· 论著 ·

脓毒症患者骨骼肌细胞基因标志物的特征分析

田阔 王健健 刘佩芳 张荟雪 卢晓宇 徐晨
哈尔滨医科大学附属第二医院卒中中心,黑龙江哈尔滨 150001
通信作者:王丽华,Email:wanglh211@163.com

【摘要】 目的 利用生物信息学方法分析脓毒症患者骨骼肌细胞基因标志物的特征。**方法** 从美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基因表达数据库(GEO)中获取脓毒症患者骨骼肌纤维组织基因芯片表达数据集(GSE13205),利用 NCBI 网站提供的在线 R 语言分析工具(GEO2R)进行基因差异表达分析,用在线生物信息队列研究工具(BART)和美国国家网络生物学资源项目软件 Cytoscpe 进行数据处理、分析并绘图;应用 DAVID 基因数据库中的京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集方法和基因本体(GO)功能富集方法对差异表达基因进行在线通路富集分析和 GO 功能分析;并进一步应用基因与蛋白质相互作用检索数据库(STRING-DB)进行基因数据集相关蛋白质的相互作用分析。**结果** 在 GSE13205 数据集中提取前 250 个基因(TOP250),共 242 个差异表达基因纳入分析,其中上调基因 78 个,下调基因 164 个。这些差异表达基因被富集到不同的生物学过程或分子功能的子集中,其中生物学过程主要富集在生长的正负向调控和矿物质的吸收等通路上。在蛋白质相互作用网络图中识别到 14 个最为密切相关的差异表达基因。**结论** 脓毒症患者差异表达基因主要集中在控制细胞生长凋亡以及介导肿瘤相关免疫功能异常的自身调节等方面。

【关键词】 脓毒症; 基因芯片; 生物信息学; 生物标志物
基金项目:国家自然科学基金(81771361,81571166)
DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.007

Characteristic bioanalysis of skeletal muscle cells gene markers in septic patients

Tian Kuo, Wang Jianjian, Liu Peifang, Zhang Huixue, Lu Xiaoyu, Xu Chen
Stroke Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China
Corresponding author: Wang Lihua, Email: wanglh211@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the characteristics of skeletal muscle cells gene markers in septic patients by using bioinformatics. **Methods** The differential gene expression of marker microarrays (GSE13205) in skeletal muscle tissue of patients with sepsis was obtained from gene expression omnibus (GEO) database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). Gene differential expression analysis was carried out using online GEO2R provided by NCBI. Data processing, analysis and mapping were carried out using online bioinformatics array research tool (BART) and Cytoscpe software, the software of the national resource for network biology. Functional annotation and pathway analysis of differential expression genes were performed using Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and gene ontology (GO) provided by the database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID), and protein interaction analysis was further performed in search tool for the retrieve of interacting genes/proteins (STRING-DB). **Results** The TOP250 genes were extracted from the GSE13205 dataset. A total of 242 differentially expressed genes were included in the analysis. Among them, 78 up-regulated genes and 164 down-regulated genes were identified. After extensive data analysis, these differentially expressed genes were enriched into different biological processes or subsets of molecular functions, mainly enriched in the positive and negative regulation of growth, mineral absorption and other pathways. The 14 most closely related genes among differentially expressed genes were identified from the protein interaction network. **Conclusion** The differential expression genes in patients with sepsis were mainly concentrated on cell growth and apoptosis and mediating tumor-related immune function regulation.

【Key words】 Sepsis; Gene chip; Bioinformatics; Biomarker
Fund program: National Natural Science Foundation of China (81771361, 81571166)
DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.007

脓毒症是机体对感染反应失调导致的危及生命的器官功能障碍。机体反应失调本身就能引起器官功能障碍,表现为细胞层面的生理及生化异常。脓毒性休克是指脓毒症合并出现严重的循环障碍和细胞代谢紊乱,其死亡风险较单纯脓毒症显著升高。最新的脓毒症定义已经将疾病变化聚焦于更加微观的细胞层面,但就目前研究结果而言,脓毒症的根本发病机制尚未明确,涉及到复杂的全身炎症效应、基因多态性、免疫功能障碍、凝血功能异常、组织损伤以及宿主对不同感染病原微生物及其毒素的异常反应等多个方面,与机体多系统、多器官病理生理改变密切相关。

众所周知,基因是细胞内的核苷酸构成的碱基对[1]。随着近几十年基因芯片技术的出现,使得

心血管疾病、癌症等多种疾病在基因层面上作用机制的相关研究取得了巨大进步，丰富和扩展了人们对生命科学的认知，至今仍是生命科学的研究热点[2]。目前研究表明，多种基因及其所对应的蛋白质在脓毒症发生发展中起到重要作用[3-4]，但是具体机制仍不明朗。本研究通过检索基因表达数据库（GEO）[5]中脓毒症相关研究得出的基因数据集，进一步鉴定差异表达基因，并利用在线数据库系统分析差异表达基因的调控网络及其编码的蛋白质之间的相互关系[6]，为深入研究脓毒症发病的分子生物学机制及早期诊断与治疗的新方法，寻找有针对性的靶点药物等提供依据。

1　资料与方法

1.1　数据的获取及方法：研究人员于 2018 年 10 月至 12 月期间利用美国国立生物技术信息中心（NCBI）的 GEO 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/），通过关键词“sepsis”检索并整理出有关脓毒症患者的基因芯片表达数据集（GSE13205），该表达数据集包括 21 个样本，分别来自 13 例脓毒症患者以及 8 例非脓毒症患者，所取组织均为骨骼肌纤维细胞病理标本，通过在线数据工具深入分析该基因数据集的特点及表达特异性。

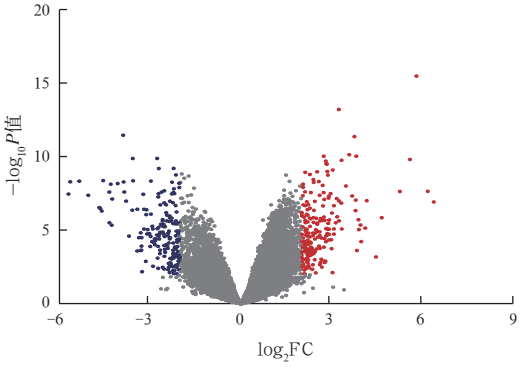
1.2　基因差异表达分析：下载 GSE13205 数据集后，采用 t 检验进行差异表达分析，计算差异表达倍数（FC）以 $|\log_2 FC|>2$、$P<0.01$ 为差异表达基因。采用 NCBI 网站提供的在线 R 语言分析工具（GEO2R，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/）进行在线分析，同时使用在线生物信息队列研究工具（BART）和美国国家网络生物学资源项目软件 Cytoscpe 进行数据处理、分析并绘图。

1.3　通路富集分析和基因本体（GO）分析：通过 DAVID 基因数据库（http://david.abcc.ncifcrf.gov）中的京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集方法及 GO 功能富集方法进行脓毒症患者差异表达基因的通路富集分析和 GO 功能分析，P 值及错误发现率（FDR）均≤0.05 即视为具有统计学意义的生物通路和 GO 通路。

1.4　蛋白质相互作用分析：利用基因与蛋白质相互作用检索数据库（STRING-DB）进行基因数据集相关蛋白质的相互作用分析，同时识别相关蛋白质家族及其相应蛋白质结构域和结合位点。

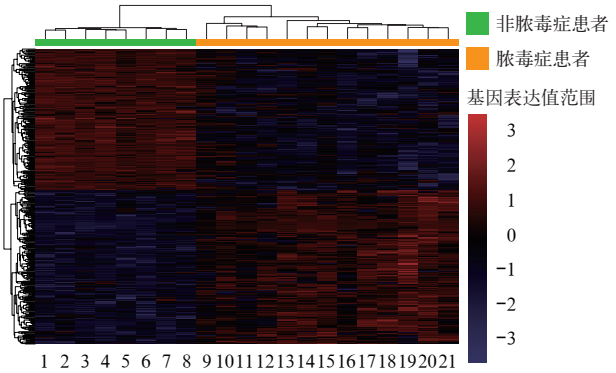
2　结　果

2.1　基因差异表达分析：利用 t 检验分析出脓毒症与非脓毒症两组样本间显著差异表达的基因后，以 $\log_2 FC$ 为横坐标，以 t 检验显著性检验 P 值的负对数 $-\log_{10}P$ 为纵坐标，对数据分布情况进行可视化绘图，得到火山图（图 1）和热图（图 2），显示该基因数据集具有显著的差异性。在 GEO2R 平台中分别对两组样本数据进行差异表达分析，提取前 250 个基因（TOP250），去除基因标志为空白的基因，共 242 个差异表达基因纳入分析，其中 $\log_2 FC$ 均呈正值的上调基因有 78 个，$\log_2 FC$ 均呈负值的下调基因有 164 个。



注：FC 为差异表达倍数；红色节点代表上调基因，蓝色节点代表下调基因，灰色节点代表非差异表达基因

图 1　脓毒症患者基因芯片表达数据集（GES13205）全部基因差异表达分布



注：样本 1～8 为非脓毒症患者，样本 9～21 为脓毒症患者；图中颜色代表差异基因在样本中的表达情况，颜色偏红代表基因表达值偏高，颜色偏蓝代表基因表达值偏低；图上方“树状线”代表根据样本的整体情况可以将样本进行聚类，最终分为两组，与分析前最初分组一致，效果良好；图左侧“树状线”代表根据基因表达情况可将基因进行聚类，最终分为两组，与分析获得的上调基因和下调基因分组一致，效果良好

图 2　基因芯片表达数据集（GES13205）中脓毒症与非脓毒症患者差异基因表达

2.2　差异表达基因的通路富集分析：以 $|\log_2 FC|>2$、$P<0.01$ 为标准，共筛选出 116 个基因，将其定义为目标基因，并对目标基因数据进行通路富集分析和 GO 功能富集分析，实验中鉴定出的目标基因主要富集于细胞对锌离子的反应、细胞对钙离子的反应、生长的调控和生长的负调控等生物学过程（表 1）以及矿物质的吸收等信号通路（图 3）。

表 1 脓毒症患者目标基因主要富集的生物学过程

GO 功能 ID	功能描述	FDR 值
0071294	细胞对锌离子的反应	< 0.000 1
0071276	细胞对钙离子的反应	< 0.000 1
0040008	生长的调控	0.000 8
0045926	生长的负调控	0.002 8

注：GO 为基因本体，FDR 为错误发现率

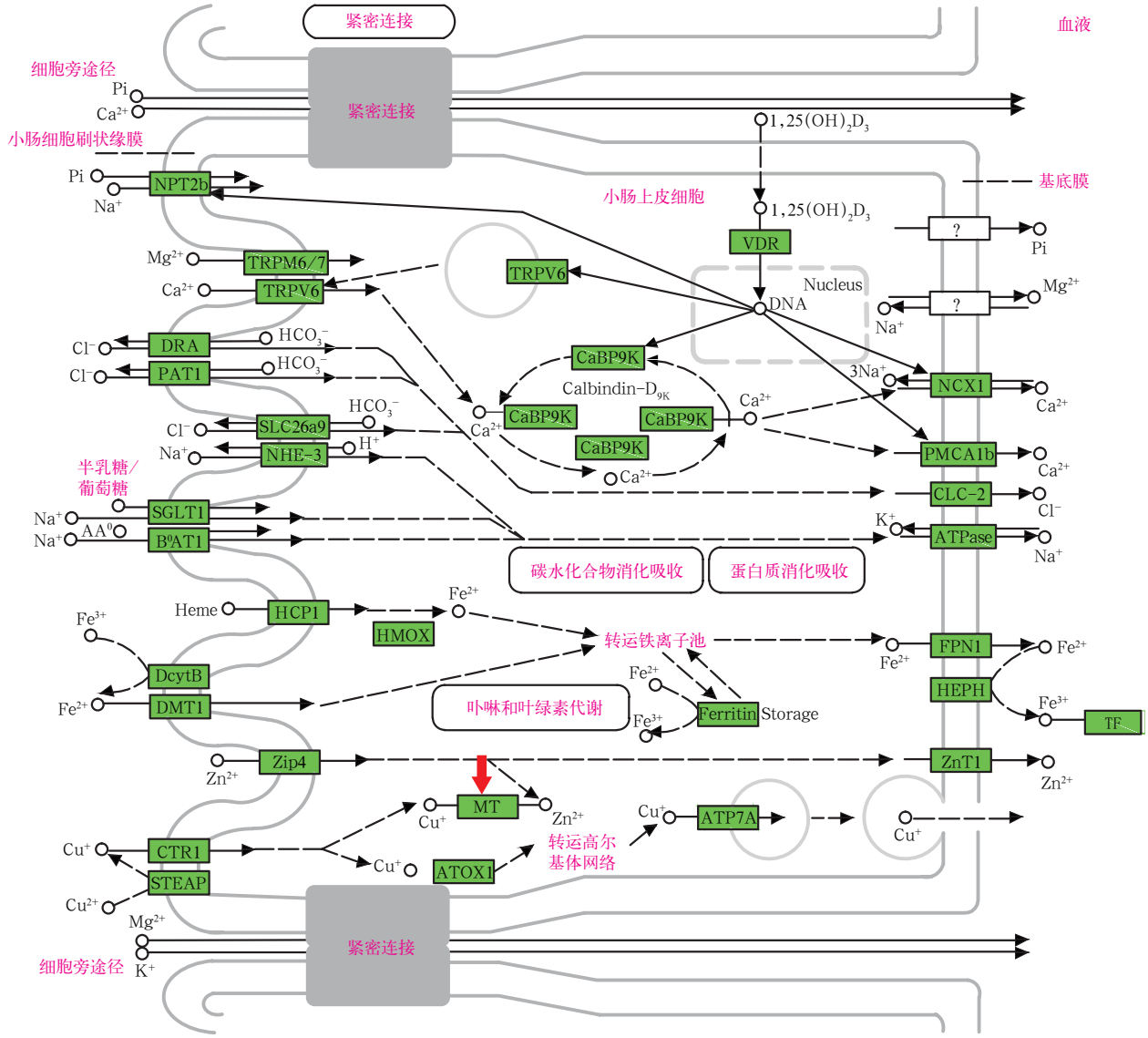
2.3 蛋白质相互作用分析：通过 STRING-DB 数据库进行目标基因相互作用分析，构成结构复杂的多中心预测差异目标基因的相互作用，并用 Cytoscpe 软件构建网络图（图 4），结果显示，首先，MT1E、MT1F、MT1G、MT1H、MT1X、MT2A 等基因形成了与金属硫蛋白（MT）相关的相互作用网络；其次，SMARCA4 和 BYSL 均与 4～5 个基因相互作用，且二者也形成多节点的相互作用网络；此外，SULT1A3、SULT1A4、SLX1A-SULT1A3 和 LSMEM1、KLHL31、PPP1R3A 均构成了三者相互作用的三元网络。

STRING-DB 分析结果还表明，目标基因富集于 MT 家族（通路标记 PF00131，FDR<0.000 1），同时显著富集于脊椎动物的 MT、MT、脊椎动物的 MT/ 金属结合位点、脊椎动物的金属硫蛋白域中（表 2）。

表 2 脓毒症患者目标基因所属蛋白质显著富集的蛋白质结构域和结合位点

通路标记	通路描述	FDR 值
IPR000006	脊椎动物的金属硫蛋白	< 0.000 1
IPR003019	金属硫蛋白	< 0.000 1
IPR017854	金属硫蛋白域	< 0.000 1
IPR018064	脊椎动物的金属硫蛋白 / 金属结合位点	< 0.000 1
IPR023587	脊椎动物的金属硫蛋白域	< 0.000 1

注：FDR 为错误发现率



注：红色箭头所示为矿物质吸收通路中的金属硫蛋白（MT），由 MT1A、MT1B、MT1E、MT1F、MT1G、MT1H、MT1M、MT1X、MT2A 9 种基因转录翻译而成，其中 MT1E、MT1F、MT1G、MT1H、MT1X、MT2A 为筛选获得的目标基因，富集在矿物质吸收通路中

图 3 脓毒症患者目标基因主要富集于矿物质吸收通路

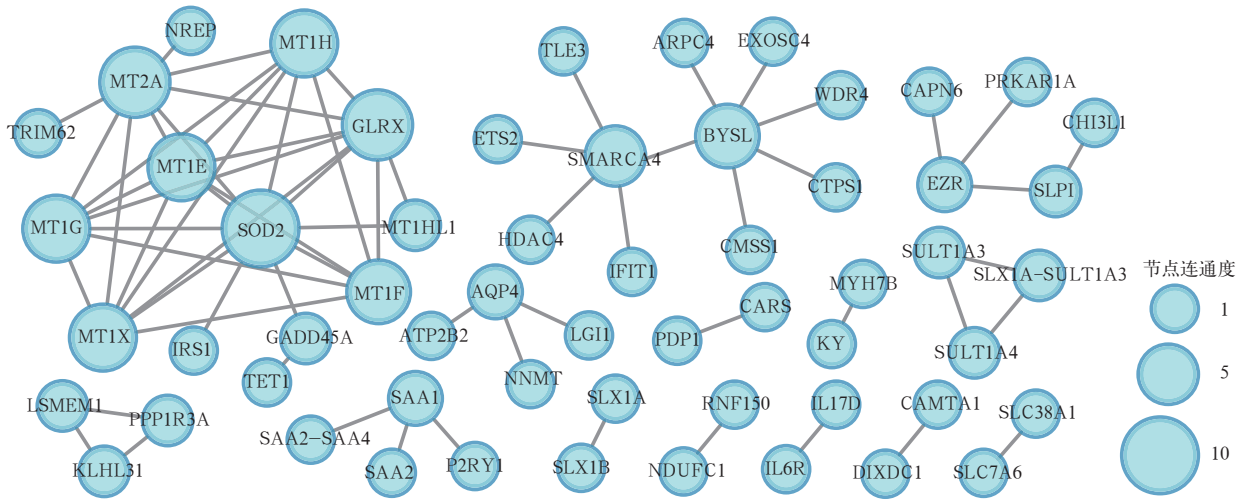


图 4　脓毒症患者部分目标基因编码的蛋白质之间相互作用关系的网络图

3　讨　论

脓毒症的发生可能与细菌内毒素、炎性介质、免疫功能紊乱、肠道细菌 / 内毒素移位、凝血功能紊乱、基因多态性等有关。由于发病过程复杂，目前脓毒症的发病机制仍需进一步阐明。本研究利用分子生物学原理，在基因与蛋白质双层水平上而非单基因水平上，对脓毒症及脓毒性休克的差异表达基因进行分析，通过 KEGG 通路富集、GO 功能及识别蛋白质间相互作用关系等分析方法，发现脓毒症发病过程中的显著变化主要发生在基因表达调控细胞生长等生物学功能方面，同时发现金属蛋白酶等蛋白质及相关基因也在脓毒症发生发展中发挥了巨大作用。

本研究通过 STRING-DB 分析显示，SMARCA4 在脓毒症发病过程中作用较大，在 3 条通路中处于核心地位。SMARCA4 为酵母交配型转换 / 蔗糖不发酵复合物（SWI/SNF）的成员之一[7]，此类复合物是一种进化保守的多亚单位的染色质重构复合物，它能够利用三磷酸腺苷（ATP）水解产生的能量动员核小体，使染色质重构，从而调节靶基因的转录。越来越多的研究证实了 SWI/SNF 复合物在肿瘤发生中起着重要作用，它的几个亚单位具有内在的肿瘤抑制子活性，是肿瘤抑制基因激活所必需的。有研究证据显示，SMARCA4 在卵巢高钙血症型小细胞癌、肝细胞肝癌等疾病中表达异常[8]，但是目前国内外针对其与脓毒症作用机制的相关研究较为罕见。

本研究通过基因通路分析表明，MT 等生物学标志物在脓毒症过程中异常表达，包括 MT1A、MT1B、MT1E、MT1F、MT1G、MT1H、MT1M、MT1X、MT2A，此类蛋白质主要在矿物质的吸收过程中发挥作用。MT 是一类低分子质量、富含半胱氨酸残基的金属结合蛋白[9]。典型的 MT 由 61 个氨基酸残基组成，相对分子质量约 7 000；其中含有 20 个半胱氨酸，6 ~ 8 个赖氨酸，7 ~ 10 个丝氨酸和 1 个乙酰化的甲硫氨酸。MT 的生物功能广泛，主要参与微量元素的贮存、运输、代谢，拮抗电离辐射，清除羟自由基及重金属解毒等多种作用。同时，MT 与肿瘤类疾病的发生发展密切相关。脓毒症等严重炎症反应疾病在宏观方面包含全身炎症反应和多器官功能衰竭，在微观方面伴随着免疫功能紊乱、机体代谢异常、能量代谢异常、水电解质异常以及内环境紊乱[10]。本研究显示，微量元素在细胞中转运的主要通路蛋白表达异常导致的代谢异常以及功能异常，可能是脓毒症疾病变化过程中一个十分重要的环节，这可能是未来治疗脓毒症的一个新靶点以及突破方向。

脓毒症也伴随着严重的感染，耐药细菌例如革兰阴性细菌细胞成分介导的免疫细胞免疫机制，以及其他炎性介质的出现，导致机体免疫功能紊乱。本研究显示，脓毒症患者基因表达异常，存在大量基因的表达升高与下降，也验证了目前一些研究的结论，即固有免疫和适应性免疫反应均参与脓毒症发病。脓毒症可能同时存在免疫亢进和免疫抑制，抗炎 / 促炎反应的强弱处于不断变化之中。适应性免疫是由 T 细胞和 B 细胞执行的免疫作用。由于肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）明显增高，机体通过激活 Fas-FasL 介导的细胞凋亡，导致 T 细胞、B 细胞、肥大细胞（MC）及树突细胞（DC）数量减少，诱发早期的免疫抑制。近期研究表明，微小 RNA（miR-223、miR-150、miR-155、miR-180a）在 T 细胞和 B 细胞的分化和生长中起关键作用[11]。但是脓毒症过程中淋巴细胞减少是否与部分基因的表达存在一定关

系还有待进一步研究。

本研究利用分子生物学技术,结合国际互联网以及计算机等信息技术手段,进行脓毒症这一全球最为危重疾病的基因数据集研究,使重症加强治疗病房(ICU)医师以及科研工作者能够更加深刻地理解脓毒症发病的深层次因素。脓毒症可能是一类复杂的涉及到人类基因异常表达并与细胞发生发展、凋亡等因素密切相关的综合征,同时也与某些癌症相关疾病的作用机制存在相似点。本研究可为未来开发出精准有效治疗脓毒症疾病的新型药物、新型治疗思路起到一定推动作用。

综上,数十年来国内外一直在进行脓毒症机制方面的研究,但国内外学者应用分子生物学大数据等方法研究脓毒症的思路仍需进一步拓宽,本研究识别的差异表达基因可用于基因检测候选标志物,同时也可在未来进一步开发出可特异性识别脓毒症的血液检测工具。本研究利用分子生物学方法研究脓毒症,揭示相关通路蛋白质的作用,可进一步为特异性药物研发等医学转化方面的应用提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. Cell, 1993, 75 (5): 843-854.

[2] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis [J]. Nature, 2010, 465 (7298): 584-589. DOI: 10.1038/nature09092.

[3] 王慧娟, 解立新. miRNA 在脓毒症中作用研究进展 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32 (3): 230-232.
Wang HJ, Xie LX. Advances in research of miRNA in sepsis [J]. J Chinese PLA Postgrad Med Sch, 2011, 32 (3): 230-232.

[4] 刘彩丽, 卢灵莉, 梁桂林, 等. 微小 RNA-223 及高迁移率族蛋白 -1 在脓毒症患儿中的表达及意义 [J]. 临床儿科杂志, 2015, 33 (5): 459-461. DOI: 10.3969j.issn.1000-3606.2015.05.015.
Liu CL, Lu LL, Liang GL, et al. Expression of plasma microRNA-223 and HMGB-1 in pediatric sepsis patients and its clinical significance [J]. J Clin Pediatr, 2015, 33 (5): 459-461. DOI: 10.3969j.issn.1000-3606.2015.05.015.

[5] 余海浪, 马文丽, 郑文岭. 用于基因数据挖掘的基因表达数据库 GEO [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27 (8): 96-103. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8135.2007.08.018.
Yu HL, Ma WL, Zheng WL. Data mining procedures using GEO (Gene Expression Omnibus) [J]. China Biotechnol, 2007, 27 (8): 96-103. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8135.2007.08.018.

[6] 余涛, 李丹, 邹小娟, 等. 基于 Oncomine 和 GEO 数据库分析 SEC24D 基因在乳腺癌中的表达意义及穿心莲内酯的干预研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (5): 1703-1707.
Yu T, Li D, Zou XJ, et al. Analysis of SEC24D gene expression in breast cancer based on Oncomine and GEO database and intervention study of andrographolide [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33 (5): 1703-1707.

[7] 伍刚. 乙肝病毒 X 蛋白诱发肝癌细胞内 miRNA 表达谱异常改变 [J]. 四川医学, 2018, 39 (5): 477-480. DOI: 10.16252/j.cnki.issn1004-0501-2018.05.001.
Wu G. Abnormal changes of miRNA expression profiles in hepatocellular carcinoma cells induced by HBV X protein [J]. Sichuan Med J, 2018, 39 (5): 477-480. DOI: 10.16252/j.cnki.issn 1004-0501-2018.05.001.

[8] 徐军, 沈源明, 石海燕, 等. 卵巢高钙血症型小细胞癌 2 例并文献复习 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34 (5): 557-559. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.05.021.
Xu J, Shen YM, Shi HY, et al. Two cases of ovarian small cell carcinoma with hypercalcemia and literature review [J]. J Clin Exp Pathol, 2018, 34 (5): 557-559. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep. 2018.05.021.

[9] 曾江华, 蒋仕秋, 刘海荣, 等. 金属硫蛋白 -Ⅰ/Ⅱ调节炎症反应的作用机制研究进展 [J]. 成都医学院学报, 2018, 13 (1): 115-118. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2257.2018.01.027.
Zeng JH, Jiang SQ, Liu HR, et al. Progress in the mechanism of metallothionein-Ⅰ/Ⅱ regulating inflammation [J]. J Chengdu Med Coll, 2018, 13 (1): 115-118. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2257.2018. 01.027.

[10] 颜穗珺, 郭伟昌, 周晓伟, 等. 金属硫蛋白基因多态性与昆明地区汉族 2 型糖尿病的相关性研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2018, 26 (7): 529-533. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2018.07.001.
Yan SJ, Guo WC, Zhou XW, et al. Association between the polymorphism of MT gene and type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Diabetes, 2018, 26 (7): 529-533. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187. 2018.07.001.

[11] Sanfilippo F, Santonocito C, Morelli A, et al. Beta-blocker use in severe sepsis and septic shock: a systematic review [J]. Curr Med Res Opin, 2015, 31 (10): 1817-1825. DOI: 10.1185/03007995. 2015.1062357.

(收稿日期:2018-12-27)

· 科研新闻速递 ·

球囊面罩通气能够降低重症患者气管插管期间低氧血症发生率

低氧血症是危重患者气管插管时最常见的并发症,可能增加患者心搏骤停和死亡风险。在重症患者气管插管期间使用球囊面罩装置进行正压通气能否预防低氧血症且不增加误吸风险仍然存在争议。为此,美国学者进行了一项多中心随机临床试验。研究人员将接受气管插管的成人患者随机分为两组:接受球囊面罩通气组以及在诱导和喉镜操作期间无通气组。主要评价指标是在诱导至气管插管后 2 min 期间观察到的最低血氧饱和度;次要评价指标是严重低氧血症的发生率(定义为血氧饱和度<0.80)。在入选的 401 例患者中,球囊面罩通气组患者最低血氧饱和度中位数为 0.96(四分位数为 0.87, 0.99),无通气组中位数为 0.93(四分位数为 0.81, 0.99),两组比较差异有统计学意义(P=0.01)。球囊面罩通气组有 21 例患者(10.9%)出现严重低氧血症,无通气组有 45 例(22.8%),相对危险度(RR)=0.48〔95% 可信区间(95%CI)=0.30~0.77〕。球囊面罩通气组与无通气组误吸发生率分别为 2.5% 和 4.0%(P=0.41),气管插管后 48 h 胸片新发透光度下降的发生率分别为 16.4% 和 14.8%(P=0.73)。研究人员据此得出结论:对于接受气管插管的成人危重病患者,球囊面罩通气能够降低其低氧血症发生率。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》, 2019, 380(9): 811-821