

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2022.04.012

Klotho 基因在不典型膜性肾病患者中的表达意义及对 OPN 水平、血栓弹力图的影响^①

赵翠, 贾利敏, 王自强, 房晓芳, 魏迪, 郭铁标, 陈保春

沧州市人民医院 医专肿瘤院区, 肾病内科, 河北 沧州 061000

摘要: 探讨 *Klotho* 基因在不典型膜性肾病患者中的表达意义及对血清骨桥蛋白(OPN)水平、血栓弹力图的影响。设 2018 年 1 月至 2020 年 1 月沧州市人民医院医专肿瘤院区肾内科收治的 100 例肾穿刺活检标本诊断为不典型膜性肾病患者为观察组, 同时纳入 30 例尸解未出现明显肾脏病变的肾组织标本为对照组, 使用免疫组织化学法对两组患者标本进行免疫组化染色, 比较两组 *Klotho* 基因 mRNA 表达情况。同时依据 *Klotho* 基因 mRNA 表达阳性细胞数及染色强度将观察组分为阳性组和阴性组, 比较两组患者 OPN 血栓弹力图的检测结果。对照组患者 *Klotho* 基因及 mRNA 表达较微弱, 肾小球内 *Klotho* 基因 mRNA 未见阳性表达。观察组患者 *Klotho* 基因 mRNA 表达呈强阳性, 与对照组相比差异有统计学意义($p < 0.05$)。阳性组有 82 例, 阴性组有 18 例。阳性组 OPN 表达水平远高于阴性组, 组间数据相比差异有统计学意义($p < 0.05$)。阳性组凝血指数、最大血栓弹力度、凝固角显著高于阴性组, 凝血时间显著低于阴性组, 组间数据相比差异有统计学意义($p < 0.05$)。*Klotho* 基因 mRNA 表达水平在不典型膜性肾病患者中显著升高, 且对患者 OPN 水平、血液凝固状态有一定影响。

关键词: *Klotho* 基因; mRNA 表达; 不典型膜性肾病; 血清骨桥蛋白; 血栓弹力图

中图分类号: R365

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2022)04-0082-05

Significance of *Klotho* Gene Expression in Patients with Atypical Membranous Nephropathy and its Effect on OPN Level and Thromboelastogram

ZHAO Cui, JIA Limin, WANG Ziqiang,
FANG Xiaofang, WEI Di, GUO Tiebiao, CHEN Baochun

Department of Nephrology, Cancer Hospital of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou Hebei 061000, China

Abstract: Studies have been done to investigate the significance of *Klotho* Gene Expression in patients with atypical membranous nephropathy and its effect on OPN level and thromboelastogram. From January 2018 to January 2020, 100 patients with atypical membranous nephropathy diagnosed by renal biopsy were collected as the observation group. At the same time, 30 renal tissue samples without obvious renal lesions were included as the control group. The samples of the two groups were immunohistochemical stained by immunohistochemical method, *Klotho* Gene mRNA expression was compared between the two groups. At

① 收稿日期: 2021-05-02

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划项目(20211480); 沧州市重点研发计划指导项目(172302122)。

作者简介: 赵翠, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肾脏病的研究。

通信作者: 贾利敏, 副主任医师。

the same time, the observation group was divided into positive group and negative group according to the number of *Klotho* Gene mRNA positive cells and staining intensity. The results of OPN thromboelastogram were compared between the two groups. The expression of *Klotho* Gene and mRNA in the control group was weak, and there was no positive expression of *Klotho* Gene mRNA in glomerulus. The expression of *Klotho* Gene mRNA in the observation group was strongly positive, which was statistically significant compared with the control group ($p < 0.05$). There were 82 cases in the positive group and 18 cases in the negative group. The expression level of OPN in the positive group was much higher than that in the negative group, and there was significant difference between the two groups ($p < 0.05$). The coagulation index, maximum thrombus elasticity and coagulation angle in the positive group were significantly higher than those in the negative group, and the coagulation time was significantly lower than that in the negative group. There was significant difference between the groups ($p < 0.05$). The expression level of *Klotho* Gene mRNA is significantly increased in patients with atypical membranous nephropathy, and has a certain effect on OPN level and blood coagulation state.

Key words: *Klotho* Gene; mRNA expression; atypical membranous nephropathy; serum osteopontin; thromboelastography

膜性肾病依据发病机制可分为不典型膜性肾病、原发性膜性肾病、继发性膜性肾病等,临床表现为肾病综合征(大量蛋白尿、低蛋白血症、高度水肿、高脂血症),或无症状、非肾病范围的蛋白尿,病程中可出现肾功能不全、高血压等。不典型膜性肾病是指病因不明确的膜性肾病,且患者患病率明显升高^[1]。*Klotho* 基因是一种与衰老有关的基因,研究显示其与肿瘤细胞生长、转移、凋亡等均有一定关系,但其对肾病患者的作用机制尚不清楚^[2]。血清骨桥蛋白(OPN)可由人体内多种细胞合成分泌,可积极调节机体器官组织的发育^[3]。此外,肾病综合征患者常见血液高凝状态,血栓弹力图指标可准确检测患者凝血因素异常情况^[4]。本研究利用免疫组织化学法对 *Klotho* 基因 mRNA 表达情况进行检测,并探讨其对患者 OPN、血栓弹力图的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

设 2018 年 1 月至 2020 年 1 月沧州市人民医院医专肿瘤院区肾内科收治的 100 例肾穿刺活检标本诊断为不典型膜性肾病患者为观察组,同时纳入 30 例尸解未出现明显肾脏病变的肾组织标本为对照组。观察组标本经福尔马林固定,行石蜡包埋切片;对照组标本经 2.5% 戊二醛进行固定,使用 Epon 包埋。本研究已获沧州市人民医院伦理委员会通过(伦批 2017025)。

1.2 方法

1.2.1 染色

Klotho 免疫组化染色试剂盒购自赛默飞世尔,对照组使用 PBS 溶液代替一抗。严格按照说明书进行染色:①脱蜡至水;②使用蒸馏水配制 3% 甲醇过氧化氢(H_2O_2) 20 mL,并使用蒸馏水洗 3 次;③使用微波抗原修复;④滴加兔抗人一抗,4 °C 下过夜,使用 PBS 溶液洗 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温下反应 1 h,使用 PBS 溶液洗 3 次;⑤滴加 SABC 复合物,室温下反应 1 h;⑥加入 DAB 试剂,使用苏木素复染,脱水封片。

Klotho 基因 mRNA 原位杂交试剂盒购自赛默飞世尔,严格按照说明书进行操作:①石蜡切片后经酒精脱蜡入水,加入 3% H_2O_2 室温下反应 10 min,使用蒸馏水洗 2 次;②滴加 3% 柠檬酸 1 mL 及 2 滴浓缩胃蛋白酶,于 37 °C 下反应 15 min,使用 PBS 溶液进行清洗,共 3 次,5 min/次,蒸馏水清洗 1 次;③滴加预杂交液,于 37 °C 下反应 3 h,滴加杂交液,于 37 °C 下反应过夜,使用 SSC 进行清洗;④于 37 °C 下滴加封闭液,30 min 后甩去多余液体,并滴加 SABC 溶液,37 °C 下反应 30 min,使用 PBS 溶液洗 4 次,5 min/次;⑤滴加生物素化过氧化物酶,37 °C 下反应 30 min,使用 PBS 溶液清洗 4 次,5 min/次;⑥DAB 显色 10 min,加入苏木素复染,脱水封片。

1.2.2 图像分析

对两组患者免疫组化染色切片及杂交染色切片进行检测,检测范围为肾小管及肾小球。每张切片随机

选取 3~5 个肾小球,并选取 3 个视野进行检测,分别检测肾小球及肾小管的吸光度值,并以平均值进行计算.

1.2.3 分组

根据观察组细胞染色强度与阳性细胞比例进行计分,染色强度可以分为 0~3 分,0 分为阴性;1 分为淡黄色颗粒;2 分为棕黄色颗粒;3 分为褐色颗粒.阳性细胞水平评分:0 分:阳性细胞 $R \leq 5\%$;1 分: $5\% < R \leq 25\%$;2 分: $25\% < R \leq 50\%$;3 分: $50\% < R \leq 75\%$;4 分: $R > 75\%$.将两项分数相乘得到分组标准,将乘积 $M \leq 4$ 分记为阴性组,其余记为阳性组.

1.2.4 OPN 水平及血栓弹力图

使用 3% H_2O_2 10 mL,高压锅抗原修复 3~5 min,使用 4 °C 一抗孵育过夜,加入二抗进行 37 °C 孵育 15 min,加入氧化物酶液-链霉素抗生物素进行 37 °C 孵育 15 min.加入 DAB 显色,使用苏木素染色 1 min,加入 0.5%~1.0% 盐酸乙醇进行分化,脱水封片.

使用 WITEYE T10000 血栓弹力图分析仪(武汉中科和信生物技术有限公司)检测阴性组、阳性组血栓弹力,检测指标包括凝血时间、凝血指数、最大血栓弹力度、凝固角.

1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0 统计学软件对患者数据进行分析,计数资料使用 χ^2 检验,用例数 n 和 % 表示;计量资料使用 t 检验,用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组 Klotho 基因蛋白量比较

对照组肾小管上皮细胞仅为微弱阳性反应,阳性颗粒仅见于肾小管上皮细胞胞浆内;肾小球为阴性反应,肾小球间质内未见明显阳性反应.观察组患者 Klotho 基因呈强阳性表达,与对照组相比,差异有统计学意义($p < 0.05$),见表 1.

表 1 两组 Klotho 基因蛋白量比较

组别	例数	肾小球	肾小管
对照组	30	0.07 ± 0.02	0.11 ± 0.03
观察组	100	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.05
t	/	7.909	6.234
p	/	0.000	0.000

2.2 两组 Klotho 基因 mRNA 原位杂交染色比较

对照组肾小球未见 Klotho 基因 mRNA 阳性表达,肾小管见极弱阳性表达.观察组肾小管上皮细胞呈强阳性表达($p < 0.05$),肾小球与对照组相比差异无统计学意义($p > 0.05$),见表 2.

表 2 两组 Klotho 基因 mRNA 原位杂交染色比较

组别	例数	肾小球	肾小管
对照组	30	0.10 ± 0.04	0.08 ± 0.03
观察组	100	0.12 ± 0.06	0.16 ± 0.06
t	/	1.713	7.030
p	/	0.089	0.000

2.3 阴性组及阳性组 OPN 蛋白表达情况比较

阳性组有 82 例,阴性组有 18 例.OPN 主要在血管内皮、血管平滑肌、肾小管粘膜上皮等上表达.阳性组 OPN 蛋白表达水平远高于阴性组,组间数据相比差异有统计学意义($p < 0.05$),见表 3.

表 3 阴性组及阳性组 OPN 蛋白表达情况比较

组别	例数	肾小球	肾小管
阴性组	18	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.05
阳性组	82	0.34 ± 0.09	0.46 ± 0.12
t	/	8.819	11.415
p	/	0.000	0.000

2.4 阴性组及阳性组血栓弹力图检测结果比较

阳性组凝血指数、最大血栓弹力度、凝固角显著高于阴性组,凝血时间显著低于阴性组,组间数据相比差异有统计学意义($p < 0.05$),见表4。

表4 阴性组及阳性组血栓弹力图检测结果比较

组别	例数	凝血时间/min	凝血指数	最大血栓弹力度/mm	凝固角/°
阴性组	18	1.85±0.42	0.12±1.06	56.04±3.28	58.39±3.28
阳性组	82	1.21±0.35	2.01±0.82	71.26±5.25	69.30±5.26
<i>t</i>	/	6.772	8.381	11.778	8.428
<i>p</i>	/	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

不典型膜性肾病常为隐匿起病,患者主要病理表现为肾小球基底膜增厚伴有上皮细胞下免疫复合物沉积,主要表现为高血压、肾功能不全等。患者常处于血液高凝状态,因此血栓栓塞是其常见并发症^[5-6]。目前临床上发现不典型膜性肾病患者治疗效果较差,因此积极探索其发病机制及临床生理特点是研究的重点所在。

本研究共收集100例不典型膜性肾病患者肾穿刺活检标本,并对其 *Klotho* 基因进行研究。*Klotho* 基因是一种与衰老有关的基因,有研究指出,小鼠缺乏 *Klotho* 基因后会出现骨质疏松、肺气肿、动脉硬化等综合征^[7]。李莉等^[8]研究指出,大鼠心、肾组织 *Klotho* 基因表达水平降低,会影响其内皮功能,从而影响肾脏功能。邹新蓉等^[9]研究发现,大鼠肾损害氧化应激反应与 *Klotho* 基因水平有关,通过使用抗氧化药物可有效上调 *Klotho* 基因的表达水平,从而减轻大鼠的临床症状。同时,许多研究结果发现, *Klotho* 基因蛋白表达水平升高时可保护肾脏^[10]。邵齐等^[11]在培养的肾小球细胞中加入 *Klotho* 基因后,发现上皮细胞合成纤维连接蛋白明显增多,提示 *Klotho* 基因可刺激肾小球上皮细胞合成细胞外基质。本研究结果显示,对照组肾小管上皮细胞仅为微弱阳性反应,阳性颗粒仅见于肾小管上皮细胞胞浆内,肾小球为阴性反应,肾小球间质内未见明显阳性反应,观察组患者 *Klotho* 基因 mRNA 表达呈强阳性($p < 0.05$)。此外, *Klotho* 基因蛋白表达不仅在肾小球,同时在肾小管上皮细胞胞浆内也有表达,提示 *Klotho* 基因对肾小管、肾小球均有一定影响^[12]。同时,本研究结果显示 *Klotho* 基因 mRNA 表达水平在肾小管内表达水平较肾小球内更明显,与王健富等^[13]研究结果一致。有研究表明^[14],对肾病患者肾脏中 *Klotho* 基因 mRNA 表达水平检测中发现, mRNA 表达水平主要分布于人肾小管及集合管上皮细胞内,且阳性信号高于肾小球。本研究结果提示患者出现肾小管的改变可能对肾间质纤维化起到重要作用。董照瀛等^[15]研究发现自发性高血压大鼠体内 *Klotho* 基因 mRNA 表达水平上调,可导致大鼠心肌胶原纤维化水平、心肌细胞厚度、高血压肾损害明显减少,提示 *Klotho* 基因还可减缓心脏损害。

OPN 是一种位于常染色体上的蛋白质,且存在于人体内不同组织及不同细胞中。邢艳阳等^[16]指出, OPN 表达受到雌激素及孕酮的影响。庞春艳等^[17]指出,表皮生长因子可通过特定的信号途径调控 OPN mRNA 表达。OPN 主要通过依赖特定序列与细胞表面特异受体进行结合,从而直接或间接促进淋巴细胞、巨噬细胞的趋化作用,从而诱导巨噬细胞分化 IL-12 等。黄雨茅等^[18]通过建立不典型膜性肾病模型发现, OPN 在肾小管间质受损区域表达上调,同时有大量巨噬细胞浸润。孔繁达等^[19]通过动物研究证实,肾小管间质中 OPN 表达增加可促进巨噬细胞浸润,从而加快肾小管损伤,加重体内炎症反应。本研究根据 *Klotho* 基因 mRNA 阳性细胞数及染色强度将观察组分为阳性组(82例)和阴性组(18例),结果显示 OPN 主要表达于血管内皮、血管平滑肌、肾小管粘膜上皮等,阳性组 OPN 蛋白表达水平远高于阴性组($p < 0.05$)。此外,有研究^[20]指出, OPN 水平与肿瘤的转移与发展有重要关系, OPN 在肾脏肿瘤患者中表达明显增加,但 OPN 与肾脏肿瘤患者中的表达水平尚无足够临床研究。但刘明等^[21]指出, OPN 与 MMP-2 因子的表达有一定关系,且对肿瘤良恶性有一定指征反应,因此可使用 OPN 水平初步对肾脏肿瘤患者进行筛选等。

肾病综合征患者常见血液高凝,因此临床上常使用血栓弹力图对血凝状态进行检测,从而动态评估血液凝块、纤维蛋白的形成,并积极反应血凝块的动态变化^[22]。本研究显示,阳性组凝血指数、最大血栓弹力度、凝固角显著高于阴性组,凝血时间显著低于阴性组($p < 0.05$),提示 *Klotho* 基因阳性表达组患者凝血状态较阴性组异常程度更高。血管内皮细胞在受损状态下会合成并分泌一种叫内皮素的物质,从而产生强烈的缩血管反应,引起动脉收缩、肾功能受损、高凝状态等,而 *Klotho* 基因 mRNA 此时在肾的表达减少,

而内皮素蛋白表达增加,从而加剧了病情的发展^[23-24].

本研究由于条件有限,样本数较小,同时观察组患者进行肾穿刺活检时可能由于时机不同对结果产生了一定的影响.因此,进一步研究还需加强对患者的随访,密切关注患者 *Klotho* 基因表达情况与治疗效果的关系,从而增加对疾病机制的认知,改善患者预后效果.综上所述,*Klotho* 基因 mRNA 表达水平在不典型膜性肾病患者中显著升高,且会升高患者 OPN 水平,并影响血液凝固状态.

参考文献:

- [1] 孙丽君,董鸿瑞,王惠,等.不典型膜性肾病病理特点的诊断价值评估[J].中华肾脏病杂志,2019,35(6):401-406.
- [2] KIMURA T, SHIZAKI K, AKIMOTO T, et al. The Impact of Preserved *Klotho* Gene Expression on Antioxidative Stress Activity in Healthy Kidney [J]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2018, 315(2): 345-352.
- [3] 夏煜琦,程帆,袁润,等.骨桥蛋白与肾结石形成机制的研究进展[J].中国医药导报,2018,15(1):45-48.
- [4] 贾利敏.不典型膜性肾病患者血栓弹力图与常规凝血试验相关性分析[J].陕西医学杂志,2018,47(12):1528-1531.
- [5] 高良云,裘怡,程晓霞.抗核抗体阳性的不典型膜性肾病与 V 型狼疮性肾炎的临床与病理比较[J].中国中西医结合肾病杂志,2018,19(1):55-57.
- [6] 王自强,贾利敏,赵翠.血栓弹力图评价阿魏酸哌嗪联合阿司匹林对不典型膜性肾病抗凝治疗的效果研究[J].陕西医学杂志,2019,48(9):1178-1181.
- [7] 倪文慧,张颖,田雨,等.*Klotho* 基因过表达对小鼠急性肾损伤肾脏血管内皮生长因子表达的影响[J].中国血液净化,2018,17(5):293-298.
- [8] 李莉,杨敏,何华琼,等.冬虫夏草菌粉对肾缺血-再灌注损伤大鼠 *Klotho* 基因和免疫调节的影响[J].中国中医急症,2016,25(7):1290-1292,1311.
- [9] 邹新蓉,王小琴,王长江.*Klotho* 基因在残余肾模型大鼠肾脏的表达及淫羊藿、黄芪、大黄复方的干预作用研究[J].华南国防医学杂志,2015,29(3):196-200.
- [10] 李杨,黄邓高,郑琳麟,等.*Klotho* 基因 G-395A 位点多态性与糖尿病肾病的关系[J].山东医药,2018,58(36):5-8.
- [11] 邵齐,马沛莉,杜恒,等.*Klotho* 基因多态性与新疆地区维吾尔族特发性草酸钙肾结石的相关性研究[J].临床泌尿外科杂志,2018,33(12):958-961.
- [12] 李莎莎,郁丽霞,何敖林,等.分泌型 *Klotho* 作为慢性肾脏病患者血清学标志物的可行性研究进展[J].中华肾脏病杂志,2018,34(12):956-960.
- [13] 王健富,邓庚国,朱春丽,等.高龄供者血清 *Klotho* 水平预测受者术后移植肾功能状态的临床研究[J].器官移植,2019,10(4):439-442.
- [14] 杨园园,姜红,李维.*Klotho* 蛋白抗肾间质纤维化作用的研究进展[J].国际儿科学杂志,2019,46(12):919-922.
- [15] 董照瀛,周晓莉.*Klotho* 缺乏致小鼠自发性血压升高的初步机制[J].第三军医大学学报,2020,42(4):401-406.
- [16] 邢艳阳,李中南,邢宇婷,等.中药健脾方对糖尿病大鼠肾组织骨桥蛋白及肾脏病理的影响[J].中国临床保健杂志,2018,21(2):225-229.
- [17] 庞春艳,张伟,刘媛,等.靶向骨桥蛋白的小干扰 RNA 对 MRL/Lpr 小鼠狼疮肾炎的治疗作用[J].免疫学杂志,2018,34(5):393-400.
- [18] 黄雨茅,金伟敏,郑戈,等.血清骨桥蛋白对极低出生体重儿急性肾损伤早期诊断和预后的价值[J].浙江医学,2019,41(12):1264-1268.
- [19] 孔繁达,张艳,朱爱松,等.基于“肾藏精起亟”理论观察补肾活血中药对慢性心力衰竭大鼠骨桥蛋白影响[J].中华中医药杂志,2018,33(12):5373-5376.
- [20] 银锡靖,覃诗婷,杨柯.骨桥蛋白在肾纤维化不同阶段中的作用研究进展[J].山东医药,2018,58(7):105-107.
- [21] 刘明,郭满,张浩,等.血管生成拟态及骨桥蛋白和基质金属蛋白酶 2 在三阴性乳腺癌组织中的表达及意义[J].新乡医学院学报,2019,36(4):345-349.
- [22] 崔金艳,李洁.雷公藤多苷片联合小剂量他克莫司及糖皮质激素治疗特发性膜性肾病患者疗效及对血栓弹力图影响[J].现代中西医结合杂志,2020,29(5):481-484.
- [23] 金钦阳,朱勤,叶羨云,等.血栓弹力图在糖尿病肾病维持性血液透析患者抗血小板药物反应性中的评估价值[J].中国医药导报,2020,17(4):94-97.
- [24] 魏明,张素娟,宋毓青,等.血栓弹力图在急性心肌梗死合并慢性肾脏病患者凝血功能评价中的作用[J].中国医药,2018,13(10):1465-1468.