

脓毒症外源性 ARDS 关键基因及信号通路的转录组学分析

谢永鹏 骆继业 王言理 胡文霞 芦雨 张倩 李小民

连云港市第一人民医院急危重症医学部, 连云港市急诊医学研究所, 江苏连云港 222000

通信作者: 李小民, Email: lyglxm1@163.com

【摘要】 目的 分析脓毒症外源性急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 大鼠的差异表达基因 (DEG), 从转录组水平探讨脓毒症 ARDS 的早期诊断及防护机制。方法 将 12 只 6~8 周龄雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为脂多糖 (LPS) 致脓毒症 ARDS 模型组 (模型组, 腹腔注射 LPS 15 mg/kg) 与对照组 (腹腔注射等量生理盐水), 每组 6 只。分别提取两组大鼠左肺组织 RNA, 采用 illumina Hiseq 测序平台的双端测序模式进行高通量测序。采用 DESeq2 软件以 $|\log_2$ 差异倍数 (FC) $|\geq 3$ 且 $P < 0.001$ 筛选 DEG。对 DEG 进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书数据库 (KEGG) 通路富集分析。使用 STRING 在线数据库和 CytoScape 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络并筛选关键基因。分离并提取 2021 年 3 月至 11 月连云港市第一人民医院急危重症医学部收治的 20 例脓毒症患者及 20 例年龄匹配的同期健康体检者的外周血单个核细胞 (PBMC), 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 对关键基因进行验证。结果 共筛选出 DEG 286 个, 其中上调基因 202 个, 下调基因 84 个。GO 富集分析表明, DEG 主要参与了中性粒细胞趋化迁移、抗菌体液反应、宿主免疫应答及体液免疫反应等生物学过程; KEGG 富集分析显示, DEG 主要通过参与白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路及趋化因子信号通路发挥生物学作用。PPI 分析共筛选出节点蛋白 262 个, 相互作用关系 852 条边; 筛选出前 15 位关键基因, 分别为 IL-6、TNF、IL-10、IL-1 β 、CXC 趋化因子配体 1 (CXCL1)、CXCL10、CXC 趋化因子受体 3 (CXCR3)、CXCR2、CXCL9、CC 趋化因子配体 7 (CCL7)、CXCL11、CCL1、CXCL13、CCL12、CCL22。采用 RT-qPCR 对脓毒症 ARDS 患者与健康对照者 PBMC 进行差异基因测序验证, 结果显示, 脓毒症患者 5 个代表性关键基因表达明显高于健康对照者 [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.803 ± 1.081 比 0.951 ± 0.359 , TNF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.376 ± 0.799 比 1.150 ± 0.504 , CXCL10 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.500 ± 0.815 比 1.107 ± 0.515 , CXCR3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.655 ± 0.628 比 0.720 ± 0.388 , CCL22 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.804 ± 0.878 比 1.010 ± 0.850 , 均 $P < 0.05$], 与 RNA 测序结果一致。结论 炎症细胞趋化迁移脱颗粒、细胞因子免疫应答反应等生物学过程和 CXCL10/CXCR3、IL-17 等信号通路在脓毒症外源性 ARDS 发生发展过程中起着重要的作用, 可作为进一步研究肺损伤机制和临床防治的新思路及新靶点。

【关键词】 脓毒症; 急性呼吸窘迫综合征; 转录组学; 生物信息学; 关键基因

基金项目: 江苏省科技厅社会发展面上项目 (BE2020670); 江苏省卫生健康委科研项目 (H2019109); 江苏省连云港市卫生健康委青年科研项目 (QN1804)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211223-01914

Transcriptomics analysis of key genes and signaling pathways in sepsis-related exogenous acute respiratory distress syndrome

Xie Yongpeng, Luo Jiye, Wang Yanli, Hu Wenxia, Lu Yu, Zhang Qian, Li Xiaomin

Department of Emergency and Critical Care Medicine, the First People's Hospital of Lianyungang, the Institute of Emergency Medicine of Lianyungang, Lianyungang 222000, Jiangsu, China

Corresponding author: Li Xiaomin, Email: lyglxm1@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the differentially expressed gene (DEG) in rats with sepsis-induced exogenous acute respiratory distress syndrome (ARDS) and explore the early diagnosis and protective mechanism of sepsis-induced ARDS at the transcriptome level. **Methods** Twelve 6 to 8 weeks old male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into lipopolysaccharide (LPS) induced sepsis-induced ARDS model group (model group, intraperitoneal injection of LPS 15 mg/kg) and control group (intraperitoneal injection of the same volume of normal saline), with 6 rats in each group. RNA was extracted from the left lung tissue of the two groups, and the paired-end sequencing mode of the illumina Hiseq sequencing platform was used for high-throughput sequencing. The DESeq2 software was used to screen DEG with $|\log_2$ (fold change, FC) $|\geq 3$ and $P < 0.001$. Gene ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on DEG. STRING and CytoScape software were used to construct a protein-protein interaction (PPI) network and screen key genes. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of 20 septic patients admitted to the emergency and critical care medical department of Lianyungang First People's Hospital from March to November 2021 and 20 age-matched healthy people in the same period were isolated and extracted, and the key genes were verified by real-time fluorescent quantitative

polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** A total of 286 DEG were screened, including 202 up-regulated genes and 84 down-regulated genes. GO enrichment analysis showed that DEG was mainly involved in biological processes such as neutrophil chemotaxis migration, antibacterial humoral response, host immune response, and humoral immune response. KEGG analysis showed that DEG mainly played a biological role through interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, and chemokine signaling pathway. In PPI analysis, a total of 262 node proteins were screened, and the interaction relationship was 852 edges. The first 15 key genes were IL-6, TNF, IL-10, IL-1 β , chemokine ligand 1 (CXCL1), CXCL10, chemokine receptor 3 (CXCR3), CXCR2, CXCL9, chemokine ligand 7 (CCL7), CXCL11, CCL1, CXCL13, CCL12, and CCL22. Five representative key genes were performed on PBMC of blood samples from septic ARDS patients and healthy controls by RT-qPCR. The results showed that their expression was significantly higher than that in the healthy controls [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.803 ± 1.081 vs. 0.951 ± 0.359 , TNF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.376 ± 0.799 vs. 1.150 ± 0.504 , CXCL10 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.500 ± 0.815 vs. 1.107 ± 0.515 , CXCR3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.655 ± 0.628 vs. 0.720 ± 0.388 , CCL22 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.804 ± 0.878 vs. 1.010 ± 0.850 , all $P < 0.05$], and the trends were consistent with the RNA-Seq results. **Conclusion** Biological processes such as chemotactic migration and degranulation of inflammatory cells, cytokine immune response, and signal pathways such as CXCL10/CXCR3 and IL-17 play important roles in the occurrence and development of sepsis-related exogenous ARDS, which would provide new ideas and targets for further study of lung injury mechanisms and clinical prevention and treatment.

【Key words】 Sepsis; Acute respiratory distress syndrome; Transcriptomics; Bioinformatics; Key gene

Fund program: Social Development Project of Department of Science and Technology of Jiangsu Province (BE2020670); General Project of Jiangsu Provincial Health Commission (H2019109); Youth Project of Lianyungang Health Commission of Jiangsu Province (QN1804)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20211223-01914

目前,脓毒症仍是全球性医学难题,全球发病率大约为 437/10 万,患病人数高达 3 150 万,占全球总人口的 0.44%,年死亡人数约为 530 万^[1]。2021 年国际指南将脓毒症定义为机体对感染反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍,而肺脏是最早且最易受累的器官之一^[2],临床大多表现为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),是重症医学领域最常见的急危重症之一^[3-4]。国际流行病学研究显示,脓毒症患者 ARDS 的发生率达 40% 以上^[5]。尽管近 20 年来对 ARDS 病理生理的理解与治疗均已取得重大进展,但对脓毒症导致 ARDS 的机制尚未完全明确^[6],且仍无特异性生物标志物及有效的防治靶点^[7]。RNA 测序(RNA-sequencing, RNA-Seq)是近年来发展较成熟的高通量测序技术,并且具有快捷分析、高分辨率等优势。本研究拟采用 RNA-Seq 技术观察脓毒症外源性 ARDS 亚型大鼠基因表达,筛选脓毒症状态下外源因素导致 ARDS 过程中的关键基因及信号通路,为阐明脓毒症外源型 ARDS 机制、探索防治靶点及寻找相对特异性标志物提供一定思路。

1 材料与方法

1.1 伦理学: 本研究中临床及动物实验过程均严格遵守医学伦理学及动物伦理学规范要求,已通过连云港市第一人民医院医学伦理委员会审批(审批号: KY-20200311001)。

1.2 转录组学分析

1.2.1 实验动物及分组: 12 只健康清洁级雄性 SD

大鼠, 6~8 周龄,体质量 230~250 g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,动物许可证号: SCXK(辽)2020-0001,动物合格证号: 210726210100856072。按照随机数字表法将大鼠分为对照组和脓毒症 ARDS 模型组(模型组),每组 6 只。通过腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 15 mg/kg 建立脓毒症 ARDS 模型;对照组给予等量生理盐水。

1.2.2 肺组织病理学观察: 制模后 36 h 所有大鼠腹腔注射甲苯噻嗪 8 mg/kg 和氯胺酮 80 mg/kg 麻醉,效果满意后经心脏穿刺放血处死大鼠,并收集标本备检。取大鼠右肺上叶,乙醇脱水,石蜡包埋、切片,光镜下观察肺组织损伤情况。

1.2.3 肺组织总 RNA 提取: 采用柱式法提取大鼠左肺总 RNA,分别采用超微量分光光度计及生物分析仪检测 RNA 样本的纯度和 RNA 完整系数等,以确保 RNA 质量能满足后续测序要求。

1.2.4 文库构建及测序: 提取总 RNA,富集 mRNA,将 RNA 片段化,反转录合成 cDNA 并进行末端修复,连接产物通过特异的引物进行桥式聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,建立测序用 cDNA 文库。文库构建成功后,应用 illumina Hiseq 平台(美国 Illumination 公司)进行高通量测序。

1.2.5 数据处理及分析: 利用 Skewer 软件(v0.2.2 版本)对测序数据从 3' 端动态去除接头序列片段和低质量片段,利用 FastQC 软件(v0.11.5 版本)对预处理数据进行质量控制分析,并针对每个样本利用 STAR 软件将预处理序列与测序物种的参考基因组

序列进行序列比对。用 DESeq2 软件(R4.1.2 版本), 以 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) $|\geq 3$ 且 $P < 0.001$ 为标准筛选出差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)。应用 R 软件(3.6.3 版本)进行统计学分析与可视化, 绘制火山图及热图以直观体现两组基因表达水平差异。对 DEG 采用 TopGO 软件进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析, 对 DEG 进行功能注释和分类。将 DEG 导入 STRING 在线数据库并进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, PPI 网络图中综合得分 > 0.7 的蛋白具有统计学意义, 利用 CytoScape 软件(3.9.1 版本)的 cytoHubba 插件筛选出最有意义的前 15 位关键基因。

1.3 验证试验

1.3.1 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR): 选取差异表达明显的 DEG 进行 RT-qPCR 验证。分离并提取 2021 年 3 月至 11 月连云港市第一人民医院急危重症医学部收治的 20 例脓毒症 ARDS 患者以及 20 例年龄匹配的同期健康体检者的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。提取 PBMC 总 RNA, 经反转录得到相应的 cDNA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因, 应用 PCR 仪进行扩增, 检测基因表达水平。反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, 45 个循环。基因引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司设计并合成。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因表达量。

1.3.2 统计学方法: 采用 R 软件(3.6.3 版本)进行统计学分析, 采用 R 软件 ggplot2 包(3.3.3 版本)制作可视化图。计量资料均符合正态分布, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 Student-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组学分析结果

2.1.1 脓毒症肺损伤病理学改变 (图 1): 光镜下观察大鼠肺组织病理学改变, 结果显示, 对照组肺组织均未见明显病理学改变; 而模型组大鼠制模后 36 h 肺组织出现较为严重的病理损伤, 表现为弥漫性肺泡损伤, 可见肺泡腔和间质内充血水肿、炎症细胞浸润、肺不张、透明膜形成等。

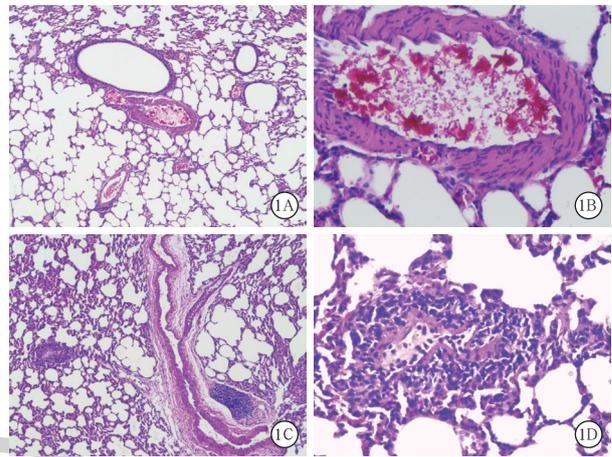


图 1 光镜下观察两组大鼠肺组织病理学改变 对照组肺泡组织 (A, 低倍放大) 和肺动脉血管组织 (B, 中倍放大) 均无明显异常。脓毒症急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 模型组肺间质增厚, 炎症细胞浸润 (C, 低倍放大); 肺动脉血管平滑肌炎症细胞浸润, 呈血管炎表现 (D, 中倍放大) HE 染色

2.1.2 肺组织 RNA 提取及质量控制: 两组样本所提取 RNA 总量 $> 0.2\text{ }\mu\text{g}$, 各样本数据具有较好的对称性, 分布的分散程度质量符合要求, 并且 RNA 纯度较高, 完整性良好, 符合建库标准 (图 2A)。为评估组内数据的可重复性进行了主成分分析 (principal component analysis, PCA), 通过降维方式观察样本间的相似程度, 结果显示 (图 2B), 对照组基因表达高度一致, 模型组基因表达趋势一致性较强; 同时, 样本相关系数聚类分析显示 (图 2C), 两组大鼠 mRNA 转录组数据之间相关性良好。

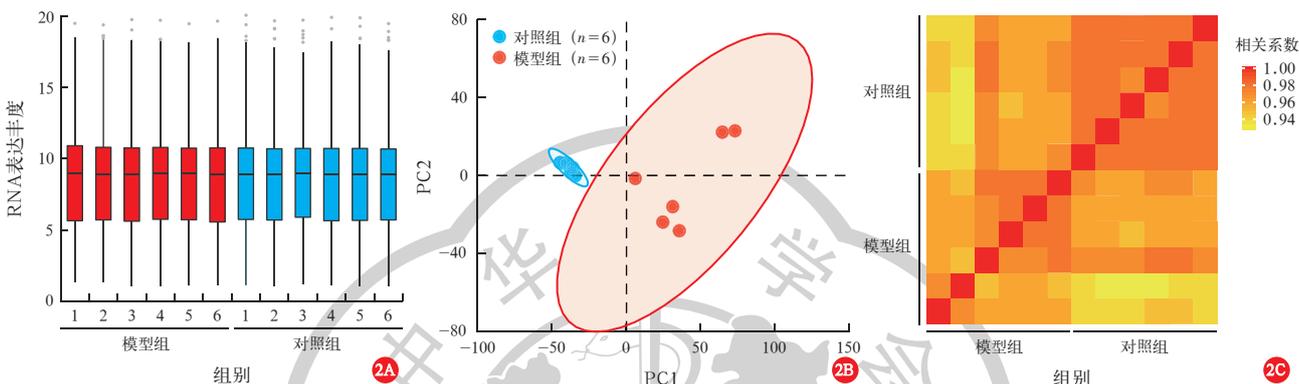
2.1.3 DEG 鉴定: 利用 DESeq2 软件(R4.1.2 版本)筛选出两组 DEG, 去掉空值后的 DEG 总数为 2 857 个。根据不同筛选条件设置方案筛选出两组之间的主要 DEG: ① $|\log_2\text{FC}| \geq 2$ 且 $P < 0.001$: 经鉴定, 模型组与对照组比较有 644 个 DEG, 其中 389 个上调基因, 255 个下调基因 (图 3A); ② $|\log_2\text{FC}| \geq 3$ 且 $P < 0.001$: 使用欧氏距离聚类分析显示, 模型组与对照组比较有 286 个 DEG, 其中 202 个上调基因, 84 个下调基因, 可视化热图见图 3B。

2.1.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 (表 1; 图 4): 对 286 个 DEG 的 GO 功能及 KEGG 通路进行富集分析表明, 在满足校正 P 值 < 0.01 且 q 值 < 0.2 的条件下, 生物过程共有 590 条, 细胞组分共有 4 条, 分子功能共有 45 条。DEG 参与的生物过程主要有中性粒细胞趋化迁移、抗菌体液反应, 同时在宿主免疫应答、体液免疫反应及肥大细胞趋化脱颗粒中发挥关键作用。在细胞组分中, DEG 主要富集于细胞外基质、质膜外侧、分泌颗粒及血小板 α 颗粒等细

胞器中。对于分子功能, DEG 在细胞因子活性、趋化因子活性、受体调节活性、趋化因子受体结合及受体配体活性方面显著富集。KEGG 通路富集结果表明,在模型组显著富集的信号通路有 33 条, DEG 主要参与了细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互作用、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、肿瘤坏死

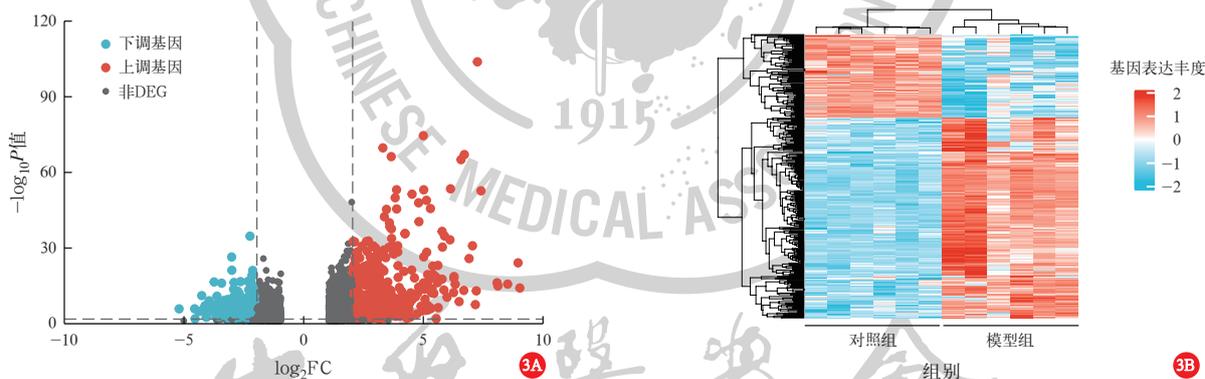
因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路及趋化因子信号通路等的生物学过程。

2.1.5 PPI分析:将筛选出的286个DEG导入STRING 在线数据库,绘制 PPI 网络图,初步筛选出 262 个节点蛋白, 852 条相互作用边数 (预期边数为 123 条), 平均节点度为 6.5, 平均局部聚类系数为 0.449, 富集 P 值 < 0.001 。选择相关系数 > 0.9 的节点蛋白再次



注: A 为两组肺组织 RNA 表达丰度图,提示各样本数据具有较好的对称性,分布的分散程度质量符合要求; B 为两组肺组织样本主成分分析 (PCA) 图, PC1、PC2 表示选定的主成分,样本间距离越近,说明基因表达趋势相似性越高; C 为两组肺组织样本相关系数矩阵热图,不同颜色代表相关系数,颜色越深,相关系数越接近于 1,说明各样本间相关性就越强

图 2 对照组与脓毒症急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 模型组 (模型组) 大鼠肺组织整体基因表达水平比较分析



注: 火山图中差异表达基因 (DEG) 筛选条件为 $|\log_2$ 差异倍数 (FC) ≥ 2 且 $P < 0.001$, 共筛选出 644 个 DEG。热图中 DEG 筛选条件为 $|\log_2$ FC ≥ 3 且 $P < 0.001$, 共筛选出 286 个 DEG, 其中红色代表上调,蓝色代表下调; 颜色越深,说明基因表达丰度越高

图 3 对照组与脓毒症急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 模型组 (模型组) 大鼠肺组织 DEG 火山图 (A) 及热图 (B)

表 1 对照组与脓毒症急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 模型组大鼠肺组织 DEG 的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

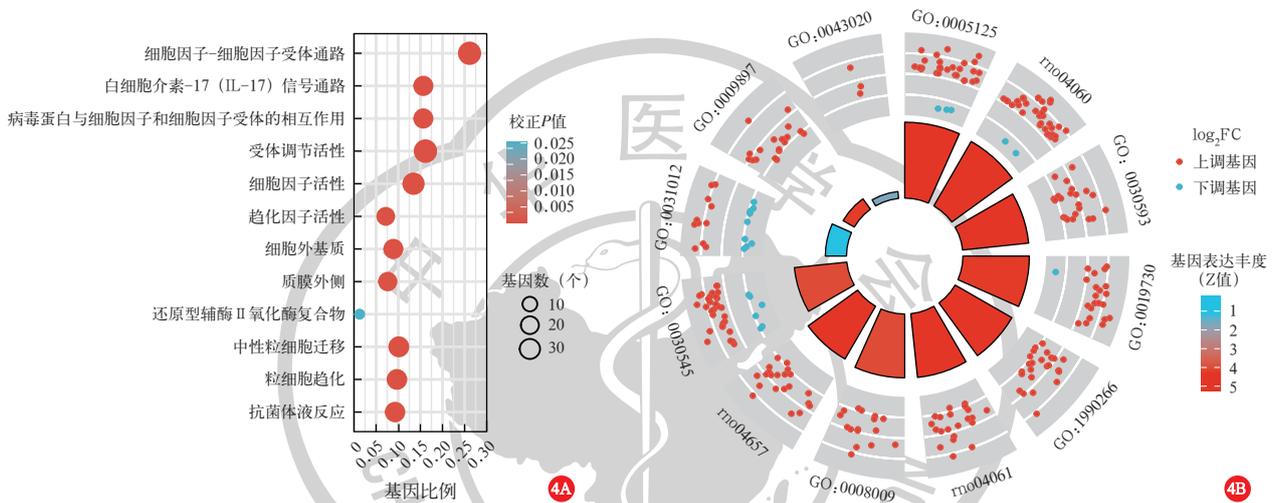
功能分类	编号	功能	基因数 (个)	校正 P 值	q 值	功能分类或通路	编号	功能或通路	基因数 (个)	校正 P 值	q 值
GO 功能						分子功能	GO:0005125	细胞因子活性	30	3.26×10^{-22}	2.71×10^{-22}
生物过程	GO:0030593	中性粒细胞趋化性	23	2.18×10^{-19}	1.57×10^{-19}		GO:0008009	趋化因子活性	16	9.86×10^{-19}	8.21×10^{-19}
	GO:1990266	中性粒细胞迁移	24	3.91×10^{-19}	2.82×10^{-19}		GO:0030545	受体调节活性	36	1.76×10^{-15}	1.46×10^{-15}
	GO:0071621	粒细胞趋化性	23	1.16×10^{-17}	8.35×10^{-18}		GO:0042379	趋化因子受体结合	16	1.76×10^{-15}	1.46×10^{-15}
	GO:0006959	体液免疫反应	27	1.34×10^{-17}	9.68×10^{-18}	KEGG	rn004060	细胞因子-细胞因子受体通路	35	8.73×10^{-22}	6.83×10^{-22}
细胞组分	GO:0031012	细胞外基质	21	2.14×10^{-6}	2.05×10^{-6}		rn004657	IL-17 信号通路	21	6.73×10^{-18}	5.27×10^{-18}
	GO:0009897	质膜外侧	18	4.86×10^{-4}	4.66×10^{-4}		rn004668	TNF 信号通路	15	3.53×10^{-9}	2.77×10^{-9}
	GO:0030141	分泌颗粒	14	2.50×10^{-2}	2.40×10^{-2}		rn004062	趋化因子信号通路	17	3.40×10^{-8}	2.66×10^{-8}
	GO:0031091	血小板 α 颗粒	3	7.90×10^{-2}	7.60×10^{-2}						

注: DEG 为差异表达基因, GO 为基因本体, KEGG 为京都基因与基因组百科全书数据库, IL-17 为白细胞介素-17, TNF 为肿瘤坏死因子

绘制 PPI 网络图发现(图 5A),该 PPI 网络较预期有更多的相互作用关系,这种富集现象也说明差异蛋白组在脓毒症 ARDS 发生发展过程中可能作为一个整体来发挥生物学活性,并在功能上存在着明确的相互关联性。应用 CytoScape 插件 cytoHubba 筛选出度值 >10 且度值最高的最有意义前 15 位关键基因(图 5B)。

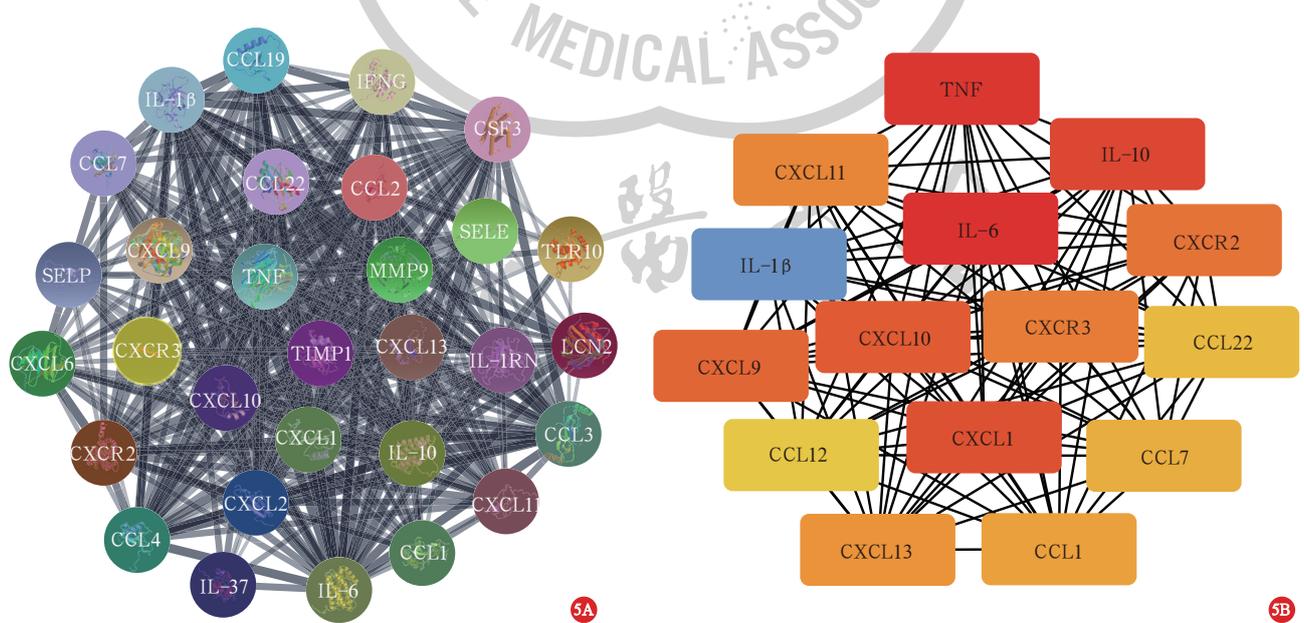
2.2 RT-qPCR 验证分析:从前 15 位关键基因中挑选出 IL-6、TNF、CXC 趋化因子配体 10(chemokine

ligand 10,CXCL10)、CXC 趋化因子受体 3(chemokine receptor 3,CXCR3)、CC 趋化因子配体 22(chemokine ligand 22, CCL22)作为关键基因,对其在大鼠肺脏组织中的表达进行分析,结果显示(图 6A),模型组大鼠肺组织中 5 个关键基因表达均显著高于对照组(均 $P < 0.01$)。采用 RT-qPCR 对 20 例脓毒症 ARDS 患者及 20 例健康对照者 PBMC 进行 DEG 测序验证,结果显示(图 6B),上述 5 个关键基因的表达趋势与 RNA-Seq 结果一致。



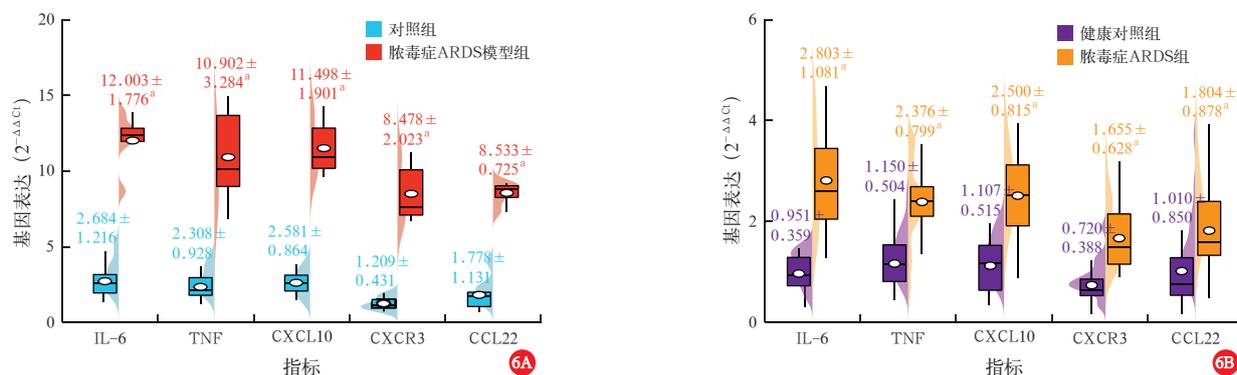
注:A为差异表达基因(DEG)生物过程、细胞组分和分子功能分布气泡图。B为不同基因本体/京都基因与基因组百科全书数据库(GO/KEGG)联合log₂差异倍数(FC)进行功能富集中DEG分布;圆心周围不同颜色代表基因表达丰度,颜色越深,说明丰度就越高

图4 对照组与脓毒症急性呼吸窘迫综合征(ARDS)模型组(模型组)大鼠肺组织DEG的GO功能及DEGG通路富集分析



注:DEG为差异表达基因,PPI为蛋白质-蛋白质相互作用,IL为白细胞介素,CCL为CC趋化因子配体,IFNG为可溶性细胞因子,CSF3为集落刺激因子3,SEL为选择蛋白,CXCL为CXC趋化因子配体,TNF为肿瘤坏死因子,MMP9为基质金属蛋白酶9,TLR10为Toll样受体10,CXCR为CXC趋化因子受体,TIMP1为组织金属蛋白酶抑制因子1,IL-1RN为白细胞介素-1受体拮抗因子,LCN2为脂质运载蛋白2

图5 对照组与脓毒症急性呼吸窘迫综合征(ARDS)模型组(模型组)大鼠肺组织DEG的PPI网络图(A)及前15位关键基因的自网络分析图(B)



注: ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, PBMC 为外周血单个核细胞, IL-6 为白细胞介素-6, TNF 为肿瘤坏死因子, CXCL10 为 CXCL 趋化因子配体 10, CXCR3 为 CXCL 趋化因子受体 3, CCL22 为 CC 趋化因子配体 22; 与对照组或健康对照组比较, ^a $P < 0.01$

图 6 脓毒症 ARDS 大鼠肺组织(A)及脓毒症 ARDS 患者 PBMC(B)中关键基因表达分析

3 讨论

众所周知,虽然目前对于脓毒症及 ARDS 均有不断更新的国际指南作为临床诊疗依据,但对于指南的应用及解读有时仍令临床医生难以适从,原因在于这类综合征的概念过于广泛^[8]。因此,在脓毒症及 ARDS 等危重疾病综合征中定义同质亚群是当前急危重症领域的研究热点。随着认识的逐步深入,人们也逐渐发现,各危重症亚群在临床特征(表型)或与分子机制相关的治疗反应(内生型)和(或)预后风险(预后)等方面均存在着较大的差异^[9]。已有临床研究表明,脓毒症 ARDS 表型患者的病情较非脓毒症相关 ARDS 患者更严重,肺损伤恢复能力更差,拔管成功率更低,近期病死率更高,远期预后也不佳^[10]。因此,对于脓毒症 ARDS 患者的早期有效防治尤为重要^[11]。然而,由于脓毒症外源性 ARDS 的发生机制复杂多样,尽管目前对其研究较多,但确切机制尚未完全明确,同样也缺乏相对有效的治疗手段及早期预警生物标志物。基于此,本研究以转录组学为切入点,从动物及临床水平探讨脓毒症外源性 ARDS 这一特殊但常见亚型发病过程中的关键基因和信号通路,探索肺损伤机制,以期寻找预防及治疗靶点。

本研究中通过腹腔注射 LPS 建立脓毒症大鼠模型,并根据大鼠呼吸窘迫症状、氧合指数及肺组织病理学改变确定合并 ARDS,该疾病模型完全符合临床常见的脓毒症外源性 ARDS 患者病情及病理学改变^[12]。本研究在对大鼠肺组织病理学改变的观察中发现,模型组出现较严重的病理损伤,表现为弥漫性肺泡损伤,可见肺泡腔和间质内充血水肿、肺不张、透明膜形成等,并且在肺泡、支气管尤其是肺部

小动脉周围存在显著的炎症细胞浸润。

本研究采用 RNA-Seq 技术全面分析了脓毒症外源性 ARDS 大鼠肺组织的转录组学,通过设定筛选条件获得了与外源性 ARDS 相关的 286 个 DEG,其中 202 个上调基因,84 个下调基因,对其进行 GO 功能及 KEGG 信号通路富集分析发现,中性粒细胞等炎症细胞的趋化迁移、宿主免疫应答及体液免疫反应在脓毒症外源性 ARDS 生物学过程中发挥了关键作用;而 DEG 的细胞定位集中在细胞外基质、质膜外侧、分泌颗粒、血小板 α 颗粒等主要参与炎症细胞趋化颗粒释放及炎症免疫反应的细胞成分中。DEG 通过转录蛋白发挥趋化因子活性,与趋化因子受体相结合,进一步介导炎症细胞在肺泡、支气管周围、肺动脉及肺部毛细血管周围侵袭浸润,通过自分泌、旁分泌及脱颗粒过程释放炎症因子,发挥受体调节活性及受体配体活性,介导炎症“瀑布反应”^[13],导致肺泡上皮细胞损伤及肺部毛细内皮损伤,通透性改变,出现顽固性肺水肿、肺不张,从而导致顽固性低氧血症及呼吸窘迫症状^[14]。而在肺小动脉血管周围的大量炎症细胞浸润可导致血管平滑肌细胞水肿,纤维结缔组织炎性增生,同时因合并严重低氧血症,介导了 ARDS 急性肺动脉高压症的病理生理改变^[15]。本研究中 KEGG 通路富集分析结果表明,在模型组显著富集的信号通路有 33 条,DEG 主要参与了趋化因子信号通路、IL-17 信号通路及 TNF 信号通路的生物学过程。

本研究在对 286 个 DEG 进行的 PPI 分析中累计筛选出节点蛋白 262 个,相互作用关系 852 条边,平均节点度为 6.5,这种 DEG 间较强的相互作用富集现象也说明差异蛋白组在脓毒症 ARDS 发生发展

过程中可能作为一个整体发挥生物学活性,并且在功能上存在着明确的相互关联性。进一步分析筛选出的排名前 15 位的关键基因发现,其主要生物学活性均集中在两大类,即以 IL-6、TNF、IL-10 等为代表的炎症细胞因子类和以 CXCL10、CXCR3、CCL22 为代表的趋化因子类。在临床水平验证分析中,采用 RT-qPCR 对 ARDS 患者 PBMC 中 IL-6、TNF- α 、CXCL10、CXCR3 及 CCL22 基因表达水平进行定量分析,结果也得到了相同的趋势,证明 RNA-Seq 技术的可信度高,也表明未来阻断趋化因子信号通路,调节炎症细胞的肺组织特异性趋化可能是控制病因及呼吸支持治疗之外,减轻肺脏损伤的生物靶向治疗的研发方向。

CCL22 属于巨噬细胞源性趋化因子,主要由单核/巨噬细胞、中性粒细胞等外周免疫细胞分泌产生,在趋化诱使外周免疫细胞向受损的组织迁移并参与炎症反应中发挥了重要作用^[16]。CXCL10 又称干扰素诱导蛋白-10(interferon inducible protein-10, IP-10),属于 CXC 趋化因子亚家族^[17],主要由 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ) 刺激单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞等产生,可与其受体 CXCR3 结合,诱导中性粒细胞、T 淋巴细胞、肥大细胞、自然杀伤细胞等到炎症损伤部位,在机体免疫系统中发挥重要作用^[18-20]。本研究表明,CXCL10 和 CXCR3 表达水平在 LPS 诱导的脓毒症外源性 ARDS 大鼠肺组织中显著上调,CXCL10 能通过与 CXCR3 结合促进肺脏损伤发生发展进程。此外,在 ARDS 患者中 CXCL10 水平也明显升高^[21],并且不断增强的炎症反应促进了肺脏损伤的病情进展,因此提示 CXCL10/CXCR3 通路可能是预防和治理脓毒症外源性 ARDS 的重要研究方向。

4 结论

综上所述,炎症细胞趋化迁移脱颗粒和细胞因子免疫应答反应等生物学过程,以及 CXCL10/CXCR3、IL-17 等信号通路,在脓毒症外源性 ARDS 的发生发展过程中起着重要的作用,对其进一步深入研究有望为解释肺脏损伤发病机制和临床诊治提供新的思路及靶点。

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] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021 [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47 (11): 1181–1247. DOI: 10.1007/s00134-021-06506-y.

[3] Henderson WR, Chen L, Amato MBP, et al. Fifty years of research in ARDS. Respiratory mechanics in acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196 (7): 822–833. DOI: 10.1164/rccm.201612-2495CI.

[4] 吕向鹏,丛竹凯,李丹,等. α -肾上腺素能受体在脓毒症致 ARDS 中的作用机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (1): 83–87. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.01.016.

[5] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. The LUNG SAFE study: a presentation of the prevalence of ARDS according to the Berlin definition [J]. *Crit Care*, 2016, 20 (1): 268. DOI: 10.1186/s13054-016-1443-x.

[6] 周亮,谭利平. 线粒体 DNA 在脓毒症相关性 ALI/ARDS 发病机制中的作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (2): 253–256. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190905-00050.

[7] 张松,周媛,丁鹏,等. 急性呼吸窘迫综合征的临床及中医证候特点分析 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2019, 26 (5): 547–550. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.05.009.

[8] Shankar-Hari M, Wunsch H, Rowan K, et al. Reflections on critical care's past, present, and future [J]. *Crit Care Med*, 2021, 49 (11): 1855–1865. DOI: 10.1097/CCM.0000000000005246.

[9] Shankar-Hari M, Santhakumaran S, Prevost AT, et al. Defining phenotypes and treatment effect heterogeneity to inform acute respiratory distress syndrome and sepsis trials: secondary analyses of three RCTs [M]. Southampton (UK): NIHR Journals Library, 2021.

[10] Saha R, Assouline B, Mason G, et al. Impact of differences in acute respiratory distress syndrome randomised controlled trial inclusion and exclusion criteria: systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Anaesth*, 2021, 127 (1): 85–101. DOI: 10.1016/j.bja.2021.02.027.

[11] 中国医疗保健国际交流促进会急诊医学分会,中华医学会急诊医学分会,中国医师协会急诊医师分会,等. 中国脓毒症早期预防与阻断急诊专家共识 [J]. *中国急救医学*, 2020, 40 (7): 577–588. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2020.07.001.

[12] 谢永鹏,钱颖,刘克喜,等. ARDS 患者机械功与肺部超声评分的相关性以及二者对预后的评估价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (6): 704–708. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.009.

[13] van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis [J]. *Immunity*, 2021, 54 (11): 2450–2464. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.10.012.

[14] 吉春玲,周厚荣,杨秀林,等. 促血管生成素-2 在脓毒症合并 ARDS 患者中的作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2018, 25 (4): 342–345. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.04.002.

[15] Bos LDJ, Artigas A, Constantin JM, et al. Precision medicine in acute respiratory distress syndrome: workshop report and recommendations for future research [J]. *Eur Respir Rev*, 2021, 30 (159): 200317. DOI: 10.1183/16000617.0317-2020.

[16] Liu B, Lin YH, Yan JC, et al. Affinity-coupled CCL22 promotes positive selection in germinal centres [J]. *Nature*, 2021, 592 (7852): 133–137. DOI: 10.1038/s41586-021-03239-2.

[17] Ichikawa A, Kuba K, Morita M, et al. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187 (1): 65–77. DOI: 10.1164/rccm.201203-0580OC.

[18] Ju YY, Jiang M, Xu FF, et al. CXCL10 and CXCR3 in the trigeminal ganglion contribute to trigeminal neuropathic pain in mice [J]. *J Pain Res*, 2021, 14: 41–51. DOI: 10.2147/JPR.S288292.

[19] Koper OM, Kamińska J, Sawicki K, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27 (6): 849–856. DOI: 10.17219/acem/68846.

[20] Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation: a target for novel cancer therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 63: 40–47. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007.

[21] Xie YP, Liu KX, Luo JY, et al. Identification of DDX58 and CXCL10 as potential biomarkers in acute respiratory distress syndrome [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38 (12): 1444–1451. DOI: 10.1089/dna.2019.4968.

(收稿日期: 2021-12-23)