

MST1 启动子区 DNA 低甲基化在 ApoE^{-/-} 小鼠肾损伤中的作用

卢冠军¹, 马胜超², 和杨杨², 徐灵博², 毛彩艳², 郭伟², 张辉², 王艳华², 田珏², 杨晓玲², 姜怡邓²

(1. 宁夏医科大学总医院泌尿外科, 2. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 哺乳动物不育系 20 样激酶 1; 肾损伤; DNA 甲基化; 载脂蛋白 E; ApoE^{-/-} 小鼠

[摘要] **目的** 探讨哺乳动物不育系 20 样激酶 1 (MST1) 及其 DNA 甲基化在载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠肾损伤中的作用及意义。**方法** 实验动物分为 2 组: (1) ApoE^{-/-} 组 ($n=10$): 雄性 ApoE^{-/-} 鼠饲以高蛋白饮食; (2) 对照组 ($n=10$): 雄性 C57BL/6J 鼠饲以高蛋白饮食。喂养 14 周后, 全自动生物化学分析仪测定小鼠血清肌酐和尿素氮水平; PAS 染色及透射电子显微镜观察小鼠肾脏组织损伤情况; 实时定量 PCR 及 Western blot 分别检测小鼠肾脏中 MST1 mRNA 和蛋白表达水平。巢式甲基化特异性 PCR (nMS-PCR) 检测小鼠肾脏 MST1 DNA 甲基化水平。**结果** 与对照组比较, ApoE^{-/-} 组血清肌酐和尿素氮分别升高了 1.1 倍和 1.6 倍 ($P<0.01$); PAS 染色和透射电镜结果显示, ApoE^{-/-} 组较对照组肾脏明显损伤; ApoE^{-/-} 小鼠肾脏 MST1 表达分别与血清肌酐和尿素氮水平呈正相关 ($R^2=0.7571, P=0.0012$; $R^2=0.7342, P=0.0015$); nMS-PCR 结果显示, ApoE^{-/-} 组肾脏中 MST1 DNA 甲基化水平较对照组显著降低 ($P<0.01$)。**结论** MST1 表达上调可能在 ApoE^{-/-} 小鼠肾损伤中发挥重要作用, 而 MST1 启动子区 DNA 低甲基化改变可能是 MST1 表达上调的重要机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of DNA Low Methylation in MST1 Promoter Region on Kidney Damage in ApoE^{-/-} Mice

LU Guan-Jun¹, MA Sheng-Chao², HE Yang-Yang², XU Ling-Bo², MAO Cai-Yan², GUO Wei², ZHANG Hui², WANG Yan-Hua², TIAN Jue², YANG Xiao-Ling², and JIANG Yi-Deng²

(1. Department of Urology, the Affiliated General Hospital, 2. Basic Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Mammalian Sterile 20-like Kinase 1; Kidney Damage; DNA Methylation; Apolipoprotein E; ApoE^{-/-} Mice

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and significance of mammalian sterile 20-like kinase 1 (MST1) and its DNA methylation in the kidney damage of apolipoprotein E gene knocked-out (ApoE^{-/-}) mice. **Methods** The experimental animals were divided into 2 groups: (1) ApoE^{-/-} group ($n=10$): male ApoE^{-/-} mice were fed with high methionine diet; (2) Control group ($n=10$): male C57BL/6J mice were fed with high methionine diet. After 14 weeks of feeding, serum creatinine and urea nitrogen levels in mice were determined by full automatic biochemical analyzer. PAS staining and transmission electron microscope were used to observe the renal tissue damage in mice. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression levels of MST1 mRNA and protein in mice kidney. MST1 DNA methylation level in mice kidney was detected by nested methylation specific PCR (nMS-PCR). **Results** Compared with the control group, serum levels of creatinine and urea nitrogen were increased by 1.1 times and 1.6 times in ApoE^{-/-} group ($P<0.01$). PAS staining and transmission electron microscopy showed that the kidney was obviously damaged in ApoE^{-/-} group compared with control group. In ApoE^{-/-} mouse kidney, MST1 expression was positively correlated with serum creatinine and urea nitrogen levels ($R^2=0.7571, P=0.0012$; $R^2=0.7342, P=0.0015$). The result of nMS-PCR showed

[收稿日期] 2016-05-03

[修回日期] 2016-06-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81560120、81360027); 宁夏回族自治区自然科学基金项目 (NZ15066、NZ15209); 宁夏教育厅项目 (NGY2014089)

[作者简介] 卢冠军, 硕士, 副教授, 研究方向为慢性肾病表观遗传学分子机制, E-mail 为 290277855@qq.com。马胜超, 博士, 讲师, 研究方向为同型半胱氨酸致动脉粥样硬化机制, E-mail 为 solarmsc@163.com。通讯作者姜怡邓, 博士, 教授, 研究方向为表观遗传学分子机制, E-mail 为 jydcan@126.com。

that renal MST1 DNA methylation level in ApoE^{-/-} group was significantly lower than that in control group ($P < 0.01$).

Conclusions The upregulation of MST1 expression may play an important role in kidney damage of ApoE^{-/-} mice. DNA low methylation in MST1 promoter region may be an important mechanism of MST1 expression upregulation.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是血清脂蛋白的重要组成部分,在脂质的运输和代谢中发挥着重要作用^[1],临床及流行病学研究显示高脂血症是慢性肾脏病发生发展的独立危险因素,脂代谢紊乱可通过诱导系膜扩张、氧化应激、炎症激活等多种途径介导肾脏损伤^[2]。研究表明,脂质肾毒性的机制主要为高脂血症损伤肾小球上皮细胞和系膜细胞,从而引起足细胞融合、系膜细胞内脂质沉积、细胞外基质增加,而进一步加重肾脏损伤^[3]。学者前期研究观察到, ApoE 基因敲除 (ApoE gene knocked-out, ApoE^{-/-}) 小鼠饲以高蛋氨酸饮食后不仅诱发严重的高脂血症而促进动脉粥样硬化发生^[4],还伴有小鼠肾脏基底膜损伤^[5],但肾脏损伤的分子机制尚不明确。哺乳动物不育系 20 样激酶 1 (mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1) 是酵母 Ste20 激酶在哺乳动物体内的同源蛋白,具有高度的保守性,在细胞增殖和凋亡过程中发挥重要的调控作用,研究显示, MST1 信号通路的激活与肾脏损伤关系密切,并在糖尿病肾病患者血清中证实 MST1 表达升高明显^[6],但 MST1 与肾脏损伤的关系尚不明确。DNA 甲基化作为表观遗传学的重要调控方式,可以维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育以及肿瘤形成^[7]。有文献证实 DNA 甲基化水平变化在肾脏损害中起到重要作用^[8],但其是否影响 MST1 启动子区甲基化水平目前仍不清楚。因此,本研究主要探讨 MST1 在高脂介导 ApoE^{-/-} 鼠肾损伤中的作用及其启动子区 DNA 甲基化的调控机制,为探讨脂代谢紊乱相关的肾损害机制及预防提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

德国 Siemens 2400 全自动生物化学分析仪及试剂盒; BS110S 型精密天平 (Sartorius, 德国); Milli-QA10 型纯水仪 (Millipore, 美国); 透射电子显微镜 (Olympus, 日本); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 5415D 型微量台式离心机 (Eppendorf, 德国); 垂直电泳仪和全自动酶标仪 (Bio-Rad, 美国); 实时定量 PCR 仪 (Funglyn, 上海)。总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生物技术有限公司); 逆转录和

实时定量 PCR 试剂盒 (Thermo, 美国); 蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒 (南京凯基有限公司); MST1 兔抗人、鼠一抗 (Abcam, 英国); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (北京博奥森生物技术有限公司)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 动物分组及饲养

实验动物由北京大学实验动物中心提供。(1) ApoE^{-/-} 组: 10 只 5 周龄雄性纯合子 ApoE^{-/-} 鼠, SPF (specific pathogen free) 级近交系 C57BL/6J, 正常饮食中添加 1.7% 高蛋氨酸饲料; (2) 对照组: 10 只性别、年龄与 ApoE^{-/-} 鼠匹配的雄性鼠, SPF 级 C57BL/6J, 正常饮食中添加 1.7% 高蛋氨酸饲料。两组小鼠均在 SPF 环境分笼饲养, 使用高压灭菌垫料, 饲养笼及饮水瓶每周消毒, 室内温度 20~25℃, 相对湿度为 55%~65%, 明暗交替各 12 h, 换气次数 18 次/小时, 饲养房内定期紫外灯消毒并自由摄食和饮水, 饲养 14 周后进行后续实验。

1.3 血清生物化学指标检测

取标本前小鼠禁食 12 h, 称重, 按每 100 g 体重腹腔注射 2 mL 20% 乌拉坦麻醉, 眼球摘除取血分离血清, 应用德国 Siemens 2400 全自动生物化学分析仪测定血清中血脂、肌酐和尿素氮等水平。

1.4 PAS 染色观察肾脏组织结构改变

过碘酸雪夫氏染色 (periodic acid-Schiff staining, PAS 染色) 操作如下: 肾组织用 Carnoy 液固定, 常规脱水包埋。石蜡切片脱蜡入蒸馏水后用自来水冲洗 3 min, 再用蒸馏水浸洗 2 次。置于阿里新兰溶液中, 室温放置 7 min, 自来水冲洗 1 次, 再用蒸馏水浸洗 2 次。置于过碘酸溶液中, 室温阴暗处浸染 20 min, 自来水冲洗 10 min。置于 Schiff 试剂中, 染核 2 min, 自来水冲洗 15 min, 双蒸水清洗使其返蓝。逐级常规乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固。

1.5 透射电镜观察肾脏组织亚细胞结构

取 1 mm×1 mm×1 mm 新鲜肾组织, 分别用戊二醛、锇酸固定, 乙醇、丙酮脱水, 包埋剂浸透, 树脂与硬化剂等包埋, 超薄切片机切片, 枸橼酸铅双染色后电镜下观察。

1.6 实时定量 PCR 检测 MST1 mRNA 水平

按提取说明书提取肾脏组织中总 RNA, 逆转录合成 cDNA。采用 Primer 5.0 软件设计引物, MST1:

上游 5'-GGGTCCCAGTAGCCAAGAT-3', 下游 5'-GAGGCACCACATACCATTCA-3'; GAPDH: 上游 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游 5'-CTG-GAAGGTGGACAGCGACG-3'。PCR 条件: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 20 s, 72℃ 延长 30 s, 扩增 45 个循环。反应结束后, 根据扩增曲线数据, 按照计算公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析 MST1 的表达量。

1.7 Western blot 检测 MST1 蛋白表达

细胞裂解法提取组织及细胞总蛋白, 取两组总蛋白各 10 μL, 120 V 70 min 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, MST1 20 V 恒压转膜 30 min, 以 β-actin 为内参, 15 V 恒压转膜 10 min, 经 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 与 MST1 特异性一抗 4℃ 孵育过夜, 与二抗室温孵育 2 h。使用凝胶成像分析仪分析 MST1 与 β-actin 的灰度值, 并根据二者的比值, 进行分析。

1.8 巢式甲基化特异性 PCR 检测 MST1 启动子区 DNA 甲基化水平

按 DNA 提取试剂盒说明书提取两组小鼠肾脏全基因组 DNA, 亚硫酸盐修饰法对全基因组 DNA 进行甲基化修饰。巢式甲基化特异性 PCR (nested methylation-specific PCR, nMS-PCR) 检测 MST1 (NC_000075.6) 启动子区 DNA 甲基化程度的改变。针对 MST1 启动子区, 设计外引物及两对内引物: 外引物: 上游 5'-TGTTTGGAGGAGGTTTGATTTATAT-3', 下游 5'-ATCCCAATACTACCTCTCCCTATTC-3'; 甲基化引物: 上游 5'-GTGGTTAAGGATGTTAAGGGTAGC-3', 下游 5'-CTAACTATAAACCGAACGAATTCGA-3'; 非甲基化引物: 上游 5'-TGGTTAAGGATGTTAAGGGTAGTGT-3', 下游 5'-TAACTATAAACCAACAAAT-TCAAT-3'。扩增反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s, 20 个循环, 每个循环降 0.5℃ 至 56℃, 72℃ 7 min。以外引物的 PCR 产物为模板, 进行内引物的扩增, 反应条件同外引物。取 5 μL PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 用凝胶成像分析仪分析甲基化条带及非甲基化条带的光密度 (optical density, OD), 按如下公式进行计算: 甲基化水平 = 甲基化 OD 值 / (甲基化 OD 值 + 非甲基化 OD 值) × 100%。

1.9 数据处理与分析

采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学处理。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 相关分析采用 Pearson 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠血脂水平

为验证小鼠是否发生高脂血症, ApoE^{-/-}小鼠饲以高蛋白饮食后, 检测血清中血脂含量。结果显示, ApoE^{-/-}组中甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 水平比对照组显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平则下降了 73.4%, 与对照组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$; 表 1)。提示 ApoE^{-/-}小鼠饲以高蛋白饮食后发生了明显的脂代谢紊乱。

表 1. 两组血脂水平比较 (n = 10, mmol/L)
Table 1. Comparison of blood lipid levels in the two groups (n = 10, mmol/L)

分组	LDL	HDL	TG	TC
对照组	0.39±0.05	1.28±0.16	0.22±0.03	2.19±0.18
ApoE ^{-/-} 组	1.46±0.53 ^a	0.34±0.05 ^a	1.86±0.49 ^b	19.84±3.62 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 小鼠血清肌酐和尿素氮水平

为证实不同基因型小鼠在相同环境中肾脏功能损伤程度是否不同, 检测小鼠血清中肌酐和尿素氮水平。结果显示, 与对照组比较, ApoE^{-/-}组小鼠血清中肌酐和尿素氮水平分别升高了 1.1 倍和 1.6 倍, 差异具有显著性 ($P < 0.05$; 表 2)。提示脂质代谢紊乱可引起肾脏功能损伤, 但具体机制有待研究。

表 2. 两组血清肌酐和尿素氮水平比较 (n = 10, mmol/L)
Table 2. Comparison of serum creatinine and urea nitrogen levels in the two groups (n = 10, mmol/L)

分组	肌酐	尿素氮
对照组	8.750±0.256	25.370±1.084
ApoE ^{-/-} 组	14.110±0.819	31.640±1.665
P 值	0.019	0.043

2.3 PAS 染色检测肾小球基底膜的变化

PAS 染色结果显示, 对照组小鼠肾小球基底膜清晰、粗细均匀, 肾小球血管袢薄而清晰; ApoE^{-/-}组小鼠肾小球均不同程度地呈现基底膜粗细不均, 系膜增生, 并可见 PAS 阳性物质沉积, 提示 ApoE^{-/-}小鼠肾小球损伤 (图 1)。

2.4 小鼠肾小球基底膜及足细胞超微结构的变化
为了明确脂代谢异常对小鼠肾脏的损伤作用, 利

用透射电子显微镜观察了肾小球基底膜和足细胞突触的形态结构。对照组肾小球基底膜光滑清晰、薄厚均匀,足细胞突触完整,次级足突形状规则,与基底膜链接紧密,排列整齐。ApoE^{-/-}组肾小球基底膜出现

薄厚不均,足细胞次级足突融合,并有局灶性倒伏(红色箭头所示),同时在毛细血管中有大量脂类物质聚集,堵塞管腔(黄色箭头所示),提示脂质代谢紊乱可诱导 ApoE^{-/-}小鼠肾脏损伤(图 2)。

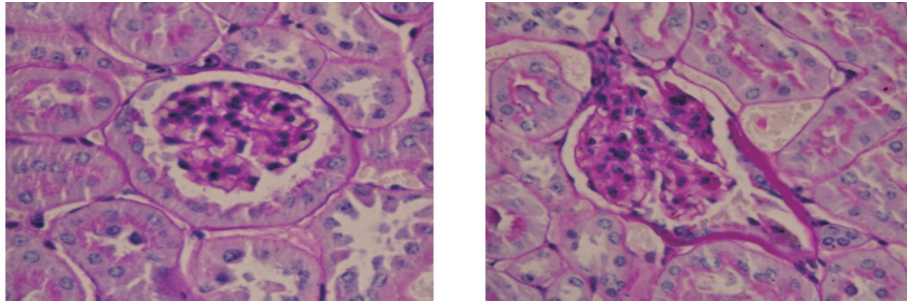


图 1. PAS 染色检测小鼠肾小球基底膜的改变(400×) 左图为对照组,右图为 ApoE^{-/-}组。

Figure 1. Changes of glomerular basement membrane detected by PAS staining in mice (400×)

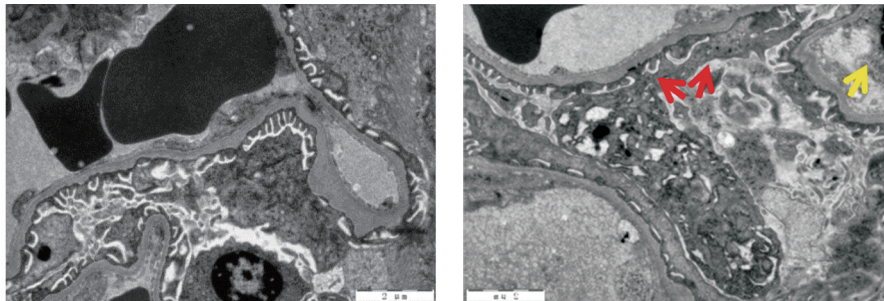


图 2. 电镜观察小鼠肾小球基底膜和足细胞超微结构的变化(20000×) 左图为对照组,右图为 ApoE^{-/-}组。

Figure 2. Ultrastructural changes of glomerular basement membrane and podocyte observed by electron microscope in mice (20000×)

2.5 小鼠肾脏中 MST1 的表达

为研究 MST1 在高脂介导肾损伤中的作用,比较了两组小鼠肾脏中 MST1 的表达。结果显示, ApoE^{-/-}组小鼠肾脏中 MST1 mRNA 表达水平明显升高,是对照组的 3.39 倍($P<0.01$);同时,Western blot 可见两组小鼠中 MST1 蛋白表达趋势与其 mRNA 一致,与对照组比较, ApoE^{-/-}组 MST1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$;图 3)。提示 MST1 的表达上调可能在高脂介导的 ApoE^{-/-}小鼠肾脏损伤中发挥着重要的作用。

2.6 ApoE^{-/-}小鼠肾脏中 MST1 的表达与血清中肌酐和尿素氮的相关性分析

为了进一步验证 ApoE^{-/-}小鼠 MST1 与肾脏损伤的相关性,对肾脏中 MST1 表达与血清肌酐和尿素氮水平进行了相关性分析。结果显示, ApoE^{-/-}小鼠肾脏 MST1 表达分别与血清肌酐和尿素氮水平呈正相关($R^2=0.7571, P=0.0012$; $R^2=0.7342, P=0.0015$;

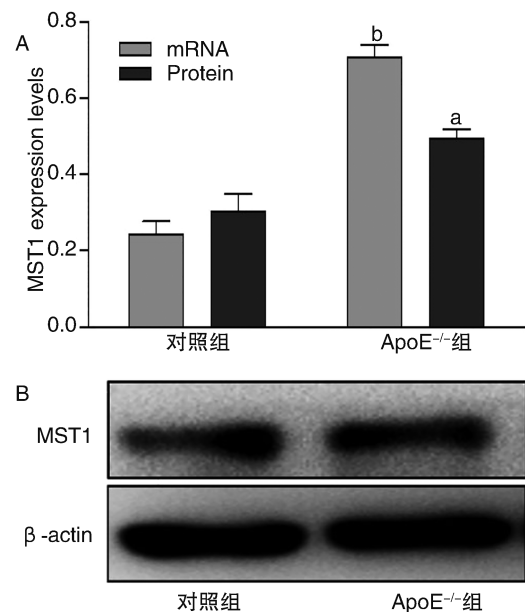


图 3. 小鼠肾脏 MST1 的表达 A 为实时定量 PCR 检测小鼠肾脏 MST1 mRNA 表达, B 为 Western blot 检测小鼠肾脏 MST1 蛋白表达。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 3. The expression of MST1 in kidney of mice

图 4)。提示 ApoE^{-/-}小鼠肾脏 MST1 表达水平与肾脏损伤密切相关。

2.7 小鼠肾脏 MST1 启动子区 DNA 甲基化水平

为了进一步探讨脂代谢紊乱致肾损伤中影响 MST1 表达的机制,用 nMS-PCR 分别检测了小鼠肾脏 MST1 启动子区 DNA 甲基化水平。结果显示,与

对照组比较,ApoE^{-/-}组小鼠肾脏 MST1 启动子区 DNA 甲基化水平下降了 13.5%,差异具有显著性($P<0.01$;图 5)。提示 MST1 启动子区 DNA 甲基化在 ApoE^{-/-}小鼠肾脏 MST1 表达水平改变中可能发挥着关键的作用。

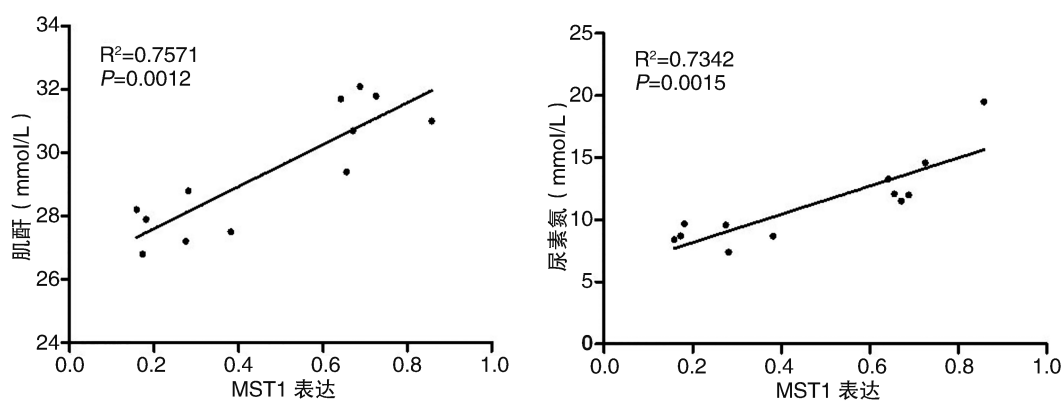


图 4. ApoE^{-/-}小鼠肾脏 MST1 表达与血清肌酐及尿素氮水平的相关性分析
Figure 4. Correlation analysis between renal MST1 expression and serum creatinine, urea nitrogen levels in ApoE^{-/-} mouse

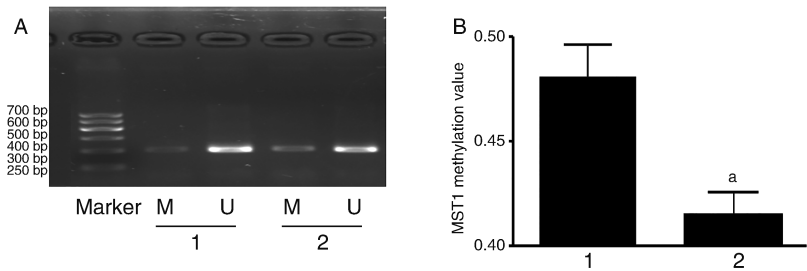


图 5. 小鼠肾脏 MST1 DNA 甲基化水平 A 为甲基化电泳图,B 为甲基化统计结果。M 为甲基化,U 为非甲基化。1 为对照组,2 为 ApoE^{-/-}组。a 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 5. The MST1 DNA methylation value in kidney of mice

3 讨论

载脂蛋白 E 是一种富含精氨酸的多态性蛋白,参与机体内脂蛋白的转化与代谢过程,可以调节多种生物学功能^[9]。研究发现,ApoE^{-/-}小鼠与野生型小鼠比较,由于富含胆固醇的脂蛋白清除障碍,而使得血清胆固醇水平较高^[10]。本文在前期研究的基础上,用高蛋氨酸饮食饲养 ApoE^{-/-}小鼠复制高脂血症小鼠模型,证实脂质转运和代谢障碍可引起肾脏损伤,并进一步探讨脂质代谢紊乱致肾损伤的相关分子机制。

研究发现,脂代谢紊乱诱导的肾损伤主要病理表现为肾小球硬化、肾小管间质纤维化等^[11]。本研

究采用全自动生物化学仪检测小鼠血清中肌酐和尿素氮水平,透射电镜及 PAS 染色观察肾小球、基底膜等的改变,结果发现,ApoE^{-/-}组小鼠血清肌酐和尿素氮水平分别升高了 1.1 倍和 1.6 倍,且肾小球均不同程度地呈现基底膜粗细不均,系膜增生,同时在毛细血管中有大量脂类物质聚集,堵塞管腔。临床研究提示,脂代谢紊乱是肾脏疾病进程中常见的并发症,而且还可加重原有肾脏损害,尤其是顽固性高脂血症,与肾脏疾病的预后具有明显的相关性^[12]。但是,目前脂代谢紊乱致肾脏损伤的具体作用机理尚未得到完全阐明。

MST1 属于人丝氨酸/苏氨酸激酶,在体内普遍表达,研究表明 MST1 在调节胚胎生长发育、细胞迁

移和分化、维护免疫系统稳定、促进细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长等多种生理活动中作用显著^[13]。近年来许多研究发现 MST1 与心血管及代谢性疾病的发生关系密切,而 MST1 在肾脏疾病中的作用和机制鲜见报道。薛玲等^[14]在原代肾小球足细胞中发现,高糖可上调 MST1 的表达,同时 Caspase-3 表达亦升高,提示 MST1 通路活性升高可能参与糖尿病肾病的发病机制。本研究结果也发现,与对照组比较,ApoE^{-/-}组肾组织中 MST1 mRNA 和蛋白表达均明显升高,与小鼠血清肌酐和尿素氮水平呈正相关,证实了 MST1 基因表达的改变与肾脏损伤程度呈正相关。

DNA 甲基化作为哺乳动物体内最常见的后天基因组表达修饰方式,其水平的变化与基因的表达一般是呈负相关的。外界的各种因素通过调控基因组的甲基化和去甲基化状态完成对基因表达的调节^[15]。目前研究发现,在肾脏疾病的发生发展中,存在着甲基化异常的现象。Hiltunen 等^[16]发现,在人与 ApoE^{-/-}小鼠中,发生全基因组的低甲基化状态。本文为了研究 DNA 甲基化调控对 MST1 表达的影响,检测了两组小鼠肾脏 MST1 启动子区 DNA 甲基化水平,结果显示,ApoE^{-/-}小鼠肾组织中 MST1 启动子区 DNA 甲基化程度明显降低了,而 DNA 低甲基化是基因转录增强的重要标志之一,与 MST1 表达水平上调相一致,提示 ApoE 基因敲除所致的脂代谢紊乱可能通过下调 DNA 甲基化水平而促进 MST1 的表达并进一步引起肾损伤。

综上所述,ApoE 基因敲除所致的脂代谢紊乱可能通过降低 MST1 启动子区 DNA 甲基化程度,使 MST1 表达水平升高,进而导致肾损伤的发生,但其具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘金凤,马洪胜,李峰,等. ApoE 基因多态性与脂质代谢相关性[J]. 中国老年学杂志, 2002, 5(23): 1802-804.
- [2] Braun F, Rinschen MM, Bartels V, et al. Altered lipid metabolism in the aging kidney identified by three layered omicanalysis [J]. Aging (Albany), 2016, 8(3): 441-457.
- [3] 周红霞,梅柏如,赵丽萍. 慢性肾脏疾病中脂质代谢异常与肾损伤的关系[J]. 江苏医药, 2007, 33(11): 1179.
- [4] Jiang Y, Zhang H, Sun T, et al. The comprehensive effects of hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia on pathogenesis of atherosclerosis and DNA hypomethylation in ApoE^{-/-} mice [J]. Acta Bioch Bioph Sin, 2012, 44(10): 866-875.
- [5] 孔繁琪,马胜超,张辉,等. MM9/TIMP-1 在 HHcy 致 ApoE^{-/-}小鼠肾脏损伤中的作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(6): 541-548.
- [6] 王强. 糖尿病肾病患者血清 Cys C、Hey 和尿 Mindin、NAG 含量检测及对疾病早期诊断的价值[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(10): 980-983.
- [7] 钱星,林超,徐斌,等. 动脉粥样硬化中 DNA 甲基化与微小 RNA 的相互作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(12): 1275-281.
- [8] 刘剑,仲芳,徐丽梨,等. 阿霉素肾病大鼠凋亡相关基因 FADD 和 APAF1 启动子 DNA 甲基化的变化[J]. 上海交通大学学报, 2012, 32(11): 1455-461.
- [9] Morihara N, Hino A, Yamaguchi T, et al. Aged garlic extract suppresses the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. J Nutr, 2016, 146(2): 460S-463S.
- [10] 张晓明,杨继红. ApoE 与动脉粥样硬化的关系及 ApoE 基因敲除小鼠在动脉粥样硬化研究中的应用[J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(S1): 169-172.
- [11] 李军辉,程东生,王峰,等. 糖尿病肾病患者血脂异常与尿蛋白关系[J]. 上海交通大学学报, 2016, 50(3): 478-483.
- [12] 周瑛,傅鹏. 他汀类药物对肾脏保护作用的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(8): 1547-550.
- [13] 李英,吴文清,刘茂东. 脂代谢异常与肾脏损害[J]. 临床荟萃, 2002, 17(6): 372-373.
- [14] 薛玲,吴蔚华,欧三桃,等. 高糖对大鼠肾小球足细胞表达蛋白激酶 MST1 的影响[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2014, 3(4): 209-213.
- [15] 史玉杰,李庆贺,刘晓辉. DNA 甲基化与基因表达调控研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 90-96.
- [16] Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions[J]. Vasc Med, 2002, 7(1): 5-11.

(此文编辑 曾学清)