中国比较医学杂志
*Chinese Journal of Comparative Medicine*
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

# 《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：miR-1247-5p 靶向 SETD8 调控 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞炎症和凋亡的机制
作者：丁秀秀，林文婷，张炳丽，蔡爽，廖东琛
收稿日期：2026-06-05
网络首发日期：2026-10-22
引用格式：丁秀秀，林文婷，张炳丽，蔡爽，廖东琛．miR-1247-5p 靶向 SETD8 调控 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞炎症和凋亡的机制[J/OL]．中国比较医学杂志．https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20261022.1714.002

**网络首发**：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认**：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# miR-1247-5p 靶向 SETD8 调控 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞炎症和凋亡的机制

丁秀秀[1]，林文婷[2]✉，张炳丽[1]，蔡 爽[1]，廖东琛[1]

（1.海南省人民医院呼吸与危重症医学科，海口 570311；2.海南省人民医院医疗保健中心，海口 570311）
✉通信作者　林文婷（1985—），女，硕士，副主任医师，研究方向：老年医学。E-mail：indakoko@163.com

**摘要**　目的 探讨 miR-1247-5p 通过调控含 SET 结构域赖氨酸甲基转移酶 8（SETD8）表达对脓毒症中细胞炎症及凋亡的影响。方法 利用 GEO 数据库（GSE184803）数据集筛选出脓毒症患者与健康对照者血清中的差异表达基因；采用实时荧光定量逆转录 PCR（RT-qPCR）测定 miR-1247-5p 及 SETD8 的表达水平；以蛋白免疫印迹法（Western blot）检测 SETD8 的蛋白表达；通过双荧光素酶报告实验验证 miR-1247-5p 对 SETD8 的靶向调控作用。以 CCK-8 评估 THP-1/M0 细胞活力；通过流式细胞术分析细胞的凋亡情况；采用酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒检测细胞上清液中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6、IL-1β 及 IL-18 的表达水平；借助 JC-1 荧光探针试剂盒检测细胞的线粒体膜电位变化。结果 GEO 数据库分析结果显示，miR-1247-5p 在脓毒症患者中呈高表达（logFC>1.5，adj.P.Value<0.05）。RT-qPCR 检测证实，脓毒症患者血清中 miR-1247-5p 表达显著上调，SETD8 表达显著下调（*P*<0.001）；在脂多糖（LPS）诱导的 THP-1/M0 细胞中，miR-1247-5p 表达显著升高（*P*<0.01），而 SETD8 表达显著降低（*P*<0.001），该结果经 Western blot 检测进一步验证 SETD8 表达降低（*P*<0.001）。双荧光素酶报告实验及 RT-qPCR 证明 miR-1247-5p 对 SETD8 的靶向调控作用（*P*<0.001）。挽救实验结果表明，敲低 SETD8 可部分逆转 miR-1247-5p 抑制对 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞活力增加（*P*<0.05）、凋亡减少（*P*<0.001）、炎症因子表达降低（*P*<0.001）及线粒体膜电位升高（*P*<0.001）。结论 miR-1247-5p 在脓毒症患者血清中高表达，且可靶向抑制 SETD8 的表达；抑制 miR-1247-5p 可改善 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞活力、凋亡、炎症及线粒体功能异常，敲低 SETD8 能部分逆转该效应。

**关键词**　miR-1247-5p；SETD8；脓毒症；炎症；细胞凋亡

# Mechanism by which miR-1247-5p targets SETD8 to regulate lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis in THP-1/M0 cells

DING Xiuxiu[1], LIN Wenting[2]✉, ZHANG Bingli[1], CAI Shuang[1], LIAO Dongchen[1]

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China;2. Medical Care Center of Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311)

**Abstract**　Objective To investigate the effects of microRNA-1247-5p (miR-1247-5p) on cellular inflammation and apoptosis in sepsis through regulation of SET domain-containing lysine methyltransferase 8 (SETD8). Methods Differentially expressed microRNAs and genes in serum samples from sepsis patients and healthy controls were identified using the GEO database. The expression levels of miR-1247-5p and SETD8 were measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). SETD8 protein expression was detected by western blot. The targeted regulatory effect of miR-1247-5p on SETD8 was examined using a dual luciferase reporter assay. THP-1/M0 cell viability was evaluated using the Cell Counting Kit-8 assay. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF- α), interleukin (IL)-6 (IL-6), IL-1β, and IL-18 in cell supernatants were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits. Changes in mitochondrial membrane potential were detected using a JC-1 fluorescence probe kit. Results GEO database analysis (GSE184803) showed that miR-1247-5p was highly expressed in patients with sepsis (log fold change>1.5, adjusted *P*<0.05). RT-qPCR analysis

收稿日期：2026-06-05
基金项目：海南省自然科学基金（823RC571）。
作者简介：丁秀秀（1988—），女，硕士，副主任医师，研究方向：肺部感染性疾病的诊治。E-mail：kquai1@sina.com
网络首发时间：2026-10-22 19:30:02　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20261022.1714.002

showed that serum miR-1247-5p expression was significantly upregulated in patients with sepsis, whereas SETD8 expression was significantly downregulated ($P$<0.001). In lipopolysaccharide (LPS)-induced THP-1/M0 cells, miR-1247-5p expression was significantly increased ($P$<0.01), whereas SETD8 expression was significantly decreased ($P$<0.001). Western blotting confirmed a significant decrease in SETD8 protein expression ($P$<0.001). The dual luciferase reporter assay and RT-qPCR confirmed that miR-1247-5p targeted and negatively regulated SETD8 ($P$<0.001). In rescue experiments, inhibition of miR-1247-5p in LPS-induced THP-1/M0 cells increased viability ($P$<0.05), reduced apoptosis ($P$<0.001) and inflammatory factor levels ($P$<0.001), and increased mitochondrial membrane potential ($P$<0.001); SETD8 knockdown partially attenuated these changes. Conclusions miR-1247-5p was highly expressed in the serum of patients with sepsis and targeted SETD8 to inhibit its expression. Inhibition of miR-1247-5p increased cell viability, reduced apoptosis and inflammation, and ameliorated mitochondrial dysfunction of LPS-induced THP-1/M0 cells; these effects were partially reversed by SETD8 knockdown.
**Key words** miR-1247-5p; SETD8; sepsis; inflammation; apoptosis

脓毒症是由宿主对感染反应失控，进而引发危及生命的器官功能障碍[1]。脓毒症常引发急性肺损伤，导致严重低氧血症、呼吸衰竭并加剧不良预后，其进展涉及炎症与凋亡通路的激活，会造成肺泡上皮细胞破坏、上皮通透性升高及肺泡腔内水肿液积聚；同时，巨噬细胞在脓毒症相关炎症中起关键作用[2-4]。此外，脓毒症诱发的全身性炎症会增加细胞内炎症因子释放，产生的活性氧与活性氮超出线粒体清除能力，导致线粒体膜脂质过氧化、蛋白损伤及能量代谢紊乱，ATP 生成减少，进而引发线粒体功能障碍[5]。本研究通过检测脓毒症患者血清中 miR-1247-5p 与含 SET 结构域赖氨酸甲基转移酶 8（SET domain lysine methyltransferase 8，SETD8）的表达水平，结合体外实验分析 miR-1247-5p 调控 SETD8 对脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的 THP-1 细胞活力、凋亡、炎症反应及线粒体膜电位的影响，为揭示脓毒症的发病机制提供新的视角。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 血清样本

本研究在海南省人民医院采集脓毒症患者（脓毒症组，包含 10 例轻度患者和 15 例重度患者）及正常健康对照者（正常组）血清样本各 25 例。患者与对照者的基本临床信息见表 1。所有研究对象均签署知情同意书，研究方案已通过海南省人民医院伦理委员会审查批准（医伦研[2022]219 号）。

表1 脓毒症组与正常组的临床基线特征($n$=25)

Table 1 Clinical baseline characteristics of sepsis group and the normal group($n$=25)

| 参数<br>Parameters | 脓毒症组<br>Sepsis group | 正常组<br>Normal group | P |
|---|---|---|---|
| 年龄/岁<br>Age/years | 62.4 ± 11.8 | 59.8 ± 10.5 | 0.421 |
| 性别<br>Gender | | | 0.572 |
| 女性 n(%)<br>Female n(%) | 9（36.0） | 11（44.0） | |
| 男性 n(%)<br>Male n(%) | 16 (64.0) | 14 (56.0) | |
| 感染部位 n(%)<br>Infection site n(%) | | | |
| 肺部<br>Lung | 12 (48.0) | - | - |
| 腹腔<br>Abdominal | 5 (20.0) | - | - |
| 泌尿道<br>Urinary tract | 3 (12.0) | - | - |
| 其他<br>Others | 5 (20.0 | - | - |
| 病原菌 n(%)<br>Pathogenic bacteria n(%) | | | |
| 革兰氏阴性菌<br>Gram negative bacteria | 10 (40.0) | - | - |
| 革兰氏阳性菌<br>Gram positive bacteria | 6 (24.0) | - | - |
| 混合感染 | 3 (12.0) | - | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Mixed infection<br>其他<br>Others | 6 (24.0) | - | - |
| APACHE II 评分<br>APACHE II score | 18.6 ± 5.2 | - | - |
| SOFA 评分<br>SOFA score | 8.4 ± 2.8 | - | - |

#### 1.1.2 细胞

人单核细胞白血病 THP-1 细胞（货号：CL-0233）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清（fetal calf serum，FBS，货号：10099141）、RPMI 1640 培养基（货号：11875093）、Lipofectamine 3000 试剂（货号：L3000015）、TRIzol 试剂（货号：15596018）、逆转录试剂盒（货号：4368814）、SYBR Green PCR Master Mix（货号：4367659）均购自赛默飞世尔科技公司；佛波酯（phorbol ester，PMA，货号：P1585）、脂多糖（lipopolysaccharide，LPS，货号：L4391）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号：P0012S）、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（货号：P0012A）、PVDF 膜（货号：FFP24）、脱脂奶粉（货号：P0216）、ECL 化学发光试剂盒（货号：P0018S）、CCK-8（货号：C0038）、细胞凋亡检测试剂盒（货号：C1062S）、JC-1 荧光探针试剂盒（货号：C2006）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（货号：PT518）、白细胞介素（interleukin，IL）-6 的 ELISA 试剂盒（货号：PI330）、IL-1β 的 ELISA 试剂盒（货号：PI301）、IL-18 的 ELISA 试剂盒（货号：PI553）、双荧光素酶报告基因检测试剂盒（货号：RG027）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；SETD8 抗体（货号：14063-1-AP）及 GAPDH 抗体（货号：60004-1-Ig）购自武汉三鹰生物技术有限公司；IκBα 抗体（货号：4812S）、p-p65 抗体（货号：3033S）、p65 抗体（货号：8242S）、β-actin 抗体（货号：4970）均购自美国 Cell Signaling Technology 公司；NC inhibitor、miR-1247-5p inhibitor、si-SETD8、野生型及突变型 SETD8 3’UTR 双荧光素酶报告质粒均由上海吉玛制药技术有限公司合成。

实时荧光定量逆转录 PCR（reverse transcription quantitative real-time PCR）仪（型号：QuantStudio 5）、电泳仪（型号：PowerPac Basic）、酶标仪（型号：Multiskan FC）、凝胶成像仪（型号：iBright CL1000）均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；CytoFLEX 流式细胞仪（型号：CytoFLEX）购自美国 Beckman Coulter 公司；倒置显微镜（型号：XDS-1B）购自中国基士恩公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 GEO 数据库分析

从 GEO 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）下载脓毒症相关数据集 GSE184803。该数据集包含脓毒症患者与健康对照者血清样本的 miRNA 表达谱数据。采用 R 语言中的“limma”包（版本 3.52.1）对原始数据进行背景校正和标准化处理。以 log2FC>1.5 且 adj.P.Value<0.05 为阈值筛选差异表达 miRNA，结果以火山图表示。

#### 1.3.2 细胞培养

THP-1 细胞采用含 10% FBS 及 1%双抗（青霉素-链霉素）的 RPMI 1640 培养基，培养于 37 ℃、5% $CO_2$ 恒温培养箱。脓毒症模型构建先以 100 ng/mL PMA 诱导 24 h 分化为 THP-1/M0 细胞后，再经 100 ng/mL LPS 处理 24 h 建立，记为 LPS 组。以未处理的 THP-1/M0 细胞作为对照（Control）组。

#### 1.3.3 细胞转染与分组

THP-1/M0 细胞以每孔 $2\times10^5$ 个接种 6 孔板中孵育 24 h，依 Lipofectamine 3000 说明书将 NC inhibitor、miR-1247-5p inhibitor 和 si-SETD8（终浓度均为 50 nmol/L）转染入 THP-1/M0 细胞，转染 24 h 后进行 100 ng/mL LPS 处理 24 h，记为 LPS+NC inhibitor 组、LPS+miR-1247-5p inhibitor 组、LPS+miR-1247-5p inhibitor+si-SETD8 组。

#### 1.3.4 RT-qPCR 检测

TRIzol 法提取细胞总 RNA 并反转录为 cDNA，以其为模板进行 RT-qPCR 检测 mRNA 水平；各基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量，其中 miR-1247-5p、SETD8 分别以 U6、GAPDH 为内参标准化。

miR-1247-5p 的逆转录序列如下：5’-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCGGG-3’。RT-qPCR 的引物序列见表 2。

表2 RT-qPCR引物序列
Table 2 RT-qPCR primer sequences

| 基因 Gene | 引物序列（5’-3’） Primer sequence (5’-3’) | 长度 length |
|---|---|---|
| miR-1247-5p | F：GACCCGTCCCGTTCGT<br>R：AGTGCAGGGTCCGAGGTATT | 66 bp |
| SETD8 | F：GGCTAGAGGCAGGAAGATGTC<br>R：AGAGCATTTGTTCGGGCTCA | 100 bp |
| U6 | F：CTCGCTTCGGCAGCACA<br>R：AACGCTTCACGAATTTGCGT | 94 bp |
| GAPDH | F：TCGGAGTCAACGGATTTGGT<br>R：TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC | 181 bp |

#### 1.3.5 蛋白免疫印迹法（Western blot）检测

THP-1/M0 细胞经磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）清洗后，加含抑制剂的裂解液冰上裂解，离心取上清液，BCA 法测蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白并转移至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭，TBST 洗涤后加一抗 4 ℃孵育过夜，再次 TBST 洗涤后加二抗室温孵育 1 h，洗涤后凝胶成像仪拍照。

#### 1.3.6 双荧光素酶报告实验

在 TargetScan Human 7.2 在线数据库（http://www.targetscan.org/vert_72/）中进行靶向预测，结果显示 miR-1247-5p 具有靶向 SETD8 的潜力（seed 序列 CCCGUCC）。野生型（序列 GGACGGG）及突变型（序列 GUUGCCG）SETD8 3’UTR 报告质粒均购自上海吉玛制药技术有限公司。载体骨架为 pmiRGLO 双荧光素酶报告基因载体，该载体同时携带萤火虫荧光素酶（Firefly Luciferase）和海肾荧光素酶（Renilla Luciferase）报告基因，后者作为内参对照。将 THP-1/M0 细胞接种至 6 孔板，以 Lipofectamine 3000 进行 WT/MUT-SETD8 双荧光素酶报告载体和 miR-1247-5p inhibitor/NC inhibitor 的共转染，48 h 后依说明书检测荧光素酶活性。

#### 1.3.7 CCK-8 检测细胞活力

THP-1/M0 细胞接种 96 孔板，处理后分别于 24、48、72 h 终止培养。每孔加 10 μL CCK-8，孵育 2 h 后酶标仪测 450 nm 吸光度，评估细胞活力。

#### 1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡

取各组 THP-1/M0 细胞悬液，1000 r/min 离心 5 min，PBS 洗涤后用 Annexin V-FITC 结合液进行重悬；经膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素（Annexin V-FITC）与碘化丙啶（propidium iodide，PI）避光染色 15 min，流式细胞仪分析细胞凋亡率。

#### 1.3.9 ELISA 试剂盒检测炎症因子

参照制造商说明，采用人 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-18 ELISA 试剂盒检测 THP-1/M0 细胞培养上清液中各因子的水平。

#### 1.3.10 JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位

THP-1/M0 细胞经 JC-1 染色缓冲液孵育后，洗涤两次，通过流式细胞术分析线粒体膜电位。

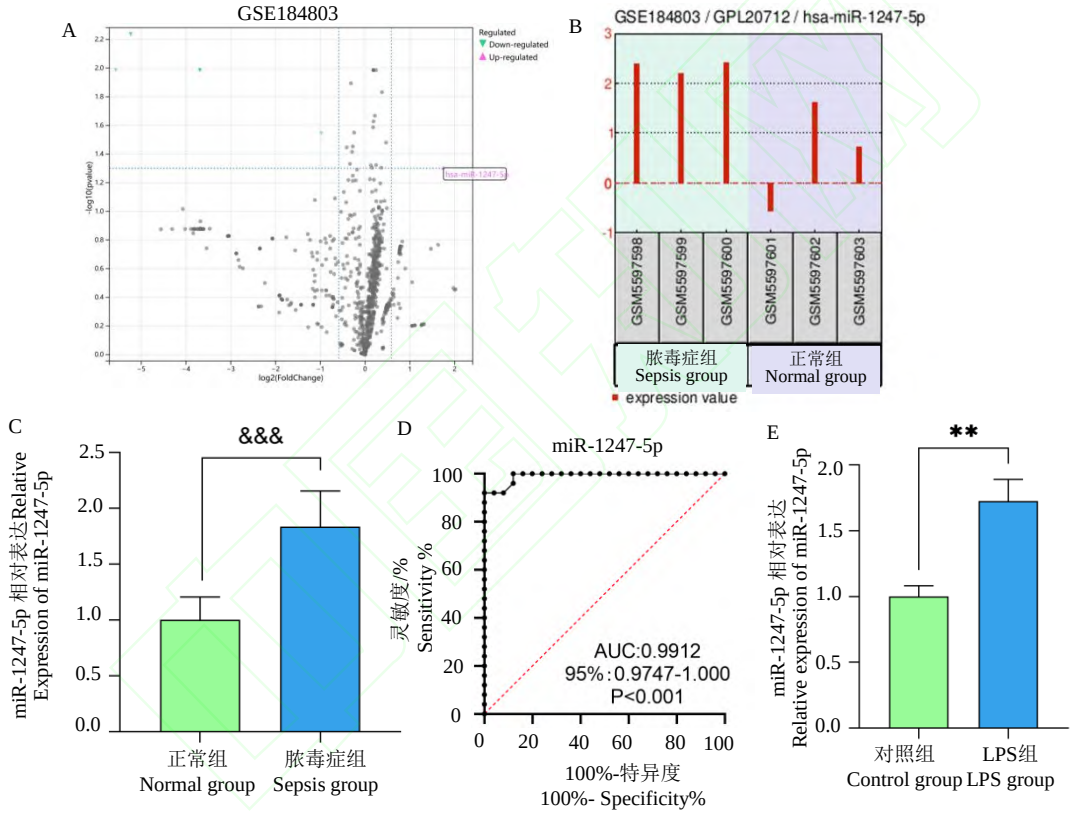
### 1.4 统计学方法

数据以平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，借助 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。两组比较采用独立样本 *t* 检验，多组比较用单/双因素方差分析以及 *SNK-q* 事后检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　miR-1247-5p 在脓毒症中高表达

GEO 数据库（GSE184803）分析显示，脓毒症患者血清中 hsa-miR-1247-5p 呈高表达（图 1A、1B）。既往研究显示，LPS 诱导的小鼠肺部炎症模型中 miR-1247 表达显著高于正常小鼠，且可通过调控 C-C 趋化因子受体 16（C-C chemokine receptor 16，CCR16）抑制模型小鼠血浆炎症因子表达[6]。针对 LPS 诱导的肺上皮细胞 A549 的研究还发现，miR-1247-3p 表达水平明显上调；下调其表达可促进细胞增殖，抑制凋亡，该调控作用通过调节靶基因肺表面活性物质蛋白 C（surfactant protein C，SFTPC）的表达实现[7, 8]。本研究经 RT-qPCR 检测验证，与正常组相比，脓毒症患者血清中 miR-1247-5p 表达显著升高（$P$<0.001，图 1C）。ROC 曲线分析表明，miR-1247-5p 对脓毒症具有潜在的诊断价值（AUC=0.9912，$P$<0.001，图 1D）。LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞中，miR-1247-5p 表达同样高于 Control 组（$P$<0.01，图 1E）。综上所述，miR-1247-5p 在脓毒症发生中呈高表达状态。




注：A：脓毒症患者和健康对照者血清中的差异基因火山图；B：miR-1247-5p 表达谱；C：RT-qPCR 检测的血清中 miR-1247-5p 表达水平（$n$=25）；D：ROC 曲线分析 miR-1247-5p 的诊断效能；E：RT-qPCR 检测的细胞中 miR-1247-5p 表达水平。与正常组相比，$^{\&\&\&}P$<0.001；与对照组相比，$^{**}P$<0.01。

图 1　脓毒症中 miR-1247-5p 的表达

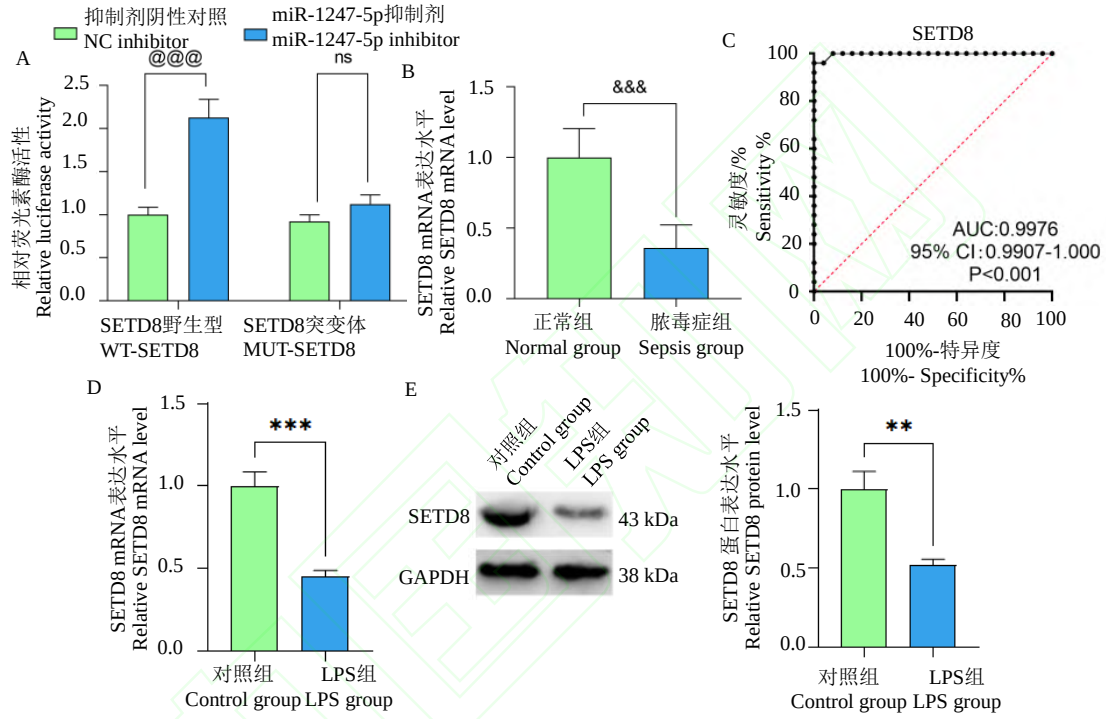
Note. A, Volcano maps of differentially expressed genes in the serum of patients with sepsis and healthy controls. B, miR-1247-5p expression profile; C: Expression level of miR-1247-5p in serum detected by RT-qPCR ($n$=25). D, ROC curve analysis of the diagnostic efficacy of miR-1247-5p. E, Expression level of miR-1247-5p in cells detected by RT-qPCR. Compared with Normal group, $^{\&\&\&}P$<0.001. Compared with Control group, $^{**}P$<0.01.

Figure 1 Expression of miR-1247-5p in sepsis

### 2.2　miR-1247-5p 靶向调控 SETD8 表达

通过 TargetScan Human 7.2 在线数据库预测发现，miR-1247-5p 可靶向 SETD8 的 3’UTR。已有研究表明，SETD8 经 LPS 处理后表达显著下调，且参与 LPS 介导的 BV2 细胞炎症反应[9]。另有文献报

道，SETD8 在炎症性肠病患者中表达明显降低，在 LPS 激活的 RAW264.7 细胞中，通过敲低 SETD8 可显著增加促炎因子表达[10]。本研究通过双荧光素酶实验进一步验证二者靶向关系，结果显示转染 miR-1247-5p 抑制剂后，野生型 SETD8 的双荧光素酶活性显著升高（*P*<0.001，图 2A），而对突变型 SETD8 的双荧光素酶活性无明显影响，这一结果证实 miR-1247-5p 可调控 SETD8 表达。此外，相较于正常组，脓毒症患者血清中 SETD8 mRNA 表达显著降低（*P*<0.001，图 2B）。ROC 曲线分析结果显示，SETD8 对于脓毒症具有潜在的诊断价值（AUC=0.9976，*P*<0.001，图 2C）。在 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞模型中，SETD8 mRNA（*P*<0.001，图 2D）及蛋白（*P*<0.01，图 2E）表达水平也较 Control 组明显下降。此外，通过分析 miR-1247-5p 和 SETD8 表达与 APACHE II 评分分层的关系，本研究发现 miR-1247-5p 和 SETD8 表达与脓毒症严重程度显著相关（表 3）。




注：A：双荧光素酶实验检测细胞中野生型和突变型 SETD8 的荧光素酶活性；B：RT-qPCR 检测血清中 SETD8 mRNA 表达水平（*n*=25）；C：ROC 曲线分析 SETD8 的诊断效能；D：RT-qPCR 测定细胞中 SETD8 mRNA 表达水平；E：Western blot 检测细胞中 SETD8 蛋白表达水平。与抑制剂阴性对照相比，$^{@@@}P$<0.001；与正常组相比，$^{\&\&\&}P$<0.001；与 Control 组相比，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001。

图 2 miR-1247-5p 靶向 SETD8 并调控其表达

Note. A, Dual-luciferase assay was used to detect the luciferase activity of wild-type and mutant SETD8 in cells. B, Expression level of SETD8 mRNA in serum was detected by RT-qPCR (*n*=25); C: ROC curve analysis of the diagnostic efficacy of SETD8. D, Expression level of SETD8 mRNA in cells was determined by RT-qPCR. E, Western blot was used to detect the expression level of SETD8 protein in cells. Compared with NC inhibitor, $^{@@@}P$<0.001. Compared with Normal group, $^{\&\&\&}P$<0.001. Compared with Control group, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001.

Figure 2 miR-1247-5p targets SETD8 and regulates its expression

表3 miR-1247-5p和SETD8表达与APACHE II评分分层的关系

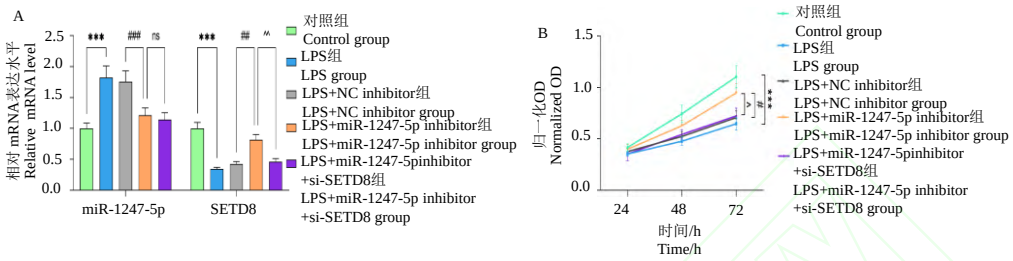
Table 3 Relationship between miR-1247-5p and SETD8 expressions and APACHE II score stratification

| 分组 Groups | 例数/n Cases/n | miR-1247-5p | SETD8 mRNA | *P* |
|---|---|---|---|---|
| 轻度组 (APACHE II≤15) Mild group (APACHE II≤15) | 10 | 1.00 ± 0.12 | 1.05 ± 0.11 | < 0.001 |
| 重度组 (APACHE II>15) Severe group (APACHE II>15) | 15 | 4.82 ± 1.25 | 0.35 ± 0.12 | |

## 2.3 miR-1247-5p 调控 SETD8 对 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞活力的影响

RT-qPCR 检测结果显示，相较于 Control 组，LPS 组中 miR-1247-5p 表达明显上调，而 SETD8 表达明显下调（*P*<0.001）；与 LPS+NC inhibitor 组相比，LPS+miR-1247-5p inhibitor 组中 miR-1247-5p

表达显著降低（*P*<0.001）、SETD8 表达显著升高（*P*<0.01）；进一步对比 LPS+miR-1247-5p inhibitor 与 LPS+miR-1247-5p inhibitor+si-SETD8 组可见，前者 miR-1247-5p 表达无明显差异，但 SETD8 表达显著上调（*P*<0.001）。上述结果表明，miR-1247-5p 可调控 SETD8 的表达（图 3A）。CCK-8 检测结果表明，与 Control 组相比，LPS 组 THP-1/M0 细胞活力明显降低（*P*<0.001）；相较于 LPS+NC inhibitor 组，LPS+miR-1247-5p inhibitor 组 THP-1/M0 细胞活力显著增强（*P*<0.05）；而对比 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组与 LPS+miR-1247-5p inhibitor+si-SETD8 组发现，后者细胞活力显著降低（*P*<0.05），提示敲低 SETD8 可逆转 miR-1247-5p 抑制剂对细胞活力的促进作用（图 3B）。




注：A：RT-qPCR 测定 miR-1247-5p 与 SETD8 mRNA 表达；B：CCK-8 检测细胞活力。与对照组相比，$^{***}P$<0.001；与 LPS+NC inhibitor 组相比，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01，$^{\#\#\#}P$<0.001；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，$^{\wedge}P$<0.05，$^{\wedge\wedge}P$<0.01。

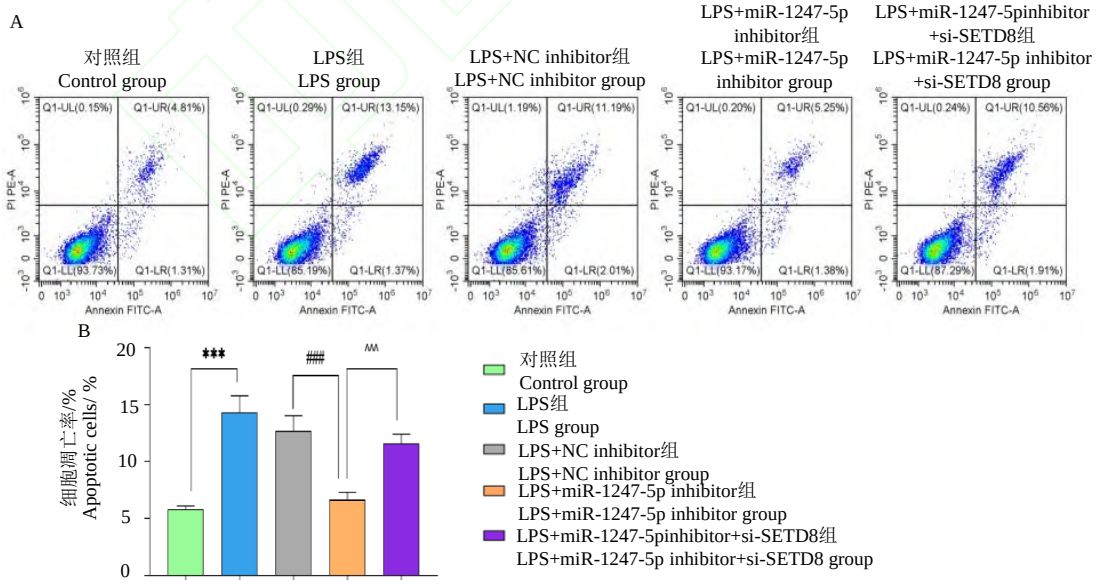
图 3 miR-1247-5p 靶向调控 SETD8 表达对 THP-1/M0 细胞活力的影响

Note. A, mRNA expressions of miR-1247-5p and SETD8 were determined by RT-qPCR. B, CCK-8 was used to detect cell viability. Compared with Control group, $^{***}P$<0.001. Compared with LPS+NC inhibitor group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.001. Compared with LPS+miR-1247-5p inhibitor group, $^{\wedge}P$<0.05, $^{\wedge\wedge}P$<0.01.

Figure 3 Effect of miR-1247-5p targeted regulation of SETD8 expression on the viability of THP-1/M0 cells

## 2.4　miR-1247-5p 调控 SETD8 对 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞凋亡的影响

流式细胞术显示，与 Control 组相比，LPS 组细胞凋亡率明显增加（*P*<0.001）；对比 LPS+NC inhibitor 组，LPS+miR-1247-5p inhibitor 组凋亡率显著下降（*P*<0.001）；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，LPS+miR-1247-5p inhibitor+si-SETD8 组凋亡率显著升高（*P*<0.001），提示敲低 SETD8 可逆转 miR-1247-5p 抑制剂对凋亡率降低的影响（图 4）。



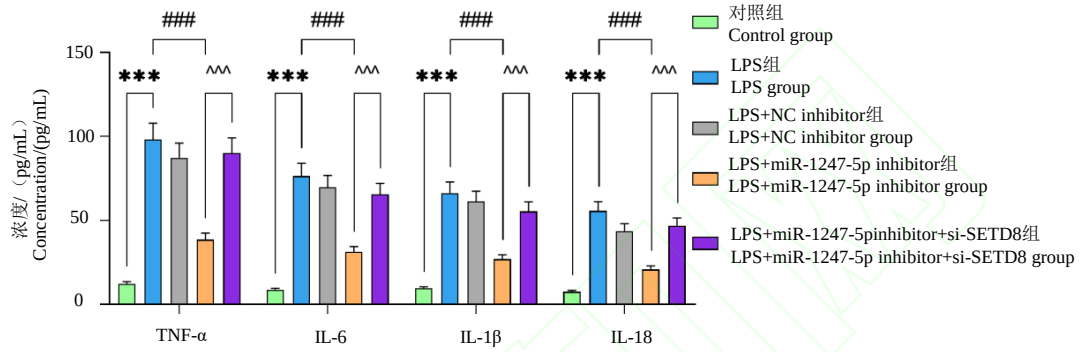

注：A：流式细胞术检测细胞凋亡；B：凋亡率。与对照组相比，$^{***}P$<0.001；与 LPS+NC inhibitor 组相比，$^{\#\#\#}P$<0.001；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，$^{\wedge\wedge\wedge}P$<0.001。

图 4 miR-1247-5p 靶向调控 SETD8 表达对 THP-1/M0 细胞凋亡的影响
Note. A, Apoptosis was detected by flow cytometry. B, Apoptosis rate. Compared with Control group, $^{***}P$<0.001. Compared with LPS+NC inhibitor group, $^{\#\#\#}P$<0.001. Compared with LPS+miR-1247-5p inhibitor group, $^{\wedge\wedge\wedge}P$<0.001.

Figure 4 Effect of miR-1247-5p targeted regulation of SETD8 expression on apoptosis of THP-1/M0 cells

## 2.5 miR-1247-5p 调控 SETD8 对 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞炎症因子分泌的影响

ELISA 结果显示，相较于 Control 组，LPS 组炎症因子（TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-18）水平显著升高（$P$<0.001）；对比 LPS+NC inhibitor 组，LPS+miR-1247-5p inhibitor 组上述炎症因子水平明显下降（$P$<0.001）；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，联合 si-SETD8 组炎症因子水平显著上升（$P$<0.001），提示敲低 SETD8 可逆转 miR-1247-5p 抑制剂对 LPS 诱导的上述炎症因子升高的抑制作用（图 5）。



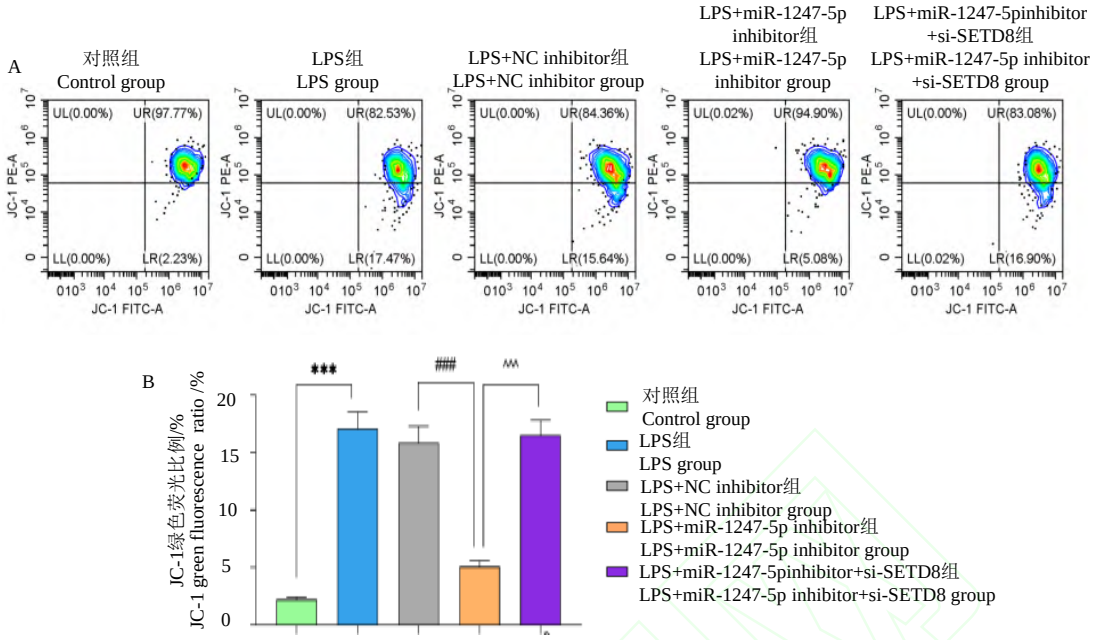

注：与对照组相比，$^{***}P$<0.001；与 LPS+NC inhibitor 组相比，$^{\#\#\#}P$<0.001；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，$^{\wedge\wedge\wedge}P$<0.001。

图 5 miR-1247-5p 靶向调控 SETD8 表达对 THP-1/M0 细胞炎症因子分泌的影响
Note. Compared with Control group, $^{***}P$<0.001. Compared with LPS+NC inhibitor group, $^{\#\#\#}P$<0.001. Compared with LPS+miR-1247-5p inhibitor group, $^{\wedge\wedge\wedge}P$<0.001.

Figure 5 Effect of miR-1247-5p targeted regulation of SETD8 expression on the secretion of inflammatory factors in THP-1/M0 cells

## 2.6 miR-1247-5p 调控 SETD8 对 LPS 诱导 THP-1/M0 细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞术检测显示，与 Control 组相比，LPS 组 JC-1 绿色荧光比率明显升高（$P$<0.001）；对比 LPS+NC inhibitor 组，LPS+miR-1247-5p inhibitor 组该比率显著降低（$P$<0.001）；而与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，LPS+miR-1247-5p inhibitor+si-SETD8 组绿色荧光比率显著升高（$P$<0.001），表明敲低 SETD8 可逆转 miR-1247-5p 抑制剂对线粒体膜电位的升高作用（图 6）。




注：A：流式细胞术检测细胞中 JC-1 荧光信号；B：JC-1 绿色荧光比率。与对照组相比，$^{***}P$<0.001；与 LPS+NC inhibitor 组相比，$^{\#\#\#}P$<0.001；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，$^{\wedge\wedge\wedge}P$<0.001。

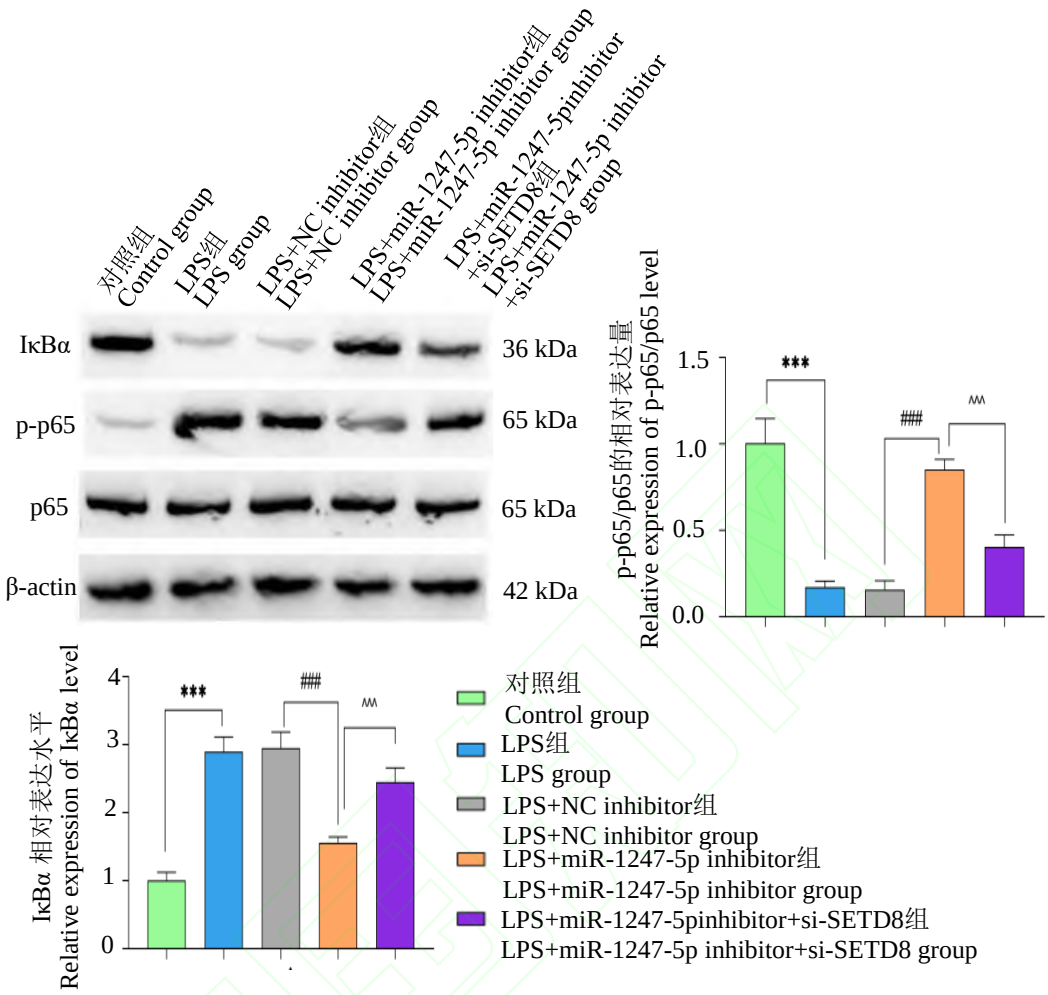
图 6 miR-1247-5p 靶向调控 SETD8 表达对 THP-1/M0 细胞线粒体膜电位的影响

Note. A, Fluorescence signals of JC-1 in cells were detected by flow cytometry. B, JC-1 green fluorescence ratio. Compared with Control group, $^{***}P$<0.001. Compared with LPS+NC inhibitor group, $^{\#\#\#}P$<0.001. Compared with LPS+miR-1247-5p inhibitor group, $^{\wedge\wedge\wedge}P$<0.001.

Figure 6 Effect of miR-1247-5p targeted regulation of SETD8 expression on the mitochondrial membrane potential of THP-1/M0 cells

## 2.7　miR-1247-5p/SETD8 轴影响 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞中 NF-κB 信号通路活性

Western blot 检测显示，与 Control 组相比，LPS 组 IκBα 蛋白水平显著降低而 p-p65/p65 蛋白水平显著升高（$P$<0.001）；对比 LPS+NC inhibitor 组，LPS+miR-1247-5p inhibitor 组 IκBα 蛋白水平升高而 p-p65/p65 蛋白水平下降（$P$<0.001）；而与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，LPS+miR-1247-5p inhibitor+si-SETD8 组 IκBα 蛋白水平下调而 p-p65/p65 蛋白水平上调（$P$<0.001），表明敲低 SETD8 可逆转 miR-1247-5p 抑制剂对 NF-κB 信号通路活性的抑制作用（图 7）。




注：与对照组相比，$^{***}P<0.001$；与 LPS+NC inhibitor 组相比，$^{\#\#\#}P<0.001$；与 LPS+miR-1247-5p inhibitor 组相比，$^{\wedge\wedge\wedge}P<0.001$。

图 7 miR-1247-5p 靶向调控 SETD8 表达对 IκBα 和 p-p65/p65 蛋白表达的影响

Note. Compared with Control group, $^{***}P<0.001$. Compared with LPS+NC inhibitor group, $^{\#\#\#}P<0.001$. Compared with LPS+miR-1247-5p inhibitor group, $^{\wedge\wedge\wedge}P<0.001$.

Figure 7 Effect of miR-1247-5p targeted regulation of SETD8 expression on the protein expressions of IκBα and p-p65/p65

## 3 讨论

脓毒症被定义为感染致宿主反应失调引发的危及生命的器官功能障碍，属严重公共卫生问题，经济负担沉重[11]。近年来，miRNA 作为基因表达的关键转录后调控因子，在脓毒症发生发展中的作用日益受到关注。本研究通过临床血清样本和 LPS 诱导的 THP-1/M0 巨噬细胞模型，揭示了 miR-1247-5p 通过靶向抑制 SETD8 表达，进而调控脓毒症炎症反应和细胞凋亡的分子机制，为脓毒症的干预提供了潜在靶点。

本研究的核心发现之一是 miR-1247-5p 在脓毒症中呈显著高表达。GEO 数据库分析与本研究 RT-qPCR 验证均一致表明，脓毒症患者血清中 miR-1247-5p 水平较健康对照显著升高，且 ROC 曲线显示其具有潜在的诊断效能（AUC=0.991 2）。这一结果与既往文献报道相吻合：丁秀秀等[6]发现 LPS 诱导的小鼠肺部炎症模型中 miR-1247 表达显著上调；程东良等[7]亦在 LPS 诱导的肺上皮细胞 A549 中观察到 miR-1247-3p 表达明显升高。值得注意的是，miR-1247-5p 在多种疾病中被证实参与炎症和凋亡调控：miR-1247-5p 在帕金森病（Parkinson's disease，PD）模型及患者中高表达，通过靶向 HMGB1 调控焦亡与神经炎症，且与 circSLC8A1 等构成的分类器对 PD 诊断价值较高，是 PD 诊断及

机制研究的潜在靶点[12]。相关研究还发现，lncRNA PGM5-AS1 作为分子海绵吸附 miR-1247-5p 以解除对 R-脊椎蛋白 1（R-spodin 1，RSPO1）的抑制，从而抑制肺癌细胞增殖与干性，为治疗提供新方向[13]。上述证据表明 miR-1247-5p 是一个在多病理过程中发挥核心调控作用的促炎相关 miRNA，本研究将其功能拓展至脓毒症领域，进一步丰富了其生物学功能图谱。

本研究的另一关键发现是 SETD8 作为 miR-1247-5p 的直接靶基因，在脓毒症中表达显著下调。双荧光素酶报告实验证实 miR-1247-5p 可直接结合 SETD8 的 3’UTR 并抑制其表达；在脓毒症患者血清及 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞中，SETD8 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低，与 miR-1247-5p 的表达呈反向关系。这一调控模式与 SETD8 在其他炎症性疾病中的表现高度一致：Zhao 等[9]报道 LPS 处理的 BV2 小胶质细胞中 SETD8 表达下调，并参与炎症反应的调控。Chen 等[10]在炎症性肠病患者及 LPS 激活的 RAW264.7 巨噬细胞中同样观察到 SETD8 表达降低，且敲低 SETD8 可显著增加促炎因子的表达。此外，在糖尿病肾病领域，多项研究证实 SETD8 表达下调可通过激活 NF-κB 通路促进炎症因子释放，过表达 SETD8 则可改善病理损伤[14, 15]。这些跨疾病证据共同提示，SETD8 是一个在炎症应激中被抑制的负向调控因子，其表达下调可能是多种炎症性疾病中促炎反应失控的共同分子事件。本研究在脓毒症中验证了这一规律，并明确了 miR-1247-5p 是介导 SETD8 下调的上游调控者。

在功能层面，本研究通过系统的挽救实验证实了 miR-1247-5p/SETD8 轴在脓毒症相关细胞表型中的因果调控作用。结果显示，抑制 miR-1247-5p 可显著增强 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞活力，减少细胞凋亡，降低炎症因子（TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-18）的分泌，并恢复线粒体膜电位（JC-1 绿色荧光比率降低），提示线粒体功能得到保护。而进一步敲低 SETD8 可部分逆转上述所有保护效应，证实 miR-1247-5p 的促炎和促凋亡作用主要通过抑制 SETD8 所介导。在信号通路层面，本研究进一步发现 miR-1247-5p/SETD8 轴对 LPS 诱导的 THP-1/M0 细胞中 NF-κB 信号通路活性具有显著调控作用。抑制 miR-1247-5p 可上调 IκBα 蛋白水平并下调 p-p65/p65 比值，而敲低 SETD8 则可逆转这一效应。NF-κB 是炎症反应的核心转录因子，其活化依赖于 IκBα 的磷酸化降解和 p65 的核转位[16-18]。结合本研究结果，我们推测 SETD8 可能抑制 NF-κB 通路关键元件的转录活性；当 SETD8 被 miR-1247-5p 抑制后，NF-κB 通路过度活化，进而驱动炎症因子大量释放和细胞凋亡。

本研究存在一定的局限性。首先，在实验设计方面，本研究仅设置了健康对照组，未纳入普通感染但未发生脓毒症的患者（如局部细菌感染）以及非感染性危重症患者（如严重创伤、急性胰腺炎、大面积烧伤等）。因此，尽管本研究发现 miR-1247-5p/SETD8 在脓毒症患者血清中表达异常，但尚无法充分论证其表达变化为脓毒症所特有，亦难以区分其变化是由感染本身还是由脓毒症相关的全身炎症反应及器官功能障碍所驱动。未来研究应扩大样本类型，纳入上述疾病对照组，通过 ROC 曲线分析比较 miR-1247-5p/SETD8 对不同疾病状态的鉴别诊断效能，以进一步明确其作为脓毒症特异性生物标志物的临床价值。其次，受限于研究周期、经费预算及动物实验平台的实际运行条件，我们未能在当前阶段建立脓毒症动物模型（如 CLP 或 LPS 腹腔注射模型）以在体验证 miR-1247-5p/SETD8 轴的生物学功能。动物实验可提供组织病理学、多器官损伤评估及生存率分析等更全面的在体证据，这将是本课题组后续研究的重点方向。最后，本研究仅选用 THP-1 人单核巨噬细胞系作为体外模型，虽为脓毒症炎症研究的经典工具细胞，但无法完全模拟体内免疫细胞与微环境之间的复杂交互作用，后续研究拟进一步在动物模型及原代巨噬细胞中验证本结论。在动物水平深入探究 miR-1247-5p/SETD8 轴对脓毒症器官损伤的保护效应及其转化潜力是未来一个重要的研究方向。需要注意的是，本研究 AUC 仅反映该队列中分子区分脓毒症患者与健康人群的能力，该诊断效能尚需更大规模独立队列验证，不可直接推广至其他人群。

综上所述，本研究报道了 miR-1247-5p 在脓毒症中通过靶向抑制 SETD8，激活 NF-κB 信号通路，促进炎症因子释放、诱导细胞凋亡及损害线粒体功能。该发现不仅揭示了脓毒症中炎症与凋亡失控的新表观遗传调控机制，也为 miR-1247-5p 或 SETD8 作为脓毒症的潜在诊断标志物提供了理论依据。

## 参考文献


[1] Hua T, Yao F, Wang H, et al. Megakaryocyte in sepsis: the trinity of coagulation, inflammation and immunity [J]. Crit Care, 2024, 28(1): 442.

[2] Lin M, Xie W, Xiong D, et al. Cyasterone ameliorates sepsis-related acute lung injury *via* AKT (Ser473)/GSK3β (Ser9)/Nrf2 pathway [J]. Chin Med, 2023, 18(1): 136.

[3] Wei M J, Huang K L, Kang H F, et al. Jing Si herbal tea modulates macrophage polarization and inflammatory signaling in LPS-induced inflammation [J]. Int J Med Sci, 2024, 21(15): 3046-3057.

[4] Jiang L, Yang D, Zhang Z, et al. Elucidating the role of *Rhodiola rosea* L. in sepsis-induced acute lung injury *via* network pharmacology: emphasis on inflammatory response, oxidative stress, and the PI3K-AKT pathway [J]. Pharm Biol, 2024, 62(1): 272-284.

[5] Sun J, Jin S, Wang Z. MitoQ alleviates mitochondria damage in sepsis-acute lung injury in a citrate synthase dependent manner [J]. Inflamm Res, 2025, 74: 92.

[6] 丁秀秀， 黄琳惠， 黄奕江． microRNA-1247 通过靶向 CCR16 抑制脂多糖诱导的小鼠急性肺炎的机制 [J]． 中国比较医学杂志，2019， 29（5）： 98-103， 115．
Ding X X, Huang L H, Huang Y J. microRNA-1247 inhibits lipopolysaccharide-induced acute pneumonia in mice by targeting CCR16 [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 98-103, 115.

[7] 程东良， 梁媛， 陈衍晨， 等． MiRNA-1247-3P 在急性呼吸窘迫综合征细胞模型中的表达及功能分析 [J]． 实用医学杂志，2015， 31（17）： 2802-2804．
Cheng D L, Liang Y, Chen Y C, et al. Expression of mi RNA-1247-3P in acute respiratory distress syndrome cell model and its function [J]. J Pract Med, 2015, 31(17): 2802-2804.

[8] 周航， 李同林， 宫帅． miR-1247-3p 靶向 SFTPC 基因对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响 [J]． 中国煤炭工业医学杂志，2020， 23（6）： 573-579．
Zhou H, Li T L, Gong S. Effects of mir-1247-3p targeting sftpc gene on lps-induced alveolar epithelial cell injury [J]. Chin J Coal Ind Med, 2020, 23(6): 573-579.

[9] Zhao Y, Yang X, Meng F, et al. SET8 participates in lipopolysaccharide-mediated BV2 cell inflammation *via* modulation of TICAM-2 expression [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2020, 98(11): 818-825.

[10] Chen P, Zhu H, Mao Y, et al. SETD8 involved in the progression of inflammatory bowel disease *via* epigenetically regulating p62 expression [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2021, 36(10): 2850-2863.

[11] Feng Z, Wang L, Yang J, et al. Sepsis: the evolution of molecular pathogenesis concepts and clinical management [J]. MedComm, 2025, 6(3): e70109.

[12] Liang J, Wan Z, Qian C, et al. The pyroptosis mediated biomarker pattern: an emerging diagnostic approach for Parkinson's disease [J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 7.

[13] Yang P, Gu H, Wu X, et al. Tumour protein p53-activated lncRNA PGM5-AS1 suppresses lung cancer growth and stemness by targeting R-spondin1 *via* microRNA-1247-5p [J]. Arch Physiol Biochem, 2025, 131(3): 513-525.

[14] Wang F, Hou W, Li X, et al. SETD8 cooperates with MZF1 to participate in hyperglycemia-induced endothelial inflammation *via* elevation of WNT5A levels in diabetic nephropathy [J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 30.

[15] Li X, Lu L, Hou W, et al. The SETD8/ELK1/bach1 complex regulates hyperglycaemia-mediated EndMT in diabetic nephropathy [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 147.

[16] Hou J, Wang X, Zhang J, et al. Chuanxiong Renshen decoction inhibits Alzheimer's disease neuroinflammation by regulating PPARγ/NF-κB pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18: 3209-3232.

[17] Li S, Ma Q, Ma Z, et al. Renal ischaemia-reperfusion injury is promoted by transcription factor NF-kB p65, which inhibits TRPC6 expression by activating miR-150 [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2024, 86(3): 369-382.

[18] Li S Z, Shu Q P, Zhou H M, et al. CLK2 mediates IκBα-independent early termination of NF-κB activation by inducing cytoplasmic redistribution and degradation [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3901.