

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: RUNX3 启动子区甲基化对脓毒症患者 28 天预后的预测价值  
作者: 应流念, 刘磊, 张颖, 殷永强, 钟毅  
网络首发日期: 2025-08-27  
引用格式: 应流念, 刘磊, 张颖, 殷永强, 钟毅. RUNX3 启动子区甲基化对脓毒症患者 28 天预后的预测价值[J/OL]. 安徽医科大学学报.  
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250827.1612.015>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## RUNX3 启动子区甲基化对脓毒症患者 28 天预后的预测价值

应流念<sup>1</sup>，刘磊<sup>1,2</sup>，张颖<sup>1,2</sup>，殷永强<sup>1</sup>，钟毅<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>贵州医科大学麻醉学院，贵阳 550004；<sup>2</sup>贵州医科大学附属医院麻醉科，贵阳 550004)

**摘要 目的** 研究脓毒症患者中 RUNX 家族转录因子 3 (RUNX3) 启动子甲基化状态及其 mRNA 表达，分析其与脓毒症的预后关系。**方法** 从基因表达综合数据库 (GEO) 中多个数据集鉴定出脓毒症差异表达基因 RUNX3，并验证基因表达和甲基化位点。纳入 120 例脓毒症患者，入组时记录临床资料并收集血液样本。采用 qPCR 和甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 检测脓毒症患者血液中 RUNX3 相对表达量及启动子甲基化状态；采用 Pearson 相关系数对患者血液中 RUNX3 水平与临床指标进行相关性分析，Kaplan-Meier 法绘制生存曲线，Cox 比例风险回归分析影响脓毒症患者预后的因素。**结果** 从数据集分析得到 RUNX3 是脓毒症预后相关的差异甲基化基因。RUNX3 mRNA 的表达水平在脓毒症死亡组较存活组低 ( $P < 0.05$ )，死亡组 RUNX3 甲基化比例高于存活组 ( $P < 0.05$ )；脓毒症组 RUNX3 mRNA 表达水平与白细胞介素 (IL)-6、降钙素原 (PCT)、C-反应蛋白 (CRP)、急性生理学及慢性健康状况评分 II (APACHE II) 评分、序贯器官衰竭 (SOFA) 评分呈负相关；Kaplan-Meier 法分析脓毒症甲基化组 28 d 存活率低于非甲基化组 ( $P < 0.05$ )；Cox 回归分析结果显示 RUNX3 启动子区甲基化是预测脓毒症患者 28 d 预后的独立危险因素。**结论** 脓毒症患者中 RUNX3 mRNA 水平降低且启动子区甲基化程度较高，RUNX3 启动子区甲基化是脓毒症患者 28 d 预后的独立危险因素，可作为脓毒症预后生物标志物。

**关键词** 脓毒症；RUNX 家族转录因子 3；甲基化；炎症反应；生物标志物

中图分类号 R 446.11

文献标志码 A

### Predictive value of methylation of RUNX3 promoter region in 28-day prognosis of patients with sepsis

Ying Liunian<sup>1</sup>, Liu Lei<sup>1,2</sup>, Zhang Ying<sup>1, 2</sup>, Yin Yongqiang<sup>1</sup>, Zhong Yi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>School of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; <sup>2</sup>Dept of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

**Abstract Objective** To investigate the methylation status of the RUNX family transcription factor 3 (RUNX3) promoter and its mRNA expression in sepsis patients, and to analyze their relationship with the prognosis of sepsis.

基金项目：贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目（编号：黔教合 KY 字[2022]234）

作者简介：应流念，女，副主任医师，硕士研究生；

钟毅，女，主任医师，硕士生导师，通信作者，E-mail: 490173559@qq.com

**Methods** Differentially expressed genes related to sepsis, including RUNX3, were identified from multiple datasets obtained from the gene expression omnibus (GEO) database. The gene expression and methylation sites were validated. A total of 120 patients with sepsis were included. Clinical data were recorded, and blood samples were collected at enrollment. Relative expression levels of RUNX3 in blood samples and promoter methylation status were detected using qPCR and methylation-specific PCR (MSP), respectively. Pearson correlation coefficients were used to analyze the correlation between RUNX3 levels in patient blood and clinical indicators. Kaplan-Meier analysis was performed to plot survival curves, and Cox proportional hazards regression analysis was conducted to identify factors affecting the prognosis of sepsis patients. **Results** Data set analysis revealed that RUNX3 was a differentially methylated gene associated with the prognosis of sepsis. The mRNA expression level of RUNX3 was lower in the non-survivor group compared to the survivor group ( $P < 0.05$ ), and the methylation ratio of RUNX3 was higher in the non-survivor group than in the survivor group ( $P < 0.05$ ). In sepsis patients, RUNX3 mRNA expression levels were negatively correlated with Interleukin-6 (IL-6), Procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) score, and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score. Kaplan-Meier analysis showed that the 28-day survival rate in the methylated group was lower than that in the unmethylated group ( $P < 0.05$ ). Cox regression analysis results indicated that RUNX3 promoter methylation was an independent risk factor for predicting the 28-day prognosis of sepsis patients. **Conclusion** In sepsis patients, the mRNA levels of RUNX3 were reduced, and the degree of promoter methylation was higher. RUNX3 promoter methylation was an independent risk factor for the 28-day prognosis of sepsis patients and could serve as a prognostic biomarker for sepsis.

**Key words** sepsis; RUNX family transcription factor 3; methylation; inflammatory response; biomarker

**Fund program** Youth Science and Technology Talent Training Project of Higher Education Institutions in Guizhou Province (No.Qianjiaohe KY Document [2022] 234)

**Corresponding author** Zhong Yi, E-mail: 490173559@qq.com

脓毒症是由机体对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>,目前,由脓毒症引起的病死率很高,占全球病死率约 20%<sup>[2]</sup>,且脓毒症休克患者预后较差,是重症监测治疗室(intensive care unit, ICU)治疗费用较昂贵的病理生理疾病之一。RUNX 家族转录因子 3(RUNX family transcription factor 3, RUNX3)是一种转录因子,影响器官的发育过程和调节细胞的增殖、分化和凋亡等<sup>[3]</sup>。DNA 甲基化是一种常见的表观遗传学修饰,有研究<sup>[4]</sup>报道在脓毒症的诊断和治疗中某些基因发生甲基化修饰, DNA 甲基化标记有助于区

分脓毒症的早期和晚期发生情况，抑制 DNA 甲基化可通过调节 NF- $\kappa$ B 途径来改善脓毒症的存活率<sup>[5]</sup>。RUNX3 基因的转录调控主要受启动子甲基化的影响，先前的研究<sup>[6]</sup>表明，在肿瘤和自身免疫性疾病中，RUNX3 的表达异常现象较为普遍，而在脓毒症中的研究相对较少。基于此，本研究旨在通过分析脓症患者差异基因表达数据，揭示 RUNX3 在脓毒症中的表达变化，并进一步阐明 RUNX3 启动子甲基化对脓症患者预后的影响，以期对脓毒症的早期诊断、预后评估及治疗靶点的确定提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2023 年 2 月—2024 年 6 月在贵州医科大学附属医院综合 ICU 的脓症患者 120 例。纳入标准：① 所有患者均满足 sepsis-3<sup>[7]</sup> 诊断标准。病原学检查或影像学检查明确感染；炎症指标 PCT、IL-6、CRP 明显增高；对于感染或疑似感染的患者，SOFA 评分较基线上升  $\geq 2$  分。② 年龄  $\geq 18$  岁。③ 首次入住 ICU。④ 获得知情同意。排除标准：① 既往心、脑等重要脏器功能不全或严重原发病者。② 恶性肿瘤、变态反应性疾病、免疫缺陷性疾病、自身免疫性疾病者、再生障碍性贫血病史者。③ 近 6 个月内接受放疗、化疗、激素或免疫抑制剂治疗者。④ 入住 ICU 病房后 24 h 内死亡者。⑤ 处于妊娠期或哺乳期女性。符合纳排标准，对入住 ICU 患者评估诊断为脓毒症后的 24 h 内采集外周血样本，保存于乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝管中，4  $^{\circ}$ C 条件下，560 r/min 离心 20 min，分离得到单核细胞样本后储存于  $-80$   $^{\circ}$ C 冰箱，备用。同时，收集患者的性别、年龄、白细胞 (white blood cell, WBC) 计数、CRP、PCT、IL-6、APACHE II 和 SOFA 评分等临床信息。APACHE II 评分总分为 71 分，分值越高表示疾病越严重；SOFA 评分总分为 24 分，分值越高器官衰竭越严重<sup>[8-9]</sup>。

本研究已获得贵州医科大学附属医院学术伦理委员会批准，且入组前均已向所有参与者或其法定监护人提供书面知情同意书。伦理批件号：2023 伦审第 (673 号)。

## 1.2 方法

**1.2.1 生物信息学分析** 从基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)中获取了脓症患者血液样本数据集 GSE65682、GSE155952、GSE63311、GSE138074，在 GSE65682 数据集中利用 R 语言 limma 包绘制火山图，筛选差异表达基因，筛选条件为  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ ， $P \text{ value} < 0.05$ ；在 GSE155952 数据集中利用 R 包：ChAMP 筛选差异甲基化位点，筛选条件为  $|\Delta\text{beta value}| > 0.2$ ，错误发现率 (false discovery rate, FDR)  $< 0.05$ 。将差异甲基化位点定位到基因上，将这些基因与差异表达基因取交集，且只保留表达趋势相反的甲基化位点及其对应的基因作为甲基化差异表达基因 (mDEGs)。然后基于 GEO 数据库筛选 mDEGs 构建脓毒症风险模型，在建模队列，将 GSE65682 数据集中 468 例包含完整临床信息的脓毒症样本根据 7 : 3 比例分成训练集和测试集。在训练集中基于 mDEGs 进行卡普兰-迈尔 (Kaplan-Meier, KM) 生存曲线分析评估 mDEGs 是否和患者的生存相关；将 KM 分析中  $P < 0.05$  的基因用于单因素 Cox、LASSO 回归分析，以验证这些基因是否为危险因素，并使用 LASSO 回归分析构建风险预测模型。

**1.2.2 qPCR 法检测 mRNA 的表达** 采用 TRIzol 法从脓毒症患者外周血单核细胞中提取得到 RNA，按照说明书反转录合成第一链 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 试剂盒，按说明书进行 RT-qPCR 实验，反应条件为 95℃ 预变性 2 min；95℃ 变性 10 s，60℃ 退火/延伸 30 s，40 个循环。以 GAPDH 为内参，以  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算出各基因的相对表达量。引物序列如下。RUNX3 上游引物：5' -AGCACCACAAGCCACTTCAG-3'，下游引物：5' -GGGAAGGAGGGTCAAAGT-3'；GAPDH 上游引物：5' -GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'，下游引物：5' -GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

**1.2.3 甲基化特异性 PCR 法 (methylating-specific PCR, MSP) 检测 RUNX3 启动子区甲基化表达** 使用 DNA 提取试剂盒提取受试者外周血单核细胞中 DNA，使用 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒将 DNA 样品中非甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶。使用 Methyl Primer Express v1.0 软件设计出甲基化引物和非甲基化引物，引物序列如下。RUNX3 非甲基化引物 (unmethylation Primer, UM)，上游引物序列：5' -GAGTTGTGGTTAGGTTTGGATTAT-3'，下游引物序列：5' -ACCACAACAATATTCCACACCA-3'；RUNX3 甲基化引物 (methylation Primer, M)，上游引物序列：5' -TTGTGGTTAGGTTTCGGATTAC-3'，下游引物序列：5' -CACAACGATATTCCACGCC-3'。将经过 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒处理后的样本按照设计好的引物序列进行甲基化特异性 PCR，扩增条件：95℃ 5 min 预变性，94℃ 20 s、60℃ 30 s、72℃ 20 s 进行 35 个循环，再以 72℃ 5 min 进行延伸，将扩增产物经 160 V 琼脂糖凝胶电泳 25 min 后观察结果。

**1.2.4 随访** 脓毒症患者随访至住院期间死亡或入组后第 28 d。在随访期间对死亡患者进行记录,并计算 28 d 病死率。根据脓毒症组在随访期间的生存情况,将患者分为脓毒症生存组和脓毒症死亡组，此外计算脓毒症组累积 28 d 病死率。

**1.3 统计学处理** 应用 R 软件、SPSS 23.0 和 GradPad Prism 10 软件统计和作图，符合正态分布的计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示，组间比较行  $t$  检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差不齐时使用 Kruskal-Wallis 检验；偏态分布定量数据采用中位数及四分位间距 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示。计数资料以率或构成比描述，组间比较采用  $\chi^2$  检验。采用 Pearson 相关系数检验来分析脓毒症患者 RUNX3 与临床特征的相关性。使用 Kaplan-Meier 法分析累计生存情况,用 Cox 比例风险回归模型分析影响脓毒症的危险因素; $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基因筛选及数据分析

**2.1.1 基于 GEO 数据库筛脓毒症 DNA 甲基化标志物** 在 GSE65682 数据集利用 R 语言 limma 包绘制火山图，共筛选了 1026 个差异表达基因，其中表达上调的基因 456 个，表达下调的基因 570 个；接着在 GSE155952 数据集中，利用 R 包：ChAMP 筛选差异甲基化位点，共筛选到 2124 个差异甲基化位点，其中上调的甲基化位点 243 个，下调的甲基化位点 1881 个。见图 1。

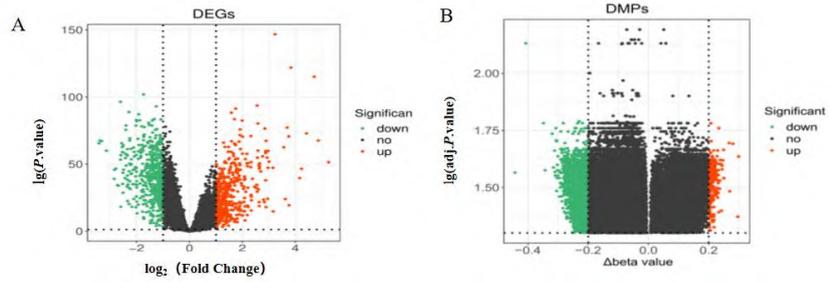


图 1 差异表达基因火山图(A) 和差异甲基化位点火山图 (B)

Fig.1 Volcano map of differentially expressed genes (A) and volcanic map of differential methylation sites (B)

**2.1.2 基于GEO 数据库筛选了 8 个mDEGs 的脓毒症风险模型的构建** 在GSE65682 数据集中, 将468 例包含完整临床信息的疾病样本根据比例 7 : 3 分成训练集和测试集, 在训练集中基于 89 个 mDEGs 进行KM 生存分析, 鉴定了 12 个 KM 显著的基因 (表1)。将这 12 个基因用于单因素Cox、LASSO 回归分析, 以验证这些基因是否是危险因素; 单因素 Cox 回归分析显示除了 PRR5L, 其余 11 个基因的 $P < 0.05$  (图2)。将这 11 个基因作为输入, 在训练集中构建 LASSO 回归模型; 为减少特征维度, 使用 R 软件 glmnet 包, 设置参数 family="cox", 实现LASSO 逻辑回归分析, 选择强相关特征, 如图 3 所示, 左图是基因系数的图形, 右图是交叉验证的误差图, 坐标deviance 表示模型解释的残差的比例, 显示了特征基因数量随解释的残差的比例 (dev) 之间的变化关系, 纵坐标是基因的系数 (左), 横坐标是 log Lambda, 纵坐标代表交叉验证的误差 (右), 在实际分析中, 该实验者希望交叉验证的误差最小的位置; 在右图形中, 左侧虚线位置就是交叉验证误差最小的位置, 根据该位置 (lambda.min) 确定对应的横坐标 log Lambda, 上边显示了特征基因的数目, 找到最优的 log Lambda 值, 就左图中找到对应的基因和系数, 以及该模型解释的残差的比例, 最终挑选 lambda 最小值的模型作为最终模型, 得到 8 个模型基因RUNX3、RASGRP1、 MBOAT2、 IL4R、 SLC7A6、 TRIT1、 BACH2、 CTSG。

表1 mDEGs 的KM 生存分析

Tab. 1 KM survival analysis of mDEGs

Gene	P value
MBOAT2	0.004 6
TRIT1	0.012 1
CTSG	0.012 4
SLC7A6	0.013 3

USP32	0.013 7
RASGRP1	0.020 2
IL4R	0.020 7
PRR5L	0.023 1
RUNX3	0.025 5
BACH2	0.027 5
NSUN3	0.028 0
BCL11B	0.035 5

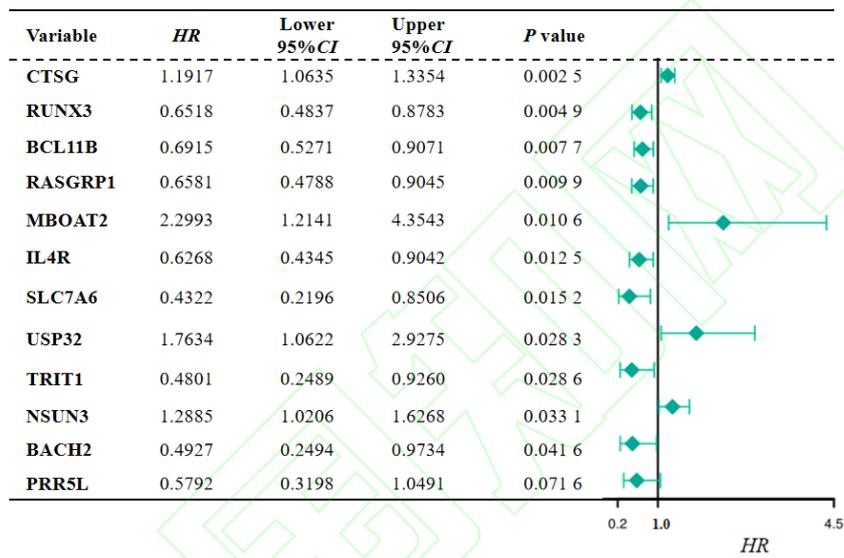


图2 单因素COX 分析图

Fig.2 Single factor COX analysis chart

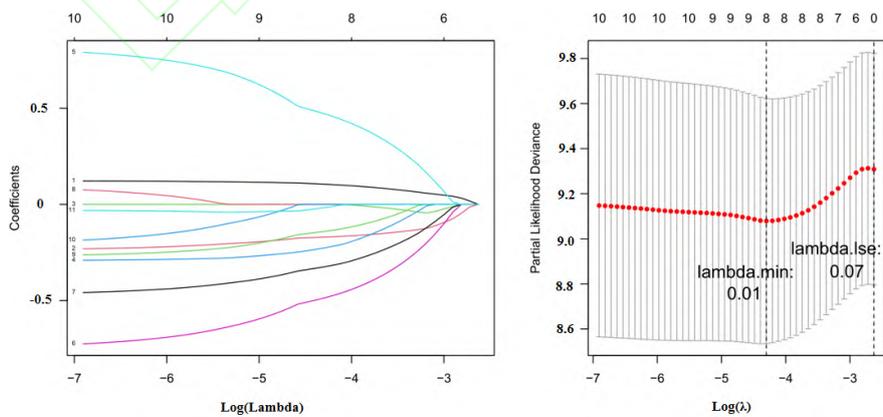


图3 LASSO 构建风险模型图

Fig. 3 Diagram of LASSO construct risk model

**2.1.3 预后 mDEGs 的表达和相关甲基化位点  $\beta$  值的验证** 通过 GSE63311 和 GSE138074 验证了这 8 个基因的表达量和 RUNX3 的甲基化位点 cg13461622。该实验分析了 GSE65682 数据集，比较了健康个体与脓毒症患者血液样本中这些 mDEGs 的相对表达水平，结果显示，在脓毒症状态下，CTSG、MBOAT2 和 IL4R 的表达水平上升，而 RUNX3、RASGRP1、SLC7A6、TRIT1 和 BACH2 的表达水平下降；在 GSE63311 的数据集中，8 个 mDEGs 的表达也得到验证。见图 4A。在 GSE155952 数据集中，该实验识别出 8 个与预后相关的 mDEGs 信号甲基化位点；随后进一步验证了 GSE138074 数据集中这 8 个甲基化位点的  $\beta$  值，并确认了在脓毒症样本中，RUNX3 基因 cg13461622 的  $\beta$  值更高。见图 4B。

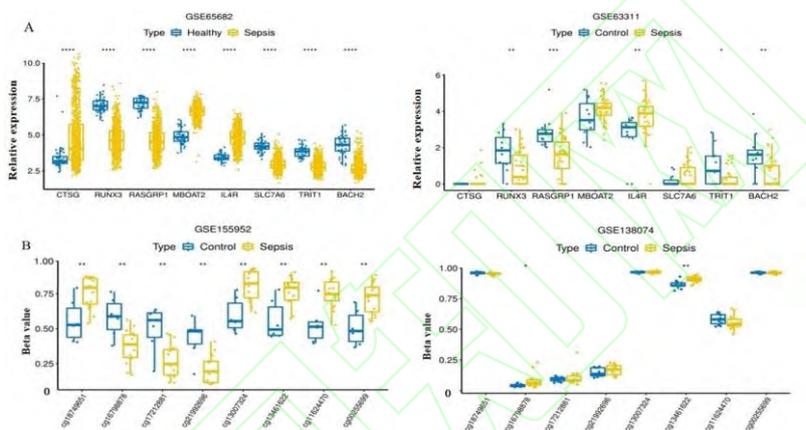


图 4 8 个 mDEGs 的表达量水平 (A) 和 8 个 mDEGs 甲基化位点和 betavalue 值 (B)

Fig.4 The expression levels of 8 mDEGs (A) and the methylation sites and betavalue of 8 mDEGs (B)

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs Control group.

**2.2 RUNX3 与脓毒症患者死亡的预测评估** 收集的 120 例脓毒症患者中，存活组 70 例，死亡组 50 例，有 41.6% 在 28 d 内发生死亡，死亡组与存活组的基线资料对比，见表 2；死亡组 RUNX3 水平均较存活组低，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，而死亡组 SOFA 评分、APACHE II 评分和 IL-6 均较存活组高，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，而 CRP、WBC 略高于存活组，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在 RUNX3 表达下调 120 例脓毒症患者中，高达 91 例(75.8%)同时伴随启动子甲基化，死亡组甲基化比例较存活组高，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 2 脓毒症死亡患者和脓毒症生存患者临床特征比较 [ $n$  (%),  $\bar{x} \pm s$ ]

Tab. 2 Comparison of clinical features between deceased patients with sepsis and surviving patients with sepsis [ $n$  (%),  $\bar{x} \pm s$ ]

Characteristics	Survival group (n = 70)	Death group (n = 50)	Statistical magnitude ( <i>t</i> / $\chi^2$ / <i>Z</i> value)	<i>P</i> value
Gender			2.064	0.166
Female	18(25.7)	19(38.0)		
Male	52(74.3)	31(62.0)		
Age (years)	55.2±14.6	59.2±17.7	-1.304	0.181
Complication				
Hypertension	13(18.5)	13(26.0)	0.948	0.330
Diabetes	10(14.3)	10(20.0)	0.686	0.408
Respiratory tract infection	10(14.3)	6(12.0)	0.132	0.717
Abdominal infection	20(28.5)	10(20.0)	1.143	0.285
Urinary system infection	8(11.4)	6(12.0)	0.009	0.923
Other	9(13.0)	5(10.0)	0.231	0.631
APACHE II score	10.56±1.37	24.46±7.50	-2.696	0.008
SOFA score	6.56±0.87	7.3±1.08	-2.811	0.006
WBC( ×10 <sup>9</sup> / L)	14.3±9.72	17.1±10.99	-1.524	0.139
PCT(ng / mL)	28.89±37.40	27.27±33.78	0.247	0.805
IL-6(pg/mL)	160.56±0.37	197.56±0.97	-2.097	0.039
CRP(mg/L)	100.56±0.97	150.56±1.82	-1.749	0.083
RUNX3 relative transcript level	1.36±0.57	0.69±0.72	-3.304	0.001

表 3 RUNX3 基因启动子甲基化状态检测结果 [n (%) ]

Tab.3 Results of promoter methylation status detection of RUNX3 gene [n (%) ]

Group	<i>n</i>	Methylation	Non-methylation	$\chi^2$ value	<i>P</i> value
Survival	70	48 (68.6)	22 (31.4)		
Death	50	43 (86.0)	7 (14.0)	4.834	0.028

**2.3 RUNX3 在脓毒症组中与临床指标的相关性分析** 采用 Pearson 相关系数检验来分析脓症患者 RUNX3 表达与临床特征的相关性。结果显示，在脓症患者中，RUNX3 与年龄、性别之间无相关性 ( $P>0.05$ )，与 CRP、PCT、IL-6、SOFA 评分、APACHE II 评分存在相关性 ( $P<0.05$ )，呈负相关。见表 4。

表 4 脓症患者中 RUNX3 与临床指标的相关性

Tab.4 Correlation between RUNX3 and clinical indicators in patients with sepsis

Item	APACHE II score	SOFA score	CRP	PCT	IL-6
RUNX3					
<i>P</i> value	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001
<i>r</i> value	-0.593	-0.497	-0.425	-0.498	-0.525

**2.4 甲基化与脓毒症患者的预后关系** 通过用 Kaplan-Meier 法分析脓症患者 28 d 累计生存情况。结果显示，甲基化组累计生存率低于非甲基化组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

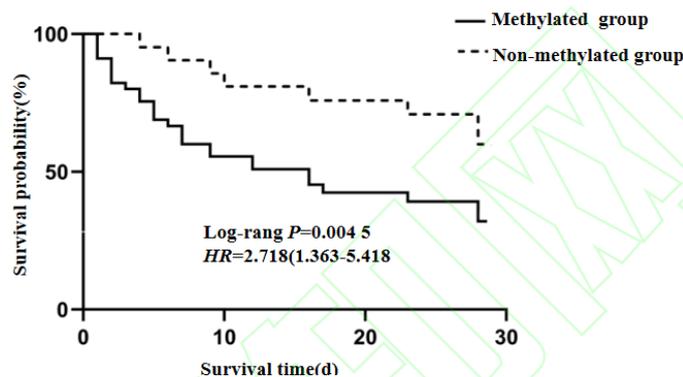


图 5 脓症患者甲基化组与非甲基化组 28 d 累计生存情况

**Fig.5 The cumulative survival of sepsis patients in the methylated group and the non-methylated group at 28 days**

**2.5 脓症患者预后的因素分析** 单因素 Cox 回归分析结果显示: APACHE II 评分、SOFA 评分、IL-6、RUNX3 启动子甲基化是脓症患者预后的影响因素, 多因素 Cox 回归分析结果显示 RUNX3 启动子区甲基化、APACHE II 评分是脓症患者预后的独立危险因素。见表 5。

表 5 脓症患者 28 d 病死率预测因素分析

Tab.5 Analysis of predictive factors of 28-day mortality in sepsis patients

Characteristics	Single factor analysis			Multiple-factor analysis		
	<i>P</i> value	<i>HR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i> value	<i>HR</i>	95% <i>CI</i>
Age	0.060	1.018	0.999- 1.038			
APACHE II score	0.001	1.072	1.028- 1.118	0.001	1.072	1.028-1.118
SOFA score	0.004	1.120	1.036 - 1.210			
WBC ( $\times 10^9 / L$ )	0.058	1.024	0.999- 1.050			
PCT (ng / mL)	0.677	1.002	0.994 - 1.010			
IL-6 (pg/mL)	0.015	1.001	1.000- 1.002			
CRP (mg/L)	0.203	1.002	0.999 - 1.004			

RUNX3 promoter region methylation	0.014	0.364	0.162 - 0.816	0.007	0.325	0.145 - 0.732
-----------------------------------	-------	-------	---------------	-------	-------	---------------

### 3 讨论

脓毒症是一种危及生命的疾病，机制复杂，炎症失衡与免疫抑制是脓毒症的重要病理生理机制<sup>[10]</sup>。尽管医疗救治取得了进展，脓毒症的预测指标如 PCT、CRP、APACHE II 评分、SOFA 评分、IFN- $\gamma$  等对其相关性和预后也得到广泛的研究<sup>[11]</sup>，但有效预测脓毒症的生物标志物也尚不完全清楚，需要人类不断去探索其他潜在生物标志物。DNA 甲基化是 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 将甲基共价转移至胞嘧啶环中的 C-5 位置的过程，从而影响基因的表达，这种表观遗传修饰与基因突变不同，是可逆的<sup>[12]</sup>，因此，具有研究靶向药物的价值。有研究<sup>[13]</sup>表明通过 DNA 甲基化进行的表观遗传调控可能在脓症患者巨噬细胞分化和外周血单核细胞炎症信号传导过程的免疫耐受中发挥作用，甲基化重编程部分是由耗尽的单核细胞中的 Wnt 信号传导抑制驱动的，并且可以通过 DNA 甲基转移酶抑制剂、Wnt 激动剂或免疫分子来逆转<sup>[14]</sup>。RUNX3 是哺乳动物的三种 runt 结构域转录因子之一，RUNX3 甲基化被认为是一种调节机制，有助于调节免疫反应并保护身体免受过度炎症的损害<sup>[15]</sup>。RUNX3 功能丧失变异可能引起免疫调节紊乱、肠道菌群失调和炎症等相关疾病<sup>[16]</sup>。有研究<sup>[17]</sup>显示，通过 RUNX3 上调增强多形核中性粒细胞(PMN)凋亡并抑制 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 (JAK2/STAT3) 磷酸化，急性重症胰腺炎 (SAP) 大鼠中 RUNX3 过表达使其相关的急性肺损伤得到改善。Tserel et al<sup>[18]</sup>的一项研究表明了 RUNX3 甲基化和表达之间存在很强的负相关。

本研究采用生物信息学策略，基于脓症患者基因表达谱数据集，揭示了一系列与脓症预后相关的 DNA 甲基化驱动的差异表达基因，并筛选出目标基因 RUNX3。通过结合脓症患者的临床数据进行相关性分析，本研究为 RUNX3 作为潜在生物标志物的评估提供了直接的证据。本研究首次探讨了 RUNX3 启动子区域的甲基化状态与脓症预后之间的关联，临床研究分析了 120 例脓症患者中存活与死亡情况，发现脓症死亡组中 RUNX3 的相对表达量低于存活组，其甲基化比例高于存活组，由此可以推测 RUNX3 低表达、高甲基化与脓症的发生密切相关，而且这种高甲基化与脓症更差的生存结局有关。本研究揭示了 RUNX3 作为预测脓症风险、评估疾病严重程度及死亡风险的生物标志物的潜力，并为后续研究提供了数据支持。研究目标是通过干预特定基因的甲基化状态来治疗脓症。本研究在该领域填补了研究空白，并为临床决策和治疗策略提供了新的研究方向和指导。尽管本研究为 RUNX3 在脓症预后中的价值提供了新的见解，但研究仍存在局限性。首先，由于样本量相对较小，临床数据收集存在客观局限性，患者细胞免疫检查资料如 CD8+T 细胞的比例、数量、CD<sup>4</sup>/CD<sup>8</sup> 细胞比例及脓症经典细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-18 未能收集完善以及部分数据缺失，同时，收集的脓症患者中诊断脓症休克的比例较高，最终的统计病死率较高，因此，相关研究结果的普遍适用性需要进一步验证。其次，尽管该研究观察到了 RUNX3 启动子区

域甲基化与脓毒症预后之间的关联，但其具体的作用机制尚不完全明确。未来的研究应考虑通过更大规模、多中心的合作来提高样本的代表性，并利用更先进的分子生物学技术，例如单细胞测序，来深入探索这一机制。此外，进行长期随访研究也是必要的，以便更全面地理解 RUNX3 启动子区域甲基化对脓毒症患者长期预后的影响。

综上所述，本研究表明了 RUNX3 在脓毒症患者中呈低表达和高甲基化状态，RUNX3 启动子区甲基化可能导致了脓毒症发生和更差的生存结局，这可能是脓毒症患者预后的关键性靶点，值得在未来继续进行研究。

### 参考文献

- [1] Nunnally M E, Ferrer R, Martin G S, et al. The Surviving Sepsis Campaign: research priorities for the administration, epidemiology, scoring and identification of sepsis[J]. *Intensive Care Med Exp*, 2021, 9(1): 34. doi:10.1186/s40635-021-00400-z.
- [2] Rudd K E, Johnson S C, Agesa K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990 – 2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *Lancet*, 2020, 395(10219): 200-11. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- [3] Mevel R, Draper J E, Lie-A-Ling M, et al. RUNX transcription factors: orchestrators of development[J]. *Development*, 2019, 146(17): dev148296. doi:10.1242/dev.148296.
- [4] Lorente-Pozo S, Navarrete P, Garzón M J, et al. DNA methylation analysis to unravel altered genetic pathways underlying early onset and late onset neonatal sepsis. a pilot study[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 622599. doi:10.3389/fimmu.2021.622599.
- [5] Cao L, Zhu T, Lang X, et al. Inhibiting DNA methylation improves survival in severe sepsis by regulating NF- $\kappa$  B pathway[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1360. doi:10.3389/fimmu.2020.01360.
- [6] Lotem J, Levanon D, Negreanu V, et al. Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1855(2): 131-43. doi:10.1016/j.bbcan.2015.01.004.
- [7] 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): 801-10. doi:10.1001/jama.2016.0287.
- [8] Knaus W A, Zimmerman J E, Wagner D P, et al. *APACHE*—acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system[J]. *Crit Care Med*, 1981, 9(8): 591-7. doi:10.1097/00003246-198108000-00008.
- [9] Vincent J L, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine[J]. *Intensive Care Med*, 1996, 22(7): 707-10. doi:10.1007/BF01709751.
- [10] Liu D, Huang S Y, Sun J H, et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options[J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 56. doi:10.1186/s40779-022-00422-y.
- [11] Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, et al. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 287. doi:10.1186/s13054-020-02993-5.
- [12] Moore L D, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38. doi:10.1038/npp.2012.112.
- [13] Lorente-Sorolla C, Garcia-Gomez A, Català-Moll F, et al. Inflammatory cytokines and organ dysfunction associate with the aberrant DNA methylome of monocytes in sepsis[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 66. doi:10.1186/s13073-019-0674-2.

- [14] Caldwell B A, Wu Y, Wang J, et al. Altered DNA methylation underlies monocyte dysregulation and immune exhaustion memory in sepsis[J]. *Cell Rep*, 2024, 43(3): 113894. doi:10.1016/j.celrep.2024.113894.
- [15] Dybska E, Nowak J K, Banaszkiwicz A, et al. Methylation of RUNX3 promoter 2 in the whole blood of children with ulcerative colitis[J]. *Genes*, 2022, 13(9): 1568. doi:10.3390/genes13091568.
- [16] Bhuyan Z A, Rahman M A, Maradana M R, et al. Genetically encoded Runx3 and CD4<sup>+</sup> intestinal epithelial lymphocyte deficiencies link SKG mouse and human predisposition to spondyloarthritis[J]. *Clin Immunol*, 2023, 247: 109220. doi:10.1016/j.clim.2022.109220.
- [17] Li S, Cui H Z, Xu C M, et al. RUNX3 protects against acute lung injury by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5382-91. doi:10.26355/eurrev\_201906\_18207.
- [18] Tserel L, Kolde R, Limbach M, et al. Age-related profiling of DNA methylation in CD8<sup>+</sup> T cells reveals changes in immune response and transcriptional regulator genes[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13107. doi:10.1038/srep13107.