

# 利用定量蛋白组学对脓毒症外周血单个核细胞差异蛋白的研究

童译庆 吴春荣 刘建军 唐建国 库鑫 严威

**【摘要】目的** 探讨基于数据非依赖性采集高分辨率色谱-质谱技术 (data independent acquisition liquid chromatography-mass spectrometry, DIA LC-MS) 对于脓毒症外周血差异蛋白研究的可行性。**方法** 采用前瞻性研究, 纳入 2016 年 4 月至 2016 年 7 月复旦大学附属上海市第五人民医院重症监护室 (ICU) 收治的 10 例脓毒症以及 10 例同时期入住 ICU 年龄性别相仿的术后并未发脓毒症的患者 (疾病对照组)。采用最新的数据非依赖性采集技术 (data independent acquisition, DIA) 联合 skyline 数据提取软件对 10 例脓毒症和 10 例对照组的外周血单个核细胞的蛋白进行研究分析, 所得的数据分别采用主成分分析法 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 进行模式识别分析, 确定外周血单个核细胞的差异蛋白, 进行通路分析以及 GO 分析。根据 PLS-DA 模型变量的重要性投影 (variable importance in the projection, VIP 值) 初步筛选可能的蛋白标志物, 并对贡献最大 (VIP > 1,  $P < 0.05$ ) 的 3 个蛋白进行 ELISA 验证和 ROC 曲线的分析。**结果** 总共鉴定到了 1 062 个碎片离子加和得到 119 个差异蛋白, 其中 31 个蛋白上调, 88 个蛋白下调。通过通路分析发现与碳代谢, 血小板激活, 细菌侵袭上皮, 补体凝血瀑布激活有关。其中高迁移率蛋白 1 (HMGB-1), 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL), 基质金属蛋白酶 8 (MMP-8) 用 ELISA 验证在脓毒症与疾病对照组的外周血单个核细胞表达中差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。ROC 曲线下面积均大于 0.85, 有较好的敏感度和特异度。**结论** 利用 DIA-MS 技术对脓毒症外周血单个核细胞进行研究检测, PLS-DA、OPLS-DA、PCA 模式识别均能用于蛋白组学数据的分析, 初步筛选 HMGB-1、NGAL、MMP-8 是值得进一步研究的脓毒症外周血单个核细胞候选生物标志物。

**【关键词】** 脓毒症; 外周血单个核细胞; 数据非依赖性采集; 蛋白组学; 炎症免疫

## Quantitative proteomic reveals the differences of peripheral blood mononuclear cells in the host

immune response to sepsis Tong Yiqing, Wu Chunrong, Liu Jianjun, Tang Jianguo, Ku Xin, Yan Wei  
Department of Trauma-Emergency & Critical Care Medicine, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China (Tong YQ, Wu CR, Liu JJ, Tang JG); Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education); Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China (Ku X, Yan W)

Corresponding author: Tang Jianguo, Email: tangjianguo@5thhospital.com

**【Abstract】Objective** To investigate the feasibility of differential expression proteins identification in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of sepsis patients using Data Independent Acquisition liquid chromatography-mass spectrometry (DIA LC-MS). **Methods** Prospective studies were employed and targeted at 10 sepsis patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of Shanghai Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University from April 2016 to July 2016. And 10 patients admitted to the ICU with similar age and sex that were not complicated with sepsis were served as the control group.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.11.014

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会课题面上项目 (201540136); 上海市科委科研项目 (18411950600)

作者单位: 200240 上海, 复旦大学附属上海市第五人民医院 创伤急救危重病医学中心 (童译庆、吴春荣、刘建军、唐建国); 200240 上海, 上海交通大学系统生物医学院 (库鑫、严威)

通信作者: 唐建国, Email: tangjianguo@5thhospital.com

The proteins from peripheral blood mononuclear cells in 10 sepsis patients and 10 control persons were analyzed using the latest DIA LC-MS technology and the skyline data extraction software; the model of data obtained from the above analysis was further discriminatorily analyzed with principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA); then the differential proteins of peripheral blood mononuclear cells were analyzed by Pathway analysis and GO analysis. The possible markers were identified by preliminary screening according to variable importance in the projection (VIP). The top 3 proteins (VIP > 1,  $P < 0.05$ ) were verified by ELISA and their ROC curves were analyzed. **Results** Totally 1 062 fragment ions were identified and 119 proteins were obtained. Among them, 31 proteins were up-regulated and 88 proteins down-regulated. Pathway analysis showed that carbon metabolism, platelet activation, bacterial invasion of epithelium, and complement coagulation cascade activation were participated in the development of sepsis. ELISA showed that significant difference of HMGB-1, MMP-8, and LCN2 in the expression of peripheral blood mononuclear cells in the sepsis and control people ( $P < 0.01$ ). The area under the ROC curve is greater than 0.85, which has good sensitivity and specificity. **Conclusions** DIA-MS is a compelling way for detecting differential expression proteins. PCA, PLS-DA and OPLS-DA are suitable for pattern recognition. The high expression of HMGB-1, NGAL and MMP-8 in immune cells may be the potential biomarker of the disease, which lays the foundation for research of early diagnosis and treatment of sepsis.

**【 Key words 】** Sepsis; Peripheral blood mononuclear cells; Data independent acquisition; Proteomics; Inflammatory immunity

脓毒症是宿主对感染产生的免疫失调反应，导致危及生命的器官功能障碍的综合征，脓毒症和脓毒症休克是 ICU 最常见的危重病，有极高的病死率<sup>[1-2]</sup>，虽然目前脓毒症的发病机制仍然不明确，但是认为免疫紊乱是脓毒症发病的重要关键，感染造成的免疫失调在不同的阶段导致宿主机体的损伤<sup>[3]</sup>。因此深入了解脓毒症免疫发病机制，对于脓毒症的诊断和治疗都十分关键<sup>[4]</sup>。外周血单个核细胞是机体的免疫组分之一，能直接反映宿主的免疫情况，又相对容易获取，研究表明脓毒症发病发展过程中外周血单个核细胞有着明显的变化。严重脓毒症能造成固有免疫和适应性免疫细胞的大量消耗，脓毒症可导致死亡患者脾脏中 B 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞和树突状细胞大量丧失。在严重脓毒症中，淋巴细胞和树突状细胞能加速免疫细胞凋亡，凋亡细胞能加速抗炎细胞因子的释放<sup>[5]</sup>。还有研究发现脓毒症的发展过程中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、B 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞显著降低，T 细胞在脓症患者中主要分化为 Th2 而不是 Th1 和 Th17<sup>[6]</sup>。然而具体机制尚不明确。

基于质谱的蛋白组学已经成为研究复杂高通量小分子蛋白的主流工具，近年来发展的 DIA 技术将整个扫描范围分为多个窗口，依次选择碎裂采集所有母离子全部子离子的信息，做到非目标性，

通量无上限，能大规模高通量地相对定量和绝对定量<sup>[7-8]</sup>。为了研究脓毒症的发生对免疫细胞的影响，进一步研究脓症患者外周血单个核细胞的差异蛋白，本研究在四级杆离子阱串联的高分辨质谱 (quadrupole-Orbitrap LC-MS) 采用数据非依赖性采集 (DIA) 的蛋白组学技术，分析比较脓症患者外周血单个核细胞，为脓毒症的发病机制提供基础，为免疫治疗的研究提供靶标。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2016 年 4 月至 2016 年 7 月复旦大学附属上海市第五人民医院中心监护室收治的 10 例脓毒症和 10 例疾病对照患者，对其临床资料和外周血样本进行前瞻性研究，脓毒症的诊断标准符合 2016 年 2 月第三次脓毒症和脓毒症休克定义的国际共识诊断标准 (sepsis-3)<sup>[9]</sup>：有明确感染证据加上入院后 SOFA 评分变化  $\geq 2$ ；年龄  $\geq 18$  岁。排除标准：①存在自身免疫性疾病，先天或者获得性免疫缺陷病；②近半年有使用免疫抑制病史；③孕妇；④严重的心力衰竭 (NYHA IV)，严重的肝病 (Child 评分 10 分以上)，慢性肾脏病需要透析；⑤住 ICU 未 24 h。本研究通过复旦大学附属第五人民医院伦理委员会批准，患者或者家属签署知情同意书。

## 1.2 仪器与试剂

Q-Exactive plus 质谱仪 (赛默飞世尔科技公司, 美国); EASY-nLC 1000 纳流超高效液相色谱 (赛默飞世尔科技公司, 美国); 乙腈 (acetonitrile, ACN) (Sigma aldrich 公司, 美国); 甲酸 (formic acid, FA) (赛默飞世尔科技公司, 美国); 人淋巴细胞分离管 (达科为生物技术公司, 中国上海); BCA 蛋白定量试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 美国); 蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor cocktail tablets) (罗氏公司, 德国); 三 (2-羧乙基) 磷 [tris (2-carboxyethyl) phosphine, TCEP] (Fluka 公司, 德国); ALS 酸不稳定表面活性剂为系统生物研究院配置提供; 碳酸氢铵、氢氧化钠、氯化钙、碘乙酰胺、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 等化学纯级别试剂均购自中国生工生物 (上海) 股份有限公司; 胰蛋白酶 (赛默飞世尔科技公司, 美国); ELISA 试剂盒 (R&D, 美国); 实验用水均为 Mili-Q 纯水仪制备的去离子水。

## 1.3 细胞蛋白样本的制备

疑似脓毒症患者 ICU 发生高热, 获得家属或本人知情同意后, 在留取高热血培养的同时, 留取 5 mL 外周静脉血, 床边采用 EDTA 管抗凝, 于 4 h 内到实验室用人淋巴细胞分离管收集提取外周血单个核细胞。外周血单个核细胞采用细胞裂解液 (0.2% ALS, 20 mmol/L HEPES, 1X 蛋白酶抑制剂) 冰上裂解 25 min, 13 000 r/min 离心 20 min 提取上清液蛋白, -80 °C 保存备用。待患者血培养结果阳性后制备质谱蛋白样品。

## 1.4 质谱蛋白样品制备

BCA 法测定蛋白浓度以后, 取 50  $\mu$ g 蛋白, 室温条件下加入 6 mol/L 尿素使蛋白变性反应 30 min, 55 °C 条件下加入 5 mmol/L TCEP 还原反应 30 min, 加入碘乙酰胺使溶液终浓度变为 6.25 mmol/L, 室温避光反应 1 h, 用 6 倍体积的碳酸氢铵溶液稀释, 1 mmol/L 氯化钙增强胰酶活性, 在碱性环境中使用胰酶变性, 37 °C 反应 16 h, 用含有 C18 填料的 96 孔柱除盐, 然后使用冷冻离心机冷冻干燥。

## 1.5 质谱数据采集

1.5.1 液相分离 DDA 和 DIA 的质谱数据 EASY nLC-1000 UPLC 系统联合 Orbitrap 质谱检测器 Q-Exactive plus 质谱仪上采集, 上样量均为 1  $\mu$ g, 在同一根自制 C18 的分析柱 (规格为 75  $\mu$ m  $\times$  15

cm) 上面进行, 分离相: A 相 0.1% 甲酸, B 相 0.1% 甲酸 + 80% 乙腈, 分析环境温度保持在 4 °C。梯度洗脱的程序见表 1。

1.5.2 质谱方法 DDA 扫描: 采用正离子扫描模式, 扫描范围是 400~1 200 m/z, 扫描时间为 75 min。一级扫描模式: 全扫描; 一级扫描范围: 400~1 200 m/z; 一级检测: 轨道分辨率 70 000 (@m/z 200); 自动增益控制 (automatic gain control ACG):  $3 \times 10^6$ ; 最长注射离子时间: 50 ms; loop count: 20; 选择电荷数为: 2~7; 二级质谱碎裂模式 HCD; 碰撞能量 NCE: 27%; 二级 AGC:  $5 \times 10^5$ 。

DIA 数据采集: 一级扫描模式: 全扫描; 一级扫描范围: 400~1 200 m/z; 一级检测分辨率 35 000 (@m/z 200); AGC:  $3 \times 10^6$ , 窗口: 32 个固定窗口, 每个窗口依次选择、碎裂、采集窗口内所有母离子的全部子离子信息用于定量。

表 1 HPLC 的分离相流速及时间

Table 1 Flow rate and time of the separated phase of HPLC

时间 (min)	A 相 (0.1% 甲酸)	B 相 (0.1% 甲酸+80% 乙腈)
0~5	97%~93%	3%~7%
5~55	93%~78%	7%~22%
55~65	78%~65%	22%~35%
65~68	65%~20%	35%~80%
68~75	20%	80%

## 1.6 数据分析

DDA 的数据采用软件 Proteome Discoverer (V1.4.1.14) 进行搜库, 数据库是 Uniprot 人类蛋白数据库 (201702 人类非冗余蛋白数据库), 胰酶漏切位点设为 0; 固定修饰半胱氨酸烷基化 (57.021 Da); 非固定修饰甲硫氨酸氧化 (15.994 Da); 肽段的 FDR: 低于 1%。搜库结果导出以 .msf 格式导入软件 Skyline (Skyline-daily 3.5.1.9283 版本) 用于建库和 DIA 数据分析提取。Skyline 建库以及 DIA 数据导入参考 Skyline 官网数据非依赖采集数据处理教程, 将 DIA 数据依次导入, 最小峰检出比为 0.01, 每个母离子最小离子对为 6, 峰模型评分 Q 值为 0.01, 用于控制鉴定蛋白质量的 dotp 值中, min dotp 值设为 0.8。选择 +1 和 +2 价子离子, 用肽段特征碎片离子的面积对肽段进行定量。最后导出蛋白、多肽、子离子, 以及定量峰面积等信息。对 DIA 定量数据用峰面积中位数进行归一化处理, 后分别删除脓毒症组和疾病对照组中样本间超过 25% 的缺失值的子离子。在碎片离子水平对于两组之间的差异进行定量分析。

## 1.7 生物信息分析

DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery) 是一个生物信息数据库,它通过从基因数据或者蛋白数据中系统提取生物信息然后整合生物学数据的分析工具。将筛选出的差异蛋白在 DAVID 网站上做 KEGG 通路分析, GO 分析。从蛋白质的生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component) 3 个方面对蛋白分别进行基因富集分析。结果采用 Benjamini 校正法校正  $P$  值进行筛选, 校正  $P < 0.05$ , 结果有统计学意义。

## 1.8 蛋白验证

采用双抗体夹心酶免疫分析法 (ELISA 法) 测定疾病对照组 (10 例), 脓毒症组 (10 例) 的外周血单个核细胞中的 HMGB-1、NGAL、MMP-8 的含量, 将裂解的外周血单个核细胞蛋白稀释 100 倍, 操作步骤严格按照试剂盒说明书步骤进行。

## 1.9 统计学方法

使用数据分析软件 R (version 3.2.2) 对 DIA 数据进行归一化处理, 并且用 R 软件对于碎片离子数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别法 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 以及强调组间差异的正交信号偏最小二乘判别分析法 (orthogonal signal correction-partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 模式识别, 分别得到二维得分图, 并且对于模型进行评价, 对候选差异离子进行加和至肽段。通过 PLS-DA 模型中的变量投影重要性标志 (VIP) 值来筛选候选的差异蛋白,  $VIP > 1$ , 差异蛋白有意义。采用 Graphpad Prim 6.0 软件对 ELISA 数据进行分析, 数据采用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用成组  $t$  检验, 对于标志物的评价利用外周血单个核细胞的蛋白表达构建 ROC 分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 患者的一般情况

10 例脓症患者外周血样本来自 2016 年 4 月至 2016 年 7 月复旦大学附属上海市第五人民医院中心监护室住院的患者, 其中男性 5 例, 女性 5 例, 年龄 38~78 岁, 平均 64.9 岁; 满足脓毒症诊断标准, 在留取高热血培养同时留取 5 mL 外周血, 血培养阳性后入组, 其中革兰阳性菌 4 例, 革兰阴性菌 3 例,

混合感染 (包括真菌) 3 例; 肺部感染 4 例, 腹腔感染 2 例, 泌尿系统感染 2 例, 其他部位感染 2 例; 感染发生前均未使用抗生素治疗。疾病对照组为术后监护患者, 男性 5 例, 女性 5 例, 年龄 44~73 岁, 平均年龄 61.7 岁, 术后未并发感染, 留取疾病对照组清晨空腹外周静脉血 5 mL。

## 2.2 差异蛋白的筛选

20 个样本建库总共获得 176 797 碎片离子, 21 126 肽段, 2 368 蛋白, 20 个 DIA 样本用 skyline 筛选鉴定到的 49 121 个碎片离子, 7 280 个肽段, 2 071 个蛋白。采用 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 进行模式识别, 分别输出二维得分图 (图 1)。由图可见 PCA、OPLS-DA、PLS-DA 三个模型均能很好将脓毒症组和疾病对照组明显区分开。由图 1A 中 PCA 得分图可见 PCA 能很好区分疾病对照组和脓毒症组, PCA 模型主要参数是  $R^2X$ ,  $R^2X$  表示模型对  $X$  变量的解释能力,  $R^2X$  越接近 1 越好, 本次 PCA 的模型评价指标  $R^2X$  为 0.74, 说明模型稳定性较好, 脓毒症组和对照组两组存在生物差异明显。 $R^2Y$  和  $Q^2$  是 PLS-DA 和 OPLS-DA 的模型评价参数,  $R^2Y$  表示模型对于  $Y$  变量的解释能力,  $Q^2$  表示模型的预测能力,  $R^2Y$  和  $Q^2$  越接近 1 表明模型越稳定可靠, 一般  $Q^2$  大于 0.5 表示模型稳定可靠。在图 1B 中, PLS-DA 模型的这些碎片可以解释两组差异 98.9% 的变化, 可以预测两组差异 92.6%。在图 1C 中, OPLS-DA 模型中这些碎片离子可以解释两组差异 98.9% 的变化, 可以预测两组差异 92.6%。表明在这组数据中两组模型的区分能力相同, OPLS-DA 和 PLS-DA 模型比 PCA 更加稳定可靠。将这些碎片离子进行加和, 得到 119 个差异蛋白, 其中 31 个高表达, 88 个低表达。在蛋白水平再次进行模型识别, 仍可以区分两组。为了更加直观地显示样本之间的关系以及不同的差异蛋白在不同的样本之间的表达差异, 利用定性的显著性差异蛋白表达量对各组样本之间进行层次聚类 (hierarchical clustering), 见图 2。

## 2.3 GO 分析和通路分析

对这 119 个蛋白进行 GO 分析, 结果如图 3 所示, GO 分析中, 在细胞组分 (图 3A) 中, 细胞外泌体、胞质, 以及细胞膜是富集到最多的细胞组分。血小板脱颗粒, 受体介导内吞以及细胞粘附反应是聚类到最多的生物功能 (图 3B), 这些功能与脓毒症免疫激活和脓毒症的发展密切相关。可能与病原体激活宿主细胞吞噬病原体的过程有关。在分

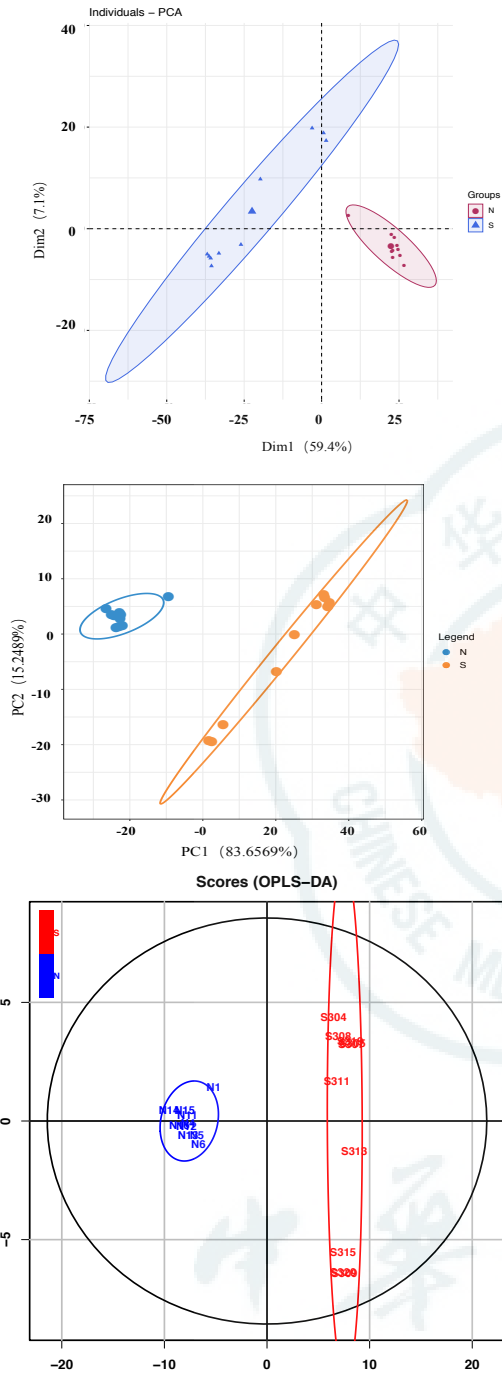


图 1 PCA, PLS-DA, OPLS-DA 模式识别的二维得分图  
Fig 1 2D-score map of PCA, PLS-DA, OPLS-DA pattern

子功能 (图 3C) 上蛋白结合, poly(A) RNA 结合, 细胞粘附以及铁离子结合是最多见的分子功能, 这可能与 T 细胞激活, 以及免疫细胞杀菌作用以及脓毒症发生相关<sup>[10]</sup>。对这些蛋白进行 KEGG 分析 (图 3D), 富集到前 10 个通路中有细菌侵袭上皮细胞、碳代谢通路、代谢通路、血小板激活、补体和凝血瀑布, 这几条通路与脓毒症的发生发展密切相关。

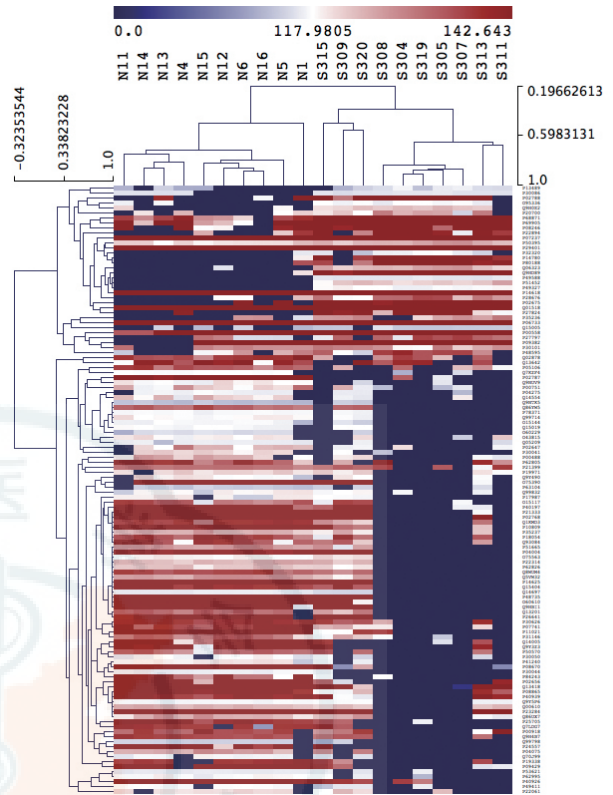


图 2 差异蛋白的聚类分析热图  
Fig 2 Cluster heat map of differential proteins

### 2.4 差异蛋白的验证

对于鉴定到的 119 个蛋白通过 OPLS-DA 模型中 VIP 值进一步筛选,  $VIP > 1$ ,  $P < 0.05$  为差异蛋白候选的标志物, 总共筛选出 46 个差异蛋白, 结果如表 2 所示。其中, 贡献最大的前 3 个蛋白, 分别是高迁移率蛋白 1 (HMGB-1), 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL), 基质金属蛋白酶 8 (MMP-8)。对这三个蛋白进行 ELISA 验证, 其中 HMGB-1 在疾病对照组和脓毒症组外周血单个核细胞的表达分别为  $(50.50 \pm 6.039)$  ng/mL、 $(174.0 \pm 9.887)$  ng/mL, 脓毒症组显著升高 ( $t=10.66$ ,  $P < 0.01$ )。MMP-8 在疾病对照组和脓毒症组外周血单个核细胞的表达分别为  $(94.87 \pm 7.665)$  ng/mL、 $(491.0 \pm 48.73)$  ng/mL, 脓毒症组显著升高 ( $t=8.03$ ,  $P < 0.01$ )。NGAL 在对照组和脓毒症组外周血单个核细胞的表达分别为  $(158.6 \pm 13.72)$  ng/mL、 $(1119 \pm 95.64)$  ng/mL, 脓毒症组明显升高 ( $t=9.942$ ,  $P < 0.01$ )。见图 4。ELISA 验证结果与质谱检测结果一致。

### 2.5 构建 ROC 曲线诊断模型

将 10 例对照组和 10 例脓毒症组外周血单个核细胞 ELISA 检测数据, 采用 Graphpad Prim 6.0 软件建立 ROC 诊断模型, 结果如图 5 所示。

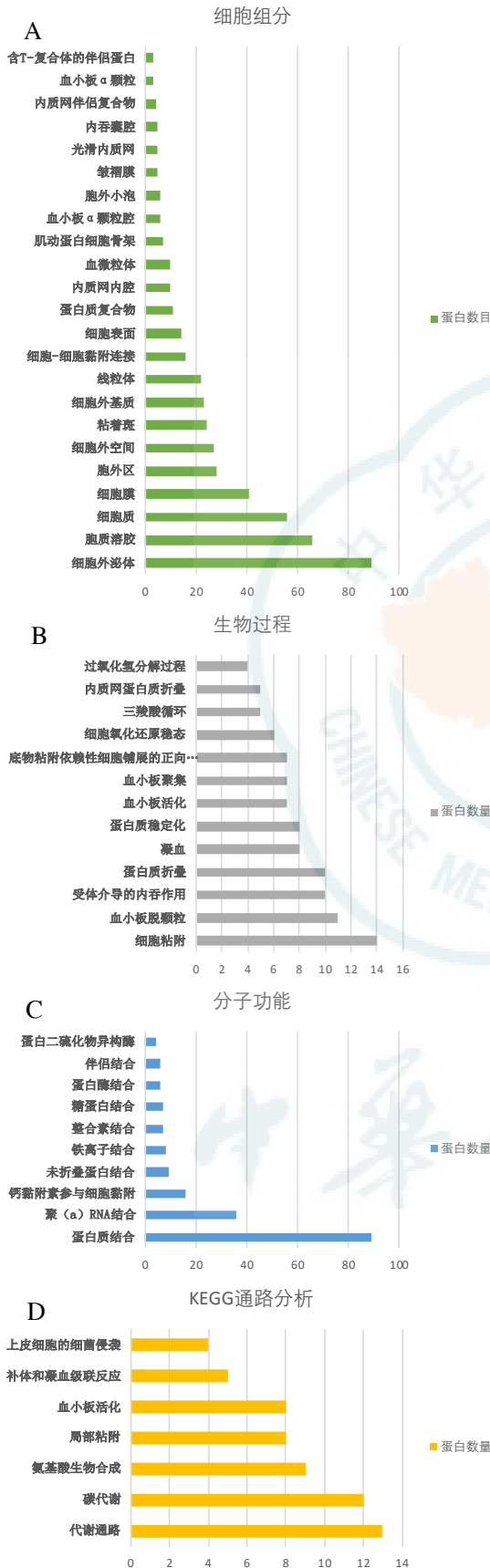


图3 差异蛋白GO分析和KEGG通路分析图

Fig 3 GO analysis and KEGG pathway diagram of differential proteins

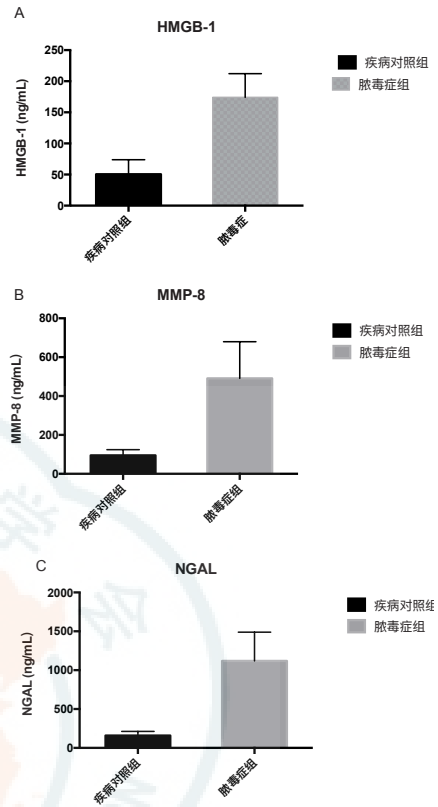


图4 ELISA 检测 HMGB-1, MMP-8, NGAL 的表达

Fig 4 The expression of HMGB-1, MMP-8, and NGAL detected by ELISA

HMGB-1 的曲线下面积和临界值分别为 0.896 和 116.11 ng/mL, 曲线下面积 95% 可信区间为 0.784~1, 灵敏度与特异度为 0.833 和 0.867。NGAL 的曲线下面积和临界值分别为 0.911 和 232.38 ng/mL, 曲线下面积 95% 可信区间为 0.824~0.988, 灵敏度与特异度分别为 0.803 和 0.667。MMP-8 的曲线下面积和临界值分别为 0.916 和 203.69 ng/mL, 曲线下面积 95% 可信区间为 0.827~1, 灵敏度与特异度分别为 0.833 和 0.867。

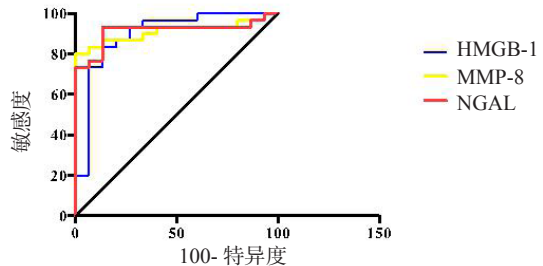


图5 HMGB-1, MMP-8, NGAL 诊断脓毒症的 ROC 曲线

Fig 5 ROC curves of HMGB-1, MMP-8, NGAL for diagnosis of sepsis

### 3 讨论

基于 DIA 的蛋白组学是新兴的定量蛋白组学方法, 通过将整个质量范围等分为多个窗口, 每个窗口一次选择, 碎裂, 扫描。DIA 能够获得质量范围内母离子全部碎片离子信息, 通量大, 循环时间固定, 同时数据可以回溯, 解决了传统的蛋白组学 shortgun 和目标采集的方法存在的问题<sup>[11]</sup>。脓毒症的发病机制涉及多器官多系统的异常, 而且其发病过程复杂, 机体失控的炎症反应被认为是脓毒症发病的重要基础, 抗炎和促炎的失衡, 启动炎症级联反应, 造成对宿主的损害。

本研究中, 脓毒症患者和对照组的 119 个差异蛋白中, 包括有血管性血友病因子 (VWF), 踝蛋白 (TLN1), 转铁蛋白 (TF) 以及载脂蛋白 A1(Apo1), 这些蛋白与细胞脱颗粒和凝血系统的活化有关。近年来凝血系统的激活也被认为是脓毒症组织损伤机制之一。还有 Toll 相互作用蛋白 (TOLLIP), 高迁移率族蛋白 (HMGB-1), Trem 样转录因子 1 (TREML1) 在脓毒症组中表达显著增加, 可能与固有免疫反应和促炎因子激活有关。此外在脓毒症组中高表达 S100 钙结合蛋白 (S100A9), 整合素亚基  $\beta 2$  (ITGB2) 和乳铁蛋白 (LTF), 参与了 NF- $\kappa$ B 转录因子的激活以及 TLR4 信号通路的

正向调节。这些生物作用调节引发促炎因子的释放, 促进脓毒症的发展。通过蛋白组学的方法可以更加深入了解脓毒症的发展机制。脓毒症是多因素的免疫介导的复杂性疾病。本研究进行验证的三个蛋白均为既往报道过的血浆中的炎症介质, 发现在外周血单个核细胞中也有相同的作用。

高迁移率蛋白 1 (HMGB-1) 是一种晚期炎症递质, 是一种内源性危险信号, 被主动分泌和被动释放到细胞外的 HMGB-1 可诱发局部炎症, 能激发细胞因子超表达, 加剧炎症级联反应, 外周血细胞受到特异性的抗原刺激后能主动分泌 HMGB-1<sup>[12]</sup>。凋亡细胞二次坏死释放 HMGB-1 作为内源性坏死因子激发细胞因子, 级联反应加剧单核/巨噬细胞的致炎反应<sup>[13]</sup>。有动物研究表明, 抑制 HMGB-1 的致炎作用可达到治疗重症感染的目的<sup>[14-15]</sup>。细胞外的 HMGB-1 在炎症中调节 T 细胞分化, 调节抗炎反应<sup>[16]</sup>。本研究中质谱和 ELISA 验证中脓毒症患者外周血单个核细胞 HMGB-1 高表达, 可能与免疫细胞炎症的启动、维持和炎症放大的级联反应有关。

目前, 血浆和尿液中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 被认为是急性肾损伤的生物标志物之一<sup>[17]</sup>。NGAL 是由肝细胞和免疫细胞分泌的小分子蛋白, 能和细胞中铁整合分子结合, 与细菌生长和组织分化密切相关, 通过宿主细胞中的

表 2 筛选出的候选蛋白标志物  
Table 2 Screened candidate protein markers

蛋白 ID	基因名	P 值	VIP 值	蛋白 ID	基因名	P 值	VIP 值
P09429	HMGB1	5.77E-22	1.398	P69905	HBA1	3.32E-08	1.068
P80188	NGAL	6.23E-19	1.350	O95336	PGLS	4.99E-08	1.064
P22894	MMP8	5.46E-16	1.335	P19338	NCL	7.53E-10	1.064
P49327	FASN FAS	6.06E-19	1.310	P30050	RPL12	1.83E-12	1.064
Q01518	CAP1	1.14E-19	1.301	P49588	AARS	1.69E-09	1.063
P51452	DUSP3	7.40E-15	1.287	Q02878	RPL6	5.20E-12	1.062
P14618	PKM	2.29E-11	1.279	P08670	VIM	2.39E-12	1.059
P30044	PRDX5	2.07E-14	1.238	P13489	RNHI	5.99E-07	1.052
P27824	CANX	2.26E-08	1.195	Q7KZF4	SND1	1.70E-11	1.036
P53621	COPA	1.51E-14	1.194	P84243	H3F3A	1.57E-09	1.031
Q9NUV9	GIMAP4	1.28E-15	1.179	Q9NTK5	OLA1	3.35E-10	1.028
P02675	FGB	5.08E-10	1.170	Q13418	ILK	6.41E-11	1.025
P32320	CDA CDD	4.31E-10	1.169	P50570	DNM2	1.26E-09	1.022
Q05209	PTPN12	5.12E-13	1.151	Q99714	HADH2	2.26E-10	1.021
P50395	GDI2	7.02E-13	1.145	Q70J99	UNC13D	7.49E-08	1.021
P28676	GCA	5.52E-07	1.141	P09382	LGALS1	0.000107	1.0191
P63104	YWHAZ	4.62E-11	1.140	P41240	CSK	2.01E-12	1.0161
O15144	ARPC2	4.31E-12	1.110	Q1KMD3	HNRNPUL2	7.62E-10	1.015
O75563	SKAP2	5.44E-12	1.100	Q14697	GANAB	3.76E-10	1.0141
P14780	MMP9	1.57E-08	1.096	P35236	PTPN7	1.61E-07	1.009
P02788	LTF	1.48E-07	1.096	Q9HD89	RETN	7.07E-06	1.004
P00558	PGK1	5.42E-06	1.096	P30086	PEBP1	2.09E-06	1.001
P20700	LMNB1	1.59E-07	1.090	P48595	SERPINB10	1.37E-06	1.087

NGAL 通过螯合铁限制细菌生长达到抗菌作用<sup>[18]</sup>。本研究通过质谱发现在脓毒症患者的外周血单个核细胞中 NGAL 的升高,可能与宿主感染时候固有免疫抗菌作用有关。将 NGAL 作为脓毒症外周血细胞标志物发现 NGAL 在诊断脓毒症时有较好敏感度,然而特异度却不高。

基质金属蛋白酶 8 (MMP-8) 能够降解基质中大部分成分,如胶原、蛋白聚糖、糖蛋白等,正常情况下含量极低,在炎症条件下 MMP-8 表达增加,导致组织的破坏<sup>[19-20]</sup>。有研究表明 MMP-8 与脓毒症严重程度密切相关<sup>[21]</sup>,能激活巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B 促炎性转录因子<sup>[20]</sup>,可能是脓毒症潜在的治疗靶点<sup>[21-22]</sup>。本研究中脓毒症组的外周血中 MMP-8 显著增高。

此外,脓毒症的发生与多种通路的激活有关,在通路富集中细菌侵袭上皮细胞、碳代谢通路、代谢通路、血小板激活、补体和凝血瀑布、激活抗体生成都在此次通路分析中富集得到。脓毒症的发展使免疫调控紊乱,机体对于严重感染应答失调导致多器官功能障碍,免疫的调控由过度免疫的激活发展至广泛的致死性的免疫抑制,这些仍需要进一步深入研究。

本研究应用 DIA-MS 在外周血单个核细胞中寻找脓毒症与疾病对照的差异蛋白,但是本研究也有不足之处:所有样本均来自于同一所医院 ICU,由于收取样本条件限制样本数目也较有限。对于目标蛋白的验证和评价,脓毒症的发展预后等进一步探索和脓毒症的机制研究需要进一步扩大样本量。作为脓毒症感染与蛋白组学的初步探索为后续脓毒症的免疫研究提供基础,为脓毒症的诊断和治疗提供靶标。

#### 参 考 文 献

- [1] Bateman BT, Schmidt U, Berman MF, et al. Temporal trends in the epidemiology of severe postoperative sepsis after elective surgery: a large, nationwide sample [J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(4): 917-925. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181cea3d0.
- [2] Angus DC. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? [J]. *JAMA*, 2010, 304(16): 1833-1834. DOI: 10.1001/jama.2010.1546.
- [3] Rittirsch D, Flierl MA, Ward Peter A. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(10): 776-787. DOI: 10.1038/nri2402.
- [4] Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, et al. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25(4): 609-634. DOI: 10.1128/CMR.00016-12.
- [5] Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS. Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(6): 1349-1362. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31823422e8.
- [6] Zhou JH, Chaudhry H, Zhong Y, et al. Dysregulation in microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients is associated with immunopathology [J]. *Cytokine*, 2015, 71(1): 89-100. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.09.003.
- [7] Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(6): O111.016717. DOI: 10.1074/mcp.O111.016717.
- [8] Chapman JD, Goodlett DR, Masselon CD. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2014, 33(6): 452-470. DOI: 10.1002/mas.21400.
- [9] 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.
- [10] 姜毅, 龚平. 铁代谢紊乱与脓毒症 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(2): 229-232. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.02.027.
- [11] 张伟. 定量蛋白质组学质谱采集技术进展 [J]. *分析化学*, 2014, (12): 1859-1868. DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.140821.
- [12] Kang R, Zhang Q, Hou W, et al. Intracellular Hmgb1 inhibits inflammatory nucleosome release and limits acute pancreatitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(4): 1097-1107. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.12.015.
- [13] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195. DOI: 10.1038/nature00858.
- [14] Nogueira-Machado JA, de Oliveira Volpe CM. HMGB-1 as a target for inflammation controlling [J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2012, 6(3): 201-209.
- [15] Yanai H, Matsuda A, An J, et al. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(51): 20699-20704. DOI: 10.1073/pnas.1320808110.
- [16] 汤鲁明, 金晓晴, 谢奇朋. RAGE 在高迁移率族蛋白 B1 调控 CD4+T 细胞 Th1/Th2 功能性分化中的作用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(3): 295-300. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.03.013.
- [17] 尚跃丰, 李家瑞, 张继翱. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白对脓症患者发生急性肾损伤的诊断研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2017, 26(5): 538-543. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.05.011.

- [ 18 ] Chakraborty S, Kaur S, Guha S, et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 129-169. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.03.008.
- [ 19 ] Sng JJ, Prazakova S, Thomas PS, et al. MMP-8, MMP-9 and neutrophil elastase in peripheral blood and exhaled breath condensate in COPD [J]. *COPD*, 2017, 14(2): 238-244. DOI: 10.1080/15412555.2016.1249790.
- [ 20 ] Quintero PA, Knolle MD, Cala LF, et al. Matrix metalloproteinase-8 inactivates macrophage inflammatory protein-1 alpha to reduce acute lung inflammation and injury in mice [J]. *J Immunol*, 2010, 184(3): 1575-1588. DOI: 10.4049/jimmunol.0900290.
- [ 21 ] Atkinson SJ, Varisco BM, Sandquist M, et al. Matrix metalloproteinase-8 augments bacterial clearance in a juvenile sepsis model [J]. *Mol Med*, 2016, 22(4):55-63. DOI: 10.2119/molmed.2016.00058.
- [ 22 ] Solan PD, Dunsmore KE, Denenberg AG, et al. A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(2): 379-387. DOI:10.1097/CCM.0b013e318232e404.

(收稿日期: 2018-03-28)

(本文编辑: 郑辛甜)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊常用的可不标注全称的英文缩略语

- |   |   |
|---|---|
| 急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS)                                    | 吸入氧体积分数 (fraction of inspired oxygen, FiO <sub>2</sub> )        |
| 主动脉夹层 (aortic dissection, AD)   | 格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow coma score, GCS)                              |
| 急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)  | 全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)       |
| 急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)  | 多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)          |
| 急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI)                                 | 多器官功能衰竭 (multiple organ failure, MOF)                           |
| 急性生理学及慢性健康状况评分系统 (acute physiology and chronic health evaluation, APACHE) | 重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP)                        |
| 急性肺动脉栓塞 (acute pulmonary embolism, APE)                                   | ST 段抬高心肌梗死 (ST elevated myocardial infarction, STEMI)           |
| 急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)                     | 心力衰竭 (heart failure, HF)  |
| 急性肾功能衰竭 (acute renal injury, ARF)   | 重症加强治疗病房 (intensive care unit, ICU)                             |
| 曲线下面积 (area under curve, AUC)   | 平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)                             |
| 心搏骤停 (cardiac arrest, CA)   | 机械通气 (mechanical ventilation, MV)                               |
| 社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP)                               | 经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI)              |
| C 反应蛋白 (C reaction protein, CRP)  | 降钙素原 (procalcitonin, PCT)                                       |
| 慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)                    | 呼气末正压 (positive end expiratory pressure, PEEP)                  |
| 心肺复苏 (cardiopulmonary resuscitation, CPR)                                 | 脉搏指示连续心排量监测 (pulse index continuous cardiac output, PiCCO)      |
| 连续肾脏替代治疗 (continuous renal replacement therapy, CRRT)                     | 受试者工作特征曲线 (receiver operation characteristic curve, ROC)        |
| 中心静脉压 (central venous pressure, CVP)                                      | 自主循环恢复 (return of spontaneous circulation, ROSC)                |
| 体外膜肺氧合 (extra corporeal membrane oxygenation, ECMO)                       | 序贯器官衰竭评分 (sequential organ failure assessment, SOFA)            |
| 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)                       | 肿瘤坏死因子 - $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ ) |
| 血管外肺水 (extravascular lung water, EVLW)                                    |   |