



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.09.009

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.09.009

• 论著 •

血清转化生长因子 β_1 、单核细胞趋化蛋白-1、低氧诱导因子-1 α 水平与慢性肾衰竭患者肠道菌群的相关性

陈豫闽 刘俊英 贾国强 郭志玲

[摘要] **目的** 研究血清转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 水平与慢性肾衰竭 (CRF) 患者肠道菌群的相关性。**方法** 纳入 2015 年 1 月 ~ 2019 年 1 月我院收治的 111 例 CRF 患者为 CRF 组,将同期于我院体检的健康者 50 例作为对照组,收集其一般资料 (性别、年龄、原发疾病)、临床资料 [血尿氮素 (BUN)、血清肌酐 (SCr)、血红蛋白 (Hb)、估算的肾小球滤过率 (eGFR)] 及血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平并比较。采用 Pearson 相关分析探讨 CRF 患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 与实验室指标及不同菌群的相关性。采用线性差别分析 (LDA) 分析菌种的差异。**结果** CRF 组患者 BUN、SCr、TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平与对照组相比均显著上升, eGFR 及 Hb 水平均显著下降 ($P < 0.05$)。Pearson 相关分析结果显示, CRF 患者血清 TGF- β_1 与 SCr 呈正相关, 与 eGFR 呈负相关 ($P < 0.05$); 血清 MCP-1 与 BUN、SCr 均呈正相关, 与 eGFR 呈负相关 ($P < 0.05$); 血清 HIF-1 α 与 BUN、SCr 均呈正相关, 与 eGFR 及 Hb 均呈负相关 ($P < 0.05$)。血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 与毛螺菌科、大肠埃希菌属及肠杆菌科水平均呈正相关, 血清 TGF- β_1 与克雷伯菌属水平呈正相关, 血清 TGF- β_1 、MCP-1 与疣微菌科水平均呈负相关, 血清 TGF- β_1 与双歧杆菌及乳酸杆菌水平均呈负相关, 血清 HIF-1 α 与双歧杆菌水平呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** CRF 患者存在肠道菌群失衡, 其条件致病菌丰度较健康者增加, 且与血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平相关, 提示肠道菌群失衡可能加重 CRF 患者炎症反应与肾纤维化, 参与 CRF 进程。

[关键词] 转化生长因子 β_1 ; 单核细胞趋化蛋白-1; 低氧诱导因子-1 α ; 慢性肾衰竭; 肠道菌群; 相关性分析

[中图分类号] R692

[文献标识码] A

Correlation of serum transforming growth factor β_1 , monocyte chemoattractant protein-1 and hypoxia inducible factor-1 α levels with the intestinal flora in patients with chronic renal failure

Chen Yumin, Liu Junying, Jia Guoqiang, Guo Zhiling. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Henan Science and Technology University, Luoyang 471000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation of serum transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) levels with intestinal flora in patients with chronic renal failure (CRF). **Methods** A total of 111 CRF patients admitted to our hospital from January 2015 to January 2019 were included in the CRF group, and 50 healthy subjects who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. General data (Gender, age, primary disease), clinical data [Blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), hemoglobin (Hb)], estimated glomerular filtration rate (eGFR)] and serum TGF- β_1 , MCP-1, HIF-1 α levels were recorded and compared between the two groups. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between serum TGF- β_1 , MCP-1, HIF-1 α , laboratory indexes and different bacterial flora in CRF patients. Linear discriminant analysis (LDA) was used to analyze the species differences of intestinal microbiota. **Results** The levels of BUN, Scr, TGF- β_1 , MCP-1 and HIF-1 α in CRF group were significantly higher than those in control group, and the levels of eGFR and Hb were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis

showed that serum TGF- β_1 was positively correlated with SCr, and negatively correlated with eGFR ($P < 0.05$); Serum MCP-1 was positively correlated with BUN and SCr, and negatively correlated with eGFR ($P < 0.05$); Serum HIF-1 α was positively correlated with BUN and SCr, and negatively correlated with eGFR and Hb. Serum TGF- β_1 and MCP-1 were positively correlated with Lachnospiraceae, Escherichia coli and Enterobacteriaceae levels, and serum TGF- β_1 was positively correlated with Klebsiella level; Serum TGF- β_1 and MCP-1 were negatively correlated with Verrucomicrobiaceae level, and serum TGF- β_1 was negatively correlated with Bifidobacterium and Lactobacillus level; Serum HIF-1 α was negatively correlated with Bifidobacterium level ($P < 0.05$). **Conclusion** The imbalance of intestinal flora of RF patients and the increase in abundance of conditioned pathogens are correlated with serum TGF- β_1 , MCP-1, and HIF-1 α levels, suggesting that the imbalance of the intestinal flora may aggravate inflammation and renal fibrosis, and participate in the development of CRF.

[Key words] Transforming growth factor β_1 ; Monocyte chemoattractant protein-1; Hypoxia inducible factor-1 α ; Chronic renal failure; Intestinal flora; Correlation analysis

慢性肾衰竭(CRF)是所有慢性肾病的终末结局,但其致病机制尚不清楚,血清转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 是最常见的致肾纤维化生长因子^[1],单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 参与免疫及炎症反应^[2],低氧诱导因子 (HIF)-1 α 高表达会促进纤维化因子表达^[3]。有研究显示,以上因子均与肾组织病变及肾脏疾病发展间存在密切联系,其血清浓度在反映肾衰竭病情中具有一定价值。而饮食改变、长期服药、肠道 pH 改变、肠道内蛋白质分解细菌数量增多等多种因素将造成 CRF 患者肠道菌群失衡^[4]。本文主要研究血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平与 CRF 患者肠道菌群间的关系,探讨肠道菌群失衡在 CRF 中的作用。

对象与方法

1. 对象:纳入 2015 年 1 月~2019 年 1 月我院收治的 111 例 CRF 患者为 CRF 组,其中男 61 例,女 50 例,年龄 22~65 岁,平均年龄(44.89 $\pm$ 16.58)岁,原发疾病分布:慢性肾小球肾炎 63 例,慢性间质性肾炎 33 例,糖尿病肾病 15 例。纳入标准:(1)符合《内科学》(第六版)中 CRF 的诊断标准;(2)血清肌酐(SCr)高于正常上限值,心力衰竭、感染得到控制;(3)未使用糖皮质激素或免疫抑制剂,且尚未进行透析治疗,估算的肾小球率过滤(eGFR) $< 50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1.73 \text{ m}^2)^{-1}$ 。排除标准:(1)合并心血管疾病、内分泌疾病、肝脏、肺脏、造血系统等严重原发疾病;(2)合并消化系统疾病;(3)合并恶性肿瘤、移植肾、孤立肾;(4)参与研究前 6 个月有手术史;(5)近期使用抗生素或益生菌等影响肠道菌群药物。将同期于我院体检的健康者 50 例作为对照组,其中男 28 例,女 22 例,年龄 23~66 岁,平均年龄(46.71 $\pm$ 15.22)岁,两组受试者性别及年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经我院伦理委员会审核批准,所有患者均签署知情同意书。

2. 方法

(1)一般资料和临床资料收集:收集患者的一般资料(性别、年龄、原发疾病)及实验室检查指标[尿素氮(BUN)、SCr、血红蛋白(Hb)],采用 EPI 公式^[5]计算 eGFR。

(2)血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平检测:采用生物素-亲和素双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ABC-ELISA)检测血清 TGF- β_1 水平,TGF- β_1 试剂盒由上海森雄科技实业公司提供。采用 ELISA 检测血清 MCP-1 及 HIF-1 α 水平,MCP-1 ELISA 试剂盒购自上海源叶锐谷生物科技有限公司,HIF-1 α ELISA 试剂盒购自江苏酶标生物科技有限公司。

(3)粪便采集及菌群分析:使用无菌采样盒收集受试者粪便标本,密封好后置入 -80°C 冰箱保存,使用德国 Invitex Biotechnology and Biodesign 公司生产的 DNA 提取检测试剂盒进行 16S rRNA 测序分析与菌群鉴定。菌群分析方法:使用 16S rRNA V4~V6 区引物进行 PCR 扩增,引物为 V4F(5'-GTGCCAGCMGCCGCG-GTAA-3')及 V6R(5'-ACAGCCATGCNCACCT-3'),共进行 25 个循环,使用 HiSeq 第二代高通量测序平台对 PCR 产物行双端测序,测序完成后,使用 Silva 数据库对样本进行物种对比与注释,使用 BugBase 进行表型预测。采用线性判别分析(LDA)分析菌种的差异。

3. 统计学处理:应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数和百分比表示,两组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组受试者实验室检查指标比较:CRF 组患者 BUN 及 SCr 水平与对照组相比均显著上升,eGFR 及 Hb 水平均显著下降($P < 0.05$)。见表 1。

2. 两组受试者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平比较:CRF 组患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平与

对照组相比均显著上升($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 两组受试者实验室检查指标比较($\bar{x} \pm s$)					
组别	例数	BUN (mmol/L)	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	eGFR [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1.73 \text{ m}^2)^{-1}$]	Hb (g/L)
CRF 组	111	12.01 $\pm$ 2.04	315.58 $\pm$ 35.27	41.15 $\pm$ 11.02	113.05 $\pm$ 20.31
对照组	50	4.16 $\pm$ 1.02	57.35 $\pm$ 11.25	128.15 $\pm$ 20.25	136.21 $\pm$ 20.57
t 值		25.766	50.549	35.216	6.669
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 两组受试者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	TGF- β_1 (ng/ml)	MCP-1 (pg/ml)	HIF-1 α (ng/L)
CRF 组	111	4.88 $\pm$ 0.25	164.54 $\pm$ 21.58	76.68 $\pm$ 11.25
对照组	50	4.02 $\pm$ 0.72	95.11 $\pm$ 13.52	19.32 $\pm$ 3.21
t 值		11.207	20.953	35.355
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

3. CRF 患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 与实验室指标的相关性分析: *Pearson* 相关分析结果显示, CRF 患者血清 TGF- β_1 与 SCr 呈正相关, 与 eGFR 呈负相关($P < 0.05$); 血清 MCP-1 与 BUN、SCr 均呈正相关, 与 eGFR 呈负相关($P < 0.05$); 血清 HIF-1 α 与 BUN、SCr 均呈正相关, 与 eGFR 及 Hb 均呈负相关($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 CRF 患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 与实验室指标的相关性分析								
项目	BUN		SCr		eGFR		Hb	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
TGF- β_1	0.13	0.913	0.41	0.022	-0.36	0.041	0.17	0.893
MCP-1	0.44	0.019	0.36	0.041	-0.57	0.011	-0.16	0.906
HIF-1 α	0.51	0.013	0.50	0.012	-0.41	0.022	-0.38	0.036

4. 两组受试者肠道菌群 LDA 值分布特征: 两组受试者肠道菌落差异分析见图 1。其中根据 LDA 分值可以看出, 对照组中疣微菌科、柔嫩梭菌属、双歧杆菌与乳酸杆菌相对丰度高于 CRF 组, 而 CRF 组中毛螺菌科、克雷伯菌属、大肠埃希菌属与肠杆菌科相对丰度高于对照组。

5. CRF 患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 与不同菌群水平的相关性分析: *Pearson* 相关分析结果显示, CRF 患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 与毛螺菌科、大肠埃希菌属及肠杆菌科水平均呈正相关, 血清 TGF- β_1

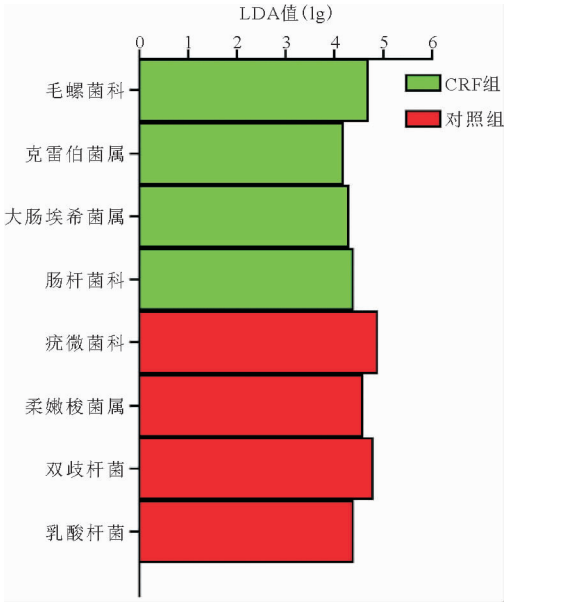


图 1 两组受试者肠道菌群 LDA 值分布特征

与克雷伯菌属水平呈正相关, 血清 TGF- β_1 、MCP-1 与疣微菌科水平均呈负相关, 血清 TGF- β_1 与双歧杆菌及乳酸杆菌水平均呈负相关, 血清 HIF-1 α 与双歧杆菌水平呈负相关($P < 0.05$)。见表 4。

讨 论

健康人的消化道内定居了约 100 万亿微生物, 其共同构成了复杂而庞大的微生态系统。正常情况下, 肠道菌群维持动态平衡, 参与人体消化吸收、能量代谢、免疫反应等生理活动, 与人体相互适应^[6]。CRF 是各种慢性肾脏病的终末结局, CRF 患者肾脏出现肾小管萎缩、肾小球硬化、肾间质纤维化等病理改变, 该病同时损害肠道屏障, 导致肠道微生态失衡。

CRF 导致肠道微生态失衡的具体机制尚未明确, 但可能与 CRF 患者结肠排空时间延长、肠道蠕动减慢、消化能力下降、肠道内可利用蛋白增多、患者血液尿素水平上升后其水解产生的氮水平增多导致肠腔粪便 pH 值改变、药物使用等原因相关^[7-8]。本文将 111 例 CRF 患者及 50 例健康者作为研究对象, 分析两组受试者肠道菌群特征, 结果发现, CRF 患者肠道菌群发生了改变, 对照组疣微菌科、柔嫩梭菌属、双歧杆菌及乳酸杆菌相对丰度高于 CRF 组, 而 CRF 组患者毛螺菌

表 4 CRF 患者血清 TGF-β ₁ 、MCP-1、HIF-1α 与不同菌群水平的相关性分析																
因素	毛螺菌科		克雷伯菌属		大肠埃希菌属		肠杆菌科		疣微菌科		柔嫩梭菌属		双歧杆菌		乳酸杆菌	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
TGF-β ₁	0.31	0.047	0.44	0.030	0.37	0.042	0.41	0.033	-0.32	0.048	0.13	0.861	-0.39	0.026	-0.41	0.034
MCP-1	0.44	0.027	0.21	0.073	0.33	0.039	0.39	0.041	-0.33	0.038	0.15	0.853	0.24	0.731	0.11	0.877
HFI-1α	0.37	0.041	0.21	0.072	0.34	0.033	0.36	0.043	-0.27	0.083	0.17	0.832	-0.31	0.049	-0.16	0.841

科、克雷伯菌属、大肠埃希菌属及肠杆菌科相对丰度高于对照组,提示 CRF 患者肠道微生态失衡。肠道微生态失衡将产生多种不良影响,肠道菌群失调可引起菌群移位、毒素增多及局部及全身炎症反应,加速肾功能恶化进展,增加患者不良预后风险,其具体致病机制尚未清楚^[9-10]。

相关研究表明,多种细胞因子均参与 CRF 患者肾脏病理改变,其中 TGF- β_1 是公认的致肾纤维化的重要生长因子,TGF- β_1 的过度堆积将导致肾组织细胞外基质过度沉积,促进肾组织纤维化^[11-12]。肾组织病理改变还与炎症反应密切相关。MCP-1 是一种对单核细胞具有趋化和激活活性的细胞因子,可特异性趋化单核细胞到组织,同时参与炎症反应、免疫调节,在 MCP-1 作用下,单核细胞与淋巴细胞聚集在内膜下发生一系列免疫及炎症反应,正常状况下,血清 MCP-1 水平较低^[13]。肾小球硬化与毛细血管疏松是肾小管缺氧的常见原因,与此同时,肾小管缺氧也将引起间质瘢痕的形成,导致肾小管萎缩,加速肾脏病变^[14]。有研究结果表明,当缺氧时,HIF-1 α 在肾脏上皮细胞上呈高表达,进而增加促纤维化因子的表达,加速肾纤维化^[15]。本研究结果发现,与对照组比较,CRF 组患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平均显著上升,且血清 TGF- β_1 与 SCr 水平呈正相关,与 eGFR 呈负相关,血清 MCP-1 与 BUN、SCr 水平均呈正相关,与 eGFR 呈负相关,血清 HIF-1 α 与 BUN、SCr 水平呈正相关,与 eGFR 及 Hb 水平呈负相关。提示肠道微生态失衡可能加重肾组织纤维化及炎症反应,参与 CRF 的发病机制。

分析 CRF 患者肠道菌群与血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平的关系发现,毛螺菌科、大肠癌细菌属及肠杆菌科与 CRF 患者血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平均呈正相关,血清 TGF- β_1 水平与克雷伯菌属呈正相关,血清 TGF- β_1 、MCP-1 水平与疣微菌科均呈负相关,血清 TGF- β_1 水平与双歧杆菌及乳酸杆菌均呈负相关。CRF 患者胃肠蠕动能力下降,消化能力减弱,消化道内尿素水平上升,以上变化将引起具有酚类、脲酶形成酶的细菌家族得到扩展,进一步加重患者肠道菌群失衡及炎症反应。同时,克雷伯菌属、大肠埃希菌属还可通过将磷脂酰胆碱与左旋肉碱转化为三甲胺,被肝黄素单加氧酶吸收,进一步氧化为三甲胺-N-氧化

物,加重患者炎症反应。以上研究结果均提示,CRF 患者肠道菌群失衡将促进组织炎症反应,加重肾组织纤维化,参与 CRF 的进程。

综上所述,CRF 患者肠道菌群失衡,其条件致病菌丰度较健康者增加,且与血清 TGF- β_1 、MCP-1、HIF-1 α 水平相关,提示肠道菌群失衡可能加重炎症反应与肾纤维化,参与 CRF 的进程。

参 考 文 献

- [1] Schardong J, Brito VB, Dipp T, et al. Intradialytic neuromuscular electrical stimulation reduces DNA damage in chronic kidney failure patients: a randomized controlled trial [J]. *Biomarkers*, 2018, 23 (1-8): 495-501.
- [2] 赵大军, 颜波, 马丽, 等. 成人过敏性紫癜肾炎病理分级与血清 TGF- β_1 、MCP-1、IL-17 水平的关系 [J]. *中国医师杂志*, 2019, 21 (6): 889-892.
- [3] Ryu DR, Yu MR, Kong KH, et al. Sirt1-hypoxia-inducible factor-1 α interaction is a key mediator of tubulointerstitial damage in the aged kidney [J]. *Aging Cell*, 2019, 18 (2): 12904.
- [4] 王美红, 张雅琼, 李荣山, 等. 慢性肾衰竭患者肠道菌群变化及其与肾功能的相关性 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2019, 35 (5): 359-366.
- [5] 徐文俊, 李甲勇, 李会丹. 不同 eGFR 公式与 ACR 联合应用在肾功能损伤高危人群中的临床价值 [J]. *检验医学*, 2021, 36 (1): 13-19.
- [6] 唐刚. 从生态学角度重新认识肠道菌群与肾脏疾病的关系 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2020, 29 (2): 176-180.
- [7] 韩文贝, 刘莹露, 万毅刚, 等. 慢性肾脏病肠道菌群失调的病理机制、治疗策略及中药的干预作用 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (13): 2425-2432.
- [8] 张梦佩, 黄光明. 肠道菌群微生态与慢性肾功能不全的研究进展 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2019, 24 (6): 685-688.
- [9] 刘欣欣, 冯爱平. 肠道微生态与肾脏疾病的相关性研究进展 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2018, 18 (2): 68-71.
- [10] 方戴琼, 顾思岚, 石鼎, 等. 人体肠道微生态与疾病发生发展的关系及机制研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28 (5): 614-617.
- [11] Asparuhova MB, Caballé-Serrano J, Buser D, et al. Bone-conditioned medium contributes to initiation and progression of osteogenesis by exhibiting synergistic TGF- β_1 /BMP-2 activity [J]. *Int J Oral Sci*, 2018, 10 (2): 20-22.
- [12] Schnieder J, Mamazhakypov A, Birnhuber A, et al. Loss of LRPI promotes acquisition of contractile-myofibroblast phenotype and release of active TGF- β_1 from ECM stores [J]. *Matrix Biol*, 2020, 88: 69-88.
- [13] Yu FPS, Dworski S, Medin JA. Deletion of MCP-1 Impedes Pathogenesis of Acid Ceramidase Deficiency [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 1808.
- [14] 窦一田, 李翀, 马鸿杰, 等. 辛通络法复方肾苏 II 阻抑局灶节段性肾小球硬化大鼠肾间质纤维化及转化生长因子 β_1 表达的影响 [J]. *天津医药*, 2017, 45 (3): 239-244.
- [15] Knight M, Braverman J, Asfaha K, et al. Lipid droplet formation in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages requires IFN- γ /HIF-1 α signaling and supports host defense [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14 (1): 1006874.

(收稿日期: 2020-12-14)

(本文编辑: 余晓曼)