DOI:10.16016/j.1000-5404.201909150

Klotho 缺乏致小鼠自发性血压升高的初步机制

董照瀛,周晓莉 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心血管内科

[摘要] **目的** 探讨小鼠体内 Klotho (KL)缺乏对血压的影响及其初步机制。**方法** 使用 KL 基因半敲除 129Sv 小鼠作为实验组($KL^{+/-}$组),同种系同龄 129Sv 小鼠作为对照组(WT 组),每组各 20 只。自 10 周龄起,应用无创 VPR tail-cuff 法监测小鼠血压,每周 2 次,至 23 周龄结束。取小鼠尿液,采用 ELISA 法检测小鼠尿微量白蛋白水平;心脏穿刺取血,ELISA 法检测小鼠醛固酮水平,尿素、肌酐测定试剂盒检测血尿素、肌酐水平;取肾脏制备石蜡切片, HE 染色观察肾脏组织病理结构;免疫组织化学法检测肾脏 KL 蛋白表达;Masson 染色观察肾脏纤维化水平,并进行半定量分析;Western blot 测定肾脏组织中 KL、SGK1、NCC、ATP synthase β 蛋白的表达。**结果** 与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠肾脏 KL 蛋白水平显著下降($P<0.01$);自 16 周龄起出现持续、自发的血压升高;23 周龄末 $KL^{+/-}$组小鼠尿白蛋白与血肌酐比值、血肌酐和血尿素水平增高,肾脏病理重塑和纤维化明显($P<0.01$);小鼠醛固酮水平升高且 SGK1、NCC、ATP synthase β 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。**结论** 体内 KL 的减少可能导致小鼠自发性血压升高,其机制可能与 KL 缺乏导致的肾脏损害和醛固酮水平升高所致的水钠潴留相关。

[关键词] Klotho;高血压;肾脏损害;醛固酮

[中图法分类号] R-332;R363.21;R544.1 [文献标志码] A

Preliminary investigation of mechanism underlying Klotho insufficiency-induced spontaneous hypertension in mice

DONG Zhaoying, ZHOU Xiaoli Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of Klotho (KL) insufficiency-induced spontaneous hypertension in mice. **Methods** We monitored blood pressure using high-throughput non-invasive blood pressure cuff in 10-week-old 129Sv mice with partial KL gene knockout ($KL^{+/-}$) and wide-type 129Sv mice of the same age ($n=20$) twice a week till the mice were 23 weeks old. Urine samples of the mice were collected for measuring the level of microalbumin using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of aldosterone, urea and creatinine in cardiac blood were determined using ELISA or commercial kits. HE staining was used to observe the pathological changes in the kidney, and the expression level of KL in the renal tissues was analyzed immunohistochemically; renal fibrosis was assessed using Masson staining. The protein expressions of KL, SGK1, NCC and ATP synthase β were detected using Western blotting. **Results** Compared with those in the wild-type mice, the expression level of KL protein in the renal tissue was significantly decreased in $KL^{+/-}$ mice ($P<0.01$). The $KL^{+/-}$ mice showed significantly increased blood pressure since 16 weeks of age with sustained hypertension. At the end of 23 weeks, the $KL^{+/-}$ presented with significantly increased urinary albumin/serum creatinine ratio and serum levels of creatinine and urea, showing also obvious pathological remodeling and fibrosis in the kidney ($P<0.01$) and increased renal expression of aldosterone, SGK1, NCC and ATP synthase β ($P<0.01$). **Conclusion** KL insufficiency may result in spontaneous blood pressure elevation possibly due to structural and functional impairment of the kidneys and water and sodium retention induced by a high aldosterone level.

[基金项目] 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(CSTC2016jcyjA0201)

[通信作者] 周晓莉,E-mail: 2385997378@qq.com

[**Key words**] Klotho; high blood pressure; kidney impairment; aldosterone

Supported by the Basic Science and Frontier Technology Research Project of Chongqing (CSTC2016jcyjA0201). Corresponding author: ZHOU Xiaoli, E-mail: 2385997378@qq.com

Klotho (KL)是一种抗衰老基因[1]。该基因的突变致KL缺失可导致小鼠出现早发衰老表型,包括寿命缩短、动脉硬化、性腺萎缩、肺气肿、多器官钙化等[2-4]。反之,KL基因过表达可延缓上述衰老表型,使小鼠寿命延长20%~30%。可见KL在衰老过程中起着重要作用。原发性高血压是一种与老龄化相关的疾病[5],大量流行病学研究证实:高血压的患病率随着年龄的增长而增加,老年人高血压患病率是年轻人的2倍左右[6],推测KL下降可能是原发性高血压的病因之一。目前,关于Klotho与血压变化的研究较少,具体分子机制也尚不清楚。因此,本研究采用$KL^{+/-}$基因半敲除小鼠建立小鼠衰老模型,观察小鼠血压变化情况及肾脏结构功能,探讨体内KL缺乏可否引起自发性高血压及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

CODA6血压监测系统购自美国Kent Scientific公司;醛固酮ELISA试剂盒(ADI-901-173)购自美国Enzo Life Sciences公司;尿素测定试剂盒(DIUR-500)、定量肌酐检测试剂盒(DICT-500)购自美国Bio Assay Systems公司;小鼠特异性微量白蛋白尿ELISA试剂盒(Albuwell M)购自Exocell公司;KL单克隆一抗体(15 mg/mL,AF1819)购自美国R&D Systems公司;血清和糖皮质激素调节激酶(serum and glucocorticoid induced kinase 1,SGK1)单克隆抗体(1∶100,sc-28338)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;NaCl协同转运蛋白(NaCl cotransporter,NCC)单克隆抗体(1∶1 000,ab3553)购自美国EMD Millipore公司;ATP synthase β单克隆抗体(1∶15 000,612518)购自美国BD Transduction Laboratories公司;β-actin(1∶7 500,ab6267)购自美国Abcam公司;山羊抗小鼠单克隆二抗体(1∶2 000,sc-2005)、山羊抗兔单克隆二抗体(1∶10 000,sc-2004)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。

1.2 实验动物

实验动物由重庆医科大学实验动物中心提供。10周龄129Sv小鼠共40只,平均体质量23~26 g。饲养条件:20~25 ℃,自然照明,自由饮水和摄食。实验分2组,$KL^{+/-}$组为KL基因半敲除129Sv小鼠;WT组(对照组)为同种系同龄129Sv小鼠,每组各20只。

1.3 小鼠血压监测

使用CODA6血压监测系统,应用高通量无创血压检测技术VPR tail-cuff法监测血压。VPR tail-cuff方法是一种常用的高通量无创血压检测技术,适合于小鼠在生理状态下血压的长期监测。本实验从两组小鼠10周龄起至23周龄进行血压检测,每周测量2次,每次15个循环测量,取血压平均值并记录,用GraphPad Prism 7.00绘制小鼠的血压变化趋势图。

1.4 肾脏形态学观察

两组各取10只小鼠,使用过量氯胺酮(180 mg/kg)和甲苯噻嗪(20 mg/kg)对部分小鼠进行安乐死,用肝素生理盐水经心脏灌注后,摘取肾脏,5%多聚甲醛溶液固定,用部分肾组织包埋做石蜡切片,连续切片,厚度5 μm。每隔10张连续切片选取1张,进行HE染色。以相同方法再次选取两组切片,脱蜡后分别进行KL蛋白免疫组化染色和Masson染色。在光学显微镜下观察KL蛋白表达、肾脏组织结构变化和纤维化水平。使用Image Pro Plus 6.0软件对KL蛋白和Masson染色阳性区域行半定量分析。

1.5 肾脏功能指标水平测定

在小鼠自由状态下,取尿液用于特异性尿微量白蛋白测定。将余下小鼠行安乐死,方法同1.4。穿刺心脏取血,按尿素测定试剂盒和定量肌酐检测试剂盒说明检测小鼠血尿素、肌酐水平。用尿白蛋白(μg/mL)×100×40/血肌酐(mg/dL)数值表示尿白蛋白与血肌酐的比值。

1.6 血浆醛固酮水平检测

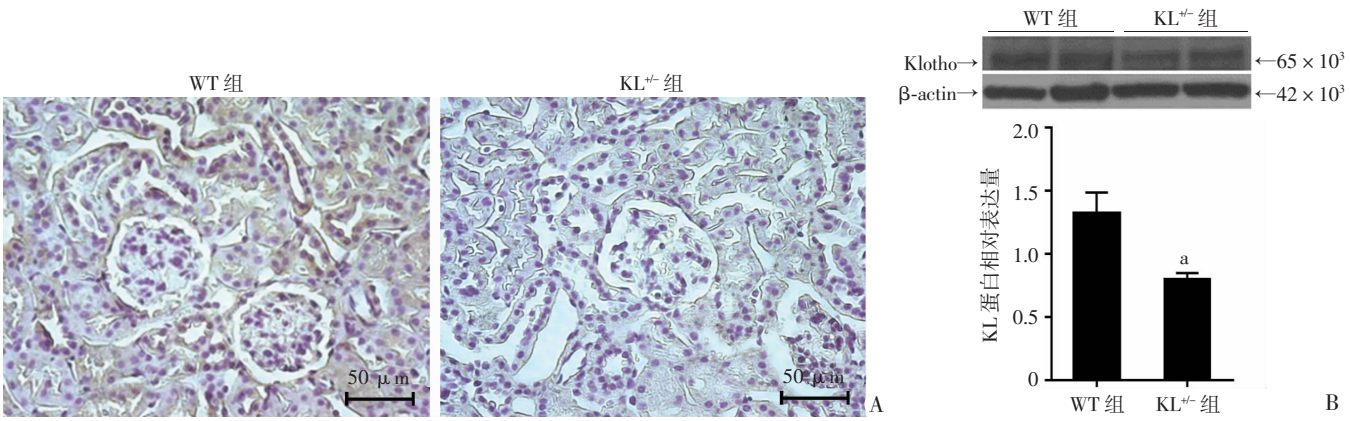
使用ELISA试剂盒检测小鼠血浆醛固酮水平并进行测定,具体操作步骤严格按设计盒说明进行。

1.7 Western blot检测蛋白表达

摘取小鼠肾脏,加裂解液完全裂解后,4 ℃条件下离心并收集上清,将膜在2%~3% BSA或2.5%~5%牛奶中TBST封闭2 h,用KL、SGK1、NCC、ATP synthase β等一抗在4 ℃下孵育过夜。以山羊抗小鼠或山羊抗兔为二抗,在室温下孵育1 h,用ECL观察蛋白,用X线片显影。以β-actin为对照。使用Image Pro Plus 6.0软件对条带灰度进行半定量分析。

1.8 统计学分析

采用SPSS 24.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示。血压数据采用重复测量单因素方差分析。其他数据采用单因素方差分析或非配对t检验进行分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。



A:免疫组织化学染色(SABC);B:Western blot 检测及半定量分析　a:$P<0.01$,与 WT 组比较

图 1　两组小鼠肾脏组织中 KL 蛋白的表达

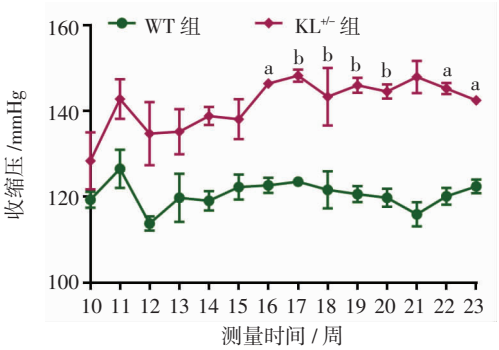
2　结果

2.1　$KL^{+/-}$组小鼠肾脏中 KL 蛋白表达下降

小鼠肾脏免疫组化结果显示:与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠肾脏 KL 蛋白表达下降,棕黄色颗粒明显减少。KL 蛋白正常情况下主要表达于肾远曲小管细胞浆内,也可表达于近曲小管等部位,染色显示为棕黄染色域。实验中 $KL^{+/-}$组肾小管中黄染较 WT 组明显减少(图 1A)。Western blot 检测 KL 蛋白并进行半定量分析,显示与 WT 组相比,$KL^{+/-}$组小鼠肾脏 KL 蛋白表达量显著下调($P<0.01$,图 1B),与免疫组化染色结果一致。

2.2　KL 下降对小鼠血压的影响

自 10 周龄起测量小鼠血压,与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠收缩压逐渐升高并维持于恒定范围内;自 16 周龄起,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$),$KL^{+/-}$组小鼠出现自发性高血压,且持续存在(图 2)。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 WT 组比较

图 2　两组小鼠收缩压水平

2.3　KL 下降对小鼠肾脏结构的影响

HE 染色结果显示:与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠肾小球硬化(系膜基质扩张、胶原沉积增加、肾小球塌陷)、肾小管损伤(扩张、萎缩)(图 3A)。Masson 染色及半定量分析显示:$KL^{+/-}$组小鼠肾小管间质和肾小球纤维化明显(图 3B、C)。提示 KL 下降可显著增加肾脏结构损伤,促进肾脏纤维化过程,导致肾脏重塑。

2.4　KL 下降对小鼠肾脏功能的影响

与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠尿白蛋白与血肌酐的比值、血肌酐和血尿素水平明显升高($P<0.05$,图 4),证明 KL 缺乏导致小鼠肾脏功能损害。

2.5　KL 下降对小鼠血浆醛固酮水平的影响

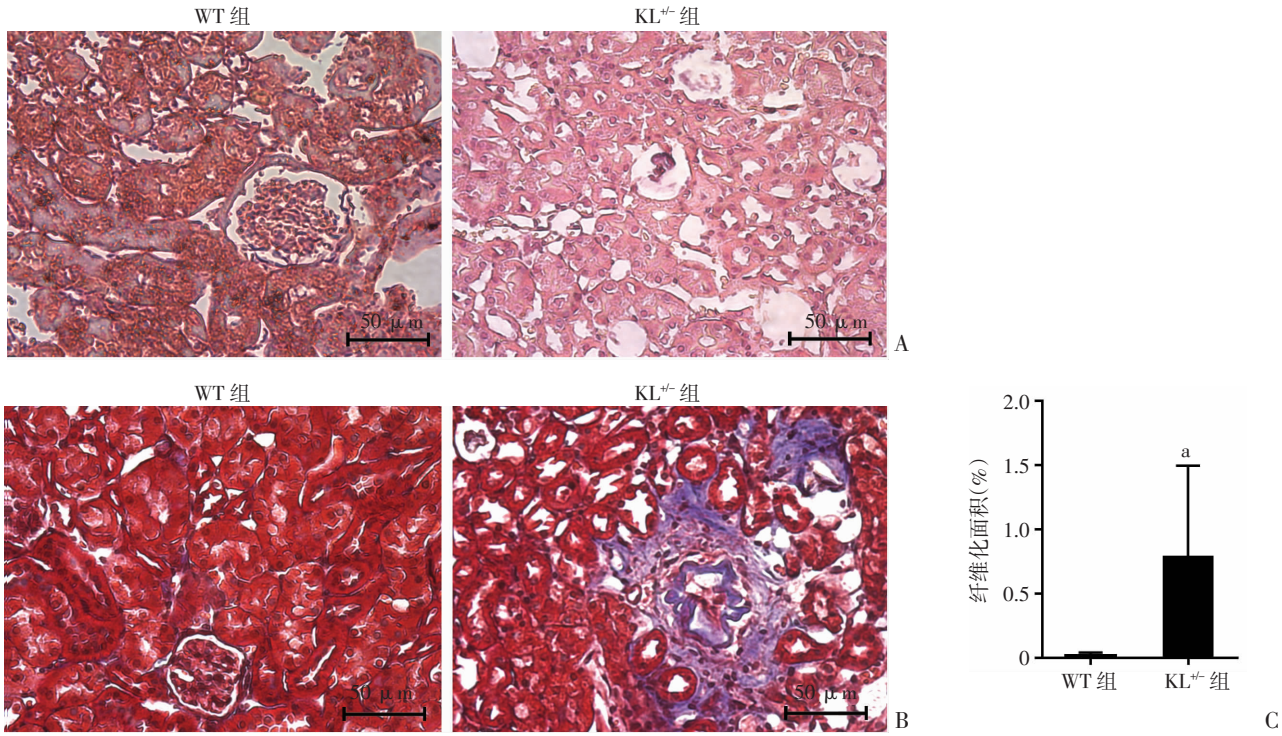
$KL^{+/-}$组小鼠血浆醛固酮水平显著高于 WT 组($P<0.05$,图 5),表明 $KL^{+/-}$可以明显升高血浆醛固酮水平。

2.6　KL 下降对水钠潴留相关蛋白因子表达的影响

肾脏 SGK1、NCC 和 ATP Symthase β 是经典的醛固酮下游因子,在调节肾脏水钠代谢方面发挥重要作用。Western blot 检测结果显示:与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠 SGK1、NCC 和 ATP Symthase β 的表达显著上调($P<0.05$,图 6)。提示 KL 缺乏可使肾脏功能下降,水钠潴留增加。

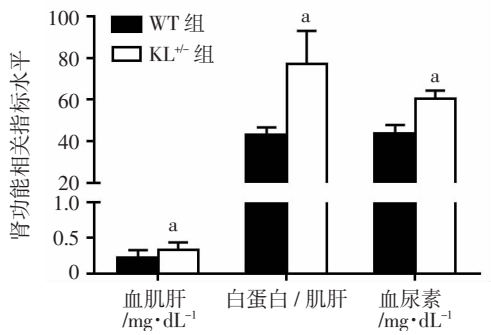
3　讨论

KL 基因是 1997 年被 KURO-O 等[7]首次发现并命名的抗衰老基因,KL 基因缺陷小鼠($KL^{-/-}$)可出现多种衰老表型,仅能存活 8 周左右,并出现性腺萎缩、动脉硬化、骨质疏松、异位钙化、肺气肿等常见的老化改变,类似于人类的“早老综合症”[2]。肾脏为人类 KL 蛋白表达的主要部位之一[8],本研究结果显示:经基因敲除的 $KL^{+/-}$组小鼠肾脏中 KL 蛋白表达明显下调;与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠自 16 周龄起,出现显著的自发性、持久性血压增高。本研究采用高通量无创血压检测技术 VPR tail-cuff 法监测血压,该方法已被证实与无线遥测 radiotelemetry 法具有良好的一致性且被



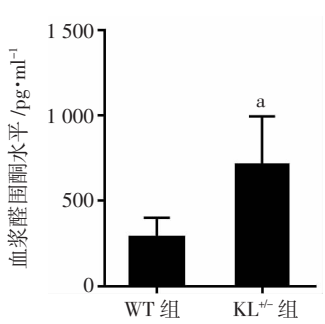
A:肾脏组织 HE 染色;B、C:肾脏组织 Masson 染色及半定量分析 a:$P<0.01$,与 WT 组比较

图 3 两组小鼠肾脏组织结构观察



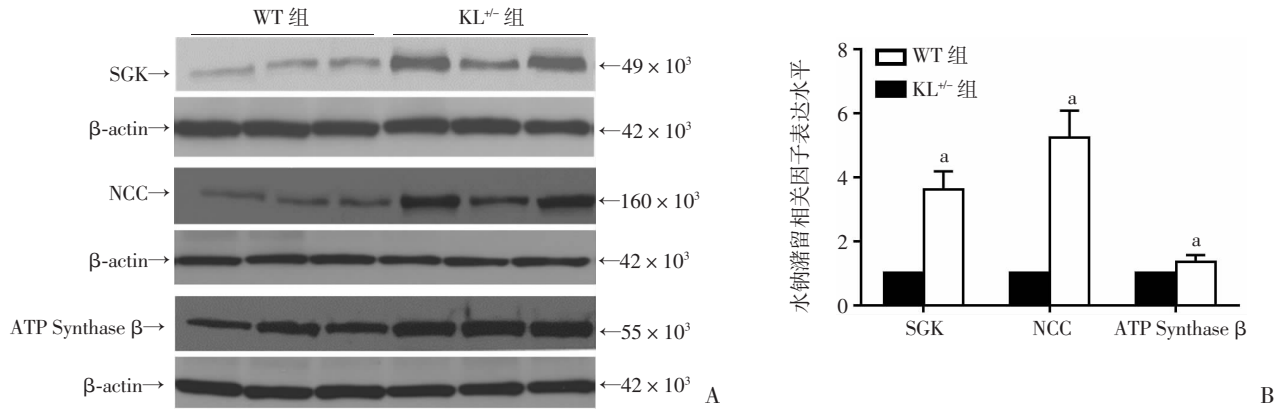
a: $P<0.05$,与 WT 组比较

图 4 小鼠肾脏功能水平



a: $P<0.05$,与 WT 组比较

图 5 两组小鼠血浆醛固酮水平



A:Western blot 检测;B:半定量分析 a: $P<0.05$,与 WT 组比较

图 6 小鼠肾脏水钠潴留相关因子 SGK1、NCC 和 ATP synthase β 的蛋白表达

美国心脏协会推荐[9],有助于对生理状态下小鼠血压进行长期监测。KL 基因为抗衰老基因,其体内的蛋白水平随年龄增长而下降。在人体内 KL 蛋白水平于 30~40 岁达高峰,此后逐渐降低[10-11],且 KL 基因的单核苷酸多态性变异与人类衰老性疾病的产生有关[12]。众所周知,高血压是一种常见的老龄化疾病,其发生与衰老进程密切相关[13]。本研究结果显示:$KL^{+/-}$组小鼠肾脏组织 KL 蛋白的表达水平与其血压水平成明显负相关,表明 KL 的足量持续表达对维持血压的正常状态起重要作用,KL 缺乏可能导致自发性高血压的发生。张欢欢等[14]对 96 例高血压患者进行血清内源性 KL 蛋白分泌检测,结果发现:随着患者血压升高,血清 KL 蛋白表达下降,其下降程度与血压水平负相关,与本研究结果相一致。另外,研究发现 KL 基因 G-395A 多态性与人类原发性高血压发病相关[15],体内 KL 基因的缺失致 Otsuka Long-Evans Tokushima 肥胖大鼠的自发性血压升高[16]。

肾脏是 KL 的主要表达器官[10],肾小管上皮细胞是 KL 蛋白的主要表达细胞[17]。KL 的表达能抑制肾小管上皮细胞、肾间质成纤维细胞等肾脏固有细胞致纤维化因子的产生,减少细胞外基质的合成与分泌[18-19]。临床研究发现高血压和肾病的发生有密不可分的关系,肾脏结构和功能异常可能对机体血压水平产生明显影响[20]。本研究发现 $KL^{+/-}$组小鼠肾小球硬化、肾小管损伤(图 3A),肾小管间质和肾小球纤维化明显,提示 KL 下调可导致肾脏结构损伤及重塑。同时,$KL^{+/-}$组小鼠血浆尿素、血浆肌酐、尿白蛋白/血浆肌酐比值较 WT 组明显升高,显示 KL 下调可导致肾脏功能的损伤($P<0.05$),KL 水平的变化可能是影响肾脏结构功能改变的前驱因素,肾脏病变进一步引起血压增高,形成恶性循环。这为进一步阐明 KL 下调所致的肾脏损害与血压增高之间的关系奠定了基础。

醛固酮是人体内最重要、作用最强的盐皮质激素。既往研究证实血浆和组织中的醛固酮增加是高血压的重要病因,原发性醛固酮增多症是继发性高血压的常见类型[21]。即使是在正常范围内醛固酮水平增高,也是预测个体发生高血压的重要因素。本研究结果显示:$KL^{+/-}$组小鼠体内血浆醛固酮水平较同龄 WT 组小鼠明显增高,与小鼠血压水平增高的趋势相同,证实 KL 下调的小鼠体内存在高醛固酮血症。

然而,KL 不足引起醛固酮升高并非肾素-血管紧张素-醛固酮(RASS)系统过度激活所致,我们在前期研究中对血浆肾素和血管紧张素Ⅱ水平进行定量分析,WT 组与 $KL^{+/-}$组小鼠差异无统计学意义。因此,我们认为 KL 缺乏引起的血压增高是高醛固酮血症的作用结果,而非 RASS 系统过度激活所致。体内醛固酮水平增高可通过多种途径影响血压,包括影响水钠潴留[22]、内皮功能[22]、血管顺应性[23]和中枢神经系统等,而水钠潴留是醛固酮的主要作用点,通过增强远端肾单位的钠重吸收来调节体液平衡和血压。醛固酮进入远曲小管和集合管上皮细胞,与胞浆内受体结合,形成激素-受体复合体,后者通过核膜,与核中 DNA 特异性结合位点相互作用,调节特异性 mRNA 转录,最终合成多种醛固酮诱导蛋白,使管腔膜对 Na^+的通透性增大,线粒体内 ATP 合成和管周膜上钠泵的活动性增加。从而导致对 Na^+的重吸收增强,对水的重吸收也增加[24]。本研究结果显示:与 WT 组比较,$KL^{+/-}$组小鼠肾小管中受醛固酮调控下游的一些因子和蛋白表达也明显增加($P<0.05$),其中包括 SGK-1、NCC、ATP synthase β 等。NCC 是位于远曲肾小管的一种重要的钠转运体,其丰度和活性受丝氨酸/苏氨酸激酶家族(WNK)的调控[25]。WNK4 可以通过阻断 NCC 向顶端膜的转运而降低细胞表面 NCC 的表达[26]。此外,醛固酮刺激信号分子 SGK1 与 WNK4 结合[27]并使其磷酸化,随后逆转了 WNK4 对 NCC 的抑制作用,导致 NCC 的净效应增加。因此,KL 缺乏引起的血压升高可能部分归因于肾脏中醛固酮-SGK-1-NCC/ATP synthase 途径信号通路的激活。

综上所述,本研究结果初步揭示了 KL 蛋白水平、醛固酮水平和高血压之间的关系,但是 KL 下降如何引起肾脏损害以及引起醛固酮水平增高的具体机制尚不清楚,有待于进一步研究。本研究提示 KL 缺失可能是导致血压升高的重要病理因素和潜在干预靶点,为后期基于临床探讨 KL 水平致高血压的机制和药物的选择提供了基础研究资料。

参考文献:

[1] AHERN G P. 5-HT and the immune system[J]. Curr Opin Pharmacol, 2011, 11(1): 29-33. DOI: 10.1016/j.coph.2011.02.004.

[2] BOKSHA I S, PROKHOROVA T A, SAVUSHKINA O K, *et al*. Klotho protein: its role in aging and central nervous system pathology[J]. Biochemistry (Mosc), 2017, 82(9): 990-1005. DOI: 10.1134/S0006297917090024.

[3] AKASAKA-MANYA K, MANYA H, ENDO T. Function and change with aging of α-klotho in the kidney[J]. Vitam Horm, 2016, 101: 239-256. DOI: 10.1016/bs.vh.2016.02.006.

[4] CIANCIOLO G, GALASSI A, CAPELLI I, *et al*. Klotho-FGF23, cardiovascular disease, and vascular calcification: black or white?[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2018, 16(2): 143-156. DOI: 10.2174/1570161115666170310092202.

[5] GUZIK T J, TOUYZ R M. Oxidative stress, inflammation,

and vascular aging in hypertension[J]. Hypertension, 2017, 70(4): 660-667. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.

[6] ONG K L, CHEUNG B M, MAN Y B, *et al*. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among United States adults 1999-2004[J]. Hypertension, 2007, 49(1): 69-75. DOI: 10.1161/01.HYP.0000252676.46043.18.

[7] 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.

[8] LU X, HU M C. Klotho/FGF23 axis in chronic kidney disease and cardiovascular disease[J]. Kidney Dis (Basel), 2017, 3(1): 15-23. DOI: 10.1159/000452880.

[9] FENG M J, WHITESALL S, ZHANG Y Y, *et al*. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements[J]. Am J Hypertens, 2008, 21(12): 1288-1291. DOI: 10.1038/ajh.2008.301.

[10] WANG Y H, SUN Z J. Current understanding of klotho[J]. Ageing Res Rev, 2009, 8(1): 43-51. DOI: 10.1016/j.arr.2008.10.002.

[11] LIM K, GROEN A, MOLOSTVOV G, *et al*. A-klotho expression in human tissues[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(10): E1308-E1318. DOI: 10.1210/jc.2015-1800.

[12] HAO Q K, WANG Y T, DING X, *et al*. G-395A polymorphism in the promoter region of the KLOTHO gene associates with frailty among the oldest-old[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6735. DOI: 10.1038/s41598-018-25040-4.

[13] PONT L, ALHAWASSI T. Challenges in the management of hypertension in older populations[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 956: 167-180. DOI: 10.1007/5584_2016_149.

[14] 张欢欢, 韩冰, 廉银珠, 等. 不同水平高血压患者血清Klotho蛋白、NO、ET-1的表达水平及相关性[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(3): 596-599.
ZHANG H H, HAN B, LIAN Y Z, *et al*. Expression levels and their correlation of Klotho protein, NO, ET-1 in patients with different levels of hypertension [J]. Chin J Gerontol, 2015, 35(3): 596-599.

[15] WANG H L, XU Q, WANG Z, *et al*. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(5/6): 386-390. DOI: 10.1016/j.cca.2009.12.004.

[16] AIZAWA H, SAITO Y, NAKAMURA T, *et al*. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 249(3): 865-871. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9246.

[17] LINDBERG K, AMIN R, MOE O W, *et al*. The kidney is the principal organ mediating klotho effects[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(10): 2169-2175. DOI: 10.1681/ASN.2013111209.

[18] HUANG J S, CHUANG C T, LIU M H, *et al*. Klotho attenuates high glucose-induced fibronectin and cell hypertrophy *via* the ERK1/2-p38 kinase signaling pathway in renal interstitial fibroblasts[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 390(1/2): 45-53. DOI: 10.1016/j.mce.2014.04.001.

[19] SATOH M, NAGASU H, MORITA Y, *et al*. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303(12): F1641-F1651. DOI: 10.1152/ajprenal.00460.2012.

[20] YANNOUTSOS A, BAHOUS S A, SAFAR M E, *et al*. Clinical relevance of aortic stiffness in end-stage renal disease and diabetes: implication for hypertension management[J]. J Hypertens, 2018, 36(6): 1237-1246. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001665.

[21] KLINE G A, PREBTANI A P H, LEUNG A A, *et al*. Primary aldosteronism: a common cause of resistant hypertension[J]. J De L'association Med Can, 2017, 189(22): E773-E778. DOI: 10.1503/cmaj.161486.

[22] RAY E C, RONDON-BERRIOS H, BOYD C R, *et al*. Sodium retention and volume expansion in nephrotic syndrome: implications for hypertension[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2015, 22(3): 179-184. DOI: 10.1053/j.ackd.2014.11.006.

[23] NEVES M F, CUNHA A R, CUNHA M R, *et al*. The role of renin-angiotensin-aldosterone system and its new components in arterial stiffness and vascular aging[J]. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2018, 25(2): 137-145. DOI: 10.1007/s40292-018-0252-5.

[24] REILLY R F, ELLISON D H. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy[J]. Physiol Rev, 2000, 80(1): 277-313. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.1.277.

[25] WU A H, WOLLEY M, STOWASSER M. The interplay of renal potassium and sodium handling in blood pressure regulation: critical role of the WNK-SPAK-NCC pathway[J]. J Hum Hypertens, 2019, 33(7): 508-523. DOI: 10.1038/s41371-019-0170-6.

[26] TAKAHASHI D, MORI T, NOMURA N, *et al*. WNK4 is the major WNK positively regulating NCC in the mouse kidney[J]. Biosci Rep, 2014, 34(3): e00107. DOI: 10.1042/BSR20140047.

[27] WYNNE B M, MISTRY A C, AL-KHALILI O, *et al*. Aldosterone modulates the association between NCC and ENaC[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4149. DOI: 10.1038/s41598-017-03510-5.

(收稿:2019-09-19;修回:2019-11-25)

(编辑 汪勤俭)