

脓毒症凝血相关基因的免疫浸润和危重特征分析

邢燕 程梦 董跃丽 程东良 史长松 杨中文

郑州大学人民医院(河南大学临床医学院,河南省人民医院)儿童重症监护室,郑州 450003

通信作者:邢燕, Email: xxyzz2942@163.com

【摘要】 目的 分析脓毒症凝血相关基因的免疫浸润和危重特征,通过大规模数据分析揭示凝血相关差异表达基因(CRDEG)在脓毒症中的作用,并探讨其与脓毒症凝血病的关系及干预靶点。**方法** ①生物信息学实验:基于根据脓毒症数据集整合的基因表达数据库(GEO)数据集,将样本分为 989 例脓毒症样本和 100 例对照样本,进行差异表达分析,并与通过基因相关数据库获得的凝血相关基因取交集,得到 CRDEG。根据脓毒症诊断模型的风险评分表达中位数,将脓毒症样本分为高风险组和低风险组,比较模型基因表达在两组间的差异;构建 CRDEG 相关蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,通过算法分析获得关键基因,分析关键基因与脓毒症的相关性,并通过受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析评估关键基因表达量对脓毒症的诊断价值。比较脓毒症高低风险组各免疫细胞浸润的相对丰度,采用 Spearman 相关法分析关键基因与免疫细胞的相关性。构建关键基因 mRNA-转录因子(TF)及关键基因 mRNA-微小 RNA(miRNA)调控网络,探讨脓毒症凝血病相关信号通路的变化。②动物实验验证:将 15 只 SD 雄性大鼠按随机数字表法分为脓毒症组、脓毒症-弥散性血管内凝血(DIC)组和人重组血小板生成素(hrTPO)干预组,每组 5 只。检测大鼠危重指标[血小板/淋巴细胞比值(PLR)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)、氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)、碱剩余(BE)、乳酸(Lac)];应用流式细胞仪检测外周血巨噬细胞表面标志物 CD163(可内化血管性血友病因子裂解酶 ADAMTS-13 的清道夫分子)水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆 ADAMTS-13 和血管性血友病因子(vWF)活性;采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测外周血白细胞微小 RNA-150(miR-150)、核转录因子 p65 表达。**结果** ①生物信息学实验结果:最终共获得 59 个 CRDEG,脓毒症高低风险组间有 25 个 CRDEG 的表达量差异存在统计学意义(均 $P < 0.05$)。构建 25 个 CRDEG 的 PPI 网络,基于 5 种算法获得基因取交集作为关键基因,分别为趋化因子 CCL5、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、T 细胞表面蛋白 CD8A、趋化因子受体 5(CCR5)、CD163。脓毒症样本与对照组样本间 5 个关键基因的表达量差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中 CD163 及 MMP-9 与脓毒症呈正相关,其他 3 个基因呈负相关。ROC 曲线分析显示,CD163 表达量在诊断脓毒症方面呈现较高的准确性[ROC 曲线下面积(AUC)为 0.746]。脓毒症高低风险组间有 20 种免疫细胞的免疫浸润丰度差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$);相关性分析显示,CD163 与巨噬细胞呈较强正相关性。调控网络分析显示,参与脓毒症凝血病的核转录因子- κB (NF- κB)可能调控 CD163 表达,而与脓毒症凝血病相关的 miR-150 可能调控 NF- κB 和 CD163。②动物实验验证结果:与脓毒症组比较,脓毒症-DIC 组大鼠危重指标恶化,凝血功能障碍加重,表现为外周血 CD163⁺巨噬细胞亚群水平升高,血浆 ADAMTS-13 活性下降、vWF 活性升高,外周血白细胞 miR-150 表达下调、p65 表达上调;hrTPO 干预组大鼠上述指标得到不同程度改善,与脓毒症-DIC 组比较,差异均有统计学意义[ADAMTS-13:(6.44 ± 1.24)% 比 (1.87 ± 0.40)%, vWF:(224.80 ± 26.19)% 比 (394.10 ± 22.54)%, miR-150($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$): 2.47 ± 0.23 比 0.97 ± 0.19 , p65($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$): 3.90 ± 0.70 比 7.71 ± 0.63 , 均 $P < 0.05$]。**结论** 通过整合的 GEO 数据集识别出 CRDEG,CD163 可能是脓毒症免疫-凝血紊乱的核心基因。巨噬细胞 CD163 及上游 NF- κB 信号分子上调、miR-150 下调与脓毒症危重指标恶化和凝血功能障碍趋势一致,hrTPO 可改善上述现象。

【关键词】 脓毒症;凝血功能障碍;生物信息学;免疫浸润;危重特征

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20220040)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250210-00080

Immune infiltration and clinical characteristics analysis of coagulation-related genes in sepsis

Xing Yan, Cheng Meng, Dong Yueli, Cheng Dongliang, Shi Changsong, Yang Zhongwen

Department of Pediatric Intensive Care Unit, Zhengzhou University People's Hospital (Henan University Clinical Medical School, Henan Provincial People's Hospital), Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Xing Yan, Email: xxyzz2942@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the immune infiltration and critical characteristics of coagulation-related genes in sepsis, reveal the role of coagulation-related differentially expressed gene (CRDEG) in sepsis through large-scale data analysis, and explore the relationship between CRDEG and coagulopathy in sepsis as well as the potential targets. **Methods** ① Bioinformatics experiment: based on the Gene Expression Omnibus (GEO) database integrated

from sepsis datasets, samples were divided into 989 sepsis samples and 100 control samples for differential expression analysis. The analysis results were intersected with coagulation-related genes obtained from gene-related databases to obtain CRDEG. According to the median expression of risk score in the sepsis diagnosis model, the sepsis samples were divided into a high-risk group and a low-risk group, and the difference of CRDEG expression between the two groups were compared. A CRDEG-related protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and key genes were obtained through algorithm analysis, and the correlation between key genes and sepsis was analyzed, and the diagnostic value of key genes expression for sepsis was evaluated by receiver operator characteristic curve (ROC curve) analysis. The relative abundance of immune cells infiltrated in the high- and low-risk groups of sepsis was compared, and the correlation between key genes and immune cells was calculated based on the Spearman correlation analysis. The key gene mRNA-transcription factor (TF) and key gene mRNA-microRNA (miRNA) regulatory network were constructed to explore the changes in the signaling pathways to coagulopathy in sepsis. ② Animal experiment verification: 15 male SD rats were randomly divided into a sepsis group, a sepsis-disseminated intravascular coagulation (DIC) group and a human recombinant thrombopoietin (hrTPO) intervention group, with 5 rats in each group. The rats' critical indicators [platelet/lymphocyte ratio (PLR), prothrombin time (PT), fibrinogen (FIB), oxygenation index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), base excess (BE), lactic acid (Lac)] were detected. The level of CD163 [the scavenger that internalizes ADAMTS-13 (von Willebrand factor-cleaving protease) on the surface of monocyte-macrophages] in peripheral blood was detected by flow cytometry. The activity of plasma ADAMTS-13 and von Willebrand factor (vWF) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of microRNA-50 (miR-150) and p65 (nuclear transcription factor) in peripheral blood leukocytes was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** ① Bioinformatics experiment results: finally, a total of 59 CRDEG were obtained. The expression levels of 25 CRDEG were statistically significant between the high-risk and low-risk groups of sepsis (all $P < 0.05$). The PPI network of the 25 CRDEG was constructed, and the intersection of genes obtained based on five algorithms as key genes, which were chemokine CCL5, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), T-cell surface protein CD8A, chemokine receptor 5 (CCR5), and CD163, respectively. The expression levels of five key genes were statistically significant between the sepsis samples and the control samples (all $P < 0.05$), among which key gene CD163 and MMP-9 were positively correlated with sepsis, and the other three genes were negatively correlated with it. ROC curve analysis showed that the CD163 expression level had a high accuracy in the diagnosis of sepsis [area under the ROC curve (AUC) was 0.746]. The immune infiltration abundance of 20 kinds of immune cells was statistically significant between the high- and low-risk groups of sepsis (all $P < 0.05$). Correlation analysis showed that CD163 was strongly positively correlated with macrophages. Regulatory network analysis showed that nuclear factor- κB (NF- κB), which participates in the coagulopathy of sepsis, might regulate the expression of CD163 and the miR-150 related to coagulopathy in sepsis might regulate NF- κB and CD163. ② Animal experimental verification results: compared with the sepsis group, the rats in the sepsis-DIC group had worse critical indicators, and coagulation function disorders were aggravated, which was manifested by the increased CD163⁺ subset levels in peripheral blood macrophages, decreased plasma ADAMTS-13 activity, increased vWF activity, downregulated miR-150 expression in peripheral blood white blood cells and upregulated p65 expression. The above indicators of the rats in the hrTPO intervention group were improved to varying degrees compared with the sepsis-DIC group, and there were statistically significant differences between the two groups [ADAMTS-13: $(6.44 \pm 1.24)\%$ vs. (1.87 ± 0.40) , vWF: $(224.80 \pm 26.19)\%$ vs. $(394.10 \pm 22.54)\%$, miR-150 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$): 2.47 ± 0.23 vs. 0.97 ± 0.19 , p65 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$): 3.90 ± 0.70 vs. 7.71 ± 0.63 , all $P < 0.05$]. **Conclusions** By integrating the GEO dataset, CRDEG was identified, with CD163 potentially being the core gene involved in sepsis-induced immune-coagulopathy. The upregulation of macrophage CD163 and upstream NF- κB signaling molecules, coupled with the downregulation of miR-150, aligns with the deterioration of critical indicators of sepsis and the trend towards coagulopathy. However, hrTPO can ameliorate these phenomena.

【Key words】 Sepsis; Coagulation dysfunction; Bioinformatics; Immune infiltration; Critical characteristics

Fund program: Henan Provincial Medical Science and Technology Research and Development Program Project (LHGJ20220040)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250210-00080

脓毒症是指宿主对感染产生的免疫失控反应,进而发生器官功能障碍,是目前临床上危重症患者死亡的主要原因之一,其发病率为 22/10 万,病死率为 9%~22%,造成了严重的经济负担^[1]。当前对于脓毒症的诊断和治疗手段有限,早期识别和有效干预仍是挑战。既往研究表明,凝血功能紊乱与脓毒症的发展密切相关。脓毒性休克患者血小板减少的发生率较高^[2]。血小板减少不仅是脓毒症患者的常见并发症,还与患者的预后相关,可引起多器官功能

障碍^[3]。研究表明,血小板减少可能会直接导致脓症患者病死率增加,可能与血小板活化参与机体先天性及获得性凝血相关免疫反应过程有关^[4]。本研究关注凝血相关差异表达基因(coagulation-related differentially expressed gene, CRDEG)与脓毒症之间的关系,旨在通过大规模数据分析揭示这些基因在脓毒症中的作用,进而探讨血小板活化机制与脓毒症凝血功能障碍的关系及干预靶点,为临床诊疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 生物信息学实验

1.1.1 脓毒症相关 CRDEG: 基于根据脓毒症数据集整合的标准化处理及去批次效应后的基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据集, 将样本分为 989 例脓毒症样本和 100 例对照样本。使用 R 语言软件包 limma (version 3.58.1) 对脓毒症样本和对照样本中的基因进行差异表达分析。将差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 与通过 GeneCards 数据库及 MSigDB 数据库收集的 1 649 个凝血相关基因 (coagulation-related gene, CRG) 取交集, 得到 CRDEG。分析 CRDEG 的表达差异, 并使用 R 语言软件包 pheatmap 绘制热图。

1.1.2 CRDEG 在脓毒症高低风险组中的验证分析: 根据基于 CRDEG 构建的脓毒症诊断模型的风险评分表达中位数, 将脓毒症样本分为高风险组和低风险组, 比较模型基因表达在两组间的差异。

1.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络与关键基因的筛选: 应用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) 构建 CRDEG 相关 PPI 网络。首先应用 Cytoscape 软件 CytoHubba 插件中的 5 种算法, 即最大团中心性算法 (maximal clique centrality, MCC)、最大领域成分算法 (maximum neighborhood component, MNC)、边缘聚集系数算法 (edge percolated component, EPC)、密集中心度算法计算 CRDEG 的得分; 然后分别根据得分依次排列, 选择 TOP5 基因; 最后将 5 种不同算法所得基因取交集, 将算法交集基因作为关键基因。

1.1.4 关键基因差异表达验证及诊断相关性分析: 针对关键基因, 在整合的 GEO 数据集中脓毒症与对照样本间进行表达差异分析, 通过 R 语言软件包 igraph (version 1.6.0) 及 ggraph (version 2.1.0) 绘制关键基因的相关性分析和弦图。相关系数 (r 值) 绝对值 < 0.3 代表弱相关或不相关, $\geq 0.3 \sim < 0.5$ 代表弱相关, $\geq 0.5 \sim < 0.7$ 代表中等程度相关, ≥ 0.7 代表强相关。使用 R 语言软件包 pROC (version 1.18.5) 绘制关键基因的受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC 曲线), 并计算 ROC 曲线下面积 (area under the ROC curve, AUC), 以评估关键基因表达量对脓毒症的诊断价值。

1.1.5 脓毒症高低风险组免疫浸润分析: 标记各浸润免疫细胞类型, 利用单样本基因集富集分析

(single-sample gene-set enrichment analysis, ssGSEA) 计算得出的富集分数表示样本中各免疫细胞浸润的相对丰度, 得出免疫细胞浸润矩阵。利用 R 语言软件包 ggplot2 (version 3.4.4) 绘制分组比较图, 展示免疫细胞在整合 GEO 数据集中脓毒症高低风险组间的表达差异。筛选出两组间差异有统计学意义的免疫细胞用于关键基因免疫浸润分析, 基于 Spearman 相关法分析关键基因与免疫细胞的相关性。

1.1.6 调控网络的构建: 通过 ChIPBase 数据库检索与关键基因结合的转录因子 (transcription factor, TF), 通过 TarBase 数据库获取与关键基因相关的微小 RNA (microRNA, miRNA), 并应用 Cytoscape 软件构建关键基因 mRNA-TF 及关键基因 mRNA-miRNA 调控网络, 探讨脓毒症凝血病相关信号通路的变化。

1.2 动物实验验证

1.2.1 实验动物及分组: 15 只 SD 大鼠, 雄性, 10 周龄, 体质量约 0.22 kg, 购于天津大学实验动物中心, 动物许可证号: SYXK (津) 2024-0002。适应性饲养 3 d 后, 将大鼠按照随机数字表法分为脓毒症组、脓毒症-弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 组和人重组血小板生成素 (human recombinant thrombopoietin, hrTPO) 干预组, 每组 5 只。

1.2.2 动物处理方法: ① 脓毒症组大鼠经气管内注入脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS; 大肠埃希菌 O111:B4) 2 mg/kg, 随后在 2 h 内以 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度静脉内注入 LPS 2 mg/kg, 24 h 后大鼠出现血压降低、尿量减少、乳酸升高并对液体复苏有反应; LPS 输注终止后 24 h 处死大鼠收集标本。② 脓毒症-DIC 组大鼠经气管内注入 LPS 10 mg/kg, 随后在 2 h 内以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度静脉内注入 LPS 10 mg/kg, 24 h 后大鼠出现血压降低、尿量减少、乳酸升高并伴有皮肤出血, 48 h 后出现持续低血压并对液体复苏不敏感; LPS 输注终止后 48 h 处死大鼠收集标本。③ hrTPO 干预组大鼠经气管内注入 LPS 10 mg/kg, 随后在 2 h 内以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度静脉内注入 LPS 10 mg/kg; 待 LPS 输注完成后, 静脉注射 hrTPO 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每日 1 次, 连续 3 d。LPS 输注终止后 24 h 内大鼠出现血压和尿量降低、乳酸升高并伴有皮肤出血, 72 h 内对液体复苏始终有反应; LPS 输注终止后 72 h 处死大鼠收集标本。所有大鼠常规输注生理盐水补液, 并收集血液样本备检。本实验操作符合动物伦理学标准, 并通过了郑州大学生命科学伦理审查委员会的伦理审批 (审批号: 2022-03-18)。

1.2.3 检测指标及方法

1.2.3.1 危重指标检测:应用动物血常规和凝血检测仪及动物血气分析仪检测大鼠血小板/淋巴细胞比值(platelet/lymphocyte ratio, PLR)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)、碱剩余(base excess, BE)、乳酸(lactic acid, Lac)。

1.2.3.2 血 CD163⁺ 巨噬细胞亚群水平检测:取大鼠外周抗凝血 100 μL , 加溶血素 0.4 mL 溶血 5 min, 加 1 \times 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 5 mL 终止溶血, 离心后, 得到外周血白细胞; 清洗细胞 2 次, 取 20 μL 细胞悬液, 加 2 μL 别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)-小鼠抗大鼠 CD3 (1:10)、2 μL 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-兔抗大鼠淋巴细胞抗原 6 复合物(lymphocyte antigen 6 complex, locus g, ly6g; 1:10)、2 μL 藻红蛋白(phycoerythrin, PE)-兔抗大鼠 CD163 抗体(1:10), 室温孵育 30 min; 1 \times PBS 洗涤后, 振荡上机, 应用流式细胞仪检测 CD163⁺ 巨噬细胞亚群。

1.2.3.3 血浆血管性血友病因子裂解酶 ADAMTS-13 和血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF) 活性检测:取静脉血 1 mL, 分离血浆后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血浆 ADAMTS-13、vWF 活性。

1.2.3.4 反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain, RT-PCR) 检测 CD163 上游信号分子微小 RNA-150(microRNA-150, miR-150)、p65 的表达:取外周抗凝血 200 μL , 加溶血素 0.8 mL 溶血 5 min, 加 1 \times PBS 10 mL 终止溶血, 离心得到外周血白细胞, 清洗 2 次弃上清, 放入 1 mL TRIzol 溶液中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。应用 TRIzol 结合 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 应用 miRcute miRNA 提取试剂盒提取微小 RNA(microRNA, miRNA), 并应用 cDNA 第一链合成试剂盒获得总 cDNA。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。应用荧光定量 PCR 仪检测 CT 值, 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算表达量。

1.3 统计学分析:生物信息学实验中所有数据处理与分析采用 R 语言软件(version 4.2.2), 动物实验中数据应用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学分析。采用 Kolmogorov-Smirno 法对计量资料进行正态性检验, 符合正态分布, 以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,

组间比较采用单样本 t 检验。计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 生物信息学实验结果

2.1.1 脓毒症 CRDEG:基于整合的 GEO 数据集, 共获得上调 DEG 209 个, 下调 DEG 208 个。将上述基因与 CRG 取交集, 最终共得到 59 个 CRDEG。根据取交集结果, 对整合的 GEO 数据集中脓毒症样本与对照样本的 CRDEG 进行表达差异分析, 并绘制出热图(图 1)。

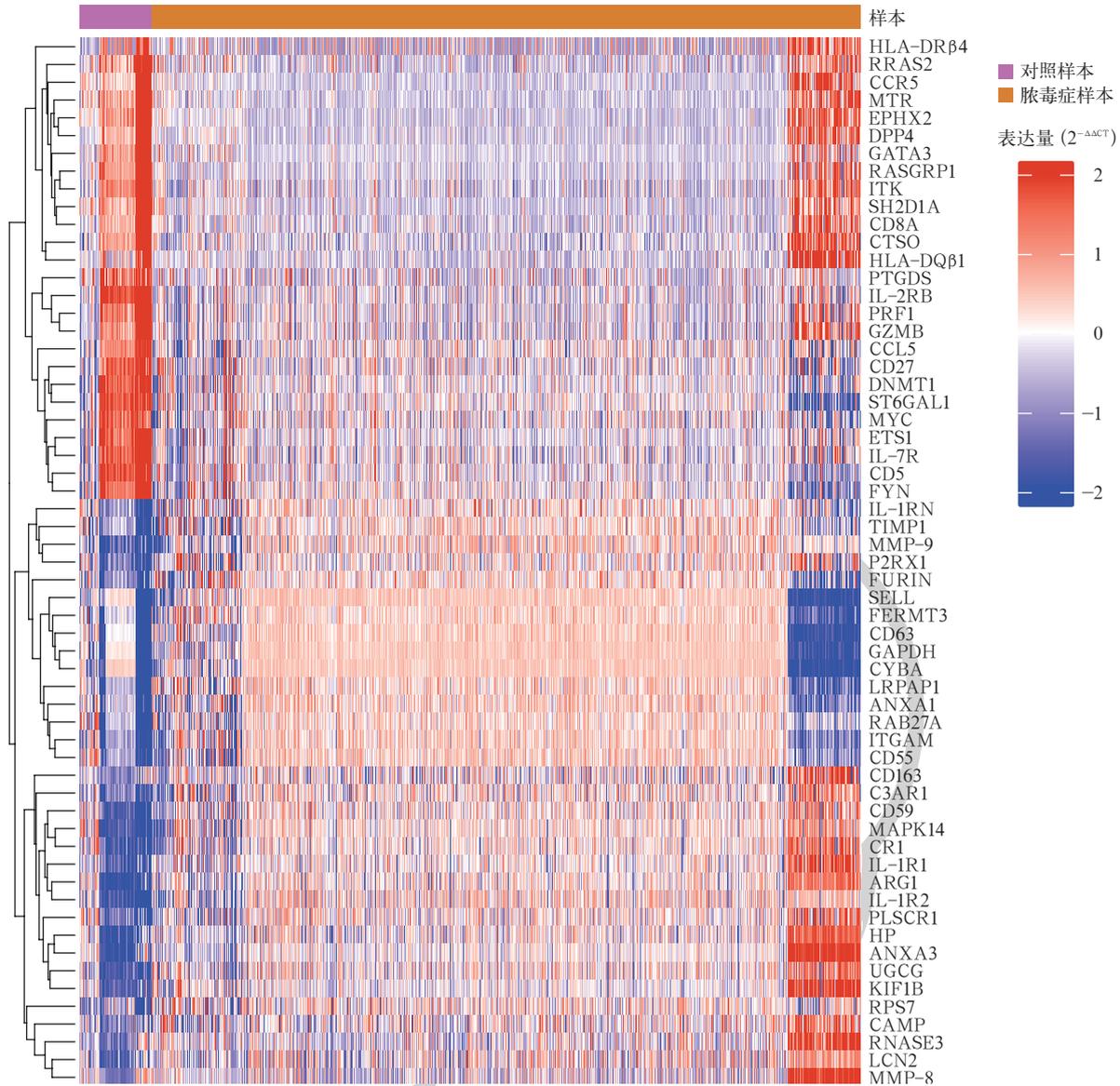
2.1.2 CRDEG 在脓毒症高低风险组中的验证分析(图 2):脓毒症高低风险组间有 25 个 CRDEG 的表达量差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.1.3 PPI 网络的构建:构建 25 个 CRDEG 的 PPI 网络, 将 5 种算法获得基因取交集, 最终得到 5 个关键基因, 分别为趋化因子 CCL5、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、T 细胞表面蛋白 CD8A、趋化因子受体 5(chemokine receptor 5, CCR5)、单核/巨噬细胞表面标志物 CD163(一种可以内化 ADAMTS-13 的清道夫分子)。

2.1.4 关键基因差异表达在脓毒症中的相关性分析及诊断价值验证:整合的 GEO 数据集中脓毒症样本与对照样本间 5 个关键基因 CCL5、MMP-9、CD8A、CCR5、CD163 的表达量差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$; 图 3)。相关性和弦图显示(图 4), 关键基因 CD163 及 MMP-9 与脓毒症主要呈现正相关性, 而其他 3 个基因则呈负相关。ROC 曲线分析显示(图 5), CCL5、CCR5、CD163、CD8A、MMP-9 表达量在诊断脓毒症方面均呈现较高的准确性(AUC 均 > 0.7)。

2.1.5 脓毒症高低风险组免疫浸润分析:ssGSEA 分析显示, 脓毒症高低风险组间有 20 种免疫细胞的免疫浸润丰度差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。这 20 种免疫细胞主要与脓毒症高风险呈正相关性, 其中 CD163 与巨噬细胞呈较强正相关性。

2.1.6 调控网络的构建:mRNA-TF 调控网络显示, 关键基因 CD163、MMP-9、CD8A 与通过 ChIPBase 数据库获得的 34 个 TF 表达水平呈现相关关系。其中, 与 CD163 相关信号通路中, 核转录因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 是最常见的可能参与脓毒症凝血的分子。利用通过 TarBase 数据库获取的与 NF- κB 基因上游相关的 miRNA 构建的 mRNA-miRNA 调控网络显示, 共包含 30 个 miRNA。其中, 与 CD163 和上游 NF- κB 信号分子相关的 miRNA 为 miR-150。



注:GEO 为基因表达数据库,CRDEG 为凝血相关差异表达基因,HLA 为主要组织相容性复合体 II 类,RRAS2 为 RAS 相关蛋白 2,CCR5 为趋化因子受体 5,MTR 为雷帕霉素激酶机制靶点,EPHX2 为可溶性环氧化物水解酶 X2,DPP4 为二肽基肽酶 4,GATA3 为 GATA 转录因子家族成员 3,RASGRP1 为 RAS 鸟苷酸释放蛋白 1,ITK 为白细胞介素-2 诱导的 T 细胞激酶,SH2D1A 为 SH2 结构域蛋白 1A,CD8A 为 T 细胞表面蛋白,CTSO 为半胱天冬酶 O 蛋白,PTGDS 为前列腺素 D2 合成酶,IL-2RB 为白细胞介素-2 受体 B,PRF1 为穿孔素 1,GZMB 为颗粒酶 B,CCL5 为趋化因子 CCL5,CD27、CD5 为 T/B 细胞识别和信号转导表面分子, DNMT1 为 DNA 甲基转移酶 1,ST6GAL1 为 α -2,6-唾液酸转移酶,MYC 为编码核蛋白的癌基因,ETS1 为骨髓成红细胞增多症病毒 E26 癌基因同源物 1,IL-7R 为白细胞介素-7 受体,FYN 为 FYN 原癌基因,IL-1R 为白细胞介素-1 受体,TIMP1 为金属肽酶抑制剂 1,MMP 为基质金属蛋白酶,P2RX1 为嘌呤能受体 P2X1,FURIN 为成对的基本氨基酸切割酶,SELL 为选择素 L 或 CD62L,FERMT3 为 Fermitins 家族蛋白 3,CD163、CD63 为单核/巨噬细胞表面标志物,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶,CYBA 为细胞色素 B-245 α ,LRPAP1 为低密度脂蛋白受体相关蛋白 1,ANXA 为编码钙离子依赖的磷脂结合蛋白,RAB27A 为 RAS 癌基因家族成员,ITGAM 为整合素 α M,CD55、CD59 为调节补体活性的膜蛋白,C3AR1 为补体 C3a 受体 1,MAPK14 为丝裂素活化蛋白激酶 14,CR1 为补体 C3b/C4b 受体 1,ARG1 为精氨酸酶 1,PLSCR1 为磷脂酰丝氨酸翻转酶 1,HP 为触珠蛋白,UGCG 为 UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶,KIF1B 为动力蛋白家族膜蛋白 1B,RPS7 为核糖体蛋白 S7,CAMP 为大环内酯类抗菌生物肽,RNASE3 为核糖核酸酶 A 家族膜蛋白 3,LCN2 为脂质运载蛋白 2

图 1 整合的 GEO 数据集中脓毒症样本与对照样本 CRDEG 差异表达分析热图

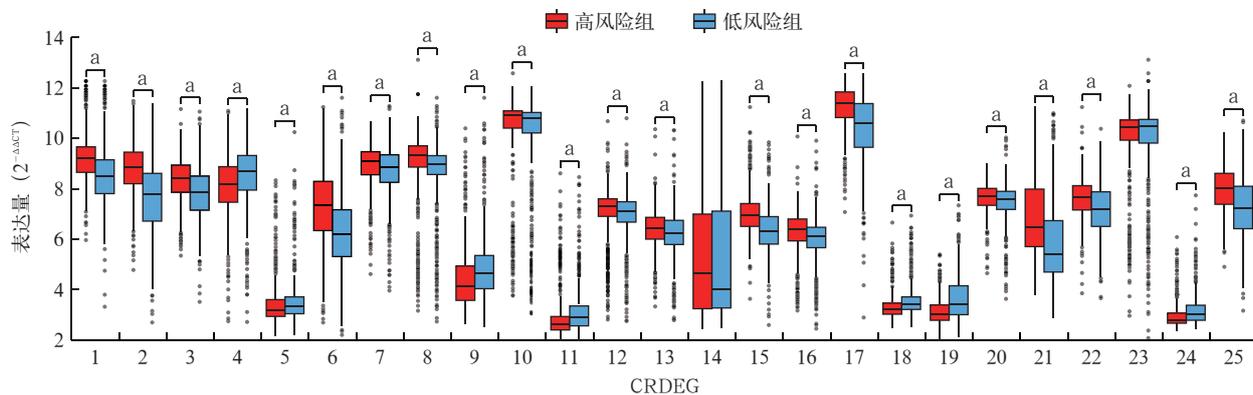
2.2 动物实验验证结果

2.2.1 危重指标 (表 1):

脓毒症-DIC 组和 hrTPO 干预组大鼠 PLR、FIB、PaO₂/FiO₂ 均较脓毒症组降低,PT、BE 绝对值、Lac 较脓毒症组升高 (均 $P < 0.05$); 但 hrTPO 干预组上述指标均较脓毒症-DIC 组改善 (均 $P < 0.05$)。

2.2.2 外周血 CD163⁺ 巨噬细胞亚群水平 (图 6):

鉴于各组小鼠危重指标的差异,同时结合生物信息学分析结果,本研究主要关注外周血中血小板-单核/巨噬细胞聚集体活化后形成的可内化 ADAMTS-13 进而增加 vWF 活性的 CD163⁺ 亚群巨噬细胞情况。结果显示,脓毒症-DIC 组和 hrTPO 干预组大鼠外周



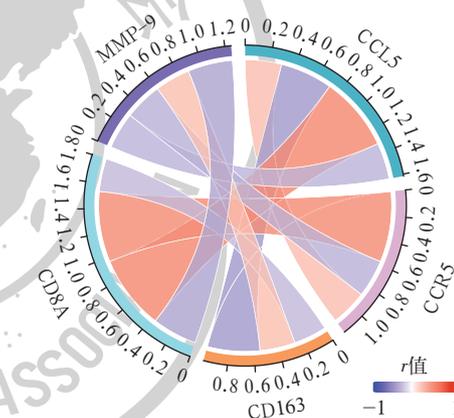
注:GEO 为基因表达数据库,CRDEG 为凝血相关差异表达基因;1 为编码钙离子依赖的磷脂结合蛋白 3(ANXA3),2 为精氨酸酶 1(ARG1),3 为补体 C3a 受体 1(C3AR1),4 为趋化因子 CCL5,5 为趋化因子受体 5(CCR5),6 为单核/巨噬细胞表面标志物 CD163,7 为调节补体活性的膜蛋白 CD55,8 为单核/巨噬细胞表面标志物 CD63,9 为 T 细胞表面蛋白 CD8A,10 为细胞色素 B-245α(CYBA),11 为可溶性环氧化物水解酶 X2(EPHX2),12 为 Fermitins 家族蛋白 3(FERMT3),13 为成对的基本氨基酸切割酶 FURIN,14 为主要组织相容性复合体 II 类 DRβ4(HLA-DRβ4),15 为白细胞介素-1 受体 1(IL-1R1),16 为低密度脂蛋白受体相关蛋白关联蛋白 1(LRPAP1),17 为基质金属蛋白酶-9(MMP-9),18 为雷帕霉素激酶机制靶点(MTR),19 为前列腺素 D2 合成酶 PTGDS,20 为 RAS 癌基因家族成员 RAB27A,21 为核糖核酶 A 家族膜蛋白 3(RNASE3),22 为核糖体蛋白 S7(RPS7),23 为选择素 L(SELL,CD62L),24 为 SH2 结构域蛋白 1A(SH2D1A),25 为 UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶(UGCG);组间比较,* $P < 0.05$

图 2 整合的 GEO 数据集中脓毒症高风险组与低风险组患者 CRDEG 表达比较

血 CD3⁺ly6g⁺CD163⁺ 巨噬细胞亚群水平较脓毒症组升高,而 hrTPO 干预组 CD3⁺ly6g⁻CD163⁺ 巨噬细胞亚群水平较脓毒症-DIC 组下降。

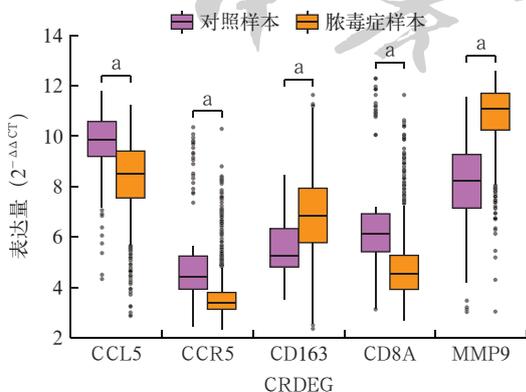
2.2.3 血浆 ADAMTS-13 和 vWF 活性(表 2):脓毒症-DIC 组和 hrTPO 干预组大鼠血浆 ADAMTS-13 活性均较脓毒症组降低,vWF 均升高(均 $P < 0.05$);而 hrTPO 干预组 ADAMTS-13、vWF 活性较脓毒症-DIC 组改善(均 $P < 0.05$)。

2.2.4 外周血白细胞 miR-150 和 p65 表达(表 3):脓毒症-DIC 组和 hrTPO 干预组大鼠外周血白细胞 miR-150 表达均较脓毒症组下调,p65 表达均较脓毒症组上调(均 $P < 0.05$);而 hrTPO 干预组 miR-150、p65 表达均较脓毒症-DIC 组改善(均 $P < 0.05$)。



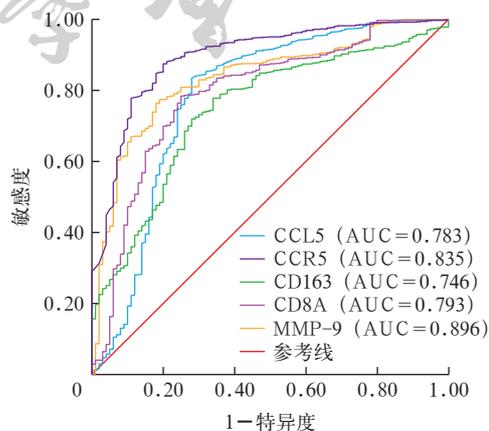
注:CRDEG 为凝血相关差异表达基因,CCL5 为趋化因子 CCL5,CCR5 为趋化因子受体 5,CD163 为单核/巨噬细胞表面标志物,CD8A 为 T 细胞表面蛋白,MMP-9 为基质金属蛋白酶-9

图 4 5 个脓毒症关键 CRDEG 的相关性分析



注:GEO 为基因表达数据库,CRDEG 为凝血相关差异表达基因,CCL5 为趋化因子 CCL5,CCR5 为趋化因子受体 5,CD163 为单核/巨噬细胞表面标志物,CD8A 为 T 细胞表面蛋白,MMP-9 为基质金属蛋白酶-9;组间比较,* $P < 0.05$

图 3 整合的 GEO 数据集中脓毒症样本与对照样本 5 个脓毒症关键 CRDEG 表达比较



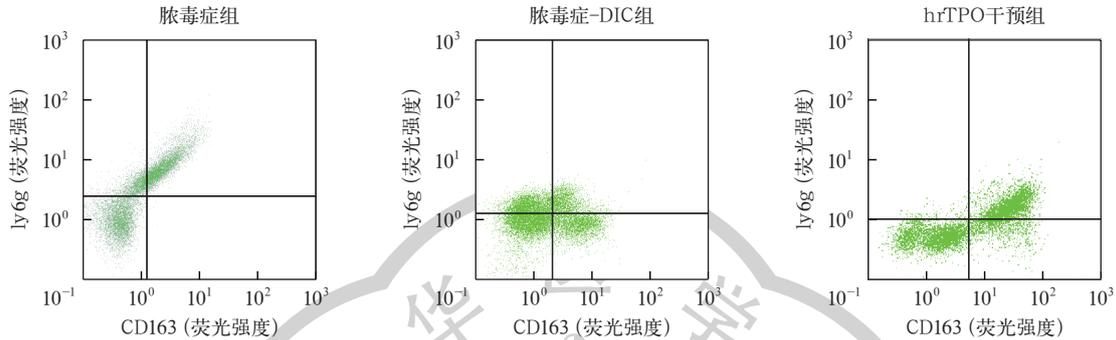
注:CRDEG 为凝血相关差异表达基因,ROC 曲线为受试者工作特征曲线,CCL5 为趋化因子 CCL5,CCR5 为趋化因子受体 5,CD163 为单核/巨噬细胞表面标志物,CD8A 为 T 细胞表面蛋白,MMP-9 为基质金属蛋白酶-9,AUC 为 ROC 曲线下面积

图 5 5 个脓毒症关键 CRDEG 诊断脓毒症的 ROC 曲线

表 1 各组大鼠危重指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	PLR	PT(s)	FIB(g/L)	PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	BE(mmol/L)	Lac(mmol/L)
脓毒症组	5	225.90 ± 61.89	14.70 ± 1.77	1.90 ± 0.32	336.30 ± 25.76	-2.60 ± 1.27	1.60 ± 0.41
脓毒症-DIC组	5	11.50 ± 3.38 ^a	44.09 ± 7.19 ^a	0.96 ± 0.30 ^a	54.80 ± 7.42 ^a	-17.52 ± 2.72 ^a	14.36 ± 2.21 ^a
hrTPO 干预组	5	47.20 ± 12.38 ^{ab}	23.66 ± 3.08 ^{ab}	1.41 ± 0.23 ^{ab}	88.40 ± 10.71 ^{ab}	-8.06 ± 2.09 ^{ab}	5.64 ± 0.80 ^{ab}

注: DIC 为弥散性血管内凝血, hrTPO 为人重组血小板生成素, PLR 为血小板/淋巴细胞比值, PT 为凝血酶原时间, FIB 为纤维蛋白原, PaO₂/FiO₂ 为氧合指数, BE 为碱剩余, Lac 为乳酸; 1 mmHg=0.133 kPa; 与脓毒症组比较, ^aP<0.05; 与脓毒症-DIC 组比较, ^bP<0.05



注: DIC 为弥散性血管内凝血, hrTPO 为人重组血小板生成素, CD163 为单核/巨噬细胞表面标志物, ly6g 为淋巴细胞抗原 6 复合物; 右下象限为 CD3⁺Ly6g⁺CD163⁺ 细胞亚群

图 6 各组大鼠外周血 CD163⁺ 巨噬细胞亚群流式图

表 2 各组大鼠血浆 ADAMTS-13 和 vWF 活性比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	ADAMTS-13	vWF
脓毒症组	5	16.55 ± 2.53	99.30 ± 22.47
脓毒症-DIC组	5	1.87 ± 0.40 ^a	394.10 ± 22.54 ^a
hrTPO 干预组	5	6.44 ± 1.24 ^{ab}	224.80 ± 26.19 ^{ab}

注: DIC 为弥散性血管内凝血, hrTPO 为人重组血小板生成素, ADAMTS-13 为血管性血友病因子裂解酶, vWF 为血管性血友病因子; 与脓毒症组比较, ^aP<0.05; 与脓毒症-DIC 组比较, ^bP<0.05

表 3 各组大鼠外周血白细胞 miR-150 和 p65 表达比较 (2^{-ΔΔCT}, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	miR-150	p65
脓毒症组	5	4.76 ± 0.35	2.23 ± 0.22
脓毒症-DIC组	5	0.97 ± 0.19 ^a	7.71 ± 0.63 ^a
hrTPO 干预组	5	2.47 ± 0.23 ^{ab}	3.90 ± 0.70 ^{ab}

注: DIC 为弥散性血管内凝血, hrTPO 为人重组血小板生成素, miR-150 为微小 RNA-150, p65 为核转录因子; 与脓毒症组比较, ^aP<0.05; 与脓毒症-DIC 组比较, ^bP<0.05

3 讨论

血小板在脓毒症发病过程中具有重要作用^[5], 20%~50% 的脓症患者出现血小板减少, 此类患者病死率高于非血小板减少者, 且血小板减少持续 2 周以上者病死率高达 66%^[6]。严重血小板减少与宿主防御功能严重受损有关^[7]; 血小板减少导致脓毒症病死率增加, 可能与血小板活化参与机体先天性及获得性凝血相关免疫反应过程有关^[4, 8]。本研究通过整合 GEO 数据集, 捕捉到与脓毒症凝血病相关的分子特征, 识别出 59 个 CRDEG, 其中 25 个对脓毒症高低风险判定具有较高的准确性。

本研究进一步构建了 CRDEG 的 PPI 网络, 并识别出 5 个关键基因, 分别为 CCL5、MMP-9、CD8A、CCR5、CD163; ROC 曲线分析显示, 上述 5 个关键基因的表达量在脓毒症诊断方面呈现较高的准确性。表明这些关键基因可能在维持细胞稳态及响应感染过程中发挥核心作用, 是潜在的重要诊治靶标。

CD163 是一种跨膜糖蛋白, 属于富含半胱氨酸清道夫受体超家族, 特异性表达于单核细胞/巨噬细胞表面, 可减轻氧化损伤, 发挥抗炎作用^[9], 其表达在单核细胞向 M2 型巨噬细胞分化过程中显著上调。上调 CD163 表达可改善凝血, 减少巨噬细胞凝聚粘连, 抑制血栓炎症^[10]; 在慢性炎症阶段, CD163 可能通过抗炎信号诱导巨噬细胞向 M2 表型转化, 促进 MMP-9 持续过表达, 导致内皮损伤, 毛细血管渗漏加重, 凝血功能衰竭^[11]。提示 CD163 可能是脓毒症免疫-凝血紊乱的核心基因。

本研究中通过构建调控网络发现, NF-κB 作为最常见的可能参与脓毒症凝血病的分子^[12], 参与了 CD163 相关信号通路, 二者的关系可作为未来研究方向。本研究显示, 与 CD163 和上游 NF-κB 信号分子相关的 miRNA 为 miR-150。研究表明, miR-150 可能与脓毒症相关血小板减少有关^[13], 其作用机制需深入研究。miR-150 虽不能作为脓毒症诊断依据, 但其下降可作为脓毒症凝血病预后不良的标志^[13], 与血小板活化进而引发 DIC 等不良预后有关^[14-16]。内皮细胞研究显示, miR-150 下降可能通过 NF-κB

途径参与血小板激活引发的一系列严重凝血功能障碍^[17]; miR-150 下降可引发后期巨噬细胞凋亡^[18]; miR-150 可通过下调促血管生成素-2 改善内皮细胞损伤^[19]。因此, miR-150 下降可能与血小板早期过度活化引发异常的凝血相关炎症,从而继发脓毒症多器官功能衰竭合并 DIC 病死率增加的机制有关,而上调 miR-150 表达可能改善上述情况。

本研究 CRDEG 与免疫细胞浸润丰度相关性分析表明, CD163 与巨噬细胞呈较强正相关性,可能影响脓毒症凝血病预后,深入研究有利于判定个体化免疫特征和设计个体化精准治疗策略。研究表明,血小板-单核/巨噬细胞聚集体预测脓毒症患者发生急性呼吸窘迫综合征的敏感度高于血小板-中性粒细胞聚集体、血小板-淋巴细胞聚集体、急性生理学及慢性健康状况评分 II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, APACHE II)、序贯器官衰竭评分 (Sequential Organ Failure Assessment, SOFA)^[20]。因此,本研究以血小板-单核/巨噬细胞聚集体作为载体,研究脓毒症凝血病的免疫干预机制。

本研究动物实验显示,脓毒症-DIC 大鼠外周血白细胞 miR-150 表达下调、p65 表达上调, CD163⁺ 巨噬细胞亚群水平升高,导致 ADAMTS-13 内化增加,分泌到血浆中的 ADAMTS-13 减少,从而 vWF 分子被裂解减少,使 vWF 活性升高,是危重指标恶化及凝血功能障碍加重的重要因素; hrTPO 可以延缓上述免疫紊乱及凝血功能障碍的进程,与呼吸循环危重指标改善趋势一致。

综上所述,本研究通过整合的 GEO 数据集,识别出与脓毒症凝血病相关 CRDEG,其中 CD163 可能是脓毒症免疫-凝血紊乱核心基因。巨噬细胞 CD163 及上游 NF- κ B 信号分子上调、miR-150 下调与脓毒症危重指标恶化和凝血功能障碍趋势一致, hrTPO 可改善上述现象。但本研究样本量相对较小,未来将结合更多临床样本进行验证,并探索如何将这些发现转化为联合疗法的实际应用。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 邢燕: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析、获取研究经费; 程梦、董跃丽、程东良: 实施研究、采集数据、统计分析、支持性贡献; 史长松: 酝酿和设计实验, 分析/解释数据, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 行政、技术和材料支持, 指导, 支持性贡献; 杨中文: 酝酿和设计实验、采集数据、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、指导

参考文献

[1] Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic

review[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(3): 223–230. DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8.

- [2] Koyama K, Katayama S, Muroi T, et al. Time course of immature platelet count and its relation to thrombocytopenia and mortality in patients with sepsis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0192064. DOI: 10.1371/journal.pone.0192064.
- [3] Li MF, Li XL, Fan KL, et al. Platelet desialylation is a novel mechanism and a therapeutic target in thrombocytopenia during sepsis: an open-label, multicenter, randomized controlled trial[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 104. DOI: 10.1186/s13045-017-0476-1.
- [4] Hampton T. Platelets' role in adaptive immunity may contribute to sepsis and shock[J]. *JAMA*, 2018, 319(13): 1311–1312. DOI: 10.1001/jama.2017.12859.
- [5] de Stoppelaar SF, van't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(4): 666–677. DOI: 10.1160/TH14-02-0126.
- [6] Greinacher A, Selleng S. How I evaluate and treat thrombocytopenia in the intensive care unit patient[J]. *Blood*, 2016, 128(26): 3032–3042. DOI: 10.1182/blood-2016-09-693655.
- [7] de Stoppelaar SF, van't Veer C, Claushuis TA, et al. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice[J]. *Blood*, 2014, 124(25): 3781–3790. DOI: 10.1182/blood-2014-05-573915.
- [8] Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. Bench-to-bedside review: platelets and active immune functions—new clues for immunopathology?[J]. *Crit Care*, 2013, 17(4): 236. DOI: 10.1186/cc12716.
- [9] Tang JP, Lu HJ, Xie ZH, et al. Identification of potential biomarkers for sepsis based on neutrophil extracellular trap-related genes[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2024, 110(1): 116380. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116380.
- [10] Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, et al. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages[J]. *Circ Res*, 2010, 106(1): 203–211. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.199505.
- [11] 刘凤琪, 唐坎凯, 张根生. 脓毒症的免疫监测和免疫治疗[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2023, 50(5): 304–309. DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230724-00010.
- [12] Jeon J, Lee JH, Park KA, et al. Brazilin selectively disrupts proximal IL-1 receptor signaling complex formation by targeting an IKK-upstream signaling components[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89(4): 515–525. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.04.004.
- [13] Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, et al. Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54612. DOI: 10.1371/journal.pone.0054612.
- [14] Braza-Boils A, Barwari T, Gutmann C, et al. Circulating microRNA levels indicate platelet and leukocyte activation in endotoxemia despite platelet P2Y₁₂ inhibition[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2897. DOI: 10.3390/ijms21082897.
- [15] Sakurai K, Miyashita T, Okazaki M, et al. Role for neutrophil extracellular traps (NETs) and platelet aggregation in early sepsis-induced hepatic dysfunction[J]. *In Vivo*, 2017, 31(6): 1051–1058. DOI: 10.21873/invivo.11169.
- [16] Yu D, Noh D, Park J. Flow cytometric evaluation of disseminated intravascular coagulation in a canine endotoxemia model[J]. *Can J Vet Res*, 2015, 79(1): 52–57.
- [17] Liu L, Yan LN, Sui Z. MicroRNA-150 affects endoplasmic reticulum stress via MALAT1-miR-150 axis-mediated NF- κ B pathway in LPS-challenged HUVECs and septic mice[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118744. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118744.
- [18] Zhou X, Zhang KJ, He ZY, et al. Downregulated miR-150 in bone marrow mesenchymal stem cells attenuates the apoptosis of LPS-stimulated RAW264.7 via MTCH2-dependent mitochondria transfer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(3): 560–567. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.098.
- [19] Rajput C, Tauseef M, Farazuddin M, et al. MicroRNA-150 suppression of angiotensin-2 generation and signaling is crucial for resolving vascular injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(2): 380–388. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306997.
- [20] 左蕾, 吴永红, 拜合提尼沙·吐尔地. 脓毒症患者外周血血小板-白细胞聚集体及其分类水平对合并 ARDS 的预测价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(8): 955–958, 963. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.08.016.

(收稿日期: 2025-02-10)

(本文编辑: 孙茜 张耘菲)