

· 基础研究 ·

槲子苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 来源泡沫细胞 DNA 异常甲基化的双向调节作用

周庆兵 吴立旗 徐凤芹

摘要 **目的** 观察槲子苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 来源泡沫细胞 DNA 甲基化的作用。**方法** 以 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞形成泡沫细胞模型; CCK-8 法检测不同浓度槲子苷对泡沫细胞的增殖抑制情况; 将细胞分为 4 组, 分别为空白对照组(无处理)、模型组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理)、槲子苷小剂量组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 30 $\mu\text{g/mL}$ 槲子苷)、槲子苷大剂量组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 100 $\mu\text{g/mL}$ 槲子苷), 处理 24 h 后收集细胞, 总胆固醇试剂盒检测槲子苷降脂效应; 同时提取 DNA, 进行甲基化免疫共沉淀联合测序(Medip-seq)检测, 并对差异甲基化基因进行 GO 与 Pathway 分析。**结果** 红油 O 染色结果提示: 以 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理的 RAW264.7 细胞泡沫化最为明显; 槲子苷对 RAW264.7 来源泡沫细胞无细胞毒作用; 大剂量槲子苷(100 $\mu\text{g/mL}$) 能够降低细胞总胆固醇($P=0.04$)。与空白组比较, 模型组共有大量异常差异基因甲基化(包括异常的基因高甲基化与基因低甲基化)。涉及多个 AS 相关功能与通路, 如蛋白激酶 C 活性, MAPK 信号通路、PPAR 信号通路、Wnt 信号通路等; 小剂量与大剂量槲子苷(30 $\mu\text{g/mL}$ 与 100 $\mu\text{g/mL}$) 均能改变泡沫细胞中异常的基因甲基化, 涉及蛋白激酶 C 功能、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、PPAR 信号通路等。槲子苷不仅能去甲基化, 同时还能促甲基化。**结论** 槲子苷可能通过对 ox-LDL 诱导的泡沫细胞异常基因甲基化进行双向调控实现抗 AS 效应。

关键词 槲子苷; RAW264.7 来源泡沫细胞; 动脉粥样硬化; 甲基化

Double Effect of Geniposide on Gene Methylation of Foam Cells Derived From RAW264.7 Induced by ox-LDL ZHOU Qing-bing, WU Li-qi, and XU Feng-qin *Institute of Geriatric Medicine, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing(100091)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of geniposide on the DNA methylation in foamed cells derived from RAW264.7 cell line induced by ox-LDL. **Methods** ox-LDL was used to induce RAW264.7 cells to form the foam cells; CCK-8 method was used to detect the cell proliferation of foam cells treated by different concentrations of geniposide; Cholesterol test kit was applied for the changing of total cholesterol in cells after the treatment of geniposide. Then cells were divided into four groups: blank control group(no treatment), model group(treated only by 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL), low-dose geniposide group(treated by 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL and 30 $\mu\text{g/mL}$ geniposide), high-dose gardenoside group(treated by 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL and 100 $\mu\text{g/mL}$ geniposide). After treatment of different concentrations of geniposide for 24 h, the foam cells were collected and Cholesterol test kit was applied to test the changing of total cholesterol in cells. Then DNA was extracted for methylation immunoprecipitation sequencing (Medip-seq). GO and Pathway databases were used to analyze the data from Medip-seq. **Results** The oil red O staining showed that RAW264.7 cells treated by 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL turned out to be foam cells well. CCK-8 showed that geniposide had no cytotoxic effects on the RAW264.7 derived foam cells; total cholesterol in foam cells decreased after treatment of high-dose gardenoside ($P=0.04$). Medip-seq showed that compared with blank control group, there were a large number of abnormal methylated genes in model group

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81603490, No. 81473529); 中国博士后科学基金资助项目(No. 2016m590187)

作者单位: 中国中医科学院老年医学研究所(北京 100091)

通讯作者: 徐凤芹, 010-62835631, E-mail: 18800021979@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190103.001

(including abnormal hypermethylated genes and hypomethylated genes). These abnormal methylated genes were involved in multiple AS related functions and pathways, such as the activity of protein kinase C, MAPK signaling pathways, PPAR signal Pathway, Wnt signaling pathways, etc. 30 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ geniposide could change the methylation level of genes in foams cells. These altered methylated genes were involved in the protein kinase C function, Wnt signaling Pathway, MAPK signaling Pathway, PPAR signaling Pathway and so on. At the same time, geniposide could not only demethylate genes, but also promote methylation. Conclusion Geniposide may treat AS by regulating the abnormal hypermethylated and hypomethylated genes in foam cells.

KEYWORDS geniposide; RAW264.7 derived foam cells; atherosclerosis; methylation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,发病机制复杂,其特征为散在的斑块形成,其中脂质是 AS 斑块的基本成分,单核巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞,以及血管平滑肌细胞的增殖,都会逐渐发展成 AS 斑块,其中巨噬细胞源泡沫细胞是 AS 形成及发展的关键^[1]。DNA 甲基化属于表观遗传学范畴,研究表明,基因异常甲基化在 AS 的发生发展中具有重要作用,异常的 DNA 甲基化与脂质代谢异常、炎症反应、内皮细胞功能紊乱等均密切相关^[2,3],针对 AS 异常基因甲基化的抗 AS 治疗也受到关注^[4]。梔子苷是从我国传统中药梔子中提取的环烯醚萜苷类化合物,研究表明梔子苷具有抗氧化、抗炎、保护内皮细胞、调脂、抑制平滑肌细胞增生等作用^[5]。目前从 DNA 甲基化角度阐释梔子苷抗 AS 作用机理的研究较少,本实验观察梔子苷是否具有调节 RAW264.7 来源泡沫细胞异常基因甲基化的作用,从体外证明梔子苷抗 AS 的作用机制。

材料与方法

1 细胞株与细胞培养 RAW264.7 细胞株购于北京协和细胞资源中心,培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,在含 5% CO_2 、温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中进行培养,培养 1~2 d 后胰蛋白酶常规消化传代。

2 药物、试剂及仪器 梔子苷购于上海源叶生物科技有限公司(货号:ZUP-1370225,纯度 > 98%);人氧化性低密度脂蛋白(human oxidized-LDL, ox-LDL)购于广东奕源生物科技有限公司(货号:YB-002);CCK-8 细胞活力检测试剂盒购于南京恩晶生物科技有限公司(货号:E1CK-000208-10);总胆固醇检测试剂盒由普利莱公司提供(货号:E1015-105);油红 O 染料购于美国 Sigma-Aldrich(货号:00625);澳洲胎牛血清购于 Gibco 公司(货号:10100-147);DNA

提取试剂盒(DNeasy Blood Tissue Kit)购于德国 Qiagen 公司(货号:Y5-69506)。HiSeq 2500 测序仪(美国,Illumina 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);酶联免疫检测仪(美国,BioTek 公司); CO_2 培养箱(美国,Thermo 公司);倒置显微镜(日本,Olympus 公司)。

3 泡沫细胞模型建立 建立泡沫细胞模型^[6]。取正常状态的 RAW264.7 细胞传代,以 1.0×10^5 个/mL 密度种植于 6 孔板中,正常培养 24 h 后,分别以无血清培养基,含 20、40、60 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 和 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 无血清培养基继续培养 24 h,弃去培养液, PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 2 次,油红 O 染色 30 min,弃去染色液后 PBS 洗 3 遍,倒置显微镜下放大 200 倍观察并拍照。

4 细胞增殖抑制实验 调整细胞浓度至 0.5×10^5 个/mL,种植在 96 孔板中,加入 4 μL 含 ox-LDL 溶液的 PBS,使 ox-LDL 终浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$,复孔为 3 个,放置在培养箱中培养 24 h 后取出加入 4 μL 不同浓度梔子苷溶液(终浓度分别为 20、40、60、120、200 $\mu\text{g/mL}$),空白组加入 4 μL PBS,培养 24 h;从 CO_2 培养箱中取出 96 孔板,每孔加入 10 μL CCK-8,放回培养箱并培养 2 h;酶联免疫检测仪在 460 nm 波长处测定其光吸收值;上述实验重复做 2 次。

5 酶法检测降脂效应 细胞分为 4 组:空白组(不含 ox-LDL)、模型组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL)、梔子苷小剂量组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 30 $\mu\text{g/mL}$ 梔子苷)、梔子苷大剂量组(80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 100 $\mu\text{g/mL}$ 梔子苷),培养处理 24 h 后弃掉培养液,裂解液裂解 10 min,转移至 1.5 mL 离心管中,2 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清进行酶学测定,具体按试剂盒说明书进行。

6 药物处理及细胞收集 调整细胞浓度至 1.0×10^5 个/mL,分为空白组、模型组、梔子苷小剂量组、梔子苷大剂量组,种植在 6 孔板中,加入 ox-LDL

至模型组、栀子苷小剂量组、栀子苷大剂量组中使其终浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$,空白组加入相应体积的 PBS,培养箱中培养 24 h 后换液并加入不同浓度栀子苷溶液,使小剂量与大剂量组栀子苷浓度分别为 30、100 $\mu\text{g/mL}$,空白组与模型组加入相应体积的 PBS,培养箱中再次培养 24 h 后细胞刮收取细胞并冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。上述实验重复 2 次。

7 甲基化免疫共沉淀结合测序分析 取出 12 份细胞标本,DNeasy Blood Tissue 试剂盒提取基因组 DNA,质检合格后进行 Medip-seq 分析,大概步骤如下:文库构建,主要包括对基因组 DNA 进行片段化,末端修复、3'末端加 A、连接接头、抗体富集、富集等步骤;Agilent 2100 检测文库的大小,合格后进行下一步实验;上机测序:对样本进行 single end $1\times 50\text{ nt}$ multiplex 测序,测序过程由 Data Collection Software 进行控制,并进行实时数据分析。

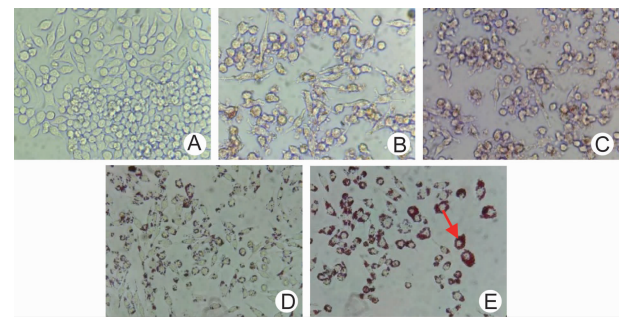
8 GO 与 Pathway 结合分析 基于 Gene Ontology (GO) GO 与 KEGG 数据库^[7-10],采用 GO 与 KEGG 分析方法将不同样本的差异甲基化基因进行功能分类及注释,得到基因参与的相关功能。

9 统计学方法 剂量-效应曲线由 GraphPad Prism 4 绘制,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义;差异甲基化基因进行 Fisher 精确检验和 χ^2 检验,按照 $P<0.05$ 和 $\text{FDR}<0.05$ 进行筛选,得到差异基因所参与的显著性、靶向性的 Pathway 和功能分类。

结 果

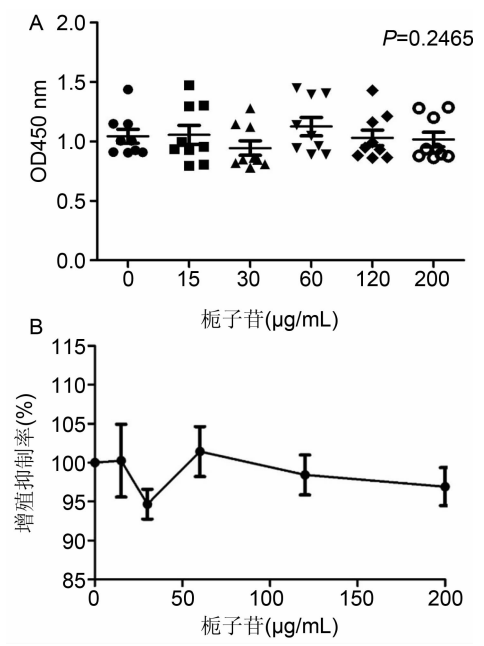
1 不同浓度 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 来源泡沫细胞模型(图 1) 空白组 RAW264.7 细胞经油红 O 染色后未见着色;20 $\mu\text{g/mL}$ 及 40 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞经油红 O 染色后可见少量橘红色脂滴聚集,随着 ox-LDL 的浓度增加,细胞内脂滴不断增加,ox-LDL 至 60 $\mu\text{g/mL}$,细胞内可见明显增多的红色颗粒,聚集在细胞内侧,ox-LDL 至 80 $\mu\text{g/mL}$,大部分细胞内侧聚集的颗粒超过细胞周长的 2/3,泡沫化十分明显,本研究后续实验以 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 作为诱导 RAW264.7 细胞成泡沫细胞的标准浓度。

2 栀子苷对 RAW264.7 来源泡沫细胞的增殖抑制作用(图 2) 通过 CCK-8 法分析,栀子苷在 0~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内对 ox-LDL 诱导的泡沫细胞无抑制作用,提示栀子苷对泡沫细胞无细胞毒作用($P=0.2465$)。选取栀子苷 30 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 作为小剂量与大剂量进行后续实验。



注: A 为空白组; B 为 20 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 组; C 为 40 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组; D 为 60 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组; E 为 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 组(箭头所示为典型泡沫细胞)

图 1 经不同浓度 ox-LDL 处理的 RAW264.7 细胞油红 O 染色结果 (油红 O, $\times 200$)

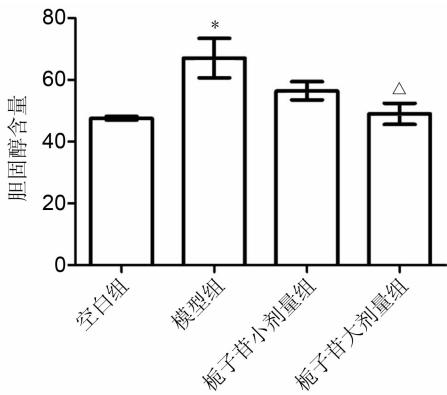


注: A 为不同浓度栀子苷对泡沫细胞作用的 OD 值比较($n=9$); B 为栀子苷对泡沫细胞作用 24 h 的剂量-效应作用

图 2 栀子苷对 RAW264.7 来源泡沫细胞增殖抑制作用

3 栀子苷对泡沫细胞总胆固醇的作用(图 3) 与空白组比较,模型组胆固醇升高明显($P<0.05$);大剂量栀子苷能够降低泡沫细胞内总胆固醇量($P=0.04$);小剂量栀子苷降脂效应不明显($P>0.05$)。

4 空白组与模型组差异甲基化基因的 GO 与 KEGG 分析(表 1) 与空白组比较,模型组有大量异常的差异甲基化基因,涉及 AS 多个功能与通路,如蛋白激酶 C 活性,MAPK 信号通路、PPAR 信号通路、Toll 样受体信号等。涉及这些通路的甲基化基因包括低甲基化与高甲基化基因。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图3 各组胆固醇含量比较

5 小剂量栀子苷与模型组差异甲基化基因的 GO 与 KEGG 分析(表 2) 与模型组比较,小剂量栀子苷能改变泡沫细胞中异常的基因甲基化。这些基因涉及多个 AS 相关功能与通路,如炎症反应调节、VEGF 信号通路,MAPK 信号通路、PPAR 信号通路等。小剂量栀子苷能纠正泡沫细胞异常基因的低甲基化与高甲基化,即具有双向的调控作用。

6 大剂量栀子苷与模型组差异甲基化基因的 GO 与 KEGG 分析(表 3) 与模型组比较,大剂量栀子苷能改变泡沫细胞中异常基因甲基化水平。这些基因涉及多个 AS 相关功能与通路,如蛋白激酶 C 活性、VEGF 信号通路,Wnt 信号通路、Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路、PPAR 信号通路等。大剂量栀子苷能纠正泡沫细胞异常基因的低甲基化与高甲基化,即具有双向的调控作用。

表 1 模型组与空白组差异甲基化基因的 GO 与 KEGG 分析

GO 与 Pathway	下调基因数	下调基因	上调基因数	上调基因
蛋白激酶 C 活性	5	Prkca、Prkcd、Prkce、Prkch、Prkd2	5	Prkcb、Prkcg、Prkci、Prkcq、Prkd3
MAPK 信号通路	72	Akt2、Cacna1d、Akt3、Map3k1、Map3k14 等	39	Arrb、Tnf、Map3k11、Fgf14、Nfkb 等
PPAR 信号通路	15	Acox1、Acs16、Mmp1a、Scd1、Sorbs1 等	7	Acs11、Rxra、Ppara、Slc27a2、Slc27a6 等
Toll 样受体信号通路	13	Akt1、Akt2、Akt3、Mapk10、Stat1 等	12	Cd86、Nfkb1、Pik3c、Tab1、Pik3ca 等
VEGF 信号通路	29	Akt2、Akt3、Mapk1、Kras、Sphk1 等	16	Nos3、Mapk13、Pla2g4d、Ppp3ca、Prkca、等
Wnt 信号通路	12	Camk2b、Chd8、Ppp3ca、Tct712、Wnt5b 等	17	Smad2、Dvl2、Ppp3cc、Prickle2、Smad3 等
Hippo 信号通路	30	Dlg1、Dvl2、Id4、Smad1、Wnt10b 等	25	Bmpr2、Dlg2、Prkci、Dlg4、Mpp5 等
内皮细胞分化调控	2	Sox9、Wnt10b	2	Ctnnb1、Pax6
平滑肌细胞增殖调控	16	Calcrl、Foxp1、Mtor、S1pr1、Tgfb2 等	13	Notch3、Pdgfd、Ptafr、Serpinf2、Sulf1 等

表 2 栀子苷小剂量组与模型组差异甲基化基因的 GO 与 KEGG 分析

GO 与 Pathway	上调基因数	上调基因	下调基因数	下调基因
炎症反应调节	6	Bcl6、Nod2、Otd7a、Rictor、Sbno2 等	5	Anxa1、Mcph1、Mgll、Nr1d2、Zyx
MAPK 信号通路	52	Akt2、Akt3、Cacna1a、Cacna1d、Map3k1、Map3k14	28	Fgf14、Nfkb1、Prkcb、Rras2、Tnf、Traf2 等
PPAR 信号通路	12	Acox1、Acs16、Acs11、Pdpk1、Sorbs1 等	5	Fabp6、Me1、Ppara、Pparg、Slc27a2 等
Toll 样受体信号通路	8	Akt2、Akt3、Mapk10、Mapk13、Mapk14 等	7	Cd86、Nfkb1、Pik3cg、Pik3r1、Pik3ca 等
VEGF 信号通路	13	Akt2、Akt3、Mapk13、Mapk14、Pla2g4d 等	6	Chp1、Pik3cg、Pik3r1、Ppp3ca、Prkcb 等
Wnt 信号通路	26	Mapk10、Tcf712、Wnt10b、Wnt5b、Wnt7b 等	23	Chp1、Prickle2、Sfrp1、Wnt8a、Vangl2 等
Hippo 信号通路	32	Ctnna2、Dlg1、Dvl2、Nf2、Ppp2r1b、Wnt10b 等	19	Bmpr2、Dlg2、Prkci、Smad4、Wwtr1 等
内皮细胞迁移调控	10	Bcar1、Bcas3、Fgf2、Flt4、Foxp1 等	2	Angpt4、Ptk2b

表 3 栀子苷大剂量组与模型组差异甲基化基因的 GO 与 KEGG 分析

GO 与 Pathway	上调基因数	上调基因	下调基因数	下调基因
蛋白激酶 C 活性	7	Prkca、Prkcd、Prkce、Prkch、Prkcq 等	3	Prkcg、Prkci、Prkd3
MAPK 信号通路	71	Akt2、Akt3、Cacna1a、Cacna1d、Fgf12 等	47	Arrb、Cacna1b、Map3k11、Ppp3cc、Tnf 等
PPAR 信号通路	12	Gyk、Mmp1a、Scd1、Sorbs1、S1c27a1 等	12	Acs11、Ppara、Scd4、Acs13、Cpt1a 等
Toll 样受体信号通路	16	Akt1、Akt2、Akt3、Mapk10、Map2k4、Map2k6 等	6	Cd86、Ikke、Pik3r5、Tab1、Tnf 等
VEGF 信号通路	13	Akt1、Akt2、Akt3、Kras、Pik3ca、Ptk2 等	6	Nos3、Pla2g4d、Ppp3c、Sh2d2a、Src 等
Wnt 信号通路	34	Chd8、Ppp3ca、Tcf712、Sox17、Wnt1 等	22	Dlg1、Dvl2、Id4、Lef1、Vangl2 等
Hippo 信号通路	36	Dlg1、Dvl2、Id4、Lef1、Llg12 等	27	Bmpr1a、Dlg4、Mpp5、Prkci、Rassf6 等

讨 论

基于甲基化免疫共沉淀联合测序技术 (Medip-seq), 本实验初步证明了梔子苷对 RAW264.7 来源泡沫细胞具有双重甲基化作用: 促甲基化与去甲基化。

在本研究中, 以 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞形成泡沫细胞, 后以不同浓度梔子苷处理泡沫细胞, 经 CCK-8 法检测发现, 梔子苷对 RAW264.7 来源泡沫细胞无细胞毒作用, 这与既往的研究一致^[11]。本实验中, 以梔子苷 30 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 分别作为小剂量与大剂量, 发现大剂量梔子苷能够降低细胞总胆固醇水平, 提示了梔子苷潜在的抗 AS 效应。

DNA 甲基化是表观遗传调控基因表达和染色体稳定的一个重要因素。异常的 DNA 甲基化包括异常的高甲基化与低甲基化在 AS 疾病中占有重要地位。Aavik E 等^[12]在全基因组范围内检测了 22 例股动脉粥样硬化斑块的甲基化情况, 与 9 例正常组比较后发现, AS 基因组在基因启动子区域存在大量异常的低甲基化位点, 同时伴有相对较少的异常高甲基化位点 (3 997 vs. 782)。既往研究证实 AS 斑块全基因组处于低甲基化状态, 并且认为全基因组低甲基化可能使得血管平滑肌增殖相关基因表达增加, 引起或加重 AS 的发生发展^[13]。为了纠正 AS 中异常的高甲基化与低甲基化水平, 需要一种具有双重甲基化调控作用的药物。在本次研究中, 用 Medip-seq 技术对梔子苷处理前后 RAW264.7 来源泡沫细胞的甲基化变化作了细致的研究。数据显示, 泡沫细胞具有大量异常的高甲基化与低甲基化基因, 大剂量和小剂量梔子苷能纠正部分异常基因的甲基化水平 (包括异常基因的高甲基化与低甲基化)。对这些异常的甲基化基因进行 GO 与 Pathway 分析, 发现这些基因涉及蛋白激酶 C 通路, Wnt 信号通路, MAPK 信号通路, PPAR 信号通路, VEGF 信号通路等, 而上述这些通路均与 AS 的发病相关^[14]。如 PPAR 信号通路, 该通路所介导的胆固醇代谢在 AS 中至关重要^[15], 其中的 PPAR- γ 的活化可抑制巨噬细胞清道夫受体 A (scavenger receptors, SRA) mRNA 表达, 进而抑制其摄取 ox-LDL 从而抑制泡沫细胞的形成, 而巨噬细胞泡沫化是动脉粥样硬化早期的关键事件^[16,17]。再如 Wnt 信号通路, 该信号通路参与涉及 AS 的多个病理过程, 不仅调节血管内皮功能障碍和血管平滑肌细胞增殖、迁移, 而且还具有调节炎症、泡沫细胞的形成和病理血管生成的能力^[18,19]。其他如 MAPK 信号通路与 AS 的发生和发展关系也十分密切, 既往胡彦武^[20]研究认为淫羊藿

苷抗动脉粥样硬化的机制可能与阻断 ERK1/2、p38 MAPK 信号通路激活而抑制血管平滑肌细胞增殖有关, 亦可能与阻断 JNK、p38 MAPK 及 NF- κ B 信号通路激活而抑制血管内皮细胞损伤及凋亡有关。

综上, 本研究结果初步证明了梔子苷能调节泡沫细胞中异常基因的高甲基化与低甲基化水平, 而这些涉及的甲基化基因与 AS 多个相关通路关系密切, 研究结果提示梔子苷可能通过双向调节泡沫细胞异常基因甲基化达到抗 AS 作用的新机制, 需要特别说明的是目前尚未有甲基化双向调控药物的研究报告, 因而本实验未设立阳性对照组。未来本课题组将重点关注某一信号通路及相关基因, 并且从其下游水平进一步深入研究梔子苷对 AS 相关基因的甲基化作用及相应的调控效应。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Orekhov AN. LDL and foam cell formation as the basis of atherogenesis [J]. Curr Opin Lipidol, 2018, 29(4): 279–284.
- [2] Muka T, Koromani F, Portilla E, et al. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: A systematic review [J]. Int J Cardiol, 2016, (212): 174–83.
- [3] Dunn J, Simmons R, Thabet S, et al. The role of epigenetics in the endothelial cell shear stress response and atherosclerosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015(67): 167–176.
- [4] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Treatment of cardiovascular pathology with epigenetically active agents: focus on natural and synthetic inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation [J]. Int J Cardiol, 2017, (227): 66–82.
- [5] 张海燕, 郭伟魁, 杨军宣, 等. 梔子对心血管系统的作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 294–297.
- [6] 段文丽, 白仁仁, 钟颖, 等. β -榄香烯对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞作用的研究 [J]. 现代生物学进展, 2014, 14(31): 6014–6018.
- [7] Berardini TZ, Li D, Huala E, et al. The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Database issue): D331–D335.
- [8] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25–29.
- [9] Aoki-Kinoshita KF, Kanehisa M. Gene annotation

- and pathway mapping in KEGG[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 396: 71–91.
- [10] Kanehisa M. The KEGG database [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 247: 91–101.
- [11] 黄丽华, 王纯洁, 纳仁高娃, 等. 栀子苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TLR4-NF- κ B 通路的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(10): 1012–1014.
- [12] Aavik E, Lumivuori H, Leppänen O, et al. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster[J]. *Eur Heart J*, 2014, 36(16): 993–1000.
- [13] Hiltunen MO, Turunen MP, Häkkinen TP, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions[J]. *Vas Med*, 2002, 7(1): 5–11.
- [14] 卢琼, 谭睿, 崔文婷, 等. 细胞信号通路对动脉粥样硬化[J]. *中国医药生物信息*, 2011, 6(7): 211–215.
- [15] Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ, et al. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(1): 119–125.
- [16] Gong FH, Cheng WL, Wang H, et al. Reduced atherosclerosis lesion size, inflammatory response in miR-150 knockout mice via macrophage effects [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(4): 658–669.
- [17] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(1): 17–28.
- [18] Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 350–357.
- [19] Lee DK, Nathan GR, Trachte AL, et al. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway enhances monocyte adhesion to endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(1): 109–116.
- [20] 胡彦武. 基于 MAPK 信号通路的淫羊藿苷抗动脉粥样硬化作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- (收稿: 2017–10–12 在线: 2019–02–13)
责任编辑: 赵芳芳

第十五次全国中西医结合神经科学学术会议征文通知

由中国中西医结合学会神经科专业委员会主办, 浙江省中西医结合学会神经内科专业委员会、浙江省中医院联合承办的“第十五次全国中西医结合神经科学学术会议”, 将于 2019 年 10 月在浙江省杭州市召开, 并举办国家级继续教学项目学习班。现将征文事宜通知如下。

征文内容 (1) 中西医结合神经系统疾病的基础和临床研究; (2) 近年来神经系统疾病的中西医结合研究成果、学术思想、临床经验等; (3) 神经系统疾病的中西医结合科研思路与方法; (4) 神经系统中西医结合临床疑难病例讨论分析。

征稿形式 全文及中文摘要各一份, 全文 4000 字以内, 摘要 300~500 字(含目的、方法、结果及结论)。所有来稿经专家评审, 合格者编入《论文专辑》, 优秀论文参加大会交流。

稿件要求 观点明确, 文字精练, 资料数据完整、可靠, 图表简明、扼要、规范, 且未在正式刊物上发表。格式为 Word 文档, 小四号宋体、1.5 倍行距(页边距设置为上下各 2.5 cm, 左 3.0 cm, 右 2.0 cm)。题目下一行注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编及第一作者的电子信箱。

投稿方式 本次征文只接受电子稿, E-mail: zjzxyjhsj@qq.com, 主题注明“2019 年第十五次全国中西医结合神经科学学术会议征文”, 截稿日期: 2019 年 8 月 31 日。