

DOI:10.13350/j.cjpb.230618

• 临床研究 •

急性肾损伤患者血清 KLF8 和 CXCL8 水平 与肠道菌群的关系研究

张然^{1*}, 张晗²

(1. 中国医科大学附属盛京医院急诊科, 辽宁沈阳 110000; 2 武警辽宁省总队医院重症医学科)

【摘要】 **目的** 探讨急性肾损伤患者血清 Kruppel 样转录因子 8(KLF8)和 CXC 趋化因子配体 8(CXCL8)水平与肠道菌群的关系。 **方法** 选取 2020 年 2 月-2022 年 2 月本院收治的 80 例急性肾损伤患者作为实验组, 同期健康体检志愿者 80 例作为对照组。采用荧光定量 RT-PCR 检测 KLF8 和 CXCL8 mRNA 表达, 取患者粪便检测肠道菌群的数量, 比较不同组别血清 KLF8 和 CXCL8 表达的差异和粪便肠道菌群的数量差异; 对可能影响急性肾损伤发病的影响因素进行 Logistic 回归分析; 采用 Spearman 相关性分析 KLF8 和 CXCL8 表达与肠道菌群的相关性。 **结果** 和对照组相比, 实验组患者血清 KLF8 和 CXCL8 水平明显升高, 粪便肠道菌群双歧杆菌、拟杆菌明显降低, 大肠埃希菌、链球菌明显升高 ($P < 0.05$); I 期组、II 期组、III 期组血清 KLF8、CXCL8 mRNA 水平依次显著升高 ($P < 0.05$), 粪便双歧杆菌、拟杆菌水平依次显著降低, 大肠埃希菌、链球菌水平依次显著升高 ($P < 0.05$); Logistic 回归分析发现, 双歧杆菌、拟杆菌是影响急性肾损伤发病的保护因素 ($P < 0.05$); KLF8 和 CXCL8 的表达与双歧杆菌、拟杆菌呈负相关, 与大肠埃希菌、链球菌呈正相关。 **结论** 急性肾损伤患者血清 KLF8 和 CXCL8 水平显著升高, 其与肠道菌群异常有关。

【关键词】 急性肾损伤; KLF8; CXCL8; 肠道菌群; 相关性

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0713-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jun;18(6):713-716.]

Study on the relationship between serum KLF8 and CXCL8 levels and intestinal flora in patients with acute renal injury

ZHANG Ran¹, ZHANG Han² (1. Department of Emergency, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110000, China; 2. Department of Intensive Care Medicine, Liaoning Armed Police Corps Hospital) *

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between the levels of serum Kruppel-like transcription factor 8 (KLF8) and CXC chemokine ligand 8 (CXCL8) and intestinal flora in patients with acute renal injury. **Methods** Eighty patients with acute renal injury admitted to our hospital from February 2020 to February 2022 were collected as the experimental group, and 80 healthy volunteers in the same period were collected as the control group. The expression of KLF8 and CXCL8 mRNA was detected by fluorescence quantitative RT-PCR, the stool of the patient was taken to detect the number of intestinal flora, the differences in the expression of KLF8 and CXCL8 in serum and the number of intestinal microflora in feces among different groups were compared; Logistic regression analysis was performed on the factors that might affect the incidence of acute renal injury; Spearman correlation was applied to analyze the correlation between KLF8 and CXCL8 expression and intestinal flora. **Results** Compared with the control group, the levels of serum KLF8 and CXCL8 in the experimental group were obviously higher, the fecal intestinal microflora bifidobacteria and bacteroides were obviously lower, and the levels of *Escherichia coli* and streptococcus were obviously higher ($P < 0.05$); The mRNA levels of serum KLF8 and CXCL8 in stage I, II and III groups were significantly increased ($P < 0.05$), the levels of fecal bifidobacterium and Bacteroides were significantly decreased, and the levels of *E. coli* and *Streptococcus* were significantly increased ($P < 0.05$); Logistic regression analysis showed that bifidobacterium and bacteroides were protective factors affecting the pathogenesis of acute renal injury ($P < 0.05$); the expression of KLF8 and CXCL8 was negatively correlated with *Bifidobacteria* and *Bacteroides*, and positively correlated with *Escherichia coli* and *Streptococcus*. **Conclusion** The levels of serum KLF8 and CXCL8 in patients with acute renal injury are obviously increased, which is related to the abnormality of intestinal flora.

【Key words】 acute renal injury; KLF8; CXCL8; intestinal flora; correlation

* **【通讯作者(简介)】** 张然(1990-), 男, 吉林通化人, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事脓毒症方面研究, E-mail: zhangran3490@163.com

肾脏的基本功能是通过排尿,调节人体水、电解质、酸碱平衡,排出代谢产物。如果肾脏机能在规定时间内发生损伤,人体健康就会受到严重威胁,若病情持续加重,甚至可致使患者生命受到威胁^[1]。急性肾损伤的患病情况每年都在增加。全球每年有上亿人因多种不同原因导致急性肾损伤,死于急性肾损伤及其并发症的患者约有 200 万人。多种临床环境可造成急性肾损伤的发生,包括急性心力衰竭或败血症^[2]。肠道菌群的变化与包括代谢性疾病在内的很多疾病的发生、预后紧密相关,如心血管系统疾病、肿瘤^[3]。研究发现,急性肾损伤与肠道菌群的变化具有显著相关性。肾脏与肠道菌群建立的肾-肠轴在急性肾损伤的发展中起到的较为重要调节作用^[4]。Kruppel 样转录因子 8(Kruppel-like factor 8, KLF8)是一种具有转录抑制作用并且存在独特基序的蛋白结构,其 N 端通过和共抑制因子的 C 端结合蛋白作用从而对基因表达产生影响^[5]。其在生物机体内表达广泛,在细胞炎症、增殖和分化等方面起重要调节作用^[6]。在大部分机体组织里 KLF8 基因表达量基本无差异,但在有些器官中其表达量相对较高,如胎盘、肾脏^[7]。作为巨噬细胞、上皮细胞等分泌的细胞炎症因子,CXC 趋化因子配体 8(CXC chemokine ligand 8, CXCL8)的作用主要是通过嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等的激活进而促使肾小球炎症反应的加强^[8]。相关研究发现,作为肾脏疾病发病进展过程中影响机体炎症反应的常见因子,CXCL8 的降低对于改善肾功能至关重要。降低 CXCL8 水平的治疗方法能够降低炎症反应,保护机体肾脏^[9]。但 KLF8 和 CXCL8 与急性肾损伤患者肠道菌群的关系尚不清楚,因此本研究主要探讨急性肾损伤患者血清 KLF8 和 CXCL8 水平与肠道菌群的关系,以期为临床研究和治疗急性肾损伤提供一定的依据。

对象与方法

1 研究对象

选取 2020 年 2 月-2022 年 2 月本院收治的 80 例急性肾损伤患者作为实验组,年龄 24~68(49.20±9.23)岁,体质指数(21.23±1.33)kg/m²,男女比例 54:26。选取同期健康体检志愿者 80 例作为对照组,年龄 24~66(48.37±7.61)岁,体质指数(22.27±1.25)kg/m²,男女比例 53:27。纳入标准:(1)符合《改善全球肾脏病预后组织临床实践指南:急性肾损伤》中关于急性肾损伤诊断标准^[10];(2)基本研究资料完整清晰。排除标准:(1)伴有肺部其他疾病;(2)长期使用糖皮质激素;(3)自身免疫疾病、恶性肿瘤者;(4)严重肝、心功能不全者;(5)慢性肾损伤患者。

2 方法

2.1 样本收集 所有患者确诊 24 h 内(对照组为体检当天)收集空腹静脉血 3~4 mL,自然冷却至室温后进行血清分离,于-20 °C 冰箱中保存以备检测。粪便标本 10 g,置入干净的 PE 管中,于 4 °C 冰箱冷藏,5 h 内完成检测。

2.2 肠道菌群检测 采用荧光定量 PCR 检测粪便中双歧杆菌、拟杆菌、大肠埃希菌、链球菌等肠道菌群的数量,根据粪便细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海酶联生物)说明书完成菌群 DNA 提取,反应引物由北京华大基因合成,引物序列见表 1。细菌拷贝系数采用 logN/g 表示。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequences

基因 Gene	上游引物 5'-3' Upstream primer	下游引物 5'-3' Downstream primer
KLF8	CTACTGTTCTGACCCC AGGCTCT	GTCTTCAGGCCACCC ATCTTAT
CXCL8	GTTGTAGCGTAGCTAG ATGC	TTCTCGTGTGCAGTA TCTACG
U6	GTG CTCGATTTCGGCA CGACAT	GTTTA AGCAGTTGG CAAGCTA
双歧杆菌	CGATCACCCTCGAACA	CACTCGCTGGATCAT CTCCT
拟杆菌	AGAGTTTGATCTCG GCTCAG	GGTTACCTTGTTACG ACTT
大肠埃希菌	CAGGCACGCTATCAA ACTAG	TACGCTCTGACCTTT ATCCAG
链球菌	CCAGGATAGGCGCCA AGAAT	TTTTGAGCCATTTGC TGGGC

2.3 检测 KLF8 和 CXCL8 表达水平 按照 RNA 试剂盒(赛默飞生物科技有限公司)提取血清中 RNA。按照逆转录试剂盒(安捷伦公司)说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。将合成的 cDNA 稀释为统一浓度后,依据定量 PCR 试剂盒(天根生物科技公司)进行检测,配备 25 μL 反应体系:2 μL cDNA 模板、0.5 μL 引物、10 μL Mix、ddH₂O 配置到 25 μl。U6 作为内参,保存 Ct 值,表达量计算方法采用 2^{-ΔΔCt}。

2.4 分组 根据疾病分期不同^[11],将急性肾损伤患者分为 I 期组(29 例,急性肾损伤 I 期)、II 期组(26 例,急性肾损伤 II 期)及 III 期组(25 例,急性肾损伤 III 期),其中 I 期组男性 20 例,女性 9 例,年龄 23~67(48.33±8.64)岁;II 期组男性 18 例,女性 8 例,年龄 25~68(49.15±9.14)岁;III 期组男性 16 例,女性 9 例,年龄 24~67(50.26±10.23)岁,3 组一般资料比较,差异无统计学意义,具有可比性。

3 统计学方法

SPSS 25.0 处理数据,计量资料均符合正态分布,采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;多组间比较使

用单因素方差分析和 SNK-q 检验; Logistic 回归分析急性肾损伤发病的影响因素; Spearman 法分析 KLF8 和 CXCL8 表达与肠道菌群的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 对照组与实验组血清 KLF8、CXCL8 mRNA 水平等水平比较

与对照组比较, 实验组血清 KLF8 和 CXCL8 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$), 粪便双歧杆菌、拟杆菌显著降低, 大肠埃希菌、链球菌水平显著升高 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 对照组与实验组血清 KLF8、CXCL8 mRNA 等水平
Table 2 Serum KLF8, CXCL8 mRNA levels in the control and experimental groups

组别 GROUP	对照组 Control group	实验组 Experimental group	<i>t</i>	<i>P</i>
KLF8 mRNA	0.91±0.09	1.12±0.07	16.474	0.000
CXCL8 mRNA	0.96±0.11	1.71±0.14	37.677	0.000
双歧杆菌	5.68±1.28	2.60±0.65	19.190	0.000
拟杆菌	4.14±1.23	1.38±0.30	19.498	0.000
大肠埃希菌	4.62±0.87	7.87±0.96	22.437	0.000
链球菌	3.19±0.35	6.66±1.34	22.410	0.000

2 不同分期患者血清 KLF8、CXCL8 mRNA 等水平比较

I 期组、II 期组、III 期组急性肾损伤患者血清 KLF8、CXCL8 mRNA 水平依次显著升高 ($P < 0.05$); 粪便双歧杆菌、拟杆菌水平依次显著降低, 大肠埃希菌、链球菌水平依次显著升高 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 不同分期患者血清 KLF8、CXCL8 mRNA 等水平
Table 3 Serum KLF8, CXCL8 mRNA levels in patients with different stages

组别 Group	I 期组 Phase I group	II 期组 Phase II group	III 期组 Phase III group	<i>t</i>	<i>P</i>
KLF8 mRNA	0.98±0.12	1.13±0.26 [#]	1.27±0.31 ^{#*}	9.919	0.000
CXCL8 mRNA	1.34±0.21	1.72±0.36 [#]	2.13±0.53 ^{#*}	28.773	0.000
双歧杆菌	3.72±0.95	2.51±0.77 [#]	1.39±0.61 ^{#*}	57.480	0.000
拟杆菌	5.36±1.34	4.18±1.13 [#]	2.68±0.92 ^{#*}	36.240	0.000
大肠埃希菌	6.57±0.97	7.73±1.37 [#]	9.52±1.73 ^{#*}	31.199	0.000
链球菌	5.16±0.45	6.74±0.63 [#]	8.32±1.34 ^{#*}	88.108	0.000

注: 与 I 期组相比, [#] $P < 0.05$; 与 II 期组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

3 Logistic 回归分析急性肾损伤的影响因素

以是否发生急性肾损伤为因变量, KLF8、CXCL8、双歧杆菌、拟杆菌、大肠埃希菌、链球菌为自变量进行 Logistic 回归分析, 结果发现, KLF8、CXCL8、大肠埃希菌、链球菌是影响急性肾损伤发生的危险因素, 双歧杆菌、拟杆菌是影响急性肾损伤的保护因素 ($P < 0.05$) (表 4)。

4 急性肾损伤患者血清 KLF8 和 CXCL8 水平与肠道

菌群的关系

双歧杆菌、拟杆菌数量与血清 KLF8 和 CXCL8 水平均呈负相关 ($P < 0.05$), 大肠埃希菌、链球菌与血清 KLF8 和 CXCL8 水平均呈正相关 ($P < 0.05$) (表 5)。

表 4 急性肾损伤的影响因素 Logistic 回归分析
Table 4 Logistic regression analysis of influencing factors of acute kidney injury

影响因素 Influence factor	β	SE	Wald χ^2	<i>P</i>	OR	95% CI
KLF8	0.516	0.163	10.014	0.002	1.675	1.217-2.305
CXCL8	0.598	0.158	14.337	0.000	1.819	1.335-2.479
双歧杆菌	-0.451	0.188	5.755	0.016	0.637	0.441-0.921
拟杆菌	-0.573	0.171	11.217	0.001	0.564	0.403-0.789
大肠埃希菌	0.579	0.179	10.458	0.001	1.784	1.256-2.534
链球菌	0.587	0.185	10.076	0.002	1.799	1.252-2.585

表 5 急性肾损伤患者血清 KLF8 和 CXCL8 水平与肠道菌群的关系
Table 5 Relationship between serum KLF8 and CXCL8 levels and intestinal microbiota in patients with acute kidney injury

变量 Variable	双歧杆菌 <i>Bi fidobacterium</i>	拟杆菌 <i>Bacteroides</i>	大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	链球菌 <i>Streptococcus</i>	
KLF8	<i>r</i>	-0.421	-0.439	0.510	0.481
	<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CXCL8	<i>r</i>	-0.510	-0.481	0.496	0.473
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

讨论

急性肾损伤临床综合症的典型特点是肾功能的急性丧失, 多种原因可以致使肾功能迅速下降, 常见病因包括急性胰腺炎、脓毒症、败血症、感染、毒素、肾结石、肾缺血再灌注等^[12]。急性肾损伤的发病机制与氧化应激反应、炎症反应、肾缺血再灌注等有关^[13]。该病首先表现的症状为肾功能毫无征兆的降低, 同时伴有细胞外容量和电解质失调。三个月或更短的时间肾功能会持续性或突然间下降, 代谢物无法排出, 致使机体有毒物质不断的沉积, 如持续恶化可导致肾脏衰竭或者死亡^[14]。随着医疗科技的进步和医疗设备的更新, 急性肾损伤治疗水平有了显著的提高, 但目前与其相关的死亡率依然较高^[15]。

机体微生态系统的主要构成部分肠道菌群被称为机体的“第二类器官”。肠道菌群有致病性细菌、条件致病菌和益生菌三类细菌组成, 其划分主要依据与宿主的关系^[16]。健康正常人肠道菌群以拟杆菌门、厚壁菌门为优势菌群, 约占 90%。不同机体肠道菌群差异约在 85%, 而不同机体基因组差异只有 0.1%。因此, 虽然正常状态下, 人体和肠道菌群处于一种和谐共处的状态, 菌群起到免疫调节、物质代谢以及生物屏障等多种功能。然而, 疾病状态下, 肠道的微环境会发生变化, 其菌群组成比例和相应作用会发生改变^[17]。

KLFs 转录因子家族参与多种生物学调控过程的

调节,包括细胞侵袭转移和增殖分化等,包含家族成员18个(KLF1-KLF18)。作为KLFs家族中的一员,KLF8是一种广泛表达的转录因子,对于调控细胞周期、转化、上皮向间质转化以及浸润等方面具有重要作用。尤其在肿瘤方面更受重视。在炎症疾病反应方面的研究报道较少,其中Jose等^[18]指出作为Kruppel样转录因子家族中具有特殊基序和转录抑制功能的蛋白质,KLF8N端可通过与共抑制因子C端结合蛋白结合影响基因的表达,参与细胞周期、侵袭和分化等多种生物学过程,与炎症反应的发生、发展关系密切。

作为一种重要的多功能细胞因子,CXC趋化因子配体(CXCL)8通过自分泌和旁分泌等方式影响肿瘤细胞的迁移、侵袭和增殖^[19-20]。研究表明CXCL8在患有支原体肺炎的患者中呈现高表达,其作用是趋化炎性细胞到达肺组织,这将进一步加深肺损伤的严重程度。CXCL8表达增加,能够加速血管侵袭和肿瘤生长。其超表达对肺腺癌的产生和恶化会产生主要的影响。研究发现,在肾损伤过程中,CXCL8的重要作用是嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的激活,进一步加强肾小球炎症反应^[21]。本研究发现,与对照组相比,急性肾损伤患者血清KLF8和CXCL8 mRNA水平显著升高,且急性肾损伤越严重,血清KLF8和CXCL8 mRNA水平越高。提示KLF8和CXCL8与急性肾损伤关系密切。实验组粪便双歧杆菌、拟杆菌与对照组比较显著降低,大肠埃希菌、链球菌水平显著升高,且急性肾损伤越严重,粪便双歧杆菌、拟杆菌水平越低,大肠埃希菌、链球菌水平越高,表明急性肾损伤发生时,肠道菌群结构可能发生了变化。Logistic回归分析发现,KLF8、CXCL8、大肠埃希菌、链球菌是影响急性肾损伤发生的危险因素,双歧杆菌、拟杆菌是影响急性肾损伤的保护因素。推测发生急性肾损伤时机体KLF8、CXCL8的表达变化影响了肠道菌群的分布。Spearman法分析双歧杆菌、拟杆菌数量与血清KLF8和CXCL8水平呈负相关,大肠埃希菌、链球菌与血清KLF8和CXCL8水平呈正相关。进一步提示机体急性肾损伤下机体KLF8、CXCL8的表达变化影响了肠道菌群的分布,这可能是由于急性肾损伤导致肾功能下降,从而引起代谢紊乱,免疫失调,生物屏障被破坏,肠道菌群组成比例发生变化,但具体作用机制有待进一步研究。

综上所述,急性肾损伤患者血清KLF8和CXCL8水平显著升高,其与肠道菌群异常有关。然而,仍需大量样本验证急性肾损伤患者KLF8和CXCL8水平对肠道菌群分布的影响,其作用机制也需更深层的研究。

【参考文献】

- [1] 刘宵琴,刘力沛,杨小冬. 姜黄素防治急性肾损伤的研究进展[J]. 现代药物与临床,2023,38(1):239-244.
- [2] Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. *Kidney Int*,2019, 96(5):1083-1099.
- [3] Rabb H, Pluznick J, Noel S. The microbiome and acute kidney injury[J]. *Nephron*,2018,140(2):120-123.
- [4] 田磊,牟娜. 急性肾损伤后慢性肾脏病的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2013,14(8):741-743.
- [5] van Vliet J, Turner J, Crossley M, et al. Human Kruppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associated with Ct BP and represses transcription[J]. *Nucleic Acids Research*,2000,28(9):1955-1962.
- [6] 翟秧秧,师鑫鹏,罗晓勇. Kruppel样转录因子8在乳腺癌中的研究进展[J]. 癌症进展,2020,18(23):2382-2385.
- [7] Yang ZM, Luo X, Bai B, et al. Expression and significance of Kruppel-like factor 8 in human villous tissues during early pregnancy[J]. *Jo Chon Med*,2013,38(10):1133-1137.
- [8] Zhang H, Chen MK, Li K, et al. Eupafolin nanoparticle improves acute renal injury induced by LPS through inhibiting ROS and inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,(85):704-711.
- [9] 何银燕. CRRT对重症急性肾损伤炎症指标CXCL8、CCL10的临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2019,20(08):688-690.
- [10] Stevens E, Levin A. Kidney disease: Improving global outcomes chronic kidney disease guideline development work group members. evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline[J]. *Ann Intern Med*,2013,158(11):825-830.
- [11] 急性肾损伤专家共识小组. 急性肾损伤诊断与分类专家共识[J]. 中华肾脏病杂志,2006,22(11):661-663.
- [12] 杨晶晶,刘坤,孙京华,等. 445例急性肾损伤病因与预后分析[J]. 国际泌尿系统杂志,2020,40(2):293-297.
- [13] 沈瑞华. 线粒体自噬对急性肾损伤的保护作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2022,31(4):363-367.
- [14] Gonzalez SR, Cortes AL, Silva RCD, et al. Acute kidney injury overview: From basic findings to new prevention and therapy strategies[J]. *Pharmacol Ther*,2019(200):1-12.
- [15] Forneck CL, Joyce EL, Fuhrman DY, et al. Association of acute kidney injury with subsequent sepsis in critically ill children[J]. *Pediatr Crit Care Med*,2021,22(1):e58-e66.
- [16] Wilson Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease[J]. *Circ Res*,2017,120(7):1183-1196.
- [17] Ejtahed HS, Angoorani P, Soroush AR, et al. Gut microbiota-derived metabolites in obesity: a systematic review[J]. *Biosci Microbiota Food Health*,2020,39(3):65-76.
- [18] Jose A, Labala S, Venuganti V V. Co-delivery of curcumin and STAT3 siRNA using deformable cationic liposomes to treat skin cancer[J]. *J Drug Target*,2017,25(4):330-341.
- [19] Liu Q, Li A, Yu S, et al. DACH1 antagonizes CXCL8 to repress tumorigenesis of lung adenocarcinoma and improve prognosis[J]. *J Hematol Oncol*,2018,11(1):1-16.
- [20] Crespo J, Wu K, Li W, et al. Human naive T cells express functional CXCL8 and promote tumorigenesis[J]. *J Immunol*,2018,201(2):814-820.
- [21] Amrouche L, Desbuissons G, Rabant M, et al. MicroRNA-146a in human and experimental ischemic AKI: CXCL8-dependent mechanism of action[J]. *J Am Soc Nephrol*,2017,28(2):479-493.

【收稿日期】 2022-12-29 【修回日期】 2023-03-05