DOI:10.16016/j.1000-5404.201911180

Klotho 对慢性肾脏病相关的动脉粥样硬化斑块不稳定性的保护作用

毕先金,杨江信,熊加川,杨 可,赵景宏 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市慢性肾脏病防治重点实验室

[摘要] **目的** 探讨慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)对动脉粥样硬化斑块稳定性的影响和 Klotho 蛋白在此病理过程中的作用。**方法** 采用 8 周龄雄性 $Apoe^{-/-}$ 小鼠制备 5/6 肾毁损 CKD 动物模型,高脂饮食 12 周,并通过腹腔注射 Klotho 蛋白(0.01 mg/kg,每 2 天注射 1 次)进行治疗。实验分为假手术组(sham 组)、CKD 组和 Klotho+CKD 组,每组 8 只小鼠。对各组小鼠主动脉根部层面切片,行 HE 和 α-SMA 免疫荧光染色,观察 CKD 对动脉粥样硬化斑块大小和纤维帽厚度的影响。体外培养人血管平滑肌(vascular smooth muscle cells,VSMCs)细胞,实验分 4 组,分别使用 CKD 5 期患者血清(CKD 组)或者健康人血清(对照组)单独及联合 Klotho 蛋白进行孵育,观察各组细胞 ROS 水平和衰老细胞所占比例。**结果** 与 sham 组比较,CKD 组动脉粥样硬化斑块面积显著增加[$(3.53\pm0.34)\times10^5$ *vs* $(2.21\pm0.21)\times10^5$ μm^2, $P<0.01$],纤维帽明显变薄[(8.43 ± 1.74) *vs* (21.21 ± 2.27) μm,$P<0.01$],腹腔注射 Klotho 蛋白后可以显著抑制以上病理变化($P<0.01$)。与对照组比较,CKD 组半乳糖苷酶阳性 VSMCs 细胞比例明显增加($P<0.01$),VSMCs 细胞 ROS 水平显著增加($P<0.01$),Klotho 蛋白预孵育后能显著抑制 CKD 导致的半乳糖苷酶阳性 VSMCs 细胞增加($P<0.01$)和 ROS 水平增加($P<0.01$)。**结论** VSMCs 细胞衰老是 CKD 导致动脉粥样硬化斑块不稳定性发生的重要原因,Klotho 蛋白在此过程中发挥保护作用。

[关键词] Klotho 蛋白;慢性肾脏病;斑块稳定性;血管平滑肌细胞;细胞衰老
[中图法分类号] R341; R543.5; R692 [文献标志码] A

Klotho protects against chronic kidney disease-associated atherosclerotic plaque vulnerability in mice

BI Xianjin, YANG Jiangxin, XIONG Jiachuan, YANG Ke, ZHAO Jinghong Department of Nephrology, Kidney Center of PLA, Chongqing Key Laboratory for Prevention and Treatment of Chronic Kidney Diseases, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of chronic kidney disease (CKD) on the instability of atherosclerotic plaques and investigate the role of Klotho in this pathological process. **Methods** A total of 24 $ApoE^{-/-}$ mice (8 weeks old) were randomly divided into sham group, CKD group and CKD+Klotho group ($n=8$ in each group). Mouse model of CKD was established by 5/6 nephrectomy in the corresponding mice. Then, these mice were fed with high-fat diet for 12 weeks, and Klotho was supplemented intraperitoneally at 0.01 mg/kg, every other day to the mice from the CKD+Klotho group. HE staining and α-SMA immunofluorescence staining were performed to evaluate the effects of CKD and Klotho on the atherosclerotic plaque size and fibrous cap thickness. Cultured human vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with the serum from CKD stage 5 patients or health individuals, in presence of Klotho protein. β-Gal staining and DCFH-DA probe were conducted to detect the proportion of senescent VSMCs and production of reactive oxygen species (ROS). **Results** The CKD group had significantly enlarged atherosclerotic plaque size [$(3.53\pm0.34)\times10^5$ *vs* $(2.21\pm0.21)\times10^5$ μm^2, $P<0.01$], and decreased fibrous cap thickness (8.43 ± 1.74 *vs* 21.21 ± 2.27 μm, $P<0.01$) when

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873605);国家自然科学基金青年科学基金(81700379)
[通信作者] 赵景宏,E-mail:zhaojh@tmmu.edu.cn

compared with the sham group. Supplement of Klotho could reverse these effects ($P<0.01$). *In vitro* experiment showed that there were larger proportion of galactosidase positive cells and higher ROS level in the VSMCs treated with the serum form CKD patients ($P<0.01$). However, pre-incubation of Klotho could alleviate theses effects ($P<0.01$). **Conclusion** Senescence of VSMCs is an important reason for instability of atherosclerotic plaques caused by CKD, and Klotho plays a protective role in the process.

[**Key words**] Klotho; chronic kidney disease; plaque stability; vascular smooth muscle cells; cellular senescence

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873605) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81700379). Corresponding author: ZHAO Jinghong, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn

心血管疾病是慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)患者最常见的并发症,也是导致患者死亡的主要原因[1]。动脉粥样硬化斑块破裂是CKD患者心血管疾病恶性事件发生的重要病理基础[2],动脉粥样硬化斑块的纤维帽变薄是发生斑块不稳定性和斑块破裂的重要原因[3],而纤维帽中的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的活性和数量是维持纤维帽厚度和动脉粥样硬化斑块稳定性的关键因素[4]。新近研究表明,不稳定性斑块的纤维帽变薄,纤维帽中的VSMCs呈现低增殖能力和衰老现象,导致斑块易破裂进而导致心血管恶性事件的发生[5]。CKD是一种衰老相关性疾病[6],CKD患者具有多种衰老特征的临床表现[7],新近动物实验和体外细胞实验也已经证实,CKD可导致多种细胞衰老进而导致个体衰老[8]。但是CKD与VSMCs衰老的关系及VSMCs衰老在CKD促进斑块不稳定性中的作用尚不清楚。

Klotho基因是1997年由KURO-O等[9]在研究原发性高血压病动物实验中发现的一种与衰老密切相关的基因。Klotho基因缺失的小鼠寿命显著缩短,并表现出类似于人类衰老的各种表现,如动脉粥样硬化、皮肤萎缩、运动失调、骨质疏松、不育症等[9]。而过表达Klotho的转基因小鼠则表现为寿命延长,说明它有抗衰老的特性[10]。因此,Klotho基因也被称为抗衰老基因。我们之前报道过Klotho蛋白对CKD引起的内皮损伤[11]、左室肥厚[12]和血栓形成[13]具有明显的保护作用。因此,Klotho蛋白是重要的心血管保护因子,并且Klotho蛋白的心血管保护作用与其强大的抗氧化应激特性密切相关。本课题组曾报道Klotho蛋白在小鼠尿毒症动脉粥样硬化模型($Apoe^{-/-}$小鼠制备5/6肾毁损CKD动物模型)中的表达显著降低[14],但是Klotho蛋白是否对CKD引起的动脉粥样硬化斑块不稳定性发挥作用还并不明确。因此,本研究以$Apoe^{-/-}$小鼠制备5/6肾毁损CKD动物模型和人VSMCs细胞株为研究对象,探讨CKD对动脉粥样硬化斑块稳定性的影响和Klotho蛋白在此病理过程中的作用,初步揭示CKD导致动脉粥样硬化斑块不稳定性的机制,并为其防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

8周龄雄性$Apoe^{-/-}$小鼠和高脂饲料购自北京华阜康公司;VSMCs细胞株购于美国ATCC细胞库;DMEM低糖培养基、胰酶、胎牛血清购于美国HyClone公司;PBS、4%多聚甲醛、柠檬酸盐、免疫染色一抗稀释液、FITC标记山羊抗兔免疫荧光二抗、DAPI染色液、抗荧光淬灭剂、DCFH-DA探针购自上海碧云天公司;α-SMA抗体购自美国Abcam公司;山羊血清购自北京中杉金桥公司;半乳糖苷酶染色试剂盒购自美国CST公司;Klotho蛋白购自美国R&D公司。

1.2 制备动物模型和分组

5/6肾毁损CKD动物模型建模方法为:8周龄雄性$Apoe^{-/-}$小鼠麻醉消毒后,先电凝右侧肾皮质2/3,2周后行左侧全肾切除。实验分3组(每组8只小鼠):①假手术组(sham组);②CKD组;③Klotho+CKD组。sham组小鼠只进行麻醉、消毒、打开肾脏包膜,不做肾脏电凝和切除。CKD组小鼠按CKD动物模型方法进行建模。Klotho+CKD组小鼠则在CKD术后通过腹腔注射Klotho蛋白(0.01 mg/kg,每2天注射1次)建模。左肾切除术后CKD组、Sham组和Klotho+CKD组持续以高脂饲料饲养12周。12周后收集小鼠血清和心脏,检测血脂、肌酐和尿素氮水平以评估小鼠建模是否成功。小鼠心脏进行固定、脱水、包埋、石蜡切片,完成HE染色和免疫荧光染色实验。实验按陆军军医大学动物伦理委员会批准的动物保护指南实施。

1.3 HE染色

取各组小鼠心脏以4%多聚甲醛固定24 h,脱水后石蜡包埋切片,切片厚度为4 μm。HE染色:将主动脉根部石蜡切片置于60 ℃孵箱中脱蜡30 min,分别经水化、苏木精染色2 min、伊红染色30 s、梯度浓度乙醇分化脱水、二甲苯透明、风干后中性树胶封片。染色后

的 HE 切片使用 Olympus 显微镜拍照。使用 Image-Pro-Plus6.0 软件进行斑块面积定量分析。

1.4 α-SMA 免疫荧光染色

脱蜡、水化方法同 HE 染色,水化后切片置于柠檬酸盐溶液中,95 ℃的水浴锅中进行抗原修复 30 min,自然冷却后使用山羊血清室温封闭 15 min,按 1∶100 稀释 α-SMA 抗体,滴加至切片上,4 ℃孵育过夜。第 2 天,PBS 洗切片 3 次,滴加山羊抗兔免疫荧光抗体 37 ℃孵育 1 h,而后 PBS 洗切片 3 次,DAPI 染色 5 min,抗荧光淬灭剂滴加后盖玻片封片。免疫荧光切片使用蔡斯 780 共聚焦显微镜拍照。使用 Image-Pro-Plus 6.0 软件进行纤维帽厚度分析。

1.5 VSMCs 细胞培养和分组

VSMCs 细胞株,置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中于 37 ℃,5%CO_2 的恒温培养箱进行培养,当细胞贴壁融合至 80%以上用 0.25%胰酶进行消化并传代。实验分 4 组:①对照组(Normal 组):使用 10%健康人血清孵育 72 h;②Klotho+Normal 组:10%健康人血清培养的条件下使用 Klotho 蛋白预孵育(200 pmol/L,预孵育 30 min);③CKD 组:使用 10% CKD 5 期患者血清孵育 72 h;④Klotho+CKD 组:10% CKD 5 期患者血清培养的条件下使用 Klotho 蛋白预孵育(200 pmol/L,预孵育 30 min)。本研究经本院伦理委员会批准(2012050-1)。

1.6 细胞半乳糖苷酶染色

按照细胞衰老测定试剂盒说明检测,按上述方法分组处理细胞后,PBS 洗 3 次,10%多聚甲醛室温固定 10 min,PBS 洗 3 次,根据说明书配制染色工作液,在 37 ℃无 CO_2 的孵育箱中染色 16 h,第 2 天 PBS 洗 3 次后,使用 Olympus 显微镜拍照,并分析记录阳性细胞比例。

1.7 细胞活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测

按照 1∶1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA 探针,使终浓度为 10 μmol/L。去除细胞培养液,加入稀释好的 DCFH-DA 1 mL。37 ℃细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,0.25%胰酶消化为单细胞悬液后使用流式细胞仪 BD verse 上机检测,使用 Flow Jo V10.3 进行结果分析和作图。

1.8 统计学分析

实验重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,实验中多组间比较用单因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 CKD 对动脉粥样硬化斑块面积的影响和 Klotho 的作用

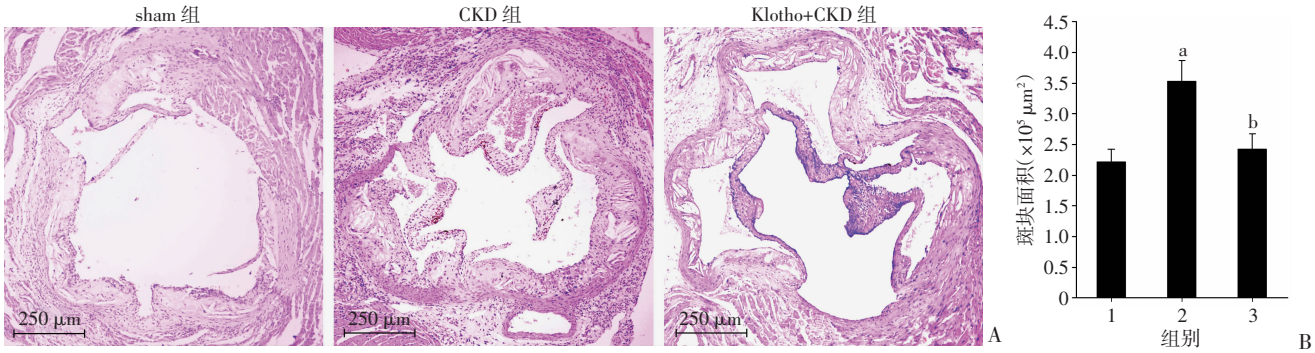
检测各组小鼠血清血脂、肌酐、尿素氮水平,结果显示,与 sham 组比较,CKD 组小鼠肌酐、尿素氮显著升高,Klotho+CKD 组小鼠肌酐、尿素氮较 CKD 组显著降低($P<0.01$,表 1);血脂水平在各组中无明显变化($P>0.05$,表 1),表明建模成功。

将各组小鼠的主动脉根部层面切片进行 HE 染色。结果显示,与 sham 组比较,CKD 组小鼠主动脉根部层面的斑块面积显著增大,腹腔注射 Klotho 蛋白可以显著抑制 CKD 导致的动脉粥样硬化斑块面积增加($P<0.01$,图 1)。

表 1 各组小鼠血肌酐、尿素氮及血脂水平变化(mg/dL,$n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	TCH	LDL	HDL	BUN	SCR
sham 组	808.75±45.99	296.88±33.29	40.51±4.28	39.86±3.84	0.56±0.07
CKD 组	809.13±54.58	297.50±32.70	40.70±3.83	80.40±8.20[a]	0.81±0.07[a]
Klotho+CKD 组	805.13±47.94	295.25±32.33	39.89±4.43	55.48±5.75[b]	0.72±0.05[b]

a:$P<0.01$,与 sham 组比较; b:$P<0.01$,与 CKD 组比较



A:主动脉根部 HE 染色;B:动脉粥样硬化斑块面积定量分析 1:sham 组;2:CKD 组;3:Klotho+CKD 组;a:$P<0.01$,与 sham 组比较; b:$P<0.01$,与 CKD 组比较

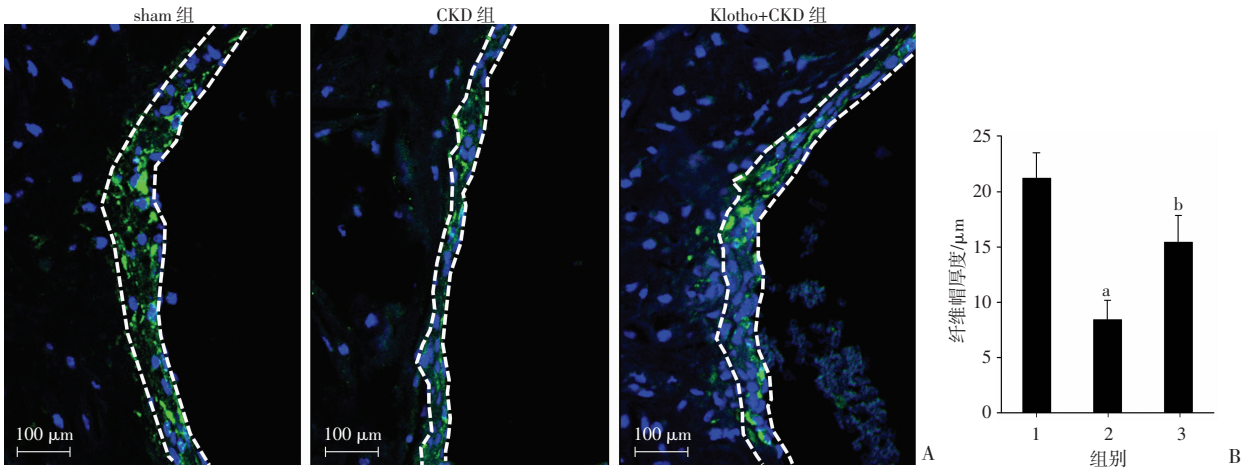
图 1 HE 染色检测 Klotho 蛋白对 CKD 导致的动脉粥样硬化斑块面积的影响

2.2　CKD 对纤维帽厚度的影响和 Klotho 的作用

对 sham 组、CKD 组和 Klotho+CKD 组的主动脉根部层面行 α-SMA 免疫荧光染色,分析 CKD 对纤维帽厚度的影响和 Klotho 的作用。结果显示,CKD 组的纤维帽厚度较 sham 组显著变薄,腹腔注射 Klotho 蛋白显著抑制 CKD 引起的纤维帽变薄($P<0.01$, 图 2)。以上结果提示,CKD 导致动脉粥样硬化斑块不稳定性增加,表现为斑块面积增加和纤维帽变薄,而 Klotho 蛋白在此病理过程中发挥明显的保护作用。

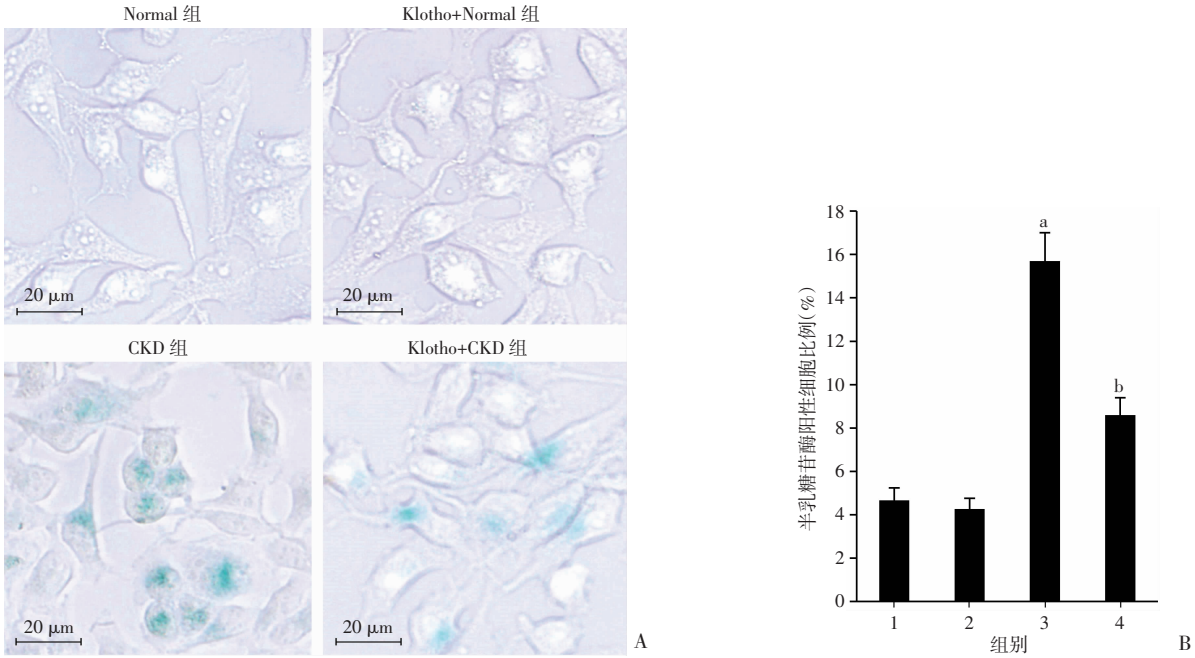
2.3　CKD 血清对 VSMCs 细胞衰老表型的影响和 Klotho 的作用

半乳糖苷酶染色(衰老标志物)提示,CKD 血清孵育 72 h 后,与健康人血清孵育后相比,半乳糖苷酶阳性 VSMCs 比例显著增加。Klotho 蛋白预孵育可以显著抑制 CKD 引起的半乳糖苷酶阳性 VSMCs 比例增加($P<0.01$, 图 3)。以上结果提示 CKD 诱导 VSMCs 衰老是 CKD 导致纤维帽变薄和斑块不稳定的重要机制,而 Klotho 蛋白可以抑制 CKD 诱导 VSMCs 细胞衰老,进而对 CKD 导致的斑块纤维帽变薄和斑块不稳定发挥保护作用。



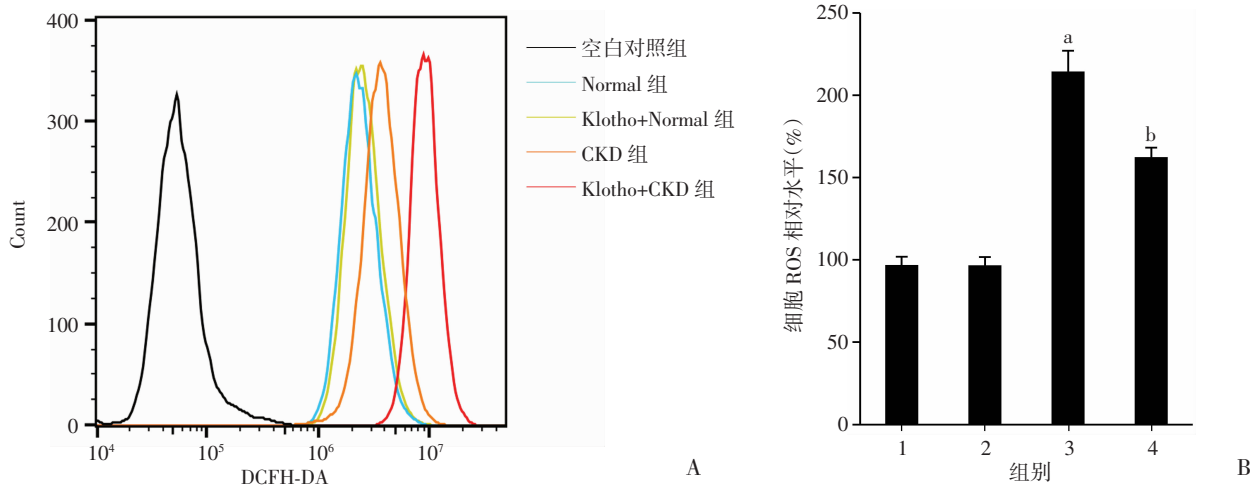
A:主动脉根部 α-SMA 免疫荧光染色;B:纤维帽厚度定量分析　1:sham 组;2:CKD 组;3:Klotho+CKD 组; a:$P<0.01$,与 sham 组比较;b:$P<0.01$,与 CKD 组比较

图 2　α-SMA 免疫荧光染色分析 CKD 对纤维帽厚度的影响和 Klotho 的作用



A:半乳糖苷酶染色;B:半乳糖苷酶染色阳性细胞比例分析　1:Normal 组;2:Klotho+Normal 组;3:CKD 组;4:Klotho+CKD 组; a:$P<0.01$,与 Normal 组比较;b:$P<0.01$,与 CKD 组比较

图 3　半乳糖苷酶染色观察 CKD 血清对 VSMCs 细胞衰老表型的影响和 Klotho 的作用



A:流式细胞仪检测 DCFH-DA 探针标记细胞 ROS 水平; B:细胞 ROS 相对水平 1: Normal 组;2:Klotho+Normal 组;3:CKD 组;4:Klotho+CKD 组; a:$P<0.01$,与 Normal 组比较;b:$P<0.01$,与 CKD 组比较

图 4 DCFH-DA 探针分析 CKD 血清对 VSMCs 细胞 ROS 生成的影响和 Klotho 的作用

2.4 CKD 血清对 VSMCs 细胞 ROS 生成的影响和 Klotho 的作用

使用 DCFH-DA 探针标记 VSMCs,检测 CKD 血清孵育后 VSMCs 的 ROS 水平。结果提示,CKD 血清孵育后,与健康人血清孵育后相比,VSMCs 细胞 ROS 水平显著增加,而 Klotho 蛋白预孵育可以显著抑制 CKD 引起的 VSMCs 细胞 ROS 水平增加($P<0.01$, 图 4)。以上结果说明 CKD 引起 VSMCs 的 ROS 大量生成是 CKD 导致 VSMCs 衰老的重要机制,Klotho 蛋白可以抑制 CKD 导致的 VSMCs 细胞 ROS 增加和衰老。

3 讨论

本研究通过动物实验发现 CKD 导致动脉粥样硬化斑块不稳定性的显著增加,表现为斑块面积明显增大和纤维帽显著变薄。初步研究其机制为 CKD 导致 VSMCs 细胞 ROS 显著增加和衰老。并且,我们通过对小鼠进行腹腔注射 Klotho 蛋白和体外 Klotho 蛋白预孵育发现,Klotho 蛋白在 CKD 导致动脉粥样硬化斑块不稳定性和 VSMCs 细胞衰老中发挥保护作用。

既往 BRO 等[15]报道 $Apoe^{-/-}$CKD 模型,但其研究关注于 CKD 导致动脉粥样硬化斑块加速进展和血管钙化,而本研究更关注动脉粥样硬化斑块的稳定性。在 CKD 患者中,急性心肌梗死的发生率是普通人群的 7.4 倍,而斑块稳定性是心血管恶性血栓事件发生的病理基础[16],与患者预后有着密不可分的关系,研究斑块稳定性更有利于探究心血管恶性血栓事件的发生机制和防治措施。但是 CKD 导致斑块不稳定性的机制并不明确,本研究初步探讨了 CKD 导致动脉粥样硬化斑块不稳定性的机制。

纤维帽是由 VSMCs 和其分泌的纤维和细胞外基质构成,VSMCs 在动脉粥样硬化斑块的发生发展中起着重要作用,尤其是对晚期动脉粥样硬化斑块的稳定性。既往已经报道 VSMCs 衰老能促进斑块不稳定性的发生,但机制并未完全阐明。WANG 等[5]报道斑块 VSMCs 中 TRF2 蛋白表达明显减少,该研究通过 VSMCs 特异 TRF2 点突变小鼠使 VSMCs 中 TRF2 功能缺失,发现 TRF2 功能缺失导致 VSMCs 衰老增加,进而增加了斑块和坏死核面积,导致动脉粥样硬化斑块不稳定;相反,过表达 TRF2 后能减少 VSMCs 衰老,并减少斑块和坏死核面积,增加斑块稳定性,提示延缓 VSMCs 衰老,对维持斑块稳定性起着十分重要的作用。本研究中,此现象得到进一步佐证,即 VSMCs 衰老增加斑块不稳定性,结果显示:Klotho 蛋白能够保护 CKD 诱导的 VSMCs 衰老,进而保护 CKD 导致的纤维帽变薄和斑块不稳定性,为 CKD 相关的动脉粥样硬化斑块不稳定性的防治提供新靶点。但是本研究的不足之处在于仅在体外细胞实验中证实 CKD 导致 VSMCs 衰老,CKD 是否可以加速小鼠斑块纤维帽中的 VSMCs 衰老,甚至是人斑块纤维帽中的 VSMCs 衰老,将是后期研究工作关注的重点。

既往研究发现,ROS 和细胞衰老关系密切,ROS 通过导致 DNA 损伤、线粒体损伤[17]等,进而导致细胞衰老,ROS 的大量产生是衰老的重要机制。而 VSMCs 细胞中 ROS 主要来自线粒体和 NADPH 家族[18]。NADPH 家族主要包括:NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5 等[19]。既往研究发现 NOX4 来源的 ROS 在年龄相关性心血管疾病中发挥重要作用。线粒体功能异常也可导致 ROS 的大量产生,并促进动脉粥样硬化进

展[20]。CKD 是一种衰老相关疾病,其诱导细胞衰老的机制与引起细胞生成大量 ROS 有密切的关系。而 CKD 内环境复杂,导致细胞 ROS 生成增多、细胞衰老的因素有很多,相比较使用单因素如硫酸吲哚酚或是硫酸对甲酚处理细胞,本研究采用尿毒症患者血清处理细胞,更能模拟尿毒症患者体内复杂的内环境。本研究发现,尿毒症患者血清孵育后,ROS 显著升高在 CKD 诱导 VSMCs 细胞衰老中发挥重要作用,但是此病理生理过程中 ROS 的来源并未阐明清楚,这将是我们今后研究工作的重要关注点。

综上所述,本研究发现 CKD 引起 VSMCs 细胞 ROS 显著增加和 VSMCs 细胞衰老,导致动脉粥样硬化斑块不稳定性的发生。进而推测在 CKD 状态下,VSMCs 细胞衰老是 CKD 患者高心血管恶性事件发生率的重要机制。本研究还发现,通过外源性补充 Klotho 蛋白能显著抑制 CKD 诱导的 VSMCs 细胞 ROS 增加和 VSMCs 细胞衰老,进而保护 CKD 引起的动脉粥样硬化斑块不稳定性,为防治 CKD 引起的动脉粥样硬化斑块不稳定性提供了新的治疗思路和靶点。

参考文献:

[1] RUIZ-HURTADO G, SARAFIDIS P, FERNÁNDEZ-ALFONSO M S, *et al*. Global cardiovascular protection in chronic kidney disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(10): 603-608. DOI:10.1038/nrcardio.2016.48.

[2] WEBSTER A C, NAGLER E V, MORTON R L, *et al*. Chronic kidney disease[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1238-1252. DOI:10.1016/s0140-6736(16)32064-5.

[3] RAGGI P, GENEST J, GILES J T, *et al*. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions[J]. Atherosclerosis, 2018, 276: 98-108. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2018.07.014.

[4] CHISTIAKOV D A, OREKHOV A N, BOBRYSHEV Y V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 214(1): 33-50. DOI:10.1111/apha.12466.

[5] WANG J L, URYGA A K, REINHOLD J, *et al*. Vascular smooth muscle cell senescence promotes atherosclerosis and features of plaque vulnerability[J]. Circulation, 2015, 132(20): 1909-1919. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016457.

[6] ROMAGNANI P, REMUZZI G, GLASSOCK R, *et al*. Chronic kidney disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17088. DOI:10.1038/nrdp.2017.88.

[7] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI K, *et al*. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. Lancet, 2013, 382(9888): 260-272. DOI:10.1016/S0140-6736(13)60687-X.

[8] TSIRPANLIS G. Cellular senescence, cardiovascular risk, and CKD: a review of established and hypothetical interconnections[J]. Am J Kidney Dis, 2008, 51(1): 131-144. DOI:10.1053/j.ajkd.2007.07.035.

[9] KURO-O M, MATSUMURA Y, AIZAWA H, *et al*. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. Nature, 1997, 390(6655): 45-51. DOI:10.1038/36285.

[10] XU Y C, SUN Z J. Molecular basis of klotho: from gene to function in aging[J]. Endocr Rev, 2015, 36(2): 174-193. DOI:10.1210/er.2013-1079.

[11] YANG K, NIE L, HUANG Y J, *et al*. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein[J]. Toxicol Lett, 2012, 215(2): 77-83. DOI:10.1016/j.toxlet.2012.10.004.

[12] YANG K, WANG C, NIE L, *et al*. Klotho protects against indoxyl sulphate-induced myocardial hypertrophy[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(10): 2434-2446. DOI:10.1681/ASN.2014060543.

[13] YANG K, DU C H, WANG X M, *et al*. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice[J]. Blood, 2017, 129(19): 2667-2679. DOI:10.1182/blood-2016-10-744060.

[14] YU J, DENG M Y, ZHAO J H, *et al*. Decreased expression of klotho gene in uremic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 261-266. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.11.046.

[15] BRO S, BENTZON J F, FALK E, *et al*. Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2466-2474. DOI:10.1097/01.asn.0000088024.72216.2e.

[16] CAI Q J, MUKKU V K, AHMAD M. Coronary artery disease in patients with chronic kidney disease: a clinical update[J]. Curr Cardiol Rev, 2013, 9(4): 331-339. DOI:10.2174/1573403x10666140214122234.

[17] BOUZID M A, FILAIRE E, MCCALL A, *et al*. Radical oxygen species, exercise and aging: an update[J]. Sports Med, 2015, 45(9): 1245-1261. DOI:10.1007/s40279-015-0348-1.

[18] CHILDS B G, DURIK M, BAKER D J, *et al*. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy[J]. Nat Med, 2015, 21(12): 1424-1435. DOI:10.1038/nm.4000.

[19] SALAZAR G. NADPH oxidases and mitochondria in vascular senescence[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): E1327. DOI:10.3390/ijms19051327.

[20] VENDROV A E, VENDROV K C, SMITH A, *et al*. NOX4 NADPH oxidase-dependent mitochondrial oxidative stress in aging-associated cardiovascular disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 23(18): 1389-1409. DOI:10.1089/ars.2014.6221.

(收稿:2019-11-21;修回:2019-12-27)

(编辑 吴培红)