

miRNA-21 和 miRNA-134 在乳腺癌患者血清中表达情况及其临床意义

石 岩^{1,3}, 秦 岩², 宋 磊⁴, 梁月勉⁵, 王小磊¹, 韩贵良¹

(河北大学附属医院 1.肿瘤内科//河北省放疗机制与规程研究重点实验室, 2.中心实验室, 3.中西医肿瘤科, 4.病理科, 河北 保定 071000)

摘要:【目的】研究乳腺癌相关 miRNA 在正常人群及乳腺癌患者血清中的表达情况, 统计分析其在乳腺癌诊断中的临床价值。【方法】收集 47 例乳腺癌及 50 例正常体检人群血清, 通过实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况。分析单个血清 miRNA 在乳腺癌诊断中的价值, 进一步用统计学方法分析多个 miRNA 联合检测的诊断价值。【结果】相比正常体检人群, 乳腺癌患者血清中 miR134 和 miR-21 表达增加, $P < 0.01$; miR-134 的表达在早期和晚期患者之间没有明显区别, $P = 0.143$; miR-21 在晚期患者中表达增加, $P = 0.004$; miR-195、miR-630、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达量在两组之间差异没有统计学意义。ROC 曲线分析结果显示, miR-21 在乳腺癌诊断中的 AUC 为 0.82(95%CI, 0.71-0.88), $P < 0.001$; miR-134 在乳腺癌诊断中的 AUC 为 0.88(95%CI, 0.80-0.94), $P < 0.001$ 。miR-21 联合 miR-134 在乳腺癌诊断中 AUC 值为 0.95(95%CI, 0.89-0.99), $P < 0.001$; 两者联合优于单一检测 miR-21 或者 miR-134, $P < 0.05$ 。【结论】miR-21 和 miR-134 在乳腺癌患者血清中升高, 血清中 miR-21 和 miR-134 的表达情况, 可以作为乳腺癌诊断的理想标志物。

关键词:乳腺癌; 微小 RNA; miRNA-21; miRNA-134; 诊断

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2016)06-0875-06

miRNA-21 and miRNA-134 as Potential Serum Markers in Diagnosis of Breast Cancer

SHI Yan^{1,3}, QIN Yan², SONG Lei⁴, LIANG Yue-mian⁵, WANG Xiao-lei¹, HAN Gui-liang¹

(1. Department of Medical Oncology // Key Laboratory for Fractionation Mechanisms and Procedures of Hebei, 2. Department of Central Lab, 3. Department of Chinese Radiology, 4. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

Corresponding to: QIN Yan, E-mail: qinyanhbsjz@sina.com

Abstract: 【Objective】 Exploring the expression of breast cancer related miRNA in the serum of normal population and breast cancer patients, analysis its clinical value in the diagnosis of breast cancer. 【Methods】 Serumswere collected from normal population and breast cancer patients. RT-PCR was used to test the expression of miR-630, miR-21, miR-195, miR-134, miR-200a, miR-381 and miR-1228. The value of single serum miRNA in diagnosis of breast cancer wereanalyzed, the diagnostic value of combined detection of multiple miRNA were further analyzedby using statistical methods. 【Results】 Compared to normal population, serum miR134 and miR21 were increased in breast cancer patients, $P < 0.01$; the expression of miR-134 had no difference between the early stage breast cancer patients and late stage breast cancer patients, $P = 0.143$; the expression of miR-21 increased in the late stage breast cancer patients, $P = 0.004$. Meanwhile, the expression of miR-195, miR-630, miR-200a, miR-381, miR-1228 levels between the two groups had nostatistical significance. ROC curve analysis showed that, in the diagnosis of breast, AUC value of miR-21 was 0.82 (95% CI, 0.71-0.88), $P < 0.001$; AUC value of miR-134 was 0.88 (95% CI, 0.80-0.94), $P < 0.001$; AUC value of miR-21 combined with miR-134 in the diagnosis of breast was 0.95 (95% CI, 0.89-0.99), $P < 0.001$, which was better than a single

收稿日期: 2016-05-12

基金项目: 河北大学附属医院青年科研基金(2015Q014)

作者简介: 石岩, 硕士, 主治医师, 研究方向: 乳腺肿瘤; 秦岩, 通信作者, 主管检验师, E-mail: qinyanhbsjz@sina.com

detector miR-21 or miR-134, $P < 0.05$. 【Conclusion】 The expression of serum miR-21 and miR-134 in the breast cancer patients was elevated and miR-21 combined with miR-134 can be used as an ideal marker for the diagnosis of breast cancer.

Key words: breast cancer; miRNA; MiRNA-21; miRNA-134; diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(6): 875-880]

乳腺癌是威胁女性健康的常见恶性肿瘤,全球每年新诊断病例达 138 万,年死亡人数约 50 万。目的应用于临床的乳腺疾病诊断方法有多种,但真正较为成熟或有理想应用前景的诊断乳腺癌的手段不多。MicroRNA 是一类内源性的非编码 RNA,由 19-25 个左右核苷酸组成,通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 碱基互补配对,从而抑制 mRNA 翻译或直接使其降解,导致靶基因的表达在转录后水平受到抑制,最终调控基因表达^[1]。近年来的研究表明血清 miRNA 表达谱与肿瘤的病理及临床特征都有关系,并且可以预测肿瘤的预后和指导临床的处理。很多 miRNA 在乳腺癌患者血清或癌组织中的异常表达可以影响肿瘤的行为和进展,其中热门的包括 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228^[2-8]。Zhang 等^[2]的研究发现 miR-21 在乳腺癌组织中表达增加,并可以通过下调 STAT3 从而参与乳腺癌的进展。Ming 等^[5-6]的研究发现 miR-138 和 miR-200a 都可以抑制乳腺癌细胞中 Cx-43 的表达。但是目前为止这 7 种 miRNA 在在乳腺癌诊断中的应用价值尚未有报道。在本研究拟通过检测正常人群、乳腺癌患者血清中 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 这 7 种 miRNA 的表达情况,统计分析其在乳腺癌诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年-2014 年河北大学附属医院肿瘤科 47 例行乳腺癌根治术患者及 50 例正常体检患者静脉血,年龄 35~71 岁,平均(53 ± 8.6)岁,血液采集后立即离心,血清保存于-80℃冰箱。所有患者术前均未行任何放、化疗。术后病理诊断三阴性乳腺癌 13 例,非三阴性乳腺癌患者 34 例。本研究中患者均签署知情同意书,并由河北大学附属医院伦理委员会审核通过。

1.2 实验试剂

RNA 提取试剂 (Invitrogen 公司);takara 反转录试剂盒 (大连宝生物公司);SYBR Green 荧光染料试剂盒 (Roche 公司);PCR 引物由上海吉玛公司设计合成。

1.3 荧光定量 RT-PCR 检测基因表达

提取所收集患者血清中总 RNA,将提取的 RNA 进行反转录成 cDNA,反应体系为 20 μL,反应条件为:16℃(30 min),45℃(30 min),85℃(5 min)。运用 SYBR Green 法检测 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况,运用的反应条件为:94℃(15 min),94℃(30 s),60℃(30 s),72℃(30 s),共循环 40 次;最后 72℃延伸 8 min。每组样品重复 3 次,试验重复 3 次,统计分析各标本中 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达。

1.4 统计学方法

采用 Medcalc 软件进行统计学分析计量数据,采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数间比较用单因素方差分析;各血清 miRNA 表达量与患者一般情况相关性采用相关分析;ROC 曲线分析用于各 miRNA 对诊断乳腺癌及区分非三阴乳腺癌与三阴性乳腺癌的敏感性与特异性分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况

两组患者一般情况如表 1 所示,年龄、体质量、哺乳史在两组之间没有明显差异($P > 0.05$)。相比于正常人群,乳腺癌组患者中有良性乳腺疾病的比例更高($P = 0.043$);有乳腺癌家族史的比例更高($P = 0.02$)。47 例乳腺癌患者中,Ⅰ期患者 6 例,Ⅱ期患者 23 例,Ⅲ期患者 13 例,Ⅳ期患者 5 例。

2.2 乳腺癌相关的 miRNA 在正常体检人群及乳腺癌患者中的表达情况

表1 乳腺癌患者及正常人群一般情况

Table 1 Baseline characteristics of breast cancer patients and controls

($\bar{x} \pm s$)

	Breast cancer($n = 47$)	Normal patients($n = 50$)	<i>P</i> value
Age/years	54.9 ± 3.2	51.4 ± 8.6	0.531
Body mass/kg	54 ± 5.3	56 ± 6.2	0.483
Benign breast disease	17/47(36.2%)	9/50(18.0%)	0.043
Lactation history	31/47(66.0%)	40/50(80%)	0.119
Family history of breast cancer	12/47(25.5%)	4/50(8%)	0.02
Stage(I / II / III / IV)	6(12.7%)/23(48.9%)/13(27.6%)/5(10.6%)		

实时荧光定量 PCR 检测正常体检人群及乳腺癌患者血清中 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况,结果发现相比正常体检人群,乳腺癌患者(包括三阴性和非三阴乳腺癌)血清中 miR134 和 miR21 表达增加, $P < 0.01$; miR-195、miR-630、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达量在两组之间差异没有统计学意义(表2)。之后我们进一步根据乳腺癌分期情况,把 47 例乳腺癌患者分成早期(29 例)和晚期(18 例),发现血清 miR-134 的表达在早期和晚期患者之间没有明显区别, $P = 0.143$; miR-21 在晚期患者中表达增加($P = 0.004$,图 1)。

2.3 血清 miRNA 在乳腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

为了进一步评价血清 miRNA 在乳腺癌诊断中的应用,我们继续对这 7 种 miRNA 做了 ROC 曲线分析(图 2)。结果显示 miR-21 的曲线下面积(AUC)为 0.82(95%CI 0.71-0.88, $P < 0.001$); miR-

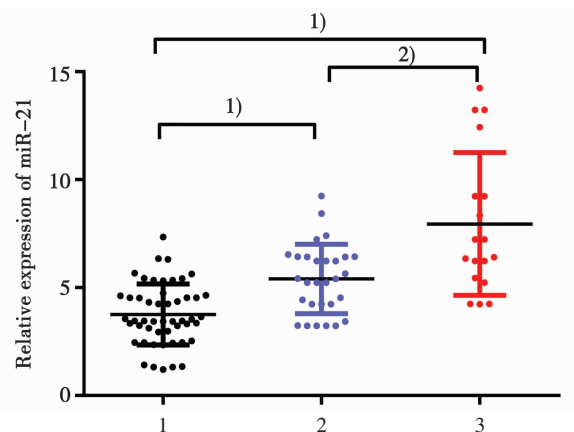
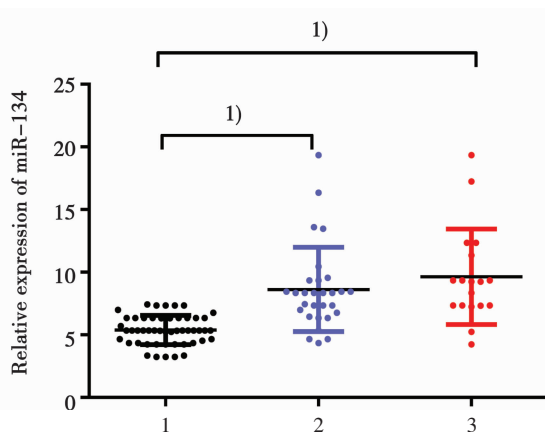
表2 两组患者血清中 7 种 miRNAs 的比较

Table 2 The expression of 7 kinds of miRNAs in the two group ($\bar{x} \pm s$)

	Normal patients($n = 50$)	Breast cancer($n = 47$)	<i>F</i>	<i>P</i>
miR-630	1.547 ± 0.288	1.543 ± 0.225	0.004	0.949
miR-21	3.760 ± 1.411	6.291 ± 2.554	37.085	<0.001
miR-195	0.351 ± 0.036	0.378 ± 0.109	2.828	0.096
miR-134	5.388 ± 1.171	9.009 ± 3.534	46.994	<0.001
miR-200a	0.378 ± 0.130	0.456 ± 0.262	3.593	0.061
miR-381	7.793 ± 1.405	8.100 ± 1.398	1.162	0.284
miR-1228	1.457 ± 0.166	1.461 ± 0.155	0.017	0.896

134 的 AUC 为 0.88(95%CI 0.80-0.94, $P < 0.001$); 其余 5 种 miRNA 做 ROC 分析差异均无统计学意义(表2)。根据 ROC 曲线分析,我们进一步确定 7 中 miRNA 用于诊断的最佳 cut-off 值,以及其在乳腺癌诊断中的敏感性和特异性(表3)。

对 7 种血清 miRNA 在乳腺癌诊断中做 ROC



1: normal patients; 2: early breast cancer patients; 3: late breast cancer patients. 1) $P < 0.01$ vs normal patients; 2) $P < 0.01$ vs early breast cancer patients.

图1 血清 miR-134 和 miR-21 在三组人群中的表达情况

Fig.1 The expression of serum miR-134 and miR-21 in the three groups

表 3 对 7 种血清 miRNAs 在乳腺癌诊断中的 ROC 曲线分析
Table 3 ROC analysis of each miRNAs on the diagnosis of breast cancer

Values	auROC	95%CI	P	Youden	Cut-off/(pg/mL)	Sensitivity/%	Specificity/%
miR-630	0.524	0.42-0.63	0.680	0.10	1.43	70.21	40.00
miR-21	0.802	0.71-0.88	<0.0001	0.48	4.74	68.09	80.00
miR-195	0.555	0.45-0.66	0.352	0.12	0.37	31.91	80.00
miR-134	0.883	0.80-0.94	<0.0001	0.71	6.35	85.11	86.00
miR-200a	0.567	0.46-0.67	0.250	0.15	0.46	46.81	68.00
miR-381	0.551	0.45-0.65	0.382	0.13	6.46	89.36	24.00
miR-1228	0.52	0.41-0.62	0.803	0.06	1.23	93.62	12.00

曲线对比(图 2),发现 miR-21 和 miR-134AUC 大于 miR-630、miR-195、miR200a、miR-381、miR-1228, $P < 0.01$; miR-21 和 miR-134 之间差异没有统计学意义, $P = 0.19$ (如图 2)。

2.4 MiR-21 联合 miR-134 在乳腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

用多元逻辑回归算得在用 miR-21 联合 miR-

134 在乳腺癌诊断时其前的系数(miR-21 & miR-134) = $1.007 \text{ miR-21} + 1.27 \text{ miR-134}$ 。miR-21 联合 miR-134 在乳腺癌诊断中的 ROC 分析结果如表 3 所示。miR-21 联合 miR-134 的 AUC 值大于 miR-21 ($P = 0.0001$); miR-21 联合 miR-134 的 AUC 值大于 miR-134 ($P = 0.025$, 图 3)。

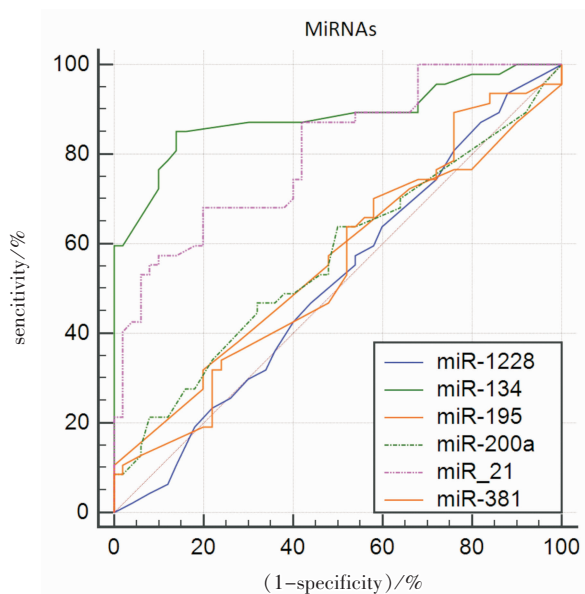


图 2 7 种血清 miRNAs 在乳腺癌诊断中的 ROC 曲线分析比较

Fig.2 Compared ROC analysis of 7 miRNAs on the diagnosis of breast cancer

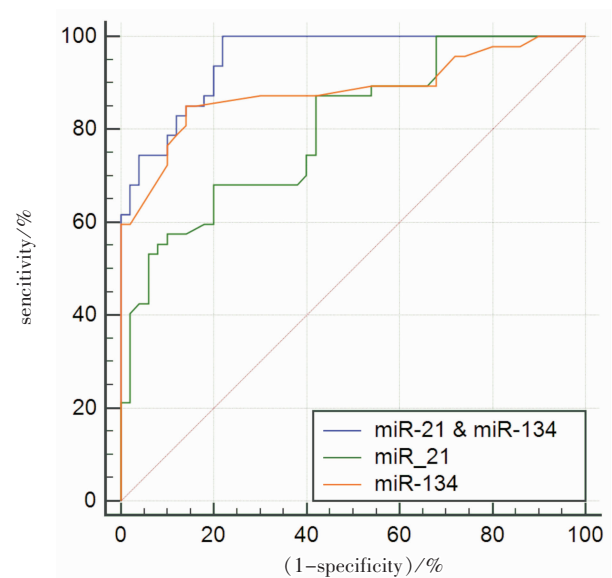


图 3 MiR-21 联合 miR-134 在乳腺癌诊断中的 ROC 曲线分析比较

Fig.3 ROC analysis and comparison of combined detection of miR-21 and miR-134 on the diagnosis of breast cancer

表 4 MiR-21 联合 miR-134 在乳腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

Table 4 ROC analysis of combined detection of miR-21 and miR-134 on the diagnosis of breast cancer

Values	auROC	95%CI	P	Youden	Cut-off	Sensitivity/%	Specificity/%
miR-21 & miR-134	0.95	0.89-0.99	< 0.001	0.78	12.17	100.00	78.00

Value of (miR-21&miR-134) = $1.007 \text{ miR-21} + 1.27 \text{ miR-134}$

3 讨论

miRNA 是一类进化上高度保守的非编码小分子单链 RNA,不仅可以游离于细胞之外,还能稳定的存在于血清中,研究表明血清 miRNA 耐 RNA 酶降解,煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等各种处理方法均不会造成血清 miRNA 的损失,其具备作为疾病分子生物标志物的许多优点^[9-10]。虽然血清 miRNA 的来源尚无定论,但是 miRNA 在不同疾病及病理进程中具有特定的表达谱,已经在多种肿瘤、自身免疫性疾病、炎症等多种疾病的诊断和预后中显示了独特的价值。

本研究选取了目前在乳腺癌领域研究热门的 7 种 miRNA,包括 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228,检测其在正常人群及乳腺癌患者血清中的表达情况,发现 miR-134 和 miR-21 在乳腺癌患者血清中表达增加,提示 miR-21 和 miR-134 可用于乳腺癌的诊断。之后我们进一步根据乳腺癌分期情况,把 47 例乳腺癌患者分成早期和晚期,发现 miR-21 和 miR-134 的表达在乳腺癌早期患者中就升高,提示 miR-21 和 miR-134 在乳腺癌的早期诊断中具有一定的临床价值。相比于早期乳腺癌患者,miR-21 在晚期患者中表达增加,而 miR-134 的表达在早期和晚期患者之间没有明显区别,提示 miR-21 可能与乳腺癌分期相关。虽然过去已有研究显示 miR-630、miR-195、miR-200a、miR-381 和 miR-1228 在乳腺癌组织中高表达或者可以直接影响乳腺癌细胞的生物学特性,但是我们的实验结果显示这 5 个 miRNA 在正常体检人群和乳腺癌患者血清中的表达并没有差异。

为了进一步评估 miRNA 在乳腺癌诊断中的临床应用价值,本研究进一步对这 7 种 miRNA 做 ROC 曲线分析,发现血清 miR-21 和 miR-134 的表达情况在乳腺癌诊断中具有较高的 AUC 值,分别为 0.802、0.883。之后我们采用多元逻辑回归算得 miR-21 联合 miR-134 在乳腺癌诊断时其前的系数(miR-21 & miR-134) = 1.007 miR-21 + 1.27 miR-134,对(miR-21 & miR-134)行 ROC 曲线分析发现其 AUC 值为 0.95,优于单一使用 miR-134 或者 miR-21 来诊断乳腺癌。与我们的研究结果相符,ZUO 等^[11]的研究发现在检测 AFP 的基础上,

联合检测血清 miR-125b 和 miR-27a 的水平,可以大大提高早期肝癌患者诊断的敏感性和特异性。Gu 及其团队^[12]的研究也发现联合检测血清 miR-182、miR-200c、miR-221 的水平可以提到前列腺癌的检出水平。随着现在检测技术和设备的提升,在少量的样本中快速、灵敏的对 miR-21 和 miR-134 同时进行检测已成为可能^[13-14]。miR-21 和 miR-134 联合检测可以大大提高乳腺癌诊断的敏感性和特异性,是一种理想的诊断标志物。

本研究通过检测检测正常人及乳腺癌患者血清中 7 种 miRNA 的表达情况,发现 miR-21 和 miR-134 在乳腺癌患者血清中表达增加,之后通过 ROC 曲线法分析 7 种 miRNA 在乳腺癌诊断中的价值,发现 miR-21 和 miR-134 在乳腺癌诊断中具有较好的敏感性和特异性,并进一步统计发现 miR-21 和 miR-134 两者联合可以大大提高乳腺癌诊断的敏感性和特异性,是一种理想的诊断标志物。

本研究存在不足之处,由于成本问题,本研究纳入的样本量相对较少,无法对大规模的样本进行初步筛选,其次本研究选择的乳腺癌患者为所有分期中的患者,得出的结论为 miR-21 和 miR-134 在乳腺癌诊断中的价值,究竟 miR-21 和 miR-134 是否可以应用于乳腺癌的早期诊断尚未明确,我们将在后续的研究中,采取前瞻性研究的方法,加大样本量,并随访观察乳腺癌患者的预后情况,进一步探究 miR-21 和 miR-134 在乳腺癌早期诊断及预后中的价值。

参考文献

- [1] IWAKAWA HO, TOMARI Y. The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(11):651-665.
- [2] ZHANG C, LIU K, LI T, et al. MiR-21: a gene of dual regulation in breast cancer [J]. Int J Oncol, 2016, 48(1):161-172.
- [3] WANG F, JIANG C, SUN Q, et al. MiR-195 is a key regulator of Raf1 in thyroid cancer [J]. Oncotargets Ther, 2015, 8:3021-3028.
- [4] O'BRIEN K, LOWRY MC, CORCORAN C, et al. MiR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity [J]. Oncotarget, 2015, 6(32):32774-32789.
- [5] MING J, ZHOU Y, DU J, et al. Identification of miR-200a as a novel suppressor of connexin 43 in breast

- cancer cells[J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(5): e00251.
- [6] MING J, ZHOU Y, DU J, et al. MiR-381 suppresses C/EBPalpha-dependent Cx43 expression in breast cancer cells[J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(6): e00266.
- [7] LIN L, LIU D, LIANG H, et al. MiR-1228 promotes breast cancer cell growth and metastasis through targeting SCAI protein[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6646-6655.
- [8] CORCORAN C, RANI S, BRESLIN S, et al. MiR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 71.
- [9] ZHOU X, WEN W, SHAN X, et al. MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of pulmonary embolism[J]. *Thromb Res*, 2016, 138: 91-95.
- [10] ZHOU X, JI G, CHEN H, et al. Clinical role of circulating miR-223 as a novel biomarker in early diagnosis of cancer patients [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 16890-16898.
- [11] ZUO D, CHEN L, LIU X, et al. Combination of miR-125b and miR-27a enhances sensitivity and specificity of AFP-based diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 37(5): 6539-6549.
- [12] GU Y, LEI D, QIN X, et al. Integrated analysis reveals together miR-182, miR-200c and miR-221 can help in the diagnosis of prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140862.
- [13] BUCHWALD UK, ADETIFA IM, BOTTOMLEY C, et al. Broad adaptive immune responses to M. tuberculosis antigens precede TST conversion in tuberculosis exposed household contacts in a TB-endemic setting [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e116268.
- [14] 包蔚郁, 白晓蓉, 郭雁翔, 等. ^{99m}Tc 标记的亚锡植酸钠联合超声造影在早期乳腺癌腋窝前哨淋巴结活检术中的应用[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2016, 42(1): 21-24.
- BAO WY, BAI XR, GUO YX, et al. Application of ^{99m}Tc labelled sodium phytate and stannous chloride combined with contrast-enhanced ultrasonography in axillary sentinel lymph node biopsy of early breast cancer[J]. *J Lanzhou Univ (Med Sci)*, 2016, 42(1): 21-24.

(编辑 孙慧兰)

(上接第 874 页 from page874)

- 2002, 39(2 Suppl 1): S1-266.
- [10] KANG SS, WONG PW, MALINOW MR. Hyperhomocyst (e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease[J]. *Annu Rev Nutr*, 1992, 12: 279-298.
- [11] HOMOCYSTEINE STUDIES C. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis[J]. *JAMA*, 2002, 288(16): 2015-2022.
- [12] HUMPHREY LL, FU R, ROGERS K, et al. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis [J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(11): 1203-1212.
- [13] 廖瑛, 梁奕铨, 肖亦斌, 等. 血浆同型半胱氨酸水平与 II 型糖尿病的关系探讨[J]. *广东医学*, 1999, 20(9): 685-686.
- LIAO Y, LIANG YQ, XIAO YB, et al. Relationship between plasma homocysteine level and type 2 diabetes mellitus [J]. *Guangdong Med J*, 1999, 20(9): 685-686.
- [14] VAN GULDENER C, KULIK W, BERGER R, et al. Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: a stable isotope study [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(3): 1064-1071.
- [15] GUTTORMSEN AB, UELAND PM, SVARSTAD E, et al. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure[J]. *Kidney Int*, 1997, 52(2): 495-502.
- [16] LIEW SC, GUPTA ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases [J]. *Eur J Med Gen*, 2015, 58(1): 1-10.
- [17] XIA M, CONLEY SM, LI G, et al. Inhibition of hyperhomocysteinemia-induced inflammasome activation and glomerular sclerosis by NLRP3 gene deletion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 829-841.
- [18] ABAIS JM, XIA M, LI G, et al. Contribution of endogenously produced reactive oxygen species to the activation of podocyte NLRP3 inflammasomes in hyperhomocysteinemia[J]. *Free Rad Biol Med*, 2014, 67(2): 211-220.
- [19] CAO L, LOU X, ZOU Z, et al. Folic acid attenuates hyperhomocysteinemia-induced glomerular damage in rats[J]. *Microvasc Res*, 2013, 89(12): 146-152.
- [20] YI F, DOS SANTOS EA, XIA M, et al. Podocyte injury and glomerulosclerosis in hyperhomocysteinemic rats[J]. *Am J Nephrol*, 2007, 27(3): 262-268.

(编辑 刘清海)