

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.15.008

文章编号: 1005-8982 (2026) 15-0046-09

实验研究·论著

骨髓间充质干细胞调控FGF23/Klotho轴对5/6肾切除大鼠肾损伤的影响*

唐玥雯, 万凤, 曹嘉巍, 杨汝春

(浙江中医药大学附属杭州市中医院 肾内科, 浙江 杭州 310007)

摘要: **目的** 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)对5/6肾切除大鼠慢性肾脏病(CKD)磷代谢紊乱的干预作用及机制。**方法** 采用5/6肾切除法复制CKD大鼠模型,随机分为对照组、5/6肾切除组和BMSCs组,每组6只。对照组行开腹探查及肾脏包膜剥离,保留双肾完整;5/6肾切除组行5/6肾切除模型+尾静脉注射等量磷酸盐缓冲液(PBS);BMSCs组行5/6肾切除模型+尾静脉注射BMSCs。检测各组大鼠肾功能及蛋白尿(血清肌酐、尿素氮、24h尿蛋白定量)、血清白蛋白、矿物代谢指标(钙、磷),以及血脂谱(总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇);酶联免疫吸附试验检测血清甲状旁腺激素(PTH)及成纤维细胞生长因子23(FGF23)水平;HE染色、Masson染色及透射电镜观察肾组织病理变化;Western blotting检测大鼠肾组织Klotho、FGF23蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链反应检测大鼠肾组织FGF23、Klotho、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a及NaPi-2c表达;采用双荧光素酶报告实验检测Klotho启动子活性,并设置GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK组、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)组及BMSCs处理组,通过Transwell非接触共培养体系干预24 h后,检测萤火虫与海肾荧光素酶比值以评估转录活性。**结果** 与对照组比较,5/6肾切除组的24h尿蛋白、血肌酐及尿素氮水平升高($P<0.05$),白蛋白水平降低($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的24h尿蛋白、血肌酐及尿素氮水平降低($P<0.05$),白蛋白水平升高($P<0.05$)。与对照组比较,5/6肾切除组的血清磷、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平升高($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的血清磷、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平降低($P<0.05$)。与对照组比较,5/6肾切除组的血清FGF23、PTH水平升高($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的血清FGF23、PTH水平降低($P<0.05$)。病理结果显示,5/6肾切除组大鼠肾组织出现肾小管损伤、间质纤维化及超微结构破坏,足突融合增加,BMSCs干预后上述病理改变减轻。与对照组比较,5/6肾切除组大鼠的FGF23蛋白相对表达量升高($P<0.05$),Klotho蛋白相对表达量降低($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的FGF23蛋白相对表达量降低($P<0.05$),Klotho蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。与对照组比较,5/6肾切除组的FGF23、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a及NaPi-2c mRNA相对表达量升高($P<0.05$),Klotho mRNA相对表达量降低($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的FGF23、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a及NaPi-2c mRNA相对表达量降低($P<0.05$),Klotho mRNA相对表达量升高($P<0.05$)。与GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK组比较,TGF- β 1组的细胞Klotho启动子相对转录活性及Klotho蛋白相对表达量降低($P<0.05$);与TGF- β 1组比较,BMSCs干预组的Klotho启动子相对转录活性及Klotho蛋白相对表达量升高($P<0.05$),BMSCs可增强Klotho启动子活性并促进其表达。**结论** BMSCs可通过调控Klotho表达,改善CKD相关的磷代谢紊乱,为CKD的干细胞治疗提供新证据。

关键词: 慢性肾脏病;骨髓间充质干细胞;成纤维细胞生长因子;Klotho;磷代谢

中图分类号: R692.5

文献标识码: A

Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate renal disease in 5/6 nephrectomized rats via regulating FGF23/Klotho axis*

收稿日期: 2026-02-26

* 基金项目: 杭州市医药卫生科技项目(A20241522);浙江省自然科学基金(Y20H050004)

[通信作者] 杨汝春, E-mail: yangruchunhz@163.com

Tang Yue-wen, Wan Feng, Cao Jia-wei, Yang Ru-chun

(Department of Nephrology, Hangzhou TCM Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310007, China)

Abstract: Objective To investigate the intervention effect and mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on phosphorus metabolism disorder in chronic kidney disease (CKD) rats with 5/6 nephrectomy.

Methods The CKD rat model was established by 5/6 nephrectomy. Rats were randomly divided into control group, 5/6 nephrectomy group and BMSCs group, with 6 rats in each group. The control group underwent laparotomy and renal capsule stripping with intact bilateral kidneys preserved; the 5/6 nephrectomy group received 5/6 nephrectomy plus tail vein injection of equal volume of phosphate-buffered saline (PBS); the BMSCs group received 5/6 nephrectomy plus tail vein injection of BMSCs. Renal function and proteinuria (serum creatinine, urea nitrogen, 24-hour urinary protein quantification), serum albumin, mineral metabolism indexes (calcium, phosphorus), and blood lipid profile (total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol) were measured in each group. Serum levels of parathyroid hormone (PTH) and fibroblast growth factor 23 (FGF23) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Renal pathological changes were observed by HE staining, Masson staining and transmission electron microscopy. The protein expressions of Klotho and FGF23 in rat renal tissues were detected by Western blotting. The mRNA expressions of FGF23, Klotho, FGFR1, FGFR4, NaPi-2a and NaPi-2c in rat renal tissues were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Klotho promoter activity was detected by dual-luciferase reporter assay. Three groups were set up: GV238-Klotho-p-Luc + pRL-TK group, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) group and BMSCs treatment group. After 24 h of intervention via Transwell non-contact co-culture system, the ratio of firefly to renilla luciferase was detected to evaluate transcriptional activity. **Results** Compared with the control group, the levels of 24-hour urinary protein, serum creatinine and urea nitrogen were increased ($P < 0.05$) and albumin level was decreased ($P < 0.05$) in the 5/6 nephrectomy group. Compared with the 5/6 nephrectomy group, the levels of 24-hour urinary protein, serum creatinine and urea nitrogen were decreased ($P < 0.05$) and albumin level was increased ($P < 0.05$) in the BMSCs group. Compared with the control group, the levels of serum phosphorus, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol were increased ($P < 0.05$) in the 5/6 nephrectomy group. Compared with the 5/6 nephrectomy group, the levels of serum phosphorus, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol were all decreased ($P < 0.05$) in the BMSCs group. Compared with the control group, serum levels of FGF23 and PTH were increased ($P < 0.05$) in the 5/6 nephrectomy group. Compared with the 5/6 nephrectomy group, serum levels of FGF23 and PTH were decreased ($P < 0.05$) in the BMSCs group. Pathological results showed that renal tubular injury, interstitial fibrosis, ultrastructural damage and increased foot process fusion occurred in the 5/6 nephrectomy group, and the above pathological changes were alleviated after BMSCs intervention. Compared with the control group, the relative protein expression of FGF23 was increased ($P < 0.05$) and the relative protein expression of Klotho was decreased ($P < 0.05$) in the 5/6 nephrectomy group. Compared with the 5/6 nephrectomy group, the relative protein expression of FGF23 was decreased ($P < 0.05$) and the relative protein expression of Klotho was increased ($P < 0.05$) in the BMSCs group. Compared with the control group, the relative mRNA expressions of FGF23, FGFR1, FGFR4, NaPi-2a and NaPi-2c were increased ($P < 0.05$) and the relative mRNA expression of Klotho was decreased ($P < 0.05$) in the 5/6 nephrectomy group. Compared with the 5/6 nephrectomy group, the relative mRNA expressions of FGF23, FGFR1, FGFR4, NaPi-2a and NaPi-2c were decreased ($P < 0.05$) and the relative mRNA expression of Klotho was increased ($P < 0.05$) in the BMSCs group. Compared with the GV238-Klotho-p-Luc + pRL-TK group, the relative transcriptional activity of Klotho promoter and the relative protein expression of Klotho were decreased ($P < 0.05$) in the TGF- β 1 group. Compared with the TGF- β 1 group, the relative transcriptional activity of Klotho promoter and the relative protein expression of Klotho were increased ($P < 0.05$) in the BMSCs treatment group. BMSCs could enhance Klotho promoter activity and promote its expression. **Conclusion** BMSCs can improve CKD-related phosphorus metabolism disorder by regulating Klotho expression, providing new evidence for stem cell therapy of CKD.

Keywords: chronic kidney disease; bone marrow mesenchymal stem cells; fibroblast growth factor 23; Klotho; phosphorus metabolism

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)在我国成人中患病率达8.2%,随着疾病进展至终末期肾病,高磷血症成为普遍且棘手的并发症^[1]。磷代谢长期紊乱可诱发全身性矿物质失衡、骨改建异常及血管钙化,不仅会增加心血管事件发生风险,更是导致CKD患者死亡的独立预测因素^[2-3]。因此,有效控制高磷血症对改善CKD患者预后至关重要。

Klotho蛋白主要表达于肾脏远端小管、甲状旁腺及脑脉络丛,是磷稳态调节的核心分子^[4]。动物实验证实,肾小管特异性敲除Klotho可导致严重高磷血症^[5-6]。临床数据亦显示,CKD患者血清Klotho水平下降与磷代谢紊乱、继发性甲旁亢及血管钙化密切相关^[7]。机制上,Klotho作为成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)的必需共受体,可增强成纤维细胞生长因子23(fibroblast growth factor 23, FGF23)的信号传导^[8]。二者在肾小管上皮细胞表面形成FGF23- α -Klotho-FGFR三元复合物,进而抑制钠-磷酸盐协同转运蛋白(sodium-phosphate cotransporter, NaPi)的功能,减少肾脏对磷酸盐的重吸收^[9]。值得注意的是,FGF23或Klotho基因缺失均可破坏机体全身磷酸盐的调节平衡,证实了二者在维持矿物质代谢平衡中存在相互依存关系^[10]。磷酸盐稳态主要依赖于NaPi-2b介导的肠道吸收与NaPi-2a/2c调控的肾脏重吸收,其中近端小管承担了绝大部分滤过磷酸盐的重吸收任务^[11]。FGF23/Klotho轴通过下调NaPi-2a/NaPi-2c表达发挥拮抗高磷血症的作用,为CKD相关矿物质代谢紊乱的治疗提供了潜在靶点。

骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)具备自我更新与多向分化潜能,且具有来源易获取、体外增殖能力强、免疫相容性良好等优势,已成为再生医学领域极具临床应用前景的候选细胞^[12]。本课题组前期研究证实,BMSCs干预后可显著降低局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)模型大鼠的血清肌酐(serum creatinine, Scr)、蛋白尿及甘油三酯水平,同时可通过调节白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达减轻肾脏局部炎症反应^[13]。尽管BMSCs已被证实可通过抗纤维化及促再生机制改善肾损伤^[14-15],但其是否能通过调控FGF23/Klotho轴改

善CKD相关高磷血症,目前尚不清楚。因此,本研究拟通过5/6肾切除复制CKD大鼠模型,探讨BMSCs对高磷血症的干预作用,并阐明其是否通过调节FGF23/Klotho信号通路恢复磷稳态。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验采用SPF级健康雄性SD大鼠。其中,4周龄大鼠用于提取原代BMSCs;6周龄(体重180~220 g)大鼠用于复制CKD模型。BMSCs的提取培养及鉴定参考文献[13]的方法。所有动物均购自浙江省医学科学院实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2020-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2016-0022]。本研究方案经浙江省医学科学院动物伦理委员会批准(ZJCLA-IACUC-20070015),并严格遵循动物福利伦理准则。采用两步法5/6肾切除术复制CKD模型^[16]:首次手术结扎并切除左肾上下极(约占左肾体积的2/3),7 d后行右肾全切术。术后4周根据24h尿蛋白定量将大鼠随机分为3组,每组6只:①对照组:仅行开腹探查及肾脏包膜剥离,保留双肾完整;②5/6肾切除组:5/6肾切除模型+尾静脉注射等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS);③BMSCs组:5/6肾切除模型+尾静脉注射BMSCs。其中,BMSCs组每只大鼠经尾静脉注射 1×10^7 个BMSCs,细胞悬液溶于500 μ L PBS中;每4周注射1次,共移植2次;对照组与5/6肾切除组大鼠经尾静脉注射等量PBS作为对照。

1.2 主要试剂与细胞

大鼠甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)、FGF23酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,FGF23多克隆抗体(YT1699)购自美国Immuno Way生物技术公司,Klotho单克隆抗体(A12028)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司,鼠抗GAPDH单克隆抗体(60004-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司,红外荧光标记的山羊抗兔/抗鼠IgG二抗(926-32214/926-68070)购自美国利科尔生物科学公司,总RNA提取试剂TRIzol™(9109)、PrimeScript™ RT试剂盒(RR036A)、SYBR® Green Master Mix(RR420A)均购自宝日生物技术(大连)有限公司,转化生长因子- β 1

(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 细胞因子 (100-21C) 购自美国派普泰克公司, Lipofectamine™ 3000 转染试剂购自美国赛默飞公司, 双荧光素酶报告检测试剂 (E1910) 购自美国普洛麦格公司, 硝酸纤维素膜购自美国 Merck Millipore 公司。HEK293T 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.3 实验方法

1.3.1 生化指标检测 于模型复制第 12 周采集大鼠腹主动脉血, 分离血清。采用全自动生化分析仪 (Hitachi 7180, 日本日立有限公司) 检测肾功能及蛋白尿 (血清肌酐、尿素氮、24h 尿蛋白定量)、血清白蛋白、矿物代谢指标 (钙、磷), 以及血脂谱 (总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇)。

1.3.2 ELISA 试验 采用 ELISA 法检测血清 PTH、FGF23 水平。严格按照试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司) 说明书操作, 使用酶标仪 (Thermo Scientific Varioskan LUX) 在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 绘制标准曲线并计算样品浓度。

1.3.3 病理染色与超微结构观察 模型复制后 12 周取大鼠肾组织。肾皮质组织经常规固定、石蜡包埋。将石蜡组织切成 2~3 μ m 厚的切片, 参照文献 [16] 的方法进行苏木精-伊红 (HE) 染色和马松 (Masson) 三色染色。染色切片使用数字扫描仪 (KF-PRO-020-HI, 宁波江峰生物科技有限公司) 扫描成像。取大小 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大鼠肾皮质样品, 进行透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 样品制备与分析。使用透射电子显微镜 (JEM-1400, 日本电子株式会社) 观察肾组织超微结构。

1.3.4 Western blotting 检测 Klotho、FGF23 蛋白表达

取大鼠肾皮质组织, 加入含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上充分研磨裂解, 4 $^{\circ}$ C 离心取上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。调整蛋白浓度一致后, 按比例加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 混匀, 沸水浴变性 10 min。取 80 μ g 总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 分别加入一抗: 兔抗 Klotho 多克隆抗体 (1:1 000 稀释)、兔抗 FGF23 多克隆抗体 (1:1 000 稀释) 及鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:5 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 随后加入红外荧光标记的山羊抗兔/抗鼠 IgG 二抗 (1:15 000 稀释), 室温避光

孵育 90 min。再次洗膜后, 使用 Odyssey CLx 成像系统 (美国利科尔生物科学公司) 扫描显影, 以 GAPDH 为内参, 采用 Image J 软件分析条带灰度值, 计算各目标蛋白的相对表达量。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 FGF23、Klotho、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a 及 NaPi-2c 表达 采用 TRIzol 试剂从肾组织中提取总 RNA, 随后使用 PrimeScript™ RT 试剂盒合成 cDNA。采用 SYBR® Green Master Mix 试剂盒, 对 Klotho、FGF23、FGFR1/4、NaPi-2a/2c 及内参基因 GAPDH 的 mRNA 表达进行定量分析。qRT-PCR 反应体系: SYBR® Green Master Mix 5 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, 无酶水 3.5 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线阶段, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量, 以 GAPDH 为内参基因。所有实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

基因	引物序列 (5'-3')	长度/bp
Klotho	正向: AACAACTTTCTTCTGCCCATTTC	24
	反向: TGAGCGGTCACCTAAGCGAAT	20
FGF23	正向: ATCAGAGGATGCTGGCTCCGTAG	23
	反向: TAGCCGTTCTCTAGCGTCCACTG	23
FGFR1	正向: ACAGACAACACCAAACCAAAAC	21
	反向: TTAATGCTCCCATACCTCGTTCTC	23
FGFR4	正向: CTAGACCTACCTCTCGATCCAC	22
	反向: CGCATATTCCACAATCACATAC	22
NaPi-2a	正向: CCTCCTCGTCAAGATGCTCAACT	23
	反向: AACACGGAAGTCTCTGGACAAC	23
NaPi-2c	正向: GTACTGCTGCCACTGGAGAATGC	23
	反向: TGGTGTGCTGCTAATGCTGCTG	23
GAPDH	正向: ACCACAGTCCATGCCATCAC	20
	反向: TCCACCACCTGTGTCTGTA	20

1.3.6 双荧光素酶报告基因实验 为探讨 BMSCs 是否通过分泌 TGF- β 1 调控 Klotho 基因转录, 构建 GV238-klotho-p-Luc 荧光素酶报告质粒 (含 Klotho 基因启动子区域)。将 GV238-klotho-p-Luc 荧光素酶报告质粒和 pRL-TK 海肾荧光素酶内参质粒按 50:1 的质量比混合, 使用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂转染至 HEK293T 细胞中。转染 6 h 后, 更换培养基。实验分组: ①GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK 组: 仅转

染质粒,无额外处理;②TGF- β 1组:转染质粒后,加入终浓度为1 ng/ μ L的重组TGF- β 1处理24 h;③BMSCs干预组:转染质粒后,加入终浓度为1 ng/ μ L的重组TGF- β 1处理,同时采用Transwell非接触共培养体系进行干预(BMSCs接种于下室,密度为 5×10^4 个/孔),共培养24 h。采用商品化双荧光素酶报告试剂盒检测系统依次检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性。以海肾荧光素酶活性作为内参,计算萤火虫/海肾的比值,代表Klotho启动子的相对转录活性。所有实验独立重复3次。

1.3.7 Western blotting检测3组细胞的Klotho蛋白表达 取1.3.6中3组处理后的细胞,采用RIPA裂解液提取总蛋白,BCA法定量后,采用Western blotting检测Klotho蛋白表达(方法同1.3.4),以GAPDH为内参进行标准化。

1.4 统计学方法

数据分析采用GraphPad Prism 9.0统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,两两比较用最小显著性差异 t 检验(LSD- t)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs改善5/6肾切除大鼠肾功能及蛋白尿

对照组、5/6肾切除组和BMSCs组大鼠的24 h尿蛋白、血肌酐、尿素氮和白蛋白水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,5/6肾切除组的24 h尿蛋白、血肌酐及尿素氮水平升高($P < 0.05$),白蛋白水平降低($P < 0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的24 h尿蛋白、血肌酐及尿素氮水平降低($P < 0.05$),白蛋白水平升高($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠肾功能及蛋白尿指标比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h尿蛋白/(g/24 h)	血肌酐/(μ mol/L)	尿素氮/(mmol/L)	白蛋白/(g/L)
对照组	9.85 $\pm$ 1.67	24.85 $\pm$ 3.57	5.93 $\pm$ 0.81	28.55 $\pm$ 0.39
5/6肾切除组	55.05 $\pm$ 43.68 ^①	59.28 $\pm$ 7.45 ^①	10.25 $\pm$ 2.04 ^①	25.48 $\pm$ 0.4 ^①
BMSCs组	18.87 $\pm$ 1.88 ^②	49.03 $\pm$ 8.35 ^②	6.93 $\pm$ 2.6 ^②	27.77 $\pm$ 0.94 ^②
F值	5.336	40.790	7.940	38.230
P值	0.020	0.000	0.004	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与5/6肾切除组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 BMSCs改善5/6肾切除大鼠钙磷代谢及脂质代谢紊乱

对照组、5/6肾切除组和BMSCs组的血清磷、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);对照组、5/6肾切除组和BMSCs组的

血清钙比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,5/6肾切除组的血清磷、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平升高($P < 0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的血清磷、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平均降低($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠钙磷代谢及脂质代谢指标比较 ($n=6, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	血清磷	血清钙	总胆固醇	甘油三酯	低密度脂蛋白胆固醇	高密度脂蛋白胆固醇
对照组	2.24 $\pm$ 0.1	2.48 $\pm$ 0.14	1.28 $\pm$ 0.11	0.54 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.1	0.81 $\pm$ 0.1
5/6肾切除组	3.06 $\pm$ 0.24 ^①	2.44 $\pm$ 0.04	2.34 $\pm$ 0.15 ^①	0.87 $\pm$ 0.14 ^①	1.66 $\pm$ 0.07 ^①	1.38 $\pm$ 0.09 ^①
BMSCs组	2.42 $\pm$ 0.55 ^②	2.51 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.41 ^②	0.57 $\pm$ 0.16 ^②	0.45 $\pm$ 0.08 ^②	1.03 $\pm$ 0.23 ^②
F值	9.047	0.817	25.090	12.580	496.200	20.950
P值	0.003	0.460	0.000	0.001	0.001	0.001

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与5/6肾切除组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 BMSCs下调血清FGF23与PTH水平

对照组、5/6肾切除组和BMSCs组的血清

FGF23、PTH水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,5/6肾切除组的血

清 FGF23、PTH 水平升高 ($P < 0.05$); 与 5/6 肾切除组比较, BMSCs 组的血清 FGF23、PTH 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 FGF23 与 PTH 水平比较
($n=6$, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	FGF23	PTH
对照组	1 175.79 $\pm$ 291.74	396.62 $\pm$ 50.59
5/6 肾切除组	1 914.88 $\pm$ 437.74 ^①	688.98 $\pm$ 231.4 ^①
BMSCs 组	597.55 $\pm$ 226.07 ^②	477.47 $\pm$ 60.28 ^②
<i>F</i> 值	23.940	6.867
<i>P</i> 值	0.000	0.008

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 5/6 肾切除组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 BMSCs 减轻肾组织病理损伤

光镜显示, 与对照组比较, 5/6 肾切除组肾小球体积增大, 系膜细胞弥漫性增生伴基质增多, 肾小球硬化、呈现局灶节段性分布, 肾间质纤维化明显; 经 BMSCs 干预后, 上述肾小球病变明显减轻, Masson 染色显示的蓝色胶原沉积面积显著减少, 提示肾间质纤维化程度得到逆转。电镜显示, 5/6 肾切除组足细胞足突呈现广泛性融合、消失, 基底膜增厚。BMSCs 治疗后, 足细胞超微结构得到显著修复, 足突融合程度明显改善, 裂孔隔膜结构趋于清晰。以上结果表明, BMSCs 不仅能改善肾功能, 还能从形态学上修复受损的肾小球及肾小管间质结构。见图 1。

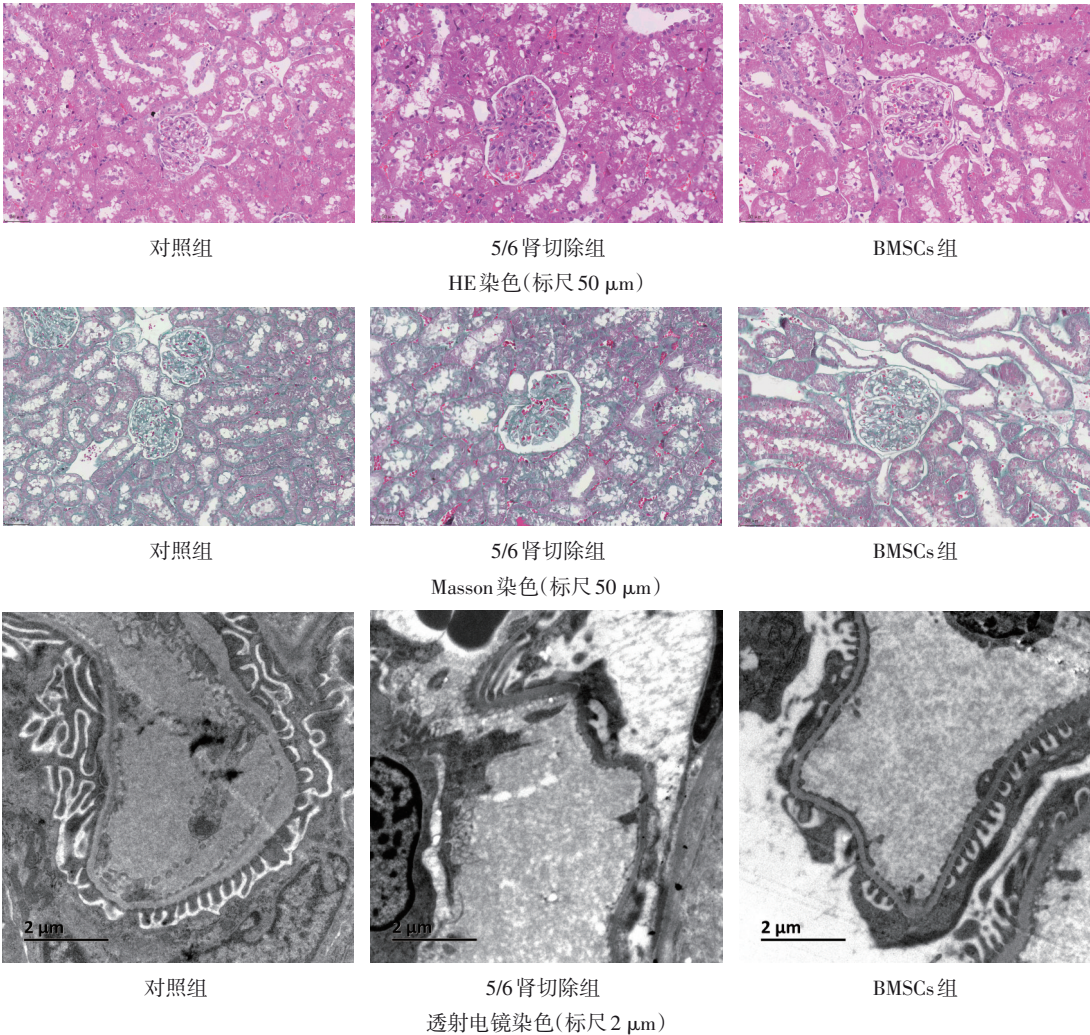


图 1 各组大鼠病理染色结果

2.5 BMSCs 调控 FGF23/Klotho 信号轴及相关磷酸转运蛋白

对照组、5/6 肾切除组和 BMSCs 组的 FGF23、

Klotho 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 5/6 肾切除组的 FGF23 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), Klotho 蛋白相

对表达量降低($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的FGF23蛋白相对表达量降低($P<0.05$),Klotho蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。见图2和表5。

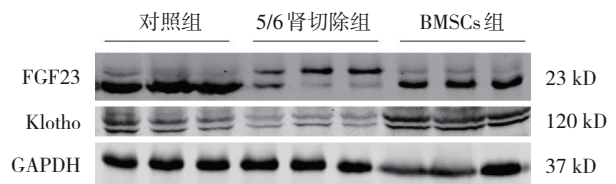


图2 各组大鼠肾组织中 FGF23 及 Klotho 蛋白表达

对照组、5/6 肾切除组和 BMSCs 组的 FGF23、Klotho、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a 及 NaPi-2c mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,5/6 肾切除组的 FGF23、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a 及 NaPi-2c mRNA 相对表达量升高($P<0.05$),Klotho mRNA 相对表达量降低

表 5 各组大鼠 FGF23、Klotho 蛋白相对表达量比较
($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	FGF23 蛋白	Klotho 蛋白
对照组	0.12 ± 0.02	0.54 ± 0.03
5/6 肾切除组	0.33 ± 0.07 ^①	0.26 ± 0.02 ^①
BMSCs 组	0.16 ± 0.03 ^②	0.56 ± 0.07 ^②
F 值	34.150	48.280
P 值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P<0.05$;②与5/6肾切除组比较, $P<0.05$ 。

($P<0.05$);与5/6肾切除组比较,BMSCs组的FGF23、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a及NaPi-2c mRNA 相对表达量降低($P<0.05$),Klotho mRNA 相对表达量升高($P<0.05$)。见表6。

表 6 各组大鼠肾组织 FGF23、Klotho、FGFR1、FGFR4、NaPi-2a、NaPi-2c mRNA 相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	FGF23	Klotho	FGFR1	FGFR4	NaPi-2a	NaPi-2c
对照组	1.09 ± 0.22	1.09 ± 0.17	0.88 ± 0.19	1.11 ± 0.43	1.07 ± 0.31	1 ± 0.27
5/6 肾切除组	2.24 ± 0.85 ^①	0.48 ± 0.2 ^①	1.85 ± 0.73 ^①	2.05 ± 0.68 ^①	1.9 ± 0.47 ^①	2.59 ± 1.08 ^①
BMSCs 组	0.72 ± 0.22 ^②	0.91 ± 0.19 ^②	0.6 ± 0.17 ^②	0.65 ± 0.21 ^②	0.97 ± 0.32 ^②	0.9 ± 0.33 ^②
F 值	13.720	17.590	12.900	13.150	11.250	12.020
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001

注: ①与对照组比较, $P<0.05$;②与5/6肾切除组比较, $P<0.05$ 。

2.6 BMSCs 通过增强 Klotho 启动子活性上调其表达

如表7所示, GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK 组、TGF-β1 组、BMSCs 干预组细胞 Klotho 启动子相对转录活性及 Klotho 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK 组比较, TGF-β1 组的细胞 Klotho 启动

子相对转录活性及 Klotho 蛋白相对表达量降低($P<0.05$);与 TGF-β1 组比较, BMSCs 干预组的 Klotho 启动子相对转录活性及 Klotho 蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。见图3。

表 7 各组细胞荧光素酶活性和 Klotho 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	启动子相对转录活性	Klotho 蛋白
GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK 组	1.87 ± 0.07	0.54 ± 0.03
TGF-β1 组	1.31 ± 0.11 ^①	0.26 ± 0.02 ^①
BMSCs 干预组	1.83 ± 0.15 ^②	0.56 ± 0.07 ^②
F 值	26.690	73.330
P 值	0.000	0.000

注: ①与 GV238-Klotho-p-Luc+pRL-TK 组比较, $P<0.05$; ②TGF-β1 组比较, $P<0.05$ 。

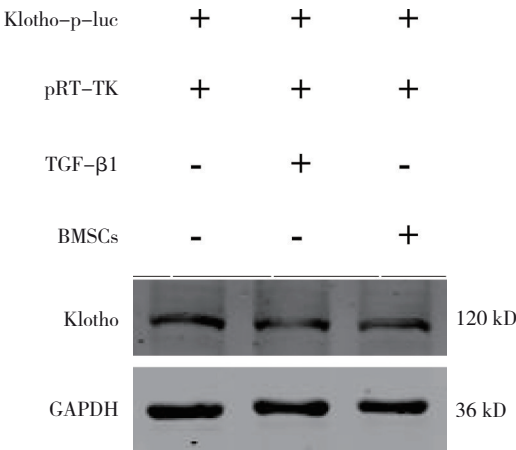


图3 各组细胞中 Klotho 蛋白表达

3 讨论

高磷血症是慢性肾脏病进展过程中最常见的并发症之一,也是加速 CKD 病程、诱发多系统损害并恶化患者预后的关键因素^[17]。Klotho/FGF23 轴是钙磷代谢调控的关键通路,生理状态下,FGF23 与 FGFR1-Klotho 受体复合物结合,协同 1,25-二羟维生素 D₃、甲状旁腺激素构成内分泌调控网络,通过抑制肾磷重吸收、调控维生素 D 代谢维持机体矿物质稳态^[8,18]。但在晚期 CKD 阶段,FGF23 水平呈指数级升高却丧失了代谢调控效能,这一“FGF23 抵抗”现象,与 Klotho 的表达缺失密切相关。Klotho 作为 FGF23 信号传导的必需共受体,其减少直接导致通路功能失活^[19]。

本研究成功复制 5/6 肾切除大鼠模型,模型大鼠呈现血清磷、FGF23 升高及肾组织 Klotho 表达下调的特征性改变,该趋势与临床 CKD 患者的代谢紊乱规律高度契合,且 Klotho 的下调与功能性肾单位的进行性丢失直接相关^[20]。多项研究已证实 BMSCs 在肾损伤中的保护作用,包括减轻 CCl₄ 诱导的肾毒性^[21]、通过 SIRT1/FOXO1 通路改善糖尿病肾病^[22],以及缓解顺铂诱导的急性慢性肾损伤^[23]。本团队前期研究亦发现,BMSCs 及其来源的外泌体可通过上调 Klotho 延缓局灶节段性肾小球硬化大鼠的肾损伤进展^[13,16]。在此基础上,本研究进一步证实,BMSCs 干预可显著改善肾功能,减轻肾组织纤维化及足细胞损伤,并有效纠正高磷血症、高 FGF23 及继发性甲旁亢。

分子机制研究表明,BMSCs 通过恢复肾脏 Klotho 表达,逆转 FGF23 的代偿性过度升高,并下调 NaPi-2a/2c 转运蛋白,从而减少磷的重吸收。本研究体外双荧光素酶报告实验揭示,BMSCs 能够通过旁分泌途径间接增强 Klotho 启动子活性,拮抗 TGF- β 1 介导的转录抑制。这提示 BMSCs 可能通过分泌特定的抗炎因子或外泌体 miRNA,解除 CKD 微环境中 Klotho 的抑制,重建 FGF23/Klotho 轴的调控功能。

本研究发现,5/6 肾切除大鼠呈现血清总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白胆固醇升高,伴高密度脂蛋白胆固醇水平异常增高的脂质代谢紊乱特征。值得注意的是,此高密度脂蛋白胆固醇升高并非保护性改变,而是 CKD 病理状态下的代偿性及功能失

调性表现^[24]:慢性炎症应激诱导肝脏 ApoA-I 合成增加以促进胆固醇逆向转运,同时肾功能不全会导致高密度脂蛋白颗粒清除障碍,最终表现为血清高密度脂蛋白胆固醇水平升高,但其抗氧化、抗炎等血管保护功能已实质受损^[25-26]。BMSCs 干预可显著降低上述各项血脂指标,使高密度脂蛋白胆固醇水平回落,提示其通过旁分泌抗炎因子、减轻全身炎症反应、调控肝脏脂代谢基因表达等多种途径^[13,16,27-28],有效纠正了 CKD 相关的脂质代谢紊乱及高密度脂蛋白功能障碍。

Klotho 作为经典的抗衰老蛋白与肾脏保护因子,其表达自 CKD 早期即开始下调,且下调程度与疾病分期及进展密切相关^[29-30]。近年来的研究证实,通过间充质干细胞干预提升 Klotho 表达,是 CKD 治疗的潜在有效策略^[31-32]。本研究的发现进一步丰富了该领域的证据体系,初步揭示了 BMSCs 通过上调 Klotho 表达调控 FGF23-Klotho 轴的作用路径。然而本研究仍存在一定局限性:其一,未采用示踪技术明确 BMSCs 在大鼠体内的定植部位与分布特征,无法进一步阐明其发挥作用的靶器官特异性;其二,缺乏 Klotho 基因敲除大鼠模型,未能直接验证 BMSCs 的肾脏保护效应与 Klotho 表达之间的因果关系,尚未阐明 BMSCs 调控 Klotho 表达的具体分子靶点与信号通路,相关精准分子机制仍需后续研究深入探索。

综上所述,本研究揭示了 BMSCs 通过上调 Klotho 重建 FGF23/Klotho 轴,从而改善 CKD 磷代谢紊乱及脂质代谢异常的新机制。这为理解 CKD-MBD 的发病机制提供了新视角,也为基于 BMSCs 的 CKD 靶向治疗策略开发提供了实验依据。

参 考 文 献:

- [1] Wang L M, Xu X, Zhang M, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: results from the sixth China chronic disease and risk factor surveillance[J]. JAMA Intern Med, 2023, 183(4): 298-310.
- [2] Wagner C A. The basics of phosphate metabolism[J]. Nephrol Dial Transplant, 2024, 39(2): 190-201.
- [3] Raju S, Saxena R. Hyperphosphatemia in kidney failure: pathophysiology, challenges, and critical role of phosphorus management[J]. Nutrients, 2025, 17(9): 1587.
- [4] Liu M J, Zhou X, Xu H, et al. Association between pan-immune-inflammation value and Serum Klotho levels: a cross-sectional analysis of renal function mediation[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1567367.
- [5] Wang Q X, Wang S, Sun Z J. Kidney-specific Klotho gene

- deletion causes aortic aneurysm via hyperphosphatemia[J]. Hypertension, 2021, 78(2): 308-319.
- [6] Grigore T V, Zuidschewoude M, Olauson H, et al. Lessons from klotho mouse models to understand mineral homeostasis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2024, 240(10): e14220.
- [7] Stabouli S, Leifheit-Nestler M, Föller M, et al. Growth hormone treatment associates with improved circulating anti-aging protein klotho and reduced arterial stiffness in children with CKD[J]. Clin Kidney J, 2025, 18(9): sfaf231.
- [8] Edmonston D, Grabner A, Wolf M. *FGF23* and klotho at the intersection of kidney and cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2024, 21(1): 11-24.
- [9] Kritmetapak K, Kumar R. Phosphatonins: from discovery to therapeutics[J]. Endocr Pract, 2023, 29(1): 69-79.
- [10] Bajt P, Racetin A, Kelam N, et al. Expression of *FGF23* and α -KLOTHO in normal human kidney development and congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) [J]. Biomolecules, 2025, 15(6): 811.
- [11] Wagner C A, Egli-Spichtig D, Rubio-Aliaga I. Updates on renal phosphate transport[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2025, 34(4): 269-275.
- [12] Hu C L, Xu T, Xu H L, et al. Ononin promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells survival via *SIRT6/Nrf2* signaling for myocardial infarction repair[J]. Phytomedicine, 2026, 150: 157514.
- [13] Yang R C, Zhu X L, Wang J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells attenuate the progression of focal segmental glomerulosclerosis in rat models[J]. BMC Nephrol, 2018, 19(1): 335.
- [14] Oka M, Kameishi S, Cho Y K, et al. Clinically relevant mesenchymal stem/stromal cell sheet transplantation method for kidney disease[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2023, 29(2): 54-62.
- [15] 高和平, 米焱, 王彩丽, 等. 人脐带间充质干细胞对糖尿病肾病大鼠肾脏 HIF-1 α 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(9): 39-49.
- [16] Wan F, Yang R C, Tang Y W, et al. BMSC-derived exosomes protect against kidney injury through regulating klotho in 5/6 nephrectomy rats[J]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 118.
- [17] Cupisti A, Giannese D, Cozzolino M, et al. Dietary phosphorus and metabolic health in CKD and ESKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2025, 20(9): 1289-1298.
- [18] Perret P L, Kim J H, Winkler A, et al. Dysregulated klotho and *FGF23* signalling aggravates vascular remodelling in age-related pulmonary hypertension[J]. Cardiovasc Res, 2026, 122(6): 764-777.
- [19] Wang S S, Xu Q, Zhang Y, et al. The *FGF23* - klotho axis promotes microinflammation in chronic kidney disease[J]. Cytokine, 2024, 184: 156781.
- [20] Chen Y F, Min J, Wu M X, et al. Therapeutic effect of the compound *Centella asiatica* in patients with stages 4-5 CKD and its influence on serum α -Klotho and *FGF23* levels[J]. Clin Tradit Med Pharmacol, 2025, 6(1): 200202.
- [21] Adel A, Abdul-Hamid M, Abdel-Kawi S H, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce CCl_4 -induced kidney injury and fibrosis in male Wistar rats[J]. Ren Fail, 2024, 46(2): 2319330.
- [22] Liu H H, Wang J, Yue G R, et al. Placenta-derived mesenchymal stem cells protect against diabetic kidney disease by upregulating autophagy-mediated *SIRT1/FOXO1* pathway[J]. Ren Fail, 2024, 46(1): 2303396.
- [23] Tang M, Shen L G, Tang M Z, et al. Human mesenchymal stromal cells ameliorate cisplatin-induced acute and chronic kidney injury via TSG-6[J]. Stem Cells, 2024, 42(9): 848-859.
- [24] Liang K, Kim C H, Vaziri N D. HMG-CoA reductase inhibition reverses LCAT and LDL receptor deficiencies and improves HDL in rats with chronic renal failure[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(3): F539-F544.
- [25] Pavanello C, Ossoli A. HDL and chronic kidney disease[J]. Atheroscler Plus, 2023, 52: 9-17.
- [26] Yang H C, Fogo A B, Kon V. Kidneys: key modulators of high-density lipoprotein levels and function[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016, 25(3): 174-179.
- [27] Pura L, Putri R D, Prahmana M A, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatory agents in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Cells, 2025, 14(17): 1313.
- [28] 石文杰, 郑佳新. 间充质干细胞及其外泌体在慢性肾脏病中的研究进展[J]. 临床个性化医学, 2026, 5(1): 102-109.
- [29] Hajare A D, Dagar N, Gaikwad A B. Klotho antiaging protein: molecular mechanisms and therapeutic potential in diseases[J]. Mol Biomed, 2025, 6(1): 19.
- [30] Edmonston D, Fuchs M A A, Burke E J, et al. Klotho and clinical outcomes in CKD: findings from the chronic renal insufficiency cohort (CRIC) study[J]. Am J Kidney Dis, 2024, 84(3): 349-360.e1.
- [31] Franco M L, Beyerstedt S, Rangel É B. Klotho and mesenchymal stem cells: a review on cell and gene therapy for chronic kidney disease and acute kidney disease[J]. Pharmaceutics, 2021, 14(1): 11.
- [32] Deng X H, Wu Z C, Sun Q, et al. The effects of Klotho delivering mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles on acute kidney injury[J]. J Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 427.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 唐玥雯, 万凤, 曹嘉巍, 等. 骨髓间充质干细胞调控 FGF23/Klotho 轴对 5/6 肾切除大鼠肾损伤的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2026, 36(15): 46-54.

Cite this article as: Tang Y W, Wan F, Cao J W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate renal disease in 5/6 nephrectomized rats via regulating FGF23/Klotho axis[J]. China Journal of Modern Medicine, 2026, 36(15): 46-54.