·基础研究·

Klotho 基因在慢性心力衰竭患者心肌中的表达

田倪妮[1,2]，魏 玲[1*]，李宏键[3]，朱向情[4]，田 青[2]，李慧萍[5]，陈 瑛[1]，潘兴华[4*]
（[1]成都军区昆明总医院地方干部病房，昆明 650032；[2]昆明市第一人民医院心内科，昆明 650011；[3]云南省第一人民医院骨科，昆明 650034；[4]云南省干细胞工程实验室，昆明 650032；[5]桂林医学院研究生学院，桂林 541000）

【摘 要】 **目的** 探讨慢性心力衰竭（CHF）患者心肌组织中 *Klotho* 基因的表达及其与心肌纤维化的关系。**方法** 心肌组织样本取材于2013年8月至2014年8月在成都军区昆明总医院心脏外科建立体外循环的60例CHF患者，按照纽约心脏联合会（NYHA）心功能分级将其分为：NYHAⅠ级组、Ⅱ级组、Ⅲ级组，每组患者各20例。运用实时荧光定量反转录－聚合酶链反应（RT-PCR）检测 *Klotho* 基因表达量，同时采用酶联免疫吸附测定（ELISA）方法检测上述60例患者血清中Ⅰ型C端胶原前肽（PⅠCP）的浓度。并对正常心肌组织及CHF患者心肌组织进行HE染色。**结果** （1）HE染色显示CHF患者心肌胶原增生；（2）与NYHAⅠ级组比较，*Klotho* 基因在NYHAⅡ级、NYHA Ⅲ级组的心肌组织中表达明显减少（均 $P<0.05$），且在NYHA Ⅲ级组中的表达较NYHA Ⅱ级组明显减少（$P<0.05$）；（3）NYHA Ⅲ级组患者血清中PⅠCP的含量高于Ⅱ级、Ⅰ级组（均 $P<0.05$），NYHAⅡ级组高于Ⅰ级组（$P<0.05$）。**结论** CHF患者心肌组织 *Klotho* 基因的表达减少可能与随着心功能恶化，其抗衰老作用及抗心肌纤维化作用逐渐减弱有关。

【关键词】 *Klotho* 基因；慢性心力衰竭；心肌纤维化
【中图分类号】 R541.6 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.11.203

Expression of *Klotho* in myocardial tissue of chronic heart failure patients

TIAN Ni-Ni[1,2], WEI Ling[1*], LI Hong-Jian[3], ZHU Xiang-Qing[4], TIAN Qing[2], LI Hui-Ping[5], CHEN Ying[1], PAN Xing-Hua[4*]
([1]Civilian Cadre's Ward, Kunming General Hospital, Chengdu Military Command, Kunming 650032, China; [2]Department of Cardiology, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650011, China; [3]Department of Orthopedics, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming 650034, China; [4]Yunnan Provincial Laboratory of Stem Cell Engineering, Kunming 650032, China; [5]Graduate School, Guilin Medical University, Guilin 541000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expression of *Klotho* in the myocardial tissue of the patients with chronic heart failure (CHF), and explore its relationship with myocardial fibrosis. **Methods** Myocardial tissue samples were collected from 60 CHF patients during cardiopulmonary bypass surgery in the Department of Cardiac Surgery, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command from August 2013 to August 2014. According to the New York Heart Association (NYHA) Functional Classification, the patients were assigned into NYHA Ⅰ group, NYHA Ⅱ group and NYHA Ⅲ group ($n=20$ for each group). The mRNA level of *Klotho* in the obtained heart tissues was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum level of carboxyterminal propeptide of type Ⅰ procollagen (PⅠCP). The morphological differences were observed between the normal myocardium and heart failure myocardial tissue by HE staining. **Results** (1) HE staining showed hyperplasia of mayocardial collagen in CHF patients. (2)The mRNA level of *Klotho* was significantly decreased in both the NYHA Ⅱ group and NYHA Ⅲ group than in the NYHA Ⅰ group (both $P<0.05$), and was lower in the NYHA Ⅲ group than in the NYHA Ⅱ group ($P<0.05$). (3)The serum level of PⅠCP was highest in the NYHA Ⅲ group, followed by that in the NYHA Ⅱ group and then in the NYHA Ⅰ group (all $P<0.05$). **Conclusion** *Klotho* expression is decreased in CHF patients, which may involved in its insufficient anti-aging effect and insufficient anti-myocardial fibrosis effect along with the deterioration of heart function.

【**Key words**】 *Klotho* gene; chronic heart failure; myocardial fibrosis

收稿日期：2016－05－12；**修回日期**：2016－07－31
基金项目：国家重点基础研究发展计划（973计划；2012CB518100）；成都军区十二五课题（B12022）
李宏键，为共同第一作者
通信作者：魏 玲，E-mail：weiling43@163.com；潘兴华，E-mail：xinghuapan@aliyun.com

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program; 2012CB518100) *and the "Twelfth Five-year Plan" of Chengdu Military Command* (B12022).

TIAN Ni-Ni and LI Hong-Jian are co-first authors who contributed equally to this work.

Corresponding author: WEI Ling, E-mail: weiling43@163.com; PAN Xing-Hua, E-mail: xinghuapan@aliyun.com

心室重构的基础是心肌细胞及其细胞外基质、胶原细胞网等变化，其相关过程包括缺血、细胞坏死和凋亡等。成纤维细胞首先在粗面内质网的多聚核糖体上通过信使RNA合成多肽链，每3条前肽链经羟化装配成一条三股螺旋的前胶原分子，再经过糖化前胶原分泌到细胞外。再由前胶原肽酶切除前胶原的C端和N端前肽而形成胶原。因此Ⅰ型C端胶原前肽(carboxyterminal propeptide of type Ⅰ procollagen，PⅠCP)可反映Ⅰ型胶原的合成。

Klotho 基因全长50 kb，包括4个内含子和5个外显子，人类的 *Klotho* 基因定位于第13号染色体(13q12)。*Klotho* 是一种与衰老有关的基因，作为一种辅助因子/复合受体调节成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)23信号，影响细胞内信号通路，包括p53/p21、c-AMP、蛋白激酶C(protein kinase C，PKC)和Wnt信号通路。Klotho可保护内皮的机能障碍和调节一氧化氮的产生，其基因表达增加可抑制胰岛素信号和氧化应激，进而抑制衰老和延长寿命。

本课题组通过观察慢性心力衰竭(chronic heart failure，CHF)患者心肌 *Klotho* 基因的表达及PⅠCP的含量变化，讨论 *Klotho* 基因在CHF患者中的作用，及其与胶原的分泌、合成，以及心肌纤维化的可能关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验样本取材于成都军区昆明总医院2013年8月至2014年8月心脏外科建立体外循环手术患者心肌的脱落组织，共计60例。所有病例均排除脑血管病、急性心肌梗死、严重肝肾功能不全等可能影响实验结果的疾病。根据纽约心脏联合会(New York Heart Association, NYHA)分级标准将60例患者分为：NYHA Ⅰ级组、NYHA Ⅱ级组和NYHAⅢ级组，每组各20例。所有标本及组织放入-80℃的超低温冰箱中备用。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂 离心柱型mRNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量4.2×SYBR real-time PCR premixure(百泰克生物技术有限公司，北京)、PICP采用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)试剂盒等。

1.2.2 仪器 荧光定量PCR系统Bio-RAD CFX96-C1000(Applied Biosystems公司，美国)、UVP凝胶成像系统、图像分析系统(Biorad公司，美国)、酶标仪。

1.3 心肌组织mRNA的提取

将收集的心肌组织标本按照mRNA提取试剂盒说明书提取mRNA，运用紫外分光光度计及1%琼脂糖凝胶电泳方法检测其浓度及纯度。合格样本冻存于-80℃超低温冰箱。

1.4 心肌组织mRNA逆转录为cDNA

在聚合酶链反应(polymerase chain reaction，PCR)管中配制20 μl反转录(reverse transcription，RT)反应混合液。按以下条件在PCR仪器上将心肌组织mRNA逆转录为cDNA：42℃ 50 min，70℃ 10 min，冰盒冷却，存于-20℃超低温冰箱。

1.5 RT-PCR扩增目的基因 *Klotho*

Klotho 基因引物由上海生工生物工程技术公司设计与合成，Klotho引物约115 bp，甘油醛3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH)引物片段约125 bp。引物设计见表1。总反应体系20 μl，扩增条件：95℃ 2 min起始模板变性，95℃ 45 s模板变性(循环数1)；61℃ 5 s退火，72℃ 1 min延伸(循环数35)，72℃ 10 min延伸(循环数1)。将无cDNA的RT管作为阴性对照管，测定各管的CT值，每个样本重复3遍，将NYHA Ⅰ级组作为对照组。

表1 目的基因引物及内参

Table 1 The primers of target gene and GAPDH

Gene	Primer sequence(5'→3')	Annealing temperature	Primer size
Klotho	F5'-TAG ACC CTG CCT GCC CTT-3'	61℃	115 bp
	R5'-GGA TAA TCT CCA GAG CTT-3'		
GAPDH	F5'-AAGGGTCATCATCATCTCTGCG-3'	57℃	125 bp
	R5'-GAGGCTGTTGTCATACTTCAT-3'		

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.6 患者血清中PⅠCP浓度的测定

ELISA方法检测本组60例患者血清中PⅠCP浓度。将特异性抗体与固相载体联结，形成固相抗体，先后加入受检标本、酶标抗体，最后加底物显色。

用酶标仪检测。

1.7 心肌组织的HE染色

采用HE染色法对正常心肌组织和CHF心肌组织进行染色。通过取材与固定、脱水透明、浸蜡包埋、切片与贴片、脱蜡HE染色、脱水透明、封固，对心肌标本进行HE染色。

1.8 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差表示，各组间比较采用方差分析。以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌组织HE染色结果

HE染色结果表明，正常心肌细胞短柱状，细胞核呈椭圆形、深染、染色质均匀（图1A）；CHF患者随着心功能的逐渐恶化，心内膜下心肌弥漫性空泡样变，心肌间质广泛纤维化（图1B，C，D）。

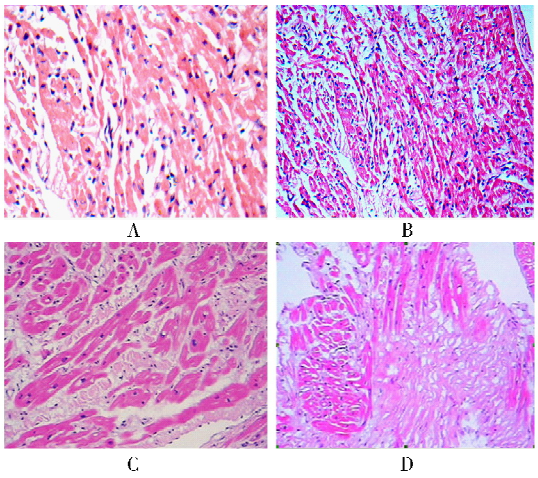


图1 心肌组织HE染色病理切片

Figure 1 HE staining of myocardial tissue

A: normal myocardium(×400); B: NYHA Ⅰ group(×200); C: NYHA Ⅱ group(×200); D: NYHA Ⅲ group(×400)

2.2 *Klotho*基因在不同心功能分级组中的相对表达量

RT-PCR测定*Klotho*基因在3个不同心功能分组中的相对表达量。经方差分析得出*Klotho*基因相对表达量：NYHAⅠ级组为1.12±0.09；NYHAⅡ级组为0.73±0.18；NYHAⅢ级组为0.37±0.19。*Klotho*基因相对表达量在3组间差异有统计学意义；两两比较结果发现，NYHAⅠ级组高于Ⅱ级组和Ⅲ级组（均$P<0.05$），NYHAⅡ级组高于Ⅲ级组（$P<0.05$；图2）。

2.3 不同心功能分级组患者血清中PⅠCP的含量

ELISA法测定各组血清中PⅠCP含量：NYHAⅠ级组为（0.324±0.053）μg/L，NYHAⅡ级组为（0.435±0.041）μg/L，NYHAⅢ级组为（0.492±0.077）μg/L。PⅠCP含量在3组间差异有统计学意义（$F=41.82$，$P<0.05$）；两两比较结果发现，NYHAⅢ级组高于Ⅱ级组、Ⅰ级组（均$P<0.05$），NYHAⅡ级组高于Ⅰ级组（$P<0.05$；图3）。

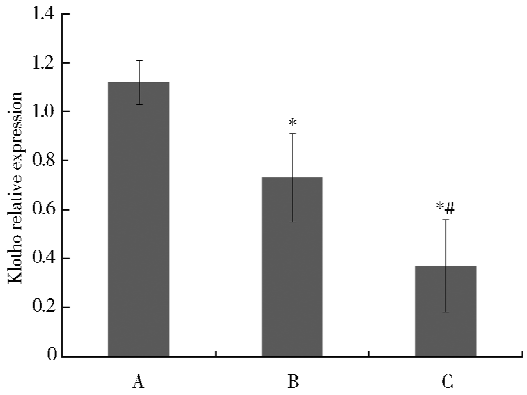


图2 各组心肌组织*Klotho*基因的表达

Figure 2 The expression of *Klotho* gene

A: NYHA Ⅰ group; B: NYHA Ⅱ group; C: NYHA Ⅲ group. Compared with NYHA Ⅰ group, $^{*}P<0.05$; compared with NYHA Ⅱ group, $^{\#}P<0.05$

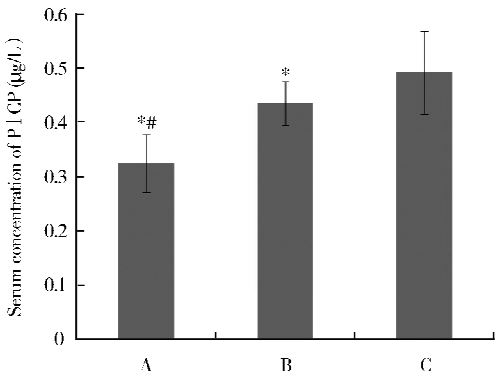


图3 不同心功能分级组血清PⅠCP浓度

Figure 3 Serum concentration of PⅠCP in different cardiac function groups

A: NYHA Ⅰ group; B: NYHA Ⅱ group; C: NYHA Ⅲ group. Compared with NYHA Ⅲ group, $^{*}P<0.05$; compared with NYHA Ⅱ group, $^{\#}P<0.05$

3 讨 论

心肌纤维化是指在心肌的组织结构中胶原纤维过量积聚，其浓度显著升高或容积分数显著增加。近年来大量研究表明，心肌纤维化可发生于高血压、心肌梗死及心力衰竭等许多心血管疾病。心肌损伤主要包括心肌细胞丢失、肥大以及间质胶原含量的改变[1,2]。已知的心脏胶原纤维主要有Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ5种，而Ⅰ、Ⅲ型胶原占90%以上（Ⅰ型约占

80%、Ⅲ型约占12%），而Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型胶原约占10%～12%[3]。Keene认为，Ⅰ型胶原有较大的硬度，有很强的张力，主要聚合成粗纤维网；Ⅲ型胶原有较大的伸展回弹力，形成细纤维网，两者共同维持胶原纤维网络的完整性，保证心脏的舒缩功能[4]。Ⅰ/Ⅲ型胶原的比值增加会导致心肌硬度增加，从而降低了心室的顺应性，使心室充盈受阻，室壁扩张，最终导致心力衰竭。肾素－血管紧张素－醛固酮系统是促进心肌间质重构的重要因素，肾素－血管紧张素－醛固酮系统在CHF病程中被激活[5,6]。心肌纤维化亦与心肌凋亡有关，内质网应激诱发的细胞凋亡与CHOP和Caspase-12有关，CHOP是内质网应激相关蛋白，是转录因子家族C/EBP成员，在正常情况下表达极低，而当内质网发生应激时其表达显著被诱导并参与下游细胞凋亡相关基因的表达[7]。Caspase-12的激活能启动细胞的凋亡程序，Caspase-12是内质网的组成蛋白，在内质网应激时能经过特定位点的剪切激活诱发细胞凋亡，因此，Caspase-12是内质网凋亡的信号分子[8]。寻求逆转上述病理改变的关键分子对于降低老年心血管疾病的发病率及猝死率具有重要意义。

Klotho蛋白是新近发现的具有抗衰老作用的蛋白，通过膜结合型和分泌型两种形式发挥生物学效应。基于前期研究及文献报道，我们推测*Klotho*基因可能具有心血管保护作用，包括：（1）Klotho蛋白具有抗氧化应激作用，而氧化应激也参与了心室重构；（2）Klotho蛋白可通过增加一氧化氮生物活性或激活血管内皮钙离子通道起到维持血管内皮完整性及其功能的作用；（3）Klotho蛋白具有降压作用；（4）Klotho蛋白抑制内皮细胞的凋亡和炎症反应。

在人群为基础的相关研究中，*Klotho*基因也和一些衰老表型相关，例如骨量的减少、骨质疏松、动脉硬化和钙代谢异常[9]。Hu等[10]发现Klotho蛋白浓度是预测社区中老年人死亡率的独立因子。*Klotho*基因和insulin/IGF-1衰老信号通路相关，可能通过抵抗氧化应激而延迟衰老[11]。

本研究中，在手术的应激状态下，各个心功能分级组中*Klotho*基因均表达，但相对表达量在3个不同的心功能分级组中有所不同，且差异有统计学意义；两两比较结果发现，NYHAⅠ级组高于Ⅱ级、Ⅲ级组（均$P<0.05$），NYHAⅡ级组高于Ⅲ级组（$P<0.05$）。ELISA法测定各NYHA分级组血清中PⅠCP含量的结果表明，PⅠCP含量在组间差异有统计学意义（$P<0.05$）；两两比较结果发现，NYHAⅢ级组高于Ⅱ级和Ⅰ级组（均$P<0.05$），NYHAⅡ级组高于Ⅰ级组（$P<0.05$）。HE染色显示，正常心肌细胞短柱状，细胞核呈椭圆形、深染、染色质均匀，而CHF患者可见心肌弥漫性空泡样变，心肌间质广泛纤维化。随着CHF患者心室重构的发生、心功能的逐渐恶化，*Klotho*基因表达量逐渐减少，提示心功能愈差的患者Klotho分泌愈少，而心肌纤维化指标PⅠCP含量逐渐增多。HE染色可见CHF患者心肌间质广泛纤维化，说明随着心功能的恶化，Klotho蛋白分泌愈少，其抗氧化及内质网应激作用越弱，抗心肌细胞凋亡、炎症反应能力越弱，其对心肌的保护作用也逐渐减弱。

本研究提示我们，*Klotho*基因作为抗衰老基因，亦对心血管具有保护作用。通过增加*Klotho*基因表达，延缓胶原的折叠和合成，从而延缓心肌纤维化进程，阻断CHF病情进展，这个新思路对防治CHF有着举足轻重的作用。

【参考文献】

[1] Zou XJ, Yang L, Yao SL, *et al*. Endoplasmic reticulum stress and C/EBP homologous protein-induced Bax translocaion are in angiotenin Ⅱ-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2012, 237(11): 1341－1349.

[2] Zhao H, Liao Y, Minamino T, *et al*. Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress[J]. Hypertens Res, 2008, 31(10): 1977－1987.

[3] Weber KT, Brilla CG. Pathological hepertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and rennin-angiotensin-aldosterone system[J]. Circulation, 1991, 83(6): 1849－1865.

[4] Keene DR, Sakai LY, Bachinger HP, *et al*. Type Ⅲ collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter[J]. Cell Biol, 1987, 105(5): 2393－2402.

[5] Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, *et al*. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications[J]. Arq Bras Cardiol, 2009, 92(2): 150－164.

[6] Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, *et al*. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(4): H1847－H1860.

[7] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress cell life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656－2664.

[8] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, *et al*. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. Nature, 2000, 403(6765): 98－103.

[9] Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, *et al*. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism[J]. Annu Rev Physiol, 2013, 75(1): 503－533.

[10] Hu MC, Shi M, Zhang J, *et al*. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1): 124－136.

[11] Semba RD, Cappola AR, Sun K, *et al*. Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2011, 66(7): 794－800.

（编辑：周宇红）