论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1012-05

紫绀型先心病患儿心肌组织SOCS3基因启动子甲基化分析及机制研究

冯泽洲,王学锋,朱 昀,何思毅,方 骏,唐富琴,顾 强,肖颖彬 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨紫绀型先心病患儿右心室心肌组织中细胞信号抑制因子3(suppressor of cell signaling 3,SOCS3)基因启动子甲基化水平及其可能机制。**方法** 选取先心病患儿34例,其中紫绀组18例,非紫绀组16例。取手术中切除的右心室流出道心肌组织作为标本,采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR,MSP)及重亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing PCR,BSP)检测心肌细胞中SOCS3启动子CpG岛甲基化程度。Western blot检测DNA甲基化转移酶3A(DNA methyltransferase, DNMT3A)、DNA甲基化转移酶3B(DNMT3B)蛋白在心肌细胞中的表达情况。**结果** 与非紫绀组相比,紫绀组SOCS3启动子CpG岛甲基化程度较高,DNMT3A蛋白较高[(0.407±0.469) *vs* (0.160±0.034),$P<0.05$],DNMT3B蛋白无明显差异[(0.054±0.012) *vs* (0.052±0.093),$P>0.05$]。**结论** 紫绀型先心病患儿心肌组织中,SOCS3启动子CpG岛呈高甲基化。高表达的DNMT3A蛋白很可能参与了SOCS3启动子CpG岛高甲基化。高甲基化的SOCS3启动子CpG岛,可能不是调控慢性缺氧适应心肌中SOCS3转录的主要因素。高表达的SOCS3启动子CpG岛以及高表达的DNA甲基化转移酶3A蛋白可能是心肌慢性缺氧适应的一种体现。

[关键词] 紫绀型先心病;SOCS3;甲基化;DNA甲基化转移酶;慢性缺氧适应

[中图法分类号] R394-3;R363.21;R541.1 [文献标志码] A

DNA methylation of SOCS3 promoter and the possible mechonism in myocardia of infants with cyanotic congenital heart defects

Feng Zezhou, Wang Xuefeng, Zhu Yun, He Siyi, Fang Jun, Tang Fuqin, Gu Qiang, Xiao Yingbin (Institute of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the methylation level of suppressor of cell signaling 3 (SOCS3) promoter in the myocardia of infants with cyanotic congenital heart defects. **Methods** A total of 34 children with cyanotic ($n=18$) and acyanotic ($n=16$) congenital cardiac defects were investigated. Samples from the right ventricular myocardia were collected to detect the methylation level of SOCS3 promoter CpG island with methylation-specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing PCR (BSP). Protein levels of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) and 3B (DNMT3B) were examined by Western blotting. **Results** Compared to the acyanotic group, the cyanotic group displayed the hypermethylation of SOCS3 promoter CpG island, higher protein level of DNMT3A (0.407 ± 0.469 *vs* 0.160 ± 0.034, $P<0.05$), and similar protein level of DNMT3B (0.054 ± 0.012 *vs* 0.052 ± 0.093, $P>0.05$). **Conclusion** SOCS3 promoter CpG island presents hypermethylation in the infants with cyanotic congenital cardiac defects. Strony expression of DNMT3A might participate in the hypermethylation of SOCS3 promoter CpG island. The hypermethylated SOCS3 promoter CpG island might not be the major factor regulating SOCS3 transcription in the myocardial adaption to chronic hypoxia. The hypermethylated SOCS3 promoter and higher DNMT 3A expression are possibly the signs of adaptive myocardium to chronic hypoxia.

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81100119)

[通信作者] 肖颖彬,电话:(023)68774107,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com

顾 强,E-mail:Qiang.gu@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0953.006.html(2014-3-28)

[**Key words**] Cyanotic congenital heart defect; Suppressor of cytokine signaling-3; methylation; DNA methyltransferase; Chronic hypoxia adaptation

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81100119). Corresponding author: Xiao Yingbin, Tel: 86-23-68774107, E-mail: xiaoyb@vip.sina.com; Gu Qiang, E-mail: Qiang.gu@hotmail.com

细胞因子信号传导抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3,SOCS3),又称STAT诱导STAT抑制因子3(STAT-induced STAT inhibitor 3,SSI3)作为JAK-STAT3的自身反馈性抑制因子,通过竞争性结合细胞因子受体抑制JAK,从而抑制STAT3磷酸化,负性调控JAK-STAT3通路[1]。JAK-STAT3信号通路及其抑制因子SOCS3在心肌生存、代谢、肥大[2]等病理生理过程发挥重要调控作用。我们前期研究发现,紫绀型先心病患儿右心室组织中IL-6-JAK-STAT3信号通路激活,同时SOCS3 mRNA及其蛋白上调;且缺氧培养时,过表达SOCS3的心肌细胞凋亡增加,提示SOCS3的适度表达精细调控缺氧心肌细胞中JAK-STAT3信号通路的活性,参与维持心肌细胞慢性缺氧适应[3]。

研究显示,肝癌中SOCS3基因启动子CpG岛高甲基化参与其转录抑制[4]。我们推测与非紫绀组相比,紫绀组心肌中可能存在SOCS3启动子CpG岛低甲基化,其促进SOCS3转录表达,调控IL-6-JAK-STAT3信号通路持续激活,维持心肌细胞生存。研究慢性缺氧心肌细胞中SOCS3的表达调控机制,有助于寻找围术期保护心肌细胞的干预靶点,改善手术患者预后。拟研究紫绀型先心病患儿右心室组织中SOCS3启动子CpG岛甲基化水平及甲基化转移酶的表达,旨在探讨缺氧心肌细胞中SOCS3启动子CpG岛甲基化水平及其意义。

1 资料与方法

1.1 病例标本临床资料与分组

经本院伦理委员会批准,在术前征得患儿家属同意并签署知情同意书。选取2012年1-12月在我科行心脏手术的患儿。紫绀型患儿18例,其中男性8例,女性10例,年龄(34.50±20.74)个月;非紫绀型患儿16例,其中男性7例,女性9例,年龄(21.5±16.47)个月。术前安静状态不吸氧1 h以上测肢端血氧饱和度。纳入标准:紫绀组,平均血氧饱和度<85%,术中证实为法洛氏四联症或右心室双出口。非紫绀组,平均血氧饱和度>95%,术中证实为室间隔缺损合并右室流出道狭窄或者室间隔缺损合并双腔右室。排除标准:患儿合并其他心脏畸形、多次行心脏矫治手术及其他系统性病变。入组患儿病例资料见表1。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 静脉复合麻醉、正中开胸建立体外循环,取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本,液氮保存,用于甲基化特异性PCR及重亚硫酸盐测序检测SOCS3启动子CpG岛甲基化程度,Western blot检测甲基化转移酶表达。

1.2.2 主要试剂 DNA抽提试剂盒(Sigma);重亚硫酸盐修饰试剂盒(Qiagen);CpG甲基化转移酶(NEB);正常人心室肌细胞总DNA(武汉原生原代);Epi Taq™ HS(for bisulfite-treated DNA)试剂盒(TaKaRa);Platinum® *Taq* DNA Polymerase试剂盒(Life Technologies);琼脂糖粉末(Invitrogen);凝胶回收试剂盒(Axygen);pMD18-T Vector试剂盒(TaKaRa);SDS裂解液(碧云天);SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(碧云天);PVDF膜(Roche);DNMT3A多克隆抗体(兔抗人,Santa Cruz);DNMT3B多克隆抗体(兔抗人,Santa Cruz);β-actin(兔抗人,博奥森);辣根过氧化酶标记二抗(山羊抗兔,碧云天)。

1.2.3 甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)

提取心肌组织DNA,每个样本取组织约25mg,按照说明书标准步骤操作;重亚硫酸盐修饰心肌组织DNA总量约1 μg,按照说明书标准步骤修饰;人SOCS3基因MSP甲基化上游引物:5′-CGAGTTTTTTACGTTGCGTTTTTGT-3′,甲基化下游引物:5′-CGATCCAAACGCCTCACG-3′,非甲基化上游引物:5′-TGAGTTTTTTATGTTGTGTTTTTGTAGTG-3′,非甲基化下游引物:5′-TGATCCAAATGCCTCATGAAACC-3′。甲基化特异性引物与非甲基化特异性引物皆扩增出109 bp片段,用CpG甲基化转移酶处理的正常人心室肌细胞全基因组DNA作为阳性对照组,用双蒸水作为阴性对照组,PCR条件:95 ℃,5 min预变性,95 ℃,30 s变性,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸60 s,共40循环,72 ℃再延伸5 min。3%琼脂糖凝胶电泳后,于凝胶成像仪显像。

1.2.4 重亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing PCR,BSP) 组织提取、重亚硫酸盐修饰与MSP处理相同。人SOCS3基因BSP引物:上游引物1:5′-TTTTTTGTTGYGAGTAGTGATT-3′,下游引

表1 紫绀组与非紫绀组患者临床资料

组别	n	年龄(月,$\bar{x}\pm s$)	男/女(例)	体质量(kg,$\bar{x}\pm s$)	LVEF(%,$\bar{x}\pm s$)	SaO_2(%,$\bar{x}\pm s$)	Hct(g/L,$\bar{x}\pm s$)	术中诊断(例)			
								TOF	DORV	VSD+RVOS	VSD+DCRV
紫绀组	18	34.50±20.74	8/10	11.22±3.92	70.09±5.25	72.11±10.69[a]	48.55±6.86[a]	17	1	0	0
非紫绀组	16	21.5±16.47	7/9	9.81±2.30	68.78±4.15	97.25±2.11	36.35±2.08	0	0	14	2

a:$P<0.01$,与非紫绀组比较

物1:5′-TCCRTCCTTAAAACTAAACCC-3′,上游引物2:5′-GATGGAAGTYGGAGATTTTAGGTT-3′,下游引物2:5′-ACTAAAACACCCACTACCCC-3′(注:Y表示C/T,R表示A/G)。对重亚硫酸盐修饰后的DNA进行PCR检测:95 ℃,5 min预变性,95 ℃,30 s变性,54 ℃退火30 s,72 ℃延伸60 s,共35循环,72 ℃再延伸5 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外光下切下含目的DNA片段的凝胶,称重并按照凝胶回收试剂盒步骤进行回收纯化。pMD18-T Vector与回收DNA片段16 ℃连接1 h,取5 μL连接产物与DH 5α感受态细胞冰浴30 min。500 μL无抗性LB培养基,37 ℃,200 r/min摇菌60 min,将菌液涂布至含X-Gal、IPTG、氨苄的平板,37 ℃倒置培养过夜,进行蓝白斑筛选,挑克隆于37 ℃,200 r/min摇菌过夜培养,取200 μL阳性菌液送上海英骏公司进行测序,运用biq-analyzer(http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/)分析测序结果并绘图。

1.2.5 Western blot检测DNMT3A、DNMT3B蛋白在心肌组织中的表达情况　从液氮中取出冻存的心肌组织,取100 mg研碎并溶解于SDS裂解液中制成匀浆,冰上裂解30 min后,离心25 min后取上清液,运用BCA法测定蛋白质含量。各标本取等量蛋白质样品于沸水浴5 min后,加入8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,湿转法(恒流)将蛋白质从SDS-聚丙烯酰胺凝胶转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉-TBST液中室温封闭2 h后,DNMT3A一抗(1∶300稀释)、DNMT3B一抗(1∶800稀释)、β-actin一抗(1∶1 000稀释)4 ℃孵育过夜,TBST液清洗(10 min,共3次),使用辣根过氧化酶标记的二抗(1∶1 000)室温孵育1 h,用显色剂显影成像,用软件(ImageJ 1.46)测目的条带和内参条带灰度值,以目的条带和内参条带灰度值比值作为目的蛋白的相对表达含量。

1.3 统计学方法

统计学分析Western blot的结果用计算灰度值的软件(Image J 1.46)统计灰度值比值。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用SPSS 19.0统计软件进行 t 检验、χ^2 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

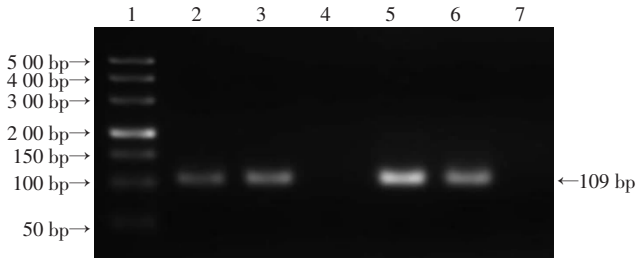
2 结果

2.1 甲基化特异性PCR(methylation specific PCR,MSP)

根据网站预测人类SOCS3启动子CpG岛,针对ATG(翻译起始点)前-1 084 ~ -186 bp区域设计MSP引物。实验发现,紫绀组SOCS3启动子CpG岛-406 bp ~ -186 bp区域甲基化程度较非紫绀组高,非紫绀组没有明显甲基化(图1)。

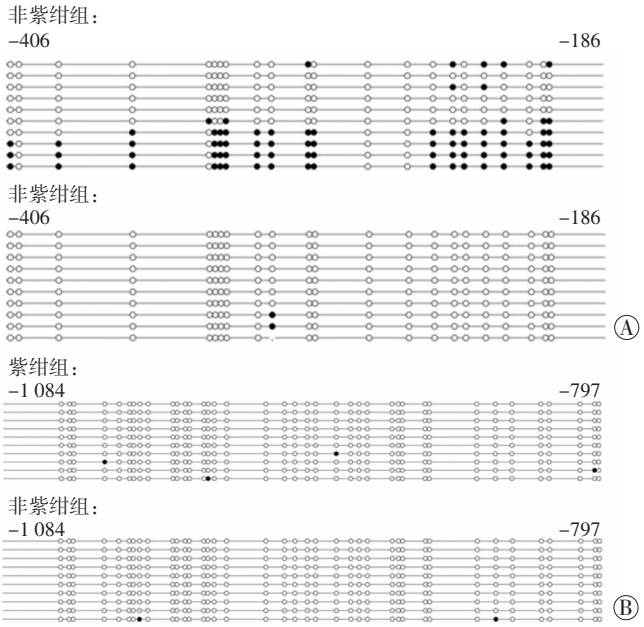
2.2 重亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing PCR,BSP)

针对人类SOCS3启动子CpG岛ATG(翻译起始点)前-1 084 ~ -186 bp设计BSP引物。实验发现,紫绀组SOCS3启动子CpG岛-406 bp ~ -186 bp区域呈部分高甲基化,非紫绀组没有明显甲基化;两组在-1 084 ~797 bp区域都无明显甲基化(图2)。



1:标准;2:紫绀组甲基化引物扩增产物;3:紫绀组非甲基化引物扩增产物;4:非紫绀组甲基化引物扩增产物;5:非紫绀组非甲基化引物扩增产物;6:阳性对照;7:阴性对照

图1 甲基化特异性PCR(MSP)检测右心室组织SOCS3启动子CpG岛甲基化

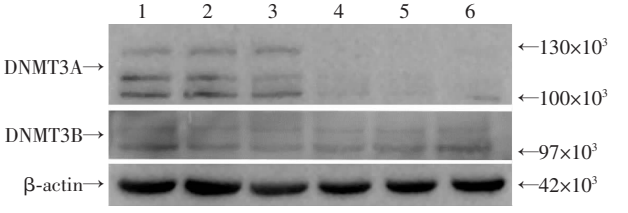


以翻译起始点作为+1,●:示甲基化CpG,○:示非甲基化CpG,·:示CpG位点胞嘧啶变异为其他碱基。A:SOCS3启动子CpG岛-406 bp ~ -186 bp区域甲基化程度;B:SOCS3启动子CpG岛-1 084 bp ~ -797 bp区域甲基化程度

图2 重亚硫酸盐修饰测序(BSP)检测右心室组织SOCS3启动子CpG岛甲基化情况

2.3 心肌中DNMT3A、DNMT3B蛋白表达改变

与非紫绀组相比,紫绀组心肌组织中DNMT3A蛋白水平显著增高[(0.407 ± 0.469) *vs* (0.160 ± 0.034),$P < 0.05$],而DNMT3B蛋白水平没有明显差异[(0.054 ± 0.012) *vs* (0.052 ± 0.093),$P > 0.05$]。DNMT3A、DNMT3B蛋白条带以及蛋白表达相对量(图3)。



1~3:紫绀组;4~6:非紫绀组

图3 Western blot检测右心室流出道组织DNMT3A、DNMT3B蛋白的表达情况

3 讨论

IL-6-JAK-STAT3 信号通路在心脏病理、生理过程中的保护作用已有较多研究[2],特异性过表达 STAT3 的心肌细胞促进心脏向心性肥大[5]。最近有研究发现,在特异性敲除心脏 SOCS3 基因的小鼠心肌梗死模型中,JAK-STAT3 信号通路活性增强,心肌细胞凋亡减少,心肌重构受到抑制[6]。细胞在缺氧状态下,JAK-STAT3 信号通路呈激活状态,SOCS3 表达增高[7-8],但在 SOCS3 过表达的细胞模型中,JAK-STAT3 信号通路活性反而被抑制,细胞凋亡增加[3]。提示 SOCS3 作为 STAT 自身诱导抑制因子,其在缺氧等病理条件下的适度表达调控着 JAK-STAT3 活性,对细胞的凋亡、能量代谢、组织重构发挥重要作用。

慢性缺氧是紫绀型先心病的共同病理生理基础[9],缺氧心肌细胞如何完成从细胞信号、蛋白合成到代谢[10]的转变,维持慢性缺氧适应稳态,其具体机制还不甚清楚。而应激状态下心肌细胞中基因转录水平的调节,是心肌细胞代偿性适应的表现[11]。缺氧可通过 DNA 甲基化调控心肌细胞基因的转录效率[12-13]。DNA 甲基化,是最重要的表观遗传修饰之一。基因启动子 CpG 岛调控转录起始活性[14],是 DNA 甲基化调控的主要区域。正常体细胞中基因启动子区域 CpG 岛通常没有发生甲基化,而其高甲基化通常参与基因的转录抑制[15]。人类 SOCS3 基因启动子 CpG 岛含有3个 STAT 共有序列,这3个序列附近的 CpG 甲基化都可能参与 SOCS3 转录抑制。与我们的预想结果相反,紫绀组 SOCS3 启动子 CpG 岛第3个 STAT 共有序列附近区域发生部分高甲基化,与肝细胞癌和冠脉平滑肌细胞中的研究类似[4,16]。第1、2个 STAT 共有序列附近[17]没有发生甲基化。紫绀组中 SOCS3 启动子 CpG 甲基化没有对 SOCS3 转录水平产生明显影响[3],可能有以下原因:①不同甲基化程度对转录影响不同。SOCS3 启动子 CpG 岛发生甲基化的区域只是部分甲基化,而肝癌研究中挑选的多个克隆测序几乎完全甲基化。启动子部分甲基化一定程度抑制基因转录,启动子完全甲基化几乎彻底抑制基因转录[18];②基因表达与启动子甲基化的关系不定。增殖不活跃细胞缺氧处理后,可能出现基因转录水平与启动子甲基化水平不相匹配,甚至矛盾[19]。提示紫绀组 SOCS3 启动子 CpG 岛甲基化可能参与调控 SOCS3 转录,但并不是调控 SOCS3 转录的主要因素,可能存在如组蛋白修饰、microRNA 调控等其他因素协同调控 SOCS3 的表达[20-21]。随后,课题组对两组对象甲基化差异的原因进行了探讨。

已知参与哺乳动物中 DNA 甲基化涉及3种甲基化转移酶 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B。DNMT1 主要参与维持甲基化(maintenance methylation),即 DNMT1 可使 DNA 复制后半甲基化的 DNA 双链完全甲基化。DNMT3A、DNMT3B 主要参与从头合成甲基化(*de novo* methylation)[22]。DNMT3A、DNMT3B 在发育早期高表达[23],并参与细胞分化,对胚胎期和新生儿期的发育不可或缺[24]。正常成年人心脏中表达一定水平DNMT1、DNMT3A、DNMT3B mRNA[25]。心室肌中细胞大多数是增殖不活跃的心肌细胞[26],且 DNMT1 主要参与 DNA 复制后的维持甲基化,在不再有丝分裂(post-mitosis)的终末分化细胞中不稳定[27]。因此,我们检测了从头合成甲基化转移酶 DNMT3A、DNMT3B 蛋白水平。实验发现,紫绀组中 DNMT3A 蛋白水平较高,而 DNMT3B 蛋白水平无明显差异。最近研究显示,缺氧的心肌纤维细胞中 DNMT1、DNMT3B 蛋白表达增高,其与基因组整体甲基化相关[28]。缺氧的原代神经细胞中,DNMT1、DNMT3A 增高[29]。提示缺氧细胞中 DNA 甲基化模式的变化可通过甲基化转移酶实现。我们推测,DNMT3A、DNMT3B 可能参与了紫绀组中 SOCS3 启动子 CpG 岛甲基化。紫绀组中 DNMT3A 被含有高甲基化 CpG 的核小体招募而稳定存在于胞核中,而非紫绀组中游离的 DNMT3 通过依赖蛋白酶途径及其他未知途径被降解[30-32]。这种机制有可能参与维持紫绀组和非紫绀组的 DNA 甲基化模式。后续的实验中课题组将进一步探讨参与 SOCS3 启动子 CpG 岛甲基化的因素。

总而言之,本实验发现与非紫绀组相比,紫绀型先心病心肌中 SOCS3 启动子 CpG 岛呈部分高甲基化,可能是 DNMT3A 蛋白被招募到 SOCS3 启动子 CpG 岛实现的。高甲基化的 SOCS3 启动子 CpG 岛可能不是调控 SOCS3 转录表达的主要因素。高甲基化的 SOCS3 启动子 CpG 岛以及高表达的甲基化转移酶蛋白水平的差异可能是心肌慢性缺氧适应的一种体现[33]。我们将进一步在离体实验中,研究慢性缺氧心肌细胞中 SOCS3 启动子 CpG 岛甲基化模式及其对 IL-6-JAK-STAT3 通路的影响等问题。

参考文献:

[1] Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity[J]. Nat Immunol, 2003, 4(12): 1169-1176.

[2] Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, *et al*. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure [J]. Pharmacol Ther, 2008, 120(2): 172-185.

[3] Gu Q, Kong Y, Yu Z B, *et al*. Hypoxia-induced SOCS3 is limiting STAT3

phosphorylation and NF-κB activation in congenital heart disease[J]. Biochimie, 2011, 93(5): 909-920.

[4] Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, *et al*. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24(42): 6406-6417.

[5] Osugi T, Oshima Y, Fujio Y, *et al*. Cardiac-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 6676-6681.

[6] Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, *et al*. Cardiac-specific deletion of SOCS3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(9): 838-852.

[7] Bai L, Yu Z, Qian G, *et al*. SOCS3 was induced by hypoxia and suppressed STAT3 phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2006, 152(1): 83-91.

[8] Noman M Z, Buart S, Van-Pelt J, *et al*. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis[J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3510-3521.

[9] Essop M F. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia [J]. J Physiol, 2007, 584(Pt 3): 715-726.

[10] Heather L C, Cole M A, Tan J J, *et al*. Metabolic adaptation to chronic hypoxia in cardiac mitochondria[J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(3): 268.

[11] Sharma S, Taegtmeyer H, Adrogue J, *et al*. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(3): H1185-H1192.

[12] Ghorbel M T, Cherif M, Jenkins E, *et al*. Transcriptomic analysis of patients with tetralogy of Fallot reveals the effect of chronic hypoxia on myocardial gene expression[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 140(2): 337-345.

[13] Watson J A, Watson C J, McCann A, *et al*. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response[J]. Epigenetics, 2010, 5(4): 293-296.

[14] Deaton A M, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription[J]. Genes Dev, 2011, 25(10): 1010-1022.

[15] Baylin S B. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer[J]. Science, 1997, 277(5334): 1948-1949.

[16] Dhar K, Rakesh K, Pankajakshan D, *et al*. SOCS3 promotor hypermethylation and STAT3-NF-κB interaction down-regulate SOCS3 expression in human coronary artery smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 304(6): H776-H785.

[17] He B, You L, Uematsu K, *et al*. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(24): 14133-14138.

[18] Zheng S, Chen P, McMillan A, *et al*. Correlations of partial and extensive methylation at the p14ARF locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors [J]. Carcinogenesis, 2000, 21(11): 2057-2064.

[19] Hartley I, Elkhoury F F, Heon-Shin J, *et al*. Long-lasting changes in DNA methylation following short-term hypoxic exposure in primary hippocampal neuronal cultures[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77859.

[20] Xiong H, Du W, Zhang Y J, *et al*. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses JAK2/STAT3 signaling via inducing the promoter-associated histone acetylation of SOCS1 and SOCS3 in human colorectal cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2012, 51(2): 174-184.

[21] Collins A S, McCoy C E, Lloyd A T, *et al*. miR-19a: an effective regulator of SOCS3 and enhancer of JAK-STAT signalling[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69090.

[22] Jones P A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(7): 484-492.

[23] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 6-21.

[24] Watanabe D, Suetake I, Tada T, *et al*. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis[J]. Mech Dev, 2002, 118 (1/2): 187-190.

[25] Robertson K D, Uzvolgyi E, Liang G, *et al*. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27 (11): 2291-2298.

[26] Mollova M, Bersell K, Walsh S, *et al*. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(4): 1446-1451.

[27] Sharma R P, Tun N, Grayson D R. Depolarization induces downregulation of DNMT1 and DNMT3a in primary cortical cultures[J]. Epigenetics, 2008, 3(2): 74-80.

[28] Watson C J, Collier P, Tea I, *et al*. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(8): 2176-2188.

[29] Wang Z, Yang D, Zhang X, *et al*. Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19229.

[30] Sharma S, De-Carvalho D D, Jeong S, *et al*. Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance[J]. PLoS Genet, 2011, 7(2): e1001286.

[31] Jeong S, Liang G, Sharma S, *et al*. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A/3B to nucleosomes containing methylated DNA[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(19): 5366-5376.

[32] Jones P A, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(11): 805-811.

[33] Watson J A, Watson C J, McCrohan A M, *et al*. Generation of an epigenetic signature by chronic hypoxia in prostate cells[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(19): 3594-3604.

(收稿:2013-12-19;修回:2014-02-05)

(编辑 郭建秀)