

慢性肾病患者血清 Klotho, HE4, UMOD 表达水平与疾病预后的相关性研究

赵智凝, 武 易, 刘 芳, 何 莹, 杨 荣, 景 涛 (第四军医大学西京医院检验病理科, 西安 710054)

摘要: 目的 研究慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)患者血清 Klotho, 人附睾蛋白 4(HE4)和尿调节素(UMOD)表达水平在评估疾病预后中的参考价值。方法 对 120 例 CKD 患者及 100 例健康体检对照者血清同时应用 ELISA 检测 Klotho 和 HE4, 电化学发光法检测 UMOD 表达水平, 分析各因子与肾小球滤过率(GFR)之间的关系。患者随访 12 个月后, 根据 GFR 下降幅度分为恶化组和稳定组, 比较两组之间血清因子变化差异, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析血清因子与预后的关系。结果 CKD 患者血清 Klotho, UMOD, GFR 和 HE4 表达水平与健康对照组相比, 差异均有统计学意义($t=22.492, 58.235, 23.668$ 和 33.341 , 均 $P<0.05$)。Klotho, UMOD 与 GFR 呈现正相关性($r=0.682, 0.582, P<0.001$), HE4 与 GFR 呈负相关性($r=-0.627, P<0.001$)。随访结束时血清 Klotho, UMOD 水平明显低于随访前, HE4 水平明显高于随访前, 恶性组患者的变化幅度与稳定组相比差异有统计学意义($t=13.263, 18.600$ 和 16.645 , 均 $P<0.001$)。随访 12 个月后患者死亡 45 例(37.50%), 高 Klotho, UMOD 水平组不良预后风险低于低 Klotho, UMOD 水平组, 高 HE4 水平组不良预后风险高于低 HE4 水平组, 差异均有统计学意义($\chi^2=4.511, 3.960, 7.484$; $P=0.034, 0.047, 0.006$)。结论 慢性肾病患者血清中 Klotho, HE4, UMOD 均存在异常表达, 其中血清 Klotho, UMOD 水平降低以及 HE4 水平升高可增加肾功能恶化风险, 三种血清因子联合可提高对预后评估的参考价值。

关键词: 慢性肾病; Klotho; 人附睾蛋白 4; 尿调节素; 预后相关性

中图分类号: R692; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-028-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.007

Study on the Relationship between the Expression Level of Klotho, HE4 and Uromodulin and the Development of Chronic Kidney Disease

ZHAO Zhi-ning, WU Yi, LIU Fang, HE Ying, YANG Rong, JING Tao

(Department of Laboratory Medicine and Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710054, China)

Abstract: Objective To study the significance of Klotho, HE4 and UMOD expression in patients with chronic kidney disease (CKD) in evaluating the prognosis of CKD. **Methods** the expression levels of Klotho and HE4 in peripheral blood of 120 CKD patients and 100 healthy patients were detected by ELISA, and the expression level of UMOD by electrochemiluminescence method. The relationship between various factors and glomerular filtration rate (GFR) were analysed. At the end of 12 months follow-up, according to the decrease of GFR, the patients were divided into deterioration group and stable group. The differences of serum factors between the two groups were compared, Kaplan-Meier survival curve was used to analyze the relationship between serum factors and prognosis. **Results** The expression levels of Klotho, UMOD, GFR and HE4 in CKD patients were significantly higher than those in healthy controls ($t = 22.492, 58.235, 23.668$ and 33.341 , all $P < 0.05$). Klotho and UMOD showed positive correlation with GFR ($r=0.682, 0.582, P<0.001$), the correlation coefficient was 0.682, 0.582, and the HE4 has a negative correlation with the GFR ($r=-0.627, P<0.001$). At the end of the follow-up, the level of serum Klotho, UMOD was significantly lower than that before the follow-up, and the level of HE4 was significantly higher than that before the follow-up. There was a significant difference between the malignant group and the stable group ($t=13.263, 18.600$ and 16.645 , all $P < 0.001$). 45 patients (37.50%) died after 12 months follow-up. The risk of adverse renal prognosis in high Klotho and UMOD group was lower than that in low Klotho and UMOD group, and the risk of adverse renal prognosis in high HE4 group was higher than that in low HE4 group ($\chi^2=4.511, 3.960, 7.484$; $P=0.034, 0.047, 0.006$). **Conclusion** Klotho, HE4 and UMOD are all abnormal expression in the serum of patients with chronic nephropathy, in which the decrease of serum Klotho and UMOD level and the increase of HE4 level can increase the risk of renal function deterioration, and three serum factors can improve the reference value for prognosis evaluation.

Keywords: chronic kidney disease; Klotho; human epididymis protein 4; uromodulin; prognosis correlation

基金项目: 陕西省科技厅社会发展项目(2020SF-167)。

作者简介: 赵智凝(1975-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 临床检验, E-mail: shirley_zzn@sina.com。

慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 以肾脏结构、功能改变为主要特征, 导致肾功能损害, 全球发病率为 8%~16%^[1-2]。目前常采用肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR)、尿清蛋白、肌酐作为评估肾功能的指标或者肾损伤标志物, 但一些干扰因素会影响结果的稳定性和可靠性^[1-3], 如 MISCHAK 等^[4]研究发现采用血清肌酐水平评估患者肾功能状态, 超过 50% 患者肌酐水平处于正常状态, 因此仍需要寻找可靠、有效的肾损伤标志物来评估 CKD 患者疾病的发生发展情况。虽然有很多血清指标可反映 CKD 的肾损伤程度, 但其临床价值仍未得到充分确证, 如 Klotho 蛋白主要在肾脏生成和代谢, 肾脏结构功能的改变均可影响 Klotho 的表达^[5,6], 人附睾蛋白 4 (human epididymis protein, HE4) 可在人肾脏纤维化状态中高表达, 通过抑制蛋白酶而调节肾纤维化组织重塑过程^[7], 尿调节素 (uromodulin, UMOD) 作为 T-H 糖蛋白, 其水平变化与 CKD 有关^[8]。目前关于血清 Klotho, HE4, UMOD 表达水平与 CKD 的预后关系报道尚不多见, 因此本文将通过实例进行探讨, 从而为临床诊治提供参考价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取我院 2017 年 4 月~2019 年 4 月期间收治的 120 例 CKD 患者, CKD 患者病程 4~15 年, 其中男性 72 例, 女性 48 例, 年龄 57.24 ± 2.34 岁, 体质指数 (BMI) 22.05 ± 2.27 kg/m²。选取同时段于我院体检中心检查健康者 100 例作为对照组, 其中男性 65 例, 女性 35 例, 年龄 56.81 ± 2.27 岁, 体质指数 (BMI) 22.47 ± 2.34 kg/m², 两组患者入组前的性别、年龄、BMI 比较差异均无统计学意义 ($\chi^2=0.580$, $P=0.446$; $t=1.376$, $P=0.170$; $t=1.347$, $P=0.179$)。患者入组前均签署知情同意书, 且该研究已获得伦理委员会批准。

纳入标准: ①肾小球滤过率 (GFR) < 60 ml/min, CKD 病史不低于 6 个月; ②具备认知、读写能力, 病历资料完整, 依从研究方案。

排除标准: ①有免疫、血液、神经系统疾病; ②急性肾损伤、肿瘤; ③每日糖皮质激素用量超过 10mg; ④ GFR < 60 ml/min; ⑤胃肠道、肺部、其他软组织感染。

1.2 仪器与试剂 Klotho, HE4, UMOD 检测试剂盒购自美国默沙克生物; 酶标仪采用赛默飞 Varioskan LUX; 电化学发光仪采用 Roche E601。

1.3 方法 患者入组后, 于随访前以及随访结束后清晨空腹抽取外周肘静脉血约 5 ml, 3 000r/min 离心 10min, 取上层血清于 -80℃ 冻存待用。采用赛默飞 Varioskan LUX 酶标仪测定血清 Klotho, HE4 水

平, 采用罗氏 E601 电化学发光仪检测血清 UMOD 水平。所有步骤严格按照试剂盒操作说明书进行。以患者随访前血清水平均值为临界值, 分为高水平组、低水平组, 比较不同组患者预后情况。

两组患者均随访 12 个月, 随访过程中均行常规排毒、降压等对症治疗, 随访前、结束后计算 GFR 值, 计算所有患者 GFR 下降幅度的均值, 若超过均值则判为肾功能恶化, 若低于均值则判为肾功能稳定^[9]。若随访 12 个月内患者死亡, 则提前终止随访, 以死亡前的随访结果为最终结果, 并判定为恶化。随访结束共有 45 例患者死亡, 11 例患者出现 GFR 下降幅度超过均值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件分析所有数据, 其中独立样本计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 计数资料以 $[n(\%)]$ 表示, 采用 χ^2 检验。指标间相关性评估采用 Pearson 相关性分析, 用 KaplanMeier 生存分析血清因子与预后的关系, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组和对照组血清 Klotho, HE4, UMOD 以及 GFR 水平 见表 1。研究组血清 Klotho, GFR 和 UMOD 显著低于对照组, HE4 水平显著高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。

表 1 研究组和对照组血清 Klotho, HE4, UMOD 以及 GFR 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 研究组 (n=120) | 对照组 (n=100) | t | P |
|----------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
| Klotho (ng/ml) | 2.55 \pm 0.48 | 8.17 \pm 2.46 | 22.492 | <0.001 |
| HE4 (pmol/L) | 342.45 \pm 86.35 | 72.53 \pm 18.45 | 33.341 | <0.001 |
| UMOD (ng/ml) | 59.62 \pm 10.53 | 129.35 \pm 27.85 | 23.668 | <0.001 |
| GFR (ml/min) | 39.45 \pm 5.53 | 109.35 \pm 10.89 | 58.235 | <0.001 |

2.2 血清 Klotho, HE4, UMOD 与 GFR 的关系 对患者血清 Klotho, HE4, UMOD 与 GFR 进行 Pearson 相关性分析, 结果显示 Klotho, UMOD 与 GFR 呈正相关性, $r=0.682, 0.582$, HE4 与 GFR 呈负相关性, $r=-0.627$, 均 $P < 0.001$ 。

2.3 恶性组、稳定组患者血清 Klotho, HE4, UMOD 变化程度 见表 2。随访结束时血清 Klotho, UMOD 水平明显低于随访前, HE4 水平明显高于随访前, 恶性组患者的变化幅度均明显高于稳定组患者, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。

2.4 不同血清水平患者的预后情况比较 见表 3。随访 12 个月死亡 45 例 (37.50%), 不同血清因子水平组患者死亡率统计学差异显著。Kaplan-Meier 曲线发现高 Klotho, UMOD 水平组不良肾

脏预后风险低于低 Klotho, UMOD 水平组, 高 HE4 水平组不良肾脏预后风险高于低 HE4 水平组, 见图 1~3。

表2 恶性组、稳定组患者血清 Klotho, HE4, UMOD 变化程度比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 恶性组 (n=56) | 稳定组 (n=64) | t | P |
|----------------|----------------|---------------|--------|--------|
| Klotho (ng/ml) | -0.95 ± 0.27 | -0.57 ± 0.16 | 9.212 | <0.001 |
| HE4 (pmol/L) | 122.25 ± 28.43 | 72.34 ± 16.45 | 11.554 | <0.001 |
| UMOD (ng/ml) | -9.56 ± 2.34 | -4.64 ± 1.56 | 13.351 | <0.001 |

表3 血清 Klotho, HE4, UMOD 水平与患者预后情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 血清因子 | 组别 | n | 生存 | 死亡 | χ^2 | P |
|--------|-----|----|----|----|----------|-------|
| Klotho | 高水平 | 63 | 45 | 18 | 4.511 | 0.034 |
| | 低水平 | 57 | 30 | 27 | | |
| HE4 | 高水平 | 66 | 36 | 30 | 3.960 | 0.047 |
| | 低水平 | 54 | 39 | 15 | | |
| UMOD | 高水平 | 62 | 46 | 16 | 7.484 | 0.006 |
| | 低水平 | 58 | 29 | 29 | | |

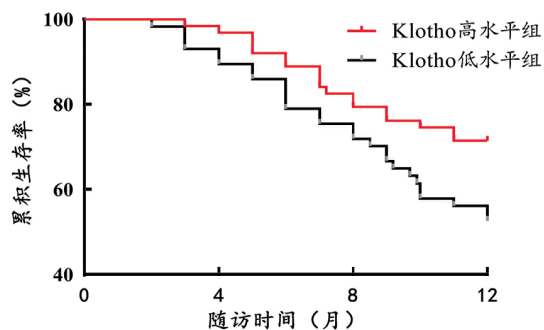


图1 Kaplan-Meier 曲线分析不同 Klotho 表达水平与患者预后的关系

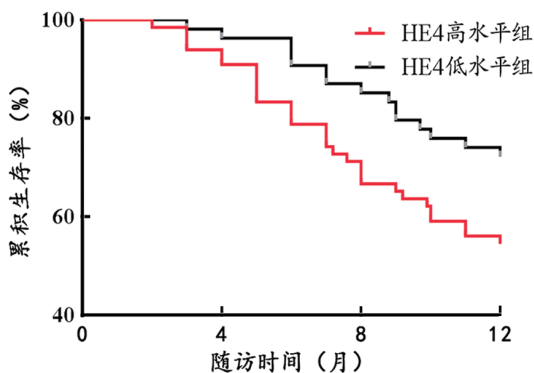


图2 Kaplan-Meier 曲线分析不同 HE4 表达水平与患者预后的关系

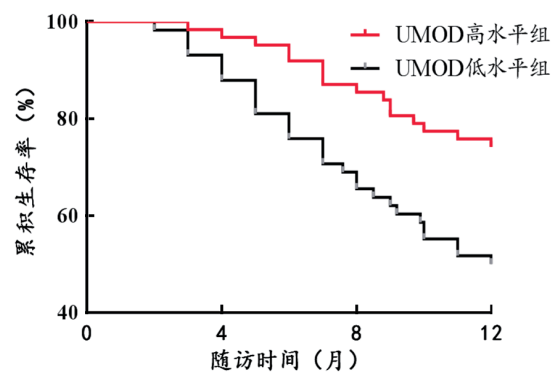


图3 Kaplan-Meier 曲线分析不同 UMOD 表达水平与患者预后的关系

3 讨论

随着人口老龄化以及生活习惯的改变, CKD 已成为临床常见病、多发病, 我国 CKD 患病率约为 10.8%, 其中 64 岁以上人群发病率 23.4%~35.8%^[3]。目前尚无有效的防治手段, 因此早发现、早干预以及预后评估对于提高 CKD 的存活率至关重要, 同时开展针对预后的生物标志物研究尤为迫切。2012 年全球改善肾脏病预后组织指南推荐通过计算 GFR 评估肾功能, 但越来越多研究发现脂质代谢异常、贫血、脑卒中、冠心病、衰老等均可降低 GFR, 从而影响评估准确性, 造成假阳性结果^[10-11]。Klotho 是近年来发现的肾脏保护因子, 其血清水平的降低与肾脏损伤的程度密切相关。此外, 分子遗传学检查发现 UMOD 基因突变可导致合成后的尿调节素多肽链失去正确的折叠能力, 沉积在内质网, 无法合成具有调节功能的尿调节素, 同时尿调节素异常沉积可加速肾小管细胞凋亡, 导致肾单位丧失和引起肾衰竭^[12]。HE4 是 WAP-4 二硫化物核心结构域 2 基因编码的产物, 可通过编码丝氨酸蛋白酶抑制剂而抑制肾脏纤维化, 延缓 CKD 进展^[13]。本次研究发现研究组患者血清 Klotho, GFR, UMOD 显著低于对照组, 且通过 Pearson 相关性分析显示 Klotho, UMOD 与 GFR 呈正相关性, HE4 与 GFR 呈负相关性, 表明 Klotho, GFR, UMOD 均可评估 CKD 患者肾功能状态。杨晓霞等^[14]研究发现外周血中 HE4 水平可随着 CKD 患者肾功能的下降而上升, 且与 GFR 呈负相关性, 与本次研究结果相近, 表明 HE4 可能作为 CKD 进展的血清生物学标志物, 用于预测 CKD 患者的预后情况。QIAN 等^[15]研究发现 CKD 患者的血清 Klotho 下降幅度越大, 患者肾功能状态越差, 则随访期间肾脏替代治疗风险越高, 这与本研究结果一致。Klotho 的降低可导致氧化应激、炎症反应以及凋亡等因素损伤肾脏功能, 加重疾病进展^[16], 血清 Klotho 水平降低幅度与肾功能的恶化程度相关, 故而恶化组患者下降幅度明

显高于稳定组患者。

本研究中120例受试者随访12个月后死亡45例(37.50%),且通过Kaplan-Meier曲线分析发现低Klotho, UMOD水平或者高HE4水平患者的预后较差,死亡风险较高,正如李莎莎等^[16]报道认为血清Klotho的降低不仅仅与肾脏损伤程度关联,同时通过长时间随访发现其可增加CKD患者进展至终末期肾脏病风险和死亡风险。Klotho功能多样,可通过自分泌或旁分泌的方式作用于肾脏,从而发挥抗炎、抗氧化以及抑制肾脏器官纤维化的作用,如Klotho可抑制肾脏上皮细胞-间充质细胞转分化引起的肾间质纤维化,以及抑制组织内质网应激介导的远端小管上皮细胞凋亡。LIU等^[17]研究发现Klotho通过调控核因子 κ B通路抑制炎症反应,从而干扰转化生长因子 β 1, Wnt信号通路,抑制肾间质纤维化,发挥肾脏保护作用。UMOD广泛存在于尿液中,具有抗菌作用^[18]。高UMOD排泄导致机体血清水平较低,可激活机体免疫功能,或者大量进入组织间质后,特别是受损伤的肾小管,与嗜中性白细胞结合而促进IL-8的合成,可诱导单核细胞分泌IL-1 β , TNF- α ,可增加淋巴细胞表面IL-2受体与HLA II类分子的表达等,从而导致炎症反应,引起慢性肾病的恶化,影响CKD患者的预后^[19]。杨丽霞等^[14,20]认为HE4是 α 平滑肌动蛋白的靶点,可在肾脏肌肉成纤维细胞中大量表达,在各种CKD患者血清中处于高表达状态,且与肾间质纤维化正相关。HE4可抑制金属基质蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等激酶活性,从而抑制胶原蛋白I的降解,使得I型胶原蛋白大量沉积于肾脏,从而引起肾脏纤维化,加速CKD进展和肾功能的恶化,故而本次研究发现血清低HE4水平患者死亡风险更高。血清学标志物应用于临床仍存在一定局限性,容易受到多种因素的干扰(炎症、氧化应激、高磷血症等),同时肾脏以外的其他器官也可分泌血清因子,如血管、脑组织、甲状旁腺等组织器官可分泌Klotho,因此在实际肾脏功能以及预后评估过程中需结合多种指标共同检测,从而提高评估效能。

综上所述,Klotho, HE4, UMOD均在慢性肾病患者血清中异常表达,其中血清Klotho, UMOD水平降低以及HE4水平增加可增加肾功能恶化风险,三种血清因子可为预后评估提供参考价值。

参考文献:

- [1] 田瑞,周芸.慢性肾脏病概念及分期诊断标准的演变和现状[J].国际移植与血液净化杂志,2018,16(1):1-4. TIAN Rui, ZHOU Yun. Chronic kidney disease: definition, evaluation and classification [J]. International Journal of Transplantation and Hemopurification, 2018, 16(1): 1-4.
- [2] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKJ K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. Lancet, 2013, 382(9888): 260-272.
- [3] 王旭,马清.不同公式计算的估算肾小球滤过率对老年慢性肾脏病预后的分析[J].中华老年多器官疾病杂志,2019,18(6):405-409. WANG Xu, MA Qing. Prognostic analysis of chronic kidney disease in the elderly with estimated glomerular filtration rate by various equations [J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2019, 18(6): 405-409.
- [4] MISCHAK H, DELLES C, VLAHOU A, et al. Proteomic biomarkers in kidney disease: issues in development and implementation[J]. Nature Reviews Nephrology, 2015, 11(4): 221-232.
- [5] HU Mingchang, SHI Mingjun, ZHANG Jianning, et al. Renal production, uptake, and handling of circulating alpha-Klotho[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2016, 27(1): 79-90.
- [6] 杨雄,尹爱萍.慢性肾脏病不同分期患者血清多项骨代谢指标变化与成纤维细胞生长因子23的相关性分析[J].现代检验医学杂志,2019,34(4):58-61, 66. YANG Xiong, YIN Aiping. Analysis of the correlation between serum bone metabolism and fibroblast growth factor 23 in patients with chronic kidney disease at different stages[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 58-61, 66.
- [7] 李安平,刘洪梅,李婵,等.血清ProGRP和HE4在慢性肾脏病患者中的临床意义[J].标记免疫分析与临床,2017,24(10):1123-1125. LI Anping, LIU Hongmei, LI Chan, et al. The clinical significance of serum proGRP and HE4 in patients with chronic kidney disease [J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2017, 24(10): 1123-1125.
- [8] RISCH L, LHOTTA K, MEIER D, et al. The serum uromodulin level is associated with kidney function[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014, 52(12): 1755-1761.
- [9] 李莎莎,叶建明,董晓红,等.血清Klotho水平对慢性肾脏病患者肾功能进展的预测价值[J].临床检验杂志,2017,35(9):666-670. LI Shasha, YE Jianming, DONG Xiaohong, et al. Predictive value of serum Klotho level for progression of renal function in patients with chronic kidney disease [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2017, 35(9): 666-670.
- [10] 张博旦,李寒,孙倩美.不同肾小球滤过率评估公式在老年人中的适用性分析[J].中华老年多器官疾病杂志,2018,17(4):313-317. ZHANG Bodan, LI Han, SUN Qianmei. Applicability analyses for glomerular filtration rate evaluation formula in the elderly [J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2018, 17(4): 313-317.
- [11] SHARDLOW A, MCINTYRE N J, FLUCK R J, et al. Chronic kidney disease in primary care: outcomes after five years in a prospective cohort study[J]. PLoS Med, 2016, 13(9): e1002128.