

炎症状态下终末期肾病大鼠肾脏 Klotho 蛋白表达及血管钙化的关系^{*}

郭莉, 李建东^{**}, 郭珊珊, 陈航, 龚幼兰, 张亚璞

(河北大学附属医院 肾脏内科, 河北 保定 071000)

[摘要] **目的:** 探讨炎症状态下终末期肾病(ESRD)大鼠 Klotho 蛋白与血管钙化的关系。**方法:** 将大鼠随机分为对照组(灌胃生理盐水)、ESRD 组(250 mg/kg 灌胃腺嘌呤)、ESRD 合并炎症组(250 mg/kg 灌胃腺嘌呤, 隔日以 1.0 g/kg 皮下注射 10% 酪蛋白), 于灌胃 10 周时, 采用化学比色法检测血清钙(Ca)、磷(P)、尿素氮(BUN)及肌酐(SCr)水平, 采用 ELISA 法检测血清甲状旁腺激素(iPTH)水平, 采用 ELISA 法测定大鼠肾脏组织 Klotho 蛋白水平、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)含量; 采用免疫组化技术检测肾脏组织 Klotho 蛋白表达, HE 染色观察肾组织形态学改变, 茜素红染色观察肾组织钙盐沉积。**结果:** 灌胃 10 周时, 各组大鼠血清 P、SCr、BUN、iPTH 及肾组织中 MDA 比较, ESRD 组、ESRD 合并炎症组均高于对照组($P < 0.01$); 各组大鼠血清 Ca 浓度及肾脏组织中 CAT 含量比较, ESRD 组、ESRD 合并炎症组低于对照组($P < 0.05$), ESRD 组血清 Ca 浓度低于 ESRD 合并炎症组($P < 0.05$); Klotho 蛋白表达主要集中在肾小管, ESRD 组、ESRD 合并炎症组肾脏组织 Klotho 蛋白表达水平显著低于对照组($P < 0.05$); HE 及茜素红染色结果显示, ESRD 合并炎症组出现肾小球萎缩及硬化, 肾内小动脉出现较多片状钙盐沉积, 肾内小动脉存在明显钙化现象。**结论:** 炎症可加重 ESRD 大鼠血管钙化, 其机制可能与降低 Klotho 蛋白表达有关。

[关键词] Klotho 蛋白; 终末期肾病; 血管钙化; 钙磷代谢; 炎症

[中图分类号] R692.5; R543 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)09-1049-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.09.012

Expression of Klotho Protein and Vascular Calcification in Kidney of Rats with End-stage Renal Disease under Inflammatory State

GUO Li, LI Jiandong, GUO Shanshan, CHEN Hang, GONG Youlan, ZHANG Yapu

(Department of Kidney Medicine, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between Klotho protein and vascular calcification in end-stage kidney disease (ESRD) rats with inflammation. **Methods:** Rats were randomly divided into control group (gastric saline), ESRD group (250 mg/kg gastric adenine) and ESRD complicated with inflammation group (250 mg/kg gastric adenine, subcutaneous injection of 10% casein at 1.0 g/kg every other day). The levels of serum calcium (Ca), phosphorus (P) urea nitrogen (BUN) and creatine (SCr) were measured by chemical colorimetric method. Serum parathyroid hormone (iPTH) level was measured by ELISA method. The level of Klotho protein, malondialdehyde (MDA) and the content of catalase (CAT) in rat kidney were measured by ELISA method. The expression of Klotho protein in renal tissue was detected by immunohistochemistry. The morphological changes of renal tissue were observed by HE staining, and the calcium deposition in renal tissue was observed by al-

^{*}[基金项目] 河北省科技计划项目(162777230)

^{**} 通信作者 E-mail: quyangner@163.com

网络出版时间: 2019-09-16 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190916.2137.012.html>

izalin red staining. **Results:** At 10 weeks after intragastric administration, the serum P, SCr, BUN, iPTH and MDA in renal tissue of rats in each group were higher than those in ESRD group and ESRD complicated with inflammation group ($P < 0.01$). The concentration of serum Ca and the content of CAT in kidney tissue of rats in each group were lower than those in control group in ESRD group and ESRD complicated inflammation group ($P < 0.05$). The concentration of serum Ca in ESRD group was lower than that in ESRD complicated with inflammation group ($P < 0.05$). The expression of Klotho protein was mainly concentrated in renal tubules. The expression of Klotho protein in renal tissue of ESRD group and ESRD complicated with inflammation group was significantly lower than that of control group ($P < 0.05$). The results of HE and alizalin red staining showed that in ESRD complicated with inflammation, there were atrophy and sclerosis of glomeruli, more flake calcium deposits were found in renal arterioles, and obvious calcification was found in renal arterioles. **Conclusion:** Inflammation can aggravate vascular calcification in ESRD rats, and its mechanism is related to the decrease of Klotho protein expression.

[**Key words**] klotho protein; end-stage renal disease; vascular calcification; calcium and phosphorus metabolism; inflammation

慢性炎症引起的终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)极易引发血管钙化和动脉粥样硬化等并发症^[1], 钙磷代谢紊乱是血管硬化的常见危险因素之一, 而高磷血症又是血管钙化的重要诱因^[2]。Klotho 蛋白是一种骨-肾内分泌轴蛋白, 与衰老密切相关, 主要在肾脏表达, 正常生理情况下 Klotho 蛋白参与维持机体磷和维生素 D 的平衡^[3-4]。研究发现, 当肾功能出现下降时, Klotho 蛋白表达减少^[5], 而 Klotho 蛋白的缺乏有可能会引起血管钙化^[6]。ESRD 患者体内常常伴有炎症的发生^[7-8], 关于 ESRD 患者炎症状态与 Klotho 蛋白表达是否有关的报道较少, 本研究通过检测 ESRD 大鼠炎症状态时的多项血管钙化指标, 探讨 Klotho 蛋白与炎症状态下 ESRD 大鼠血管钙化的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器及动物

1.1.1 主要试剂及仪器 腺嘌呤、酪蛋白购自迈新生物技术有限公司, 血清钙(Ca)、磷(P)、肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)试剂盒购自北京北方生物研究所, Klotho 蛋白、大鼠丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)及甲状旁腺激素(iPTH) ELISA 试剂盒购自美国 Sigma 公司, 大鼠 Klotho 免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠

30 只, 体质量 250 g, 由中国食品药品检定研究院提供[许可证号 SCXK(京)2016-0017]。实验的整个过程对 SD 大鼠处置均符合《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

1.2 方法

大鼠适应性喂养 5 d, 参考文献[9-10]将大鼠随机分均为对照组(灌胃生理盐水)、ESRD 组(灌胃 250 mg/kg 腺嘌呤)、ESRD 合并炎症组(灌胃 250 mg/kg 腺嘌呤, 隔日以 1.0 g/kg 皮下注射 10% 酪蛋白), 各组大鼠连续灌胃 10 周。

1.3 检测指标

连续灌胃 10 周后, 禁食 12 h 后称重, 按 0.3 mL/100 g 体质量给予 10% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉, 麻醉后各组大鼠通过腹主动脉收集血液, 3 000 r/min 离心分离血清, 采用化学比色法检测血清 Ca、P、BUN 及 SCr, 采用 ELISA 法检测血清 iPTH 水平; 取血麻醉后处死大鼠, 取大鼠肾脏组织, 去除肾脏包膜, 纵切面切开肾脏, 1/3 置于 4% 多聚甲醛固定, 其余 -80 ℃ 冰箱冻存。多聚甲醛固定的肾脏组织石蜡包埋、切片, 采用免疫组化法检测 Klotho 蛋白在肾脏组织的原位表达, HE 染色后显微镜下观察肾组织形态学改变, 茜素红染色后显微镜下观察肾组织钙盐沉积。取 -80 ℃ 冻存的肾组织块置于研钵内, 用移液器按 1:9 的比例取预冷的匀浆介质(0.9% 氯化钠)在冰上碾磨 6~8 min, 充分碾碎, 使组织匀浆化, 低温低速 3 000 r/min, 离心 15 min, 离心好的匀浆留取上清液, 采用 ELISA 法

测定肾组织匀浆上清液中 Klotho 蛋白水平、MDA 及 CAT 含量。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 软件处理,计数资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *LSD* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 P、Ca、SCr、BUN 及 iPTH

灌胃 10 周时, ESRD 组、ESRD 合并炎症组大鼠血清 P、SCr、BUN 及 iPTH 浓度显著高于对照组,

差异有统计学意义 ($P < 0.01$); ESRD 组与 ESRD 合并炎症组血清 P、SCr、BUN 及 iPTH 浓度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各组大鼠血清 Ca 浓度比较, ESRD 组 < ESRD 合并炎症组 < 对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 肾组织匀浆中 Klotho 蛋白、MDA 及 CAT 水平

大鼠肾脏组织匀浆中 Klotho 蛋白和 CAT 水平表现为 ESRD 合并炎症组 < ESRD 组 < 对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); MDA 水平比较表现为 ESRD 合并炎症组 > ESRD 组 > 对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 1 各组大鼠血清 P、Ca、SCr、BUN 及 iPTH 水平($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Serum levels of P, Ca, SCr, BUN and iPTH in rats

| 血清指标 | 对照组 | ESRD 组 | ESRD 合并炎症组 |
|--------------|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| P(mmol/L) | 2.02 ± 0.11 | 5.21 ± 0.35 ⁽¹⁾ | 5.36 ± 0.29 ⁽¹⁾ |
| Ca(mmol/L) | 2.66 ± 0.23 | 2.14 ± 0.15 ⁽²⁾ | 2.47 ± 0.32 ^{(2) (3)} |
| SCr(μmol/L) | 63.47 ± 5.93 | 268.91 ± 10.55 ⁽¹⁾ | 260.73 ± 11.98 ⁽¹⁾ |
| BUN(mmol/L) | 7.18 ± 0.92 | 27.44 ± 2.51 ⁽¹⁾ | 34.19 ± 3.75 ⁽¹⁾ |
| iPTH(ng/L) | 30.42 ± 4.28 | 43.61 ± 5.90 ⁽¹⁾ | 45.49 ± 4.86 ⁽¹⁾ |

注:与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.05$; ⁽³⁾ 与 ESRD 组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠肾脏组织匀浆中 Klotho 蛋白表达水平、MDA 及 CAT 含量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of Klotho protein expression, MDA and CAT content in renal homogenate of rats in each group

| 肾脏组织 | 对照组 | ESRD 组 | ESRD 合并炎症组 |
|---------------|---------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Klotho(ng/L) | 136.11 ± 3.51 | 80.84 ± 2.97 ⁽¹⁾ | 71.66 ± 3.09 ⁽¹⁾⁽²⁾ |
| MDA(nmol/L) | 0.91 ± 0.13 | 2.13 ± 0.16 ⁽¹⁾ | 5.77 ± 0.11 ⁽¹⁾⁽²⁾ |
| CAT(U/mg) | 26.06 ± 1.01 | 11.35 ± 1.65 ⁽¹⁾ | 8.21 ± 0.84 ⁽¹⁾⁽²⁾ |

注: ⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾ 与 ESRD 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 肾组织 Klotho 蛋白表达

免疫组化染色结果显示, Klotho 蛋白表达主要集中在肾小管, 正常对照组 Klotho 蛋白表达较多, ESRD 组和 ESRD 合并炎症组 Klotho 蛋白的表达减少, ESRD 合并炎症组表达最弱, ESRD 组、ESRD 合并炎症组显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 3。

2.4 肾脏组织组织形态学

HE 染色结果显示, 正常对照组大鼠肾小球、

表 3 各组大鼠肾脏组织 Klotho 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Expression of Klotho protein in kidney of rats in each group

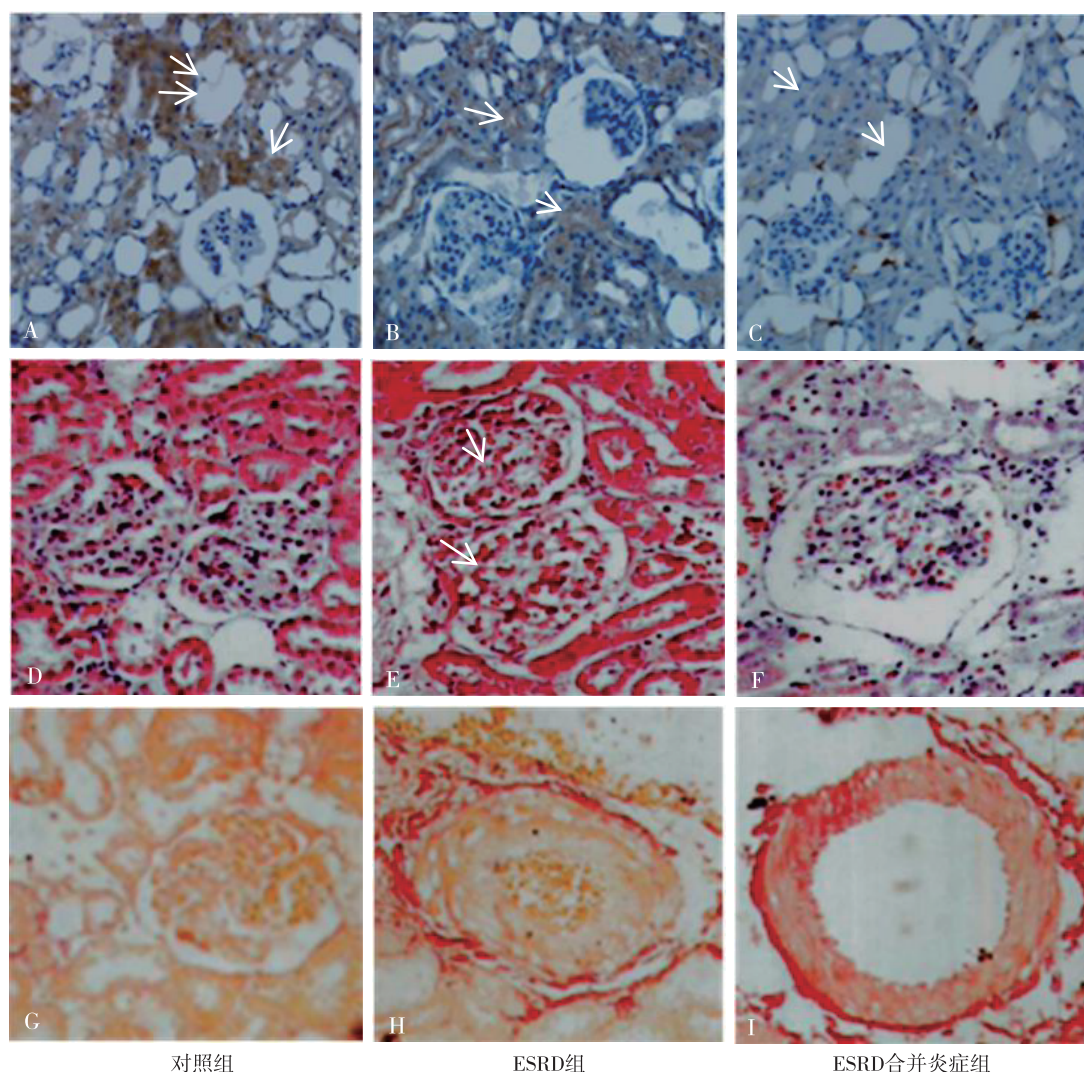
| 组别 | Klotho 平均光密度值 |
|------------|-----------------------------|
| 对照组 | 43.79 ± 1.87 |
| ESRD 组 | 14.32 ± 0.95 ⁽¹⁾ |
| ESRD 合并炎症组 | 10.44 ± 0.29 ⁽¹⁾ |

注: ⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

小管间质、肾血管均正常, 而 ESRD 组呈现系膜区增宽, 肾小球、肾小管纤维结缔组织增生显著, 出现炎性细胞浸润, ESRD 合并炎症组出现肾小球萎缩和硬化。见图 1。

2.5 大鼠肾组织钙盐沉积

茜素红染色结果显示, 正常对照组无钙化, ESRD 组肾内小动脉及周围组织有少许点片状钙盐沉积, 而 ESRD 合并炎症组肾内小动脉及周围组织有较多红色点片状钙盐沉积, 肾内小动脉存在明显钙化现象。见图 1。



注:A、B、C 为 Klotho 蛋白表达(免疫组织化学,×200,箭头为表达阳性),D、E、F 为组织形态学(HE,×200,箭头为系膜区增宽),G、H、I 为钙盐沉积(茜素红,×400,红色示钙盐沉积)。

图 1 各组大鼠肾脏组织 Klotho 蛋白表达、组织形态学及钙盐沉积

Fig. 1 Expression of Klotho protein in kidney tissue of rats in each group

3 讨论

血管钙化是一种常见、发生于血管系统软组织的生物钙化,磷酸钙矿物质在各种血管组织中的沉积是其典型表现,可导致血管中层厚度增加或硬化斑块的形成,临床多见于老龄、高血压、肾功能不全者等^[11-13]。本课题组已报道,ESRD 患者高磷血症与血管硬化密切相关,血磷水平是影响患者血管情况的重要因素。本研究观察了血清 Ca、P、SCr、BUN 及 iPTH 的水平,结果显示,与正常对照组相比,ESRD 组、ESRD 合并炎症组大鼠血清 Ca 均降

低,而血清 P 和 iPTH 却显著升高。提示 ESRD 时大鼠肾功能减退,限制机体对钙的吸收,进而引起血清中低血钙的发生;但由于肾功能障碍,导致肾脏排泄磷的能力的减弱,所以会引起大鼠血清 P 水平的升高;而低钙高磷血症又对 iPTH 的分泌产生刺激,加剧 iPTH 水平的上升。因此,抑制甲状旁腺功能亢进或 iPTH 的分泌也可成为临床防治血管钙化的有效措施之一。

Klotho 蛋白与多种生物学功能相关,在肾病发生、发展过程中起到关键性作用^[14]。有研究表明:Klotho 基因的表达多少与肾衰竭的发生密切相关,过表达可减轻肾脏氧化应激造成的损伤,对肾脏产

生一定的保护作用^[15];而 ESRD 患者体内常常伴有炎症的发生,CAT 是一类末端氧化酶,为生物防御系统的关键酶之一,可防止细胞内过氧化;MDA 是脂质过氧化的终产物,可间接反映细胞受自由基攻击的损伤程度,二者可以反映慢性肾脏病患者体内氧化应激水平^[16]。本研究检测炎症状态下 ESRD 大鼠的 Klotho 蛋白浓度、CAT 含量、MDA 含量,实验结果显示:对照组大鼠肾组织中 CAT 含量较高,而 ESRD 组与 ESRD 合并炎症组大鼠 CAT 含量均显著下降($P < 0.01$);与对照组比,ESRD 组与 ESRD 合并炎症组大鼠 MDA 显著升高($P < 0.01$);免疫组化染色 Klotho 蛋白表达主要集中在肾小管,ESRD 组和 ESRD 合并炎症组 Klotho 蛋白的表达明显减少($P < 0.05$),且 ESRD 合并炎症组大鼠的表达最弱;提示 ESRD 患者在炎症状态时,Klotho 蛋白减少与 CAT 含量下降、MDA 含量升高有关,推测 Klotho 蛋白可能通过防止细胞内过氧化和避免细胞受自由基攻击来保护肾小管上皮细胞,从而在 ESRD 时保护组织免受炎症的伤害。HE 染色结果提示:对照组大鼠肾小球、小管间质、肾血管均正常,而 ESRD 组呈现系膜区增宽,肾小球、肾小管纤维结缔组织增生显著,出现炎性细胞浸润,ESRD 合并炎症组出现肾小球萎缩和硬化;茜素红染色显微结果显示:ESRD 组肾内小动脉及周围组织有少许点片状钙盐沉积,而 ESRD 合并炎症组肾内小动脉及周围组织有较多红色点片状钙盐沉积,肾内小动脉存在明显钙化现象。上述结果提示在 ESRD 时,炎症可作为一种危险因素促进血管钙化,与 Klotho 蛋白下降有关。有体外实验证明,Klotho 蛋白能直接抑制磷诱导的血管平滑肌细胞钙化,阻碍血管平滑肌细胞向成骨细胞转化^[17]。推测 Klotho 蛋白可能是血管钙化的抑制因子,机制可能为:(1) Klotho 蛋白通过加强 FGF-23 活性促进肾脏磷的排泄;(2) 过表达 Klotho 可延缓 CRF 进展,阻碍由于肾功能恶化导致的矿物质代谢紊乱和其他血管钙化的因素^[18]。Hu 等^[19] 研究显示:Klotho 过表达的 CKD 基因小鼠具有较高的 Klotho 蛋白水平,且小鼠有较好的残存肾功能。

综上所述,甲状旁腺功能亢进和钙磷代谢紊乱可以启动血管钙化。炎症状态可加速 ESRD 血管钙化的进程,而 Klotho 蛋白对 ESRD 血管具有一定的保护作用,可改善高磷血症以及内皮细胞损伤,减少血管疾病的发生与发展,具有重要的临床参考价值。

4 参考文献

[1] DAVIS M R, HRUSKA K A. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(2): 472 – 479.

[2] 覃春美, 欧三桃. 高磷血症与慢性肾脏病血管钙化研究进展[J]. *现代临床医学*, 2015, 41(1): 13 – 15.

[3] KUROSU H, YAMAMOTO M, CLARK J D, et al. Suppression of aging in mice by the hormone klotho [J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1829 – 1833.

[4] LI S A, WATSONSBE M, YAMADA H, et al. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive of mice [J]. *Cell Struct Funct*, 2004, 29(4): 91 – 99.

[5] 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.

[6] ZUNUNI VABED S, NIKASA P, ARDALAN M. Klotho and renal fibrosis [J]. *Nephrourol Mon*, 2013, 5(5): 946 – 948.

[7] 杜亚琴, 李怡, 王莉. 炎症、氧化应激与终末期肾病血管钙化[J]. *实用医院临床杂志*, 2016, 13(5): 218 – 221.

[8] 冯兵, 杨旭, 叶自林, 等. 尿毒症患者微炎症与血管功能损伤的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(6): 473 – 475.

[9] 杜卉莲, 傅晓晴. 慢性肾衰动物的模型制备及临床应用 [J]. *中医研究*, 2005, 18(12): 53 – 57.

[10] 张艺, 马玲, 肖业伟, 等. 慢性炎症状态下成纤维细胞生长因子 23 与终末期肾病血管钙化的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(19): 5422 – 5424.

[11] BHAN I, THADHANI R. Vascular calcification and ESRD: a hard target [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(SUP 1): 102 – 105.

[12] ZIYAD A A. Media vascular calcification in diabetes mellitus and chronic kidney disease: the role of inflammation [J]. *Cardiovascular and Haematological Disorders-Drug Targets*, 2007, 7(1): 1 – 6.

[13] GEORGE T. Is inflammation the link between atherosclerosis and vascular calcification in chronic kidney disease [J]. *Blood Purif*, 2007, 25(2): 179 – 182.

[14] 林文军, 刘志红. Klotho-慢性肾脏病的心血管保护因子 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2016, 25(1): 62 – 66.

[15] MALTESE G, PSEFTALI P M, RIZZO B, et al. The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(3): 621 – 627.