

袁玲,王蕾,程鹏,等. 5-Aza-CdR 通过抑制大鼠原代肾肌成纤维细胞 *Epo* 基因启动子高甲基化逆转 PMT [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 79-85.

Yuan L, Wang L, Cheng P, et al. 5-Aza-CdR reverses pericyte-myofibroblast transition by inhibiting *Epo* gene promoter hypermethylation in rat primary renal myofibroblasts [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 79-85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.008

# 5-Aza-CdR 通过抑制大鼠原代肾肌成纤维细胞 *Epo* 基因启动子高甲基化逆转 PMT

袁玲\*,王蕾,程鹏,江茜,崔晓雪

(天津市医药科学研究所,天津 300020)

**【摘要】** 目的 观察去甲基化剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)对大鼠原代肾肌成纤维细胞的周细胞肌成纤维细胞转化(pericyte-myofibroblast transition, PMT)的影响。方法 取 5-Aza-CdR 250 ng/mL 处理大鼠原代肾肌成纤维细胞 72 h, 采用焦磷酸测序方法检测促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因启动子甲基化程度, 采用免疫荧光与 Western blot 检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、血小板源性生长因子受体  $\beta$ (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR $\beta$ )和 DNA 甲基转移酶 3a(DNA methyltransferase 3a, Dnmt3a)的蛋白表达水平, 并检测细胞上清液 EPO 水平。结果 与对照组相比, 5-Aza-CdR 处理能显著降低 Dnmt3a 的表达和 *Epo* 启动子高甲基化水平, 并随之降低了肌成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA 的表达及  $\alpha$ -SMA 与 PDGFR $\beta$  的表达比例, 同时, 5-Aza-CdR 处理提高了细胞上清液中 EPO 的水平。结论 5-Aza-CdR 可通过抑制大鼠原代肾肌成纤维细胞 *Epo* 启动子高甲基化逆转 PMT。

**【关键词】** 周细胞-肌成纤维细胞转化; EPO; DNA 甲基化; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; DNA 甲基转移酶

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0079-07

## 5-Aza-CdR reverses pericyte-myofibroblast transition by inhibiting *Epo* gene promoter hypermethylation in rat primary renal myofibroblasts

YUAN Ling\*, WANG Lei, CHENG Peng, JIANG Qian, CUI Xiaoxue

(Tianjin Institute of Medical and pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China)

**【Abstract】** **Objective** To examine the effect of the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on pericyte-myofibroblast transition (PMT) in primary rat renal myofibroblasts. **Methods** Rat primary renal myofibroblasts were treated with 5-Aza-CdR 250 ng/mL for 72 h, and the degree of *Epo* promoter methylation was detected by pyrosequencing. Protein expression levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) and DNA methyltransferase (Dnmt3a) were detected by immunofluorescence and Western blot, and erythropoietin (EPO) levels in the supernatant were detected. **Results** Compared with the control group, 5-Aza-CdR treatment significantly decreased the expression of Dnmt3a and hypermethylation of the *Epo* promoter, and subsequently decreased the expression of  $\alpha$ -SMA and the expression ratio of  $\alpha$ -SMA to PDGFR $\beta$  in myofibroblasts. Meanwhile, 5-Aza-CdR treatment increased the level of EPO in the cell supernatant. **Conclusions** 5-Aza-CdR can reverse PMT by inhibiting *Epo* promoter hypermethylation in primary renal myofibroblasts.

**【基金项目】**天津市卫生健康科技项目(TJWJ2022MS050)。

**【作者简介】**袁玲(1979—),女,硕士,副研究员,研究方向:慢性肾病及其并发症。E-mail:1128sun@163.com

**【 Keywords 】** pericyte-myofibroblast transition; EPO; DNA methylation; 5-aza-2'-deoxycytidine; DNA methyltransferase

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肾性贫血是慢性肾疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的主要并发症之一, 随肾功能下降其发生率逐渐增加, 对患者的生存质量及长期存活均有重要影响。肾周细胞 (renal EPO-producing cells, REPCs) 是正常肾产生促红细胞生成素的细胞<sup>[1]</sup>。它是起源于间充质的高度分枝的间质细胞, 包裹在微血管基底膜内, 通过不同的信号通路与内皮细胞相互作用。在正常情况下, 这些细胞位于皮髓质交界 O<sub>2</sub> 利用率急剧下降的区域, 表达 CD73 和血小板源性生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR $\beta$ )<sup>[2]</sup>。在 CKD 进展过程中, 周细胞分化为表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞 (PDGFR $\beta^+$ 、CD73<sup>+</sup>、 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) 即发生周细胞肌成纤维细胞转化 (pericyte-myofibroblast transition, PMT), 其促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 表达明显降低<sup>[3-5]</sup>。PDGFR $\beta^+$ 周细胞和  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>PDGFR $\beta^+$ 肌成纤维细胞可以作为研究正常或 CKD 肾周细胞肌成纤维细胞转化 (pericyte-myofibroblast transition, PMT) 的标记物<sup>[5-6]</sup>。PMT 已被证明是 CKD 慢性进展的关键<sup>[5,7]</sup>。然而, 目前 CKD 中 REPCs 发生 PMT 的具体机制仍不是很清楚。新近研究表明该过程与 *Epo* 5' 的 DNA 高甲基化密切相关<sup>[7-8]</sup>。5-氮杂-2' 脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 是一种去甲基化剂, 已被食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准直接或间接用于影响基因的疾病治疗<sup>[9]</sup>。在表观遗传学研究中, 5-Aza-CdR 也被广泛用作抑制 DNA 甲基转移酶<sup>[10-11]</sup>。本研究采用 5-Aza-CdR 处理大鼠原代肾肌成纤维细胞通过调控 *Epo* 的 DNA 高甲基化状态研究 PMT 可逆性。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

原代大鼠肾肌成纤维细胞 (rat-icell-u017) 购自 iCell 生物科技股份有限公司。

### 1.2 主要试剂与仪器

原代细胞培养体系 (iCell 生物科技股份有限公司, 货号 PriMed-iCell-015); 5-Aza-CdR (北京索莱宝科技有限公司, 货号 D9010); 二甲基亚砜 (美国 Sigma 公司, 货号 276855); Rat EPO ELISA Kit (武汉博士德生物公司, 货号 EK1351); 小鼠抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (美国 Novus Biologicals 公司, 货号 NBP2-33006); 小鼠抗 DNA 甲基转移酶 3a (DNA methyltransferase 3a, Dnmt3a) (美国 Santa Cruz 公司, 货号 sc-373905); 兔抗血小板源性生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR $\beta$ ) (英国 Abcam 公司, 货号 ab32570); 兔抗 CD73 (美国 CST 公司, 货号 13160); 特异性荧光标记二抗 (美国 CST 公司, 货号 4412); 小鼠抗  $\beta$ -actin (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号 TA-09); DNA Marker (天根生化科技 (北京) 有限公司, 货号 MD114-02); EpiTaq<sup>TM</sup> HS (宝生物工程 (大连) 有限公司, 货号 R110A); EZ DNA Methylation-GoldKit (美国 ZYMO RESEARCH 公司, 货号 D5005); PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (德国 QIAGEN 公司, 货号 974002); PyroMark Q48 Magnetic Beads (德国 QIAGEN 公司, 货号 974203); PyroMark Q48 Discs (德国 QIAGEN 公司, 货号 974901); PyroMark Q48 Absorber Strips (德国 QIAGEN 公司, 货号 974912)。焦磷酸测序仪 (德国 QIAGEN, 货号 PyroMark Q48); 一体化成像仪 (美国 GE 公司 Image, 货号 QuantLAS500); PCR 仪 (德国赛默飞世尔科技公司, 货号 QuantStudio5); 酶标仪 (德国赛默飞世尔科技公司, 货号 Multiskan FC); 荧光显微镜 (日本尼康公司, 货号 Ni-U); 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

于培养瓶中培养原代大鼠肾肌成纤维细胞, 待细胞覆盖培养瓶壁 80%~90% 后传代, 将细胞接种于 6 孔板进行后续实验。

### 1.3.2 分组及药物处理

实验分对照组和 5-Aza-CdR 组,5-Aza-CdR 剂量依据文献<sup>[12]</sup>和噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)测试结果判定。MTT 测定方法为:REPCs( $1 \times 10^5$ /mL)分别用不同浓度的 5-Aza-CdR 在 37 °C 条件下处理 24 h,处理后每孔加 20  $\mu$ L MTT 孵育 4 h,用 150  $\mu$ L 二甲基亚砷溶解紫色甲瓚晶体,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度。将细胞接种于 6 孔板中,并在标准 CO<sub>2</sub> 培养箱(95%空气,5% CO<sub>2</sub>)中于 37 °C 的上述培养基中孵育。2 d 后,细胞用 250 ng/mL 5-Aza-CdR 或二甲基亚砷溶剂处理 24 h,处理结束后收集各组细胞或细胞上清液用于后续实验。

### 1.3.3 细胞培养上清中 EPO 水平分析

取 1.3.2 中处理 72 h 后的各组细胞悬液 200  $\mu$ L,3000 r/min 离心 15 min 收集上清液,严格按照试剂盒说明采用 R. EPO ELISA 试剂盒检测细胞培养上清中 EPO 水平。

### 1.3.4 免疫荧光染色检测

免疫荧光染色检测原代大鼠肾肌成纤维细胞 Dnmt3a 的表达,并分别检测  $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$  和  $\alpha$ -SMA/CD 73 共定位表达。5-Aza-CdR 处理 72 h 后,6 孔板中的细胞爬片经 4%多聚甲醛固定 15 min,TBS 冲洗 3 次,采用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭过氧化物酶 10 min,TBS 冲洗 3 次,血清封闭 20 min,加入浓度为 1:200 的相应一抗,4 °C 孵育过夜后,TBS 冲洗 3 次,荧光二抗 37 °C 孵育 1 h,TBS 冲洗 3 次,DAPI 复染后滴入防荧光淬灭剂封片。以 TBS 代替一抗设立阴性对照。

### 1.3.5 Western blot 法检测肾肌成纤维细胞 $\alpha$ -SMA、PDGFR $\beta$ 和 Dnmt3a 蛋白表达水平

5-Aza-CdR 处理 72 h 后,将细胞匀浆后加入适量含有 PMSF 的蛋白裂解液,提取组织蛋白,并用 BCA 法进行蛋白定量。将蛋白样本进行凝胶电泳,电转至 PVDF 膜上,经漂洗、封闭后加入稀释一抗  $\alpha$ -SMA(1:1000)、PDGFR $\beta$ (1:1000)、Dnmt3a(1:1000)和  $\beta$ -actin(1:1000),4 °C 孵育过夜,然后加入相应二抗(1:5000)37 °C 孵育 1 h,使用凝胶成像仪进行观察,随后用 Image J 1.4.3.67 测定条带灰度值,以目的蛋白与内参  $\beta$ -actin 的灰度值比值表示。

### 1.3.6 焦磷酸测序

使用焦磷酸测序检测 *Epo* 启动子内 3 个 CpG 位点(转录起始位点的+219、+221 和+232 碱基对)的甲基化。待分析序列为:TTYGYGTTTT TTGGAYGGTGATTATTTTTTTTTTAGGTTATT,其中 Y 代表 CpG 位点。5-Aza-CdR 处理 72 h 后,从各组细胞样本中提取基因组 DNA。根据试剂盒说明书,使用 EZ DNA 甲基化试剂盒进行亚硫酸氢钠基因组 DNA 的转化。使用引物(正向 PCR 引物 5'-GTGTTTTAGAATAGATTTTGGTTA GG-3';反向 PCR 引物 5'-biotin-ACCAAATCACC CCAATAACCTAA-3'和测序引物 5'-AGGGTTAT AGAGTTTTTTTG-3')对含有亚硫酸转化 DNA 启动子的基因组 DNA 片段扩增,PCR 产物经 PyroMark Q48 Autoprep(Qiagen)按照使用说明书进行 CpG 定量。该分析包括 *Epo* 转录起始位点的+219、+221 和+232 碱基对甲基化位点。在本研究中,这些位点被指定为 CpG15~CpG17 进行数据分析。在软件(PyroMark Q48 Autoprep 2.4.1 software, Qiagen)中计算 3 个 CpG 位点的甲基化百分比。

## 1.4 统计学分析

实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS 19.0 进行统计分析,采 *t* 检验进行组间比较。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTT 检测 5-Aza-CdR 对肾肌成纤维细胞存活率的影响

125~250 ng/mL 5-Aza-CdR 处理后,肾原代肌成纤维细胞 OD 值稳定,对细胞无毒性作用。然而,当 5-Aza-CdR 浓度大于 250 ng/mL 时,OD 值下降,表明细胞毒性限制了细胞活力(图 1)。因此,选择 5-Aza-CdR 250 ng/mL 作为给药浓度。

### 2.2 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞培养上清中 EPO 水平的影响

与对照组相比,5-Aza-CdR 组培养上清中 EPO 水平显著升高,具有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 2。

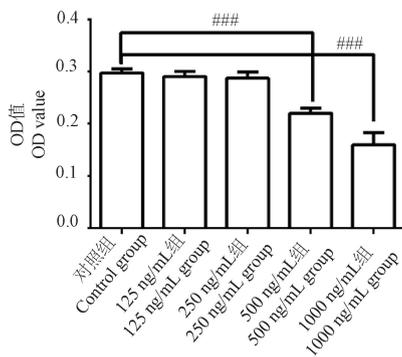
### 2.3 5-Aza-CdR 处理 72 h 对肌成纤维细胞 Dnmt3a 表达的影响

IF 结果显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 组

Dnmt3a 表达显著减少,见图 3A。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 组 Dnmt3a 表达显著下降,具有统计学意义( $P<0.001$ ),见图 3B。

## 2.4 5-Aza-CdR 处理 72 h 对肌成纤维细胞 $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$ 和 $\alpha$ -SMA/CD73 共定位表达的影响

如图 4A,IF 结果显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 处理后,表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞数量明显减少,一部分肌成纤维细胞(PDGFR $\beta^+$ ;CD73 $^+$ ;  $\alpha$ -SMA $^+$ )转分化为周细胞(PDGFR $\beta^+$ ;CD73 $^+$ ;  $\alpha$ -SMA $^-$ ;如白色箭头所示),Western blot 检测结果

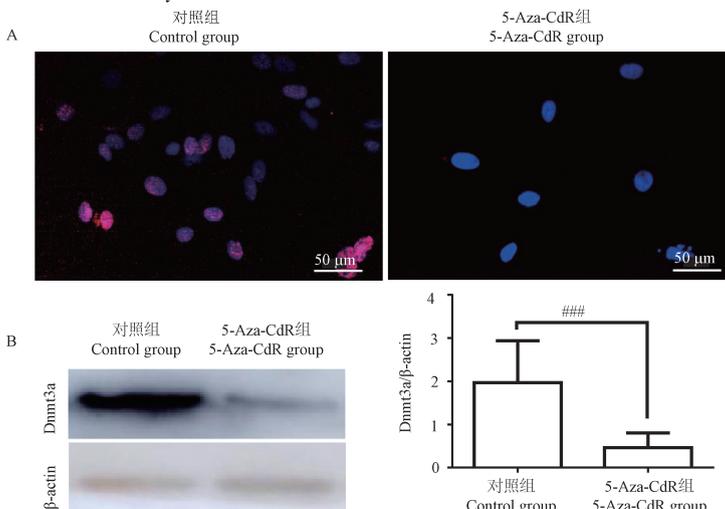


注:与对照组相比,### $P<0.001$ 。

图 1 不同浓度 5-Aza-CdR 对肾肌成纤维细胞存活率的影响

Note. Compared with control group, ### $P<0.001$ .

Figure 1 Effects of different concentrations 5-Aza-CdR on myofibroblast cells viability



注:A:免疫荧光检测 Dnmt3a 的表达;B:Western blot 检测 Dnmt3a 的表达。与对照组相比,### $P<0.001$ 。

图 3 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞甲基转移酶 Dnmt3a 表达的影响

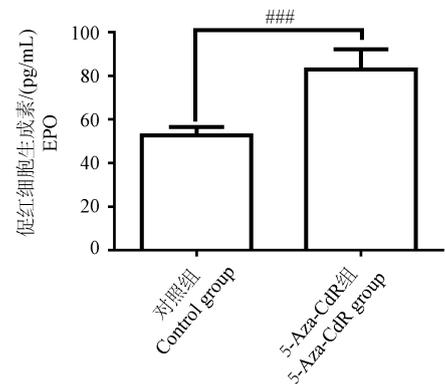
Note. A, Immunofluorescence analysis of Dnmt3a protein expression. B, Western blot analysis of Dnmt3a protein expression. Compared with control group, ### $P<0.001$ .

Figure 3 Effects of 5-Aza-CdR on the expression of methyltransferase Dnmt3a in myofibroblasts

显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 组  $\alpha$ -SMA 表达显著下降,差异有统计学意义( $P<0.001$ ),PDGFR $\beta$  表达差异不明显, $\alpha$ -SMA 与 PDGFR $\beta$  的表达比值( $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$ )降低( $P<0.01$ ,见图 4B、4C),证实肌成纤维细胞数量减少及相应的周细胞数量的增加,亦提示大部分原代大鼠肌成纤维细胞转分化为周细胞。

## 2.5 5-Aza-CdR 处理 72 h 对肌成纤维细胞 Epo 启动子甲基化的影响

如图 5 所示,灰色区域为 CpG 位点,其甲基化百分比为胞嘧啶的数目与胞嘧啶和胸腺嘧啶

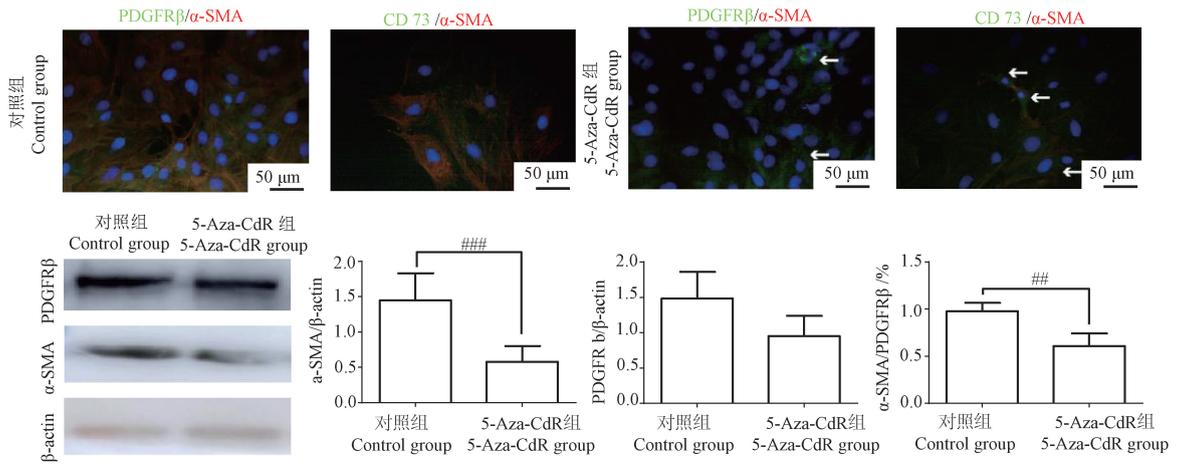


注:与对照组相比,### $P<0.001$ 。

图 2 5-Aza-CdR 对肌成纤维细胞上清中 EPO 水平的影响

Note. Compared with control group, ### $P<0.001$ .

Figure 2 Effects of 5-Aza-CdR on EPO level in myofibroblast culture supernatant

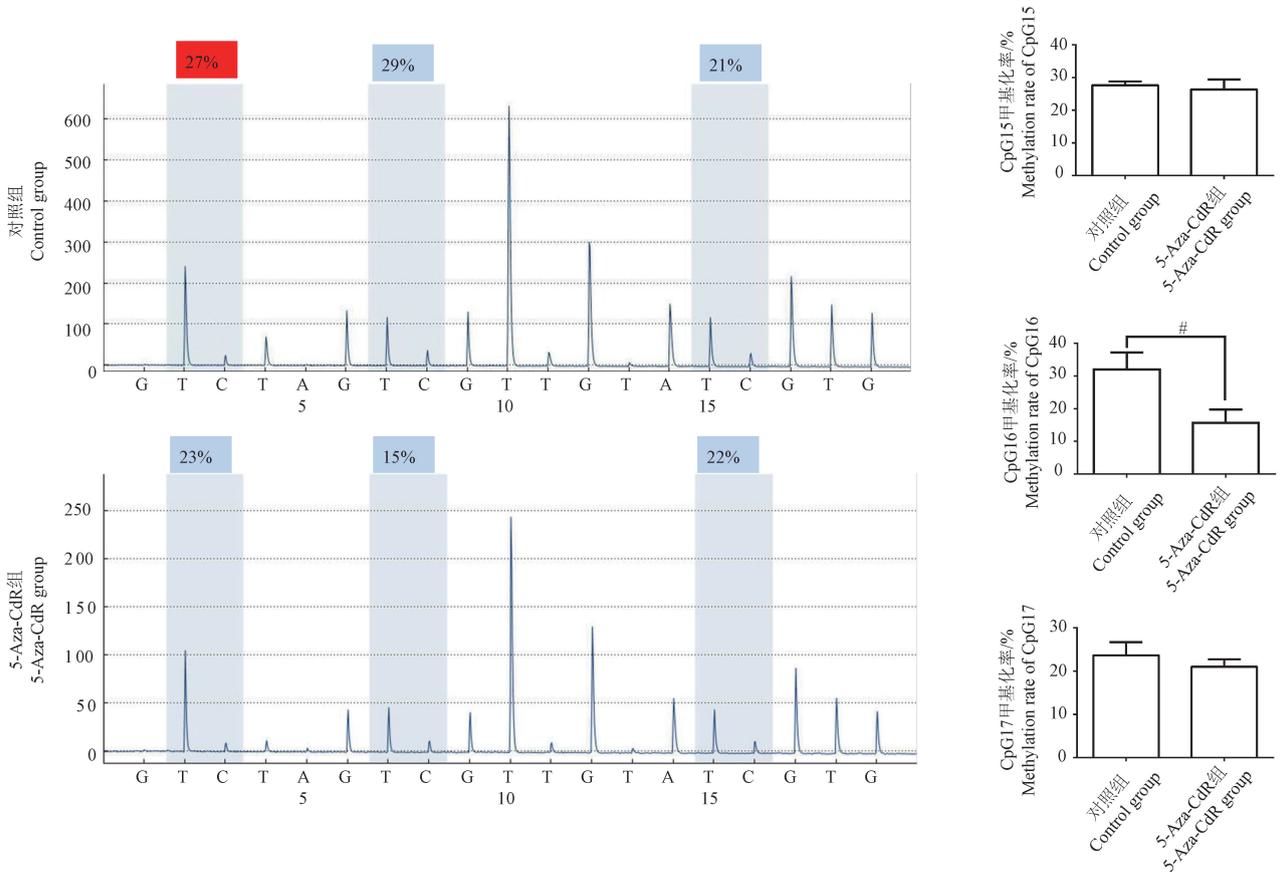


注:A:免疫荧光检测 α-SMA/PDGFRβ 和 α-SMA/CD73 共定位表达;B:Western blot 检测 α-SMA 和 PDGFRβ 的表达;C:α-SMA 和 PDGFRβ 的表达量分析,白色箭头:周细胞(α-SMA<sup>-</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup>)。与对照组相比,##*P*<0.01,###*P*<0.001。

图 4 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞 PMT 的影响

Note. A, Immunofluorescence analysis the co-localized expressions of α-SMA/PDGFRβ and α-SMA/CD73. B, Western blot analysis the protein expression of α-SMA and PDGFRβ. C, Expression analysis of α-SMA and PDGFRβ. White arrows, Pericytes (α-SMA<sup>-</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup>). Compared with control group, ## *P*<0.01, ### *P*<0.001.

Figure 4 Effects of 5-Aza-CdR on PMT of myfibroblasts



注:与对照组相比, #*P*<0.05。

图 5 5-Aza-CdR 处理对肌成纤维细胞 *Epo* 启动子甲基化的影响

Note. Compared with control group, # *P*<0.05.

Figure 5 Effect of 5-Aza-CdR on methylation of *Epo* promoter in myfibroblasts

之和的数目比值。该比值由仪器自动计算并显示于 CpG 位点顶部的阴影区域。使用焦磷酸测序法对肌成纤维细胞 *Epo* 启动子甲基化水平进行检测,结果显示,5-Aza-CdR 处理后,与对照组相比,肌成纤维细胞 *Epo* 启动子 CpG16 的甲基化水平降低 ( $P < 0.05$ ), CpG15 和 CpG17 甲基化水平差异不明显。

### 3 讨论

肾周细胞能够通过 HIF-2 $\alpha$  依赖性基因转录过程产生 EPO,以应对贫血或缺氧。然而,在肾纤维化过程中,周细胞向肌成纤维细胞的转变阻碍了 *Epo* 的转录。在 CKD 肾中,肾周细胞分化为高水平表达  $\alpha$ -SMA 的肌成纤维细胞,其 EPO 产生减少<sup>[7,13]</sup>。肾性贫血的原因不是产生 EPO 的细胞的损失,而是这些细胞发生 PMT 转分化为产生 EPO 能力较低的肌成纤维细胞<sup>[14]</sup>。据报道该过程与 DNA 高甲基化密切相关,去除触发损伤的刺激后,这些肌成纤维细胞保持可塑性,恢复 EPO 的产生<sup>[8,13]</sup>。5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5-Aza) 是近 40 年首次合成的,其用于处理培养的癌细胞时,被发现具有广泛的抗代谢活性,并且是一种有效的急性髓性白血病化疗药物<sup>[15-16]</sup>。研究发现,5-Aza 被摄入 DNA,其一方面直接与 DNA 单链结合,另一方面可催化蛋白酶体依赖的 Dnmt 的降解,发挥去甲基化的生物活性<sup>[17]</sup>。基于逆转表观遗传的作用,5-Aza 和 5-Aza-CdR 被广泛用于证明特定基因区域甲基化的缺失与相关基因的激活之间的相关性<sup>[18]</sup>。此外,也有研究报道,在癌症治疗中,低剂量的去甲基化药物可以有效地消耗 Dnmt,而高剂量会导致细胞周期阻滞和细胞毒性<sup>[19-20]</sup>。为了研究恢复 EPO 产生的可能性,我们将肌成纤维细胞暴露于低浓度的去甲基化剂 5-Aza-CdR 中,发现 5-Aza-CdR 处理降低了肾肌成纤维细胞 Dnmt3a 的表达,焦磷酸测序同时证实 *Epo* 启动子的高甲基化被降低,证实 5-Aza-CdR 处理能逆转 *Epo* 基因的高甲基化,与文献报道一致<sup>[6]</sup>。已有研究证明肾 REPCs 的周细胞-肌成纤维细胞转化与 *Epo* 的高甲基化密切相关<sup>[6-8]</sup>。本研究进一步采用 IF 分别检测 PDGFR $\beta$ / $\alpha$ -SMA 和 CD73/ $\alpha$ -SMA 的共定位表达及 Western blot 检测  $\alpha$ -SMA 与 PDGFR $\beta$  的表达比

值( $\alpha$ -SMA/PDGFR $\beta$ )的变化分析 REPCs 中周细胞和肌成纤维细胞两种细胞状态的相互转化情况,本研究观察到 5-Aza-CdR 处理后肌成纤维细胞数量减少及相应的周细胞数量增加,提示大部分原代大鼠肌成纤维细胞转分化为周细胞。检测细胞上清液中 EPO 的水平发现 5-Aza-CdR 处理后随肌成纤维细胞转分化为周细胞的数量增加,EPO 水平也相应升高。由此表明 5-Aza-CdR 可以通过抑制 *Epo* 基因的高甲基化逆转周细胞向肌成纤维细胞的转变,促进大部分肌成纤维细胞向周细胞分化,恢复 EPO 的产生。CHOU 等<sup>[5]</sup>对缺血再灌注导致的急性肾损伤 (ischemia/reperfusion injury-induced acute kidney injury, IRI-AKI) 期间周细胞表观遗传改变的研究中提出肌成纤维细胞起源于静止周细胞,其数量在 IRI-AKI 后增加,被称为活化周细胞,后者在肾恢复过程中发生凋亡,少数存活的周细胞被分类为失活周细胞,这几种周细胞有包括 DNA 高甲基化在内的不同的表观遗传修饰,这些表观遗传修饰导致了 CKD 的进展,5-Aza 处理能逆转活化周细胞的特征,使它们更类似于静止周细胞<sup>[5]</sup>,与本研究结果相一致。

总之,肾周细胞产生 EPO,但在 CKD 进展过程中,由于 *Epo* 基因的高甲基化,周细胞转分化为肌成纤维细胞时,EPO 产生被抑制。本研究在体外实验证实低浓度去甲基化剂 5-Aza-CdR 能较好地抑制 *Epo* 启动子高甲基化发挥调控 PMT 的作用从而恢复产生 EPO,但需要更进一步在体内实验结合其给药效应确定具体给药浓度。此外,这些发现也提示我们可以探索其他具有抑制 *Epo* 高甲基化或逆转 PMT 功能的药物用于防治 CKD 患者肾性贫血。

### 参考文献:

- [1] PAN S Y, TSAI P Z, CHOU Y H, et al. Kidney pericyte hypoxia-inducible factor regulates erythropoiesis but not kidney fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2021, 99 (6): 1354-1368.
- [2] STASI A, FRANZIN R, DIVELLA C, et al. Double labeling of PDGFR- $\beta$  and  $\alpha$ -SMA in swine models of acute kidney injury to detect pericyte-to-myofibroblast transdifferentiation as early marker of fibrosis [J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(19): e3779.

- [ 3 ] BAPST A M, KNÖPFEL T, NOLAN K A, et al. Neurogenic and pericytic plasticity of conditionally immortalized cells derived from renal erythropoietin-producing cells [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(5): 2420-2433.
- [ 4 ] LIM J H, YOON J M, OH S H, et al. Paricalcitol improves hypoxia-induced and TGF- $\beta$ 1-induced injury in kidney pericytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9751.
- [ 5 ] CHOU Y H, PAN S Y, SHAO Y H, et al. Methylation in pericytes after acute injury promotes chronic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 4845-4857.
- [ 6 ] SHIH H M, WU C J, LIN S L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells [J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, 117(11): 955-963.
- [ 7 ] CHOU Y H, PAN S Y, SHIH H M, et al. Update of pericytes function and their roles in kidney diseases [J]. *J Formos Med Assoc*, 2024, 123(3): 307-317.
- [ 8 ] DEWI F R, FATCIIYAH F. Methylation impact analysis of erythropoietin (EPO) Gene to hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) activity [J]. *Bioinformatics*, 2013, 9(15): 782-787.
- [ 9 ] YANG X, LAY F, HAN H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(11): 536-546.
- [ 10 ] 王报捷, 苏丽晴, 张志勇, 等. 5-Aza-CdR 通过 Notch1 通路对小鼠海马神经发生的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(1): 34-39.  
WANG B J, SU L Q, ZHANG Z Y, et al. Effects of 5-Aza-CdR on hippocampal neurogenesis in mice via the Notch1 pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(1): 34-39.
- [ 11 ] 杜静, 宫凯凯, 杨丽娟, 等. 全反式维甲酸诱导经典霍奇金淋巴瘤 B 细胞表型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(2): 46-52.  
DU J, GONG K K, YANG L J, et al. Restoration of the lost B-cell phenotype in classical Hodgkin lymphoma cells by all trans-retinoic acid treatment [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(2): 46-52.
- [ 12 ] ADOMAKO A, CALVO V, BIRAN N, et al. Identification of markers that functionally define a quiescent multiple myeloma cell sub-population surviving bortezomib treatment [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 444.
- [ 13 ] SOUMA T, YAMAZAKI S, MORIGUCHI T, et al. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(10): 1599-1616.
- [ 14 ] ASADA N, TAKASE M, NAKAMURA J, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal Anemia in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 3981-3990.
- [ 15 ] MONTESINOS P, RECHER C, VIVES S, et al. Ivosidenib and azacitidine in IDH1-mutated acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(16): 1519-1531.
- [ 16 ] 郭怀鹏, 康蕾, 刘聪, 等. 去甲基化药物治疗老年急性髓系白血病的 Meta 分析 [J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(5): 347-352.  
GUO HP, KANG L, LIU C, et al. Hypomethylating agents in elderly patients with acute myeloid leukemia: a Meta-analysis of randomised trials [J]. *J Clin Hemato*, 2021, 34(5): 347-352.
- [ 17 ] SANTI D V, GARRETT C E, BARR P J. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs [J]. *Cell*, 1983, 33(1): 9-10.
- [ 18 ] CHRISTMAN J K. 5-Azacitidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5483-5495.
- [ 19 ] TSAI H C, LI H, VAN NESTE L, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 430-446.
- [ 20 ] ISSA J P J, GARCIA-MANERO G, GILES F J, et al. Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies [J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1635-1640.

[收稿日期]2024-05-08