doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.20.020

阿尔茨海默病与血浆Klotho蛋白水平相关性研究*

李宝善[1],唐渝平[1△],马厚勋[2],蒋 宜[1],李婷婷[1],裴文楠[1]
(1.重庆市急救医疗中心/重庆大学附属中心医院,重庆 400014; 2.重庆医科大学附属第一医院,重庆 400016)

摘要:目的 研究阿尔茨海默病(AD)与血浆Klotho蛋白水平的相关性。**方法** 选取重庆市急救医疗中心老年病科2016年5月至2018年5月收治的AD患者69例作为观察组,非AD患者70例作为对照组。相关因素行Logistic多因素回归分析。**结果** 观察组患者血浆Klotho蛋白水平($P=0.006$)、简易智力状况显著(MMSE)评分($P=0.000$)显著低于对照组,两组患者性别比例、年龄、体质量指数、糖尿病、高血压病、患病情况、血脂水平、受教育程度比较,差异无统计学意义($P>0.05$);多因素Logistic连续回归分析提示,低血浆Klotho蛋白水平和高龄是AD的独立危险因素($OR=2.703$, $P=0.014$)。**结论** 低血浆Klotho蛋白水平与AD发病相关,监测血浆Klotho蛋白水平对于AD的预防、诊断及预后判断有重要临床意义。

关键词: Klotho蛋白;老年;阿尔茨海默病;危险因素;相关性
中图分类号:R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)20－0064－03

Association Between Plasma Klotho Protein Level and Alzheimer's Disease

LI Baoshan[1], *TANG Yuping*[1], *MA Houxun*[2], *JIANG Yi*[1], *LI Tingting*[1], *PEI Wennan*[1]
(*1. Chongqing Emergency Medical Center · Chongqing University Central Hospital, Chongqing, China 400014; 2. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016*)

Abstract: Objective To study the association of plasma Klotho level with Alzheimer's disease(AD). **Methods** A total of 69 AD patients admitted to the Department of Geriatrics of Chongqing Emergency Medical Center from May 2016 to May 2018 were selected as the observation group and 70 non－AD patients as the control group. Logistic multivariate regression analysis was performed on related factors. **Results** The Klotho protein level($P=0.006$) and the Mini Mental Status Scale(MMSE) score($P=0.000$) of the observation group were significantly lower than those of the control group. The gender ratio, age, body mass index, diabetes, prevalence of hypertension, blood lipid level, and education level in the two groups were not statistically different($P>0.05$). Multivariate Logistic continuous regression analysis suggested that low plasma Klotho protein level and age were independent risk factors for AD($OR=2\ 703$, $P=0.014$). **Conclusion** Low plasma Klotho protein levels are related to the onset of AD. Monitoring plasma Klotho protein levels has important clinical significance for the prevention, diagnosis and prognosis of AD.

Key words: Klotho protein; elderly people; Alzheimer's disease; risk factor; association

老年期痴呆是老年人群痴呆的总称,包括阿尔茨海默病(AD)、血管性痴呆、额颞性痴呆、路易体痴呆等,其中AD患者占比超过50%[1]。AD不仅严重影响患者的生活质量,也给患者家庭带来沉重的经济负担,已成为严重的公共健康问题。研究发现,Klotho基因多态性及其表达与认知功能损害有关[2－3],而Klotho基因表达产物——Klotho蛋白水平的高低与AD的相关性尚未深入开展研究。本研究中应用酶联免疫吸附(ELISA)法检测AD患者与非AD患者血浆Klotho蛋白水平,探索Klotho蛋白与AD相关性,为AD的综合防治提供新思路。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:观察组,年龄大于65岁;符合第5版《美国精神疾病诊断与评估手册》(DSM－Ⅴ)中AD诊断标准[4];符合美国国家衰老研究所(NIA)和阿尔茨海默病学会(AA)2011年发布的NIA－AA诊断标准中的"很可能"AD的诊断标准;简易智力状况量表(MMSE)评分中文盲≤17分,小学程度≤20分,中学程度≤22分,大学程度≤23分;临床痴呆评定量表(CDR)评分≥1分;Hachinski缺血量表评分≤4分。对照组,同期本科住院患者;年龄大于65岁;MMSE量表评分中文盲>17分,小学程度>20分,中学程度>22分,大学程度>23分;CDR评分为0分。本研究方案遵循《赫尔辛基宣言》,经重庆市急救医疗中心医学伦理委员会批准,患者家属签署知情同意书。

排除标准:血管性痴呆、帕金森病、抑郁症、硬膜下血肿、脑出血、脑积液、脑瘤、甲状腺功能减退、谵妄等所致痴呆或记忆障碍;Hachinski缺血量表评分>4分;肾脏疾病及其他严重精神、躯体疾病。对照组,近年来认知

*基金项目:国家自然科学基金[30672212];重庆市卫生与计划生育委员会医学科研计划项目[2016MSXM080]。
第一作者:李宝善,男,硕士研究生,主治医师,研究方向为衰老相关性疾病,(电话)023－63692187。
△通信作者:唐渝平,女,大学本科,主任医师,研究方向为老年病学,(电子信箱)542004538@qq.com。

功能有明显下降；肾脏疾病及其他严重精神、躯体疾病。

病例选择与分组：选取重庆市急救医疗中心老年病科2016年5月至2018年5月收治的69例AD患者作为观察组，男40例、女29例，年龄79～99岁、平均（83.10±5.05）岁；将70例非AD患者作为对照组，男34例、女36例，年龄77～96岁、平均（83.80±4.02）岁。两组患者一般资料比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），具有可比性。

1.2 观察指标

认知功能：2位主治医师以上职称者分别采用MMSE量表、CDR量表、Hachinski缺血量表评估。

相关检查：患者入院行系统体格检查，测量身高、体质量，并计算体质量指数（BMI）；完善头颅CT或MRI影像检查。抽取患者清晨空腹静脉血3 mL，抗凝，离心、分离出血清，采用7060型全自动生化分析仪（日本Hitachi公司）检测总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL－C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL－C）水平。

Klotho蛋白浓度：取患者清晨空腹静脉血3 mL，抗凝，离心，分离得血浆，采用680型酶标仪（美国BioRad公司），以人Klotho蛋白ELISA检测试剂盒（美国R&D公司）检测。按试剂盒说明书及仪器操作标准流程进行。

1.3 统计学处理

采用PASW Statistics 18.0统计学软件分析。计量资料以 $\overline{X}\pm s$ 表示，行 t 检验；计数资料以率（%）表示，行 χ^2 检验；相关因素行Logistic多因素回归分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。多因素回归分析时，血浆Klotho蛋白水平低于中位数视为降低，赋值1，否则赋值0；男性赋值1，女性0；年龄以所有研究对象年龄中位数为分界线，高于中位数赋值1，否则0；糖尿病、高血压者赋值1，否则0；TC，TG，LDL－C均高于正常值，HDL－C低于正常值者赋值1，否则0。

2 结果

2.1 观察指标

结果见表1。

2.2 AD相关因素分析

以单因素Logistic回归分析模型评价AD的相关因素。该模型包括性别、年龄、受教育程度、高体质量指数、高血压、2型糖尿病、高TC、高LDL－C、高TG、低HDL－C及低血浆Klotho蛋白水平。结果发现，高龄和低血浆Klotho蛋白水平是AD的危险因素；TG升高有助于减少AD。多因素连续Logistic回归分析提示，低血浆Klotho蛋白水平和高龄均为AD的独立危险因素；性别、受教育程度、高BMI、高血压、2型糖尿病、高TC、高LDL－C、高TG、低HDL－C的 P 值均大于0.05。详见表2、表3。

表1 两组患者观察指标比较

指标		观察组（$n=69$）	对照组（$n=70$）	χ^2/t 值	P 值
性别（男/女，例）		36/33	34/36	0.180	0.671
年龄（$\overline{X}\pm s$，岁）		83.10±5.05	83.80±4.02	－0.903	0.368
BMI（$\overline{X}\pm s$，kg/m^2）		23.65±4.20	23.48±3.53	0.237	0.813
高血压[例（%）]		57（82.61）	55（78.57）	0.362	0.547
2型糖尿病[例（%）]		23（33.33）	27（38.57）	0.414	0.520
TC（$\overline{X}\pm s$，mmol/L）		4.47±1.19	4.51±1.21	－0.224	0.823
TG（$\overline{X}\pm s$，mmol/L）		1.39±0.59	1.60±1.04	－1.482	0.141
LDL－C（$\overline{X}\pm s$，mmol/L）		2.08±0.72	2.18±0.93	－0.914	0.362
HDL－C（$\overline{X}\pm s$，mmol/L）		1.33±0.56	1.23±0.37	1.138	0.257
Klotho蛋白（$\overline{X}\pm s$，pg/mL）		608.68±24.33	752.80±32.08	－2.987	0.006
受教育程度[例（%）]	文盲	8（11.59）	7（10.00）	0.390	0.942
	小学	33（47.83）	31（44.29）		
	中学	22（31.88）	25（35.71）		
	大学及以上	6（8.70）	7（10.00）		
MMSE评分（$\overline{X}\pm s$，分）		15.83±1.76	26.97±1.14	－44.278	0.000

表2 AD危险因素的单因素回归分析

项目	B	SE	$Wald$	OR	95% CI	P 值
性别（男/女）	－0.854	0.477	3.210	0.426	（0.167，1.084）	0.073
年龄	1.200	0.500	5.766	3.319	（1.247，8.836）	0.016
受教育程度	－0.236	0.450	0.275	0.790	（0.327，1.908）	0.600
高BMI	0.848	0.451	3.529	2.334	（0.964，5.652）	0.060
低Klotho蛋白	1.393	0.512	7.397	4.026	（1.476，10.985）	0.007
高血压病	－0.017	0.562	0.001	0.984	（0.327，2.957）	0.976
2型糖尿病	－0.556	0.457	1.478	0.573	（0.234，1.406）	0.224
TC	0.785	0.598	1.724	2.192	（0.679，7.077）	0.189
TG	－1.080	0.526	4.219	0.339	（0.121，0.952）	0.040
LDL－C	－0.734	0.983	0.558	0.480	（0.070，3.293）	0.455
HDL－C	0.847	0.499	2.881	0.790	（0.327，1.908）	0.600

表3 AD危险因素的多因素连续回归分析

项目	B	SE	$Wald$	OR	95% CI	P 值
年龄	0.874	0.401	4.751	2.397	（1.092，5.263）	0.029
低Klotho蛋白	0.994	0.403	6.080	2.703	（1.226，5.958）	0.014

3 讨论

痴呆现已确定的危险因素包括年龄、家族史、遗传因素，可能的危险因素包括脑外伤、性别、教育程度、婚姻状况、职业、地区和种族差异、轻度认知功能损害、中风相关风险因素、炎症、职业暴露、雌激素水平、唐氏综合征等[5－7]。根据2010年第六次人口普查的结果，我国总人口达13.3亿，65岁以上人口接近2.4亿，占比达18.05%，按AD 5%[2]的发病率保守估算，目前我国AD患者多于1 100万。AD可使患者失智甚至失能，需要专人长期照护，给家庭、社会带来沉重负担。

增龄、脑血管病是老年期痴呆至关重要的危险因素，本研究中证实，高龄是AD的独立危险因素，但对此

尚无有效干预手段。因此在AD防治措施中，控制脑血管疾病相关危险因素，防治脑血管疾病显得极其重要。同时，本研究中发现，低血浆Klotho蛋白水平是AD的危险因素。DUBAL等[8-9]发现，Klotho蛋白不仅可提高模型小鼠的认知功能，还可抵抗AD淀粉样前体蛋白过表达导致的神经退化。Klotho蛋白存在于肾脏、脑室脉络丛、大脑、海马、胎盘、小肠、前列腺等组织器官中[10]。有学者认为，肾脏表达的Klotho蛋白进入血液循环，而脉络丛产生的Klotho蛋白则进入脑脊液[11]。进一步研究发现，脑脊液中Klotho蛋白水平也随年龄增长而下降，AD患者脑脊液中Klotho蛋白水平也有下降[12]。这与外周血中Klotho蛋白水平具有一致性。

细胞表面存在一些尚未鉴定出的Klotho蛋白特定受体，Klotho蛋白通过与其高亲和力相结合，启动细胞内信号传导。该信号传导可抑制胰岛素样生长因子1（IGF-1）受体与胰岛素受体底物中酪氨酸的磷酸化，进而导致磷脂酰肌醇激酶3与胰岛素结合减少，从而抑制胰岛素/IGF-1信号传导[13]。而胰岛素/IGF-1信号传导的下调与老年痴呆相关。LABAK等[14]研究证实，抑制了脑胰岛素受体及其表达的动物，表现出认知障碍和AD常见的神经降解特征。此外，还发现高胰岛素血症可增加脑组织β淀粉样肽前体蛋白（Aβ）和炎症指数，从而促进晚期糖化终末产物的形成、脂质活性氧（ROS）的增加，严重危害神经元可塑性、记忆和认知系统。综上推测，血浆Klotho蛋白水平降低，胰岛素/IGF-1信号活性减弱，神经降解、脑组织Aβ增加，ROS增加，神经元、记忆和认知系统受到损害，从而有利于AD的发生、发展。

SEMBA等[15]研究发现，AD患者脑脊液中Klotho蛋白水平较对照组下降。KUANG等[16]对AD模型小鼠的研究发现，可溶性Klotho蛋白水平升高可显著改善记忆障碍和Aβ水平，其机制与抑制IGF-1/Akt/mTOR信号通路有关。由此推测，血浆Klotho蛋白的高表达可能有益于AD的防治，但具体机制尚待研究。

脑组织及脑脊液中均可检测到Klotho蛋白，且该蛋白具有改善认知功能、Aβ水平等作用，但其抗衰老、改善认知功能的具体临床机制尚不明确。LEON等[17]通过增加外源性Klotho蛋白片段诱导并增强NMDA依赖性突触可塑性，从而达到改善小鼠认知功能的目的，为AD的治疗提供了新的思路和方法。

综上所述，低血浆Klotho蛋白水平与AD发病相关，监测血浆Klotho蛋白水平对AD的预防、诊断及预后判断有重要临床意义。

参考文献：

[1] 范肖冬. ICD-10精神与行为障碍分类[M]. 北京：人民卫生出版社，1993：41-44.

[2] SHIMOKATA H, ANDO F, FUKUKAWA Y, et al. Klotho gene promoter polymorphism and cognitive impairment[J]. Geriatrics Gerontology International, 2010, 6(2): 136-141.

[3] 周晓辉，于兆海，苗海军. 血清Klotho蛋白浓度与轻度认知功能障碍的相关研究[J]. 中华精神科杂志，2014，47(1)：17-20.

[4] BLACK DW, GRANT JE. DSM-5 Guidebook. The essential companion to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition[J]. Journal of Psychiatric Practice, 2015, 21(2): 171-173.

[5] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志，2016，31(10)：937-950.

[6] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南2010[J]. 中华心血管病杂志，2011，39(7)：579-616.

[7] 郭 峰，张振馨. 痴呆的流行病学研究现状[J]. 中华神经科杂志，2007，40(5)：343-346.

[8] DUBAL DB, YOKOYAMA JS, ZHU L, et al. Life extension factor klotho enhances cognition[J]. Cell Reports, 2014, 7: 1065-1076.

[9] DUBAL DB, ZHU L, SANCHEZ PE, et al. Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice[J]. J Neurosci, 2015, 35(6): 2358-2371.

[10] WANG YH, SUN ZJ. Current understanding of klotho[J]. Ageing Res Rev, 2009, 8(11): 43-51.

[11] SATHYANESAN M, GIRGENTI MJ, BANASR M, et al. A molecular characterization of the choroid plexus and stress-induced gene regulation[J]. Translation Psychiatry, 2012, 2(7): e139.

[12] ALEAGHA MSE, SIROOS B, AHMADI M, et al. Decreased concentration of Klotho in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis[J]. Journal of Neuroimmunology, 2015, 281: 5-8.

[13] SCMBA 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(A7): 794-800.

[14] LABAK M, FONIOK T, KIRK D, et al. Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injection of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer s disease[J]. Acta Neurochir Suppl, 2010, 106: 177-181.

[15] SEMBA RD, MOGHEKAR AR, HU T, et al, Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease[J]. Neurosci Lett, 2014, 558: 37-40.

[16] KUANG X, ZHOU HJ, THORNE AH, et al. Neuroprotective effect of ligustilide through induction of alpha-secretase processing of both APP and klotho in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Front Aging Neurosci, 2017, 9: 353.

[17] LEON J, MORENO AJ, GARAY BI, et al. Peripheral elevation of aklotho fragment enhances brain function and resilience in Young, Aging, and a-synuclein transgenic mice[J]. Cell Rep, 2017, 20(6): 1360-1371.

（收稿日期：2019-12-25；修回日期：2020-03-19）