

冠心病的DNA甲基化研究

叶华丹 洪青晓 汤琳琳 周安楠 蒋丹捷 李奕润 戴东君 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 作为心血管疾病的主要组成, 冠心病已成为西方国家人民死亡的主要原因之一。冠心病是由多种因素所导致的复杂疾病, 它的环境致病因素主要有缺氧、子宫环境改变、吸烟、环境污染和不良饮食等。这些体外和体内环境的改变会导致表观遗传修饰的改变, 如DNA甲基化水平的变化, 并进一步影响基因功能, 增加冠心病患病风险。目前, 冠心病的DNA甲基化研究主要集中在与雌激素受体、免疫、脂质代谢、氧化应激、凝血以及9p21区域等的相关基因。该文针对最新的研究进展, 系统地阐述了DNA甲基化修饰在冠心病中的作用。

关键词 冠心病; 表观遗传学; DNA甲基化; 环境; 基因调控

DNA Methylation in Coronary Heart Disease

Ye Huadan, Hong Qingxiao, Tang Linlin, Zhou Annan, Jiang Danjie, Li Yirun, Dai Dongjun, Duan Shiwei*

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

Abstract Coronary heart disease (CHD) is a type of cardiovascular disease that has become a major cause of human deaths in the western countries. CHD is a complex disease driven by the interaction of many factors from both environment and genetics. The environmental factors contributing to CHD include hypoxia, alteration of pre-natal environment, smoking, environmental pollution and unhealthy lifestyle diet. The *in vivo* and *in vitro* changes of environmental factors can lead to the alteration of epigenetic modification such as DNA methylation. Aberrant DNA methylation levels can influence the expression of genes and contribute to the risk of CHD. Current researches of DNA methylation mainly focus on genes related with estrogen receptor, immune, lipid metabolism, oxidative stress, blood coagulation and 9p21 genes. Our review summarized the contribution of DNA methylation to the risk of CHD based on the latest progress of DNA methylation research.

Key words coronary heart disease; epigenetics; DNA methylation; environment; gene regulation

1 冠心病的危害性

心血管疾病已成为西方国家人民死亡的主要原因之一^[1], 而且近年来其年发病率和死亡率呈逐渐上

升趋势。冠心病作为心血管疾病的主要类型, 主要是由于脂质代谢异常, 导致血脂在原本光滑的动脉内膜上堆积成类似粥样化的白色斑块, 而这些斑块逐

收稿日期: 2014-03-29 接受日期: 2014-06-09

国家自然科学基金(批准号: 31100919、81371469)、浙江自然科学基金杰出青年(批准号: LR13H020003)、宁波市科技局/农业与社会发展攻关项目(批准号: 2012C50032)、宁波市自然科学基金(批准号: 2007A610077、200701A6304004)、宁波大学重点学科项目(批准号: XKL11D2117)和宁波大学王宽诚幸福基金资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87609950, E-mail: duanshiwei@nbu.edu.cn

Received: March 29, 2014 Accepted: June 9, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100919, 81371469), Natural Science Foundation of Zhejiang Excellent Youth (Grant No.LR13H020003), Ningbo Administration of Science and Technology/Agriculture and Society Development Research Projects (Grant No.2012C50032), Natural Science Foundation of Ningbo (Grant No.2007A610077, 200701A6304004), Key Disciplines Projects of Ningbo University (Grant No.XKL11D2117) and K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609950, E-mail: duanshiwei@nbu.edu.cn

网络出版时间: 2014-09-23 14:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0102.html>

渐积累可造成血管狭窄以及堵塞、限制或完全中断心肌供血, 从而引起一系列严重的心肌缺血病症^[2]。

冠心病多发于45岁以上的中老年人, 但近年来随着人们不良生活习惯的形成, 在小于40岁人群中冠心病的发生率呈现快速增长的趋势^[3]。2012年的流行病学统计调查显示, 我国城市居民心脑血管疾病的病死率由1990年的36.6%上升到2011年的41.5%。随着中国人口老龄化的加剧, 有数据预测从2000年到2029年, 中国冠心病死亡人数将达到2 000万人, 同时可导致高达1 600万人丧失劳动力^[4]。冠心病也给社会带来极大的经济负担, 在美国, 冠心病所带来的经济损失将从1 720亿美元(2010年)增长到2 760亿美元(2030年)。而中国统计数据表明, 仅在2011年中国的心脑血管病住院治疗所花费的费用就高达414.5亿元^[5]。

2 国内外冠心病相关的DNA甲基化研究概况

得益于近年来新型生物技术的应用, 表观遗传学研究得到了快速的发展。表观遗传修饰包括组蛋白修饰、染色质构象变化、DNA甲基化和microRNA表达等方面, 其中DNA甲基化是现阶段研究比较多的一个方向。DNA甲基化主要是在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用下, 以

S腺苷甲硫氨酸(DNA methyltransferases, SAM)为甲基供体, 将活化的甲基引入胞嘧啶的第五位碳原子上, 在不改变DNA碱基序列的基础上使得DNA修饰发生变化来调控基因的表达^[6]。哺乳动物的DNA甲基化多发生在CpG双核苷酸上, 启动子区域高甲基化会导致基因低表达^[7]。目前, 有超过20多万篇关于冠心病的科研文献, 这些文献涉及超过3 000个基因, DNA甲基化研究虽然逐年增多, 但是关于冠心病的DNA甲基化研究不超过100篇^[8]。

2.1 环境因素对DNA甲基化的影响

目前, 有关冠心病发病机制的假说涉及遗传、营养和生活习惯等诸多因素^[9]。但是冠心病的具体发病机制还不是十分清楚。冠心病的主要致病环境因素包括缺氧^[10-11]、子宫环境、吸烟^[12-15]、环境污染^[16]和饮食^[17-19]等(图1)。冠心病相关致病环境因素的改变极有可能会引起人体内基因的表达遗传学变化, 从而使基因功能发生紊乱, 最终诱发冠心病。

缺氧是冠心病风险增加的重要原因之一。机体对氧的敏感性与体内稳态及疾病发生都有着一定的相关性, 缺氧可引起相关的表观遗传修饰改变及一系列病理现象^[20]。长时间缺氧可引起心肌纤维细胞中的表观遗传修饰, 影响相关基因的表达。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甲基化转移酶(DNMTs)的表达也增

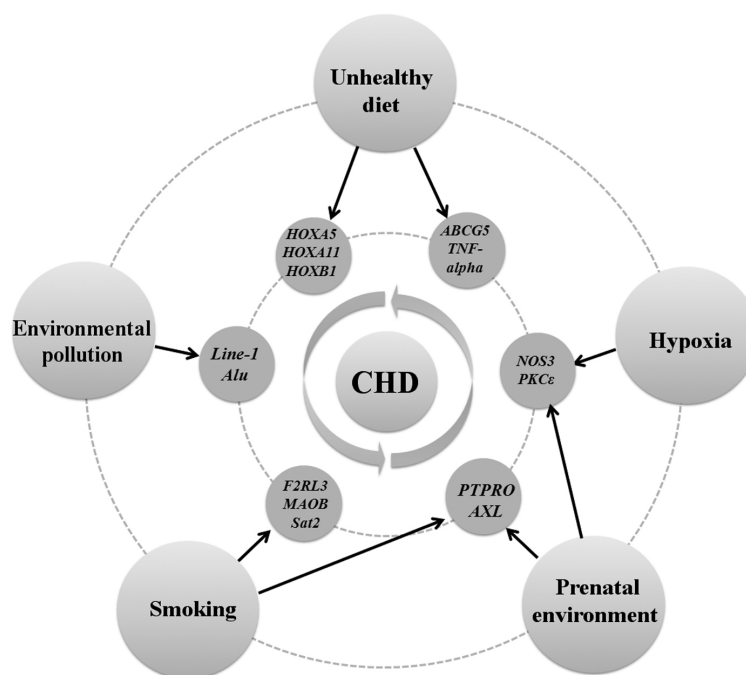


图1 冠心病环境因素相关基因

Fig.1 Genes of environmental risk factors of CHD

加, 这些与低氧诱导因子(HIF-1 α)的调节有关。缺血性心脏病中的DNMTs表达上调, 为开辟冠心病提供了新的治疗方向^[21]。

有证据表明, 缺氧造成胎儿宫内生长发育受限, 伴随着脐动脉内NOS3启动子区域甲基化程度的增加, 脐静脉内甲基化程度会降低^[10]。缺氧还会使胎儿心脏中PKC ϵ 基因表达抑制, 增加心脏缺血性损伤。研究发现男性胎儿缺氧导致心脏中Egr-1的结合位点PKC ϵ 启动子区域CpG位点甲基化程度增加^[11]。更有研究表明, 二手烟会影响孕期母体的子宫内环境, 导致婴儿出生后其AXL及PTPRO基因的DNA甲基化水平会明显增加, 而且长重复序列(Sat2)的甲基化水平也会随着子宫内环境的变化发生相应的改变^[12,14]。另外, 成人吸烟能够导致MAOB基因启动子甲基化水平发生变化^[15], 继而可能会增加冠心病发病的风险。F2RL3甲基化水平改变与吸烟行为相关, 并且是导致冠心病患者死亡的一个重要的风险因素^[13]。空气中的微粒污染可导致人体内Line-1及Alu重复元件甲基化水平发生改变, 这可能是环境污染诱发冠心病的原因之一^[16]。饮食改变也与DNA甲基化相关, 当石蟹猴的富含大豆蛋白的高脂肪饮食改为富含酪氨酸的高脂肪饮食时, 肝脏和肌肉组织中的基因甲基化水平会明显增高, 主要包括同源盒基因(HOXA5、HOXA11和HOXB1)和ABCG5基因^[17]。此外, 母亲肥胖或者孕期高脂肪饮食可导致子代体重过高, 并增加成年患冠心病的风险^[18]。饮食干预有可能改变基因的甲基化水平, 有研究表明在通过低卡路里摄入而减肥的女性中, Leptin和TNF- α 启动子DNA甲基化水平有显著的逆向修饰现象^[19]。

2.2 冠心病相关基因的DNA甲基化研究

目前, 有少数研究已证实相关基因的甲基化水平改变与冠心病发生发展相关。在新加坡华人中的研究表明, 总体DNA甲基化水平的升高与冠心病密切相关^[19]。印度人群的冠心病患者和正常健康人的总体DNA甲基化水平进行比较后发现, 冠心病患者的总体DNA甲基化程度要明显高于健康对照组, 而且冠心病患者血清中的同型半胱氨酸水平明显高于对照组^[22]。在白人种群中肝脏总体高水平的DNA甲基化是患冠心病风险的一个重要因素, 而在黑人种群中却没有这一发现^[23]。MTHFR C677T的单核苷酸多态性影响DNA甲基化水平, 而且总体DNA甲基

化水平与血浆中叶酸水平呈负相关^[24]。在叶酸和维生素B的摄入量低的情况下, 一碳代谢和同型半胱氨酸通路基因(男性中发现的三个基因区域分别是TCN2启动子区域、CBS 5'-非编码区和AMT基因内部以及在女性中发现的PON1基因内部和CBS 5'-非编码区)的DNA甲基化水平升高, 它们相应表达产物的降低会影响心血管疾病的患病风险^[25]。

冠心病发病风险除了与外周血以及肝脏中的总体DNA甲基化水平升高相关外, 某些特定基因的DNA甲基化变化也与冠心病的发生发展相关(表1)。这些基因包括雌激素相关基因(ESR1和ESR2)、免疫相关基因(FOXP3、PLA2G7、MMP-9、NFKB1和GATA3)、脂质相关基因(ABCA1、KLF2和LRP1)、氧化应激相关基因(EC-SOD、GSTP1、BNIP3和p66shc)、凝血相关基因(TM、F7和P2Y12)、9p21基因(p14^{ARF}、BAX、BCL-2、TIMP3、p15INK4b和p16INK4a)、血管生成相关基因(FGF2和TGFB3)以及具有其他功能的基因(CIQL4、CCDC47和GCK)。

2.2.1 雌激素受体基因 雌激素受体基因(estrogen receptor, ESR)编码蛋白是核受体家族的成员, 包括雌激素受体1(ESR1)和雌激素受体2(ESR2)。研究表明, 女性在绝经之前患冠心病的概率是男性患病率的10%, 而绝经之后患冠心病率几乎和男性相同^[26]。雌激素水平降低会导致血管内皮功能受损, 这一变化可导致冠状动脉粥样硬化^[27]。雌激素可以对心血管系统起到保护作用^[28]。ESR1基因的DNA甲基化和冠心病之间的研究表明, 在外周血中冠心病病例组的ESR1基因的DNA甲基化水平明显高于健康对照组^[29]。在动脉粥样硬化和老化血管系统发现, DNA甲基化水平的升高会导致ESR1基因失活, 这也说明ESR1基因DNA高甲基化水平会增加患冠心病的风险^[27]。另外, 当DNA甲基化转移酶被抑制时, 血管细胞株的ESR2基因表达非常活跃, 而且ESR2的DNA甲基化水平增加能够加速动脉粥样硬化和血管老化^[30]。

2.2.2 免疫反应相关基因 免疫因素在冠心病发展进程上起着重要作用。在冠状动脉粥样硬化过程中, 免疫反应与斑块稳定性密切相关^[31]。炎症相关基因(NFKB1和GATA3)已被证实与冠心病的发生发展密切相关, NFKB1和GATA3的表观遗传学修饰改变可调节相关的炎症反应^[32]。但是目前在冠心病中没有这两个基因相关的DNA甲基化研究。

表1 冠心病相关基因DNA甲基化的相关研究

Table 1 Researches of DNA methylation with CHD related genes

| 基因组别 Gene group | DNA甲基化变化 Changes of DNA methylation | 基因表达 Gene expression | |
|---------------------------------|--|-------------------------|----|
| Estrogen receptor genes | <i>ESR1</i> + | Down regulation | |
| | <i>ESR2</i> + | Down regulation | |
| Immune related genes | <i>FOXP3</i> + | Down regulation | |
| | <i>PLA2G7</i> | NA | |
| | <i>MMP-9</i> - | Up regulation | |
| | <i>NFKB1</i> | NA | |
| | <i>GATA3</i> | NA | |
| Lipid related genes | <i>ABCA1</i> + | Down regulation | |
| | <i>KLF2</i> + | Down regulation | |
| | <i>LRP1</i> - | Up regulation | |
| Oxidative stress related genes | <i>EC-SOD</i> + | Down regulation | |
| | <i>GSTP1</i> + | Down regulation | |
| | <i>BNIP3</i> - | Up regulation | |
| | <i>p66shc</i> + | Down regulation | |
| Blood coagulation related genes | <i>TM</i> + | Down regulation | |
| | <i>F7</i> | NA | |
| | <i>P2Y12</i> | NA | |
| | <i>p14^{ARF}</i> | NA | |
| 9p21 genes | <i>BAX</i> | NA | |
| | <i>BCL-2</i> | NA | |
| | <i>TIMP3</i> | NA | |
| | <i>p15INK4b</i> + | Down regulation | |
| | <i>p16INK4a</i> + | NA | |
| | Angiogenesis related genes | <i>FGF2</i> | NA |
| | | <i>TGFBR3</i> | NA |
| Other genes | | <i>CIQL4</i> | NA |
| | <i>CCDC47</i> | NA | |
| | <i>GCK</i> | NA | |

“+”表示DNA甲基化水平上升;“-”表示DNA甲基化水平下降; NA表示没有表达数据。

“+” indicates increased DNA methylation level;“-” indicates decreased DNA methylation level; NA indicates no expression data.

在冠状动脉粥样硬化疾病中, 调节T(T regulatory, Treg)细胞与保护斑块破裂密切相关, 但是目前对于Treg保护斑块破裂的具体机制仍不清楚^[33]。有研究指出, *FOXP3*的表观遗传学修饰可以作为识别T细胞Treg表型的一个标记^[34]。DNA甲基化水平升高会抑制*FOXP3*表达, 这可能会减少Treg细胞产生, 从而降低患冠心病的风险^[35]。相反, *FOXP3*去甲基化可以抑制冠心病中Treg细胞的活性, 继而增加患冠心病的风险^[36]。

血小板激活因子乙酰水解酶(phospholipase A2, group VII; *PLA2G7*)基因编码的分泌酶能够催化降解血小板活性因子, *PLA2G7*基因对冠心病发生发展风险上的贡献可能与在炎症水平上的调节功能相

关, 而且在病变冠脉中发现有大量*PLA2G7*的表达产物^[37]。已有研究证明, *PLA2G7*启动子区域DNA甲基化水平变化与冠心病的发生发展相关联, 并发现女性中*PLA2G7*甲基化水平明显高于男性, 而且在女性冠心病样本中出现年龄增大伴随甲基化水平升高的现象, 而这在男性冠心病样本中正好表现相反, 这个看似矛盾的结果有可能是由于男性中存在较多的比如吸烟等等其他危险暴露因子所致。此外, 女性冠心病样本的DNA甲基化程度分别与总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)和载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)存在正相关^[38]。

金属蛋白酶基因(matrix metalloproteinase, MMP)家族蛋白参与正常生理过程中细胞外基质的分解,

比如胚胎的发生和发育以及组织的重生。*MMP-9*是冠心病相关的一种重要炎症基因,其表达蛋白是判定冠心病的一种重要标准^[39]。有研究显示,*MMP-9*启动子区域甲基化水平降低会导致患者血浆*MMP-9*浓度的升高^[40]。

2.2.3 血脂相关基因 冠心病的发生发展与脂类水平的变化相关,虽然冠心病与相关脂类基因之间有很多关于单核苷多态性的研究^[41-42],但是关于冠心病与脂类基因DNA甲基化之间的研究并不多。三磷酸腺苷结合盒转运子A1基因(ATP-binding cassette transporter A1, *ABCA1*)编码的蛋白在胆固醇和脂肪清除通路中发挥着重要作用,*ABCA1*基因启动子区域DNA甲基化水平的升高导致不同个体之间的血浆中高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)的浓度产生差异^[43],而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的浓度改变与冠心病的发生发展密切相关^[44]。

低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)能够诱发内皮功能障碍,是冠心病主要危险因素,而且低密度脂蛋白能够改变内皮细胞DNA甲基化转移酶1的表达和DNA甲基化转移酶的活性。内皮*KLF2*基因是一个维持血管内稳态的重要转录因子^[45]。而Kumar等^[45]研究发现,低密度脂蛋白通过*KLF2*基因的DNA甲基化和组蛋白甲基化能够限制内皮*KLF2*的表达。

低密度脂蛋白受体相关蛋白1基因(low-density-lipoprotein receptor-related protein 1, *LRP1*)编码的产物在细胞内信号转导、脂质稳态和凋亡细胞的清除等细胞过程中都起内吞作用。人血管平滑肌细胞中*LRP1*基因的DNA甲基化水平降低能够使该基因的表达增加^[46]。而在冠心病血管病变中*LRP1*基因的表达产物对病变斑块的产生和堆积起着重要的作用^[47]。

2.2.4 氧化应激相关基因 有许多研究已证明,冠心病的发生与氧化应激相关^[48-49]。细胞外超氧歧化酶(extracellular superoxide dismutase, *EC-SOD*)在保护动脉粥样化、高血压、心力衰竭和糖尿病等方面具有重要的作用^[50],*EC-SOD*的缺乏容易导致心肌损伤的增加、心肌纤维化以及心脏功能的丧失^[51]。谷胱甘肽S转移酶(glutathione-S-transferase P1, *GSTP1*)具有抗凋亡和抗炎效应,是心力衰竭患者诊断的血清标志物。研究表明心肌梗死早期,*GSTP1*可以影响心肌细胞的结构和功能,防止患者向心力衰竭的

方向发展^[52]。*BCL2/E1B*腺病毒互作蛋白3(*BCL2/E1B adenovirus interacting protein 3*, *BNIP3*)的表达会显著增强心力衰竭的症状^[53]。*EC-SOD*和*GSTP1*基因DNA高甲基化以及*BNIP3*基因DNA低甲基化影响氧化应激反应使冠心病具有易感性^[54]。

*p66shc*表达的蛋白有促进氧化应激的作用^[55],*p66shc*衔接蛋白与动脉粥样化的形成相关^[56]。有研究证明,同型半胱氨酸可导致*p66shc*启动子区域高甲基化,这一机制在同型半胱氨酸诱导内皮细胞功能障碍中有重要的作用,继而有可能诱发冠心病的发生^[57]。

2.2.5 凝血相关基因 血浆血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)普遍存在于血管内皮细胞表面,其表达产物与凝血酶结合后借抗凝因子蛋白C的活化来发挥抗凝作用,与动脉粥样硬化中的抗凝/纤溶系统失衡相关。有研究发现,冠心病病例组的TM基因启动子甲基化水平明显高于健康对照组。由于病例组TM基因启动子区的高甲基化状态可以抑制TM基因表达,使其失去对抗损伤内皮引起的脉粥样硬化作用,从而产生促动脉粥样硬化^[58]。

凝血因子VII(F7)的浓度高低是判断冠心病患病风险的一个标志物,在血管内膜血栓形成以前,凝血异常可能导致血栓的形成和延伸,这在冠心病的发生发展中起着重要的作用^[59]。Friso等^[60]研究发现,*F7*基因DNA甲基化水平的变化与血清中凝血因子VII的浓度呈负相关关系,并且只有*F7*基因在多态性位点-402G>A的A1A1状态下的DNA甲基化水平升高才与冠心病相关。

*P2Y12*基因编码蛋白是血小板表面的二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)受体蛋白,它参与血小板的聚集,是治疗凝血障碍的潜在目标。氯吡格雷能够选择性地与血小板表面腺苷酸环化酶偶联的ADP受体结合而抑制血小板聚集。*P2Y12*基因启动子低甲基化可增加氯吡格雷耐药性,这表明*P2Y12*基因启动子低甲基化可提高冠心病的患病风险^[61]。

2.2.6 染色体9p21相关基因 染色体9p21上的基因已被证实与冠心病相关,更有研究表明9p21上的基因与颈动脉斑块、中风、动脉瘤、外周动脉疾病、心脏衰竭等心血管疾病相关,这些证据表明这些基因在心血管疾病形成中扮演重要角色^[62]。同济大学Zhuang等^[63]对*BAX*、*BCL-2*、*TIMP3*、*p14^{ARF}*、*p15^{INK4b}*和*p16^{INK4a}*这6个候选基因进行甲基化研究,结

果发现, $p15^{INK4b}$ 和 $p16^{INK4a}$ 这两个基因的DNA甲基化水平的升高与冠心病的发生发展相关。

2.2.7 血管生成相关基因 氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)可诱导成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, *FGF2*)编码基因的高甲基化修饰, 从而下调基因表达, 并破坏人类冠状动脉内皮细胞, 最终导致动脉粥样化形成而增加冠心病风险^[64]。转化生长因子3受体(transforming growth factor beta receptor 3, *TGFBR3*)基因属于转化生长因子受体超家族成员, 对冠脉血管的发展有重要作用^[65]。最新的全基因组DNA甲基化水平研究发现, 在冠心病人中*TGFBR3*基因下游区域甲基化水平显著升高。然而, *TGFBR3*基因下游区域高甲基化修饰是否可致血管生成异常, 继而导致冠心病风险, 这个假设需要进一步的实验证明。

2.2.8 其他基因 最新研究报道了冠心病人的全基因组的DNA甲基化水平, 发现了冠心病中*CIQL4*基因的内含子区域和*CCDC47*基因上游区域中出现显著高甲基化修饰^[66]。此外, 葡萄糖激酶(glucokinase, *GCK*)编码基因是葡萄糖代谢中磷酸化步骤的关键酶^[67], 且*GCK*基因内部的甲基化岛在冠心病组中出现显著低甲基化修饰, 暗示糖代谢异常与心血管疾病关系密切^[68]。

3 总结与展望

DNA甲基化是遗传因素和环境因素进行相互作用的桥梁。人类在母体内所处的早期环境以及后期的生存环境均可影响基因组DNA的甲基化修饰, 进而调控相关基因的表达, 最终影响疾病的发生和发展^[69]。DNA甲基化与冠心病的发生发展密切相关。环境因素可以通过改变DNA甲基化修饰来增加或减少冠心病的发病风险。随着对DNA甲基化研究的深入, 我们对冠心病的相关环境致病因素的发病机理将会有更进一步的了解。DNA甲基化与冠心病之间的研究还不多, DNA甲基化与冠心病发病机制相结合的研究需要进一步加强。尽管如此, DNA甲基化相关的研究和进展, 给冠心病的发病机制带来了新的研究方向, 也为未来在临床上冠心病风险的早期预防和治疗提供新的思路。

参考文献 (References)

1 McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts

- R, Cox DR, *et al.* A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007; 316(5830): 1488-91.
- 2 赵冬. 什么是冠心病的危险因素. 心肺血管病杂志(*Zhao Dong. What is a risk factor for coronary heart disease. Journal of Cardiovascular and Pulmonary Disease*) 2000; 19(1): 73.
- 3 许红. 青年人冠心病危险因素分析及护理对策. 护士进修杂志(*Xu Hong. Coronary heart disease (CHD) risk factors analysis and nursing countermeasures in young. Journal of Nurses Training*) 2007; 22(13): 1203-4.
- 4 Moran A, Zhao D, Gu D, Coxson P, Chen CS, Cheng J, *et al.* The future impact of population growth and aging on coronary heart disease in China: Projections from the coronary heart disease policy model-china. *BMC Public Health* 2008; 8: 394.
- 5 王文, 朱曼璐, 王拥军, 吴兆苏, 高润霖, 孔灵芝, 胡盛寿. 心血管病已成为我国重要的公共卫生问题. 中国循环杂志(*Wang Wen, Zhu Manlu, Wang Yongjun, Wu Zhaosu, Gao Runlin, Kong Lingzhi, Hu Shengshou. Cardiovascular disease has become an important public health problem in China. Chinese Circulation Journal*) 2013; 27(6): 408-12.
- 6 O'Neill J, Senior TJ, Allen K, Huxter JR, Csicsvari J. Reactivation of experience-dependent cell assembly patterns in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2008; 11(2): 209-15.
- 7 Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 2007; 3(10): 2023-36.
- 8 Duan S, Luo X, Dong C. Identification of susceptibility modules for coronary artery disease using a genome wide integrated network analysis. *Gene* 2013; 531(2): 347-54.
- 9 汤琳琳, 刘琼, 步世忠, 徐雷艇, 王钦文, 麦一峰, 段世伟. 2型糖尿病过程中环境因素与DNA甲基化的研究进展. 遗传(*Tang Linlin, Liu Qiong, Bu Shizhong, Xu Leiting, Wang Qinwen, Duan Shiwei. The effect of environmental factors and DNA methylation on type 2 diabetes mellitus. Hereditas*) 2013; 35(10): 1143-52.
- 10 Krause BJ, Costello PM, Munoz-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): 944-52.
- 11 Chen M, Xiong F, Zhang L. Promoter methylation of Egr-1 site contributes to fetal hypoxia-mediated PKCepsilon gene repression in the developing heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 304(9): R683-9.
- 12 Breton CV, Byun HM, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(5): 462-7.
- 13 Breitling LP, Salzmann K, Rothenbacher D, Burwinkel B, Brenner H. Smoking, F2RL3 methylation, and prognosis in stable coronary heart disease. *Eur Heart J* 2012; 33(22): 2841-8.
- 14 Flom JD, Ferris JS, Liao Y, Tehranifar P, Richards CB, Cho YH, *et al.* Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(12): 2518-23.
- 15 Launay JM, Del Pino M, Chironi G, Callebert J, Peoc'h K, Megnien JL, *et al.* Smoking induces long-lasting effects through

- a monoamine-oxidase epigenetic regulation. *PLoS One* 2009; 4(11): e7959.
- 16 Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, *et al.* Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(7): 572-8.
- 17 Howard TD, Ho SM, Zhang L, Chen J, Cui W, Slager R, *et al.* Epigenetic changes with dietary soy in cynomolgus monkeys. *PLoS One* 2011; 6(10): e26791.
- 18 Barnes SK, Ozanne SE. Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 106(1): 323-36.
- 19 Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, *et al.* Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 2011; 67(3): 463-70.
- 20 Prabhakar NR. Sensing hypoxia: Physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol* 2013; 591(Pt 9): 2245-57.
- 21 Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, *et al.* Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Hum Mol Genet* 2014; 23(8): 2176-88.
- 22 Sharma P, Kumar J, Garg G, Kumar A, Patowary A, Karthikeyan G, *et al.* Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients. *DNA Cell Biol* 2008; 27(7): 357-65.
- 23 Bressler J, Shimmin LC, Boerwinkle E, Hixson JE. Global DNA methylation and risk of subclinical atherosclerosis in young adults: the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study. *Atherosclerosis* 2011; 219(2): 958-62.
- 24 Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, *et al.* A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8): 5606-11.
- 25 Fiorito G, Guarrera S, Valle C, Ricceri F, Russo A, Grioni S, *et al.* B-vitamins intake, DNA-methylation of one carbon metabolism and homocysteine pathway genes and myocardial infarction risk: the EPICOR study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24(5): 483-8.
- 26 马娟, 杨帆, 魏经汉, 赵洛沙. 雌激素及血管紧张素转化酶与绝经女性冠心病的相关性研究. *中国循证心血管医学杂志* (Ma Juan, Yang Fan, Wei Jinghan, Zhao Luosha. Influence of estrogen on angiotensin converting enzyme in postmenopausal women. *Chin J Evid Bases Cardiovasc Med*) 2013; 5(2): 165-6.
- 27 Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, *et al.* Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999; 43(4): 985-91.
- 28 Hanke H, Hanke S, Bruck B, Brehme U, Gugel N, Finking G, *et al.* Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996; 121(1): 129-38.
- 29 靳松, 沈干, 胡世莲, 马礼坤, 吴蕾, 陈尹, 徐婷娟. 雌激素受体启动子区甲基化与冠状动脉粥样硬化的关系. *中国老年学杂志* (Jin Song, Shen Gan, Hu Shilian, Ma Likun, Wu Lei, Chen Yin, Xu Tingjun. Association of methylation of the estrogen receptor-A gene with coronary heart disease. *Chinese Journal of Gerontology*) 2011; 4(31): 1102-4.
- 30 Kim J, Kim JY, Song KS, Lee YH, Seo JS, Jelinek J, *et al.* Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and *in-vitro* vascular senescence. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(1): 72-80.
- 31 沈彩云. 冠心病患者脂类代谢及炎症因子与代谢综合征关系探究. *当代医学* (Shen Caiyun. Lipid metabolism and inflammation factors to explore the relationship with the metabolic syndrome in Patients with coronary heart disease. *Contemporary Medicine*) 2012; 18(23): 43.
- 32 Stegger JG, Schmidt EB, Berentzen TL, Tjonneland A, Vogel U, Rimm E, *et al.* Interaction between obesity and the NFKB1-94ins/delATTG promoter polymorphism in relation to incident acute coronary syndrome: A follow up study in three independent cohorts. *PLoS One* 2013; 8(5): e63004.
- 33 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-95.
- 34 Baron U, Floess S, Wiczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, *et al.* DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(9): 2378-89.
- 35 Jia L, Zhu L, Wang JZ, Wang XJ, Chen JZ, Song L, *et al.* Methylation of FOXP3 in regulatory T cells is related to the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2013; 228(2): 346-52.
- 36 Lu C X, Xu R D, Cao M, Wang G, Yan F Q, Shang S S, *et al.* FOXP3 demethylation as a means of identifying quantitative defects in regulatory T cells in acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2013; 229(1): 263-70.
- 37 Serruys PW, Garcia-Garcia HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, *et al.* Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 2008; 118(11): 1172-82.
- 38 Jiang D, Zheng D, Wang L, Huang Y, Liu H, Xu L, *et al.* Elevated PLA2G7 gene promoter methylation as a gender-specific marker of aging increases the risk of coronary heart disease in females. *PLoS One* 2013; 8(3): e59752.
- 39 王永维, 孟晓萍, 韩敏. 基质金属蛋白酶MMP9与各类型冠心病的相关性. *吉林医学* (Wang Yongwei, Meng Xiaoping, Han Min. Correlation of matrix metalloproteinases MMP9 and all types of coronary heart disease. *Jilin Medical Journal*) 2007; 28(11): 1269-71.
- 40 刘振江, 刘启明, 周胜华. 冠心病患者MMP-9基因DNA去甲基化及其异常表达的研究. *中国医药指南* (Liu Zhenjiang, Liu Qiming, Zhou Shenghua. The Effect of DNA Methylation on the gene of metal metalloproteinases -9 and the role of it in the atherosclerosis. *Guide of China Medicine*) 2011; 9(25): 177-9.
- 41 Heidari MM, Foruzannia SK, Khatami M, Hadadzadeh M, Emami Meybodi M. Apolipoprotein e gene polymorphism in Iranian coronary atherosclerosis patients candidate for coronary artery bypass graft. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(7): 841-4.
- 42 Deshpande CS, Singhal RS, Mukherjee MS. Association of paraoxonase1 gene Q192R polymorphism and apolipoprotein B in Asian Indian women with coronary artery disease risk. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17(2): 140-6.
- 43 Guay SP, Brisson D, Munger J, Lamarche B, Gaudet D, and Bouchard L. ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics* 2012; 7(5): 464-72.

- 44 Nejat A, Mirbolouk M, Mohebi R, Hasheminia M, Tohidi M, Saadat N, *et al.* Changes in lipid measures and incident coronary heart disease: Tehran Lipid & Glucose Study. *Clin Biochem* 2014.
- 45 Kumar A, Kumar S, Vikram A, Hoffman T A, Naqvi A, Lewarchik CM, *et al.* Histone and DNA methylation-mediated epigenetic downregulation of endothelial Kruppel-like factor 2 by low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(8): 1936-42.
- 46 刘彬. DNA甲基化对LRP1表达的影响及其在冠心病发病机制中作用的实验研究. 中南大学博士学位论文(Liu Bin. The research of DNA methylation of LRP1 and its pathogenesis in coronary heart disease. Zhongnan University) 2008.
- 47 Cunningham N, Laffan MA, Manning RA, O'Donnell JS. Low-density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16(7): 465-8.
- 48 Rajesh KG, Surekha RH, Mrudula SK, Prasad Y, Sanjib KS, Prathiba N. Oxidative and nitrosative stress in association with DNA damage in coronary heart disease. *Singapore Med J* 2011; 52(4): 283-8.
- 49 Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, Uemura T, Soejima H, Kaikita K, *et al.* Differences in oxidative stress markers based on the aetiology of heart failure: Comparison of oxidative stress in patients with and without coronary artery disease. *Free Radic Res* 2009; 43(12): 1159-66.
- 50 Maksimenko AV, Vavaev AV. Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. Enzyme antioxidants: the next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress. *Heart Int* 2012; 7(1): e3.
- 51 Kliment CR, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase protects cardiovascular syndecan-1 from oxidative shedding. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(9): 1075-80.
- 52 Andrukhova O, Salama M, Krssak M, Wiedemann D, El-Housseiny L, Hacker M, *et al.* Single-Dose GSTP1 Prevents Infarction-Induced Heart Failure. *J Card Fail* 2014; 20(2): 135-45.
- 53 Gerhardt HJ. Operative hearing improvement in obliterated tympanum and irreversibly blocked eustachian tube. I. *Acta Otolaryngol* 1972; 74(1): 57-60.
- 54 Lakshmi SV, Naushad SM, Reddy CA, Saumya K, Rao DS, Kotamraju S, *et al.* Oxidative stress in coronary artery disease: Epigenetic perspective. *Mol Cell Biochem* 2013; 374(1/2): 203-11.
- 55 Kim CS, Kim YR, Naqvi A, Kumar S, Hoffman TA, Jung SB, *et al.* Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc. *Cardiovasc Res* 2011; 92(3): 466-75.
- 56 Franzeck FC, Hof D, Spescha RD, Hasun M, Akhmedov A, Steffel J, *et al.* Expression of the aging gene p66Shc is increased in peripheral blood monocytes of patients with acute coronary syndrome but not with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2012; 220(1): 282-6.
- 57 Xia N, Pautz A, Wollscheid U, Reifenberg G, Forstermann U, Li H. Artichoke, cynarin and cyanidin downregulate the expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary smooth muscle cells. *Molecules* 2014; 19(3): 3654-68.
- 58 刘文秀. 冠心病与血浆血栓调节蛋白基因启动子甲基化关系的初步研究. 第四军医大学硕士学位论文(Liu Wenxiu. Preliminary study on the relationship between the methylation of plasma thrombomodulin gene promoter and CHD. The Forth Military Medical University) 2007.
- 59 Shanker J, Perumal G, Maitra A, Rao VS, Natesha BK, John S, *et al.* Genotype-phenotype relationship of F7 R353Q polymorphism and plasma factor VII coagulant activity in Asian Indian families predisposed to coronary artery disease. *J Genet* 2009; 88(3): 291-7.
- 60 Friso S, Lotto V, Choi SW, Girelli D, Pinotti M, Guarini P, *et al.* Promoter methylation in coagulation F7 gene influences plasma FVII concentrations and relates to coronary artery disease. *J Med Genet* 2012; 49(3): 192-9.
- 61 Su J, Li X, Yu Q, Liu Y, Wang Y, Song H, *et al.* Association of P2Y12 gene promoter DNA methylation with the risk of clopidogrel resistance in coronary artery disease patients. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 450814.
- 62 Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(2): 196-206.
- 63 Zhuang J, Peng W, Li H, Wang W, Wei Y, Li W, *et al.* Methylation of p15INK4b and expression of ANRIL on chromosome 9p21 are associated with coronary artery disease. *PLoS One* 2012; 7(10): e47193.
- 64 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.
- 65 Compton LA, Potash DA, Brown CB, Barnett JV. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ Res* 2007; 101(8): 784-91.
- 66 Sharma P, Garg G, Kumar A, Mohammad F, Kumar SR, Tanwar VS, *et al.* Genome wide DNA methylation profiling for epigenetic alteration in coronary artery disease patients. *Gene* 2014; 541(1): 31-40.
- 67 Xu L, Zheng D, Wang L, Jiang D, Liu H, Liao Q, *et al.* GCK gene-body hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 151723.
- 68 Dong C, Tang L, Liu Z, Bu S, Liu Q, Wang Q, *et al.* Landscape of the relationship between type 2 diabetes and coronary heart disease through an integrated gene network analysis. *Gene* 2014; 539(1): 30-6.
- 69 Jiang D, Hong Q, Shen Y, Xu Y, Zhu H, Li Y, *et al.* The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(5): e96822.