

儿童脓毒症血浆代谢物分析

欧俊斌, 林敏欣, 李小琳, 刘玉玲, 梁巧

基金项目: 中山市医学科研项目(2020J153)

作者单位: 528403 广东 中山, 中山市博爱医院儿科(欧俊斌, 李小琳, 刘玉玲, 梁巧), 新生儿科(林敏欣)

作者简介: 欧俊斌(1986-), 男, 医学硕士, 副主任医师。研究方向: 代谢组学研究

通讯作者: 李小琳, E-mail: lixiaolin97930@126.com

【摘要】 目的 分析脓毒症患儿血浆代谢物的水平, 寻找儿童脓毒症血浆差异代谢物。方法 选取 2019 年 10 月至 2021 年 11 月中山市博爱医院收治的 37 例脓毒症早期患儿为观察组, 在入院 24 h 内采血, 选择同期 38 例健康儿童为对照组, 检测两组血浆中 11 项氨基酸及 31 项酰基肉碱, 比较两组血浆代谢物水平的差异。结果 通过主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)显示两组血浆氨基酸及酰基肉碱代谢谱差异显著, 氨基酸分析中, 苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、甘氨酸明显增高, 酰基肉碱分析中, 丁酰肉碱、异戊酰肉碱明显增高, 游离肉碱、肉豆蔻酰肉碱、棕榈酰肉碱、棕榈烯酰肉碱、十八碳酰肉碱、十八碳烯酰肉碱及十八碳二烯酰肉碱明显减少。结论 脓毒症患儿的差异代谢物提示机体存在代谢紊乱, 并有线粒体功能障碍, 可作为儿童脓毒症的生物标志物。

【关键词】 脓毒症; 代谢组学; 儿童

doi:10.3969/j.issn.1674-3865.2024.01.010

【中图分类号】 R725.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3865(2024)01-0042-05

Analysis of plasma metabolites in sepsis in children OU Junbin, LIN Minxin, LI Xiaolin, LIU Yuling, LIANG Qiao. Zhongshan Boai Hospital, Zhongshan 528403, China

【Abstract】 **Objective** To find the differential metabolites in children with sepsis by analyzing the levels of serum metabolites. **Methods** Serum samples were collected in 24h after admission from 37 children with early sepsis as the observation group, who were hospitalized in Zhongshan Boai Hospital from October 2019 to November 2021, and 38 healthy children were enrolled as the control group during the same period. The levels of 11 kinds of amino acids and 31 kinds of acylcarnitine in plasma were detected and the differences in serum metabolites were compared between two groups. **Results** Principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) showed that there was significantly different metabolic profiling of plasma amino acids and acylcarnitine between observation group and control group; in the analysis of amino acid, the levels of phenylalanine, valine, leucine and glycine were significantly increased; in the analysis of acylcarnitine, the levels of butyrylcarnitine and isovalerylcarnitine were significantly increased, while the levels of L-carnitine, myristoylcarnitine, palmitoylcarnitine, hexadecenoyl carnitine, octadecanoylcarnitine, octadecaenoylcarnitine and octadecadienoylcarnitine were significantly decreased. **Conclusion** The differences in serum metabolites in children with sepsis is mainly associated with metabolic disorders, and there may be mitochondrial dysfunction, which can be used as biomarkers of sepsis in children.

【Keywords】 Sepsis; Metabolomics; Children

儿童脓毒症全球范围内仍具有较高的发病率和病死率, 每年新发约 120 万例, 是儿童死亡的主要疾病之一^[1]。脓毒症是一种全身性炎症性疾病, 是宿主对感染反应失调而引起的危及生命的器官功能障碍。脓毒症发病机制复杂, 尽管现代医学针对脓毒

症的治疗取得了长足进步, 但脓毒症的转归仍难以预测, 准确有效的脓毒症生物标志物成为了研究热点, 对患者治疗及预后意义重大^[2]。

目前在临床实践中应用广泛的脓毒症生物标志物, 如白细胞计数、C 反应蛋白、降钙素原和乳酸水

平,在诊断敏感性和特异性方面表现不够理想^[3]。现已证实代谢功能障碍是脓毒症的关键特征之一^[4],当生物体遭受各种病理或生理刺激后,体内的代谢特征将发生动态的显著的变化,表现为血乳酸和葡萄糖水平升高、肌肉分解代谢和氨基酸浓度紊乱以及线粒体功能障碍,而这一病理变化过程中不断生成的物质,它调控着许多细胞内的生命活动,能更准确地反映生物体系的状态^[5-6]。本研究通过分析讨论脓毒症患儿氨基酸及酰基肉碱代谢谱的变化特点,以试图寻找和识别潜在的儿童脓毒症早期生物标志物。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2019 年 10 月至 2021 年 11 月中山市博爱医院收治的脓毒症早期患儿 37 例为观察组,其中男 20 例,女 17 例;年龄(1.76 ± 0.99)岁;体质量(11.74 ± 3.28)kg;体质量指数为 16.83 ± 1.76 。同期选取在我院行健康体检的儿童 38 例为对照组,其中男 18 例,女 20 例;年龄(1.84 ± 1.68)岁;体质量(11.01 ± 8.27)kg;体质量指数为 16.77 ± 1.38 。两组研究对象性别、年龄、体质量、体质量指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

本研究已通过中山市博爱医院伦理委员会审核(KY-2020-004-10)。

1.2 诊断标准

参考《儿童脓毒性休克(感染性休克)诊治专家共识(2015 版)》中脓毒症的诊断标准^[7]。

1.3 纳入标准

(1)符合脓毒症的诊断标准;(2)年龄 0~14 岁;(3)患儿家属知情同意。

1.4 排除标准

(1)合并遗传代谢性疾病;(2)合并慢性疾病,如肾病综合征、紫癜性肾炎、系统性红斑狼疮等;(3)合并营养不良或肥胖症。

1.5 方法

观察组在治疗前,对照组则空腹采外周静脉血,采用 ACQUITYTQD 型超高效液相色谱-串联四级杆质谱仪检测 11 项氨基酸和 31 项酰基肉碱。

11 项氨基酸包括丙氨酸、精氨酸、瓜氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸。

31 项酰基肉碱包括游离肉碱、乙酰肉碱、丙酰肉碱、丁酰肉碱、丙二酰肉碱、甲基丙二酰肉碱、异戊酰肉碱、异戊烯酰肉碱、己酰肉碱、戊二酰肉碱、己二酰肉碱、辛酰肉碱、辛烯酰肉碱、癸酰肉碱、癸烯酰肉

碱、癸二烯酰肉碱、月桂酰肉碱、月桂烯酰肉碱、肉豆蔻酰肉碱、肉豆蔻烯酰肉碱、肉豆蔻二烯酰肉碱、3-羟基肉豆蔻酰肉碱、棕榈酰肉碱、棕榈烯酰肉碱、3-羟基棕榈酰肉碱、3-羟基棕榈烯酰肉碱、十八碳酰肉碱、十八碳烯酰肉碱、3-羟基十八碳烯酰肉碱、十八碳二烯酰肉碱、3-羟基十八碳酰肉碱。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料样本经正态性检验,若为正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,若为非正态分布采用 [$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

质谱数据在 SIMCA-P 14.1 软件中行主成分分析以及正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA),对变量重要性投影值 > 1.0 的物质使用 SPSS 19.0 软件进行独立样本 t 检验,根据 $P < 0.05$ 的原则,筛选潜在的生物标志物,最终采用 MetaboAnalyst 5.0 数据库对生物标志物行富集分析。

2 结果

11 项氨基酸及 31 项酰基肉碱检测结果:

对两组血浆代谢物(氨基酸及酰基肉碱)数据进行主成分分析发现,所有样本的总体分布稳定性较高($R^2X = 0.56, Q^2 = 0.27$),表明该模型稳定可靠,主成分分析图中观察组样本主要位于上象限,对照组样本主要位于下象限,说明两组样本血浆代谢物水平存在差异,见图 1(封三)。

对两组血浆代谢物(氨基酸及酰基肉碱)数据进行 OPLS-DA 分析($R^2Y = 0.78, Q^2 = 0.54$)发现,两组样品分布空间无明显重叠,说明两组样本血浆代谢物水平差异显著,见图 2(封三)。

OPLS-DA 模型的 200 次响应排序检验(R^2, Q^2 截距分别为 0.352、-0.534)提示模型未过拟合,见图 3。

选择对变量重要性投影值 > 1.0 且 t 检验 $P < 0.05$ 的变量为差异代谢物,升高的有 6 种,分别为苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丁酰肉碱、异戊酰肉碱,下降的有 7 种,分别为游离肉碱、肉豆蔻酰肉碱、棕榈酰肉碱、棕榈烯酰肉碱、十八碳酰肉碱、十八碳烯酰肉碱、十八碳二烯酰肉碱,见表 1。并对该 13 种差异代谢物行富集分析,以 $P < 0.05$ 作为筛选条件,结果表明,肉碱合成($P < 0.01$)、长链脂肪酸的线粒体 β 氧化($P = 0.01$)、脂肪酸代谢($P = 0.03$)为脓毒症患儿的差异代谢通路。

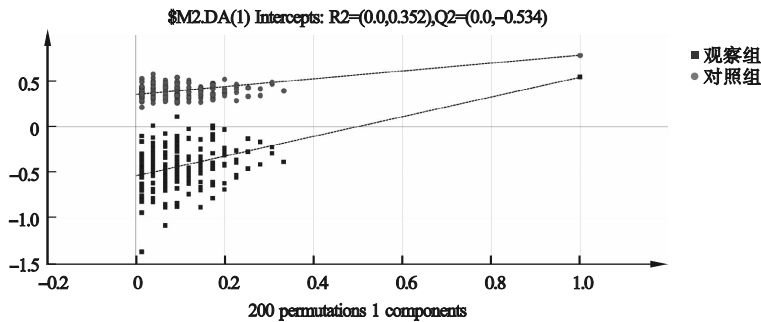


图 3 OPLS-DA 200 次响应排序检验图

表 1 两组血浆氨基酸及酰基肉碱对变量重要性投影值 > 1 的差异代谢物比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

代谢物	对照组	观察组	对变量重要性投影值	t	P
苯丙氨酸	42.92 ± 14.51	68.82 ± 19.15	1.74	-6.61	<0.01
缬氨酸	124.77 ± 39.95	190.88 ± 61.28	1.69	-5.55	<0.01
亮氨酸	137.18 ± 40.76	192.88 ± 67.25	1.46	-4.35	<0.01
甘氨酸	266.50 ± 72.98	364.82 ± 166.87	1.23	-3.30	<0.01
丁酰肉碱	0.17 ± 0.04	0.20 ± 0.07	1.07	-2.45	<0.05
异戊酰肉碱	0.08 ± 0.03	0.15 ± 0.09	1.38	-4.59	<0.01
游离肉碱	36.05 ± 14.78	23.92 ± 9.42	1.51	4.23	<0.01
肉豆蔻酰肉碱	0.12 ± 0.07	0.08 ± 0.04	1.23	2.88	<0.01
棕榈酰肉碱	1.61 ± 1.10	1.03 ± 0.34	1.28	3.08	<0.01
棕榈烯酰肉碱	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.02	1.17	2.88	<0.01
十八碳酰肉碱	0.76 ± 0.33	0.58 ± 0.24	1.09	2.63	<0.05
十八碳烯酰肉碱	1.30 ± 0.49	0.91 ± 0.38	1.40	3.82	<0.01
十八碳二烯酰肉碱	0.34 ± 0.13	0.23 ± 0.10	1.46	4.19	<0.01

3 讨论

脓毒症发病机制复杂,患者的高度异质性给脓毒症的诊断和治疗带来不确定性,被称为“医学史上最悠久也是最捉摸不定的综合征之一”^[8]。脓毒症被视为一场“隐藏的公共卫生灾难”,世界卫生组织倡议各国政府应优先加强脓毒症的预防及诊治,将其列为“全球医疗优先关注的疾病”^[9]。尽管医学界做出了最大努力,但脓毒症的诊断标准仍局限性地取决于临床判断、用时数日的血培养以及非特异性的炎症指标。由于以上不足,生物标志物已被建议通过快速诊断和开始治疗来提高脓毒症的决策^[10]。生物标志物是由机体产生的一类特异性物质,反映着疾病的发生、发展,脓毒症的高异质性使得单一的生物标志物不足以全面评估病情,但众多生物标志物形成的组合可显著提高诊治准确性。目前还没有理想的生物标志物能完全满足所有实际的要求,系统的研究还处于起步阶段^[11]。本研究对观察组及对照组的血浆代谢物进行检测分析,构建 OPLS-DA 模型,筛选出了一组具有统计学和生物学意义的差异代谢物,并以此为基础探索儿童脓毒症早期的代谢

过程 and 变化机制。

本研究运用质谱技术对组成蛋白质的氨基酸进行分析,发现观察组苯丙氨酸明显增高,这一观察结果与以往的研究结果相一致,苯丙氨酸为芳香族氨基酸,参与儿茶酚胺的合成,在脓毒症中,机体肌肉分解增加,儿茶酚胺释放增多,体外研究表明,肾上腺素可下调苯丙氨酸羟化酶的活性,这都可能致苯丙氨酸的堆积,苯丙氨酸水平升高与脓症患者预后不良相关,在严重感染患者中,苯丙氨酸水平升高的患者死亡率更高^[12-14]。本研究发现观察组患儿缬氨酸及亮氨酸水平明显增高,该两种氨基酸同为支链氨基酸,属于必需氨基酸,多项不同地域和种族人群的病例对照及横断面研究均指出,支链氨基酸水平增高与胰岛素抵抗关联密切^[15-16]。支链氨基酸分解代谢主要发生在线粒体内,缬氨酸及亮氨酸水平明显增高亦提示肌肉中线粒体代谢的严重缺陷^[17]。

除了氨基酸代谢途径出现明显扰动,本研究富集分析的结果表明脂肪酸代谢、肉碱合成是脓毒症患儿显著的差异代谢通路,表现在观察组患儿游离肉碱水平低于对照组,此外经富集分析发现脓毒症

患儿长链脂肪酸的线粒体 β 氧化通路受到显著干扰,表现在观察组患儿肉豆蔻酰肉碱、棕榈酰肉碱、棕榈烯酰肉碱、十八碳酰肉碱、十八碳烯酰肉碱及十八碳二烯酰肉碱的水平低于对照组,可见低水平的游离肉碱使长链酰基肉碱形成不足。脂解可补充葡萄糖代谢紊乱患儿的能量需求,然而也有实验结果表明,长链脂肪酸水平在脓毒症大鼠中却是减少,脂肪酸的需求和血液中的含量之间存在不平衡^[18],由此可知,本研究发现的差异代谢通路可能涉及脓毒症机体能量供需失衡。已有充足的实验证据表明,脓毒症可能会干扰线粒体功能,以及由此导致的能量产生受损^[19]。本研究观察组丁酰肉碱及异戊酰肉碱水平高于对照组,血浆中升高的短链酰基肉碱可能是由于肉碱棕榈酰转移酶I下游的线粒体脂肪酸 β 氧化不完全,表明线粒体功能障碍^[20]。有 2 项研究表明线粒体功能障碍可导致甘氨酸生物合成途径上调,本研究中脓毒症患儿甘氨酸水平增高,与既往研究结果相符^[21-22]。甘氨酸具有抗氧化和免疫调节作用,还可以减少自由基的生成,是人体细胞内的主要代谢调节物质之一,对脓毒症机体起保护作用^[23]。

4 结论

本研究通过对脓毒症患儿血中代谢物的研究,发现了一组生物标志物,提示机体存在代谢紊乱及线粒体功能障碍,并尝试探索脓毒症的发病机制。这些生物标志物可能有助于在脓毒症领域早期诊断,辅助临床决策,实现精准诊治^[24]。代谢组学已显示出作为脓毒症诊断工具的巨大潜力^[25],由于宿主对脓毒症反应的异质性,目前该类生物标志物的研究往往受限于样本量小,而不具有普遍性,为了更好地实现特异性,将来仍需要更进一步的多例数、前瞻性、多中心研究来阐明。

参考文献

[1] Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children [J]. *Intensive Care Med*, 2020,46(Suppl 1):10-67.

[2] Bustamante A, Garcia-Berrocoso T, Penalba A, et al. Sepsis biomarkers reprofiling to predict stroke-associated infections [J]. *J Neuroimmunol*, 2017,312:19-23.

[3] Ahn S, Lee SH, Chung KS, et al. Development and validation of a novel sepsis biomarker based on amino acid profiling [J]. *Clin Nutr*, 2021,40(6):3668-3676.

[4] Losser MR, Damoiseil C, Payen D. Bench-to-bedside review: Glucose and stress conditions in the intensive care unit [J]. *Crit Care*, 2010,14(4):231.

[5] Pham-Tuan H, Kaskavelis L, Daykin CA, et al. Method development in high-performance liquid chromatography for

high-throughput profiling and metabonomic studies of biofluid samples [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003,789(2):283-301.

[6] Shockcor JP, Holmes E. Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis [J]. *Curr Top Med Chem*, 2002,2(1):35-51.

[7] 中华医学会儿科学分会急救学组,中华医学会急诊医学分会儿科学组,中国医师协会儿童重症医师分会. 儿童脓毒性休克(感染性休克)诊治专家共识(2015 版) [J]. *中华儿科杂志*, 2015,53(8):576-580.

[8] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013,369(9):840-851.

[9] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, et al. Recognizing sepsis as a global health priority —— a WHO resolution [J]. *N Engl J Med*, 2017,377(5):414-417.

[10] Marshall JC, Reinhart K; International Sepsis Forum. Biomarkers of sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2009,37(7):2290-2298.

[11] 李立斌,严静. 脓毒症的生物标志物:过去、现在和将来 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2013,22(9):954-956.

[12] Liu Z, Triba MN, Amathieu R, et al. Nuclear magnetic resonance-based serum metabolomic analysis reveals different disease evolution profiles between septic shock survivors and non-survivors [J]. *Crit Care*, 2019,23(1):169.

[13] Su L, Li H, Xie A, et al. Dynamic changes in amino acid concentration profiles in patients with sepsis [J]. *PLoS One*, 2015,10(4):e0121933.

[14] Huang SS, Lin JY, Chen WS, et al. Phenylalanine- and leucine-defined metabolic types identify high mortality risk in patients with severe infection [J]. *Int J Infect Dis*, 2019,85:143-149.

[15] Chen T, Ni Y, Ma X, et al. Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations [J]. *Sci Rep*, 2016,6:20594.

[16] Tillin T, Hughes AD, Wang Q, et al. Diabetes risk and amino acid profiles: cross-sectional and prospective analyses of ethnicity, amino acids and diabetes in a South Asian and European cohort from the SABRE (Southall And Brent REvisited) Study [J]. *Diabetologia*, 2015,58(5):968-979.

[17] Ryan TE, Yamaguchi DJ, Schmidt CA, et al. Extensive skeletal muscle cell mitochondriopathy distinguishes critical limb ischemia patients from claudicants [J]. *JCI Insight*, 2018,3(21):e123235.

[18] Lin ZY, Xu PB, Yan SK, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by (1)H NMR and pattern recognition [J]. *NMR Biomed*, 2009,22(6):601-608.

[19] Kohoutová M, Dejmejk J, Tuma Z, et al. Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction [J]. *Physiol Res*, 2018,67(Suppl 4):S577-592.

[20] Violante S, Ijlst L, Te Brinke H, et al. Carnitine palmitoyltransferase 2 and carnitine/acylcarnitine translocase are involved in the mitochondrial synthesis and export of acylcarnitines [J]. *FASEB J*, 2013,27(5):2039-2044.

[21] Ost M, Keipert S, van Schothorst EM, et al. Muscle mitochondrial hormesis promotes cellular survival via serine/glycine pathway flux [J]. *FASEB J*, 2015,29(4):1314-1328.

[22] Nikkanen J, Forsstrom S, Euro L, et al. Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016,23(4):635-648.