

· 调查与研究 ·

基于 GEO 数据库分析脓毒症相关性死亡的潜在差异表达基因和微小 RNAs

吕卓辰 罗士元 童尧 周瑶 王颖

【摘要】 目的 基于基因表达数据库(GEO)运用生物信息学筛选与脓毒症相关性死亡相关的潜在差异表达基因和微小 RNAs(miRNAs)。方法 从 GEO 数据库下载人类血液样本基因表达谱芯片数据集 GSE48080 和 GSE54514,选择两个时点(诊断脓毒症时、脓毒症病程中),使用 GEO2R 在线工具对脓毒症存活患者和非存活患者进行差异表达基因(DEGs)筛选。通过基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,研究脓毒症相关性死亡 DEGs 涉及的病理生理过程和潜在信号通路。使用 STRING 在线工具构建 DEGs 蛋白-蛋白相互作用(PPI),使用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络拓扑,使用 CytoHubba 工具筛选枢纽(Hub)基因。使用 NetworkAnalyst 构建 Hub 基因的目标 miRNAs,使用 RT-qPCR 验证本院脓毒症存活患者和非存活患者相关基因表达变化。结果 在脓毒症病程中,脓毒症存活患者和非存活患者基因表达呈现异质性,共筛选出 15 个 DEGs。KEGG 通路富集分析显示,金黄色葡萄球菌感染、NOD 样受体信号通路、硫代谢和集管酸分泌四个途径存在显著富集。PPI 和 CytoHubba 分析筛选出 10 个 Hub 基因(SLC4A1、EPB42、LTF、LCN2、DEFA4、HBM、HBG1、GMPR、CAMP、OLFM4)。NetworkAnalyst 分析预测了 10 个关键 miRNAs。RT-qPCR 验证结果显示,5 个 Hub 基因(SLC4A1、EPB42、LCN2、DEFA4、OLFM4)与上述分析中的趋势一致。结论 基于 GEO 数据库的生物信息学分析,脓毒症存活患者和非存活患者在脓毒症病程中存在差异表达基因,为探索脓毒症相关性死亡的生物标志物提供了数据支持。

【关键词】 GEO 数据库;脓毒症相关性死亡;差异表达基因;微小 RNAs

Analysis of potential differently expressed genes and miRNAs for sepsis-associated mortality based on GEO database LYU Zhuochen, LUO Shiyuan, TONG Yao, ZHOU Yao, WANG Ying. Department of Anesthesiology, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Corresponding author: WANG Ying, Email: wy10879@rjh.com.cn

【Abstract】 Objective To identify the potential differently expressed genes and microRNAs (miRNAs) in sepsis survivors and non-survivors through bioinformatics-based research based on gene expression omnibus (GEO). **Methods** Two gene expression profile microarray datasets of human blood samples (GSE48080 and GSE54514) were downloaded from the GEO database. The differential expression genes (DEGs) between sepsis survivors and non-survivors at two time points (diagnosis of sepsis, course of sepsis) were screened with the GEO2R online tool. The gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were used to study the pathophysiological processes and potential signaling pathways involved in sepsis related death DEGs. STRING online tool was used to construct the DEGs protein-protein interaction (PPI). Cytoscape with CytoHubba was used to investigate the potential hub genes. NetworkAnalyst was used to construct targeted miRNAs of the hub genes. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was established to evaluate the expression of potential hub genes in our sepsis survivors and non-survivors. **Results** During the course of sepsis, there was heterogeneity in gene expression between sepsis survivors and non-survivors. Fifteen DEGs were found to be remarkably differentially expressed between sepsis survivors and non-survivors during the course of sepsis. Four KEGG pathways, including staphylococcus aureus infection, NOD-like receptor signaling pathway, sulfur metabolism and collecting duct acid secretion, were significantly enriched. In combination with the results of the PPI network and CytoHubba, ten hub genes (SLC4A1, EPB42, LTF, LCN2, DEFA4, HBM, HBG1, GMPR, CAMP, OLFM4) were selected as potential biomarkers for sepsis-associated mortality. With NetworkAnalyst

DOI:10.12089/jca.2024.11.012

基金项目:国家自然科学基金重大项目(T2293730,T2293734)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院麻醉科

通信作者:王颖,Email: wy10879@rjh.com.cn

analysis, ten miRNAs were predicted as potential key miRNAs. RT-qPCR confirmed that the expressions of five of these genes (SLC4A1, EPB42, LCN2, DEFA4, OLFM4) were in accordance with the microarray results. **Conclusion** Bioinformatics analysis based on GEO database showed DEGs between sepsis survivors and non-survivors in the course of sepsis, which contributed to identification of potential biomarkers and risk factors for sepsis-associated mortality.

【Key words】 GEO database; Sepsis-associated mortality; Differential expression genes; MicroRNAs

脓毒症是全身严重感染致死的常见原因。脓毒症发病率高达 0.3%~0.48%, 逐渐成为发展中国家 ICU 内死亡主要原因之一^[1-3]。不同程度的免疫反应能够使脓症患者病情加速恶化, 同时, 免疫状态在脓毒症不同阶段经历动态变化^[4]。在脓症患者中, 血清胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 浓度升高预示结局恶化^[5]。τ 蛋白浓度增高是严重脓症患者 28 d 死亡率的预测因子^[6]。I 型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 信号通路表达上调可能预示着疾病进展, 有望成为脓毒症相关性死亡的预测因子^[7]。与传统生物标志物 (降钙素原、C-反应蛋白、中性粒细胞) 比较, 6 个潜在生物标志物 (IGHG1、IL1R2、LCN2、LTF、MMP8、OLFM4) 在预测脓症患者预后中显示出更大的受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线下面积 (area under the curve, AUC)^[8]。然而, 关于脓毒症相关性死亡的潜在生物标志物研究鲜有报道。为此, 本研究通过研究脓毒症存活患者和非存活患者之间的差异表达基因 (differential expression genes, DEGs) 和微小 RNAs (microRNAs, miRNAs), 旨在探索脓毒症相关性死亡的生物标志物, 进一步明确脓毒症相关性死亡的危险因素。

资料与方法

基因表达谱数据获取 从美国国家生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO) 下载两个人类血液样本基因表达谱芯片数据集 GSE48080 和 GSE54514。GSE48080 阵列数据为 Agilent-014850 全人类基因组微阵列 4x44K G4112F (GPL4133), 包含 23 例人类血液样本, 其中 10 例为脓毒症存活患者, 10 例为脓毒症非存活患者 (随访时间为诊断脓毒症后 28 d), 以及 3 例健康对照样本。脓毒症患者的血液样本分别在诊断脓毒症时和诊断脓毒症后第 7 天采集。GSE54514 阵列数据为 Illumina HumanHT-12 V3.0 表达芯片 (GPL6947), 包含 163 例人类血液样本, 其中 96 例为脓毒症存活

患者, 31 例为脓毒症非存活患者 (随访时间为诊断脓毒症后 1 个月), 36 例健康对照样本。对于脓毒症存活患者和非存活患者, 从诊断脓毒症开始每天采集血液样本, 至诊断脓毒症后第 5 天。

DEGs 筛选分析 使用 GEO2R 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) 对 GSE48080 和 GSE54514 数据集进行分析。选取数据集中的两个时点, 即诊断脓毒症时、脓毒症病程中 (GSE48080 为诊断脓毒症后第 7 天, GSE54514 为诊断脓毒症后第 5 天), 对脓毒症存活患者和非存活患者进行 DEGs 筛选。 $P < 0.05$ 且 $|\log FC| > 1$ 作为筛选条件, 获取 DEGs 列表。使用 Funrich (<http://funrich.org/>) 工具包绘制韦恩图^[9-11]。

功能富集分析 对筛选出的 DEGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析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。GO 分析包括: 生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。使用 DAVID 在线工具对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 分析, 错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 设定为显著富集的阈值。

蛋白-蛋白相互作用网络构建和 Hub 基因筛选 使用 STRING 在线工具 (<http://string-db.org/>) 构建 DEGs 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI)。置信度得分 > 0.40 用于筛选 PPI 网络。使用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络拓扑, 使用 CytoHubba 工具筛选枢纽 (Hub) 基因。

miRNAs 筛选分析 使用 NetworkAnalyst 在线工具 (<https://www.networkanalyst.ca/>) 筛选前 10 个 Hub 基因对应的 miRNAs, 每个 Hub 基因的截止值为 1.0。

纳入标准 为了验证上述基于 GEO 数据库分析 DEGs 的临床相关性, 选择 2021 年 5 月 28 日至 11 月 9 日在本院诊断为脓毒症的患者。此部分研究经医院伦理委员会批准 (KY 2021-278)。所有纳入患者年龄 18~80 岁, 符合脓毒症 3.0 诊断标准。排除标准: 脓毒症病程中进行手术治疗, 合并恶性

肿瘤, 孕妇或哺乳期, 缺乏相关临床数据。患者在诊断脓毒症后 5~7 d, 采集全血样本。从诊断脓毒症开始, 所有患者随访 1 个月。

RT-qPCR 分析 使用 TRIzol 试剂从全血中提取 RNA^[12], 使用 RT-qPCR 技术分析 mRNA 的表达, GAPDH 作为内参。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 相对表达量。

统计分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。正态分布计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

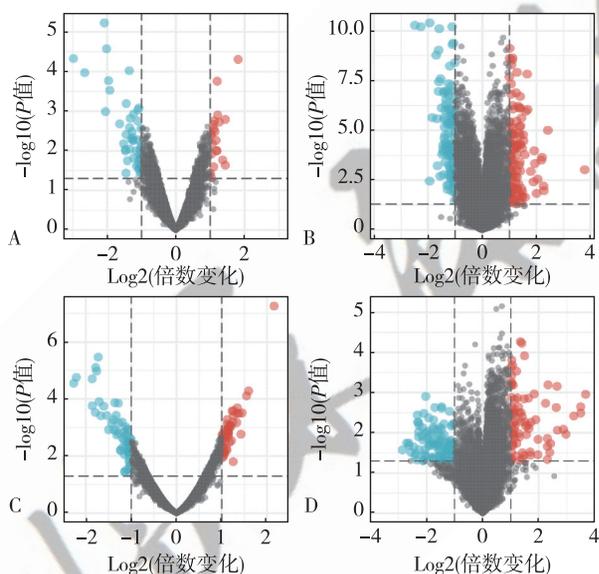
结 果

DEGs 的筛选 在诊断脓毒症时, 从 GSE48080 中筛选获取 68 个 DEGs, 从 GSE54514 数据集中筛选获取 237 个 DEGs。在诊断脓毒症后 5~7 d, 从 GSE48080 数据集中筛选获取 114 个 DEGs, 从 GSE54514 数据集中筛选获取 192 个 DEGs (图 1)。进一步筛选分析, 绘制韦恩图。在诊断脓毒症时, 识别出 4 个 DEGs: CA1、HBM、ERAF、HBD; 在诊断脓毒症后 5~7 d, 识别出 15 个 DEGs: HBG1、CAMP、

ERAF、SLC4A1、HBM、SELENBP1、LTF、EPB42、KRT1、GMPR、SLC25A39、OLFM4、PLEK2、DEFA4、LCN2 (图 2)。结果显示, 诊断脓毒症时, 脓毒症存活患者和非存活患者基因表达谱高度一致, 两者的生物学过程高度相近; 随着病情进展, 脓毒症存活患者和非存活患者基因表达呈现异质性。因此, 后续研究中采用脓毒症病程中筛选出的 15 个 DEGs 进行分析。

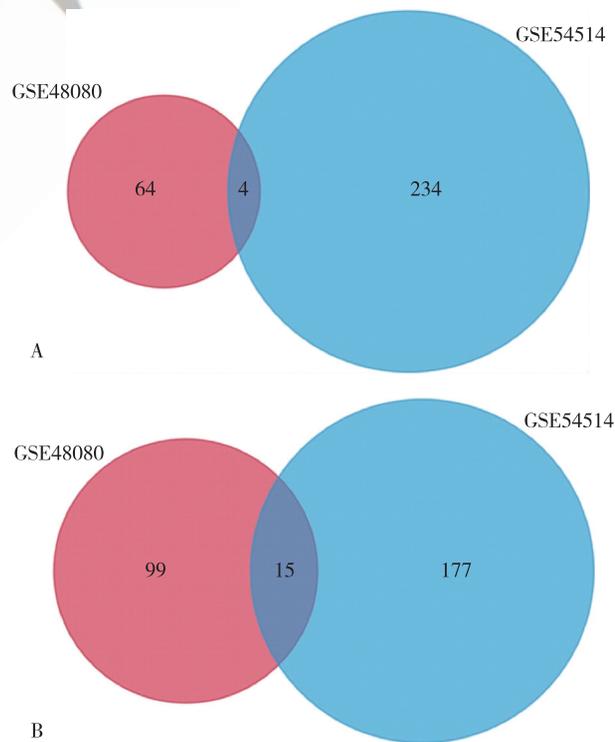
GO 和 KEGG 通路富集分析 使用 DAVID 在线工具对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 分析显示, GO-BP 主要富集在黏膜先天免疫反应、中性粒细胞释放、中性粒细胞免疫反应中的激活和中性粒细胞激活、中性粒细胞介导的免疫。GO-CC 主要富集在特异性颗粒腔、特异性颗粒、分泌性颗粒腔、细胞质囊泡腔和囊泡腔。GO-MF 主要富集在结合珠蛋白、氧运载活性、脂多糖结合、氧结合和过氧化酶活性。KEGG 分析显示, DEGs 主要富集在金黄色葡萄球菌感染、NOD 样受体信号通路、硫代谢和集管酸分泌 (图 3, 表 1)。

PPI 网络构建和 Hub 基因筛选 基于 STRING 在线工具, 将上述筛选得到的 15 个 DEGs 进行 PPI 分析 (图 4)。基于 CytoHubba 生成的结果, 选择前



注: A, GSE48080 数据集, 诊断脓毒症时 DEGs 火山图; B, GSE54514 数据集, 诊断脓毒症时 DEGs 火山图; C, GSE48080 数据集, 诊断脓毒症后 5~7 d DEGs 火山图; D, GSE54514 数据集, 诊断脓毒症后 5~7 d DEGs 火山图。蓝色点表示表达量明显降低 ($\log FC < -1$) 的 DEGs, 红色点表示表达量明显升高 ($\log FC > 1$) 的 DEGs, 黑色点表示表达量变化无明显差异 ($|\log FC| < 1$) 的 DEGs。

图 1 两个数据集中脓毒症存活患者与非存活患者不同时间 DEGs 火山图



注: A, 诊断脓毒症时; B, 诊断脓毒症后 5~7 d。

图 2 GSE48080 和 GSE54514 数据集 DEGs 韦恩图

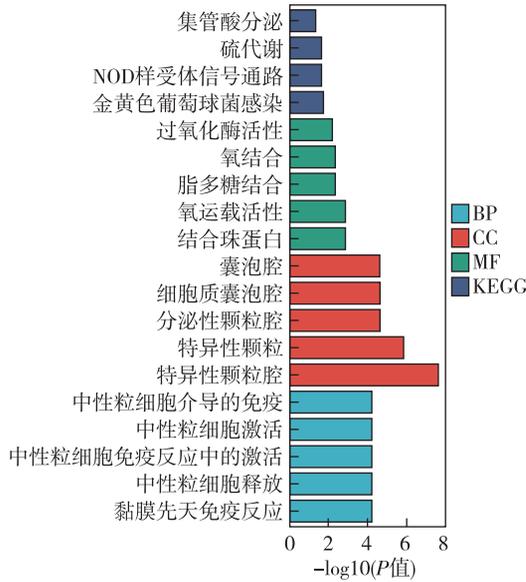


图 3 DEGs 的 GO 分析和 KEGG 通路富集分析图

10 个 Hub 基因: SLC4A1、EPB42、LTF、LCN2、DEFA4、HBM、HBG1、GMPR、CAMP 和 OLFM4 (图 5)。结果显示, SLC4A1 最为重要, 其次是 EPB42、

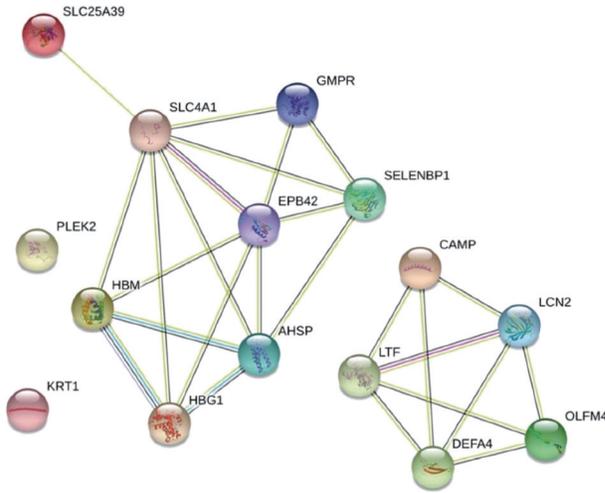
LTF、LCN2、DEFA4、HBM、HBG1、GMPR、CAMP 和 OLFM4。与脓毒症存活患者比较, CAMP、SLC4A1、LTF、EPB42、OLFM4、DEFA4、LCN2 在脓毒症非存活患者中表达量明显升高, HBG1、HBM、GMPR 在脓毒症非存活患者中表达量明显降低。

DEGs-miRNAs 调控网络 基于 NetworkAnalyst 数据库预测目标 miRNAs (图 6)。LTF 和 GMPR 被预测为同一 miRNA (hsa-miR-6845-3p) 的共同靶点, OLFM4 和 DEFA4 具有相同的 miRNA (hsa-miR-355-5p) 靶点, SLC4A1 和 EPB42 为 2 个 miRNAs (hsa-miR-129-5p 和 hsa-miR-8055) 的共同靶点。6 个 miRNAs (hsa-miR-4723-3p、hsa-miR-7111-3p、hsa-miR-3183、hsa-miR-5193、hsa-miR-6727-3p、hsa-miR-6769b-3p) 可以与 GMPR 和 SLC4A1 结合。

DEGs 转录水平验证 使用 RT-qPCR 分析了 10 个关键 DEGs 在脓毒症存活患者 (n=6) 和非存活患者 (n=6) 之间的表达差异 (P<0.05)。验证结果显示, 五个 DEGs (SLC4A1、EPB42、LCN2、DEFA4 和 OLFM4) 与上述分析中的趋势一致 (图 7)。

表 1 DEGs 的 GO 和 KEGG 通路富集分析

类别	编号	描述	基因占比	P 值	校正 P 值
BP	GO:0002446	中性粒细胞介导的免疫	6/14	<0.001	<0.001
BP	GO:0042119	中性粒细胞激活	6/14	<0.001	<0.001
BP	GO:0002283	中性粒细胞免疫反应中的激活	6/14	<0.001	<0.001
BP	GO:0043312	中性粒细胞释放	6/14	<0.001	<0.001
BP	GO:0002227	黏膜先天免疫反应	3/14	<0.001	<0.001
CC	GO:0031983	囊泡腔	5/14	<0.001	<0.001
CC	GO:0060205	细胞质囊泡腔	5/14	<0.001	<0.001
CC	GO:0034774	分泌性颗粒腔	5/14	<0.001	<0.001
CC	GO:0042581	特异性颗粒	5/14	<0.001	<0.001
CC	GO:0035580	特异性颗粒腔	5/14	<0.001	<0.001
MF	GO:0004601	过氧化酶活性	2/13	<0.001	0.006
MF	GO:0019825	氧结合	2/13	<0.001	0.005
MF	GO:0001530	脂多糖结合	2/13	<0.001	0.005
MF	GO:0005344	氧运载活性	2/13	<0.001	0.001
MF	GO:0031720	结合珠蛋白	2/13	<0.001	0.001
KEGG	hsa04966	集管酸分泌	1/6	0.020	0.045
KEGG	hsa00920	硫代谢	1/6	0.007	0.022
KEGG	hsa04621	NOD 样受体信号通路	2/6	0.007	0.022
KEGG	hsa05150	金黄色葡萄球菌感染	2/6	0.002	0.018

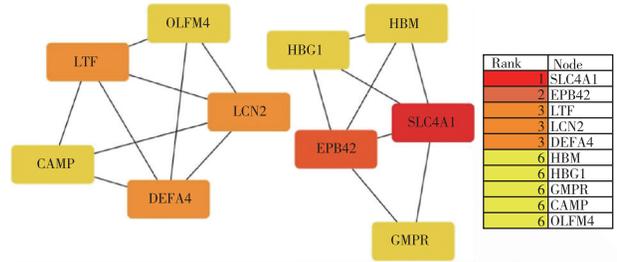


注:每个节点表示一个蛋白,节点之间连线表示两个蛋白之间相互作用。蓝色连线表示数据库验证相关性,紫红色连线表示实验验证相关性,黄色连线表示文献信息支持,黑色连线表示存在共表达,淡紫色表示蛋白质同源。

图 4 基于 STRING 分析 15 个 DEGs 的 PPI 网络图

讨论

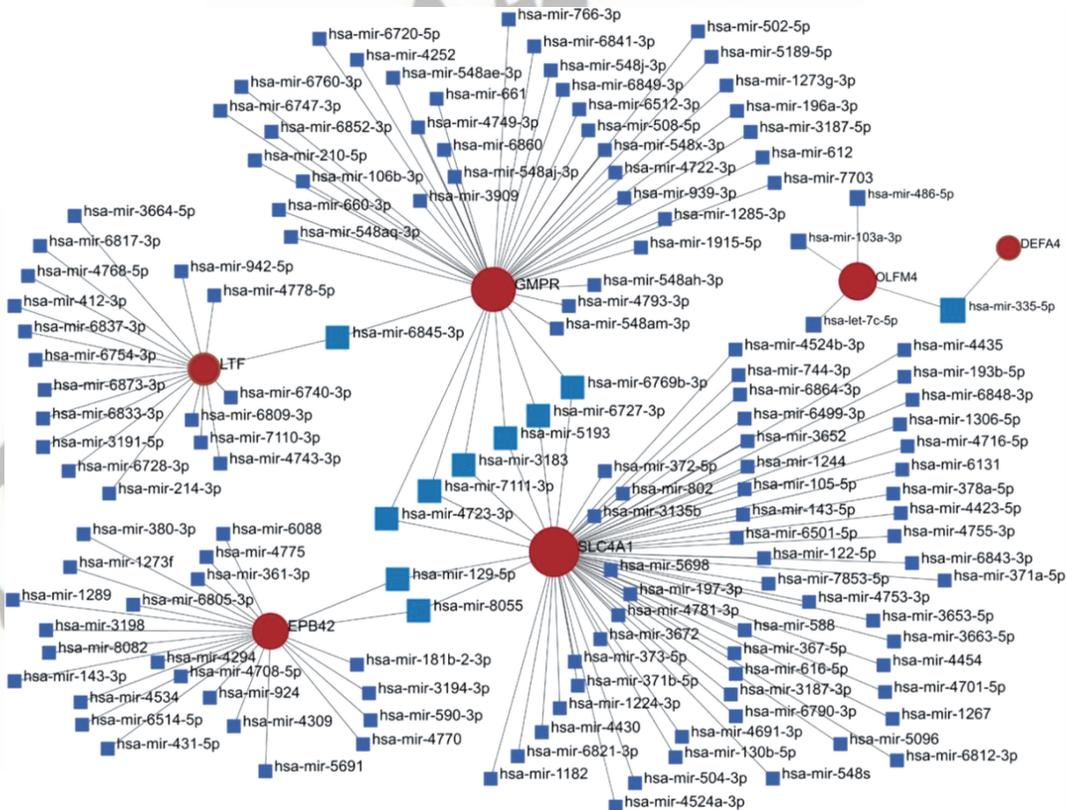
本研究通过生物信息学分析了脓毒症存活患者和非存活患者在诊断脓毒症时、脓毒症病程中的差异表达基因,探索评估脓毒症严重程度的生物标



注:节点颜色表示度数,使用伪色尺度描绘排名前 10 的 Hub 基因,红色代表度数最高,橙色和黄色依次代表度数降低。

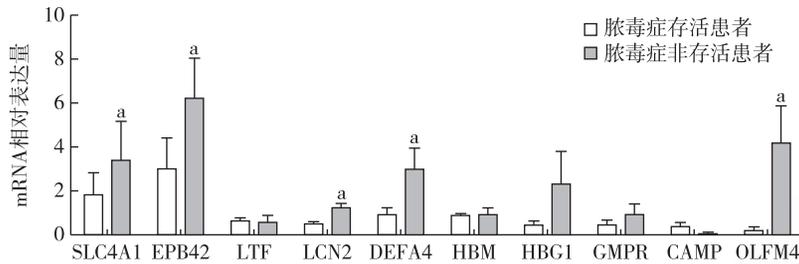
图 5 基于 CytoHubba 生成的前 10 个 Hub 基因 PPI 网络图

志物。既往生物信息学研究^[13-16]中,多选择分析脓毒症与非脓毒症患者的 DEGs,探索诊断脓毒症的生物标志物,但是,对于脓毒症严重程度的评估,仍然缺乏快速准确的生物学指标。本研究结果显示,在诊断脓毒症时,脓毒症存活患者和非存活患者具有类似的生物学过程;然而,在诊断脓毒症后 5~7 d,脓毒症存活患者和非存活患者基因表达呈现出异质性,10 个 Hub 基因(SLC4A1、EPB42、LTF、LCN2、DEFA4、HBM、HBG1、GMPR、CAMP、OLFM4)是预测脓毒症严重程度的潜在生物标志物,10 种靶向



注:红点代表 Hub 基因,深蓝色方块代表与 Hub 基因连接性较低的 miRNA,浅蓝色方块代表与 Hub 基因连接性较高的 miRNA。

图 6 基于 NetworkAnalyst 数据库预测 Hub 基因 miRNA-DEGs 网络图



注:与脓毒症存活患者比较,^a $P < 0.05$ 。

图7 通过 RT-qPCR 比较 10 个 DEGs 在脓毒症存活患者和非存活患者之间表达差异图

miRNAs与脓毒症严重程度具有潜在相关性。

与健康志愿者比较,不同原因的脓毒症患者活性氧产生增加,且在诊断脓毒症后持续 5~7 d^[17]。与脓毒症存活患者比较,脓毒症非存活患者 HIF1A 和糖酵解基因显著上调,在诊断脓毒症后 5~7 d 达到高峰^[18]。诊断脓毒症后第 1 天,人类白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR)在脓毒症存活患者和非存活患者之间表达量差异无统计学意义,但在诊断脓毒症后第 7 天,脓毒症存活患者 HLA-DR 表达量显著增加,而脓毒症非存活患者 HLA-DR 表达量明显减少^[19]。以上结果均提示,诊断脓毒症时和脓毒症病程中基因表达谱存在显著差异,治疗期间免疫细胞的功能恢复与预后密切相关,且诊断脓毒症后 5~7 d 可能对预后具有关键预测价值。为此,本研究选择诊断脓毒症后 5~7 d 作为评估脓毒症严重程度的关键时间段。

本研究结果显示,在诊断脓毒症后 5~7 d,筛选出脓毒症存活患者与非存活患者之间 10 个关键 DEGs,主要参与介导中性粒细胞介导的免疫(LTF、LCN2、DEFA4、CAMP、OLFM4)和氧利用(SLC4A1、EPB42、HBM、HBG1、GMPR)。进一步采集本院脓毒症患者全血分析进行验证,结果显示 5 个关键基因(SLC4A1、EPB42、LCN2、DEFA4 和 OLFM4)的表达趋势与生物信息学分析结果一致,而其他基因未观察到明显差异,可能由于样本量有限、检测方法不同和患者个体差异。

本研究结果显示,脓毒症病程中 DEGs 的细胞功能主要参与中性粒细胞介导的免疫。LCN2 编码与中性粒细胞凝胶酶相关的脂钙素,是参与先天免疫和凋亡的铁运输蛋白^[20-22]。LCN2 可以通过吸收铁载细菌侧链防止微生物获取铁^[23],在 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)激活后调节中性粒细胞功能并释放促炎细胞因子^[24]。与非脓毒症患者比较,脓毒症患者的血液中 LCN2 表达量显著升

高^[25],可以作为脓毒症的潜在诊断指标。本研究结果中,与脓毒症存活患者比较,脓毒症非存活患者血液中 LCN2 mRNA 表达量明显升高,显示其有望作为预测脓毒症预后的生物标志物。DEFA4 编码中性粒细胞防御素 4,对革兰氏阴性细菌具有抗微生物活性^[26]。DEFA4 可以通过 TLR4 直接刺激巨噬细胞释放 IL-6^[27]。DEFA4 在脓毒症早期诊断中显示出潜在价值^[28],特别是在脓毒症引发急性呼吸窘迫综合症患者人群中^[29]。本研究结果中,DEFA4 在脓毒症非存活患者中表达量明显升高,显示其具有预测脓毒症严重程度的重要价值。OLFM4 是一种分泌型糖蛋白,标记中性粒细胞亚群,调控细胞生长、分化和凋亡^[30]。OLFM4 基因敲除小鼠的脓毒症发病率更低^[31],且 OLFM+ 中性粒细胞百分比与脓毒症的 60 d 死亡率独立相关^[32],提示其作为预测脓毒症个体反应的潜在靶标。以上结果提示,免疫状态在脓毒症不同阶段经历动态变化,脓毒症患者的预后取决于治疗期间恢复适应性免疫的能力,动态监测相关指标对于预测脓毒症患者预后具有重要价值。

本研究结果显示,脓毒症病程中差异基因功能与红细胞功能,即氧利用和氧运输途径密切相关。HBM 和 ERAF 在诊断脓毒症时和脓毒症病程中均明显降低,两者均参与编码血红蛋白^[33],通过影响血红蛋白功能,可能导致脓毒症患者易发溶血性贫血。目前,HBM 和 ERAF 在脓毒症中的具体作用仍不清楚,需要进一步的研究进行验证。SLC4A1 是 SLC4 家族的成员,编码跨膜蛋白,能够跨越细胞膜运输 HCO_3^- ^[34]。SLC4A1 负责调控红细胞运输 CO_2 的能力,转化为 HCO_3^- 和 H^+ ,进而影响红细胞携氧功能,在维持细胞酸碱平衡中发挥重要作用^[35]。SLC4A1 功能异常导致红细胞易碎性增加,从而导致溶血性贫血。本研究结果中,脓毒症非存活患者的 SLC4A1 mRNA 表达量明显升高,显示其具有预

测脓毒症预后的潜在价值。EPB42 编码红细胞膜蛋白,它可以调节细胞骨架和机械性能。EPB42 和 SLC4A1 都涉及血流感染的过程^[36]。EPB42 和 SLC4A1 为原发性骨髓纤维化患者的 DEGs,且与免疫系统的紊乱程度高度相关^[37]。目前,EPB42 在脓毒症中的作用仍不清楚,需要进一步的研究进行验证。本研究结果中,脓毒症非存活患者的 EPB42 mRNA 表达量明显升高,显示其具有预测脓毒症严重程度的重要价值。脓症患者容易引起溶血性贫血,与红细胞功能相关的氧利用和氧运输途径密切相关。红细胞骨架和机械性能改变、红细胞酶缺陷、骨髓造血能力降低、血红蛋白运输能力变化等,都是诱发脓毒症溶血性贫血的关键因素。

miRNAs 通过降解靶基因并削弱其翻译来调控基因的表达。血清中 miR-486-5p 表达量升高与肺炎患者严重程度呈正相关,可作为脓毒症的诊断标志物^[38]。miR-155 涉及调控免疫系统,其增加与脓毒症的进展和严重程度呈正相关^[39]。血液中 miR-147b 可以单独或与降钙素原联合评估,作为脓毒症的临床诊断依据^[40]。本研究中,10 种 miRNAs (miR-6845、miR-355、miR-129、miR-8055、miR-4723、miR-7111、miR-3183、miR-5193、miR-6727、miR-6769b)通过调控中性粒细胞介导的免疫功能及氧利用等途径关键基因表达,对脓毒症严重程度起到关键作用,目前缺乏相关实验室及临床研究结果,仍需要进一步研究验证。

综上所述,本研究通过对两个人类血液样本基因表达谱芯片数据集 (GSE48080 和 GSE54514) 进行生物信息学的分析,发现 10 个 Hub 基因 (SLC4A1、EPB42、LTF、LCN2、DEFA4、HBM、HGB1、GMPR、CAMP、OLFM4) 和 10 种靶向 miRNAs 是预测脓毒症严重程度的潜在生物标志物,分子功能主要集中在中性粒细胞介导的免疫功能和氧利用途径。本研究基于 GEO 数据库的生物信息学分析,可以有效挖掘脓毒症相关性死亡的潜在差异基因和 miRNAs,为进一步探讨脓毒症的分子机制和治疗靶点提供新的数据支持。

参 考 文 献

- [1] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013, 369(9): 840-851.
- [2] Álvaro-Meca A, Jiménez-Sousa MA, Micheloud D, et al. Epidemiological trends of sepsis in the twenty-first century (2000-2013): an analysis of incidence, mortality, and associated costs in Spain. *Popul Health Metr*, 2018, 16(1): 4.
- [3] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med*, 2017, 43(3): 304-377.
- [4] Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev*, 2016, 274(1): 330-353.
- [5] Wu L, Ai ML, Feng Q, et al. Serum glial fibrillary acidic protein and ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 for diagnosis of sepsis-associated encephalopathy and outcome prognostication. *J Crit Care*, 2019, 52: 172-179.
- [6] Zhao T, Xia Y, Wang D, et al. Association between elevated serum Tau protein level and sepsis-associated encephalopathy in patients with severe sepsis. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2019, 2019: 1876174.
- [7] Qi Y, Chen X, Wu N, et al. Identification of risk factors for sepsis-associated mortality by gene expression profiling analysis. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5350-5355.
- [8] Martínez-Paz P, Aragón-Camino M, Gómez-Sánchez E, et al. Distinguishing septic shock from non-septic shock in postsurgical patients using gene expression. *J Infect*, 2021, 83(2): 147-155.
- [9] Fonseca P, Pathan M, Chitti SV, et al. Funrich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *J Mol Biol*, 2021, 433(11): 166747.
- [10] Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1321455.
- [11] Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, et al. Funrich: an open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*, 2015, 15(15): 2597-2601.
- [12] Wang Y, Lin J, Chen QZ, et al. Overexpression of mitochondrial Hsp75 protects neural stem cells against microglia-derived soluble factor-induced neurotoxicity by regulating mitochondrial permeability transition pore opening in vitro. *Int J Mol Med*, 2015, 36(6): 1487-1496.
- [13] Almansa R, Heredia-Rodríguez M, Gomez-Sanchez E, et al. Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J Infect*, 2015, 70(5): 445-456.
- [14] Sweeney TE, Wong HR. Risk stratification and prognosis in sepsis: what have we learned from microarrays. *Clin Chest Med*, 2016, 37(2): 209-218.
- [15] Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*, 2016, 4(4): 259-271.
- [16] Sweeney TE, Perumal TM, Henao R, et al. A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 694.
- [17] Santos SS, Carmo AM, Brunialti MK, et al. Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4

- (1): 5.
- [18] Ferreira BL, Leite G, Brunialti M, et al. HIF-1 α and hypoxia responsive genes are differentially expressed in leukocytes from survivors and non-survivors patients during clinical sepsis. *Shock*, 2021, 56(1): 80-91.
- [19] Yu H, Qi Z, Zhao L, et al. Prognostic value of dynamic monitoring of cellular immunity and HMGB1 in severe sepsis: delayed chronic inflammation may be the leading cause of death in late severe sepsis. *Clin Lab*, 2016, 62(12): 2379-2385.
- [20] Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 2002, 10(5): 1045-1056.
- [21] Shields-Cutler RR, Crowley JR, Miller CD, et al. Human metabolome-derived Cofactors are required for the antibacterial activity of siderocalin in urine. *J Biol Chem*, 2016, 291(50): 25901-25910.
- [22] Bao G, Clifton M, Hoette TM, et al. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(8): 602-609.
- [23] Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. Lipocalin 2: an emerging player in iron homeostasis and inflammation. *Annu Rev Nutr*, 2017, 37: 103-130.
- [24] Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204(4): 471-479.
- [25] Wang Y, Wang H, Zhang C, et al. Plasma Hsa-miR-92a-3p in correlation with lipocalin-2 is associated with sepsis-induced coagulopathy. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 155.
- [26] Ericksen B, Wu Z, Lu W, et al. Antibacterial activity and specificity of the six human alpha-defensins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 269-275.
- [27] Vandenbroucke RE, Vanlaere I, Van Hauwermeiren F, et al. Pro-inflammatory effects of matrix metalloproteinase 7 in acute inflammation. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(3): 579-588.
- [28] Zhang S, Li N, Chen W, et al. Time series gene expression profiles analysis identified several potential biomarkers for sepsis. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(10): 1862-1871.
- [29] Feng J, Pang J, He D, et al. Identification of genes with altered methylation and its role in early diagnosis of sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 243-253.
- [30] Liu W, Lee HW, Liu Y, et al. Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acids and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid leukemia cell growth, differentiation, and apoptosis. *Blood*, 2010, 116(23): 4938-4947.
- [31] Stark JE, Opoka AM, Mallela J, et al. Juvenile OLFM4-null mice are protected from sepsis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318(3): F809-F816.
- [32] Kangelaris KN, Clemens R, Fang X, et al. A neutrophil subset defined by intracellular olfactomedin 4 is associated with mortality in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 320(5): L892-L902.
- [33] Brunyanski A, Erdelyi K, Szczesny B, et al. Upregulation and mitochondrial sequestration of hemoglobin occur in circulating leukocytes during critical illness, conferring a cytoprotective phenotype. *Mol Med*, 2015, 21(1): 666-675.
- [34] Romero MF, Chen AP, Parker MD, et al. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 159-182.
- [35] Yan Q, Sharma-Kuinkel BK, Deshmukh H, et al. Dusp3 and Psme3 are associated with murine susceptibility to *Staphylococcus aureus* infection and human sepsis. *PLoS Pathog*, 2014, 10(6): e1004149.
- [36] Sironi M, Forni D, Clerici M, et al. Genetic conflicts with plasmodium parasites and functional constraints shape the evolution of erythrocyte cytoskeletal proteins. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14682.
- [37] Ma H, Liu J, Li Z, et al. Expression profile analysis reveals hub genes that are associated with immune system dysregulation in primary myelofibrosis. *Hematology*, 2021, 26(1): 478-490.
- [38] Sun B, Guo S. miR-486-5p Serves as a diagnostic biomarker for sepsis and its predictive value for clinical outcomes. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 3687-3695.
- [39] Chen M, Wang F, Xia H, et al. MicroRNA-155: regulation of immune cells in sepsis. *mediators inflamm*, 2021, 2021: 8874854.
- [40] Trung NT, Lien TT, Sang VV, et al. Circulating miR-147b as a diagnostic marker for patients with bacterial sepsis and septic shock. *PLoS One*, 2021, 16(12): e0261228.

(收稿日期:2023-10-09)