

# 特发性肺纤维化患者血清 KL-6、CCL18 和 microRNA-21 的表达及意义

梁春联, 权晓娟, 章琳, 李秀丽

西安交通大学第二附属医院呼吸二病区, 陕西 西安 710004

**摘要:** **目的** 分析特发性肺纤维化(IPF)患者血清中涎液化糖链抗原(KL)-6、趋化因子配体(CCL)18及微小核糖核酸(microRNA, miR)-21的表达及其与肺功能水平、病情严重程度关系。**方法** 选取2014年3月至2018年6月就诊的IPF患者60例为IPF组,同时收集60例健康体检者作为对照组,采用酶联免疫吸附法检测两组对象血清KL-6、CCL18蛋白表达水平,实时荧光定量PCR法检测两组对象血清miR-21表达水平,观察患者血清中上述标志物分子含量的变化;探讨其水平与肺功能指标——用力肺活量占预计值的百分比(FVC% pred)及一氧化碳弥散量占预计值的百分比(DLco% pred)间的相关性,并进一步对稳定期和急性加重期IPF患者的血清KL-6、CCL18和miR-21水平进行对比分析。**结果** IPF组患者血清KL-6、CCL18、miR-21水平显著高于对照组( $P < 0.01$ ),且其表达水平与FVC% pred(KL-6:  $r = -0.47, P < 0.01$ ; CCL18:  $r = -0.53, P < 0.01$ ; miR-21:  $r = -0.50, P < 0.01$ )、DLco% pred(KL-6:  $r = -0.35, P < 0.01$ ; CCL18:  $r = -0.48, P < 0.01$ ; miR-21:  $r = -0.38, P < 0.01$ )分别呈显著负相关。与稳定期IPF患者相比,急性加重期IPF患者血清KL-6、CCL18、miR-21水平进一步升高( $P = 0.011, 0.049, 0.033$ )。**结论** IPF患者血清KL-6、CCL18和miR-21水平较正常人显著升高,且其水平高低与肺功能参数、病情严重程度之间有一定相关性,可用作病情评估、预后判定的生物学指标。

**关键词:** 特发性肺纤维化; 涎液化糖链抗原6; 趋化因子配体18; 微小核糖核酸-21; 肺功能; 急性加重

**中图分类号:** R 563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)04-0452-04

## Expression and significance of serum KL-6, CCL18 and microRNA-21 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis

LIANG Chun-lian, QUAN Xiao-juan, ZHANG Lin, LI Xiu-li

Second Ward of Respiratory Department, the Second Affiliated Hospital of

Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China

Corresponding author: LI Xiu-li, E-mail: lixiuli1968@163.com

**Abstract: Objective** To explore the expressions and significance of serum Krebs von den Lungen-6 (KL-6), CC chemokine ligand 18 (CCL-18) and microRNA-21 (miR-21) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and their associations with pulmonary function and disease severity. **Methods** Sixty patients with IPF treated from March 2014 to June 2018 were selected as IPF group, and 60 health examiners were served as control group at the same time. The serum levels of KL-6, CCL18 were detected by ELISA, and miR-21 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, respectively in two groups to observe the changes of the above-mentioned molecular markers. The relationship between their levels and the pulmonary function indexes [forced vital capacity (percentage of predicted value), FVC% pred and diffusing capacity for carbon monoxide (percentage of predicted value), DLco% pred] were analyzed. The levels of KL-6, CCL18 and miR-21 were compared in the patients with stable and acute exacerbation of IPF. **Results** The levels of serum KL-6, CCL18 and miR-21 in IPF group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.01$ ), and their expression levels were negatively correlated with FVC% pred (KL-6:  $r = -0.47, P < 0.01$ ; CCL18:  $r = -0.53, P < 0.01$ ; miR-21:  $r = -0.50, P < 0.01$ ) and DLco% pred (KL-6:  $r = -0.35, P < 0.01$ ; CCL18:  $r = -0.48, P < 0.01$ ; miR-21:  $r = -0.38, P < 0.01$ ), respectively. Compared with the stable patients, the serum levels of KL-6, CCL18 and miR-21 were further increased in patients with acute exacerbation of IPF (KL-6:  $P = 0.011$ , CCL18:  $P = 0.049$ , miR-21:  $P = 0.033$ ). **Conclusion** The

serum levels of KL-6, CCL18, and miR-21 in IPF patients are obviously higher than those in health persons, and their levels are correlated with pulmonary function parameters and the severity of the disease, which can be used as biomarkers for evaluating the development and prognosis of the patients with IPF.

**Key words:** Idiopathic pulmonary fibrosis; Krebs von den Lungen-6; CC chemokine ligand 18; microRNA-21; Pulmonary function; Acute exacerbation

**Fund program:** Shaanxi Provincial Natural Science Basic Research Plan Project (2018JM7076)

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种进行性、致死性的慢性肺间质纤维化疾病。IPF 病因不明, 起病隐匿, 在其发展过程中存在高度的个体差异性, 有的患者可较长时间保持病情稳定, 有的患者短期内即迅速出现恶化即 IPF 急性加重 (acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis, AEIPF)。目前, 该病的临床诊断主要依据症状、体征、肺功能指标、高分辨 CT 及支气管镜活检等手段进行, 但上述方法对于有些患者尤其老年患者难以配合和耐受, 且其在疾病的严重程度、活动性及预后评估方面均有一定的局限性。

血清标志物采样方法简便、容易获取、患者对检测依从性高, 适于广泛开展。目前, 国外众多研究表明 IPF 患者血液中涎液化糖链抗原 6 (Krebs von den Lungen-6, KL-6)、趋化因子配体 18 (CC chemokine ligand 18, CCL18) 的水平显著升高, 并且其表达水平高低与疾病的严重程度、生存及预后有一定的相关性<sup>[1-3]</sup>。但国内对 IPF 患者上述血清标志物的临床检测及应用尚较少。同时, 越来越多的研究表明, 微小核糖核酸 (microRNA, miR) 在血循环中稳定表达, 且其表达水平与机体的生理、病理状况紧密相关, 并有望作为糖尿病、心血管病、肺癌等多种疾病的诊断标志物。有文献报道 IPF 患者血清 miR-21 水平较正常人升高, 且其水平高低可能与疾病的发展程度有一定的相关性<sup>[4-5]</sup>, 但 miR-21 水平与肺功能指标间的相关性及其作为疾病标志物的临床应用价值尚有待进一步验证和探讨。

因此, 本研究对 IPF 患者血清中 KL-6、CCL18、miR-21 的水平进行检测, 分析其表达水平与肺功能指标间的相关性, 并探索急性加重期患者上述标志物水平的进一步变化, 以期对 IPF 的早期诊断、病情监测、预后评估及临床用药提供指导。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 3 月至 2018 年 6 月在本院门诊、住院诊疗的 IPF 患者 60 例为 IPF 组, 其中男 47 例, 女 13 例; 年龄 51 ~ 74 (63.87 ± 5.69) 岁; 病程 6 ~ 34 (16.98 ± 6.93) 个月。同时选取在本院门诊

体检的同年龄段、性别比例一致的正常人群 60 例作为健康对照组。所有病例均符合 2011 年美国胸科学会/欧洲呼吸学 (ATS/ERS/JRS/ALAT) 会制定的诊断标准<sup>[6]</sup>。排除标准: 合并恶性肿瘤、严重肝肾疾病、糖尿病等代谢性疾病者, 近 2 个月内曾使用糖皮质激素、免疫抑制剂等药物治疗者。IPF 急性加重 (AEIPF) 的判定标准: (1) IPF 患者近 30 d 内不明原因出现呼吸困难加重; (2) 高分辨率 CT (HRCT) 在原有病变的基础上出现新发双肺磨玻璃影或不伴实变影; (3) 气管分泌物或肺泡灌洗液病原学检查没有感染依据; (4) 除外左心衰、肺栓塞、急性肺损伤等诱因。根据该判定标准, IPF 患者 60 例中, AEIPF 患者为 12 例, 稳定期患者为 48 例。本研究经西安交通大学第二附属医院伦理委员会审核批准。

### 1.2 观察指标

**1.2.1 肺功能及血气分析** 使用肺功能仪 (美国 Sensor Neducs 2200) 检测用力肺活量占预计值的百分比 (FVC% pred) 及一氧化碳弥散量占预计值的百分比 (DLco% pred); 使用血气分析仪 (丹麦雷度米特, 型号: ABL700) 检测动脉血氧分压 (PaO<sub>2</sub>)。

**1.2.2 血清标志物的检测** 所有研究对象均于就诊当日抽取空腹肘静脉血 8 ml, 3 000 rpm 离心 10 min 分离上层血清, 保存于 -80 °C 冰箱备用。采用酶联免疫吸附法检测血清 KL-6 (KL-6 ELISA 试剂盒, 日本 Eidia 有限公司)、CCL18 (CCL18/PARC ELISA 试剂盒, 美国 R&D 公司) 蛋白表达水平。实时荧光定量 PCR 法检测血清 miR-21 的表达, 以 U6 作为内参, 结果采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法分析, 计算相对表达量。

**1.3 统计学方法** 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 *t* 检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验; 相关性采用 Pearson's 相关分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组一般资料比较** 两组在性别比例、年龄、吸烟史上比较, 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。IPF 组患者肺功能指标 FVC% pred、DLco% pred、PaO<sub>2</sub> 均显著低于对照组 (P 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 两组血清 KL-6、CCL18 蛋白表达水平和 miR-21 表达水平比较 IPF 组患者外周血 KL-6、CCL18 蛋白表达水平及 miR-21 表达水平均显著高于对照组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 2。

2.3 IPF 患者血清标志物与肺功能指标的相关性 相关分析显示, IPF 患者血清 KL-6、CCL18、miR-21 水

表 1 两组一般资料比较 ( $n=60$ )

指标	对照组	IPF 组	统计值	$P$ 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	64.75 $\pm$ 5.74	63.87 $\pm$ 5.69	$t=0.847$	0.399
性别(例, 男/女)	45/15	47/13	$\chi^2=0.186$	0.666
吸烟史(例, 有/无)	41/19	46/14	$\chi^2=1.045$	0.307
FVC% pred ( $\bar{x} \pm s$ )	88.48 $\pm$ 4.63	69.48 $\pm$ 5.05	$t=21.495$	0.000
DLco% pred ( $\bar{x} \pm s$ )	89.49 $\pm$ 5.01	45.19 $\pm$ 4.77	$t=49.593$	0.000
PaO <sub>2</sub> (mm Hg, $\bar{x} \pm s$ )	88.01 $\pm$ 4.61	68.57 $\pm$ 5.27	$t=21.497$	0.000

表 2 两组血清 KL-6、CCL18 蛋白表达水平和 miR-21 表达水平比较 ( $n=60, \bar{x} \pm s$ )

组别	KL-6(U/ml)	CCL18(ng/ml)	miR-21
对照组	313.53 $\pm$ 44.35	38.40 $\pm$ 21.06	1.17 $\pm$ 0.25
IPF 组	943.58 $\pm$ 217.01	141.07 $\pm$ 31.51	2.24 $\pm$ 0.32
$t$ 值	22.033	20.981	20.470
$P$ 值	0.000	0.000	0.000

表 3 稳定期和急性加重期患者血清标志物比较

组别	例数	KL-6(U/ml)	CCL18(ng/ml)	miR-21
稳定期	48	939.36 $\pm$ 222.16	141.80 $\pm$ 33.17	2.31 $\pm$ 0.46
AEIPF	12	1149.33 $\pm$ 252.99*	165.17 $\pm$ 35.20*	2.69 $\pm$ 0.62*
$t$ 值		2.661	2.028	2.214
$P$ 值		0.011	0.049	0.033

注:与稳定期患者相比, \* $P < 0.05$ 。

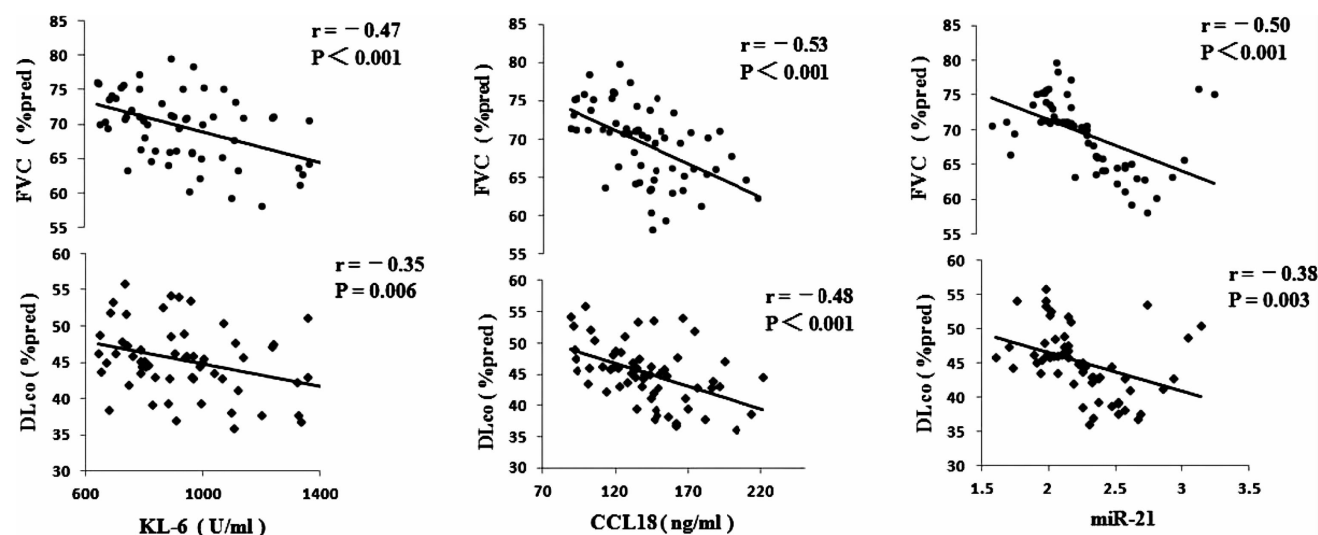


图 1 IPF 患者血清标志物水平与肺功能的相关性

平与 FVC% pred、DLco% pred 分别呈显著负相关 ( $P$  均  $< 0.01$ )。见图 1。

2.4 稳定期和 AEIPF 患者血清标志物水平比较

AEIPF 患者血清 KL-6、CCL18 和 miR-21 表达水平较稳定期患者进一步升高 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 3。

### 3 讨论

迄今, IPF 的病因和发病机制尚不明确, 临床诊断时患者往往已处于疾病晚期, 而且在诊断后疾病的发展过程中存在高度的异质性。因此, 对 IPF 标志物分子的鉴定将为疾病的早期诊断、病情评估、预后判定提供有力的帮助。与现有的诊断方法相比, 血清标志物的检测操作简单, 并可重复检测以动态评估病情变化。目前, 对于 IPF 血循环标志物的鉴定国外开展的较多, 尤其是日本, 他们对 KL-6、CCL18、肺泡表面活性蛋白 (surfactant protein, SP, 如 SP-A、SP-D)、基质金属蛋白酶 7 (matrix metallo proteinase-7, MMP-7)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,

VEGF) 等进行广泛的研究, 并已将部分研究成果应用到临床实践中<sup>[7-9]</sup>。然而, 国内相关研究报道却寥寥无几。miRNA 是一类高度保守的、非编码小分子 RNA, 在血液中高丰度表达并稳定存在, 并与许多疾病的病理状况紧密相关。近期研究报道, IPF 患者血清中 miR-21 的表达升高<sup>[4-5]</sup>。因此, 本研究对 60 例 IPF 患者血清 KL-6、CCL18、miR-21 水平进行了检测, 结果显示, 与对照组相比, IPF 组患者血清 KL-6、CCL18、miR-21 水平显著增加; 而在 AEIPF 患者, 其表达水平较稳定期患者进一步升高, 提示上述标志物与病情的发展变化有一定相关性。

IPF 患者主要表现为限制性肺通气功能障碍和弥散功能障碍, 通过检测肺功能可以间接反映其病理损伤程度。但在临床实践中, 很多老年患者往往无法配合实施。本研究相关分析表明, IPF 患者血清 KL-6、CCL18、miR-21 水平与肺功能指标 FVC% pred、DLco% pred 呈显著负相关, 提示当肺功能检测难以进行时, 可以依据上述三个标志物的表达水平对患者

的病情进行初步评估和预判。

KL-6 是一种高分子量糖蛋白,主要表达于 II 型肺泡上皮细胞膜表面,IPF 时血清 KL-6 升高的机制主要有两方面:(1)肺泡上皮损伤,再生的 II 型肺泡上皮细胞高表达 KL-6,导致其生成增加。(2)肺泡基底膜损伤、毛细血管通透性增加,使得 KL-6 释放入血增多。而入血后的 KL-6 可抑制肺成纤维细胞的凋亡,并促进其增殖和迁移,进一步促进肺纤维化进展<sup>[10]</sup>。研究表明,血清 KL-6 浓度大于 1 000 U/ml 时提示预后不良,而当其水平大于 1 300 U/ml 时则预示着 AEIPF 发生的几率显著增加<sup>[11-12]</sup>。本研究中 AEIPF 患者血清 KL-6 水平为 1 149.33 U/ml,与上述报道接近。CCL18 是一类趋化因子家族的小细胞因子,主要由抗原递呈细胞产生,在肺中高表达并介导炎症及免疫反应。IPF 患者血清 CCL18 升高可能与以下因素有关:(1)肺组织释放入血增多;(2)疾病状态下血液中胶原含量增加,刺激肺外巨噬细胞分泌更多的 CCL18。据报道,肺纤维化患者肺泡灌洗液和血清中 CCL18 水平明显升高<sup>[13]</sup>。另外,国外研究还发现,IPF 患者血清 CCL18 > 150 ng/ml 时的死亡率明显升高,是预后不良的危险因素<sup>[14]</sup>。本研究稳定期患者血清 CCL18 水平(141.8 ± 33.17) ng/ml,AEIPF 患者水平升高至(165.17 ± 35.20) ng/ml,与上述报道相一致。IPF 疾病状态下,血清 miRNA 表达升高的机制尚不明确,推测可能与肺组织损伤破坏时生成及释放入血增多有关。

尽管尚有诸多问题不明确,但是,生物标志物可以帮助解决 IPF 患者分层及精准医疗等重要问题。同时 IPF 新药的临床试验也迫切需要可靠的生物指标来进行疗效评估<sup>[15]</sup>。因此,生物标志物的重要性日益凸显出来。本研究虽然验证了 KL-6、CCL18、miR-21 的异常表达及病情监测作用,但其作为标志物分子联合诊断 IPF 的特异性、准确性尚有待进一步探讨。同时,抗肺纤维化新药(如吡非尼酮、尼达尼布等)对其表达水平的影响也有待进一步研究。

#### 参考文献

[1] Guiot J, Moermans C, Henket M, et al. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis [J]. Lung, 2017, 195(3): 273-280.

- [2] Cai M, Bonella F, He X, et al. CCL18 in serum, BAL fluid and alveolar macrophage culture supernatant in interstitial lung diseases [J]. Respir Med, 2013, 107(9): 1444-1452.
- [3] Ohshimo S, Ishikawa N, Horimasu Y, et al. Baseline KL-6 predicts increased risk for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Med, 2014, 108(7): 1031-1039.
- [4] Li P, Zhao GQ, Chen TF, et al. Serum miR-21 and miR-155 expression in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Asthma, 2013, 50(9): 960-964.
- [5] Li P, Li J, Chen T, et al. Expression analysis of serum microRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(6): 1554-1562.
- [6] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824.
- [7] Sokai A, Tanizawa K, Handa T, et al. Importance of serial changes in biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. ERJ Open Res, 2017, 3(3): 00019-2016.
- [8] Wakamatsu K, Nagata N, Kumazoe H, et al. Prognostic value of serial serum KL-6 measurements in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Investig, 2017, 55(1): 16-23.
- [9] Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, et al. Comparative study of circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as disease markers of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Disease Markers, 2016, 2016: 4759040.
- [10] 朱晨, 赵亚滨, 孔灵菲, 等. 涎液化糖链蛋白 6 在特发性肺纤维化患者支气管肺泡灌洗液和血清中的表达及临床意义 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2015, 14(3): 225-228.
- [11] Satoh H, Kurishima K, Ishikawa H, et al. Increased levels of KL-6 and subsequent mortality in patients with interstitial lung diseases [J]. J Intern Med, 2006, 260(5): 429-434.
- [12] Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, et al. Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(5 Pt 1): 1680-1684.
- [13] Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, et al. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(5): 1685-1693.
- [14] Prasse A, Probst C, Bargagli E, et al. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(8): 717-723.
- [15] 李炯, 苏立. 特发性肺纤维化病情评估和预后生物标志物的研究进展 [J]. 重庆医学, 2017, 46(25): 3591-3594.

收稿日期: 2019-07-06 修回日期: 2019-08-27 编辑: 石嘉莹