

# MMP14 和 KLKB1 可能是脓毒症诊治的潜在生物标志物

## ——基于蛋白质组学及生物信息学的分析

冯立波<sup>1</sup> 刘玉<sup>2</sup> 陈睦虎<sup>3</sup> 胡迎春<sup>4</sup>

<sup>1</sup>西南医科大学附属医院胃肠外科, 四川泸州 646000; <sup>2</sup>西南医科大学附属医院心电图科, 四川泸州 646000; <sup>3</sup>西南医科大学附属医院急救医学科, 四川泸州 646000; <sup>4</sup>西南医科大学临床医学系, 四川泸州 646000

通信作者: 胡迎春, Email: huyingchun913@qq.com

**【摘要】** 目的 对脓毒症患者进行蛋白质质谱分析, 寻找脓毒症诊治的潜在新靶点。方法 采用横断面观察研究方法, 纳入 2019 年 1 月至 12 月在西南医科大学附属医院急诊科急诊重症监护病房(EICU)就诊的 12 例脓毒症患者及同期 9 例健康体检者。采集两组受试者外周血进行蛋白质质谱分析, 并采用非依赖性采集技术得到各蛋白表达数据。将所得数据导入整合差异表达和通路分析在线网络工具 IDEP2, 对数据进行 ID 转换, 并进行均一化处理, 验证其可比性, 再用主成分分析剔除离群数据。以  $P < 0.05$ 、 $\log_2$  差异倍数(FC)  $> 1$  或  $\log_2$ FC  $< -1$  为差异有统计学意义, 筛选出差异蛋白。用 DAVID 在线网站将筛选出的差异蛋白进行基因本体(GO)分析, 从蛋白质的生物过程、细胞组分、分子功能 3 个方面对蛋白进行富集分析, 同时进行京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)通路分析。通过基因与蛋白质相互作用检索数据库(String)在线网站进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析, 找到紧密联系的相关蛋白。结果 两组数据经均一化处理后提示具有可比性。最终共筛选出 125 个差异蛋白, 其中 99 个上调, 26 个下调。GO 富集分析显示, 筛选出的差异蛋白主要分布在细胞外, 具有细胞调节功能及催化活性, 参与生物调节、代谢过程及免疫过程; KEGG 通路分析提示这些蛋白参与了氨基酸、糖类代谢及免疫相关通路。PPI 分析显示, 关键蛋白主要为基质金属蛋白酶 14(MMP14)、纤维蛋白 1(FBLN1)和血浆激肽释放酶 1(KLKB1)等, 最终筛选出与炎症、免疫等紧密相关的 MMP14 及 KLKB1, 二者可能是早期诊治脓毒症的潜在新靶点。结论 MMP14 和 KLKB1 可能为脓毒症诊治及预后判断的潜在生物标志物。

**【关键词】** 脓毒症; 生物信息学; 蛋白质组学; 生物标志物

基金项目: 四川省科技计划项目(2019JDPT0003, 2020YFS0517)

临床试验注册: 中国临床试验注册中心, ChiCTR 1900021261

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210706-01011

### Matrix metalloproteinase 14 and plasma kallikrein 1 may be potential biomarkers in the diagnosis and treatment of sepsis: a proteomics and bioinformatics analysis

Feng Libo<sup>1</sup>, Liu Yu<sup>2</sup>, Chen Mulu<sup>3</sup>, Hu Yingchun<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; <sup>2</sup>Department of Electrocardiogram, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; <sup>3</sup>Department of Emergency Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; <sup>4</sup>Department of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

Corresponding author: Hu Yingchun, Email: huyingchun913@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To analyze protein profiles in septic patients, and to find potential new targets for the diagnosis and treatment of sepsis. **Methods** A cross sectional observational study was conducted. From January to December 2019, 12 septic patients and 9 healthy volunteers were recruited in the emergency intensive care unit (EICU) of the emergency department of the Affiliated Hospital of Southwest Medical University. The peripheral blood of the two groups was collected for protein mass spectrometry analysis, and the data-independent acquisition technology was used to obtain the expression data of each protein. The obtained data was imported into the online network tool Integrated Differential Expression and Pathway analysis (IDEP2), the data underwent ID converted and were homogenized to verify their comparability, and then principal component analysis was used to eliminate outlier data. Then data with  $P < 0.05$ ,  $\log_2$  fold change (FC)  $> 1$  or  $\log_2$ FC  $< -1$  were considered to have a statistically significant difference, and the differential proteins were screened out. On the DAVID website, the screened differential proteins would be analyzed by gene ontology (GO), and the biological process, cellular components, and molecular function of the proteins would be analyzed. Protein enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were performed. Protein-protein interaction (PPI) analysis was performed through the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database (STRING) website to find closely related proteins. **Results** The data in this study were shown to be comparable after

normalization. A total of 125 differential proteins were screened, of which 99 were up-regulated and 26 were down-regulated. GO enrichment analysis discovered that these proteins were mainly extracellular, with cellular regulatory functions and catalytic functions involved in biological regulation, metabolic process and immune process. KEGG pathway analysis suggested that these proteins were involved in amino acid, carbohydrate metabolism and immune-related pathways. PPI analysis showed that key proteins included matrix metalloproteinase 14 (MMP14), fibulin 1 (FBLN1), plasma kallikrein 1 (KLKB1), etc., and finally screened out MMP14 and KLKB1, which were closely related to inflammation and immunity. Both might be potential new targets for early diagnosis and treatment of sepsis. **Conclusion** MMP14 and KLKB1 may be potential biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of sepsis.

**【Key words】** Sepsis; Bioinformatics; Proteomics; Biomarker

**Fund program:** Science and Technology Planning Project of Sichuan Province (2019JDPT0003, 2020YFS0517)

**Trial Registration:** Chinese Clinical Trial Registry, ChiCTR 1900021261

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210706-01011

脓毒症是由宿主对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>,是临床常见的急危重症,具有很高的死亡风险<sup>[2]</sup>。导致脓毒症最常见的感染部位是肺部(64%),其次是腹部(20%)、血流(15%),以及肾和泌尿生殖道(14%)<sup>[3-4]</sup>。在全球范围内,成人住院患者脓毒症的发病率估计为270/10万,总病死率约26%<sup>[5]</sup>;在新生儿和婴儿因胸部感染而死亡的病例中,约70%与脓毒症相关<sup>[6]</sup>。随着世界人口老龄化,以及相关老年病、免疫抑制相关疾病的发病率增高,脓毒症正成为一种严重且日益常见的临床问题,但目前临床上对脓毒症仍然缺乏特异、及时的诊断标志物。目前指南提示脓毒症诊断越早,越有利于降低患者的病死率。近年来蛋白质组学在临床上广泛应用,本研究基于蛋白质组学质谱的高通量分析,发现了脓症患者蛋白质组学的表达变化,为挖掘早期诊治脓毒症的潜在生物标志物提供了依据,报告如下。

## 1 资料和方法

**1.1 招募志愿者:**本研究的志愿者为2019年1月至12月在西南医科大学附属医院急诊科急重症监护病房(emergency intensive care unit, EICU)就诊的脓症患者和同期健康体检者,共招募了9例健康体检者和12例脓症患者。本研究采用横断面观察研究方法,符合医学伦理学标准,通过了西南医科大学附属医院临床试验伦理委员会审批(审批号:ky2018029),并在中国临床试验注册中心进行了注册(注册号:ChiCTR 1900021261)。在加入本研究前,每位参与者及其家属均签署了知情同意书。

**1.1.1 纳入标准:**①入住急诊医学部EICU的患者;②符合2016年美国危重病医学会(Society of Critical Care Medicine, SCCM)与欧洲重症医学会(European Society of Critical Care Medicine, ESICM)联合发布的脓毒症3.0诊断标准<sup>[1]</sup>;③年龄 $\geq 16$ 岁且 $\leq 67$ 岁。

**1.1.2 排除标准:**既往有器官功能衰竭、免疫系统疾病、血液系统疾病的患者。

**1.2 血液收集、蛋白样本制备及质谱分析:**根据美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)定义的临床和微生物学标准进行血液培养以确认感染的存在,所有脓症患者均按照脓毒症和脓毒性休克管理国际指南治疗<sup>[7]</sup>。

对于EICU可疑脓毒症的高热患者,在获得患者和家属的知情同意后,采集高热时血液进行培养,并采集5 mL外周静脉血;健康体检者取清晨空腹外周静脉血5 mL。血液经抗凝后于30 min内离心取上清液,保存于西南医科大学附属医院生物样本库。由深圳华大基因公司完成质谱分析,并采用数据非依赖性采集技术(data-independent acquisition, DIA)检测,得到各蛋白表达数据。

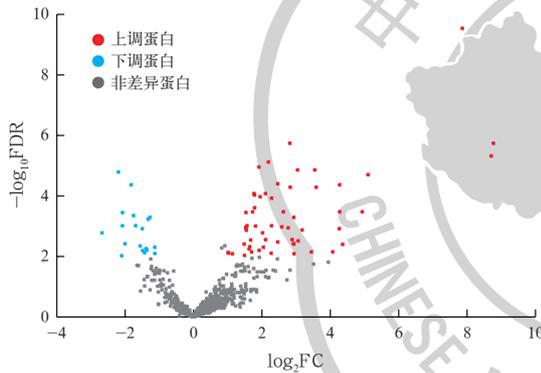
**1.3 生物信息学分析:**采用基于R语言程序软件设计的IDEP2在线网络将蛋白质质谱数据进行ID转换,对数化均一处理,分析样本可比性;并使用主成分分析(principal component analysis, PCA)方法排除离群数据。以 $P < 0.05$ 、 $\log_2$ 差异倍数(fold change, FC)  $> 1$ 或 $\log_2$ FC  $< -1$ 为差异有统计学意义,筛选出差异蛋白,并绘制火山图;将差异蛋白按照P值从小到大排序,最终筛选出具有统计学意义的蛋白进行热图分析。采用DAVID在线网站将筛选出的差异蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)分析,从蛋白质的生物过程、细胞组分、分子功能3个方面进行富集分析,同时进行京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过基因与蛋白质相互作用检索数据库(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database, STRING)在线网站进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析,找到紧密联系的相关蛋白。

1.4 统计学分析:应用 Excel 软件收集受试者一般资料。计量资料呈正态分布,以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;计数资料以频数表示。

## 2 结果

2.1 受试者的一般情况:12 例脓毒症患者高热时血培养均呈阳性,纳入脓毒症组,其中男性 8 例,女性 4 例;年龄( $59.8 \pm 15.2$ )岁;感染发生前均未使用抗菌药物治疗。健康对照组中男性 3 例,女性 6 例;年龄( $58.3 \pm 13.4$ )岁。

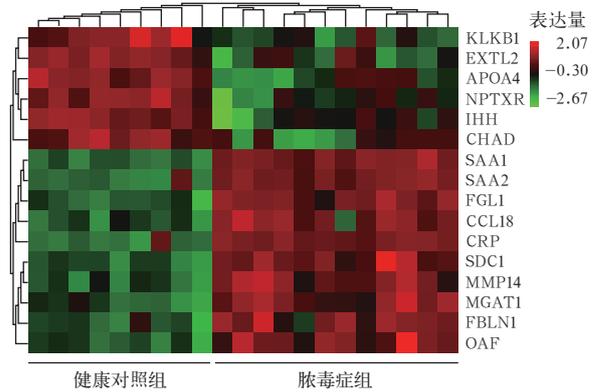
2.2 差异蛋白的筛选:将 DIA 数据进行归一化校正,转换为对数值,最大程度消除测量间的非实验差异,再通过标准化处理,PCA 分析排除离群样本,最后共筛选出 125 个差异蛋白,其中 99 个上调,26 个下调(图 1)。从上调和下调的蛋白中选取 P 值最小的 16 个差异蛋白绘制热图进行分析(图 2)。



注:FC 为差异倍数, FDR 为错误发现率

图 1 脓毒症组与健康对照组受试者外周血差异蛋白火山图

2.3 GO 分析和 KEGG 通路分析:将 125 个差异蛋白进行 GO 富集分析,结果显示(表 1;图 3),差异蛋



注:KLKB1 为血浆激肽释放酶 1, EXTL2 为外泌体样蛋白 2, APOA4 为载脂蛋白 A4, NPTXR 为神经元正五聚蛋白, IHH 为印度刺猬蛋白, CHAD 为人软骨蛋白, SAA 为血清淀粉样蛋白 A, FGL1 为纤维蛋白原样蛋白 1, CCL18 为 C-C 基序趋化因子 18, CRP 为 C-反应蛋白, SDC1 为多配体聚糖 1, MMP14 为基质金属蛋白酶 14, MGAT1 为  $\alpha$ -1,3 甘露糖基-2- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 1, FBLN1 为纤维蛋白 1, OAF 为油酸激活转录因子

图 2 脓毒症组与健康对照组受试者外周血 16 个显著差异蛋白热图

白在细胞外区域、细胞器、细胞膜等都有较高富集,主要是在细胞外;在生物过程中,这些蛋白主要聚类在细胞过程、生物调节、代谢过程、多细胞器官过程、刺激反应、免疫系统过程等;在分子功能上,聚类最多的是分子连接、催化剂活性及分子功能调节等。KEGG 通路分析提示(表 2;图 4),这些蛋白主要参与以下通路过程,即聚糖的生物合成和代谢、氨基酸及碳水化合物代谢、信号转导、信号分子和相互作用、免疫系统、内分泌系统。

2.4 PPI 分析:由 PPI 网络图可以看出(图 5),处于相对核心位置的蛋白有基质金属蛋白酶 14(matrix metalloproteinase 14, MMP14)、纤维蛋白 1(fibulin1,

表 1 脓毒症组与健康对照组受试者外周血主要差异蛋白的 GO 富集分析

类别	GO 编号	注释名称	蛋白数量(个)	P 值	主要相关蛋白
生物过程	GO:0022617	细胞外基质分解	5	$8.90 \times 10^{-5}$	MMP14, MMP2, TIMP1, KLKB1、CD44
	GO:0001666	缺氧反应	4	$16.17 \times 10^{-3}$	MMP14, LDHA, MMP2, CYTB
	GO:0031638	酶原激活	2	$27.53 \times 10^{-3}$	MMP14, KLKB1
	GO:0030307	细胞生长的正调控	3	$27.89 \times 10^{-3}$	CDC42, MMP14, HYAL1
	GO:0010952	肽酶活性的正调控	2	$39.53 \times 10^{-3}$	MMP14, FBLN1
细胞组分	GO:0070062	胞外分泌体	38	$5.51 \times 10^{-18}$	CRP, SAA1, SAA2, KLKB1 等
	GO:0005615	细胞外间隙	23	$1.33 \times 10^{-11}$	CCL14, CRP, SAA1, KLKB1 等
	GO:0005925	黏着斑	6	$6.39 \times 10^{-3}$	CDC42, MMP14, ACTB 等
	GO:0031012	细胞外基质	5	$12.15 \times 10^{-3}$	MMP14, MMP2, FBLN1, LTBP2 等
分子功能	GO:0005509	钙离子结合	8	$6.82 \times 10^{-3}$	CRP, MMP14, FBLN1, LTBP2 等
	GO:0016504	肽酶激活活性	2	$30.96 \times 10^{-3}$	MMP14, FBLN1
	GO:0005178	整合素结合	3	$43.00 \times 10^{-3}$	MMP14, FBLN1, IGF1
	GO:0004252	丝氨酸型内肽酶活性	4	$45.92 \times 10^{-3}$	C1QA, MMP14, MMP2, KLKB1

注:GO 为基因本体, MMP 为基质金属蛋白酶, TIMP1 为基质金属蛋白酶组织抑制剂 1, KLKB1 为血浆激肽释放酶 1, LDHA 为 L-乳酸脱氢酶 A 链, CYTB 为胱抑素 B, CDC42 为细胞分裂控制蛋白 42, HYAL1 为透明质酸酶 1, FBLN1 为纤维蛋白 1, CRP 为 C-反应蛋白, SAA 为血清淀粉样蛋白 A, CCL14 为 C-C 基序趋化因子 14, ACTB 为  $\beta$ -肌动蛋白, LTBP2 为潜伏转化生长因子  $\beta$  结合蛋白 2, IGF1 为胰岛素样生长因子 1, C1QA 为补体 C1q 亚组分亚基 A

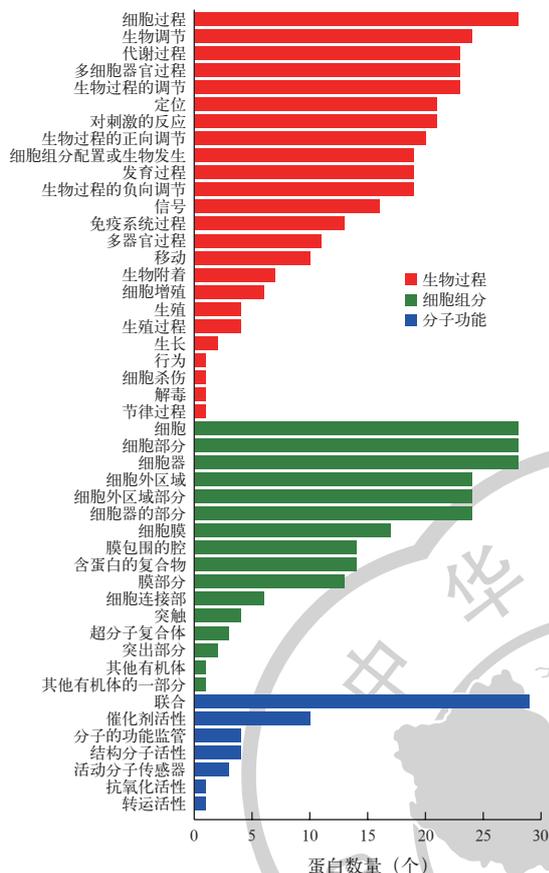
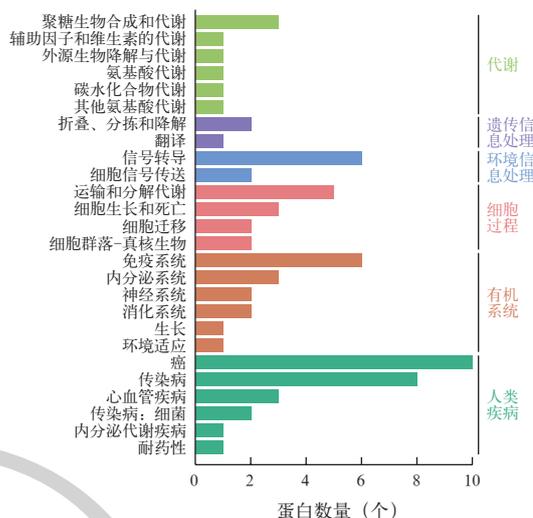


图3 脓毒症组与健康对照组受试者外周血差异蛋白的基因本体(GO)富集分析

表2 脓毒症组与健康对照组受试者外周血主要差异蛋白的KEGG通路富集分析

通路编号	通路名称	蛋白数量(个)	P值	主要相关蛋白
hsa05205	癌症中的蛋白多糖	6	0.001 81	CDC42、MMP2、SDC1、IGF1、CD44、ACTB
hsa04640	造血细胞谱系	4	0.006 80	CSF1、CD59、CD14、CD44
hsa05130	致病性大肠杆菌感染	3	0.021 85	CDC42、CD14、ACTB
hsa04912	GnRH 信号通路	3	0.032 82	CDC42、MMP14、MMP2
hsa05131	志贺菌病	3	0.033 32	CDC42、CD44、ACTB
hsa04610	补体和凝血级联反应	3	0.038 24	C1QA、CD59、KLKB1
hsa05132	沙门菌感染	3	0.053 37	CDC42、CD14、ACTB
hsa04512	ECM 受体相互作用	3	0.058 03	CHAD、SDC1、CD44
hsa04510	黏着斑	4	0.064 38	CDC42、CHAD、IGF1、ACTB
hsa04015	Rap1 信号通路	4	0.067 41	CDC42、CSF1、IGF1、ACTB
hsa04670	白细胸跨内皮迁移	3	0.094 16	CDC42、MMP2、ACTB
hsa04977	维生素的消化和吸收	2	0.094 72	BTD、APOA4

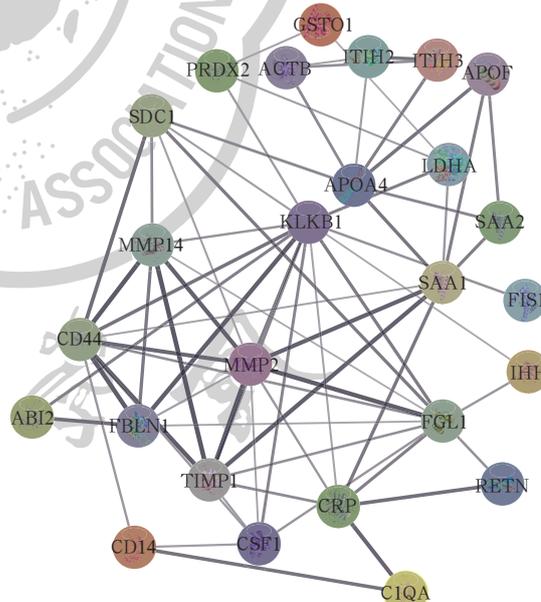
注:KEGG 为京都基因与基因组百科全书数据库,GnRH 为促性腺激素释放激素,ECM 为细胞外基质,CDC42 为细胞分裂控制蛋白42,MMP 为基质金属蛋白酶,SDC1 为多配体聚糖1,IGF1 为胰岛素样生长因子1,ACTB 为β-肌动蛋白,CSF1 为巨噬细胞集落刺激因子1,C1QA 为补体C1q亚组分亚基A,KLKB1 为血浆激肽释放酶1,CHAD 为软骨黏连蛋白,BTD 为生物素酶,APOA4 为载脂蛋白A4



注:KEGG 为京都基因与基因组百科全书数据库

图4 脓毒症组与健康对照组受试者外周血差异蛋白的KEGG通路富集分析

FBLN1)、多配体聚糖1(syndecan 1, SDC1)、纤维蛋白原样蛋白1(fibrinogen like 1, FGL1)、血浆激肽释放酶1(plasma kallikrein 1, KLKB1)和载脂蛋白A4(apolipoprotein A-IV, APOA4)等,与其他差异蛋白存在联系较多,提示其可能是潜在的脓毒症相关蛋白。



注:PPI 为蛋白质-蛋白质相互作用,GSTO1 为谷胱甘肽S-转移酶omega-1,PRDX2 为过氧化还原蛋白2,ACTB 为β-肌动蛋白,ITIH 为间α胰蛋白酶抑制剂重链H,APOF 为载脂蛋白F,SDC1 为多配体聚糖1,MMP 为基质金属蛋白酶,KLKB1 为血浆激肽释放酶1,APOA4 为载脂蛋白A4,LDHA 为L-乳酸脱氢酶A链,SAA 为血清淀粉样蛋白A,FIS1 为线粒体裂变1蛋白,IHH 为印度刺桐蛋白,ABI2 为阿尔贝森交互器2,FBLN1 为纤维蛋白1,TIMP1 为基质金属蛋白酶组织抑制剂1,CRP 为C-反应蛋白,FGL1 为纤维蛋白原样蛋白1,RETN 为抵抗素,CSF1 为巨噬细胞集落刺激因子1,C1QA 为补体C1q亚组分亚基A

图5 脓毒症组与健康对照组受试者外周血差异蛋白的PPI网络图

### 3 讨论

本研究通过蛋白质质谱分析得出 125 个脓毒症相关差异蛋白,并筛选出 16 个  $P$  值最小的蛋白,其中 10 个上调,6 个下调;热图分析可见,上调的蛋白差异均较明显,下调的蛋白中以 KLKB1 最为突出;PPI 分析显示,MMP14、FBLN1、SDC1、FGL1、KLKB1 等蛋白均处于核心位置,且在 GO 及 KEGG 通路分析中 MMP14 和 KLKB1 参与的通路  $P$  值均较小,查阅大量文献发现两者与炎症、感染均相关,所以最终选取 MMP14 和 KLKB1 作为讨论对象,并考虑其为脓毒症诊治相关潜在生物标志物。

MMP14 是 MMP 家族的一个亚家族,主要位于细胞膜,是一种降解细胞外基质(如胶原)各种成分的内肽酶,也是细胞外胶原降解必不可少的参与者;同时 MMP14 可激活 MMP2。在发育过程中,MMP14 参与骨骼和骨外结缔组织形成,可能通过切割酪氨酸蛋白激酶 7(protein tyrosine kinase 7,PTK7)参与肌动蛋白细胞骨架重组<sup>[8]</sup>。MMP14 通过激活 MMP15 成为细胞生长和迁移的正调节器,同时还与 MMP2 前体相关,参与纤维血管组织的形成<sup>[9]</sup>。MMP14 不仅参与了类风湿关节炎血管翳形成和关节滑膜组织血管形成的病理过程<sup>[10]</sup>,还可以通过裂解黏附性 G 蛋白受体 B1(adhesion G protein-coupled receptor B1,ADGRB1)释放抑制血管生成的血管抑制素-40,从而抑制肿瘤生长<sup>[11-12]</sup>。总结起来,MMP14 主要在骨骼形成、慢性炎症和肿瘤的发生发展中发挥作用。MMP14 也正向调节巨噬细胞的移动<sup>[13]</sup>。巨噬细胞在人体内参与非特异性防卫和特异性防卫,主要功能是以固定细胞或游离细胞的形式对细胞残片及病原体发挥噬菌作用(即吞噬和消化),并激活淋巴细胞或其他免疫细胞对病原体进行免疫应答。机体在遭遇炎症、感染后,必然产生氧化应激,有研究表明 MMP14 可能参与抗氧化应激反应<sup>[14]</sup>。MMP14 可促进细胞移动及生长<sup>[15]</sup>,这是其促进骨骼及骨外组织形成的重要原因,可能也是炎症和创伤修复的条件之一。但是目前关于 MMP14 与急性炎症、感染关系的研究极少。有研究提示,给予 MMP14 基因缺失小鼠注入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)后,其肺部炎症损伤加重,死亡率增加,认为 MMP14 在解决急性炎症蛋白水解级联反应的激活中发挥了作用<sup>[16]</sup>。该研究者同时观察到脓症患者体内 MMP14 水平升高,与本研究蛋白质质谱分析结果相同。MMP14 在脓毒症中的作用及相应机制有待进一步研究。

KLKB1 是血浆激肽释放酶(kallikrein, KLK)家族中的一员,是一种由激肽释放酶原产生的丝氨酸蛋白酶,它本质上是一种水解酶,作用于肽键,也就是丝氨酸肽链内切酶,是血浆激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)的重要组成。KKS 被认为是炎症过程的中枢调节因子,同时又受先天免疫系统成分的调节<sup>[17]</sup>。本研究 KEGG 分析提示, KLKB1 参与补体及凝血级联通路。凝血级联与补体级联存在直接或间接的联系,主要是相互增强、促进的关系<sup>[18-19]</sup>。脓毒症是一个严重且日益普遍的临床问题,尽管其非常复杂,但有充分的证据表明, 全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)可能与先天免疫系统的过度激活有关,凝血级联及补体级联就是两个重要的先天免疫系统<sup>[20]</sup>。同时,脓毒症又是弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)最常见的原因。随着脓毒症的发展,免疫细胞和内皮细胞受到促炎细胞因子的刺激,由此产生的组织因子(tissue factor, TF)表达可引起凝血系统的激活,进而导致 DIC。补体可非特异性防御各病原体,其激活路径有 3 条,即经典路径、外源凝集素路径和替代路径<sup>[21]</sup>,均可激活关键性酶,而激活的酶反过来又会促使补体产生相应的效应分子。补体激活的主要结果是招募炎症和免疫活性细胞,产生调理素,以及直接杀死病原体<sup>[22]</sup>。由此看来, KLKB1 对于炎症似乎是一种促进因子,故在脓毒症中的表达应升高。研究表明, KLKB1 可活化纤维蛋白溶酶原,正向调节纤溶,负向调节凝血<sup>[23]</sup>,而脓毒症通过各种机制激活凝血及补体级联反应,故可认为 KLKB1 负向调节脓毒症。其实 KLKB1 也是一种循环的“原酶”,需蛋白水解才能产生活性激肽酶,发挥作用时以“牺牲”自己为代价,故脓毒症时 KLKB1 通过水解产生活性激肽酶,降低自身含量,触发或增强先天免疫系统<sup>[17,24]</sup>,以抵抗脓毒症时病原入侵及各种过度炎症反应,保护机体。本研究蛋白质质谱分析提示脓症患者 KLKB1 表达水平降低,可能与此保护机制有关。

KLK 分为两大类,即血浆 KLK 和组织 KLK,分别由前激肽释放酶和 KLK 前体转换而来,在相对分子质量、底物、免疫学特性、基因结构和释放的激肽种类等方面存在很大差异。血浆 KLK 即 KLKB1,又称 Fletcher 因子<sup>[25]</sup>,是一种高分子量糖蛋白,以高分子量激肽原(high molecular weight kininogen, HMWK)为底物释放九肽即缓激肽(bradykinin, BK),具有舒

血管及降压作用,脓毒性休克与该机制密切相关。

LPS是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,具有极强的致炎作用。LPS可以刺激巨噬细胞及单核细胞分泌白细胞介素(interleukins, IL-1 $\beta$ 、IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等大量炎症因子,最终导致脓毒症<sup>[26-27]</sup>。研究表明,LPS可诱导KKS系统活化<sup>[28]</sup>,并触发产生一系列炎症因子,进而导致全身炎症反应<sup>[25]</sup>,甚至诱发脓毒性休克;其具体作用机制大概是因为LPS与KKS中血浆HMWK结合,激活KLKB1,同时促进HMWK裂解释放BK,从而导致炎症反应。有诸多研究提示,KLKB1作为血浆KLK家族的一员,与炎症有着密切关联,故其可能为评估脓毒症病情严重程度及推测预后的一个潜在的重要指标<sup>[29-31]</sup>。然而,这些报道主要是基于分子蛋白层面的分析讨论,缺乏确切的临床前瞻性研究,可为后续的脓毒症诊治研究提供一个思路和方向。

综上所述,MMP14及KLKB1是潜在的脓毒症生物标志物,可能有助于对脓毒症的早期诊断,以及对治疗和预后的判断,但本研究缺乏临床验证,且其中各种机制仍需进一步探索研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10141): 75-87. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2.
- [3] Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units [J]. *JAMA*, 2009, 302 (21): 2323-2329. DOI: 10.1001/jama.2009.1754.
- [4] Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, et al. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study [J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33 (3): 435-443. DOI: 10.1007/s00134-006-0504-z.
- [5] 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.
- [6] Black RE, Cousens S, Johnson HL, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis [J]. *Lancet*, 2010, 375 (9730): 1969-1987. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60549-1.
- [7] 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.
- [8] Golubkov VS, Chekanov AV, Cieplak P, et al. The Wnt/planar cell polarity protein-tyrosine kinase-7 (PTK7) is a highly efficient proteolytic target of membrane type-1 matrix metalloproteinase: implications in cancer and embryogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (46): 35740-35749. DOI: 10.1074/jbc.M110.165159.
- [9] Noda K, Ishida S, Inoue M, et al. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5): 2163-2170. DOI: 10.1167/iovs.02-0662.
- [10] Qin S, Wang FM, Zhou M, et al. Immunolocalization of membrane-type 1 MMP in human rheumatoid synovium tissues [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (8): 9286-9292.
- [11] 刘振杰,张丹丹,李涛,等. RNAi下调MMP-14表达对类风湿关节炎滑膜细胞炎症因子分泌的影响 [J]. *广东医学*, 2015, 36 (15): 2342-2345. DOI: CNKI:SUN:GAYX.0.2015-15-024.
- [12] Cork SM, Kaur B, Devi NS, et al. A proprotein convertase/MMP-14 proteolytic cascade releases a novel 40 kDa vasculostatin from tumor suppressor BAI1 [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (50): 5144-5152. DOI: 10.1038/onc.2012.1.
- [13] Yang T, Zhang J, Cao Y, et al. Wnt5a/Ror2 mediates temporomandibular joint subchondral bone remodeling [J]. *J Dent Res*, 2015, 94 (6): 803-812. DOI: 10.1177/0022034515576051.
- [14] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 192 (1): 1-15. DOI: 10.1002/jcp.10119.
- [15] Gu GP, Zhao DJ, Yin ZM, et al. BST-2 binding with cellular MT1-MMP blocks cell growth and migration via decreasing MMP2 activity [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113 (3): 1013-1021. DOI: 10.1002/jcb.23433.
- [16] Aguirre A, Blázquez-Prieto J, Amado-Rodríguez L, et al. Matrix metalloproteinase-14 triggers an anti-inflammatory proteolytic cascade in endotoxemia [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95 (5): 487-497. DOI: 10.1007/s00109-017-1510-z.
- [17] Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47 (13): 2161-2169. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.05.010.
- [18] Gulla KC, Gupta K, Krarup A, et al. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot [J]. *Immunology*, 2010, 129 (4): 482-495. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03200.x.
- [19] Oikonomopoulou K, Ricklin D, Ward PA, et al. Interactions between coagulation and complement: their role in inflammation [J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34 (1): 151-165. DOI: 10.1007/s00281-011-0280-x.
- [20] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (10): 776-787. DOI: 10.1038/nri2402.
- [21] Bajic G, Degn SE, Thiel S, et al. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases [J]. *EMBO J*, 2015, 34 (22): 2735-2757. DOI: 10.15252/embj.2015191881.
- [22] Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses [J]. *Cell Res*, 2010, 20 (1): 34-50. DOI: 10.1038/cr.2009.139.
- [23] Mandle RJ Jr, Kaplan AP. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen [J]. *Blood*, 1979, 54 (4): 850-862. DOI: 10.1182/blood.V54.4.850.bloodjournal544850.
- [24] Lipsey M, Persson B, Eriksson O, et al. The outcome of critically ill COVID-19 patients is linked to thromboinflammation dominated by the kallikrein/kinin system [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 627579. DOI: 10.3389/fimmu.2021.627579.
- [25] Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14 (1): 28-39. DOI: 10.1111/jth.13194.
- [26] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease [J]. *Blood*, 1996, 87 (6): 2095-2147. DOI: 10.1006/bcmd.1996.0011.
- [27] 陈思如,修光辉,周娟,等. 高迁移率族蛋白B1在内毒素诱导脓毒症大鼠肠黏膜屏障损伤中的作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (7): 803-807. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20200109-00126.
- [28] DeLa Cadena RA, Suffredini AF, Page JD, et al. Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers [J]. *Blood*, 1993, 81 (12): 3313-3317. DOI: 10.1007/BF00840065.
- [29] Kenne E, Rasmuson J, Renné T, et al. Neutrophils engage the kallikrein-kinin system to open up the endothelial barrier in acute inflammation [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (2): 2599-2609. DOI: 10.1096/fj.201801329R.
- [30] Didiasova M, Wujak L, Schaefer L, et al. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond [J]. *Cell Signal*, 2018, 51: 257-265. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.08.006.
- [31] Qadri F, Bader M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22 (1): 31-44. DOI: 10.1080/14728222.2018.1409724.

(收稿日期: 2021-07-06)