通过提取脓毒症患者及健康志愿者的外周血中总 RNA 进行高通量测序。与对照组相比发现, 共有 4 934 个上调的



A : 差异表达 lncRNAs 的 ceRNA 网络, 红色为 miRNA, 蓝色为 lncRNA, 黄色为基因; B : lncRNAs 预测靶基因的 KEGG 分析; C : 调控 PD-1/PD-L1 通路的 lncRNA 的 ceRNA 网络, 红色为 lncRNA, 蓝色为 miRNA, 黄色为基因

图 6 差异表达 lncRNAs 功能分析和 ceRNA 网络

mRNAs 和 4 395 个下调的 mRNAs、375 个上调的 lncRNAs 和 474 个下调的 lncRNAs 以及 74 个上调的 miRNAs 和 77 个下调的 miRNAs。

随后本研究对差异表达的 mRNAs 进行 KEGG 分析。KEGG 分析结果显示差异表达的 mRNAs 富集于炎症免疫相关通路, 其中包括辅助性 T 细胞 (Th17、Th1 和 Th2) 分化、T 细胞受体等相关信号通路。T 细胞是适应性免疫的细胞成分, 辅助 T 细胞通过分泌各种细胞因子和趋化因子激活先天性免疫细胞和适应性免疫细胞。Th17 细胞、Th1 和 Th2 细胞是 CD4⁺T 淋巴细胞的亚群 [8]。有学者发现在严重脓毒症期间 Th17 细胞免疫反应下调会增加脓毒症患者的病死率 [9]。Th1 细胞、Th2 细胞是功能不同 Th 细胞亚群, 参与人体的促炎反应和抑炎反应的平衡。Th1 细胞和 Th2 细胞之间的平衡, 影响巨噬细胞的极化, M1/M2 巨噬细胞平衡极化决定了器官在炎症或损伤中的命运 [10]。本研究结果表明在脓毒症患者血液中 Th17 活化通路下调, 影响 Th17 细胞的分化; Th1 细胞和 Th2 细胞分化信号通路的下调, 导致 M1 和 M2 型巨噬细胞转化平衡被打破; Th17 细胞分化、Th1 细胞和 Th2 细胞分化, 受 T 细胞受体信号通路的调控; 最终影响免疫细胞的增殖和活化。导致机体免疫异常。综上所述, 脓毒症的免疫炎症反应, 影响辅助性 T 细胞的增殖和分化, 从而导致机体的免疫抑制。

结合 GEO 数据库中下载的 4 套脓毒症患者数据集和本研究的 DE mRNA, 本研究筛选出 131 个共同差异表达的靶

基因。同时,靶基因的 KEGG 功能分析提示差异基因同样富集于免疫和炎症反应相关通路。与上述的结果一致。其中显著富集在 PD-1/PD-L1 信号通路。PD-1 也称为 CD279,是适应性和先天免疫应答的抑制剂;在肿瘤疾病中得到广泛的研究^[11]。PD-1 通过调节 T 细胞的活性,促进 T 细胞凋亡,在抑制免疫反应和促进自我耐受方面起着至关重要的作用^[12]。PD-L1 是一种跨膜蛋白,在免疫细胞表面表达。被认为是免疫反应的辅助抑制因子,它可以与 PD-1 结合,减少 PD-1 阳性细胞的增殖,抑制其细胞因子分泌并诱导细胞凋亡^[13]。研究表明,PD-1/PD-L1 信号通路与脓毒症患者的病死率和预后密切相关;可导致 T 细胞耗竭、凋亡和增殖受损^[14]。因此,通过发现调控 PD-1/PD-L1 通路的分子,研究其调控机制将为诊断和治疗提供新的方向。

进一步,本研究还发现 TLR2、CD247 和 LAT 差异表达的基因在脓毒症中参与 PD-1/PD-L1 通路的调控 TLR2 通过 TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路,引起免疫细胞表面 PL-L1 的表达增加,激活 PD-1/PD-L1 信号通路,最终抑制 T 细胞活化所需基因及细胞因子的转录和翻译,发挥负向调控 T 细胞活性的作用^[15]。从本研究发现 TLR2 在 PD-1/PD-L1 信号通路中高表达,可能通过激活 PD-1/PD-L1 信号通路来诱导脓毒症免疫抑制。CD247 (又称 CD3Z 或 TCRZ) 基因位于人染色体 1q24.2,在慢性炎症、自身免疫性疾病和肿瘤发展过程中发挥重要作用。一项 Meta 分析显示脓毒症休克小鼠模型中的 CD247 表达水平明显降低^[16]。既往研究表明,PD-1/PD-L1 信号通路的激活会引起 CD247 基因的低表达,诱导 T 细胞的凋亡^[17]。本研究则证实,CD247 脓毒症外周血中低表达。LAT 是一种支架蛋白,是 T 细胞活化的中心信号纽带^[18]。有研究者发现,在体内实验和体外实验中,LAT 的磷酸化水平降低,引起 T 淋巴细胞的激活障碍^[19]。此外,近期文献报道 LAT 的活性降低会减少辅助性 T 细胞活性,而通过抑制 PD-1 能够逆转这一现象^[20]。总结本研究结果发现 TLR2、CD247 和 LAT 表达水平在脓毒症外周血中分别呈现上调、下调和下调。共同激活 PD-1/PD-L1 通路来抑制脓症患者血液中 T 细胞、单核细胞和巨噬细胞的活化,诱发细胞凋亡,有望成为脓毒症免疫功能障碍的新的标记物和治疗靶点。

同时,本研究对 131 个差异表达的 mRNAs 与调控这些基因的 miRNAs 构建 miRNA-mRNA 网络,进一步挖掘 miRNAs 在脓毒症中的调控作用;通过 miRNA-mRNA 关联分析发现,hsa-miR-370-3p、hsa-miR-3619-3p 和 hsa-miR-4488 分别调控 TLR2、CD247 和 LAT3。hsa-miR-370-3p 和类风湿性关节炎和痛风性关节炎的发病机制有关^[21],hsa-miR-4488 和皮炎发病机制相关^[22]。类风湿性关节

炎、痛风性关节炎和皮炎均为自身免疫性疾病^[21-22],关于 hsa-miR-3619-3p,目前尚无相关文献报道。本研究结果发现 hsa-miR-370-3p 低表达、hsa-miR-3619-3p 高表达和 hsa-miR-4488 高表达,负反馈调控 TLR2、CD247 和 LAT,与上述的研究结果一致,前面研究发现 TLR2、CD247 和 LAT 参与调控脓毒症中 PD-1/PD-L1 信号通路。因此推测 hsa-miR-370-3p、hsa-miR-3619-3p 和 hsa-miR-4488 通过分别调控 TLR2、CD247 和 LAT 表达来影响 PD-1/PD-L1 信号通路的激活,为脓毒症免疫抑制相关研究提供新的策略。

此外,本研究也筛选到 375 个上调和 474 个下调的 lncRNAs。近期的研究发现,lncRNAs 具有巨大的临床价值,其可能在脓毒症诱导的器官功能障碍中发挥着重要作用^[23]。本研究构建了 lncRNA-miRNA-mRNA 竞争性 RNA 网络来预测 lncRNA 的功能,并对预测的下游靶基因进行 KEGG 分析,结果同样在 PD-1/PD-L1 信号通路中富集,并通过 ceRNA 网络分析发现 80 个 lncRNAs 调控该通路。其中 TCONS_00265603、TCONS_00234402 和 TCONS_00265581 可以通过竞争性抑制 hsa-miR-3619-3p、hsa-miR-370-3p 和 phsa-miR-4488 参与调控 CD247、TLR2 和 LAT 表达。有相关研究发现 lncRNA SNHG14 调节 miR-5590-3p/ZEB1 靶向轴影响 PD-1/PD-L1 信号通路,从而促进弥漫性大 B 细胞淋巴瘤得进展和免疫逃逸^[24]。Hu 等^[25]发现 lncRNA XLOC_003810 可以促进 T 细胞活化,并抑制重症肌无力相关胸腺瘤患者的 PD-1/PD-L1 表达。然而,在脓毒症中,尚无 lncRNA 调控 PD-1/PD-L1 信号通路的相关研究,本研究初步发现 lncRNA 可能通过调控 PD-1/PD-L1 信号来调控机体免疫系统,诱导先天免疫细胞及适应性免疫细胞的活化,为脓毒症的发展提供了新的方向。

综上所述本研究全面分析了脓症患者外周血中 mRNAs 和非编码 RNAs (lncRNAs 和 miRNAs) 的表达,并结合 GEO 数据库中 4 个脓毒症数据集和本研究测序数据的相互验证;找出 131 个重叠基因,通过 KEGG 分析发现显著富集在 PD-1/PDL-1 通路;并构建 miRNA-mRNA 网络,进而发现参与调控 PD-1/PDL-1 通路的相关网络分子,为靶向治疗提供了理论依据。最后,构建了 lncRNA-miRNA-mRNA 网络,借助 lncRNAs 靶基因预测和 KEGG 分析,再次证实 PD-1/PDL-1 信号通路在脓毒症免疫抑制中发挥了重要作用,初步发现参与调控该通路相关的 lncRNAs,由于 lncRNAs 在该通路中的调节方式尚不明确,该分析为未来的研究提供了宝贵的资源和信息。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李兴、宋春梅:实验操作、论文撰写;

卢文辉：数据收集及整理；穆根华、卢仲谦；统计学分析；
邓义军：研究设计、论文修改

参 考 文 献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2.
- [3] Esposito S, de Simone G, Boccia G, et al. Sepsis and septic shock: new definitions, new diagnostic and therapeutic approaches[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2017, 10: 204-212. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.06.013.
- [4] Iro MA, Soundara Pandi SP. Clinical application of non-coding RNAs in sepsis[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2020, 33(6): 530-539. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000688.
- [5] Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 167-179. DOI: 10.1038/nrd.2016.117.
- [6] 韦毅萌, 袁丁, 余言午, 等. 宏基因组二代测序技术在血流感染脓毒症患者诊疗中的应用价值 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2023, 32(6): 786-789. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2023.06.012.
- [7] Qian XY, Zhao JY, Yeung PY, et al. Revealing lncRNA structures and interactions by sequencing-based approaches[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(1): 33-52. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.09.012.
- [8] Read KA, Powell MD, Sreekumar BK, et al. In vitro differentiation of effector CD4⁺ T helper cell subsets[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1960: 75-84. DOI: 10.1007/978-1-4939-9167-9_6.
- [9] Wu HP, Chung K, Lin CY, et al. Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(8): 751-763. DOI: 10.1007/s00011-013-0630-3.
- [10] Chen YN, Hu MR, Wang L, et al. Macrophage M1/M2 polarization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- [11] Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3):727-742.
- [12] Ai LY, Xu AT, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 pathway: signaling, cancer, and beyond[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1248: 33-59. DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5_3.
- [13] Nakamori Y, Park EJ, Shimaoka M. Immune deregulation in sepsis and septic shock: reversing immune paralysis by targeting PD-1/PD-L1 pathway[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 624279. DOI: 10.3389/fimmu.2020.624279.
- [14] Tomino A, Tsuda M, Aoki R, et al. Increased PD-1 expression and altered T cell repertoire diversity predict mortality in patients with septic shock: a preliminary study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169653. DOI: 10.1371/journal.pone.0169653.
- [15] Bi SX, Huang WJ, Chen S, et al. Cordyceps militaris polysaccharide converts immunosuppressive macrophages into M1-like phenotype and activates T lymphocytes by inhibiting the PD-L1/PD-1 axis between TAMs and T lymphocytes[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 261-280. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.050.
- [16] Jiang Y, Miao Q, Hu L, et al. FYN and CD247: key genes for septic shock based on bioinformatics and meta-analysis[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2022, 25(10): 1722-1730. DOI: 10.2174/1386207324666210816123508.
- [17] Li YP, Chen SB, Li XC, et al. CD247, a potential T cell-derived disease severity and prognostic biomarker in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 762594. DOI: 10.3389/fimmu.2021.762594.
- [18] Malissen B, Aguado E, Malissen M. Role of the LAT adaptor in T-cell development and Th2 differentiation[J]. *Adv Immunol*, 2005, 87: 1-25. DOI: 10.1016/S0065-2776(05)87001-4.
- [19] Saibil SD, Deenick EK, Ohashi PS. The sound of silence: modulating energy in T lymphocytes[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6): 658-664. DOI: 10.1016/j.coi.2007.08.005.
- [20] Li YK, Tunbridge HM, Britton GJ, et al. A LAT-based signaling complex in the immunological synapse as determined with live cell imaging is less stable in T cells with regulatory capability[J]. *Cells*, 2021, 10(2): 418. DOI: 10.3390/cells10020418.
- [21] Chen XM, Zhao Y, Wu XD, et al. Novel findings from determination of common expressed plasma exosomal microRNAs in patients with psoriatic arthritis, psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis, and gouty arthritis[J]. *Discov Med*, 2019, 28(151): 47-68.
- [22] Zhong DL, Wu CY, Xu D, et al. Plasma-derived exosomal hsa-miR-4488 and hsa-miR-1228-5p: novel biomarkers for dermatomyositis-associated interstitial lung disease with anti-melanoma differentiation-associated protein 5 antibody-positive subset[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6676107. DOI: 10.1155/2021/6676107.
- [23] Hashemian SM, Pourhanifeh MH, Fadaei S, et al. Non-coding RNAs and exosomes: their role in the pathogenesis of sepsis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 51-74. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.05.012.
- [24] Zhao LN, Liu Y, Zhang JB, et al. LncRNA SNHG14/miR-5590-3p/ZEB1 positive feedback loop promoted diffuse large B cell lymphoma progression and immune evasion through regulating PD-1/PD-L1 checkpoint[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 731. DOI: 10.1038/s41419-019-1886-5.
- [25] Hu B, Niu L, Jiang Z, et al. LncRNA XLOC003810 promotes T cell activation and inhibits PD-1/PD-L1 expression in patients with myasthenia gravis-related thymoma[J]. *Scand J Immunol*, 2020, 92(1): e12886. DOI: 10.1111/sji.12886.

(收稿日期：2023-01-15)

(本文编辑：姜宇婷)