

Klotho 在缺血再灌注损伤中的研究进展

王玉杰, 李元建, 江俊麟

(中南大学湘雅药学院药理学系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] Klotho; 缺血再灌注损伤; 氧化应激; 钙超载; 细胞凋亡

[摘要] 缺血再灌注损伤在临床中十分常见且难以避免,是影响缺血性疾病治疗效果的一个重要因素。Klotho 作为一种抗衰老蛋白,具有抗氧化应激、抗凋亡、抗炎、抑制钙超载等作用。本文结合国内外 Klotho 与缺血再灌注损伤相关疾病的最新研究报道,就 Klotho 与缺血再灌注损伤关系及其作用机制作一综述,为抗缺血再灌注损伤新药的后续研发提供依据。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Research progress of Klotho in ischemia reperfusion injury

WANG Yu-Jie, LI Yuan-Jian, JIANG Jun-Lin

(Department of Pharmacology, School of Pharmaceutic Science, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] Klotho; Ischemia reperfusion injury; Oxidative stress; Calcium overload; Apoptosis

[ABSTRACT] Ischemia reperfusion injury, an important clinical problem that is caused by interruption of blood supply to tissue followed by blood reflow into the exposed area, is commonly seen in clinic and is difficult to avoid. Klotho, an anti-aging protein, possesses a variety of functions including anti-oxidative stress, anti-apoptosis, anti-inflammation, calcium overload inhibition and so on. This review summarizes the current knowledge of the involvement of Klotho in ischemia reperfusion injury and its possible mechanisms, attempting to provide some basis for the research and development of new drugs for the treatment of ischemia reperfusion injury.

组织缺血是冠心病、休克、脑卒中、外周血管疾病的重要病理基础。组织缺血一段时间后恢复血流供应,可出现缺血损伤进一步加重的现象,被称为缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)。缺血再灌注损伤在临床中十分常见且难以避免,常发生在溶栓治疗、动脉搭桥、移植等手术中,成为影响缺血治疗效果的一个重要因素。Klotho 基因是 1997 年日本学者发现的一个与衰老有关的基因。近年越来越多的研究表明 Klotho 与缺血再灌注损伤的发生发展具有密切的联系。本文就 Klotho 与缺血再灌注损伤关系及作用机制作一综述。

1 Klotho 基因、蛋白及其功能

Klotho 基因定位于人类 13 号染色体上,包含 5

个外显子、4 个内含子,全长 50 Kb^[1]。Klotho 基因编码的 Klotho 蛋白有膜型和分泌型两种形式。膜结合型 Klotho 蛋白由胞外区域(约 980 个氨基酸残基的氨基末端)、跨膜区域和胞内区域(11 个氨基酸残基的羧基端)构成,其中胞外区域含有 2 个重复的 440 个氨基酸残基序列,命名为 KL1 和 KL2。2 个重复序列的连接区域为 Lys-Lys-Arg-Lys 保守序列,是蛋白酶裂解的潜在位点^[2-3](图 1)。

膜结合型 Klotho 主要作为成纤维细胞生长因子 23(fibroblast growth factor-23, FGF-23)的协同受体,参与 FGF-23 介导的钙磷代谢调节^[4]。膜结合型 Klotho 蛋白的胞外区域可以水解并分泌到血液、尿液和脑脊液中,称为分泌型 Klotho 蛋白。研究报道解聚素-金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease, ADAM)——ADAM10/ADAM17 可对膜结合型 Klotho 蛋白胞外功能区连接处的 Lys-Lys-Arg-Lys

[收稿日期] 2016-11-25

[修回日期] 2017-02-27

[作者简介] 王玉杰,硕士研究生,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 wangyujie1990@foxmail.com。通讯作者江俊麟,教授,博士生导师,研究方向为心血管生理与药理,E-mail 为 junlinjiang@csu.edu.cn。

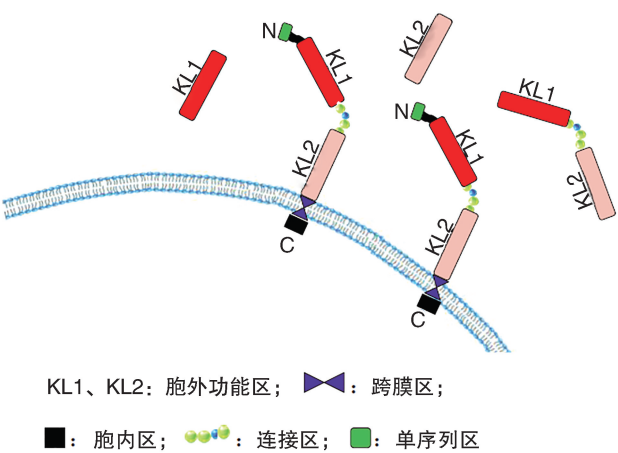


图 1. Klotho 蛋白结构 膜型 Klotho 蛋白为单向跨膜分子, 结构分为 5 部分: 细胞外功能区、跨膜区、胞内区、连接区、单序列区。分泌型 Klotho 蛋白有两种来源, 大部分由解聚素-金属蛋白酶水解膜型 Klotho 蛋白形成, 小部分由 Klotho 基因选择性表达合成。

Figure 1. Structure of Klotho protein

保守序列进行裂解, 使得 KL1 或 KL1-KL2 分泌到细胞外^[3]。分泌型 Klotho 蛋白不仅具有膜结合型 Klotho 的钙磷代谢调节作用, 还具有抗氧化、抗炎、调节生长激素分泌、抑制细胞凋亡以及促进血管发生等多种作用。

2 Klotho 与缺血再灌注损伤

2.1 Klotho 与肾缺血再灌注损伤

Klotho 分布在肾脏、心脏、主动脉、脑、甲状旁腺等多种组织, 其中肾脏是 Klotho 的主要生成及代谢器官^[1,5]。研究显示在缺血再灌注诱导的急性肾损伤小鼠, 其肾组织、尿液、血液中 Klotho 蛋白显著减少, 但随着肾功能的恢复, Klotho 含量也逐渐恢复^[6]。临床急性肾损伤患者的肾活检结果也证实肾组织 Klotho 减少, 且减少程度与血浆肌酐呈负相关; 慢性肾脏病患者也普遍存在 Klotho 减少, 且肾功能越差, Klotho 减少越明显的现象^[7]。此外, Klotho 缺陷小鼠亦表现出明显的肾脏功能损伤和肾组织病变^[6]。以上研究均提示 Klotho 在肾脏缺血再灌注诱导急性肾损伤的病理生理过程中起关键作用, 可作为未来抗肾缺血再灌注损伤的治疗靶点。多项动物实验已证实增加 Klotho 表达能明显改善肾缺血再灌注诱导的肾功能损伤, 缓解肾脏病理病变。在猪肾脏缺血再灌注模型, 外源性应用药物提高 Klotho 表达可明显改善肾功能^[7]。在肾脏缺血再灌注诱发急性肾损伤大鼠模型, 过表达 Klotho 可明显降低大鼠血浆肌酐水平和凋亡细胞总

数, 抑制肾组织损伤^[8]。

2.2 Klotho 与心脏缺血再灌注损伤

Klotho 除广泛分布于肾脏外, 在心脏也有分布。研究显示在缺血再灌注诱导心脏损伤的小鼠模型中, 心脏组织 Klotho 水平明显下降^[9], 在体给予 Klotho 蛋白可明显改善缺血再灌注诱导的心肌梗死和重构, 抑制细胞凋亡^[10] 和心脏异常钙信号生成^[11]。临床检测发现, 患有慢性心脏病患者血清中 Klotho 水平较低, 且老年冠状动脉狭窄患者冠状动脉狭窄程度与血浆 Klotho 蛋白水平呈负相关^[12], 而 Klotho 浓度较高者其动脉最大狭窄的发生以及狭窄指数都显著降低; 慢性心脏病危险因素(年龄、糖尿病、吸烟、炎症)与血清 Klotho 浓度多因素 Logistic 回归分析也显示 Klotho 浓度与慢性心脏病风险呈负相关^[13]。心脏瓣膜置换手术常见急性肾损伤患者血液检查结果发现血清 Klotho 水平显著降低^[14]。此外, Klotho 缺陷尿毒症性心肌病小鼠心肌肥厚加剧, 但静脉注射可溶性 Klotho 蛋白可改善这种情况^[11]。以上研究结果提示 Klotho 在心肌缺血再灌注中发挥重要作用, 血清 Klotho 水平降低可能是一种标记心血管紊乱的生物标志物。

2.3 Klotho 与其它组织器官缺血再灌注损伤

Klotho 与其它组织器官缺血再灌注研究有限, 但也有研究显示 Klotho 可能在肝脏、脑缺血再灌注损伤中发挥重要作用。Majumdar 等^[15] 在 460 例缺血性卒中患者及 574 例年龄、性别相匹配的正常对照人群进行基因分型发现, 40 岁年龄组 Klotho KL-VS 纯合子基因型人群较杂合子人群缺血性卒中的发病率高 1.5~3.0 倍, 而在 50 岁年龄组则没有明显差异, 提示 Klotho 基因变异可能参与早期缺血性脑卒中的发生。此外, Kim 等^[16] 对女性缺血性脑卒中患者进行基因分型分析, 同样发现 Klotho 基因变异是缺血性脑卒中的一个重要危险因素^[16]。

新近研究显示, Klotho 可通过调节 FGF-19、FGF-15、FGF-21 与其受体作用, 调节肝脏的代谢及再生能力^[9,17]。在肝脏中, FGF-19 需要与 Klotho-FGFR4 形成三元复合物, 以激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2), 从而激活 FGF-19 信号通路。三种炎症介质: 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin, IL-1 β) 和 IL-6 能明显抑制肝脏 Klotho 表达, 其中, IL-1 β 能完全抑制 Klotho 的蛋白表达, 抑制肝细胞增殖和代谢^[18]。提示 Klotho 可能是通过调节 FGF-19/Klotho 信号通路, 发挥抗肝脏缺血再灌注损伤作用。

3 Klotho 抗缺血再灌注损伤的作用

3.1 Klotho 与氧化应激

氧化应激是公认的导致缺血再灌注损伤的重要病理环节。活性氧、过氧化物、氧自由基等可破坏细胞膜和细胞核,触发和加重缺血再灌注损伤。细胞实验、动物实验和临床研究均发现 Klotho 可以抑制多种原因引起的氧化应激反应。在肾小管上皮细胞, H_2O_2 可以浓度依赖性降低细胞内 Klotho 表达,增加活性氧生成,引起细胞损伤^[19];在糖尿病大鼠模型和糖尿病肾病患者,Klotho 表达明显下降,脂质过氧化产物明显增加,两者呈负相关^[20]。Klotho 表达缺少可促进活性氧的产生及氧化应激反应,而过表达 Klotho 或外源性上调 Klotho 表达则可明显减轻氧化应激反应,增加细胞和器官对氧化应激的抵抗^[21]。在 Klotho 基因突变小鼠,海马组织中脂质过氧化水平升高,伴随小鼠认知功能障碍,应用抗氧化剂后可明显减轻小鼠认知障碍和脂质过氧化^[22]。

Klotho 抗氧化的分子机制可能与叉头转录因子 (forkhead transcription factors, FOXOs) 激活有关。细胞实验显示,Klotho 可通过抑制胰岛素/胰岛素样生长因子 1 信号通路,激活 FOXOs,上调锰过氧化物歧化酶表达,减少活性氧生成,增加细胞的氧化应激抵抗力。此外,Klotho 也可通过上调红细胞生成素受体表达,发挥抗氧化作用^[23]。

3.2 Klotho 与炎症

炎症细胞活化是缺血再灌注的另一重要病理机制。组织缺血再灌注可引起中性粒细胞激活并释放 TNF- α 、IL-1、IL-8 等炎症细胞因子,后者介导组织细胞损伤、坏死,并进一步活化炎症细胞释放更多炎症细胞因子,形成“瀑布式”损伤,导致全身炎症反应综合征;另外,活化的中性粒细胞进一步游走、渗出、聚集在组织中,并释放氧自由基和蛋白酶等引起微血管损伤和组织损伤^[24]。众多研究发现 Klotho 的减少与体内炎症反应密切相关,增加 Klotho 表达可以抑制炎症反应。在糖尿病肾病模型,Klotho 可抑制肾脏细胞间粘附分子表达上调,并抑制核转录因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 活化和单核细胞向内皮细胞黏附^[25];在猪肾脏缺血再灌注模型中,补体抑制剂诱导 Klotho 表达增加可抑制 NF- κB 信号通路^[7];在盐敏感性高血压大鼠模型,Klotho 基因可明显抑制巨噬细胞、淋巴细胞等炎症细胞的浸润,降低单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 等炎症介质的表达;

在糖尿病动物模型,Klotho 基因缺失可明显促进炎症介质 TNF- α 、IL-6 及单核细胞趋化因子生成,加重炎症反应,过表达 Klotho 则可明显减轻炎症反应;Klotho 基因转染可抑制血管紧张素 II 诱导的肾组织炎症浸润、小管内皮细胞皱缩或脱落^[26]。另外,一些炎症细胞因子也可以调控 Klotho 基因表达。肝脏、脂肪组织、肿瘤组织细胞释放的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 能够明显抑制 Klotho 表达,加重细胞损伤^[18]。

3.3 Klotho 与钙超载

钙超载在缺血再灌注损伤中起关键作用。静息状态下钙离子储存在肌浆网和线粒体中,当出现缺血再灌注损伤后,细胞外钙大量内流,引起钙超载。同时,由于脂质过氧化产物不断损伤组织以及含巯基的蛋白质和酶,也加重了钙超载。细胞内钙超载通过激活钙敏蛋白水解酶、磷脂酶和核酸内切酶等,使细胞膜水解、线粒体结构破坏,进而导致 ATP 生成减少、细胞及组织缺氧,对缺血再灌注损伤造成级联放大效应。Klotho 可作为内源性钙离子调节物质,调节缺血再灌注损伤诱导的钙超载。研究发现,在肾脏远曲小管,Klotho 蛋白可通过水解钙通道瞬时感受电位 (transient receptor potential, TRP) 家族成员 TRPV5 的 N-多糖唾液酸,增加肾上皮细胞表面 TRPV5 的含量促进钙内流^[27]。在培养的内皮细胞,Klotho 基因缺乏可导致瞬时受体电位通道 I (transient-receptor potential canonical Ca^{2+} channel 1, TRPC1) 内化作用受损,使细胞表面 TRPC1 表达增加,促进钙内流。同时,细胞外钙离子浓度的改变亦可调节 Klotho 蛋白功能,以 Na^+-K^+ -ATP 酶依赖形式介导细胞钙转运。此外,Klotho 蛋白还可直接与 VEGFR2 和 TRPC1 结合,参与 VEGF 介导的细胞钙内流^[28]。

3.4 Klotho 与细胞凋亡

缺血再灌注损伤时,氧自由基、钙超载、酸性代谢产物增多以及 ATP 能量障碍等途径导致线粒体通透转换孔开放,引起细胞内外离子平衡失调及线粒体解偶联的发生,最终导致细胞凋亡,而细胞凋亡率增加又会加重缺血再灌注损伤^[29]。实验发现肾缺血再灌注导致的肾损伤中,肾组织细胞凋亡数目以及促凋亡蛋白表达显著增加,同时伴随着肾组织 Klotho 表达下降^[30]。外源性应用 Klotho 蛋白或增加 Klotho 基因表达,能明显抑制缺血、单侧输尿管梗阻、环孢霉素、异丙肾上腺素等多种损伤因素诱导的肾上皮细胞或心肌细胞凋亡,表明 Klotho 可能能在细胞凋亡中发挥着负性调节作用。内质网应

激是调控体内凋亡信号的重要通路。研究显示, Klotho 蛋白在抑制细胞凋亡的同时,可明显减少内质网应激标记物糖调节蛋白-78 (glucose-regulated

protein-78, GRP-78) 和 Caspase12 的表达, 提示 Klotho 可能通过调节内质网应激,抑制细胞凋亡^[10] (图 2)。

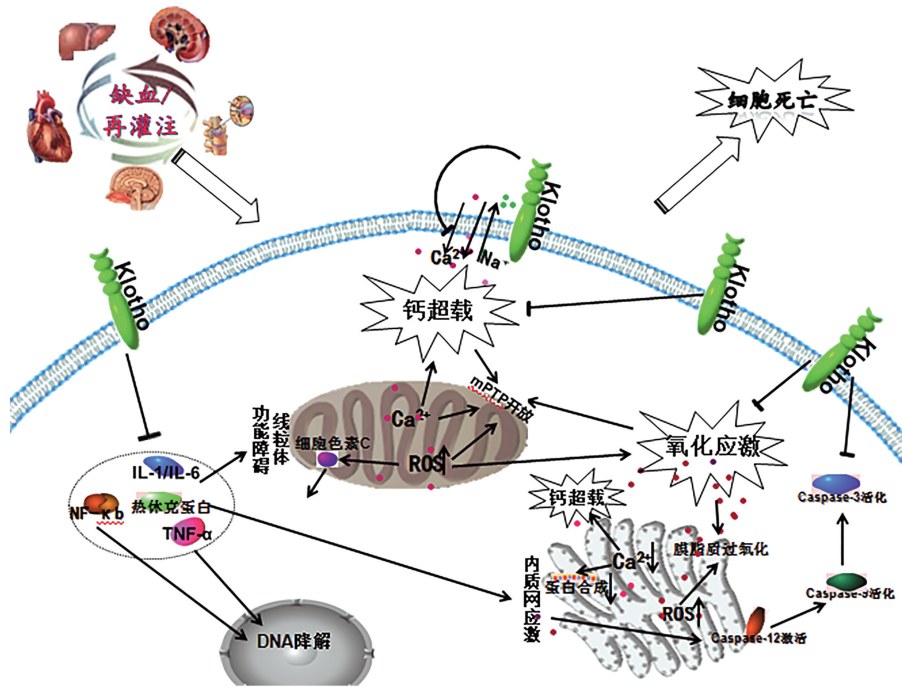


图 2. Klotho 与缺血再灌注损伤机制 缺血再灌注损伤诱导细胞钙超载、氧化应激、炎症反应,引发线粒体功能障碍,导致细胞凋亡。Klotho 蛋白可抑制钙超载、氧化应激和炎症反应,减少细胞凋亡,发挥抗缺血再灌注损伤作用。

Figure 2. Klotho and mechanism of IRI

4 前景与展望

Klotho 蛋白的生物效应应具有多效性,可通过不同途径调节磷酸盐代谢、抗氧化应激、抗炎及抑制细胞凋亡。近年来,众多动物实验和临床研究均表明 Klotho 基因缺失可多环节促进和加重组织缺血再灌注损伤,通过上调 Klotho 表达来预防和治疗组织缺血再灌注所带来的损伤,有望为以后药物研发提供新思路。

[参考文献]

[1] Kuro OM, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing [J]. Nature, 1997, 390 (6) : 45-51.

[2] Dermaku SM, Kolgeci S, Abazi S, et al. Significance of the anti-aging protein Klotho[J]. Mol Membr Biol, 2013, 30(8) : 369-385.

[3] Kim J, Hwang K, Park K, et al. Biological role of anti-aging protein Klotho[J]. J Life Med, 2015, 5(1) : 1-6.

[4] Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23

[J]. Nature, 2006, 444(7120) : 770-774.

[5] Manya H, Akasaka MK, Endo T. Klotho protein deficiency and aging[J]. Geriatr Ggerintol Int, 2010, 10(Suppl 1) : S80-S87.

[6] Hu M, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective [J]. Kidney Int, 2010, 78 (12) : 1 240-251.

[7] Castellano G, Intini A, Stasi A, et al. Complement modulation of anti-aging factor Klotho in ischemia/reperfusion injury and delayed graft function [J]. Am J Transplant, 2016, 16(1) : 325-333.

[8] Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure[J]. Nephrol Dial Transpl, 2005, 20(12) : 2 636-645.

[9] Liu SQ, Roberts D, Kharitononkov A, et al. Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue [J]. Sci Report, 2013, 3 (7468) : 2 767-778.

[10] Song S, Gao P, Xiao H, et al. Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress

- [J]. Plos One, 2013, 8(12): e82 968.
- [11] Xie J, Yoon J, An SW, et al. Soluble Klotho protects against uremic cardiomyopathy independently of fibroblast growth factor 23 and phosphate[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 26(5): 1 150-160.
- [12] 刘 玮, 张韶英, 徐慧敏, 等. 老年冠心病患者血浆 Klotho 水平测定的临床意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(2): 171-174.
- [13] Navarro JF, Donate J, Muros M, et al. Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease[J]. Heart, 2013, 100(1): 34-40.
- [14] Liu YJ, Sun HD, Chen J, et al. Klotho; a novel and early biomarker of acute kidney injury after cardiac valve replacement surgery in adults[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5): 7 351-358.
- [15] Majumdar V, Nagaraja D, Christopher R. Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke[J]. Biochem Bioph Res Co, 2010, 403(3-4): 412-416.
- [16] Kim Y, Kim J, Nam YJ, et al. Klotho is a genetic risk factor for ischemic stroke caused by cardioembolism in Korean females[J]. Neurosci Lett, 2006, 407(3): 189-194.
- [17] Kuro OM. Klotho and beta-Klotho[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 728: 25-40.
- [18] Zhao Y, Meng C, Wang Y, et al. IL-1 β inhibits β -Klotho expression and FGF19 signaling in hepatocytes[J]. Am J Physiol Endoc Metab, 2016, 310(4): E289-E300.
- [19] Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, et al. Indoxyl sulfate downregulates renal expression of Klotho through production of ROS and activation of nuclear factor- κ B[J]. Am J Nephro, 2011, 33(4): 319-324.
- [20] Lin Y, Sun Z. In vivo pancreatic beta-cell-specific expression of antiaging gene Klotho; a novel approach for preserving beta-cells in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2015, 64(4): 1 444-458.
- [21] Cheng MF, Chen LJ, Wang MC, et al. Decrease of FGF receptor (FGFR) and interstitial fibrosis in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Horm Metab Res, 2014, 46(1): 1-7.
- [22] Kuro OM. Klotho[J]. Pflügers Archiv Eur J Phys, 2010, 459(2): 333-343.
- [23] Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho[J]. J Biol Chem, 2005, 280(45): 38 029-034.
- [24] Derek M, Derek J. Myocardial reperfusion injury [J]. New Engl J Med, 2007, 357(11): 1 121-135.
- [25] Zhao YH, Banerjee S, Dey N, et al. Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine) 536 phosphorylation[J]. Diabetes, 2011, 60(7): 1 907-916.
- [26] 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.
- [27] Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, et al. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel[J]. Science, 2005, 310(5747): 490-493.
- [28] Kusaba T, Okigaki M, Matui A, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca²⁺ channel to maintain endothelial integrity[J]. P Natl Acad Sci USA, 2010, 107(45): 19 308-313.
- [29] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury [J]. Intrev Cel Mol Bio, 2012, 298: 229-317.
- [30] 钱盈盈, 严玉澄, 沈 玥, 等. Klotho 在急性缺血再灌注性肾损伤中的变化及其与凋亡的关系[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2014, 34(6): 788-793, 798.
- (此文编辑 朱雯霞)