

基于 DIA LC-MS 对脓毒症患者外周血差异蛋白的研究分析*

王陈龙¹, 邱峰¹, 操龙斌^{1△}, 朱天川², 曾令恒¹

1. 南方医科大学南海医院, 广东佛山 528244; 2. 中山大学附属第五医院, 广东珠海 519000

摘要:目的 基于数据非依赖性采集高分辨率色谱-质谱技术(DIA LC-MS)对脓毒症患者外周血差异蛋白进行研究分析,为患者临床治疗提供参考。方法 选择南方医科大学南海医院以及中山大学附属第五医院 2018 年 8 月至 2019 年 8 月重症监护室收治的 60 例脓毒症患者作为观察组,同时选取上述两所医院同一时期重症监护室收治的非脓毒症患者作为对照组,采用 DIA LC-MS 对患者外周血差异蛋白进行研究,采用主成分分析法(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)以及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)进行模式识别,确定差异蛋白后进行通路分析以及 GO 分析,利用 PLS-DA 模型变量的重要性投影(VIP 值)筛选可能的蛋白标志物,同时对贡献最大的蛋白进行 ELISA 验证以及 ROC 曲线分析。结果 两组患者共获得 530 391 个碎片离子,63 378 个肽段,7 104 个蛋白;60 个 DIA 标本采用 Skyline 共筛选鉴定得到 147 363 个碎片离子,21 840 个肽段,6 213 个蛋白。将碎片离子加和,共得到 357 个差异蛋白,其中 93 个高表达,264 个低表达。对这 357 个差异蛋白进行 GO 分析显示,富集最多的细胞组分是细胞外泌体、细胞膜以及细胞质;受体介导内吞、细胞黏附反应以及血小板脱颗粒可能与脓毒症的发展密切相关;在对这些差异蛋白进行 KEGG 分析后显示,细菌侵袭上皮细胞、代谢通路、碳水化合物代谢通路、血小板激活、补体以及凝血瀑布这几条通路与脓毒症的发展密切相关,并且利用 VIP 值共筛选出 138 个差异蛋白,对其中贡献最大的高迁移率蛋白(HMGB-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)以及基质金属蛋白酶-8(MMP-8)进行 ELISA 验证后显示,观察组患者 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8 表达水平明显高于对照组,两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。将两组患者外周血单个核细胞进行 ELISA 检测后建立 ROC 曲线诊断模型显示, HMGB-1 灵敏度为 0.832,特异度为 0.865; NGAL 灵敏度为 0.802,特异度为 0.668; MMP-8 灵敏度为 0.833,特异度为 0.866。结论 基于 DIA LC-MS 技术对脓毒症患者外周血差异蛋白进行研究后显示,PLS-DA、OPLS-DA 以及 PCA 模式能够分析蛋白质组学数据,初步筛选出 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8 是脓毒症患者外周血单个核细胞的候选生物标志物。

关键词:脓毒症; 蛋白质组学; 炎症免疫; 外周血单个核细胞

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)18-2600-04

Research and analysis of differential proteins in peripheral blood of the patients with sepsis based on DIA LC-MS*

WANG Chenlong¹, QIU Feng¹, CAO Longbin^{1△}, ZHU Tianchuan², ZENG Lingheng¹

1. Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan, Guangdong 528244, China;

2. Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China

Abstract: Objective To research and analyze the differential proteins in peripheral blood of the patients with sepsis based on the data independent acquisition liquid chromatography-mass spectrometry (DIA LC-MS) to provide a reference for the patients' clinical treatment. **Methods** Sixty patients with sepsis admitted to ICU of the Nanhai Hospital of Southern Medical University and the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat sen University from August 2018 to August 2019 were selected as the observation group, and the patients with non-sepsis in ICU of these two hospitals at the same time were selected as the control group. DIA LC-MS was used to study the differential proteins in peripheral blood of the patients. The principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used for conducting the pattern recognition. After determining the differential proteins, the pathway analysis and GO analysis were performed. The possible protein markers were screened on the important projection of the PLS-DA model variables sum, meanwhile the protein with more contribution

* 基金项目:广东省佛山市自筹经费类科技计划项目(1920001001240);广东省佛山市卫生和康局医学科研课题(20200278);广东省佛山市十三五医学重点专科(检验科 FSZDZK135045);广东省佛山市南海区“十三五”医学重点专科(检验科)。

作者简介:王陈龙,男,副主任技师,主要从事临床检验诊断学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: attooo@163.com。

conducted ELISA verification and ROC curve analysis. **Results** A total of 530 391 fragment ions, 63 378 peptide segments and 7 104 proteins were obtained from the two groups. A total of 147 363 fragment ions, 21 840 peptide segments and 6 213 proteins were obtained from 60 DIA samples by the sum adopting the skyline screening. A total of 357 differentially expressed proteins were obtained by addition of fragment ions, of which 93 were highly expressed and 264 were low expressed. The GO analysis of these 357 differential proteins showed that the most abundant cell components were exosomes, cell membrane and cytoplasm; receptor mediated endocytosis, cell adhesion reaction and platelet degranulation could be closely related to the development of sepsis; the KEGG analysis of these differential proteins showed that the pathways such as bacteria invaded the epithelial cells, metabolic pathway, carbon metabolism pathway, platelet excitation, complement and blood coagulation cascade were closely correlated with the sepsis progress, in addition, 138 differentially expressed proteins were screened by VIP value screening, among which HMGB-1, NGAL and MMP-8 contributed the most, the ELISA verification showed that and the expression levels of HMGB-1, NGAL and MMP-8 in the observation group were significantly higher than those in the control group, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). The peripheral blood mononuclear cells conducted the ELISA detection, the established ROC diagnostic model showed that the sensitivity of HMGB-1 was 0.832, the specificity was 0.865; the sensitivity of NGAL was 0.802, the specificity was 0.668; the sensitivity of MMP-8 was 0.833, the specificity was 0.866. **Conclusion** Based on DIA LC-MS technology, the study on the differential proteins in peripheral blood of the patients with sepsis shows that the PLS-DA, OPLS-DA and PCA models could analyze proteomic data, and preliminarily selected HMGB-1, NGAL and MMP-8 are the candidate biomarkers of peripheral blood mononuclear cells in the patients with sepsis.

Key words: sepsis; proteomics; inflammatory immunity; peripheral blood mononuclear cells

脓毒症作为一种由于感染引起的全身炎症反应综合征,它是严重创伤、烧伤、感染以及外科大手术常见并发症,并且随着病情进展可能导致患者出现器官功能障碍以及循环障碍,进一步发展还可能引起患者脓毒症休克,危及生命安全,因此研究脓毒症发病机制对于掌握患者病情进展情况,挽救患者生命有着重要意义^[1-3]。外周血作为人体免疫系统的重要组成部分,其单个核细胞既能够有效反映宿主的免疫情况,又相对容易获取,因此观察外周血单个核细胞变化情况对研究脓毒症的发展有着重要指导意义^[4-5]。随着近年来医学技术的发展,基于质谱的蛋白质组学已经成为研究复杂高通量小分子蛋白的主流工具,而数据非依赖(DIA)技术则是通过对所有母离子选择、碎裂,采集母离子的全部离子信息,能够大规模、高通量地做到相对定量和绝对定量。为此,南方医科大学南海医院以及中山大学附属第五医院基于数据非依赖性采集高分辨率色谱-质谱技术(DIA LC-MS)对脓毒症患者外周血差异蛋白进行研究分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择南方医科大学南海医院以及中山大学附属第五医院 2018 年 8 月至 2019 年 8 月重症监护室收治的 60 例脓毒症患者作为观察组,同时将上述两所医院同一时期入住重症监护室的术后未并发脓毒症的 60 例患者作为对照组。纳入标准:(1)患者存在明确感染证据,序贯器官衰竭评估(SOFA 评分)变化 ≥ 2 ;(2)患者家属知情并签署同意书。排除

标准:(1)患者存在自身免疫疾病;(2)合并严重肝、肾功能不全者;(3)患者近半年内使用过免疫抑制药物。观察组中男 33 例,女 27 例;年龄 35~79 岁,平均(61.5 \pm 4.8)岁;肺部感染 24 例,腹腔感染 12 例,泌尿系感染 15 例,其他部位感染 19 例。对照组中男 31 例,女 29 例;年龄 34~76 岁,平均(61.2 \pm 4.7)岁。两组研究对象在性别、年龄方面差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 细胞蛋白标本制备 疑似脓毒症患者重症监护室发生高热后,留取高热血培养的同时取外周静脉血 5 mL,床边 EDTA 管抗凝,于 4 h 内送至实验室分类提取外周血单个核细胞。

1.2.2 质谱蛋白标本制备 在 BCA 法测定患者蛋白水平后取 50 μ g 蛋白,加入 6 mol/L 尿素反应 30 min,55 $^{\circ}$ C 下加入 5 mmol/L TCEP 还原反应 30 min,然后加入碘乙酰胺控制水平为 6.25 mmol/L,避光反应 1 h,加入碳酸氢铵稀释后再加入 1 mmol/L 氯化钙,碱性环境中使胰酶变性,37 $^{\circ}$ C 下反应 16 h,除盐后冷冻干燥。

1.2.3 采集质谱数据 采用 EASY nLC-1000 UP-LC 系统联合 Orbitrap 质谱检测器 Q-Exactive plus 质谱仪进行数据采集,上样量 1 μ g,在同一根自制 C18 分析柱上进行。分离相:A 相为 0.1%甲酸,B 相为 0.1%甲酸加 80%乙腈,环境温度控制在 4 $^{\circ}$ C。梯度洗脱程序:0~5 min,A 相 97%~93%,B 相 3%~

7%；>5~55 min, A 相 93%~78%, B 相 7%~22%；>55~65 min, A 相 78%~65%, B 相 22%~35%；>65~68 min, A 相 65%~20%, B 相 35%~80%；>68~75 min, A 相 20%, B 相 80%。

1.2.4 质谱方法 DDA 扫描:采用正离子扫描,范围为 400~1 200 m/z,时间 75 min。一级扫描模式为全扫描,范围为 400~1 200 m/z,一级检测轨道分辨率 70 000 FWHM@200 m/z;自动增益控制为 3×10^6 ,最长注射离子时间为 50 ms,电荷数 2~7,loop count 20,二级质谱碎裂模式 HCD,碰撞能量 NCE 为 27%,二级自动增益控制为 5×10^5 。DIA 数据采集:一级扫描模式为全扫描,范围为 400~1 200 m/z,一级检测轨道分辨率 35 000 FWHM@200 m/z,AGC 为 5×10^5 ,窗口为 32 个固定窗口,每个窗口分别为选择、碎裂、采集母离子和全部子离子信息用于定量。

1.2.5 数据及生物信息分析 DDA 数据采用软件 Proteome Discoverer 进行搜索,结果导入软件 Skyline 建库并进行数据分析提取。将筛选出的差异蛋白在 DAVID 生物信息数据库中作 KEGG 通路分析、GO 分析,从蛋白质的生物过程、分子功能、细胞组分进行基因富集分析。

1.2.6 蛋白验证 采用双抗体夹心酶免疫分析法(ELISA)测定外周血单个核细胞中生物标志物的含量,试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司,操作步骤严格按照说明书进行。

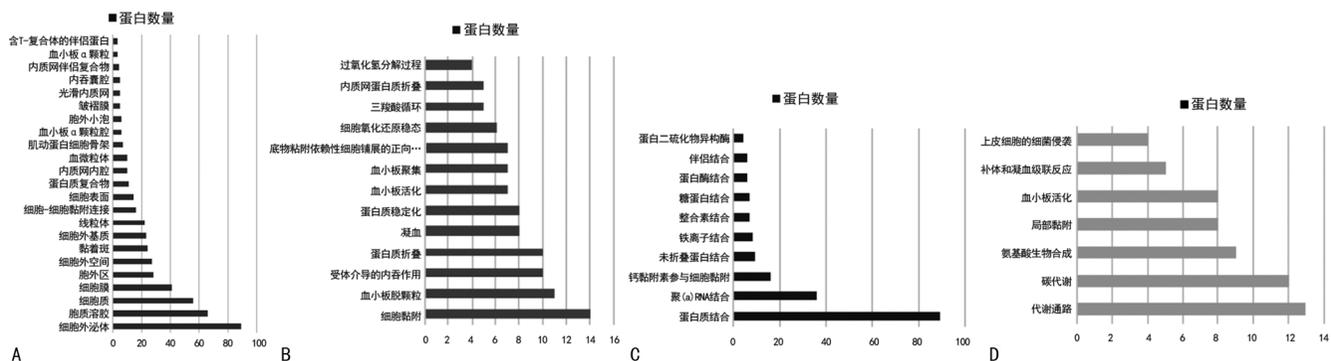
1.3 统计学处理 采用 R 软件(version3. 2. 2)对碎片离子数据进行主成分分析法(PCA)、偏最小二乘

法-判别分析(PLS-DA)以及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)进行模式识别,并对模型进行评价;通过 PLS-DA 模型变量的重要性投影(VIP 值)标志筛选候选差异蛋白,VIP 值>1,差异蛋白有意义。建立受试者工作特征(ROC)曲线诊断模型,分析指标诊断效能。采用 SPSS18.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异蛋白的筛选 两组患者共获得 530 391 个碎片离子,63 378 个肽段,7 104 个蛋白;60 个 DIA 标本采用 Skyline 共筛选鉴定得到 147 363 个碎片离子,21 840 个肽段,6 213 个蛋白。将碎片离子加和,共得到 357 个差异蛋白,其中 93 个高表达,264 个低表达。为了更直观地显示不同差异蛋白在不同标本间的表达差异,可根据显著性差异蛋白表达量在标本间进行层次聚类。

2.2 GO 分析和通路分析 对这 357 个差异蛋白进行 GO 分析显示,富集最多的细胞组分是细胞外分泌体、细胞膜以及细胞质,见图 1A;聚类到最多的生物功能是受体介导内吞、细胞黏附反应以及血小板脱颗粒,见图 1B,这些功能可能与脓毒症的发展密切相关;最多见的分子功能是蛋白结合、poly(A)RNA 结合、细胞黏附以及铁离子结合,见图 1C;在对这些差异蛋白进行 KEGG 分析后显示,细菌侵袭上皮细胞、代谢通路、碳代谢通路、血小板激活、补体以及凝血瀑布这几条通路与脓毒症的发展密切相关,见图 1D。



注:A 为细胞组分;B 为生物过程;C 为分子功能;D 为 KEGG 通路。

图 1 差异蛋白 GO 分析和通路分析

2.3 差异蛋白的验证 对 357 个差异蛋白进行 VIP 值筛选,共筛选出 138 个差异蛋白,其中贡献最大的分别是高迁移率蛋白(HMGB-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)以及基质金属蛋白酶-8(MMP-8),在进行 ELISA 验证后显示,观察组患者 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8 表达水平明显高于对照组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组患者 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8 表达水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	n	HMGB-1	NGAL	MMP-8
观察组	60	173.65±9.89	491.85±48.71	1 119.28±95.24
对照组	60	50.51±6.04	94.82±7.67	156.72±13.75
<i>t</i>		82.308 9	62.368 1	78.211 5
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

2.4 ROC 曲线诊断模型 将两组患者外周血单个核细胞进行 ELISA 检测后建立 ROC 曲线诊断模型显示, HMGB-1 灵敏度为 0.832, 特异度为 0.865; NGAL 灵敏度为 0.802, 特异度为 0.668; MMP-8 灵敏度为 0.833, 特异度为 0.866。

3 讨论

目前脓毒症的发病机制尚不明确, 但是临床研究显示免疫紊乱是脓毒症发病的关键因素^[6-7]。患者一旦发病后病情进展迅速, 临床救治困难, 这也是导致危重症患者死亡的首要因素, 研究显示并发心肌损害更严重影响到患者临床预后, 近 40% 的患者会出现不同程度的心肌损害, 尤其是在新生儿败血症中更易出现, 一旦出现心血管并发症, 患者病情就会急剧恶化, 病死率可上升至 70%~90%, 因此了解脓毒症的发病机制对于挽救患者生命安全有着重要意义^[8]。

本研究显示, 在对两组患者检测后共获得 530 391 个碎片离子, 63 378 个肽段, 7 104 个蛋白; 60 个 DIA 标本采用 Skyline 共筛选鉴定得到 147 363 个碎片离子, 21 840 个肽段, 6 213 个蛋白。将碎片离子加和, 共得到 357 个差异蛋白, 其中 93 个高表达, 264 个低表达。正是这些蛋白的生物作用引发了促炎因子的释放, 加剧了患者脓毒症的进展, 因此通过蛋白质组学的方法可以更加直观地了解脓毒症的发病机制^[9-10]。

研究发现脓毒症的发展与多种通路有关, 免疫调节系统紊乱导致机体严重感染应答失调, 免疫调控由过度的免疫激活进展至致死性免疫抑制。在对 357 个差异蛋白进行 GO 分析显示, 富集最多的细胞组分是细胞外泌体、细胞膜以及细胞质; 聚类到最多的生物功能是受体介导内吞、细胞黏附反应以及血小板脱颗粒, 这些功能可能与脓毒症的发展密切相关。最常见的分子功能是蛋白结合、poly(A)RNA 结合、细胞黏附以及铁离子结合。在对这些差异蛋白进行 KEGG 分析后显示, 细菌侵袭上皮细胞、代谢通路、碳代谢通路、血小板激活、补体以及凝血瀑布这几条通路与脓毒症的发展密切相关^[11-12]。而 HMGB-1 作为一种晚期炎症递质, 它的主动分泌和被动释放能够诱发患者出现局部炎症, 激发细胞因子超表达, 加剧炎症反应。而凋亡细胞的二次坏死释放 HMGB-1 能够级联加剧单核/巨噬细胞的致炎反应, 因此脓毒症患者外周血单核细胞 HMGB-1 的高表达可能与免疫细胞炎症的启动与维持, 以及炎症放大的级联反应存在密切联系。NGAL 作为急性肾损伤的生物标志物之一, 它由肝脏细胞和免疫细胞分泌, 与细菌生长和组织分化有密切关系, NGAL 的升高可能与宿主感染细菌时自身免疫抗菌作用有关。MMP-8 在正常情况下水平极低, 它能够激活巨噬细胞中 NF- κ B 促炎性转录因子, 炎症条件下 MMP-8 表达的升高导致患者组织

的破坏^[13-14]。本研究显示, 对 357 个差异蛋白进行 VIP 值筛选, 共筛选出 138 个差异蛋白, 其中贡献最大的分别是 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8, 在进行 ELISA 验证后显示, 脓毒症患者 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8 表达水平明显高于非脓毒症患者, 并且 HMGB-1 灵敏度为 0.832、特异度为 0.865, NGAL 灵敏度为 0.802、特异度为 0.668, MMP-8 灵敏度为 0.833、特异度为 0.866, 对患者临床诊治具有一定指导意义。

综上所述, 基于 DIA LC-MS 技术对脓毒症患者外周血差异蛋白进行研究后显示, PLS-DA、OPLS-DA 以及 PCA 模式能够分析蛋白质组学数据, 初步筛选出 HMGB-1、NGAL 以及 MMP-8 作为脓毒症患者外周血单个核细胞的候选生物标志物。

参考文献

- [1] 邓亚萍, 梁思灵, 王兰. 中医药治疗脓毒症免疫功能紊乱的研究进展[J]. 现代中医临床, 2019, 26(5): 6-9.
- [2] 张晨. Wnt 信号通路在脓毒症中的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2019, 46(10): 741-744.
- [3] 周婷, 史家欣, 李小民. 间充质干细胞在脓毒症的应用研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(21): 55-59.
- [4] 霍雁, 李淑芳. 脓毒症的病因病机及中医治疗进展[J]. 中国中医急症, 2019, 28(10): 1874-1876.
- [5] 乔书华. 儿童重症肺炎合并脓毒症的诊治进展[J]. 海南医学, 2019, 30(1): 106-111.
- [6] 王首江, 邢柏. 机体免疫功能与脓毒症关系的研究进展[J]. 海南医学, 2016, 27(7): 1129-1131.
- [7] BURKE J, WOOD S, HERMON A, et al. Improving outcome of sepsis on the ward: introducing the "Sepsis Six" bundle[J]. Nurs Crit Care, 2019, 24(1): 33-39.
- [8] CONWAY-MORRIS A, WILSON J, SHANKAR-HARI M. Immune activation in sepsis[J]. Crit Care Clin, 2018, 34(1): 29-34.
- [9] 童译庆, 吴春荣, 刘建军, 等. 利用定量蛋白质组学对脓毒症外周血单个核细胞差异蛋白的研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(11): 1251-1259.
- [10] 陈静, 龚宗炼, 葛颖, 等. 脓毒症患者感染病原学特点及血液指标的监测分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(17): 2571-2574.
- [11] 叶瑞, 胡炜, 刘炳炜, 等. 脓毒症患者 T 淋巴细胞亚群变化及与炎症状态的关系研究[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(17): 41-47.
- [12] 黄鹤, 田昭涛, 黎檀实. 脓毒症免疫调节机制研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(3): 841-845.
- [13] 姚咏明, 梁樱译. 外科脓毒症免疫调控障碍机制[J]. 医学研究生学报, 2019, 32(1): 26-30.
- [14] 李宁, 曾其毅. 脓毒症免疫动力学与免疫抑制[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(6): 408-413.