

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.010

盲肠结扎穿孔术致脓毒症的代谢网络基础研究*

周凤高¹,徐 冕²,颜悦新³,刘桢名¹,许 成¹,蒋国云¹,赵 琨¹,武 或¹,刘 荣^{1△}

(1.昆明医科大学第一附属医院 EICU,昆明 650032;2.云南省阜外心血管病医院 SICU,昆明 650032;
3.南方医科大学深圳宝安医院 ICU,广东深圳 518100)

[摘要] **目的** 探讨脓毒症的特征性代谢标志物及代谢网络的动态变化规律。**方法** 采用盲肠结扎穿孔 (CLP)方法制作大鼠脓毒症模型,分为 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组,每组 10 只,并分别对应术前(0 h),CLP 模型建立后 6、12、24、48 h 采集大鼠股动脉血 2 mL,离心收集血清;再利用代谢组学分析方法从血清中筛选出具有统计学和生物学意义的代谢物,并以 KEGG 数据库为基础对筛选出来的代谢物进行代谢通路分析。**结果** (1)各组之间负、正离子模式均出现差异离子,与术前(即无脓毒症)对比,脓毒症 24 h(即 D 组)差异离子数最多;(2)根据负离子模式确定了 75 条代谢通路,根据 pos 离子模式确定了 158 条代谢通路,代谢通路主要包括碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂类、类固醇类、嘌呤、胆汁酸等各种代谢。**结论** 脓毒症 24 h 代谢组学差异性最明显,有多条碳水化合物、蛋白质、氨基酸等代谢通路参与。

[关键词] 脓毒症;盲肠结扎穿孔;代谢组学;液相色谱-质谱
[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)05-0765-05

Basic study on metabolic network of sepsis caused by cecal ligation and puncture*

ZHOU Fenggao¹,XU Mian²,YAN Yuexin³,LIU Yaming¹,XU Cheng¹,
JIANG Guoyun¹,ZHAO Kun¹,WU Yu¹, LIU Rong^{1△}

(1. Emergency Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Surgical Intensive Care Unit, Fuwai Cardiovascular Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Intensive Care Unit, Affiliated Shenzhen Baoan Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100, China)

[Abstract] **Objective** To explore the characteristic metabolic markers of sepsis and the dynamic change rule of metabolic network. **Methods** The rat sepsis models were prepared by using the cecal ligation and puncture (CLP), which were divided into the group A, B, C, D and E, 10 rats in each group, 2mL femoral arterial blood was collected before operation (0 h), at 6, 12, 24, 48 h after the CLP model construction respectively, and centrifuged for collecting serum; then the metabolomics analysis method was utilized to screen out metabolites with statistical and biological significance from the serum and its metabolic pathway analysis on the screened metabolites was performed based on the KEGG database. **Results** (1) The negative and positive ion modes among the groups all showed the different ions, and the number of different ions at 24 h in sepsis (group D) was maximal compared with preoperation (non- sepsis). (2) According to the negative ion mode, 75 metabolic pathways were determined, and 158 metabolic pathways were determined according to the positive ion mode. The metabolic pathways mainly included various metabolisms such as carbohydrates, protein, amino acids, lipids, cholesterol, purine and bile acid. **Conclusion** The difference of sepsis 24 h metabolomics is most distinct with many metabolic pathways participation such as carbohydrates, proteins, amino acid.

[Key words] sepsis; cecal ligation and puncture; metabolomics; liquid chromatography - mass spectrometry

脓毒症是由严重创伤、烧伤、休克、大手术后、感染等因素引起的全身炎性反应,被定义为威胁生命的严重宿主炎性反应,严重时可导致多器官功能障碍,也是导致重症患者死亡的主要原因之一^[1]。目前临床上仍未发现一种或者几种特异性的生物标记物用于脓毒症早期诊断,而诊断及治疗越晚的患者病死率

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(2015FB022)。 作者简介:周凤高(1989—),在读硕士,主要从事急危重症临床工作。 △ 通信作者,E-mail:2665834124@qq.com。

越高,相反,尽早的诊断并及时干预可以明显提高患者的治愈率^[2]。因此,寻找脓毒症的特异性标记物以帮助早期诊断至关重要。代谢组学由 OLIVER 等^[3]在 1998 年最先提出,并于 1999 年由 NICHOLSON 等^[4]命名为“代谢组学”,该学科是对生物体因受外界刺激所产生的代谢产物进行分析,并试图阐述其代谢规律^[5-6]。在最近的研究中,IZQUIERDO-GARCIA 等^[7]用定量核磁共振(NMR)代谢组学发现脓毒症大鼠的肺组织、肺泡液中的代谢产物发生了显著变化,并认为代谢组学分析方法是诊断脓毒症的潜在有用技术。而脓毒症患者的全身炎症反应失控是炎症因子和炎症因子构成的网络综合结果所致^[8]。因此本研究通过代谢组学的方法,试图寻找脓毒症的特异性标志物及其代谢网络的变化规律。

1 材料与方法

1.1 动物及实验材料 雄性 SD 大鼠 50 只,6~8 周龄,体质量 250~300 g,由昆明医科大学动物实验中心提供。氯化钠注射液(0.9%),水合氯醛(10%),碘伏消毒液,无菌剪刀、手术刀、镊子、纱布,21G 针头,无菌 5-0 丝线和圆针。

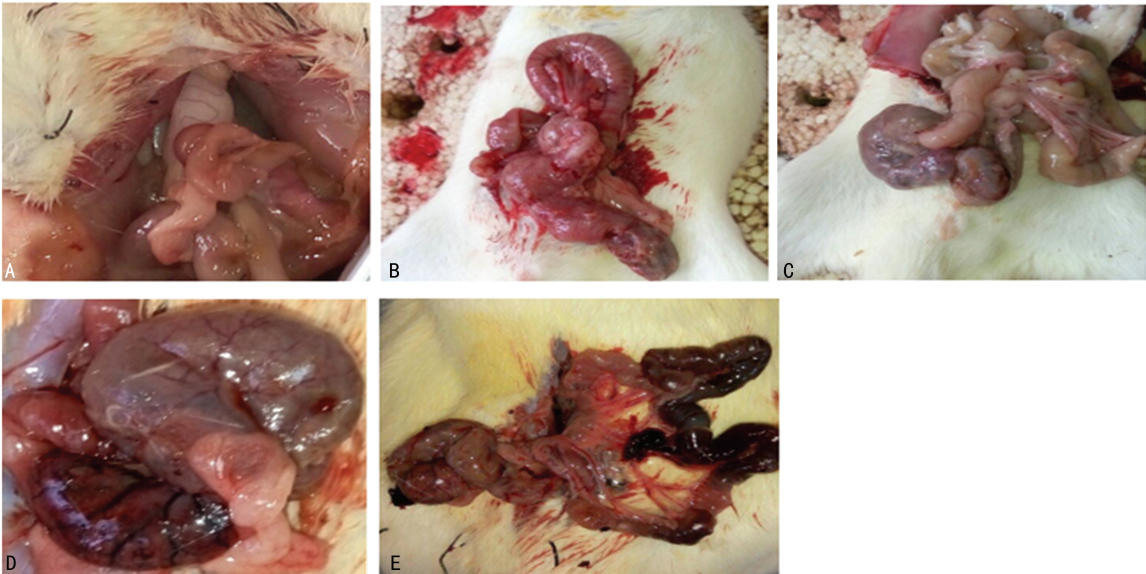
1.2 仪器 高速低温离心机(法国 Oouan 公司),超低温保温箱(中国 Forma Scientific 公司),液相色谱 277C UPLC System(美国 Waters 公司),质谱 SYN-APT G2 XS QTOF(美国 Waters 公司)等。

1.3 脓毒症模型 SD 大鼠术前 1 d 禁食,可饮水,大鼠分组做好标记。根据大鼠标记,依次行盲肠结扎穿孔(CLP);首先腹腔注射水合氯醛(10%),注射剂量约为 0.4 mg/kg(根据大鼠麻醉效果可适当增减),麻醉成功后,将大鼠固定于夹板上,腹部备皮,消毒;用

手术刀逐层切开腹部,切口为腹部中下部位,长约 1.5 cm;用无菌镊逐层分开并固定皮肤、肌肉,用湿纱布分开并保护腹腔肠管,寻找到盲肠并置于湿纱布上。用镊子钝性分离盲肠肠系膜末端 1 cm 处,用 5-0 丝线结扎分离部位,结扎盲肠远端长度均为 1 cm,约为盲肠的 1/2,并用 21G 针头穿刺肠壁 2 次,针孔间距约 3 mm,挤出适量肠内容物,然后将盲肠按原位放回腹腔,并逐层缝合腹壁肌肉、皮肤,关腹后皮下注射氯化钠注射液(3 mL/100 g),补充手术过程中体液的丢失,术后置于相同环境中。根据大鼠标记分为 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组,分别对应术前(0 h),CLP 模型建立后 6、12、24、48 h 采集大鼠股动脉动脉血 2 mL,3 000 r/min 离心 3 min,收集上清液用于大鼠代谢组学的检测,-80 ℃保存备用。采完血后将其脱臼处死,剪开腹部观察其腹腔脏器变化情况。一般情况观察发现:大鼠的麻醉苏醒时间基本相同,为(60±30)min;各组大鼠术后均出现饮食、饮水明显减少,精神萎靡,蜷缩少动,皮发无光泽等。按预设的时间点采血后,剪刀剪开大鼠腹部,观察大鼠的腹部变化情况。可以发现实验时间越长,腹部缺血、感染情况越明显(图 1)。根据大鼠的一般情况变化,以及大鼠腹部情况的变化,可判定大鼠脓毒症模型复制成功。

1.4 代谢组学分析

1.4.1 实验流程 为了获得可靠的数据,本项目加入质控(QC)样本来对整个实验进行监控,QC 样本为取等量制备好的实验样本混合而成。首先用有机试剂沉淀蛋白法分别对 3 组样本进行代谢物提取,其次用液相色谱-质谱检测对代谢物提取液依次进行分析,见图 2。



A:术前;B:CLP 模型建立后 6 h;C:CLP 模型建立后 12 h;D:CLP 模型建立后 24 h;E:CLP 模型建立后 48 h

图 1 不同时间点腹部变化情况

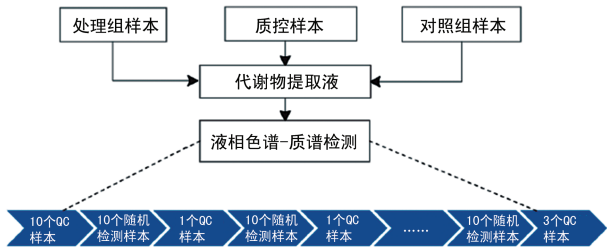


图 2 实验流程

1.4.1.1 代谢物提取方法 取-80℃低温保存的血清样品(含样本制备 QC),先置于-20℃放置 30 min,再放置于 4℃冰箱使之融化,直至样品内看不见冰;用可调节间距的排枪,将每个样品(含 QC)各取 40 μL(可根据实际检测样品的情况调整),加入相应 96 孔板中,剩余样品冻存;在已加入 40 μL 样品(含 QC)的新 EP 管中加入甲醇 120 μL,封膜后振荡 1 min,置于-20℃冰箱 30 min;4 000 r/min 4℃离心 20 min;将 96 孔板从离心机中取出,每个孔取 20 μL 置于新的 96 孔板中,加入 180 μL 50%甲醇进行稀释,每个孔取出 20 μL 置于样品槽中混合为上机 QC 样本,每个孔取 80 μL 置于新的 96 孔板中;用热封仪对 96 孔板加盖铝膜封口,在膜上用笔注明项目编号及正负离子,板编号,有蛋白沉淀的板同时封膜后置于-80℃保存。

1.4.1.2 液相参数描述 采用液相色谱 277C UPLC System (100 mm×2.1 mm,1.7 μm, Waters, USA)进行色谱分离,色谱柱柱温为 50℃,流速为 0.4 mL/min,其中 A 流动相为水和 0.1%甲酸,B 流动相为甲醇和 0.1%甲酸。对代谢物采用以下梯度进行洗脱:0~2 min,100%流动相 A;2~11 min,0~100%流动相 B;11~13 min,100%流动相 B;13~15 min 则为 100%流动相 A。每个样本的上样体积为 10 μL。

1.4.1.3 质谱参数描述 对从色谱柱上洗脱下来的小分子,利用高分辨串联质谱 SYNAPT G2-XS QTOF (美国 Waters 公司),分别进行正负离子模式采集。正离子模式下,毛细管电压和锥孔电压分别为 2 kV 和 40 V。负离子模式下,毛细管电压及锥孔电压分别为 2 kV 和 40 V。采用 MSE 模式进行 Centroid 数据采集,一级扫描为 50~1 200 Da,扫描时间为 0.2 s,对所有母离子按照 20~40 eV 的能量进行碎裂,采集所有的碎片信息,扫描时间为 0.2 s。在数据采集过程中,对 LE 信号每 3 s 进行实时质量校正。同时,每隔 10 个样本进行一次混合后 QC 样本的采集,用于评估在样本采集过程中仪器状态的稳定性。

1.4.2 信息分析流程

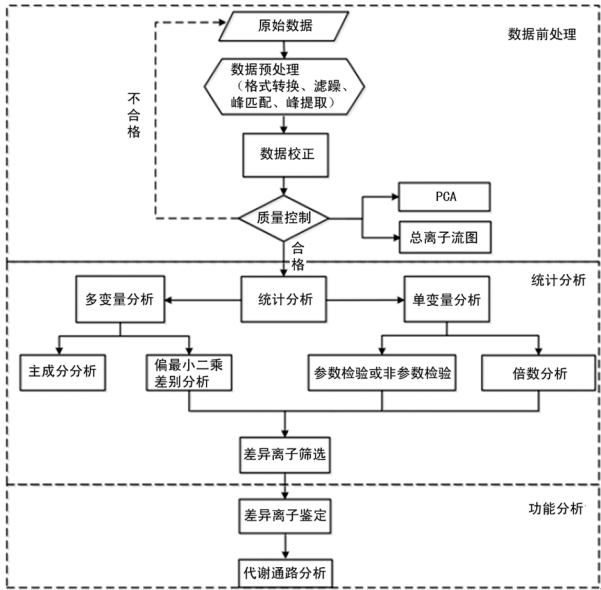


图 3 信息分析流程

在获得下机数据(原始数据 rawdata)后,依次根据信息分析流程步骤对下机数据进行处理。首先对质谱下的机原始数据进行数据前处理;其次用统计方法筛选出差异离子;最后对代谢物及差异代谢物进行鉴定,并分析其代谢通路。质谱下机原始数据导入商业软件 Progenesis Q1 (version 2.2) 进行峰提取,获得代谢物相关的质荷比、保留时间和离子面积等信息。随后对提取出来的数据去低质量离子,采用基于质控样本信息对真实样本信号进行局部多项式回归拟合信号^[9]方法校正。对校正后的数据进行过滤,即将所有 QC 样品中相对标准偏差(RSD)>30%的离子过滤掉(RSD>30%的离子在实验过程中波动较大,不纳入下游统计学分析)。

1.5 统计学处理 由于代谢组学数据具有“高维、海量”的特点,因此需要用单维和多维的方法根据数据特性从不同角度进行分析。本研究采用华大代谢组学研究团队自主开发的代谢组学数据分析流程,进行单变量和多变量分析,从而获得组间差异代谢物;其方法包括参数检验和非参数检验、差异表达倍数分析、主成分分析 PCA、偏最小二乘法判别分析 PLS-DA^[10-11]等。

2 结 果

2.1 差异离子筛选及鉴定 根据信息分析流程,该项目采用多变量分析 PLS-DA 模型第二主成分的 VIP 值,结合单变量分析差异倍数(fold-change)和 q-value 值来筛选差异表达的代谢物。筛选条件:(1) VIP≥1;(2) fold change≥1.2(≤0.833 3);(3) q<0.05。三者取交集,得到共有的离子即差异离子。差异离子结果发现,各组与对照组之间正(pos)、负(neg)离子模式均出现差异离子,且在 24 h 即 D~A

表 1 差异离子鉴定表

离子模式	各组比较	差异离子	上调(一级鉴定数)	下调(一级鉴定数)	上调(二级鉴定数)	下调(二级鉴定数)
pos	C-A 组	278	37	72	24	41
pos	D-A 组	388	63	88	29	50
pos	E-A 组	151	17	64	9	41
pos	E-B 组	297	52	46	42	25
pos	D-C 组	3	1	0	0	0
pos	C-B 组	6	2	3	1	2
pos	D-B 组	136	24	29	14	12
pos	E-D 组	204	46	21	31	8
neg	B-A 组	119	2	24	1	4
neg	C-A 组	110	7	21	5	4
neg	D-A 组	149	15	24	6	6
neg	E-A 组	104	8	29	3	3
neg	E-B 组	127	16	12	7	1
neg	D-C 组	2	0	0	0	0
neg	C-B 组	4	0	1	0	0
neg	D-B 组	37	7	6	2	2
neg	E-D 组	5	1	0	0	0

一级鉴定数:通过一级数据搜索数据库后被鉴定的离子数目;二级鉴定数:通过数据库的理论二级碎片搜索后被鉴定的数目

组间差异离子数最多,此结果发现脓毒症模型下动物体内早期 6 h 即 B~A 组(甚至更早)就开始出现代谢物的变化,而且在 24 h 即 D~A 组左右出现最大变化,见表 1。

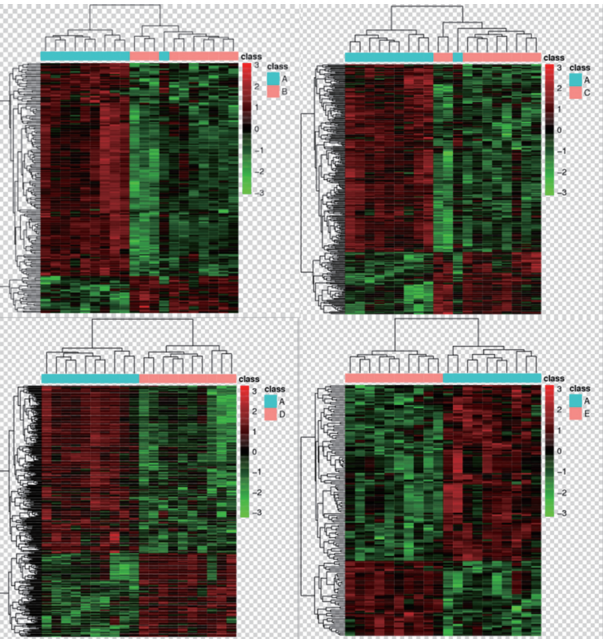


图 4 差异离子聚类分析图

2.3 差异代谢物通路分析 根据筛选出的差异离子,基于 KEGG 数据库进行代谢物代谢通路查找,通过代谢通路分析能够帮助了解代谢物所参与的主要生化代谢途径和信号转导通路。最终根据 neg 离子模式确定了 75 条代谢通路,根据 pos 离子模式确定

了 158 条代谢通路,其通路主要包含了碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂类、类固醇类、嘌呤、胆汁酸等代谢通路,且各通路之间相互联系。

2.2 根据筛选出来的差异离子做聚类分析 从聚类图中能更直观地发现 6 h 即 B~A 组就开始出现差异(甚至更早),到 24 h 即 D~A 组对比差异最明显,强度最大,见图 4。图中每一行代表一个差异离子,每一列代表一个样本,不同颜色代表不同强度,颜色从绿色到红色表示强调从低到高。

3 讨 论

众所周知,全身炎症反应综合征、脓毒症、脓毒性休克和多器官功能障碍综合征是同一病理过程的不同阶段,终末阶段表现为多器官功能障碍综合征。多器官功能障碍综合征病死率为 50%~60%,它是当今危重症医学研究的重点和难点,早期诊断、治疗,患者的生存率会大大提高^[12-13]。脓毒症动物模型的制作方法众多,但越来越多的学者认为 CLP 建型更符合临床,有学者把 CLP 作为脓毒症模型的金标准等^[14]。

代谢组学主要是通过高通量的实验和大规模的计算,研究分析机体内小分子代谢物的变化规律,目的是从检测到的大量代谢物中筛选出具有统计学和生物学意义的代谢物,并根据相应的数据库对代谢物的代谢过程进行分析。

脓毒症发病机制复杂、病死率高,学者们一直在尝试寻找诊断脓毒症的特异性标记物,以期早期诊断、治疗,降低其病死率。早期的研究发现:检测脓毒

症患者血浆中异常表达的蛋白,可用于脓毒症的诊断及预后的预测^[15]。而有研究则利用代谢组学分析方法发现脓毒症大鼠的心脏、肝脏及大脑中均有多种异常蛋白的表达^[16-18];IZQUIERDO-GARCIA 等^[7]同样利用代谢组学方法发现脓毒症大鼠的肺组织、肺泡液中的代谢产物发生了显著变化,并认为代谢组学分析方法可用于诊断脓毒症;近年来,XU 等^[19]利用代谢组学方法确定了 6 种脂肪酸用于评估脓毒症的预后。然而,由于脓毒症发生机制复杂,参与代谢的代谢物及代谢途径也非常复杂,因此脓毒症不可能只用 1 个或 2 个生物标志物可以诊断的。所以,笔者尝试一种基于整体代谢谱的预测方法来识别脓毒症早期特异性代谢物,并阐明其在脓毒症中的病理生理过程及代谢途径。

本研究中发现不同时间组之间 neg、pos 离子模式均出现差异离子,在 CLP 模型建立后 6 h 即 B-A 组(甚至更早)就开始出现明显差异,且在 24 h 即 D-A 组差异离子数最多。脓毒症时机体发生一系列复杂的病理生理反应,主要包括内皮细胞损伤、细胞因子及炎症因子释放、线粒体功能障碍、脂质过氧化、DNA 的损伤、自由基失衡、氧化抗氧化失衡等^[20]。当机体受到各种病理或生理刺激时机体处于应激状态,机体主要表现为“高代谢”,因此分泌大量应激激素,如儿茶酚胺、胰高血糖素、甲状腺素等,此时机体能量需求明显增加,促使大量能源物质消耗、肌肉蛋白分解,故能量代谢出现紊乱;脓毒症时机体逐渐出现缺血缺氧^[21],线粒体氧化功能出现障碍,机体“氧债”增加,乳酸、酮体产生增加;当出现脓毒症时机体全身炎症反应、血液中炎症介质及激素水平等升高,从而导致胰岛素抵抗,进一步引起碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂肪酸和核酸等代谢物变化的紊乱^[22-24]。因此脓毒症时机体可出现一系列差异性代谢物。本研究中发现 neg 离子模式差异离子共 4 324 个,pos 离子模式共 4 053 个,并通过 KEGG 数据库,其根据 neg 离子模式确定了 75 条代谢通路,根据 pos 离子模式确定了 158 条代谢通路,其代谢通路主要包括碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂类、类固醇类、嘌呤、胆汁酸等,说明脓毒症是一个极其复杂的病理生理反应,涵盖了机体各个系统的生理反应,并相互影响。

本研究尚有以下方面需进一步探讨:(1)仍需较大样本量进一步验证其共同代谢物及其代谢通路;(2)可进一步研究分析各个时间段代谢物及其代谢通路,并分析其病理生理过程;(3)因脓毒症病理生理极其复杂,因此脓毒症发生时的代谢物及其代谢通路众多,如需找到特异性标记物,还需要大量的研究对比分析。

总之,代谢组学对脓毒症的研究分析及诊断有重

要意义。本研究利用代谢组学方法研究了脓毒症的不同阶段,发现的一些潜在的分子代谢产物及其相关的代谢途径可能成为今后脓毒症代谢途径研究的重要线索。

参考文献

- [1] SKRUPKY L P, KERBY P W, HOTCHKISS R S. Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects[J]. *Anesthesiology*, 2011, 115 (6): 1349-1362.
- [2] SAMRAJ R S, ZINGARELLI B, WONG H R. Role of biomarkers in sepsis care[J]. *Shock*, 2013, 40(3): 358-365.
- [3] OLIVER S G, WINSON M K, KELL D B, et al. Systematic functional analysis of the yeast genome[J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(9): 373-378.
- [4] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [5] 周宁, 颜贤忠. 代谢性疾病的代谢组学研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2015, 42(5): 561-567.
- [6] OTT K H, ARAMBAR N, SINGH B, et al. Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 971-985.
- [7] IZQUIERDO-GARCIA J L, NIN N, RUIZ-CABELLO J, et al. A metabolomic approach for diagnosis of experimental sepsis[J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(12): 2023-2032.
- [8] 王建东. 小鼠盲肠结扎穿孔模型血浆蛋白质组变化的初步研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2005.
- [9] DUNN W B, BROADHURST D, BEGLEY P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6 (7): 1060-1083.
- [10] BARKER M, RAYENS W. Partial least squares for discrimination[J]. *J Chemometr*, 2003, 17(3): 166-173.
- [11] WESTERHUIS J A, HOEFSLOOT H C J, SMIT S, et al. Assessment of PLS-DA cross validation[J]. *Metabolomics*, 2008, 4(1): 81-89.
- [12] NATANSON C, DANNERR L. Early goal-directed therapy reduced mortality and multiorgan dysfunction in severe sepsis or septic shock[J]. *ACP J Club*, 2002, 136(1): 90.
- [13] RIVERS E, NGUYEN B, HAVSTAD S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(6): 1368-1377.
- [14] DEJAGER L, PINHEIRO I, DEJONCKHEERE E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard(下转第 774 页)

40(5):482-485,490.

- [9] YANG S B, HU S Y, LI B G, et al. Localization of nerve entry point and intramuscular nerve-dense regions as targets to block brachioradialis muscle spasticity[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(8):11912-11920.
- [10] 杨方玖, 薛黔, 刘茂生. 背阔肌的神经解剖及其临床意义[J]. *解剖与临床*, 2006, 11(4):226-228.
- [11] WONG M T, LIM A Y, CONINCK C D, et al. Functional units within the latissimus dorsi muscle based on Sihler technique[J]. *Ann Plast Surg*, 2007, 59(2):152-155.
- [12] 杨方玖, 薛黔. 人背阔肌肌内神经分布和肌构筑特征及其临床意义[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2005, 23(5):501-503, 506.
- [13] YANG S B, HU S J, TIAN X F, et al. A novel method for localizing nerve entry points during spasticity treatment[J]. *Int J Morphol*, 2017, 35(3):799-803.
- [14] SERUYA M, JOHNSON J D. Surgical treatment of pediatric upper limb spasticity: the shoulder[J]. *Semin Plast Surg*, 2016, 30(1):45-50.
- [15] NAMDARI S, ALOSH H, BALDWIN K, et al. Outcomes of tendon fractional lengthenings to improve shoulder function in patients with spastic hemiparesis[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2012, 21(5):691-698.
- [16] 毛雅君, 励建安. 神经阻滞定位方法和临床应用[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33(10):795-798.
- [17] FRANZ A, KLAAS J, SCHUMANN M, et al. Anatomical versus functional motor points of selected upper body muscles[J]. *Muscle Nerve*, 2018, 57(3):460-465.
- [18] SNOBL D, BINAGHI L E, ZENKER W. Microarchitecture and innervation of the human latissimus dorsi muscle[J]. *J Reconstr Microsurg*, 1998, 14(3):171-177.
- [19] CHANG MA. Possible Adverse Effects of Repeated Botulinum Toxin A Injections to Decrease Post-Stroke Spasticity in Adults Undergoing Rehabilitation: A Review of the Literature[J]. *Allied Health*, 2015, 44(3):140-144.
- [20] LORENCE Z P, KENKEL J M, FAGIEN S, et al. A review of onabotulinumtoxinA (Botox)[J]. *Aesthet Surg*, 2013, 33(1 Suppl):9-12.
- [21] BORODIC G E, FERRANTE R, PEARCE L B, et al. Histologic assessment of dose-related diffusion and muscle fiber response after therapeutic botulinum A toxin injections[J]. *Mov Disord*, 1994, 9(1):31-39.
- [22] 中国康复医学会. 肉毒毒素治疗成人肢体肌痉挛中国指南[J]. *中国康复医学杂志*, 2015, 30(1):11-81.

(收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-11-14)

(上接第 769 页)

model for polymicrobial sepsis? [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19(4):198-208.

- [15] SIMON L, GAUVIN F, AMRE D K, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(2):206-217.
- [16] HINKELBEIN J, FELDMANN R E, SCHUBERT C, et al. Alterations in rat serum proteome and metabolome as putative disease markers in sepsis[J]. *J Trauma Injury Infect Crit Care*, 2009, 66(4):1065-1075.
- [17] HINKELBEIN J, KALENKA A, SCHUBERT C, et al. Proteome and metabolome alterations in heart and liver indicate compromised energy production during sepsis. [J]. *Protein Peptide Letters*, 2010, 17(1):18.
- [18] HINKELBEIN J, Feldmann R, PETERKA A, et al. Alterations in cerebral metabolomics and proteomic expression during sepsis[J]. *Current Neurovascul Res*, 2007, 4(4):280-288.
- [19] XU P B, LIN Z Y, MENG H B, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis[J]. *Nmr in Biomedicine*, 2008, 22(6):601-608.
- [20] ANDRADES M, RITTER C, OLIVEIRA M R D, et al. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress [J]. *J Surg Res*, 2009, 167(2):e307-313.
- [21] KAZDA A. Meeting the energy requirements in sepsis [J]. *Czech Med*, 1988, 11(1):1-9.
- [22] UBHI B K, CHENG K K, DONG J, et al. Targeted metabolomics identifies perturbations in amino acid metabolism that sub-classify patients with COPD[J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(12):3125-3133.
- [23] SHAH S H, SUN J L, STEVENS R D, et al. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease[J]. *Am Heart J*, 2012, 163(6):844-850.
- [24] CARRARO S, GIORDANO G, RENIERO F, et al. Asthma severity in childhood and metabolomic profiling of breath condensate[J]. *Allergy*, 2013, 68(1):110-117.

(收稿日期:2018-09-28 修回日期:2018-11-16)