

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.008

p21^{Waf1/Cip1} 甲基化调控细胞衰老张爱红¹, 郑全辉^{2△}, 郑茗予³, 郑爱华¹

(1. 河北省唐山市工人医院 ICU 室 063000; 2. 河北联合大学基础医学院免疫室, 河北唐山 063000; 3. 河北省唐山市第一中学 063000)

[摘要] **目的** 探讨 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化改变对细胞衰老进程的影响。**方法** 采用克隆、测序的方法定量检测 p21^{Waf1/Cip1} 启动子在人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)衰老过程中的甲基化改变; RT-PCR 和 Western blot 检测 p21^{Waf1/Cip1} 的表达; 采用 5-氮杂-2-脱氧胞苷去甲基化处理 2BS 细胞, 通过 MTT 和 β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老。**结果** p21^{Waf1/Cip1} 启动子在年轻 2BS 中, CpG 甲基化的发生率为 1.25%; 在中年细胞中为 27.27%; 在衰老 2BS 细胞中为 0.64%; p21^{Waf1/Cip1} 的表达在细胞衰老过程中呈波动性变化, 先增加, 后降低, 到细胞开始衰老时, 表达又显著增加; 中年 2BS 细胞经 5-氮杂-2-脱氧胞苷处理后, p21^{Waf1/Cip1} 表达增加, 细胞增殖速率较正常中年细胞显著降低, 同时细胞 β-半乳糖苷酶染色阳性率增加。**结论** p21^{Waf1/Cip1} 去甲基化加速细胞衰老。

[关键词] 细胞衰老; p21^{Waf1/Cip1}; DNA 甲基化; 5-氮杂-2-脱氧胞苷**[中图分类号]** R339.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1035-04Cellular senescence is regulated by p21^{Waf1/Cip1} methylationZhang Aihong¹, Zheng Quanhui^{2△}, Zheng Mingyu³, Zheng Aihua¹

(1. Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Tangshan No. 1 High School, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of p21^{Waf1/Cip1} methylation changes on the process of cellular senescence. **Methods** Bisulfite sequencing was used to analyze the methylation changes of p21^{Waf1/Cip1} in the process of cellular senescence; p21^{Waf1/Cip1} expression was detected by RT-PCR and Western-blot; Middle-aged 2BS cells was treated by 5-aza-CdR and cellular senescence was detected by MTT and SA-β-Gal staining. **Results** Bisulfite sequencing analysis of p21^{Waf1/Cip1} promoter showed that CpGs were methylated by 1.25% in the young 2BS cells, by 27.27% in the middle-aged 2BS cells, while only by 0.64% in the senescent cells. The expression of p21^{Waf1/Cip1} was low in the young(28 PD) 2BS cells, it increased first(35 PD) but decreased later in the middle-aged(42 PD) cells. In the senescent 2BS cells, p21^{Waf1/Cip1} expression was further increased. 5-aza-CdR treatment resulted in decreased growth rate but increased β-Gal staining of middle-aged 2BS cells. **Conclusion** The process of cellular senescence is regulated by the status of p21^{Waf1/Cip1} methylation, and p21^{Waf1/Cip1} demethylation accelerates cellular senescence.

[Key words] cellular senescence; p21^{Waf1/Cip1}; DNA methylation; 5-aza-CdR

体外培养的正常人二倍体细胞在经历一定的细胞倍增周期之后, 增殖能力下降, 最后停止增殖的状态称为细胞衰老^[1]。细胞衰老是生物整体衰老的基础, 并且是进化过程中形成的机体预防肿瘤发生的手段之一。目前研究表明, 细胞衰老是由多种分子机制调控的主动过程, 其中, 表观遗传学调控包括 DNA 甲基化, 组蛋白的甲基化与乙酰化修饰以及微小 RNA 等均在细胞衰老过程中发挥重要作用^[2]。DNA 甲基化是哺乳类动物一种重要的表观遗传修饰方式, 主要发生在 CpG 序列中的 C 碱基上。从总体上看, 细胞衰老过程中 DNA 甲基化水平是逐渐下降的, 并且其下降速度与物种寿命呈负相关^[3]。然而, 对于特异基因在细胞衰老过程中的甲基化改变及其对细胞衰老的影响, 目前并不十分清楚。

p21^{Waf1/Cip1} 是一种重要的细胞周期调节基因, 通过抑制细胞周期蛋白 A, 细胞周期蛋白 E-细胞周期蛋白依赖性激酶 2 和细胞周期蛋白 D-细胞周期蛋白依赖性激酶 4 的活性, 抑制 pRb 蛋白的磷酸化, 导致细胞不能进入 S 期而引起细胞增殖受阻^[4]。p21^{Waf1/Cip1} 基因启动子富含 CpG, 提示其表达可能受 DNA 甲基化的调控。为此, 本研究以人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)为研究对象, 深入探讨了 p21^{Waf1/Cip1} 在细胞衰老过程

中的甲基化改变及 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化对其表达和细胞衰老的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 2BS 细胞购自北京天坛生物制品研究所; 亚硫酸氢钠、氢醌、5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-CdR)、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma 公司; β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)购自美国 Invitrogen 公司; RIPA 蛋白裂解液、苯甲基磺酰氨(PMSF)、蛋白浓度测定试剂盒购自北京百泰克公司; 鼠抗人 p21^{Waf1/Cip1}(sc-6264)一抗、β-actin 一抗(sc-1616)购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中山公司; Western blot 化学发光底物购自 Pierce 公司; 引物由上海生物工程服务公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 2BS 细胞在含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基, 饱和湿度, 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养。细胞融合度达到 90%~95% 后, 进行 1:2 传代。2BS 细胞平均代龄为 55~60 PDs(倍增次数), 30 PDs 以前为年轻细胞, 30~50 PDs 为中年细胞, 55 PDs 以后为衰老细胞^[5]。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 将不同代龄的 2BS 细胞收集于

预冷的 PBS 中, 4 °C 1 500 g 离心收集细胞。按 1×10^6 cells/500 μ L 加入基因组 DNA 抽提缓冲液, 37 °C 1 h, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 μ g/mL, 50 °C 3 h, 不时轻摇。等体积酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 于 OD 260 测定 DNA 浓度。

1.2.3 亚硫酸氢钠处理基因组 DNA 将 1 μ g DNA 用三蒸水稀释至 50 μ L, 加入 5 μ L 3 mol/L NaOH(终浓度: 0.275 mol/L), 37 °C 孵育 15 min。加入 520 μ L 新鲜配制的 3 mol/L 亚硫酸氢钠 pH 5.0, 30 μ L 10 mmol/L 氢醌, 混匀后 50 °C 孵育 16 h。使用澳大利亚 Qiaquick 胶纯化试剂盒对亚硫酸氢钠处理过的 DNA 进行纯化后于 -20 °C 保存。

1.2.4 甲基化特异的 PCR(MSP) 用以上亚硫酸氢钠处理过的基因组 DNA 作为模板, 针对 p21^{Waf1/Cip1} 启动子 CpG 岛设计引物, 每条引物都包含 CpG 二核苷酸序列: p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化引物: 上游序列为: 5'-TTG TAG TAC GCG AGG TTT CG-3', 下游序列为: 5'-CAA CTC AAC GCG ACC CTA AT-3', PCR 产物长度为 190 bp; p21^{Waf1/Cip1} 启动子非甲基化引物: 上游序列为: 5'-TTT TGG GAT TGG TTG GTT TG-3', 下游序列为: 5'-ACA CCC AAC TCC AAC TCC AC-3'; PCR 产物长度为 235 bp。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 29 个循环。PCR 产物经 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, EB 染色, Image Master VDS 成像系统(Pharmacia 公司)照像。

1.2.5 克隆测序 首先, 用以上亚硫酸氢钠处理过的基因组 DNA 作模板, 分别针对 p21^{Waf1/Cip1} 启动子 CpG 岛设计引物, 使每条引物不包含 CpG 二核苷酸序列, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件同 MSP。p21^{Waf1/Cip1} 启动子上游引物序列为: 5'-GGG AGG AGG GAA GTG TTT TT-3'; 下游引物序列为: 5'-ACA ACT ACT CAC ACC TCA ACT-3'。PCR 产物经胶纯化后与 Promega 公司的 pGEM-T Easy 载体在 4 °C 连接过夜。取 2 μ L 连接产物, 转化 JM109 感受态细胞, 每一代龄 2BS 细胞至少挑取 10 个克隆, 提取质粒测序, 以甲基化 CpG(mCpGs) 占所测总 CpGs 的百分含量, 作为 DNA 甲基化的发生率。

1.2.6 RT-PCR 法检测 以澳大利亚 Qiagen 公司 RT mini kit 提取不同代龄 2BS 细胞总 RNA 并进行反转录。PCR 反应采用如下条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 27 个循环。p21^{Waf1/Cip1} 上游序列为: 5'-GAG GAA GAC CAT GTG GAC-3'; 下游序列为: 5'-CAG CAC TCT TAG GAA CCT C-3'; GAPDH: 上游序列为: 5'-CGA GTC AAC GGA TTT GGT GGT AT-3'; 下游序列为: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GAA GAC-3'。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后进行密度扫描分析。

1.2.7 Western blot 检测 收集细胞, 加入适量(50~300 μ L)RIPA 蛋白裂解液, 冰上裂解 20 min 后离心 15 min, 取 10 μ L 上清液测定蛋白含量。取等量蛋白(10 μ g)进行 SDS-PAGE 胶电泳(125 V, 30 min; 160~180 V, 45~60 min)。电泳至溴酚蓝迁移至凝胶底部时结束, 取出凝胶进行湿式转印, 条件为 250 mA 恒流转印 60~90 min。将 NC 膜用 TBST(20 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)漂洗 5 min。室温用含 5% 低脂奶粉的 TBST 封闭, 加入 p21^{Waf1/Cip1} 一抗, 浓度为 1 μ g/mL, 4 °C 过夜。室温下用 TBST 漂洗 6 次, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG, 室温下孵育 1 h, TBST 漂洗 6 次, 加入底物 A、B 显色 5 min, 曝光。Image Master VDS(Amersham Pharmacia 公司)软件分析信号光密度。

1.2.8 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR 处理 将中年(39 PD)2BS 细胞接种于新培养瓶, 密度为 10^4 cells/cm²。培养过夜后, 加入 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR, 终浓度为 1 μ mmol/L, 每 24 h 更换含有新鲜药物的培养液, 对照组细胞采用等量 DMSO 处理。连续处理 9 d(3 PDs)后收获细胞, 检测相关指标。

1.2.9 MTT 法测定 5-aza-CdR 处理对细胞生长的影响 将 2BS 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔细胞数 2.5×10^3 个, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。分别于 20、44、68、92、116、140 h 和 164 h 加入 25 μ L MTT, 继续培养 4 h, 吸净培养液, 每孔加 200 μ L DMSO, 放置 5~10 min 后, 用酶标仪于 570 nm 处测定各孔的光吸收值。以培养时间为横轴, 平均光吸收值为纵轴, 绘制生长曲线, 比较正常中年细胞与衰老细胞和 5-aza-CdR 处理中年细胞的增殖速率。

1.2.10 衰老相关的 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色 细胞融合达到 70%~80% 状态时, 用 PBS 洗 2 遍, 室温下以 3% 甲醛固定 5 min, 加入新鲜配置的 SA- β -Gal 染色液, 37 °C、无 CO₂ 条件下温浴 16 h, 倒置相差显微镜下进行观察、拍照, 随机选取 5 个视野, 计数分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 p21^{Waf1/Cip1} 在 2BS 细胞衰老过程中的甲基化改变 通过 DNA 甲基化软件分析, 选取 p21^{Waf1/Cip1} 启动子上 CpG 岛作为分析对象, 见图 1。分别提取年轻(28 PD)、中年(42 PD)和衰老(58 PD)2BS 细胞基因组 DNA, 经亚硫酸氢钠处理后进行 PCR 扩增。PCR 产物克隆、测序结果显示, p21^{Waf1/Cip1} 启动子在年轻细胞中, CpG 甲基化的发生率为 1.25%; 在中年细胞中为 27.27%; 在衰老 2BS 细胞中为 0.64%, 见表 1。

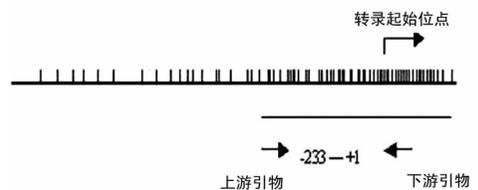


图 1 p21^{Waf1/Cip1} 基因启动子上 CpG 岛所在基因位点

表 1 p21^{Waf1/Cip1} 启动子在 2BS 细胞衰老过程中的甲基化改变

代龄(PD)	克隆数	总 CpGs	甲基化 CpGs	甲基化 CpGs/总 CpG%
28	10	240	3	1.25
42	11	264	72	27.27
58	13	312	2	0.64

2.2 p21^{Waf1/Cip1} 在 2BS 细胞衰老过程中的表达变化 启动子甲基化是抑制基因表达的一种主要的表观遗传学方式, 为了解 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化对其表达的影响, 作者采用 RT-PCR 和 Western-blot 法分别检测连续培养至细胞开始衰老过程时 p21^{Waf1/Cip1} 的表达变化。RT-PCR 检测结果显示, p21^{Waf1/Cip1} 的表达从年轻(28 PD)到中年(33 PD)2BS 细胞中变化不明显, 但在中年(38~46 PD)p21^{Waf1/Cip1} 的表达显著降低, 至细胞开始衰老时(55 PD)p21^{Waf1/Cip1} 的表达又显著增加, 见图 2a。

p21^{Waf1/Cip1} 在蛋白水平的表达变化与 RT-PCR 结果一致,表现为在中年 2BS 细胞中表达降低,而在细胞开始衰老时表达又显著增加,见图 2b 和 2c。以上结果提示,p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化调控 p21^{Waf1/Cip1} 在细胞衰老过程中的表达。

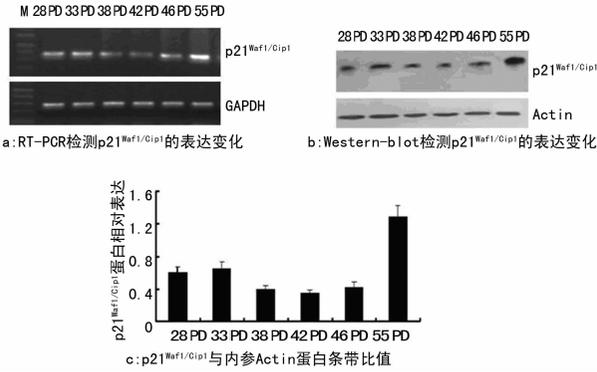


图 2 RT-PCR 和 Western blot 检测不同代龄 2BS 细胞中 p21^{Waf1/Cip1} 的表达变化

2.3 p21^{Waf1/Cip1} 启动子去甲基化增加 p21^{Waf1/Cip1} 的表达 为进一步验证 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化对其表达的影响,采用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR 连续处理中年 (39 PD) 2BS 细胞 9 d (3 PDs),甲基化特异的 PCR 结果显示,5-aza-CdR 处理组 2BS 细胞 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化与对照处理组比较显著降低,见图 3a 和 3b。但是,与对照处理组比较,5-aza-CdR 处理组 2BS 细胞中 p21^{Waf1/Cip1} 的表达显著增加,见图 3c 和 3d。

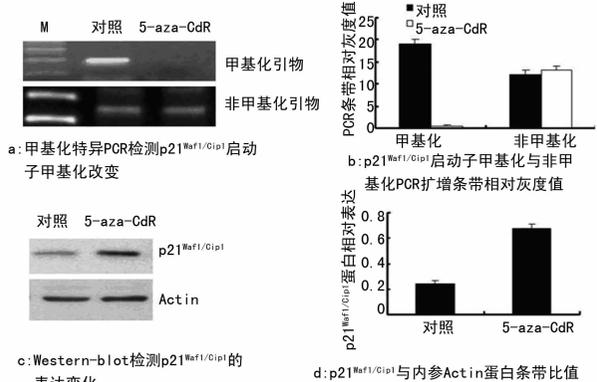


图 3 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR 处理中年 2BS 细胞 p21^{Waf1/Cip1} 的甲基化和蛋白表达变化

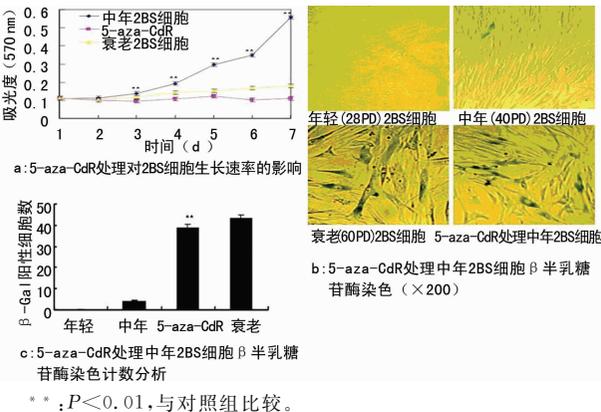


图 4 5-aza-CdR 处理加速中年 2BS 细胞的衰老

2.4 p21^{Waf1/Cip1} 启动子去甲基化加速细胞衰老 检测 5-aza-CdR 处理对中年 2BS 细胞生长速率的影响,发现与对照组 2BS 细胞相比,5-aza-CdR 处理组中年 2BS 细胞的生长速度显著降

低 ($P < 0.01$),其增殖曲线与衰老细胞相似,显示明显的生长阻滞,见图 4a。而且,5-aza-CdR 处理中年 2BS 细胞出现明显的衰老表型,衰老相关 β 半乳糖苷酶染色阳性细胞数较对照处理组显著增加 ($P < 0.01$),见图 4b 和 4c。

3 讨论

3.1 p21^{Waf1/Cip1} 参与细胞衰老调控 细胞衰老是多基因控制的细胞生理过程,主要表现为细胞增殖能力的逐渐丧失,细胞体积增大和衰老相关的 β 半乳糖苷酶活性显著增加^[6]。研究证实,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21^{Waf1/Cip1} 在衰老细胞中表达显著增加,并对细胞衰老过程发挥重要的调控作用^[7]。p21^{Waf1/Cip1} 能够灭活由众多细胞周期蛋白及其激酶组成的复合物,进而导致非磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白 Rb 表达增加并通过结合 E2F 转录因子家族蛋白,导致细胞周期阻滞和细胞衰老^[8-9]。

3.2 DNA 甲基化调节细胞衰老过程中 p21^{Waf1/Cip1} 的表达 作为表观遗传学调控的重要方式之一,DNA 甲基化主要通过以下 2 种机制发挥转录抑制作用。首先,甲基化的 CpG 序列阻碍转录因子与 DNA 的相互结合,目前已知的该类转录因子主要有 E2F、NF- κ B、AP-2 等;另外,甲基化的 CpG 与甲基化结合蛋白结合,通过改变染色质结构,发挥直接转录抑制作用^[10]。在此研究中,作者发现 p21^{Waf1/Cip1} 启动子在年轻 2BS 细胞中低甲基化,中年细胞中甲基化增加,而在衰老细胞中甲基化又显著降低。与 DNA 甲基化对基因表达的抑制效果一致,p21^{Waf1/Cip1} 在 2BS 细胞中的表达从年轻 (28 PD) 到中年 (46 PD) 总体呈下降趋势。但从年轻 (28 PD) 到中年 (33 PD) 阶段,p21^{Waf1/Cip1} 的表达并没有降低,而只有到 38 PD 时,p21^{Waf1/Cip1} 的表达才显著降低并且一直持续到 46 PD,表明 p21^{Waf1/Cip1} 启动子在中年 2BS 细胞中的甲基化是一个缓慢发生的过程。当细胞开始衰老时 (55 PD),p21^{Waf1/Cip1} 的表达又明显增加,这与 p21^{Waf1/Cip1} 启动细胞衰老的作用是一致的。

3.3 p21^{Waf1/Cip1} 去甲基化加速细胞衰老 采用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR 处理中年 2BS 细胞,本研究观察到 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化程度显著降低,表达增加,同时,与试剂对照处理组比较,5-aza-CdR 处理中年 2BS 细胞出现明显的细胞周期阻滞,细胞体积增大和衰老相关 β 半乳糖苷酶活性的增强。此结果进一步证实,p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化调控细胞衰老的进程。以往研究证实,细胞衰老进程伴随着 DNA 总体甲基化水平的不断降低,而体外培养细胞的去甲基化处理可显著缩短细胞的传代次数^[11]。然而,对于细胞衰老过程中 DNA 甲基化对特异基因的表达调控所知甚少,此研究结果表明,细胞衰老过程中 DNA 甲基化的改变不是一个随机的事件,而是伴随着细胞衰老相关 p21^{Waf1/Cip1} 基因甲基化的波动性改变,p21^{Waf1/Cip1} 启动子去甲基化加速细胞衰老的发生。

对于细胞衰老过程中 p21^{Waf1/Cip1} 启动子甲基化的建立和维持机制目前还不清楚。有研究表明,DNA 甲基化酶 1 (DNMT1) 与其他转录因子相互作用,发挥对特异基因的初始甲基化作用^[12]。另外,Fatemi 等^[13] 发现对于已发生少量甲基化的 DNA 序列,DNMT1 能催化其他未甲基化的 DNA 迅速发生甲基化。而 Brenner 等^[14] 发现 Myc 蛋白抑制 p21^{Waf1/Cip1} 的表达与 Myc 和 DNMT3a 相互作用所致 p21^{Waf1/Cip1} 启动子的异常甲基化有关。DNMT1 在细胞衰老过程中表达降低,而 DNMT3a 在中年细胞中表达显著增加^[15]。因此,DNMT1 和 (或)DNMT3a 可能参与了细胞衰老过程中 p21^{Waf1/Cip1} 启动子的甲基化调控,然而,其确切分子机制仍需大量实验加以证明。

总之,本研究发现,细胞衰老过程中 DNA 甲基化通过调节 p21^{Waf1/Cip1} 的表达调控细胞衰老进程,p21^{Waf1/Cip1} 启动子在中年细胞中高甲基化并抑制其表达,从而发挥延缓细胞衰老的作用,而 p21^{Waf1/Cip1} 启动子去甲基化增加其表达,迅速启动细胞衰老的发生。该研究结果为认识表观遗传学对细胞衰老的调控提供了新的线索。

参考文献

- [1] Evan GI, d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence; hot or what? [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(1): 25-31.
- [2] D'Aquila P, Rose G, Bellizzi D, et al. Epigenetics and aging[J]. *Maturitas*, 2013, 74(2): 130-136.
- [3] 尹献辉,刘佳,李雪芹,等.衰老的表观遗传机制研究进展[J]. *细胞生物学学报*, 2013, 35(7): 1027-1034.
- [4] Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, et al. CDK inhibitors(p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(19): 3599-3610.
- [5] 张宗玉,范新青,童坦君.人胚肺二倍体成纤维细胞端区长度的代龄变化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1997, 13(1): 43-45.
- [6] Berdasco M, Esteller M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011 [J]. *Aging Cell*, 2012, 11(2): 181-186.
- [7] Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, et al. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo [J]. *Cancer Res*, 2010, 22(5): 9381-9390.
- [8] Ioachim E. Expression patterns of cyclins D1, E and cyc-

lin-dependent kinase inhibitors p21^{Waf1/Cip1}, p27kip1 in colorectal carcinoma; correlation with other cell cycle regulators(pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features [J]. *Int J Clin Pract*, 2008, 62(11): 1736-1743.

- [9] Shi X, Tian B, Liu L, et al. Rb protein is essential to the senescence-associated heterochromatic foci formation induced by HMGA2 in primary WI38 cells [J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40(8): 391-398.
- [10] Mason K, Liu Z, Aguirre-Lavin T, et al. Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. [J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 134(1-2): 45-55.
- [11] Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(10): 1018-1027.
- [12] Zhang Q, Wang HY, Marzec M, et al. STAT3- and DNA-methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(19): 6948-6953.
- [13] Fatemi M, Hermann A, Gowher H, et al. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(20): 4981-4984.
- [14] Brenner C, Deplus R, Didelot C, et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor [J]. *EMBO J*, 2005, 24(2): 336-346.
- [15] Zhang W, Ji W, Yang J, et al. Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence [J]. *Life Sci*, 2008, 83(13-14): 475-480.

(收稿日期:2014-10-14 修回日期:2014-12-19)

(上接第 1034 页)

- [3] Ateshrang A, Ochs BG, Ludemann M, et al. Fibula and tibial fusion with cancellous allograft vitalised with autologous bone marrow; first result for infected tibial non-union [J]. *Arch Orthc Trauma Surg*, 2009, 129(1): 97-104.
- [4] Ma T, Shang BC, Tang H, et al. Nano-hydroxyapatite/chitosan/kojic glucomannan scaffolds loaded with cationic liposomal vancomycin; preparation, in vitro release and activity against *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2011, 22(12): 1669-1681.
- [5] Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis [J]. *Am Fam Physician*, 2011, 84(9): 1027-1033.
- [6] Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, et al. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics [J]. *J Bone Jt Surg Br*, 1992, 74(4): 600-607.
- [7] 赵欣,王德平.纳米羟基磷灰石作为药物载体材料的研究进展 [J]. *材料导报*, 2010, 24(12): 116-120.

- [8] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, et al. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes [J]. *Biomed Mater Res*, 2000, 51(4): 586-595.
- [9] Rey-Rico A, Silva M, Couceiro J, et al. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2 [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21: 317-340.
- [10] Anusha A, Menon D, Nair S, et al. A molecular receptor targeted, hydroxyapatite nanocrystal based multimodal contrast agent [J]. *Biomaterials*, 2013, 31(9): 2606-2616.
- [11] 樊国栋,张春梅.聚乳酸在医学领域应用研究进展 [J]. *科技导报*, 2010, 31(19): 103-107.
- [12] 许锋,詹玉林,宋兴华.骨形态发生蛋白 2 基因治疗骨缺损研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 32(11): 1612-1614.

(收稿日期:2014-10-26 修回日期:2014-12-10)