

基于蛋白质组测序挖掘导致脓毒症患者肌少症的潜在原因

蒋安琪¹ 梁笑辉¹ 尤勇¹ 许芸¹ 吴姝韵¹ 王刚¹ 钱苏皖¹ 傅昱² 虞文魁¹

¹南京大学医学院附属鼓楼医院重症医学科, 南京 210008; ²南京中医药大学鼓楼临床医学院(南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京鼓楼医院)重症医学科, 南京 210008

通信作者: 虞文魁, Email: yudrnj@163.com

【摘要】 目的 基于蛋白质组测序分析脓毒症患者肌少症发生发展的潜在原因, 为脓毒症等重症感染状态下肌少症的早期干预治疗寻找潜在靶点。**方法** 肌肉样本来源于南京大学医学院附属鼓楼医院重症医学科住院的 2 例行清创治疗的严重创伤并发脓毒症患者(脓毒症组)和骨科进行开创手术的 2 例非脓毒症患者(对照组), 均通过常规活检操作获取。通过苏木素-伊红(HE)染色光镜下观察肌肉组织形态; 透射电镜下观察肌肉组织线粒体状态。进一步对肌肉组织进行蛋白质组测序, 比对和分析差异表达蛋白, 以差异表达比值大于 1.5 且 $P < 0.05$ 作为显著上调表达的变化阈值, 差异倍数小于 -0.67 且 $P < 0.05$ 作为显著下调表达的变化阈值, 并对差异表达蛋白进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果** 与对照组相比, 脓毒症组光镜下观察显示肌肉明显萎缩, 肌纤维横截面积明显减小(μm^2 : $2\,291.77 \pm 807.77$ 比 $4\,570.29 \pm 1\,687.53$, $P < 0.05$); 电镜下显示肌纤维线粒体水肿、空泡化, 正常线粒体的比例显著下降[(16.8 ± 10.0)% 比 (94.4 ± 3.2)%, $P < 0.05$]。基于蛋白质组测序, 与对照组比较, 脓毒症组有 171 个显著差异表达蛋白, 其中 122 个蛋白表达显著上调, 49 个蛋白表达显著下调。GO 分析显示, 与对照组相比, 脓毒症组显著上调差异表达蛋白的前 10 个富集条目主要集中在对刺激的响应, 以及生物膜相关过程或活动等方面, 包括膜的组成部分、膜的固有成分、刺激的检测、生物刺激的检测、对营养物质的响应、内质网膜、内质网亚室、外部生物刺激的检测、核外膜-内质网膜网络、活性氧代谢过程的调控; 显著下调差异表达蛋白的前 10 个富集条目主要集中在催化和代谢过程, 包括 10-甲酰四氢叶酸分解代谢过程、含叶酸的化合物分解代谢过程、含蝶啶的化合物分解代谢过程、10-甲酰四氢叶酸代谢过程、氧化还原酶活性(作用于供体的 CH-NH 基团, 以 NAD 或 NADP 作为受体)、氧化还原酶活性(作用于供体的 CH-NH 基团)、叶酸复合物代谢过程、细胞修饰的氨基酸分解代谢过程、二羧酸分解过程、四氢叶酸代谢过程, 这些提示脓毒症患者肌肉组织中差异蛋白主要在生物刺激的感知、营养物质代谢等过程显著富集。生物学通路相关的 KEGG 分析显示, 与对照组相比, 脓毒症组差异表达蛋白的前 10 个富集条目主要集中在对毒性物质的失活, 以及免疫相关过程或活动等方面, 包括过氧化物酶体、矿物质吸收、核转录因子- κB 信号通路、甲型流感、炎症性肠病、核细胞质运输、弓形虫病、单纯疱疹病毒 1 型感染、铁死亡、利什曼病, 表现为脓毒症患者肌肉组织中过氧化物酶体显著激活, 矿物质吸收活性显著减低, 核转录因子- κB 信号通路显著活化。**结论** 脓毒症时线粒体功能异常导致代谢紊乱可能是引发肌少症的关键因素, 靶向改善线粒体功能以恢复肌肉代谢稳态是改善脓毒症等重症背景下肌少症的潜在治疗措施。

【关键词】 脓毒症; 肌少症; 线粒体; 蛋白质组学; 功能障碍

基金项目: 江苏省南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK23099)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241202-00980

Exploring the potential causes of sarcopenia in sepsis patients based on proteome sequencing

Jiang Anqi¹, Liang Xiaohui¹, You Yong¹, Xu Yun¹, Wu Shuyun¹, Wang Gang¹, Qian Suwan¹, Fu Yu², Yu Wenkui¹

¹Department of Critical Care Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Jiangsu 210008, China; ²Department of Critical Care Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu 210008, China

Corresponding author: Yu Wenkui, Email: yudrnj@163.com

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanisms underlying the occurrence and development of sarcopenia in clinical sepsis patients based on proteomic sequencing, and to identify potential targets for early intervention and treatment of sarcopenia in severe infectious states such as sepsis. **Methods** Muscle samples were obtained from two severe trauma patients with sepsis who underwent debridement treatment (sepsis group) hospitalized in the department of critical care medicine of Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, and two non-sepsis patients who underwent open surgery (control group) in the department of orthopedics. Both were obtained through routine biopsy procedures. The morphology of muscle tissue was observed under a light microscope using hematoxylin-eosin (HE) staining; mitochondrial status in muscle tissue was observed under transmission electron microscopy. Further proteomic sequencing of muscle tissue was performed to compare and analyze proteins with

significantly differentially expressed proteins. A threshold of fold change > 1.5 and $P < 0.05$ was set for significantly upregulated proteins, and fold change < -0.67 with $P < 0.05$ for significantly downregulated proteins. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were conducted on the significantly differentially expressed proteins. **Results** Compared with the control group, the sepsis group showed significant muscle atrophy under light microscopy, with a markedly reduced cross-sectional area of muscle fibers (μm^2 : $2\,291.77 \pm 807.77$ vs. $4\,570.29 \pm 1\,687.53$, $P < 0.05$). Electron microscopy revealed mitochondrial edema, vacuolization, and a decreased proportion of normal mitochondria [$(16.8 \pm 10.0)\%$ vs. $(94.4 \pm 3.2)\%$, $P < 0.05$]. Compared with the control group, proteomic sequencing identified 171 significantly differentially expressed proteins in the sepsis group, including 122 significantly upregulated and 49 significantly downregulated proteins. GO analysis indicated that the top 10 enriched terms for upregulated significantly differentially expressed proteins were primarily related to response to stimulus and membrane-associated processes, including integral component of membrane, intrinsic component of membrane, detection of stimulus, detection of biotic stimulus, response to nutrient, endoplasmic reticulum membrane, endoplasmic reticulum subcompartment, detection of external biotic stimulus, nuclear outer membrane- endoplasmic reticulum membrane network and regulation of reactive oxygen species metabolic process. The top 10 enriched terms for downregulated significantly differentially expressed proteins were mainly associated with catalytic and metabolic processes, including 10-formyltetrahydrofolate catabolic process, folic acid-containing compound catabolic process, pteridine-containing compound catabolic process, 10-formyltetrahydrofolate metabolic process, oxidoreductase activity (acting on the CH-NH group of donors, NAD or NADP as receptors), oxidoreductase activity (acting on the CH-NH group of donors), folic acid-containing compound metabolic process, cellular modified amino acid catabolic process, dicarboxylic acid catabolic process and tetrahydrofolate catabolic process. These findings suggest that differentially expressed proteins in sepsis patients are significantly enriched in processes such as perception of biological stimuli and nutrient metabolism. KEGG pathway analysis revealed that the top 10 enriched pathways for differentially expressed proteins were mainly involved in detoxification and immune-related processes, including peroxisome, mineral absorption, nuclear factor- κB signaling pathway, influenza A, inflammatory bowel disease, nucleocytoplasmic transport, toxoplasmosis, herpes simplex virus 1 infection, ferroptosis and Leishmaniasis, indicating significant activation of peroxisomes and the nuclear factor- κB signaling pathway, and reduced mineral absorption activity in sepsis muscle tissue. **Conclusions** Mitochondrial dysfunction-induced metabolic disorders may be a key factor in sarcopenia during sepsis. Targeting mitochondrial function to restore muscle metabolic homeostasis represents a potential therapeutic strategy for sarcopenia in severe conditions such as sepsis.

[Key words] Sepsis; Sarcopenia; Mitochondria; Proteomics; Dysfunction

Fund program: Nanjing Health Technology Development Special Fund Project of Jiangsu Province (YKK23099)

DOI: 10.3760/cma.j.cn.121430-20241202-00980

脓毒症是一种危及生命的感染并发症,临床表现为宿主对感染反应失调引发的多器官功能障碍。在全球范围内,脓毒症的发病率居高不下,其治疗一直是临床亟待解决的难题^[1]。器官功能障碍是导致脓症患者死亡的主要原因,发生功能障碍的器官每增加 1 个,患者病死率将增加 15%~20%^[1-2]。肌少症在脓症患者中的发生率超过 60%,合并肌少症的患者病死率明显升高,与预后不良密切相关^[2]。肌少症主要表现为肌肉萎缩和力量下降,这会显著增加脓毒症等重症感染患者发生多器官功能障碍的风险,例如:在急性期内,脓毒症引发的呼吸肌无力或膈肌萎缩导致患者脱机拔管困难,进而增加患者的呼吸机依赖性和呼吸衰竭复发率,最终延长住院时间,并增加院内病死率^[3];慢性期则会导致患者残疾率增加,降低生活质量并增加长期病死率^[4];心肌萎缩则会导致心功能不全并增加心力衰竭的发生率^[5]。因此,挖掘肌少症的关键靶点并进行早期干预治疗是改善脓症患者预后的关键。

肌少症本质上是由肌肉组织中蛋白质合成与分解过程不平衡所导致;而氧化应激和炎症等是引发肌少症的关键因素。目前临床上主要通过外源性补充营养来试图减缓肌少症的发展或改善肌少症^[6],其他治疗策略主要针对抗炎、抗氧化、促进蛋白质合成、抑制蛋白质分解、促进肌肉再生等方面,包括药物治疗、基因治疗等^[7],但尝试的多种外源性治疗措施并未获得显著的临床疗效。目前针对脓毒症合并肌少症的临床治疗仅停留在探索尝试阶段,造成上述困境的一个重要原因在于脓毒症状态下肌少症发生发展的病理生理学机制了解不全,因此尚无有效的针对性治疗策略。

临床针对脓症患者发生肌少症的治疗需要综合考虑患者的代谢特点、炎症状态和个体化需求等多方面因素^[8]。脓毒症动物模型的构建和相关研究已经极大地提升了我们对脓毒症模型下肌少症发生发展的认识。然而,动物毕竟与人存在诸多不同,无法完全模拟人类系统的复杂情况,加之脓毒症患者的个体异质性,以及基础疾病的多样性和复杂性,

进而造成使用脓毒症动物模型获得的观点和结论很大程度上偏离了真实患者背景下的生物学情景。所以,我们迫切需要探究脓症患者肌少症的分子机制以提高对肌少症的认识和治疗。本研究拟对脓症患者肌肉组织进行蛋白质组学分析,以期阐明肌少症发生过程中蛋白分子表达及信号通路的变化情况,为脓毒症等重症感染情况下的肌少症早期干预治疗提供新的思路 and 理论依据。

1 资料与方法

1.1 样本来源与伦理:本研究使用的肌肉样本由南京大学医学院附属鼓楼医院重症医学科和骨科临床专业医生通过常规活检操作获取。脓毒症组肌肉组织(标记为脓毒症组 1 和脓毒症组 2)来源于重症医学科住院的 2 例严重创伤并发脓毒症需清创治疗的患者,对照组肌肉组织(标记为对照组 1 和对照组 2)来源于骨科进行开创手术的 2 例非脓毒症患者。每位患者收集到 2 份肌肉样品(400~500 mg),其中一份组织样本基于实验需求进行预处理,并分别储存在液氮、电镜固定液和 4% 多聚甲醛固定液中,用于后续实验。

本研究获得南京大学医学院附属鼓楼医院临床研究伦理委员会批准(审批号:2023-427-02),遵循《赫尔辛基宣言》原则,征得受试者的知情同意。

1.2 肌肉组织表型评估:将经过 4% 多聚甲醛固定 48 h 以上的肌肉组织送上海瑞雨生物科技有限公司进行后续测试服务,包括石蜡包埋、切片(片厚 4 μm)、二甲苯脱蜡、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、光镜下观察,使用 Image J 软件测量和评估肌纤维横截面积。

1.3 肌肉组织线粒体状态评估:从电镜固定液中取出肌肉组织样本,进一步使用 2.5% 戊二醛固定液固定 2~4 h,经 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0)漂洗,再经 1% 钨酸-0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0)固定 1~3 h,重复 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液漂洗;固定好的肌肉组织用浓度递增(50%、70%、80%、90%、95%、100%、100%)的乙醇溶液进行处理,并用 100% 丙酮脱水 20 min;然后使用不同配比的丙酮:SPURR 包埋剂溶液进行渗透处理。最后经 70 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱聚合 24 h 后,使用 Reichert-Jung Ultra III 超微切片机制备 60~80 nm 厚的超薄切片,经铀-铅双染后置于室温干燥过夜,透射电镜下观察并扫描成像。

1.4 蛋白质组文库构建及测序:蛋白质组学的文库构建及测序服务由南京江北新区生物医药公共

服务平台完成。使用 8 mol/L 尿素裂解液提取肌肉组织中总蛋白,震荡破碎(65 Hz、60 s,重复 3 次),并于低温下裂解 30 min 后 14 000 $\times g$ 离心 30 min,保留上清,进行蛋白定量。使用二硫苏糖醇和碘乙酰胺对上述蛋白溶液进行还原烷基化,然后用 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液将样本中尿素浓度稀释至 2 mol/L 以下,并用胰酶溶液(1:100)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下孵育酶解 16 h,除盐后在真空下冷冻干燥。将适量肽段粉末复溶于 0.1% 甲酸溶液,用 EASY-nLC 1200 超高效液相系统进行洗脱分析。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液。肽段经洗脱电离后串联至 Thermo Scientific Q ExactiveTM HF-X 质谱仪进行分析。数据采集模式为数据非依赖型采集(data independent acquisition, DIA),参数设置为默认。

1.5 蛋白质组学分析:样本的肽段结果使用蛋白质组学数据处理软件 DIA-NN(v1.8.1)进行检索,检索参数设置为默认,其中数据库使用人源的 uniprot_human_UP000005640 作为参考。采用主成分分析(principal components analysis, PCA)、相对标准差(relative standard deviation, RSD)和 Pearson 相关性评估蛋白定量在组内的重复性,最终以显著差异蛋白的分层聚类热图呈现组内样本间的重复性。采用 Spectronaut 15.0 蛋白质组学软件对 DIA 数据进行分析,并选择默认参数。其中蛋白质定性标准设置错误发现率(false discovery rate, FDR)的先验阈值和蛋白阈值均为 1.0%。采用小于 1.0% 的 FDR 对应的前 3 个肽段的峰面积平均值对蛋白的分组进行定量。对于被过滤的峰面积数据及未检测到的数据,其结果用数值 0.1 进行填充,以便于后续统计分析。每个样本的数据进行中位数标准化后,对鉴定到的蛋白进行统计检验。

1.6 统计学分析:采用 Prism Graph 9.0 软件进行组间表型的统计分析。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用双侧 Student *t* 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。组间蛋白定量比较的显著性水平使用 Student *T* 检验进行评估,其中,以差异表达比值大于 1.5 且 $P<0.05$ 作为显著上调表达的变化阈值,差异倍数小于 -0.67 且 $P<0.05$ 作为显著下调表达的变化阈值,且以 \log_2 (倍数改变)的形式进行表示。基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析中的

差异显著性均使用 Fisher 精确检验进行评估,且以 $-\log_{10}(P \text{ 值})$ 的形式进行表示。

2 结果

2.1 患者基本信息: 2 例脓毒症患者(脓毒症组)和 2 例非脓毒症患者(对照组)均为男性,基本信息见表 1。

表 1 不同肌肉样本来源患者的基线特征

组别	样本标号	年龄(岁)	性别	感染部位	活检时病程(d)
脓毒症组	脓毒症组 1	27	男性	肺部	3
	脓毒症组 2	22	男性	腹腔	4
对照组	对照组 1	61	男性		
	对照组 2	55	男性		

注:空白代表无此项

2.2 脓毒症患者肌肉明显萎缩且肌肉组织中线粒体发生异常: HE 染色显示,脓毒症组肌肉明显萎缩(图 1),且肌纤维横截面积显著低于对照组(μm^2 : $2\,291.77 \pm 807.77$ 比 $4\,570.29 \pm 1\,687.53$, $P < 0.05$),提示脓毒症患者发生了肌少症。电镜下观察发现,脓毒症组肌肉细胞中线粒体水肿、空泡化(图 2),正常线粒体的比例显著低于对照组[(16.8 ± 10.0)% 比 (94.4 ± 3.2)%, $P < 0.05$],表明脓毒症患者肌肉组织中线粒体发生了异常。

2.3 脓毒症组与对照组相比显著差异表达的蛋白: 基于检测到的 2 349 个蛋白表达量的聚类分析显示,脓毒症组与对照组明显分开(图 3A),表明组内样本的重复性良好。进一步结合显著性水平的截断值设定,与对照组相比,脓毒症组有 171 个差异表达蛋白,其中 122 个蛋白表达显著上调,49 个蛋白表达显著下调(图 3B)。

2.4 显著差异表达蛋白的 GO 分析结果: GO 分析显示,与对照组相比,脓毒症组显著上调表达差异蛋白的前 10 个富集条目主要集中在对刺激的响应,以及生物膜相关过程或活动等方面,包括膜的组成部分、膜的固有成分、刺激的检测、生物刺激的检测、对营养物质的响应、内质网膜、内质网亚室、外

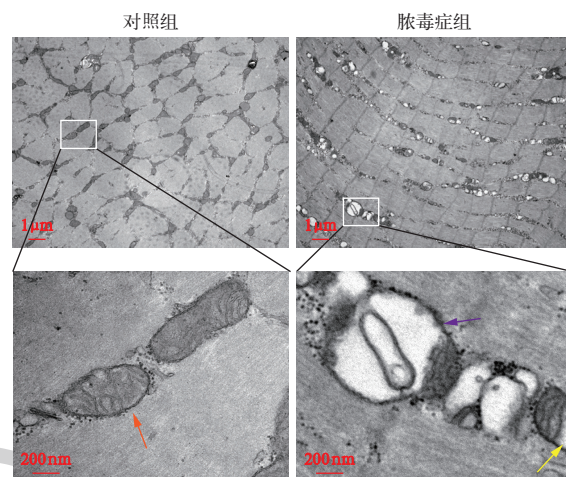


图 2 透射电镜下观察各组患者肌肉组织中线粒体改变与对照组比较,脓毒症组肌纤维细胞线粒体损伤,线粒体水肿、空泡化;橙色箭头所示线粒体正常状态,黄色箭头所示线粒体水肿状态,紫色箭头所示线粒体空泡化状态;下图为上图($\times 10\,000$)局部放大 200 倍后的图,以突出线粒体的形态差异

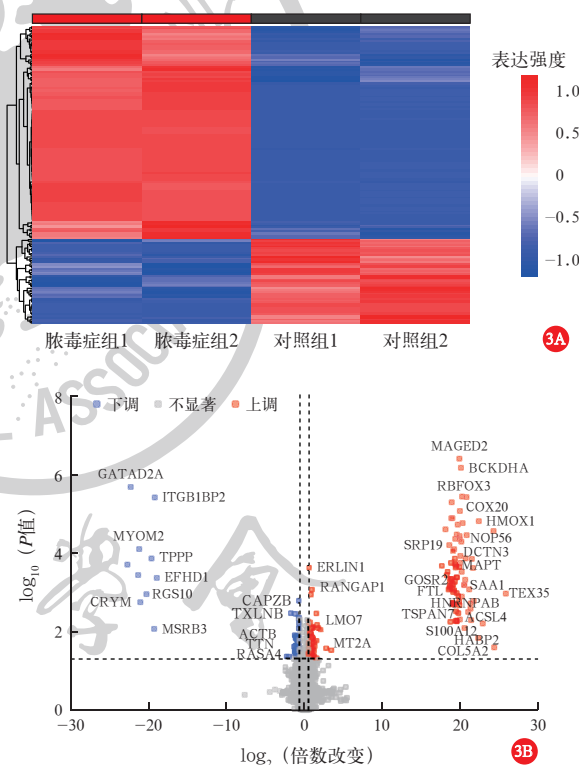


图 3 脓毒症组与对照组患者相比肌肉组织中差异表达蛋白的分层聚类热图(A)和火山图(B)

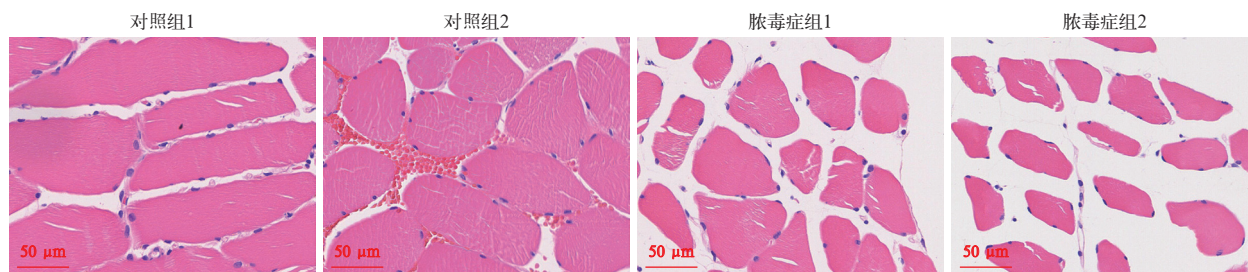
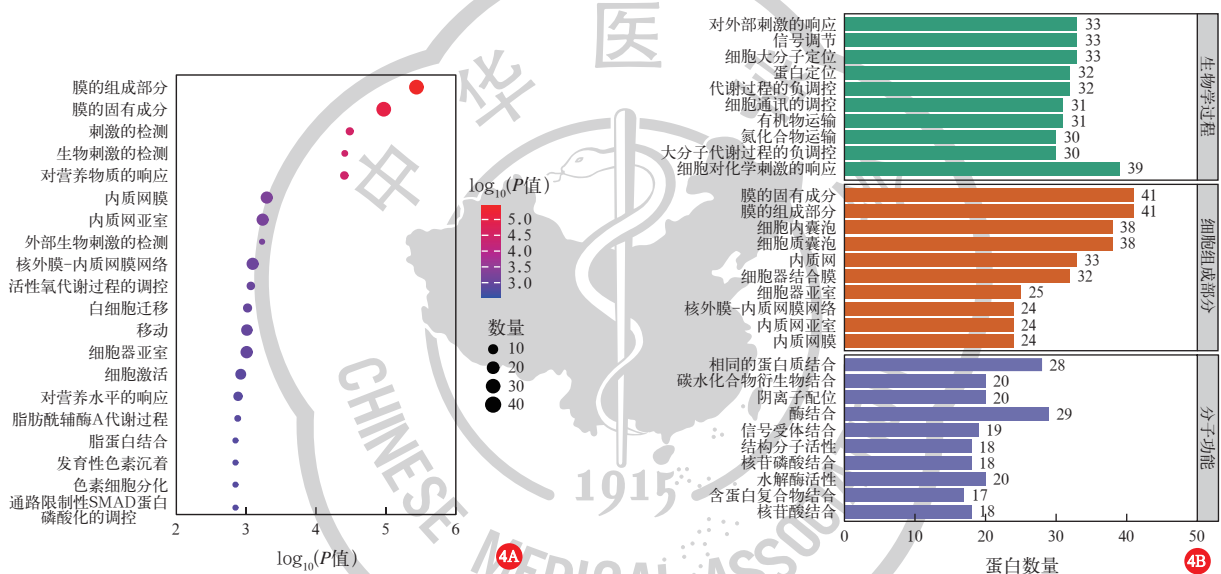


图 1 光镜下观察各组患者肌肉组织改变情况 与对照组比较,脓毒症患者肌纤维明显萎缩 苏木素-伊红(HE)染色 低倍放大

部生物刺激的检测、核外膜-内质网膜网络、活性氧代谢过程的调控,提示脓毒症患者自发地提升了肌肉组织中对内部或外部刺激的响应性,以及生物膜相关行为或活动的活跃性(图 4);显著下调表达差异蛋白的前 10 个富集条目主要集中在催化和代谢过程,包括 10-甲酰四氢叶酸分解代谢过程、含叶酸的化合物分解代谢过程、含蝶啶的化合物分解代谢过程、10-甲酰四氢叶酸代谢过程、氧化还原酶活性(作用于供体的 CH-NH 基团,以 NAD 或 NADP 作为受体)、氧化还原酶活性(作用于供体的 CH-NH 基团)、叶酸复合代谢过程、细胞修饰的氨基酸分解代

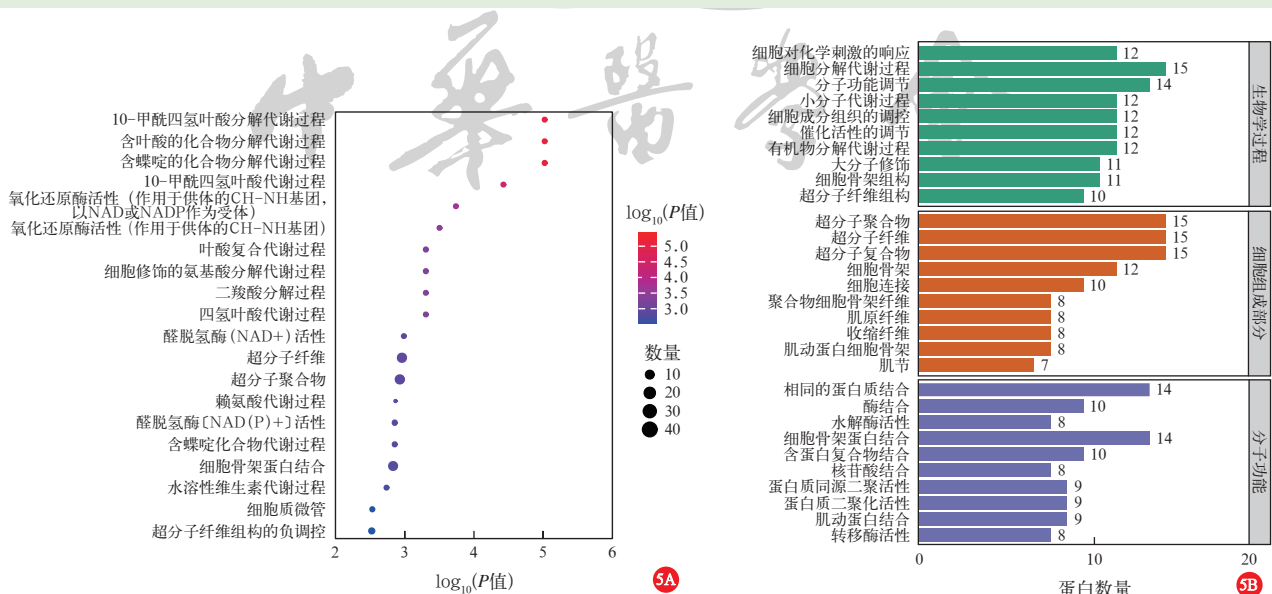
谢过程、二羧酸分解过程、四氢叶酸代谢过程,提示脓毒症引发患者主动下调了多个代谢相关的生物学过程,尤其与四氢叶酸和氧化还原酶相关的(图 5)。

2.5 显著差异表达蛋白的 KEGG 分析结果(图 6): KEGG 富集分析结果显示,与对照组相比,脓毒症组差异表达蛋白的前 10 个富集条目主要集中在对毒性物质的失活,以及免疫相关过程或活动等方面,包括过氧化物酶体、矿物质吸收、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路、甲型流感、炎症性肠病、核细胞质运输、弓形虫病、单纯疱疹病毒 1 型感染、铁死亡、利什曼病,提示脓毒症患者肌肉



注: A 为 GO 功能条目的显著性水平; B 为 3 大类生物学作用(生物学过程、细胞组成部分和分子功能)条目的蛋白数量

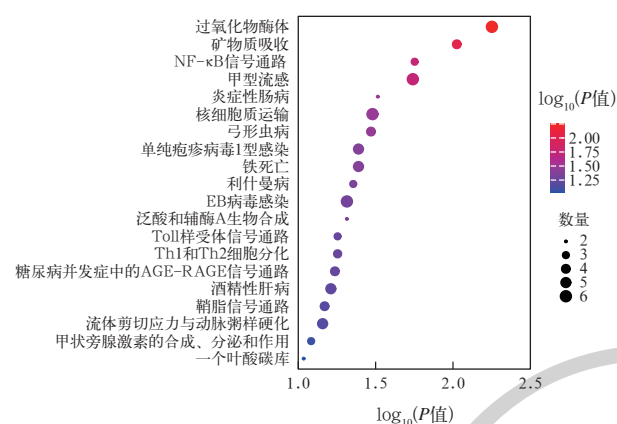
图 4 脓毒症与对照组相比肌肉组织中显著上调差异表达蛋白的基因本体论(GO)富集结果



注: A 为 GO 功能条目的显著性水平; B 为 3 大类生物学作用(生物学过程、细胞组成部分和分子功能)条目的蛋白数量

图 5 脓毒症与对照组相比肌肉组织中显著下调差异表达蛋白的基因本体论(GO)富集结果

组织中代谢毒性物质清除、免疫相关反应等信号通路发生显著变化。



注: NF-κB 为核转录因子-κB, Th1 为辅助性 T 细胞 1, Th2 为辅助性 T 细胞 2, AGE-RAGE 为晚期糖化终产物-晚期糖化终产物受体

图6 脓毒症组与对照组相比差异表达蛋白的京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析

3 讨论

脓毒症导致的肌少症与患者的不良预后密切相关,并引发多种临床合并症,增加患者 ICU 住院时间和死亡风险^[9]。尽管目前报道了一系列研究来挖掘脓毒症背景下肌少症发生发展的规律和机制,如生长激素^[10]、糖皮质激素^[11]等,但是大部分研究均聚焦于脓毒症动物模型下的机制探索,且并未筛选到合适的贴合临床应用的分子靶点或信号通路。受限于临床患者与疾病动物模型之间在生理解剖方面的差异,在动物模型基础上挖掘到的调控肌肉萎缩表型的关键通路很难在临床患者中得到有效应用和推广。本研究中使用脓毒症和非脓毒症患者的肌肉组织样本,借助蛋白质组学挖掘到了临床脓毒症显著差异表达的关键蛋白以及对应的生物学过程,为分子靶向肌少症的临床治疗提供了依据和可能的方向。

本研究通过表型鉴定发现脓毒症患者的肌肉存在明显的萎缩症状,同时肌肉组织中异常线粒体比例更高,出现大量的空泡化线粒体。有研究者已在多种脓毒症动物模型中发现了显著的肌肉萎缩表型,如小鼠^[12]、猪^[13]等,但是并未关注到线粒体状态或功能改变与肌少症之间的关联。肌少症主要是由蛋白质合成与分解过程不平衡所致,而线粒体作为细胞唯一的能量供应工厂参与维持了细胞所有的代谢活动。因此,线粒体的形态异常及其功能紊乱无疑会引发能量供应异常,进而导致蛋白质等物质代谢的紊乱^[14]。有研究者在营养不良/不活动、糖

尿病、癌症、肾脏和心力衰竭以及肌少症等多种疾病中开展的系列研究中发现了线粒体依赖性信号通路与肌肉萎缩表型的联系,并提出线粒体功能障碍是肌少症的主要促成机制,包括能量产生受损,代谢灵活性降低,维持氧化还原稳态困难和调节细胞凋亡紊乱等^[15]。本研究中通过光镜和电镜观察明确了脓症患者肌肉组织同时存在萎缩表型和线粒体形态异常,基于此提出了线粒体功能异常引发肌肉组织中蛋白质代谢紊乱,进而导致肌肉萎缩表型的猜想。因此,靶向改善线粒体功能和循环平衡的策略均有可能作为缓解脓毒症背景下肌少症的潜在治疗方案。

在明确表型的基础上,本研究采用蛋白质组学分析技术探讨了肌少症背后的关键分子和信号通路,发现脓症患者肌肉组织中显著上调差异表达蛋白的富集条目主要集中在对刺激的响应,以及生物膜相关过程或活动等方面,提示脓症患者主动增强了肌肉组织对内部或外部刺激的响应性,以及生物膜相关行为的活跃性。脓毒症被定义为由宿主系统性炎症和对感染的免疫反应失调引起的危及生命的器官功能障碍综合征,该病症涉及微生物感染、炎症因子、细胞损伤相关的模式分子、氧化损伤产生的活性氧类物质等极其复杂多样的外源性或内源性刺激^[16],如何有效平衡机体对刺激的响应性避免过激反应,以及降低刺激对机体各个器官组织的损害,可能是挖掘新型干预策略以治疗脓毒症患者的一个有潜力的方向。脓症患者肌肉组织中显著下调差异表达蛋白的富集条目主要集中在与催化和代谢过程有关的方面,尤其突显的是关于叶酸相关代谢过程。作为基本生化反应的成分和催化剂,叶酸因其在 DNA 合成和甲基化过程等核苷酸相关代谢中的核心作用而对生命至关重要^[17]。有趣的是,叶酸相关代谢过程的活性均显著降低,我们猜想可能是脓毒症背景下,机体优先考虑生存的问题,通过降低非关键器官或组织的代谢水平来保证关键器官的生命活动。但是,降低非关键器官或组织的代谢水平所引发的连锁危害,以及累及其他关键器官的功能性发挥可能是无法预料到的不利发展方向,这也正是需要临床医生或者基础研究者挖掘新靶标和新策略以实施干预手段的关键所在。

基于显著差异表达蛋白的 KEGG 分析显示,排在前 3 位的生物学过程或通路是过氧化物酶体、矿物质吸收和 NF-κB 信号通路,相比前两个生物学过

程尚无明确信号通路调节的短板, NF- κ B 信号通路可能更具有潜力作为干预手段的分子靶标。一系列研究已经证明了靶向 NF- κ B 相关通路能够缓解脓毒症背景下的多个器官的损伤, 例如: Liu 等^[18]使用基于血清的体外脓毒症模型明确了在脓毒症小鼠血清处理的 C2C12 肌管中, 一种神经调节蛋白 NRG-1 β 通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ /NF- κ B 依赖通路调节肌发生并保护细胞凋亡; Ren 等^[19]通过脂多糖处理的小鼠模型实验证实, 非瑟酮能够改善脂多糖刺激受损肝脏中的 Toll 样受体 4 表达以及 NF- κ B p65、丝裂素活化蛋白激酶(p38、细胞外信号调节激酶 1/2 和 c-Jun 氨基末端激酶)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶和蛋白激酶 B 的磷酸化; Kim 等^[20]通过脂多糖建立的急性肺损伤小鼠模型明确了原花青素 B2 能够通过调节 Hippo/Rho/ 磷脂酰肌醇 3-激酶/NF- κ B 信号通路进而缓解脓毒症诱导的急性肺损伤; Shi 等^[21]借助细胞和小鼠模型明确了脱唾液酸糖蛋白受体 1 经由 NF- κ B/ 活化转录因子 5 通路调节单核细胞到巨噬细胞的分化, 进而促使脓毒症背景下的肝损伤, 并证明了靶向脱唾液酸糖蛋白受体 1 能缓解脓毒症肝损伤, 并改善小鼠存活率。因此, 靶向肌肉组织中的 NF- κ B 相关信号通路在改善脓毒症引发的肌少症方面将具有一定的潜力, 但其具体的分子靶点和干预药物仍需要大量研究来探索与实施。

4 局限性

受限于临床样本的难获得性, 本研究仅纳入了 2 例脓毒症患者和 2 例非脓毒症患者, 尽管样本量偏少, 但是蛋白质组学的测试结果显示组内一致性较高, 因而组间比较筛选到的显著差异表达蛋白理论上可信的; 脓毒症组与非脓毒症组患者在年龄上存在明显的差异, 基于文献调研, 肌肉代谢能力和力量确实随着年龄的增长而下降, 因此, 组间比较筛选到的显著差异表达蛋白在一定程度上受到年龄因素的影响。尽管本研究挖掘到了具有改善脓毒症肌少症的潜在信号通路, 但是究竟靶向哪一确定的分子仍需要大量实验研究来进一步明确。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 蒋安琪、梁笑辉: 实验操作、论文撰写; 尤勇、傅昱: 基金获取、研究指导、论文修改; 许芸、吴姝韵、王刚、钱苏皖: 数据采集、整理、统计学分析; 虞文魁: 论文选题、研究设计

参考文献

[1] Bauer M, Gerlach H, Vogelmann T, et al. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009

and 2019: results from a systematic review and meta-analysis [J]. Crit Care, 2020, 24 (1): 239. DOI: 10.1186/s13054-020-02950-2.

- [2] Liu W, Hu CH, Zhao SP. Sarcopenia and mortality risk of patients with sepsis: a Meta-analysis [J]. Int J Clin Pract, 2022, 2022: 4974410. DOI: 10.1155/2022/4974410.
- [3] Goligher EC, Ferguson ND, Brochard LJ. Clinical challenges in mechanical ventilation [J]. Lancet, 2016, 387 (10030): 1856-1866. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30176-3.
- [4] De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, et al. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study [J]. JAMA, 2002, 288 (22): 2859-2867. DOI: 10.1001/jama.288.22.2859.
- [5] Hollenberg SM, Singer M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18 (6): 424-434. DOI: 10.1038/s41569-020-00492-2.
- [6] Chen LK, Woo J, Assantachai P, et al. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 consensus update on sarcopenia diagnosis and treatment [J]. J Am Med Dir Assoc, 2020, 21 (3): 300-307. e2. DOI: 10.1016/j.jamda.2019.12.012.
- [7] Yin L, Li N, Jia WH, et al. Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments [J]. Pharmacol Res, 2021, 172: 105807. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105807.
- [8] Cavaillon JM, Singer M, Skirecki T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads [J]. EMBO Mol Med, 2020, 12 (4): e10128. DOI: 10.15252/emmm.201810128.
- [9] Ebadi M, Montano-Loza AJ. Insights on clinical relevance of sarcopenia in patients with cirrhosis and sepsis [J]. Liver Int, 2018, 38 (5): 786-788. DOI: 10.1111/liv.13720.
- [10] Pruekprasert N, Meng QH, Gu R, et al. α 7 nicotinic acetylcholine receptor agonists regulate inflammation and growth hormone resistance in sepsis [J]. Shock, 2021, 56 (6): 1057-1065. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001792.
- [11] Moreno-Rupérez Á, Priego T, González-Nicolás MÁ, et al. Role of glucocorticoid signaling and HDAC4 activation in diaphragm and gastrocnemius proteolytic activity in septic rats [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (7): 3641. DOI: 10.3390/ijms23073641.
- [12] Zanders L, Kny M, Hahn A, et al. Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2022, 13 (1): 713-727. DOI: 10.1002/jcsm.12867.
- [13] Liu H, Pan DK, Li P, et al. Loss of ZBED6 protects against sepsis-induced muscle atrophy by upregulating DOK3-mediated RAC1/PI3K/AKT signaling pathway in pigs [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10 (29): e2302298. DOI: 10.1002/advsc.202302298.
- [14] Zong Y, Li H, Liao P, et al. Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9 (1): 124. DOI: 10.1038/s41392-024-01839-8.
- [15] Romanello V, Sandri M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance [J]. Front Physiol, 2016, 6: 422. DOI: 10.3389/fphys.2015.00422.
- [16] Zhang YY, Ning BT. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6 (1): 407. DOI: 10.1038/s41392-021-00816-9.
- [17] Menezó Y, Elder K, Clement A, et al. Folic acid, folinic acid, 5 methyl tetrahydrofolate supplementation for mutations that affect epigenesis through the folate and one-carbon cycles [J]. Biomolecules, 2022, 12 (2): 197. DOI: 10.3390/biom12020197.
- [18] Liu L, Liu XR, Bai YP, et al. Neuregulin-1 β modulates myogenesis in septic mouse serum-treated C2C12 myotubes *in vitro* through PPAR γ /NF- κ B signaling [J]. Mol Biol Rep, 2018, 45 (6): 1611-1619. DOI: 10.1007/s11033-018-4293-6.
- [19] Ren Q, Guo F, Tao SB, et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109772. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109772.
- [20] Kim GO, Park DH, Bae JS. Procyanidin B2 attenuates sepsis-induced acute lung injury via regulating Hippo/Rho/PI3K/NF- κ B signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (9): 7930. DOI: 10.3390/ijms24097930.
- [21] Shi R, Wang JG, Zhang Z, et al. ASGR1 promotes liver injury in sepsis by modulating monocyte-to-macrophage differentiation via NF- κ B/ATF5 pathway [J]. Life Sci, 2023, 315: 121339. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121339.

(收稿日期: 2024-12-02)
(本文编辑: 保健媛 马英)