

## 综述

# Klotho与肾损伤及修复的研究进展

戴厚永, 杨斌\*

南通大学附属医院肾内科, 南通 226001

**摘要:** Klotho蛋白在肾脏高表达, 可溶型Klotho广泛分布于血液、尿液和脑脊液中, 在体内发挥重要内分泌功能。Klotho在肾损伤中的作用日益受到重视, 已有研究表明Klotho在急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)中呈暂时性, 而在慢性肾脏病中呈持续性肾脏局部和系统性缺陷。Klotho可望成为肾损伤的生物标志物, 有利于AKI早期诊断及反映其向慢性肾损伤的进展, 并有潜在的治疗价值。然而, 对Klotho如何影响AKI修复的研究有限。本综述着重讨论Klotho在AKI及修复中的作用, 特别是Klotho与细胞命运(坏死/凋亡/自噬)、修复/再生、Wnt/ $\beta$ -catenin和促红细胞生成素受体(Klotho的效应因子之一)的关系。

**关键词:** Klotho; 急性肾损伤; 修复; 生物标志物

**中图分类号:** R334.1; R692

## Research update of Klotho in kidney injury and repair

DAI Hou-Yong, YANG Bin\*

Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

**Abstract:** Klotho is highly expressed in the kidney, while soluble Klotho is detectable in the blood, urine, and cerebrospinal fluid, and has multiple hormone-like functions. The role of Klotho in kidney injury has attracted more and more attentions from researchers. Emerging evidence revealed that the transient deficiency of Klotho is an early event of acute kidney injury (AKI), whereas, in chronic kidney disease, this deficiency is sustained not only in the kidney, but also in other organ systems. Therefore, Klotho could be a potential biomarker for early diagnosis of AKI, as well as for its progression to chronic kidney disease. Moreover, Klotho might have therapeutic value to renal injury. Nevertheless, there are only few studies on the involvement of Klotho in post AKI repair. This review focused on the role of Klotho in not only kidney injury, but also its repair, in particular the relationship between Klotho and cell fate (autophagy/apoptosis/necrosis), repair/regeneration, Wnt/ $\beta$ -catenin and erythropoietin receptor, one of the Klotho effectors.

**Key words:** Klotho; acute kidney injury; repair; biomarker

Kuro-o 等<sup>[1]</sup>于1997年发现一种与衰老有关的新基因, 并用古希腊神话中纺织生命之线的女神的名字命名为Klotho。目前已经发现Klotho蛋白有 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 三种类型。其中 $\beta$ -Klotho蛋白与胆汁酸和能量代谢有关,  $\gamma$ -Klotho蛋白的功能还不明确。如没有特别说明, 我们常说的Klotho即为 $\alpha$ -Klotho蛋白<sup>[2]</sup>。机体 $\alpha$ -Klotho蛋白又有三种亚型: 膜结合型、可溶型和分泌型<sup>[3]</sup>。膜结合型全长的Klotho为一单

通道跨膜蛋白, 作为成纤维细胞生长因子23 (fibroblast growth factor 23, FGF23)的共受体, 抑制 $1,25-(OH)_2D_3$ 合成, 抑制磷的吸收, 促进磷排泄。循环中的Klotho蛋白由可溶型和分泌型Klotho组成, 其中分泌型占其中大部分, 它通过选择性剪接转录mRNA产生, 可溶型Klotho由蛋白酶降解膜结合型Klotho的胞外域而产生<sup>[3]</sup>。一般可溶型Klotho指膜结合型Klotho的降解片段, 其广泛存在于血液、尿液和脑

Received 2018-06-05 Accepted 2018-10-12

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81570677).

\*Corresponding author. E-mail: by5@le.ac.uk; dryangbin@hotmail.com

脊液中,发挥内分泌样功能。除抗衰老外,目前发现 Klotho 还有抑制胰岛素和 Wnt 信号,调节钙和磷稳态、调节甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 分泌、抗氧化应激、抑制细胞炎症和凋亡,促进自噬,抑制纤维化等作用。分泌型 Klotho 蛋白由于其结合位点和作用受体还没有确定,其功能目前还不十分清楚<sup>[3]</sup>。随着研究的不断深入,将有更多 Klotho 蛋白功能被逐步发现。本文就 Klotho 在急慢性肾脏损伤及修复中的作用研究进展作一综述。

## 1 肾脏是产生和代谢Klotho的主要部位

Klotho 蛋白在肾脏、甲状旁腺和脉络丛高表达<sup>[4]</sup>。肾脏特异性 Klotho 基因敲除和全身 Klotho 基因敲除小鼠具有相同的表型,表明肾脏可能是全身循环中 Klotho 的主要来源<sup>[5]</sup>。Hu 等<sup>[6]</sup>检测大鼠双肾切除前后血清 Klotho 水平,发现双肾切除后血清 Klotho 急剧下降,该结果也支持肾脏是循环中 Klotho 的重要来源。不仅如此,在双肾切除大鼠血清中 Klotho 半衰期延长,说明肾脏在清除 Klotho 中也发挥重要作用。体内外实验均发现 Klotho 蛋白是从近端肾小管基底膜通过胞吞作用转运到管腔膜而从尿液排出体外<sup>[6]</sup>。进一步检测 Klotho 在肾脏各部位的表达发现,其高表达于远曲小管,近端小管次之,在部分内髓集合细胞也有少量 Klotho 表达<sup>[7]</sup>。因此,肾脏在维持机体 Klotho 稳态方面发挥重要作用:肾脏不仅是全身 Klotho 的主要来源,而且是清除血液循环中 Klotho 的主要器官<sup>[6]</sup>。阐明肾脏在 Klotho 产生和代谢中的作用无疑将有助于认识其在肾损伤中的作用,也为应用 Klotho 干预治疗肾损伤提供了理论依据。

## 2 Klotho与急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)及修复

AKI 是指由多种原因引起的肾功能急剧下降而出现的临床综合征。Hu 等<sup>[8]</sup>发现大鼠 AKI 时血、尿和肾组织中 Klotho 呈急性一过性减少,而且 Klotho 可作为肾保护作用因子,促进损伤修复,故 Klotho 有望成为 AKI 早期生物标志物用于诊断,并具有潜在的治疗价值。血中的 Klotho 在大鼠 AKI 发病 3 h 即开始下降,48 h 开始回升,至 7 天时恢复至基线水平。尿 Klotho 在 AKI 第 1 天时开始下降,第 2 天开始回升,至第 7 天时接近正常水平;AKI 时,大鼠肾组织 Klotho 表达也减少。在人 AKI 时尿液

中 Klotho 蛋白也减少,进一步支持上述发现<sup>[8]</sup>。对不同 Klotho 表达水平的小鼠诱导 AKI 后发现,与正常表达 Klotho 的野生型小鼠比较,Klotho 缺陷小鼠 ( $Kl^{-/-}$ )AKI 病变较重。相反,过表达 Klotho (Tg-Kl) 时 AKI 病变较轻,显示 Klotho 能减轻肾损伤,促进 AKI 时肾组织修复<sup>[8]</sup>。研究显示,Klotho 能通过 HSP-70 减轻缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡<sup>[9]</sup>。自噬在促进 AKI 修复过程中起重要作用<sup>[10]</sup>,Klotho 通过激活自噬,减轻缺血再灌注损伤,延缓 AKI 进展到慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD)<sup>[11]</sup>。中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 在缺血再灌注引起的 AKI 中发挥肾保护作用<sup>[12]</sup>,推测 Klotho 上调 NGAL 也是其肾保护作用可能机制之一<sup>[8]</sup>。我们的既往研究显示在急性缺血再灌注损伤动物模型中,促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 可上调 caspase-3,促进炎症细胞凋亡,修复肾损伤<sup>[13]</sup>。此外,组织保护型 EPO 衍生肽,只与组织保护型受体 (erythropoietin receptor/ $\beta$  common receptor, EPOR/ $\beta$ cR) 结合,不刺激 EPO 同源二聚受体 (EPOR)<sub>2</sub>,亦可通过抑制 caspase-3 活性,减少肾固有细胞凋亡来改善缺血再灌注和环孢素 A 联合诱导的肾损伤<sup>[14]</sup>。更有趣的是近来有学者发现 EPOR 是 Klotho 发挥细胞保护作用的下游效应分子<sup>[15]</sup>。这些结果显示 Klotho 促进 AKI 时肾损伤修复的机制比较复杂,值得进一步深入研究,特别是 Klotho 与 EPOR/ $\beta$ cR 的关系目前尚无报道。

Liu 等<sup>[16]</sup>的研究显示心脏瓣膜置换术后缺血再灌注肾损伤患者血中 Klotho 一过性快速下降,进一步提示其为新的早期 AKI 生物标志物。在另一项 30 例非手术相关性 AKI 患者及 126 例对照组 (16 例正常对照,30 例 CKD1~5 期患者,80 例 CKD5 期患者) 血清 Klotho 水平横断面病例对照研究中,结果显示对照组血清 Klotho 水平与估算肾小球滤过率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) 水平呈正相关,而在 AKI 患者随着 eGFR 逐渐降低,Klotho 水平越来越高<sup>[17]</sup>。该结果与 Liu 等<sup>[16]</sup>的报道不一致,其原因可能与检测 Klotho 的时间点不同,以及 Klotho 蛋白在不同原因所致 AKI 中的作用机制不同有关<sup>[17]</sup>。另外,在 eGFR 相当的 AKI 和 CKD 患者中,AKI 患者血清 Klotho 水平高于 CKD 患者,其原因可能是 AKI 时,尚有部分有活力的小管细胞能产生 Klotho 有关<sup>[17]</sup>。有关 Klotho 在 AKI 患者血和尿中

的表达水平变化及其相关性, 以及如何将其作为生物标志物来指导临床 AKI 的诊治, 需要在不同病因导致的 AKI 患者中进行多中心及大样本的动态检测, 同时需要将检测样本、时间点及方法等标准化。

### 3 Klotho与CKD

各种原因引起的慢性肾脏结构和功能障碍, 包括肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 正常和不正常的病理损伤、血液或尿液成分异常, 及影像学检查异常, 或不明原因 GFR 下降 ( $< 60 \text{ mL}/\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2$ ) 超过 3 个月即为 CKD。

在 CKD 动物模型中, 血、尿和肾组织 Klotho 水平都减少, 表明 CKD 是一种全 Klotho 缺陷状态<sup>[18]</sup>, 所以 Klotho 不仅有望作为 CKD 生物标志物, 而且可预测 CKD 的进展<sup>[19]</sup>。通过检测 CKD 患者血和尿中的 Klotho 水平发现, 尿 Klotho 在 CKD1 期即开始减少, 且随着 CKD 进展而进一步减少, 然而血清 Klotho 水平到 CKD2 期才开始减少<sup>[20, 21]</sup>。在美国一项为期 10 年的健康老化与身体成分研究中, 共纳入 2 496 名受试者, 平均年龄为 75 岁, 结果显示血清 Klotho 水平与肾功能减退及 CKD 的发生相关, 低 Klotho 水平受试者肾功能减退更明显<sup>[22]</sup>。

大量研究表明阻止 Klotho 减少、促进内源性 Klotho 产生或给予外源性 Klotho 能延缓慢性肾衰竭进展<sup>[23]</sup>。肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 抑制剂、HMG CoA 还原酶抑制剂、VitD 类似物、PPAR- $\gamma$  激动剂和抗氧化剂均能上调 Klotho 表达水平, 发挥抗肾脏纤维化作用及改善 CKD 并发症<sup>[24]</sup>。

Zhao 等<sup>[25]</sup> 研究显示 mTOR 信号通路抑制剂能上调内源性 Klotho 表达而抑制慢性肾衰竭小鼠血管钙化。Lin 等<sup>[26]</sup> 通过腹腔注射组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A 干预腺嘌呤喂养导致的小鼠慢性肾衰竭模型, 发现组蛋白去乙酰化酶抑制剂能抑制肾脏和骨骼内源性 Klotho 的丢失而减轻肾纤维化和骨损伤。此外, 曲古抑菌素 A 通过使 PPAR- $\gamma$  乙酰化促进 Klotho 恢复而延缓 CKD 进展<sup>[27]</sup>。大黄酸可通过影响启动子去甲基化增加内源性 Klotho 的表达而发挥肾保护作用<sup>[28]</sup>。已有报道, 重组 Klotho 腹腔注射不仅是一种可行、安全、有效的预防和治疗 AKI 进展为 CKD 的方法, 而且还能改善尿毒症相关并发症如尿毒症心肌病, 显示了其临床应用前景<sup>[29]</sup>。

最近有研究显示, 应用 Klotho 蛋白通过抑制足细胞瞬时受体电位通道 6 (transient receptor potential channel 6, TRPC6) 介导的  $\text{Ca}^{2+}$  内流信号而减轻蛋白尿<sup>[30]</sup>。Zhou 等<sup>[31]</sup> 研究显示 Klotho 可通过抑制 Wnt 信号相关的  $\beta$  链接素 ( $\beta$ -catenin) 而改善肾脏纤维化, 显示了其对 CKD 的修复作用。此外, EPO 能调节 Klotho 的表达, 减轻 CKD 时 Klotho 的下调<sup>[32]</sup>, 但 Klotho 在 AKI 时对  $\beta$  链接素的作用如何, 以及 Klotho 联合 EPO 的肾保护作用还不十分明了。我们将结合前期研究结果<sup>[13, 14]</sup>, 以及 Klotho 能上调肾脏 EPOR 的表达等<sup>[15]</sup>, 进一步确定 Klotho 在急性肾损伤及修复中的研究目标 (图 1)。

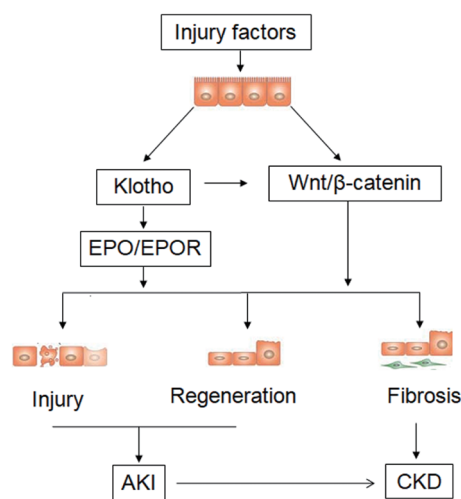


图 1. 急性肾损伤和慢性肾脏病肾损伤、再生和纤维化中的 Klotho 及其相关信号通路

Fig. 1. The Klotho and its related signal pathways in kidney injury, regeneration and fibrosis during the course of acute kidney injury (AKI) and chronic kidney disease (CKD). EPO: erythropoietin; EPOR: erythropoietin receptor.

### 4 展望

自从 Klotho 蛋白发现以来, 其在各种急慢性肾脏病的作用和地位受到广泛重视。随着研究的不断深入, Klotho 缺陷不仅是致病因素, 而且导致疾病进展, 故有望成为生物标志物, 但仍需大样本临床验证。Klotho 蛋白亦可有助于各种急慢性肾脏病的诊断, 并为临床治疗提供新的策略。

### 参考文献

- 1 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R,

- Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390(6655): 45–51.
- 2 Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and *Klotho*: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 503–533.
  - 3 Xu Y, Sun Z. Molecular basis of *Klotho*: from gene to function in aging. *Endocr Rev* 2015; 36(2): 174–193.
  - 4 Olauson H, Mencke R, Hillebrands JL, Larsson TE. Tissue expression and source of circulating  $\alpha$ *Klotho*. *Bone* 2017; 100: 19–35.
  - 5 Lindberg K, Amin R, Moe OW, Hu MC, Erben RG, Östman Wernerson A, Lanske B, Olauson H, Larsson TE. The kidney is the principal organ mediating *klotho* effects. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(10): 2169–2175.
  - 6 Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, Ravikumar P, Gillings N, Bian A, Sidhu SS, Kuro-o M, Moe OW. Renal production, uptake, and handling of circulating  $\alpha$ *Klotho*. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(1): 79–90.
  - 7 Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, Haussler MR, Kerr Whitfield G. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging *klotho* gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414(3): 557–562.
  - 8 Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW. *Klotho* deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int* 2010; 78(12): 1240–1251.
  - 9 Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Yoshida S, Shiohira S, Nitta K, Tsuchiya K. *Klotho* reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(1): 60–68.
  - 10 He L, Livingston MJ, Dong Z. Autophagy in acute kidney injury and repair. *Nephron Clin Pract* 2014; 127(1–4): 56–60.
  - 11 Shi M, Flores B, Gillings N, Bian A, Cho HJ, Yan S, Liu Y, Levine B, Moe OW, Hu MC.  $\alpha$ *Klotho* mitigates progression of AKI to CKD through activation of autophagy. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(8): 2331–2345.
  - 12 Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(3): 407–413.
  - 13 Yang B, Hosgood SA, Bagul A, Waller HL, Nicholson ML. Erythropoietin regulates apoptosis, inflammation and tissue remodelling via caspase-3 and IL-1 $\beta$  in isolated hemoperfused kidneys. *Eur J Pharmacol* 2011; 660(2–3): 420–430.
  - 14 Wu Y, Zhang J, Liu F, Yang C, Zhang Y, Liu A, Shi L, Wu Y, Zhu T, Nicholson ML, Fan Y, Yang B. Protective effects of HBSP on ischemia reperfusion and cyclosporine a induced renal injury. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 758159.
  - 15 Hu MC, Shi M, Cho HJ, Zhang J, Pavlenko A, Liu S, Sidhu S, Huang LJ, Moe OW. The erythropoietin receptor is a downstream effector of *Klotho*-induced cytoprotection. *Kidney Int* 2013; 84(3): 468–481.
  - 16 Liu YJ, Sun HD, Chen J, Chen MY, Ouyang B, Guan XD. *Klotho*: a novel and early biomarker of acute kidney injury after cardiac valve replacement surgery in adults. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(5): 7351–7358.
  - 17 Seibert E, Radler D, Ulrich C, Hanika S, Fiedler R, Girndt M. Serum *klotho* levels in acute kidney injury. *Clin Nephrol* 2017; 87 (4): 173–179.
  - 18 Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. *Klotho* deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(1): 124–136.
  - 19 Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of *Klotho* in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27(7): 2650–2657.
  - 20 Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. *Klotho* deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(1): 124–136.
  - 21 Barker SL, Pastor J, Carranza D, Quiñones H, Griffith C, Goetz R, Mohammadi M, Ye J, Zhang J, Hu MC, Kuro-o M, Moe OW, Sidhu SS. The demonstration of  $\alpha$ *Klotho* deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(2): 223–233.
  - 22 Drew DA, Katz R, Kritchevsky S, Ix J, Shlipak M, Gutiérrez OM, Newman A, Hoofnagle A, Fried L, Semba RD, Sarnak M. Association between soluble *Klotho* and change in kidney function: the health aging and body composition study. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(6): 1859–1866.
  - 23 Neyra JA, Hu MC. Potential application of *klotho* in human chronic kidney disease. *Bone* 2017; 100: 41–49.
  - 24 Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. *Klotho* and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013; 180: 47–63.
  - 25 Zhao Y, Zhao MM, Cai Y, Zheng MF, Sun WL, Zhang SY, Kong W, Gu J, Wang X, Xu MJ. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via *Klotho* upregulation. *Kidney Int* 2015; 88(4): 711–721.
  - 26 Lin W, Li Y, Chen F, Yin S, Liu Z, Cao W. *Klotho* preservation via histone deacetylase inhibition attenuates chronic kidney disease-associated bone injury in mice. *Sci Rep* 2017; 7:

- 46195.
- 27 Lin W, Zhang Q, Liu L, Yin S, Liu Z, Cao W. Klotho restoration via acetylation of peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$  reduces the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017; 92(3): 669–679.
- 28 Zhang Q, Liu L, Lin W, Yin S, Duan A, Liu Z, Cao W. Rhein reverses Klotho repression via promoter demethylation and protects against kidney and bone injuries in mice with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017; 91(1): 144–156.
- 29 Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro-O M, Moe OW. Recombinant  $\alpha$ -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int* 2017; 91(5): 1104–1114.
- 30 Kim JH, Xie J, Hwang KH, Wu YL, Oliver N, Eom M, Park KS, Barrezaeta N, Kong ID, Fracasso RP, Huang CL, Cha SK. Klotho may ameliorate proteinuria by targeting TRPC6 channels in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(1): 140–151.
- 31 Zhou L, Li Y, Zhou D, Tan RJ, Liu Y. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(5): 771–785.
- 32 Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Shiohira S, Nitta K, Tsuchiya K. Recombinant human erythropoietin mitigates reductions in renal klotho expression. *Am J Nephrol* 2010; 32(2): 137–144.