

老年冠心病患者血浆 Klotho 水平测定的临床意义

刘 玮, 张韶英, 徐慧敏, 管斯斯

(武汉市中心医院老年科, 湖北省武汉市 430014)

[关键词] Klotho 基因; 冠状动脉狭窄; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨老年冠心病患者血浆 Klotho 蛋白测定的临床意义。**方法** 随机选取 60 岁以上的老年住院患者, 根据冠状动脉造影或冠状动脉 CTA 结果分为冠心病组 138 例(根据病变冠状动脉数目又分为单支病变组和多支病变组两个亚组)和对照组(140 例), 分别对各组进行血浆 Klotho 蛋白检测, 并对冠心病组患者的冠状动脉狭窄程度与其血浆 Klotho 蛋白水平进行相关性分析。**结果** 冠心病组患者血浆 Klotho 蛋白水平显著低于对照组, 多支病变组患者血清 Klotho 蛋白水平低于单支病变组。冠心病组患者的冠状动脉狭窄程度与血浆 Klotho 蛋白水平呈负相关。**结论** 血浆 Klotho 蛋白水平一定程度上可以反映冠状动脉狭窄程度, 其可以作为评价冠状动脉狭窄程度的指标之一。

[中图分类号] R543.3

[文献标识码] A

Clinical Significance of Plasma Klotho Protein in Senile Patients with Coronary Artery Disease

LIU Wei, ZHANG Shao-Ying, XU Hui-Min, and GUAN Si-Si

(Department of Geriatrics, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430014, China)

[KEY WORDS] Klotho; Coronary Artery Stenosis; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between coronary artery disease (CAD) and the level of plasma Klotho protein in the aged. **Methods** A total of 138 patients over 60 years old with CAD (experiment group) were enrolled, including 65 cases of single vessel lesion, 73 cases of multivessels lesion. And a total of 140 controls above 60 years old without CAD were chosen. The levels of plasma Klotho protein were detected and compared between the two groups. The degree of coronary artery stenosis were assessed by Gensini scores. The correlation between coronary artery stenosis degree and the level of plasma Klotho protein was analyzed simultaneously. **Results** The level of plasma Klotho protein in experiment group was lower than that in control group. Moreover, the level of plasma Klotho protein in multivessels lesion group was lower than that in single vessel lesion group. The coronary artery stenosis degree was negatively correlated with the level of plasma Klotho protein. **Conclusion** The level of plasma Klotho protein may reflect the degree of coronary stenosis and could be used as an index to estimate the coronary artery stenosis degree.

Klotho 基因是一种与衰老密切相关的新基因, 最早于 1997 年被发现^[1]。Klotho 基因缺陷型小鼠出现类似于人类衰老的各种表型变化, 如寿命缩短、骨质疏松、动脉硬化、皮肤肌肉萎缩、软组织钙化、听力下降、糖和能量代谢异常等^[2]; Klotho 基因的过度表达, 可抑制细胞衰老, 预防衰老相关性疾病如动脉粥样硬化等的发生, 使小鼠的寿命延长

19% ~ 31%^[3]。冠状动脉造影和冠状动脉 CT 血管造影(冠状动脉 CTA)是目前诊断冠心病的最直接的金标准和应用最广泛的诊疗手段。本研究根据冠状动脉造影和(或)冠状动脉 CTA 结果对 60 岁以上的老年患者进行分组, 检测其血浆 Klotho 蛋白水平, 以探讨老年患者冠状动脉粥样硬化性心脏病与血浆 Klotho 蛋白之间的关系。

[收稿日期] 2014-04-01

[修回日期] 2014-06-01

[基金项目] 武汉市科技局资助课题(201260523187-4)

[作者简介] 刘玮, 博士, 主治医师, 主要从事衰老及动脉粥样硬化机制研究。通讯作者张韶英, 主任医师, 主要从事衰老及动脉粥样硬化机制研究, E-mail 为 5622788@qq.com。

1 对象与方法

1.1 临床资料

研究对象来自 2012 年 3 月至 2012 年 11 月武汉市中心医院老年科, 随机选取年龄 ≥ 60 岁的老年住院患者 278 例(男 136 例, 女 142 例, 年龄 60 ~ 97 岁)。所有入选患者均经过询问病史, 测量血压、体质指数, 行心电图、超声心动图以及相关实验室检查等。并排除急慢性肝肾疾病、脑血管病、周围血管性疾病、肿瘤等。

1.2 病例分组

根据冠状动脉造影结果和(或)冠状动脉 CTA 结果分为冠心病组 138 例和对照组 140 例。冠心病诊断标准(Judkin's 方法): 根据 1975 年美国心脏病学会分段分类标准将冠状动脉进行分段, 至少在两个 X 线投影位置均能看到冠状动脉分支、段狭窄 $\geq 50\%$ 的即可诊断为冠心病。根据病变冠状动脉数量又分为单支病变组和多支病变组(两支及以上)。

1.3 冠状动脉狭窄程度评价

采用 Gensini 评分法^[4]。分为两个部分: ①冠状动脉病变部位评分: 左冠状动脉主干为 5 分, 前降支、回旋支近段为 2.5 分, 前降支中段为 1.5 分, 心尖支、钝缘支、远段、后降支、第一对角支各 1 分, 第二对角支和后侧支为 0.5 分, 右冠状动脉近段、中段、远段、后降支各 1 分。②冠状动脉狭窄程度评分: 将冠状动脉狭窄程度为 25%、50%、75%、90%、99%、100% 的分别记 1、2、3、8、16、32 分; 将两部分评分的乘积作为该病变的冠状动脉狭窄程度评分。多处病变者将各病变处的评分累计。

1.4 一般资料的记录

①每天吸烟 1 支以上, 吸烟时间 > 1 年的记录为有吸烟史; ②体质指数(BMI) = 体重/身高² (kg/m²); ③已接受降压药物治疗, 或者非同日两次测量收缩压 ≥ 140 mmHg 或舒张压 ≥ 90 mmHg 记录为高血压; ④已接受降糖药物治疗, 或者空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或餐后血糖 ≥ 11.1 mmol/L 记录为糖尿病; ⑤已接受降脂药物治疗, 或者总胆固醇 > 5.7 mmol/L 或甘油三酯 > 2.3 mmol/L 或低密度脂蛋白 > 3.7 mmol/L 记录为高血脂。

1.5 血浆 Klotho 蛋白检测^[5]

清晨采集各组患者的空腹肘静脉血 3 ~ 5 mL, 于 2 kr/min 条件下离心 10 min, 吸取上清液(血浆)于 -80°C 冰箱保存待测。将上诉血浆按 1:10 稀释后加入 96 孔板中, 每孔加入 0.1 mL, 静置过夜, 次

日弃去孔内液体, 用加入吐温 -20 的 PBS 洗涤 5 次。每孔加入用牛血清白蛋白稀释(1:12 500)的抗血浆 Klotho 蛋白抗体(英国 Abcam, ab76356) 0.1 mL, 37°C 孵育 1 h, 弃去液体, 用加入吐温 -20 的 PBS 洗涤 5 次。然后加入牛血清白蛋白稀释(1:2 000)的二抗抗体, 每孔 0.1 mL, 37°C 孵育 1 h, 弃去液体, 用加入吐温 -20 的 PBS 洗涤 5 次。每孔加入 TBM 显色剂 0.1 mL, 37°C 孵育 30 min, 终止液终止反应。于美国产酶标仪中测量读数。所有值至少重复检测 3 次。

1.6 统计分析

采用 SPSS18.0 统计软件进行分析, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 两变量之间的相关关系采用直线相关分析; 两组间均数的比较采用 *t* 检验, 多组间均数的比较采用 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠心病组与对照组临床资料分析

两研究组年龄、舒张压(DBP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、体质指数(BMI)差异无显著性; 冠心病组空腹血糖(FPG)、收缩压(SBP)、低密度脂蛋白(LDL)水平、男性及吸烟比例明显高于对照组, 而高密度脂蛋白(HDL)水平明显低于对照组(表 1)。

表 1. 两组基本资料比较

Table 1. The comparison of general characteristics between two groups

指 标	冠心病组 (<i>n</i> = 138)	对照组 (<i>n</i> = 140)
年龄(岁)	75.47 \pm 6.45	78.43 \pm 7.31
男性	72.38% ^a	63.56%
吸烟史	52.46%	36.35%
SBP(mmHg)	137.71 \pm 8.45 ^a	112.58 \pm 7.21
DBP(mmHg)	62.57 \pm 5.18	63.65 \pm 7.47
TC(mmol/L)	4.67 \pm 0.58	4.56 \pm 0.47
TG(mmol/L)	1.78 \pm 0.26	1.58 \pm 0.35
LDL(mmol/L)	2.88 \pm 0.41 ^a	2.04 \pm 0.32
HDL(mmol/L)	1.11 \pm 0.18 ^a	1.58 \pm 0.29
BMI(kg/m ²)	25.14 \pm 3.02	24.48 \pm 2.26
空腹血糖(mmol/L)	6.88 \pm 0.63 ^a	5.17 \pm 0.76

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 冠心病组与对照组血浆 Klotho 水平比较

与对照组相比,冠心病组患者的血浆 Klotho 蛋白吸光度值明显降低($P < 0.05$)。其中,多支病变组患者的血浆 Klotho 蛋白吸光度值低于单支病变组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2. 冠心病组及对照组血浆 Klotho 水平

Table 2. Comparison of Klotho protein expression between CAD group and control group

分 组	n	Klotho(A _{450 nm})
冠心病组	138	0.24 ± 0.08 ^a
单支病变组	65	0.28 ± 0.07
多支病变组	73	0.20 ± 0.06 ^b
对照组	140	0.39 ± 0.09

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与单支病变组比较。

2.3 冠状动脉狭窄程度与 Klotho 水平相关性

138 例冠心病患者按病变冠状动脉的狭窄程度与血浆 Klotho 蛋白吸光度值进行 Pearson 相关性分析,结果提示 Klotho 的吸光度值随冠状动脉狭窄程度增加而降低,两者存在负相关($r = -0.8884$, $P < 0.05$;图 1)。

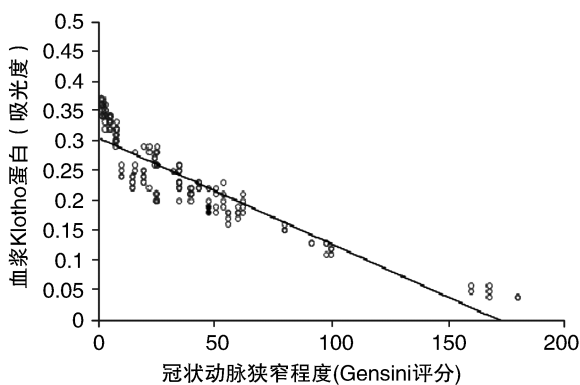


图 1. 冠状动脉狭窄程度与 Klotho 水平之间的相关关系

Figure 1. The correlation between degree of coronary artery stenosis and the level of plasma Klotho protein

3 讨 论

临床研究证实,早期正确评估冠状动脉粥样硬化的严重程度对于冠状动脉血运重建策略的选择,改善患者预后有着重要的帮助。目前冠状动脉造影仍是确切评价冠状动脉粥样硬化严重程度的金标准。近年来,多排螺旋 CT 下冠状动脉成像,即冠状动脉 CTA 也被认为是一种较可靠的评价冠状动

脉狭窄的诊断方法^[6,7]。但由于冠状动脉造影的有创性使其应用受到限制,冠状动脉 CTA 也由于其放射性损伤以及造影剂引起的肾功能损害受到某些患者特别是老年患者的排斥。因此,寻求简便无创的诊断方法成为临床研究的重要方向,目前也已经发现一些预测冠状动脉狭窄的指标,如血压变异性等^[8]。

人类的 Klotho 基因可通过不同的选择性拼接产生两种蛋白产物:膜型 Klotho 蛋白和分泌型 Klotho 蛋白。分泌型 Klotho 可作为一种内循环因子或激素,通过抑制细胞内胰岛素/胰岛素样生长因子 1 (insulin/IGF-1) 信号通路发挥其生物学作用^[9,10]。研究发现,Klotho 基因对抑制动脉粥样硬化进程有重要作用。Klotho 基因缺陷的小鼠在 4 周龄就开始出现动脉粥样硬化征象,并随着增龄而逐渐加重。将外源性 Klotho 转入 Klotho 基因缺陷的小鼠体内后,其动脉粥样硬化程度可得到显著改善^[11]。而且,体外转染 Klotho 基因可减轻大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤^[12]。Junsuke 等^[13]将含有 Klotho 基因的质粒转入小鼠体内后,发现小鼠血浆、肝脏、肾脏内的超氧化物歧化酶活性明显增加,脂质过氧化物的含量明显减少,而且血浆中 NO 含量也增加,认为 Klotho 可通过调节体内氧化应激改善内皮细胞功能障碍。

本研究发现,冠心病组血清 Klotho 蛋白水平明显低于对照组,其中,多支病变组血浆 Klotho 蛋白水平低于单支病变组。进一步分析发现,冠心病组患者的血浆 Klotho 蛋白水平随着冠状动脉狭窄程度的加重而降低,即两者呈负相关。说明血浆 Klotho 蛋白可在一定程度上反映体内冠状动脉粥样硬化的程度。Klotho 蛋白作为抗衰老基因具有抑制动脉粥样硬化的作用。伴随着衰老的进程,血浆 Klotho 蛋白水平逐渐降低,冠状动脉因失去 Klotho 基因的保护作用而出现粥样硬化,这可能是老年患者易发生冠心病的重要原因之一。

本研究结果提示血浆 Klotho 蛋白水平在一定程度上可以反映冠状动脉狭窄程度,可以作为评价冠状动脉狭窄程度的指标之一,亦可用于冠心病的早期筛查。同时,研究如何提高血浆 Klotho 蛋白水平,有可能为冠心病的治疗提供新的靶点和方向。但由于本研究的样本量较少,上述结果还需要更深入和大样本的研究来进一步证实。

[参考文献]

[1] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the

- mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling aging [J]. *Nature*, 1997, 390 (6 655): 45-51.
- [2] Masuda H, Chikuda H, Suga T, et al. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible Klotho gene expression in Klotho mutant mice [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(12): 1 274-283.
- [3] Kurosu H, Yamamoto m, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho [J]. *Science*, 2005, 309 (5 742): 1 829-833.
- [4] Cesari F, Gori AM, Fedi S, et al. Modification of protein Z and interleukin-6 during the acute phase of coronary artery disease [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007, 18 (1): 85-86.
- [5] 苏显明, 杨伟, 何亚军, 等. 老年人缓慢窦性心律患者 Klotho 水平测定的临床意义[J]. *山西医科大学学报*, 2013, 44(1): 32-34.
- [6] 郝宝顺, 刘勇, 周彬, 等. 320 排动态容积 CT 冠状动脉成像诊断冠状动脉狭窄的价值[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(1): 74-78.
- [7] 周璐, 张兆琪, 于薇, 等. 320 排动态容积 CT 对冠状动脉狭窄的诊断价值[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(5): 445-448.
- [8] 吴琳, 余显冠, 徐龙昌, 等. 血压变异性与冠状动脉病变的相关性分析[J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41 (5): 474-478.
- [9] Torres PU, Pried, Moline-Bletry V, et al. Klotho: an anti-aging protein involved in mineral and vitamin D metabolism [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(8): 730-737.
- [10] Li S A, Watanabe M, Yamada H, et al. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice [J]. *Cell Struct Funct*, 2004, 29 (4): 91-99.
- [11] Masuda H, Chikuda H, Suga T, et al. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible Klotho gene expression in Klotho mutant mice [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126 (12): 1 274-283.
- [12] 李宝善, 马厚勋, 王艳娇, 等. 体外转染 Klotho 基因对 H9c2(2-1)大鼠心肌细胞缺血再灌注的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32 (5): 951-954.
- [13] Junsuke Ohta, Hiromi Rakugi, Kazuhiko Ishikawa, et al. Klotho gene delivery suppresses oxidative stress in vivo [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2007, 7 (3): 293-299.
- (此文编辑 李小玲)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊计量单位的使用

本刊使用下列计量单位(各类单位中,第一个单位为基本单位):

- ①长度:m, cm, mm, μm , nm, pm, fm;
- ②质量:g, kg, mg, μg , ng, pg;
- ③时间:s, ms, μs , ns, min, h, d;
- ④电流:A, mA, μA , nA;
- ⑤热力学温度:°C, 也可用 K;
- ⑥物质的量: mol, mmol, μmol , nmol, pmol;
- ⑦频率: Hz, kHz, MHz, GHz, THz;
- ⑧力、重力: N, kN, MN;
- ⑨压力、压强和应力: Pa, kPa, mPa;
- ⑩能量、功和热: J, kJ;
- ⑪电位、电压和电动势: V, mV, kV;
- ⑫放射性活度: Bq, kBq, MBq, GBq;

- ⑬容积、体积: L, mL, μL , nL;
- ⑭转速: r/min, r/s, kr/min, Mr/min;
- ⑮密度: kg/L;
- ⑯级差: dB;
- ⑰溶液浓度: mol/L, mmol/L, $\mu\text{mol/L}$, nmol/L, pmol/L; 也可用 g/L, mg/L, $\mu\text{g/L}$, ng/L, pg/L;
- ⑱一种物质含有另一种物质的量: mol/kg, mmol/g, $\mu\text{mol/g}$, nmol/g, pmol/g; 也可用 mg/g, $\mu\text{g/g}$, ng/g;
- ⑲血压: kPa, 也可用 mmHg (1 mmHg = 0.133 3 kPa); 其它生理压用 Pa, 也可用 cmH_2O (1 cmH_2O = 98 Pa)。

注意: 不得使用分母带词头的单位, 如/ml/ μg / μg /dl 等请修改为/L/ μg /L, 但/kg 例外。