DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240404

基于DIA蛋白质组学技术筛选脓毒症脑病发病相关关键蛋白质的研究

吴淑慧，胡宏杰，陆昱汝，祝伟*

（1.华中科技大学同济医学院附属同济医院急诊医学科，湖北 武汉 430030；
2.华中科技大学同济医学院附属同济医院重症医学科，湖北 武汉 430030）

【摘要】目的 通过数据独立采集（DIA）定量蛋白质组学技术和机器学习方法挖掘脓毒症脑病（SAE）患者血浆关键蛋白质，以指导SAE的发病机制研究并助力SAE早期诊断。**方法** 通过DIA定量蛋白质组学技术检测脓毒症和SAE患者血浆蛋白质水平，同时，通过生物信息学方法明确两组患者间的差异蛋白质并进行功能分析。进一步通过极限梯度提升法（XGBoost）、最小绝对收缩和选择回归算法（LASSO）机器学习模型等方法在差异蛋白质中筛选关键差异蛋白质构建列线图并评价其诊断效能。**结果** 通过DIA定量蛋白质组学技术和生物信息学分析在患者血浆中共筛选出22个差异表达蛋白质，其中9个蛋白质表达水平在SAE组中上调，13个蛋白质表达水平在SAE组中下调。差异蛋白质涉及丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、病灶黏附和磷脂酶D等信号通路，参与细胞黏附、信号转导、高分子修饰等生物学过程，同时，肠道疾病与SAE发生可能存在密切关系。进一步通过XGBoost机器学习模型、LASSO回归机器学习模型和五折交叉验证的方法在22个差异蛋白质中筛选出两个关键蛋白质内质网蛋白29（ERP29）和白细胞介素增强剂结合因子3（ILF3）。将两个关键蛋白质构建列线图并评价其诊断效果，其中训练集受试者工作特征曲线（ROC）的曲线下面积（AUC）为0.925 6，测试集AUC为0.875。**结论** 基于DIA定量蛋白质组学技术和机器学习方法明确的蛋白质ERP29和ILF3是SAE发生的关键蛋白质，是SAE发病机制研究的重要靶点。ERP29和ILF3可作为生物学标志物用于SAE早期诊断。

【关键词】脓毒症脑病；蛋白质组学；机器学习；生物学标志物

中图分类号：R631 **文献标识码：**A **文章编号：**2096-8965（2024）04-0028-09

Research on screening key proteins related to the pathogenesis of sepsis associated encephalopathy based on DIA proteomics technology

Wu Shuhui, Hu Hongjie, Lu Yuru, Zhu Wei*

(1. Department of Emergency Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China;
2. Department of Intensive Care Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

【Abstract】Objective To explore the key proteins in plasma of patients with sepsis associated encephalopathy (SAE) through data-independent acquisition(DIA) quantitative proteomics and machine learning techniques, with the aim of guiding research on SAE pathogenesis and aiding early diagnosis. **Methods** The protein levels of

收稿日期：2024-10-12；**修回日期：**2024-11-12

基金项目：湖北省重点研发计划项目（2022BCA038）

通信作者：祝 伟（1976-），男，湖北武汉人，主任医师，博士研究生导师，主要从事脓毒症和脓毒症脑病的机制方面的研究，E-mail: tjjzkzw512@163.com

plasma in patients with sepsis and SAE were measured using DIA quantitative proteomics technology. The differential proteins between the two patient groups were identified and functionally analyzed using bioinformatics methods. Key differential proteins were further screened using machine learning models such as Extreme Gradient Boosting（XGBoost） and Least Absolute Shrinkage and Selection Operator（LASSO） regression to construct a nomogram and evaluate its diagnostic performance. **Results** A total of 22 differentially expressed proteins were identified in the plasma of patients using DIA quantitative proteomics technology and bioinformatics analysis. Among these, the expression levels of 9 proteins were upregulated and 13 proteins were downregulated in the SAE group. These proteins were involved in signaling pathways such as Mitogen-Activated Protein Kinase（MAPK） signaling, focal adhesion and phospholipase D signaling pathways, and were involved in biological processes such as cell adhesion, signaling, macromolecular modification, etc. Meanwhile, intestinal diseases were found to have a potential association with the occurrence of SAE. Further screening was conducted using XGBoost and LASSO regression machine learning model, along with 5-fold cross validation to identify two key differential proteins, Endoplasmic Reticulum Protein 29 (ERP29) and Interleukin Enhancer Binding Factor 3 (ILF3), among the 22 differentially expressed proteins. A nomogram was constructed with these two key proteins and the diagnostic efficacy was evaluated, with area under curve (AUC) value 0.925 6 for the receiver operating characteristic curve (ROC) in the training set and AUC value 0.875 in the test set. **Conclusion** ERP29 and ILF3, identified through DIA quantitative proteomics and machine learning techniques, are key proteins involved in the occurrence of SAE and represent important targets for studying the pathogenesis of SAE. ERP29 and ILF3 can be used as biomarkers for early diagnosis of SAE.

【**Keywords**】Sepsis associated encephalopathy; Proteomics; Machine learning; Biomarker

0 前言

脓毒症是一种由于机体感染过度反应导致的严重危及生命的器官功能障碍综合征，是全球主要的死亡原因之一[1]。研究[2]显示，中国1992—2020年，重症监护病房内脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克的死亡率分别为3.1%、43.6%和53.3%。脓毒症脑病（Sepsis Associated Encephalopathy，SAE）是由脓毒症导致的弥漫性脑功能障碍。研究[3]表明，高达70%的脓毒症患者会发生SAE，急性期表现为行为异常、精神错乱、焦虑抑郁、快感缺失、社交和环境兴趣降低、谵妄甚至昏迷，与高死亡率密切相关，20%~50%的脓毒症患者出院后1年内仍会持续存在轻度至中度的记忆改变，部分患者出现学习能力下降或认知功能障碍，严重影响生活质量[4-8]。因此，SAE逐步成为脓毒症研究领域需要关注的重点问题。

目前，SAE的病理机制尚未完全阐明。研究[9-10]表明，氧化应激、神经炎症反应和血脑屏障受损等与SAE的发生密切相关。SAE的临床诊断仍以排他诊断为主，虽然临床评估量表、脑电图和功能磁共振成像等方法在SAE诊断中有一定作用，但是临床早期诊断SAE仍然存在一定的困难。因此，针对SAE的发病机制及其关键蛋白质靶点的深入研究，积极探寻新的生物标志物对于降低脓毒症患者病死率具有重要意义。

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象，研究细胞、组织或生物体蛋白质组成及其变化规律的科学。通过蛋白质组学技术可以对生物样本中的蛋白质、翻译后修饰位点（如磷酸化）进行大规模地鉴定，进而从高通量的数据分析中挖掘有价值的信息和规律，为功能机制的探究提供基础。定量蛋白质组学是蛋白质组学研究中最重要的技术之一，可以对样品之间蛋白质水平的变化进行定量分析。随着质谱技术和生物信息学的迅速发展，数据非依赖性采集（Data-Independent Acquisition，DIA）蛋白质组学技术逐渐成为生物标志物筛选研究的主要手段。与传统蛋白质组学方法相比，DIA技术在筛选差异蛋白质过程中，存在样本数量无限制、特异性好、检测深度高且重复性好等优势。因此，DIA蛋白质组学技术逐步成为疾病机制研究和生物标志物筛查的重要手段。

本研究拟通过DIA蛋白质组学技术对脓毒症及SAE患者的血浆样本进行相对蛋白定量比较，筛选出差异表达的蛋白质，并进行生物信息学分析。通过本研究挖掘SAE患者血浆中的关键蛋白质，以期揭示SAE的发病机制，同时通过关键差异蛋白质指导SAE患者的早期诊断。

1 材料与方法

1.1 研究对象选取与分组

根据纳入标准与排除标准，选取2022年9—12月华中科技大学同济医学院附属同济医院收治的脓毒症患者作为研究对象。

纳入标准：①脓毒症的诊断符合脓毒症3.0标准[1]；②患者年龄为18~80岁；③重症监护室（Intensive Care Unit，ICU）入院时间>24 h；④自愿签署知情同意书，因意识障碍无法签署者由受试者委托代理人代为签署；⑤临床资料完整。

排除标准：①确诊为恶性肿瘤的患者；②既往存在或新发各种中枢神经系统疾病；③确诊为精神相关疾病；④由中枢神经系统感染、颅脑肿瘤、电解质紊乱及安眠药等因素引起的意识障碍；⑤妊娠期、哺乳期患者；⑥听力和视力受损等无法完成量表测试；⑦研究者认定不适合的情况。

根据意识模糊评估量表评分、蒙特利尔认知评估量表评分、焦虑抑郁量表评分或事件影响量表评分，判断受试者是否出现焦虑、抑郁、认知功能障碍和意识改变等精神状态改变，为SAE诊断提供依据。将入组的脓毒症患者分为脓毒症SAE组和脓毒症非SAE组。两组患者按年龄和性别匹配（每组n=15例），留取外周血样本并开展后续研究（见图1）。本研究通过了华中科技大学同济医学院附属同济医院医学伦理委员会（编号：TJ-IRB20220767）审批。

1.2 临床资料收集

按照实验方案收集患者年龄、性别和住院时间等一般信息，心率、体温、呼吸频率和血压等生命体征，以及血常规、肝肾功能、降钙素原（Procalcitonin，PCT）、超敏C反应蛋白（hypersensitive C-Reactive Protein，hs-CRP）和凝血功能等实验室检测指标。

1.3 样本处理及质谱数据分析

1.3.1 材料

异丙醇（Thermo Fisher Scientific，美国，A461-4）、乙腈（Thermo Fisher Scientific，美国，A998-4）、尿素（Sigma-Aldrich，美国，51456-500G）、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[Tris（Hydroxy-methyl）Aminomethane Hydrochloride，Tris-HCl]（Sigma-Aldrich，美国，T1503-1KG）、十二烷基硫酸钠（Sigma-Aldrich，美国，L3771-500G）、脱氧胆酸钠（Sodium deoxycho-late，SDC）（Sigma-Aldrich，美国，D6750-25G）、氯乙酰胺（Chloroacetamide，CAA）（Sigma-Aldrich，美国，C0267-100G）、三氟乙酸（Trifluoroacetic acid，TFA）（Sigma-Aldrich，美国，299537-500G）、三氯乙酸（Sigma-Aldrich，美国，T6399-500G）、三（2-羧乙基）膦[Tris（2-carboxyethyl）phosphine，TCEP]（Sigma-Aldrich，美国，C4706-10G）、胰蛋白酶（SignalChem，日本，T575-31N-10）、无水乙醇（中国医药集团有限公司，中国，10009218）、丙酮（中国医药集团有限公司，中国，10000418）、二甲苯（中国医药集团有限公司，中国，10023418）、马斯亮蓝法（Bradford）法蛋白质定量检测试剂盒（生工生物工程股份有限公司，中国，C503031-1000），BCA蛋白质定量检测试剂盒（生工生物工程股份有限公司，中国，C503021-0500）。

1.3.2 样本处理

采集最终纳入患者入院后24 h内外周静脉血5 mL，并将其置于EDTA抗凝试管内。离心机4℃

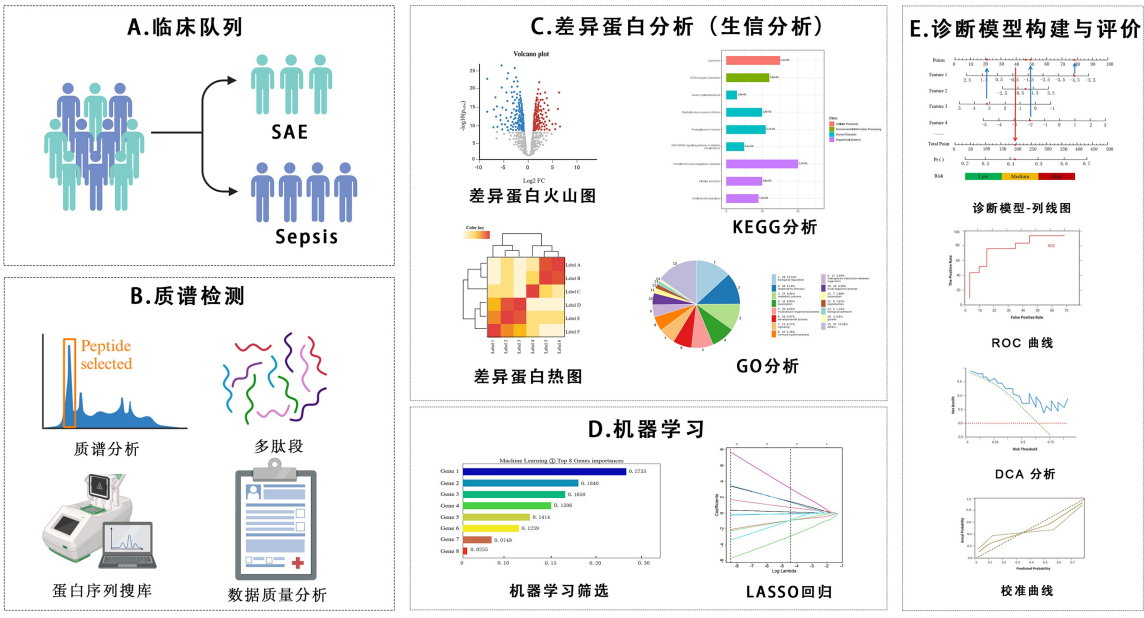


图1 蛋白质组学联合机器学习筛选并验证SAE发病关键蛋白质的实验流程图

Figure 1 Flow chart of screening and validation key proteins in SAE pathogenesis using proteomics combined with machine learning

预冷，30 min内以2 500 r/min离心15 min，收集上清液至EP管内，-80℃冻存备用。

向样品中加入裂解液［1%SDC、100 mmol/L Tris-HCl（pH=8.5）、10 mmol/L TCEP、40 mmol/L CAA］，60℃孵育30 min进行还原烷基化反应。采用马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取等量蛋白补齐至相同体积，加入等体积双蒸馏水，将SDC浓度稀释至0.5%以下，按照酶与蛋白1∶50的质量比加入胰蛋白酶，37℃孵育振荡过夜进行酶切。第2天加入TFA终止酶切，取上清进行苯乙烯二乙烯基苯-反相磺酸盐脱盐柱脱盐，真空抽干后-20℃冻存备用。

1.3.3 质谱检测

质谱分析使用timsTOF Pro液质联用系统进行。肽段样品经过自动进样器进样结合至C18 Trap柱，并在反相C18分析柱中分离。通过流动相A（0.1%甲酸）和流动相B（0.1%甲酸/99.9%乙腈）建立60 min的分离梯度，流速设为0.3 mL/min。质谱仪以diaPASEF模式运行。DIA原始数据使用DIA-NN（V1.8.1）软件的Library-Free Mode分析。蛋白序列数据库是从UniProt下载的人的蛋白数据库。检索参数主要采用默认设置。蛋白质定量信息使用MaxLFQ算法进行归一化处理。在DIA-NN输出表中使用“PG.MaxLFQ”进行蛋白质水平的定量分析。

1.4 生物信息学分析

在相关数据库中搜定性、定量的蛋白数据后，对质谱结果进行质控评价、定量分析、差异蛋白筛选，筛选标准：以差异倍数（Fold Change，*FC*）>1.2、*P*<0.05为显著上调的变化阈值，*FC*<1/1.2、*P*<0.05为显著下调的变化阈值。再使用相关的数据库鉴定蛋白的功能注释。选择基因本体论（Gene Ontology，GO）数据库（http://geneontology.org/）对筛选得到的差异蛋白从生物学过程、细胞组分和分子功能三个方面进行GO注释分析功能聚类分析；采用京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes，KEGG）通路数据库（http://www.genome.jp/kegg//）对差异蛋白涉及的代谢通路进行分析；通过疾病本体论（Disease Ontology，DO）数据库（https://disease-ontology.org/）对差异蛋白涉及的人类疾病、表型特征进行分析。同时绘制火山图、聚类热图、主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）图等实现比较组差异数据的可视化，以体现差异蛋白中可信蛋白数据质量控制情况、差异蛋白表达情况和蛋白功能情况，从而确定其上调或下调的基因靶点。

1.5 机器学习分析

选取*FC*及统计学检验（*P*<0.05）作为初筛依据。使用机器学习方法极限梯度提升法（eXtreme Gradient Boosting，XGBoost）以及最小绝对收缩和选择回归算法（Least Absolute Shrinkage and Selection Operator，LASSO）进行进一步的生物标志物筛选[11-12]，最后筛选出的标志物，根据实际情况选择合适的建模方法建模。此外，本研究还采用5倍交叉验证法对差异蛋白进行随机组合，并根据受试者工作特征曲线（Receiver Operating Characteristic Curve，ROC）的曲线下面积（Area Under Curve，AUC）选出最佳蛋白组合。在选择最佳蛋白质组合时，使用Python的itertools库中的组合函数生成了不同数量的蛋白组合，AUC值最大的蛋白组合被选为最佳组合。

1.6 模型构建与评价

将全部患者的数据以3∶1的比例分为测试集和训练集。通过C指数和AUC值从区分度评价模型，通过校准曲线等方法评价模型的校准度以及一致性，通过决策分析曲线（Decision Curve Analysis，DCA）分析或列线图等方法评价模型的临床效应。

1.7 统计分析

数据采用SPSS 25.0进行统计分析。对于符合正态分布的连续性变量，使用平均数±标准差表示；用*t*检验比较符合正态分布数据的平均值；对于不符合正态分布的连续型变量，使用四分位数描述，用秩和检验比较非正态分布数据组的平均值。定性数据以频率或百分比表示，组间比较采用卡方检验或Fisher检验。在本研究中，*P*<0.05为差异有统计学意义。统计学分析以及模型建立方法，均通过SPSS、R语言或Python进行。

2 结果

2.1 基线数据比较

2组患者在一般情况、生命体征和实验室检测结果等方面差异无统计学意义（*P*>0.05，见表1，表2）。

2.2 外周血差异蛋白质分析与筛选

使用DIA技术获取了所有患者的血浆蛋白质组图谱。全部队列蛋白质组学的差异丰度分析显示，22个蛋白质在SAE组中显著失调（$|\log_2 FC|\geq 0.26$，*P*<0.05）。在所有研究对象中，与脓毒症非SAE组相比，SAE组的22个蛋白质的表达水平显著不同，其中，9个蛋白质表达水平在SAE组中上调，13个蛋白质表达水平在SAE组中下调。差异蛋白火山图与聚类热图见图2A，2B。PCA显示SAE组和非SAE组可明显区分见图2C。

2.3 功能富集分析

对差异蛋白进行GO、KEGG通路和DO富集分析。差异蛋白的GO条目在生物过程类别中富集

表1 基线资料比较：一般信息

Table 1 Comparison of baseline information: General information

参数	研究对象		$\chi^2/Z/t$值	P值
	脓毒症非SAE组（n=15例）	脓毒症SAE组（n=15例）		
性别，n（例）			0.136	0.713
男	6	7		
女	9	8		
住院时间（d）	9.0（6.0，11.0）	11.0（6.0，14.0）	−0.853	0.394
年龄（岁）	65.0（54.0，77.0）	69.0（59.0，77.0）	−0.623	0.533
体温（℃）	36.7（36.2，36.8）	36.5（36.4，37.6）	−0.334	0.738
脉搏（次/min）	94.8±22.7	113.3±33.8	−1.758	0.064
呼吸频率（次/min）	19.9±3.3	21.2±2.8	−1.140	0.264
收缩压（mmHg）	103.5±24.1	106.3±31.4	−0.274	0.432
舒张压（mmHg）	64.3±13.4	66.7±17.0	−0.429	0.360

表2 基线资料比较：实验室检查

Table 2 Comparison of baseline information: Laboratory examinations

参数	研究对象		$\chi^2/Z/t$	P值
	脓毒症非SAE组（n=15例）	脓毒症SAE组（n=15例）		
D−二聚体（mg/L）	3.9（2.0，5.2）	5.9（4.0，6.6）	−1.701	0.089
凝血酶原时间（s）	14.6（11.9，17.0）	15.0（12.7，16.9）	−0.290	0.771
凝血酶时间（s）	14.8（13.7，16.4）	15.7（13.2，17.1）	−0.311	0.755
活化部分凝血活酶时间（s）	33.4（31.4，37.0）	32.2（27.4，38.0）	−0.622	0.534
凝血酶原活动度（%）	69.2±22.7	79.5±19.3	−1.343	0.271
纤维蛋白原（g/L）	4.4（2.4，4.9）	3.8（3.0，4.2）	−0.373	0.709
白细胞计数（10^9/L）	11.8（9.3，13.3）	13.7（8.3，21.9）	−0.975	0.330
中性粒细胞（10^9/L）	11.6（9.5，13.0）	12.3（7.5，19.0）	−0.539	0.590
红细胞计数（10^9/L）	3.6（3.3，4.8）	3.7（3.1，4.1）	−0.415	0.678
血红蛋白（g/L）	122.5±20.8	109.7±20.7	1.690	0.470
血小板（10^9/L）	215.4±80.8	160.5±75.4	1.926	0.885
hs−CRP（mg/L）	148.8±111.6	169.6±82.1	−0.583	0.565
PCT（ng/mL）	4.3（2.6，6.7）	19.5（1.3，44.1）	−1.431	0.152
丙氨酸氨基转移酶（U/L）	18.0（12.0，84.0）	24.0（13.0，64.0）	−0.062	0.950
天门冬氨酸氨基转移酶（U/L）	29.0（16.0，73.0）	40.0（18.0，59.0）	−0.125	0.901
总胆红素（μmol/L）	10.4（6.6，13.1）	12.8（7.6，22.6）	−1.307	0.191
白蛋白（g/L）	32.0（29.8，33.9）	27.5（24.4，32.0）	−1.722	0.085
血肌酐（μmol/L）	77.0（57.5，114.5）	108.0（69.0，175.0）	−1.307	0.191
血尿素氮（mmol/L）	12.6±6.3	14.1±8.9	−0.514	0.291

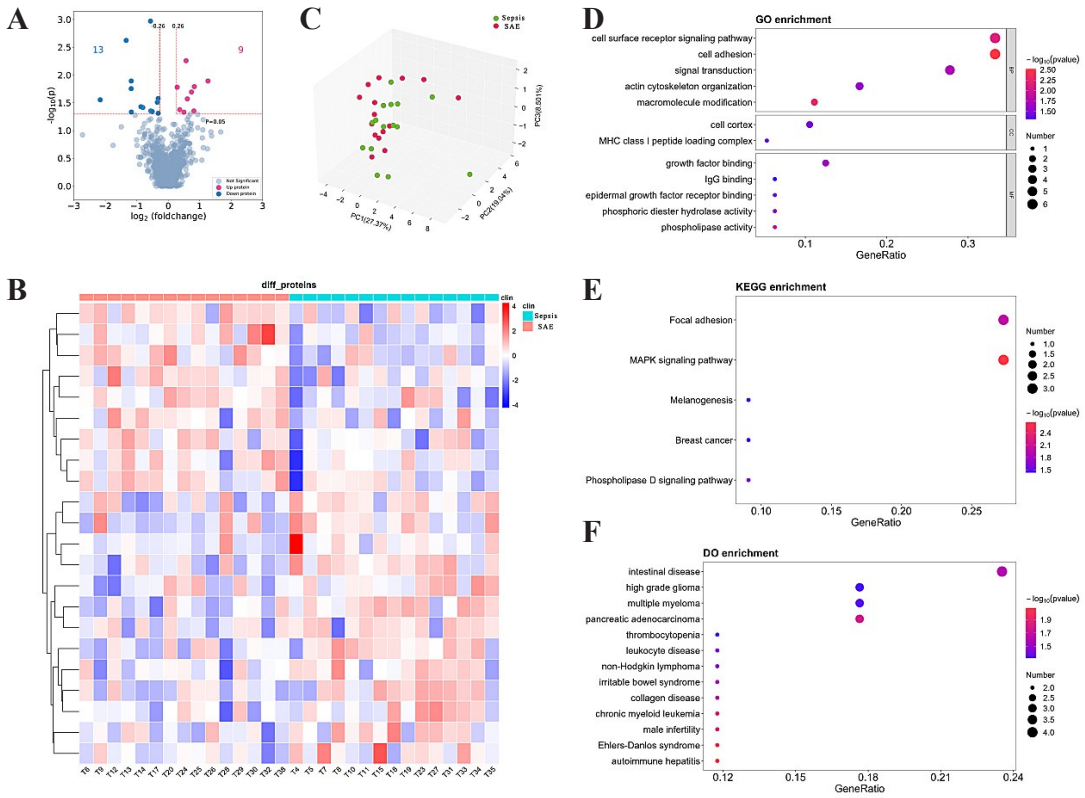
的主要有“细胞黏附，细胞表面受体信号通路，信号转导，肌动蛋白细胞骨架组织和高分子修饰”；在细胞组分类别中富集的主要有“细胞皮层和MHC Ⅰ类多肽装载复合体”；在分子功能类别中富集的主要有“生长因子结合，磷脂酶活性，磷酸二酯水解酶活性，表皮生长因子受体结合和IgG结合”；差异蛋白在KEGG途径中富集的主要有“丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase，MAPK）信号通路，病灶黏附，磷脂酶D信号通路，乳腺癌和黑色素生成”；差异蛋白在DO条目中富集的主要有“肠道疾病，胰腺癌，多发性骨髓瘤，高级别胶质瘤，自身免疫性肝炎”（见图2D~2F）。

2.4 关键蛋白质筛选

应用XGBoost机器学习模型从上述分析中筛选出来的22个蛋白质中挑选出14个蛋白质，蛋白质预测重要性（见图3A）。应用LASSO回归模型进一步在上述14个蛋白质中筛选出11个蛋白质（见图3B，3C），具体蛋白质对应的基因名称为*BHMT*、*ERP29*、*ILF3*、*PCDH12*、*MYL9*、*COL6A1*、*CHST9*、*IGKV2D-24*、*KRT2*、*FLNA*和*C1S*（按差异倍数从小到大排列，见图4）。将上述11个蛋白质随机组合，进行五折交叉验证筛选，通过AUC选择最优组合。最优的蛋白质组合为内质网蛋白29（Endoplasmic Reticulum Protein 29，ERP29）和白细胞介素增强剂结合因子3（Interleukin Enhancer Binding Factor 3，ILF3），其AUC为0.937 5。

2.5 模型构建与评价

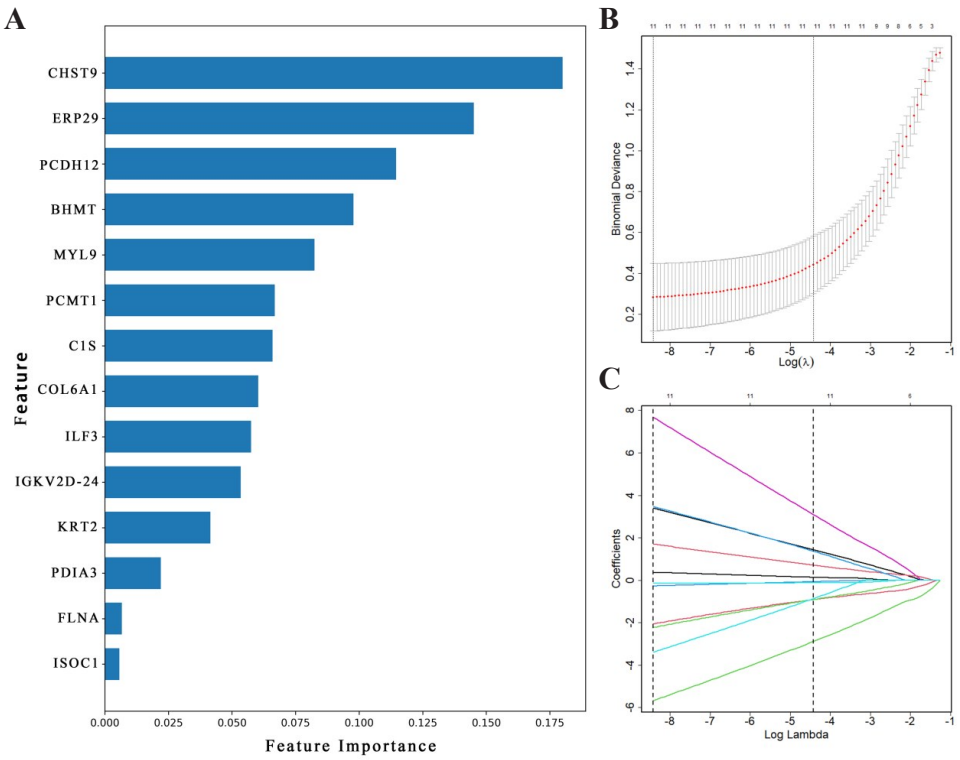
将蛋白质ERP29和ILF3构建列线图（见图5A）。对列线图进行评价，训练集的AUC *95%CI*



A：差异蛋白质火山图；B：差异蛋白质聚类热图；C：PCA 图；D：差异蛋白GO分析；E：差异蛋白KEGG分析；F：差异蛋白DO分析。

图2　差异蛋白质分析

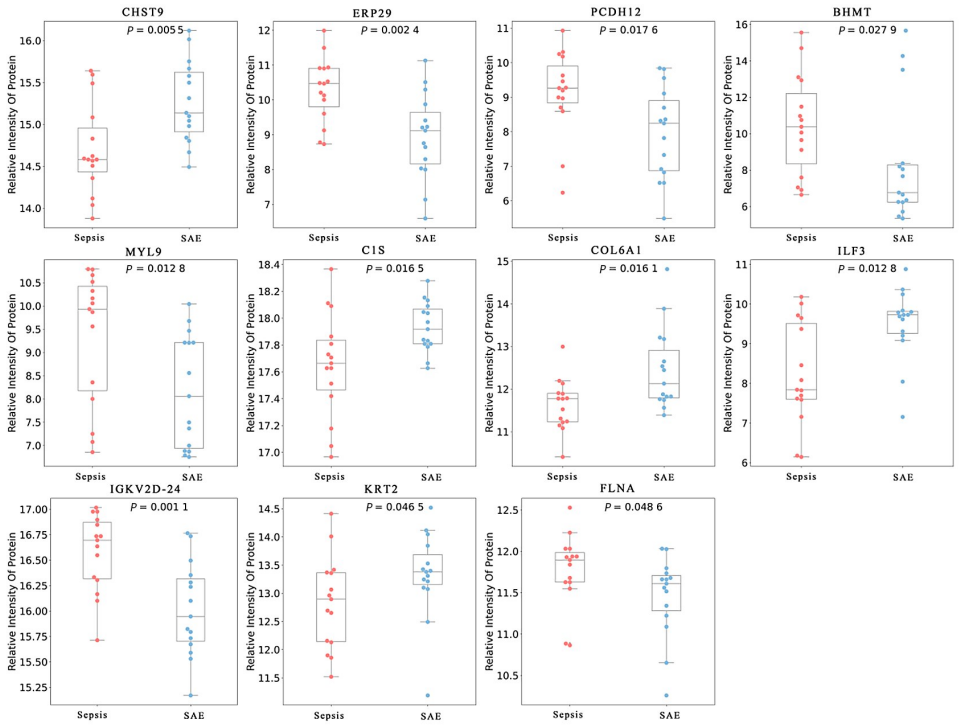
Figure 2　Analysis of differential protein



A：XGBoost筛选蛋白质结果；B：LASSO 回归分析交叉验证曲线；C：LASSO回归系数路径图。

图3　机器学习方法筛选蛋白质

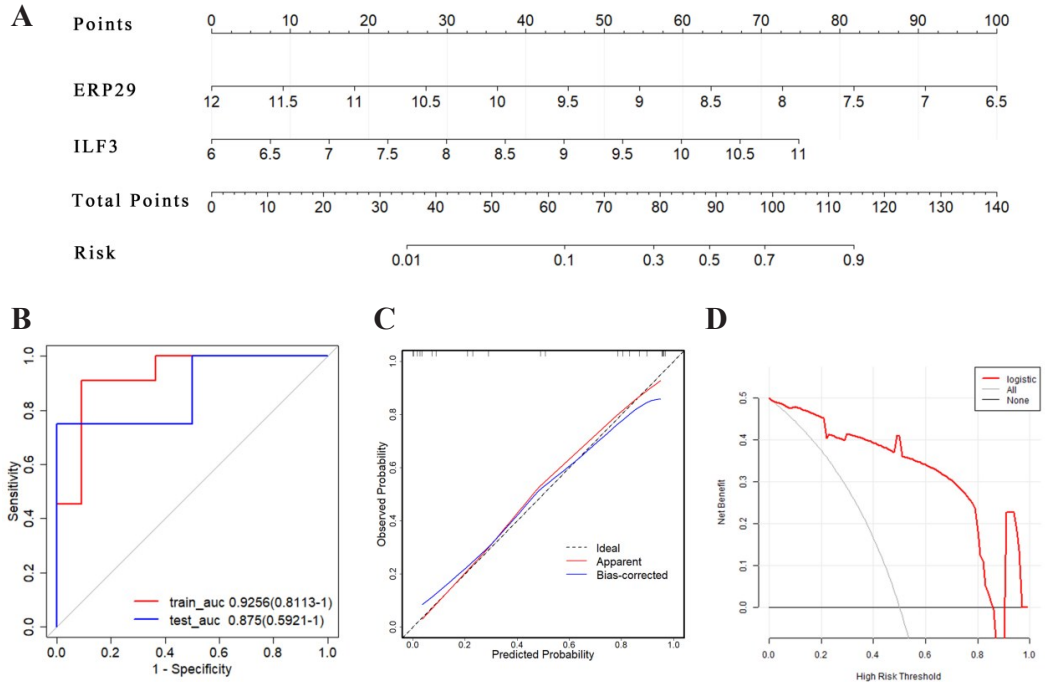
Figure 3　Machine learning methods for screening proteins



图为机器学习筛选所得的11种蛋白质在Sepsis非SAE组和SAE组的表达差异，每一个小图代表一种蛋白质的表达情况，小图中每一个点代表一个样本。

图4　LASSO回归分析筛选的蛋白质在两组之间的表达差异

Figure 4　Differences in the expression of proteins screened by LASSO regression analysis between the two groups



A：列线图；B：ROC曲线；C：校准曲线；D：DCA曲线。

图5　列线图的构建与评价

Figure 5　Construction and evaluation of nomogram

0.925 6（0.811 3~1.000 0），测试集的AUC *95%CI* 0.875（0.592 1~1.000 0），其区分度良好（见图5B）。校准曲线和决策曲线分析显示了该列线图具有的良好性能和临床效用（图5C，5D）。

3　讨论

脓毒症是重症监护病房常见的危重症，有很高的病死率。脑是脓毒症常累积的器官之一，一旦发

生SAE，脓毒症患者病死率将明显增加。因此，积极探寻SAE的发病机制，并寻找标志物以早期诊断SAE对降低其发病率有重要意义。

蛋白质组学技术通过检测遗传物质在蛋白水平上的变化，揭示差异蛋白表达与疾病间的联系，对于寻找可靠的生物学标志物具有重要价值[13]。DIA作为一种靶向蛋白质组学技术，可高效测定复杂样品中丰度极低的蛋白分子，极大地提高定量分析的可信度，在蛋白检测中有更高的准确性和重复性。研究[14-15]表明，DIA蛋白组学技术在疾病机制研究以及生物学标志物探寻中发挥了重要作用。相对于传统统计学方法机器学习方法可以在大量数据中发现有意义的模式和规律，能更好地预测疾病发生的风险。近年来，越来越多的研究将机器学习方法应用于预测疾病发生、发展、预后和生存[16-18]。

基于蛋白质组学技术和机器学习方法在疾病机制研究和诊断中的优势，本研究联合DIA蛋白质组学技术和机器学习方法，探索SAE发病机制的关键蛋白质靶点，并积极寻找SAE早期诊断的生物标志物。本研究发现，在脓毒症和SAE两组患者中存在22个差异蛋白质，在功能研究中，上述差异蛋白质涉及MAPK信号通路、病灶黏附和磷脂酶D等信号通路，参与细胞黏附、信号转导、高分子修饰等生物学过程，同时肠道疾病与SAE发生可能存在密切关系，肠–脑轴被认为是脓毒症患者急性认知障碍和长期认知能力下降的关键因素[19]。随后，本研究应用XGBoost、LASSO回归和五折交叉验证的方法，明确了ERP29和ILF3是脓毒症和SAE两组患者中存在的核心差异蛋白质。为进一步验证核心差异蛋白质对SAE的诊断效果，本研究将ERP29和ILF3构建列线图，并应用ROC曲线、DCA分析和校准曲线对模型进行评价，结果发现模型的区分度良好，列线图有良好的性能和临床效用。

ERP29是蛋白质二硫键异构酶蛋白家族的成员，定位于内质网腔，在中枢神经系统神经元中高表达，参与蛋白质折叠、运输和分泌[20]。研究[20]发现，ERP29是一种神经保护剂，在神经退行性疾病中可发挥细胞保护作用。大脑皮质中ERP29过表达可减少神经元凋亡，提高运动神经元存活率，而ERP29表达水平下调则会增加神经元死亡。但是，也有研究[21]发现，ERP29作为PKA/SP1/ERP29信号通路上的关键蛋白，表达增加可促进线粒体相关内质网膜形成，并促进海马中小胶质细胞极化为M1型，介导神经炎症反应发生。ILF3是一种双链RNA结合蛋白，可与其他蛋白质、双链RNA、小非编码RNA和mRNA复合，以调节基因表达并稳定mRNA。研究[22]表明，ILF3可通过加速p105 mRNA的衰变增加核因子κB（Nuclear Factor kappa-B，NF-κB）活性，导致巨噬细胞炎症放大，而NF-κB信号通路在SAE的发生发展中发挥重要作用，参与免疫反应、炎症反应、细胞生长与死亡等多个病理过程。相反，ILF3过表达在脓毒症神经炎症反应中发挥抑制作用，提示ILF3可能作为SAE治疗的新靶点[23]。上述研究表明，ERP29和ILF3在中枢神经系统中存在双重作用。本研究发现，SAE患者血浆中ERP29表达水平下调，而ILF3表达水平上调，提示ERP29和ILF3在SAE的发生和发展中可能发挥了重要作用，但具体作用机制尚需进一步研究。

总之，ERP29和ILF3参与了SAE的发生发展，有望成为SAE发病机制研究的重要靶点蛋白。同时，联合血浆EPR29和ILF3浓度水平检测，可助力实现SAE早期诊断。

参考文献

[1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801.

[2] XIE J, WANG H, KANG Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: A national cross-sectional survey [J]. Critical Care Medicine, 2020, 48(3): e209-e218.

[3] ANDONEGUI G, ZELINSKI E L, SCHUBERT C L, et al. Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment[J]. JCI Insight, 2018, 3(9) : e99364.

[4] ITO H, HOSOMI S, KOYAMA Y, et al. Sepsis-associated encephalopathy: A mini-review of inflammation in the brain and body[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2022, 14: 912866.

[5] PIVA S, BERTONI M, GITTI N, et al. Neurological complications of sepsis[J]. Current Opinion in Critical Care, 2023, 29(2): 75-84.

[6] ROBBA C, CRIPPA I A, TACCONE F S. Septic encephalopathy[J]. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2018, 18(12): 82.

[7] CALSAVARA A J C, NOBRE V, BARICHELLO T, et al. Post-sepsis cognitive impairment and associated risk factors: A systematic review[J]. Australian Critical Care, 2018, 31(4): 242-253.

[8] BARICHELLO T, SAYANA P, GIRIDHARAN V V, et al. Long-term cognitive outcomes after sepsis: A translational systematic review[J]. Molecular Neurobiology, 2019, 56(1): 186-251.

[9] CHUNG H Y, WICKEL J, BRUNKHORST F M, et al. Sepsis-associated encephalopathy: From delirium to dementia?[J]. Journal of Clinical Medicine, 2020, 9(3): 703.

[10] CATARINA A V, BRANCHINI G, BETTONI L, et al.

Sepsis-associated encephalopathy: From pathophysiology to progress in experimental studies[J]. Molecular Neurobiology, 2021, 58(6): 2770-2779.

[11] GU J, XIE S, LI X, et al. Identification of plasma proteomic signatures associated with the progression of cardia gastric cancer and precancerous lesions[J]. Journal of the National Cancer Center, 2023, 3(4): 286-294.

[12] WANG Y, CHEN L, YAO C, et al. Early plasma proteomic biomarkers and prediction model of acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass, a prospective nested cohort study[J]. International Journal of Surgery, 2023, 109(9): 2561-2573.

[13] JAIN K K. Role of proteomics in the development of personalized medicine[J]. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 2016, 102: 41-52.

[14] 海云翔, 宋敏, 杨秀娟, 等. 基于DIA蛋白质组学技术联合PRM验证探讨去卵巢骨质疏松大鼠差异蛋白表达[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(11): 87-93.

[15] MA J, LIU M, WANG Y, et al. Quantitative proteomics analysis of young and elderly skin with DIA mass spectrometry reveals new skin aging-related proteins[J]. Aging, 2020,12(13):13529-13554.

[16] GANDAGLIA G, PLOUSSARD G, VALERIO M, et al. A novel nomogram to identify candidates for extended pelvic lymph node dissection among patients with clinically localized prostate cancer diagnosed with magnetic resonance imaging-targeted and systematic biopsies[J]. European Urology, 2019, 75(3): 506-514.

[17] LIU Q, JIANG P, JIANG Y, et al. Development and validation of an institutional nomogram for aiding aneurysm rupture risk stratification[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 13826.

[18] TEVIS S E, WEBER S M, KENT K C, et al. Nomogram to predict postoperative readmission in patients who undergo general surgery[J]. Jama Surgery, 2015, 150(6): 505-510.

[19] WANG X, WEN X, YUAN S, et al. Gut-brain axis in the pathogenesis of sepsis-associated encephalopathy[J]. Neurobiology of Disease, 2024, 195: 106499.

[20] MCLAUGHLIN T, FALKOWSKI M, WANG J J, et al. Molecular chaperone ERp29: A potential target for cellular protection in retinal and neurodegenerative diseases[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2018, 1074: 421-427.

[21] HUI Y, XU Z, LI J, et al. Nonenzymatic function of DPP4 promotes diabetes-associated cognitive dysfunction through IGF-2R/PKA/SP1/ERp29/IP3R2 pathway-mediated impairment of Treg function and M1 microglia polarization[J]. Metabolism, 2023, 138: 155340.

[22] WANG Z Y, CHENG J, WANG Y, et al. Macrophage ILF3 promotes abdominal aortic aneurysm by inducing inflammatory imbalance in male mice[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 7249.

[23] YAO Y, XU K, SUN Y, et al. MiR-215-5p inhibits the inflammation injury in septic H9c2 by regulating ILF3 and LRRFIP1[J]. International Immunopharmacology, 2020, 78: 106000.

（上接第21页）

[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(11): 2184-2200.

[87] ZHANG Z, CHEN Z, LIU R, et al. Bcl-2 proteins regulate mitophagy in lipopolysaccharide-induced acute lung injury via PINK1/Parkin signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 6579696.

[88] ZHANG K, WANG Y, CHEN S, et al. TREM2hi resident macrophages protect the septic heart by maintaining cardiomyocyte homeostasis[J]. Nat Metab, 2023, 5(1): 129-146.

[89] ARREDONDO M, MARTÍNEZ R, NÚÑEZ M T, et al. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc[J]. Biol Res, 2006, 39(1): 95-102.

[90] TARDITO S, BASSANETTI I, BIGNARDI C, et al. Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(16): 6235-6242.9696.

[91] SARRAF S A, SHAH H V, KANFER G, et al. Loss of TAX1BP1-directed autophagy results in protein aggregate accumulation in the brain[J]. Mol Cell, 2020, 80(5): 779-795. e10.

[92] FRIEDMANN ANGELI J P, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(12): 1180-1191.

[93] MAO C, LIU X, ZHANG Y, et al. DHODH-mediated ferroptosis defense is a targetable vulnerability in cancer [J]. Nature, 2021, 593(7860): 586-590.

[94] XIE Y, LI J, KANG R, et al. Interplay between lipid metabolism and autophagy[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 431.

[95] FERECATU I, CANAL F, FABBRI L, et al. Dysfunction in the mitochondrial Fe-S assembly machinery leads to formation of the chemoresistant truncated VDAC1 isoform without HIF-1α activation[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194782.

[96] BHARAT V, DURAIRAJ A S, VANHAUWAERT R, et al. A mitochondrial inside-out iron-calcium signal reveals drug targets for Parkinson's disease[J]. Cell Rep, 2023, 42 (12): 113544.