

线粒体相关蛋白 FAHD1 和 GDF-15 在脓毒症诊断中的价值

——来自一项多中心研究患者的检测结果

李萌¹ 任蓉蓉¹ 陈上仲² 陈琛¹ 严静²

¹ 浙江医院医学检验科, 杭州 310013; ² 浙江医院重症医学科, 杭州 310013

通信作者: 严静, Email: zjicu@vip.163.com

【摘要】 目的 探讨线粒体相关蛋白延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白 1 (FAHD1) 和生长分化因子 15 (GDF-15) 在脓毒症诊断中的价值。方法 从一项基于脓毒症的早期预警及规范化诊疗体系建立的“脓毒症全过程预警及诊治管理数据库”中, 收集 2014 年 5 月至 2015 年 10 月浙江医院、浙江大学医学院附属第二医院、中山大学附属第一医院、四川大学华西医院、宁波市第一医院纳入的疑似感染的成人患者。分析脓毒症和非脓毒症患者基础生命体征信息及确诊时主要血常规指标、肝肾功能指标、血气指标、急性生理学与慢性健康状况评分 II (APACHE II) 和序贯器官衰竭评分 (SOFA) 等。利用保存的血清样本, 用电化学发光法检测降钙素原 (PCT) 水平, 用免疫比浊法检测 C-反应蛋白 (CRP) 水平, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 FAHD1 和 GDF-15 水平。采用单因素和多因素 Logistic 回归分析脓毒症诊断中的危险因素, 并应用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 分析各指标对脓毒症的诊断效能。结果 共入选 132 例患者, 其中脓毒症 76 例, 非脓毒症 56 例。与非脓毒症组相比, 脓毒症组心率加快 (次/min: 116.4 ± 17.8 比 97.4 ± 19.1), 平均动脉压 (MAP)、血小板计数 (PLT)、动脉血氧分压 (PaO₂) 显著降低 [MAP (mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa): 65.8 ± 9.7 比 74.7 ± 10.3 , PLT ($\times 10^9/L$): 120 (69, 204) 比 163 (117, 239), PaO₂ (mmHg): $83.0 (66.6, 108.0)$ 比 $108.0 (84.4, 130.0)$, 均 $P < 0.05$], 直接胆红素 (DBil)、血肌酐 (SCr)、血乳酸 (Lac)、APACHE II 评分和 SOFA 评分均显著升高 [DBil ($\mu\text{mol/L}$): $13.00 (5.55, 55.31)$ 比 $6.20 (2.20, 21.90)$, SCr ($\mu\text{mol/L}$): $118.00 (70.00, 191.73)$ 比 $77.20 (59.65, 110.86)$, Lac (mmol/L): $2.90 (1.50, 4.10)$ 比 $1.90 (1.20, 2.80)$, APACHE II (分): $20.0 (16.0, 25.0)$ 比 $16.0 (10.0, 21.0)$, SOFA (分): $12.0 (8.0, 16.0)$ 比 $8.0 (5.0, 13.0)$, 均 $P < 0.05$]。此外, 脓毒症组血清 FAHD1、GDF-15、PCT、CRP 水平均显著高于非脓毒症组 [FAHD1 ($\mu\text{g/L}$): $3.96 (2.25, 5.92)$ 比 $2.47 (1.03, 3.54)$, GDF-15 ($\mu\text{g/L}$): $8.46 (4.37, 19.68)$ 比 $4.32 (1.74, 10.39)$, PCT ($\mu\text{g/L}$): $3.79 (1.37, 11.32)$ 比 $0.42 (0.12, 2.14)$, CRP (mg/L): $154.43 (61.33, 283.20)$ 比 $65.95 (28.15, 144.69)$, 均 $P < 0.01$]。多因素 Logistic 回归分析显示, 血清 FAHD1 [优势比 (OR) = 1.135, 95% 可信区间 (95%CI) 为 1.045 ~ 1.234]、GDF-15 (OR = 1.090, 95%CI 为 1.029 ~ 1.155) 和 CRP (OR = 1.007, 95%CI 为 1.002 ~ 1.011) 均是脓毒症诊断的风险因素 (均 $P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, 在脓毒症诊断中, 血清线粒体相关蛋白 FAHD1 和 GDF-15 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.727 (95%CI 为 0.641 ~ 0.802)、0.677 (95%CI 为 0.588 ~ 0.757), 经典感染指标 PCT 和 CRP 的 AUC 分别为 0.767 (95%CI 为 0.683 ~ 0.837)、0.680 (95%CI 为 0.591 ~ 0.760), 线粒体相关蛋白与经典感染指标的 AUC 差异无统计学意义。FAHD1、GDF-15、PCT 与 CRP 联合诊断的 AUC 最大, 为 0.809 (95%CI 为 0.730 ~ 0.874), 其敏感度为 75.00%, 特异度为 80.00%。结论 线粒体相关蛋白 FAHD1 和 GDF-15 在脓毒症诊断中具有一定作用, 与 PCT、CRP 指标联合诊断效能会提高, 可为脓毒症诊断标志物的筛查提供试验依据。

【关键词】 延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白 1; 生长分化因子 15; 脓毒症; 生物标志物

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY16H200002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200813-00575

Study on the value of mitochondrial associated protein fumarylacetoacetate domain containing protein 1 and growth differentiation factor-15 in the diagnosis of sepsis: test results from the patients of a multicenter study

Li Meng¹, Ren Rongrong¹, Chen Shangzhong², Chen Chen¹, Yan Jing²

¹ Department of Clinical Laboratory, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, Zhejiang, China; ² Department of Critical Care Medicine, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, Zhejiang, China

Corresponding author: Yan Jing, Email: zjicu@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the diagnostic value of mitochondrial associated protein fumarylacetoacetate domain containing protein 1 (FAHD1) and growth differentiation factor-15 (GDF-15) in sepsis. **Methods** Based on the database of the whole process of sepsis early warning, diagnosis and treatment management, which was established on the study of sepsis early warning and standardized diagnosis and treatment system, adult patients with suspected infection admitted to the department of critical care medicine of Zhejiang Hospital, Second Affiliated Hospital of Zhejiang

University, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, West China Hospital of Sichuan University, Ningbo First Hospital from May 2014 to October 2015 were enrolled. The basic vital signs, and the main blood routine results, liver and kidney function, blood gas, acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) and sequential organ failure assessment (SOFA) score at the time of diagnosis of patients with or without sepsis were analyzed. The preserved serum samples were taken, the levels of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) were detected by electrochemiluminescence method, immunoturbidimetry respectively, and FAHD1 and GDF-15 were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Univariate and multivariate Logistic regression were used to analyze the risk factors for sepsis diagnose. The indexes' diagnostic efficacy in sepsis were analyzed by receiver operator characteristics curve (ROC curve). **Results** A total of 132 patients were enrolled, including 76 cases of sepsis and 56 cases of non-sepsis. Compared with the non-sepsis group, the heart rate in the sepsis group was increased (bpm: 116.4 ± 17.8 vs. 97.4 ± 19.1), while the mean arterial pressure (MAP), platelet count (PLT), arterial partial pressure of oxygen (PaO_2) were significantly decreased [MAP (mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa): 65.8 ± 9.7 vs. 74.7 ± 10.3 , PLT ($\times 10^9/\text{L}$): 120 (69, 204) vs. 163 (117, 239), PaO_2 (mmHg): 83.0 (66.6, 108.0) vs. 108.0 (84.4, 130.0), all $P < 0.05$], direct bilirubin (DBil), serum creatinine (SCr), lactic acid (Lac), APACHE II score and SOFA score were significantly increased [DBil ($\mu\text{mol/L}$): 13.00 (5.55, 55.31) vs. 6.20 (2.20, 21.90), SCr ($\mu\text{mol/L}$): 118.00 (70.00, 191.73) vs. 77.20 (59.65, 110.86), Lac (mmol/L): 2.90 (1.50, 4.10) vs. 1.90 (1.20, 2.80), APACHE II score: 20.0 (16.0, 25.0) vs. 16.0 (10.0, 21.0), SOFA score: 12.0 (8.0, 16.0) vs. 8.0 (5.0, 13.0), all $P < 0.05$]. In addition, the serum levels of FAHD1, GDF-15, PCT and CRP in sepsis group were significantly higher than those in non-sepsis group [FAHD1 ($\mu\text{g/L}$): 3.96 (2.25, 5.92) vs. 2.47 (1.03, 3.54), GDF-15 ($\mu\text{g/L}$): 8.46 (4.37, 19.68) vs. 4.32 (1.74, 10.39), PCT ($\mu\text{g/L}$): 3.79 (1.37, 11.32) vs. 0.42 (0.12, 2.14), CRP (mg/L): 154.43 (61.33, 283.20) vs. 65.95 (28.15, 144.69), all $P < 0.01$]. Multivariate Logistic regression showed that serum FAHD1 [odds ratio (OR) = 1.135, 95% confidence interval (95%CI) was 1.045–1.234], GDF-15 (OR = 1.090, 95%CI was 1.029–1.155) and CRP (OR = 1.007, 95%CI was 1.002–1.011) were risk factors for sepsis (all $P < 0.05$). ROC curve analysis of sepsis showed that the areas under ROC curve (AUC) of serum mitochondrial associated proteins FAHD1 and GDF-15 were 0.727 (95%CI was 0.641–0.802) and 0.677 (95%CI was 0.588–0.757), respectively; and the AUC of classical infection indexes PCT and CRP were 0.767 (95%CI was 0.683–0.837) and 0.680 (95%CI was 0.59–0.760), respectively. There was no significant difference between the AUC of mitochondrial associated proteins and classical infection indexes. The combination of FAHD1, GDF-15, PCT and CRP had the largest AUC, which was 0.809 (95%CI was 0.730–0.874), and the sensitivity was 75.00%, and the specificity was 80.00%. **Conclusion** Mitochondrial associated protein FAHD1 and GDF-15 are associated with sepsis, and the diagnostic efficiency is improved when combined with PCT and CRP, which might provide experimental basis for screening diagnostic markers of sepsis.

【Key words】 Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1; Growth differentiation factor-15; Sepsis; Biomarker

Fund program: Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (LY16H200002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200813-00575

脓毒症是重症监护病房(intensive care unit, ICU)患者的常见病因,且病死率居高不下^[1]。早期诊断和规范化治疗是提高脓症患者生存率及降低致残率的关键^[2-3],而生物学标志物为临床诊断提供了依据。降钙素原(procalcitonin, PCT)单独或与乳酸、乳酸清除率等指标联用是评价脓毒症严重程度及不良预后的良好指标^[4-5];C-反应蛋白(C-reaction protein, CRP)虽缺乏特异性,但具有监测感染、辅助判断脓毒症的价值^[6]。学者们仍在寻找脓毒症诊断标志物,以期降低脓毒症的发病率和病死率。

线粒体是细胞供能代谢中心,而氧化应激能够引起线粒体损伤;同时,线粒体功能障碍是脓毒症发生的重要病理特征之一^[7]。我们前期运用同位素标记相对和绝对定量标记技术(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ),结合二维液相色谱串联质谱技术(two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 2DLC-MS/MS)筛选脓毒症血清标志物,发现在脓毒

症确诊前后线粒体相关蛋白延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白1(fumarylacetoacetate hydrolase domain containing protein 1, FAHD1)水平显著改变。本研究中通过检测非脓毒症与脓症患者血清中FAHD1和另一种线粒体相关蛋白生长分化因子15(growth differentiation factor-15, GDF-15)水平,分析二者在脓毒症诊断中的价值,以期为脓毒症早期诊断提供试验基础。

1 资料与方法

1.1 数据及样本来源:为了研究脓毒症早期预警及规范化诊疗体系,由浙江大学和浙江医院联合研发建立了“脓毒症全过程预警及诊治管理数据库”,完整记录了脓症患者发病前后的生理状态及诊治情况。基于该数据库,本研究收集2014年5月至2015年10月浙江医院、浙江大学医学院附属第二医院、中山大学附属第一医院、四川大学华西医院、宁波市第一医院收治的高度怀疑感染成人患者的临床资料及其保存的血清样本。

1.1.1 纳入标准: 高度怀疑感染并至少存在以下任意一项。① 体温 $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$; ② 呼吸频率 >20 次/min; ③ 心率 >90 次/min; ④ 主诉发热/发冷; ⑤ 外周血白细胞计数 (white blood cell count, WBC) $>12.0 \times 10^9/\text{L}$ 或 $<4 \times 10^9/\text{L}$, 或者未成熟粒细胞 >0.10 。

1.1.2 排除标准: 年龄 <18 周岁; 恶性肿瘤终末期; 主要病史资料缺失者。

1.2 伦理学: 本研究符合医学伦理学标准, 已通过浙江医院医学伦理委员会临床试验审查 (批件号: 2015-94K)。

1.3 研究方法: 分析患者基本信息、临床资料及常规实验室指标, 利用保存的血清样本检测 CRP、PCT、FAHD1 和 GDF-15 水平。

1.3.1 分组: 根据 Sepsis-3 诊断标准, 将患者分为非脓毒症组及脓毒症组。

1.3.2 临床指标分析: 收集患者性别、年龄、基础生命体征信息; 确诊时 WBC、血红蛋白 (hemoglobin, Hb)、血细胞比容 (hematocrit, HCT) 及血小板计数 (platelet count, PLT) 等血常规指标, 总胆红素 (total bilirubin, TBil)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBil)、血肌酐 (serum creatinine, SCr)、24 h 尿量等肾功能指标, 血乳酸 (lactic acid, Lac) 和动脉血氧分压 (arterial partial pressure of oxygen, PaO₂) 等血气指标, 急性生理学与慢性健康状况评分 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II) 以及序贯器官衰竭评分 (sequential organ failure assessment, SOFA) 等。

1.3.3 检测指标及方法: 利用 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存的血清样本进行检测。

1.3.3.1 CRP、PCT 测定: 用全自动生化仪 (AU5800, 美国 Beckman 公司) 采用免疫比浊法检测血清 CRP 水平; 应用全自动免疫发光仪 (Cobas e602, 瑞士 Roche 公司) 采用电化学发光法检测血清 PCT 水平。

1.3.3.2 血清 FAHD1 测定: 采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 双抗体夹心法试剂盒 (MyBioSource Inc, 美国 San Diego 公司) 进行检测。向包被抗人 FAHD1 的单克隆抗体微孔板中加入血清样本和酶标抗体, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 洗涤后依次加入显色液和终止液, 15 min 内在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值, 根据标准曲线浓度, 通过吸光度线性回归计算 FAHD1 水平。

1.3.3.3 血清 GDF-15 测定: 采用 ELISA 双抗体夹

心法试剂盒 (R&D Systems Inc, 美国 Minneapolis 公司) 进行检测。向包被抗人 GDF-15 的单克隆抗体微孔板中加入稀释的血清样本 (1:16), 室温振荡 2 h; 洗涤后加入酶标抗体和终止液, 30 min 内在酶标仪 450 nm 和 570 nm 处读取吸光度值, 根据四参数公式计算 GDF-15 水平。

1.4 统计学分析: 应用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。呈正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验; 非正态分布的计量数据以中位数 (四分位数) [$M(Q_L, Q_U)$] 表示, 组间比较用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以例数和百分比 (%) 表示, 当任意组别的例数 ≥ 5 时, 两组间比较用 Pearson χ^2 检验, 当 $1 \leq$ 任意组别的例数 < 5 时, 两组间比较采用连续校正 χ^2 检验。非脓毒症与脓毒症组血清学指标采用单因素、多因素 Logistic 回归分析。应用 SPSS 22.0 软件和 Medcalc 11.4 软件绘制受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristics curve, ROC 曲线), 分析血清 FAHD1、GDF-15、PCT 和 CRP 对脓毒症的诊断效能, ROC 曲线下面积 (area under ROC curve, AUC) 比较采用 Z 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基线资料及基本生命体征信息 (表 1): 132 例患者均来自 ICU, 其中脓毒症 76 例, 非脓毒症 56 例。脓毒症与非脓毒症组年龄、性别比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。脓毒症与非脓毒症患者均存在不同部位的感染, 以肺部感染为主, 同样感染部位在组间差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与非脓毒症组相比, 脓毒症组患者心率加快 ($P < 0.01$), MAP 降低 ($P < 0.01$), 而体温、呼吸频率、格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow coma scale, GCS) 差异未见统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

2.2 脓毒症与非脓症患者实验室指标及临床评分比较 (表 2): 与非脓毒症组相比, 脓毒症组患者 WBC、TBil、DBil、SCr、Lac、APACHE II 评分和 SOFA 评分均有增高, 且 DBil、SCr、Lac、APACHE II 评分和 SOFA 评分组间比较差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 脓毒症组患者 Hb、PLT、24 h 尿量和 PaO₂ 均降低, 且 PLT 和 PaO₂ 组间比较差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.3 脓毒症与非脓症患者血清 FAHD1、GDF-15 水平及感染相关指标比较 (表 3): 与非脓毒症组相

表1 脓毒症与非脓毒症患者基线资料及基本生命体征信息比较

组别	例数 (例)	男性 [例(%)]	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	感染部位 [例(%)]					
				肺部	泌尿系统	腹腔	肠道	血流	混合
脓毒症组	76	53 (69.7)	62.2 ± 16.8	48 (63.2)	4 (5.3)	16 (21.1)	1 (1.3)	12 (15.8)	10 (13.2)
非脓毒症组	56	46 (82.1)	63.7 ± 21.0	39 (69.6)	1 (1.8)	6 (10.7)	1 (1.8)	4 (7.1)	3 (5.4)
χ^2/t 值		1.109	0.442	0.349	0.328	2.481	0.000	1.881	1.419
P值		0.292	0.658	0.554	0.567	0.115	1.000	0.170	0.234

组别	例数 (例)	体温 ($^{\circ}\text{C}$, $\bar{x} \pm s$)	心率 (次/min, $\bar{x} \pm s$)	呼吸频率 (次/min, $\bar{x} \pm s$)	MAP (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	GCS评分 [分, $M(Q_L, Q_U)$]
非脓毒症组	56	37.8 ± 0.9	97.4 ± 19.1	20.4 ± 5.4	74.7 ± 10.3	12.0 (8.5, 14.0)
t/Z值		-0.811	-5.892	-1.876	5.010	-0.520
P值		0.419	<0.001	0.063	<0.001	0.603

注: MAP为平均动脉压, GCS为格拉斯哥昏迷评分; 1 mmHg=0.133 kPa

表2 脓毒症与非脓毒症患者实验室指标及临床评分比较

组别	例数 (例)	WBC [$\times 10^9/L$,	Hb [g/L,	HCT	PLT [$\times 10^9/L$,	TBil [$\mu\text{mol/L}$,	DBil [$\mu\text{mol/L}$,
		$M(Q_L, Q_U)$]	$M(Q_L, Q_U)$]	($\bar{x} \pm s$)	$M(Q_L, Q_U)$]	$M(Q_L, Q_U)$]	$M(Q_L, Q_U)$]
脓毒症组	76	11.0 (8.4, 13.8)	89.0 (74.5, 105.0)	0.298 ± 0.071	163 (117, 239)	20.00 (12.43, 75.75)	13.00 (5.55, 55.31)
非脓毒症组	56	13.5 (8.0, 16.9)	87.5 (67.8, 104.5)	0.297 ± 0.047	120 (69, 204)	17.10 (10.50, 30.40)	6.20 (2.20, 21.90)
Z/t值		-1.655	-0.371	-0.161	-2.934	-1.508	-2.812
P值		0.098	0.710	0.872	0.003	0.131	0.005

组别	例数 (例)	SCr [$\mu\text{mol/L}$,	24 h 尿量 [mL,	Lac [mmol/L,	PaO ₂ [mmHg,	APACHE II评分	SOFA评分
		$M(Q_L, Q_U)$]	$M(Q_L, Q_U)$]	$M(Q_L, Q_U)$]	$M(Q_L, Q_U)$]	[分, $M(Q_L, Q_U)$]	[分, $M(Q_L, Q_U)$]
脓毒症组	76	118.00 (70.00, 191.73)	1 220 (800, 1 975)	2.90 (1.50, 4.10)	83.0 (66.6, 108.0)	20.0 (16.0, 25.0)	12.0 (8.0, 16.0)
非脓毒症组	56	77.20 (59.65, 110.86)	1 580 (1 025, 2 187)	1.90 (1.20, 2.80)	108.0 (84.4, 130.0)	16.0 (10.0, 21.0)	8.0 (5.0, 13.0)
Z值		-3.205	-1.600	-3.122	-3.833	-3.480	-4.067
P值		0.001	0.110	0.002	<0.001	0.001	<0.001

注: WBC为白细胞计数, Hb为血红蛋白, HCT为血细胞比容, PLT为血小板计数, TBil为总胆红素, DBil为直接胆红素, SCr为血肌酐, Lac为血乳酸, PaO₂为动脉血氧分压, APACHE II为急性生理学与慢性健康状况评分II, SOFA为序贯器官衰竭评分; 1 mmHg=0.133 kPa

比,脓毒症组血清FAHD1、GDF-15及感染相关指标PCT、CRP水平均明显升高,且差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

上述4个指标纳入多因素Logistic回归分析,血清FAHD1、GDF-15及CRP水平进入方程,提示这些指标均是脓毒症诊断的独立危险因素(均 $P < 0.05$)。

表3 脓毒症与非脓毒症患者血清FAHD1、GDF-15、PCT及CRP水平比较 [$M(Q_L, Q_U)$]

组别	例数 (例)	FAHD1	GDF-15
		($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)
脓毒症组	76	3.96 (2.25, 5.92)	8.46 (4.37, 19.68)
非脓毒症组	56	2.47 (1.03, 3.54)	4.32 (1.74, 10.39)
Z值		-4.067	-3.700
P值		<0.001	<0.001

组别	例数 (例)	PCT	CRP
		($\mu\text{g/L}$)	(mg/L)
脓毒症组	76	3.79 (1.37, 11.32)	154.43 (61.33, 283.20)
非脓毒症组	56	0.42 (0.12, 2.14)	65.95 (28.15, 144.69)
Z值		-5.141	-3.779
P值		<0.001	<0.001

注: FAHD1为延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白1, GDF-15为生长与分化因子15, PCT为降钙素原, CRP为C-反应蛋白

表4 Logistic回归分析脓毒症诊断中的危险因素

指标	单因素 Logistic 回归			
	β 值	P值	OR值	95%CI
FAHD1	0.084	0.025	1.088	1.011 ~ 1.171
GDF-15	0.094	<0.001	1.099	1.042 ~ 1.158
PCT	0.051	0.034	1.053	1.004 ~ 1.104
CRP	0.007	<0.001	1.007	1.003 ~ 1.011

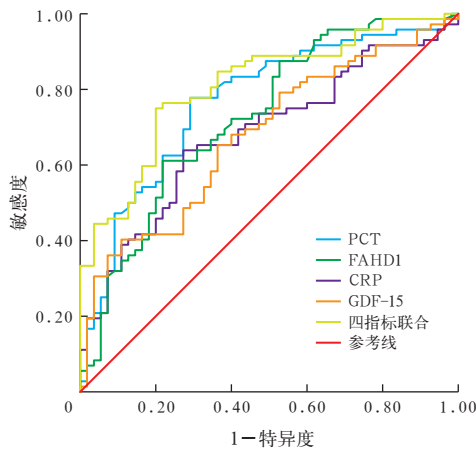
指标	多因素 Logistic 回归			
	β 值	P值	OR值	95%CI
FAHD1	0.127	0.003	1.135	1.045 ~ 1.234
GDF-15	0.087	0.003	1.090	1.029 ~ 1.155
PCT	0.023	0.185	1.024	0.989 ~ 1.060
CRP	0.007	0.003	1.007	1.002 ~ 1.011

注: FAHD1为延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白1, GDF-15为生长与分化因子15, PCT为降钙素原, CRP为C-反应蛋白, OR为优势比, 95%CI为95%可信区间

2.4 Logistic回归分析脓毒症诊断中的危险因素(表4):单因素Logistic回归分析中FAHD1、GDF-15、PCT、CRP均与脓毒症诊断相关(均 $P < 0.05$)。将

2.5 ROC曲线分析(图1;表5):在脓毒症诊断中,血清FAHD1、GDF-15、PCT和CRP的AUC分别为0.727、0.677、0.767及0.680;线粒体相关蛋

白 FAHD1、GDF-15 的 AUC 与经典感染指标 PCT、CRP 的 AUC 比较差异均无统计学意义 (FAHD1 与 PCT、CRP 相比, Z 值分别为 0.650、0.755, 均 $P > 0.05$; GDF-15 与 PCT、CRP 相比, Z 值分别为 1.728、0.038, 均 $P > 0.05$)。FAHD1、GDF-15、PCT 与 CRP 4 个指标联合诊断脓毒症的 AUC 为 0.809, 诊断价值明显提高, 四指标联合的 AUC 明显大于 GDF-15、CRP 单指标诊断 (Z 值分别为 2.930、3.020, 均 $P < 0.05$), 而与 FAHD1、PCT 单指标诊断差异无统计学意义 (Z 值分别为 1.817、1.100, 均 $P > 0.05$)。



注: PCT 为降钙素原, FAHD1 为延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白 1, CRP 为 C-反应蛋白, GDF-15 为生长与分化因子 15, ROC 曲线为受试者工作特征曲线

图 1 4 个血清指标单独及联合对脓毒症诊断的 ROC 曲线

表 5 4 个血清指标单独及联合对脓毒症的诊断效能

指标	AUC	95%CI	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)
FAHD1	0.727	0.641 ~ 0.802	>3.55	61.11	77.19
GDF-15	0.677	0.588 ~ 0.757	>6.08	65.75	64.91
PCT	0.767	0.683 ~ 0.837	>1.04	78.08	70.91
CRP	0.680	0.591 ~ 0.760	>115.59	64.38	73.68
四指标联合	0.809	0.730 ~ 0.874	>0.546 8	75.00	80.00

注: FAHD1 为延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶结构域含蛋白 1, GDF-15 为生长与分化因子 15, PCT 为降钙素原, CRP 为 C-反应蛋白, AUC 为受试者工作特征曲线下面积, 95%CI 为 95% 可信区间

3 讨论

本研究对 56 例非脓毒症及 76 例脓毒症患者的临床信息分析显示, 脓症患者表现出心率加快, MAP、PLT、PaO₂ 显著降低, DBil、SCr、PCT、CRP 以及 APACHE II 和 SOFA 评分显著升高。同时本研究结果显示, 前期通过蛋白组学筛选出的血清线粒体相关蛋白 FAHD1、GDF-15 水平在脓症患者中均显著升高; 单因素和多因素 Logistic 回归均显示, 血清 FAHD1 和 GDF-15 是脓毒症诊断的风险因素。

线粒体功能障碍是脓毒症发生发展的重要病理特征之一。脓毒症时由于细胞因子、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的过度产生而直接或间接地抑制某些酶和呼吸链复合物, 导致电子传递系统受阻, 引起线粒体功能障碍; 同时, 线粒体功能障碍也进一步加速器官供氧障碍、抗氧化保护系统衰竭等, 造成脓毒症局部缺氧加重^[8]。那么, 线粒体相关蛋白能否成为脓毒症诊断的潜在标志物呢?

FAHD1 是 2011 年被发现并鉴定的一种线粒体蛋白, 是延胡索酰乙酰乙酸酯水解酶超家族中的成员, 具有酰基丙酮酸水解酶和草酰乙酸脱羧酶活性^[9-10]。在人体正常细胞、未转化细胞和肿瘤细胞株中均可检测到 FAHD1 表达, 其定位于线粒体, 但表达量不同^[11]。沉默人细胞中 Fahd1 基因表达会影响线粒体电子传递系统的活性, 线粒体氧化磷酸化速率显著降低, 并导致细胞早衰样生长停滞^[12-13]。FAHD1 蛋白异常也会影响内皮细胞功能^[12], 而内皮细胞的损伤与脓毒症的发生发展具有重要作用^[14]。我们通过 iTRAQ-2DLC-MS/MS 技术对脓毒症血清标志物进行分析, 发现线粒体相关蛋白 FAHD1 显著增高。本研究进一步增加样本量通过 ELISA 验证, 结果显示, 脓毒症组血清 FAHD1 水平显著高于非脓毒症组, 推测脓毒症时细胞线粒体受损, 线粒体相关蛋白 FAHD1 释放入血, 血清中 FAHD1 含量增加; 同时, 细胞内行使功能的线粒体蛋白受损, 组织细胞功能障碍, 加速脓毒症的发生, 但具体机制仍有待进一步研究。

本研究中同时检测了血清中另一种线粒体相关蛋白 GDF-15。GDF-15 是转化生长因子-β 超家族的成员, 在人体中, GDF-15 主要在胎盘中表达, 在肾、肝、肺、胰腺和前列腺中表达水平较低, 但在炎症、肿瘤、心血管疾病、肾脏等疾病中 GDF-15 表达上调^[15-16]。近年来, 线粒体损伤而导致的多系统受累患者血清 GDF-15 水平增高^[17], GDF-15 已被确定为潜在的线粒体疾病相关生物学标志物^[18]。本研究结果显示, GDF-15 水平在脓毒症组显著高于非脓毒症组。有研究显示, 在内毒素诱导的脓毒症小鼠模型中, GDF-15 缺乏可以增强炎症反应, 加重脓毒症小鼠的肾脏和心脏损伤; 而过表达 GDF-15 可以起到保护肾脏和心脏的作用^[19]。

本研究中还检测了感染相关指标 PCT、CRP 的水平, 二者常用于脓毒症的辅助诊断中^[4-6], 且学者

们仍在不断发掘它们在脓毒症诊断及预测中的价值^[20-22]。血清 PCT、CRP 水平与线粒体相关蛋白 FAHD1、GDF-15 水平表现出相似的变化趋势,在脓毒症组均显著增高。ROC 曲线分析显示,诊断脓毒症的 AUC 由高到低依次为 PCT、FAHD1、CRP 和 GDF-15;其中 FAHD1 具有较高的特异度(77.19%),PCT 具有较高的敏感度(78.08%);在脓毒症诊断中,线粒体相关蛋白 FAHD1、GDF-15 的 AUC 分别与经典感染标志物 PCT 或 CRP 比较差异均未见统计学意义。FAHD1、GDF-15、PCT、CRP 4 个指标联合诊断脓毒症的 AUC 最大,为 0.809,敏感度为 75.00%,特异度为 80.00%。四指标联合的 AUC 明显大于 GDF-15 或 CRP 单指标诊断,但与 FAHD1 或 PCT 单指标诊断的 AUC 差异未见统计学意义。

综上所述,线粒体相关蛋白 FAHD1 和 GDF-15 在脓毒症患者中显著升高,参与脓毒症的发生发展;FAHD1、GDF-15 与经典指标 PCT、CRP 联合对脓毒症的诊断效能会进一步提高,为线粒体相关蛋白 FAHD1 和 GDF-15 成为潜在的脓毒症诊断标志物提供试验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193 (3): 259-272. DOI: 10.1164/rccm.201504-0781OC.
- [2] 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.
- [3] Grondman I, Pirvu A, Riza A, et al. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48 (1): 1-14. DOI: 10.1042/BST20190029.
- [4] 赵梦雅, 段美丽. 血乳酸和乳酸清除率与降钙素原联合检测对脓毒症患者病情严重程度及预后评估的临床意义 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (4): 449-453. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200129-00086.
Zhao MY, Duan ML. Lactic acid, lactate clearance and procalcitonin in assessing the severity and predicting prognosis in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2020, 32 (4): 449-453. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200129-00086.
- [5] Neeser O, Branche A, Mueller B, et al. How to: implement procalcitonin testing in my practice [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25 (10): 1226-1230. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.12.028.
- [6] Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66 Suppl 2: ii33-40. DOI: 10.1093/jac/dkq523.
- [7] Supinski GS, Schroder EA, Callahan LA. Mitochondria and critical illness [J]. *Chest*, 2020, 157 (2): 310-322. DOI: 10.1016/j.chest.2019.08.2182.
- [8] Zhong J, Tan Y, Lu J, et al. Therapeutic contribution of melatonin to the treatment of septic cardiomyopathy: a novel mechanism linking Ripk3-modified mitochondrial performance and endoplasmic reticulum function [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101287. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101287.
- [9] Weiss A, Holzkecht M, Cappuccio E, et al. Expression, purification, crystallization, and enzyme assays of fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing proteins [J]. *J Vis Exp*, 2019 (148): 10.3791/59729. DOI: 10.3791/59729.
- [10] Pircher H, von Grafenstein S, Diener T, et al. Identification of FAH domain-containing protein 1 (FAHD1) as oxaloacetate decarboxylase [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (11): 6755-6762. DOI: 10.1074/jbc.M114.609305.
- [11] Pircher H, Straganz GD, Ehehalt D, et al. Identification of human fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1 (FAHD1) as a novel mitochondrial acylpyruvase [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (42): 36500-36508. DOI: 10.1074/jbc.M111.264770.
- [12] Petit M, Koziel R, Etemad S, et al. Depletion of oxaloacetate decarboxylase FAHD1 inhibits mitochondrial electron transport and induces cellular senescence in human endothelial cells [J]. *Exp Gerontol*, 2017, 92: 7-12. DOI: 10.1016/j.exger.2017.03.004.
- [13] Etemad S, Petit M, Weiss AKH, et al. Oxaloacetate decarboxylase FAHD1: a new regulator of mitochondrial function and senescence [J]. *Mech Ageing Dev*, 2019, 177: 22-29. DOI: 10.1016/j.mad.2018.07.007.
- [14] Levi M, van der Poll T. Endothelial injury in sepsis [J]. *Intensive Care Med*, 2013, 39 (10): 1839-1842. DOI: 10.1007/s00134-013-3054-1.
- [15] 李平珍, 张永, 谭锋. 生长分化因子 15 在老年不稳定性心绞痛患者中的表达和预测作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2020, 22 (7): 718-721. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2020.07.012.
Li PZ, Zhang Y, Tan F. Expression of GDF-15 and its value in predicting UAP in the elderly [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2020, 22 (7): 718-721. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2020.07.012.
- [16] Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 951. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00951.
- [17] Lovadi E, Csereklyei M, Merkli H, et al. Elevated FGF 21 in myotonic dystrophy type 1 and mitochondrial diseases [J]. *Muscle Nerve*, 2017, 55 (4): 564-569. DOI: 10.1002/mus.25364.
- [18] Kalko SG, Paco S, Jou C, et al. Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 91. DOI: 10.1186/1471-2164-15-91.
- [19] Abulizi P, Loganathan N, Zhao D, et al. Growth differentiation factor-15 deficiency augments inflammatory response and exacerbates septic heart and renal injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 1037. DOI: 10.1038/s41598-017-00902-5.
- [20] 覃小兰, 郭权来, 刘云涛, 等. 降钙素原及 C-反应蛋白联合序贯器官衰竭评分对肺部感染致脓毒症老年患者预后的评估价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (5): 562-565. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.05.008.
Qin XL, Guo QL, Liu YT, et al. Prognostic value of procalcitonin and C-reactive protein combined with sequential organ failure assessment score in elderly patients with sepsis induced by pulmonary infection [J]. *Chin Crit Care Med*, 2019, 31 (5): 562-565. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.05.008.
- [21] 颜磊磊, 蔡国龙, 胡才宝, 等. 降钙素原清除率对老年严重脓毒症/脓毒性休克预后的预测价值 [J]. *浙江医学*, 2017, 39 (9): 708-712. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.9.2017-638.
Yan ML, Cai GL, Hu CB, et al. PCT clearance rate as an outcome predictor for elderly septic patients [J]. *Zhejiang Med J*, 2017, 39 (9): 708-712. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.9.2017-638.
- [22] 杨军英, 赵建军, 雷罗春, 等. 降钙素原联合 APACHE II 评分预测老年脓毒症患者预后的价值 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2019, 26 (1): 34-37. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.01.009.
Yang JY, Zhao JJ, Lei LC, et al. Significance of using procalcitonin combined with acute physiology and chronic health evaluation II score to estimate prognosis of elderly patients with sepsis [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2019, 26 (1): 34-37. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.01.009.