

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001901

非小细胞肺癌患者血浆氧化应激水平和
Klotho 启动子甲基化分析于 露¹, 梁 良²

(四川省医学科学院·四川省人民医院 1. 呼吸内科; 2. 肿瘤中心, 成都 610072)

【摘要】目的:探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血浆氧化应激损伤水平和 Klotho 蛋白启动子甲基化状态及临床意义。**方法:**选择 66 名在四川省人民医院确诊为 NSCLC 的患者, 另选 50 名健康人群作为对照组, 分别采集其血浆。血浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和过氧化氢酶(catalase, CAT)水平采用试剂盒检测。qPCR 和 Western blot 检测血浆 Klotho 的表达。Klotho 表达量与氧化应激的相关性采用 Pearson 相关性分析。甲基化特异性 PCR(MS-PCR)检测 Klotho 甲基化水平。CpG 岛甲基化率采用焦磷酸盐测序法。**结果:**相对于对照组[(94.56 ± 16.40) mU/L], 观察组 SOD 含量[(79.86 ± 18.24) mU/L]明显降低($t=4.487, P=0.000$), 观察组 MDA 水平[(2.87 ± 2.26) pg/mL]与对照组[(2.52 ± 1.06) pg/mL]无统计学差异($t=1.675, P=0.097$), 观察组 CAT 水平[(18.50 ± 4.62) U/mg]与对照组[(25.26 ± 3.54) U/mg]相比明显降低($t=8.605, P=0.000$)。观察组(0.66 ± 0.16)比对照组(1.04 ± 0.10)血浆 Klotho 基因($t=14.93, P=0.000$)降低; 观察组(0.70 ± 0.20)比对照组(1.04 ± 0.10)血浆 Klotho 蛋白表达($t=10.92, P=0.000$)降低, 且 Klotho 蛋白表达量与 SOD 水平($r=0.768, P=0.000$)和 CAT 水平($r=0.708, P=0.000$)呈正相关。观察组 Klotho 启动子 CpG 岛甲基化水平升高。**结论:**Klotho 甲基化可能是 NSCLC 患者血浆氧化应激状态的一个临床标志物。

【关键词】非小细胞肺癌; 氧化应激; Klotho; 甲基化; CpG 岛**【中图分类号】**R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-02-09Level of oxidative stress and Klotho promoter methylation in the plasma of
patients with non-small cell lung cancerYu Lu¹, Liang Liang²(1. Respiratory Medicine; 2. Tumor Center, Sichuan Academy of Medical Sciences
& Sichuan Provincial People's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the level of oxidative stress and Klotho promoter methylation in the plasma of patients with non-small cell lung cancer(NSCLC) and their clinical significance. **Methods:** Plasma samples were collected from 66 patients, who were diagnosed with NSCLC in Sichuan Provincial People's Hospital(as observation group), and 50 healthy people(as control group). Assay kits were used to determine the levels of superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), and catalase(CAT) in plasma. The mRNA and protein expression of Klotho in plasma was measured/determined by qPCR and Western blot, respectively. Pearson correlation analysis was performed for the correlation between Klotho expression level and oxidative stress. Klotho methylation level was determined by methylation-specific PCR(MS-PCR). The methylation rate of CpG islands was determined by pyrosequencing. **Results:** Compared with the control group, the observation group had significantly reduced levels of SOD[(79.86 ± 18.24) mU/L vs. (94.56 ± 16.40) mU/L, $t=4.487, P=0.000$] and CAT[(18.50 ± 4.62) U/mg vs. (25.26 ± 3.54) U/mg, $t=8.605, P=0.000$], but there was no significant difference in MDA level between the observation group and the control group[(2.87 ± 2.26) pg/mL vs. (2.52 ± 1.06) pg/mL, $t=1.675, P=0.097$]. The mRNA and protein expression levels of Klotho in plasma were significantly lower in the observation group than in the control group(mRNA: 0.66 ± 0.16 vs. 1.04 ± 0.10, $t=14.93, P=0.000$; protein: 0.70 ± 0.20 vs. 1.04 ± 0.10, $t=10.92, P=0.000$). There was a positive correlation between the protein expression of Klotho and the levels of SOD($r=0.768, P=0.000$) and CAT($r=0.708, P=0.000$). Meanwhile, the observation group had an increased methylation level of CpG islands in the Klotho

作者介绍: 于 露, Email: yulu8228@163.com,

研究方向: 呼吸系统肿瘤分子机制。

通信作者: 梁 良, Email: 244560349@qq.com。

基金项目: 四川省卫生计生委科研资助项目(编号: 17PJ045)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181103.1452.020.html>

(2018-11-06)

promoter. **Conclusion:** Klotho methylation may be a clinical marker of oxidative stress in the plasma of patients with NSCLC.**【Key words】**non-small cell lung cancer; oxidative stress; Klotho; methylation; CpG island

近年来肺癌人群的数量正呈逐渐上升的趋势^[1]。在我国约有 80% 的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。NSCLC 早期病变部位比较局限,常表现为胸腔脏器局部浸润,而远处转移较少。有研究表明氧化应激损伤参与了 NSCLC 的发生发展^[2-3],但机制存在许多争议。Klotho 基因是新发现的一种衰老相关基因,该基因与肿瘤的关系近年来越来越受到关注^[4-6]。有研究报告 Klotho 与氧化应激密切相关^[7-8]。本研究拟对 NSCLC 患者的临床资料进行分析,进一步探讨 Klotho 在 NSCLC 中的氧化应激损伤中扮演的角色,研究 Klotho 的表达和启动子甲基化在其中的相关机制,为早期诊断和治疗 NSCLC 寻找新的靶标。

1 材料与方法

1.1 人群资料

选择 2016 年 2 月至 2017 年 6 月在四川省人民医院确诊为 NSCLC 的患者临床资料进行回顾性分析,收集入选患者的一般资料,包括年龄、性别、吸烟情况、肿瘤大小、肿瘤分期等。根据国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)推出第 8 版肺癌 TNM 分期标准建议的 T(原发肿瘤)、N(区域淋巴结)、M(远处转移)分期法。入选标准:①所有患者经穿刺组织病理学检查确诊为 I~II 期 NSCLC,并进行 CT 或 MRI 评价。②未向远处转移且无合并其他恶性肿瘤;③尚未进行手术且未进行过化疗或放疗;④临床资料完整;⑤肝肾功能正常,无严重的并发症。共有 66 例 NSCLC 患者作为观察组纳入本研究,其中男性 45 人,女性 21 人,年龄(53.09±11.86)岁。共有 50 名健康成年志愿者作为对照组纳入本研究,其中男性 40 人,女性 10 人,年龄(51.82±9.51)岁。2 组人群性别比例差异无统计学意义($\chi^2=2.029$, $P=0.154$),2 组年龄差异无统计学意义($t=0.621$, $P=0.536$)。

1.2 试剂

总 SOD 活性检测试剂盒(WST-8 法)、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司。EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 购自美国 EZ Biosystems™ 公司,MS-PCR(甲基化特异性 PCR)试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。兔抗人 Klotho 一抗购自 Millipore 公司,辣根过氧化物标记山羊抗兔二抗购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪选用 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System。

1.3 方法

1.3.1 血浆氧化应激检测 收集 2 组人群血浆,4℃ 1 500 r/min 15 min,取上清。总 SOD 检测方法:96 孔板设置空白对照孔和样品孔,按试剂盒说明书依次加入待测样品和工作

液,37℃ 孵育 30 min,酶标仪 450 nm 测定吸光度(absorbance, A),计算总 SOD 水平。MDA 检测方法:设置空白对照,标准品和样品,每管加入 MDA 检测工作液,100℃ 水浴 15 min,冷却至室温后 1 000 g 离心 10 min。取适量上清加入到 96 孔板中,酶标仪在 532 nm 测定吸光度,计算 MDA 含量。CAT 检测方法:取样品加入过氧化氢酶检测缓冲液混匀,再加入过氧化氢溶液。加入过氧化氢酶反应终止液,混匀终止反应。加入过氧化氢酶检测缓冲液到上述反应体系混匀。取 10 μL 加入到 96 孔板,加入 200 μL 显色工作液。25℃ 至少孵育 15 min 后测定 A520 计算 CAT 含量。

1.3.2 qPCR 检测 mRNA 表达 Trizol 法提取血浆总 mRNA,逆转录试剂盒转为 cDNA。Klotho 引物上游 5'-ACCTG-GTGGCGCACAACC-3',下游 5'-TTGGCAAACCAACCTAG-TACA-3';内参为 GAPDH,上游 5'-CAAGGCTGTGGGCAA-GGT-3',下游 5'-CAAGGCTGTGGGCAAGGT-3'。根据Takara SYBR® Premix Ex Taq™ II Real time PCR 反应条件为:预变性 95℃ 30 s;变性 95℃ 5 s,60℃ 31 s,40 个循环;返回 95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s;终止反应。反应体系为 20 μL。反应完成采用软件 StepOne Software v2.3 分析结果。

1.3.3 Western blot 提取血浆总蛋白,采用 BCA 法蛋白定量后用聚丙烯酰胺凝胶(SDS)电泳分离,电泳结束后转膜至聚偏二氟乙烯膜。5%脱脂奶粉封闭后,加入兔抗人 Klotho 一抗 4℃ 孵育 12 h, TBST 洗膜,加入辣根过氧化物标记山羊抗兔二抗孵育 1.5 h。采用凝胶成像仪采集图像,结果采用 Quantity One 软件进行条带灰度分析。

1.3.4 甲基化特异性 PCR 提取血浆 DNA,采用 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 试剂盒将 DNA 进行重亚硫酸氢盐处理,以处理后的 DNA 为模板扩增。Klotho 甲基化引物为:上游 5'-CGTTTGTGGAGCGGTTGC-3',下游 5'-GCCATAAA-CGCTCTACAAACG-3',Klotho 非甲基化引物为:上游 5'-GTGTTTGTGGAGCTGGCTGT-3',下游 5'-CACCATAAACAT-CCTACAAACAC-3',PCR 反应循环的设置:95℃ 5 min,94℃ 20 s,共 35 个循环,60℃ 30 s,共 35 个循环,72℃ 20 s,共 35 个循环,72℃ 5 min。反应结束后取 10 μL 反应产物电泳,琼脂糖凝胶浓度为 1.2%,电压 90 V。根据电泳图像扩增出甲基化条带而未扩增出非甲基化条带记为完全甲基化,未扩增出甲基化条带而扩增出非甲基化条带记为完全非甲基化。

1.3.5 焦磷酸盐测序检测 CpG 位点 使用 Qiagen PyroMark PCR 试剂盒扩增重亚硫酸氢盐处理的 DNA。扩增反应设置为:94℃ 15 min,(95℃ 30 s,61℃ 30 s,72℃ 5 min)×35 循环,72℃ 5 min。然后使用 PyroMark™ Q96 MD Pyrosequencing System 试剂盒对 Klotho 特异性 PCR 产物进行定量焦磷酸测序分析。测试的 CpG 位点的甲基化程度=甲基化胞嘧啶(methylated cytosine)/胞嘧啶总和×100%。每个样本检测后计算均值。

1.4 统计分析

采用软件 SPSS 19.0 进行统计分析。采用 D'Agostino-Pearson 法对计量数据进行正态性检验,符合正态分布的采用 t 检验,数据用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。率或构成比比较采用卡方检验。资料相关性采用 Pearson 相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般资料

对照组和观察组人群性别通过卡方检验差异无统计学意义 ($\chi^2=2.029, P=0.154$); 年龄呈正态分布, 对照组年龄 (51.82 ± 9.51) 岁, 观察组年龄 (53.09 ± 11.86) 岁, 差异均无统计学意义 ($t=0.621, P=0.536$); 吸烟情况有统计学意义, 观察组吸烟比例高于对照组 ($\chi^2=20.213, P=0.000$)。

表 1 2 组人群基本资料 ($n, \bar{x} \pm s$)

基本资料	对照组 ($n=50$)	观察组 ($n=66$)	t/χ^2 值	P 值
性别比例(n ,男/女)	40/10	45/21	2.029	0.154
年龄(岁)	51.82 ± 9.51	53.09 ± 11.86	0.621	0.536
吸烟人数/不吸烟人数	17/33	51/15	20.213	0.000

2.2 氧化应激检测

与对照组相比观察组血浆 SOD 含量明显降低 ($t=4.487, P=0.000$), 观察组 MDA 水平与对照组无统计学差异 ($t=1.675, P=0.097$), 观察组 CAT 水平与对照组相比明显降低 ($t=8.605, P=0.000$), 见表 2。

表 2 对照组与观察组血浆氧化应激水平检测

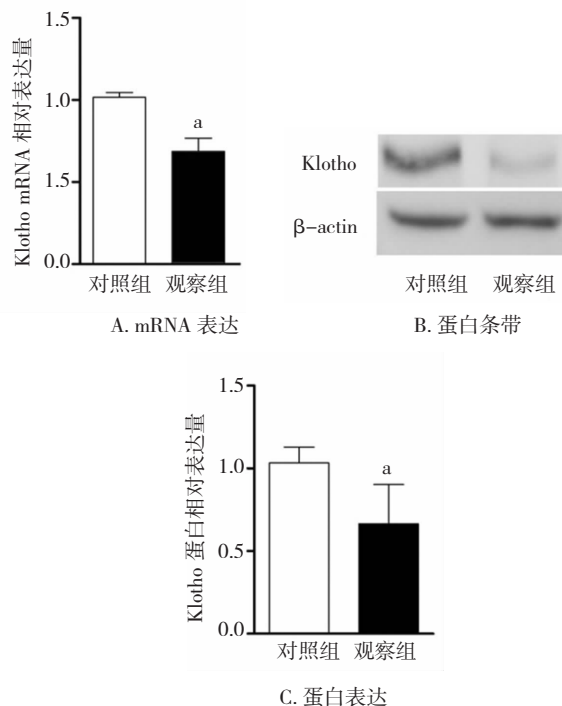
指标	对照组 ($n=50$)	观察组 ($n=66$)	t 值	P 值
SOD(mU/L)	94.56 ± 16.40	79.86 ± 18.24	4.487	0.000
MDA(pg/mL)	2.52 ± 1.06	2.87 ± 2.26	1.675	0.097
CAT(U/mg)	25.26 ± 3.54	18.50 ± 4.62	8.605	0.000

2.3 Klotho 基因和蛋白表达

如图 1A 所示,通过对 2 组人群血浆中 Klotho 的 mRNA 的检测发现,与对照组 (1.04 ± 0.10) 相比,观察组 (0.66 ± 0.16) Klotho 基因 mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义 ($t=14.93, P=0.000$);图 1B 为蛋白条带,观察组条带灰度明显降低。如图 1C 所示,用 Quantity One 软件进行目的蛋白与内参的相对条带灰度分析定量,观察组 (0.70 ± 0.20) 比对照组 (1.03 ± 0.10) 明显降低 ($t=10.920, P=0.000$)。

2.4 Klotho 表达与氧化应激相关性

如图 2A 所示,观察组人群 Klotho 蛋白表达量与其血浆 SOD 含量呈正相关 ($r=0.768, P=0.000$);如图 2B 所示,观察组人群 Klotho 蛋白表达量与其血浆 CAT 含量呈正相关 ($r=0.708, P=0.000$)。



注:与对照组相比,a表示 $P < 0.05$

图 1 2 组人群血浆 Klotho 的表达

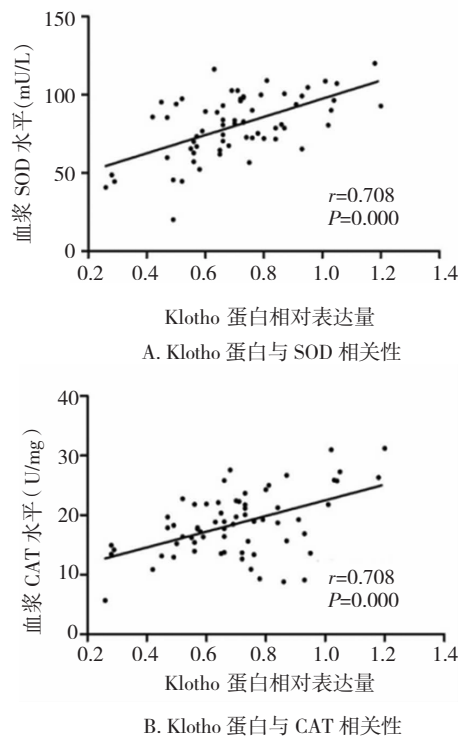
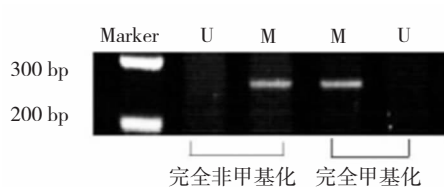


图 2 NSCLC 患者血浆 Klotho 蛋白表达量与 SOD 和 CAT 水平的相关性分析

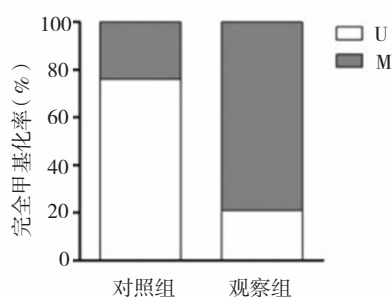
2.5 Klotho 启动子甲基化水平

图 3A 为完全甲基化和完全非甲基化条带示例。如图 3B 所示,对照组 38 人为完全非甲基化,12 人完全甲基化,甲基化率为 24%;观察组完全非甲基化 14 人,完全甲基化 52 人,

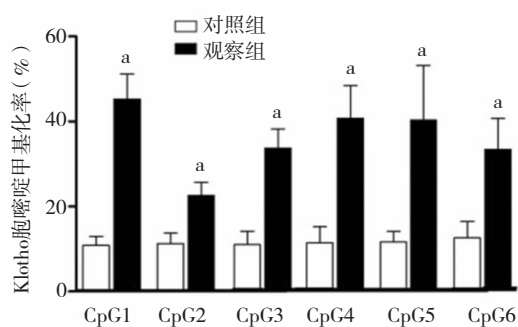
甲基化率为 79%, 采用卡方检验差异有统计学意义 ($\chi^2=32.347, P=0.000$)。图 3C 和表 3 通过焦磷酸盐测序法检测了对照组与观察组 Klotho 基因 6 个 CpG 岛位点的甲基化水平, 6 个位点差异均有统计学意义。



A. 甲基化与非甲基化典型条带



B. 甲基化程度



注: 与对照组相比, a 表示 $P < 0.05$

C. 6 个 CpG 岛位点甲基化率

图 3 2 组人群血浆 Klotho 甲基化程度

表 3 Klotho 基因 6 个 CpG 岛位点的甲基化水平

胞嘧啶甲基化率 (%)	对照组 (n=50)	观察组 (n=66)	t 值	P 值
CpG1	11.45 ± 2.40	43.65 ± 8.64	25.590	0.000
CpG2	12.22 ± 2.66	21.88 ± 5.46	11.510	0.000
CpG3	12.40 ± 3.04	34.50 ± 7.62	19.360	0.000
CpG4	11.88 ± 2.55	41.52 ± 9.65	21.150	0.000
CpG5	12.58 ± 2.05	40.36 ± 12.42	15.640	0.000
CpG6	13.66 ± 3.06	35.76 ± 9.25	16.220	0.000

3 讨论

NSCLC 的发生与遗传、环境、营养、抽烟喝酒等不良生活习惯密切相关, 早发现、早诊断、早治疗可

以有效降低 NSCLC 死亡率, 改善生存质量^[9]。NSCLC 的发生和病程发展受遗传和环境等多种因素影响, 而氧化应激是一个高危因素。

在一般生理条件下, 细胞内有高效的氧化-还原体系来防止自由基造成的氧化应激损伤。但在病理条件下, 氧化-还原体系失衡, 自由基的产生速率超出了机体抗氧化调节能力的范围, 导致对机体的氧化应激损伤。研究表明, 癌患者癌组织内存在大量的氧化应激损伤, 可能与 P53 信号通路和 Kras 的激活有关^[10]。国外学者研究发现, 恶性肿瘤发生发展过程中, 高浓度的自由基可以产生大量活性氧, 进而破坏机体内细胞 DNA, 也可与蛋白发生特异性反应生成衍生物, 继而改变细胞内环境的状态, 促进肿瘤发生发展^[10]。另一方面, 肿瘤组织也可产生活性氧诱发新的脂质过氧化, 损伤正常细胞。在氧化应激反应中, 脂质将被过氧化物损坏, 过氧化氢酶(catalase, CAT)是催化过氧化氢分解成氧和水的酶, 存在于细胞的过氧化物体内。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是氧化应激最终产物之一, 可间接反映细胞上的自由基损伤程度, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是抗氧化系统中去除氧自由基的主要成员之一^[11-12]。本研究结果发现, 与对照组相比, 观察组患者血浆中 SOD 和 CAT 活力均降低, 说明在 NSCLC 患者体内已经存在氧化-抗氧化紊乱状态。相对于对照组人群, NSCLC 患者 MDA 水平虽然有升高的趋势, 但无统计学差异。在以后的研究中, 氧化应激损伤状态与 NSCLC 分期预后、组织分型将进一步深入探讨。

Klotho 基因是国外学者 1997 年在衰老的小鼠模型上新发现的一种衰老相关基因^[13-17], 将 Klotho 敲除后小鼠在出生后第 3 周即表现出衰老现象, 继而发生各种疾病。近年国内外研究发现, 受多种因素调控的 Klotho 除了具有衰老相关病理生理作用, 还参与氧化应激损伤和恶性肿瘤等多种疾病的发生发展过程^[14-17]。Klotho 可通过多种途径发挥抗氧化作用, 如促进多种抗氧化基因过氧化氢酶、SOD 等的表达, 进而发挥抗氧化的作用^[18-20]。基于以上报道, 本研究发现, 与对照组比较, 观察组人群血浆 Klotho 基因 mRNA 和蛋白表达明显降低, 且 NSCLC 患者 Klotho 基因表达量与 SOD 和 CAT 水平均呈正相关。Klotho 既有抗氧化的作用, 氧化应激损伤也可通过不同途径下调 Klotho 的表达^[18-19]。此外国外报

道结肠癌、肝癌和乳腺癌组织中 Klotho 表达水平较正常组织降低,过表达可使肿瘤组织生长抑制,提示 Klotho 可能是一个肿瘤抑制因子^[20],这些研究提示 Klotho 可能作为一个抗肿瘤靶点用于肿瘤的治疗。

人类 Klotho 基因定位于染色体 13q12,Klotho 基因全长约 50 kb,其外显子 1 及旁侧 2 000 bp 序列中,G+C 的平均含量为 66.75%,提示这一区域可能有 CpG 岛的形成。DNA 甲基化修饰通常发生在 CpG 基序中的胞嘧啶基团。增加启动子甲基化的结果通常降低基因表达^[21-22]。本研究表明,相对于对照组人群,NSCLC 患者 Klotho 的甲基化水平明显升高,表明 Klotho 启动子甲基化在 NSCLC 氧化应激损伤的病理生理学中发挥着重要的作用。当然,一个基因的小变化对于疾病和健康的影响有限,然而 Klotho 甲基化的变化将影响下游途径的正常功能,具有潜在的临床意义。

综上所述,通过对 NSCLC 患者的临床研究,本研究发现 Klotho 甲基化可能是 NSCLC 体内氧化应激损伤的一个临床标志物和新的治疗靶标。更深入的具体机制还需要进一步研究,相信在不久的将来随着 Klotho 基因在更多恶性肿瘤中研究的开展,抗衰老基因 Klotho 作为一种新型的抑癌基因会得到越来越多的关注和重视,也为恶性肿瘤的靶向治疗提供更多理论依据。

参 考 文 献

- [1] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志,2010,13(5):488-493.
- [2] 马育华,彭海英,王志惠. 非小细胞肺癌组织中 DEC1 mRNA、DEC2 mRNA 表达及意义[J]. 山东医药,2016,56(12):20-23.
- [3] Takenaka T,Furuya K,Yamazaki K,et al. The prognostic impact of combined pulmonary fibrosis and emphysema in patients with clinical stage IA non-small cell lung cancer[J]. Surg Today,2018,48(2):229-235.
- [4] Meazza C,Elsedfy HH,Khalaf RI,et al. Serum α -klotho levels are not informative for the evaluation of growth hormone secretion in short children[J]. J Pediatr Endocrinol Metab,2017,30(10):1055-1059.
- [5] Ohnishi M,Kato S,Akiyoshi J,et al. Dietary and genetic evidence for enhancing glucose metabolism and reducing obesity by inhibiting Klotho functions[J]. FASEB J,2011,25(6):2031-2039.
- [6] Lan DF,Wang L. Association between plasma Klotho levels and insulin resistance in type 2 diabetic patient[J]. Chin J Diabetes,2012,20(1):43-45.
- [7] 韩艳平,王佑民. 代谢正常肥胖人群中 Klotho 蛋白与氧化应激相关性研究[J]. 安徽医科大学学报,2016,51(5):678-681.
- [8] 唐荣,周巧玲,刘志纯,等. 福辛普利、氯沙坦对自发性高血压大鼠 Klotho 表达及氧化应激的影响[J]. 中南大学学报(医学版),2011,36(1):27-33.
- [9] 都瑾,高建辉,韩纪昌,等. 非小细胞肺癌肿瘤组织干细胞标志物 CD133 的表达[J]. 中国组织工程研究,2015,19(36):5816-5820.
- [10] Federico A,Morgillo F,Tuccillo C,et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis[J]. Int J Canc,2007,121(11):2381-2386.
- [11] Bahnson ES,Koo N,Cantu-Medellin N,et al. Nitric oxide inhibits neointimal hyperplasia following vascular injury via differential, cell-specific modulation of SOD-1 in the arterial wall[J]. Nitric Oxide,2015,44:8-17.
- [12] Li L,Tan J,Miao Y,et al. ROS and autophagy:interactions and molecular regulatory mechanisms[J]. Cell Mol Neurobiol,2015,35(5):615-621.
- [13] Xu Y,Sun Z. Molecular basis of Klotho:from gene to function in aging[J]. Endocr Rev,2015,36(2):174-193.
- [14] Tang R,Zhou Q,Liu Z,et al. Effects of fosinopril and losartan on renal Klotho expression and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban,2011,36(1):27-33.
- [15] 常晋瑞,孙娜,南瑛,等. Klotho 的研究进展[J]. 生理科学进展,2015,46(4):245-249.
- [16] Hu MC,Kuro-o M,Moe OW. Renal and extrarenal actions of Klotho[J]. Semin Nephrol,2013,33(2):118-129.
- [17] Liu JJ,Liu S,Morgenthaler NG,et al. Association of plasma soluble α -Klotho with pro-endothelin-1 in patients with type 2 diabetes[J]. Atherosclerosis,2014,233(2):415-418.
- [18] Amitani M,Asakawa A,Amitani H,et al. Plasma Klotho levels decrease in both anorexia nervosa and obesity[J]. Nutrition,2013,29(9):1106-1109.
- [19] Kim SJ,Cheresh P,Eren M,et al. Klotho,an anti-aging molecule, attenuates oxidant-induced alveolar epithelial cell mtDNA damage and apoptosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2017,313(1):L16-26.
- [20] Zhou X,Wang X. Klotho;a novel biomarker for cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2015,141(6):961-969.
- [21] Yang X,Wang X,Liu D,et al. Epigenetic regulation of macrophage polarization by DNA methyltransferase 3b[J]. Mol Endocrinol,2014,28(4):565-574.
- [22] Takasugi M. Progressive age-dependent DNA methylation changes start before adulthood in mouse tissues[J]. Mech Ageing Dev,2011,132(1-2):65-71.

(责任编辑:冉明会)