

# 冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者 IL-6 基因甲基化研究及方法探讨

陈光<sup>1,2</sup>, 何浩强<sup>1,2</sup>, 刘咏梅<sup>1</sup>, 王理<sup>3</sup>, 王阶<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;  
3 首都儿科研究所, 北京 100020)

**[摘要]** **目的:**研究冠心病不稳定性心绞痛(unstable angina,UA)患者外周血细胞中白细胞介素-6(IL-6)基因启动子区甲基化状态与中医血瘀证的关系。**方法:**选取 6 例 2015 年 2 月—2015 年 5 月中国中医科学院广安门医院心血管科住院或门诊 UA 血瘀证患者作为试验组,另选取 6 例中国中医科学院广安门医院心内科住院或门诊 UA 非血瘀证患者作为对照组,采用重亚硫酸盐处理检测两组 IL-6 基因启动子区甲基化状态并进行组间比较,分析血瘀证与基因启动子区甲基化相关性。**结果:**IL-6 基因转录起始位点前 -1 118 bp 至 -826 bp 序列中 7 个位点 CpG 位点甲基化程度血瘀证组存在高于非血瘀证组的趋势,但差异尚无统计学意义。IL-6 基因转录起始位点前 -1 471 bp 至 -1 184 bp 序列 4 个 CpG 位点甲基化程度血瘀证组与非血瘀证组之间的差异尚不明显。**结论:**UA 血瘀证患者 IL-6 基因启动子甲基化水平存在高于非血瘀证组的趋势,一定程度反映了 UA 血瘀证本质。

**[关键词]** 冠心病; 不稳定性心绞痛; 血瘀证; DNA 甲基化; 表观遗传学; 亚硫酸氢盐质谱

**[中图分类号]** R287;R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0023-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190023

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1406.050.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 14:06

## IL-6 Gene Promoter Methylation in Patients with Blood Stasis Syndrome and Unstable Angina

CHEN Guang<sup>1,2</sup>, HE Hao-qiang<sup>1,2</sup>, LIU Yong-mei<sup>1</sup>, WANG Li<sup>3</sup>, WANG Jie<sup>1\*</sup>

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;  
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the correlation between blood stasis syndrome (BBS) and the interleukin-6 (IL-6) gene promoter methylation state in the unstable angina (UA) patients. **Method:** Six BBS in patients or out patients from the Department of Cardiology, Guang'anmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences were recruited from February to May in 2015 as the test group, while 6 non BBS in patients or out patients were recruited as control group. The IL-6 gene promoter methylation states were detected by bisulfite and compared between two groups to analyze the correlation between BBS and gene promoter methylation state. **Result:** The methylation degree of BBS group was potentially higher than that of non BBS group on 7 sites from -1 118 to -826 bp before the transcription initiation site of IL-6, but with no statistically difference between the two groups; and there was no significant difference in the methylation degree on 4 sites from -1 471 to -1 184 bp

**[收稿日期]** 20170417(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473561;81673847);国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09301307)

**[第一作者]** 陈光,在读博士,从事中西医结合心血管病防治研究,Tel:18510600727,E-mail:wcdlgz0000@163.com

**[通讯作者]** \*王阶,主任医师,教授,博士生导师,从事中西医结合心血管病防治研究,Tel:010-88001229,E-mail:wangjie0103@126.com

before the transcription initiation site of IL-6 between two groups. **Conclusion:** It could be inferred that the methylation states of BBS group were potentially higher than those of non BBS group on IL-6 promoter, in part reflecting the essence of BBS.

**[Key words]** coronary heart disease; unstable angina; blood stasis syndrome; DNA methylation; epigenetics; bisulfite method

冠心病是导致世界人口死亡的最大原因<sup>[1]</sup>,血瘀证是冠心病最常见的证候之一<sup>[2-3]</sup>。早在 1999 年就有学者认为冠心病是炎症性疾病<sup>[4]</sup>。冠心病血瘀证的生物学基础研究一直备受学术界关注,前期研究发现,冠心病血瘀证的实质与微循环障碍<sup>[5-7]</sup>,血液高凝滞状态<sup>[8]</sup>,血小板活化和黏附聚集<sup>[9-12]</sup>,血栓形成<sup>[13-14]</sup>,免疫功能障碍<sup>[15-16]</sup>等现代病理改变密切相关,这些病理均存在炎症反应的参加。另外,一些学者提出了冠心病血瘀证发展的瘀毒致变假说<sup>[17]</sup>,血瘀化毒的病理基础也与炎症反应密切相关。本课题组认为,基因储存着生命的全部信息,生物体一切生命现象都与其有关,客观存在的血瘀证也必然存在遗传调控和表观遗传调控紊乱,DNA 甲基化是经典的表观遗传学调控机制之一。因此,本课题组从 DNA 甲基化层面探讨冠心病血瘀证与炎症相关的分子机制。同时,前期对冠心病血瘀证 mRNA 差异表达谱研究进行文献挖掘及生物信息学分析,结果提示冠心病血瘀证与炎症相关,相关信号通路中的白细胞介素-6(IL-6)基因在 NCBI 数据库基因功能注释中提示其与多种炎症相关疾病的发生发展密切相关。因此,本研究以 IL-6 为切入点,采用重亚硫酸盐处理后 Sequenom 质谱检测技术,检测冠心病血瘀证患者该基因启动子区甲基化状态,欲通过本研究进一步探索 DNA 甲基化用于证候研究的方法。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 中国中医科学院广安门医院心血管科 2015 年 2 月—5 月住院或门诊的 12 例 UA 患者,其中男 6 例,女 6 例,年龄 53~68 岁,中位年龄 63 岁,平均年龄(61.67±1.42)岁。据上述中医诊断标准,患者分为血瘀证组 6 例,非血瘀证组 6 例。血瘀证组和非血瘀证组一般资料比较,差异无统计学意义,具有可比性。

**1.2 诊断标准** 西医诊断标准,不稳定性心绞痛参照 ACCF/AHA2012 年更新的指南<sup>[18]</sup>,临床表现分为静息心绞痛或夜间心绞痛持续 20 min 以上;新近发生的心绞痛(2 个月以内)且程度严重;近期心绞痛逐渐加重,原来可缓解的措施现在无效或不完全

有效。

中医证候诊断标准参考 1988 年《血瘀证诊断参考标准》<sup>[19]</sup>,《血瘀证诊断标准的研究》<sup>[20]</sup>血瘀证诊断标准积分表以及 2012 年《冠心病血瘀证诊断标准研究》<sup>[21]</sup>。冠心病血瘀证诊断标准,主要指标,胸痛位置固定;舌质色紫或暗;舌有瘀斑瘀点;冠脉 CTA 或冠脉造影显示任何一支血管明显狭窄(>75%);超声显示心脏或血管内有附壁血栓。次要指标,胸痛夜间加重;口唇或齿龈色暗;舌下脉络粗胀或曲张,或色青紫、紫红、绛紫、紫黑;脉涩;造影或血管超声显示其他血管狭窄(>50%);活化部分凝血活酶时间(APTT)或凝血酶原时间(PT)缩短;纤维蛋白原升高;D-2 聚体升高。符合 2 条主要指标,或 3 条次要指标,或 1 条主要指标加 2 条次要指标即可诊断血瘀证,且指标中至少 1 项宏观指标,单纯理化指标不能诊断。

**1.3 纳入标准** 符合冠心病西医诊断标准与血瘀证中医诊断标准,且 24 h 内有过心绞痛发作;年龄在 18~75 岁;本试验通过中国中医科学院广安门医院伦理委员会批准,患者知情且签署知情同意书。

**1.4 排除标准** ①急性心肌梗死、主动脉夹层、胆心综合征、食管裂孔疝、胃及食管返流、甲亢、颈椎病、重度神经官能症、更年期综合征所致胸痛者;②高血压控制不良、重度心律失常、重度心肺功能不全者;③合并感染性疾病者;④合并肝肾功能不全者;⑤妊娠或哺乳期妇女者;⑥合并有严重神经、精神疾患者;⑦近 4 周内出血倾向或作过手术者;⑧过敏体质者;⑨恶性肿瘤患者。

## 1.5 观察指标及方法

**1.5.1 标本留取及重亚硫酸盐处理** 用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管留取 UA 患者空腹 8 h 肘静脉血 4 mL,室温静置 2 min, -20℃冻存。运用通用型柱式基因组提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2298)提取上述血样基因组 DNA,用 NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)测定纯度和浓度,选择符合要求的 DNA。根据样本 DNA 浓度,取 DNA 500 ng(若 DNA 浓度不满足取 500 ng,则根据 DNA 浓度取最大量),

加水定容至 45  $\mu\text{L}$ 。运用 EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research 公司,批号 D5004)对样品进行重亚硫酸盐处理。

**1.5.2 质谱检测 IL-6 基因启动子甲基化状态**  
UCSC 数据库 (<http://genome.ucsc.edu/>) 查找 IL-6 基因注释,采用 Sequenom 的 Epidesigner 平台 (<http://www.epidesigner.com/start3.html>) 设计引物,引物序列,IL-6 基因转录起始位点前 2 000 bp 内上游 (IL-6\_1),左引物 5'-AGGAAGAGAGTTGGAGATTGGAGGGATAATTTAGT-3',右引物 5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTACTCACCTCTTTATTAATAAATATCAAAA-3';下游 (IL-6\_2)左引物 5'-AGGAAGAGAGGGTTGTGTAGAATTGTTTGTTA-3',右引物 5'-CAGTAATACGACTCAC TATAGGGAGAAGGCTCCTAAAACCCATACAAATAC CCC-3'。对 12 个待测样本 DNA 进行甲基化特异性 PCR,5  $\mu\text{L}$  反应体系:H<sub>2</sub>O 1.42  $\mu\text{L}$ ,Buffer 0.5  $\mu\text{L}$ ,Dntp 0.04  $\mu\text{L}$ ,En 0.04  $\mu\text{L}$ ,Primer L 1  $\mu\text{L}$ ,Primer R 1  $\mu\text{L}$ ,DNA 1  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  4 min,95  $^{\circ}\text{C}$  25 s,56  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,45 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min完成扩增反应。对扩增产物进行电泳检测。对扩增效果合格的产物进行虾碱性磷酸酶 (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) 处理,以及 T7DNA 聚合酶转录,并进行碱基特异性酶切,运用 Sequenom 公司的 MassARRAY 相对分子质量阵列技术平台检测。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 统计,计数资料采用 Pearson 卡方检验,若单元期望频数 < 4 时采用 Fisher 精确检验;计量资料做正态性检验,若为偏态分布资料,采用中位数表示,并用非参数检验;若为正态分布,则检验方差齐性,若方差不齐,采用校正 Student' *t* 检验,若方差齐,采用 Student' *t* 检验。

表 2 两组患者样本 IL-6 基因甲基化程度比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Comparison of methylation degree of IL-6 between two groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	IL-6_1_CpG_1	IL-6_1_CpG_2.3	IL-6_1_CpG_4.5.6	IL-6_2_CpG_1.2	IL-6_2_CpG_3
血瘀证	0.672 $\pm$ 0.092 65	0.622 0 $\pm$ 0.075 19	0.708 0 $\pm$ 0.079 96	0.188 3 $\pm$ 0.009 46	0.076 7 $\pm$ 0.004 22
非血瘀证	0.615 $\pm$ 0.046 82	0.541 7 $\pm$ 0.076 96	0.618 3 $\pm$ 0.044 98	0.186 7 $\pm$ 0.008 43	0.070 0 $\pm$ 0.005 77

### 3 讨论

本研究采用重亚硫酸盐处理后 Sequenom 质谱检测技术,对冠心病血瘀证患者 IL-6 基因启动子区甲基化状态进行研究,发现了组间存在差异趋势的位点,属于大样本量验证前常规小样本量的预实验,

$P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基因组 DNA 提取质量标准检测** 提取 DNA 的纯度与浓度符合后续重亚硫酸盐处理对 DNA 的要求。见表 1。

表 1 待测样本 DNA 纯度与浓度检测

Table 1 DNA purity and concentration of samples to be tested

No.	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
1	53.6	1.88	1.24
2	34.0	1.84	0.87
3	124.1	1.86	1.86
4	272.3	1.83	1.87
5	82.4	1.79	1.19
6	63.4	1.91	1.61
7	70.2	1.80	0.98
8	115.6	1.81	1.64
9	34.1	1.94	1.12
10	28.2	1.92	0.86
11	167.6	1.65	1.06
12	142.0	1.80	1.39

**2.2 两组患者 IL-6 基因启动子区甲基化水平比较**

IL-6 基因转录起始位点前 2 000 bp 内两段序列中存在 36 个 CpG 位点,血瘀证组与非血瘀证组样本甲基化程度数据符合正态分布,转录起始位点前 -1 118 bp 至 -826 bp 序列 (即 IL-6\_1) 中 7 个 CpG 位点甲基化程度血瘀证组存在高于非血瘀证组的趋势,在方差齐的情况下独立样本 *t* 检验显示组间差异暂无统计学意义;而 IL-6 基因转录起始位点前 -1 471 bp 至 -1 184 bp 序列 (即 IL-6\_2) 中 4 个 CpG 位点甲基化程度血瘀证组与非血瘀证组之间的差异尚不明显。见表 2。

在甲基化系统研究方法中起到承上启下的作用,其技术要点及结果的分析方法十分重要。以下对甲基化系统研究方法、预试验的技术及结果分析以及甲基化的中医研究适宜范围总结如下。

DNA 甲基化,在真核细胞中只发生在胞嘧啶第

5 位碳原子上,且主要发生在 CpG 双核苷酸序列的胞嘧啶上。DNA 的甲基化修饰使 DNA 双螺旋凹槽 (DNA 结合蛋白的部位) 的构象发生改变,影响其与 DNA 结合蛋白的结合能力。若探求某 mRNA 转录水平的变化是否由 DNA 甲基化修饰这一表观遗传机制调控,可以通过比较目的基因在两组间甲基化程度是否存在差异而进行推测。目前,检测甲基化的方法主要包括特定位点检测的亚硫酸氢钠修饰后测序法,焦磷酸测序,Sequenom 质谱检测,高通量筛选的芯片检测或测序 (全基因组或 RRBS),分析甲基化相对比例的 LC-MS/MS 液相色谱串联质谱分析。DNA 甲基化的临床研究方法一般可概括为 ①高通量小样本大范围筛选差异位点;②选择一种特定位点检测方法,扩大样本对筛选的差异位点进行验证;③分训练组和验证组的队列研究构建用于诊断、判断预后、预测药物反应性或安全性的生物标志物模型;④对验证的差异位点相关基因进行生物信息学分析,结果多个层面构建网络,并通过动物、细胞实验进行功能学验证。

本试验采用 Sequenom 质谱检测的方法,即首先对 DNA 进行重亚硫酸盐处理,将变性 DNA 中未甲基化的胞嘧啶经多步反应转化为尿嘧啶,甲基化的胞嘧啶仍然保持不变;处理后的 DNA 经目的基因的特定引物 PCR 扩增,尿嘧啶则转变为胸腺嘧啶,而胞嘧啶与胸腺嘧啶在质谱检测中飞行时间不同,如此甲基化和未甲基化的胞嘧啶得以区分。运用本方法需注意的是,在查询到目的 DNA 转录起始位点前 2 000 bp 的序列后目标序列的确定和引物设计的要点,①一般排除本研究未考虑 IL-6 基因转录起始位点前 116 bp 的 5'UTR,因为 5'UTR 序列中一般不存在甲基化调控。②考虑启动子的位置及目标序列的长度,启动子区域的位置可以通过 UCSC 数据库组蛋白修饰及 DNA 酶敏感情况进行推测,也可以通过 GeneCards 网站 (<http://www.genecards.org/>) 查找转录因子结合位点进行推测,但甲基化修饰不仅存在于启动子区域,还可能存在于启动子区域附近,本方法 PCR 限制待测序列长度在 300 bp 左右,因此需综合考虑扩增序列位置,待测序列最好在一定程度上包含启动子及其附近区域。③考虑 CpG 位点的分布,因为 CpG 分布密集区域一般处于低甲基化,并非调控序列,所以一般不选择目标序列 CpG 位点过于密集的位置。④参考以往文献研究的结果,如对于 IL-6 基因,文献提示该基因 -611, -613, -557, -575 位点的 CpG 位点血瘀

证与非血瘀证组间存在差异,在经费有限的情况下则可重点考察文献报道的位点。运用本方法分析结果时需要注意,①质谱检测平台报告甲基化程度精准度较高的测量范围在 50% ~ 95%,分析结果时应结合技术特点,如本试验 IL-6-2 的甲基化程度两组均值都低于 50%,则需考虑精准度影响检测结果的问题,在未采用其他甲基化检测方法前不可轻易下结论。②结果与预期相反时应考虑,检测结果受样本量小所致的个体差异影响;甲基化修饰存在于目的序列以外的其他 CpG 位点;转录水平的差异由组蛋白修饰等其他方式调节。

DNA 甲基化在中医研究领域的适宜范围应考虑甲基化的调控特点与所要研究中医学问题之间的关系。中心法则中, DNA 将遗传信息转录到 mRNA, mRNA 通过 transfer RNA 翻译成蛋白质。在 DNA 转录为 mRNA 层面的调控机制主要包括 DNA 甲基化、组蛋白磷酸化或乙酰化等。mRNA 可与 miRNA 碱基互补配对而实现调控<sup>[22]</sup>, miRNA 又受内源性干扰 RNA 调控<sup>[23-24]</sup>,内源性干扰 RNA 包括 lncRNA<sup>[25-26]</sup>与 circRNA<sup>[27-28]</sup>。可见,表观遗传学水平的调控方式多样,而根据中医学的基本特点与证候的特征选择研究层面则至关重要。DNA 甲基化本身是可逆的,受环境因素改变的影响,且在脊椎动物中甲基化 CpG 在整个基因组中均有分布,又可扩展到涉及遗传物质适应性选择的基因组印记, X 染色体失活<sup>[29-32]</sup>,为研究遗传因素决定并受环境影响的体质,疾病发生发展过程中动态演变的证候提供了新视野。

#### [参考文献]

- [1] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. The Lancet, 2013, 380(9859): 2095-2128.
- [2] 杜莹, 贾连群, 王列, 等. 冠心病心绞痛证型分布及辨证规律系统综述 [J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(3): 1-2, 11.
- [3] 毕颖斐, 毛静远, 张伯礼. 基于文献的冠心病中医证型地域性分布特征研究 [J]. 中医杂志, 2012, 53(3): 228-230.
- [4] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. New Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [5] 丘瑞香, 罗致强, 杨守玉, 等. 冠心病血瘀证微循环障碍与气病致瘀的研究 [J]. 中医杂志, 1991, 36(10): 36-38.

- [6] 胡庆福,陈泽霖,陈依萍,等. 血瘀证患者红细胞膜流动性的观察[J]. 中西医结合杂志,1989,9(7):405-406.
- [7] 任建勋,刘建勋,林成仁,等. 冠心病不稳定性心绞痛患者气滞血瘀证和气虚血瘀证的生物学基础比较分析[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(4):352-356.
- [8] 宋庆桥,胡元会,商秀洋,等. 冠心病稳定型心绞痛血瘀证患者 tPAI-1、sICAM-1 及 MMP-9 的表达变化[J]. 中国中医急症,2011,20(9):1377-1380.
- [9] 李雪峰,蒋跃绒,吴彩凤,等. 冠心病血小板功能蛋白与证候相关性研究[J]. 中国分子心脏病学杂志,2009,9(6):326-331.
- [10] 陈可冀,薛梅,殷惠军. 血小板活化与冠状动脉粥样硬化性心脏病和血瘀证的关系[J]. 首都医科大学学报,2008,29(3):266-269.
- [11] 吴锦,陈可冀,裴正礼,等. 冠心病血瘀证患者血小板扫描电镜形态观察[J]. 中国医药学报,1990,5(1):18-20.
- [12] 吴锦,陈可冀. 冠心病血瘀证患者血小板超微结构和功能的研究[J]. 中西医结合杂志,1988,8(10):593-595.
- [13] 翁维良,姜成田,崔晶,等. 冠心病血瘀证患者体外血栓形成试验的观察[J]. 中西医结合杂志,1986,6(2):82-83.
- [14] 褚瑜光,李军,宋庆桥,等. 冠心病患者血栓弹力图与中医血瘀证的相关性研究[J]. 北京中医药,2015,34(9):683-685.
- [15] 刘剑刚,许勇钢,苏庆民. 冠心病血瘀证的 T 细胞亚群、血脂和血液流变性改变及其相互关系[J]. 中国微循环杂志,1999,3(4):254.
- [16] 廖奕华. 冠心病血瘀证患者免疫功能的初步研究[J]. 辽宁中医药杂志,1998,25(2):58.
- [17] 徐浩,史大卓,殷惠军,等. “瘀毒致变”与急性心血管事件:假说的提出与临床意义[J]. 中国中西医结合杂志,2008,28(10):934-938.
- [18] Anderson J L, Adams C D, Antman E M, et al. 2012 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACCF/AHA 2007; Guidelines for the Management of Patients with Unstable; Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(23): E179-E347.
- [19] 血瘀证研究国际会议. 血瘀证诊断参考标准[J]. 中西医结合杂志,1989,9(2):111.
- [20] 王阶,陈可冀,翁维良,等. 血瘀证诊断标准的研究[J]. 中西医结合杂志,1988,8(10):580-589.
- [21] 付长庚,高铸炜,王培利,等. 冠心病血瘀证诊断标准研究[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(9):1285-1286.
- [22] Thomson D W, Dinger M E. Endogenous microRNA sponges:evidence and controversy [J]. Nat Rev Genet, 2016,17(5):272-83.
- [23] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. Cell,2011,146(3):353-358.
- [24] Tay Y, Rinn J, Pandolfi P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. Nature,2014,505(7483):344-352.
- [25] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. Cell, 2011,147(2):358-369.
- [26] 王阶,姚魁武,刘咏梅,等. 冠心病血瘀证转录组学研究——病证结合生物标志物研究思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(19):1-5.
- [27] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. Nature,2013,495(7441):333-338.
- [28] Conn S J, Pillman K A, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs [J]. Cell,2015,160(6):1125-1134.
- [29] Razin A, Riggs A D. DNA methylation and gene function [J]. Science,1980,210(4470):604-610.
- [30] Schubeler D. Function and information content of DNA methylation [J]. Nature,2015,517(7534):321-326.
- [31] Smith Z D, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development [J]. Nat Rev Genet,2013,14(3):204-220.
- [32] ZHU H, WANG G, QIAN J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation [J]. Nat Rev Genet,2016,17(9):551-565.

[责任编辑 张丰丰]