

肺部感染继发脓毒症差异基因的表达及生物信息学分析

刘刚¹ 刘颖¹ 陶浚玲¹ 李叶红¹ 王永强¹ 李世欣¹ 刘頔²

¹ 贵州医科大学附属医院重症医学科, 贵州贵阳 550004; ² 北京师范大学互联网发展研究院, 北京 100875

通信作者: 刘颖, Email: 2356831401@qq.com

【摘要】 目的 通过生物信息学分析筛选肺部感染继发脓毒症的关键基因, 为该疾病的基础研究提供理论依据, 并寻找理想的动物模型方案。**方法** ① 实验 1 (生物信息学分析): 利用基因表达数据库 (GEO) 筛选肺部感染继发脓毒症和多种脓毒症动物模型数据集, 利用 R 软件对各数据集进行基因差异分析, 差异基因进行基因本体 (GO) 分析和京都基因与基因组百科 (KEGG) 富集分析。肺部感染继发脓毒症数据集差异基因与临床症状进行相关性分析, 绘制差异基因与临床症状相关性热图, 利用加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 和蛋白-蛋白互作用网络 (PPIN) 分析进行聚类筛选核心基因和关键基因。② 实验 2 (脓毒症动物模型验证): 选择体质量 21~25 g 的雄性小鼠, 随机分为模型组和对照 (Sham) 组, 采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备小鼠脓毒症损伤模型, Sham 组仅需暴露盲肠。术后 24 h 处死小鼠取肺组织提取总 RNA, 用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测关键基因的 mRNA 表达。**结果** ① 实验 1: 肺部感染继发脓毒症数据集 GSE 134364 和 GSE 65682 分析后得到共有差异基因 319 个, 其中, 社区获得性肺炎 (CAP) 与医院获得性肺炎 (HAP) 在基因水平上无差异; 各动物模型基因差异较大, 无共有差异基因; 患者与动物模型差异基因在 GO 功能上有相似的富集, 主要在细胞分化、细胞过程的调控、细胞对刺激反应的调节等方面; KEGG 通路富集的比较则差异较大, 其中, CLP 动物模型与患者呈现更高的一致性; WGCNA 和 PPIN 分析后得到的关键基因有 MAPK14、NLRC4 和 LCN2。② 实验 2: 动物实验结果显示, CLP 模型小鼠肺组织细胞中 MAPK14、NLRC4 和 LCN2 的 mRNA 表达较 Sham 组呈明显上调, 与 GEO 的分布结果一致。**结论** MAPK14、NLRC4 和 LCN2 是肺部感染继发脓毒症的关键基因, 其参与了生物学过程的调节, 是潜在的研究方向; CLP 动物模型更能反映肺部感染继发脓毒症患者的生物学特征, 是理想的动物模型方案。

【关键词】 肺部感染; 脓毒症; 社区获得性肺炎; 医院获得性肺炎; 动物模型; 高通量基因表达数据库

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC2001900)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210908-01350

Differential gene expression and bioinformatics analysis in sepsis secondary to pneumonia

Liu Gang¹, Liu Ying¹, Tao Junling¹, Li Yehong¹, Wang Yongqiang¹, Li Shixin¹, Liu Di²

¹Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; ²Institute of Internet Development, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Corresponding author: Liu Ying, Email: 2356831401@qq.com

【Abstract】 Objective To analyze and screen the key genes of sepsis secondary to pulmonary infection by bioinformatics, and to provide theoretical basis for the basic research of the disease and find an ideal animal model program. **Methods** Experiment 1 (bioinformatics analysis): gene expression data sets of pulmonary infection secondary sepsis patients and multiple sepsis animal models were screened by Gene Expression Omnibus (GEO) Database, and gene differences were analyzed by R software. Differential genes were analyzed by gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. Correlation analysis was conducted between differential genes and clinical symptoms in the data set of pulmonary infection secondary sepsis, and the correlation heat map between differential genes and clinical symptoms was drawn. Key genes were screened by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and protein-protein interaction network analysis (PPIN) clustering. Experiment 2 (sepsis animal model preparation): male mice weighing 21~25 g were randomly divided into the key genes group and the control (Sham) group. And cecal ligation and puncture (CLP) was used to establish mouse sepsis model, while the mice in sham group were performed by exposure of cecum. And all the mice were sacrificed 24 hours after surgery to extract the total RNA from lung tissue, real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect mRNA expression of key genes. **Results** Experiment 1 (bioinformatics analysis): 319 differential genes were showed by GSE 134364 and GSE 65682 data set analysis of pulmonary infection secondary sepsis. And there was no genetic difference between community acquired pneumonia (CAP) and hospital acquired pneumonia (HAP) in patients with pulmonary infection secondary to sepsis. Obvious differences existed between

differential genes in animal models, and there was no common differential gene. Differential genes in patients and animal models were similarly enriched in GO function, mainly in cell differentiation, regulation of cell process, and regulation of cellular response to stimuli, there were significant differences in pathway enrichment, among which, CLP animal models showed higher consistency with patients. The key genes obtained by WGCNA and PPIN analysis were MAPK14, NLRC4 and LCN2. Experiment 2 (sepsis animal model preparation): animal experiment results showed that the mRNA expressions of MAPK14, NLRC4 and LCN2 in lung tissue of CLP model mice were significantly up-regulated compared with the sham group. **Conclusions** MAPK14, NLRC4 and LCN2 are key genes involved in the regulation of biological processes of pulmonary sepsis secondary to infection, and are potential research directions of this disease. What's more, CLP animal model can better reflect the biological characteristics of patients with pulmonary infection secondary sepsis, and is one of the ideal animal model schemes for pulmonary infection secondary sepsis.

【Key words】 Pneumonia; Sepsis; Community acquired pneumonia; Hospital acquired pneumonia; Animal model; Gene Expression Omnibus

Fund program: National Key Research and Development Project of China (2018YFC2001900)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210908-01350

肺部感染是导致脓毒症最常见原因之一^[1-2]。依感染的不同,可分为社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)和医院获得性肺炎(hospital acquired pneumonia, HAP)。脓毒症是肺部感染的主要并发症,在合并肺部基础疾病患者中更为常见,因此,肺部感染继发脓毒症在重症患者中的病死率明显增高^[3-4]。CAP 和 HAP 具有不同的病原学基础, HAP 因更易合并耐药病原微生物感染,治疗上更为棘手, HAP 病死率也较 CAP 高^[5-6]。本研究旨在探索 CAP 与 HAP 是否在基因水平及生物学过程中存在差异,为肺部感染继发脓毒症的临床诊断、治疗及预后判断提供潜在的研究方向。

脓毒症动物模型的研究是进一步探索肺部感染继发脓毒症病理生理特征的主要方法。常见动物建模方法有盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)、油酸注射(oleic acid, OA)、腹膜污染感染术(peritoneal contamination and infection, PCI)及致病细菌悬浮液雾化吸入等。临床上胃肠道穿孔患者继发脓毒症的发病率较高^[7], CLP 动物模型可能与脓毒症患者的病理生理过程更为相似。但不论何种动物模型,其临床转化效果均有一定差异^[8]。本研究拟对多种脓毒症动物模型进行生物信息学分析,探索更符合肺部感染继发脓症患者基因变化的动物模型,为基础研究找到更为理想的动物模型方案。

1 材料与方法

1.1 基因表达数据集筛选及差异基因分析:通过基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)检索“sepsis”数据集,筛选患者样本量大,且有患者公开临床性状信息的数据集,最终选择 GSE 65682、GSE 134364 为肺部感染继发脓症患者转录组数据;同时检索不同制模方式的脓毒症动物模型,且有明确肺部感染或肺损伤动物模型的数据集,最终选

择 GSE 15379、GSE 15869、GSE 18712、GSE 23767、GSE 61459、GSE 90727 为肺部感染继发脓毒症动物模型转录组数据(见表 1)。分别利用 R 软件及 GEO2R 对人及动物数据集进行差异基因筛选,人数数据集以肺部感染继发脓症患者与健康受试者分组, CLP、PCI、OA、致病细菌悬浮液雾化吸入与假手术组分组。取 $P < 0.05$ 、 $\text{LogFC} > 1$ 为条件筛选差异基因。

表 1 GEO 基因表达数据集信息

基因数据集	物种	基因来源	异常样本分布		正常样本分布	
			来源	例数(个)	来源	例数(个)
GSE 65682	人	外周血	HAP 或 CAP	183	健康受试者	42
GSE 134364	人	外周血	HAP 或 CAP	98	健康受试者	83
GSE 15379	小鼠	肺组织	CLP 24 h	3	假手术	3
GSE 15869	小鼠	肺组织	细菌雾化吸入	5	PBS 雾化	6
GSE 18712	小鼠	肺组织	OA 18 h	5	生理血清	5
GSE 23767	小鼠	肺组织	PCI 6 h	4	生理盐水	3
GSE 61459	小鼠	肺组织	细菌鼻感染	10	PBS 鼻滴入	6
GSE 90727	小鼠	外周血	CLP 24 h	8	假手术	8

注: GEO 为基因表达数据库, HAP 为医院获得性肺炎, CAP 为社区获得性肺炎, CLP 为盲肠结扎穿孔术, OA 为油酸注射, PCI 为腹膜污染感染术, PBS 为磷酸盐缓冲液

1.2 差异基因富集分析:利用 R 软件对差异基因进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释与京都基因与基因组百科(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,以错误发现率(false discovery rate, FDR)校正 P 值 < 0.05 为具有统计学意义的生物医学功能和信号转导通路,以数据集差异基因主要富集的功能及通路进行指标分析。

1.3 差异基因聚类分析:提取 GSE 134364 数据集中患者的临床症状,利用加权基因共表达网络(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)对差异基因与临床症状进行聚类,得到差异基因与临床症状的相关系数(correlation coefficient, COR)和

显著性(P 值)的热图。使用 Cytoscape 软件中心法则(maximal clique centrality, MCC)提取模块中与临床症状相关性和显著性明显(COR 绝对值高且 P 值 <0.05)的前 10 个含基因名的差异基因为核心基因。

利用基因与蛋白质相互作用检索在线数据库(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database, STRING)网站对肺部感染继发脓毒症数据集共同差异基因进行基因-蛋白转换,取中等置信度(medium confidence) >0.700 ,使用 Cytoscape 软件 MCC 法提取核心蛋白(hub protein),去除单独未呈网蛋白,构成蛋白-蛋白互作用网络(protein-protein interaction network, PPIN),选择在 PPIN 为核心蛋白且同时在 WGCNA 中为核心基因的差异基因为关键基因。

1.4 动物模型制备及验证:选取体质量为 21~25 g 昆明种雄性小鼠 12 只,随机分为 CLP 脓毒症模型组(CLP 组, $n=6$)和对照组(Sham 组, $n=6$)。采用 CLP 制备脓毒症模型,Sham 组仅暴露盲肠后关闭腹腔;术后给予 50 mL/kg 生理盐水皮下注射补液治疗。制模 24 h 后麻醉处死小鼠,取肺组织提取总 RNA,使用 mRNA 逆转录试剂盒(日本 TAKARA 公司, RR047A)合成 cDNA。提取 cDNA 后采用实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)进行检测,核心基因引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成,基因表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

本实验获得贵州医科大学动物伦理委员会批准同意(审批号: NO2101465),实验中严格遵守动物实验伦理原则。

1.5 统计学方法:采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者采用 t 检验进行两两比较,方差不齐者采用校正 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,采用非参数曼-惠特尼 U 检验;分类变量用百分数表示,采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因筛选:从 GEO 数据库中筛选出人肺部感染继发脓毒症数据集 GSE 134364 和 GSE 65682, GSE 134364 数据集中异常样本组与正常样本组比较有 619 个差异基因, GSE 65682 数据集中有 1 169 个差异基因,其中 319 个为 2 个数据集共有差异基因(见表 2)。动物模型数据集 GSE 15379、GSE 15869、GSE 18712、GSE 23767、GSE 61459、

GSE 90727 中各数据集异常样本与正常样本比较,差异基因分别有 73、739、1 123、6 084、1 823 和 787 个, 6 个数据集共有的差异基因数为 0 个。虽然各动物模型数据集间无共有差异基因,但 LCN2 在肺组织来源的 CLP 模型(GSE 15379)、肺组织来源的细菌雾化吸入模型(GSE 15869)、外周血来源的 CLP 模型(GSE 90727)和肺部感染继发脓毒症患者(GSE 65682、GSE 134364)数据集差异基因中同时存在。GSE 65682、GSE 134364 数据集中,由 HAP 和 CAP 所导致的脓毒症与健康受试者具有相似的差异基因, HAP 与 CAP 差异基因间无明显差异表达(见表 2)。间接说明肺部感染继发脓毒症患者中 HAP 和 CAP 的差异基因基本相同。

表 2 各数据集差异基因分析及在 HAP 和 CAP 中的分布

基因数据集	物种	差异基因数 (个)	共有差异 基因数 (个)	HAP 差异 基因数 (个)	CAP 差异 基因数 (个)	HAP 与 CAP 差异基因数 (个)
GSE 134364	人	619	319	645	631	7
GSE 65682	人	1 169		1 127	1 215	4
GSE 15379	小鼠	73	0			
GSE 15869	小鼠	739				
GSE 18712	小鼠	1 123				
GSE 23767	小鼠	6 084				
GSE 61459	小鼠	1 823				
GSE 90727	小鼠	787				

注:从基因表达数据库(GEO)筛选出的各数据集分别进行异常样本与正常样本分组,再利用 R 软件及 GEO2R 进行差异基因筛选;从 GEO 筛选出的肺部感染继发脓毒症数据集,根据来源不同分为 HAP 组、CAP 组和健康受试者组,两两间分别用 R 软件及 GEO2R 进行差异基因筛选;HAP 为医院获得性肺炎, CAP 为社区获得性肺炎

2.2 差异基因功能注释和通路富集分析:各数据集差异基因在 GO 功能注释富集分析中均有相同表现,主要集中在细胞分化、细胞过程调控、细胞对刺激反应调节、细胞信号传递、免疫过程调节、功能定位、生物过程正调控、生物过程负调控、细胞通讯调节、氮化合物代谢过程调节等(见表 3)。KEGG 通路富集分析中患者数据集和动物模型差异基因富集差异较大,患者差异基因主要集中在辅助性 T 细胞 17(helper T cell 17, Th17)细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化、造血细胞谱系、炎症性肠病、嗜 T 淋巴细胞病毒 I 型感染、T 细胞受体信号通路、抗原加工和呈递方面,其中, GSE 90727 数据集差异基因在以上信号通路上也有一定的富集(见表 4)。因此,肺部感染继发脓毒症患者与脓毒症动物模型均有相似的生物学功能,但仅有 CLP 动物模型差异基因通路富集上与患者相似。

表 3 基因表达数据库(GEO)中数据集差异基因 GO 功能注释富集分析

富集功能 ID	富集功能	基因数(个)和差异基因百分比							
		GSE 65682	GSE 134364	GSE 15379	GSE 15869	GSE 18712	GSE 23767	GSE 61459	GSE 90727
0009987	细胞分化	989 (95.00)	376 (92.16)	—	323 (88.49)	787 (90.77)	192 (87.27)	256 (93.43)	1 065 (86.66)
0050794	细胞过程调控	699 (67.15)	268 (65.69)	265 (64.16)	250 (68.49)	569 (65.63)	160 (72.73)	212 (77.37)	797 (64.85)
0050896	细胞对刺激反应调节	666 (63.98)	277 (67.89)	238 (57.63)	233 (63.84)	488 (56.29)	173 (78.64)	738 (60.05)	738 (60.05)
0007154	细胞信号传递	206 (50.49)	461 (44.28)	7 152 (34.21)	161 (44.11)	345 (39.79)	120 (54.55)	168 (61.31)	512 (41.66)
0002376	免疫过程调节	199 (48.77)	383 (36.79)	128 (30.99)	100 (27.40)	172 (19.84)	103 (46.82)	124 (45.26)	380 (30.92)
0051179	功能定位	498 (47.84)	195 (47.79)	154 (37.29)	178 (48.77)	365 (42.10)	88 (40.00)	136 (49.64)	465 (37.84)
0048518	生物过程正调控	472 (45.34)	189 (46.32)	188 (45.52)	189 (51.78)	384 (44.29)	121 (55.00)	167 (60.95)	565 (45.97)
0048519	生物过程负调控	407 (39.10)	139 (34.07)	144 (34.87)	141 (38.63)	337 (38.87)	98 (44.55)	134 (48.91)	475 (38.65)
0010646	细胞通讯调节	261 (25.07)	109 (26.72)	103 (24.94)	95 (26.03)	204 (23.53)	77 (35.00)	110 (40.15)	307 (24.98)
1901564	氮化合物代谢过程调节	226 (21.71)	76 (18.63)	143 (34.62)	132 (36.16)	328 (37.83)	99 (45.00)	133 (48.54)	445 (36.21)

注:GO 为基因本体;表中括号外数值为富集功能基因数,括号内数值为富集功能基因数与总差异基因的百分比,“—”为数据集差异基因在功能注释上无富集或富集后 P 值无意义;因基因富集功能较多,且基因功能多有交叉,故列出关联紧密的前 10 个基因功能

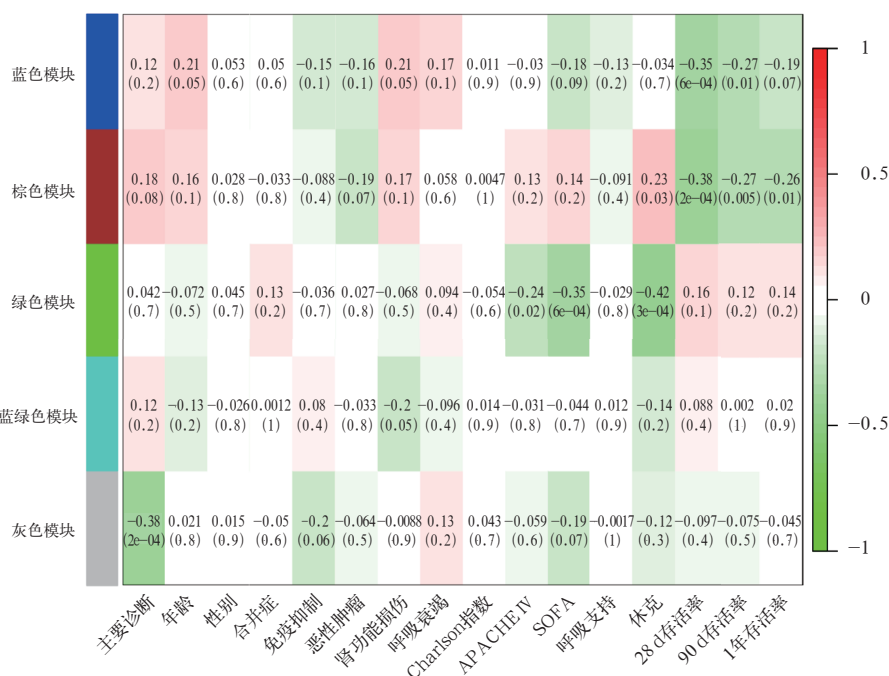
表 4 基因表达数据库(GEO)中数据集差异基因 KEGG 信号通路富集分析

富集通路 ID	富集通路	基因数(个)和差异基因百分比							
		GSE 65682	GSE 134364	GSE 15379	GSE 15869	GSE 18712	GSE 23767	GSE 61459	GSE 90727
ko04659	Th17 细胞分化	27 (5.13)	21 (9.05)	—	—	—	—	—	28 (4.35)
ko04658	Th1 和 Th2 细胞分化	24 (4.56)	21 (9.05)	—	—	—	—	—	20 (3.11)
ko04640	造血细胞谱系	31 (5.89)	30 (12.93)	—	—	—	—	—	36 (5.60)
ko05321	炎症性肠病	15 (2.85)	15 (6.47)	—	—	—	—	—	21 (3.27)
ko05166	嗜 T 细胞病毒 I 型感染	31 (5.89)	19 (8.19)	—	—	27 (5.53)	—	15 (8.33)	—
ko04660	T 细胞受体信号通路	17 (3.23)	15 (6.47)	—	—	20 (4.10)	—	—	—
ko04612	抗原加工和呈递	13 (2.47)	13 (5.60)	—	—	—	—	—	—

注:KEGG 为京都基因与基因组百科全书,Th17 为辅助性 T 细胞 17,Th1 为辅助性 T 细胞 1,Th2 为辅助性 T 细胞 2;表中括号外数值为富集功能基因数,括号内数值为富集功能基因数与总差异基因的百分比,“—”为数据集差异基因在通路上无富集或富集后 P 值无意义;因人数据集差异基因通路富集相同的通路仅有 7 个,故列出 7 个富集通路

2.3 核心基因和关键基因的

筛选:对 GSE 134364 数据集中肺部感染继发脓毒症患者差异基因进行 WGCNA 聚类,患者各时间段存活率与蓝色、棕色基因模块显著相关;绿色基因模块与休克、序贯器官衰竭评分(sequential organ failure assessment, SOFA)、急性生理学与慢性健康状况评分Ⅳ(acute physiology and chronic health evaluation Ⅳ, APACHE Ⅳ)评分显著相关;灰色基因模块与主要诊断相关(见图 1)。提取与临床症状有明显相关的蓝色、棕色、绿色模块中前 10 个含基因名的差异基因为核心基因(见表 5)。与临床症状有明显相关的核心基因在蓝色模块



注:APACHE Ⅳ为急性生理学与慢性健康状况评分Ⅳ,SOFA 为序贯器官衰竭评分;最左侧的颜色块代表模块,最右侧的颜色条代表相关性范围,中间部分的热图中颜色越深相关性越高;红色表示正相关,绿色表示负相关,每个单元格中括号外数值代表相关性(COR 值),括号内数值代表显著性(P 值)

图 1 GSE 134364 数据集中差异基因与临床症状相关性热图

中主要有 TLR5、MEF2A、MAPK14、SIPA1L2、GAS7、DYSF、WDFY3、MKNK1、MCTP2；棕色模块中主要有 NLRC4、C19orf59、RAB27A、CDADC1、FAM105A、ATP11B、SERPINB1、BNIP2、MMADHC；绿色模块中主要有 PILRA、NLRP1、MMP8、LCN2、TAGAP、MAML2、METTL9、SNX3。

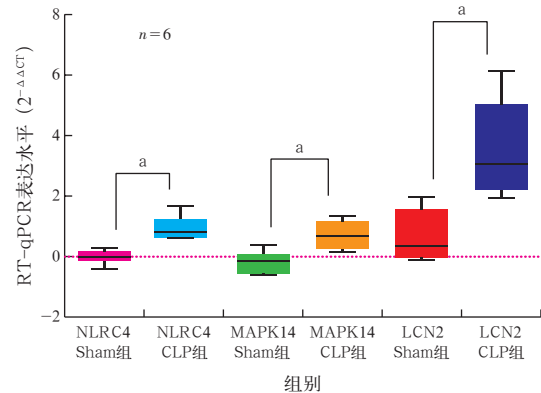
表 5 基因表达数据库 (GEO) 中差异基因 WGCNA 和 PPIN 聚类分析

相关性分析	核心基因	关键基因
WGCNA 蓝色模块	MAPK14、TLR5、MEF2A、SIPA1L2、GAS7、DYSF、WDFY3、MKNK1、MCTP2	
WGCNA 棕色模块	NLRC4、C19orf59、RAB27A、CDADC1、FAM105A、ATP11B、SERPINB1、BNIP2、MMADHC	MAPK14、NLRC4、LCN2
WGCNA 绿色模块	LCN2、PILRA、NLRP1、MMP8、TAGAP、MAML2、METTL9、SNX3	
PPIN	MAPK14、NLRC4、LCN2、TLR5、MET2A、DYSF、MKNK1、BNIP2、MADHC、MNLRP1、PYGL、TAGAP	

注：WGCNA 为加权基因共表达网络分析，PPIN 为蛋白-蛋白相互作用网络；因前 10 个含基因名的核心基因中含有相同的基因名，所以 WGCNA 棕色和绿色模块有 9 个核心基因，绿色模块有 8 个核心基因；MAPK14 为丝裂原活化蛋白激酶，TLR5 为 Toll 样受体 5，MEF2A 为肌细胞增强因子 2A，SIPA1L2 为阿尔兹海默症的风险基因，GAS7 为生长休止蛋白 7，DYSF 为 dysferlin 基因，WDFY3 为选择性自噬的主要调节因子，MKNK1 为 MAPK 相互作用激酶 1，MCTP2 为多个 C2 结构域和跨膜区蛋白 2，NLRC4 是炎症小体的一员，C19orf59 为 19 号染色体开放阅读框 59，RAB27A 为 Rab 家族中的一个，CDADC1 为细胞增殖相关基因，FAM105A 为去泛素化的 OTU 家族的预测假酶成员，ATP11B 为 P4 翻转酶家族 VI 类，SERPINB1 为弹性蛋白酶抑制剂，BNIP2 为促进凋亡基因 2，MMADHC 为甲基丙二酸血症和高胱氨酸尿症 D 型蛋白，LCN2 为中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白，PILRA 为 II 型成对免疫球蛋白样受体，NLRP1 为热蛋白结构域 1，MMP8 为人基质金属蛋白酶-8，TAGAP 为 T 细胞活化 Rho GTPase 活化蛋白，MAML2 为 NOTCH 信号通路的共激活因子，METTL9 为甲基转移酶样蛋白 9，SNX3 为分选连接蛋白 3 基因。

对肺部感染继发脓毒症数据集的 319 个差异基因进行 PPIN 分析。结果显示，WGCNA 聚类中差异基因的 MAPK14、NLRC4、LCN2、TLR5、MET2A、DYSF、MKNK1、BNIP2、MMADHC、NLRP1、PYGL、TAGAP 在 PPIN 网络中为核心蛋白，其中 MAPK14、NLRC4 和 LCN2 处于 PPIN 网络中联系更为紧密的位置，且 LCN2 在动物模型数据集 GSE 90727 的 WGCNA、PPIN 聚类分析中仍为核心基因和蛋白，故选择 MAPK14、NLRC4 和 LCN2 作为该疾病的关键基因 (见表 5)。

2.4 关键基因在脓毒症动物模型中的表达 (图 2)：CLP 脓毒症动物模型 24 h 后关键基因 MAPK14、NLRC4 和 LCN2 在细胞中 mRNA 表达均较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。与数据集中分布的结果一致。



注：CLP 组为盲肠结扎穿孔术脓毒症模型组，Sham 组为对照组；炎症小体 NLRC4、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK14) 及中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (LCN2) 基因均在脓毒症动物模型中呈高表达趋势；与 Sham 组比较，^a $P < 0.01$

图 2 关键基因在脓毒症模型小鼠 CLP 组和对照组 (Sham 组) 细胞中 mRNA 的表达比较

3 讨论

脓毒症是由于宿主对感染反应失调，引起的危及生命的器官功能障碍^[9]。随着对脓毒症的不深入了解，目前认为其病理生理过程不仅是炎症反应失衡、免疫功能障碍等，同时包括线粒体损伤、凝血功能障碍、自噬等多种病理生理过程，共同导致全身各器官的损伤或功能障碍^[10-11]。本研究通过对脓毒症患者外周血转录组差异基因的分析发现，众多差异基因参与脓毒症复杂的病理生理过程，但这些基因主要集中在免疫反应的生物过程中。脓毒症炎症细胞在早期表现为过度活化，而在后期则表现为显著的抑制，提示导致脓毒症器官损伤最重要的机制仍为免疫调控异常^[12-13]。但肺部感染仍是脓毒症的主要病因之一，由于造成 CAP 及 HAP 感染的病原微生物不同，常需采用不同的抗菌药物治疗方案^[14-15]。近年来随着多重耐药菌感染患者数量的不断增长，特别是在危重患者中耐碳青霉烯类肠杆菌感染、耐万古霉素金黄色葡萄球菌等耐药菌感染的增加，使 HAP 的诊断及治疗愈发棘手^[16-17]。虽然 CAP 与 HAP 患者具有不同的致病因素、发展过程及预后，但两者在基因水平上却无显著差异；相较于健康受试者，CAP 和 HAP 在生物学功能、病理生理过程及分子功能中均保持高度的相似性。因此，对于不明病原微生物感染的肺部感染继发脓毒症患者，现阶段仍无潜在的特异性指标用以鉴别 CAP 及 HAP，仍需要临床医生结合患者病史、临床表现及细菌学差异综合分析。

众多基因参与到肺部感染继发脓毒症患者的病

理生理过程中,如 TLR5、DYSF、MAPK14、NLRC4、SERPINB1、C19orf59 等关键基因与患者存活率显著相关;而 LCN2、MMP8、NLRP1 等基因与患者器官功能显著相关。尤其是 MAPK14、NLRC4 及 LCN2 基因,同处于 PPIN 及 WGCNA 的中心位置,更有可能是肺部感染继发脓毒症的关键核心基因。

MAPK14 为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)中的一员,可参与细胞周期调控、细胞凋亡、增殖和炎症反应等生理过程^[18]。MAPK14 通过影响自噬的水平变化,从而发挥对脓毒症炎症反应的调控^[19-20]。在肺部感染继发脓毒症患者中,MAPK14 呈现显著的差异,而在动物模型中则差异不明显。该基因在多个脓毒症患者数据集中表现出同样趋势^[21]。对于肺部感染继发的脓毒症,MAPK14 仍是值得进一步研究的关键基因。

NLRC4 为炎症小体的一员,可发挥调控免疫系统的稳态的作用,一旦炎症小体被激活,可引起白细胞介素(interleukins, IL-1 β 、IL-18)等细胞因子释放,在炎症疾病的免疫反应中发挥积极作用^[22-23]。在肺部感染继发脓毒症患者中,NLRC4 均表现出差异,其作为炎症程序性细胞死亡途径的关键调控因子^[24],可能是导致脓毒症器官损伤的关键因素。

LCN2 也称为中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白,在脓毒症早期即可表达出显著差异,呈高表达趋势,其参与了微生物群稳态、细胞外抑菌、巨噬细胞及中性粒细胞的活化、调节免疫反应及保护器官功能的作用^[25-26],且 LCN2 在动物肺组织及外周血中也呈现出同样表现。因此,LCN2 可能是肺部感染继发脓毒症的关键基因之一。

由于脓毒症是多种复杂的病理生理机制共同参与的结果,基因样本受制于患者组织、血液样本来源的差异,可能造成检测的不稳定及影响测序准确性等,尤其是对于脓毒症患者不同发病原因的针对性测序,仍有待于进一步的研究及探索^[27]。为更好地研究脓毒症患者的发病机制,目前已有多种脓毒症动物模型应用于科学研究中。根据脓毒症诱导方式的不同,可分为外源性毒素注射、病原体植入及破坏实验动物的保护屏障以引起细菌侵袭等方式,以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)注射、腹腔内细菌接种及 CLP 模型最为常见,而肺部感染动物模型以致病菌悬浮液雾化吸入为主,急性肺损伤动物模型则以 OA 注射为主,但由于诸如物种、环境、脓毒症发病时间等差异的存在,不论何种动物模型均

与脓毒症患者的实际情况有着较大差异^[28-29]。这些差异同样表现在基因水平上,在 GO 及 KEGG 富集分析中,各动物模型之间均有不同程度的差异,而制作方式相似的动物模型具有更为相似的生物学过程,致病细菌悬浮液雾化吸入和 CLP 动物模型与人体具有相似生物学过程,故这两种模型更接近肺部感染继发脓毒症患者。如仅针对脓毒症继发组织器官损伤的研究,CLP 及致病细菌悬浮液雾化吸入均与人体有较好的相关性,鉴于 CLP 模型具有更简易的可操作性,故应得到更广泛的应用。

综上所述,众多基因参与调控肺部感染继发脓毒症的发生发展,多种病理生理过程相互影响。CAP 及 HAP 具有相同的生物学过程,两者在基因水平上无显著差异。CLP 动物模型是研究肺部感染继发脓毒症的首选,相较于其他动物模型,具有与人体更为相似的生物学过程。肺部感染继发脓毒症的差异基因大多参与在免疫调控的过程中,MAPK14、NLRC4 及 LCN2 为核心基因,可能为该疾病的病理生理过程、诊断、治疗及预后判断提供新的探索方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10219): 200–211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention Epicenters Program. Prevalence, underlying causes, and preventability of sepsis-associated mortality in US acute care hospitals [J]. *JAMA Netw Open*, 2019, 2 (2): e187571. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2018.7571.
- [3] Cillóniz C, Domínguez C, Ielpo A, et al. Risk and prognostic factors in very old patients with sepsis secondary to community-acquired pneumonia [J]. *J Clin Med*, 2019, 8 (7): 961. DOI: 10.3390/jcm8070961.
- [4] Cilloniz C, Peroni HJ, Gabarrús A, et al. Lymphopenia is associated with poor outcomes of patients with community-acquired pneumonia and sepsis [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2021, 8 (6): ofab169. DOI: 10.1093/ofid/ofab169.
- [5] Heo JY, Song JY. Disease burden and etiologic distribution of community-acquired pneumonia in adults: evolving epidemiology in the era of pneumococcal conjugate vaccines [J]. *Infect Chemother*, 2018, 50 (4): 287–300. DOI: 10.3947/ic.2018.50.4.287.
- [6] Zaragoza R, Vidal-Cortés P, Aguilar G, et al. Update of the treatment of nosocomial pneumonia in the ICU [J]. *Crit Care*, 2020, 24 (1): 383. DOI: 10.1186/s13054-020-03091-2.
- [7] 周业庭, 叶松, 张立飞, 等. 急性胃肠穿孔继发脓毒症的临床特征和预后影响因素评价 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (5): 460–464. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.05.004.
- [8] Nandi M, Jackson SK, Macrae D, et al. Rethinking animal models of sepsis—working towards improved clinical translation whilst integrating the 3Rs [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134 (13): 1715–1734. DOI: 10.1042/CS20200679.
- [9] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 [J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43 (3): 304–377. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6.
- [10] 刘垚, 刘逸, 张小禾, 等. 甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体 2 促进小鼠巨噬细胞内毒素耐受形成的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (4): 472–477. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201106-00705.

- [11] Huang M, Cai SL, Su JQ. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (21): 5376. DOI: 10.3390/ijms20215376.
- [12] Cao C, Yu MM, Chai YF. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (10): 782. DOI: 10.1038/s41419-019-2015-1.
- [13] Sepsis and Critical Illness Research Center Investigators. Innate immunity in the persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome and its implications for therapy [J]. Front Immunol, 2018, 9: 595. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00595.
- [14] 陈虹. 实体器官移植术后肺部感染诊治的哲学思辨 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2018, 6 (3): 170-172. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.03.002.
- [15] 李拥玲, 曾艳辉. 2016—2018 年某二甲医院住院患者血培养病原菌分布及耐药性特征 [J]. 实用检验医师杂志, 2021, 13 (1): 3-6. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.01.002.
- [16] Lin Q, Wang Y, Yu J, et al. Bacterial characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) colonized strains and their correlation with subsequent infection [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21 (1): 638. DOI: 10.1186/s12879-021-06315-0.
- [17] Lu FL, Inoue K, Kato J, et al. Functions and regulation of lipocalin-2 in gut-origin sepsis: a narrative review [J]. Crit Care, 2019, 23 (1): 269. DOI: 10.1186/s13054-019-2550-2.
- [18] Lo U, Selvaraj V, Plane JM, et al. p38 α (MAPK14) critically regulates the immunological response and the production of specific cytokines and chemokines in astrocytes [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7405. DOI: 10.1038/srep07405.
- [19] She H, He YL, Zhao YR, et al. Release the autophagy brake on inflammation: the MAPK14/p38 α -ULK1 pedal [J]. Autophagy, 2018, 14 (6): 1097-1098. DOI: 10.1080/15548627.2018.1446626.
- [20] Hirota Y, Yamashita S, Kurihara Y, et al. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways [J]. Autophagy, 2015, 11 (2): 332-343. DOI: 10.1080/15548627.2015.1023047.
- [21] Zeng XL, Feng JH, Yang YL, et al. Screening of key genes of sepsis and septic shock using bioinformatics analysis [J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 829-841. DOI: 10.2147/JIR.S301663.
- [22] Kumar V. Inflammasomes: Pandora's box for sepsis [J]. J Inflamm Res, 2018, 11: 477-502. DOI: 10.2147/JIR.S178084.
- [23] Gu XY, Wei C, Zhu XS, et al. Effect of interleukin-31 on septic shock through regulating inflammasomes and interleukin-1 β [J]. Exp Ther Med, 2018, 16 (1): 171-177. DOI: 10.3892/etm.2018.6181.
- [24] Wen JX, Xuan B, Liu Y, et al. Updating the NLRP4 inflammasome: from bacterial infections to autoimmunity and cancer [J]. Front Immunol, 2021, 12: 702527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.702527.
- [25] Abella V, Scotece M, Conde J, et al. The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases [J]. Biomarkers, 2015, 20 (8): 565-571. DOI: 10.3109/1354750X.2015.1123354.
- [26] Molecular Diagnosis and Risk Stratification in Sepsis (MARS) consortium. The leukocyte non-coding RNA landscape in critically ill patients with sepsis [J]. Elife, 2020, 9: e58597. DOI: 10.7554/eLife.58597.
- [27] 莫均荣, 张振辉, 陈美婷, 等. 基于 GEO 芯片和生物信息学分析构建脓毒症相关 ceRNA 网络 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (4): 427-432. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210205-00211.
- [28] Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, et al. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the gap? [J]. ILAR J, 2017, 58 (1): 90-105. DOI: 10.1093/ilar/ilx007.
- [29] Alverdy JC, Keskey R, Thewissen R. Can the cecal ligation and puncture model be repurposed to better inform therapy in human sepsis? [J]. Infect Immun, 2020, 88 (9): e00942-19. DOI: 10.1128/IAI.00942-19.

(收稿日期: 2021-09-08)

关于“床旁超声监测下腔静脉在重症患者容量管理中的应用进展”一文的更正声明

由于个人疏忽,原发表于《中华危重病急救医学》2021 年第 11 期第 1379 页的“床旁超声监测下腔静脉在重症患者容量管理中的应用进展”一文中,校样时忽略了表格。现发现表格存在错误,如下:表 2 最后一行“下腔静脉直径>21 mm 且下腔静脉塌陷指数应为<50%”;表 3 中第 4 行漏掉了“下腔静脉直径比参考值为>1.43,敏感度为 67.6%,特异度为 90.0%”。修改后的表格如下,并用黄色阴影标记了修改的部分。我对读者造成的损失深表歉意。

表 2 下腔静脉直径及塌陷指数与中心静脉压的关系^[22]

下腔静脉直径和塌陷指数	中心静脉压 (mmHg)
下腔静脉直径 $\leq$ 21 mm 且下腔静脉塌陷指数>50%	3 (0~5)
下腔静脉直径<21 mm 且下腔静脉塌陷指数<50%	8 (5~10)
下腔静脉直径>21 mm 且下腔静脉塌陷指数>50%	8 (5~10)
下腔静脉直径>21 mm 且下腔静脉塌陷指数<50%	15 (10~20)

注:下腔静脉塌陷指数=呼气时下腔静脉直径-吸气时下腔静脉直径/呼气时下腔静脉直径;1 mmHg=0.133 kPa

表 3 下腔静脉超声关于容量反应性研究的特征

文献	患者类型	参考指标	参考值	敏感度 (%)	特异度 (%)
Feissel 等 ^[12]	控制通气	呼吸变异率	>12%		
Shah 等 ^[23]	自主呼吸	下腔静脉塌陷指数(右腋中线冠状切面)	>42%	61.5	67.1
Yao 等 ^[24]	控制通气	下腔静脉面积膨胀指数	>10.2%	97.3	40.0
		下腔静脉直径比	>1.43	67.6	90.0
Barbier 等 ^[32]	控制通气	下腔静脉膨胀指数	>18%	90.0	91.0
Airapetian 等 ^[38]	自主呼吸	下腔静脉塌陷指数	>42%	31.0	97.0
Muller 等 ^[39]	自主呼吸	下腔静脉塌陷指数	>40%	70.0	80.0
Bortolotti 等 ^[40]	自主呼吸	下腔静脉塌陷指数	>39%	93.0	88.0
		下腔静脉直径	<11 mm	83.0	88.0
Moretti 等 ^[43]	控制通气	下腔静脉膨胀指数	>16%	70.6	100.0
Charbonneau 等 ^[46]	控制通气	下腔静脉膨胀指数	>21%	38.0	61.0
张灵界等 ^[49]	自主呼吸	呼吸变异率	>9.85%	100.0	25.0
王震等 ^[50]	控制通气	呼吸变异率			

注:下腔静脉塌陷指数=(呼气时下腔静脉直径-吸气时下腔静脉直径)/呼气时下腔静脉直径;下腔静脉膨胀指数=(吸气时下腔静脉直径-呼气时下腔静脉直径)/呼气时下腔静脉直径;下腔静脉面积膨胀指数=(吸气时下腔静脉面积-呼气时下腔静脉面积)/呼气时下腔静脉面积;下腔静脉直径比=长轴直径/短轴直径;空白代表无此项

作者高学慧