

Klotho 蛋白在糖尿病肾病中的研究进展

王岚¹, 邹新蓉², 王小琴²

(1. 湖北中医药大学第一临床学院, 武汉 430061; 2. 湖北省中医院, 湖北省中医药研究院)

[摘要] 糖尿病肾病是糖尿病微血管并发症之一,也是终末期肾衰竭的主要致病因素。作为一种多因素作用下的复杂疾病,多种细胞因子、信号通路等参与其中。现阶段临床上针对糖尿病肾病所导致的高致残率、高死亡率,尚无确切有效的治疗方案,寻找新的治疗靶点,将具有重要的临床价值。Klotho 作为一种抗衰老基因,其编码的蛋白具有广泛的生物学效应,在多种急、慢性肾脏病中发挥肾脏保护作用,并与糖尿病肾病的发生发展关系密切。本文将从 Klotho 参与调节氧化应激、血管钙化、内皮功能紊乱、肾脏纤维化四个方面,探讨其在糖尿病肾病中的作用。

[关键词] 糖尿病肾病;基因表达调控;血管钙化;综述

DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2019.01.033

Research progress of klotho in diabetic nephropathy Wang Lan*, Zou Xinrong, Wang Xiaoqin (* Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Corresponding author: Wang Xiaoqin, Email: wangxiao773@hotmail.com

[Abstract] Diabetic nephropathy(DN) is one of microvascular complications of diabetes mellitus and is a leading cause of end-stage renal failure. As a kind of complicated disease, various cytokines and signaling pathways have been shown to mediate renal damage in DN. The optimal treatment for DN remains undefined. Seeking for a novel therapeutic target will be important in treatment of DN. Klotho is an anti-aging protein that exerts its biological functions through multiple modes on different kidney diseases. Klotho is closely associated with the pathogenesis of kidney injury in DN. This article will review its renoprotection effects via 4 kinds of potential mechanisms such as anti-vascular calcification, anti-endothelial dysfunction, anti-oxidative stress and anti-fibrosis.

[Keywords] Diabetic nephropathies; Gene expression regulation; Vascular calcification; Review

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最严重的微血管并发症之一,也是终末期肾衰竭的主要致病因素。据预测,至2030年,全球范围内20~79岁的人口中将会有7.7%罹患糖尿病^[1],与之伴随的,将是DN发病率的逐年上升。糖尿病肾病是多因素作用下的一种复杂疾病,其确切发病机制尚未阐明。其中,氧化应激、血管钙化、内皮功能紊乱、肾脏纤维化等是加剧DN发生发展的重要病理基础。Klotho作为一种抗衰老基因于1997年首次发现^[2],全长约50 kb,由5个外显子和4个内含子组成。Klotho主要在远端肾小管及脑脉络丛表达,少量表达于甲状旁腺、前列腺、胎盘等组织。迄今为止,发现Klotho家族包含α-Klotho、β-Klotho及γ-klotho三种蛋白。Klotho基因编码的蛋白具有抗炎性反应、抗氧化应激、抗细胞

凋亡、抗纤维化、抗肿瘤等多种生物学效应。近年来相继有研究报道,Klotho在多种急、慢性肾脏疾病如急性肾损伤、缺血性肾病、高血压肾损害、多囊肾、肾小球肾炎、糖尿病肾病中发挥肾脏保护作用^[3-7],其中,Klotho与糖尿病肾病的发生发展关系密切,业已成为研究的热点,现综述如下。

1 Klotho 蛋白与糖尿病肾病氧化应激

氧化应激是孕育糖尿病微血管并发症的共同土壤,亦是激活DN相关信号通路的关键介质之一。在高糖刺激下,增强的氧化应激不仅能诱导足细胞和内皮细胞的凋亡,还能直接发起攻击,导致细胞损伤^[8-9]。同时,氧化应激是活性氧(ROS)与抗氧化剂之间平衡被打破时的表现,而糖尿病是一类以ROS生成过多为特征的疾病,并由此导致三磷酸腺苷

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81703991);国家自然科学基金面上项目(81573907)

作者简介:王岚,主治医师,讲师,Email:lanwang_ann@163.com

通信作者:王小琴,主任医师,博士生导师,Email:wangxiao773@hotmail.com

(ATP)高表达及腺嘌呤受体 P2X7 的激活,从而引发细胞死亡^[10]。Menzies 等^[11]研究发现,糖尿病患者相较于对照组,肾组织标本中的 P2X7 表达增多;并通过动物实验证明 P2X7 抑制剂能够减轻 DN 小鼠的肾脏损害。可见,在高血糖刺激下,肾脏 P2X7 的激活参与了 DN 进程。而近来有研究表明,在糖尿病大鼠模型中,肾脏 Klotho 的表达与 P2X7 呈负相关,且随着病情的加剧,肾功能及氧化还原平衡参数出现改变时,仍维持负相关。因此, Klotho 与 P2X7 在 DN 进程中存在拮抗作用。超氧化物歧化酶(MnSOD)可以清除体内有害的氧自由基,具有抗氧化的作用。有研究报道:叉头转录因子 O3a (FoxO3a)具有提高 MnSOD 表达的生物学效应^[12],因此 FoxO3a 可对线粒体 ROS 的生成起到负调控的作用,从而拮抗氧化应激^[13]。Lim 等^[14]研究表明, Klotho 能够抑制 FoxO3a 的磷酸化,使得 FoxO3a 与 MnSOD 启动子区域结合增强,揭示 Klotho 可能通过 FoxO3a 介导的 MnSOD 抑制 ROS 相关的氧化应激。Liu 等^[15]在体外实验中观察到 AGEs 可呈剂量依赖性的增强氧化应激并降低近端小管上皮细胞 Klotho 的表达;成功质粒转染后, Klotho 的过表达可显著改善 AGEs 诱导的小管损伤标志物的产生及细胞凋亡。提示 Klotho 可能通过抗氧化应激发挥小管间质的保护作用。

由此可见, Klotho 可通过阻断 P2X7, 调节 FoxO3a、AGEs 因子等多种途径抗氧化应激,发挥肾脏保护作用。

2 Klotho 蛋白与糖尿病肾病血管钙化

血管钙化是高血压、糖尿病、慢性肾脏病、动脉粥样硬化等多种疾病普遍存在的病理特点。既与钙磷代谢紊乱,钙盐沉积于动脉壁有关;又与骨的矿化作用类似,是一种细胞介导的可调控的过程,其中以血管平滑肌细胞(VSMC)向成骨样细胞表型转变最为常见。而 DN 在双重危险因素作用下,血管钙化愈发明显,导致患者致残率及死亡风险升高。Klotho 基因敲除小鼠在 4 周龄时即可出现动脉硬化,并持续加重,表现动脉广泛钙化,而予以外源性 Klotho 干预后,血管病变得以明显改善^[2]。Hum 等^[16]发现,通过腺相关病毒介导的 Klotho 基因转导能够降低 DN 小鼠的血磷水平。Jono 等^[17]报道, Klotho 的高表达能够有效抑制高磷诱导下的 VSMC 向成骨细胞转分化。进一步研究发现,在尿毒症环境下,VSMC 上的Ⅲ型钠磷协同转运体中的亚型 Pit-

1 活性增强,表达升高,Pit-1 可促进磷的吸收,从而引发血管钙化。而当 Klotho 过表达时,Pit-1 水平下降,成骨细胞转录因子 2 表达减少;提示 Klotho 可能通过抑制 VSMC 对磷的吸收,防止 VSMC 向成骨细胞表型转变,从而减轻血管钙化^[18]。成纤维细胞生长因子-23 (FGF-23)是体内重要的调磷因子, Klotho 作为 FGF23 与 FGFR 结合所必须的辅助因子,协同 FGF23 调节钙磷代谢。在 DN 患者的血浆及肾脏中, Klotho 表达下降,随着病情加剧,肾脏分泌的 Klotho 显著减少,由此引发机体对 FGF23 的抵抗状态,导致血磷升高,继发性甲状旁腺功能亢进,维生素 D 缺乏等一系列代谢紊乱的局面,最终将导致血管钙化^[19-23]。

以上证据表明, Klotho 可能通过参与调节钙磷代谢,抑制 VSMC 向成骨细胞转分化得以防治 DN 血管钙化。

3 Klotho 与糖尿病肾病内皮功能紊乱

血管内皮功能紊乱与 DN 的发生发展密切相关。广泛的内皮损伤是糖尿病微血管并发症的重要危险因素之一。生理状态下,血管内皮生长因子(VEGF)能够调节血管通透性,促进血管新生并维持血管功能。Klotho 基因缺陷小鼠表现出 VEGF 介导的血管生成受损及血管通透性升高^[24]。近来有报道称 Klotho 蛋白可通过直接与 VEGF 受体 2 (VEGFR-2)及瞬时受体电位通道 1 (TRPC-1)相结合,增强 VEGFR-2 与 TRPC-1 之间的相互作用,从而调节 VEGFR/TRPC-1 介导的 Ca²⁺内流,发挥维持血管内皮生物稳态的作用^[24]。相反, Klotho 缺乏将引发 Ca²⁺内流持续增强和 Ca²⁺依赖型蛋白酶的过度活化,促使血管损伤,血管通透性升高。可见, Klotho 可能通过调节 VEGF 的表达参与血管病变的病理过程^[25]。可调节肾小球血管壁通透性,发挥血管保护作用^[26-27]。Kadoya 等^[28]报道,在早期糖尿病肾病 Akita 小鼠模型中可观察到内皮细胞糖萼缺失、肾小球巨噬细胞浸润、肾小球肥大、系膜扩张等病理特征,而在 Klotho 转基因-Akita 小鼠模型中, Klotho 的过表达使以上病理损伤得以缓解。钙蛋白酶的激活与肾小球巨噬细胞浸润关系密切。有研究表明,抑制钙蛋白酶的活性可以减少高糖环境下的内皮细胞表面促炎症黏附分子的表达^[29]。而 Kadoya 等在细胞培养时,进一步发现, Klotho 能够抑制高糖诱导下的钙蛋白酶激活。Manya 等^[30]在 Klotho 基因缺陷的小鼠肾脏中观察到 μ -钙蛋白酶

的激活,说明 Klotho 蛋白可以抑制 μ -钙蛋白酶的活化。

因此,Klotho 可能是一种血管保护蛋白,通过调节 VEGF 的表达,维持内皮的生理结构,降低内皮细胞的炎性反应和拮抗钙蛋白酶的活性等途径,改善内皮功能,发挥 DN 的保护作用。

4 Klotho 蛋白与糖尿病肾病肾脏纤维化

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 信号通路的激活可引发 DN 肾脏纤维化^[31]。有研究报道^[32],在 Klotho 基因缺陷小鼠肾脏中,TGF β 1 的下游因子 Smad2 磷酸化水平增强,说明 Klotho 基因缺陷可能通过激活 TGF β 1/Smad2 信号通路,加剧早期 DN。提示 Klotho 蛋白可通过拮抗 TGF β 1,发挥在 DN 中的抗纤维化作用。目前认为,在 DN 状态下,Wnt/ β -catenin 信号通路的激活参与了足细胞功能失调,系膜细胞凋亡,小管上皮细胞间质转分化的进程,从而与 DN 纤维化密切相关^[33]。Zhou 等^[34]研究表明,无论在 Akita、db/db 小鼠还是链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病小鼠肾组织中,均可出现 Wnt、 β -catenin 蛋白表达上调。进一步在 Akita 糖尿病小鼠模型中观察到,Wnt 信号通路的激活可导致多种促纤维化因子的过度生成,而予以 Wnt 信号通路阻断剂干预后,Akita 糖尿病小鼠肾脏的纤维化、炎症状态得以显著改善。有学者在单侧输尿管梗阻及阿霉素诱导的肾脏纤维化小鼠模型中发现, β -catenin 的活化与 Klotho 蛋白表达减少关系密切,且在体外实验中发现,Klotho 能够与 Wnt1、Wnt4 和 Wnt7a 等多种配体相结合,从而抑制 Wnt 信号通路的激活。证明了 Klotho 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的内源性阻断剂^[35]。而在本课题组的前期研究中,同样证明了 Klotho 与 Wnt/ β -catenin 的负向调控关系。在 STZ 诱导的 DN 小鼠肾组织中 Klotho 蛋白表达较健康对照组明显下降,Wnt、 β -catenin 蛋白表达显著上调;而中药治疗组 DN 小鼠中,Klotho 蛋白表达较模型组明显增加,而 Wnt、 β -catenin 蛋白表达水平则相反^[36]。亦有学者在单侧肾切除的糖尿病小鼠中发现,经重组 Klotho 干预后,肾小球肥大及促纤维化指标均明显下调^[37]。

以上种种证据表明,Klotho 通过参与调控 TGF- β 1、Wnt 信号通路等多种途径拮抗 DN 纤维化的进程,发挥肾脏的保护作用。

5 小结

现阶段临床上针对糖尿病肾病所导致的高致残

率、高死亡率,尚无确切有效的治疗方案,寻找新的治疗靶点,将具有重要意义。Klotho 作为一种抗衰老蛋白,可通过抗氧化应激、抑制血管钙化、调节内皮功能、拮抗肾脏纤维化等多种途径保护肾脏,有望成为糖尿病肾病新的治疗靶点。

参考文献

- [1] SHAW J E, SICREE R A, ZIMMET P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] 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.
- [3] HU M C, KUROO M, MOE O W. Klotho and kidney disease [J]. *J Nephrol*, 2010, 23 Suppl 16(4): 136-144.
- [4] YOSHISUKE H, NAOKI K, MINORU S, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene [J]. *PNAS*, 2007, 104(7): 2331-2336.
- [5] KOH N, FUJIMORI T, NISHIGUCHI S, et al. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2001, 280(4): 1015-1020.
- [6] HIDEKAZU S, TAKUMI Y, KEN T, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2005, 20(12): 2636-2645.
- [7] CHENG M F, CHEN L J, CHENG J T. Decrease of klotho in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Biomed Res Int*, 2010, 5: 13853.
- [8] SUSZTAK K, RAFF A C, SCHIFFER M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2006, 55(1): 225-233.
- [9] PICONI L, QUAGLIARO L, ASSALONI R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. *Diabetes-Metab Res*, 2006, 22(3): 198-203.
- [10] RODRIGUES A M, SERRALHA R S, FARIAS C, et al. P2X 7, receptor and klotho expressions in diabetic nephropathy progression [J]. *Purinerg Signal*, 2018, 14(2): 1-10.
- [11] MENZIES R I, BOOTH J W R, MULLINS J J, et al. Hyperglycemia-induced Renal P2X7 Receptor Activation Enhances Diabetes-related Injury [J]. *Ebiomedicine*, 2017, 19(C): 73-83.
- [12] YAMAMOTO M, CLARK J D, PASTOR J V, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(45): 38029-38034.
- [13] EMERLING B M, WEINBERG F, LIU J L, et al. PTEN

- regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a) [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7): 2622-2627.
- [14] LIM S W, JIN L, LUO K, et al. Klotho enhances FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase expression by negatively regulating PI3K/AKT pathway during tacrolimus-induced oxidative stress [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8:e2972.
- [15] LIU Y N, ZHOU J W, LI T T, et al. Sulodexide protects renal tubular epithelial cells from oxidative stress-induced injury via upregulating klotho expression at an early stage of diabetic kidney disease [J]. *J Diabetes Res*, 2017(8): 4989847.
- [16] HUM J M, O'BRYAN L M, TATIPARTHI A K, et al. Chronic hyperphosphatemia and vascular calcification are reduced by stable delivery of soluble klotho [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(4): 1162-1174.
- [17] JONO S, MCKEE M D, MURRY C E, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification [J]. *Circ Res*, 2000, 87(7): 10-17.
- [18] HU M C, SHI M J, PASTOR J, et al. Klotho; a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule [J]. *Faseb J*, 2010, 24(9): 3438-3450.
- [19] TITAN S M, ZATZ R, GRACIOLLI F G, et al. FGF-23 as a predictor of renal outcome in diabetic nephropathy [J]. *Clin J Am Soc Nephro*, 2011, 6(2): 241-247.
- [20] KIM S S, SONG S H, KIM I J, et al. Decreased plasma α -Klotho predict progression of nephropathy with type 2 diabetic patients [J]. *J Diabetes Complicat*, 2016, 30(5): 887-892.
- [21] 马春园, 郝丽荣. FGF23-Klotho轴在慢性肾脏病骨矿物质代谢紊乱中的作用 [J]. *医学综述*, 2015, 21(7): 1169-1172.
- [22] LEE E Y, KIM S S, LEE J S, et al. Soluble α -klotho as a novel biomarker in the early stage of nephropathy in patients with type 2 diabetes [J]. *Plos One*, 2014, 9(8): e102984.
- [23] TAKAHASHI H, KOMABA H, TAKAHASHI Y, et al. Impact of parathyroidectomy on serum FGF23 and soluble Klotho in hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism [J]. *J Clin Endocr Metab*, 2014, 99(4): E652-E658.
- [24] KUSABA T, OKIGAKI M, MATUI A, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca^{2+} channel to maintain endothelial integrity [J]. *PNAS*, 2010, 107(45): 19308-19313.
- [25] KACSO I M, BONDOR C I, KACSO G. Soluble serum Klotho in diabetic nephropathy: Relationship to VEGF-A [J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(16/17): 1415-1420.
- [26] KIDOKORO K, SATOH M, CHANNON K M, et al. Maintenance of endothelial guanosine triphosphate cyclohydrolase I ameliorates diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(7): 1139-1150.
- [27] SALMON A H J, FERGUSON J K, BURFORD J L, et al. Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(8): 1339-1350.
- [28] KADOYA H, SATOH M, HARUNA Y, et al. Klotho attenuates renal hypertrophy and glomerular injury in Ins2Akita diabetic mice [J]. *Clin Exp Nephrol* 2016, 20(5): 671-678.
- [29] STALKER T J, SKVARKA C B, SCALIA R. A novel role for calpains in the endothelial dysfunction of hyperglycemia [J]. *Faseb J*, 2003, 17(11): 1511.
- [30] MANYA H, INOMATA M, FUJIMORI, et al. Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35503-35508.
- [31] KANWAR Y S, SUN L, XIE P, et al. A Glimpse of Various Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy [J]. *Annu Rev Pathol-Mech*, 2011, 6: 395-423.
- [32] LIN Y, KURO-O M, SUN Z J. Genetic deficiency of anti-aging gene klotho exacerbates early nephropathy in STZ-induced diabetes in male mice [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3855-3863.
- [33] XIAO L, WANG M, YANG S, et al. A glimpse of the pathogenetic mechanisms of Wnt/ β -catenin signaling in diabetic nephropathy [J]. *B Biomed Res Int*, 2013: 987064.
- [34] ZHOU T, HE X, CHENG R, et al. Implication of dysregulation of the canonical wntless-type MMTV integration site (WNT) pathway in diabetic nephropathy [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(1): 255-266.
- [35] ZHOU L, LI Y, ZHOU D, et al. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(5): 771-785.
- [36] 胡应林. Klotho基因在糖尿病肾病小鼠模型的表达及肾实质颗粒的干预作用 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [37] OH H J, NAM B Y, WU M, et al. Klotho plays a protective role against glomerular hypertrophy in a cell cycle-dependent manner in diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol-Renal*, 2018, 315(4): F791-F805.