

Klotho 蛋白早期诊断严重创伤导致 AKI 的价值*

杨银忠,程文霞,陈敏敏,赵 鹃

(四川省人民医院东院检验科,四川成都 610101)

摘要:目的 观察 Klotho 蛋白在严重创伤导致急性肾损伤(AKI)患者血清中的变化,探讨其早期诊断 AKI 的价值。**方法** 选择 2017 年 3—12 月该院重症监护室收治的严重创伤导致 AKI 患者 43 例,创伤未导致 AKI(NAKI)患者 40 例,分别收集术前(入院 15 min 内),术后 2、4、6 h 的血清样本,再随机选取同期健康对照组 40 例,最后统一用酶联免疫吸附测定法检测血清 Klotho 蛋白和肌氨酸氧化酶法检测血清肌酐(Scr)水平,再进行统计学分析。**结果** AKI 组患者术前(入院 15 min 内),术后 2、4、6 h Klotho 蛋白与 NAKI 组和健康对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);AKI 患者术前(入院 15 min 内)Klotho 蛋白水平升高,术后 2、4、6 h 逐渐下降。AKI 组患者各时间点 Scr 水平比较及与 NAKI 组和健康对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 检查 Klotho 蛋白有助于早期诊断严重创伤导致 AKI,可作为早期诊断的标志物。

关键词: 创伤和损伤; 急性病; 肾损伤; 早期诊断; Klotho 蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.015

中图法分类号: R446.61; R692

文章编号: 1673-4130(2019)01-0056-04

文献标识码: A

The value of Klotho protein in early diagnosis of AKI patients with severe trauma*

YANG Yinzhong, CHENG Wenxia, CHEN Minmin, ZHAO Juan

(The East Ward Laboratory of Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610101, China)

Abstract: Objective To observe the changes of Klotho protein in the serum of patients with acute kidney injury (AKI) caused by severe trauma and to explore the value of early diagnosis of AKI. **Methods** patients with acute kidney injury (AKI) caused by severe trauma was divided into acute kidney injury patients (AKI) group ($n=43$) and non-result in AKI patients (NAKI) group ($n=40$) and collected their serum samples before operation (within 15 min after admission). Then collected their serum samples 2, 4, 6 h after the operation, and randomly selected 40 cases of healthy controls. Determination of Klotho protein content by ELISA and determination the serum creatinine (Scr) level by sarcosine oxidase method, and statistical treatment. **Results** The Klotho protein of the AKI patients group began to rise before the operation (within the hospital 15min), and 2, 4 and 6 h decreased gradually after operation, which was statistically significant with the NAKI group and the healthy control group. There was no statistical significance for Scr in the statistical time period and in each group. **Conclusion** Detection of Klotho protein can help early diagnosis of AKI caused by severe trauma, and can be used as a marker for early diagnosis.

Key words: wounds and injuries; acute disease; kidney injuries; early diagnosis; klotho protein

近年来,随着我国城市建设及社会的飞速发展,车祸伤、高坠伤、打击伤等创伤已严重威胁人类的生命安全,急性肾损伤(AKI)是严重创伤后临床常见的并发症。据统计,严重创伤后 AKI 发生率为 30%~50%,且发病率呈逐年上升趋势,病死率可高达 29%~90%^[1-2]。传统的实验室检测肾损伤的指标主要有肌酐(Scr)和尿量等,以估测肾损伤程度,但这些指标异常时患者肾实质有可能已发生不可逆转损伤。目前,早期诊断 AKI 尚不理想,因此,寻找快速、

便捷、灵敏度和特异度高的生物学标志物对预测及早期诊断意义重大。Klotho 蛋白是体内 Klotho 基因编码的一种单向跨膜蛋白,主要在肾小管上皮细胞中表达。有研究表明,在早期肾损伤时 Klotho 等基因表达改变,Klotho 蛋白在血浆中水平较高,但在正常细胞及肾损伤修复后水平均较低,是反映 AKI 的一种理想标志物^[3-4]。本研究通过观察严重创伤后 AKI 患者血清 Klotho 蛋白水平的动态变化,旨在探讨该血清标志物早期诊断 AKI 的价值。

* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会资助项目(16PJ468)。

作者简介:杨银忠,男,主管技师,主要从事医学检验方向的研究。

本文引用格式:杨银忠,程文霞,陈敏敏,等. Klotho 蛋白早期诊断严重创伤导致 AKI 的价值[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(1):56-58.

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 3—12 月该院重症监护室收治的严重创伤后 1 周内发生 AKI 患者 43 例作为 AKI 组,其中男 23 例,女 20 例;平均(38.22±8.91)岁。车祸伤 25 例,高坠伤 7 例,挤压伤 5 例,刀刺伤 3 例,其他伤 3 例。排除既往有慢性肾脏病史、正在服用免疫类或糖皮质激素类药物和存在恶性肿瘤等基础疾病患者。选择年龄、性别、病因及手术方式与 AKI 组相匹配的 40 例创伤非 AKI (NAKI)患者作为 NAKI 组,其中男 21 例,女 19 例;平均(38.23±8.01)岁。再随机选择健康对照组 40 例,其中男 20 例,女 20 例;平均(37.7±7.43)岁。各组研究对象性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。所有诊断为 AKI 的病例均符合 2005 年急性肾损伤网络(AKIN)和 2002 急性透析质量倡议(ADQI)推荐的诊断标准:48 h 内肾功能突然下降,血肌酐(Scr)绝对值增加 $\geq 26.4 \mu\text{mol/L}$ 或达到基线值的 1.5 倍或尿量 $< 0.5 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 且持续超过 6 h。本研究经医院伦理委员会批准,符合医学伦理要求。

1.2 样本收集和指标测定

1.2.1 样本收集 收集患者术前(入院 15 min 内),术后 2、4、6 h 的血液样本各 4 mL,4 000 r/min 离心 1 min 取上清液进行检测。

1.2.2 Klotho 蛋白检测 采用美国 Cusabio 公司生

产的酶联免疫吸附测定试剂进行检测,严格按试剂盒说明书制定的操作规程进行操作,其实验原理为用纯化的抗体包被微孔制成固相载体,往包被抗 Klotho 蛋白抗体的微孔中依次加入标本和标准品、生物素化的抗 Klotho 蛋白抗体、HRP 标记的亲合素等,经彻底洗涤后底物四甲基联苯胺(TMB)显色,颜色深浅与样本中 Klotho 蛋白量呈正相关,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度,计算样本浓度。

1.2.3 Scr 检测 采用九强公司生产的肌氨酸氧化酶法试剂盒,采用美国 Beckman-Coulter 5800 全自动生化仪进行检测,严格按实验室操作规程进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行分析,符合正态分布计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组研究对象 Klotho 蛋白水平比较 AKI 组患者术前(入院 15 min 内),术后 2、4、6 h Klotho 蛋白水平与 NAKI 组与健康对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);AKI 患者术前(入院 15 min 内) Klotho 蛋白水平升高,术后 2、4、6 h 逐渐下降。见表 1。AKI 组患者各时间点 Scr 水平比较及与 NAKI 组和健康对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 各组研究对象 Klotho 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

观察时间	AKI 组($n=43$)	NAKI 组($n=40$)	健康对照组($n=40$)	F	P
术前(入院 15 min 内)	0.91±0.45	0.075±0.030	0.035±0.020	51.31	0.000
术后 2 h	0.57±0.26	0.051±0.030	0.035±0.020	47.52	0.000
术后 4 h	0.49±0.38	0.037±0.020	0.035±0.020	27.61	0.000
术后 6 h	0.36±0.26	0.032±0.020	0.035±0.020	25.33	0.000
F	10.37	5.79	—		
P	0.000	0.001	—		

注:—表示无数据

表 2 AKI 与和对对照组 Scr 的检查水平及比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

观察时间	AKI 组($n=43$)	NAKI 组($n=40$)	健康对照组($n=40$)	F	P
术前(入院 15 min 内)	68.02±19.75	65.32±19.15	66.08±14.01	0.066	0.865
术后 2 h	72.11±16.33	70.26±19.18	66.08±14.01	0.698	0.562
术后 4 h	74.31±15.27	69.72±19.34	66.08±14.01	1.460	0.378
术后 6 h	75.56±18.31	68.77±20.21	66.08±14.01	1.250	0.365
F	4.23	0.717	—		
P	0.071	0.467	—		

注:—表示无数据

2.2 Klotho 蛋白的诊断效能 Klotho 蛋白在术前(入院 15 min 内),术后 2、4、6 h 的受试者工作特征曲线(ROC)曲线下面积(AUC)分别为 0.955、1.000、

1.000、1.000,Klotho 蛋白在术前(入院 15 min 内),2、4、6 h 的临床诊断临界点分别为 0.122、0.165、0.144、0.101 ng/mL。见图 1、表 3。

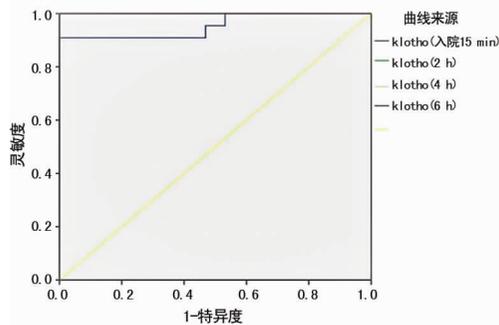


图 1 ROC 曲线图

表 3 Klotho 蛋白的诊断效能

时间	AUC	SD	P	95%CI
术前(入院 15 min 内)	0.955	0.032	0.000	0.892~1.000
术后 2 h	1.000	0.000	0.000	1.000~1.000
术后 4 h	1.000	0.000	0.000	1.000~1.000
术后 6 h	1.000	0.000	0.000	1.000~1.000

3 讨 论

Klotho 蛋白最初是在 1997 年由韩国科学家 Ku-roo 在抗衰老研究中被发现的,其是体内 Klotho 基因编码的一种单向跨膜蛋白,主要表达在肾小管上皮细胞中,可在血液及尿液中检查到。近年来, HU 等^[5]研究表明,在 AKI 大鼠和小鼠中随肾功能损伤的进展,肾脏、血液和尿液中 Klotho 蛋白水平均显著减低,当肾功能恢复后体液和组织中 Klotho 蛋白水平又可恢复到正常水平。在研究 AKI 患者的尿液时也发现, Klotho 蛋白水平显著减低,提示 AKI 是一种 Klotho 蛋白缺失的急性、暂时性病理状态^[6]。同时,有研究表明, Klotho 蛋白缺陷可加重缺血再灌注导致的组织损伤,而 Klotho 蛋白的过表达可缓解损伤,进一步证明 Klotho 蛋白表达变化在脏器缺血再灌注损伤的病理生理过程中具有重要作用,其有可能作为诊断 AKI 的一个新的标志物。目前,严重创伤后 AKI 相关 Klotho 蛋白指标的动态变化尚未见文献报道。

当患者发生严重创伤后肾脏是最易受累的器官之一,在创伤失血、脏器受损和休克等多种因素作用下,机体处于应激状态,直接导致肾脏血流量灌注不足或缺血,从而引起肾组织损伤,导致 AKI 的发生。有研究表明,创伤后发生 AKI 的原因与炎症介质过度活化和表达密切相关,在受损早期肾脏会及时自我维护及修复,包括早期阻止炎症细胞活化及炎症介质的释放等^[7]。

目前,有研究表明, Klotho 蛋白具有调节细胞表面多种糖蛋白的激素样因子功能,如上调热休克蛋白 70 表达等,提高抗凋亡蛋白稳定性和间接抑制氧化应激,通过抑制细胞内相关传导信号,上调抗氧化酶类的表达,在阻止早期炎症细胞活化和炎症介质释放方面具有一定作用^[5-6]。因此,当机体发生严重创伤导

致 AKI 后肾组织细胞凋亡导致 Klotho 蛋白表达下调, Klotho 蛋白则作为一种激素样因子发挥抗凋亡、抗炎、抗氧化等作用,从而导致血液浓度发生相应改变。本研究通过比较 AKI 组、NAKI 组和健康对照组研究对象血清 Klotho 蛋白发现, AKI 组患者 Klotho 蛋白水平术前(入院 15 min 内), 术后 2、4、6 h 均明显高于 NAKI 组和健康对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但各组研究对象 Scr 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明 AKI 患者术前(入院 15 min 内)及术后 6 h 内 Klotho 蛋白水平变化比 Scr 更早, 对 AKI 的早期诊断价值明显优于 Scr, 与相关动物实验研究结果基本吻合^[4-6]。

本研究在不同时间点 AKI 组患者 Klotho 蛋白检测结果比较发现, 患者 Klotho 蛋白水平术前(入院 15 min 内)已升高, 术后 2、4、6 h 逐渐下降, 而术后 6 h 内 Scr 水平无多大变化, 表明 Klotho 蛋白是预测严重创伤导致肾损伤早期诊断的良好指标, 其次 Klotho 蛋白也可能与肾脏的修复具有一定关系^[4]。但本研究与大鼠等动物实验研究结果具有一定差别^[5-6], 大鼠实验组在创伤 2 h 后再逐渐降低, 而本研究是 AKI 患者入院后就检测到升高再逐渐降低, 可能是本研究所选择的 AKI 患者均为严重创伤患者和入院时间等因素有关。

目前, 国内研究^[4-8]和国外研究^[9]探讨了在心脏术后引起急性缺血再灌注导致 AKI 时 Klotho 蛋白的变化, 但尚未查阅到其他原因导致 AKI 时 Klotho 蛋白变化的文献。通过本研究和在心脏术后导致 AKI 的文献比较后发现, Klotho 蛋白均有可能作为 AKI 标志物的价值, 但本研究 Klotho 蛋白变化的时间比其他文献报道更早, 可能与本研究 AKI 组患者创伤均较严重和就诊时间等有关。考虑到本研究仅为小样本单中心研究, 故未来尚需多中心和多样本进行前瞻性研究, 并评估其诊断价值。

4 结 论

AKI 患者 Klotho 蛋白水平术前(入院 15 min 内)已升高, 术后 2、4、6 h 逐渐下降, 而术后 6 h 内 Scr 水平无多大变化, 表明 Klotho 蛋白是预测严重创伤导致肾损伤早期诊断的良好指标。检查 Klotho 蛋白有助于早期诊断严重创伤导致 AKI, 可作为早期诊断的标志物。

参考文献

[1] SRISAWAT N, HOSTE E E, KELLUM J A. Modern classification of acute kidney injury [J]. Blood Purif, 2010, 29(3):300-307.
 [2] 臧芝栋, 黄英姿, 杨毅, 等. 尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白和白细胞介素-18 对重症患者急性肾损伤的早期诊断价值[J]. 中华内科杂志, 2010, 49(5):396-399.
 [3] KABIR-UD-DIN, RUB M A, NAQVI A Z. (下转第 61 页)

DNA 在该水平上的不确定度。实际测量过程相关联的不确定度分量应从接收样品启动测量程序开始,至输出测量结果终止。按本方法计算所得测量不确定度不确定来源上主要包含了分析测量阶段中各种影响组分(如操作人员、仪器、试剂、校准品、质控品、环境条件等)的变异。但未包括与分析前和分析后阶段相关的测量不确定度分量,也未包括由于人群生物学变异而产生的测量不确定度。

每个实验室应建立自己的目标不确定度,以评价各检验指标是否满足临床要求^[13-14]。目前,尚未有检验程序的测量不确定度的国家标准或性能规范,据文献报道,扩展不确定度若大于 10%,需改善检测系统性能及稳定性,提高检测的准确度和精密度^[15]。本实验室根据实验室自身的条件,制定 HBV-DNA 的目标不确定度为 10%。而本研究评定得到的相对不确定度(12.6%)略高于实验室设定的目标不确定度,提示应从检测人员、检测仪器、检测试剂和方法、所使用的校准品和质控品、环境温湿度条件等方面入手,采取加强人员培训、提高试剂质量、变更方法、加强仪器检定和校准、严格控制环境温湿度,逐步改进检验质量,以缩小测量不确定度,为临床疾病的诊治提供更有价值的参考依据。

4 结 论

HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度评定具有重要意义,可作为临床实验室检验结果质量持续改进的依据,并用于解释临床检验结果。

参考文献

[1] 肖倩,张轩,李有强,等.化学发光分析仪检测激素类项目的测量不确定度评估[J].实用医学杂志,2015,31(9):1532-1535.

[2] 田恩冰,李颖,李伟强,等.“自上而下”法评定检验项目的测量不确定度[J].标记免疫分析与临床,2017,24(1):113-117.

[3] SCHNEIDER F, MAURER C, FRIEDBERG R C. Inter-

national organization for standardization(ISO) 15189[J]. Ann Lab Med, 2017, 37(5):365-370.

[4] MAGNUSSON B, OSSOWICKI H, RIENITZ O, et al. Routine internal- and external-quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(3):212-220.

[5] 徐润源,张洁.8 项生化指标测量不确定度评估及允许范围的初步研究[J].上海交通大学学报:医学版,2016,36(12):1777-1783.

[6] 童清,周睿,梁玉芳,等.使用室内质控与能力验证数据评估测量不确定度[J].检验医学与临床,2016,13(20):2866-2868.

[7] 张诗诗,王薇,赵海建,等.临床检验总误差与测量不确定度[J].现代检验医学杂志,2016,31(5):153-156.

[8] 卢妙莲,胡珺,高云龙,等.血液常规检验项目测量不确定度评定[J].实用医学杂志,2014,30(11):1817-1819.

[9] 蒋玲丽,王雪亮,肖艳群,等.荧光定量 PCR 测定 HBV-DNA 测量不确定度评定的探讨[J].检验医学,2014,29(3):241-244.

[10] 庄健海,罗娜,黄星华,等.2 项分子生物学诊断指标测量不确定度评定[J].国际医药卫生导报,2013,19(6):756-762.

[11] 吕京.常规临床检验结果不确定度的若干问题[J].临床检验杂志,2011,29(5):322-323.

[12] 包安裕,李艳,陈晨.22 项生化检测项目测量不确定度的评价[J].现代检验医学杂志,2014,29(6):156-158.

[13] 熊大迁,张灵玲,许安春.目标不确定度的确定方式与不确定度的定期评审在质量改进中的价值[J].国际检验医学杂志,2014,35(17):2369-2371.

[14] 汪旭强,方洁芸. Nordertest 准则评价 13 项生化检测项目的测量不确定度[J].国际检验医学杂志,2017,38(1):109-110.

[15] 尹晶平,董菁,徐杰,等.测量不确定度评估临床干生化检验的初步应用[J].检验医学与临床,2015,12(20):3033-3034.

(收稿日期:2018-08-16 修回日期:2018-10-22)

(上接第 58 页)

Micellization of mixtures of amphiphilic drugs and cationic surfactants: a detailed study[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 92(1):16-24.

[4] 钱盈盈,严玉澄,沈玥,等. Klotho 在急性缺血再灌注性肾损伤中的变化及其与凋亡的关系[J].上海交通大学学报(医学版),2014,34(6):788-793.

[5] HU M C, KURO-O M, MOE O W. Klotho and kidney disease[J]. J Nephrol, 2010, 23 Suppl 16: S136-144.

[6] HU M C, SHI M, ZHANG J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective[J]. Kidney Int, 2010, 78(12):1240-1251.

[7] PANNU N, KLARENBACH S, WIEBE N, et al. Renal replacement therapy in patients with acute renal failure: a systematic review[J]. JAMA, 2008, 299(7):793-805.

[8] LIU Y J, SUN H D, CHEN J, et al. Klotho: a novel and early biomarker of acute kidney injury after cardiac valve replacement surgery in adults[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5):7351-7358.

[9] SEO M Y, YANG J, LEE JUN-YONG, et al. Renal klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury[J]. Korean J Intern Med, 2015, 30(4):489-495.

(收稿日期:2018-08-02 修回日期:2018-10-08)