

在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和人脐静脉平滑肌细胞中 同型半胱氨酸对 B1 和 Alu 重复序列甲基化的影响

吴凯¹, 马胜超², 孙炜炜³, 王菊³, 曹成建³, 马长剑³, 杨安宁¹, 姜怡邓^{1,4}

(宁夏医科大学 1. 基础医学院, 3. 检验学院, 4. 总医院, 宁夏银川市 750004;

2. 四川大学华西基础与法医学院, 四川省成都市 610041)

[关键词] B1 和 Alu 重复序列; 甲基化; 同型半胱氨酸; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 血管平滑肌细胞

[摘要] **目的** 观察同型半胱氨酸对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠不同组织和人脐静脉平滑肌细胞中 B1 和 Alu 序列甲基化水平的影响, 为进一步阐明同型半胱氨酸致动脉粥样硬化形成的分子机制提供理论和实验依据。**方法** 复制高同型半胱氨酸血症载脂蛋白 E 基因敲除小鼠模型, 给予不同饮食 14 周后, 分别取小鼠心脏组织、血管及白细胞; 原代培养人脐静脉平滑肌细胞, 用 50、100、200 及 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸干预培养 72 h 后, 抽提组织、白细胞及平滑肌细胞的基因组 DNA, 采用巢式降落式甲基化特异性 PCR 法分别检测不同组织和细胞中 B1 和 Alu 序列甲基化水平的变化。**结果** 饲以高蛋氨酸饮食的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠心脏组织、血管和白细胞中 B1 重复序列甲基化水平下降明显, 与正常对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); 在同型半胱氨酸干预的平滑肌细胞中 Alu 序列甲基化水平下降显著 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。**结论** 同型半胱氨酸引起 B1 和 Alu 序列低甲基化改变可能是其导致动脉粥样硬化发生发展的重要机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Homocysteine on the Methylation Status of B1 and Alu Repetitive Sequences in ApoE^{-/-} Mice and Human Vascular Smooth Muscle Cells

WU Kai¹, MA Sheng-Chao², SUN Wei-Wei³, WANG Ju³, CAO Cheng-Jian³, MA Chang-Jian³, YANG An-Ning¹, JIANG Yi-Deng^{1,4}

(1. School of Basic Medical Sciences, 3. Laboratory medical college, 4. Genenal Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[KEY WORDS] B1 and Alu Repetitive Sequences; Methylation; Homocysteine; ApoE^{-/-} Mice; Vascular Smooth Muscle Cells

[ABSTRACT] **Aim** To observe the methylation levels of B1 and Alu sequences in different tissues of ApoE^{-/-} mice and human vascular smooth muscle cells induced by homocysteine (Hcy), so as to further clarify the molecular mechanisms of Hcy-induced atherosclerosis (As). **Methods** The hyperhomocysteinemia ApoE^{-/-} mice model were replicated, and the heart tissues, aortas and white blood cells were taken from mice after fed for 14 weeks. 50, 100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy were added into the primary cultured human umbilical vein smooth muscle cells for 72 h. The genomic DNA were extracted from the heart tissues, aortas, white blood cells and vascular smooth muscle cells. Then the methylation status of B1 and Alu repetitive sequences were examined by nMS-PCR. **Results** The methylation levels of B1 repetitive sequences were significantly decreased in the heart tissues, aortas and white blood cells of ApoE^{-/-} mice fed with high methionine diet. Compared with the control group, there were significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The m-

[收稿日期] 2013-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81260105、81160044 和 81260063)、2010 年教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0916)、宁夏自然科学基金项目(NZ11176)和宁夏自治区科技厅科技攻关项目(20100820, [2012]17)

[作者简介] 吴凯, 硕士, 副教授, 研究方向为心血管发病机制, E-mail 为 solarmsc@163.com。马胜超, 博士研究生, 研究方向为心血管发病机制, E-mail 为 290277855@qq.com。孙炜炜, 硕士, 研究方向为心血管发病机制, E-mail 为 sweila@126.com。通讯作者姜怡邓, E-mail 为 jydcan@126.com。

ethylation levels of Alu sequences in the smooth muscle cells cultured with Hcy were significantly declined ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusion** The hypomethylation of B1 and Alu repetitive sequences induced by Hcy may be an important mechanism of As.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是由多种因素诱导的心脑血管疾病。研究证实 As 形成过程中存在整体基因组和某些特定基因的 DNA 甲基化异常^[1,2]。同型半胱氨酸(homocysteinemia, Hcy)异常升高可以导致高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)。研究表明 Hcy 是 As 的一个重要的独立危险因素,它可以通过影响基因启动子区甲基化水平发挥生物学作用^[3]。B1 重复序列是啮齿类动物基因组中短散布重复序列(short interspersed repeated sequences, SINE)家族的一员,Alu 序列是人类基因组中相对应于 B1 重复序列的 SINE^[4,5]。B1 和 Alu 序列广泛散布于整个基因组中,其甲基化的变化可有效反映出基因组整体的甲基化状态,然而,Hcy 能否影响 B1 和 Alu 序列甲基化的变化却鲜少报道。本课题选择 ApoE^{-/-} 鼠和人血管平滑肌细胞(VSMC)作为研究对象,采用巢式降落式 PCR(nMS-PCR)法分别检测 ApoE^{-/-} 鼠组织和平滑肌细胞中 B1 和 Alu 重复序列甲基化的变化,观察 Hcy 对不同组织和细胞中 Alu 和 B1 重复序列甲基化的作用,为进一步阐明 Hcy 致 As 形成的分子机制提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

相差显微镜(Nikon 公司);PCR 仪和凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);高速低温离心机和 CO₂ 孵箱(Heraeus 公司);精密天平(Sartorius 公司),pH 测定仪(Jenway Ltd 公司);低速离心机(上海安亭仪器厂)。青霉素、链霉素、D-PBS 缓冲液、DMEM/F-12 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司);胰蛋白酶、D-Hanks 液、同型半胱氨酸(Sigma 公司);红细胞裂解液(北京康为生物技术公司);DNA 提取试剂盒(Promega 公司);DNA 甲基化修饰试剂盒(Epigentek 公司);引物由上海生工公司合成。

1.2 动物模型与分组^[6]

SPF 级近交系 C57BL/6J 背景 5 周龄雄性纯合子 ApoE^{-/-} 鼠,体质量 18~20 g,由北京大学实验动物中心提供[合格证号 SCXK(学)2002-001]。选择性别、年龄与 ApoE^{-/-} 鼠相匹配的 SPF 级 C57BL/6J 雄鼠(wild type, WT)作为对照。实验动物分为 4

组,每组 12 只:(1)正常对照组:饲以普通饮食。(2)ApoE^{-/-} 对照组:ApoE^{-/-} 鼠饲以普通饮食。(3)高蛋氨酸组:ApoE^{-/-} 鼠饲以高蛋氨酸饮食(普通饮食中加入 1.7% 蛋氨酸)。(4)干预组:ApoE^{-/-} 鼠饲以高蛋氨酸饮食加 0.006% 叶酸和 0.0004% 维生素 B12。小鼠均分笼饲养于 SPF 级环境内,自由饮食。14 周后,各组小鼠腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉,摘除眼球取血后离心收集外周血细胞,分离腹主动脉并剪取心脏用于后续试验。

1.3 人脐静脉平滑肌细胞的培养^[7]

取剖宫产术后的胎儿脐静脉,在超净工作台内将血管条剪成 1 mm × 1 mm 的血管小块,均匀贴于培养瓶底,培养瓶内加入 4 mL 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液,置 37℃、5% CO₂ 孵箱培养,3 天后,换新鲜培养液,以后每 3 天换液 1 次,待组织块周围生长的细胞融合度达 90% 时传代。取第 3 代细胞用于实验,将细胞分别置于终浓度为 0、50、100、200、500 μmol/L Hcy 的培养液中孵育 72 h,以备后续实验使用。

1.4 组织和细胞 DNA 的提取

取各组小鼠组织,组织匀浆器匀浆,取上清液转移到离心管中;收集平滑肌细胞并转移到离心管中。15000 g 离心 10 min。弃上清,加入 200 μL PBS 清洗细胞,离心并弃去 PBS,涡旋振荡器剧烈振荡使细胞重悬。向离心管中加入 600 μL 核裂解液,以裂解组织细胞。加入 200 μL 蛋白沉淀液高速剧烈振荡 20 s,冰上冷却 5 min。15000 g 离心 4 min,形成白色致密的蛋白沉淀。移上清液(含 DNA)至加有 600 μL 异丙醇的离心管中,轻轻颠倒混匀。15000 g 离心 1 min,弃上清,加入 600 μL 70% 乙醇清洗 DNA 沉淀。15000 g 离心 1 min,自然干燥 10 min。向离心管中加入 100 μL DNA Rehydration Solution,65℃ 孵育 1 h 溶解 DNA。取 3 μL DNA 溶液,加 1 μL 上样缓冲液(含 0.25% 溴酚兰,40% 蔗糖),100 V/cm 1% 琼脂糖凝胶(含有 0.05 mL/L EB)电泳 30 min,紫外凝胶成像分析仪下观察。

1.5 DNA 纯度和浓度的检测

待测 DNA 样品用蒸馏水 1:20 稀释,充分混匀。用蒸馏水作为空白,在波长 260 nm 处调节紫外分光光度计读数至零,然后用紫外分光光度计分别测定样品 260 nm 的 OD 值。DNA 样品浓度计算公式:

$DNA = 50 \times OD_{260} \times \text{稀释倍数} (\mu\text{g/mL})$ 。以 260 nm 和 280 nm 的 OD 值的比值 (OD_{260}/OD_{280}) 判断 DNA 样品纯度。 OD_{260}/OD_{280} 为 1.7 ~ 2.0 之间的 DNA 用于后续实验。

1.6 DNA 重亚硫酸盐修饰

取 20 μL 提取的 DNA 样品于 PCR 管中,加 130 μL CT Conversion Reagent,混匀。将样品管放到 PCR 仪上,按下列步骤操作:98 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 64 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 h。将上步样品加到含有 600 μL M-Binding Buffer 的 IC 柱中,10000 g 离心 30 s,弃掉收集管中的液体。加 100 μL M-Wash Buffer 到柱中,10000 g 离心 30 s。加 200 μL M-Desulphonation Buffer 到柱中,室温放置 15 min,10000 g 离心 30 s。加 200 μL M-Wash Buffer 到柱中,10000 g 离心 30 s。将柱放到一个 1.5 mL 的离心管中,加 10 μL M-Elution Buffer 到柱中,10000 g 离心 30 s,洗脱 DNA。

1.7 巢式降落式甲基化特异性 PCR 法检测 B1 和 Alu 序列甲基化改变

使用在线甲基化引物设计软件 MethPrimer 设计甲基化引物,B1 外引物为上游 5'-ATA GAA GTG GAT GTT TAT AGT TAG TTA TTG-3',下游 5'-CAC TCC AAC TTT TTA ACC CTA AC-3'。甲基化上游 5'-GTT AGT TAT TGG ATG GGT TAT ACG G-3',下游 5'-TAC AAC TAA AAA CAA AAA CTC CGA A-3';非甲基化上游 5'-GTT AGT TAT TGG ATG GGT TAT ATG G-3',下游 5'-TACA ACT AAA AAC AAA AAC TCC AAA-3'。Alu 外引物为上游 5'-TTA GTT TTG TGA AGA TTG TTA ATG GTA GT-3',下游 5'-ACA ATT AAA CCA AAA ACC AAA TCA C-3'。甲基化上游 5'-TTT TAG TTA ATA CGT GAA ATT TCG T-3',下游 5'-CAA TCT TAA CTC ACT ACA AAC TCC G-3';非甲基化上游 5'-AGA TTA TTT TAG TTA ATA TGT GAA ATT TTG-3',下游 5'-ATC TTA ACT CAC TAC AAA CTC CAC C-3'。反应体系:Mix 12.5 μL ,上游引物 (M/U) 1 μL ,下游引物 (M/U) 1 μL ,DNA 模板 4 μL ,加无核酸酶水至 25 μL 。采用降落式 PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,69 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,运行 30 个循环,每个循环退火温度下降 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。然后运行扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,69 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,于恒定的退火温度下进行 20 个循环。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。反应后取终产物 3 μL 在 2% 的琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 30 min,紫外线照像分析光密度。按如下公式进行结果的计算:甲基化 (%) = $OD_{\text{甲基化}} /$

$(OD_{\text{甲基化}} + OD_{\text{非甲基化}})$,每组实验重复 3 次。

1.8 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数间比较采用 Student's *t* 检验,多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA 的提取、浓度和纯度

提取的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像分析仪下拍照,得到理想的 DNA 条带(图 1)。核酸分析仪测得 DNA 的浓度在 $1.78 \times 10^3 \text{ mg/L}$ 左右,纯度均在 1.81 左右。

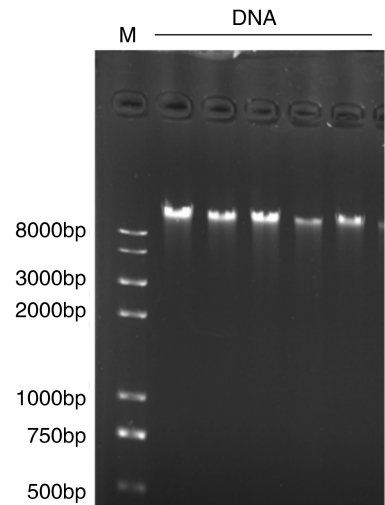


图 1. 基因组 DNA 电泳图

Figure 1. The electrophoresis graph of genomic DNA

2.2 同型半胱氨酸对 ApoE^{-/-} 鼠 B1 序列甲基化修饰状态的影响

B1 序列的甲基化程度在 ApoE^{-/-} 鼠的血管、白细胞和心脏中呈不同程度的降低。在 ApoE^{-/-} 鼠血管中,ApoE^{-/-} 对照组、高蛋白组 B1 序列甲基化程度与正常对照组比较分别降低了 7.37%、13.41%,干预组与高蛋白组比较增加了 9.10% ($P < 0.05$);在白细胞中,与正常对照组比较,ApoE^{-/-} 对照组和高蛋白组 B1 序列甲基化程度分别下降了 7.98%、14.82%,而干预组与高蛋白组比较增加了 9.83% ($P < 0.05$);在心脏中,ApoE^{-/-} 对照组、高蛋白组 B1 序列甲基化程度与正常对照组比较分别降低了 6.67%、6.14%,干预组与高蛋白组比较增加了 5.57% ($P < 0.05$;图 2 和图 3)。

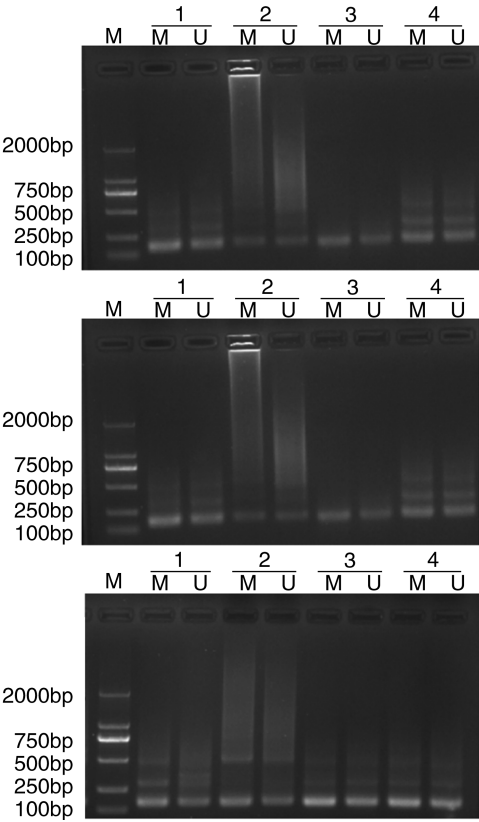


图 2. Hcy 对 ApoE^{-/-} 鼠血管(上图)、白细胞(中图)和心脏(下图)B1 序列甲基化电泳图 1 为正常对照组,2 为 ApoE^{-/-} 对照组,3 为高蛋氨酸组,4 为干预组;M 为甲基化,U 为非甲基化。

Figure 2. The electrophoresis graph of Hcy on B1 methylation status in aorta (upon), white blood cells (middle) and heart (below) of ApoE^{-/-} mice

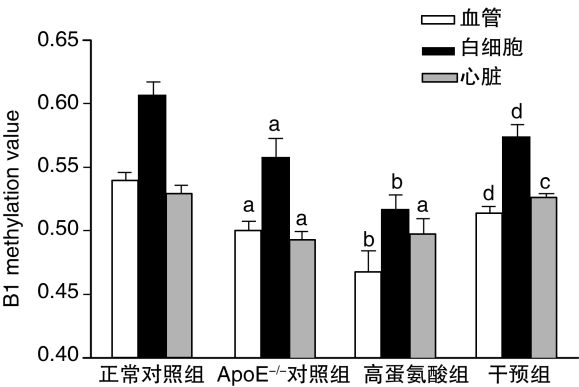


图 3. Hcy 对 ApoE^{-/-} 鼠血管、白细胞与心脏 B1 序列甲基化修饰状态的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与高蛋氨酸组比较。

Figure 3. Effect of Hcy on the B1 methylation status of aorta, blood cells, heart in ApoE^{-/-} mice

2.3 同型半胱氨酸对人脐静脉平滑肌细胞 Alu 序列甲基化修饰状态的影响

nMS-PCR 法检测结果表明,不同浓度的 Hcy 作

用于平滑肌细胞 72 h 后,Alu 重复序列甲基化程度降低,表现为低甲基化,随着 Hcy 浓度从 50 到 100 至 500 $\mu\text{mol/L}$,平滑肌细胞 Alu 序列甲基化程度与对照组比较分别下降了 26.2%、20.1%、22.2% 和 19.7%,差异有显著性($P < 0.05$;图 4)。

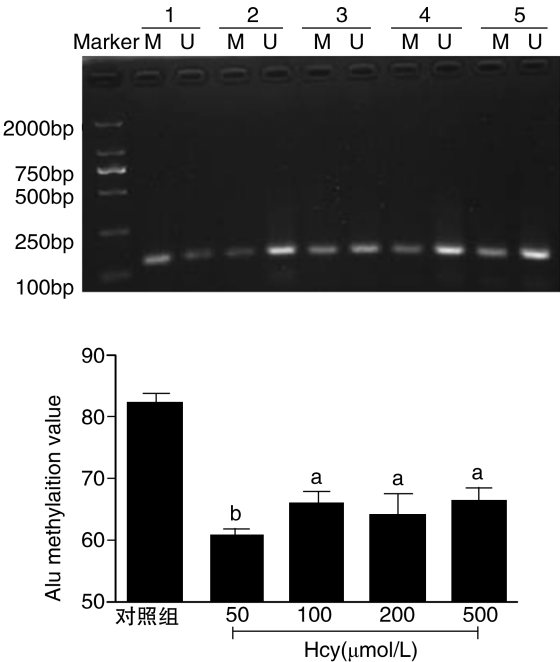


图 4. Hcy 对平滑肌细胞 Alu 序列甲基化修饰状态的影响 1 为对照组,2 ~ 5 依次为 50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较;M 为甲基化,U 为非甲基化。

Figure 4. Effect of Hcy on the Alu methylation status in smooth muscle cell

3 讨论

As 是由多种遗传因素和环境因素综合作用的结果,大量临床和循证医学证实,Hcy 是 As 的一个重要的独立危险因素,可通过多种机制诱发 As^[8,9]。ApoE^{-/-} 小鼠是研究 As 经典的动物模型,高蛋氨酸饮食会加速 ApoE^{-/-} 鼠 As 形成的进程,这与人类 As 形成过程相似^[10]。而平滑肌细胞的增殖和迁移是 As 发生发展的中心环节^[11]。故该实验采用饲以高蛋氨酸的 ApoE^{-/-} 小鼠建立高同型半胱氨酸血症模型及用 Hcy 干预原代培养的人脐静脉平滑肌细胞,检测 Alu 和 B1 序列的甲基化状态,以期进一步解释和阐明 Hcy 导致 As 的分子机制。

B1 和 Alu 序列中 CpG 二核苷酸含量丰富,CpG 是基因组甲基化的主要底物,这为人类基因组提供了甲基化的位点,而甲基化/去甲基化可以调节基因的表达,进而影响疾病的发生发展^[12]。Alu 是短散

布核元件中最大的一个家族,人基因组中含量最丰富的一种中度重复序列,在单倍体人基因组中重复可达 30 万 ~ 50 万次,约占人基因组的 3% ~ 6%^[13],Alu 重复序列已被证明在正常组织中呈高甲基化水平,Alu 序列的低甲基化已经被用来解释人类肿瘤中出现的基因组低甲基化现象^[14]。B1 重复序列约占鼠 17% ~ 25% 的基因组序列,B1 序列甲基化水平是基因组总甲基化水平良好的指示因子^[15]。本实验在 ApoE^{-/-}小鼠发生 As 的基础上,分别检测了 ApoE^{-/-}小鼠的心脏、血管和白细胞中 B1 重复序列的甲基化水平,结果显示 B1 重复序列发生了低甲基化改变。同时,在 Hcy 干预的血管平滑肌细胞中发现 Alu 序列也发生了低甲基化改变。结果表明高蛋氨酸饮食引起的 ApoE^{-/-}鼠 Hcy 浓度升高可导致 B1 序列甲基化程度的降低,且外源性给予高浓度的 Hcy 刺激也会产生类似的结果。而这种甲基化修饰状态的改变很可能因为异常升高的 Hcy 干扰了蛋氨酸循环代谢途径产生的。在蛋氨酸代谢循环中,Hcy 接受甲基四氢叶酸提供的甲基转化为甲硫氨酸,后者经活化生成 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)。在 DNA 甲基转移酶的作用下,体内唯一的 DNA 甲基供体 SAM 提供甲基,将胞嘧啶的第 5 位碳原子甲基化,从而使胞嘧啶转化为 5-甲基胞嘧啶,SAM 转变为 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),SAH 被 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶水解生成 Hcy 和腺苷^[16,17]。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学调控机制,基因启动子区高甲基化与基因的表达呈负相关,而去甲基化可促进转录激活因子和其识别序列的结合,使基因表达升高,而高甲基化则抑制基因的表达^[18]。实验研究结果显示在 Hcy 作用下,B1 和 Alu 序列发生低甲基化改变,这很可能是由于 Hcy 处于向 DNA 转甲基反应的下游,Hcy 浓度升高,引起其上游底物 SAH 出路受阻、浓度升高,而 SAH 是甲基转移酶的抑制剂,进而导致 B1 和 Alu 序列甲基化程度的降低。同时实验研究结果发现,干预组加入叶酸和维生素 B12 后,B1 序列甲基化程度较高蛋氨酸组有所升高。这可能是因为叶酸是 Hcy 代谢过程中的重要决定因子,可减少 Hcy 的生成;维生素 B12 作为辅助因子可促进叶酸的循环利用,从而进一步减轻 Hcy 产生的损伤效应^[19,20]。不同浓度 Hcy 对 VSMC 全基因组甲基化的影响结果显示,Hcy 引起基因组去甲基化并不呈剂量依赖关系,引起 DNA 甲基化程度变化最明显的是 50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组。这有些出乎预料,但我们发现“VSMC 与不同浓度 Hcy 作用 72 h 后,在 50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组中,VSMC 数量明显增加,而其他 Hcy

浓度组中 VSMC 的数量反而减少^[21]。Hcy 对 VSMC 内 DNA 甲基接受能力和内源性 DNA 甲基转移酶活性影响的分析、DNA 甲基敏感性限制性酶切分析、Hcy 对 VSMC Alu 和 Line-1 甲基化影响的分析”多次相关的重复实验中,皆显示出 50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 对甲基化的影响最显著^[22],提示这一效应并非实验偶然因素所致,但何以无量-效关系,我们尚无合理解释。一个推测是:高 Hcy 可通过多种机制致病,Hcy 浓度在 50 $\mu\text{mol/L}$ 左右时,显示出较明显的对 DNA 甲基化修饰的干扰,浓度进一步升高后,其促进氧化应激、细胞凋亡、炎症等机制可能对细胞造成更严重的伤害,从而掩盖其对 DNA 甲基化修饰的影响。

研究显示,在 As 发生的早期,即未发生疾病症状的时候就存在基因甲基化状态的改变^[23],而 Hcy 能够引起 B1 和 Alu 序列甲基化程度降低,这可能是 Hcy 导致 As 发生发展的重要机制之一,但更深层次的作用机制,仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Findeisen HM, Kahles FK, Bruemmer D. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell function in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2013, 15(4): 319.
- [2] Hsu CY, Sun CY, Lee CC, et al. Global DNA methylation not increased in chronic hemodialysis patients: a case-control study[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(10): 1 195-199.
- [3] Zhang D, Chen Y, Xie X, et al. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(4): 487-496.
- [4] Roy-Engel AM. A tale of an a-tail: The lifeline of a SINE[J]. *Mob Genet Elements*, 2012, 2(6): 282-286.
- [5] Koval AP, Veniaminova NA, Kramerov DA. Additional box B of RNA polymerase III promoter in SINE B1 can be functional[J]. *Gene*, 2011, 487(2): 113-117.
- [6] 巩慧慧,王菊,孙炜炜,等. HHcy 对 ApoE^{-/-}鼠动脉粥样硬化的影响及叶酸、VB12 的干预效应[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21: 4 493-496.
- [7] 姜怡邓,孙炜炜,马长剑,等. LDLR 启动子区 DNA 甲基化调控同型半胱氨酸致平滑肌细胞增殖的作用机制[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32: 245-249.
- [8] 侯建军,贾绍斌,张政军,等. 瑞舒伐他汀对高同型半胱氨酸血症大鼠主动脉组织 Bcl-2 甲基化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(3): 220-224.
- [9] Zhang D, Fang P, Jiang X, et al. Severe hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLR/CBS-deficient mice[J]. *Circ Res*, 2012, 111(1): 37-

- 49.
- [10] 孙颖, 李敏, 王翠英, 等. 非诺贝特对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉组织 CXCL16 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 28(13): 203-207.
- [11] Zhang H, Chen J, Liu X, et al. IL-17 induces expression of vascular cell adhesion molecule through signalling pathway of NF- κ B, but not Akt1 and TAK1 in vascular smooth muscle cells [J]. Scand J Immunol, 2013, 77(4): 230-237.
- [12] Ichiyanagi K. Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements SINEs [J]. Genes Genet Syst, 2013, 88(1): 19-29.
- [13] Cook GW, Konkel MK, Walker JA, et al. A comparison of 100 human genes using an Alu element-based instability model[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65188.
- [14] Sirivanichsuntorn P, Keelawat S, Danuthai K, et al. LINE-1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma[J]. BMC Clin Pathol, 2013, 13: 10.
- [15] Yusuke Ohnishi, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, et al. Active role of small non-coding RNAs derived from SINE/B1 retrotransposon during early mouse development [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 903-909.
- [16] 艾力克木·阿不都玩克, 周晓辉. 高同型半胱氨酸血症与认知功能障碍[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(11): 922-924.
- [17] Ma S, Zhang H, Sun W, et al. Hyperhomocysteinemia induces cardiac injury by up-regulation of p53-dependent Noxa and Bax expression through the p53 DNA methylation in ApoE^{-/-} mice[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(5): 391-400.
- [18] Bressler J, Shimmin LC, Boerwinkle E, et al. Global DNA methylation and risk of subclinical atherosclerosis in young adults: the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study [J]. Atherosclerosis, 2011, 219: 958-962.
- [19] 陈梅玲, 林小慧, 李清华, 等. 动脉粥样硬化性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸水平及亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(9): 733-736.
- [20] Fernández-Roig S, Lai SC, Murphy MM, et al. Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCblR/CD320 knockout mouse [J]. Nutr Metab (Lond), 2012, 18(9): 41.
- [21] 姜怡邓, 马琳娜, 刘学英, 等. S-腺苷同型半胱氨酸水解酶在同型半胱氨酸致平滑肌细胞增殖中作用机制的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(20): 2347-355.
- [22] 姜怡邓, 马琳娜, 韩学波, 等. 基因组 DNA 甲基化在同型半胱氨酸致平滑肌细胞增殖的作用机制研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(7): 751-754.
- [23] 刘艳辉, 危当恒. 动脉粥样硬化的表观遗传学研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 369-374.
- (此文编辑 许雪梅)