

慢性肾脏病患者成纤维细胞生长因子 23、Klotho 蛋白与颈动脉内膜中膜厚度的相关性

陈金艳¹, 胡勇², 孙红¹, 姜婷³, 刘先英¹

(青岛大学附属海慈医院, 1. 肾内科, 2. 干部保健科, 3. 科研科, 山东省青岛市 266001)

[关键词] 慢性肾脏病; 成纤维细胞生长因子 23; Klotho 蛋白; 颈动脉内膜中膜厚度

[摘要] 目的 探讨慢性肾脏病(CKD)2~5 期非透析患者血清成纤维细胞生长因子 23(FGF-23)、Klotho 蛋白水平与颈动脉粥样硬化程度的关系。方法 对 126 例 CKD2~5 期患者用彩色超声测定其颈动脉内膜中膜厚度(CIMT), 根据 CIMT 分为 CIMT 增厚组及 CIMT 正常组。酶联免疫吸附法测定血清 FGF-23、Klotho 蛋白水平, 收集患者一般资料及临床生化指标。对两组相关指标进行比较, 分析 FGF-23、Klotho 蛋白与颈动脉硬化度的相关性。采用非条件 Logistic 回归分析进行 CIMT 影响因素的多因素分析。结果 CIMT 增厚组血清 FGF-23 水平明显高于 CIMT 正常组(435.39 ± 221.20 比 360.22 ± 194.26 , $P < 0.05$), Klotho 蛋白水平明显低于 CIMT 正常组(446.54 ± 132.49 比 499.36 ± 121.38 , $P < 0.05$)。多因素逐步回归分析显示, Klotho 蛋白是 CKD 患者 CIMT 增厚的独立保护性因素($OR = 1.086$, $P < 0.05$), 而年龄增长、FGF-23 是 CKD 患者 CIMT 增厚的独立危险因素($OR = 1.075$, $P < 0.05$; $OR = 1.238$, $P < 0.05$)。结论 CKD2~5 期非透析患者 CIMT 增厚与 FGF-23、Klotho 蛋白有关, FGF-23、Klotho 蛋白在颈动脉硬化的发生发展中起重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship between fibroblast growth factor 23, Klotho protein and carotid intima-media thickness in patients with chronic kidney disease

CHEN Jin-Yan¹, HU Yong², SUN Hong¹, JIANG Ting³, LIU Xian-Ying¹

(1. Department of Nephrology, 2. Department of Cadre Health Care, 3. Department of Scientific Research, the Affiliated Haici Hospital, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266001, China)

[KEY WORDS] Chronic kidney disease; Fibroblast growth factor 23; Klotho protein; Carotid intima-media thickness

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between serum levels of fibroblast growth factor 23 (FGF-23), Klotho protein and carotid atherosclerosis in non-dialysis patients with chronic kidney disease (CKD) 2-5 stage. **Methods** 126 CKD 2-5 stage patients were involved in the study. Carotid intima-media thickness (CIMT) was measured by color Doppler ultrasonography. The patients were divided into CIMT thickening group and CIMT normal group according to CIMT. Serum levels of FGF-23 and Klotho protein were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the general data and clinical biochemical indexes were collected. The relative indexes of the two groups were compared, and the correlation between FGF-23, Klotho protein and carotid atherosclerosis was analyzed. Unconditional Logistic regression analysis was used for multivariate analysis of CIMT influencing factors. **Results** The serum FGF-23 level in CIMT thickening group was significantly higher than that in CIMT normal group (435.39 ± 221.20 vs 360.22 ± 194.26 , $P < 0.05$), and the level of Klotho protein was significantly lower than that in CIMT normal group (446.54 ± 132.49 vs 499.36 ± 121.38 , $P < 0.05$). Multivariate stepwise regression analysis showed that Klotho protein was an independent protective factor for CIMT thickening in patients with CKD ($OR = 1.086$, $P < 0.05$), while age increase and FGF-23 were independent risk factors for CIMT thickening in patients with CKD ($OR = 1.075$, $P < 0.05$; $OR = 1.238$, $P < 0.05$). **Conclusion** CIMT thickening is related to FGF-23 and Klotho proteins in non-dialysis patients with CKD 2-5 stage. FGF-23 and Klotho protein play an important role in the occurrence and development of carotid atherosclerosis.

[收稿日期] 2016-07-05

[修回日期] 2017-05-02

[基金项目] 青岛市中医药科研计划(2017-zyx015)

[作者简介] 陈金艳, 博士, 主治医师, 研究方向为肾脏疾病诊治, E-mail 为 hhl_qd@126.com。通讯作者刘先英, 主任医师, 研究方向为肾脏疾病诊治, E-mail 为 Lxy32086@126.com。

动脉硬化是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者最主要的血管并发症,动脉硬化性心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)也是CKD的最常见并发症和首要死亡原因。国外研究表明,CKD动脉硬化的发生率较同龄一般人群高3~30倍,发病年龄提前至40岁,被称为加速性动脉粥样硬化。动脉硬化的程度决定了心脑血管病发生的阈值、严重程度和预后。颈动脉内膜中膜厚度(carotid intima-media thickness, CIMT)是公认的可反映早期动脉硬化的标志,并且可以预测心血管事件发生的危险。CKD患者动脉硬化除了存在年龄、糖尿病、吸烟等传统危险因素,骨矿物质代谢紊乱引起血管钙化造成动脉硬化的病理机制也得到重视。成纤维细胞生长因子23(fibroblast growth factor 23, FGF-23)、Klotho蛋白、全段甲状旁腺激素(intact parathyroid hormone, iPTH)是调节人体钙磷代谢的主要激素。本研究采用颈动脉B超检测CIMT反映动脉硬化情况,并探讨CKD2~5期非透析患者FGF-23、Klotho蛋白与CIMT的关系,进一步阐明CKD2~5期非透析患者高CVD发病率及死亡率的机制。

1 资料和方法

1.1 一般资料

病例来自2013年2月至2014年7月我院门诊及住院确诊为CKD2~5期非透析的患者,诊断标准符合美国肾脏基金会2002年制订的K/DOQI标准,年龄>18岁,肾小球滤过率按照肾脏病膳食改良试验公式计算。CKD2~5期患者[肾小球滤过率估计值(estimated glomerular filtration rate, eGFR) 15~89 mL/(min·1.73 m²)]126例,男73例,女53例,年龄27~65岁,平均50.4±12.3岁, eGFR平均为51.9±103 mL/(min·1.73 m²)。排除肾脏替代治疗、急性冠状动脉综合征患者及近期内有感染及慢性肾衰竭急性加重的病例。原发病:慢性肾炎48例,糖尿病肾病37例,高血压性肾病24例,肾病综合征6例,多囊肾5例,痛风性肾病2例,慢性间质性肾炎4例。

1.2 CIMT超声检查

采用美国Sonolin G 50型彩色多普勒超声诊断仪,选用L10-5探头,频率5~10 MHz,取卧位,双肩垫低枕头,头偏向对侧,沿胸锁乳突肌外缘纵切,依次检查左右颈内、颈外、颈总动脉及分叉处,观察颈内动脉、颈外动脉及颈总动脉内径、IMT厚度,取6次双侧颈内动脉、颈外动脉及颈总动脉的IMT厚度平均值为IMT。全部病例均由同一位资深超声诊断

医师检查。

1.3 生化指标测定

应用Olympus-AU2700全自动生化分析仪测定血清肌酐、尿素氮、钙、磷、白蛋白、高敏C反应蛋白、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇。应用罗氏E170全自动免疫分析仪及化学发光免疫法测定iPTH。

1.4 FGF-23、Klotho蛋白测定

均采用双位点酶联免疫吸附方法测定,试剂盒分别来自美国Immutopics公司和Ebioscience公司,以上检测均由本院生化实验室完成。

1.5 动脉硬化病变程度判定

以管腔内膜交界面到中膜与外膜交界面之间的垂直距离为IMT。判断标准:(1)IMT正常:颈总动脉最大IMT<1.0 mm和分叉处后壁IMT≤1.0 mm;(2)IMT增厚:颈总动脉IMT≥1.0 mm,或分叉处IMT>1.0 mm;(3)粥样斑块:突向管腔的局灶性动脉壁增厚,其厚度超过相邻区域IMT至少50%。CIMT增厚定义:IMT增厚或局部有粥样斑块。

1.6 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件包进行统计分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用非配对 t 检验,各组间均数比较用单因素方差分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验。采用非条件Logistic回归分析进行CIMT影响因素的多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

本研究纳入CKD2~5期患者126例, CIMT增厚组54例,阳性率42.9%; CIMT正常组72例。CIMT增厚组年龄、体质指数(body mass index, BMI)、糖尿病、血iPTH、FGF-23水平均高于CIMT正常组,血红蛋白、内生肌酐清除率、Klotho蛋白水平则低于CIMT正常组,差异有统计学意义($P<0.05$;表1)。

2.2 CIMT影响因素的多因素分析

以CIMT为应变量,将CKD患者年龄、BMI、血红蛋白、Klotho蛋白、FGF-23、iPTH指标纳入多因素Logistic回归分析,结果显示Klotho蛋白($OR=1.086, 95\%CI 1.019 \sim 1.056, P<0.05$)和FGF-23($OR=1.238, 95\%CI 1.203 \sim 1.857, P<0.05$)为CKD患者CIMT增厚的影响因素,其中Klotho蛋白是CIMT增厚的保护性因素,而FGF-23、年龄增长是CIMT增厚的独立危险因素(表2)。

表 1. CIMT 增厚组与 CIMT 正常组一般临床资料比较

Table 1. Comparison of general clinical data between CIMT thickening group and CIMT normal group

一般资料	CIMT 正常组 (n = 72)	CIMT 增厚组 (n = 54)	P 值
年龄 (岁)	46.90±11.90	51.98±10.84 ^a	0.015
男/女 (例)	43/29	30/24	0.237
BMI (kg/m ²)	23.45±3.71	26.13±3.52 ^a	0.043
吸烟 (%)	48.4	59.3	0.242
糖尿病 [例 (%)]	16 (22.2)	21 (38.8) ^a	0.042
收缩压 (mmHg)	147.22±12.14	148.46±12.11	0.571
舒张压 (mmHg)	88.18±8.20	89.69±7.85	0.299
血红蛋白 (g/L)	122.46±10.59	118.29±9.82 ^a	0.026
白蛋白 (g/L)	37.01±5.20	35.65±4.18	0.078
内生肌酐清除率 (mL/min)	64.85±25.67	48.12±24.05 ^a	0.034
钙 (mmol/L)	2.13±0.14	2.10±0.20	0.534
磷 (mmol/L)	1.64±0.43	1.52±0.30	0.085
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	2.99±0.65	2.92±0.61	0.567
甘油三酯 (mmol/L)	1.83±0.35	1.73±0.31	0.095
iPTH (ng/L)	137.18±131.69	202.00±194.12 ^a	0.037
高敏 C 反应蛋白 (mg/L)	3.56±1.04	4.74±2.62	0.073
FGF-23	360.22±194.26	435.39±221.20 ^a	0.045
Klotho 蛋白	499.36±121.38	446.54±132.49 ^a	0.022

a 为 $P<0.05$, 与 CIMT 正常组比较。

表 2. CKD 患者 CIMT 增厚相关因素的 Logistic 回归分析

Table 2. Logistic regression analysis of related factors of CIMT thickening in CKD patients

自变量	B	SE	Sig	OR	95% CI
Klotho 蛋白	-0.012	0.005	0.018 ^a	1.086	1.019~1.056
FGF-23	0.082	0.032	0.011 ^a	1.238	1.203~1.857
iPTH	0.001	0.002	0.558	1.001	0.997~1.005
血红蛋白	-0.022	0.027	0.407	0.978	0.928~1.031
BMI	0.002	0.003	0.558	1.002	0.995~1.008
年龄	0.278	0.146	0.047 ^a	1.075	1.027~1.126

a 为 $P<0.05$ 。

3 讨 论

动脉硬化引发的 CVD 是 CKD 尤其是终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD) 患者的重要并发症之一,同时也成为该人群的首要死亡原因。2014 年美国肾脏数据系统(USRDS)的报告显示,近 40%的 ESRD 患者死于 CVD^[1]。既往研究证实,CVD 在大部分 CKD 患者进展至 ESRD 前就已存在,并且随着肾脏病的进展,发生率逐年升高而病情也逐渐加重^[2]。

Klotho 基因是 1997 年 Kuro-o 等在研究自发型高血压小鼠时发现的抗衰老基因,敲除 Klotho 基因小鼠会出现寿命缩短、生长迟缓、胸腺功能退化、肺气肿、认知障碍、皮肤萎缩、骨质减少、高磷血症、高

PTH 血症、高 FGF-23 血症、血管内皮功能紊乱、血管钙化、进展性动脉粥样硬化等一系列衰老的表现。Klotho 蛋白是 Klotho 基因的表达产物,其中有 α -Klotho、 β -Klotho 和 γ -Klotho 蛋白 3 种形式。已有动物模型证实,敲除 Klotho 基因的小鼠具有血管内皮损伤的过度表达,而补充循环 Klotho 蛋白后,其血管内皮功能改善,说明 Klotho 蛋白对血管内皮细胞具有保护作用^[3]。Klotho 蛋白也可使 P53/P21 表达抑制,缓解由过氧化氢所诱导的内皮细胞衰老,因此 Klotho 蛋白减少可造成血管内皮细胞的衰老和凋亡,促进动脉粥样硬化的发生^[4]。Leopold^[5]研究也表明 CKD 患者中血管平滑肌细胞表达内源性 Klotho 蛋白减少,Klotho 蛋白为内源性血管钙化抑制因子,且为 FGF-23 的重要辅助因子。本研究发现 CIMT 增厚组血清 Klotho 蛋白明显低于 CIMT 正常组 ($P<0.05$), Logistic 回归分析 Klotho 蛋白是 CKD 患者 CIMT 增厚发生的独立保护性因素。我们推测其机制可能如下:①保护肾小球,改善肾功能不全;②肾近曲小管上皮细胞的 NaPi-2a 和 NaPi-2c 协同转运体受到抑制从而增加尿磷的排泄,达到降低血磷,起到间接抑制血管钙化和损伤的作用;③直接抑制血管平滑肌细胞 NaPi-3 mRNA 的转录、血管平滑肌细胞对血磷的摄取、血管平滑肌细胞钙化及转分化;④抑制体内微炎症反应活化,降低氧化

应激产物,促进一氧化氮合成^[6-9]。

高磷血症被认为是 CKD 患者引起动脉硬化的一个非传统因素。研究发现,与血磷相比,FGF-23 是 CKD 不良预后的一个更敏感的预测因子,即使在 CKD 患者 $eGFR > 60 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$, FGF-23 升高仍然与其心血管损伤及动脉硬化独立相关^[10]。Mirza 等^[11-12]对社区老年群体的研究认为即使在正常范围的较高的 FGF-23 水平也与血管损害和动脉僵硬度增加独立相关,在 CKD 患者中,血 FGF-23 水平增高者更易出现动脉粥样硬化,有更高的风险发生左心室肥厚,预后不佳。分析其机制可能是 CKD 患者升高的 PTH 通过刺激磷的释放而诱导 FGF-23 生成,FGF-23 又反馈刺激 PTH 的分泌,使血管硬化的危险增加。本研究发现 CIMT 增厚组 iPTH 高于 CIMT 正常组。此外发现 FGF-23 与 Klotho 蛋白共同在血管组织上表达,提示 FGF-23-Klotho 轴与 CVD 的发生及血管发生病理性改变相关。还有报道证实高 FGF-23 水平与内皮功能紊乱相关,不论在正常人还是肾功能减退患者 FGF-23 均可降低其内皮依赖的血管舒张功能,CKD3~4 期患者中高水平的 FGF-23 可以通过内皮细胞介导血管功能障碍^[13-15],而内皮功能障碍是动脉粥样硬化重要的始动环节,其进展和增高的炎症反应对动脉硬化和 CVD 的发展非常关键。Larsson^[16]研究发现在慢性肾衰竭患者 FGF-23 与血管病变具有相关性,尽管血磷水平正常,单纯 FGF-23 升高也可加重动脉粥样硬化的进展,并不依赖于血磷的水平。本研究中 CKD 患者 CIMT 增厚组血磷与 CIMT 正常组比较差异无统计学意义,而 CIMT 增厚组血清 FGF-23 水平高于 CIMT 正常组,进一步行多因素 Logistic 回归分析,结果表明血清 FGF-23 是 CKD 患者发生 CIMT 增厚的一个独立危险因素,与既往研究一致。

综上所述,Klotho 蛋白水平的下降不仅仅是肾脏受损的早期标志物,同时在 CKD 及动脉硬化的进展过程中 Klotho 蛋白也起关键作用;在高磷血症出现前,FGF-23 水平已升高,显示其可更早地预测 CKD 患者的矿物质和骨代谢异常导致动脉硬化。Klotho 蛋白、FGF-23 对于 CKD 患者发生 CVD 的具体作用机制,以及我们能否对 Klotho 蛋白、FGF-23 进行有效调控,从而降低 CKD 患者发生 CVD 的风险,尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, et al. United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease[J]. *Kidney Int Suppl*, 2015, 5(1): 2-7.
- [2] Inker LA, Astor BC, Fox CH, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 63(5): 713-735.
- [3] Heine GH, Nangaku M, Fliser D. Calcium and phosphate impact cardiovascular risk[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(15): 1112-121.
- [4] 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.
- [5] Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(4): 267-274.
- [6] Razaque MS. FGF-23, Klotho and vitamin D interactions: What have we learned from in vivo mouse genetics studies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 728: 84-91.
- [7] Nabeshima Y, Imura H. Alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis[J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(3): 455-464.
- [8] Hu MC, Shi MJ, Zhang JN. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(1): 124-136.
- [9] Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and kidney disease[J]. *J Nephrol*, 2010, 16(4): S136-S144.
- [10] Faul C, Amaral AP, Oskoue B, et al. FGF-23 induces left ventricular hypertrophy[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4393-408.
- [11] Mirza MA, Hansen T, Johansson L, et al. Relationship between circulating FGF-23 and total body atherosclerosis in the community[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(10): 3125-3131.
- [12] Mirza MA, Larsson A, Melhus H, et al. Serum intact FGF-23 associated with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207(2): 546-551.
- [13] Mirza MA, Larsson A, Lind L, et al. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in community[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 205(2): 385-390.
- [14] Donate-Correa J, Mora-Fernández C, Martínez-Sanz R, et al. Expression of FGF-23/KLOTHO system in human vascular tissue[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 165(1): 179-183.
- [15] Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al. Longitudinal analysis of vascular function and biomarkers of metabolic bone disorders before and after renal transplantation[J]. *Am J Nephrol*, 2013, 37(2): 126-134.
- [16] Larsson TE. The role of FGF-23 in CKD-MBD and cardio-vascular disease: friend or foe? [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(5): 1376-381.

(此文编辑 曾学清)