

内皮型一氧化氮合酶基因启动子区 DNA 甲基化调控同型半胱氨酸致内皮细胞损伤的机制

姜怡邓, 孙炜炜, 马胜超, 王菊, 巩慧慧, 马长剑

(宁夏医科大学检验学院, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 同型半胱氨酸; 内皮型一氧化氮合酶; DNA 甲基化

[摘要] **目的** 探讨内皮型一氧化氮合酶基因启动子区 DNA 甲基化在同型半胱氨酸致内皮细胞损伤中的作用机制。**方法** 原代培养人脐静脉内皮细胞, 加入 0、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸和 100 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸 + 维生素 B12 + 叶酸的培养液中孵育 72 h。MTT 法检测人脐静脉内皮细胞的增殖活性; 实时定量 PCR 测定内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达; 化学比色法测定内皮型一氧化氮合酶活性; 硝酸还原酶法检测一氧化氮生成量。巢式降落式甲基化特异性 PCR 法检测内皮型一氧化氮合酶基因启动子区 DNA 甲基化改变; 同位素法检测 DNA 甲基化转移酶的活性。**结果** 人脐静脉内皮细胞与不同浓度同型半胱氨酸孵育 72 h 后, 人脐静脉内皮细胞的增殖活性降低, 内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达、内皮型一氧化氮合酶活性和一氧化氮的含量明显下降。内皮型一氧化氮合酶基因启动子序列 DNA 甲基化程度随同型半胱氨酸浓度的升高而增加, 且 DNA 甲基化转移酶活性升高, 而叶酸和维生素 B12 有一定拮抗作用, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。**结论** 同型半胱氨酸可导致内皮型一氧化氮合酶基因启动子区序列高甲基化修饰, 并出现相应的内皮型一氧化氮合酶基因表达下调, 这可能是同型半胱氨酸致内皮细胞损伤的重要机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Mechanism of Endothelial Nitric Oxide Synthase Promoter DNA Methylation in the Impairment of Endothelial Cells Induced by Homocysteine

JIANG Yi-Deng, SUN Wei-Wei, MA Sheng-Chao, WANG Ju, GONG Hui-Hui, and MA Chang-Jian

(Laboratory Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Endothelial Nitric Oxide Synthase; DNA Methylation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) promoter DNA methylation in the damage of endothelial cells induced by homocysteine (Hcy). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured with Hcy at different concentrations (0, 50, 100, 200 and 500 $\mu\text{mol/L}$) and 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + Vitamin B12 + folate respectively for 72 hours. The cell viability of HUVEC was detected by MTT, the mRNA expression of eNOS was analyzed by real-time PCR. The activity of eNOS was analyzed by ELISA, and the production of nitric oxide (NO) was examined by a commercial kit. Nested methylation specific polymerase chain reaction (nMS-PCR) was used for analysis of the methylation pattern in promoter regions of eNOS gene. The DNA methyltransferase activity was measured by isotope method. **Results** The viability of HUVEC exposed to different concentrations of Hcy decreased significantly. The mRNA levels of eNOS, eNOS activity and the NO production were significantly decreased. The methylation levels of eNOS promoter were Hcy-dose dependently increased, and the DNA methyltransferase activity was correlative increased. **Conclusion** Homocysteine can induce DNA hypermethylation of eNOS promoter, and the eNOS gene expression displayed correlative decrease, which may be an important mechanism for homocysteine-mediated endothelial impairment.

[收稿日期] 2012-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30960124 和 81160044); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-10-0916)

[作者简介] 姜怡邓, 博士, 副教授, 主要从事动脉粥样硬化的分子机制研究, E-mail 为 jwcjyd@163.com。孙炜炜, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化的分子机制研究, E-mail 为 swwcan@163.com。马胜超, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化的分子机制研究, E-mail 为 mscuniv@126.com。

高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的独立危险因素^[1], 但迄今为止, 其引起 As 的发病机制并不完全清楚。同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 引起 As 的发病机制曾被认为主要与氧化应激有关^[2,3], Hcy 的自由巯基很容易发生自氧化而产生氧自由基, 造成脂质和内皮细胞的氧化损伤。但半胱氨酸 (cysteine, Cys) 与 Hcy 的分子结构相似, 仅在碳链上少一个甲基, 且其血浆浓度远高于 Hcy, 大约是 Hcy 血浆浓度的 20~30 倍, 但 Cys 并不被认为促进氧化应激和 As^[4]。显然, Hcy 致 As 可能存在其他重要机制。DNA 甲基化修饰是调控基因表达的重要方式, Hcy 参与转甲基代谢的蛋氨酸循环, 而 Cys 则不参与转甲基代谢。因此, Hcy 可能通过调控 As 相关基因的 DNA 甲基化修饰、干扰其表达从而促进 As 的发生发展。内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 生成的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是调控血管功能、抗 As 发生发展的重要内在机制。Hcy 使 NO 系统功能障碍已有广泛的实验证据, 但 Hcy 可否影响 eNOS 基因的甲基化修饰、并进而干扰其表达尚无定论。因此, 本研究利用体外培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 观察不同浓度 Hcy 对 eNOS 基因启动子区 DNA 甲基化状态的影响, 探讨 DNA 甲基化在 Hcy 致内皮细胞 NO 系统损伤中的作用机制, 为阐明 Hcy 在 As 发生中的作用机制提供新的视角。

1 材料与方法

1.1 主要材料

实时荧光定量基因扩增仪 FTC-3000 (Funglyn Biotech 公司); 高速低温离心机 Beckmancomlter AvantiJ-301 (Heraeus 公司) 和 HF160W CO₂ 孵箱 (上海力申科学仪器有限公司); CKX31 相差显微镜 (OLYMPUS 公司); 721 型分光光度计 (惠普上海分析仪器有限公司); Universal Hood II 型凝胶成像系统和酶标仪 680 (Bio-Rad 公司)。胎牛血清 (杭州四季青), 胶原酶 II、胰蛋白酶、Hcy、四甲基偶氮唑蓝盐 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma 公司); 兔抗人 eNOS 多克隆抗体、SABC 免疫组织化学检测试剂盒、DAB 显色试剂盒 (北京中杉生物工程公司); NO 及 eNOS 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); DNA 提取试剂盒 (Promega 公司), DNA 甲基化修饰试剂盒 (Epigentek 公司); RNA 提取试剂 Trizol (Invitro-

gen 公司), 反转录试剂盒和荧光 PCR 试剂盒 (Fermentas 公司), 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

取健康、足月剖腹产胎儿脐带, 用 37℃、无菌 D-Hanks 液冲洗静脉腔数次, 注入 0.1% 胶原酶 II, 适量 D-Hanks 液充满血管消化 15 min。吸出消化液, 注入离心管中, 获得细胞, 加入含 20% 胎牛血清的 M199 培养基, 重悬, 以 2×10^8 /L 接种于培养瓶, 37℃、饱和湿度 5% CO₂ 培养箱中培养, 以后每隔 2~3 天换液一次, 待细胞长满瓶底后, 以 1:2 传代, 选用第 3 代细胞用于实验。将细胞分别置于终浓度为 0 (对照组)、50、100、200、500 μmol/L Hcy 和 100 μmol/L Hcy + 30 μmol/L VitB12 + 30 μmol/L 叶酸 (F+V) 的培养液中孵育 72 h, 以备实验使用。

1.3 MTT 法检测人脐静脉内皮细胞的活性

用 0.25% 胰蛋白酶消化 HUVEC, 用含 10% 胎牛血清的培养液 M199 配成单个细胞悬液 5×10^7 /L, 加入 96 孔培养板, 每孔 200 μL, 培养 5 天后, 吸出培养液, 分别按分组设计加入含 Hcy 的培养液培养 72 h 后, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL, 37℃ 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值 (A), 记录结果, 细胞增殖活性 = $[1 - (\text{空白组 A 值} - \text{试验组 A 值}) / \text{空白组 A 值}] \times 100\%$ 。

1.4 DNA 甲基转移酶活性测定^[5]

2×10^6 HUVEC 裂解, 取 5 μg 细胞裂解蛋白与 0.5 μg poly[d(I-C)d(I-C)] 及 3 μg Ci³H-SAM 置于 1.5 mL 离心管中 (总体积 20 μL), 混匀, 37℃ 水浴 120 min。加入 300 μL 反应终止液, 37℃ 水浴 30 min。酚 (pH8.0) 抽提乙醇沉淀 poly[d(I-C)d(I-C)], 加入 40 μL 0.3 mmol/L NaOH 37℃ 水浴 60 min。将上述液体点在 WhatmanGF/C 滤纸上, 80℃ 烘干 5 min, 用冷 50 g/L 三氯醋酸洗 3 次, 冷无水乙醇洗 2 次, 80℃ 烘干 5 min。置于 5 mL 二甲苯闪烁液中测定液闪活性, 计每分 cpm 值。以样本每分计数值比阳性对照每分计数值表示 DNA 甲基转移酶相对活性。

1.5 荧光定量 PCR 法测定内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达

在 NCBI GeneBank 数据库中查询 eNOS (NM_001160110.1), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物: eNOS 的引物为上游 5'-ACACTTCTTGACCCTC-CACCC-3', 下游 5'-CCCCAGCATCCCTACTCCCA-3', 扩增产物长度为 162 bp。GAPDH 引物为上游 5'-

GAGCTGAACGGGAAACTCAC-3', 下游 5'-GGTCTGGGATGGAACTGTG-3', 扩增产物长度为 146 bp, 探针: 5'-6-FAM-ACGCCGCCACGGCCTCTTTCA-TAMRA-3'。收集各组细胞, 用 Trizol 抽提总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 用以下条件进行 PCR: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 扩增 35 个循环。实验结果根据如下公式计算: 目的基因的相对量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI}(\text{待测样品}) - Ct_{GAPDH}(\text{待测样品})] - [Ct_{GI}(\text{校正样品}) - Ct_{GAPDH}(\text{校正样品})]$ 。GI 为目的基因, 校正样品为任何被选做代表 1 倍目的基因表达量的样品。

1.6 内皮型一氧化氮合酶活性及一氧化氮浓度测定

将细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞长满时, 将培养细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用生理盐水悬浮细胞, 反复冻融 3 次破碎细胞。运用化学比色法测定细胞内 eNOS 活性, 具体操作按试剂盒说明书进行。NO 浓度按 NO 试剂盒(硝酸还原酶法)说明书测定。

1.7 内皮型一氧化氮合酶启动子区 DNA 甲基化的检测

按 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA, 用亚硫酸盐修饰法对 DNA 进行处理。实验采用巢式降落式甲基化特异性 PCR (nMS-PCR)。采用网上在线 (<http://www.urogene.org/methprimer/>) 设计引物, eNOS 外引物上游为 5'-AGG AGGTT-TAGAGAAAGAGTTGTT-3', 下游为 5'-TTATAAAC-CTAATCCTTCCCCTACC-3', 产物长度为 250 bp, PCR 条件为 30 个循环(94℃30 s, 65℃30 s, 72℃1 min)。甲基化上游为 5'-ATTTAGAGATTATGGAGAAGGG-GAC-3', 下游为 5'-TATTATCTTTCTCAAACATTACC-CG-3'; 非甲基化上游为 5'-ATTTAGAGATTATG-GAGAAGGGGAT-3', 下游为 5'-ATTATCTTTCT-CAAACATTACCCACA-3'。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后采用降落式 PCR 程序, 30 个循环(94℃30 s, 62℃30 s, 72℃1 min), 再于恒定的退火温度下进行 20 个循环(94℃30 s, 47℃30 s, 72℃1 min), 最后 72℃再延伸 10 min。甲基化产物为 147 bp, 非甲基化产物为 146 bp, 反应后取终产物 4 μL 在 2% 琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 30 min, 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 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。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 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞增殖活性的影响

Hcy 干预 HUVEC 培养 72 h 后, HUVEC 数量减少, 与对照组比较, 100、200、500 μmol/L Hcy 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 其中 500 μmol/L Hcy 组最明显, 而 VitB12 + 叶酸干预组中 HUVEC 增殖活性较 100 ~ 500 μmol/L Hcy 组增加 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. Hcy 对 HUVEC 增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of Hcy on the proliferation of HUVEC

分 组	增殖活性
对照组	100
50 μmol/L Hcy 组	87.8 ± 17.0
100 μmol/L Hcy 组	70.2 ± 12.8 ^a
200 μmol/L Hcy 组	60.3 ± 12.4 ^b
500 μmol/L Hcy 组	50.8 ± 11.5 ^b
VitB12 + 叶酸干预组	80.8 ± 11.4 ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 100 ~ 500 μmol/L Hcy 组比较。

2.2 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞 DNA 甲基转移酶活性的影响

DNA 甲基转移酶活性随 Hcy 浓度的增加而增加, 其中 50、100、200、500 μmol/L Hcy 组中 DNA 甲基转移酶的活性分别是对照组的 1.11、1.40、1.51、1.61 倍 ($P < 0.05$), 叶酸和 VitB12 干预后, DNA 甲基转移酶活性较 100、200、500 μmol/L Hcy 组分别减少了 12.25%、18.63% 和 23.73% (表 2)。

表 2. Hcy 对 HUVEC DNA 甲基转移酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effect of Hcy on HUVEC DNA methyltransferase activity

分 组	DNA 甲基转移酶活性 (cpm)
对照组	5628.0 ± 208.0
50 μmol/L Hcy 组	6251.0 ± 422.0 ^a
100 μmol/L Hcy 组	7892.0 ± 448.0 ^b
200 μmol/L Hcy 组	8510.0 ± 562.0 ^b
500 μmol/L Hcy 组	9079.0 ± 189.0 ^b
VitB12 + 叶酸干预组	6925.0 ± 562.0 ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 100 ~ 500 μmol/L Hcy 组比较。

2.3 同型半胱氨酸对 eNOS mRNA 表达、eNOS 活性及一氧化氮含量的影响

HUVEC 与不同浓度 Hcy 作用 72 h 后,各 Hcy 处理组的细胞内 eNOS 活性与对照组比较分别降低了 19.36%、28.18%、28.19%、40.24% ($P < 0.05$),

叶酸和 VitB12 干预后, eNOS 活性较 100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组分别增加了 3.47%、3.49%、19.68%。各组细胞 eNOS mRNA 的表达量(图 1)、eNOS 活性与 NO 含量的变化一致(表 3)。

表 3. Hcy 对 HUVEC 中 eNOS mRNA 表达、eNOS 活性和 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The effects of Hcy on mRNA and activity of HUVEC eNOS and the contents of NO

分 组	eNOS mRNA	eNOS 活性(kU/L)	NO 含量(nmol/L)
对照组	16.40 \pm 1.13	7.630 \pm 0.148	0.757 \pm 0.012
50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	11.73 \pm 0.76	6.153 \pm 0.190 ^a	0.678 \pm 0.024 ^a
100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	10.85 \pm 2.93	5.480 \pm 0.295 ^a	0.662 \pm 0.025 ^a
200 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	8.57 \pm 2.33 ^a	5.479 \pm 0.149 ^b	0.533 \pm 0.028 ^b
500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	6.69 \pm 0.73 ^b	4.560 \pm 0.423 ^b	0.480 \pm 0.030 ^b
VitB12 + 叶酸干预组	9.74 \pm 1.39	5.677 \pm 0.161	0.666 \pm 0.024

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

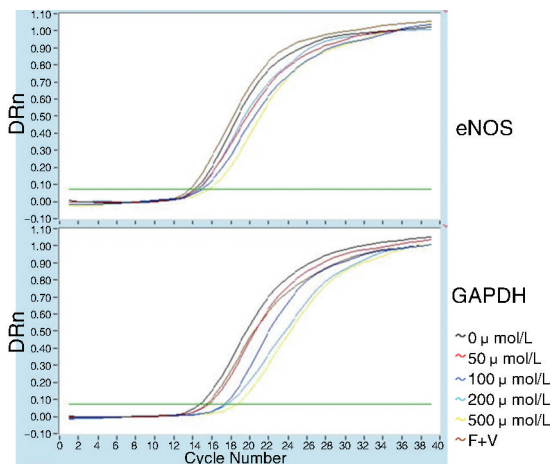


图 1. Real-time PCR 检测 HUVEC 中 eNOS mRNA 的表达

Figure 1. mRNA expression of eNOS in HUVEC detected by real-time PCR

2.4 同型半胱氨酸对内皮型一氧化氮合酶 DNA 甲基化修饰状态的影响

nMS-PCR 法检测 eNOS 启动子区 DNA 甲基化结果表明,各 Hcy 浓度组的 eNOS DNA 甲基化程度随 Hcy 浓度的增高而增高,其中 50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 DNA 甲基化程度分别比对照组增加了 9.22%、21.41%、28.93%、23.87% ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。叶酸和 VitB12 干预后, eNOS DNA 甲基化程度较 100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组分别减少了 3.62%、12.84%、6.63% (图 2 和表 4)。

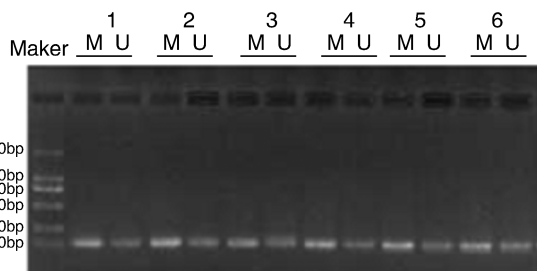


图 2. nMS-PCR 法检测 HUVEC 中 eNOS 基因甲基化修饰状态 M 为甲基化, U 为非甲基化; 1 ~ 5 依次为 0、50、100、200 和 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组, 6 为 VitB12 + 叶酸干预组。

Figure 2. The eNOS gene methylation status in HUVEC analyzed by nMS-PCR

表 4. Hcy 对 HUVEC 中 eNOS 基因甲基化修饰状态的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4. Effect of Hcy on the eNOS gene methylation status ($\bar{x} \pm s$)

分 组	eNOS DNA 甲基化程度
对照组	46.28% \pm 7.99%
50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	50.98% \pm 9.54% ^a
100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	58.89% \pm 8.00% ^a
200 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	65.12% \pm 10.55% ^b
500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组	60.79% \pm 12.35% ^b
VitB12 + 叶酸干预组	56.76% \pm 9.90% ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组比较。

3 讨论

As 所致的心脑血管疾病是一种严重危害人类身体健康的常见病、多发病^[6]。HHcy 已被公认为致 As 的一个主要独立危险因素,其致 As 的主要机制包括:促进氧化应激、凋亡、炎症,干扰 NO 系统的功能等^[7]。在 As 形成过程中,内皮细胞损伤是 As 形成的始动机制,因此,研究内皮细胞功能的改变及其机制,是阐明 As 形成分子机制的重要环节。

有研究发现,HHcy 时,Hcy 长期作用于内皮细胞使 eNOS 受损,eNOS 基因表达减少,NO 降解加速,使得保护机制丧失,其中心致病机制可能主要与 Hcy 引起的氧化应激和游离自由基生成增多相关^[8]。该研究结果显示随着 Hcy 浓度的增加,HUVEC 增殖活性下降,可能与 Hcy 引起的氧化应激有关。叶酸是 Hcy 代谢过程中的重要决定因子,可减少 Hcy 的生成;VitB12 作为辅助因子可促进叶酸的循环利用^[9]。研究发现,干预组加入叶酸和 VitB12 后,HUVEC 增殖活性升高,表明叶酸和 VitB12 可减轻 Hcy 的损伤作用。

Hcy 是一种含硫氨基酸,在体内的代谢包括再甲基化和转硫作用两条途径。在再甲基化途径中,Hcy 通过干扰甲硫氨酸循环而引起基因位点的甲基化异常^[10,11],DNA 甲基化是表观遗传学修饰的方式之一,基因启动子区的高甲基化可影响转录激活因子和其识别序列的结合,直接抑制基因表达,而去甲基化则可表现出基因的活跃^[12]。该实验采用 nMS-PCR 法^[13]检测内皮细胞 eNOS 基因启动子区 DNA 呈高甲基化改变并随着 Hcy 浓度的升高甲基化程度增加,且 eNOS mRNA 表达降低,eNOS 活性和 NO 生成相应下降。这可能是由于随 Hcy 浓度升高,加速了甲硫氨酸循环,DNA 甲基转移酶活性同步增加,在 DNA 甲基转移酶的作用下,-CH₂-基团被转移至 eNOS 基因,引起 eNOS 基因启动子区甲基化,从而抑制了 eNOS 的表达,下调 NO 的生成,进而导致内皮细胞的损伤。DNA 甲基转移酶是 DNA 甲基化修饰调控的关键酶,实验结果显示 DNA 甲基转移酶活性随 Hcy 浓度的增加而增加,与 eNOS 基因启动子区出现高甲基化相一致。

综上所述,eNOS 基因启动子区高甲基化可能

是 Hcy 致内皮细胞损伤的重要机制之一,深入探讨上述问题将有助于阐明 Hcy 在 As 发生中的作用机制,为预防和治疗 As 提供更加深入的认识。

[参考文献]

- [1] Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR, et al. L-Homocysteine and L-homocysteine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36 (5): 632-640.
- [2] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98 (1): 5-7.
- [3] Fryer RH, Wilson BD, Gubler rDB, et al. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13 (9): 1 327-333.
- [4] Tawakol A, Omalnd T, Gerhard M, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans [J]. *Circulation*, 1997, 95: 1 119-121.
- [5] Yideng J, Zhihong L, Jiantuan X, et al. Homocysteine-mediated PPARalpha, gamma DNA methylation and its potential pathogenic mechanism in monocytes [J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27 (3): 143-150.
- [6] Klein L, Gheorghiad M. Coronary artery disease and prevention of heart failure [J]. *Med Clin North Am*, 2004, 88 (5): 1 209-235.
- [7] 张敬各,王丽珍,韩晓群,等. 同型半胱氨酸对内皮细胞一氧化氮合酶系统的损伤机制及叶酸的拮抗效应 [J]. *分子细胞生物学报*, 2007, 40 (1): 17-23.
- [8] Anna Portela, Manel Esteller. Epigenetic modifications and human disease [J]. *Nature Biotechnolog*, 2010, 28 (10): 1 057-068.
- [9] Malinow MR, Duell PB, Hess DL, et al. Reduction of plasma homocysteine level by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease [J]. *New Eng J Med*, 1998, 338: 1 009-015.
- [10] Castro R, Rivera I, Struys EA, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease [J]. *Clin Chem*, 2003, 49 (8): 1 292-296.
- [11] Stabler SP, Allen RH, Dolce ET, et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamindeficient elderly and response to treatment [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84 (6): 1 422-429.
- [12] 关 丽,贾光宏,邵菊芳. 同型半胱氨酸促血管平滑肌细胞增殖的机制 [J]. *中国心血管杂志*, 2002, 7 (3): 161-162.
- [13] Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores [J]. *Nat Genet*, 2009, 41 (2): 178-186.

(此文编辑 许雪梅)