本文引用：胡春燕，张 赛，靳晶晶，等. 维持性血液透析患者全血 Runx2 甲基化水平与血管钙化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志，2022，30(6)：517-523.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-06-0517-07

·临床研究·

维持性血液透析患者全血 Runx2 甲基化水平与血管钙化的关系

胡春燕，张 赛，靳晶晶，程美娟，张胜雷，白亚玲，徐金升

（河北省慢性肾病临床医学研究中心 河北省肾脏病血管钙化重点实验室 河北医科大学第四医院肾内科，河北省石家庄市 050011）

[关键词] Runx2； 甲基化； 维持性血液透析； 血管钙化

[摘 要] **目的** 探讨 Runx2 甲基化水平与维持性血液透析(MHD)患者血管钙化的关系。**方法** 选取在河北医科大学第四医院行 MHD 的患者 58 例为研究对象，收集患者的临床资料，根据冠状动脉钙化(CAC)评分结果将患者分为无钙化组、轻中度钙化组、重度钙化组。应用 Methprimer 进行 Runx2 甲基化引物设计，采用甲基化特异性 PCR 检测患者的全血 Runx2 甲基化水平，Spearman 相关性分析探究其与血管钙化的关系。受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评估 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化的诊断价值。**结果** 差异性检验发现三组间全血 Runx2 甲基化水平差异有统计学意义，且随着血管钙化程度的增加，Runx2 甲基化的表达水平降低。Spearman 相关性分析显示 Runx2 甲基化水平与血管钙化呈负相关($r=-0.51$，$P<0.01$)，年龄、血磷与血管钙化呈正相关($P<0.05$)。ROC 曲线分析显示，Runx2 甲基化水平诊断血管钙化的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.761($P<0.001$)，Runx2 甲基化水平与年龄、血磷三者联合诊断血管钙化的 AUC 及灵敏度均显著提高($P<0.05$)。**结论** 全血 Runx2 甲基化水平可能成为诊断 MHD 患者血管钙化的生物标志物，且与年龄、血磷联合评估时 AUC 及灵敏度均显著提高。

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

The relationship between Runx2 methylation level and vascular calcification in maintenance hemodialysis patients

HU Chunyan, ZHANG Sai, JIN Jingjing, CHENG Meijuan, ZHANG Shenglei, BAI Yaling, XU Jinsheng

(*Hebei Clinical Research Center for Chronic Kidney Disease & Hebei Key Laboratory of Vascular Calcification in Kidney Disease & Departments of Nephrology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei* 050011, *China*)

[**KEY WORDS**] Runx2; methylation; maintenance hemodialysis; vascular calcification

[**ABSTRACT**] **Aim** To explore the relationship between Runx2 methylation level and vascular calcification in maintenance hemodialysis (MHD) patients. **Methods** 58 patients who underwent MHD in the Fourth Hospital of Hebei Medical University were selected as the research objects. The clinical data of the patients were collected. According to the coronary artery calcification (CAC) score, the patients were divided into non-calcification group, mild to moderate calcification group, and severe calcification group. Methprimer was used to design Runx2 methylation primers, methylation-specific PCR was used to detect the level of Runx2 methylation in the whole blood of patients, and Spearman correlation analysis was used to explore its relationship with vascular calcification. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of Runx2 methylation level for vascular calcification in MHD patients. **Results** The difference test found that the Runx2 methylation level difference between the three groups was statistically significant. And as the degree of vascular calcification increased, the expression level of Runx2 methylation decreased. Spearman correlation analysis showed that the methylation level of Runx2 was negatively correlated with vascular calcification ($r=$

[收稿日期] 2021-07-29 [修回日期] 2021-09-28

[基金项目] 河北省重点研发计划项目(20377704D)；河北省科技计划项目(16397733D)；河北省医学科学研究重点课题(20170174)

[作者简介] 胡春燕，主管护师，主要从事慢性肾脏病患者动静脉内瘘及血管钙化的相关研究，E-mail 为 huchunyan0309@126.com。通信作者徐金升，教授，博士研究生导师，主要从事慢性肾脏病血管钙化的机制研究，E-mail 为 xjs5766@126.com。

−0.51, $P<0.01$), age and serum phosphorus were positively correlated with vascular calcification ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the ROC curve (AUC) for the diagnosis of vascular calcification by Runx2 methylation level was 0.761 ($P<0.001$). The AUC and sensitivity of the diagnosis of vascular calcification in combination with Runx2 methylation level, age and blood phosphorus were significantly improved ($P<0.05$). **Conclusion** Runx2 methylation level may be a biomarker for the diagnosis of vascular calcification in patients with MHD, and the AUC and sensitivity are significantly improved when combined with age and blood phosphorus.

目前慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的患病率和死亡率呈逐年上升趋势[1]。心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是导致慢性肾脏病患者死亡的主要原因。血管钙化(vascular calcification, VC)是CKD患者的常见并发症[2],是心血管疾病病死率增高的独立危险因素[3]。血管钙化发生发展的过程涉及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)分化为成骨样细胞,在这一过程中,Runx2(Run-related transcription factor 2)发挥着重要的促进作用[4]。DNA甲基化是目前研究最热点的表观遗传学机制之一,多项研究已经证实DNA甲基化的检测为肺癌等肿瘤的风险筛查和预防提供了新的机遇[5-6]。近年来越来越多的研究发现DNA甲基化可以调控血管钙化的发生发展[7-8]。随着DNA甲基化相关研究的不断深入,Runx2甲基化日益成为了一项新的研究热点,有研究发现Runx2甲基化与血管钙化的发生发展有关[9-10]。但尚无研究表明全血Runx2甲基化水平对维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)患者血管钙化具有早期诊断价值,本研究探讨全血Runx2甲基化水平与MHD患者血管钙化的关系,旨在为将来血管钙化相关疾病的早期诊断及治疗提供新的研究思路。

1 资料和方法

1.1 样本量计算

我们应用ROC相关样本量计算方法进行样本量估算,参考相关文献,假设冠状动脉钙化阴性组和阳性组人数比例为1∶2,期望的ROC曲线下面积最少达到0.746[11],假设$\alpha=0.05$,$\beta=0.10$,我们需要阳性组人数至少37例,阴性组人数19例,故样本量至少56例。

1.2 研究对象

我们选取在河北医科大学第四医院行MHD的患者58例为研究对象。纳入标准:(1)年龄>18岁;(2)维持性血液透析患者,3次/周,4 h/次。排除标准:(1)骨恶性肿瘤患者;(2)1个月内有明显感染的患者;(3)1个月内发生急性心脑血管事件的患者。本研究经我院伦理委员会审核通过,所有患者均签署知情同意书。

1.3 主要试剂与仪器

DNA提取试剂盒[FlexiGene® DNA Kit(250), QIAGEN];DNA重亚硫酸盐转化试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];甲基化特异性PCR试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];Runx2甲基化引物[英潍捷基(上海)贸易有限公司];普通离心机;高速冷冻离心机(美国Thermo公司);分光光度计(德国EMCLAB公司);PCR仪(美国赛默飞公司);电泳仪(伯乐公司);UVP凝胶成像系统。

1.4 临床资料收集

通过问卷调查、医院病历系统和血液透析记录单查阅等方式,收集患者的一般资料、实验室资料、血管钙化资料等。①一般资料:姓名、性别、年龄、透析龄、原发病诊断、糖尿病病史、高血压病病史、冠心病病史等。②实验室资料:血钙、血磷、全段甲状旁腺激素(intact parathyroid hormone, iPTH)、血白蛋白、胆固醇、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)等。所有患者的静脉血均在清晨空腹状态下抽取,并在本院检验中心检测。③血管钙化资料:冠状动脉钙化评分(coronary artery calcium score, CAC)是目前诊断血管钙化的金标准,应用64层螺旋CT对受试者进行冠状动脉病变检查,根据钙化面积、体积、峰值由计算机评分软件计算CAC[12]。根据冠状动脉钙化积分将结果进行分层,把患者分为三组:无钙化组(得分=0 AU)、轻中度钙化组(得分1~400 AU)、重度钙化组(得分>400 AU)。

1.5 Runx2甲基化测定

Runx2甲基化采用甲基化特异性PCR试验(MSP)方法测定。

1.5.1 DNA提取

采集所有研究对象的清晨空腹静脉血2 mL,置于抗凝管中,严格按照QIAGEN的DNA提取试剂盒操作说明提取全血DNA。提取好的DNA利用分光光度计检测浓度,并置于−20 ℃保存备用。

1.5.2 重亚硫酸盐转化和转化后的DNA纯化

严格按照说明使用天根生化科技(北京)有限公司

的 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒进行重亚硫酸盐转化和转化后的 DNA 纯化。纯化后的 DNA 利用分光光度计检测浓度,并置于-20 ℃保存备用。

1.5.3 Runx2 甲基化引物设计 我们利用在线工具 Methprimer(网址 http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)进行 Runx2 甲基化引物设计[13]。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.5.4 甲基化特异性 PCR 检测及电泳分析 应用天根生化科技(北京)有限公司的甲基化特异性 PCR 试剂盒进行甲基化特异性 PCR 检测。按照操作说明配制 PCR 反应体系。PCR 反应条件为 95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 20 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 20 s,循环 35 次,最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 反应完成后,在 20 μL 样本中加入 3 μL 6×DNA Loading Buffer,取 8 μL 样本进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 替代物染色后于凝胶成像系统观察结果。剩余样本于-20 ℃保存。最后用 Image J 软件处理图像。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件进行统计学分析,GraphPad Prism 及 MedCalc 软件绘图。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布的计量资料用中位数(四分位间距)表示,计数资料用频数(百分比)表示。三组间计量资料的比较采用 ANOVA 分析或 K-W H 检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验。Spearman 相关性分析探索 Runx2 甲基化水平与血管钙化的关系。ROC 曲线评估 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化的诊断价值。$P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料

本研究共纳入研究对象 58 例,其中男性 37 例(63.79%),女性 21 例(36.21%),年龄 26~84 岁,平均(57.07±15.94)岁。透析龄为 5.5(7.25)年。原发病构成包括慢性肾小球肾炎 22 例(37.93%)、糖尿病肾病 10 例(17.24%)、高血压肾病 7 例(12.07%)、多囊肾病 2 例(3.45%)、乙型肝炎病毒相关性肾炎 2 例(3.45%)、肾脏肿瘤 2 例(3.45%)、其他 13 例(22.41%)。根据冠状动脉钙化评分结果,将纳入的患者分为三组,无钙化组 19 例(32.76%),轻中度钙化组 19 例(32.76%),重度钙化组 20 例(34.49%)。经统计学分析,我们发现三组之间年龄、糖尿病史、高血压病史、冠心病史、血磷、血钙、胆固醇差异有统计学意义(均 $P<0.05$),而性别、透析龄、白蛋白、ALP、iPTH、25-羟维生素 D 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$;表 1)。

表 1. 三组患者一般资料比较

Table 1. Comparison of general data between the three groups

项目	无钙化组(n=19)	轻中度钙化组(n=19)	重度钙化组(n=20)	P 值
年龄/岁	41.95±10.15	64.42±14.94	64.45±10.62	<0.001
男性/[例(%)]	12(63.16)	14(73.68)	11(55.00)	0.478
透析龄/年	5.32±3.76	6.95±4.48	6.75±6.24	0.576
CKD-MBD/[例(%)]	9(47.37)	9(47.37)	8(40.00)	0.866
高血压病/[例(%)]	16(84.21)	19(100)	20(100)	0.039
糖尿病/[例(%)]	1(5.26)	6(31.58)	10(50.00)	0.009
冠心病/[例(%)]	2(10.52)	10(52.63)	10(50.00)	0.011
血磷/(mmol/L)	1.16±0.49	1.23±0.35	2.13±0.36	<0.001
血钙/(mmol/L)	2.29±0.22	2.18±0.24	2.07±0.04	0.011
iPTH/(ng/L)	197.4±142.00	238.70±94.11	384.00±388.00	0.063
白蛋白/(g/L)	41.67±3.74	39.04±3.55	40.31±2.84	0.065
ALP/(U/L)	110.40(68.00)	112.70(84.8)	92.35(70.80)	0.358
胆固醇/(mmol/L)	4.28(3.76)	3.52(0.35)	4.37(1.38)	<0.001
25-羟维生素 D/(μg/L)	17.85(7.17)	18.02(17.91)	13.83(1.58)	0.071

注:CKD-MBD:慢性肾脏病-矿物质和骨异常。

2.2 三组间 Runx2 甲基化的表达情况

我们应用在线工具 Methprimer 预测 Runx2 的 CpG 岛(http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)(图 1A),同时进行 Runx2 甲基化的引物设计,引物设计如下:Left M 引物为 TTTTTAGGTTTCGGAAATTGTATAC,Right M 引物为 CAAAAAATAAATCGTAAACAACGAA;Left U 引物为 GTTTTTAGGTTTTGGAAATTGTATATG,Right U 引物为 CCAAAAAAATAAATCATAAACAACAAA。我们利用甲基化特异性 PCR 检测三组患者的全血 Runx2 甲基化水平。M 表示 Runx2 甲基化状态,U 表示 Runx2 非甲基化状态,M/(M+U)表示 Runx2 甲基化水平。我们利用 Image J 软件处理图像,得出相应数值,进行统计学分析,结果发现无钙化组 Runx2 甲基化水平为(0.48±0.03),轻中度钙化组为(0.45±0.05),重度钙化组为(0.43±0.07),三组间 Runx2 甲基化水平差异有统计学意义($\chi^2=14.77$,$P=0.001$)。并且我们可以看到,随着血管钙化程度的增加,Runx2 甲基化的表达水平降低(图 1B)。

2.3 Runx2 甲基化与血管钙化及一般临床资料的相关性分析

我们利用 Spearman 相关性分析来探究三组患者的 Runx2 甲基化水平与血管钙化及一般临床资料的相关性。结果显示 Runx2 甲基化水平与血管钙化呈负相关($r=-0.51$,$P<0.01$),与年龄、血磷呈负相关(均 $P<0.05$)。而年龄、血磷与血管钙化呈正相关(均 $P<0.05$),血钙与血管钙化呈负相关($P<0.05$,表 2 和图 2)。

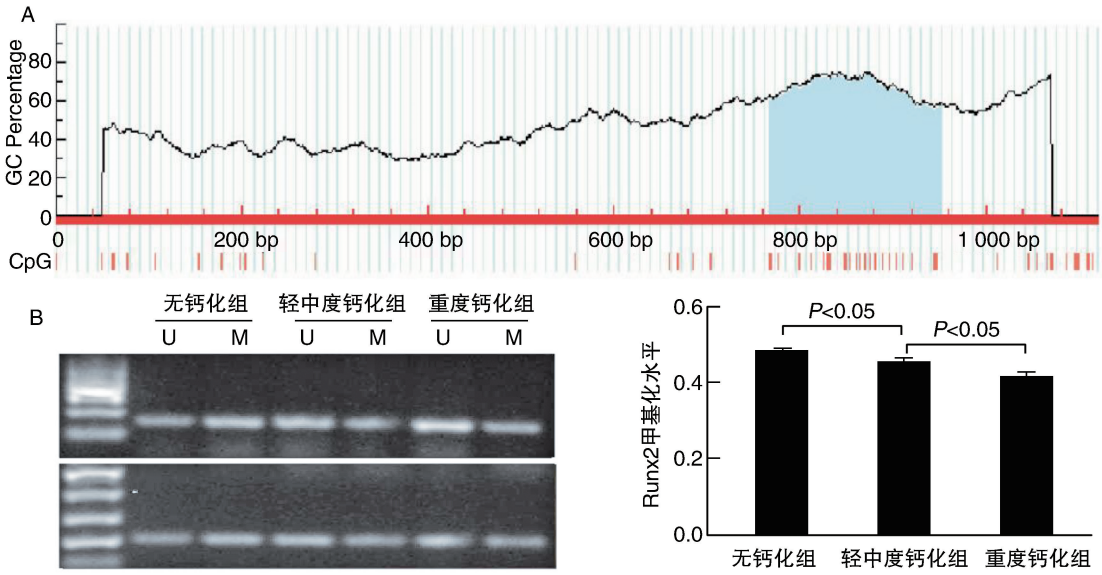

图 1. Runx2 甲基化检测结果

A 为在线工具 Methprimer 预测 Runx2 的 CpG 岛(http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi),B 为三组患者的全血 Runx2 甲基化水平。M 为甲基化引物扩增结果,U 为非甲基化引物扩增结果。

Figure 1. The results of Runx2 methylation test

表 2. Runx2 甲基化水平与血管钙化及临床资料的相关性

Table 2. Correlation between the level of Runx2 methylation and the degree of vascular calcification, clinical data

参数	Runx2 甲基化	血管钙化	年龄	血磷	血钙	ALP	iPTH	25-羟维生素 D	胆固醇
Runx2 甲基化	—								
血管钙化	−0.51[b]	—							
年龄	−0.34[a]	0.57[b]	—						
血磷	−0.36[b]	0.68[b]	0.21	—					
血钙	0.32[a]	−0.40[b]	−0.30[b]	−0.38[b]	—				
ALP	0.15	−0.14	−0.15	0.07	0.23	—			
iPTH	−0.10	0.31[a]	0.00	0.42[b]	−0.01	0.40[b]	—		
25-羟维生素 D	0.03	−0.24	−0.41[b]	−0.17	0.03	0.05	0.12	—	
胆固醇	−0.10	0.13	−0.12	0.42[b]	−0.23	0.13	0.15	−0.14	—

注:表中数据为相关系数 r 值。“—”表示数据无法获取,空白处表示不适用。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$。

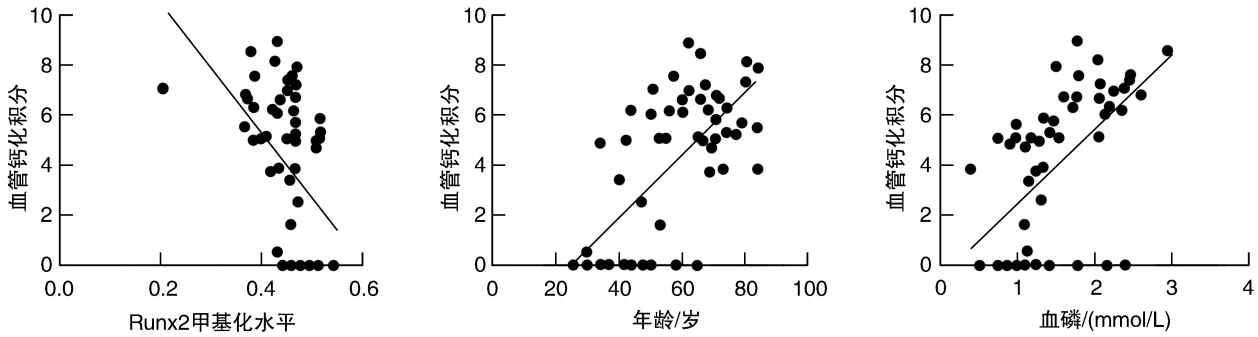

图 2. Runx2 甲基化水平、年龄、血磷与血管钙化的相关性分析

Figure 2. Correlation between the level Runx2 methylation, age, serum phosphorus and the degree of vascular calcification

2.4　Runx2 甲基化水平诊断血管钙化的 ROC 曲线分析

为进一步评价 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化的诊断价值，我们将患者按冠状动脉钙化积分的结果分为无钙化组和钙化组，从而进行 ROC 曲线分析。结果显示，Runx2 甲基化水平诊断血管钙化的 ROC 曲线下面积（AUC）为 0.761，95% CI 为 0.631～0.863（P<0.001），灵敏度为 43.59%，特异度为 100%。联合 ROC 曲线分析显示，Runx2 甲基化水平分别与年龄、血磷联合及三者联合诊断血管钙化的 AUC 分别为 0.923、0.823、0.950，灵敏度分别为 87.18%、64.10%、84.62%，特异度分别为 89.47%、94.74%、100%。与 Runx2 甲基化水平单独诊断血管钙化相比，三者联合诊断血管钙化的 AUC 及灵敏度均显著提高（P<0.05；图 3）。

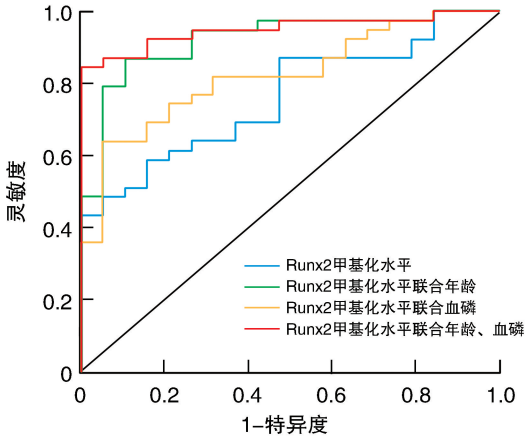

图 3. Runx2 甲基化水平与年龄、血磷联合诊断血管钙化的 ROC 曲线

Figure 3. ROC curve of Runx2 methylation level combined with age and serum phosphorus in diagnosis of vascular calcification

3　讨　论

终末期肾脏病（end-stage renal disease，ESRD）患者肾脏替代治疗中主要的治疗方式仍是血液透析。血管钙化是 MHD 患者常见的并发症[14]，可导致 MHD 患者心血管事件及死亡事件的增加。因此，探讨 MHD 患者血管钙化的发生机制和诊疗方法十分必要。血管钙化的发生机制复杂，可能与成骨分化、软骨形成有关[15]。Runx2 在血管钙化的发生发展中起着重要的促进作用[16]。DNA 甲基化是目前研究最热点的表观遗传学机制之一，多项研究已经证实 DNA 甲基化可用于肺癌、乳腺癌等常见肿瘤的诊断[6,17]，这说明 DNA 甲基化的检测为肿瘤的风险筛查和预防提供了新的机遇。最近研究发现，DNA 甲基化等表观遗传学也可以调控血管钙化，但目前尚缺乏相关研究证明 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化有诊断价值，因此本研究探讨了 Runx2 甲基化水平与 MHD 患者血管钙化的关系，结果提示 Runx2 甲基化水平与血管钙化呈负相关，且对 MHD 患者血管钙化具有诊断价值。

DNA 甲基化在基因表达的过程中起调控作用，其主要发生在 CpG 岛上。CpG 岛是指由 200 bp 的碱基组成的 DNA 序列中 GC 含量占 60% 以上的一个区域。研究表明，DNA 甲基化可引起染色质结构、DNA 构象和稳定性等改变，进而控制基因表达[18]。DNA 甲基化抑制基因表达，机制主要是高度甲基化的 DNA 与组蛋白结合紧密并且能够招募转录抑制因子、抑制转录激活因子与启动子区域的结合，从而达到抑制基因表达的目的。相关研究表明，miR-34b[19]、Klotho 基因[20]、长链非编码 RNA（lncRNA）H19[21]、9k21 染色体附近的 CDKN2A/2B 基因[22]、Wnt 受体 Frizzled1 基因[23] 等基因的 DNA 甲基化均可以通过调控基因的表达来调节血管钙

化的发生发展。Runx2 作为血管钙化的促进因子，其甲基化能否调控血管钙化的发生发展，这是目前的一项研究热点。血管钙化发生的关键环节是血管平滑肌细胞由收缩表型转变为成骨样表型，成骨分化是其中的一个重要环节。有研究[9-10,24-26]发现 Runx2 甲基化可以调控 Runx2 的表达及成骨分化、软骨形成等过程。但尚无明确证据证明 Runx2 甲基化对 MHD 患者血管钙化有诊断价值，本研究以既往的研究为基础，探究 Runx2 甲基化水平与 MHD 患者血管钙化的关系。

我们根据冠状动脉钙化积分结果将 MHD 患者分为无钙化组、轻中度钙化组、重度钙化组，检测三组患者的全血 Runx2 甲基化水平。研究发现，三组间 Runx2 甲基化水平差异有统计学意义，且随着血管钙化程度的增加，Runx2 甲基化水平降低。为进一步探究 Runx2 甲基化水平与 MHD 患者血管钙化的关系，我们进行了 Spearman 相关性分析，以相关系数 r 值表示两者的关系，r 值越接近-1 或 1，表明二者间相关关系越大。结果显示 Runx2 甲基化水平与血管钙化水平呈负相关（$r=-0.51$，$P<0.01$）。经过差异性检验及相关性分析，我们发现血管钙化与年龄、血磷呈中等程度或者强相关，这与既往 Vervloet 等[27]研究结果一致。为进一步探讨 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化的诊断价值，我们进一步将患者分为无钙化组和钙化组，进行 ROC 曲线分析，结果发现 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化有诊断价值（AUC 为 0.761，$P<0.001$）。为进一步评价 Runx2 甲基化水平联合年龄、血磷及三者联合对血管钙化的诊断价值，我们进行了联合 ROC 曲线及差异性 ROC 曲线分析，结果显示，与 Runx2 甲基化水平单独诊断血管钙化相比，三者联合诊断 MHD 患者血管钙化的 AUC 及灵敏度均显著提高（$P<0.05$）。

本研究仍存在不足之处。（1）本研究由于时间限制，未对患者血管钙化的进展、心血管事件发生率及死亡率等数据进行随访；（2）本研究的样本量较小，另外，我们应用的评价血管钙化的方法仅为 CAC 评分，虽然研究[28]显示 CAC 评分可反映 ESRD 患者动脉粥样硬化性血管事件的严重程度，但这可能会低估血管钙化的实际发生率，因此未来的临床研究中应该扩大样本量、并结合不同的组织学方法综合评估血管钙化的程度；（3）本研究只选取了最可能发生甲基化的 Runx2 基因序列，未来的研究中可以多选取几个 Runx2 甲基化位点，进行比较。

综上，Runx2 甲基化水平可能成为诊断 MHD 患者血管钙化的生物标志物，且与年龄、血磷联合评估时 AUC 及灵敏度均显著提高。但未来仍需要大样本、前瞻性的临床研究和基础实验进一步评价 Runx2 甲基化水平对 MHD 患者血管钙化的影响。

[参考文献]

[1] LEVIN A, TONELLI M, BONVENTRE J, et al. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy[J]. Lancet, 2017, 390(1105): 1888-1917.

[2] VIEGAS C, ARAÚJO N, MARREIROS C, et al. The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in chronic kidney disease (CKD): challenging old concepts with new facts[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(12): 4274-4299.

[3] BUNDY J D, CAI X, MEHTA R C, et al. Serum calcification propensity and clinical events in CKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2019, 14(11): 1562-1571.

[4] CHEN Y, ZHAO X, WU H. Transcriptional programming in arteriosclerotic disease: a multifaceted function of the Runx2 (Runt-related transcription factor 2)[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(1): 20-34.

[5] JIANG S. Tet2 at the interface between cancer and immunity[J]. Commun Biol, 2020, 3(1): 667.

[6] HONG Y, KIM W J. DNA methylation markers in lung cancer[J]. Curr Genomics, 2021, 22(2): 79-87.

[7] FU Y, WANG X, KONG W. Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(8, SI): 1173-1189.

[8] OUYANG L, SU X, LI W, et al. ALKBH1-demethylated DNA N6-methyladenine modification triggers vascular calcification via osteogenic reprogramming in chronic kidney disease[J]. J Clin Invest, 2021, 131(14): 146985.

[9] WAKITANI S, YOKOI D, HIDAKA Y, et al. The differentially DNA-methylated region responsible for expression of runt-related transcription factor 2[J]. J Vet Med Sci, 2017, 79(2): 230-237.

[10] ZHANG R P, JZ S, XIANG L X. GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(47): 41083-41094.

[11] CAI H, LU R, ZHANG M, et al. Serum soluble klotho level is associated with abdominal aortic calcification in patients on maintenance hemodialysis[J]. Blood Purif, 2015, 40(2): 120-126.

[12] ROSENBLIT P D. Extreme atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk recognition[J]. Curr Diab Rep, 2019, 19(8): 61.

[13] LI L C, DAHIYA R. Methprimer: designing primers for methylation PCRs[J]. Bioinformatics, 2002, 18(11): 1427-1431.

[14] SMITH E R. Vascular calcification in Uremia: new-age concepts about an old-age problem[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1397: 175-208.

[15] YAMADA S, GIACHELLI C M. Vascular calcification in CKD-MBD: roles for phosphate, FGF23, and Klotho[J]. Bone, 2017, 100: 87-93.

[16] KAWANE T, KOMORI H, LIU W, et al. Dlx5 and mef2 regulate a novel Runx2 enhancer for osteoblast-specific expression[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(9): 1960-1969.

[17] LINOWIECKA K, URBANOWSKA-DOMAŃSKA O, GUZ J, et al. The potential influence of breast cancer estrogen receptors' distribution on active DNA demethylation[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2019, 23(2): 74-80.

[18] CHEN B H, MARIONI R, COLICINO E, et al. DNA methylation-based measures of biological age: Meta-analysis predicting time to death[J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(9): 1844-1865.

[19] LIN X, LI F, XU F, et al. Aberration methylation of miR-34b was involved in regulating vascular calcification by targeting Notch1[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(10): 3182-3197.

[20] CHEN J, ZHANG X Y, ZHANG H, et al. Indoxyl sulfate enhance the hypermethylation of klotho and promote the process of vascular calcification in chronic kidney disease[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(10): 1236-1246.

[21] HADJI F, BOULANGER M C, GUAY S, et al. Altered DNA methylation of long noncoding RNA H19 in calcific aortic valve disease promotes mineralization by silencing NOTCH1[J]. Circulation, 2016, 134(23): 1848-1862.

[22] ZHOU S, CAI B, ZHANG Z, et al. CDKN2B methylation and aortic arch calcification in patients with ischemic stroke[J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(6): 609-620.

[23] WU F, JIAO J, LIU F, et al. Hypermethylation of frizzled1 is associated with Wnt/β-catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(2): 1-9.

[24] TAKAHASHI A, DE ANDRÉS M C, HASHIMOTO K, et al. DNA methylation of the RUNX2 P1 promoter mediates MMP13 transcription in chondrocytes[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7771.

[25] CHEN J C, CHUA M, BELLON R B, et al. Epigenetic changes during mechanically induced osteogenic lineage commitment[J]. J Biomech Eng, 2015, 137(2): 020902.

[26] EZURA Y, SEKIYA I, KOGA H, et al. Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(5): 1416-1426.

[27] VERVLOET M. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(2): 109-120.

[28] KIM J K, HONG C W, PARK M J, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation in uremia is associated with chronic inflammation and prevalent coronary artery disease[J]. J Immunol Res, 2017: 8415179.

(此文编辑 许雪梅)