

<원 저>

Cisplatin 유도 급성신부전에서 Klotho 단백질의 발현

박소라[†] · 김태원[†] · 김영중 · 김현태 · 류시윤 · 정주영*

충남대학교 수의과대학

(접수: 2014년 6월 14일, 수정: 2014년 10월 24일, 게재승인: 2014년 11월 5일)

Localization of Klotho in cisplatin induced acute kidney failure

So-Ra Park[†], Tae-Won Kim[†], Young-Jung Kim, Hyun-Tae Kim, Si-Yun Ryu, Ju-Young Jung*

Department of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received: June 14, 2014; Revised: October 24, 2014; Accepted: November 5, 2014)

Abstract: Klotho deficiency is an early event in acute kidney injury (AKI) that exacerbates acute kidney damage. The present study explored the expression of Klotho and inflammation related factors in cisplatin-induced AKI. Rats (n = 18) were treated with cisplatin intraperitoneal injection (5 mg/kg) or left untreated as controls (n = 6), then sacrificed at 5 (n = 6) and 10 days (n = 6) after cisplatin injection, the serum kidney enzymes and kidney cell apoptosis were significantly increased. Moreover, the expression of Klotho was decreased when compared to the control group, especially in the cortex and outer medulla regions. In contrast, inflammation related signals including nuclear factor kappa B, tumor necrosis factor- α , and tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis were enhanced. However, 10 days after cisplatin injection, Klotho expression was enhanced upon both IHC and Western blot analysis, with slightly recovered renal function and decreased apoptosis. Furthermore, inflammation related signals expression was decreased relative to the 5 days group. Overall, this study confirmed the opposite expression patterns between Klotho and inflammation related signals and their localization in cisplatin-induced AKI kidney.

Keywords: acute kidney injury, inflammatory cytokine, Klotho, localization

서 론

급성신부전(Acute Kidney Injury; AKI)은 콩팥 혈류의 감소, 사구체신염, 약물 부작용 등 여러 인자로 인하여 발생하며 콩팥 관형 세포와 세뇨관 사이질 염증의 빠른 악화로 인한 세뇨관 손상 및 신기능의 저하를 보이며 산화 스트레스에 의한 콩팥 세뇨관 세포의 사멸을 특징으로 한다 [16].

시스플라틴(cisplatin)은 여러 종류의 암에 널리 사용되는 항암제 중 하나로 뛰어난 항암효과를 가지고 있지만 과 투여 시 보이는 이독성(ototoxicity) 및 콩팥 독성 등으로 인해 그 사용에 주의를 요구하고 있다 [3]. 시스플라틴 유래 부작용 중 급성신부전은 가장 높은 빈도를 보이며, 사이질 세포(interstitial cell) 염증과 유리기(free radical)로 인한 세뇨관 손상을 일으키고, tumor necrosis factor(TNF) 계열의 인자와 이들의 생물학적 활성인자인 nuclear factor-kappa B(NF-

κ B)가 관여하여 세뇨관 세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려졌다 [1, 13]. 최근에는, TNF 계열의 사이토카인(cytokine)인 TNF-like weak inducer of apoptosis(TWEAK)가 수용체인 Fn14와 상호작용하여 콩팥 사이질에 염증을 유도하여 급성신부전의 진행에 관여하는 것으로 보고되었다 [9].

Klotho는 노화 방지와 연관이 있는 단백질로 수명, 불임증, 동맥경화증, 골다공증, 피부 위축 등의 퇴행성 질병과 관련이 있으며 타 장기보다 콩팥에서 주로 발현되는 것으로 알려졌다 [10, 13]. 최근에는 이러한 Klotho의 발현이 콩팥 손상 시 감소하는 양상을 나타내는 것으로 보고되었으며 이러한 경향은 만성신부전 동물모델에서도 확인되었다 [4, 7, 8, 11, 19]. 또한 노화에 따른 콩팥 손상 모델에서도 활성산소의 증가와 함께 Klotho의 발현이 감소하는 것으로 보고된 바 있다 [21]. 이처럼 콩팥 손상과 Klotho의 발현 정도에 대한 연구는 보고된 바 있지만 콩팥 손상 시 손상 부위와 관련하

*Corresponding author

Tel: +82-42-821-8899, Fax: +82-42-821-7926

E-mail: jyjung@cnu.ac.kr

[†]The first two authors contributed equally to this work.

여 Klotho와 사이토카인의 콩팥 내 발현 위치에 따른 연구는 알려지지 않았다. 따라서 본 실험을 통해 시스플라틴으로 유발된 급성신부전에서 면역염색과 Western blot을 통해 Klotho와 급성신부전의 진행에 관여하는 사이토카인인 TNF- α , NF- κ B, TWEAK의 발현 위치 및 부위별 발현 양상에 대해 알아보려고 한다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서는 4주령 된 SPF Sprague-Dawley 수컷 래트(오리엔트바이오, 대한민국) 18마리를 1주간 순화한 후 사용하였으며, 적절한 온도, 습도 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$, 12시간 광주기) 하에 사료와 식수는 자유롭게 제공되었으며 모든 동물은 충남대학교 실험동물센터에서 사육되었다. 순화과정을 거친 래트는 군당 6마리씩 세 개의 군으로 나누었다. 첫 번째 군은 대조군으로 증류수를 복강 내 투여한 후 5일 뒤에 부검을 하였고, 두 번째와 세 번째 군은 시스플라틴(5 mg/kg; Sigma, USA)을 복강 내 주입한 각각 5일과 10일 뒤에 부검을 하였다. 모든 실험은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 수행되었다.

콩팥 기능 측정

래트의 미정맥을 통해 채혈한 후 4°C 에서 30분간 거치한 후 $2,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리했다. 수거한 혈청을 자동혈청분석기를 이용하여 혈청 내의 혈중 요소질소 수치와 크레아티닌 수치를 분석하였다(IDEXX Laboratories, USA).

조직보존

부검에 앞서 래트의 마취를 위해 Tiletamine과 Zolazepam의 합제(30 mg/kg; Virbac, Carros, FRA)를 복강 투여한 후 복대동맥을 통한 PBS 관류로 방혈을 마친 후 periodate lyine paraformaldehyde(PLP)로 5분간 관류하여 콩팥을 고정하였다. 적출된 콩팥을 1~2 mm의 시상 절편으로 잘라 4°C PLP에서 하루 동안 후 고정 뒤 조직 탈수과정을 거쳐 polyester wax로 포매한 후 microtome을 이용하여 $5 \mu\text{m}$ 로 박절하여 슬라이드 절편을 만들어 면역염색과 H&E 염색에 사용하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL) 염색

ApoTag Peroxidase In situ Apoptosis Detection kit (Millipore, USA)를 이용하여 TUNEL 염색을 하였다. 조직 절편은 자일렌을 통해 polyester wax를 제거하였고, 단계 농도별 알코올을 이용하여 함수시킨 후 proteinase-K(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Millipore, USA)를 15분간 처리하여 PBS로 2회 씻어낸 후 equilibration buffer를 10초간, working-strength TdTenzyme를 37°C 에서 1시간 동안 처리하였다. 추후 stop-

wash buffer를 10분간 처리하여 반응을 멈추고, PBS로 씻어낸 뒤 anti-digoxigenin-peroxidase로 30분간 처리 후 3,3'-diaminobenzidin(DAB)을 이용해 발색하였다. 발현의 분석은 광학현미경(Nikon eclipse 80i; Nikon, Japan)을 이용하여 100배 확대한 후 조직의 겉질(cortex), 바깥속질(outer medullar), 속속질(inner medullar)에서 각각 염색된 세포 수 대 총 세포 수의 비율을 계산하여 측정하였다.

면역조직화학염색

조직 절편을 자일렌을 이용하여 polyester wax를 제거하고 농도별 알코올을 이용하여 함수시킨 후 0.5% 트리톤 X-100에 30분간 처리하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 비특이성 결합부위는 PBS와 1:10으로 희석된 말 혈청(normal horse serum) 또는 염소 혈청(normal goat serum)을 1시간 처리하여 차단한 후 Klotho(1:100; Abcam, UK), TNF- α (1:50; Abcam), TWEAK(1:50; Abcam), NF- κ B(1:300; Abcam)를 4°C 에서 하루 동안 처리하였다. 추후 2차 항체(anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG; Abcam) 처리 과정을 거친 뒤 DAB로 발색하고 봉입 과정을 거쳐 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

Western blot 분석

콩팥 부위별 분석을 위하여 적출한 콩팥을 겉질, 바깥속질, 속속질의 부위별로 나눈 조직 샘플을 이용하여, 용해 buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM sodium chloride, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate 및 0.1% sodium dodecyl sulfate, with a protease inhibitor cocktail)를 통해 만들어진 단백질 샘플은 Bradford assay로 정량하여 실험에 사용하였다. 단백질 샘플은 6~15%의 SDS-polyacrylamide gels을 사용하였고, nitrocellulose membrane을 이용하여 전사하였다. 전사된 막(membrane)은 5% skim milk (TBS-T)로 비특이성 단백질을 차단하였고 각각의 1차 항체 TNF- α (1:500), TWEAK(1:300), NF- κ B(1:1000), Klotho(1:500)를 4°C 에서 하루 동안 처리하였다. TBS-T로 세척한 막에 2차 항체(anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG)를 1시간 처리한 뒤, 항체와 결합한 막을 chemiluminescence system (Bio-Rad Laboratories, USA)으로 측정, Image Lab software (Bio-Rad Laboratories)로 분석하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 mean values \pm standard error of the mean(SEM)으로 나타내었으며 통계 분석은 Dunnett-test를 따르는 one-way ANOVA를 사용하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 일 경우 유의한 차이가 있는 것으로 평가하였다.

결 과

콩팥 기능 평가

각 군의 혈청 혈중요소질소(blood urea nitrogen)와 크레아

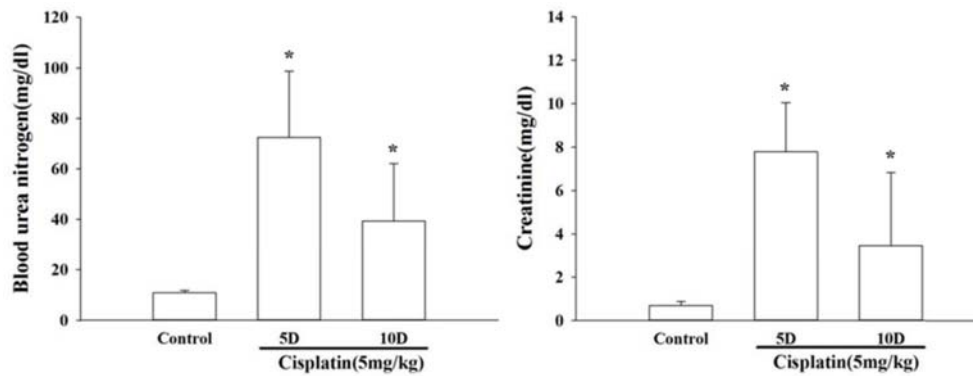


Fig. 1. The levels of plasma blood urea nitrogen and Creatinine concentration after cisplatin injection (5 mg/kg). The rats (n = 6/group) were sacrificed 5 (5D) and 10 days (10D) after cisplatin (5 mg/kg) intraperitoneal injection. Values are expressed as mean \pm SEM of 3~4 independent experiments, * p < 0.05, a significant difference in comparison with the control group.

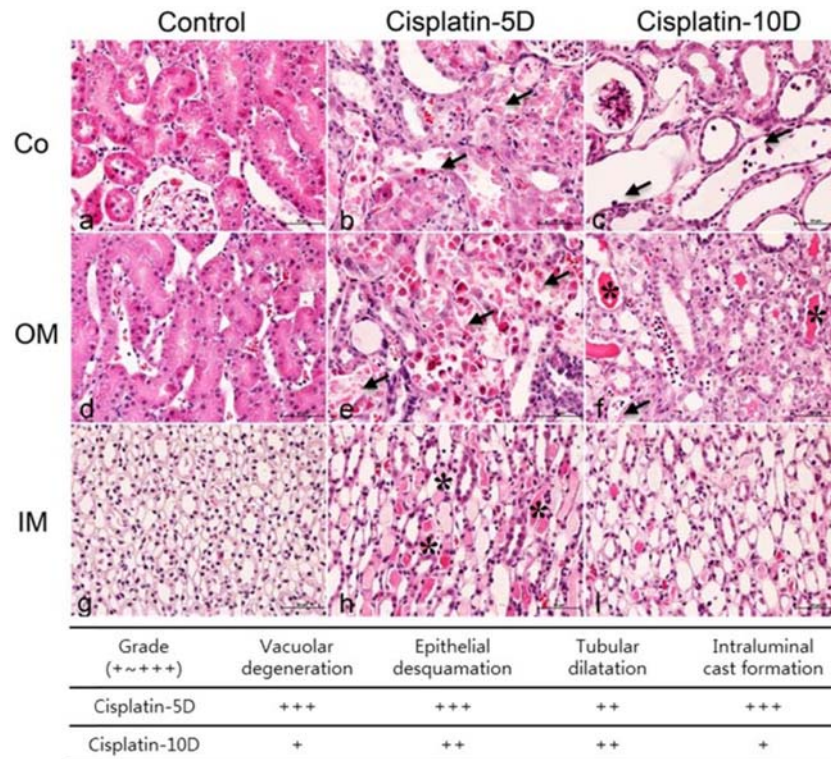


Fig. 2. Hematoxylin & Eosin stained kidney tissue from the cisplatin injected rat ($\times 400$). The rats (n = 6/group) were sacrificed 5 (5D) and 10 days (10D) after cisplatin (5 mg/kg) intraperitoneal injection. The control group showed the normal morphology with well-preserved brush border membranes. In the 5D group, distinctive tubular epithelial desquamation (arrow) and intraluminal cast formation (*) were observed. In 10 days after cisplatin treated group, histopathological alterations were ameliorated than that of the 5 days group. Co: cortex, OM: outer medulla, IM: inner medulla. Scale bar = 50 μ m.

티닌(creatinine)의 농도는 Fig. 1에서와 같이 나타났다. 시스플라틴 투여 후 5일이 경과한 군의 혈중요소질소와 혈청 크레아티닌의 수치는 72.50 ± 26.1 mg/dL과 7.78 ± 0.91 mg/dL, 10일이 경과한 군에서는 39.38 ± 22.58 mg/dL과 3.46 ± 1.37 mg/dL로 대조군과 비교했을 때 유의성 있게 증가했으나, 시스플라틴 투여 후 10일째에는 5일째와 비교하여 약 50%의 수치가 감소해서 대조군과 비교하여 유의성이 있을 뿐 5일

째와는 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다.

콩팥 조직의 병리조직학적 형태의 변화는 H&E 염색으로 확인하였다 (Fig. 2). 대조군의 콩팥 조직은 정상인 조밀한 세포질과 함께 정상인 형태를 보였으나, 시스플라틴 투여 후 5일이 지난 콩팥에서 겉질과 바깥속질 부위에서 세뇨관의 팽창, 표피의 박리, 사멸 세포 등을 관찰할 수 있으며, 속속질에서는 내강의 폐색이 나타났다. 이러한 형태적 변화는 시스

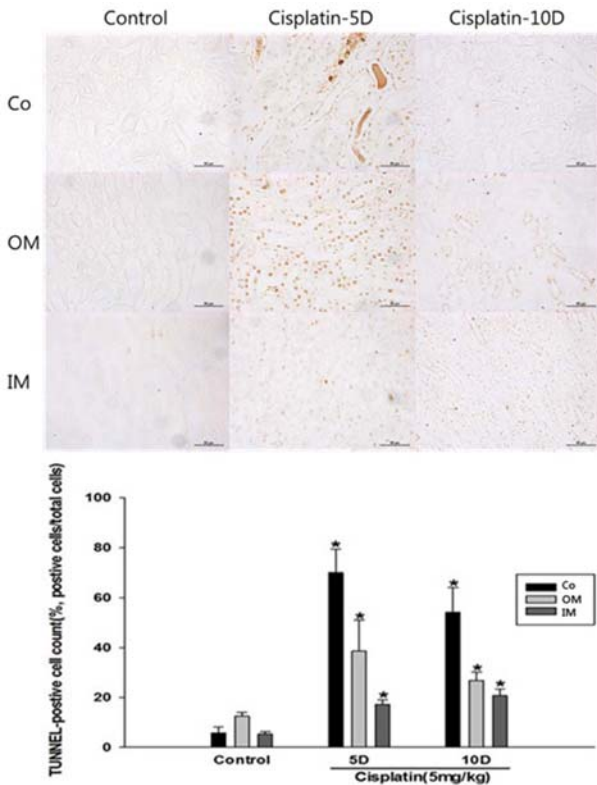


Fig. 3. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) stained tissue from the cisplatin injected rat ($\times 400$). The rats ($n = 6/\text{group}$) were sacrificed 5 (5D) and 10 days (10D) after cisplatin (5 mg/kg) intraperitoneal injection. In the control group, TUNEL-positive cells were rarely expressed, whereas in the 5D group, TUNEL-positive cell was increased in all region including, Co, OM, and IM if compared to the control group. In the 10D group, the expression of TUNEL positive cells were decreased in Co and OM region compared to 5D group without significant differences. Scale bar = 50 μm .

플라틴 투여 후 10일이 경과한 조직에서는 5일의 조직에 비해 적게 관찰되었다.

대조군의 콩팥에서 TUNEL 양성세포, 즉 자가사멸한 세포는 겉질, 바깥속질, 속속질의 전 부위에서 거의 찾아볼 수 없었다. 시스플라틴 투여 후 5일째 조직에서는 겉질과 바깥속질에서 TUNEL 양성세포 수가 크게 증가했다. 반면, 시스플라틴 투여 후 10일이 지난 콩팥에서는 그 양상이 감소하였으며 특히, 바깥속질 부위에서 현저한 감소세를 보였으나 5일이 지난 군과 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 3; $p > 0.05$).

Klotho와 NF κ B, TNF α , TWEAK의 발현

Klotho의 발현을 면역조직화학염색과 Western blot을 통하여 발현 부위별 차이를 알아보았다. 면역염색 상에서 정상 콩팥의 Klotho는 주로 겉질 부위에서 발현하며, 먼쪽곱슬세관(distal convoluted tubule)과 연결세관(connecting tubule)에서 발현하는 것을 확인하였고 속속질 부위의 집합관 세포(collecting duct)에서도 발현됨을 확인하였다(Fig. 4). 이러한

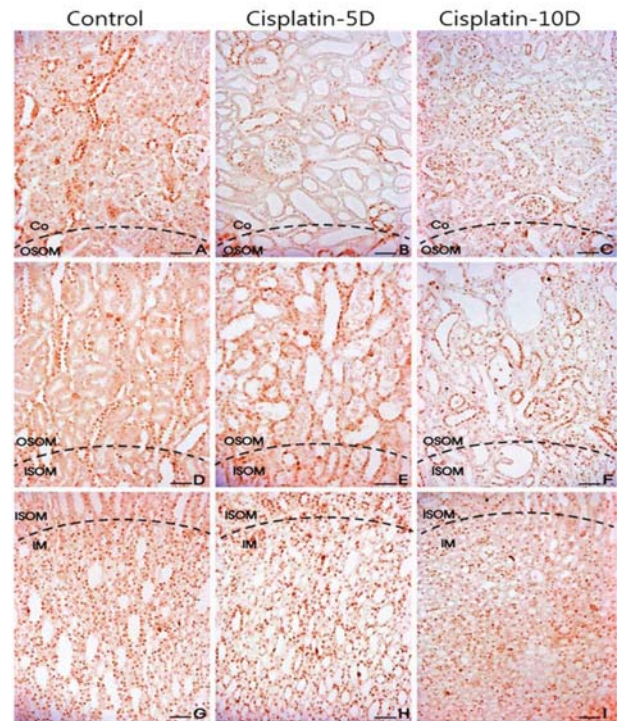


Fig. 4. Immunohistochemical staining for the Klotho expression in the cisplatin-treated rat kidney ($\times 200$). The rats ($n = 6/\text{group}$) were sacrificed 5 (5D) and 10 days (10D) after cisplatin (5 mg/kg) intraperitoneal injection. The positive stained cell was decreased in the 5D group at Co, OM, and IM region. In the 10D group, decreased expression was slightly recovered compared to the 5D group. OSOM: outer strip outer medulla, ISOM: inner strip outer medulla. Scale bar = 100 μm .

발현은 시스플라틴 투여 후 5일째에 대조군과 비교하면 겉질 부위의 먼쪽곱슬세관과 연결세관에서 감소하며 속속질 부위의 집합관 세포에서도 감소하는 것을 확인하였다. 핵에 집중되어 있던 염색상이 얼어짐을 관찰할 수 있었고 시스플라틴 투여 10일 후의 조직에서는 5일째의 조직에서 감소했던 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. Western blot에서도 부위에 따른 차이는 있었지만 시스플라틴 투여 후에 Klotho의 발현이 감소했음을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 그러나 겉질과 바깥속질에서는 Klotho의 발현이 감소하였지만 속속질 부위는 시스플라틴 투여 후 5일이 지난 콩팥에서 그 발현이 감소하지 않았다.

NF- κ B, TNF- α , TWEAK는 Klotho와는 반대의 발현 양상을 나타냈다. Klotho의 발현과는 다르게 대조군의 먼쪽곱슬세관과 연결세관에서 발현이 크게 나타나지 않았다. 면역염색에서 NF- κ B는 시스플라틴 투여 후 5일이 된 콩팥의 토리곱슬세관(proximal convoluted tubule)의 핵에서 그 염색상을 관찰할 수 있었으며 TNF- α 는 대조군에서 토리곱슬세관의 세포질의 기저막(basal membrane)에서 발현이 나타났다. 또한 시스플라틴 투여 5일째에서 가장 높은 염색상을 나타냈다. 10일째에서는 5일째보다 발현이 감소했다. TWEAK은 대조군의 시스플라틴 투여 5일째와 투여 10일째

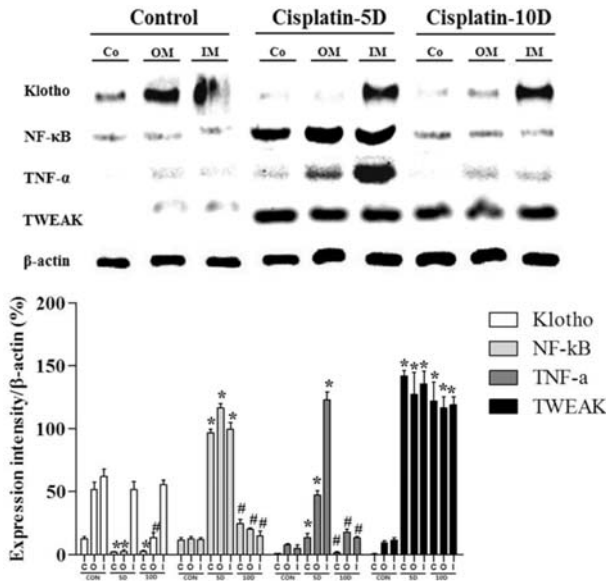


Fig. 5. Western blot analysis for the Klotho, NF- κ B, TNF- α and TWEAK expression in the cisplatin-treated rat kidney. The rats ($n=6$ /group) were sacrificed 5 (5D) and 10 days (10D) after cisplatin (5 mg/kg) intraperitoneal injection. Values are expressed as mean \pm SEM for triplicate experiments, * $p < 0.05$, a significant difference in comparison with the control group, # $p < 0.05$, a significant difference in comparison with the 5D group.

의 발현에서 차이는 보이지 않았으나, 토리쪽곱슬세관의 핵에서 대조군보다는 발현이 증가했으며(Fig. 6), Western blot 결과에서도 사이토카인의 발현은 시스플라틴 투여 후 5일째에 증가하며 10일째에는 감소하는 양상을 보였다. 세부 부위별로 살펴보면 NF- κ B는 시스플라틴 투여 5일째의 전 부위에서 많이 증가했고, TNF- α 는 시스플라틴 투여 5일째 군에서 겉질보다 바깥속질과 속속질에서 증가하였고 10일째에 비교적 감소하는 것으로 나타났다. 하지만, TWEAK의 발현은 시스플라틴 투여 5일째에 전 부위에서 증가하였으며, 증가한 발현양상은 시스플라틴을 투여한 뒤 5일과 10일이 지난 콩팥에서 유의성이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

고 찰

과량의 시스플라틴은 세뇨관 세포에 직접 손상을 입혀 산화스트레스를 유발하고 활성산소를 증가시켜 세포사멸을 일으키며 연쇄적인 염증 반응에 의한 콩팥 손상으로 신부전을 발생시키는 것으로 알려졌다 [1, 12]. 본 실험에서는 혈중요소질소와 크레아티닌의 농도를 측정하여 콩팥 기능의 저하 여부를 확인하였다. 혈중요소질소와 크레아티닌은 콩팥의 상태를 나타내는 지표로, 혈중요소질소는 7~21 mg/dL, 크레아티닌은 0.7 ± 0.13 mg/dL의 정상범위를 가진다. 콩팥 손상으로 인하여 사구체 여과율과 콩팥 혈류가 감소하면 혈중요소질소와 혈청 크레아티닌의 수치는 증가하게 된다. 본 실험에서 시스플라틴 투여 후 5일이 경과한 군의 혈중요소질소과

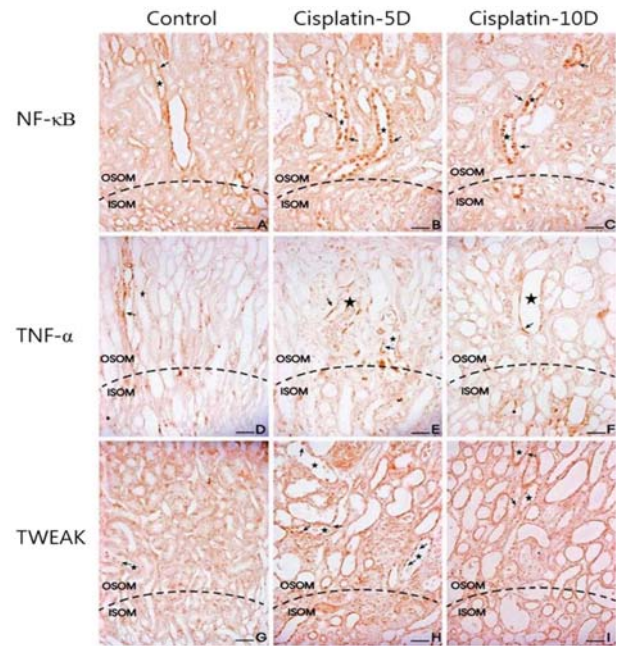


Fig. 6. Immunohistochemical staining for the NF- κ B, TNF- α and TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) expression in the cisplatin-treated rat kidney ($\times 200$). The rats ($n=6$ /group) were sacrificed 5 (5D) and 10 days (10D) after cisplatin (5 mg/kg) intraperitoneal injection. Positive stained cell (arrows) was shown in the proximal tubules (star) from the S3 segments of proximal tubules of OSOM. Scale bar = 100 μ m.

크레아티닌의 수치는 대조군과 비교했을 때 각각 7배가량 증가하였다. 또한 시스플라틴 투여 후 5일째의 조직에서 병리조직학적인 변화와 함께 자가사멸한 세포를 H&E와 TUNEL 염색을 통해서 확인하였다. 위와 같은 손상은 시스플라틴 투여 후 10일이 지난 조직을 통해 그 손상이 감소하였음을 확인하였다.

최근 연구에 따르면 Klotho의 발현은 허혈로 인한 콩팥 손상 시 급격하게 감소하였다가 손상이 회복됨에 따라 복구되는 것으로 밝혀졌다 [5]. 이렇듯 Klotho가 콩팥 손상과 회복 시 빠르게 반응하여 발현이 감소했다가 증가하는 특성으로 말미암아 콩팥 손상의 지표로 활용하는 방법도 연구 중이다 [6]. 또한 허혈 모델에서 Klotho가 콩팥 세포의 자가사멸을 줄여주는 것으로 밝혀졌으며 Klotho를 제거한 마우스에서 콩팥에 손상을 주었을 경우 그 손상의 정도가 wild-type에 비해 크게 나타나는 것으로 Klotho의 손상에 따른 보호 효과적인 측면 또한 연구되고 있다 [14, 20]. Klotho는 정상적으로 콩팥의 세뇨관 세포에서 발현된다고 알려졌으며 정상 콩팥의 먼쪽곱슬세관에서 높게 발현하고, 토리쪽곱슬세관에서는 상대적으로 낮게 발현하는 것으로 보고된 바 있다 [6]. 본 실험에서 면역염색실험 결과, Klotho의 발현은 겉질의 연결세관, 먼쪽곱슬세관 및 토리 일부에서도 나타남을 확인하였으며, 바깥속질과 속속질의 집합관 세포에서도 발현이 나타났다. 하지만 Western blot의 결과상 속속질 부위의 Klotho의 발현은 시스플라틴 투여 후에도 감소하지 않았다.

이는 정상적으로 요가 농축되는 속속질 부위의 특성상 정상 상태에서도 삼투로 인한 지속적인 손상을 받고 있어 Klotho의 발현이 다른 부위와는 다르게 발현이 된 것으로 추측된다.

급성신부전에서 시스플라틴은 TNF- α 와 같은 사이토카인을 유도하며 [15, 17], 세포의 분화, 증식을 조절하는 TWEAK 및 NF- κ B와 세뇨관 세포에 작용하여 콩팥 손상을 일으킨다고 알려졌다 [4, 9, 17, 18]. 또한, 염증으로 인한 콩팥의 손상 시 TWEAK와 TNF- α 가 NF- κ B를 통해 콩팥의 Klotho를 감소시킨다는 연구가 보고된 바 있다 [13]. 본 실험을 통해서 면역염색과 Western blot을 통한 단백질 발현 양상을 관찰한 결과, Klotho 발현은 사이토카인의 발현 양상과 반대의 경향을 나타낸다는 이전의 연구와 일치하는 것을 확인하였다. 또한 면역염색상에서 시스플라틴의 특징적인 손상 부위인 바깥속질 바깥줄무늬의 토리쪽곱슬세관 토리쪽3분절 부위(s3 segment of proximal tubule in the outer stripe of outer medulla)에서 염증성 사이토카인의 발현이 가장 활발함을 확인하였으며, 염증성 사이토카인은 Klotho의 발현이 감소한 5일째에 증가하고 손상이 수복된 것으로 추정되는 10일째에는 그 발현이 감소하였다. TWEAK는 TNF와 기능적인 측면은 유사하지만 TNF에 비해 상대적으로 더 넓게 발현되는 것으로 알려졌다 [2]. 본 실험에서 5일째에 증가한 TWEAK의 발현은 10일째 군에서도 그 발현이 지속되었다.

본 연구를 통해, 시스플라틴에 의한 콩팥 손상 시 발생하는 염증 반응과 Klotho 발현 양상은 관련이 있으며, 손상이 생긴 후 수복됨에 따라 손상 부위에서의 Klotho 발현이 부위별로 복구되는 것을 확인하였다. 추후 Klotho의 발현 기전에 대한 추가 연구를 통해 콩팥 손상에 따른 방어기전으로서 Klotho의 새로운 시각을 제공할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 충남대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

1. Arjumand W, Seth A, Sultana S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2011, **49**, 2013-2021.
2. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 1997, **272**, 32401-32410.
3. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* 2003, **10**, 257-266.
4. Gao HX, Campbell SR, Burkly LC, Jakubowski A, Jarchum I, Banas B, Saleem MA, Mathieson PW, Berman JW, Michaelson JS, Putterman C. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells. *Cytokine* 2009, **46**, 24-35.
5. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013, **180**, 47-63.
6. Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2012, **5**, 423-429.
7. Izquierdo MC, Perez-Gomez MV, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, Poveda J, Moreno JA, Egido J, Ortiz A. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27** (Suppl 4), iv6-10.
8. Izquierdo MC, Sanz AB, Sánchez-Niño MD, Pérez-Gómez MV, Ruiz-Ortega M, Poveda J, Ruiz-Andrés O, Ramos AM, Moreno JA, Egido J, Ortiz A. Acute kidney injury transcriptomics unveils a relationship between inflammation and ageing. *Nefrologia* 2012, **32**, 715-723.
9. Justo P, Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Winkles JA, Lorz C, Egido J, Ortiz A. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int* 2006, **70**, 1750-1758.
10. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997, **390**, 45-51.
11. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**, 2505-2512.
12. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2010, **2**, 2490-2518.
13. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramirez R, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal Klotho expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol* 2011, **22**, 1315-1325.
14. Panesso MC, Shi M, Cho HJ, Paek J, Ye J, Moe OW, Hu MC. Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2014, **85**, 855-870.
15. Ramesh G, Reeves WB. TNFR γ -mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, **285**, F610-618.
16. Remuzzi G, Ruggenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* 1997, **51**, 2-15.
17. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2008, **19**, 695-703.
18. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, Ortiz A. TWEAK activates the non-canonical NF κ B pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS One* 2010, **5**, e8955.
19. Schmitt R, Cantley LG. The impact of aging on kidney repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, **294**, F1265-1272.

20. **Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, Mitobe M, Nishimura S, Shirota S, Akiba T, Nihei H.** Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20**, 2636-2645.
21. **Zuo Z, Lei H, Wang X, Wang Y, Sonntag W, Sun Z.** Aging-related kidney damage is associated with a decrease in klotho expression and an increase in superoxide production. *Age* 2011, **33**, 261-274.