

• 综 述 •

脓毒症患者循环游离 DNA 甲基化特征及其临床应用前景*

晏梓豪¹综述, 龚 艺^{2△}审校

重庆医科大学附属第一医院: 1. 检验科; 2. 输血科, 重庆 400016

摘要: 脓毒症是感染诱发的宿主失调性炎症反应所致的器官功能障碍, 具有高发病率和高病死率。循环游离 DNA(cfDNA)作为一种来源于细胞凋亡、坏死及免疫过程的分子标志, 近年来受到广泛关注。cfDNA 不仅在浓度水平上反映机体组织损伤, 其片段组学和甲基化特征更携带组织来源及免疫状态信息, 为脓毒症的诊断、分型及预后评估提供了新的思路。该文总结了 cfDNA 甲基化的检测方法、脓毒症患者 cfDNA 甲基化特征的研究进展, 分析其在器官损伤监测、免疫失衡评估及疾病预后中的应用潜力, 并提出当前研究尚待解决的问题。

关键词: 脓毒症; 循环游离 DNA; DNA 甲基化; 免疫失衡; 预后评估

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2026.01.016

中图法分类号: R589; R730.4

文章编号: 1673-4130(2026)01-0091-06

文献标志码: A

**Methylation characteristics of circulating cell-free DNA in sepsis patients
and their clinical application prospects***

YAN Zihao¹, GONG Yi^{2△}

1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Blood Transfusion, the First
Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, characterized by high incidence and mortality. Circulating cell-free DNA (cfDNA), released from apoptosis, necrosis, and immune processes, has attracted increasing attention in recent years as a molecular biomarker. Beyond reflecting tissue injury at the concentration level, cfDNA fragmentomics and methylation profiles also carry information on tissue origins and immune status, providing new insights into the diagnosis, subtyping, and prognostic evaluation of sepsis. This review summarizes current methodologies for cfDNA methylation detection, highlights recent advances in the study of cfDNA methylation features in sepsis patients, and discusses their potential applications in monitoring organ injury, assessing immune dysregulation, and predicting outcomes. Furthermore, we outline the key challenges that remain to be addressed in this emerging field.

Key words: sepsis; circulating cell-free DNA; DNA methylation; immune dysregulation; prognostic evaluation

循环游离 DNA(cfDNA)是存在于血浆中的无细胞 DNA 片段, 其甲基化图谱具有组织特异性, 可作为“分子指纹”指示受损组织^[1]。近些年随着高通量测序与解卷积算法的发展, cfDNA 甲基化的组织溯源能力被系统证实^[2], MOSS 等^[1]构建的人体细胞类型甲基化图谱为其奠定了基础。随后多项工作在重症与感染场景中揭示了 cfDNA 与病情严重程度及器官损伤的相关性, 提示其在脓毒症监测中的潜在价值^[3-4]。

1 cfDNA 甲基化检测与分析方法

cfDNA 的片段通常较短且丰度有限, 在有限样本

条件下准确检测 cfDNA 甲基化一直是该领域的技术难点。随着测序及分子检测技术的发展, cfDNA 甲基化分析方法不断演进, 从早期的全基因组检测逐渐拓展到低输入量富集策略和靶向定量检测, 并结合计算方法实现组织来源的推断。这些进展不仅提升了检测灵敏度和特异性, 也为 cfDNA 在脓毒症等复杂疾病中的应用奠定了技术基础。以下将对主要检测方法及其特点进行概述。

1.1 传统方法与局限性 在 cfDNA 甲基化研究的早期, 亚硫酸氢盐测序(BS)被广泛应用, 并被视为获取

* 基金项目: 重庆市医学科研项目(2024ZDXM002)。

△ 通信作者, E-mail: 532933936@qq.com。

全基因组 CpG 位点甲基化信息的“金标准”^[5]。该方法通过将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,从而实现对甲基化状态的识别。然而,BS 在处理过程中往往导致 DNA 片段的大量降解,对样本起始量和测序深度要求较高,对于本身含量低、片段短的 cfDNA 并不适用^[6]。尽管近年来出现了酶促甲基化测序(EM-seq)、碱基转化辅助测序(TAPS)等改良技术,能在一定程度上降低 DNA 损伤,但成本和应用范围仍存在局限^[7-8]。

1.2 富集与低输入技术 针对 cfDNA 样本量有限的特点,富集型甲基化检测方法逐渐兴起。以细胞游离 DNA 甲基化免疫沉淀测序(cfMeDIP-seq)为代表的技术,利用抗 5-甲基胞嘧啶抗体富集甲基化 DNA 片段,从而显著提高了检测灵敏度,并避免了亚硫酸盐处理带来的额外降解。该方法能在极低输入量条件下获得可靠的甲基化谱,适合脓毒症等急危重症患者血浆样本的分析^[9]。需要注意的是,这类方法通常以区域水平检测为主,难以实现单碱基分辨率,但在实际应用中依然显示出较高的可行性^[10]。

1.3 靶向与数字定量方法 在临床应用层面,靶向检测和数字化定量技术的优势更加突出。靶向甲基化测序可针对特定的组织特异性位点进行检测,灵敏度和特异度均较高,且具有较好的成本效益。对于明确的甲基化标志物,数字 PCR[如微滴式数字 PCR(ddPCR)]可实现绝对定量,即使在 cfDNA 丰度极低的情况下也能获得准确结果。例如,Septin 9 基因(SEPT9)甲基化标志在结直肠癌筛查中已有商业检测应用(Epi proColon 检测系统),虽然当前主要采用甲基定量 PCR 方法,但最近也有研究尝试利用 ddPCR 检测 SEPT9 和 SHOX2 基因等标志物,其在低丰度 cfDNA 样本中表现出良好灵敏度和定量精度^[11-12]。这类方法为脓毒症相关器官损伤标志物的快速检测提供了可借鉴的思路。

1.4 解卷积算法与组织来源分析 除了实验技术的进步,算法的发展也极大拓展了 cfDNA 甲基化的应用空间。通过参考甲基化图谱(如 MethAtlas),结合解卷积算法(如 cfSort),能够在血浆 cfDNA 中分离出不同组织的甲基化信号,从而推断 cfDNA 的组织来源。在脓毒症研究中,这一方法已被用于揭示免疫细胞和肝脏来源 cfDNA 的比例变化,与临床器官功能障碍情况高度一致^[13]。但是在全身炎症和多器官损伤并存的情况下,血液细胞片段往往占据主导地位,可能掩盖其他组织信号^[14],提示现有算法在临床应用中仍需进一步优化。

2 cfDNA 甲基化与脓毒症发生发展

脓毒症最严重的后果之一是多器官功能障碍综

合征(MODS)。传统上是通过临床指标和生化参数来判断器官损伤程度,但这些指标往往缺乏特异性,并且往往滞后于器官组织损伤的分子或细胞改变。基于 cfDNA 甲基化的分析有潜力实现对器官损伤的早期、动态监测,由于不同组织或细胞释放到循环中的 cfDNA 携带其独有的甲基化“指纹”,检测这些信息可在分子水平捕捉各器官的损伤信号。

2.1 cfDNA 总量与病情严重度的关联 DADAM 等^[15]研究表明,脓毒症组 cfDNA 水平较对照组大幅升高(标准差约 3.30),且非存活者的 cfDNA 水平也显著高于存活者^[15]。此外,cfDNA 水平随着脓毒症严重度[如序贯器官衰竭(SOFA)评分]的增加而上升,并与 28 d 病死率相关^[16]。在最近的一项前瞻性研究中,DE MIRANDA 等^[16]在 94 例脓毒症及感染患者中分析了核 cfDNA(cf-nDNA)与线粒体 cfDNA(cf-mtDNA)水平与临床严重度指标的关联性。研究结果显示,仅用 L1PA2_90 靶点检测的 cf-nDNA 即可将“感染”与“脓毒症”两组区分开来,曲线下面积(AUC)为 0.817(95%CI:0.725~0.909),灵敏度与特异度分别约为 77.0%和 79.3%;而将 cf-nDNA 与 SOFA 评分联合使用后,该模型诊断分层能力显著提升,AUC 提高至 0.916(95%CI:0.853~0.979),灵敏度为 88.1%,特异度为 80.0%。该研究还发现,在被诊断脓毒症后需要 ICU 收治者中,联合模型在识别可能需要 ICU 收治的患者时表现尚可(AUC = 0.753),但特异度偏低(仅约 50.0%),这提示在不同临床情境下联合模型的性能可能受限制。

2.2 特定器官来源的甲基化标志物在器官损伤中的作用 脓毒症相关急性肾损伤(SI-AKI)是脓毒症常见的并发症之一^[17]。肾脏细胞损伤(包括肾上皮与肾内皮细胞)可释放肾源性 cfDNA 进入循环^[4],通过 cfDNA 甲基化解卷积,可定量评估肾来源 cfDNA 的比例变化。YOU 等^[4]的研究首次验证了肾特异甲基化标记对 SI-AKI 的监测价值:与无 AKI 的脓毒症患者相比,SI-AKI 患者血浆中源自肾小管上皮细胞的 cfDNA 相对贡献显著升高(中位数 1.34%,脓毒症无 AKI 者为 0.83%,健康对照者为 0.84%)。更重要的是,肾源性 cfDNA 这一指标对 SI-AKI 的判别具有较高准确性,其 AUC 达到 0.920,而同期总 cfDNA 水平的 AUC 约为 0.890。这提示相对于粗略的总 cfDNA 量,甲基化分析得到的肾特异 cfDNA 指标具有更优的诊断效能。此外,肾源性 cfDNA 水平与传统肾功能指标并不直接相关,其水平与同期血清肌酐无显著相关性($r=0.44, P>0.05$),与同期尿量也无相关性($r\approx 0.00, P\approx 0.99$),表明 cfDNA 甲基化检测反映肾

脏组织细胞的真实损伤程度早于功能障碍指标的变化。

肝脏是清除 cfDNA 的重要器官,同样易受脓毒症影响^[18-19]。脓毒症时,肝细胞受损可释放肝源性 cfDNA,而肝清除功能下降又可能加剧 cfDNA 在循环中的积聚^[3],使肝来源 cfDNA 的变化更为复杂。目前肝源 cfDNA 的特定甲基化标志物在肝损伤监测中已显示出良好的作用。在 LEHMANN-WERMAN 等^[20]的研究中,通过鉴定肝实质细胞特异性去甲基化 CpG 位点(如靠近 ITIH4、IGF2R 和 VTN 基因的区域),成功将这些标志物用于检测肝源 cfDNA 在混合样本中的水平。在健康个体中这些肝源标志物水平较低,而在脓毒症患者中,其水平显著升高,并与丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)等传统肝功能损害指标显著相关。在 CANO-GAMEZ 等^[13]的研究中,甲基化基础的组织溯源分析进一步证明,在肝功能不全的脓症患者中,肝实质肝细胞与 Kupffer 细胞来源的 cfDNA 占比有明显增加,这也与临床上 ALT 等肝酶指标同步上升。该研究强调,利用甲基化图谱识别组织来源变化,能为判断肝脏受损的严重程度提供补充信息。

脓毒症可引发急性心功能抑制,即所谓的脓毒症心肌病^[21],其特点是可逆的心排出量下降和射血分数降低,被认为与炎症因子冲击和心肌微循环障碍有关^[22-23]。尽管脓毒症心肌损伤不像心肌梗死那样造成大量心肌细胞坏死,但仍可能有心肌细胞凋亡及损伤发生^[24-25]。ZEMMOUR 等^[26]通过鉴定心肌细胞特异性去甲基化基因座 FAM101A,实现心肌来源 cfDNA 在血浆中的量化。他们发现脓症患者中心肌 cfDNA 水平显著升高,并且与病死率高度相关,优于肌钙蛋白等部分传统心肌标志物。而 cfDNA 甲基化分析为检测微小的心肌损伤进一步提供了新思路。已有研究在非感染情况下(心肌梗死)建立了心脏特异性 cfDNA 标志物检测方法;REN 等^[27]应用高通量甲基化测序筛选出 6 个心脏特异高甲基化的 CpG 位点(位于 CORO6、CACNA1C、OBSCN 等基因),并据此开发了针对其中核心位点 CORO6 的 ddPCR 检测。该方法能够清晰地检测出心肌梗死患者入院时血浆中心源性 cfDNA 水平的升高。不过,目前专门针对脓症患者中心肌 cfDNA 或心肌特异性甲基化位点的研究仍然非常有限,大多数为单个时间点或横断面分析,关于不同严重程度分层及纵向动态监测的研究仍显不足。

重症肺损伤和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是脓毒症器官功能障碍的重要组成部分^[28]。相比其他脏

器,肺组织在脓毒症中常出现弥漫性肺泡损伤和上皮细胞受损^[29]。利用 cfDNA 甲基化解卷积可以量化肺组织来源的 cfDNA,从而无创监测肺损伤程度。以新型冠状病毒感染(COVID-19)的重症肺损伤为模型的研究提供了有力证据:LI 等^[30]分析 COVID-19 患者血浆中 cfDNA 的甲基化图谱,发现重症患者中肺泡上皮、支气管上皮和肺内皮来源 cfDNA 水平显著高于非重症患者或健康对照者;肺泡上皮来源的 cfDNA 在区分 COVID-19 重症与非重症患者中的 AUC 达 0.958 和 0.941,并且该指标预测 SOFA 评分及住院死亡率的 AUC 分别为 0.919 和 0.955,表明肺源特异性 cfDNA 信号与肺损伤严重程度及患者预后密切相关。此外,MAGENHEIM 等^[31]开发的肺上皮特异性甲基化标记可用于敏感检测肺源 cfDNA,在肺疾病(包括慢性阻塞性肺疾病急性加重、肺癌)中肺源 cfDNA 水平升高已被观察到,支持肺损伤监测的可能性。

2.3 免疫细胞甲基化重塑与炎症状态 脓毒症患者的 cfDNA 部分来源于免疫细胞的凋亡和细胞外释放。在这些来源中,先天免疫细胞(如中性粒细胞、单核/巨噬细胞)与适应性免疫细胞(如淋巴细胞)都有重要贡献^[1]。因此,cfDNA 的细胞来源特征能够部分反映免疫系统在感染过程中的受损程度与炎症负荷^[32]。例如,在重症感染中,大量中性粒细胞趋化到感染灶并经历细胞死亡的过程,其中包括产生网状中性粒细胞胞外陷阱(NETs)等,会造成粒细胞来源 cfDNA 急剧升高^[33-34]。LI 等^[30]的研究显示,重症 COVID-19 患者的 cfDNA 中 B 细胞、T 细胞和中性粒细胞来源比例明显高于轻症患者,而自然杀伤细胞(NK 细胞)来源的 cfDNA 占比相对降低。这提示重症状态下适应性免疫损耗加强,同时先天免疫过度激活,而 NK 细胞来源比例下降提示其在重症状态下可能存在功能受损或免疫抑制。类似的现象亦在脓毒症人群中存在,有研究显示,NK 细胞数量和活性下降与免疫抑制及不良预后密切相关^[35]。目前鲜见对脓症患者 cfDNA 来源构成的纵向监测研究,但现有证据提示 cfDNA 来源比例的动态变化可能与脓毒症免疫反应由高炎症向免疫抑制转变的阶段过程相对应。

目前关于淋巴细胞、NK 细胞甲基化的研究仍有限,大多数证据集中在单核/巨噬细胞,因此后文重点介绍该细胞类型的甲基化异常。单核/巨噬细胞在经历内毒素耐受后表现为促炎基因表达下降、抗炎基因上调,以及抗原呈递能力减弱(HLA-DR 下降,PD-L1 等抑制性分子上调)^[36]。这一功能表型的维持部分依赖于表观遗传调控,其中 DNA 甲基化的作用日益受

到关注^[37]。LORENTE-SOROLLA 等^[36]对脓毒症患者单核细胞的甲基化组进行了分析,发现脓毒症患者的单核细胞基因组甲基化出现广泛改变,相比健康人呈现特定基因座的高甲基化或低甲基化。这些差异甲基化与关键的免疫调节因子密切相关;研究证明单核细胞 DNA 甲基化谱变化与患者血浆中白细胞介素-6、白细胞介素-10 等炎症因子水平呈显著相关,并且与患者的 SOFA 评分等器官功能指标相关联。也就是说,甲基化改变程度大的患者往往伴有更高的免疫抑制因子水平和更严重的器官功能障碍。该团队后续通过体外脂多糖刺激实验及离体单核细胞样本分析发现,耐受性基因在第一次接触革兰阴性菌内毒素时,其表达与 DNA 甲基化状态发生重编程,并且这一重编程过程依赖于 JAK2-STAT 通路^[38]。这一结果支持这样一种观点:脓毒症中免疫细胞向耐受(低反应性)表型转变,与 DNA 甲基化介导的基因沉默或激活存在密切关联。因此,cfDNA 甲基化不仅是反映免疫细胞损伤与免疫表型转变的潜在分子标志物,也可能在驱动免疫功能失衡过程中发挥重要作用。

2.4 释放机制与清除机制对甲基化图谱的影响 正常情况下,细胞凋亡产生的短片段 cfDNA 可被血浆中的核酸酶(如 DNases I)降解,并通过肝脾的巨噬细胞吞噬系统清除,低分子量片段也可能被肾脏滤过以维持血浆 cfDNA 的低稳态浓度^[39-41]。健康人 cfDNA 半衰期仅为几分钟至两小时^[39],表明机体能迅速移除大部分游离 DNA 碎片。在脓毒症等危重状态下,这一动态平衡被打破:非常规死亡形式如凋亡、坏死及 NETs 形成过程中可释放 cfDNA 片段^[30,42]。同时,肝脏等清除器官功能受损使 cfDNA 的清除效率下降。CANO-GAMEZ 等^[13]研究中发现脓毒症患者血浆 cfDNA 较健康人升高约 41 倍,其组织来源组成在两组间相似,但末端基序与片段长度分布发生了改变,即 cfDNA 在循环中滞留时间延长,受到核酸酶持续消化导致片段特征不同。如前文所述,脓毒症时中性粒细胞、淋巴细胞、实质器官细胞均大量释放 cfDNA,然而清除途径的削弱使这些来源的 cfDNA 在血中大量滞留,最终体现在甲基化解卷积分分析中表现为各组织来源 cfDNA 绝对含量和相对贡献的改变。

3 cfDNA 甲基化与脓毒症预后

有研究通过临床队列分析证明,高水平的血浆 cfDNA 与脓毒症患者不良预后(较高死亡率)之间存在显著相关^[43]。有研究进一步指出,cfDNA 的预后预测效能可优于传统 APACHE II 评分,将二者结合能够提高死亡风险评估的准确性^[44]。随着研究的深入,针对 cfDNA 甲基化特征的分析为脓毒症预后评

估提供了新的视角。一项全基因组甲基化谱研究显示,脓毒症患者外周血中多种免疫相关基因出现低甲基化改变,且与 SOFA 评分及降钙素原等疾病严重程度指标密切相关。其中,SLX4 基因的低甲基化对预测患者死亡等不良结局具有较高价值(AUC $\approx$ 0.821)^[45]。值得一提的是,脓毒症后期的免疫抑制状态同样伴随特定基因甲基化异常。例如白细胞介素 10、TREM1 等免疫调节基因在脓毒症休克患者中甲基化水平显著改变,提示 cfDNA 甲基化特征有望反映机体免疫功能状态的动态变化^[46]。

不只是观察性的临床研究,一些动物实验也从干预角度支持 DNA 甲基化对预后可能具有调节作用。在盲肠结扎穿孔或内毒素诱导的严重脓毒症动物模型中,应用 DNA 甲基转移酶抑制剂(DNMT 抑制剂)可显著降低 DNMT1、DNMT3A 等甲基化酶的表达,抑制 NF- κ B 通路活化,并减少炎症介质释放,从而改善生存率^[47]。在另外的肺损伤模型中,用 DNMT 抑制剂干预可减轻肺组织炎症和结构损害,并降低血清炎症因子水平^[48]。这些研究表明,通过表观遗传机制调节免疫与炎症反应是可行的,对脓毒症患者的预后评估与治疗策略具有启示意义。

此外,如前文所述,利用 cfDNA 甲基化图谱还可解析其组织来源可评估器官损伤程度。以上研究结果揭示,血浆 cfDNA 甲基化在脓毒症预后评估中具有重要潜力,不仅可用于预测患者的病死风险,还可反映宿主免疫状态改变及提示特定器官功能障碍的严重程度。但需要注意的是,当前有关 cfDNA 甲基化用于脓毒症预后评估的研究多为探索性,各研究采用的检测平台和分析策略存在较大异质性,尚未建立统一的评价标准。

4 展 望

近年来,有关 cfDNA 甲基化与脓毒症的研究逐渐增多,但要实现其在重症精准监测中的临床应用,仍面临诸多亟待解决的问题:(1)如何建立统一的 cfDNA 样本前处理标准并开展大规模多中心验证?不同研究在采血管类型、离心条件、样本保存等预分析环节存在差异,可能导致血细胞裂解和基因组 DNA 污染,从而干扰 cfDNA 检测结果。(2)如何完善甲基化参考图谱并优化解卷积分算法以适配复杂病理?脓毒症等多器官损伤状态下可能出现超出健康人数据库的新颖甲基化模式,现有算法难以准确分类。(3)如何开发快速经济的检测平台以实现床旁实时监测?当前的全基因组甲基化测序信息最全面但成本高、耗时长,难以满足临床实时性要求。临床更需要简便、迅速且费用可接受的 cfDNA 甲基化检测方法。

(4)能否针对表观遗传靶点进行干预并整合 cfDNA 标志用于个体化治疗? 已有研究提示, DNA 甲基化等表观遗传改变在脓毒症免疫失衡和器官损伤中发挥一定作用。若能明确关键甲基化调控酶或通路, 药物干预可能改善预后。

围绕样本处理、算法优化、检测平台与干预策略的深入研究, 将为 cfDNA 甲基化在脓毒症精准监测与个体化治疗中的应用奠定基础。随着检测技术的发展和多组学数据的积累, cfDNA 甲基化有望逐步进入临床决策流程, 成为危重症医学中的重要分子工具, 用于早期预警、风险评估与预后改善。

参考文献

- [1] MOSS J, MAGENHEIM J, NEIMAN D, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5068.
- [2] GAHAN P B, SCHWARZENBACH H, ANKER P. The history and future of basic and translational cell-free DNA research at a glance[J]. Diagnostics, 2022, 12(5): 1192.
- [3] CHAROENSAPPAKIT A, SAE-KHOW K, RATTANALIAM P, et al. Cell-free DNA as diagnostic and prognostic biomarkers for adult sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 19624.
- [4] YOU R, QUAN X, XIA P, et al. A promising application of kidney-specific cell-free DNA methylation markers in real-time monitoring sepsis-induced acute kidney injury[J]. Epigenetics, 2024, 19(1): 2408146.
- [5] LI Y, TOLLEFSBOL T O. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis[J]. Methods Mol Biol, 2011, 791: 11-21.
- [6] FENG S, ZHONG Z, WANG M, et al. Efficient and accurate determination of genome-wide DNA methylation patterns in Arabidopsis thaliana with enzymatic methyl sequencing[J]. Epigenetics Chromatin, 2020, 13(1): 42.
- [7] VAISVILA R, CHAITHANYA PONNALURI V K, SUN Z, et al. Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA[J]. Genome Res, 2021, 31(7): 1280-1289.
- [8] SIEJKA-ZIELIŃSKA P, CHENG J, JACKSON F, et al. Cell-free DNA TAPS provides multimodal information for early cancer detection[J]. Sci Adv, 2021, 7(36): eabh0534.
- [9] SHEN S Y, BURGNER J M, BRATMAN S V, et al. Preparation of cfMeDIP-seq libraries for methylome profiling of plasma cell-free DNA[J]. Nat Protoc, 2019, 14(10): 2749-2780.
- [10] GRISOLIA P, TUFANO R, IANNARONE C, et al. Dif-

ferential methylation of circulating free DNA assessed through cfMeDIP as a new tool for breast cancer diagnosis and detection of BRCA1/2 mutation[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 938.

- [11] WARREN J D, XIONG W, BUNKER A M, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer[J]. BMC Med, 2011, 9: 133.
- [12] GROSSI I, ASSONI C, LORINI L, et al. Evaluation of DNA methylation levels of SEPT9 and SHOX2 in plasma of patients with head and neck squamous cell carcinoma using droplet digital PCR[J]. Oncol Rep, 2024, 51(3): 8711.
- [13] CANO-GAMEZ K, MACLEAN P, INOUE M, et al. The circulating cell-free DNA landscape in sepsis is dominated by impaired liver clearance[J]. Cell Genom, 2025, 5(10): 100971.
- [14] SUN T, YUAN J, ZHU Y, et al. Systematic evaluation of methylation-based cell type deconvolution methods for plasma cell-free DNA[J]. Genome Biol, 2024, 25(1): 318.
- [15] DADAM M N, HIEN L T, MAKRAM E M, et al. Role of cell-free DNA levels in the diagnosis and prognosis of sepsis and bacteremia: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2024, 19(8): e0305895.
- [16] DE MIRANDA F S, CLAUDIO L M A M, DE ALMEIDA D S M, et al. Cell-free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for assessing sepsis severity[J]. Biomedicines, 2024, 12(5): 933.
- [17] PEERAPORN RATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GÓMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. Kidney Int, 2019, 96(5): 1083-1099.
- [18] KHIER S, GAHAN P B. Hepatic clearance of cell-free DNA: possible impact on early metastasis diagnosis[J]. Mol Diagn Ther, 2021, 25(6): 677-682.
- [19] GUO Y, GUO W, CHEN H, et al. Mechanisms of sepsis-induced acute liver injury: a comprehensive review[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 15: 1504223.
- [20] LEHMANN-WERMAN R, MAGENHEIM J, MOSS J, et al. Monitoring liver damage using hepatocyte-specific methylation markers in cell-free circulating DNA[J]. JCI Insight, 2018, 3(12): e120687.
- [21] L' HEUREUX M, STERNBERG M, BRATH L, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: a comprehensive review[J]. Curr Cardiol Rep, 2020, 22(5): 35.
- [22] HABIMANA R, CHOI I, CHO H J, et al. Sepsis-induced cardiac dysfunction: a review of pathophysiology[J]. Acute Crit Care, 2020, 35(2): 57-66.
- [23] HIRAIWA H, KASUGAI D, OKUMURA T, et al. Clinical implications of septic cardiomyopathy: a narrative re-

- view[J]. *Medicine*, 2024, 103(17):e37940.
- [24] KRISHNAGOPALAN S, KUMAR A, PARRILLO J E, et al. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8(5):376-388.
- [25] LONG X, YANG Y, ZHOU K. Sepsis induces the cardiomyocyte apoptosis and cardiac dysfunction through activation of YAP1/Serpine1/caspase-3 pathway [J]. *Open Med*, 2024, 19(1):20241018.
- [26] ZEMMOUR H, PLANER D, MAGENHEIM J, et al. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1443.
- [27] REN J, JIANG L, LIU X, et al. Heart-specific DNA methylation analysis in plasma for the investigation of myocardial damage [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1):36.
- [28] KIM W Y, HONG S B. Sepsis and acute respiratory distress syndrome: recent update [J]. *Tuberc Respir Dis*, 2016, 79(2):53-57.
- [29] XU H, SHENG S, LUO W, et al. Acute respiratory distress syndrome heterogeneity and the septic ARDS subgroup [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1277161.
- [30] LI Y Y, YUAN M M, LI Y Y, et al. Cell-free DNA methylation reveals cell-specific tissue injury and correlates with disease severity and patient outcomes in COVID-19 [J]. *Clin Epigenetics*, 2024, 16(1):37.
- [31] MAGENHEIM J, ROKACH A, PERETZ A, et al. Universal lung epithelium DNA methylation markers for detection of lung damage in liquid biopsies [J]. *Eur Respir J*, 2022, 60(5):3056.
- [32] CHENG A P, CHENG M P, GU W, et al. Cell-free DNA tissues of origin by methylation profiling reveals significant cell, tissue, and organ-specific injury related to COVID-19 severity [J]. *Med*, 2021, 2(4):411-422.
- [33] JACKSON CHORNENKI N L, COKE R, KWONG A C, et al. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2019, 7(1):29.
- [34] PIGNATARO G, GEMMA S, PETRUCCI M, et al. Unraveling NETs in sepsis: from cellular mechanisms to clinical relevance [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(15):7464.
- [35] WANG F, CUI Y, HE D, et al. Natural killer cells in sepsis: friends or foes? [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1101918.
- [36] 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.
- [37] WU D, SHI Y, ZHANG H, et al. Epigenetic mechanisms of Immune remodeling in sepsis: targeting histone modification [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2):112.
- [38] MORANTE-PALACIOS O, LORENTE-SOROLLA C, CIUDAD L, et al. JAK2-STAT epigenetically regulates tolerized genes in monocytes in the first encounter with gram-negative bacterial endotoxins in sepsis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:734652.
- [39] KUSTANOVICH A, SCHWARTZ R, PERETZ T, et al. Life and death of circulating cell-free DNA [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(8):1057-1067.
- [40] DERMODY S M, BHAMBHANI C, SWIECICKI P L, et al. Trans-renal cell-free tumor DNA for urine-based liquid biopsy of cancer [J]. *Front Genet*, 2022, 13:879108.
- [41] KOUDAHL CONRAD J B, VESTERMAN HENRIKSEN T, BERG NORS J, et al. The role of renal and liver function in clinical ctDNA testing [J]. *PLoS One*, 2025, 20(2):e0319194.
- [42] LIU F, SU Y, LIU X, et al. Cell-free DNA: a metabolic byproduct with diagnostic and prognostic potential in rheumatic disorders [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16:1537934.
- [43] UROSEVIC N, MERRITT A J, INGLIS T J J. Plasma cfDNA predictors of established bacteraemic infection [J]. *Access Microbiol*, 2022, 4(6):acmi000373.
- [44] DENNHARDT S, CEANGA I A, BAUMBACH P, et al. Cell-free DNA in patients with sepsis: long term trajectory and association with 28-day mortality and sepsis-associated acute kidney injury [J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1382003.
- [45] CAO L, ZHU T, LANG X, et al. Inhibiting DNA methylation improves survival in severe sepsis by regulating NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1360.
- [46] FU H, GAO B, ZHOU X, et al. DNA dioxygenase TET2 deficiency aggravates sepsis-induced acute lung injury by targeting ITGA10 via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2025, 30(1):60.
- [47] PONTI G, MACCAFERRI M, MANFREDINI M, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 479:14-19.
- [48] TILL J E, BLACK T A, GENTILE C, et al. Optimization of sources of circulating cell-free DNA variability for downstream molecular analysis [J]. *J Mol Diagn*, 2021, 23(11):1545-1552.