

DOI:10.13350/j.cjpb.240710

• 论著 •

慢性肾脏病血液透析患者血管钙化、死亡风险和肠道微生物组之间的潜在联系^{*}

吴海莉, 吴秀萍^{**}, 张敏敏, 胡迪

(铜陵市立医院血液透析中心, 安徽铜陵 244000)

【摘要】 目的 初步分析慢性肾脏病(CKD)血液透析患者血管钙化、死亡风险和肠道微生物组之间的潜在联系, 为该患者的治疗防控提供参考。 **方法** 选取本院符合纳入标准的慢性肾脏病患者 45 例作为研究对象, 其中 24 例进行血液透析的患者为透析组, 21 例未进行血液透析的患者为未透析组。应用 16SrDNA 测序技术检测患者肠道菌群, 并使用生物信息学方法分析各组对象肠道菌群变化。 **结果** 透析组发生血管钙化 12 例, 死亡 1 例; 未透析组发生血管钙化 5 例, 死亡 0 例; 透析组血管钙化率及死亡率均高于未透析组, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。2 组厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门丰度较高, 透析组患者拟杆菌门的丰度低于未透析组($P<0.05$), 放线菌门的丰度高于未透析组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。两组肠道菌群有离散趋势, 说明两组肠道菌群组成存在差异。2 组 Shannon 指数和 Chaol 指数比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。2 组比较有 16 个差异菌, 透析组患者中肠杆菌目、放线菌门、埃希菌? 志贺菌属等的丰度升高, 未透析组的拟杆菌门、毛螺菌属丰度升高。 **结论** 慢性肾脏病血液透析患者血管钙化、死亡风险和肠道微生物组密切相关, 互相影响。透析组的肠道菌群中潜在病原体显著增加, 有益细菌显著减少, 血液钙化及死亡风险高于未透析组。

【关键词】 慢性肾脏病; 血液透析; 血管钙化; 死亡风险; 肠道微生物组

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)07-0795-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jul.;19(7):795-799.]

Potential relationship between vascular calcification, death risk and intestinal microbiota in hemodialysis patients with chronic kidney disease

WU Haili, WU Xiuping, ZHANG Minmin, HU Di (*Respiratory Department of Tongling Municipal Hospital, Tongling 244000, Anhui, China*)^{***}

【Abstract】 Objective To preliminarily analyze the potential relationship between vascular calcification, death risk and intestinal microbiota in hemodialysis patients with chronic kidney disease (CKD), and to provide reference for the treatment and prevention of this kind of patients. **Methods** Forty-five patients with chronic kidney disease who met the inclusion criteria in our hospital were selected as the research object, of which 24 patients with hemodialysis were dialysis group and 21 patients without hemodialysis were non-dialysis group. The intestinal flora of patients was detected by 16SrDNA sequencing technology, and the changes of intestinal flora in each group were analyzed by bioinformatics method. **Results** There were 12 cases of vascular calcification and 1 case of death in the dialysis group; There were 5 cases of vascular calcification and 0 deaths in the non dialysis group; The vascular calcification rate and mortality rate in the dialysis group were higher than those in the non dialysis group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The abundance of *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* was higher in two groups. The abundance of *Bacteroidetes* in the dialysis group was lower than that in the non dialysis group ($P<0.05$), while the abundance of *Actinobacteria* was higher than that in the non dialysis group ($P<0.05$), and the difference was statistically significant. The two groups of gut microbiota showed a trend of dispersion, indicating differences in the composition of the two groups of gut microbiota. There was no statistically significant difference ($P>0.05$) between the two groups of Shannon index and Chaol index. There are 16 different bacteria compared between the two groups. The abundance of *Enterobacteriales*, *Actinobacteria*, *Escherichia coli*, and *Shigella* increased in the dialysis group, while the abundance of *Bacteroidetes* and *Spirulina* increased in the non dialysis group. **Conclusion** The potential pathogens in intestinal flora in dialysis group increased significantly, while the beneficial bacteria decreased significantly, and the risk of blood

* **【基金项目】** 安徽省科技厅项目(No. 1804h08020238)。

** **【通讯作者】** 吴秀萍, E-mail: 602009357@qq.com

【作者简介】 吴海莉(1980-), 女, 安徽铜陵人, 本科, 中级职称, 主要研究血液透析相关。E-mail: 3673566272@qq.com

calcification and death was higher than that in non-dialysis group.

【Keywords】 chronic kidney disease; hemodialysis; vascular calcification; risk of death; intestinal microbiota

慢性肾脏病(CKD)血液透析患者常常面临着血管钙化和增加的死亡风险^[1]。近年来,越来越多的研究表明,肠道微生物组可能与这些问题之间息息相关。血管钙化是指在血管壁中出现钙盐沉积的过程,它是慢性肾脏病血液透析患者常见的并发症之一^[2]。研究表明,血管钙化可能与肠道微生物组的失衡有关^[3]。肠道菌群的异常改变可能导致肠道屏障功能受损,使得细菌和其产生的代谢产物进入循环系统,刺激免疫系统的反应,导致炎症反应和内皮细胞损伤,最终促进血管钙化的发生^[4]。此外,肠道微生物组的改变也与慢性肾脏病血液透析患者的死亡风险增加相关。研究发现,肠道菌群的失调可能导致肠道屏障功能受损、炎症反应增加和代谢产物的异常释放,从而影响患者的免疫功能和全身健康状况。这些改变进一步增加了心血管事件、感染和其他并发症的风险,最终导致患者的死亡风险增加^[5]。尽管肠道微生物组与慢性肾脏病血液透析患者的血管钙化和死亡风险之间存在潜在联系,但目前对于具体机制的了解仍然有限。进一步的研究需要探索肠道菌群与血管钙化的关系,以及如何通过调节肠道微生物组来减少患者的死亡风险。

本研究基于 16SrDNA 高通量测序技术,通过对比透析组与未透析组的肠道菌群分布特征,分析肠道菌群改变与慢性肾脏病血液透析患者血管钙化、死亡风险的相关性,进一步探讨肠道菌群易位生物标志对慢性肾脏病血液透析患者血管钙化、死亡风险的临床诊断价值。本研究将有助于深入理解这种联系,并为预防和治疗提供新的思路和策略。

材料与方法

1 一般资料

选择 2022 年 1 月-2023 年 12 月本院符合纳入标准的慢性肾脏病患者 45 例作为研究对象,其中 24 例进行血液透析的患者为透析组,21 例未进行血液透析的患者为未透析组。透析组、未透析组对象之间性别、年龄等一般临床资料对比差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

2 病例选择

2.1 慢性肾脏病诊断标准 参照 2019 年《中国慢性肾脏病矿物质和骨异常诊治指南》解读^[6]。基于临床症状、体征及检查报告综合分析。

2.2 血管钙化诊断标准 参照《血管钙化研究进展和临床实践的共识与争议》^[7]。

2.3 纳入标准 (1) ≥ 18 岁;(2)符合上述诊断标准;

(3)患者知情且自愿签署知情通知书。

表 1 两组患者一般资料对比
Table 1 Comparison of the general data of the two groups of patients

组别	年龄(岁)	性别		合并基础疾病		
		男	女	高血压	糖尿病	吸烟史
透析组 (n=24)	63.79±9.46	13 (54.17%)	11 (45.83%)	8 (33.33%)	7 (29.17%)	9 (37.50%)
未透析组 (n=21)	65.61±11.28	10 (47.62%)	11 (52.38%)	5 (23.81%)	7 (33.33%)	9 (42.86%)
统计值	0.589	0.192		0.495		
P	0.559	0.661		0.781		

2.4 排除标准 (1)其他明确的疾病状态:排除患有其他严重疾病的患者,如严重心血管疾病、感染性疾病等。这些疾病可能对血管钙化和死亡风险产生影响,并干扰与肠道微生物组之间的关联;(2)用药情况:排除正在使用可能影响血管钙化和死亡风险的药物的患者,如钙剂、维生素 D 及其衍生物等药物可能直接或间接地影响血管钙化的进程;(3)肠道疾病和手术史:排除患有肠道疾病(如克罗恩病、溃疡性结肠炎等)或进行过相关肠道手术的患者。这些因素可能对肠道微生物组产生重要影响,从而干扰与血管钙化和死亡风险的关联;(4)肠道感染:排除近期有肠道感染的患者。肠道感染可能导致肠道菌群失调,影响微生物组的分析结果;(5)缺乏完整的临床数据:排除缺乏完整临床数据的患者,如缺少相关血液检查、病史记录等。这些数据对于评估血管钙化、死亡风险和肠道微生物组之间的关系至关重要。

3 标本采集

向研究对象提供粪便标本盒,要求采集当日新鲜中段粪便,放入 -80°C 超低温冰箱冻存储存,所有样本收集完毕后,采用 16S rDNA 高通量测序技术分析肠道菌群的结构,检测粪便标本中具有代表性的菌群数量。测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

4 研究方法

4.1 提取及分析 (1)使用 DNA 提取试剂盒,从粪便样本中提取微生物组的总 DNA。运用 PCR 扩增技术获取足够数量和质量的 DNA。(2)16SrRNA 基因测序:选择适当的引物对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,然后将扩增产物进行高通量测序。这可以得到关于微生物组成的信息,并评估不同分类水平上的物种丰富度和多样性。(3)数据分析:对测序数据进行生物信息学分析,包括序列质控、去噪、聚类 and 分类等步骤。通过比对到参考数据库,可以确定各个 OTU(操作分

类单元)的物种归属,进而评估物种丰富度和多样性。
(4)差异性分析:使用统计学方法对不同组别的样本进行比较,以识别在慢性肾脏病血液透析患者中存在差异的微生物群落。通过比较 Alpha 多样性指数(如 Shannon 指数、Simpson 指数等)和 Beta 多样性指数(如 PCoA、NMDS 等)来实现。

5 统计分析

本研究采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,。最后使用 LEfSe 软件分析评估组间差异的微生物,以线型判断分析(LDA)大于 2 为有显著差异。计数资料采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1 各组发生血管钙化及死亡情况

透析组发生血管钙化 12 例,死亡 1 例;未透析组发生血管钙化 5 例,死亡 0 例;透析组血管钙化率及死亡率情况均高于未透析组。 $(P>0.05)$ 。

2 各组患者肠道菌群门水平对比

结果显示,2 组厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)丰度较高。透析组患者拟杆菌门的丰度低于未透析组($P<0.05$),放线菌门的丰度高于未透析组($P<0.05$),差异有统计学意义(图 1)。

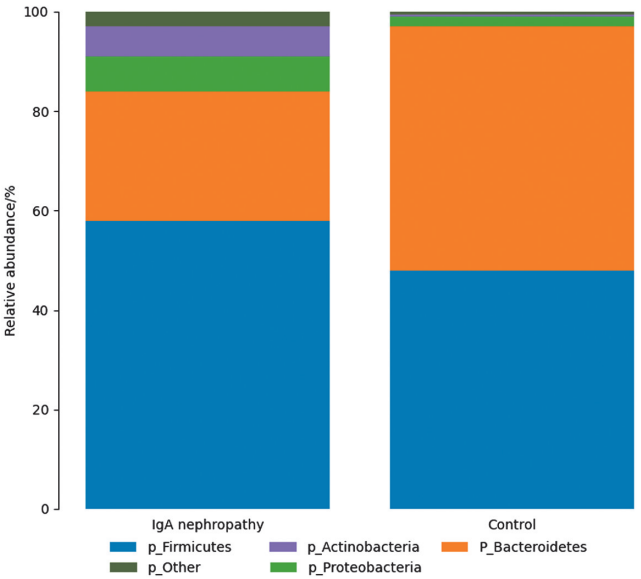


图 1 两组患者肠道菌群门水平对比
Fig. 1 Comparison of gut microbiota at the phylum level between two patient groups

3 各组患者肠道菌群组成差异分析

肠道菌群 β 多样性应用 POA 和 NMDS 进行分析,发现两组肠道菌群有离散趋势,说明两组肠道菌群组成存在差异(图 2)。

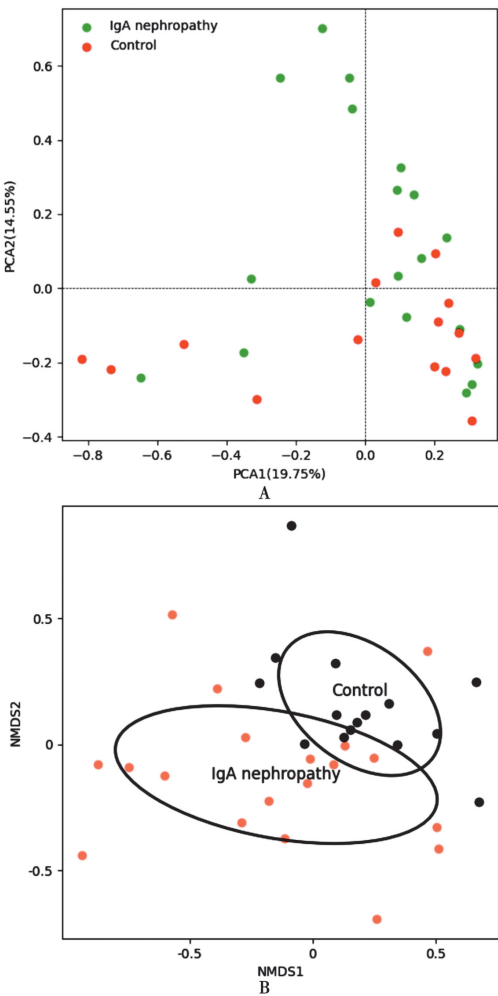


图 2 两组患者肠道菌群物种差异分析
Fig. 2 Analysis of species differences in gut microbiota between two patient groups

4 各组患者肠道菌群物种差异性分析

两组比较有 16 个差异菌,透析组 Shannon 指数为(4.28±0.53),Chaol 指数为(162±36);未透析组 Shannon 指数为(4.13±0.24),Chaol 指数为(156±29),2 组 Shannon 指数和 Chaol 指数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。LEfSe 分析显示,透析组患者中肠杆菌目、放线菌门、埃希菌·志贺菌属等的丰度升高,未透析组的拟杆菌门、毛螺菌属丰度升高(图 3)。

讨 论

慢性肾脏病(CKD)是一种进展缓慢且不可逆转的肾脏疾病,其与肠道微生物组之间存在着密切的关系。肠道微生物组是指人体肠道内居住的微生物群落,包括细菌、真菌、病毒等^[8]。在慢性肾脏病患者中,肠道微生物组的失衡已被广泛报道。这种失衡可能导致肠道屏障功能受损,使得肠道内的有害物质和代谢产物进入循环系统,引发炎症反应和免疫紊乱。此外,肠道微生物组的改变还可能影响体内氮负荷的处理和

尿素的产生,进一步加重肾脏的负担^[9]。研究表明,慢性肾脏病患者的肠道微生物组与疾病的进展和并发症风险密切相关。例如,某些细菌的增多与肾小球滤过率的下降和尿蛋白的增加相关^[10];而其他细菌的过度生长则与心血管疾病、炎症反应和代谢紊乱等并发症的风险增加有关^[11]。此外,慢性肾脏病患者的肠道微生物组还可能影响药物的代谢和效果。肠道微生物可以通过代谢酶的作用改变药物的活性和毒性,从而影响药物的疗效和不良反应^[12]。针对肠道微生物组在慢性肾脏病中的作用,一些研究已经开始探索调整肠道微生物组以改善慢性肾脏病进展和预后的策略。这包括通过益生菌和益生元的补充来调节肠道微生物组的平衡,以及采取其他干预措施如饮食调整和粪菌移植等。

统,引起炎症反应和内皮细胞损伤,最终促进血管钙化的发生^[13]。此外,某些特定的菌群也与血管钙化的发展相关,如放线菌门的丰度显著升高。研究发现,某些放线菌门的成员能够激活免疫细胞产生炎症因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6),这些炎症因子可以诱导血管平滑肌细胞转变为骨样细胞,并促进钙盐沉积^[14-15]。其次,菌群失衡可能增加了慢性肾脏病血液透析患者的死亡风险。肠道菌群的异常改变可能导致患者的免疫功能和全身健康状况^[16]。这些改变进一步增加了心血管事件、感染和其他并发症的风险,最终导致患者的死亡风险增加。

在本项研究中肠道菌群 β 多样性的分析结果显示,慢性肾脏病血液透析患者与非透析组之间存在差异。透析组的肠道菌群中潜在病原体显著增加,而有益细菌显著减少。这种差异可能是由多个因素导致的。首先,血液透析本身可能对肠道菌群产生影响。血液透析过程中,患者的血液被引出体外,经过滤器进行清洁和排毒,然后再回输到体内。这个过程可能会干扰肠道菌群的平衡,引起菌群失调^[17]。另外,透析过程中使用的透析液也可能对肠道菌群产生影响,进一步改变菌群的组成。其次,慢性肾脏病本身可能导致肠道菌群的改变。肾功能不全会引起体内代谢产物的积累,如尿素和肌酐等,这些代谢产物可能对肠道菌群产生影响^[18]。此外,肾功能不全还会导致电解质紊乱和酸碱平衡失调,这些因素也可能对肠道菌群产生影响。另外,慢性肾脏病血液透析患者常常需要长期使用药物,如抗生素、磷酸盐结合剂等。这些药物可能对肠道菌群产生直接或间接的影响,导致菌群失衡。最后,慢性肾脏病血液透析患者的饮食限制和营养摄入不足也可能对肠道菌群产生影响。透析患者需要限制高磷饮食,同时可能存在蛋白质摄入不足的情况。这些因素可能导致肠道环境的改变,进而影响菌群的组成^[19]。

另外,对两组患者肠道菌结果分析比较发现肠道菌群物种具有差异性。在慢性肾脏病血液透析患者和未透析组之间存在16个差异菌。其中,在透析组患者中,肠杆菌目、放线菌门、埃希菌?志贺菌属等的丰度升高;而在未透析组中,拟杆菌门、毛螺菌属的丰度升高。这些肠道菌群物种差异可能与血管钙化和死亡风险之间的潜在联系有关。一些研究发现,埃希菌-志贺菌属可能参与血管钙化的发生和发展。首先,埃希菌-志贺菌属可以产生一系列的炎症介质,如细胞因子和化学介质。这些炎症介质能够引起内皮细胞的损伤和炎症反应,进而促进血管壁的炎症反应和纤维斑块形成,最终导致血管钙化的发生^[20]。其次,埃希菌-志贺菌属还可以通过促进氧化应激的机制参与血管钙化。



图3 两组 LefSe 分析
Fig. 3 LefSe analysis between two group

本研究结果表明,透析组血管钙化与死亡情况高于未透析组,且慢性肾脏病患者存在菌群失衡,如拟杆菌门的丰度显著低于未透析组,放线菌门的丰度显著高于未透析组。分析原因在于,菌群失衡可能导致肠道屏障功能受损,使得细菌和其代谢产物进入循环系

氧化应激是指细胞内外环境中活性氧物质过多积累导致细胞氧化损伤的状态。埃希菌-志贺菌属的存在可以增加氧化应激的程度,导致血管内皮细胞的功能异常,进而促进血管钙化的发展^[21]。此外,埃希菌-志贺菌属可能还影响血管壁细胞的功能。研究发现,埃希菌-志贺菌属可以通过与血管壁细胞的相互作用,改变细胞的信号传导和代谢途径,进而影响血管壁细胞的功能和形态学特征,最终参与血管钙化的过程^[22-23]。本研究证实了这种异常的肠道菌群分布存在与慢性肾脏病患者中。

综上,慢性肾脏疾病透析组和未透析组在肠道菌群的丰度和组成上存在差异。与未透析组相比,透析组的血管钙化和死亡风险显著增加。慢性肾脏病血液透析患者的血管钙化、死亡风险和肠道微生物组之间存在密切关联,并相互影响。本次研究的主要局限性在于样本量有限,较小的样本容易引起偶然误差,并可能无法充分反映整个患者群体的特征。未来的研究考虑多中心合作,以扩大样本规模。

【参考文献】

- [1] Ogata H, Fukagawa M, Hirakata HK et al. Effect of treating hyperphosphatemia with lanthanum carbonate vs calcium carbonate on cardiovascular events in patients with chronic kidney disease undergoing hemodialysis: The LANDMARK randomized clinical trial[J]. JAMA, 2021, 325(19):1946-1954.
- [2] Yang L, Dai R, Wu H, et al. Unspliced XBP1 counteracts β -Catenin to inhibit vascular calcification[J]. Circ Res, 2022, 130(2):213-229.
- [3] 云舒,张静,屈伟,等. 醋酸泼尼松长期治疗对阿霉素肾病大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(6):643-649.
- [4] Laucyte-Cibulskiene A, Ward LJ, Ebert T, et al. Role of GDF-15, YKL-40 and MMP 9 in patients with end-stage kidney disease: focus on sex-specific associations with vascular outcomes and all-cause mortality[J]. Biol Sex Differ, 2021, 12(1):50.
- [5] Nagata N, Takeuchi T, Masuoka H, et al. Human gut microbiota and its metabolites impact immune responses in COVID-19 and its complications[J]. Gastroenterology, 2023, 164(2):272-288.
- [6] 李贵森. 2019年《中国慢性肾脏病矿物质和骨异常诊治指南》解读[J]. 诊断学理论与实践, 2020, 19(3):229-231.
- [7] 黄辉,张爱华,陈靖,等. 血管钙化研究进展和临床实践的共识与争议[J]. 生理学报, 2022, 74(6):859-884.
- [8] Vemuri R, Shankar EM, Chieppa M, et al. Beyond just bacteria: functional biomes in the gut ecosystem including virome, mycobiome, archaeome and helminths [J]. Microorganisms, 2020, 8(4):483.
- [9] Chen H, Tong T, Lu SY, et al. Urea cycle activation triggered by host-microbiota maladaptation driving colorectal tumorigenesis [J]. Cell Metab, 2023, 35(4):651-666.
- [10] Li D, Lu Y, Yuan S, et al. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine-N-oxide and multiple health outcomes: an umbrella review and updated meta-analysis [J]. Am J Clin Nutr, 2022, 116(1):230-243.
- [11] Liu X, Tong X, Zou Y, et al. Mendelian randomization analyses support causal relationships between blood metabolites and the gut microbiome[J]. Nat Genet, 2022, 54(1):52-61.
- [12] Collins SL, Patterson AD. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(1):19-32.
- [13] Zhang YW, Cao MM, Li YJ, et al. Fecal microbiota transplantation ameliorates bone loss in mice with ovariectomy-induced osteoporosis via modulating gut microbiota and metabolic function[J]. J Orthop Translat, 2022, 37:46-60.
- [14] 侯立鹏,马丽芳,王瑞青. 肿瘤坏死因子 α 短期刺激促进骨髓间充质干细胞的成骨分化[J]. 东南大学学报:医学版, 2021, 40(4):500-505.
- [15] 尹国婷,刘洁云,王要鑫,等. 苦碟子通过 NLRP3 对急性心梗大鼠心肌细胞损伤及纤维化的作用研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2023, 15(6):683-688.
- [16] Luo Y, Tong Y, Wu L, et al. Alteration of gut microbiota in individuals at high-risk for rheumatoid arthritis associated with disturbed metabolome and the initiation of arthritis through the triggering of mucosal immunity imbalance [J]. Arthritis Rheumatol, 2023, 75(10):1736-1748.
- [17] 胡文兴,刘敏. 益生菌对维持性血液透析慢性肾脏病患者肠道菌群失调的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(11):1323-1326.
- [18] Wang X, Yang S, Li S, et al. Aberrant gut microbiota alters host metabolome and impacts renal failure in humans and rodents [J]. Gut, 2020, 69(12):2131-2142.
- [19] Ampong I, Watkins A, Gutierrez-Merino J, et al. Dietary protein insufficiency: an important consideration in fatty liver disease [J]? Br J Nutr, 2020, 123(6):601-609.
- [20] 袁玲,裴卫,王蕾,等. 慢性肾脏病血管钙化大鼠并发心肌炎性反应[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(2):197-202.
- [21] Fu D, Wu J, Wu X, et al. The two-component system histidine kinase EnvZ contributes to Avian pathogenic *Escherichia coli* pathogenicity by regulating biofilm formation and stress responses[J]. Poult Sci, 2023, 102(2):102388.
- [22] Shad AA, Shad WA. *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance[J]. Arch Microbiol, 2021, 203(1):45-58.
- [23] Yin L, Li X, Ghosh S, et al. Role of gut microbiota-derived metabolites on vascular calcification in CKD[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(3):1332-1341.

【收稿日期】 2024-02-04 【修回日期】 2024-04-29