

基于蛋白组学揭示脓毒症相关性 急性肾损伤的新型生物标志物： 一项前瞻性多中心队列研究

朱为民¹ 陈南瑾¹ 戴罕之¹ 董翠翠¹ 徐煜彬² 陈琪² 余芳宇³
郑诚⁴ 张超⁵ 张胜¹ 徐颖鹤¹ 蒋永波¹

¹温州医科大学附属台州医院(浙江省台州医院)重症医学科,台州 317000;²台州市中心医院
精准中心,台州 318000;³台州市中医院重症医学科,台州 318000;⁴台州市立医院重症医学科,
台州 318000;⁵台州恩泽医院重症医学科,台州 318000

通信作者:蒋永波,Email:jyongpo8@163.com

【摘要】 目的 通过蛋白组学寻找并验证脓毒症相关性急性肾损伤(SA-AKI)早期诊断及精准连续性肾脏替代治疗(CRRT)的新型生物标志物。**方法** 采用前瞻性多中心队列研究,连续纳入2019年4月至2021年12月入住浙江省台州市5家医院的脓毒症患者,根据是否发生急性肾损伤(AKI)将脓毒症患者分为SA-AKI组和非SA-AKI组,并以同期健康体检者作为对照(NC组)。采集受试者外周血进行蛋白质质谱分析,筛选出差异蛋白,并对差异蛋白进行功能富集分析;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测目标蛋白水平,用受试者工作特征曲线(ROC曲线)评价目标蛋白对SA-AKI的预测价值。另外选择1家医院的脓毒症患者及健康体检者,外部验证目标蛋白的表达水平及其对SA-AKI的预测价值,以及是否行CRRT治疗的准确性。**结果** 纳入37例脓毒症患者(其中AKI 19例,非AKI 18例)和31例健康体检者进行蛋白组学分析,结果在SA-AKI组与非SA-AKI组间有7个显著差异表达蛋白,即胱抑素C(CST3)、 β_2 -微球蛋白(β_2 M)、胰岛素样生长因子结合蛋白4(IGFBP4)、补体因子I(CFI)、补体因子D(CFD)、CD59、糖蛋白前列腺素D2合成酶(PTGDS);功能富集分析显示,筛选出的7个差异蛋白主要参与免疫反应、补体激活、凝血级联反应、中性粒细胞脱颗粒等生物学功能。ELISA结果显示,各目标蛋白在SA-AKI组中均有特异性表达。此外,选取65例脓毒症患者(其中AKI 38例,非AKI 27例)和20例健康体检者对7个目标蛋白进行外部验证。ELISA结果显示,SA-AKI组与非SA-AKI组间CST3、 β_2 M、IGFBP4、CFD、CD59蛋白表达水平差异存在统计学意义;ROC曲线显示,CST3、 β_2 M、IGFBP4、CFD、CD59预测SA-AKI的曲线下面积(AUC)分别为0.788、0.723、0.723、0.795、0.836,均高于0.7。对是否进行CRRT患者分析发现,IGFBP4具有较好的预测价值,AUC为0.84。**结论** 基于蛋白组学分析,CST3、 β_2 M、IGFBP4、CFD、CD59可能为SA-AKI早期诊断的潜在生物标志物,其中IGFBP4可能为SA-AKI是否行CRRT治疗的潜在生物标志物,但还需进一步临床验证。

【关键词】 脓毒症相关性急性肾损伤; 蛋白组学; 标志物; 连续性肾脏替代治疗

基金项目: 浙江省台州市社会发展科技计划项目(21ywb05, 23ywa47)

临床试验注册: 中国临床试验注册中心, ChiCTR1900022081

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250317-00253

Proteomics reveals biomarkers for sepsis-associated acute kidney injury: a prospective multicenter cohort study

Zhu Weimin¹, Chen Nanjin¹, Dai Hanzhi¹, Dong Cuicui¹, Xu Yubin², Chen Qi², Yu Fangyu³, Zheng Cheng⁴, Zhang Chao⁵, Zhang Sheng¹, Xu Yinghe¹, Jiang Yongpo¹

¹Department of Critical Care Medicine, Taizhou Hospital of Zhejiang Province Affiliated to Wenzhou Medical University, Taizhou 317000, China; ²Precision Medicine Center, Taizhou Central Hospital, Taizhou University, Taizhou 318000, China; ³Department of Intensive Care Unit, Taizhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Taizhou 318000, China; ⁴Department of Intensive Care Unit, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, China; ⁵Department of Intensive Care Unit, Taizhou Enze Hospital, Taizhou 318000, China

Corresponding author: Jiang Yongpo, Email: jyongpo8@163.com

【Abstract】 Objective To identify and validate novel biomarkers for the early diagnosis of sepsis-associated acute kidney injury (SA-AKI) and precise continuous renal replacement therapy (CRRT) using proteomics. **Methods** A prospective multicenter cohort study was conducted. Patients with sepsis admitted to five hospitals in Taizhou City of Zhejiang Province from April 2019 to December 2021 were continuously enrolled, based on the occurrence of acute kidney injury (AKI). Sepsis patients were divided into SA-AKI group and non-SA-AKI group, and healthy individuals who underwent physical examinations during the same period were used as control (NC group).

Peripheral blood samples from participants were collected for protein mass spectrometry analysis. Differentially expressed proteins were identified, and functional enrichment analysis was conducted on these proteins. The levels of target proteins were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the predictive value of target protein for SA-AKI were evaluated by receiver operator characteristic curve (ROC curve). Additionally, sepsis patients and healthy individuals were selected from one hospital to externally verify the expression level of the target protein and its predictive value for SA-AKI, as well as the accuracy of CRRT treatment. **Results** A total of 37 patients with sepsis (including 19 with AKI and 18 without AKI) and 31 healthy individuals were enrolled for proteomic analysis. Seven proteins were identified with significantly differential expression between the SA-AKI group and non-SA-AKI group: namely cystatin C (CST3), β_2 -microglobulin (β_2 M), insulin-like growth factor-binding protein 4 (IGFBP4), complement factor I (CFI), complement factor D (CFD), CD59, and glycoprotein prostaglandin D2 synthase (PTGDS). Functional enrichment analysis revealed that these proteins were involved in immune response, complement activation, coagulation cascade, and neutrophil degranulation. ELISA results demonstrated specific expression of each target protein in the SA-AKI group. Additionally, 65 patients with sepsis (38 with AKI and 27 without AKI) and 20 healthy individuals were selected for external validation of the 7 target proteins. ELISA results showed that there were statistically significant differences in the expression levels of CST3, β_2 M, IGFBP4, CFD, and CD59 between the SA-AKI group and non-SA-AKI group. ROC curve analysis indicated that the area under the curve (AUC) values of CST3, β_2 M, IGFBP4, CFD, and CD59 for predicting SA-AKI were 0.788, 0.723, 0.723, 0.795, and 0.836, respectively, all exceeding 0.7. Further analysis of patients who underwent CRRT or not revealed that IGFBP4 had a good predictive value, with an AUC of 0.84. **Conclusions** Based on proteomic analysis, CST3, β_2 M, IGFBP4, CFD, and CD59 may serve as potential biomarkers for the diagnosis of SA-AKI, among which IGFBP4 might be a potential biomarker for predicting the need for CRRT in SA-AKI patients. However, further clinical validation is required.

【Key words】 Sepsis-associated acute kidney injury; Proteomics; Biomarker; Continuous renal replacement therapy

Fund program: Social Development Science and Technology Plan Project of Taizhou City of Zhejiang Province (21ywb05, 23ywa47)

Trial registration: Chinese Clinical Trial Registry (ChiCTR1900022081)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250317-00253

脓毒症相关性急性肾损伤(sepsis associated-acute kidney injury, SA-AKI)是脓毒症患者以急性肾小球滤过率急性减退为特征的临床综合征,也是重症监护病房(intensive care unit, ICU)危重患者常见并发症之一^[1]。约 40% 的脓毒症患者并发急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),且 AKI 越严重,脓毒症患者病死率越高^[2],其中 AKI 1、2、3 级患者的 28 d 病死率分别为 42.3%、66.7% 和 84.6%^[3]。目前 AKI 采用血清肌酐(serum creatinine, SCr)和尿量等指标作为诊断标准,存在一定的局限性。因为只有当肾小球滤过率损失到达 50% 时才会引起 SCr 升高,尿量更容易受到患者本身容量状态、药物等非肾脏因素影响,容易造成 AKI 患者诊断滞后及治疗的延误^[4]。

近年来,研究发现一批新型的生物标志物用于 AKI 的早期诊断及精准治疗中,如肾脏损伤分子-1(kidney injury molecule-1, KIM-1)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)、肝型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid-binding protein, L-FABP)、组织金属蛋白酶抑制剂 2(tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、胰岛素样生长因子结合蛋白 7(insulin-like growth

factor binding protein-7, IGFBP7)等^[5-6]。由于 AKI 病因不同,发病的病理生理机制也不完全相同,其中 NGAL 被认为是肾脏的“肌钙蛋白”,有研究者指出 NGAL > 150 μ g/L 可以作为启动连续性肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy, CRRT)的参考指标,但与心肌梗死不同的是,AKI 的病因不局限于缺血,SA-AKI 患者 NGAL 水平没有其他病因 AKI 患者高,也容易受到炎症反应等因素的影响^[7],所以 NGAL 是一个具有高度敏感的标志物,但不是 SA-AKI 的特异性指标。许多新型生物标志物均无法快速床边检测,以至于在临床上没法得到很好的应用。因此,亟需新的方法筛选和验证高敏感度、特异度的新型生物标志物用于 SA-AKI 患者的早期诊断和治疗,从而改善患者预后。

本研究旨在寻找并验证一批可用于早期诊断 SA-AKI 患者的特异性分子标志物,以建立预警识别、早期诊断、精准 CRRT 的临床治疗方案,以期实现对 SA-AKI 患者的早诊断及精准治疗,从而改善患者预后,具有较大的社会效益和经济效益。

1 资料与方法

1.1 研究对象: 采用前瞻性多中心队列研究,连续纳入 2019 年 4 月至 2021 年 12 月因脓毒症入住 ICU 的患者,排除妊娠期或哺乳期妇女、肿瘤晚期、

4 h 内死亡或者自动出院患者(脓毒症组),选择同期健康体检者作为对照(NC 组)。以台州市中心医院、台州恩泽医院、台州市中医院、台州市立医院的研究对象作为蛋白组学队列;以浙江省台州医院的研究对象作为验证队列。

1.2 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,经浙江省台州医院伦理委员会审核批准(审批号:K20190102),并在中国临床试验注册中心注册(注册号:ChiCTR1900022081),患者入组前均签署知情同意书。

1.3 临床信息收集:记录患者性别、年龄、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 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)、感染部位及血常规、降钙素原(procalcitonin, PCT)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、凝血功能等实验室指标,同时记录是否存在 AKI、呼吸衰竭、出血等并发症以及入 ICU 后是否行机械通气、CRRT、使用血管活性药物等治疗措施。根据 AKI 诊断标准^[8]将脓毒症患者分为 SA-AKI 组与非 SA-AKI 组。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血样本收集:于脓毒症患者入组当日采集 15 mL 外周血,室温下凝固 60 min, 1 600×g 离心 10 min 分离血清, -80 ℃ 保存;健康体检者同样收集血清样本于 -80 ℃ 保存,用于蛋白组学和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测。

1.4.2 液相色谱-质谱/质谱(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)联用分析:使用测序级胰蛋白酶消化血清中的蛋白质,用 SMA1000 型超微紫外分光光度计测定上清液浓度,用 Waters UPLC 系统 BEH C18 nanoACQUITY 色谱柱(75 μm×25 cm, 1.7 μm)分离多肽。采用纳米流液相色谱(ACQUITY UPLC 系统,美国 Waters 公司)联用质谱(Q Exactive 质谱仪,美国赛默飞世尔科技公司)进行蛋白组学分析。利用 70 000 分辨率的 Orbitrap 剖面模式获得全质量扫描(300~140 m/z),选择电荷范围 2~6 的肽段进行进一步的 LC-MS/MS 分析。在 27% 归一化碰撞能量和 35 000 分辨率下,基于高能碰撞解离进行碎片化,并选择 20 种肽段最强烈的峰。动态排除时间为 20 s。

1.4.3 蛋白质鉴定和数据库检索:利用 MaxQuant 1.6.1.0 搜索引擎,在 SwissProt 数据库中对 LC-MS/

MS 生成的人类来源蛋白(Homo sapiens)开展检索。参数设置:前体离子质量容差为 20×10^{-6} , 碎片离子质量容差为 20×10^{-6} ;将蛋氨酸氧化、蛋白 N 端乙酰化设为可变修饰,半胱氨酸的碳酰胺甲基化设为固定修饰;胰蛋白酶切割允许最多 2 个缺失位点,并以 1% 的错误发现率对肽段和蛋白鉴定结果进行过滤。采用 MaxQuant 结合无标签定量策略进行蛋白质定量,要求最小肽段比为 2,且仅以未修饰肽段用于相对定量。血清样本共鉴定出 879 种蛋白。归一化后的蛋白质丰度经 log2 转换后用于定量分析。

1.4.4 功能富集分析:利用 DAVID 6.8 在线工具和 ClueGO 插件对与疾病状态高度相关的改变蛋白及共表达模块进行功能富集分析,对这些共表达模块进行更深层次的生物学理解。功能富集分析的显著性以错误发现率小于 0.05 定义。

1.4.5 ELISA 检测蛋白表达水平:为了进一步确认蛋白组学分析结果,对与临床特征显著相关模块的枢纽蛋白进行随机验证,根据 ELISA 试剂盒说明书对外部样本补体因子 D(complement factor D, CFD)、β₂-微球蛋白(β₂-microglobulin, β₂M)、CD59、胱抑素 C(cystatin C, CST3)、IGFBP4、糖蛋白前列腺素 D2 合成酶(glycoprotein prostaglandin D2 synthase, PTGDS)、补体因子 I(complement factor I, CFI)进行检测。

1.5 统计学分析:所有统计分析使用 R 4.4.2 和 GraphPad Prism 10 软件。计量数据采用 Shapiro-Wilk 进行正态性检验,正态分布数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和独立样本 t 检验;非正态分布数据以中位数(四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,采用非参数 Mann-Whitney U 检验和 Kruskal-Wallis H 检验。计数资料以例数或百分比表示,采用 χ^2 检验, $n < 5$ 时采用 Fisher 确切概率法。采用主成分分析(principal component analysis, PCA)血清样本的蛋白组学,用 Benjamini-Hochberg 程序校正错误发现率,控制多重测试中的 I 型错误,缺失值 < 40% 的蛋白质用蛋白组学数据中的最小值进行插补,蛋白丰度通过 R 极值的 normalize Between Arrays 函数归一化,对归一化蛋白丰度进行 log2 转化,以“ $|\log_2 FC| \geq \log_2(1.5)$ (或 $FC \geq 1.5$ 或 $\leq 1/1.5$)且校正 $P < 0.05$ ”表示蛋白水平有显著变化。采用受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)分析 AKI 及 CRRT 治疗的预测价值,计算曲线下面积(area under the curve, AUC)。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 脓毒症患者临床特征：蛋白组学队列中纳入 37 例脓毒症患者(其中 SA-AKI 19 例)和 31 例健康体检受试者。表 1 显示, SA-AKI 组与非 SA-AKI 组患者年龄、性别差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。相比非 SA-AKI 组, SA-AKI 组具有更高的 SOFA 评分、APACHE II 评分, 心率(heart rate, HR)也更快(均 $P<0.05$)。在实验室检查方面, SA-AKI 组与非 SA-AKI 组患者血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、SCr、pH 值、血乳酸(lactic acid, Lac)、碱剩余(base excess, BE)差异均存在统计学意义(均 $P<0.05$)。在临床干预方面, SA-AKI 组与非 SA-AKI 组患者进行机械通气、CRRT 及血管活性药物使用的比例差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.2 脓毒症患者血清蛋白组学分析：根据质谱蛋白组数据特征, PCA 分析显示, SA-AKI 组与非 SA-AKI 组数据分布有明显区分, 且均不同于 NC 组(图 1A)。SA-AKI 组与非 SA-AKI 组共有 7 个显著差异蛋白, 其中 6 个蛋白表达上调, 1 个蛋白表达下调(图 1B~C)。对上述 7 个显著差异蛋白进行功能富集分析显示, 其主要参与免疫反应、补体激活、凝血级联反应、中性粒细胞脱颗粒等生物学功能(表 2), 表明这些差异性蛋白确实能很好地反映 SA-AKI 的发展过程。

表 2 对是否发生 AKI 两组脓毒症患者间 7 个显著差异蛋白的功能富集分析

来源	生物学功能	校正 P 值	交集
GO: BP	免疫效应过程	<0.001	PTGDS、CFD、CD59、 β_2 M、CFI
GO: BP	补体激活	0.008	CFD、CD59、CFI
GO: BP	免疫反应的正向调控	0.020	CFD、CD59、 β_2 M、CFI
GO: CC	物质交换、信号传递	<0.001	CST3、PTGDS、CFD、IGFBP4、CD59、 β_2 M、CFI
GO: CC	内质网	0.019	CST3、PTGDS、IGFBP4、CD59、 β_2 M
KEGG	补体和凝血级联反应	0.001	CFD、CD59、CFI
REAC	补体级联反应	0.008	CFD、CD59、CFI
REAC	中性粒细胞脱颗粒	0.026	CST3、CFD、CD59、 β_2 M
REAC	先天性免疫系统	0.042	CST3、CFD、CD59、 β_2 M、CFI
WP	补体系统	0.006	CFD、CD59、CFI
WP	神经元发育与可塑性中的补体系统	0.008	CFD、CD59、CFI
WP	睡眠调节	0.045	CST3、PTGDS

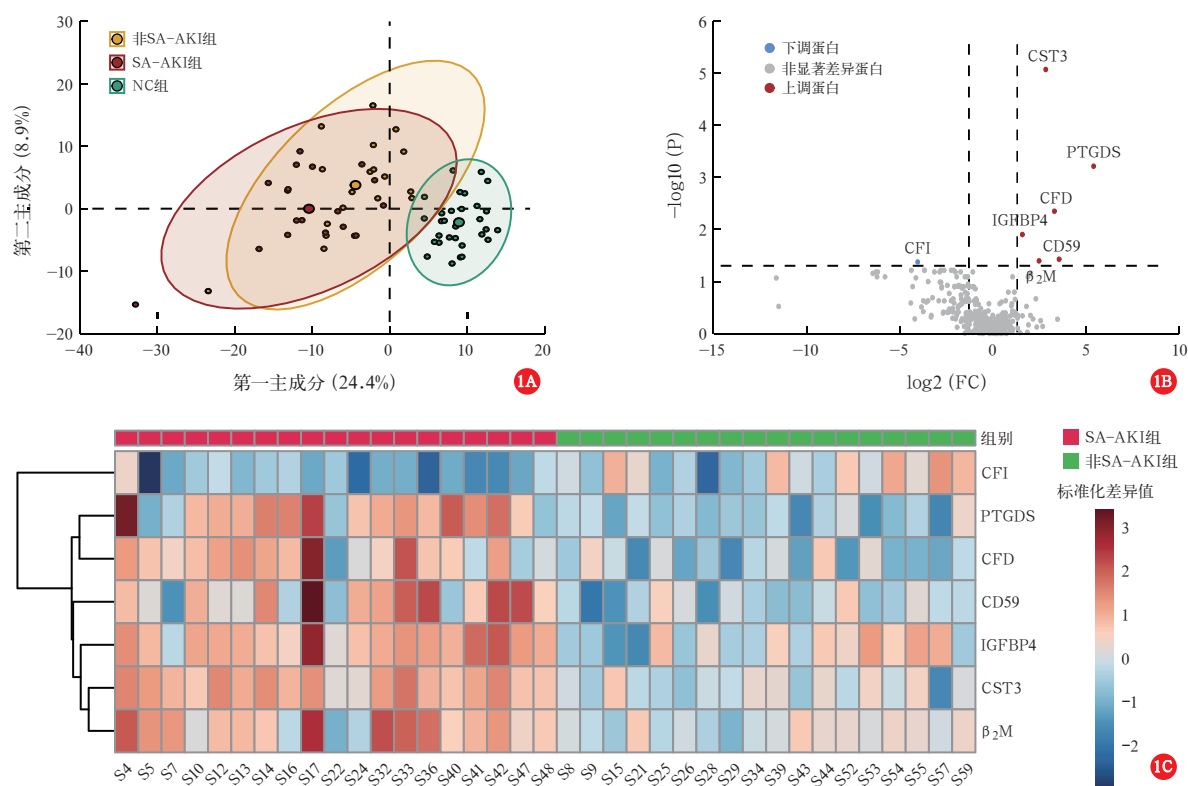
注: AKI 为急性肾损伤, GO 为基因本体论, BP 为生物过程, CC 为细胞组分, KEGG 为京都基因与基因组百科全书, REAC 为 Reactome 数据库, WP 为维基通路, PTGDS 为糖蛋白前列腺素 D2 合成酶, CFD 为补体因子 D, β_2 M 为 β_2 -微球蛋白, CFI 为补体因子 I, CST3 为胱抑素 C, IGFBP4 为胰岛素样生长因子结合蛋白 4

2.3 用于诊断 SA-AKI 的候选生物标志物：基于正交偏最小二乘法(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)分析显示, SA-AKI 组与非 SA-AKI 组间的差异蛋白能够明显区分, 表明他们的血清蛋白组学特征存在明显差异(图 2A)。每种差异蛋白变量投影重要性(variable importance

表 1 是否发生 AKI 两组脓毒症患者临床特征比较

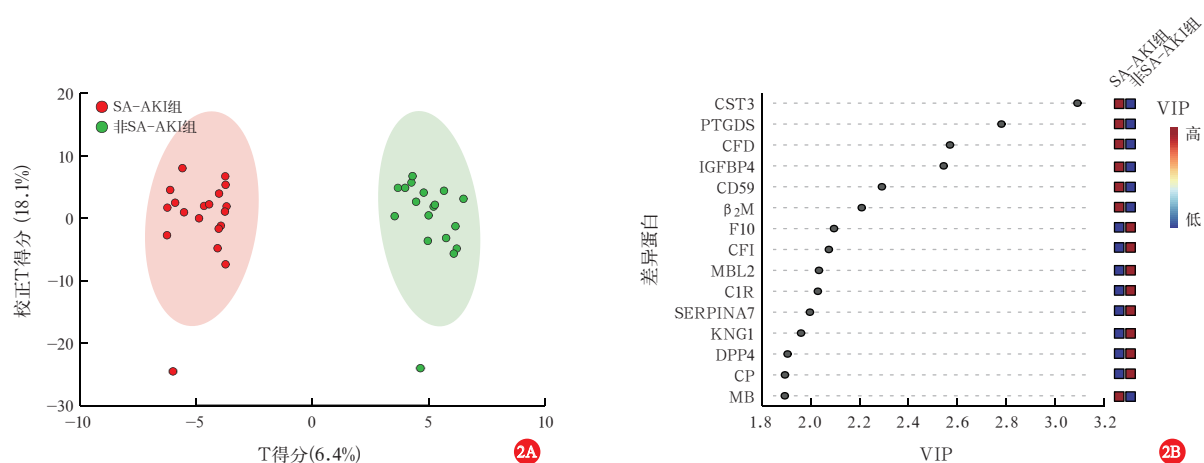
指标	SA-AKI 组 ($n=19$)	非 SA-AKI 组 ($n=18$)	$Z/\chi^2/t$ 值	P 值	指标	SA-AKI 组 ($n=19$)	非 SA-AKI 组 ($n=18$)	$t/Z/\chi^2$ 值	P 值
年龄[岁, $M(Q_1, Q_3)$]	75.00(62.00, 78.50)	72.50(65.25, 78.25)	-0.259	0.796	BUN(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	17.37 $\pm$ 6.92	7.34 $\pm$ 3.16	-5.684	<0.001
性别(例,男/女)	8/11	8/10	Fisher	1.000	SCr [μ mol/L, $M(Q_1, Q_3)$]	179.0(166.5, 254.5)	76.0(65.0, 95.0)	-5.055	<0.001
SOFA 评分(分, $\bar{x}\pm s$)	7.84 $\pm$ 3.17	4.89 $\pm$ 2.17	-3.167	0.002	AST [U/L, $M(Q_1, Q_3)$]	61.0(28.5, 175.2)	43.5(25.2, 86.5)	-0.905	0.365
APACHE II 评分(分, $\bar{x}\pm s$)	22.21 $\pm$ 7.39	12.22 $\pm$ 5.69	-4.587	<0.001	GLU(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	6.73 $\pm$ 2.83	8.06 $\pm$ 3.09	1.297	0.204
HR(次/min, $\bar{x}\pm s$)	105.37 $\pm$ 19.58	90.44 $\pm$ 17.26	-2.454	0.019	pH 值($\bar{x}\pm s$)	7.36 $\pm$ 0.08	7.44 $\pm$ 0.03	3.818	<0.001
RR[次/min, $M(Q_1, Q_3)$]	22.0(17.0, 24.0)	19.0(15.0, 21.0)	-1.299	0.194	Lac [mmol/L, $M(Q_1, Q_3)$]	2.40(1.35, 4.75)	1.45(0.97, 1.75)	-2.257	0.024
PLT($\times 10^9$ /L, $\bar{x}\pm s$)	143.16 $\pm$ 93.48	152.67 $\pm$ 68.23	0.352	0.727	BE(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	-5.04 $\pm$ 4.38	-1.88 $\pm$ 2.33	2.725	0.011
WBC [$\times 10^9$ /L, $M(Q_1, Q_3)$]	12.90(9.90, 16.95)	11.51(5.77, 16.58)	-0.714	0.475	PaCO ₂ [mmHg, $M(Q_1, Q_3)$]	34.2(30.9, 37.6)	33.0(30.0, 36.5)	-0.829	0.407
Hb(g/L, $\bar{x}\pm s$)	125.74 $\pm$ 31.07	115.06 $\pm$ 18.32	-1.282	0.210	PaO ₂ [mmHg, $M(Q_1, Q_3)$]	86.6(74.5, 132.5)	135.5(104.5, 148.0)	-1.639	0.101
Hct [$M(Q_1, Q_3)$]	0.355(0.305, 0.432)	0.356(0.320, 0.378)	-0.790	0.429	Na ⁺ (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	139.12 $\pm$ 6.70	139.81 $\pm$ 3.80	0.388	0.701
PT[s, $M(Q_1, Q_3)$]	14.90(13.60, 16.40)	14.70(14.10, 15.50)	-0.138	0.890	K ⁺ (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	4.21 $\pm$ 0.92	4.12 $\pm$ 0.42	-0.392	0.697
INR [$M(Q_1, Q_3)$]	1.23(1.13, 1.41)	1.17(1.12, 1.25)	-1.060	0.289	Ca ²⁺ [mmol/L, $M(Q_1, Q_3)$]	1.86(1.66, 2.01)	2.00(1.92, 2.10)	-1.717	0.086
APTT[s, $M(Q_1, Q_3)$]	41.10(35.85, 47.00)	44.00(41.60, 47.20)	-0.783	0.433	机械通气[例(%)]	11(57.89)	7(38.89)	Fisher	0.330
PCT [μ g/L, $M(Q_1, Q_3)$]	29.65(10.07, 50.19)	5.70(2.48, 31.59)	-1.505	0.132	CRRT[例(%)]	4(21.05)	0(0)	Fisher	0.105
CRP(mg/L, $\bar{x}\pm s$)	182.98 $\pm$ 111.61	190.89 $\pm$ 103.04	0.224	0.824	血管活性药物[例(%)]	10(52.63)	6(33.33)	Fisher	0.325
ALB(g/L, $\bar{x}\pm s$)	28.99 $\pm$ 6.06	28.02 $\pm$ 3.86	-0.539	0.594	28 d 死亡[例(%)]	15(78.95)	17(94.44)	Fisher	0.340

注: AKI 为急性肾损伤, SA-AKI 为脓毒症相关性急性肾损伤, SOFA 为序贯器官衰竭评分, APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分 II, HR 为心率, RR 为呼吸频率, PLT 为血小板计数, WBC 为白细胞计数, Hb 为血红蛋白, Hct 为血细胞比容, PT 为凝血酶原时间, INR 为国际标准化比值, APTT 为活化部分凝血活酶时间, PCT 为降钙素原, CRP 为 C-反应蛋白, ALB 为白蛋白, BUN 为血尿素氮, SCr 为血清肌酐, AST 为天冬氨酸转氨酶, GLU 为葡萄糖, Lac 为血乳酸, BE 为碱剩余, PaCO₂ 为动脉血二氧化碳分压, PaO₂ 为动脉血氧分压, CRRT 为连续性肾脏替代治疗; 1 mmHg=0.133 kPa



注: A 为各组已鉴定的差异蛋白主成分分析(PCA), SA-AKI 组为脓毒症相关性急性肾损伤患者,非 SA-AKI 组为脓毒症非急性肾损伤患者, NC 为健康体检者; B 为 SA-AKI 组与非 SA-AKI 组差异表达差异蛋白的火山图, FC 为差异倍数, CST3 为胱抑素 C, PTGDS 为糖蛋白前列腺素 D2 合成酶, CFD 为补体因子 D, IGFBP4 为胰岛素样生长因子结合蛋白 4, CFI 为补体因子 1, β_2M 为 β_2 -微球蛋白; C 为 SA-AKI 组与非 SA-AKI 组差异表达蛋白的热图

图 1 各组研究对象血清样本的蛋白组学分析



注: SA-AKI 组为脓毒症相关性急性肾损伤患者,非 SA-AKI 组为脓毒症非急性肾损伤患者, VIP 为变量投影重要性, CST3 为胱抑素 C, PTGDS 为糖蛋白前列腺素 D2 合成酶, CFD 为补体因子 D, IGFBP4 为胰岛素样生长因子结合蛋白 4, β_2M 为 β_2 -微球蛋白, F10 为凝血因子 X, CFI 为补体因子 1, MBL2 为甘露糖结合凝集素 2, C1R 为 C1r 补体成分, SERPINA7 为丝氨酸蛋白酶抑制剂 A7, KNG1 为激肽原 1, DPP4 为二肽基肽酶 4, CP 为铜蓝蛋白, MB 为肌红蛋白

图 2 正交偏最小二乘法分析 SA-AKI 组与非 SA-AKI 组患者的差异蛋白(A)及其重要性(B)

in projection, VIP) 分析显示(图 2B),共有 10 个蛋白的 VIP>2,其中上述 7 个显著差异表达蛋白均在这 10 个蛋白内,进一步说明这 7 个蛋白具有区分 SA-AKI 与非 SA-AKI 患者的巨大潜力。

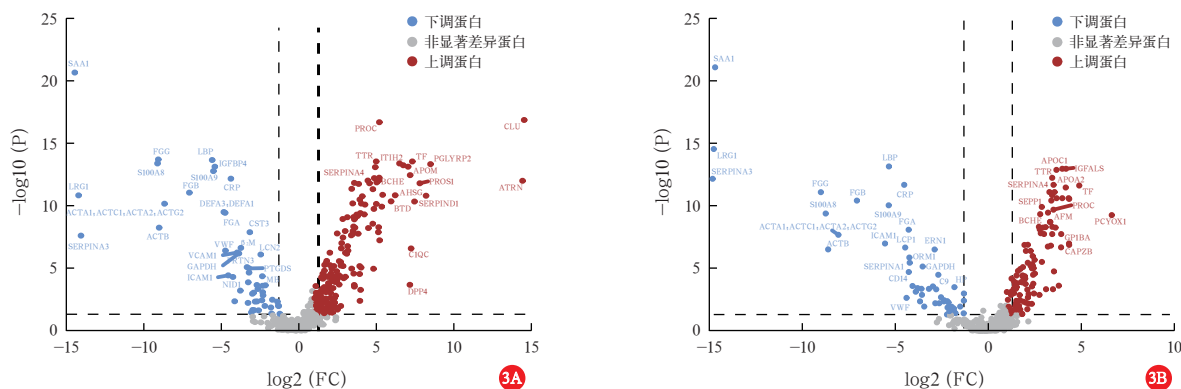
引入 NC 组,寻找在 NC、SA-AKI 和非 SA-AKI

组中表达逐步变化的关键蛋白。差异性分析显示,与 NC 组比较,SA-AKI 组共有 231 个显著差异表达蛋白,其中 178 个蛋白表达上调,53 个蛋白表达下调(图 3A);非 SA-AKI 组共有 167 个显著差异表达蛋白,其中 115 个蛋白表达上调,52 个蛋白表达下

调(图 3B)。对 3 组间显著差异表达蛋白进行交集分析显示(表 3), IGFBP4、 β_2 M 在 3 组间均显著差异表达,且随着疾病进展,蛋白表达量逐步上调(均 $P<0.05$); 另外 PTGDS、CST3、CFD、CD59、CFI 等 5 个蛋白虽然在非 SA-AKI 组与 NC 组间差异无统计学意义,但是在 SA-AKI 组与非 SA-AKI 组、SA-AKI 组与 NC 组间差异均存在统计学意义(均 $P<0.05$),即这 5 个蛋白在 SA-AKI 组中特异性表达。

2.4 目标蛋白的进一步验证:在验证队列中纳入 65 例脓毒症患者(其中 SA-AKI 38 例)和 20 例健康

健康体检受试者,对筛选出的目标蛋白进行进一步的外部验证,ELISA 结果显示(表 4), SA-AKI 组与非 SA-AKI 组 IGFBP4、 β_2 M、CFD、CD59、CST3 蛋白表达差异均存在统计学意义(均 $P<0.05$)。ROC 曲线分析显示(图 4), CD59、CFD、CST3、 β_2 M、IGFBP4 预测 SA-AKI 的 AUC 值均高于 0.7。此外,CRRT 患者 IGFBP4 水平显著高于非 CRRT 患者($\mu\text{g/L}$: 45.8 ± 36.0 比 15.8 ± 12.5 , $P<0.05$),且 IGFBP4 对 SA-AKI 患者是否行 CRRT 具有较好的预测价值, AUC 为 0.84。



注: SA-AKI 组为脓毒症相关性急性肾损伤患者,非 SA-AKI 组为脓毒症非急性肾损伤患者,NC 组为健康体检者;FC 为差异倍数

图 3 SA-AKI 组与 NC 组(A)、非 SA-AKI 与 NC 组(B)血清中差异表达蛋白的火山图

表 3 3 组研究对象差异表达蛋白水平比较 [$\log_2, M(Q_1, Q_3)$]

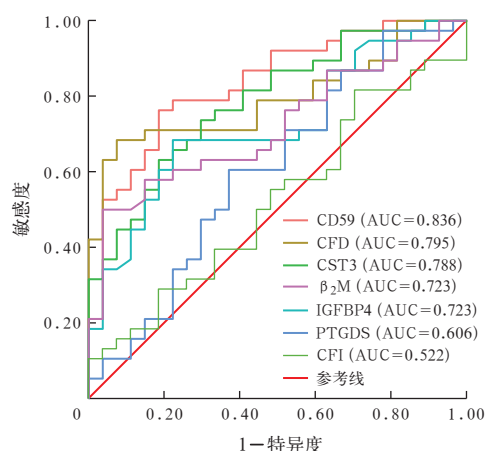
组别	例数(例)	IGFBP4	β_2 M	CST3	PTGDS	CFD	CD59	CFI
NC 组	31	-0.82 (-1.02, -0.51)	-0.58 (-0.93, -0.34)	-0.61 (-1.10, 0.02)	-0.18 (-0.71, 0.07)	-0.17 (-0.60, 0.24)	-0.32 (-0.60, -0.07)	0.66 (0.25, 1.04)
非 SA-AKI 组	18	-0.01 (-0.48, 0.66) ^a	0.05 (-0.14, 0.31) ^a	-0.05 (-0.30, 0.30) ^a	-0.44 (-0.83, -0.16)	-0.53 (-1.16, 0.04)	-0.26 (-0.74, 0.01)	0.03 (-0.46, 0.82) ^a
SA-AKI 组	19	1.07 (0.83, 1.32) ^{ab}	0.88 (0.50, 1.58) ^{ab}	1.07 (0.76, 1.42) ^{ab}	1.04 (0.69, 1.60) ^{ab}	0.74 (0.29, 1.20) ^{ab}	0.83 (0.19, 1.77) ^{ab}	-1.02 (-1.35, -0.49) ^{ab}
H 值		39.533	35.583	36.102	21.843	18.908	15.982	33.174
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: NC 组为健康体检者, SA-AKI 组为脓毒症相关性急性肾损伤患者,非 SA-AKI 组为脓毒症非急性肾损伤患者; IGFBP4 为胰岛素样生长因子结合蛋白 4, β_2 M 为 β_2 -微球蛋白, CST3 为胱抑素 C, PTGDS 为糖蛋白前列腺素 D2 合成酶, CFD 为补体因子 D, CFI 为补体因子 I; 与 NC 组比较, ^a $P<0.05$; 与非 SA-AKI 组比较, ^b $P<0.05$

表 4 验证队列中 3 组研究对象差异表达蛋白水平比较

组别	例数(例)	IGFBP4 [$\mu\text{g/L}$, $M(Q_1, Q_3)$]	β_2 M [$\mu\text{g/L}$, $M(Q_1, Q_3)$]	CST3 [mg/L , $M(Q_1, Q_3)$]	PTGDS [$\mu\text{g/L}$, $M(Q_1, Q_3)$]	CFD [mg/L , $M(Q_1, Q_3)$]	CD59 [$\mu\text{g/L}$, $M(Q_1, Q_3)$]	CFI [mg/L , $\bar{x}\pm s$]
NC 组	20	2.55 (2.19, 3.16)	4.28 (3.41, 6.16)	16.70 (14.02, 24.30)	2.00 (1.61, 2.41)	7.44 (4.76, 10.71)	60.47 (48.78, 97.06)	140.94 $\pm$ 49.86
非 SA-AKI 组	27	7.54 (4.24, 8.96) ^a	4.62 (3.58, 6.28) ^a	29.84 (19.36, 46.51) ^a	3.10 (1.75, 4.78) ^a	6.00 (4.73, 6.88) ^a	61.47 (51.74, 97.33) ^a	128.17 $\pm$ 37.96
SA-AKI 组	38	12.43 (6.43, 18.32) ^{ab}	8.07 (4.59, 13.62) ^{ab}	15.86 (11.97, 21.41) ^{ab}	3.46 (2.35, 5.38) ^a	10.41 (6.30, 17.29) ^{ab}	250.46 (113.66, 374.11) ^{ab}	138.79 $\pm$ 57.93
H/F 值		41.848	12.567	19.289	11.873	17.516	27.595	0.480
P 值		<0.001	0.002	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	0.622

注: NC 组为健康体检者, SA-AKI 组为脓毒症相关性急性肾损伤患者,非 SA-AKI 组为脓毒症非急性肾损伤患者; IGFBP4 为胰岛素样生长因子结合蛋白 4, β_2 M 为 β_2 -微球蛋白, CST3 为胱抑素 C, PTGDS 为糖蛋白前列腺素 D2 合成酶, CFD 为补体因子 D, CFI 为补体因子 I; 与 NC 组比较, ^a $P<0.05$; 与非 SA-AKI 组比较, ^b $P<0.05$



注: CFD 为补体因子 D, CST3 为胱抑素 C, β_2 M 为 β_2 -微球蛋白, IGFBP4 为胰岛素样生长因子结合蛋白 4, PTGDS 为糖蛋白前列腺素 D2 合成酶, CFI 为补体因子 I, SA-AKI 为脓毒症相关性急性肾损伤, ROC 曲线为受试者工作特征曲线, AUC 为曲线下面积

图 4 各蛋白对 SA-AKI 患者预测的 ROC 曲线

3 讨论

本研究通过蛋白质质谱分析得出 SA-AKI 的发病机制可能与免疫反应、补体激活、凝血级联反应、中性粒细胞脱颗粒等生物学功能相关。目前临床上基于 SCr 和尿量对 AKI 的诊断标准存在明显滞后性,从而导致临床诊断和治疗的延迟^[6]。因此,迫切需要寻找早期的生物标志物以实现损伤严重程度的及时诊断和预测。近年来,蛋白组学在肾脏疾病研究领域展现出广阔的前景,它不仅有可能发现不同肾脏疾病的早期信号和生物标志物,还可能在肾脏疾病的治疗及预后评估方面发挥指导性作用^[9]。本研究结果表明 CST3、 β_2 M、IGFBP4、CFD、CD59 等标志物可用于 SA-AKI 的早期预测以及评估是否行 CRRT 治疗。

既往研究发现,NGAL、IGFBP7、TIMP-2、KIM-1 和 CST3 等可能为 SA-AKI 的新型生物标志物^[6, 10],但由于 AKI 通常是多因素引起的,并且上述生物标志物并不具备足够的特异性,因此,在将其应用于临床实践时具有一定局限性。CST3 属于一种低相对分子质量的非糖化蛋白质,能够自由穿过肾小球膜,随后被近端肾小管上皮细胞完整地吸收与代谢。所有有核细胞均会以恒定速率生成 CST3,其水平不会受到炎症、发热和(或)外部因素干扰,同时,性别、年龄、体质量等因素也不会对其造成影响,因而 CST3 可作为反映肾小球滤过率的一项标志物^[11]。根据临床试验结果显示,对于早期诊断 AKI, CST3 比 SCr 具有更高的敏感性,可以在比 SCr 早 24~48 h 进行检测。血液中的 CST3 在肾小球滤过功能受损

时就会升高,而且随着肾脏损伤的严重程度增加,其水平也会相应升高^[12]。也有相关的研究表明,将损伤生物标志物与 CST3 和脑啡肽原 A 等功能性生物标志物联合应用,有助于准确预测 AKI,区分病理生理途径,证明 AKI 病因,并对 AKI 严重程度进行分级^[11]。本研究显示,SA-AKI 组 CST3 水平高于非 SA-AKI 组,且 CST3 预测 SA-AKI 的 AUC 值为 0.788,这恰好支持了既往的研究结果。

β_2 M 作为主要组织相容性复合体 I 类分子的构成部分,在免疫反应进程中发挥关键效用,涵盖黏膜免疫、肿瘤监测以及免疫球蛋白稳态维持等方面。大量研究表明, β_2 M 是肾功能的生物标志物,其血清水平与肾小球滤过率有关^[13]。在 20 世纪 80 年代,相关研究分析了 β_2 M 评估肾功能的能力,发现它在大多数情况下优于 SCr^[14]。但也有研究表明,在使用改良的儿科 RIFLE(危险、损伤、衰竭、肾功能丧失、终末期肾病)的旧标准定义的情况下, β_2 M 预测 AKI 的效能较低, AUC 为 0.59^[15]。随着 2012 改善全球肾脏病预后组织 AKI 诊断标准的实施, Barton 等^[16]对 β_2 M 进行了进一步研究,发现其与 AKI 发展相关(AUC 为 0.84),且患者的 β_2 M 水平越高, AKI 分期越高。本研究发现 β_2 M 可作为预测 SA-AKI 早期预警的生物标志物。

既往研究证实, IGFBP7 被用作 AKI 的早期诊断和预后标志物^[17]。作为生长因子结合蛋白家族中另一个重要成员, IGFBP4 在肾脏疾病中的作用也逐渐受到重视。相关研究发现, IGFBP4 在慢性肾功能不全患者血清中高表达,这与肾衰竭程度、骨营养不良期间的成骨减少有关^[18]。其他研究发现, IGFBP4 的血清水平与狼疮肾炎的慢性指数和估计肾小球滤过率密切相关,可作为狼疮肾炎的标志物^[19]。本研究显示, IGFBP4 在 SA-AKI 组显著高于非 SA-AKI 组和 NC 组,说明 IGFBP4 在 SA-AKI 的发生发展中可能也起着某种关键作用。另外,进行 CRRT 治疗的 SA-AKI 患者 IGFBP4 水平明显高于非 CRRT 患者, ROC 曲线分析发现 IGFBP4 可以较好地预测 SA-AKI 患者是否需要行 CRRT 治疗, AUC 为 0.84,但仍需要进一步临床研究。

CFD 作为一个新近发现的丝氨酸蛋白酶基因,主要在脂肪组织和坐骨神经组织中进行合成,在补体旁路途径激活过程中扮演着限速酶的角色^[20]。研究表明, CFD 通过肾小球膜过滤,在肾功能障碍患者中其循环浓度显著上升,尤其在终末期肾功能

衰竭患者中 CFD 水平升高近 10 倍,因此,CFD 血清调节与肾功能不全可能存在关联^[21]。

CD59 是一种膜性调节蛋白,从主要生理功能来看,其能够避免膜攻击复合物对同种细胞或自身细胞造成溶解破坏^[22]。CD59 在阵发性睡眠性血红蛋白尿和先天性 CD59 缺乏症中的作用已经明确^[23],然而其导致肾功能损伤的作用机制还不清楚。相关研究表明,CD59 表达于肾小管和肾小球的所有细胞,并参与多种疾病的发生发展,如果没有补体激活的抑制系统,肾脏可能会受到损害,推测肾脏 CD59 对同源补体攻击具有保护作用^[24]。研究发现,给小鼠体内转入人 CD59 基因后,小鼠的肾脏缺血/再灌注损伤明显减轻^[25]。在大鼠体内,CD59 和 Crry 共同抵抗体内补体介导的损伤以维持肾脏结构及功能的完整性,表明在补体介导的肾小球损伤中,肾小球细胞膜上膜攻击复合物的形成可能会诱导功能和代谢的变化,并影响随后的损伤过程^[26]。

综上所述,CST3、 β_2 M、IGFBP4、CFD、CD59 可能是预测 SA-AKI 的潜在生物标志物,这有助于早期诊断 SA-AKI,对于 SA-AKI 患者是否行 CRRT 治疗,IGFBP4 可能会提供帮助,未来还需要通过大样本前瞻性研究及临床实践来验证这些标志物的诊断效能。此外,对于其中的各种机制仍需进一步地探索和研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 朱为民:论文选题、研究设计、实验操作、论文撰写;陈南瑾、徐颖鹤:研究指导、论文修改;戴罕之、董翠翠、余芳宇、郑诚、张超、张胜:数据采集、整理、统计学分析;徐煜彬、陈琪:实验操作、论文撰写;蒋永波:论文选题、研究设计、基金获取、研究指导、论文修改

参考文献

- Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury [J]. BMJ, 2019, 364: k4891. DOI: 10.1136/bmj.k4891.
- Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, et al. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database [J]. Intensive Care Med, 2009, 35 (10): 1692–1702. DOI: 10.1007/s00134-009-1530-4.
- Tian HH, Sun T, Hao D, et al. The optimal timing of continuous renal replacement therapy for patients with sepsis-induced acute kidney injury [J]. Int Urol Nephrol, 2014, 46 (10): 2009–2014. DOI: 10.1007/s11255-014-0747-5.
- Teo SH, Endre ZH. Biomarkers in acute kidney injury (AKI) [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017, 31 (3): 331–344. DOI: 10.1016/j.bpa.2017.10.003.
- Klein SJ, Brandtner AK, Lehner GF, et al. Biomarkers for prediction of renal replacement therapy in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. Intensive Care Med, 2018, 44 (3): 323–336. DOI: 10.1007/s00134-018-5126-8.
- Wang KF, Xie SL, Xiao K, et al. Biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 6937947. DOI: 10.1155/2018/6937947.
- Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury [J]. Nephrology (Carlton), 2010, 15 (4): 419–428. DOI: 10.1111/j.1444-1797.2010.01317.x.
- Madero M, Levin A, Ahmed SB, et al. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2024 clinical practice guideline [J]. Ann Intern Med, 2025, 178 (5): 705–713. DOI: 10.7326/ANNALS-24-01926.
- Li YM, Long JK, Chen JQ, et al. Analysis of spatiotemporal urine protein dynamics to identify new biomarkers for sepsis-induced acute kidney injury [J]. Front Physiol, 2020, 11: 139. DOI: 10.3389/fphys.2020.00139.
- Dai XG, Zeng ZH, Fu CL, et al. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, cystatin C, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in critically ill patients with sepsis-associated acute kidney injury [J]. Crit Care, 2015, 19 (1): 223. DOI: 10.1186/s13054-015-0941-6.
- Yang H, Lin CL, Zhuang CY, et al. Serum Cystatin C as a predictor of acute kidney injury in neonates: a meta-analysis [J]. J Pediatr (Rio J), 2022, 98 (3): 230–240. DOI: 10.1016/j.jpeds.2021.08.005.
- Maruniak-Chudek I, Owsianka-Podlesny T, Wróblewska J, et al. Is serum cystatin C a better marker of kidney function than serum creatinine in septic newborns? [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012, 66: 175–180. DOI: 10.5604/17322693.988679.
- Argyropoulos CP, Chen SS, Ng YH, et al. Rediscovering beta-2 microglobulin as a biomarker across the spectrum of kidney diseases [J]. Front Med (Lausanne), 2017, 4: 73. DOI: 10.3389/fmed.2017.00073.
- Fernandez F, Barrio V, Guzman J, et al. Beta-2-microglobulin in the assessment of renal function in full term newborns following perinatal asphyxia [J]. J Perinat Med, 1989, 17 (6): 453–459. DOI: 10.1515/jpme.1989.17.6.453.
- Du Y, Zappitelli M, Mian A, et al. Urinary biomarkers to detect acute kidney injury in the pediatric emergency center [J]. Pediatr Nephrol, 2011, 26 (2): 267–274. DOI: 10.1007/s00467-010-1673-0.
- Barton KT, Kakajiwal A, Dietzen DJ, et al. Using the newer Kidney Disease: Improving Global Outcomes criteria, beta-2-microglobulin levels associate with severity of acute kidney injury [J]. Clin Kidney J, 2018, 11 (6): 797–802. DOI: 10.1093/ckj/sfy056.
- 杨书英, 王勇强, 高红梅, 等. 尿胰岛素样生长因子结合蛋白 7 对脓毒症所致急性肾损伤的早期诊断价值 [J]. 中华急诊医学杂志, 2017, 26 (9): 1010–1014. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.09.007.
- Van Doorn J, Cornelissen AJ, Van Buul-Offers SC. Plasma levels of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) under normal and pathological conditions [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2001, 54 (5): 655–664. DOI: 10.1046/j.1365-2265.2001.01248.x.
- Wu TF, Xie C, Han J, et al. Insulin-like growth factor binding protein-4 as a marker of chronic lupus nephritis [J]. PLoS One, 2016, 11 (3): e0151491. DOI: 10.1371/journal.pone.0151491.
- Lesavre PH, Müller-Eberhard HJ. Mechanism of action of factor D of the alternative complement pathway [J]. J Exp Med, 1978, 148 (6): 1498–1509. DOI: 10.1084/jem.148.6.1498.
- Volanakis JE, Barnum SR, Giddens M, et al. Renal filtration and catabolism of complement protein D [J]. N Engl J Med, 1985, 312 (7): 395–399. DOI: 10.1056/NEJM198502143120702.
- Lachmann PJ. The control of homologous lysis [J]. Immunol Today, 1991, 12 (9): 312–315. DOI: 10.1016/0167-5699(91)90005-E.
- Weinstock C. Association of blood group antigen CD59 with disease [J]. Transfus Med Hemother, 2022, 49 (1): 13–24. DOI: 10.1159/000521174.
- Matsuo S, Nishikage H, Yoshida F, et al. Role of CD59 in experimental glomerulonephritis in rats [J]. Kidney Int, 1994, 46 (1): 191–200. DOI: 10.1038/ki.1994.259.
- Bongoni AK, Lu B, Salvaris EJ, et al. Overexpression of human CD55 and CD59 or treatment with human CD55 protects against renal ischemia-reperfusion injury in mice [J]. J Immunol, 2017, 198 (12): 4837–4845. DOI: 10.4049/jimmunol.1601943.
- Watanabe M, Morita Y, Mizuno M, et al. CD59 protects rat kidney from complement mediated injury in collaboration with crry [J]. Kidney Int, 2000, 58 (4): 1569–1579. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00318.x.

(收稿日期: 2025-03-17)
(本文编辑: 保健媛 马英)