

DNA 甲基化修饰对血管疾病稳态失衡的影响

陈晓颖, 叶华丹, 洪青晓, 周安楠, 汤琳琳, 段世伟

宁波大学医学院, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211

摘要: 自稳态平衡是机体生命活动的重要基础, 在维持机体的正常生理功能中发挥重要作用。血管疾病中的稳态失衡受物理、化学、生物等内外环境改变及致病因素的影响, 其中氧稳态、血流稳态、糖脂代谢稳态在内环境的影响中较为突出, 由此引起的一系列表观遗传修饰将导致血管结构和功能的异常。表观遗传学中的 DNA 甲基化与血管疾病的发生发展密不可分。此外, 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)及 N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenine, m⁶A)作为新的修饰碱基, 将为表观遗传学研究提供新的思路。文章主要对 DNA 甲基化修饰变异在血管疾病稳态失衡方面的研究进展进行了阐述。

关键词: DNA 甲基化; 血管稳态; 5hmC; m⁶A

The effects of DNA methylation on the homeostasis in vascular diseases

Xiaoying Chen, Huadan Ye, Qingxiao Hong, Annan Zhou, Linlin Tang, Shiwei Duan

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Homeostasis is fundamental to maintain normal physiological functions in our body. Internal and external physical, chemical and biological changes can cause dysregulation of vascular homeostasis, which is closely associated with the homeostasis of oxygen supply, blood transportation and lipid metabolism. Subsequent epigenetic modifications are able to lead to abnormal structures and function of vessels. DNA methylation has been shown to play a vital role in the development of vascular diseases. In addition, 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and N⁶-methyladenine (m⁶A), as new epigenetic modifications, provide additional clues for vascular diseases. In this review, we summarize the effects of DNA methylation on the homeostasis dysregulation in the vascular diseases.

Keywords: DNA methylation; vascular homeostasis; 5hmC; m⁶A

“稳态”概念首先由法国生理学家克洛德·贝尔纳(Claude Bernard)提出。1932 年美国生理学家坎农(Cannon W.)在《人体的智慧》一书中明确了内稳态理论, 即人和动植物基本生理功能及机体内环境组

成与特性相对动态恒定的生理状态。机体可以通过分子、细胞、器官和整体水平上复杂的协调和互动达到内环境平衡。血管是一个由内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等构成的整合性器官, 其稳态功

收稿日期: 2014-09-29; 修回日期: 2014-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31100919), 浙江省自然科学基金杰出青年项目(编号: LR13H020003)和浙江省自然科学基金学术交叉项目(编号: LS14H26001)资助

作者简介: 陈晓颖, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: cxywzmc@163.com

通讯作者: 段世伟, 博士, 研究员, 研究方向: 遗传学。E-mail: duanshiwei@nbu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.14-327

网络出版时间: 2015-1-15 10:05:59

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150115.1005.001.html>

能的平衡是机体生命活动的重要基础。各种物理、化学、生物等内外环境改变及致病因素的作用,均能造成血管稳态失衡,导致血管功能或结构的改变与损伤,并且带来一系列以血管病变为病理基础的相关疾病,如动脉粥样硬化、高血压、脑卒中、眼病、肾脏疾病等。由于近年来高通量技术的快速发展,表观遗传修饰作为基因表达的重要机制逐渐被人们所认识。DNA 甲基化修饰导致血管相关基因转录失调,在血管功能维持平衡的过程中扮演重要角色,此外, RNA 甲基化的修饰作用也逐渐成为血管疾病机制研究的热点。

1 影响血管稳态的微环境

血管微环境主要是指邻近组织细胞及其分泌的各种生长因子所组成的体内环境。微环境的稳定是保证细胞正常增殖、分化,代谢和功能活动的重要条件。血管在维持稳态平衡过程中,内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等受代谢紊乱、血管活性物质(血管活性多肽、脂肪因子、脂质代谢分子、活性氨基酸及衍生物、气体信号等)、血流动力学等影响相互作用形成特殊的环境。血管稳态是指血管功能处于平衡状态,与血管内皮和平滑肌细胞密切相关^[1]。

血管内皮的功能主要是屏障作用,其合成和释放的多种内皮衍生血管活性因子在血管的自稳态调节中起着重要作用。血管内皮细胞合成和释放的内皮源性舒张因子(前列环素、一氧化氮、内皮源性超极化因子等)能够维持血管的内环境稳定^[2]。有研究表明,不同物质对血管稳态的影响不同,如前列环素能抑制血小板聚集和使血管扩张^[3];非对称性二甲基精氨酸能抑制一氧化氮合酶的活性,减少一氧化氮的生成,并生成超氧化物,导致内皮功能失调从而破坏血管稳态^[4];犬尿氨酸^[5]以及 S-亚硝基硫醇^[6]代谢都有扩张血管、降低血压的作用;高盐^[7]可增加血管张力,从而使血管稳态失衡。另外,氧化应激^[8]、肾素-血管紧张素系统^[9]、氧化低密度脂蛋白^[10]、同型半胱氨酸血症^[11]、内质网应激^[12]以及内皮微颗粒^[13]等因素能够直接或间接影响血管内皮和平滑肌的功能。

血管平滑肌细胞是构成血管壁组织结构及调节血管张力和血流量的主要细胞类型。与机体其它组织的成熟细胞相比,血管平滑肌细胞并非终末分化,

其保留了一定的可塑性,可在不同的表型之间进行转换,分为收缩型和分泌型^[14]。正常成人动脉血管的平滑肌细胞以收缩型为主,而当受到环境压力的影响,一部分血管平滑肌细胞可转化为分泌型,合成许多血管活性物质、生长因子及细胞外基质,刺激细胞的高度增殖和迁移,使得血管壁增厚并参与纤维斑块的形成,最终导致血管稳态失衡^[14]。血小板衍生生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)^[15]、成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)^[16]、赖氨酰氧化酶样 1 蛋白(Lysyl oxidase-like 1, LOXL1)^[17]、内皮素-1(Endothelin 1, ET-1)^[18]、细胞因子干扰素 γ (Interferon γ , IFN- γ)^[14]等多种蛋白均与血管平滑肌细胞的稳态密切相关。有新的研究发现,血管平滑肌细胞通过线粒体自噬能够调节细胞结构和功能的变化,在动脉粥样硬化斑块中,可观察到典型的自噬现象^[19]。

1.1 氧稳态对血管稳态的影响

氧稳态与血管稳态密切相关^[20]。机体内,许多情况可造成整体或局部氧稳态失衡的环境,如心肌或脑组织缺血、肿瘤的快速生长、高海拔作业等。低氧诱导因子-1(Hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是氧稳态的主要调节者,作为低氧诱导最重要的转录因子,其结合到特异性识别序列的启动子上,可激活转录^[21]。HIF-1 由 α 、 β 两个亚基组成, HIF-1 α 的稳定性受氧浓度的影响较大,该亚基的一个重要靶基因是血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF),随着 HIF-1 α 水平的升高, VEGF 的表达上调^[22],从而形成大血管胚胎干细胞衍生的肿瘤,并损害血管功能,在肿瘤块内形成缺氧微环境^[23]。到目前为止,已经发现超过 60 个基因的表达与 HIF-1 有关,其中大部分可直接或间接参与血管稳态失衡的过程^[24]。有研究提示,血管内皮细胞对缺氧的反应中,ATP 结合盒转运子 A1(ATP-binding cassette transporter 1, ABCA1)是最显著上调的基因之一^[25],HIF-1 α 可诱导该基因的表达^[26],提示该基因参与心血管疾病的发生发展。

1.2 血液稳态对血管稳态的影响

机体血液动力学微环境是血管稳态必不可少的重要调节因素,血压增高、血管局部狭窄所产生的湍流和剪切应力的变化通过影响血管平滑肌细胞的

增殖和凋亡、内皮细胞的形态和功能、白细胞的黏附作用以及调节细胞外基质的合成、消除等方面,从而影响血管结构和功能的变化^[27]。剪切应力还可以选择性调节许多基因表达,如血小板源性生长因子 B(PDGFB)、细胞间粘附分子 1(Intercellular adhesion molecule 1, ICAM1)、组织型纤溶酶原激活剂(Plasminogen activator, tissue, PLAT)、转化生长因子 β 1(Transforming growth factor, beta, TGF- β)等^[28],这些基因在维持血管壁功能中具有重要作用。此外,内皮细胞上的机械感受器分子能将外界的机械刺激转化为生化信号,目前已经发现的信号通路有 Caveolae、受体酪氨酸激酶(Receptor of tyrosine kinase, RTK)、整合素家族分子(Integrins), G 蛋白和离子通道^[29]。

1.3 糖、脂代谢对血管稳态的影响

糖、脂代谢紊乱易使机体发生氧化应激、炎症反应、血管舒缩功能异常及内质网应激的改变,导致心血管疾病、糖尿病和肥胖等代谢疾病的产生。相关核转录因子(过氧化物酶体增殖物激活受体、肝 X 受体、胆汁酸受体、孕烷受体等)以内源性小分子代谢产物为配体,调控糖、脂代谢相关关键基因的表达来影响基因转录激活或抑制。体内和体外实验研究已表明,高血糖环境可诱导机体内氧自由基的过量产生,使细胞内抗氧化防御系统受损,对细胞产生多种毒性作用,导致细胞数量及其功能和活力的降低,使血管内皮细胞功能受影响,提示高血糖环境对血管的稳态维持有影响^[30,31]。胆固醇在动脉

内膜中大量沉积,形成粥样物质,以及平滑肌细胞向内膜的迁移、增殖、大量分泌胶原形成纤维化,也会导致血管硬化^[32]。

2 DNA 和 RNA 甲基化修饰对血管稳态的影响

血管的表观遗传修饰已成为血管稳态研究的一个新热点,探索环境与遗传因素的相互作用,特别是血管相关的 DNA(表 1)及 RNA 受环境影响的甲基化修饰,有助于人们更全面地了解疾病机制。血管稳态失衡的原因非常复杂,目前已发现调节血管稳态的重要基因有 VEGF 家族^[33]、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K-AKT)信号通路的 FoxO 家族^[34]、凋亡抑制因子 2(Baculoviral IAP repeat containing 2, Birc2)^[35]、细胞色素 P450^[22]、浆膜蛋白 4(Reticulon 4, RTN4)^[36]、过氧化物酶 II^[37]、Delta 样配体 4(Delta-like 4, DLL4)^[38]、组蛋白去乙酰化酶 7(Histone deacetylase 7, HDAC7)^[39]、弹性蛋白微原纤维界面因子 1(Elastin microfibril interfacier 1, EMILIN1)^[40]、转化生长因子- β (TGF- β)^[41]、骨形态发生蛋白家族(BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein family)^[42]、重组人相关 RAS 病毒癌基因同源物(Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog, RRAS)^[43]、一氧化氮合成酶(Nitric oxide synthase, NOS)与 NO 代谢相关的精氨酸琥珀酸裂解酶(Argininosuccinate lyase, ASL)^[44] 基因等。

2.1 DNA 甲基化

DNA 甲基化修饰是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)的催化下,以 S-腺

表 1 与血管稳态相关的基因 DNA 甲基化研究

相关疾病	微环境	基因 DNA 甲基化水平改变
冠心病	氧稳态	EC-SOD(-)、BNIP3(+)、GSTP1(-)、PKC ϵ (-)等
	血流稳态	KLF4(-)、TGF-B(-)等
	糖脂代谢	ABCA1(-)、ACAT1(+), KLF2(-)、LRP1(+), 15-LO(-)等
	其他	ER α (-), MCT-3(-), FGF2(-), TFPI-2(-), FOXP3(-), F7(+), COL15A1(+)等
高血压	氧稳态	SOD2(-)、ECE(+)等
	血流稳态	AT1b(+), NKCC1(+), sACE(-)等
	糖脂代谢	11 β -HSD-2(-)等
脑卒中	其他	P53(-), TSP-1(-)等
其他疾病	氧稳态	ADRB3(-)等
	其他	BCL-2(-)等

注: (-)代表基因表达下调, (+)代表基因表达上调。

甘甲硫氨酸(SAM)为供体,将甲基(-CH₃)转移至胞嘧啶的第 5 位碳原子上,形成 5-甲基胞嘧啶(5mC)的过程。DNA 甲基化形式多发生在 CpG 双核苷酸序列的胞嘧啶第五位碳上(C5)形成 5mC,而启动子区域 CpG 岛形成的 5mC 在胚胎发育、基因组印记、基因沉默及基因表达中起了重要作用^[45]。在哺乳动物中已经发现 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 3 种催化酶。目前认为, DNMT1 主要是维持 DNA 复制过程中甲基化的稳定性,而 DNMT3a 和 DNMT3b 属于从头甲基转移酶,有助于形成新的甲基化形成,并在胚胎发育的早期起作用^[46]。目前有两种为人熟知的机制:其一,由于甲基化的 DNA 不能被一些转录因子所识别,使得这些转录因子不能结合到该基因的启动子区,从而抑制了转录;其二, DNA 甲基结合蛋白识别甲基化的 DNA,招募协同抑制因子使靶基因沉默。

通过全基因组鸟枪法测序,动脉粥样硬化发病相关的差异甲基化 CpG 证实了基因参与内皮及平滑肌细胞的调控作用^[47],这些发现为更好地了解血管失稳态的分子机制提供了新的线索。研究表明,载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, APOE)基因敲除小鼠在尚未出现动脉粥样硬化病变之前,在主动脉和外周血单个核细胞中就已经出现了 DNA 甲基化特征的改变,提示 DNA 甲基化谱的改变可作为血管功能失衡的早期标志^[48]。

DNA 甲基化修饰与氧稳态有关。研究发现,缺氧敏感性的增强与氧化应激的升高、基因编码抗氧化酶的表达降低以及促氧化酶表达的增加有关^[20],如靠近编码抗氧化酶超氧化物歧化酶 2(Superoxide dismutase 2, mitochondrial, SOD2)基因的转录起始位点的 CpG 位点甲基化程度增加,基因编码 SOD2 的能力降低,从而影响低氧带来的血管稳态失衡^[20]。低氧反应中可发现脐动脉内一氧化氮合酶 3(NOS3)启动子区域甲基化程度增加,而脐静脉内甲基化程度降低,说明缺氧还可以造成胎儿宫内生长发育受限,而胎儿生长迟缓与内皮功能障碍、心血管风险有关^[49]。另外,长时间缺氧还会诱导心肌细胞发生纤维化,且相关基因的甲基化程度以及 DNA 甲基转移酶(DNMT)也增加。DNMT 可成为治疗心肌纤维化的靶点,因为 DNMT 抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza)会抑制 TGF- β 的促纤维化作用^[50]。

DNA 甲基化修饰与血流稳态有关。血管内皮位

于血管壁和血液的界面,因直接与血流接触而持续受到血流剪切力的影响。研究表明,血液动力学的扰动与动脉粥样硬化的易感性相关,内皮 Kruppel 样因子 4(Endothelial Kruppel-Like Factor 4, KLF4)是一种重要的抗内皮炎症的转录因子,血流动力学通过诱导内皮 KLF4 基因启动子 CpG 甲基化,抑制 KLF4 的转录,从而促进血栓生成及平滑肌细胞增殖^[51]。动物实验证实,低剪切应力可降低 NOS3/NO 的表达,削弱血管内皮对危险因素的抵御作用,促进血管平滑肌细胞的移行、分化和增殖从而促进新生内膜的形成。Dunn 等^[52]发现,在内皮细胞中 DNMT1 在振荡剪切应力作用下表达增多,同时颈动脉血流紊乱可导致 11 个机械敏感基因(*HoxA5*、*Tmem184b*、*Adamts15*、*Klf3*、*Cmklr1*、*Pkp4*、*Acvrl1*、*Dok4*、*Spry2*、*Zfp46* 和 *F2rl1*)高甲基化修饰。

DNA 甲基化修饰与糖、脂代谢稳态有关。Ling 等^[53]研究发现,高血糖可诱导血管炎症相关基因(*IL-6*、*MSP-1* 等)的表观遗传学修饰,核因子 κ B(NF- κ B)是一种结合血管炎症相关基因的转录因子,血糖控制不佳可增强单核细胞中 NF- κ B 的活性从而使炎症反应增强,炎细胞浸润血管壁可造成血管损伤,包括内皮细胞及肌细胞坏死。对于糖尿病患者,其血液成分的改变将引起血管内皮细胞功能异常,从而使血-视网膜屏障受损,最终导致眼部病变。高血脂对血管稳态的影响有着重要意义,一定浓度的游离胆固醇能引起内皮细胞内来源于 NADPH 氧化酶的血管活性氧(ROS)升高,激活 NF- κ B,进而导致内皮细胞损伤^[54],NADPH 氧化酶是血管细胞产生活性氧的主要酶,其相关亚单位的表达与血管稳态密切相关。脂质代谢相关的研究发现^[11],同型半胱氨酸(Hcy)诱导的脂代谢基因 *ABCA1* 的高甲基化和乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 1(Acetyl-CoA acetyltransferase 1, *ACAT1*)的低甲基化修饰,促使胆固醇逆向转运受阻,并在巨噬细胞中积累形成泡沫细胞,从而导致动脉粥样硬化的形成。低密度脂蛋白(LDL)容易诱导血管内皮功能障碍,通过下调内皮 Kruppel 样因子 2(KLF2)的启动子区域活动,导致内皮稳态失衡^[55]。

2.2 DNA 羟甲基化

近几年,除了对 DNA 甲基化的研究,DNA 羟

甲基化逐步开始有一些初步研究。DNA 羟甲基化主要是由于 DNA 被 10-11 易位家族蛋白(Ten-eleven translocation, TET)进一步氧化形成了 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)。TET 酶在羟甲基化过程中为关键酶, TET 家族蛋白包括 TET1、TET2、TET3, 这些都包含 α -酮戊二酸和二价铁依赖性双加氧酶, 在基因调控及基因表达过程中起了一定作用^[56]。TET1 负责在印迹调控区域积累 5hmC, 而 TET2 则主要是将多功能性基因羟化^[57]。

羟甲基化(5hmC)是甲基(5mC)羟甲基化的一种形式, 5hmC 是甲基化外的另一种重要的胞嘧啶修饰^[58]。羟甲基化与甲基化相比有不同的功能, CpG 岛甲基化与基因表达较低有关, 而基因内部羟甲基化则与基因表达较高有关^[59]。5mC 通常会抑制基因的表达, 而 5hmC 则与基因表达的激活有关^[60]。5hmC 已被认为是去甲基化修饰的关键中间环节, 或是作为染色质因子的一个信号^[58], 其在胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶(TDG)和去甲基酶的共同作用下, 可通过碱基切除继而逆转 DNA 甲基化修饰^[61]。其中重要的 TET 家族蛋白可以介导氧化作用, 因为 TET 蛋白在二价铁离子与 2-酮戊二酸依赖性氧化酶的共同作用下可以将 5mC 氧化^[62]。

Song 等^[63]发现基因中 5hmC 富集程度与低氧环境下的血管生成密切相关, TET 蛋白催化 5mC 变成 5hmC 的过程需要氧分子^[64]。敲除 TET2 可增加 5mC 水平, 同时降低染色质与平滑肌细胞收缩相关基因(*MYOCD*、*SRF*、*MYH11* 等)启动子区的结合^[14]。人体正常组织中 5hmC 分布存在差异性, 脑组织含量最高, 心脏、乳腺含量最低^[65], 5hmC 通过改变 DNA 甲基化状态来阻止抑制基因和凋亡基因失活, 5hmC 水平的降低使得基因缺乏保护导致肿瘤发生, 这同样对心脑血管疾病有着提示作用。

2.3 RNA 甲基化

RNA 甲基化也开始成为表观遗传修饰研究的一个新方向, 其表现形式为 N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)。1955 年研究细菌 DNA 时发现 m⁶A, 因检测技术有限, m⁶A 的机制不是很清楚。但随着检测技术的发展, 目前发现 m⁶A 是发生在碱基第 6 位 N 原子上的甲基化, 主要是通过 m⁶A 甲基转移酶的作用使 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基转移到腺嘌呤的第 6 位 N 原子, 是真核生物中最常见

的一种 RNA 转录后修饰。研究发现高达 20% 的人类 mRNA 常规发生了甲基化, 超过 5000 种不同的 mRNA 分子包含 m⁶A, 意味着这种修饰有可能广泛地影响了基因的表达模式^[66]。m⁶A 修饰主要发生在外显子区域和 3'-UTR 区域^[67], 不仅影响 mRNA 加工或运输的效率, 同时在基因的调节和表达方面起了一定的作用^[67]。

最新研究发现, 脂肪量和肥胖相关因子基因(Fat mass and obesity associated, *FTO*)^[68]、烷烃羟化酶同源 5 基因(*AlkB* family member 5, RNA demethylase, *ALKBH5*)^[69]与 m⁶A 密切相关, 这两个基因敲除会使 mRNA 的 m⁶A 水平增加。*FTO* 是肥胖症相关的重要基因, 脂肪组织的生长离不开营养物质与氧的供应, 而这需要通过增加脂肪组织中血管的数量及容量来实现, 因此, 脂肪生成通常受血管稳态的影响。肥胖风险基因 *FTO* 编码一种能够逆转这种修饰的酶, 可将 mRNA 中的 m⁶A 残基转换为普通的腺苷。携带 *FTO* 突变的人会拥有过度活性的 *FTO* 酶, 导致 m⁶A 低水平, 并引起食物摄入和代谢异常导致肥胖^[66]。*ALKBH5* 可以通过它的 6-羟甲基衍生物转化为腺嘌呤, *ALKBH5* 在体外可以使 m⁶A 去甲基化^[70]。m⁶A 甲基化沉默显著地影响基因表达和选择性的剪接模式, 影响对 P53 信号传导途径和细胞凋亡的调节^[71]。

3 DNA 甲基化在血管疾病中的表现

3.1 冠心病

DNA 甲基化修饰变异与冠心病之间密切相关。DNA 异常甲基化受到高胆固醇、缺氧、吸烟等血管危险因素的影响, 通过诱导血管稳态失衡, 促进心血管疾病的发生发展。研究证实, 营养和环境暴露通过形成高血压危险因素在孕期^[72]或饥饿^[73]期间影响基因表达的甲基化修饰。动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是冠心病的始动病因, 大量研究表明, DNA 的异常甲基化与 AS 的发生密切相关。已知雌激素通过与特异性受体结合有保护心血管的作用, AS 患者中血管平滑肌上雌激素受体 α (*Estrogen receptor α , ER α*)基因的启动子 CpG 岛存在异常高甲基化, 导致基因沉默, 高血浆 Hcy 可导致 *ER α* 甲基化程度增高, 参与 AS 的病变和发展^[74]。Zhu 等^[75]发现单羧酸转运蛋白 3(*Monocarboxylate transporters 3, MCT-3*)基因第二外显子区 CpG 岛的甲基化效应

抑制了基因的转录,使血管平滑肌细胞增殖及纤维沉积,从而加重动脉粥样硬化程度;Friso 等^[76]发现冠心病患者的外周血单核细胞中凝固因子 VII(Coagulation factor VII, *F7*)启动子区甲基化水平降低,可作为预测特定表型冠心病的标志物。此外,细胞外超氧化物歧化酶(Extracellular superoxide dismutase, *EC-SOD*)基因的高甲基化状态促进氧化应激,增加心血管患病风险^[77]。诱导型一氧化氮合酶(*iNOS*)基因启动子区域的高甲基化 CpG 可促进动脉粥样硬化的进展^[78]。冠心病患者中还表现出免疫相关的叉状头转录因子(Forkhead box P3, *FOXP3*)基因表达下调^[79],骨形态发生蛋白 3(*BNIP3*)基因的上调和谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase p11, *GSTP1*)的下调^[42]。

目前还发现, XV 型胶原 $\alpha 1$ (Collagen type XV $\alpha 1$, *COL15A1*)基因的低甲基化发生在血管平滑肌细胞的增殖过程,通过增强基因的表达影响平滑肌细胞的表型,并促进动脉粥样硬化形成^[80];成纤维细胞生长因子 2(*FGF2*)基因的甲基化在同型半胱氨酸诱导下,表达降低^[81];15-脂氧合酶(Arachidonate 15-lipoxygenase, *15-LO*)基因启动子高甲基化的细胞模型表达有助于平滑肌细胞迁移,通过炎症反应破坏血管稳态^[82];组织因子途径抑制物 2(Tissue factor pathway inhibitor 2, *TFPI-2*)基因表达与平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞,其甲基化模式的改变也将影响血管稳态^[83]。冠心病的发病机制十分复杂,目前 DNA 甲基化修饰在该领域的研究仍处于探索阶段。

3.2 高血压

高血压的发病机制和病变过程相对复杂,异常 DNA 甲基化修饰可参与某些高血压候选基因的表达,最终导致血压的发生与发展。越来越多的证据表明,代谢酶基因 *11 β -HSD-2*(Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2)和 *ECE 1*(Endothelin converting enzyme 1)及受体基因(Angiotensin II receptor, type 1b, *AT1b*)等通过甲基化调控参与了原发性高血压的发生发展。高甲基化的 *11 β -HSD* 和 *AT1b* 基因启动子区低甲基化或去甲基化均会导致高血压的发生^[84]。血浆 Hcy 水平增高会引起平滑肌细胞 DNA 去甲基化,进而诱发 *AT1b*、内皮素转换酶(*ECE*)等基因的去甲基化,通过肾素-血管紧张素-醛固酮等系统影响血压的变化^[85]。在自发性高血压大鼠(SHR)

实验中还发现了编码 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 协同转运蛋白 1 的 *NKCC1* 基因,其启动子区域的甲基化水平降低,导致表达下调,改变膜离子的通透性^[86],说明 *NKCC1* 甲基化可参与全身血压的调节。在中国人群中,过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPAR γ*)基因多态性与原发性高血压病相关^[87], *PPAR γ* 在心血管平滑肌细胞、内皮细胞、视网膜等组织细胞中呈低水平表达。*PPAR γ* 启动子区的甲基化程度在不同细胞模型中的差异较大。在来源于人脂肪组织的间充质干细胞中, *PPAR γ* 呈现低甲基化状态(甲基化程度 8%~23%),在脂肪生成过程中尽管个别 CpG 位点发生了去甲基化, *PPAR γ* 仍保持着稳定的低甲基化状态;来源于人骨髓和肌肉组织的间充质干细胞也同样保持着低甲基化状态^[88,89]。Riviere 等^[90]研究了体细胞血管紧张素转换酶(Angiotensin I converting enzyme, *sACE*)基因启动子区甲基化的调控作用, *sACE* 可将血管紧张素 I 催化为更具血管收缩性的血管紧张素 II,通过高甲基化修饰与抑制基因转录,影响高血压的发病过程。Senanayake 等^[91]研究发现,经治疗后的高血压大鼠,其全基因组 DNA 甲基化由低水平升到正常水平,提示全基因组 DNA 甲基化水平与高血压的发病机制密切相关。

另外,盐敏感性对血压存在遗传易感性,其候选基因包括 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶(钠泵)基因、 α -adducin 基因、胰岛素受体 β 亚单位基因、激肽释放酶-激肽系统(KKS)通路的部分基因、可溶性鸟苷酸环化酶(*sGC*)基因等。近 80% 的 CpG 岛对暴露于高盐饮食有差异性甲基化反应,通过对 Dahl 盐敏感大鼠肾外髓 5hmC 和 5mC 进行单核苷酸分辨率,发现高水平的 5mC 具有较低的 mRNA 富集,与此相反,高水平的 5hmC 具有高表达性^[92]。

3.3 脑卒中

脑卒中是发病率、死亡率、致残较高的疾病之一。近年来,缺血性脑卒中发病中的表观遗传机制成为研究的新方向,其中 DNA 甲基化与脑卒中的研究较多。研究表明,缺血性脑卒中患者 *P53* 基因启动子区甲基化程度明显升高,并且 *P53* 甲基化程度与颈动脉硬化程度、外周血 HCY 浓度相关^[93]。脑缺血再灌注损伤的机制包括自由基机制、细胞内钙离子超载机制、兴奋性氨基酸机制、一氧化氮和炎症

反应机制等。脑梗死的危险因素主要有年龄、高血压、糖尿病、高同型半胱氨酸(Hcy)血症、血脂紊乱、吸烟、缺乏运动、肥胖等,这些均可增加 ROS 的产生,导致生物可用的一氧化氮(Nitric oxide, NO)减少,最终使血管内皮失去正常功能。Kelly 等^[94]发现,当机体缺乏对于 DNA 甲基化异常重要的亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)时,脑梗死的发病率呈明显升高趋势。血小板反应蛋白-1(Thrombospondin 1, TSP-1)是一种有效的血管生成抑制因子,参与了血小板聚集、血管形成和肿瘤形成,研究发现 TSP-1 甲基化水平增高,其编码的 mRNA 表达下降,导致脑缺血后血管生成^[95]。

3.4 其他疾病

血管疾病的表观遗传修饰还表现于肾、肺、视网膜等组织中。鼠肾组织内 CpG 二核苷酸 C 碱基处的 DNA 甲基化模式发生改变,并伴随 DNA 甲基化酶、RNA 聚合酶的活性下降,但在 1 型糖尿病患者中,糖尿病肾病相关基因 *UNC13B*(Unc-13 homolog B)则出现了 DNA 高甲基化^[96],可见 DNA 甲基化在糖尿病血管病变中的作用方式相当复杂。在小鼠模型中发现,肾脏中 DNA 5hmC 及 *Tet* 基因的表达会影响缺血再灌注损伤, *CXCL10*(Chemokine (C-X-C motif) ligand 10)和 *IFNGR2*(Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1))基因启动子区域 5hmC 富集减少,这可能有助于在肾脏缺血再灌注损伤过程中基因转录的调控^[97]。

慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者肺组织 *BCL-2* (B-cell CLL/lymphoma 2)基因启动子区发生异常甲基化,位于-127 bp 的 CpG 中的 C 位点为异常甲基化好发部位,吸烟可能通过诱发 *BCL-2* 基因启动区异常甲基化,从而影响 *BCL-2* 蛋白表达,进而参与 COPD 患者肺血管内皮细胞凋亡^[98]。

视网膜新生血管的形成是一个复杂且有多种因子参与的过程^[99]。增殖型糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变和视网膜中央静脉阻塞等病变均存在视网膜组织的缺血、缺氧,继而释放过量的血管内皮生长因子(VEGF),导致视网膜新生血管失稳态。研究表明,β₃-肾上腺素受体(Adrenoceptor beta 3, ADRB3)在视网膜血管内皮细胞表达,氧化应激和细胞凋亡与其启动子甲基化的程度成反比,表明甲基化的损失可能是由于氧化应激诱导的 DNA 损伤^[100]。

4 结语与展望

以血管功能及结构异常为病理基础的血管疾病是当前威胁人类健康的重要疾病,寻找其分子机制的靶向治疗已成为学科研究的重点。已知低氧可诱导细胞内 DNA 出现差异性甲基化修饰,血流动力学可以选择性调节多种基因表达,表观遗传修饰与糖脂代谢有着密切的关联。然而,现今对 DNA 和 RNA 的甲基化,特别是 5hmC 和 m⁶A 的研究尚不够深入。由于血管功能调控的分子机制复杂,影响因素众多,人们对其调控网络的认识还远远不够。因此,相应的检测技术有待提高。通过多种组织的血管内皮及平滑肌细胞,开展 DNA 及 RNA 表观修饰/表达的影响实验,利用甲基化芯片、5hmC DNA 免疫共沉淀和 m⁶A RNA 免疫共沉淀的高通量测序平台,研究 DNA 去甲基化对基因表达的影响以及基因表达与各类表观遗传修饰(组蛋白修饰、非编码 RNA 调控)之间的关系,建立起与血管稳态相关细胞系中 DNA/RNA 甲基化的功能数据网络,以便在疾病风险的预测能力上进行系统评估。

另外, DNA 和 RNA 甲基化作为血管疾病新的诊疗工具,利用其修饰上的可逆特性,有助于人们寻找有效的干预靶点。目前,已证实了 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷(5-azacytidine)和地西他滨(Decitabine)在临床试验中的有效性,期间还发现一些治疗药物具有一定的去甲基化作用,但由于这类药物的作用机制尚不明确,在很大程度上限制了临床应用。虽然目前有很多问题亟待解决,但表观遗传学修饰,特别是 5hmC 和 m⁶A,将有望成为新的用于血管相关疾病的早期诊断表观遗传标志。

参考文献

- [1] Rader DJ, Parmacek MS. Secreted miRNAs suppress atherogenesis. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(3): 233–235. [\[DOI\]](#)
- [2] Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N, Shimokawa H. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med*, 2008, 205(9): 2053–2063. [\[DOI\]](#)
- [3] Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and

- inflammation. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(2): 126–137. [\[DOI\]](#)
- [4] Tsang H, Leiper J, Lao KH, Dowsett L, Delahaye MW, Barnes G, Wharton J, Howard L, Iannone L, Lang NN, Wilkins MR, Wojciak-Stothard B. Role of asymmetric methylarginine and connexin 43 in the regulation of pulmonary endothelial function. *Pulm Circ*, 2013, 3(3): 675–691. [\[DOI\]](#)
- [5] Wang YT, Liu HZ, McKenzie G, Witting PK, Stasch JP, Hahn M, Changsirivathanathamrong D, Wu BJ, Ball HJ, Thomas SR, Kapoor V, Celermajor DS, Mellor AL, Keane JF, Hunt NH, Stocker R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med*, 2010, 16(3): 279–285. [\[DOI\]](#)
- [6] Maron BA, Tang SS, Loscalzo J. S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(3): 270–287. [\[DOI\]](#)
- [7] Marvar PJ, Gordon FJ, Harrison DG. Blood pressure control: salt gets under your skin. *Nat Med*, 2009, 15(5): 487–488. [\[DOI\]](#)
- [8] Li SY, Sun Y, Qi XD, Shi Y, Gao H, Wu Q, Liu XC, Yu HT, Zhang CJ. Protective effect and mechanism of glutaredoxin 1 on coronary arteries endothelial cells damage induced by high glucose. *Biomed Mater Eng*, 2014, 24(6): 3897–3903. [\[DOI\]](#)
- [9] Millis RM. Epigenetics and hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2011, 13(1): 21–28. [\[DOI\]](#)
- [10] Liu J, Yao ST, Zhai L, Feng YL, Song GH, Yu Y, Zhu P, Qin SC. Ox-LDL down-regulates expression of pigment epithelium-derived factor in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Phys Sin*, 2014, 66(4): 489–495. [\[DOI\]](#)
- [11] Liang Y, Yang XL, Ma LN, Cai X, Wang L, Yang C, Li GZ, Zhang MH, Sun WW, Jiang YD. Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45(3): 220–228. [\[DOI\]](#)
- [12] Leonard A, Paton AW, El-Quadi M, Paton JC, Fazal F. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates endothelial cell inflammation. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110949. [\[DOI\]](#)
- [13] Hu SS, Zhang HG, Zhang QJ, Xiu RJ. CD51⁺ endothelial microparticles as a biomarker of endothelial dysfunction in obese patients with hypertension. *Endocrine*, 2014, doi: 10.1007/s12020-014-0423-7. [\[DOI\]](#)
- [14] Liu RJ, Jin Y, Tang WH, Qin LF, Zhang XB, Tellides G, Hwa J, Yu J, Martin KA. Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity. *Circulation*, 2013, 128(18): 2047–2057. [\[DOI\]](#)
- [15] Ning YY, Huang HD, Dong YC, Sun QY, Zhang W, Xu WJ, Li Q. 5-Aza-2'-deoxycytidine inhibited PDGF-induced rat airway smooth muscle cell phenotypic switching. *Arch Toxicol*, 2013, 87(5): 871–881. [\[DOI\]](#)
- [16] 韩萨茹拉, 高爱琴, 李金泉, 张燕军, 梅步俊. 成纤维细胞生长因子(FGF)研究进展. *安徽农业科学*, 2009, 37(7): 3008–3010. [\[DOI\]](#)
- [17] Liu XQ, Zhao Y, Gao JG, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li TS. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*, 2004, 36(2): 178–182. [\[DOI\]](#)
- [18] Chester AH, Yacoub MH. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014, 2014(2): 62–78. [\[DOI\]](#)
- [19] Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res*, 2010, 107(7): 839–850. [\[DOI\]](#)
- [20] Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan GX, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL, Prabhakar NR. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7): 2515–2520. [\[DOI\]](#)
- [21] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 2012, 148(3): 399–408. [\[DOI\]](#)
- [22] Jacob A, Potin S, Saubaméa B, Crete D, Scherrmann JM, Curis E, Peyssonnaud C, Declèves X. Hypoxia interferes with aryl hydrocarbon receptor pathway in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *J Neurochem*, 2014, doi: 10.1111/jnc.12972. [\[DOI\]](#)
- [23] Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E, Keshet E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998, 394(6692): 485–490. [\[DOI\]](#)
- [24] 盛妮妮, 黄晶. 缺氧诱导血管新生机制的研究进展. *心血管病学进展*, 2008, 29(5): 760–763. [\[DOI\]](#)
- [25] Van Eck M. ATP-binding cassette transporter A1: key player in cardiovascular and metabolic disease at local and

- systemic level. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(4): 297–303. [\[DOI\]](#)
- [26] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JGN, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 2005, 105(2): 659–669. [\[DOI\]](#)
- [27] Conway DE, Schwartz MA. Flow-dependent cellular mechanotransduction in atherosclerosis. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 22): 5101–5109. [\[DOI\]](#)
- [28] Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Ono S, Yoshida A. Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res*, 2013, 116: 308–311. [\[DOI\]](#)
- [29] 杨琼, 武春艳, 江璐, 刘录山. 剪切应力-内皮细胞-Caveolin-1 信号通路在动脉粥样硬化中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(3): 237–240. [\[DOI\]](#)
- [30] Kowluru RA, Kennedy A. Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001, 10(9): 1665–1676. [\[DOI\]](#)
- [31] Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11–12): 1581–1587. [\[DOI\]](#)
- [32] Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*, 2014, 129(15): 1551–1559. [\[DOI\]](#)
- [33] Helotera H, Alitalo K. The VEGF family, the inside story. *Cell*, 2007, 130(4): 591–592. [\[DOI\]](#)
- [34] Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji HK, Xiao YH, Ding ZH, Miao LL, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR, Jiang S, Gilliland DG, Chin L, Wong WH, Castrillon DH, DePinho RA. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell*, 2007, 128(2): 309–323. [\[DOI\]](#)
- [35] Santoro MM, Samuel T, Mitchell T, Reed JC, Stainier DYR. Birc2 (cIap1) regulates endothelial cell integrity and blood vessel homeostasis. *Nat Genet*, 2007, 39(11): 1397–1402. [\[DOI\]](#)
- [36] Chen YQ, Zhao SP, Xiang R. RTN3 and RTN4: Candidate modulators in vascular cell apoptosis and atherosclerosis. *J Cell Biochem*, 2010, 111(4): 797–800. [\[DOI\]](#)
- [37] Kang DH, Lee DJ, Lee KW, Park YS, Lee JY, Lee SH, Koh YJ, Koh GY, Choi C, Yu DY, Kim J, Kang SW. Peroxiredoxin is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular endothelial cells. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 545–558. [\[DOI\]](#)
- [38] Yan MH, Callahan CA, Beyer JC, Allamneni KP, Zhang G, Ridgway JB, Niessen K, Plowman GD. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. *Nature*, 2010, 463(7282): E6–E7. [\[DOI\]](#)
- [39] Chang SR, Young BD, Li SJ, Qi XX, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell*, 2006, 126(2): 321–334. [\[DOI\]](#)
- [40] Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G, Bressan GM. Emilin1 links TGF- β maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*, 2006, 124(5): 929–942. [\[DOI\]](#)
- [41] Raman M, Cobb MH. TGF- β regulation by Emilin1: new links in the etiology of hypertension. *Cell*, 2006, 124(5): 893–895. [\[DOI\]](#)
- [42] Lakshmi SVV, Naushad SM, Reddy CA, Saumya K, Rao DS, Kotamraju S, Kutala VK. Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective. *Mol Cell Biochem*, 2013, 374(1–2): 203–211. [\[DOI\]](#)
- [43] Komatsu M, Ruoslahti E. R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. *Nat Med*, 2005, 11(12): 1346–1350. [\[DOI\]](#)
- [44] Berthe MC, Bernard M, Rasmusen C, Darquy S, Cynober L, Couderc R. Arginine or citrulline associated with a statin stimulates nitric oxide production in bovine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(2–3): 566–570. [\[DOI\]](#)
- [45] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 6–21. [\[DOI\]](#)
- [46] Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review). *Mol Med Rep*, 2012, 5(4): 883–889. [\[DOI\]](#)
- [47] Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, Ramírez-Ruz J, Gomez A, Gonçalves I, Moran S, Esteller M. A DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7(5): 692–700. [\[DOI\]](#)

- [48] Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, Ballestar E, Esteller M, Zaina S. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29147–29154. [\[DOI\]](#)
- [49] Krause BJ, Costello PM, Muñoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanello P. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics*, 2013, 8(9): 944–952. [\[DOI\]](#)
- [50] Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, Phelan D, Ledwidge MT, McDonald KM, McCann A, Sharaf O, Baugh JA. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(8): 2176–2188. [\[DOI\]](#)
- [51] Jiang YZ, Jiménez JM, Ou K, McCormick ME, Zhang LD, Davies PF. Hemodynamic disturbed flow induces differential DNA methylation of endothelial Kruppel-Like Factor 4 promoter *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res*, 2014, 115(1): 32–43. [\[DOI\]](#)
- [52] Dunn J, Qiu HW, Kim S, Jjingo D, Hoffman R, Kim CW, Jang I, Son DJ, Kim D, Pan CY, Fan YH, Jordan IK, Jo H. Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 3187–3199. [\[DOI\]](#)
- [53] Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2009, 58(12): 2718–2725. [\[DOI\]](#)
- [54] 权媛, 钱民章. 胆固醇通过 NADPH 氧化酶诱导 ROS 升高, NF- κ B 活化进而导致内皮细胞损伤. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8): 1521–1526. [\[DOI\]](#)
- [55] Kumar A, Kumar S, Vikram A, Hoffman TA, Naqvi A, Lewarchik CM, Kim Y-R, Irani K. Histone and DNA methylation-mediated epigenetic downregulation of endothelial Kruppel-like factor 2 by low-density in cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8): 1936–1942. [\[DOI\]](#)
- [56] Kinney SRM, Pradhan S. Ten eleven translocation enzymes and 5-hydroxymethylation in mammalian development and cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 754: 57–79. [\[DOI\]](#)
- [57] Piccolo FM, Bagci H, Brown KE, Landeira D, Soza-Ried J, Feytout A, Mooijman D, Hajkova P, Leitch HG, Tada T, Kriaucionis S, Dawlaty MM, Jaenisch R, Merckenschlager M, Fisher AG. Different roles for Tet1 and Tet2 proteins in reprogramming-mediated erasure of imprints induced by EGC fusion. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1023–1033. [\[DOI\]](#)
- [58] Guibert S, Weber M. Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. *Curr Top Dev Biol*, 2013, 104: 47–83. [\[DOI\]](#)
- [59] Kato T, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology*, 2014, 80: 133–139. [\[DOI\]](#)
- [60] Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(1): 7–13. [\[DOI\]](#)
- [61] Dalton SR, Bellacosa A. DNA demethylation by TDG. *Epigenomics*, 2012, 4(4): 459–467. [\[DOI\]](#)
- [62] Ponnaluri VKC, Maciejewski JP, Mukherji M. A mechanistic overview of TET-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2): 115–120. [\[DOI\]](#)
- [63] Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi CQ, Li XK, Li YJ, Chen CH, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang BC, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(1): 68–72. [\[DOI\]](#)
- [64] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129–1133. [\[DOI\]](#)
- [65] Li WW, Liu M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids*, 2011, 2011: Article ID 870726. [\[DOI\]](#)
- [66] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149(7): 1635–1646. [\[DOI\]](#)
- [67] Niu YM, Zhao X, Wu YS, Li MM, Wang XJ, Yang YG. N⁶-methyl-adenosine (m⁶A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genom, Proteom Bioinform*, 2013, 11(1): 8–17. [\[DOI\]](#)
- [68] Jia GF, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng GQ, Yang Y, Yi CQ, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. N⁶-methyladenosine in

- nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885–887. [\[DOI\]](#)
- [69] Zheng GQ, Dahl JA, Niu YM, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbø CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu ZK, Bosmans RPG, Dai Q, Hao YJ, Yang X, Zhao WM, Tong WM, Wang XJ, Bogdan F, Furu K, Fu Y, Jia GF, Zhao X, Liu J, Krokan HE, Klungland A, Yang YG, He C. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18–29. [\[DOI\]](#)
- [70] Li DY, Delaney JC, Page CM, Yang XD, Chen AS, Wong C, Drennan CL, Essigmann JM. Exocyclic carbons adjacent to the N⁶ of adenine are targets for oxidation by the *Escherichia coli* adaptive response protein AlkB. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(21): 8896–8901. [\[DOI\]](#)
- [71] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 2012, 485(7397): 201–206. [\[DOI\]](#)
- [72] Napoli C, Crudele V, Soricelli A, Al-Omran M, Vitale N, Infante T, Mancini FP. Primary prevention of atherosclerosis: a clinical challenge for the reversal of epigenetic mechanisms? *Circulation*, 2012, 125(19): 2363–2373. [\[DOI\]](#)
- [73] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol Elmsford N*, 2005, 20(3): 345–352. [\[DOI\]](#)
- [74] Huang YS, Zhi YF, Wang SR. Hypermethylation of estrogen receptor- α gene in atheromatosis patients and its correlation with homocysteine. *Pathophysiol*, 2009, 16(4): 259–265. [\[DOI\]](#)
- [75] Zhu SK, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong CM. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis. *Circulation*, 2005, 112(9): 1353–1361. [\[DOI\]](#)
- [76] Friso S, Lotto V, Choi SW, Girelli D, Pinotti M, Guarini P, Udali S, Pattini P, Pizzolo F, Martinelli N, Corrocher R, Bernardi F, Olivieri O. Promoter methylation in coagulation F7 gene influences plasma F concentrations and relates to coronary artery disease. *J Med Genet*, 2012, 49(3): 192–199. [\[DOI\]](#)
- [77] Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(7): 895–904. [\[DOI\]](#)
- [78] Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA. Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol*, 2005, 175(6): 3846–3861. [\[DOI\]](#)
- [79] Jia L, Zhu L, Wang JZ, Wang XJ, Chen JZ, Song L, Wu YJ, Sun K, Yuan ZY, Hui RT. Methylation of *FOXP3* in regulatory T cells is related to the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2013, 228(2): 346–352. [\[DOI\]](#)
- [80] Connelly JJ, Cherepanova OA, Doss JF, Karaoli T, Lillard TS, Markunas CA, Nelson S, Wang T, Ellis PD, Langford CF, Haynes C, Seo DM, Goldschmidt-Clermont PJ, Shah SH, Kraus WE, Hauser ER, Gregory SG. Epigenetic regulation of COL15A1 in smooth muscle cell replicative aging and atherosclerosis. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(25): 5107–5120. [\[DOI\]](#)
- [81] Yang TC, Chen YJ, Chang SF, Chen CH, Chang PY, Lu SC. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 11. [\[DOI\]](#)
- [82] Liu C, Xu DW, Sjöberg J, Forsell P, Björkholm M, Claesson HE. Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by promoter methylation. *Exp Cell Res*, 2004, 297(1): 61–67. [\[DOI\]](#)
- [83] Zawadzki C, Chatelain N, Delestre M, Susen S, Quesnel B, Juthier F, Jeanpierre E, Azzaoui R, Corseaux D, Breyné J, Torpier G, Staels B, Van Belle E, Jude B. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 2009, 204(2): e4–e14. [\[DOI\]](#)
- [84] Nuyt AM, Szyf M. Developmental programming through epigenetic changes. *Circ Res*, 2007, 100(4): 452–455. [\[DOI\]](#)
- [85] 姜怡邓, 张建中, 黄英, 苏娟, 张敬各, 王丽珍, 韩晓群, 王树人. 高半胱氨酸在平滑肌细胞中介导 DNA 甲基化及机制的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(5): 479–489. [\[DOI\]](#)
- [86] Lee HA, Baek I, Seok YM, Yang EY, Cho HM, Lee DY, Hong SH, Kim IK. Promoter hypomethylation upregulates

- Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 252–257. [\[DOI\]](#)
- [87] 张扬, 邹晓译, 刘双江, 孙强, 丁丽君, 郝佳, 赵君. PPAR γ C161 \rightarrow T、 α -内收蛋白 Gly460Trp 基因多态性与原发性高血压的关系. 疑难病杂志, 2014, 13(6): 563–566. [\[DOI\]](#)
- [88] Noer A, Boquest AC, Collas P. Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. *BMC Cell Biol*, 2007, 8: 18. [\[DOI\]](#)
- [89] Noer A, Sørensen AL, Boquest AC, Collas P. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(8): 3543–3556. [\[DOI\]](#)
- [90] Rivière G, Lienhard D, Andrieu T, Vieau D, Frey BM, Frey FJ. Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. *Epigenetics*, 2011, 6(4): 478–489. [\[DOI\]](#)
- [91] Senanayake GVK, Banigesh A, Wu LY, Lee P, Juurlink BHJ. The dietary phase 2 protein inducer sulforaphane can normalize the kidney epigenome and improve blood pressure in hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 2012, 25(2): 229–235. [\[DOI\]](#)
- [92] Liu Y, Liu PY, Yang C, Cowley AW, Liang MY. Base-resolution maps of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in Dahl S rats: effect of salt and genomic sequence. *Hypertension*, 2014, 63(4): 827–838. [\[DOI\]](#)
- [93] 魏艳. P53 基因启动子区甲基化状态与缺血性脑卒中的相关性研究[学位论文]. 济南: 山东大学, 2012. [\[DOI\]](#)
- [94] Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, Shih VE, Silveira S, Plo-maritoglou A, Furie KL. Homocysteine, MTHFR 677C/T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology*, 2002, 59(4): 529–536. [\[DOI\]](#)
- [95] Hu CJ, Chen SD, Yang DI, Lin TN, Chen CM, Huang THM, Hsu CY. Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(12): 1519–1526. [\[DOI\]](#)
- [96] Trégouët DA, Groop PH, McGinn S, Forsblom C, Hadjadj S, Marre M, Parving HH, Tarnow L, Telgmann R, Godefroy T, Nicaud V, Rousseau R, Parkkonen M, Hoverfält A, Gut I, Heath S, Matsuda F, Cox R, Kazeem G, Farrall M, Gauguier D, Brand-Herrmann SM, Cambien F, Lathrop M, Vionnet N, EURAGEDIC Consortium. G/T substitution in intron 1 of the *UNC13B* gene is associated with increased risk of nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2843–2850. [\[DOI\]](#)
- [97] Huang N, Tan L, Xue ZG, Cang J, Wang H. Reduction of DNA hydroxymethylation in the mouse kidney insulted by ischemia reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(4): 697–702. [\[DOI\]](#)
- [98] Zeng HH, Kong XL, Peng H, Chen Y, Cai S, Luo H, Chen P. Apoptosis and Bcl-2 family proteins, taken to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16(6): 711–727. [\[DOI\]](#)
- [99] Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, 2005, 438(7070): 960–966. [\[DOI\]](#)
- [100] Safi SZ, Qvist R, Yan GOS, Ismail ISB. Differential expression and role of hyperglycemia induced oxidative stress in epigenetic regulation of β 1, β 2 and β 3-adrenergic receptors in retinal endothelial cells. *BMC Med Genomics*, 2014, 7: 29. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 朱卫国)