

## 同型半胱氨酸致足细胞凋亡中 FoxO1 DNA 甲基化水平增高

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2980>

2095-4344.2980

投稿日期: 2019-12-23

送审日期: 2019-12-28

采用日期: 2020-02-26

在线日期: 2020-04-16

中图分类号:

R446; R496; R318

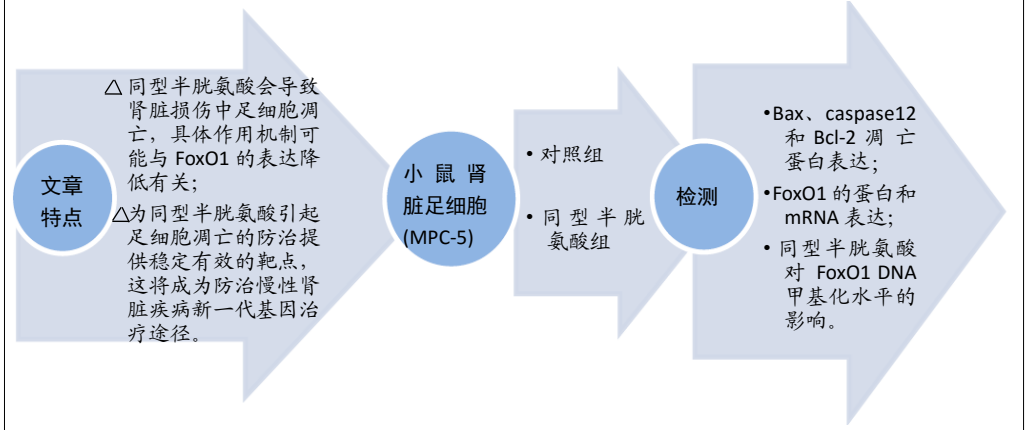
文章编号:

2095-4344(2021)02-00269-0

文献标识码: B

刘昆<sup>1, 2, 3</sup>, 谢琳<sup>2, 3, 4</sup>, 曹军<sup>1, 2, 3</sup>, 丁宁<sup>2, 3, 4</sup>, 徐灵博<sup>2, 3, 4</sup>, 马胜超<sup>2, 3, 4</sup>, 李桂忠<sup>2, 3, 4</sup>, 姜怡邓<sup>2, 3, 4</sup>, 卢冠军<sup>2, 3, 5</sup>

## 文章快速阅读:



## 文题释义:

**足细胞:** 是附着于肾小球基底膜外侧一种终末分化细胞, 与血管内皮细胞和肾小球基底膜共同构成肾小球滤过膜。研究发现, 足细胞由细胞器、主突和足突组成, 其中足突与基底膜相连形成肾小球滤过的最后屏障; 足细胞还参与肾小球基底膜的基质合成和维持其正常的结构功能; 因此, 足细胞对于维持肾小球滤过功能的完整性有着重要的作用。

**同型半胱氨酸:** 是蛋氨酸在氨基酸循环代谢过程中产生的中间产物, 研究表明同型半胱氨酸具有广泛的生物学效应, 包括加速动脉粥样硬化、损害损伤后内皮修复和功能、调节脂质代谢和诱导血栓形成; 同型半胱氨酸已经被认为是心血管疾病的独立因素, 而且与肾损伤有密切联系, 研究旨在阐明同型半胱氨酸在肾损伤中的具体作用机制。

## 摘要

**背景:** 同型半胱氨酸增多会引起肾损伤并导致足细胞凋亡, 但是其具体机制尚不清楚。

**目的:** 探讨叉头框转录因子O1 (forkhead box O, FoxO1)及其DNA甲基化在同型半胱氨酸致足细胞凋亡中的作用。

**方法:** 体外培养小鼠肾脏足细胞(MPC-5), 将其分为对照组(0 μmol/L同型半胱氨酸)和同型半胱氨酸组(80 μmol/L同型半胱氨酸)。干预细胞48 h后, 采用免疫荧光技术检验足细胞凋亡相关蛋白Bax、caspase12和Bcl-2的表达情况; 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测FoxO1 mRNA水平; 采用Western blot检测FoxO1和DNMT1蛋白表达水平; 采用巢式降落式特异性PCR(nMS-PCR)测验FoxO1的DNA甲基化水平。

**结果与结论:** ①与对照组相比, 同型半胱氨酸组足细胞中Bax和caspase12表达明显增高, Bcl-2表达明显降低; ②FoxO1的mRNA和蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ ); ③与对照组相比, 同型半胱氨酸组FoxO1 DNA甲基化水平明显升高( $P < 0.01$ ), 同型半胱氨酸组足细胞中DNMT1蛋白表达明显增高( $P < 0.01$ ); ④结果表明: FoxO1 DNA高甲基化在同型半胱氨酸致足细胞凋亡中作用显著, 而DNMT1参与同型半胱氨酸诱导的足细胞凋亡过程。

**关键词:** 肾; 肾小球; 肾损伤; 同型半胱氨酸; 足细胞; 凋亡; 因子; 甲基化

**缩略语:** DNA甲基转移酶: DNA methyltransferases, DNMTs; 叉头框转录因子O1: forkhead box O, FoxO1

## Increased FoxO1 DNA methylation level in homocysteine-induced podocyte apoptosis

Liu Kun<sup>1, 2, 3</sup>, Xie Lin<sup>2, 3, 4</sup>, Cao Jun<sup>1, 2, 3</sup>, Ding Ning<sup>2, 3, 4</sup>, Xu Lingbo<sup>2, 3, 4</sup>, Ma Shengchao<sup>2, 3, 4</sup>, Li Guizhong<sup>2, 3, 4</sup>, Jiang Yideng<sup>2, 3, 4</sup>, Lu Guanjun<sup>2, 3, 5</sup>

<sup>1</sup>Clinical Medical College, <sup>2</sup>Basic Medical College, <sup>3</sup>Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; <sup>4</sup>Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; <sup>5</sup>Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; <sup>6</sup>General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Liu Kun, Master candidate, Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

宁夏医科大学, <sup>1</sup>临床医学院, <sup>2</sup>基础医学院, 宁夏回族自治区银川市 750004; <sup>3</sup>国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; <sup>4</sup>宁夏血管损伤与修复研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; <sup>5</sup>宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004

第一作者: 刘昆, 男, 1992年生, 安徽省太和县人, 汉族, 宁夏医科大学在读硕士, 主要从事肾脏损伤中同型半胱氨酸对肾小球的影响研究。

通讯作者: 卢冠军, 硕士, 主任医师, 宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004; 国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; 宁夏血管损伤与修复研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004

<https://orcid.org/0000-0002-0938-1378> (刘昆)

基金资助: 国家自然科学基金(81560120), 项目负责人: 卢冠军

引用本文: 刘昆, 谢琳, 曹军, 丁宁, 徐灵博, 马胜超, 李桂忠, 姜怡邓, 卢冠军. 同型半胱氨酸致足细胞凋亡中 FoxO1 DNA

甲基化水平增高 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2):269-273.



**Corresponding author:** Lu Guanjun, Master, Chief physician, Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

## Abstract

**BACKGROUND:** The increase of homocysteine can lead to renal injury and podocyte apoptosis, but the specific mechanism is not clear.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of Forkhead box O1 (FoxO1) and its DNA methylation in podocyte apoptosis induced by homocysteine.

**METHODS:** Mouse renal podocytes (MPC-5) were cultured *in vitro* and divided into control group (0  $\mu\text{mol/L}$  homocysteine) and homocysteine group (80  $\mu\text{mol/L}$  homocysteine). After 48 hours of intervention, the expression of podocyte apoptosis-related proteins Bax, caspase12 and Bcl-2 was detected by immunofluorescence technique; the expression level of FoxO1 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR; the protein expression levels of FoxO1 and DNMT1 were detected by western blot; DNA methylation level of FoxO1 was detected by nested methylation-specific PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, the expression levels of Bax and caspase12 protein in podocytes of the homocysteine group were significantly increased, while the expression of Bcl-2 protein was significantly decreased. The expression levels of FoxO1 mRNA and protein were significantly decreased in the homocysteine group compared with the control group ( $P < 0.01$ ). At the same time, the methylation level of FoxO1 DNA in the homocysteine group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), and the expression of DNMT1 protein in podocytes in the homocysteine group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). To conclude, FoxO1 DNA hypermethylation plays a significant role in podocyte apoptosis induced by homocysteine, whereas DNMT1 participates in homocysteine-induced podocyte apoptosis.

**Key words:** kidney; glomerulus; renal injury; homocysteine; podocyte; apoptosis; factor; methylation

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81560120 (to LGJ)

**How to cite this article:** LIU K, XIE L, CAO J, DING N, XU LB, MA SC, LI GZ, JIANG YD, LU GJ. Increased FoxO1 DNA methylation level in homocysteine-induced podocyte apoptosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(2):269-273.

## 0 引言 Introduction

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是氨基酸代谢中蛋氨酸循环过程中产生的中间产物, 研究表明肾脏是同型半胱氨酸的重要代谢场所<sup>[1]</sup>, 血清中同型半胱氨酸水平升高会导致肾小球受损和肾脏功能下降<sup>[2-3]</sup>, 进而引起慢性肾炎、肾病综合征等疾病的发生, 并发慢性肾功能不全等综合征。足细胞与血管内皮细胞及肾小球基底膜共同组成了肾小球的滤过屏障, 是参与肾脏循环功能过程中的重要组成部分。有文献报道表明, 足细胞凋亡会增加多种肾脏疾病的发生概率<sup>[4-5]</sup>, 但是其具体凋亡机制还尚未完全清楚; 因此, 对足细胞凋亡的研究成为防治肾脏疾病的发生、发展的重要措施。FoxO1 作为叉头框转录因子 (forkhead box O, FoxO) 家族中最早被发现的成员, 是调节细胞代谢、分化及凋亡等信号转导的重要转录因子<sup>[6-7]</sup>; 作者所在实验室前期研究证实 FoxO1 DNA 高甲基化会导致肝脏细胞凋亡进而引起肝脏损伤<sup>[8]</sup>。同时 DNA 甲基化是与肾脏疾病发病机制密切相关的表观遗传调节方式, 在慢性肾炎、肾病综合征和糖尿病肾病中均发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。但是同型半胱氨酸是否可以通过调控基因 DNA 甲基化水平从而参与肾脏疾病的发生、发展目前尚不清楚。因此, 研究旨在探讨 FoxO1 DNA 甲基化在同型半胱氨酸致足细胞凋亡中的作用, 为进一步研究同型半胱氨酸导致肾脏损伤的分子机制提供实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 11 月至 2019 年 12 月在银川市国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室完成。

1.3 材料 小鼠肾脏足细胞株 (MPC-5), 由宁夏医科大学病理生理学系惠赠。

实验主要试剂和仪器: 胎牛血清、DMEM 高糖培养基培

养基 (美国, Gibco); 青链霉素、胰蛋白酶消化液 (碧云天生物技术研究所); 同型半胱氨酸 (美国, Sigma); 基因组 DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒 (北京, 天根); 蛋白提取试剂盒和蛋白定量试剂盒 (南京, 凯基); 反转录和 qRT-PCR 试剂盒 (美国, Thermo Fisher); DNA 甲基化修饰试剂盒 (美国, ZYMO); FoxO1 抗体、Bax 抗体、caspase12 抗体、Bcl2 抗体、DNMT1 抗体 (美国, Abcam); 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; CO<sub>2</sub> 培养箱 (德国, Heraeus); 超净工作台 (苏州, 安泰); 5415D 型微量台式离心机 (德国, Eppendorf); BS110S 型精密天平 (德国, Sartorius); 荧光定量 PCR 仪 (上海, 枫岭); 垂直电泳仪和 Model 680 全自动酶标仪 (美国, Bio-Rad)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养和分组 用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液培养足细胞, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 浓度的培养箱中。实验室前期研究发现, 同型半胱氨酸在浓度为 80  $\mu\text{mol/L}$  时干预足细胞 48 h, 足细胞凋亡程度最具有意义<sup>[11]</sup>; 因此当细胞密度达到 80% 时, 用终浓度 0  $\mu\text{mol/L}$  同型半胱氨酸为对照组和 80  $\mu\text{mol/L}$  同型半胱氨酸为实验组, 分别干预细胞 48 h 后, 收集细胞用于检测相关指标。

#### 同型半胱氨酸干预小鼠肾脏足细胞培养

细胞来源: 小鼠肾脏足细胞株 (MPC-5), 由宁夏医科大学病理生理学系惠赠

培养基介绍: DMEM 高糖培养基

添加材料: 体积分数 10% 胎牛血清

培养时间: 当细胞密度达到 80% 时, 用终浓度 80  $\mu\text{mol/L}$  同型半胱氨酸干预 48 h

细胞传代: 2 d 传代 1 次, 取第 3 代做干预细胞实验

足细胞鉴定: 荧光染色和聚合酶链反应法 (PCR) 鉴定足细胞的标志蛋白 Podocin 和 WT1 的表达, 显微镜下观察足细胞的形态

1.4.2 免疫荧光染色检测凋亡蛋白表达 用 40 g/L 多聚甲醛

分别固定对照组和同型半胱氨酸组足细胞 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 在体积分数 10% 过氧化氢下作用 10 min。用含 0.3% Triton X-100 孵育 10 min, PBS 冲洗后加入山羊血清封闭 1 h。然后分别加入对应的 Bax、caspase12、Bcl2 一抗, 4 °C 孵育过夜。PBS 冲洗后加入荧光二抗, 室温避光孵育 2 h, DAPI 染细胞核 10 min 后, 加入防荧光淬灭剂封固, 于共聚焦显微镜下观察并拍照, 使用 image J 对目的区域进行分析统计。

**1.4.3 实时荧光定量 PCR 检测各组 FoxO1 mRNA 的表达** 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取各组足细胞总 RNA, 通过 GenBank 数据库查询 FoxO1 的序列并设计引物。FoxO1: 上游: 5'-GTA CGC CGA CCT CAT CAC CAA G-3', 下游: 5'-GCA CGC TCT TCA CCA TCC ACT C-3'。PCR 扩增程序: 95 °C 10 min, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 70 °C 10 s, 共 50 个循环, 同时设内参 (GADPH) 对照和空白对照, 同体系扩增目的基因的相对量按照公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。

**1.4.4 Western blot 检测 FoxO1 和 DNMT1 的蛋白表达** 按照全蛋白提取试剂盒说明书提取各组足细胞全蛋白, 加入上样缓冲液后煮沸变性 5 min, 每组取 30 μg 总蛋白经过 SDS-PAGE 凝胶电泳 80 V, 然后电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 与稀释比例 1 : 1 000 的抗 FoxO1 或 DNMT1 抗体 4 °C 孵育过夜, 用稀释比例 1 : 5 000 的二抗室温孵育 2 h, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 通过凝胶图像分析成像系统进行扫描, 以 β-actin 为内参, 计算 FoxO1 和 DNMT1 与 β-actin 内参灰度值的比值做半定量检测。

**1.4.5 nMS-PCR 检测 FoxO1 DNA 甲基化水平** 按照 DNA 提取试剂盒说明书提取对照组和同型半胱氨酸组细胞的全基因组 DNA 并甲基化修饰全基因组 DNA。nMS-PCR 法检测 FoxO1 DNA 甲基化程度的改变。针对 FoxO1 序列, 在线 (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 设计一对外引物及两对内引物 (外引物: 上游: 5'-GAA AAT ATT AAA TTA AAA TAA AAT TTA T-3', 下游: 5'-TTT AAT TAC TAA AAA ACA AAC CAA C-3'; 甲基化引物: 上游: 5'-TTT ATT CGG GTT TTT CGA GTA TTC-3', 下游 5'-CGA ATA TTT CTA TAA TTC TCT CGC C-3'; 非甲基化引物: 上游: 5'-TTT ATT TGG GTT TTT TGA GTA TTT G-3', 下游: 5'-CAA ATA TTT CTA TAA TTC TCT CAC C-3')。反应体系: PCR MIX 12.5 μL、H<sub>2</sub>O 7 μL、上下游引物各 1 μL、已修饰的 DNA 3.5 μL, 共 25 μL。外引物扩增的反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30 s, 20 个循环, 每个循环降 0.5 °C 至 53 °C, 72 °C 7 min。使用外引物的 PCR 产物为模板, 进行内外引物的扩增, 反应条件和外引物相同。然后将产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 用凝胶成像分析仪成像分析甲基化的条带, 按如下公式进行计算: 甲基化水平 = 甲基化 A 值 ÷ (甲基化 A 值 + 非甲基化 A 值)。

**1.5 主要观察指标** ①各组细胞 Bax、caspase12 和 Bcl-2 凋亡蛋白表达; ② FoxO1 的蛋白和 mRNA 表达; ③同型半胱氨酸对 FoxO1 DNA 甲基化水平的影响。

**1.6 统计学分析** 实验结果均为计量资料, 实验数据使用

Prism 5.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 同型半胱氨酸对足细胞中 Bax、caspase12 和 Bcl-2 凋亡蛋白表达的影响** 采用免疫荧光染色检测足细胞凋亡情况, 利用 Image J 软件对各组免疫荧光阳性区域进行统计分析, 结果显示: 与对照组相比, 同型半胱氨酸组足细胞相关凋亡蛋白 Bax、caspase12 荧光强度表达明显增加, 提示同型半胱氨酸组 Bax、caspase12 表达增加; 同型半胱氨酸组 Bcl-2 荧光强度减弱, 提示 Bcl-2 表达降低, 表明同型半胱氨酸可以促进足细胞凋亡水平增加, 见图 1。

**2.2 同型半胱氨酸对 FoxO1 表达的影响** 为了证明 FoxO1 在同型半胱氨酸诱导的足细胞凋亡中发挥作用, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测足细胞中 FoxO1 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示: 与对照组相比, 同型半胱氨酸组足细胞 FoxO1 的 mRNA 表达下降 (*P* < 0.01), 同时同型半胱氨酸组足细胞 FoxO1 相关蛋白表达下降 (*P* < 0.01), 见图 2。

**2.3 同型半胱氨酸对 FoxO1 DNA 甲基化的影响** 为了进一步探讨同型半胱氨酸使 FoxO1 表达降低的机制, 采用 nMS-PCR 检测足细胞中 FoxO1 DNA 甲基化水平, 与对照组相比, 同型半胱氨酸组 FoxO1 DNA 甲基化水平升高 (*P* < 0.01), 见图 3。

**2.4 DNMT1 在同型半胱氨酸致足细胞凋亡中的表达** 采用 Western blot 检测足细胞中 DNMT1 蛋白表达水平。结果显示: 与对照组相比, 同型半胱氨酸组足细胞 DNMT1 蛋白表达升高 (*P* < 0.01), 见图 4。

## 3 讨论 Discussion

足细胞是附着于肾小球基底膜外侧一种终末分化细胞, 与血管内皮细胞和肾小球基底膜共同构成肾小球滤过膜。研究发现, 足细胞由细胞器、主突和足突组成, 其中足突与基底膜相连形成肾小球滤过的最后屏障; 足细胞还参与肾小球基底膜的基质合成和维持其正常的结构功能<sup>[12]</sup>; 因此, 足细胞对于维持肾小球滤过功能的完整性有着重要的作用。目前研究表明, 同型半胱氨酸不仅作为心脑血管疾病发生的重要独立危险因素, 也与肾脏疾病的发生、发展过程密切相关; 其中 80% 的慢性肾脏病患者存在高同型半胱氨酸血症<sup>[13-15]</sup>。此外, 足细胞凋亡会引起足突融合和肾脏滤过屏障功能降低并导致蛋白尿、血尿的发生, 在多种慢性肾脏病如肾脏慢性损伤、慢性肾炎、肾病综合征和肾衰竭的发生发展中有着关键作用<sup>[16-17]</sup>。此次实验结果表明, 同型半胱氨酸可以诱导足细胞发生凋亡, 但是同型半胱氨酸通过哪种途径诱导足细胞凋亡的发生, 其具体机制尚不清楚。

FoxO1 是一种位于细胞核内的转录因子<sup>[18]</sup>, 其编码的蛋白通过与下游靶标如凋亡相关基因、抗氧化应激酶、细胞周期停滞基因以及代谢和免疫调节因子结合发挥多种调节功能。研究发现, 在人类各种疾病的发生与发展中都有 FoxO1

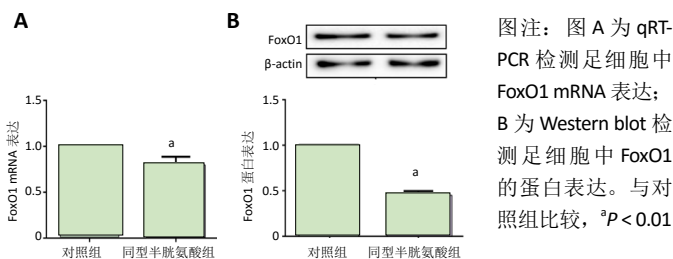
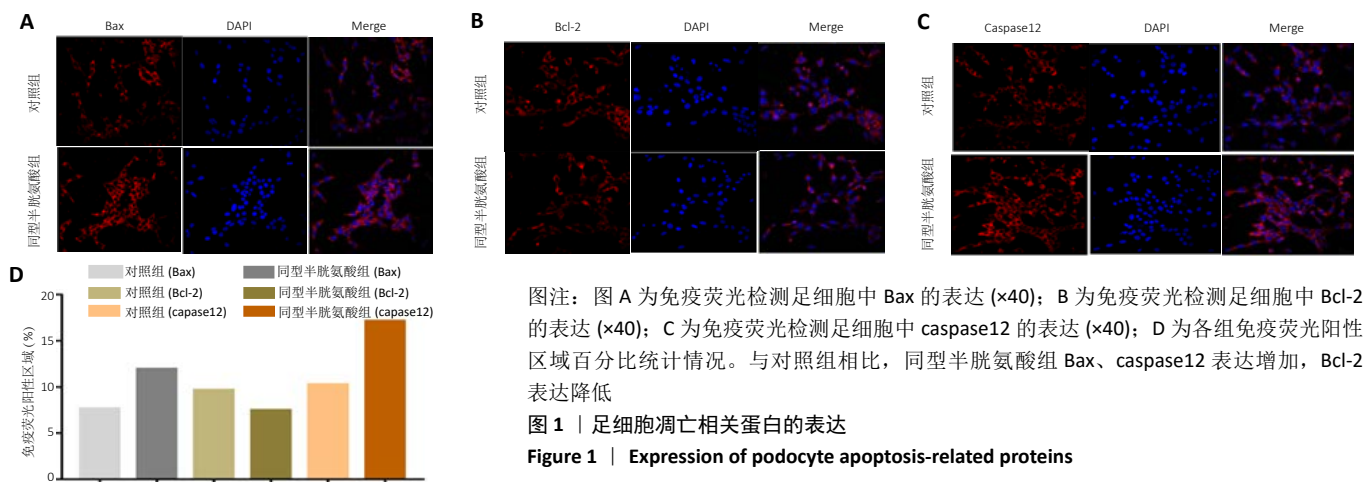


图 2 | FoxO1 在足细胞中的表达  
Figure 2 | Expression of FoxO1 in podocytes

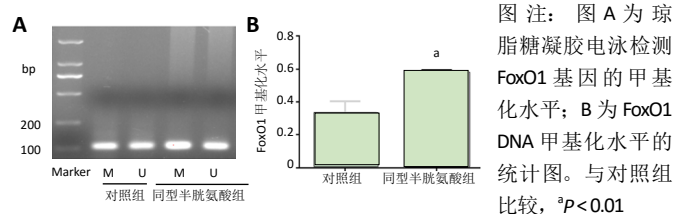
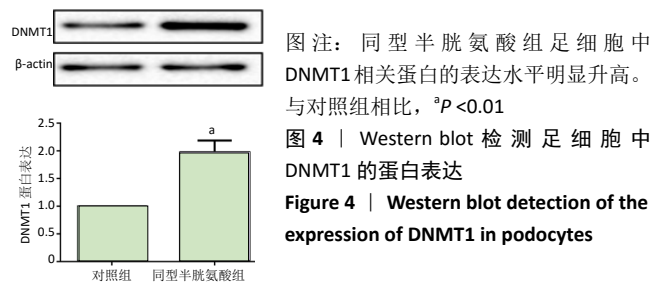


图 3 | nMS-PCR 法检测足细胞中 FoxO1 DNA 甲基化水平  
Figure 3 | Detection of FoxO1 DNA methylation level by nested methylation-specific PCR

的参与，包括糖尿病肾病、肾脏肿瘤、前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌和胃癌等<sup>[19-22]</sup>；然而，其转录后修饰的调节机制和 FoxO1 的临床意义仍然未能阐明。在此基础上，作者首先检测了 FoxO1 在足细胞中的表达，结果显示同型半胱氨酸作用下 FoxO1 在足细胞中表达下调，提示 FoxO1 可能通过负性调控足细胞的凋亡在肾脏损伤中发挥作用。

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 的催化下将 DNA 链中 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5 碳位共价结合一个甲基，形成 5-甲基胞嘧啶的一种常见表观遗传学修饰过程。近些年研究发现，DNA 甲基化可以通过抑制基因的转录、延伸从而抑制基因的表达<sup>[23-24]</sup>。例如，尹树慧等<sup>[25]</sup>报道在肾细胞癌患者中抑癌基因 Ras 相关区域家族亚型 A(RASSF1A) 启动子区高甲基化导致 RASSF1A 蛋白表达下降，引起癌细胞的增殖；吴元等<sup>[26]</sup>发现抑癌基因 SOX7 启动子区高甲基化使其在膀胱癌中表达降低；但是有关 FoxO1 DNA 甲基化与肾脏足细胞凋亡的相关性研究很少，其具体作用尚不明确。此次实验发现，同型半胱氨酸组



中 FoxO1 DNA 甲基化水平明显升高，而且前面的结果已经表明同型半胱氨酸组 FoxO1 基因的 mRNA 和相关蛋白表达呈低表达，这就提示 FoxO1 的表达水平降低可能与 FoxO1 启动子区 DNA 甲基化水平升高密切相关。DNA 甲基转移酶在 DNA 甲基化中发挥着重要的作用，目前研究发现，人类是由 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 调节，而一旦 DNA 甲基化模式建立，维持型 DNA 甲基转移酶 DNMT1 会通过复制将它们传递到下一代<sup>[27-28]</sup>。研究表明 DNMT1 在多种疾病中发挥重要的调节作用<sup>[29-30]</sup>，如：DNMT1 通过与抑癌基因 SHP-1 的启动子区结合发生高甲基化，导致白血病的发生；田平等<sup>[30]</sup>发现在糖尿病肾病中 DNMT1 增高引起分泌型卷曲相关蛋白 1(Sfrp1) 的表达降低，进而促进了肾纤维化的发展。此次实验表明，同型半胱氨酸组中 DNMT1 表达升高，提示 DNMT1 可能在促进 FoxO1 DNA 甲基化中作用显著。

综上所述，FoxO1 启动子区高 DNA 甲基化使其在足细胞中表达减少，进而导致足细胞凋亡。为进一步研究同型半胱氨酸导致肾脏损伤提供了新的实验依据和研究方向。

**作者贡献：**实验设计由刘昆 (第一作者) 和谢琳 (第二作者) 完成；实验实施由曹军 (第三作者)、丁宁 (第四作者) 和徐灵博 (第五作者) 完成；试验评估由马胜超 (第六作者)、李桂忠 (第七作者)、姜怡邓 (第八作者) 和卢冠军 (通讯作者) 完成。通过了盲法评估。

**经费支持：**该文章接受了“国家自然科学基金 (81560120)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] OSTRAKHOVITCH EA, TABIBZADEH S. Homocysteine in Chronic Kidney Disease. *Adv Clin Chem.* 2015;72:77-106.

[2] KARMIN O, SLOW YL. Metabolic Imbalance of Homocysteine and Hydrogen Sulfide in Kidney Disease. *Curr Med Chem.* 2018;25(3):367-377.

[3] 叶增纯,黎燕,张俊,等.原发性肾小球肾炎患者高同型半胱氨酸血症的发生率及与靶器官损害之间的关系[J].*中山大学学报(医学科学版)*,2016,37(6):869-874+880.

[4] CHEN X, ZHAO L, XING Y, et al. Down-regulation of microRNA-21 reduces inflammation and podocyte apoptosis in diabetic nephropathy by relieving the repression of TIMP3 expression. *Biomed Pharmacother.* 2018; 108:7-14.

[5] 蒲道静,郑府,徐先顺,等.萝卜硫素干预纳米细菌诱导肾小管上皮细胞凋亡及线粒体自噬相关蛋白的表达[J].*中国组织工程研究*,2019,23(34):5503-5507.

[6] WEI X, YANG X, WANG B, et al. LncRNA MBNL1-AS1 represses cell proliferation and enhances cell apoptosis via targeting miR-135a-5p/PHLPP2/FoxO1 axis in bladder cancer. *Cancer Med.* 2019 Nov 25.

[7] XING YQ, LI A, YANG Y, et al. The regulation of FoxO1 and its role in disease progression. *Life Sci.* 2018;193:124-131.

[8] 谢琳,丁宁,徐灵博,等.FoxO1 DNA 甲基化在同型半胱氨酸致肝细胞凋亡中的作用[J].*实用医学杂志*,2018,34(16):2659-2662+2669.

[9] HISHIKAWA A, HAYASHI K, ABE T, et al. Decreased KAT5 Expression Impairs DNA Repair and Induces Altered DNA Methylation in Kidney Podocytes. *Cell Rep.* 2019;26(5):1318-1332.e4.

[10] LASSEIGNE BN, BROOKS JD. The Role of DNA Methylation in Renal Cell Carcinoma. *Mol Diagn Ther.* 2018;22(4):431-442.

[11] 丁宁,郭凤英,谢琳,等.miR-30a 在同型半胱氨酸致足细胞凋亡中的作用[J].*广东医学*,2019,40(6):762-766.

[12] 李金红,陶建瓴,李航.足细胞损伤与糖尿病肾病的研究现状[J].*中国医学科学院学报*,2010,32(5):590-596.

[13] WU CC, ZHENG CM, LIN YF, et al. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem.* 2012; 45(16-17):1286-94.

[14] ZHOU YF, GUAN YF. [Hyperhomocysteinemia and kidney diseases]. *Sheng Li Xue Bao.* 2018;70(6):607-611.

[15] CIANCIOLO G, DE PASCALIS A, DI LULLO L, et al. Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression: Which Comes First? *Cardiorenal Med.* 2017;7(4):255-266.

[16] FAN Y, ZHANG J, XIAO W, et al. Rtn1a-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress in Podocyte Injury and Diabetic Nephropathy. *Sci Rep.* 2017;7(1):323.

[17] WANG Y, LI H, SONG SP.  $\beta$ -Arrestin 1/2 Aggravates Podocyte Apoptosis of Diabetic Nephropathy via Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Med Sci Monit.* 2018;24:1724-1732.

[18] WANG L, SCOTT I, ZHU L, et al. GCN5L1 modulates cross-talk between mitochondria and cell signaling to regulate FoxO1 stability and gluconeogenesis. *Nat Commun.* 2017;8(1):523.

[19] 贺东黎.姜黄素通过ATK/FoxM1信号通路调控胃癌干细胞增殖及凋亡[J].*中国组织工程研究*,2016,20(32):4731-4737.

[20] CHAE YC, KIM JY, PARK JW, et al. FoxO1 degradation via G9a-mediated methylation promotes cell proliferation in colon cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(4):1692-1705.

[21] 张扬,吴朝蒙,雷博涵,等.PI3K/AKT/FoxO1信号通路参与复方中药CFF-1诱导的前列腺癌细胞凋亡和周期阻滞[J].*中华男科学杂志*,2017,23(09):828-837

[22] LIU Z, REN YA, PANGAS SA, et al. FOXO1/3 and PTEN Depletion in Granulosa Cells Promotes Ovarian Granulosa Cell Tumor Development. *Mol Endocrinol.* 2015; 29(7):1006-1024.

[23] TIRADO-MAGALLANES R, REBBANI K, LIM R, et al. Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget.* 2017;8(3):5629-5637.

[24] ZHANG L, ZHANG Q, LIU S, et al. DNA methyltransferases 1 may be a therapy target for attenuating diabetic nephropathy and podocyte injury. *Kidney Int.* 2017;92(1):140-153.

[25] 尹树慧,闫少春,周立社,等.肾细胞癌患者组织中RASSF1A、hMLH1及ALU甲基化水平的分析[J].*临床检验杂志*,2016,34(1):31-34.

[26] 吴元,张文涛,马文超,等.SOX7启动子甲基化对膀胱癌增殖及凋亡的影响[J].*医学研究生学报*,2019,32(12):1285-1290.

[27] KIM M, COSTELLO J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med.* 2017 Apr 28;49(4):e322.

[28] MOORE LD, LE T, FAN G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23-38.

[29] AL-JAMAL HA, MAT JUSOH SA, HASSAN R, et al. Enhancing SHP-1 expression with 5-azacytidine may inhibit STAT3 activation and confer sensitivity in lestaurtinib (CEP-701)-resistant FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *BMC Cancer.* 2015;15:869.

[30] 田平平,刘忠强,孔静,等.DNA甲基转移酶及分泌型卷曲相关蛋白1在糖尿病肾脏疾病大鼠肾组织中的表达研究[J].*中国糖尿病杂志*,2018,26(7):594-598.