

中性粒细胞胞外诱捕网可增加脓毒症发生风险 ——一项两样本单向孟德尔随机化研究

王建 张炎 程璐 耿艳霞 鲁俊 周江

南京中医药大学附属医院重症医学科, 江苏南京 210029

通信作者: 周江, Email: 1967chch@163.com

【摘要】 目的 基于孟德尔随机化分析方法, 探讨中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 与脓毒症的因果关系。**方法** 选择基于 Donkel 等对荷兰鹿特丹研究 (RS) 分析结果的针对 NET 生物标志物髓过氧化物酶 (MPO)-DNA 复合体全基因组关联分析 (GWAS) 数据集, 以及英国生物样本库 (UK biobank) 中识别脓毒症的相关 GWAS 数据集, 以 MPO-DNA 复合体为暴露因素, 筛选与 MPO-DNA 复合体相关的单核苷酸多态性 (SNP) 作为遗传变异工具变量 (IV)。采用两样本单向孟德尔随机化主要分析方法逆方差分析法 (IVW) 分析 MPO-DNA 复合体与脓毒症、脓毒症 28 d 死亡、因脓毒症需重症监护、需重症监护的脓毒症 28 d 死亡的潜在因果关系。利用 MR Egger 回归截距检验评估 SNP 水平多效性; 采用 “leave one out” 检验进行敏感性分析。**结果** GWAS 数据均来自于欧洲人群, 男女不限, 以孟德尔随机化三大假设为前提设置筛选标准, 最终 22 个 SNP 纳入孟德尔随机化分析。采用 IVW 方法进行孟德尔随机化因果关联效应分析结果显示, MPO-DNA 复合体水平每增加 1 个标准差, 脓毒症发生风险上升约 18% [优势比 (OR) = 1.18, 95% 可信区间 (95%CI) 为 1.07 ~ 1.29, $P < 0.001$], 脓毒症 28 d 死亡风险上升约 51% (OR = 1.51, 95%CI 为 1.27 ~ 1.81, $P < 0.001$), 因脓毒症需重症监护的风险上升约 38% (OR = 1.38, 95%CI 为 1.12 ~ 1.70, $P = 0.002$), 需重症监护的脓毒症 28 d 死亡风险上升约 125% (OR = 2.25, 95%CI 为 1.21 ~ 4.18, $P = 0.010$); MR Egger 回归截距检验提示纳入的 SNP 不存在水平多效性, MR-PRESSO 检验未发现离群值; 敏感性分析提示孟德尔随机化结果稳健。**结论** 通过孟德尔随机化分析得出 NET 水平升高可增加脓毒症的发生、恶化及死亡风险。

【关键词】 中性粒细胞胞外诱捕网; 髓过氧化物酶-DNA 复合体; 脓毒症; 孟德尔随机化

基金项目: 国家自然科学基金 (82074379); 江苏省中医药科技发展计划项目 (ZD202004, QN202004)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230117-00030

Neutrophil extracellular trap increase the risk of sepsis: a two-sample, one-way Mendelian randomization study

Wang Jian, Zhang Yan, Cheng Lu, Geng Yanxia, Lu Jun, Zhou Jiang

Department of Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

Corresponding author: Zhou Jiang, Email: 1967chch@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the causal relationship between neutrophil extracellular trap (NET) and sepsis based on Mendelian randomization analysis. **Methods** The genome wide association study (GWAS) dataset for the NET biomarker myeloperoxidase (MPO)-DNA complex based on Donkel et al. 's Rotterdam study (RS) and GWAS dataset for identifying sepsis from the UK biobank were selected to screen single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with MPO-DNA complex as instrumental variable (IV) for genetic variation, using MPO-DNA complex as exposure factor. Potential causal associations between MPO-DNA complex and the risk of occurrence of sepsis, 28-day death from sepsis, need for intensive care due to sepsis, and 28-day death from sepsis requiring intensive care were analyzed using a two-sample, one-way Mendelian randomization analysis primary analysis method of inverse analysis of variance (IVW). Potential pleiotropy was assessed using the MR Egger regression intercept test. Sensitivity analysis was performed using the "leave one out" test. **Results** The GWAS data were obtained from a European population of both sexes, and the screening criteria was based on the three main assumptions of Mendelian randomization, resulting in 22 SNP entering the Mendelian randomization analysis. The results of the Mendelian randomization causal association effect analysis using the IVW method showed that for every standard deviation increase in the level of the MPO-DNA complex, the risk of sepsis increased by approximately 18% [odds ratio (OR) = 1.18, 95% confidence interval (95%CI) was 1.07-1.29, $P < 0.001$], the risk of 28-day death from sepsis increased by approximately 51% (OR = 1.51, 95%CI was 1.27-1.81, $P < 0.001$), an increase of approximately 38% in the risk of occurrence of needing intensive care due to sepsis (OR = 1.38, 95%CI was 1.12-1.70, $P = 0.002$), and an increase of approximately 125% in the risk of 28-day death from sepsis requiring intensive care (OR = 2.25, 95%CI was 1.21-4.18, $P = 0.01$). MR Egger regression intercept test suggested that there was no horizontal pleiotropy in the included SNP, and the MR-PRESSO test did not find outliers. Sensitivity analysis suggested that the results of Mendelian randomization were robust. **Conclusion** Rising NET can increase the risk of sepsis onset, progression and death as derived from Mendelian randomization analysis.

【Key words】 Neutrophil extracellular trap; Myeloperoxidase-DNA complex; Sepsis; Mendelian randomization

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82074379); Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Technology Development Planning Project (ZD202004, QN202004)
DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230117-00030

脓毒症是机体对感染应答失调所致的危及生命的器官功能障碍^[1]。尽管国际指南不断更新^[2],脓毒症病死率仍高达 23.7%^[3]。一项针对我国 44 家医院重症监护病房(intensive care unit, ICU)脓毒症流行病学的横断面研究显示,脓毒症发病率近 20.6%, 90 d 病死率高达 35.5%^[4]。因此,脓毒症成为威胁 ICU 患者生命安全的主要原因,积极寻找脓毒症发病的始动环节和危险因素,对于降低脓毒症发病率、改善脓毒症预后至关重要。

中性粒细胞可通过吞噬、“呼吸爆发”、脱颗粒等方式发挥固有免疫作用,但在受到病原微生物、脂多糖、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、补体等刺激后,活化的中性粒细胞发生了区别于坏死、凋亡的程序性死亡^[5],中性粒细胞骨架重新排列,颗粒膜及核膜完整性受损,细胞颗粒中的中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等进入细胞核,组蛋白水解、染色质解聚、瓜氨酸化,最后装配有 MPO 和 NE 等颗粒酶的组蛋白-DNA 骨架形成纤维网状结构并排出胞外,形成了中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)^[6]。NET 能够介导炎症反应、凝血功能紊乱、组织损伤等病理过程,参与自身免疫性疾病、肿瘤、心脑血管疾病、血栓性疾病等发生发展^[7-17]。一项针对脓毒症的研究表明,脓毒症患者循环 NET 水平升高^[18-21],但考虑到混杂因素与反向因果干扰,NET 与脓毒症发生的因果关系尚不明确。因此,本研究拟使用孟德尔随机化方法^[22-23]探究循环 NET 水平升高能否增加脓毒症的发生风险和死亡风险,以期治疗脓毒症提供新的方向。

1 资料和方法

1.1 研究资料

1.1.1 MPO-DNA 复合体全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)数据来源:以 NET 生物标志物 MPO-DNA 复合体的 GWAS 数据集作为暴露因素,从中筛选可以作为工具变量(instrumental variable, IV)的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)数据。该数据集来源于 Donkel 等^[24]对荷兰鹿特丹研究(the Rotterdam study, RS)的分析结果。RS 研究根据开始时间分为 3 批队列:第 1 批队列(RS-I)始于 1990 年,有 7 983 例参与者;

始于 2000 年的第 2 批队列(RS-II)和始于 2005 年的第 3 批队列(RS-III)则进一步扩大,共有 14 926 例参与者。RS 研究已经通过了伊拉斯谟医学会医学伦理委员会和荷兰卫生、福利、体育部的批准,依据《赫尔辛基宣言》,所有参与者均签署了书面知情同意书。Donkel 等^[24]使用单倍型参考联盟(Haplotype Reference Consortium, HRC)估算的常见的变异基因型,在 RS-I 的 3 514 例参与者和 RS-II 的 2 076 例参与者中进行了 GWAS 分析,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定了外周血 MPO-DNA 复合体水平以反映循环中的 NET 水平,总体人群年龄为(68.8±8.5)岁,男性占 43.4%;在 RS-I 队列中,人群年龄为(72.5±7.0)岁,男性占 42.0%,MPO-DNA 复合体水平为(4.1±0.7)AU/L;在 RS-II 队列中,人群年龄为(64.9±8.0)岁,男性占 45.6%,MPO-DNA 复合体水平为(4.2±0.7)AU/L。利用 Illumina Infinium II HumanHap550 或 610Quad 阵列对参与者约 7 254 867 个全基因组 SNP 进行基因分型。Donkel 等^[24]研究的原始 GWAS 数据集可以通过“MRC-IEU Open GWAS project”或“GWAS Catalog”公开数据库获取。

1.1.2 脓毒症 GWAS 数据来源:脓毒症的诊断依据《疾病和有关健康问题的国际统计分类(第 10 次修订本)》(ICD-10),使用编码 A02、A39、A40、A41 在英国生物样本库(UK biobank)中识别脓毒症相关的 GWAS 数据集,亦可通过“MRC-IEU Open GWAS project”公开数据库获取,依据医院病案统计(hospital episode statistics, HES),脓毒症数据集(ieu-b-4980)包含 11 643 例脓毒症患者和 474 841 例样本库中的其他参与者(对照病例);脓毒症 28 d 死亡数据集(ieu-b-5086)包含 1 896 例在入院 28 d 内死亡的脓毒症患者和 484 588 例样本库中的其他参与者(对照病例);需重症监护的脓毒症数据集(ieu-b-4982)包含 1 380 例需重症监护的脓毒症患者和 429 925 例样本库中的其他参与者(对照病例);需重症监护的脓毒症 28 d 死亡数据集(ieu-b-4981)包含 347 例需重症监护的在 28 d 内死亡的脓毒症患者和 431 018 例样本库中的其他参与者(对照病例)^[25]。纳入人群均为欧洲血统,性别不限,UK biobank 样本库的队列研究已获得英国西北多中心研究伦理委员会批准,依据

《赫尔辛基宣言》,原始研究中的所有参与者均签署了书面知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 孟德尔随机化原理及假设:本研究以 NET 生物标志物 MPO-DNA 复合体作为暴露因素,以脓毒症作为结局因素,以 MPO-DNA 复合体的 SNP 作为遗传变异 IV,采用孟德尔随机化方法探讨 NET 与脓毒症之间的潜在因果关系。孟德尔随机化需满足三大假设^[26]条件(图 1):①筛选的 IV 需与暴露因素 MPO-DNA 复合体密切相关;②筛选的 IV 与导致脓毒症的其他混杂因素不相关;③筛选的 IV 只能通过影响 MPO-DNA 复合体这条唯一途径导致脓毒症的发生,当 IV 通过暴露以外其他途径影响结局时,可认为该遗传变异具有多效性。

1.2.2 IV 的筛选:以 MPO-DNA 复合体作为暴露因素,IV 的筛选条件:①与 MPO-DNA 复合体相关的 SNP 需达到全基因组显著水平($P < 5 \times 10^{-8}$)或提示性关联水平($P < 5 \times 10^{-6}$);②SNP 之间不存在明显的连锁不平衡,即设置连锁不平衡系数 $r^2 < 0.001$,连锁不平衡区域宽度(kb) $> 10\,000$,以保证各 SNP 之间相互独立,将 SNP 逐个输入 PhenoScanner 网站分别筛选并排除多效性对结局的影响;③将 SNP 与结局因素合并,删去与结局因素在全基因组显著相关($P < 5 \times 10^{-8}$)的 SNP,不使用代理 SNP 替代结局中不存在的 SNP;④协调暴露与结局结果数据集,排除具有回文序列的 SNP,然后实施 MR-PRESSO 检验去除离群 SNP;⑤通过 β^2/SE^2 公式(式中 SE 为标准误差)计算 F 值^[27],将 F 值 > 10 作为强相关 IV 的标准,删去弱相关 IV。

1.2.3 孟德尔随机化分析:逆方差加权法(inverse-variance weighted, IVW)作为孟德尔随机化的主要分析方法,结合了从每个 SNP 得到的 Wald 比值的因果

估计值(即回归时不考虑截距项的存在,以 SE^2 的倒数作为权重来进行拟合),采用荟萃分析的方法得到暴露对结局的集合因果效应。在进行 IVW 之前,对协调后的暴露结局数据集进行 Cochran Q 异质性检验, $P < 0.05$ 作为异质性显著标准;如存在异质性则使用随机效应模型 IVW 方法,否则使用固定效应模型 IVW 方法。以 MR Egger 回归法、加权中位数法(weighted median, WM)、加权模型和简单模型作为孟德尔随机化方法的补充,孟德尔随机化因果效应估计结果使用优势比(odds ratio, OR)及其 95% 可信区间(95% confidence interval, 95%CI)表示。

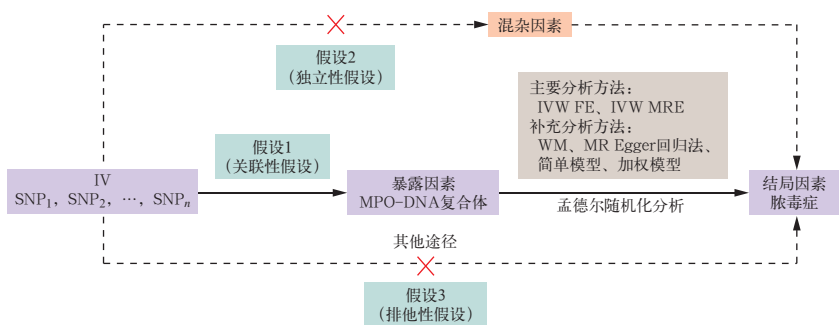
1.2.4 多效性及敏感性分析:除将筛选出的 SNP 逐个带入 PhenoScanner 网站检验并排除与能导致结局的混杂因素相关的 SNP 外,利用 MR Egger 回归截距检验评估潜在多效性,截距项 $P > 0.05$ 表示 IV 不存在水平多效性。使用“leave one out”检验(即留一法检验)进行敏感性分析,逐个剔除 SNP,计算剩余 SNP 的 Meta 效应,观察剔除每个 SNP 后结果是否发生变化;若结果效应变化明显,则说明某个 SNP 对结果的影响较大,原孟德尔随机化结果不稳健。

1.2.5 统计学分析:使用 R 软件(version 4.2.2)中的“MR-PRESSO(version 1.0)”包和“TwoSampleMR(version 0.5.6)”包实现上述统计分析, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPO-DNA 复合体 IV 筛选结果:将 MPO-DNA 复合体相关 GWAS 数据集导入 R 软件,设置全基因组显著水平($P < 5 \times 10^{-8}$)及去连锁不平衡($r^2 < 0.001$, kb $> 10\,000$),未发现与 MPO-DNA 复合体显著相关的 SNP;而在设置提示性关联水平($P < 5 \times 10^{-6}$)和去连锁不平衡筛选后,发现 27 个与暴露 MPO-DNA 复合体相关的 SNP(表 1),与 Donkel 等^[24]的研究结果一致。

将筛选出的 SNP 逐个输入 PhenoScanner 网站,并未发现与脓毒症其他混杂因素相关的 SNP,将上述 27 个 SNP 分别与脓毒症 GWAS 数据集、脓毒症 28 d 死亡 GWAS 数据集、需重症监护的脓毒症 GWAS 数据集、需重症监护的脓毒症 28 d 死亡 GWAS 数据集合并后取交集,结果显示,rs20026539 和 rs1456749 并不被包含在结局变量的 GWAS 数据集中,故弃去;在



注: IV 为工具变量, SNP 为单核苷酸多态性, MPO 为髓过氧化物酶, IVW FE 为固定效应模型逆方差加权法, IVW MRE 为随机效应模型逆方差加权法, WM 为加权中位数法

图 1 孟德尔随机化原理及三大假设

表 1 MPO-DNA 复合体相关 GWAS 数据集中筛选出的复合体 SNP 信息

SNP	基因	染色体 序列	位置	效应等位 基因	其他等位 基因	β 值	SE	P 值	F 值
rs289078	LINC02497	4	31416764	A	T	0.1027	0.0202	3.51×10^{-7}	25.85
rs6448772	LINC02497	4	31410172	T	C	0.1050	0.0206	3.52×10^{-7}	25.98
rs143727003	ATP13A5	3	193098824	T	C	-0.4487	0.0883	3.70×10^{-7}	25.82
rs200265319	MTND5P18	1	238193467	A	C	-0.5514	0.1108	6.53×10^{-7}	24.77
rs454864	LINC02501	4	31447488	A	G	-0.1016	0.0205	7.19×10^{-7}	24.56
rs289075	LINC02501	4	31450380	C	G	0.1009	0.0205	8.36×10^{-7}	24.23
rs9684129	LINC02501	4	31447003	T	C	-0.1010	0.0205	8.40×10^{-7}	24.27
rs289077	LINC02501	4	31450122	A	T	-0.1009	0.0205	8.46×10^{-7}	24.23
rs1456749	LINC02501	4	31445720	T	C	0.1006	0.0205	9.58×10^{-7}	24.08
rs13314784	LARS2	3	45406592	T	C	0.0782	0.0160	9.78×10^{-7}	23.89
rs34201812	LARS2	3	45407535	T	C	0.0782	0.0160	9.98×10^{-7}	23.89
rs410175	LINC02501	4	31478536	A	C	0.0992	0.0203	1.03×10^{-6}	23.88
rs13092994	LARS2	3	45403191	A	G	0.0783	0.0161	1.08×10^{-6}	23.65
rs147802074	KIF26B	1	245448314	T	C	-0.2016	0.0418	1.42×10^{-6}	23.26
rs670594	LINC02501	4	31469713	T	G	0.0988	0.0206	1.62×10^{-6}	23.00
rs454058	LINC02501	4	31461339	A	C	-0.0986	0.0206	1.78×10^{-6}	22.91
rs398050	LINC02501	4	31461995	T	C	0.0982	0.0207	2.02×10^{-6}	22.51
rs6777962	LARS2	3	45405584	T	C	-0.0756	0.0160	2.22×10^{-6}	22.33
rs7656004	LINC02501	4	31463416	T	C	-0.0977	0.0207	2.28×10^{-6}	22.28
rs685128	LINC02501	4	31468822	A	G	-0.0972	0.0206	2.37×10^{-6}	22.26
rs637924	LINC02501	4	31465610	T	C	-0.0969	0.0207	2.80×10^{-6}	21.91
rs10985542	NDUFA8	9	124887090	A	G	-0.0984	0.0210	2.84×10^{-6}	21.96
rs10457220	CDK19	6	110965818	T	C	0.1917	0.0414	3.59×10^{-6}	21.44
rs117539923	CATSPERB	14	92167474	A	G	-0.3353	0.0726	3.90×10^{-6}	21.33
rs67983734	MIR4478	8	76119618	T	C	0.2743	0.0596	4.18×10^{-6}	21.18
rs112514818	CDK19	6	111070814	T	C	-0.1961	0.0427	4.46×10^{-6}	21.09
rs7615041	AC027119.1	3	6027486	A	G	0.0860	0.0187	4.47×10^{-6}	21.15

注：MPO 为髓过氧化物酶，GWAS 为全基因组关联分析，SNP 为单核苷酸多态性，SE 为标准误差

“TwoSampleMR”包中使用“harmonise”函数分别协调暴露结局的数据集，均发现 rs289075、rs289077 和 rs289078 为回文序列 SNP，故弃去。通过 β^2/SE^2 公式计算 F 值，发现暴露 SNP 的 F 值为 21.09 ~ 25.98，未发现弱相关 IV；采用“MR-PRESSO”包对各暴露结局进行离群值分析，均未发现离群 SNP。最终共有 22 个有效 SNP 纳入孟德尔随机化分析。

2.2 MPO-DNA 复合体与脓毒症的关联：MPO-DNA 复合体与脓毒症数据集的 Cochran Q 异质性检验结果显示， $Q=35.08$ 、 $P=0.028$ ，故采用 IVW 随机效应模型进行孟德尔随机化因果关联效应分析。结果显示(图 2, 图 3A)，MPO-DNA 复合体水平每增加 1 个标准差，脓毒症的发生风险上升约 18% ($OR=1.18$, $95\%CI$ 为 1.07 ~ 1.29, $P<0.001$)；用 WM ($OR=1.24$, $95\%CI$ 为 1.11 ~ 1.38, $P<0.001$)、加权模型 ($OR=1.39$, $95\%CI$ 为 1.10 ~ 1.76, $P=0.011$)、简单模型 ($OR=1.26$, $95\%CI$ 为 1.13 ~ 1.40, $P<0.001$) 补充分析结果与 IVW 分析结果一致，但 MR Egger 回归法未发现类似结果 ($OR=1.05$, $95\%CI$ 为 0.82 ~ 1.35, $P=0.690$)。

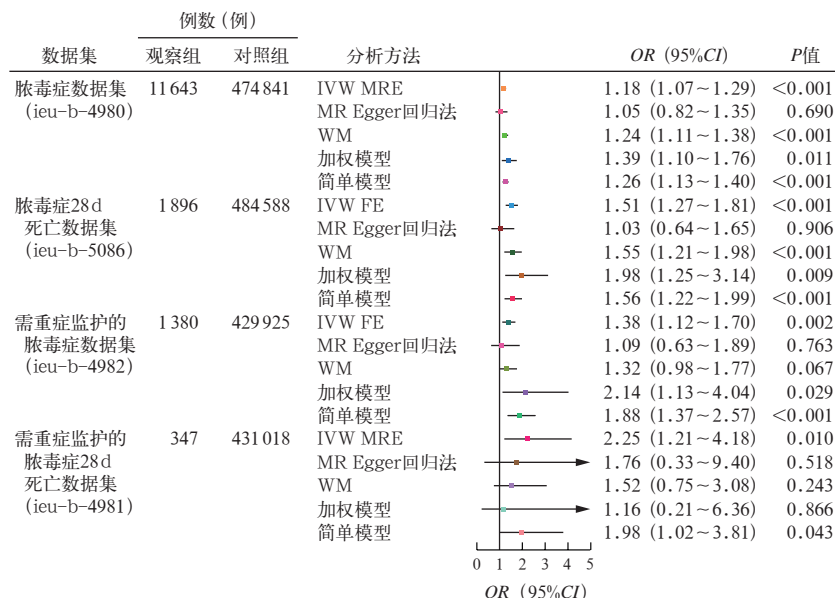
对纳入的 SNP 进行 MR Egger 截距检验，得到截距值为 0.013，截距项 P 值为 0.34，提示 SNP 不存在水平多效性。对纳入的 SNP 进行敏感性分析显示(图 4A)，在去除任一 SNP 后，剩余 SNP 对结局影响的效应区间均在无效线右侧并与总体效应区间相似，表明孟德尔随机化结果稳健。

2.3 MPO-DNA 复合体与脓毒症 28 d 死亡的关联：对 MPO-DNA 复合体与脓毒症 28 d 死亡数据集进行 Cochran Q 异质性检验，结果显示， $Q=12.48$ 、 $P=0.93$ ，故采用 IVW 固定效应模型进行孟德尔随机化因果关联效应分析。结果显示(图 2, 图 3B)，MPO-DNA 复合体水平每增加 1 个标准差，脓毒症患者的 28 d 死亡风险上升约 51% ($OR=1.51$, $95\%CI$ 为 1.27 ~ 1.81, $P<0.001$)；使用 WM ($OR=1.55$, $95\%CI$ 为 1.21 ~ 1.98, $P<0.001$)、加权模型 ($OR=1.98$, $95\%CI$ 为 1.25 ~ 3.14, $P=0.009$)、简单模型 ($OR=1.56$, $95\%CI$ 为 1.22 ~ 1.99, $P<0.001$) 补充分析结果与 IVW 分析结果一致，但 MR Egger 回归法未发现类似结果 ($OR=1.03$, $95\%CI$ 为 0.64 ~ 1.65, $P=0.906$)。对纳入的 SNP 进行 MR

Egger 截距检验,得到截距值为 0.040,截距项 P 值为 0.10,提示 SNP 不存在水平多效性。对纳入的 SNP 进行敏感性分析显示(图 4B),在去除任一 SNP 后,剩余 SNP 对结局影响的效应区间均在无效线右侧并与总体效应区间相似,表明孟德尔随机化结果稳健。

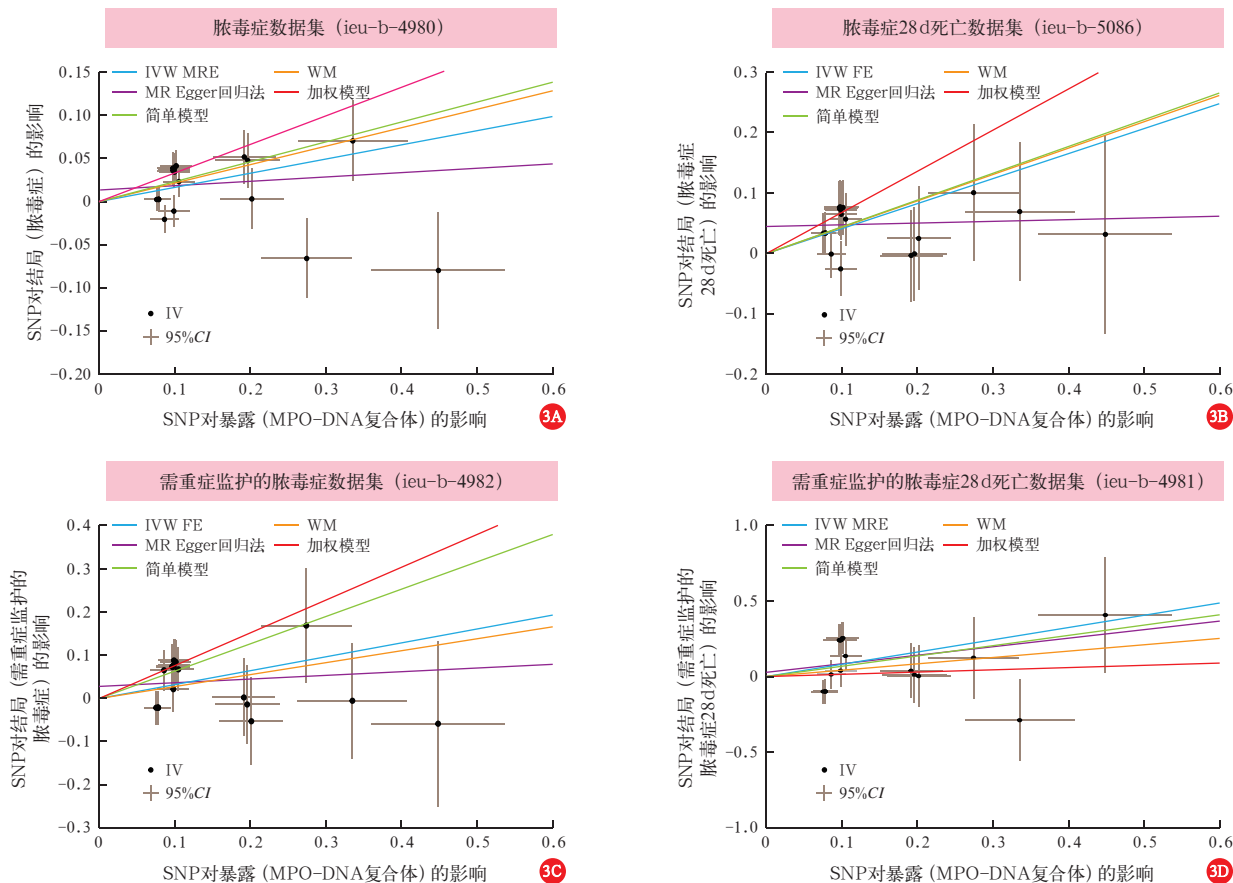
2.4 MPO-DNA 复合体与脓毒症需重症监护的关联:对 MPO-DNA 复合体与需重症监护的脓毒症数据集进行 Cochran Q 异质性检验,结果显示, $Q=18.91$ 、 $P=0.59$,故采用 IVW 固定效应模型进行孟德尔随机化因果关联效应分析。结果显示(图 2,图 3C),MPO-DNA 复合体水平每增加 1 个标准差,脓毒症需重症监护风险上升约 38%($OR=1.38$, $95\%CI$ 为 $1.12 \sim 1.70$, $P=0.002$);使用加权模型($OR=2.14$, $95\%CI$ 为

$1.13 \sim 4.04$, $P=0.029$)、简单模型($OR=1.88$, $95\%CI$ 为 $1.37 \sim 2.57$, $P<0.001$)补充分析结果与 IVW 分



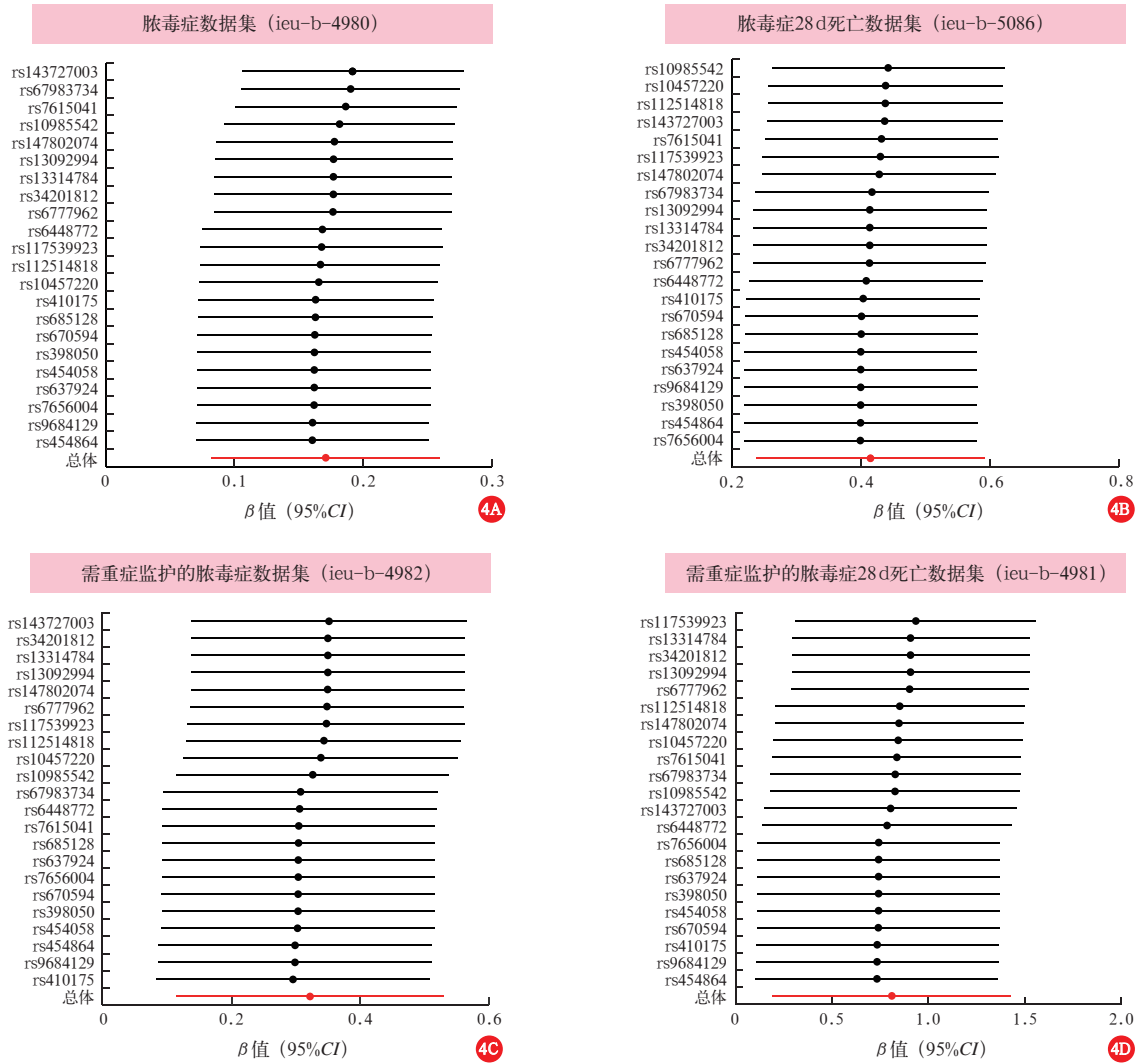
注: MPO 为髓过氧化物酶,IVW MRE 为随机效应模型逆方差加权法,WM 为加权中位数法,IVW FE 为固定效应模型逆方差加权法,OR 为优势比,95%CI 为 95% 可信区间

图 2 MPO-DNA 复合体与脓毒症发生、加重及死亡风险关联的孟德尔随机化森林图



注: MPO 为髓过氧化物酶,SNP 为单核苷酸多态性,IVW MRE 为随机效应模型逆方差加权法,WM 为加权中位数法,IVW FE 为固定效应模型逆方差加权法,IV 为工具变量,95%CI 为 95% 可信区间;斜率>0 代表暴露是结局的不利因素

图 3 MPO-DNA 复合体与脓毒症发生、加重及死亡风险因果效应的孟德尔随机化散点图



注：MPO 为髓过氧化物酶；图中每条黑线反映出去除单个单核苷酸多态性(SNP)后剩余 SNP 合并效应的 β 值及其 95% 可信区间(95%CI),红线为总体合并效应的 β 值及其 95%CI

图 4 MPO-DNA 复合体与脓毒症发生、加重及死亡风险关联的孟德尔随机化敏感性分析

析结果一致,而 MR Egger 回归法 ($OR=1.09$, $95\%CI$ 为 $0.63 \sim 1.89$, $P=0.763$) 和 WM ($OR=1.32$, $95\%CI$ 为 $0.98 \sim 1.77$, $P=0.067$) 未发现类似结果。对纳入的 SNP 进行 MR Egger 截距检验,得到截距值为 0.027 ,截距项 P 值为 0.37 ,提示 SNP 不存在水平多效性。对纳入的 SNP 进行敏感性分析显示(图 4C),在去除任一 SNP 后,剩余 SNP 对结局影响的效应区间均在无效线右侧并与总体效应区间相似,表明孟德尔随机化结果稳健。

2.5 MPO-DNA 复合体与需重症监护的脓毒症 28 d 死亡的关联:对 MPO-DNA 复合体与需重症监护的脓毒症 28 d 死亡数据集进行 Cochran Q 异质性检验,结果显示, $Q=46.46$, $P=0.001$,故采用 IVW 随机效应模型进行孟德尔随机化因果关联效应分析。

结果显示(图 2,图 3D),MPO-DNA 复合体水平每增加 1 个标准差,需重症监护的脓毒症 28 d 死亡风险上升约 125% ($OR=2.25$, $95\%CI$ 为 $1.21 \sim 4.18$, $P=0.010$);使用简单模型 ($OR=1.98$, $95\%CI$ 为 $1.02 \sim 3.81$, $P=0.043$) 补充分析结果与 IVW 分析结果一致,但 MR Egger 回归法 ($OR=1.76$, $95\%CI$ 为 $0.33 \sim 9.40$, $P=0.518$)、WM ($OR=1.52$, $95\%CI$ 为 $0.75 \sim 3.08$, $P=0.243$)、加权模型 ($OR=1.16$, $95\%CI$ 为 $0.21 \sim 6.36$, $P=0.866$) 未发现类似结果。对纳入的 SNP 进行 MR Egger 截距检验,得到截距值为 0.029 ,截距项 P 值为 0.76 ,提示 SNP 不存在水平多效性。对纳入的 SNP 进行敏感性分析显示(图 4D),在去除任一 SNP 后,剩余 SNP 对结局影响的效应区间均在无效线右侧并与总体效应区间相似,表明孟德尔随机化结果稳健。

3 讨论

脓毒症可由不同病原微生物、不同部位感染导致,病理生理机制包括炎症失衡、免疫紊乱、氧化应激、凝血障碍、内分泌失衡等^[28]。上述一系列病理生理改变在脓毒症进展中相互兼夹,使治疗脓毒症趋于复杂,针对脓毒症病理生理机制使用肿瘤坏死因子- α 抗体^[29]、维生素 C 疗法^[30-31]等并不能使所有患者受益,疾病异质性与混杂因素干扰为寻找脓毒症治疗思路及靶点增加了困难。生物表型由遗传基因所决定,孟德尔第二定律指出,染色体减数分裂过程中,等位基因分离、非等位基因自由组合,这种分离、结合过程不受除表型外的混杂因素干扰,因此,将遗传变异作为 IV,通过孟德尔随机化分析方法可规避临床研究中的混杂、偏倚、反向因果关系等的干扰,直接推断暴露因素与结局之间的因果效应关系,为探寻导致脓毒症发生的风险因素提供有力证据^[32]。

Brinkmann 等^[6]在 2004 年发现,活化的中性粒细胞可通过程序性死亡形成 NET, NET 的 DNA 网状骨架结构及镶嵌于上的组蛋白、颗粒组分(MPO 和 NE)、组织蛋白酶 G 等能对微生物起到局限及灭杀作用;但 NET 中直接暴露于细胞外的 DNA 和组蛋白也可直接通过损伤相关分子模式启动并放大炎症级联反应^[5],亦可通过作用于 Toll 样受体 2/4 (Toll-like receptor 2/4, TLR2/4)激活 TLR2/4-核转录因子- κ B 通路^[33]、诱导 M1 型巨噬细胞分化^[34]等途径,加重机体炎症反应。Wang 等^[35]研究发现,NET 可影响 CD4⁺ 细胞代谢重编程,促进调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)分化,成为固有免疫和适应性免疫的“桥梁”,这可能诱导脓毒症免疫麻痹的发生。目前临床研究表明,脓症患者 NET 水平明显升高^[18-21];在脓毒症动物模型中使用 DNA 酶促进 NET 降解后可以明显降低趋化因子、IL-6、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 等促炎因子水平,从而降低动物的死亡率^[36]。但亦有临床研究中未发现 NET 水平与脓毒症预后的关联^[37]。考虑到脓毒症本身存在较大的异质性,本研究从遗传变异角度出发,利用孟德尔随机化方法分析 NET 与脓毒症的因果效应。

MPO-DNA 复合体是 NET 的重要组分。本研究使用基于 Donkel 等^[24]对 RS 分析结果的 MPO-DNA 复合体的 GWAS 数据集,以 MPO-DNA 复合体作为暴露因素,以来源于 UK biobank 样本库中识别脓毒

症的相关 GWAS 数据集作为结局因素。从暴露中筛选的 IV 需满足孟德尔随机化研究关联性、独立性、排他性三大假设,本研究在全基因组显著性水平($P < 5 \times 10^{-8}$)上未发现与 MPO-DNA 复合体相关的 SNP,继而以 $P < 5 \times 10^{-6}$ 筛选得到 27 个 SNP,且各 SNP 之间不存在连锁不平衡,使用 PhenoScanner 网站对筛选的 SNP 进行逐一审查,未发现与能导致脓毒症的其他混杂因素相关的 SNP,将 27 个 SNP 与脓毒症及其亚组 GWAS 数据集经过取交集并弃去与脓毒症在全基因组显著相关的 SNP、同方向校正并弃去回文序列 SNP、去离群值、去弱相关 IV 等步骤后,得到 22 个“SNP—暴露—结局”数据,并纳入孟德尔随机化分析。采用孟德尔随机化主要分析方法 IVW 分析结果显示,随着 MPO-DNA 复合体水平升高,脓毒症、脓毒症 28 d 死亡、因脓毒症需重症监护、需重症监护的脓毒症 28 d 死亡的发生风险均明显升高,且可能随着脓毒症病程延长而逐渐加重,这种因果效应表现也逐渐明显, MPO-DNA 复合体水平每增加 1 个标准差,脓症患者 28 d 死亡风险增加约 51% ($OR = 1.51$, 95%CI 为 1.27 ~ 1.81, $P < 0.001$),需重症监护的脓毒症 28 d 死亡风险增加约 125% ($OR = 2.25$, 95%CI 为 1.21 ~ 4.18, $P = 0.010$);但是在 4 组数据集的 MR Egger 回归分析中均未发现 MPO-DNA 复合体与结局之间的因果效应,不排除具有水平多效性的 SNP 的影响,故对 4 组数据分别进行 MR Egger 截距检验,结果显示,4 组截距均小于 0.05 且均 $P > 0.05$,提示不存在水平多效性,仍可采用 IVW 分析结果;敏感性分析结果亦提示孟德尔随机化结果稳健。

综上所述,本研究基于孟德尔随机化分析结果得出结论,循环中 NET 升高可能会增加脓毒症的发生风险(或因感染、损伤等因素进展至脓毒症)。本研究亦有不足之处:① 由于 NET 是由 DNA 骨架、组蛋白、颗粒酶(MPO 和 NE)等多组分架构形成的网状结构,Donkel 等^[24]亦只能通过测量 MPO-DNA 复合体水平间接反映 NET 水平,因此目前尚无直接针对 NET 的 GWAS 数据;② Donkel 等^[24]的 GWAS 数据是基于对 RS 的分析结果,最终纳入分析的人群仅 5 590 例,样本量较少,这可能是导致未能发现与 MPO-DNA 复合体在全基因组显著性水平相关的 SNP 的原因,期待与 NET 相关的具有更大样本量的 GWAS 研究;③ 对于脓毒症结局的数据更倾向于细菌感染导致的脓毒症,而真菌、病毒等感染或创伤等均为

影响 NET 和导致脓毒症发生的始动因素,采取多变量孟德尔随机化分析方法或许能进一步完善本研究的结论。

4 结论

本研究基于孟德尔第二定律,从基因角度,以遗传变异为 IV,采用孟德尔随机化分析方法得出 NET 升高与脓毒症的发生发展之间存在因果关联,与前期临床研究结果一致,或可为临床治疗或预防脓毒症提供“针对 NET 的靶向治疗或许可以改善脓毒症发生或死亡结局”的假设,但仍需进一步开展临床试验对该假设进行证实或证伪。

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] Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update [J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44 (6): 925-928. DOI: 10.1007/s00134-018-5085-0.
- [3] Lu J, Wang X, Chen QH, et al. The effect of early goal-directed therapy on mortality in patients with severe sepsis and septic shock: a meta-analysis [J]. *J Surg Res*, 2016, 202 (2): 389-397. DOI: 10.1016/j.jss.2015.12.048.
- [4] CHinese Epidemiological Study of Sepsis (CHES) Study Investigators. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48 (3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- [5] Daniel C, Leppkes M, Muñoz LE, et al. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15 (9): 559-575. DOI: 10.1038/s41581-019-0163-2.
- [6] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
- [7] 房雨莹, 俞海国. 中性粒细胞外陷阱在风湿性疾病中的研究进展 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2022, 37 (18): 1438-1440. DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20210407-00403.
- [8] 王仲杰, 程忠平. 中性粒细胞外陷阱与肿瘤的研究进展 [J]. *肿瘤学杂志*, 2020, 26 (1): 58-61. DOI: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.01.B013.
- [9] 张陆陆, 蒋安, 王辉, 等. 中性粒细胞外陷阱在缺血性脑卒中中的作用的研究进展 [J]. *中华神经科杂志*, 2022, 55 (10): 1169-1175. DOI: 10.3760/cma.j.cn113694-20220303-00155.
- [10] 张婷, 高伟伟, 陈晴, 等. 中性粒细胞外陷阱在脑梗死发病机制中的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36 (12): 2695-2701. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.12.043.
- [11] 李飞, 周静, 张鹏, 等. 中性粒细胞外陷阱在急性心肌梗死或稳定型心绞痛患者血运重建中的作用 [J]. *河北医药*, 2018, 40 (24): 3791-3794. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2018.24.028.
- [12] 郭轩彤, 马丽红. 中性粒细胞外陷阱在血栓形成中的作用及研究进展 [J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18 (11): 1044-1051. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2020.11.017.
- [13] 陈雨薇, 陈薇薇, 陈影, 等. 中性粒细胞外陷阱在脓毒症相关性凝血功能障碍中的作用研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (2): 198-201. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210221-00264.
- [14] 张芳晓, 章志丹, 马晓春. 中性粒细胞外陷阱与脓毒症凝血功能障碍的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (8): 752-755. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.08.017.
- [15] 黄雨朦, 姬倩, 朱艳艳, 等. 外周血中 5-羟色胺通过诱导中性粒细胞外陷阱网生成加重脓毒症小鼠肺损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (12): 1423-1427. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210427-00625.
- [16] 蒋静, 穆盛田, 张芳晓, 等. 肝素预处理对脓毒症小鼠血清及肺组织中中性粒细胞外陷阱网水平的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (4): 337-341. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.010.
- [17] 乔艳婷, 蒋静, 章志丹, 等. 肝素减轻中性粒细胞外陷阱网诱导的内皮细胞损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (4): 342-346. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.011.
- [18] 王朝晖, 魏繁, 李玉中. 中性粒细胞外陷阱在细菌性脓毒症中的作用 [J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29 (4): 418-422. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201704010.
- [19] 唐颖, 黄元平, 荆文花, 等. 头孢哌酮钠舒巴坦钠对反复下呼吸道感染患者中性粒细胞外陷阱形成的影响 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43 (3): 607-610. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20170327.
- [20] 张芳晓, 章志丹, 马晓春. 脓症患者中性粒细胞外陷阱网的水平及临床意义: 附一项前瞻性观察性研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (2): 122-126. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.006.
- [21] 高飞, 惠皎洁, 杨岚, 等. 中性粒细胞功能在脓毒症肝损伤中的变化及其对预后的影响: 一项前瞻性观察性研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (11): 1324-1329. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.11.003.
- [22] Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? [J]. *Int J Epidemiol*, 2003, 32 (1): 1-22. DOI: 10.1093/ije/dyg070.
- [23] Emdin CA, Khera AV, Kathiresan S. Mendelian randomization [J]. *JAMA*, 2017, 318 (19): 1925-1926. DOI: 10.1001/jama.2017.17219.
- [24] Donkel SJ, Portilla Fernández E, Ahmad S, et al. Common and rare variants genetic association analysis of circulating neutrophil extracellular traps [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 615527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.615527.
- [25] Hamilton FW, Thomas M, Arnold D, et al. Therapeutic potential of IL6R blockade for the treatment of sepsis and sepsis-related death: a Mendelian randomisation study [J]. *PLoS Med*, 2023, 20 (1): e1004174. DOI: 10.1371/journal.pmed.1004174.
- [26] Davies NM, Holmes MV, Davey Smith G. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians [J]. *BMJ*, 2018, 362: k601. DOI: 10.1136/bmj.k601.
- [27] Li B, Martin EB. An approximation to the *F* distribution using the chi-square distribution [J]. *Comput Stat Data Anal*, 2002, 40 (1): 21-26. DOI: 10.1016/S0167-9473(01)00097-4.
- [28] 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.
- [29] NORASEPT II Study Group. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock [J]. *Lancet*, 1998, 351 (9107): 929-933. DOI: 10.1016/S0140-673(00)80009-4.
- [30] 贺丽玲, 闫新明. 维生素 C 辅助治疗脓毒症研究进展 [J]. *医药导报*, 2022, 41 (7): 1004-1007. DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2022.07.013.
- [31] LOVIT Investigators and the Canadian Critical Care Trials Group. Intravenous vitamin C in adults with sepsis in the intensive care unit [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386 (25): 2387-2398. DOI: 10.1056/NEJMoa2200644.
- [32] Russell JA, Meyer NJ, Walley KR. Use of Mendelian randomization to better understand and treat sepsis [J]. *Intensive Care Med*, 2022, 48 (11): 1638-1641. DOI: 10.1007/s00134-022-06778-y.
- [33] Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis [J]. *Science*, 2015, 349 (6245): 316-320. DOI: 10.1126/science.aaa8064.
- [34] Song C, Li HT, Li Y, et al. NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382 (2): 111486. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.06.031.
- [35] Wang H, Zhang HJ, Wang Y, et al. Regulatory T-cell and neutrophil extracellular trap interaction contributes to carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2021, 75 (6): 1271-1283. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.07.032.
- [36] Luo LT, Zhang S, Wang YZ, et al. Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307 (7): L586-L596. DOI: 10.1152/ajplung.00365.2013.
- [37] Hoppenbrouwers T, Boeddha NP, Ekinci E, et al. Neutrophil extracellular traps in children with meningococcal sepsis [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2018, 19 (6): e286-e291. DOI: 10.1097/PCC.0000000000001496.

(收稿日期: 2023-01-17)
(责任编辑: 孙茜 张耘菲)