

# 构建糖尿病大鼠模型：Klotho基因导入对冠状动脉的保护作用

舒礼良, 陈茂林, 苏刚, 徐敬(郑州大学第一附属医院, 河南省郑州市 450052)

## 文章亮点:

①使用与人类 Klotho 基因相似度极高的大鼠作为实验对象, 实验结果具有较高指导意义。②导入 Klotho 基因, 通过检测个体 Klotho 蛋白表达值确定导入效果。③Klotho 蛋白表达增高的个体冠状动脉血管粥样硬化水平明显降低, 提示 Klotho 基因导入对冠脉具有保护作用。

## 关键词:

实验动物模型; 基因病毒载体及相关因子动物模型; 糖尿病; Klotho 基因; 脂蛋白; 冠状动脉粥样硬化; 基因导入

## 主题词:

模型, 动物; 脂蛋白类; 冠状动脉疾病; 糖尿病; 组织工程

## 摘要

**背景:** Klotho 基因是一种与机体衰老、代谢以及疾病有重要关联的基因, 并已在小鼠动物实验中证实可减缓和抑制动脉粥样硬化, 其机制与参与脂类代谢有关。

**目的:** 构建糖尿病大鼠模型, 观察 Klotho 基因导入是否对糖尿病大鼠冠状动脉具有保护作用。

**方法:** 由正常 SD 大鼠肾组织提取 Klotho 基因, 对目的基因进行 PCR 扩增, 以腺病毒作为载体。随机将 SD 大鼠分为模型组、对照组和治疗组, 进行糖尿病造模; 将 Klotho 基因导入治疗组, 对照组导入普通腺病毒, 模型组不作任何处理。造模成功后 12 周时处死模型动物, 检测血清低密度脂蛋白、高密度脂蛋白浓度及冠状动脉内膜、中膜厚度比。

**结果与结论:** 高密度脂蛋白浓度, 治疗组高于模型组及对照组, 治疗组与模型组、治疗组与对照组差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 模型组与对照组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。低密度脂蛋白浓度, 各模型组均有明显升高, 但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。计算各组内膜厚度, 治疗组显著小于模型组及对照组, 差异均有显著性意义( $P < 0.01$ ), 而模型组与对照组差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各组间中膜厚度差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。内膜、中膜厚度比, 治疗组分别与模型组及对照组相比, 差异均有显著性意义( $P < 0.01$ ); 治疗组与正常组差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 表明 KL 基因导入后内膜、中膜厚度比基本接近于正常水平, 低于模型组及对照组, 内膜增厚程度减小。提示 Klotho 基因导入糖尿病大鼠后对冠状动脉具有保护作用。

舒礼良, 陈茂林, 苏刚, 徐敬. 构建糖尿病大鼠模型: Klotho 基因导入对冠状动脉的保护作用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(49):7958-7963.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.49.015

## Construction of diabetic rat models: protective effect of Klotho gene transfer on coronary artery

Shu Li-liang, Chen Mao-lin, Su Gang, Xu Jing (First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Klotho gene has an important correlation with organism aging, metabolism and disease. It is confirmed by mouse experiments that Klotho gene can slow down and inhibit atherosclerosis, and its underlying mechanism is involved in lipid metabolism.

**OBJECTIVE:** To establish diabetic rat models and observe whether Klotho gene transfer has a protective effect on coronary artery of diabetic rats.

**METHODS:** Klotho gene was extracted from the kidney tissue of normal Sprague-Dawley rats. The target gene was amplified by polymerase chain reaction. Adenovirus was taken as a carrier. Sprague-Dawley rats were randomly divided into model, control and treatment groups to establish diabetic rat models. Klotho gene was transferred into the treatment group, and common adenovirus was transferred into the control group. Rats in model group did not receive any treatment. At the 12<sup>th</sup> week after modeling, the model animals were sacrificed. Serum low density lipoprotein, high density lipoprotein concentrations, coronary artery intima-media thickness ratio were determined.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The high density lipoprotein concentration in treatment group was significantly higher than that in the model and control groups ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in high density lipoprotein concentration between model and control groups. The low density lipoprotein in each group was significantly increased, but the differences were not significant ( $P > 0.05$ ). The intima thickness in treatment group

舒礼良, 男, 1975 年生, 河南省信阳市人, 汉族, 2003 年郑州大学毕业, 博士, 讲师, 主治医师, 主要从事冠心病发病机制及其防治研究。

通讯作者: 舒礼良, 博士, 讲师, 主治医师, 郑州大学第一附属医院, 河南省郑州市 450052

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)49-07958-06

稿件接受: 2015-09-10

http://www.crter.org

Shu Li-liang, M.D., Lecturer, Attending physician, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Corresponding author: Shu Li-liang, M.D., Lecturer, Attending physician, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Accepted: 2015-09-10

was significantly smaller than that in model and control groups ( $P < 0.01$ ), but the differences between model and control groups were not significant ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in media thickness between each group ( $P > 0.05$ ). The intima-media thickness ratio in the treatment group was significantly lower than that in the model and control groups ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the intima-media thickness ratio between treatment and normal groups ( $P > 0.05$ ). These results showed that after Klotho gene transfer, the intima-media thickness ratio was substantially close to the normal level, and lower than that in the model and control groups, and the degree of intimal thickening reduced. These results suggest that Klotho gene has a protective effect on coronary artery after being transferred into diabetic rats.

**Subject headings:** Models, Animal; Lipoproteins; Coronary Artery Disease; Diabetes Mellitus; Tissue Engineering

Shu LL, Chen ML, Su G, Xu J. Construction of diabetic rat models: protective effect of Klotho gene transfer on coronary artery. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(49):7958-7963.

## 0 引言 Introduction

随着生活质量提高, 饮食结构改变, 现今冠心病、高血压、糖尿病等已成为威胁人类健康的主要疾病。对合并糖尿病的冠心病患者, 血液黏稠度增加, 脂质代谢异常, 而低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白以及三酰甘油都是动脉粥样斑块形成的重要物质<sup>[1]</sup>, 并在粥样斑块发展过程中有重要作用。

Klotho基因(以下简称KL基因)是一种近些年新发现的, 与机体衰老、寿命以及老年性疾病有重要关联的基因<sup>[2]</sup>, KL基因可生成两种蛋白质产物: 膜型KL蛋白和分泌型KL蛋白。其中膜型蛋白为一种单次跨膜蛋白, 此类型表达主要位于肾脏、前列腺以及小肠<sup>[3]</sup>, 该蛋白主要参与成纤维细胞生长因子专性复合体受体来发挥作用。分泌型蛋白无跨膜性结构以胞内结构, 其主要发挥功能是以游离形式广泛分布于大脑、肾脏以及胎盘等组织, 血清中也可检测到游离KL蛋白。以游离形式存在的KL蛋白作用于离子通道, 调节胰岛素样生长因子受体<sup>[4]</sup>, 或通过调节其余类似的细胞表面糖蛋白的活性, 以此发挥作用。KL基因表达变化与一些病理状态的发展及预后有很高的相关性<sup>[5]</sup>。

考虑到大鼠KL基因与人类存在同源性, 文章采用SD大鼠进行糖尿病造模, 导入KL基因, 比较KL基因导入组大鼠与其他糖尿病组大鼠相比冠状动脉粥样硬化程度是否减轻。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验, 于2013年10月至2014年8月在杭州赫贝科技有限公司完成。

**1.2 材料** 清洁级SD大鼠73只, 体质量150–170 g, 雄性, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(沪)2008-0016。

**实验分组:** 将大鼠按随机数字表法分为正常组和糖尿病组, 适应喂养1周后, 正常组喂以普通饲料, 糖尿病组喂以高脂饮食, 一段时间后糖尿病组给予腹腔注射链脲佐菌素, 正常组仅注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。尾静脉采血测空腹血糖, 以空腹血糖  $> 16.7 \text{ mmol/L}$  作为糖尿病大鼠造模成功标准。

将糖尿病大鼠随机分成3组, 其中糖尿病模型组17只, 糖尿病模型+病毒转染组(治疗组)18只, 糖尿病模型+阴性载体组(对照组)18只。

构建糖尿病大鼠模型实验主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
链脲佐菌素	Sigma-aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司
转染试剂 Lipofectamine 2000	invitrogen 公司
腺病毒	Biovit 公司
pMD18-T-Klotho 质粒	杭州赫贝科技有限公司
质粒抽提试剂盒	Generay 公司
保真 PCR 试剂 LA Taq	TaKaRa 公司
限制性内切酶、T <sub>4</sub> DNA 连接酶	Fermentas 公司
DNA 凝胶回收试剂盒	Axygen 公司
PVDF 膜	Millipore 公司
脂蛋白胆固醇测定试剂盒	北京北化康泰临床试剂有限公司
糖尿病模型饲料	南通特洛菲饲料科技有限公司
ECL Plus 发光试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5x)、Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天公司
超低温冰箱	青岛海尔集团, BS-812 型
安穩血糖仪	三诺生物传感股份有限公司
酶标仪: SPECTRA max Plus 384	Molecular Devices 公司
恒温箱: DHG 9070A	上海精宏
微量加样器	Eppendorf 公司
A 值测量仪器: Merinton SMA4000	北京普华博奥生物科技有限公司
PCR 仪: Bio-Rad CFX connect 及 Bio-Rad MJ MiniOpticon	伯乐生命医学产品(上海)有限公司
显微镜 BH2 型	OLYMPUS 公司
超净工作台	苏州净化

### 1.3 造模方法

**创建糖尿病大鼠模型:** 糖尿病组大鼠喂以高脂饮食, 一段时间后以  $30 \text{ mg/kg}$  的剂量一次性腹腔注射链脲佐菌素进行糖尿病造模。继续原饲料喂养12周, 饱腹时尾静脉采

血测空腹血糖, 以空腹血糖 > 16.7 mmol/L 作为糖尿病成模标准。模型组不作处理, 治疗组给予一次性尾静脉注射 Ad-rklotho, 对照组给予一次注射 Ad-EGFP。平均每只大鼠腺病毒注射剂量为  $2 \times 10^9$  TU。

**糖尿病大鼠模型造模成功标准:** ①常规观察: 正常组动物皮毛光亮整洁, 灵活好动, 饮食正常, 体质量持续增加, 无死亡现象; 糖尿病组、治疗组及对照组有不同程度的精神萎靡, 活动减少, 饮食减少, 皮毛凌乱, 体质量增长不明显或下降等表现。②以空腹血糖 > 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠造模成功的标准。

**KL 基因扩增及其载体构建:** 由正常 SD 大鼠肾组织提取 Klotho 基因。

**目的基因的提取:** 取 2  $\mu$ L RNA 溶液于高精度分光光度计检测吸光度值(A), 观察蛋白吸收峰值  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 、 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  比值及连续波长吸收峰, 并计算 RNA 溶液浓度, 以  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 2.0$  且  $< 2.3$  为标准。将提取出的 RNA 约 1  $\mu$ g、Oligo(dT)18 引物 2  $\mu$ L、焦碳酸二乙酯水 10  $\mu$ L 放入离心管中, 经离心处理后加入相关药品干浴得到 cDNA。根据提取的目的基因序列设计扩增引物, 通过 PCR 扩增体系进行 KL 基因扩增。

将 KL 基因克隆到 pMD18-T 载体, 从 37  $^{\circ}$ C 过夜培养平板上挑取白色克隆, 接种于 4 mL 含有 50 g/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 220 r/min 振荡培养过夜。用质粒提取试剂盒提取质粒, 进行制粒制备并对重组质粒进行酶切鉴定。

**腺病毒包装与载体构建:** 于液氮罐中取出冻存的 293 细胞, 37  $^{\circ}$ C 水浴快速融化, 然后将其接种于培养瓶中, 加入 DMEM 培养基(含体积分数 10% 胎牛血清), 待细胞生长成均匀单层细胞并达 90% 以上聚集度时传代。取 4  $\mu$ g DNA 用培养基制成 DNA 稀释液, 将转染复合物加入到含有细胞和完全培养基的 6 孔板中, 轻柔混匀, 培养 4-6 h 后更换培养液, 于 37  $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。待细胞长满培养皿, 将细胞传代于 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养皿中, 每天观察, 待细胞长满瓶底时, 再传入 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 观察出毒迹象。培养扩增 HEK293 细胞, 当细胞汇合度达到 80%-90% 时加入第 1 代病毒 AD-rklotho, 感染 48 h 后收集细胞, 离心 10 min 收集病毒上清, 病毒扩增至 P3 代后用腺病毒纯化试剂盒纯化 P3 代病毒。

病毒滴定可从 AD-rklotho 病毒样品中检测到 3 405 bp 的条带, 表明目的基因已成功整合在病毒基因组中, 见图 1。

#### 1.4 指标测定

**样本采集:** 上述 4 组动物每周测 1 次血糖, 造模后麻醉大鼠, 每组取 15 只, 打开腹腔, 腹主动脉采血, 收集血清用于生化检测。取心脏组织, 沿冠状沟向下将心脏分成两部分, 上半部分浸泡于体积分数 10% 甲醛溶液中, 下部分用液氮速冻, -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱内保存用于 RT-PCR、Western Blot (免疫印迹试验) 检测。

**血清生化检测:** 使用血清脂蛋白试剂盒, 血清分级沉淀后与相应试剂混合后离心, 取上清液测定胆固醇。将 RI 用 10 mL RI 溶解, 配成工作液, 稳定 10 min, 96 孔板中加入 10  $\mu$ L 上清液再加入 100  $\mu$ L 工作液, 混匀后 37  $^{\circ}$ C 反应 5 min, 高密度脂蛋白酶标仪 500 nm 处测定 A 值, 低密度脂蛋白 520 nm 处测定 A 值, 计算高密度脂蛋白及低密度脂蛋白浓度。

**冠状动脉切片染色:** 取大鼠冠状动脉进行切片, 切片厚度为 4  $\mu$ m, 经 Masson 染色后胶原纤维呈蓝绿色指示外膜, 平滑肌呈鲜红色指示中膜, 内弹性膜呈白色或无色, 为中膜内膜的分界点; 用测微尺计算各组内膜、中膜厚度。

**1.5 主要观察指标** 造模后 12 周观察血清 KL 蛋白含量、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白浓度及冠状动脉内膜、中膜厚度比。

**1.6 统计学分析** 数据采用  $\bar{x} \pm s$  标出, 应用 SPSS 统计学软件进行处理 (SPSS 19.0 中文版), 对得到的数据进行两独立样本 *t* 检验, 设定  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 纳入 SD 大鼠共 73 只, 以 15 只作为正常组, 其余大鼠注射链脲佐菌素后死亡 5 只, 造模成功 53 只, 第 3 周因血糖恢复正常脱失 1 只, 第 8, 11 周因酮症酸中毒死亡 2 只, 治疗组腺病毒转染失败 1 只, 最后每组取 15 只进入最后各项结果检测。

大鼠造模流程图见图 2。

**2.2 造模方法的改进** 在糖尿病基础上制造高血脂的状态, 一定程度上加快了动脉粥样硬化的过程, 同时方便观察 KL 基因导入效果。

**2.3 血糖检测** 造模后检测大鼠血糖浓度, 正常组 5.7 mmol/L, 糖尿病模型组 17.3 mmol/L, 对照组 16.7 mmol/L, 治疗组 16.1 mmol/L, 提示糖尿病大鼠造模成功, 各模型组间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 3。

**2.4 Klotho 蛋白表达水平比较** 造模后第 12 周, 治疗组大鼠血清中的 Klotho 蛋白含量 ( $0.618 \pm 0.081$ ) g/L 明显高于对照组 ( $0.351 \pm 0.054$ ) g/L 和模型组 ( $0.401 \pm 0.062$ ) g/L, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

**2.5 脂蛋白浓度比较** 见表 1。

高密度脂蛋白浓度, 治疗组高于模型组及对照组, 两独立样本 *t* 检验治疗组与模型组、治疗组与对照组差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 模型组与对照组间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

低密度脂蛋白浓度, 各模型组均有明显升高, 两独立样本 *t* 检验显示各组间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.6 冠状动脉内膜粥样斑块检测** 造模后第 12 周, 经 Masson 染色后胶原纤维呈蓝绿色指示外膜, 平滑肌呈鲜红色指示中膜, 内弹性膜呈白色或无色, 为中膜、内膜的分界点, 正常组及各造模组切片结果见图 5。

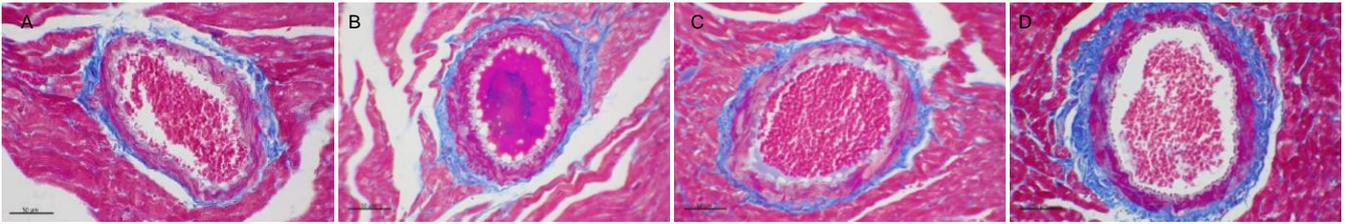


图5 各组大鼠冠状动脉内膜粥样斑块的组织形态学比较(Masson 染色, x400)

Figure 5 Histomorphological comparison of coronary atherosclerotic plaque in the intima of rats in each group (Masson staining, x400)

图注: 图 A-D 为正常组、模型组、对照组、治疗组。

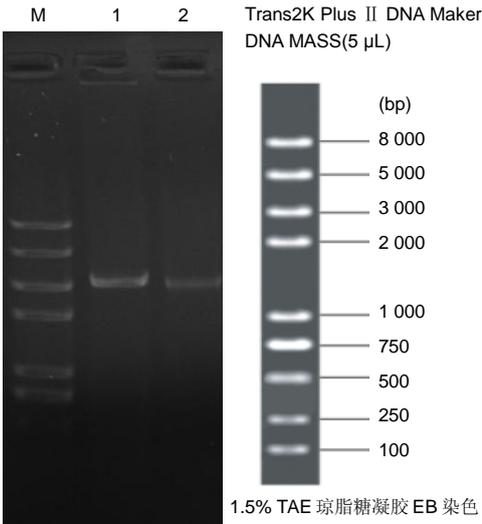


图1 AD-rklotho 病毒样品 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification results of AD-rklotho virus samples

图注: M 为 Trans2K plus marker, lane1 为 Ad-EGFP-rklotho 病毒样品原液, lane2 为 Ad-EGFP-rklotho 病毒样品 10 倍稀释液。

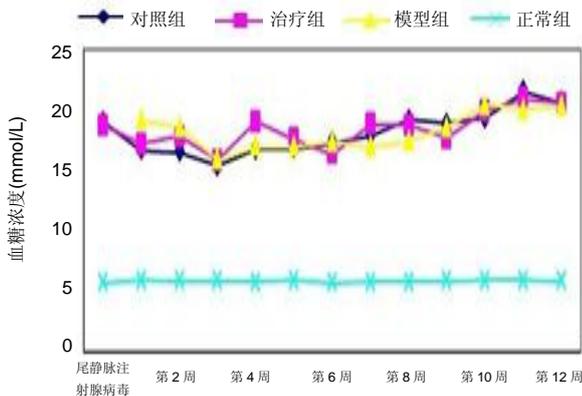


图3 各组大鼠的血糖浓度比较

Figure 3 Comparison of blood glucose concentration of rats among groups

表1 造模后第12周各组大鼠脂蛋白浓度比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=15$ , mmol/L)

Table 1 Comparison of lipoprotein concentration of rats in each group at the 12<sup>th</sup> week after modeling

指标	正常组	模型组	对照组	治疗组
高密度脂蛋白	0.67±0.06	0.47±0.10 <sup>a</sup>	0.48±0.11 <sup>a</sup>	0.61±0.06
低密度脂蛋白	0.44±0.06	0.44±0.04	0.45±0.10	0.44±0.09

表注: 与治疗组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

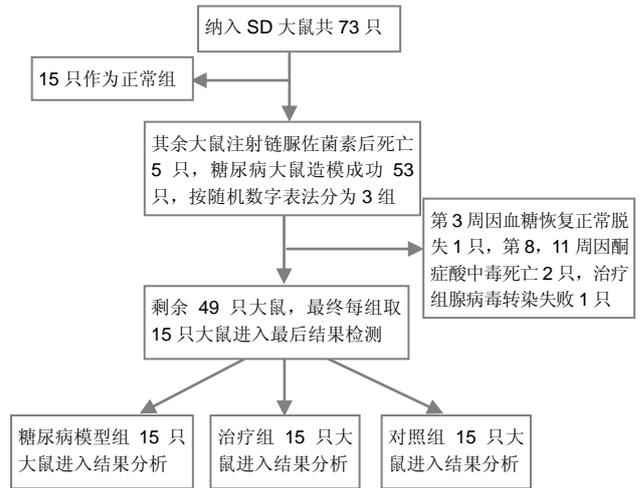


图2 大鼠造模及分组流程图

Figure 2 Flowchart of establishing diabetic rat models and grouping

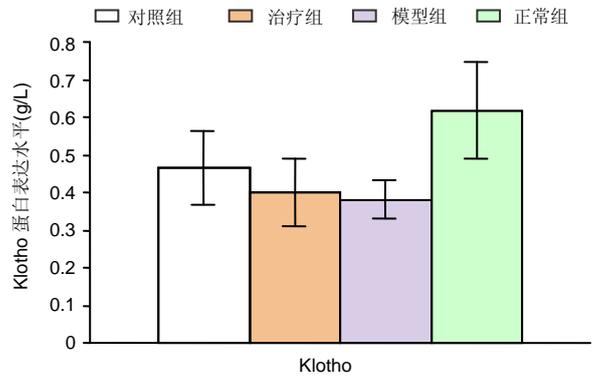


图4 各组大鼠 Klotho 蛋白表达水平比较

Figure 4 Comparison of Klotho protein expression level of rats among groups

表2 造模后第12周各组大鼠内膜厚度及内膜、中膜厚度比的比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=15$ )

Table 2 Comparison of intima thickness and intima-media thickness ratio of rats in each group at the 12<sup>th</sup> week after modeling

组别	内膜、中膜厚度比
正常组	0.238±0.062
模型组	0.316±0.037 <sup>ab</sup>
对照组	0.308±0.023 <sup>ab</sup>
治疗组	0.237±0.097

表注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与治疗组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

各造模组大鼠均可见内皮细胞下有充满脂质的泡沫细胞, 泡沫细胞体积较大, 胞浆呈空泡状, 泡沫细胞主要来源于迁入内膜的平滑肌细胞吞噬脂质形成, 此外, 内膜还可见少量淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞; 动脉血管中膜中膜层结构变疏松, 平滑肌细胞特性改变, 多位合成型细胞, 并出现细胞迁移, 全层弹性纤维减少; 外膜无明显病理性改变。正常组未见。

造模后第12周, 计算各组内膜厚度, 治疗组为(1.74±0.05) μm, 模型组为(2.15±0.05) μm, 对照组为(2.23±0.06) μm, 治疗组显著小于模型组及对照组, 经过两独立样本 $t$ 检验, 差异均有显著性意义( $P < 0.01$ ), 而模型组与对照组, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各组间中膜厚度差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

各组大鼠内膜、中膜厚度比见表2。

内膜、中膜厚度比, 治疗组分别与模型组及对照组行 $t$ 检验, 差异均有显著性意义( $P < 0.01$ ); 治疗组与正常组差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 表明KL基因导入后内膜、中膜厚度比基本接近于正常水平, 低于模型组及对照组, 内膜增厚程度减小。

### 3 讨论 Discussion

冠心病是动脉粥样硬化累及心脏动脉的结果, 血管内膜增厚狭窄或阻塞, 造成心肌供血不足而缺血缺氧或坏死, 国内冠心病发病率逐年提高, 现已成为城市及乡村人口重要死因之一<sup>[6]</sup>。随着研究深入, 冠心病的治疗手段不断创新, 但冠心病的发病因素也日趋复杂, 目前只能依靠终身服用药物对冠心病的发展进行遏制, 新的治疗如基因治疗已成为当下研究的热门。

KL基因不仅是衰老相关性基因, 与衰老相关病理改变有密切联系, 同时也通过其分子机制对个体多种代谢进行干预, 参与了冠心病、糖尿病的发生发展, 使得KL基因的研究日趋受到重视。

大鼠KL基因与人类具有同源性(81%相似), 可以作为良好的实验素材, 对临床具有相当指导性, SD大鼠又因具有较Wistar大鼠更强的抵抗力及短的生长周期而被应用于本实验。对大鼠进行实验性糖尿病造模, 采用的是经典一次性大量腹腔注射链脲佐菌素的方式, 因其对大鼠胰岛 $\beta$ 细胞具有高度选择的毒性作用<sup>[7]</sup>。一次性大量腹腔注射缩短了造模周期, 较静脉注射有更高的安全性、较低的技术难度以及更低的副作用, 较转基因及自发性糖尿病造模具有更好的稳定性, 糖尿病自发缓解概率极低, 实验中每组每周1次血糖检测, 各组间血糖水平差异无显著性意义。与目前糖尿病大鼠造模不同的是, 造模成功后各实验组继续给予高脂饮食, 使大鼠形成高脂血症, 采用含猪油、胆固醇、胆盐和丙基硫氧嘧啶的饲料, 缩短了高脂血症形成的周期(10 d左右), 且稳定性较高, 血脂水平稳定升高。这种糖尿病、高血脂的内环境, 接近冠心病

患者饮食习惯, 同时使大鼠更易在短期(< 12周)内出现动脉粥样硬化。

KL基因对动脉粥样硬化具有抑制作用已在相关动物实验中得到体现<sup>[8-11]</sup>, 本实验中对照组和模型组大鼠与正常组大鼠的KL基因表达程度差异无显著性意义, 但是出现了明显的冠状动脉粥样硬化, 表明高血糖、高血脂对动脉粥样硬化有一定促进作用。治疗组大鼠KL蛋白相对于其余各组有明显升高, 动脉内膜却无统计学意义的增厚, 可知在高血糖、高血脂的内环境下, KL基因仍能够正常表达, 且表达增强可稳定发挥其抑制动脉粥样硬化的作用。

实验除了对各组KL蛋白量、冠状动脉中膜内膜厚度比对KL基因导入效果进行评估外, 同时对动脉粥样硬化有重要影响作用的低密度脂蛋白、高密度脂蛋白进行检测。其中低密度脂蛋白结果可由以下两种因素产生: ①糖尿病使血清低密度脂蛋白水平上升。②KL基因具有多态性<sup>[12]</sup>, 其G395A的3个位点表达强弱与低密度脂蛋白高低之间存在互为因果的关系。血清高密度脂蛋白在治疗组中显现出明显增高, 根据外国学者Arking等<sup>[13-14]</sup>研究指出, KL基因等位基因的FF位点表达增强可以带来高密度脂蛋白降低以及血压升高。

本实验中KL基因治疗组高密度脂蛋白水平高于阴性对照组及模型组, 但与空白对照组相比升高幅度不大, 这种结果也可能是阴性对照组及模型组高密度脂蛋白水平下降所致, 已有研究证实在国内人口中, 63%的冠状动脉粥样硬化患者同时存在低高密度脂蛋白血症<sup>[15]</sup>。综上, KL基因对高密度脂蛋白血清水平有维持作用, 对动脉粥样硬化有直接保护作用<sup>[16-21]</sup>, 但KL基因对低密度脂蛋白的影响尚未得到有统计学意义的结果, 其对动脉粥样硬化的保护作用是否与影响低密度脂蛋白水平有关可进一步研究。

综上, KL基因导入大鼠取得的结果可为未来临床基因导入治疗提供支持, 增加KL基因的表达也能够提供稳定、长期的保护效果, 但对动脉粥样硬化形成的重要炎症介质方面的研究, 也是KL基因下一步的研究重点。

**致谢:** 感谢郑州大学基础医学院及郑州大学第一临床学院各位教授对实验给予的关注与帮助, 感谢杭州赫贝科技有限公司及全体技术人员在实验上提供的指导及支持。

**作者贡献:** 第一、二、三作者进行实验设计, 实施为第一、二作者, 评估为第四作者, 第一、二作者成文, 第一、四作者审核, 第一、二作者对文章负责。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**文章查重:** 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

**学术术语:** 基因导入的概念? 即把已知基因转移到真核细胞, 并且整合到基因组中得到稳定表达的技术。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核査。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2010; 362(17):1563-1574.
- [2] Kuro-o M, Matsumura Y, Ailawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.
- [3] Kumsu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005;309(5742):1829-1833.
- [4] Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, et al. Downregulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249(3):865-871.
- [5] Arking DE, Becker DM, Yanek LR, et al. KLOTHO allele status and risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1154-1161.
- [6] Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3): 626-630.
- [7] Raekleum N, Rackietan ML, Nadkami MR. Studies on Diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*. 1993;29:91.
- [8] 王虎林, 司良毅, 孙兰英, 等. Klotho基因G-395A多态性与动脉硬化相关性研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2008, 10(2): 96-98.
- [9] Takeshita K, Yamamoto K, Ito M, et al. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, "Klotho" mouse. *Semin Thromb Hemost*. 2002;28(6):545-554.
- [10] Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Maden C, et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab*. 2008;7(2):125-134.
- [11] Price MJ, Shah PK. New strategies in managing and preventing atherosclerosis: focus on HDL. *Rev Cardiovasc Med*. 2002;3(3):129-137.
- [12] 房晨鹏, 刘怡欣, 田鹏, 等. Klotho基因多态性与低密度脂蛋白水平的关系[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(14):2818-2820.
- [13] Arking DE, Becker DM, Yanek LR, et al. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1154-1161.
- [14] Arking DE, Atzmon G, Arking A, et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res*. 2005;96:412-418.
- [15] Wang HL, Xu Q, Wu 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. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411: 386-390.
- [16] Shu L, Chen M, Wen M, et al. Study of klotho gene transfer for the protective effect of the coronary of diabetic rats. *Pak J Pharm Sci*. 2014;27(6 Suppl):2095-2099.
- [17] Navarro-González JF, Donate-Correa J, de Fuentes M, et al. Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Heart*. 2014;100(1):34-40.
- [18] Ko GJ, Lee YM, Lee EA, et al. The association of Klotho gene polymorphism with the mortality of patients on maintenance dialysis. *Clin Nephrol*. 2013;80(4):263-269.
- [19] Tangri N, Alam A, Wooten EC, et al. Lack of association of Klotho gene variants with valvular and vascular calcification in Caucasians: a candidate gene study of the Framingham Offspring Cohort. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(12): 3998-4002.
- [20] Jo SH, Kim SG, Choi YJ, et al. KLOTHO gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean population. *Int Heart J*. 2009; 50(1):23-32.
- [21] Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, et al. The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism*. 2006;55(10): 1344-1351.