

论 著

基础研究

高寒环境失血性休克大鼠代谢特征及诊断相关生物标志物：
基于血浆代谢组学和3种机器学习算法的探索性研究周孝伟¹, 李涛¹, 周远群¹, 邹立勇¹, 张紫森¹, 朱娱¹, 吴银雨², 王莉^{1*}¹陆军特色医学中心(第三军医大学大坪医院)野战外科研究部战伤休克与输血研究室, 重庆 400042; ²陆军特色医学中心(第三军医大学大坪医院)麻醉科, 重庆 400042

[中图分类号] R737.33 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0002.2026.0627

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 周孝伟,李涛,周远群等.高寒环境失血性休克大鼠代谢特征及诊断相关生物标志物:基于血浆代谢组学和3种机器学习算法的探索性研究[J].解放军医学杂志,DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.0002.2026.0627.

[收稿日期] 2026-01-01 [录用日期] 2026-04-08 [上线日期] 2026-06-27

[摘要] **目的** 基于血浆代谢组学解析高寒环境下失血性休克大鼠的代谢特征, 筛选可用于高寒复合失血性休克诊断的生物标志物。**方法** 将140只SD大鼠随机分为对照组和高寒环境联合非控制性致死性休克(H-UHS)组($n=70$)。两组大鼠经 -15°C 低温处理12 h后, H-UHS组建立非控制性失血性休克模型。检测大鼠生命体征、血气、血生化及凝血指标; 超高效液相色谱-质谱联用技术进行血浆代谢组学检测, 采用3D无监督主成分分析(3D-PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和加权共表达网络分析(WGCNA)筛选其中的差异代谢物; 进一步采用最小绝对收缩与选择算子(LASSO)、支持向量机递归特征消除(SVM-RFE)和随机森林(RF)三种机器学习算法交叉验证筛选特征代谢产物, 并以受试者工作特征(ROC)曲线评估其诊断效能。**结果** 与对照组比较, H-UHS组大鼠平均动脉压(MAP)、心率(HR)和呼吸频率(RR)明显降低, 血乳酸明显升高、碳酸氢盐明显降低, 伴肝谷丙转氨酶、谷草转氨酶、心肌肌钙蛋白T及D-乳酸明显升高, 凝血时间明显延长, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。代谢组学分析共筛选出1470种差异代谢物, 主要富集于果糖和甘露糖代谢、类固醇激素及次级胆汁酸生物合成等通路。4种特征性的代谢产物在3种机器学习算法交叉验证中均被锁定, 即预苯酸、硒代半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸和磷酸乙醇胺; 其识别高寒失血性休克的ROC曲线下面积(AUC)分别为0.945、0.979、0.953和0.991。**结论** 预苯酸、硒代半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸和磷酸乙醇胺可作为高寒联合失血性休克诊断相关的潜在生物标志物。

[关键词] 代谢组学; 低温; 失血性休克; 生物标志物**Metabolic characteristics and diagnostic biomarkers in rats with hemorrhagic shock combined with hypothermia:**Zhou Xiao-Wei¹, Li Tao¹, Zhou Yuan-Qun¹, Zou Li-Yong¹, Zhang Zi-Sen¹, Zhu Yu¹, Wu Yin-Yu², Wang Li^{1*}¹Department of War Wound Shock and Transfusion, Institute of Field Surgery, ²Department of Anesthesiology, Army Medical Center (Daping Hospital of Third Military Medical University), Chongqing 400042, China

*Corresponding author, E-mail: wangli123@tmmu.edu.cn

This work was supported by the Science and Technology Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJZD-K202512803)

[Abstract] **Objective** To investigate the metabolic characteristics of rats with hypothermia and hemorrhagic shock based on plasma metabolomics, and to screen for specific biomarkers. **Methods** A total of 140 Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and hypothermic environment combined with uncontrolled lethal hemorrhagic shock (H-UHS) group ($n=70$). Following 12 h of exposure to -15°C , an uncontrolled hemorrhagic shock model was established in rats of H-UHS group. Vital signs,

[基金项目] 重庆市教委科学技术研究项目(KJZD-K202512803)**[作者简介]** 周孝伟, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事战创伤早期救治和脓毒症脑病认知功能障碍方面的研究**[通信作者]** 王莉, E-mail: wangli123@tmmu.edu.cn

blood gas, biochemical, and coagulation parameters were subsequently measured. Plasma metabolomic profiling was performed using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Differential metabolites were screened by 3D-principal component analysis (3D-PCA), orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA), and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). Feature metabolites were further identified through cross-validation with three machine learning algorithms: least absolute shrinkage and selection operator (LASSO), support vector machine with recursive feature elimination (svm-rfe), and random forest (RF). Diagnostic performance was evaluated using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. **Results** Compared with control group, the rats in H-UHS group exhibited significant reductions in mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and respiratory rate (RR), along with elevated blood lactate, decreased bicarbonate, significantly increased hepatic enzymes, cardiac troponin T, and D-lactate, and prolonged coagulation time, with the difference is statistically significant ($P<0.05$). A total of 1,470 differential metabolites were identified by metabolomic analysis, primarily enriched in fructose and mannose metabolism, steroid hormone biosynthesis, and secondary bile acid biosynthesis pathways. Cross-validation using three machine learning algorithms identified four overlapping characteristic metabolites: prephenic acid, selenocysteine, 2'-deoxyuridine-5'-diphosphate, and phosphoethanolamine, with areas under the receiver operating characteristic curve (AUCs) of 0.945, 0.979, 0.953, and 0.991, respectively. **Conclusion** Prephenic acid, selenocysteine, 2'-deoxyuridine-5'-diphosphate, and phosphoethanolamine may serve as potential diagnostic biomarkers for hypothermia combined with hemorrhagic shock.

[Key words] metabolomics; hypothermia; hemorrhagic shock; biomarkers

失血性休克作为创伤救治中的危重病症,其病理生理过程涉及微循环障碍、氧化应激及代谢紊乱等多重机制^[1]。高寒环境可能加剧失血性休克的疾病进程,这与内环境紊乱、炎症应激因子升高及代谢重编程密切相关^[2]。现有证据显示,低温状态下机体出现显著的代谢重编程,包括三羧酸循环紊乱、脂肪酸氧化增强及精氨酸代谢异常等特征性改变^[3-4]。动物实验亦显示,失血性休克可导致乳酸积累、酸碱失衡等典型代谢紊乱^[5];而核心体温降至33℃时,心输出量及肾血流量进一步下降,血流动力学不稳定性显著增加^[6]。上述代谢紊乱与血流动力学损伤的交互作用,是高寒环境下失血性休克预后极差的重要原因。因此,识别高寒失血性休克的代谢特征及筛选特异性代谢标志物,对于指导临床提前干预、改善预后具有重要意义。本研究建立低温联合失血性休克大鼠模型,基于血浆代谢组学分析,探究该模型的代谢特征并挖掘关键生物标志物,以期相关的临床诊治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 140只10周龄雄性SD大鼠,体重180~220g,购自陆军特色医学中心实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2022-0004]。饲养于SPF环境(温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$,湿度50%~60%,光照周期12h/12h)。本研究获陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20194758)。

1.2 主要试剂与仪器 D-乳酸ELISA试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);乙腈(美国赛默飞世尔科技公司);甲酸(Fluka,德国Sigma-Aldrich公司)。低温试验箱(BPH-500B,上海一恒科学仪器有限公司);电子血压计(HaoGan,北京汉王科技股份有限公司);

高速冷冻离心机,生化分析仪(DXC 800,美国Beckman公司);血流动力学测定仪(澳大利亚AD Instruments公司);血气分析仪(ABL800,丹麦雷度米特公司);凝血分析仪(ACL TOP 700,西班牙沃芬公司)。

1.3 大鼠分组设计及模型制备 140只大鼠按随机数表法分为对照组和高寒环境联合非控制性致死性休克组(H-UHS组),每组70只。实验当天将两组大鼠置于低温试验箱(温度 -15°C)饲养12h,期间禁食禁水;大鼠出箱后测得核心体温在 $30\sim 33^\circ\text{C}$,立即转移至低温实验室(室温 $4\pm 2^\circ\text{C}$)。H-UHS组大鼠按照本实验室建立的方法制备大鼠非控制性失血性休克模型^[7],模型制备方法如下:腹腔注射3%戊巴比妥钠(30mg/kg)进行麻醉后,将大鼠仰卧位固定,行左侧股动脉插管(导管内径0.58mm,外径0.96mm)连接电子血压计持续监测平均动脉压;沿腹中线切开腹壁3~4cm暴露脾,使用显微眼科剪在脾动脉二级分支间剪开脾实质并切断其中一条脾动脉分支造成活动性出血,迅速关闭腹腔;以平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)约30min降至 $40\pm 2\text{ mmHg}$,并维持5min不再回升为模型成功标准。对照组大鼠仅进行麻醉、股动脉插管及开腹探查,不造成脾创伤。

1.4 大鼠生命体征和血液相关指标的检测 为全面评估模型创伤严重程度和表型分组依据,两组大鼠在股动脉插管后稳定10min,接血流动力学测定仪监测MAP、心率(heart rate, HR)、呼吸频率(respiratory rate, RR);核心体温经温度计测量直肠温度获得。休克末抽取大鼠外周动脉血用于血气、血生化和凝血指标的检测。血气指标采用血气分析仪测定;D-乳酸采用ELISA试剂盒测定,其余血生

化指标采用全自动生化分析仪检测；凝血功能由全自动凝血分析仪检测。

1.5 高寒环境失血性休克血浆代谢特征与差异分析 采集大鼠静脉血 5 ml, 3000 r/min 离心 10 min 取上清；上清液再以 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min, 取 50 μ l 上清置于 EP 管中, 加入 200 μ l 提取液(甲醇:乙腈=1:1, 含同位素标记内标混合物), 涡旋 30 s, 冰水浴超声处理 10 min, -40 ℃ 静置 1 h 后, 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液上机检测。为满足复杂生物样本中低丰度代谢物的检测, 采用超高效液相色谱仪, 通过 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 液相色谱柱分离目标化合物。原始数据经 XCMS (v3.12.0) 进行峰识别、提取及对齐; 以 SVR 校正系统误差, 剔除 QC 样本 RSD>30% 的特征, 缺失值以组内均值填补。经 MetaboAnalyst 5.0 归一化及标准化后, 以 HMDB、MassBank 等数据库注释代谢物(ppm<30)。采用 3D 无监督主成分分析(3D-principal component analysis, 3D-PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)评估组间代谢差异。3D-PCA 通过降维聚类, 可更直观地展示组间样本的空间分离趋势。OPLS-DA 则通过最大化组间差异、过滤组内不相关变异, 提高组间区分能力和模型解释度。以变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP) ≥ 1.0 、 $P<0.05$ 、差异倍数(fold change, FC) >1.5 或 $<1/1.5$ 为阈值筛选差异代谢物。使用 MetaboAnalyst 5.0(<http://metpa.metabolomics.ca>)对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。

1.6 加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)筛选相关代谢产物 WGCNA 通过构建代谢物共表达网络, 将高度协同变化的代谢物聚类为功能模块, 揭示与高寒环境失血性休克相关的代谢特征。本研究运用“WGCNA”R 包对代谢组学数据集进行聚类分析, 以识别并排除离群样本, 确保数据的可靠性。随后, 基于代谢产物丰度值, 通过使网络的无尺度拟合指数 $R^2 \geq 0.9$ 的最小软阈值 β , 构建近似无尺度拓扑的共表达网络。最后, 利用皮尔森相关分析识别出与分组最显著相关的代谢模块。

1.7 机器学习筛选高寒失血性休克的生物标志物及其诊断性能评估 将 WGCNA 分析筛选的高寒休克显著相关的代谢产物与有人类代谢数据库(Human Metabolome Database, HMDB)注释信息的差异代谢产物进行 Venn 分析, 以降低单一方法可能带来的假阳性, 提高候选标志物的可靠性。映射到的代谢物进一步使用最小绝对收缩与选择算子(Least Absolute

Shrinkage and Selection Operator, LASSO)、支持向量机递归特征消除(Support Vector Machine with Recursive Feature Elimination, SVM-RFE)和随机森林(Random Forest, RF)三种机器学习算法交叉验证, 从不同数学原理(正则化、最大间隔、集成学习)角度共同筛选, 以提高生物标志物筛选的稳健性和可靠性。LASSO 通过 glmnet 包实现, 采用 10 折交叉验证选取最小 λ , 以获得最优稀疏模型, 保留非零系数代谢产物; SVM-RFE 通过 e1071 与 caret 包实现, 采用递归特征消除法筛选最优特征基因; RF 利用 randomForest 包, 设定 ntree=100, 基于基尼指数评估基因重要性, 筛选重要性 Top30 的代谢产物。采用小提琴图分析高寒环境失血性休克特征代谢产物的丰度水平, 受试者操作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线下面积(area under the curve, AUC)用以评估标志物区分病例与对照的能力, AUC >0.80 提示模型识别效能较高, AUC 接近 1.00 则提示效能优越。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或 t 检验。首先, 通过单变量分析计算差异倍数(fold change, FC), 并进行 Benjamini-Hochberg(BH)校正以获得错误发现率(FDR)。随后, 结合多变量统计分析方法——OPLS-DA, 从整体代谢轮廓角度评估组间差异, 并采用置换检验(permutation test, 随机打乱样本分组标签重建模型)检验模型是否存在过拟合, 评估 OPLS-DA 模型的可靠性与预测能力。差异代谢物的筛选标准为: (1) $P<0.05$ 且 $VIP \geq 1.0$; (2) $FC \geq 1.5$ 作为上调的变化阈值, $FC \leq 1/1.5$ 作为显著下调的变化阈值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高寒环境失血性休克大鼠生命体征、血气、血生化和凝血指标变化 与对照组相比, H-UHS 组大鼠 MAP、HR 和 RR 均明显降低($P<0.05$), 两组核心体温差异无统计学意义($P>0.05$); 血气分析结果显示, H-UHS 组大鼠血乳酸水平明显升高($P<0.05$), 碳酸氢盐浓度明显降低($P<0.05$), 两组 pH 值差异无统计学意义($P>0.05$); 凝血功能检测显示, H-UHS 组大鼠血浆凝血酶原时间和凝血酶时间延长($P<0.05$), 两组活化部分凝血活酶时间和纤维蛋白原水平差异无统计学意义($P>0.05$, 表 1)。

2.2 高寒环境失血性休克大鼠血浆代谢特征与差异分析 3D-PCA 分析结果显示, 两组大鼠 3D-PCA 得分图明显分离, 提示两组代谢表型差异明显(图 1A)。采用 OPLS-DA 验证模型稳健性, 置换检验显示模型

表1 高寒环境失血性休克大鼠生命体征、血气、血生化和凝血指标变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Change of vital signs, blood gas, blood biochemistry, and coagulation indicators in rats with hemorrhagic shock and hypothermia

指标	对照组	H-UHS组	<i>t</i>	<i>P</i>
生命体征				
核心体温($^{\circ}\text{C}$, $\bar{x} \pm s$)	31.69 $\pm$ 1.03	32.23 $\pm$ 0.55	1.30	0.21
MAP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	107.88 $\pm$ 10.40	40.75 $\pm$ 1.67	18.030	<0.001 ^{***}
HR(次/min, $\bar{x} \pm s$)	310.13 $\pm$ 20.80	281.63 $\pm$ 22.69	2.608	0.021 [*]
RR(次/min, $\bar{x} \pm s$)	80.50 $\pm$ 12.92	46.63 $\pm$ 8.02	6.302	<0.001 ^{***}
血气				
pH($\bar{x} \pm s$)	7.29 $\pm$ 0.09	7.21 $\pm$ 0.15	1.290	0.220
乳酸(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.12 $\pm$ 1.85	3.86 $\pm$ 1.13	2.270	0.039 [*]
cHCO ₃ ⁻ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	20.37 $\pm$ 2.63	17.78 $\pm$ 1.15	2.550	0.023 [*]
血生化				
AST(U/L, $\bar{x} \pm s$)	155.46 $\pm$ 21.07	208.73 $\pm$ 39.77	3.347	0.005 ^{**}
ALT(U/L, $\bar{x} \pm s$)	43.44 $\pm$ 5.12	54.21 $\pm$ 12.32	2.284	0.038 [*]
血尿素氮(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	13.51 $\pm$ 3.24	10.05 $\pm$ 2.47	0.013	0.989
血肌酐(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	14.52 $\pm$ 3.22	15.67 $\pm$ 3.85	1.208	0.247
cTnT($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)	0.34 $\pm$ 0.12	0.94 $\pm$ 0.17	8.230	<0.001 ^{***}
D-乳酸(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	0.36 $\pm$ 0.07	1.04 $\pm$ 0.41	4.660	<0.001 ^{***}
凝血指标				
APTT(s, $\bar{x} \pm s$)	18.16 $\pm$ 1.34	17.60 $\pm$ 1.16	0.899	0.384
PT(s, $\bar{x} \pm s$)	13.41 $\pm$ 1.21	15.51 $\pm$ 1.29	3.368	0.005 ^{**}
TT(s, $\bar{x} \pm s$)	25.65 $\pm$ 2.20	31.43 $\pm$ 4.05	3.550	0.003 ^{**}
FIB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	1.39 $\pm$ 0.12	1.32 $\pm$ 0.24	0.148	0.885

两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。H-UHS. 高寒环境联合非控制性致死性休克; MAP. 平均动脉压; HR. 心率; RR. 呼吸频率; AST. 谷草转氨酶; ALT. 谷丙转氨酶; cTnT. 心肌肌钙蛋白T; APTT. 活化部分凝血活酶时间; PT. 血浆凝血酶原时间; TT. 凝血酶时间; FIB. 纤维蛋白原

无过拟合(图1B-C), 模型可有效区分两组; 基于VIP ≥ 1 筛选出4813个差异代谢物(图1D)。

差异分析共筛选出1470个差异代谢物, 其中上调1281个、下调189个(图2A-B)。差异代谢物主要为脂质和类脂分子、有机酸及其衍生物和苯环型化合物等(图2C)。KEGG通路富集分析结果显示, 通路富集主要集中在果糖和甘露糖代谢、组氨酸和嘌呤衍生物碱的生物合成, 类固醇激素生物合成及次级胆汁酸生物合成等(图2D)。其中, 上调代谢物主要与次级胆汁酸生物合成、活性氧、类固醇激素生物合成相关(图2E); 下调代谢物则与硫酸乙酰肝素/肝素、硫酸软骨素/硫酸皮肤素和硒化合物代谢相关(图2F)。

2.3 WGCNA分析筛选高寒环境休克相关代谢产物 基于WGCNA分析, 两组大鼠代谢物表达谱显著分离(图3A)。当软阈值 $\text{power}=17$ 时, 无标度拓扑指数 $R^2 \approx 0.9$, 符合无标度网络特征(图3B)。构建基因网络后共鉴定17个共表达模块, 其中青绿色模块与高寒失血性休克表型显著正相关($r=0.76$, $P < 0.01$), 包含550个核心代谢物(图3C-E)。

2.4 机器学习筛选与高寒失血性休克显著相关的特征代谢产物 对WGCNA分析筛选的550个核心代谢产物进行Venn分析, 得到164个与高寒休克显著相关的差异代谢产物(图4A)。基于机器学习算法识别特征代谢产物, 在LASSO回归分析中, 通过多次交叉验证, 成功筛选出13个特征代谢产物(图4B-C, 附表1); 在支持向量机递归特征消除(SVM-RFE)方法中, 当特征数量设定为8, 分类器的误差达到最小(图4D), 从而筛选出与疾病相关的特征代谢产物; 随机森林算法确定的重性评分前30的特征代谢产物见图4E、附表1。综合这三种机器学习算法的结果, 有4个与高寒休克显著相关的特征代谢产物在所有模型中均有重叠, 它们分别是预苯酸、硒代半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸和磷酸乙醇胺(图4F)。

2.5 特征代谢产物的丰度水平及对高寒失血性休克大鼠的识别效能 高寒环境失血性休克特征代谢产物表达情况的小提琴图显示, 预苯酸、磷酸乙醇胺在休克后表达明显上调($P < 0.001$), 硒代半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸在休克后表达明显下调($P < 0.001$, 图5A)。ROC曲线分析显示, 预苯酸、硒代

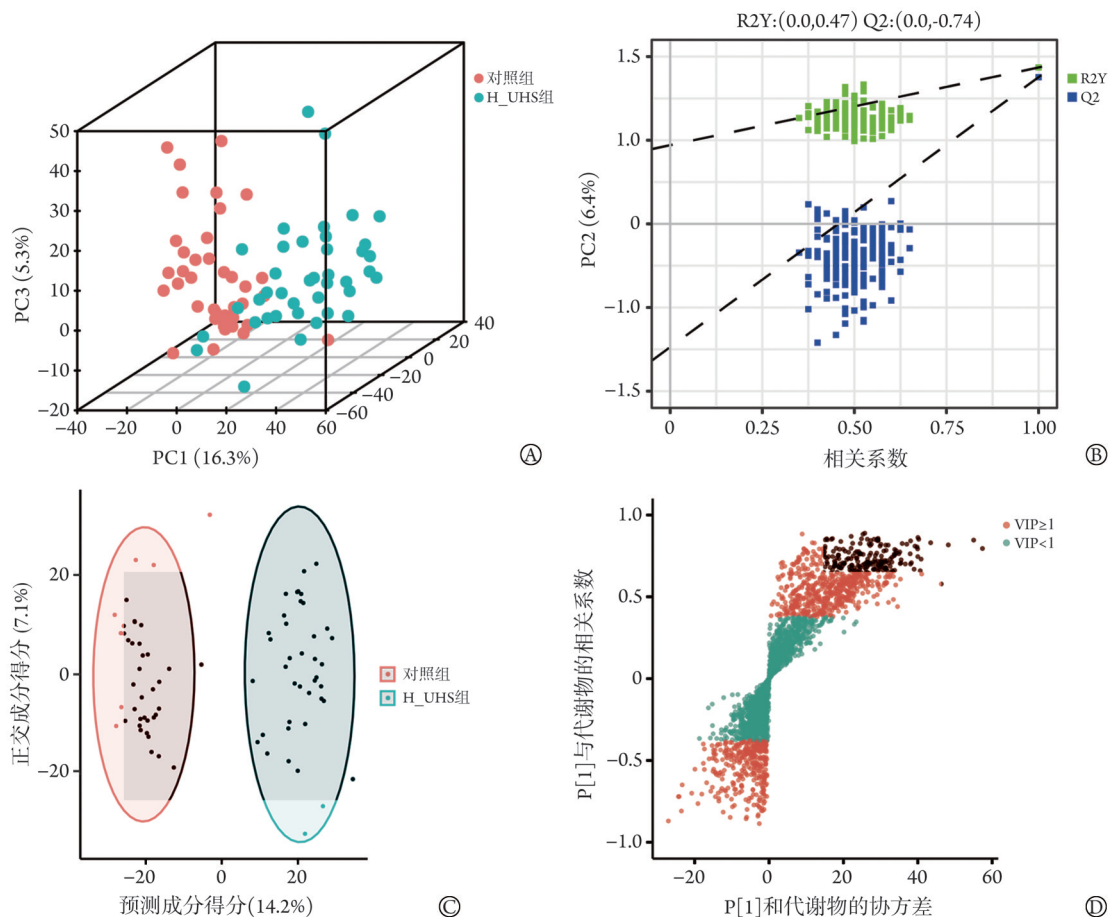


图1 高寒环境失血性休克大鼠血浆代谢产物指纹图谱分析

Fig.1 Plasma metabolite fingerprint analysis in rats with hemorrhagic shock and hypothermia

A. 三维主成分分析图; B. OPLS-DA 相关性分析; C. OPLS-DA 得分图; D. 变量重要性投影(VIP)分析; H-UHS. 高寒环境联合非控制性致死性休克

半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸和磷酸乙醇胺识别大鼠高寒环境失血性休克的AUC值分别为0.945、0.979、0.953和0.991，提示其诊断价值较高(图5B)。

3 讨论

高寒环境会加速战创伤性休克的进展，导致器官功能障碍和病死率显著增加^[8-9]。但高寒联合战创伤性休克的特点及机制的相关研究较少。鉴于战创伤高发人群以男性为主，且雌性大鼠体内雌激素水平呈周期性波动，可能引入额外变异性，影响实验结果的一致性和可重复性，本研究选择雄性大鼠复制高寒联合失血性休克模型。研究结果显示，高寒联合失血性休克后，大鼠重要生命体征明显降低，同时伴有核心体温降低、代谢性酸中毒和凝血时间延长为特征的“致死三联征”，进一步引起肝功能、心功能和肠屏障功能等多器官系统损伤。

有研究显示，冷暴露合并失血性休克可抑制凝血酶活性，干扰血小板功能，导致凝血功能障碍，而酸中毒则削弱心肌收缩力并降低血管反应性，共

同促进微循环灌注损害和“致死三联征”的恶性循环，进而导致多器官功能障碍^[2]。此外，肠屏障功能受损可导致细菌和内毒素易位，并通过肠系膜淋巴回流介导炎症脂质介质(如花生四烯酸)释放和远端器官损伤^[10]。因此，高寒环境下失血性休克所致多器官功能障碍，可能是微循环衰竭、凝血功能失调、酸中毒及炎症失控等多重机制交织的结果。值得注意的是，本研究中，大鼠肾功能指标未表现出明显异常，究其原因，首先，肾的代偿能力较强，即使在全身性低灌注状态，肾仍可通过自身调节机制维持基本的滤过功能，从而延缓血清肌酐和尿素氮的升高^[11]；其次，血清肌酐和尿素氮改变存在滞后性，相关研究显示，在失血性休克模型中，肾微循环和氧合可能已受损，但血清肌酐水平仍可维持在正常范围，直到损伤进展到一定程度才出现升高^[12]；第三，高寒环境本身可能通过降低代谢率、减少氧耗及抑制细胞凋亡通路等途径，对肾产生一定保护作用，从而减轻急性肾损伤的表现^[13]。

鉴于代谢改变在疾病发生发展中的重要作用，

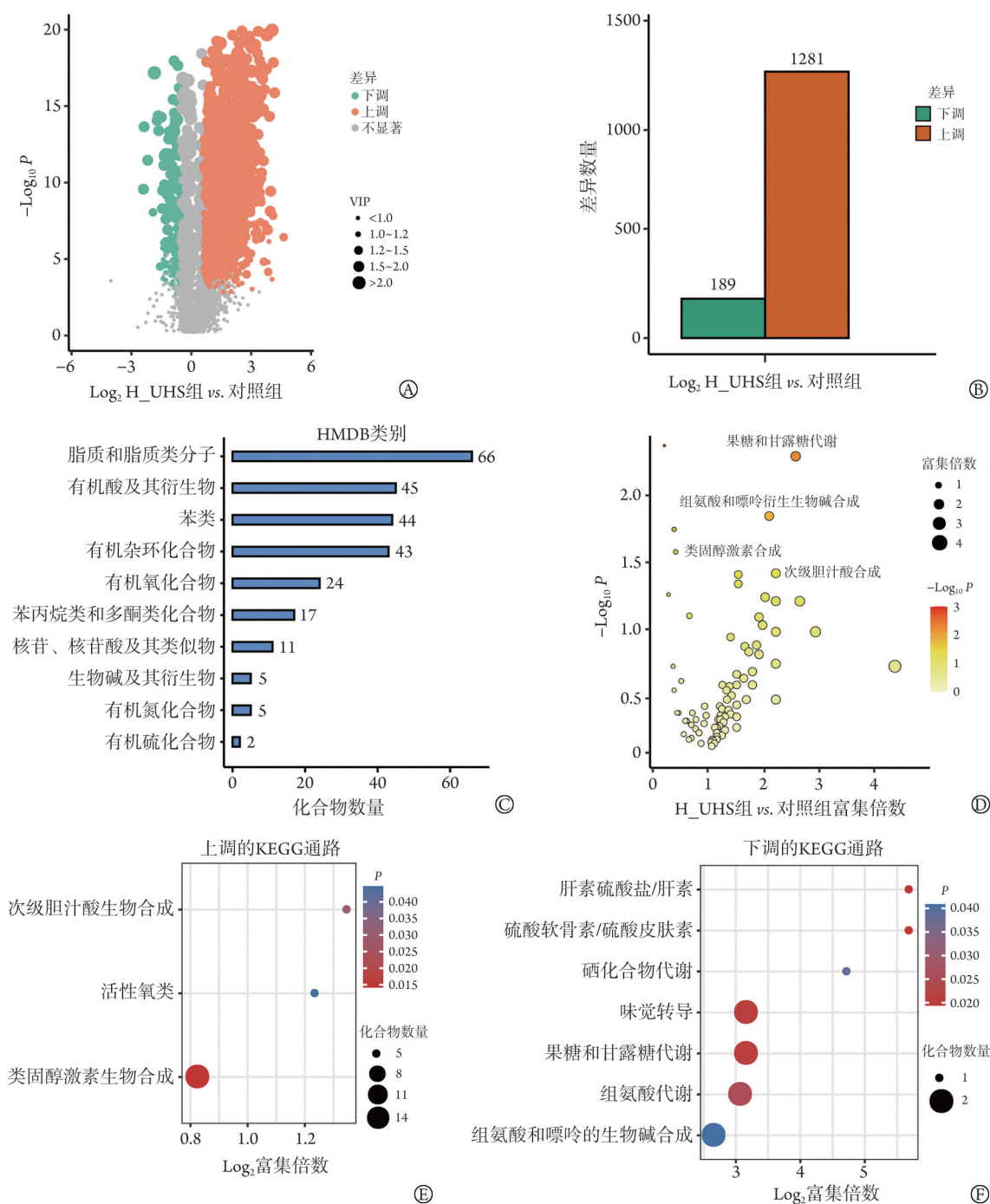


图2 高寒环境失血性休克大鼠血浆代谢组学差异和富集分析

Fig.2 Plasma metabolomics differences and KEGG analysis in rats with hemorrhagic shock and hypothermia

A. 差异代谢产物火山图; B. 差异代谢产物统计图; C. 差异代谢产物 HMDB 分类图; D. 差异代谢产物富集分析图; E-F. 上下调代谢产物 KEGG 富集分析. H-UHS. 高寒环境联合非控制性致死性休克

本研究进行了代谢组学检测和分析。在数据分析策略上，参考已有研究^[14-16]，联合差异代谢物与 WGCNA 共表达网络锁定关键代谢模块后，采用 LASSO、RF 和 SVM-RFE 三种机器学习算法进行标志物筛选。该算法组合的选择基于方法学互补性：LASSO 通过正则化实现稀疏筛选以控制模型复杂度，RF 可捕捉代谢物间的非线性交互作用，SVM-RFE 则

对小样本高维数据具有强鲁棒性。取三种算法共同识别的代谢物作为候选标志物，以过滤假阳性、增强结果稳健性。最终确定 4 种生物标志物：预苯酸、硒代半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸、磷酸乙醇胺，其 AUC 均 > 0.90，显著参与高寒失血性休克的疾病进程。

本研究结果显示，预苯酸和磷酸乙醇胺的含量

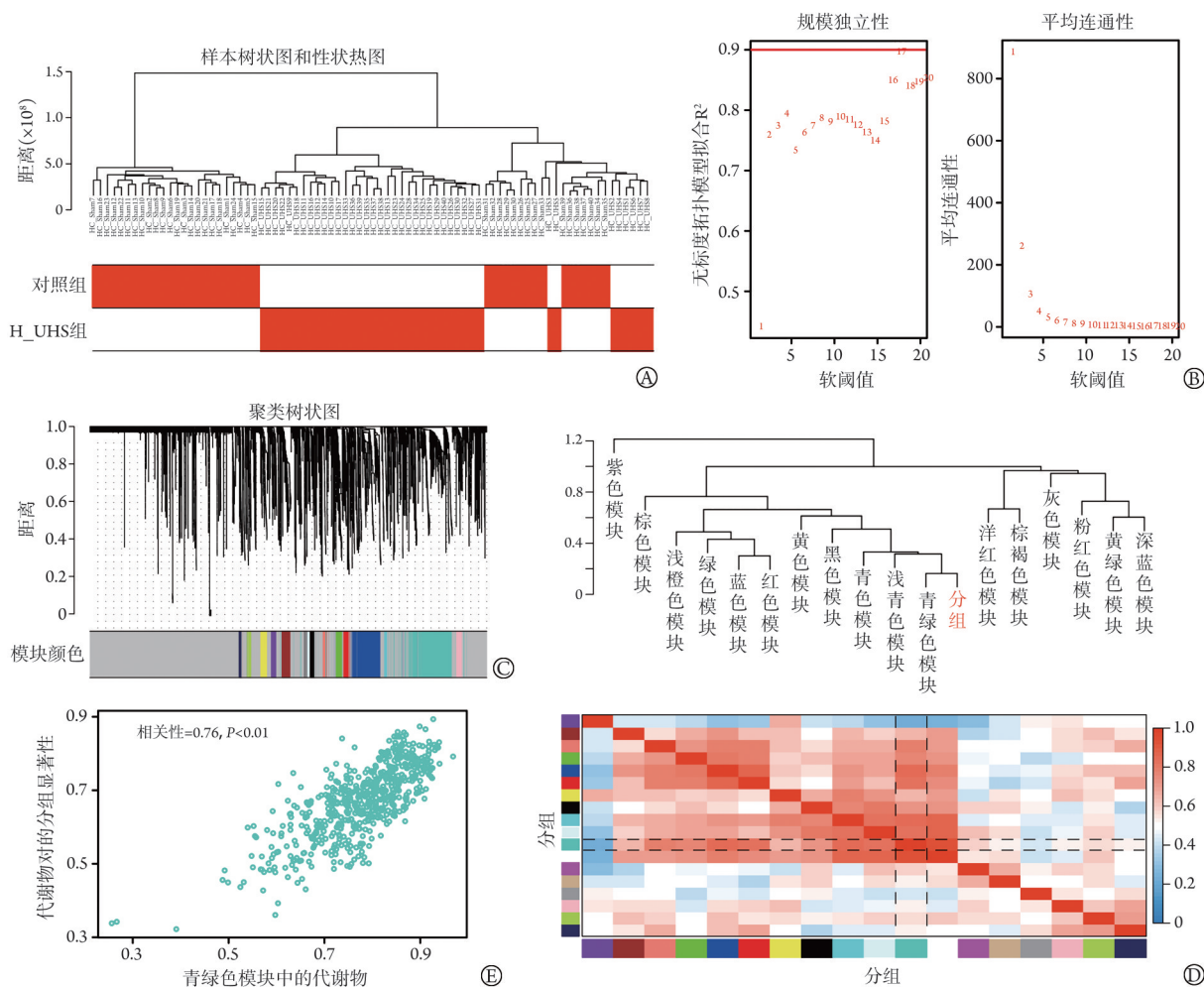


图3 加权共表达网络分析(WGCNA)筛选与大鼠高寒休克显著相关的代谢产物

Fig. 3 Screening of significant related metabolites with hemorrhagic shock and hypothermia by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) in rats

A. 样本树状图和性状热图; B. 软阈值选择和平均连接度; C. 模块树状图; D. 模块与性状的相关性热图, 上图为模块聚类树状图, 下图为模块-性状相关性热图, 上下图联合用于识别与休克表型相关的功能模块; E. 模块代谢产物与性状显著性关系图。H-UHS. 高寒环境联合非控制性致死性休克

在高寒失血性休克后明显升高。预苯酸作为微生物莽草酸途径合成芳香族氨基酸(如苯丙氨酸和酪氨酸)的前体, 哺乳动物缺乏该途径, 正常情况下外周血中几乎检测不到^[17]。高寒联合失血性休克时肠黏膜缺血缺氧引起肠屏障破坏, 大肠杆菌、克雷伯菌等肠道微生物合成的大量预苯酸, 可经受损肠屏障入血, 其升高可能反映肠屏障功能破坏。磷酸乙醇胺属于磷脂代谢中的磷酸单酯代谢产物, 参与磷脂的合成与分解产谢。有研究显示, 磷酸乙醇胺的累积可直接抑制线粒体电子传输链(ETC), 导致ATP生成骤减和复合物 I/III 电子漏出^[18-19]。线粒体ATP水平下降使AMP/ATP和ADP/ATP比值升高, 激活AMPK信号通路, 该通路可磷酸化下游靶蛋白, 提高糖酵解速率, 进而使机体乳酸水平进一步增高^[20-21]。可见, 高寒联合失血性休克后磷酸乙醇胺

的升高, 可能通过线粒体ATP下降—AMPK激活—糖酵解增强造成休克和代谢紊乱, 为高寒环境下创伤失血性休克的病理机制提供新视角。

此外, 硒代半胱氨酸和2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸含量在高寒失血性休克后明显降低。硒代半胱氨酸是一种由半胱氨酸的硫原子被硒取代而形成的氨基酸, 是谷胱甘肽过氧化物酶(GPXs)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)和硒蛋白 T(SELENOT)等多种硒蛋白的活性中心, 对抗氧化、细胞信号转导及细胞凋亡等多种生理过程至关重要^[22-23]。SELENOT是一种内质网驻留蛋白, 在转基因细胞和动物模型中, SELENOT减少会导致活性氧(ROS)和活性氮(RNS)浓度增高, 进而引起错误折叠蛋白质增多, 这与多种神经退行性疾病、心血管疾病、代谢性疾病和免疫性疾病的发生有关^[24]。此外, 流行病学研究显示, 硒缺乏与克

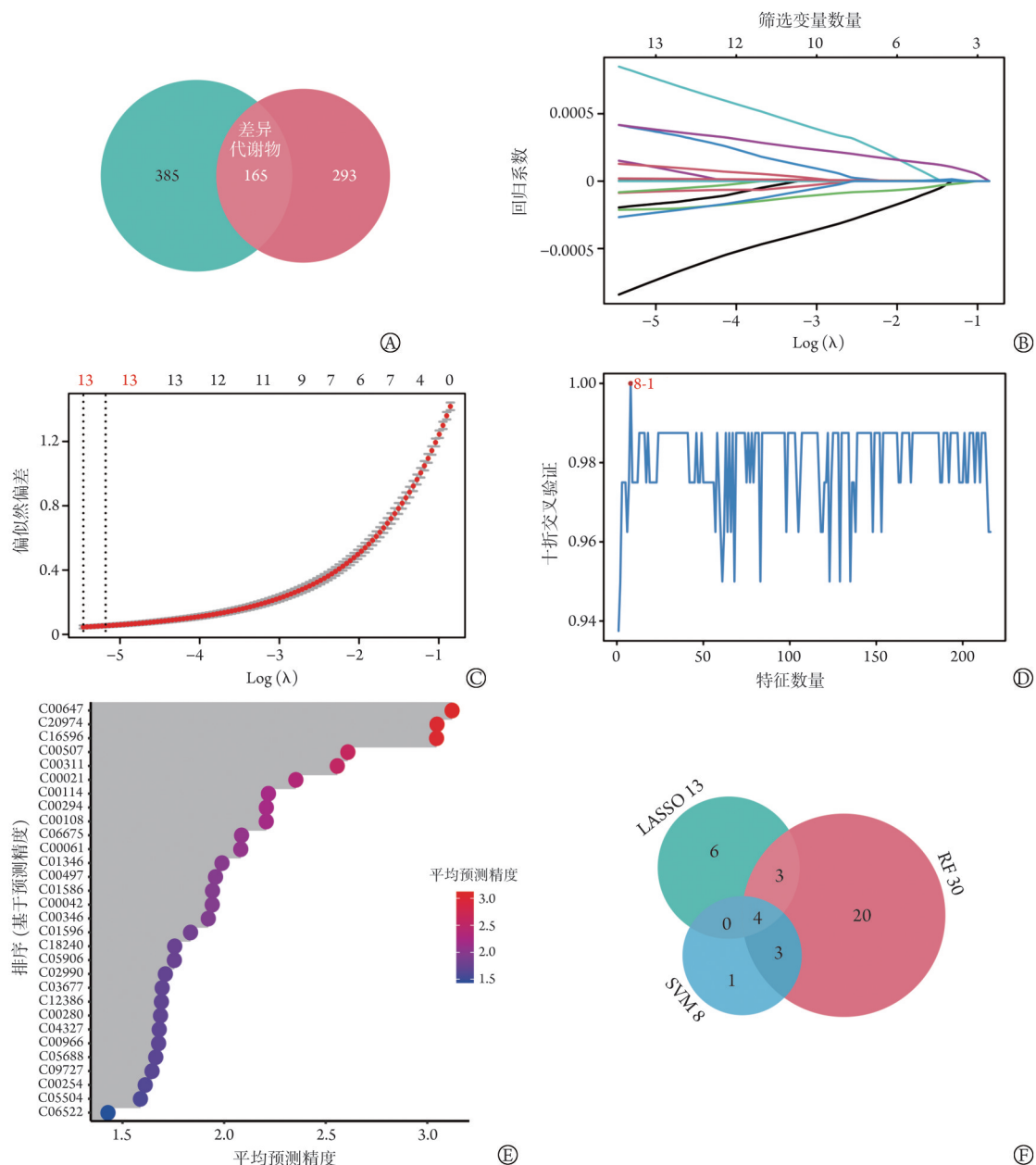


图4 机器学习筛选高寒失血性休克相关的特征代谢产物

Fig.4 Screening of characteristic metabolites of hemorrhagic shock and hypothermia by machine learning in rats

A. 加权基因共表达网络分析(WGCNA)筛选代谢产物和差异代谢产物维恩图; B、C. 最小绝对收缩与选择算子(LASSO)回归分析筛选生物标志物; D. 支持向量机递归特征消除(SVM)算法筛选生物标志物; E. 随机森林算法(RF)筛选生物标志物; F. 三种机器学习算法中重叠代谢产物维恩图

罗恩病和溃疡性结肠炎的严重程度相关。补充适量的硒可激活 Nrf2, 使其进入细胞核并与抗氧化/亲电反应元件(ARE/EpRE)区域结合, 从而增强抗氧化基因(如 GPXs 和 TrxR)的表达。这些硒蛋白能够有效对抗氧化应激, 抑制炎症信号通路, 改善患者的症状^[25-26]。Gärtner 等^[27]发现, 补充硒可降低全身炎症反应综合征(SIRS)或脓毒症患者多器官衰竭(特别是急性肾衰竭和呼吸窘迫综合征)的发生率。此外, 一项关于创伤患者的 Meta 分析显示, 补充硒可降低创伤患者的病死率, 并缩短 ICU 住院时间^[28]。在高寒

联合失血性休克后, 硒代半胱氨酸的丰度降低, 可能直接导致硒蛋白水平下降。这会导致 ROS 和炎症因子大量累积, 进而参与多器官功能障碍的发生。因此, 补充硒代半胱氨酸可能是一种有效的救治策略。2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸是嘧啶核苷酸代谢中的一个关键中间产物, 主要涉及 DNA 合成、修复、细胞增殖及氧化应激的调控。当 2'-脱氧尿苷-5'-二磷酸丰度减少时, 会导致 DNA 合成所必需的核苷酸 dTMP 合成减少, 从而抑制 DNA 合成, 影响细胞周期的正常进行, 导致细胞增殖受阻; 还会引起下游产物脱

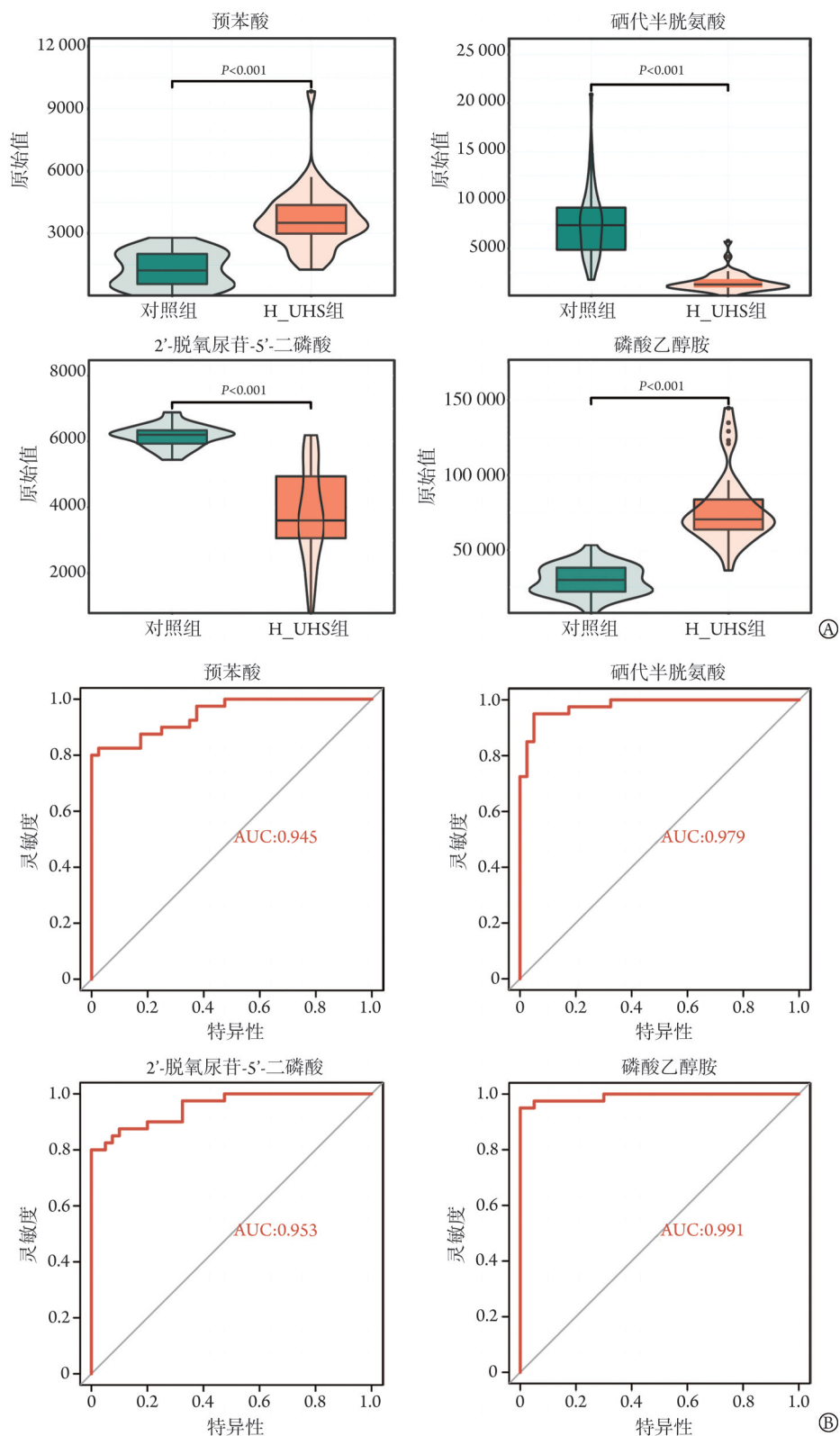


图5 大鼠高寒环境休克特征代谢产物丰度差异及诊断价值

Fig.5 Abundance difference and diagnostic value of characteristic metabolites of hemorrhagic shock and hypothermia in rats

A. 特征代谢产物丰度小提琴图；B. 特征代谢产物的受试者操作特征(ROC)曲线。H-UHS. 高寒环境联合非控制性致死性休克；AUC. ROC曲线下面积

氧尿苷(dU)的生成，从而削弱细胞的抗氧化能力，导致氧化应激和内质网应激加剧，进而影响细胞存活^[29-30]。

本研究整合WGCNA分析和机器学习算法筛选了4种在高寒联合失血性休克大鼠血浆中差异显著的代谢产物预苯酸、硒代半胱氨酸、2'-脱氧尿苷-5'-

二磷酸和磷酸乙醇胺,可作为高寒联合失血性休克诊断相关潜在生物标志物,有望为早期识别和治疗高寒联合失血性休克提供新的思路。但上述代谢标志物是经非靶向筛选及机器学习交叉验证获得,尚未经靶向定量方法及临床创伤低体温患者样本验证,其诊断的截断值及普适性尚待进一步验证;此外,本研究机制阐释以生物信息学关联分析为主,代谢物的因果作用及救治潜力未经体内功能干预与细胞模型验证,后续拟通过代谢物补充及干预实验进行确认。

【参考文献】

- [1] Xu P, Xu W, Gao S, *et al.* Global metabolic profiling of hemorrhagic shock and resuscitation[J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(4): e5044.
- [2] Zhou X, Zou L, Deng H, *et al.* Protective effects and mechanisms of inhibiting endoplasmic reticulum stress on cold seawater immersion combined with hemorrhagic shock[J]. *J Inflamm Res*, 2025, 17: 4923-4940.
- [3] Li JH, Liu JL, Song JW, *et al.* Metabolomic analysis of fatal hypothermia using ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Front Mol Biosci*, 2025, 12: 1563642.
- [4] Horioka K, Tanaka H, Watanabe S, *et al.* FATP1-mediated fatty acid uptake in renal tubular cells as a countermeasure for hypothermia[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2025, 103(4): 403-419.
- [5] Dong Q, Xie H, Liu J, *et al.* 20(S)-Ginsenoside Rg2 amino acid derivatives for anti hemorrhagic shock: Synthesis, characterization and evaluation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 240: 115939.
- [6] Caminos Eguillor JF, Ferrara G, Kanoore Edul VS, *et al.* Effects of systemic hypothermia on microcirculation in conditions of hemodynamic stability and in hemorrhagic shock[J]. *Shock*, 2020, 55(5): 686-692.
- [7] 朱妮,李涛,刘良明.不同药物对非控制性出血性休克治疗效果的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(18): 2417-2419.
- [8] 姚娟,向鹏程,袁俊强.警惕野外的隐形杀手——低体温[J]. *创伤外科杂志*, 2023, 25(6): 479-481.
- [9] Xu J, Yu W, Li N, *et al.* The impact of high-altitude and cold environment on brain and heart damage in rats with hemorrhagic shock[J]. *Brain Circ*, 2024, 10(2): 174-83.
- [10] Jin H, Huan Z, Wu Y, *et al.* Lirb4 ameliorates ileal injury in rats with hemorrhagic shock and suppresses the activation of NF- κ B signaling pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(4): 167082.
- [11] Huang Q, Wang Y, Zhang Z, *et al.* Organ dysfunction induced by hemorrhagic shock: from mechanisms to therapeutic medicines[J]. *Pharmacol Res*, 2025, 216: 107755.
- [12] Bergis B, Laemmel E, Laitselart P, *et al.* Effects of hemorrhagic shock and rhabdomyolysis on renal microcirculation, oxygenation, and function in a female swine model[J]. *Anesthesiology*, 2024, 141(3): 554-565.
- [13] Zhang P, Bai L, Tong Y, *et al.* CIRP attenuates acute kidney injury after hypothermic cardiovascular surgery by inhibiting PHD3/HIF-1 α -mediated ROS-TGF- β 1/p38 MAPK activation and mitochondrial apoptotic pathways[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 61.
- [14] Zhang J, Jia Z, Zhang J, *et al.* Identification of M2 macrophage-related genes associated with diffuse large B-cell lymphoma via bioinformatics and machine learning approaches[J]. *Biol Direct*, 2025, 20(1): 58.
- [15] Guo W, Chen H, Wang F, *et al.* Identifying potential three key targets gene for septic shock in children using bioinformatics and machine learning methods[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1586584.
- [16] Wu YK, Liu CD, Liu C, *et al.* Machine learning and weighted gene co-expression network analysis identify a three-gene signature to diagnose rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1387311.
- [17] 江晶洁,刘涛,林双君.基于莽草酸途径微生物合成芳香族化合物及其衍生物的研究进展[J]. *生命科学*, 2019, 31(5): 430-448.
- [18] Guan Y, Chen X, Wu M, *et al.* The phosphatidylethanolamine biosynthesis pathway provides a new target for cancer chemotherapy[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(4): 746-760.
- [19] Gohil VM, Zhu L, Baker CD, *et al.* Meclizine inhibits mitochondrial respiration through direct targeting of cytosolic phosphoethanolamine metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(49): 35387-35395.
- [20] Oakhill J S, Steel R, Chen Z P, *et al.* AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase[J]. *Science (New York, NY)*, 2011, 332(6036): 1433-5.
- [21] Mendoza EE, Pocceschi MG, Kong X, *et al.* Control of glycolytic flux by AMP-activated protein kinase in tumor cells adapted to low pH[J]. *Transl Oncol*, 2012, 5(3): 208-216.
- [22] Schoenmakers E, Chatterjee K. Human disorders affecting the selenocysteine incorporation pathway cause systemic selenoprotein deficiency[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33(7): 481-497.
- [23] Barchielli G, Capperucci A, Tanini D. The role of selenium in pathologies: an updated review[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2): 251.
- [24] Pothion H, Jehan C, Tostivint H, *et al.* Selenoprotein T: an essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33(17): 1257-1275.
- [25] Vaghari-Tabari M, Jafari-Gharabaghloou D, Sadeghsoltani F, *et al.* Zinc and selenium in inflammatory bowel disease: trace elements with key roles[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199(9): 3190-3204.
- [26] Hu W, Zhao C, Hu H, *et al.* Food sources of selenium and its relationship with chronic diseases[J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1739.
- [27] Gärtner R, Albrich W, Angstwurm MW. The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma[J]. *BioFactors (Oxford, England)*, 2001, 14(1-4): 199-204.
- [28] Huang JF, Hsu CP, Ouyang CH, *et al.* The impact of selenium supplementation on trauma patients-systematic review and Meta-analysis[J]. *Nutrients*, 2022, 14(2): 342.
- [29] Mullen NJ, Singh PK. Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic dependency[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(5): 275-294.
- [30] Shi DD, Savani MR, Abdullah KG, *et al.* Emerging roles of nucleotide metabolism in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2023, 9(8): 624-635.

(责任编辑: 蒋铭敏, 张小利)