

• 专家述评 •

Klotho 在慢性肾病和血管钙化中的作用*

崔丽艳, 赵 阳

(北京大学第三医院检验科, 北京 100191)

摘 要: Klotho 基因是 KURO-O 等于 1997 年发现的基因, Klotho 敲除小鼠表现出早衰的表型, 而 Klotho 过表达小鼠则具有更长的寿命, 提示 Klotho 基因在衰老和衰老相关疾病的发生中起着重要作用。Klotho 的主要表达器官是肾脏、脑部和甲状旁腺。Klotho 在体内分为膜型和分泌型 2 种形式, 并发挥不同的生理学作用。本文主要综述了 Klotho 与慢性肾病 (CKD) 和血管钙化的关系, 并对 Klotho 相关研究提出了展望。

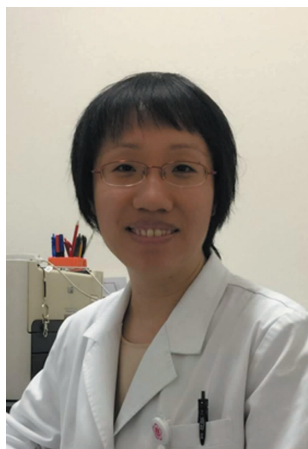
关键词: Klotho; 慢性肾病; 血管钙化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.001

中图法分类号: Q343.1

文章编号: 1673-4130(2018)14-1665-04

文献标识码: A



崔丽艳

1 Klotho 基因的一般生物学特点

Klotho 基因是最初由 KURO-O 等^[1]于 1997 年发现并鉴定的基因, 它表达一种抗衰老的蛋白, 参与多种生理过程, 发挥多种生物学效应。Klotho 敲除的小鼠表现出类似人类早衰的现象, 包括寿命缩短、生长迟滞、骨质疏松、血管钙化、无

调控肾脏内离子通道以及抑制 Wnt 信号通路、抑制细胞凋亡和衰老等等^[5]。

2 Klotho 与慢性肾病 (CKD)

CKD 与心血管疾病的高发病率和致死率相关。美国心脏学会 (AHA) 声明, CKD 患者应被归入心血管疾病的最高危人群^[6]。传统危险因子只能部分解释 CKD 患者患心血管疾病的风险增高, 这说明还有其他危险因子参与 CKD 发病。

2.1 CKD 患者中 Klotho 表达降低 研究发现, 在 CKD 患者中, Klotho 的蛋白表达水平下降, 在其他血管早衰性疾病如高血压和糖尿病中也有类似的发现^[7]。KOH 等^[8]对透析患者的肾脏组织进行 Klotho 蛋白表达的检测发现, 与对照人群相比, 透析患者的肾脏组织 Klotho 表达仅为前者的 5%~15%。在终末期肾病患者中结果类似^[9]。即便在健康人群中, 随着年龄的增加, 血浆和尿液中 Klotho 蛋白的浓度也逐渐降低。有研究表明啮齿类动物发生急性肾损伤 (AKI) 时, 血液及尿液中 Klotho 蛋白浓度降低, 已知 Klotho 蛋白表达的降低是肾损伤后最先出现的变化, 并且这种降低是可以随着肾功能的恢复而逆转的, 这说明 AKI 是一种短暂的 Klotho 缺失的过程。最近有研究表明 Klotho 水平降低可能通过作用于 Wnt/ β -Catenin 通路或离子通道 TRPV6 从而影响肾脏功能^[10-11]。基于以上大量研究, 毋庸置疑的是 Klotho 蛋白表达水平与肾功能密切相关, 这也为临床上肾脏疾病的诊断提供了全新的生物标志物。如今越来越多的证据表明, Klotho 蛋白水平的降低不仅是 CKD 的早期预兆, 也是肾功能下降、冠心病和心肌肥厚等

生育力、内皮功能失常、进行性动脉粥样硬化和皮肤萎缩等, 其寿命仅为 2 个月左右^[2]。Klotho 基因在人和小鼠中位于染色体 13q12, 其编码一种 I 型单次跨膜蛋白, 该蛋白含有 1 012 个氨基酸。Klotho 基因主要表达在肾脏远端小管上皮细胞, 在其他一些器官如垂体、胰腺、卵巢、睾丸等也有表达^[1]。

Klotho 蛋白在体内有 2 种形式: 膜型和分泌型。膜型 Klotho 蛋白为基因全段表达产物; 分泌型 Klotho 蛋白可由 Klotho 基因的可变剪接以及胞外段脱落形成。近年研究表明膜型 Klotho 参与了矿物质代谢的内分泌调节以及多种信号通路的调节^[3]。在人体中, 与膜型 Klotho 蛋白相比, 分泌型 Klotho 蛋白占有主导地位, 分泌型 Klotho 蛋白在血液、尿液和脑脊液中都可以检测到^[4]。它在循环系统内作为一种体液因子发挥多种生物学功能, 如抑制炎症、抗氧化、

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (61771022; 81700648)。

作者简介: 崔丽艳, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师。北京医师协会检验医/技师分会肾病学组副组长, 中国医师学会检验医师分会肾病专委会委员, 北京大学第三医院检验科免疫组组长。专业方向为临床免疫学检验。主要从事生物标志物筛选、早期诊断及相关机制等方向研究。

本文引用格式: 崔丽艳, 赵阳. Klotho 在慢性肾病和血管钙化中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(14): 1665-1667.

发病的标志之一^[12]。

2.2 Klotho 蛋白对肾脏的保护作用 Klotho 是肾脏的保护因子。当过表达 Klotho 后,对小鼠肾小球肾炎和 AKI 模型有明显改善作用^[13-15]。目前关于 Klotho 保护肾脏免受损伤的具体机制研究还不是很明确,但可能包括抗氧化^[13]、抗凋亡^[14-16]、抗衰老^[16-17]和血管新生^[18]。除了 AKI, Klotho 蛋白对于 CKD 的保护作用也在多种动物模型中得到了确认。给予 Klotho 的腺病毒能够改善长期血管紧张素 II 注射引起的肾功能障碍/蛋白尿和肾小管间质改变^[19]。近年研究发现,PPAR γ 受体激动剂、血管紧张素 II-I 型受体激动剂、维生素 D 受体激动剂和雷帕霉素等药物可在离体或在体水平上调 Klotho 的表达^[3,20]。因此,临床上增加内源性 Klotho 水平可能是治疗 CKD 相关疾病的新策略。

2.3 CKD 中 Klotho、成纤维细胞生长因子 23 (FGF23)、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 和甲状旁腺素的变化 随着 CKD 的加重,血浆 FGF23 水平逐渐升高,这是在 FGF 受体活性降低后维持 FGF23 正常信号通路活性的一种代偿^[21]。在正常的肾脏中, Klotho 表达是足量的,而 FGF23 的表达水平很少,这样 FGF23 可以有效地发挥促尿磷外排的作用。随着 CKD 的进展, FGF23 水平越来越高,而功能正常的肾单位以及肾小管表达的 Klotho 水平越来越低。血浆 FGF23 水平的增多是为了维持血磷稳态,但这也抑制了 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的合成^[21]。最终,尿磷外排的速率跟不上血磷增加的速率,导致了高磷血症。因此, Klotho 的表达下降加速了肾损伤的过程,形成了 Klotho 表达减少与肾功能下降的恶性循环。由于 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 能够上调 Klotho 在肾脏的表达^[22], 维生素 D 或维生素 D 受体激动剂 (VDRA) 可能为临床上抑制这种恶性循环提供可能。CKD 发生时 Klotho、FGF23、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 及甲状旁腺素 (PTH) 的变化示意图见图 1^[23]。

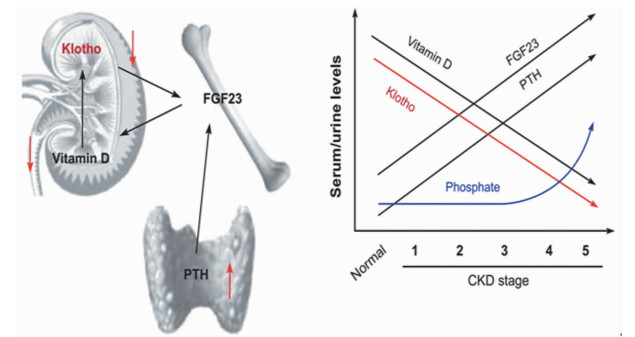


图 1 随着 CKD 的发展, Klotho、FGF23、PTH、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 水平的变化

3 Klotho 与血管钙化

3.1 血管钙化的发病 血管钙化是指钙磷复合物 (羟基磷灰石) 在血管壁的异位沉积, 是动脉粥样硬

化、CKD、糖尿病血管病变、高血压和血管损伤等患者中普遍存在的共同临床病理表现。血管钙化包括内膜钙化和中膜钙化。其中内膜钙化主要见于动脉粥样硬化, 而中膜钙化主要发生于 CKD、衰老过程以及糖尿病患者中。尤其在终末期肾衰竭患者中, 冠状动脉和主动脉钙化导致血管僵硬增加, 被认为是血液透析患者主要的心血管疾病, 是重要的致死因素。慢性肾衰竭患者的血管钙化大多为中膜钙化, 常常发生于患者的大中动脉, 如主动脉、股动脉等。在慢性肾衰竭患者中, 血管钙化的进程加快, 且更为严重^[24]。

血管钙化是慢性肾衰竭患者主要发生的心血管疾病, 由于肾功能紊乱以及继发的内分泌调节紊乱, 慢性肾衰竭患者常发生高磷血症。众多研究表明, 升高的血磷能够直接作用于血管平滑肌细胞进而促进血管钙化。血管钙化的发生机制包括平滑肌细胞的凋亡, 这是比较早期的反应^[25]。与此同时, 平滑肌细胞会发生一种表型转化, 由平滑肌细胞的收缩表型向成骨/成软骨表型转化, 分泌基质小泡和胶原纤维, 伴随凋亡小体的形成, 形成了羟基磷灰石沉积的早期病灶^[26]。

3.2 Klotho 抑制血管钙化发生 在 K1+/- 和野生型小鼠 CKD 模型中存在大量软组织钙化和血管钙化, 而 Klotho 转基因小鼠 CKD 模型则无钙化的发生^[27], 其中发生钙化的器官主要在主动脉和肾脏, 这一事实证明了 Klotho 能够减轻血管钙化的发生。并且, 在这些 CKD 模型小鼠中, Klotho 转基因小鼠的肾功能最好, PTH 水平最低, 而 K1+/- 小鼠的肾功能最差, PTH 水平也最高 (和野生型小鼠 CKD 模型相比)。LAU 等^[28]发现 VDRA 能够上调体内 Klotho 的表达从而抑制 CKD 模型小鼠的主动脉钙化。

血管钙化的一个重要调控因子是磷。高磷血症能够加重 CKD 并发症, 如甲状旁腺功能亢进、骨营养不良和血管钙化的发生, 而控制血磷能够减轻这些病症^[29]。在 K1+/- 和野生型小鼠 CKD 模型中都存在高磷血症。而在 Klotho 转基因小鼠 CKD 模型中则无高磷血症发生^[27]。因此, Klotho 可能是一种促进尿磷外排的蛋白, 这种促进尿磷外排的作用可能是其抑制血管钙化的可能机制之一。

Ⅲ型钠磷转运体 Pit-1 和 Pit-2 是平滑肌细胞摄取无机磷的关键调控者, 其在血管钙化的发病中也扮演了重要角色; Cbfa1 的增加是平滑肌细胞向成骨表型分化的标志, 而 SM22 α 是平滑肌细胞收缩表型的标志, 此二者的变化常见于血管钙化^[20]。与野生型小鼠相比, Klotho 敲除小鼠中 Pit-1、Pit-2 和 Cbfa-1 的 mRNA 水平升高, SM22 α 的 mRNA 水平降低, 而在 Klotho 转基因小鼠中有着相反的变化。因此, Klotho 可能能够调控平滑肌细胞的分化和去分化^[27]。在离

体培养的平滑肌细胞中, Klotho 也能抑制高磷条件下钠磷转运体对磷的摄取^[27]。

综上所述, Klotho 减轻血管钙化的可能途径是: (1) 减缓 CKD 的发病进程, 维持肾功能; (2) 通过促进尿磷外排维持正常血磷水平; (3) 直接抑制平滑肌细胞对磷的摄取^[30]。

4 小结与展望

Klotho 基因是哺乳动物体内一个重要的衰老抑制基因。它同时具有受体、配体和酶的功能, 具有调节钙磷代谢、抗氧化、抗凋亡以及抗衰老等作用, 并以此实现对机体多种器官尤其是肾脏的保护。AKI 能够诱导短暂而严重的肾脏、内分泌系统 Klotho 表达的降低, 而 CKD 则引起一种持续的系统性的 Klotho 缺失状态。Klotho 对 AKI 和 CKD 都有保护性作用^[15, 27]。Klotho 不仅是一种敏感的 CKD 生物标记物, 同时也在肾脏疾病、矿物质代谢和 CKD 后血管钙化的发生、发展中起到重要作用。Klotho 在临床诊断和治疗中的意义在于: (1) 作为 CKD 的早期敏感生物标志物, 用于预测诊断 CKD。目前检测 Klotho 的 ELISA 试剂盒已经面世, 在未来一段时间内, 将会有大规模的临床前调查和测试, 可能在不久的将来, 血液/尿液 Klotho 的临床检测将会普及, 将可能为肾脏疾病乃至心血管疾病的诊断提供重要依据。 (2) 临床上用来增加内源性 Klotho 或外源给予 Klotho 的疗法可能治疗肾脏疾病、血管钙化和高磷血症等具有潜在的重要意义。

总之, Klotho 具有广泛并重要的生物学保护作用, 是目前衰老、肾脏病和心血管领域的研究热点之一。

参考文献

- [1] KURO-O M, MATSUMURA Y, AIZAWA H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing [J]. *Nature*, 1997, 390(6655): 45-51.
- [2] KURO-O M. Klotho [J]. *Pflugers Archiv*, 2010, 459(2): 333-343.
- [3] LU X, HU M C. Klotho/FGF23 axis in chronic kidney disease and cardiovascular disease [J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2017, 3(1): 15-23.
- [4] CHANG Q, HOEFS S, VAN DER KEMP A W, et al. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel [J]. *Science*, 2005, 310(5747): 490-493.
- [5] HU M C, KURO-O M, MOE O W. Renal and extrarenal actions of Klotho [J]. *Semin Nephrol*, 2013, 33(2): 118-129.
- [6] COVIC A, VERVLOET M, MASSY Z A, et al. Bone and mineral disorders in chronic kidney disease: implications for cardiovascular health and ageing in the general population [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(4): 319-331.
- [7] BARKER S L, PASTOR J, CARRANZA D, et al. The demonstration of alphaKlotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(2): 223-233.
- [8] KOH N, FUJIMORI T, NISHIGUCHI S, et al. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(4): 1015-1020.
- [9] WEBSTER A C, NAGLER E V, MORTON R L, et al. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1238-1252.
- [10] KIM J H, XIE J, HWANG K H, et al. Klotho may ameliorate proteinuria by targeting TRPC6 channels in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(1): 140-151.
- [11] ZHOU L, LI Y, ZHOU D, et al. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/beta-catenin signaling [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(5): 771-785.
- [12] MARTIN-NUNEZ E, DONATE-CORREA J, MUROS-DE-FUENTES M, et al. Implications of Klotho in vascular health and disease [J]. *World J Cardiol*, 2014, 6(12): 1262-1269.
- [13] HARUNA Y, KASHIHARA N, SATOH M, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(7): 2331-2336.
- [14] SUGIURA H, YOSHIDA T, TSUCHIYA K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(12): 2636-2645.
- [15] SUGIURA H, YOSHIDA T, MITOBE M, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70 [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(1): 60-68.
- [16] IKUSHIMA M, RAKUGI H, ISHIKAWA K, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(3): 827-832.
- [17] LIU H, FERGUSSON M M, CASTILHO R M, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging [J]. *Science*, 2007, 317(5839): 803-806.
- [18] SHIMADA T, TAKESHITA Y, MUROHARA T, et al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse [J]. *Circulation*, 2004, 110(9): 1148-1155.
- [19] MITANI H, ISHIZAKA N, AIZAWA T, et al. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage [J]. *Hypertension*, 2002, 39(4): 838-843.
- [20] ZHAO Y, ZHAO M M, CAI Y, et al. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation [J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 711-721.

增高可能是由于含有较高铬盐尿液的盐饱和度较高,这有助于晶体形成^[6-8]。尿沉渣分析表明,铬盐暴露工人尿 RBC、WBC、Bact 数量等与对照组相比无显著差异,但尿中 EC、SRC 数和 X'TAL 水平明显升高,表明较高水平的尿铬可造成肾损伤,自动尿沉渣分析方法可用于提供铬盐暴露工人肾损伤监测的辅助指标。

目前尿酶活性分析已经广泛应用于肾损伤的评价,有文献报道铬盐暴露工人尿中 NAG、AST、LDH、GGT 和 ALP 活性会升高,并认为这是肾小管损伤的早期敏感指标^[2-3]。本实验中,与对照组相比,暴露组中尿 AST、LDH、ALP 活性无显著升高,可能与铬盐暴露工人的暴露剂量差异有关^[9-10]。本实验结果显示,铬盐暴露工人尿中 NAG 活力显著升高,并与 U-Cr 水平显著相关,提示尿 NAG 是评价早期肾损伤的指标之一。

4 结 论

尿沉渣自动分析和尿 NAG 酶活性测定对职业铬盐暴露工人健康监测具有一定的辅助作用。

参考文献

[1] 闫蕾,贾光,张济,等. 职业接触可溶性铬盐个体暴露与尿铬水平的相关性研究[J]. 中华预防医学杂志,2006,40(6):386-389.

[2] HU G, LI P, LI Y, et al. Methylation levels of P16 and TP53 that are involved in DNA strand breakage of 16HBE cells treated by hexavalent chromium[J]. Toxicol Lett, 2016, 249:15-21.

(上接第 1667 页)

[21] GUTIERREZ O, ISAKOVA T, RHEE E, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease [J]. Journal of the Am Soc Nephrol, 2005, 16(7):2205-2215.

[22] TSUJIKAWA H, KURITAKI Y, FUJIMORI T, et al. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(12):2393-2403.

[23] KURO-O M. Klotho and the aging process[J]. Korean J Intern Med, 2011, 26(2):113-122.

[24] VERVOET M, COZZOLINO M. Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall? [J]. Kidney Int, 2017, 91(4):808-817.

[25] PROUDFOOT D, SKEPPER J N, HEGYI L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies [J]. Circulation research, 2000, 87(11):1055-

[3] LI Y, LI P, YU S, et al. miR-3940-5p associated with genetic damage in workers exposed to hexavalent chromium [J]. Toxicol Lett, 2014, 229(1):319-326.

[4] 李桂荣, 张济, 闫蕾, 等. 可溶性铬盐职业接触者 DNA 链断裂的研究[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(6):395-399.

[5] 刘素华, 刘岚铮, 张瑛, 等. 石墨炉原子吸收法直接测定红细胞中铬[J]. 预防医学论坛, 2005, 11(4):428-429.

[6] DELANGHE J R, KOURI T T, HUBER A R, et al. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice[J]. Clin Chim Acta, 2000, 301(1/2):1-18.

[7] REINE N J, LANGSTON C E. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample[J]. Clin Tech Small Anim Pract, 2005, 20(1):2-10.

[8] OTTIGER C, HUBER A R. Quantitative urine particle analysis: integrative approach for the optimal combination of automation with UF-100 and microscopic review with KOVA cell chamber[J]. Clin Chem, 2003, 49(4):617-623.

[9] WANG X, QIN Q, XU X, et al. Chromium-induced early changes in renal function among ferrochromium-producing workers[J]. Toxicology, 1994, 90(1/2):93-101.

[10] WANG T, JIA G, ZHANG J, et al. Renal impairment caused by chronic occupational chromate exposure[J]. Int Arch Occup Environ Health, 2011, 84(4):393-401.

(收稿日期:2018-01-02 修回日期:2018-04-08)

1062.

[26] SHANAHAN C M, CROUTHAMEL M H, KAPUSTIN A, et al. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate [J]. Circ Res, 2011, 109(6):697-711.

[27] HU M C, SHI M, ZHANG J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1):124-136.

[28] LAU W L, LEAF E M, HU M C, et al. Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet [J]. Kidney Int, 2012, 82(12):1261-1270.

[29] KURO O M. Phosphate and klotho [J]. Kidney Int Suppl, 2011, 38(121):S20-23.

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

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-03-11)