

维生素 D 缺乏和 DNA 甲基化在年龄相关性黄斑变性中的研究现状

张博,白洁,董丽,刘平,郑轶

基金项目:黑龙江省博士后资助经费(No. LBH-Z15154)

作者单位:(150001) 中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院眼科

作者简介:张博,哈尔滨医科大学在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:郑轶,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. yizhengkitty@163.com

收稿日期:2016-08-18 修回日期:2016-10-31

Advances in vitamin D deficiency and DNA methylation in age - related macular degeneration

Bo Zhang, Jie Bai, Li Dong, Ping Liu, Yi Zheng

Foundation item: Post-doctoral Funding for Heilongjiang Province (No. LBH-Z15154)

The First Eye Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yi Zheng. The First Eye Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. yizhengkitty@163.com

Received:2016-08-18 Accepted:2016-10-31

Abstract

• Age-related macular degeneration (AMD) is one of the main diseases in the world leading to vision loss in the elderly, and is a multi-factorial and multi-mechanism mediated chronic degenerative eye disease. The exact pathogenesis of AMD is still not clear, and many studies found that age, genetic factors, nutritional imbalance, epigenetics, oxidative stress, a variety of complement factors activation and inflammatory reaction were involved in the pathogenesis. Recent studies have found that vitamin D levels and DNA methylation were closely related to AMD. Thus, a simple generalization of vitamin D deficiency and DNA methylation in the pathogenesis of AMD were made.

• KEYWORDS: age-related macular degeneration; vitamin D deficiency; DNA methylation

Citation: Zhang B, Bai J, Dong L, et al. Advances in vitamin D deficiency and DNA methylation in age - related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(12):2225-2228

摘要

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,

AMD)是世界范围内中老年人视力丧失的主要疾病之一,是多病因多因素多机制介导的慢性退行性眼科疾病。AMD 确切发病机制仍不明确,众多研究发现年龄、遗传、营养失衡、表观遗传学、氧化应激、补体激活和炎症反应等多种因素参与其发病。近年来研究发现机体维生素 D 水平和 DNA 甲基化与 AMD 发病有一定关系。以下将维生素 D 缺乏和 DNA 甲基化在 AMD 发病机制的作用进行简要综述。

关键词:年龄相关性黄斑变性;维生素 D 缺乏;DNA 甲基化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.12.13

引用:张博,白洁,董丽,等. 维生素 D 缺乏和 DNA 甲基化在年龄相关性黄斑变性中的研究现状. *国际眼科杂志* 2016;16(12):2225-2228

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD),为黄斑区结构退行性改变,分为干性和湿性。世界 60 岁以上老年人中就有 10% 的人深受 AMD 损害视力的影响,约有 2%~4% 的 65 岁以上老年人患有晚期 AMD,80 岁以上比例上升到约 10%~12%。大约 1%~3% 的 60 岁以上老年人患有新生血管性 AMD,同时干性 AMD 所占比例是 1%~2%^[1-2]。现国际公认年龄、吸烟、饮食、体重指数、高血压、黄斑长期慢性光损伤等是 AMD 致病高危因素。目前关于 AMD 发病发展的具体病因机制仍不确切,但是营养失衡方面的维生素 D 缺乏和相关基因的 DNA 甲基化在 AMD 发病机制的作用日益受到重视。

1 维生素 D

1.1 维生素 D 概述 维生素 D (VitD) 是一种脂溶性维生素,也是一种固醇衍生物,主要包括维生素 D₂ 和维生素 D₃。维生素 D 主要由人体皮肤内的 7-脱氢胆固醇在特定波长紫外线(290~315nm)作用下合成,亦可由鱼、蛋黄、菌菇类等食物中摄取。维生素 D 在人体内需要经过两次羟基化形成活性代谢物,第一次在肝脏 25-羟化酶作用下生成 25-羟维生素 D [25(OH)D],第二次在肾脏 1-α 羟化酶作用生成 1,25 二羟维生素 D [1,25(OH)₂D],即活性维生素 D (或称激素 D)。25(OH)D 是维生素 D 在体内的主要储存方式,体现机体内维生素 D 水平的较好血清学指标,1,25(OH)₂D 与维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合,发挥广泛并多重的生物学效应。

1.2 维生素 D 具备的生理功能

1.2.1 维生素 D 具有抗炎的特性 活性维生素 D 能够抑制辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的增生,同时减少炎症因子 IL-2、IL-6、IL-8、IL-12 的产生^[3-7]。有动物实验

研究发现将老年小鼠给予6wk维生素D补充后,衰老过程明显减缓,且老年小鼠视网膜炎症反应水平降低,淀粉样 β 蛋白聚积减少,视功能有一定程度的改善^[6]。同样Tang等^[8]证实维生素D₃可以通过抑制辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)免疫应答来阻止实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠的抗视网膜免疫反应。

1.2.2 维生素D具有抗新生血管特性 Albert等^[9]应用氧诱导的缺血性视网膜病变小鼠来评估维生素D₃抗新生血管生成作用,实验发现与对照组比,给予维生素D₃喂养组小鼠的视网膜新生血管显著减少,抑制效应呈剂量依赖性。这提示维生素D₃是有效的新生血管抑制剂。而湿性AMD晚期特征之一就是视网膜下或者脉络膜新生血管生成。VitD可以预防晚期湿性AMD,因为活性维生素D可以抑制能表达VDR的血管内皮细胞大量增殖^[10],同时减少缺氧诱导因子1(HIF-1)表达,而HIF-1能够诱导血管内皮生长因子(VEGF)的释放^[9,11]。VEGF的释放最终导致新生血管的生成。

1.2.3 维生素D具有抗氧化应激特性 视网膜是机体内需氧量较高的组织,易受氧化损伤。随着年龄增长,RPE细胞内存积大量脂褐素,其与氧发生反应产生超氧负离子等物质。维生素D^[12]可以通过抑制超氧阴离子自由基产生和诱导NO产生,来维持线粒体功能和细胞活力,使细胞免受氧化应激损害。活性维生素D在体外可通过诱导葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)转录,提高G6PD酶活性和谷胱甘肽含量来清除细胞中的活性氧^[13]。在氧化应激中,G6PD会被激活并催化生成NADPH,以保持细胞内氧化还原平衡,保护细胞免受氧化应激的损害。

1.3 维生素D缺乏与AMD “国际骨质疏松基金会”认为,25(OH)D \geq 30ng/mL为充足;20~29ng/mL为不足;<20ng/mL为维生素D缺乏。全球大约10亿人存在维生素D不足水平现象,且我国人群维生素D不足或缺乏现象也较为广泛^[14]。VitD缺乏与一些系统性疾病有一定的相关性,如多发性硬化症、肺结核^[3,15]、糖尿病^[16]、心脑血管疾病^[17]等。Millen等^[18]针对参与年龄相关性眼病的类胡萝卜素研究(Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study, CAREDS)的913名绝经期妇女检测血清VitD含量,发现维生素D缺乏组AMD患病率较高。美国一项关于AMD环境风险因素的病例对照研究,发现同卵双胞胎中处于早期AMD的有较高VitD摄入量^[19]。Itty等^[20]针对216名非新生血管型AMD,146名湿性AMD以及100名健康人进行采血调查,发现新生血管性AMD患者组25(OH)D水平最低,且患有VitD不足及缺乏相对更多。Annweiler等^[21]应用系统回顾和Meta分析方式探讨两者之间关系,发现高浓度25(OH)D可预防AMD发病发展,且当25(OH)D浓度低于50nmol/L时,血清VitD浓度与晚期AMD密切相关,其OR值为2.18(95%CI:1.34~3.56)。Kim等^[22]对17045名韩国40岁以上人进行横断面研究,结果显示血清高浓度25羟维生素D与晚期AMD发病呈负关联(OR:0.32;95%CI:0.12~0.81;P=0.018),但与早期AMD患者及女性晚期AMD患者联系不大。然而最近一些报道^[23-24]却否定AMD发病风险与25(OH)D浓度的相关性,原因可能在于样本人群差异,实验设计不同,这说明未来需要更多研究,特别是纵向研究,来探讨AMD与维生素D之间的相关性。

2 维生素D与DNA甲基化

维生素D内分泌系统和表观遗传改变之间存在相互作用的现象,特别是DNA甲基化。一方面,表观遗传调控在维生素D受体表达中起着关键作用,而这机制的失调会导致机体病理改变。另一方面VitD参与表观遗传调节过程。活性维生素D具有抑制肿瘤细胞增生的功能。而25-羟维生素D₃-24-羟化酶(CYP24A1)是使活性维生素D分解的关键酶。Ramnath等^[25]在肺腺癌细胞发现启动子甲基化状态与CYP24A1表达呈负相关,CYP24A1启动子高甲基化引起的转录沉默有利于活性维生素D抗肿瘤细胞增殖的作用。而CYP24A1启动子低甲基化会导致活性维生素D功能失效。在一项针对美国非裔人群的横断面和介入调查结果发现,VitD缺乏与非裔美国人全基因组低甲基化有关^[26]。同样一项关于美国非裔青少年研究发现,严重的VitD缺乏与白细胞DNA甲基化改变密切相关^[27]。这是因为维生素D调节元件可以直接与DNA甲基化转移酶I和3b结合,进而改变DNA甲基化状态^[28]。怀孕期间母体VitD缺乏会导致子代kba基因甲基化状态改变,Ikba蛋白表达降低,导致机体存在持续炎症反应,最终子代呈现胰岛素抵抗征象^[29]。这说明母体怀孕期间的VitD缺乏可导致子代基因甲基化改变。然而最近一些报道^[30-31]却否定维生素D与DNA甲基化的相关性,原因可能在于样本人群差异,这说明未来需要更多研究。

3 DNA甲基化

3.1 DNA甲基化概述 表观遗传学是指探究在基因组DNA序列不发生改变的条件下,环境改变导致可遗传的表型发生变化为内容的遗传学研究新领域。近年研究发现表观遗传机制可能在许多复杂的眼部疾病,如角膜炎、弱视、近视、白内障、青光眼、增殖性玻璃体视网膜病变、糖尿病视网膜病变、视网膜色素变性、脉络膜黑色素瘤、视网膜母细胞瘤以及年龄相关性黄斑变性(AMD)中发挥致病作用^[32]。DNA甲基化是表观遗传调控的主要方式,指在DNA甲基化转移酶的催化下,在CpG二核苷酸的胞嘧啶5'碳位共价键上结合一个甲基基团,形成5-甲基胞嘧啶。哺乳类动物视网膜存在3种DNA甲基转移酶,其中人的视网膜RPE细胞表达DNMT1。DNA甲基化一般与基因沉默相关,而去甲基化可以诱导基因激活^[33]。

3.2 DNA甲基化与AMD 已有许多研究证实DNA甲基化参与衰老、氧化应激、炎症等复杂的生命过程。DNA甲基化是一种参与调节基因转录与细胞分化的表观遗传机制^[34-35]。组织的甲基化状态在疾病发病中处于重要地位。全血DNA甲基化水平改变与基因转录活性及基因组不稳定性增加有关,这可能是诱发多种疾病(包括单基因和复杂型多因素疾病如某些类型肿瘤)发病的多个条件中起重要作用的一个环节^[36-37]。虽然遗传易感性在AMD发病发展起到一定程度的决定作用,但是Hutchinson等^[38]对同卵双胞胎的AMD相关风险基因型与表型进行分析后发现,AMD的发病发展乃至最后的转归受表观遗传调控影响更大,这提示表观遗传学在AMD诸多发病机制占有一定的地位。然而DNA甲基化如何引起AMD发病的机制仍在研究中。

3.2.1 DNA甲基化与线粒体DNA 基因甲基化状态和线粒体是相互关联的。DNA甲基化与线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)缺失或损伤可以引起表观遗传

传学改变。Xie 等^[39]发现 mtDNA 含量减少可以诱导基因甲基化,数目恢复后则甲基化水平下降。当 mtDNA 发生变异时,细胞核 DNA(nuclear DNA, nDNA)甲基化状态受到一定程度影响。Atilano 等^[40]选取两类人 RPE 细胞株(这些细胞株 nDNA 一致,但 mtDNA 为 H 单倍群或 J 单倍群),比较分析这些细胞株总体甲基化水平差异和 AMD 相关 4 个风险基因(CFH、EFPMP1、VEGFA 和 NFkB2)表达水平。结果发现 J 单倍群细胞株总体甲基化程度更高,且与未经治疗的 H 单倍群细胞株相比,未经处理的 J 单倍群的 4 个基因表达水平较低,但当经甲基转移酶抑制剂治疗后,两细胞株的 4 个基因表达水平却相近。

mtDNA 参与了 AMD 的发病过程。RPE 细胞和感光细胞富含线粒体,其 mtDNA 的改变可以导致氧自由基增多,加重 RPE 及感光细胞损伤,最终导致 AMD 的发生。mtDNA 可诱导 ARPE-19 细胞产生炎症因子 IL-6 和 IL-8,其与 AMD 的发生和发展密切相关^[41]。

3.2.2 DNA 甲基化与 GSTM1 和 GSTM5 国内外众多实验研究证实氧化应激^[42]在 AMD 发病发展起重要作用,且该机制也发现受到表观遗传调控。Hunter 等^[43]借助 Illumina 人类甲基化 27 平台,对 AMD 和对照组的视网膜色素上皮(RPE)、脉络膜进行 DNA 甲基化的区别检测,结果显示与年龄匹配健康组相比,AMD 患者组的 GSTM1 和 GSTM5 启动子区存在高甲基化改变,同时发现 RPE、脉络膜以及神经感觉层中的这两种抗氧化酶表达水平明显降低。谷胱甘肽硫转移酶对机体抵御活性氧的损害至关重要,而这些酶的表现遗传学改变可能会使 AMD 患者视网膜对氧化应激反应的敏感性增加。

3.2.3 DNA 甲基化与 IL17RC AMD 是慢性炎症性疾病,局部炎症反应^[44]参与玻璃膜疣的形成与 AMD 发病,其中炎症因子 IL-17 参与其过程。IL-17RC 是 IL-17 受体复合物的一个重要亚基,与 IL-17 亚型特异性结合,激活炎症下游的多条信号转导通路,影响细胞因子等炎症相关基因表达^[45]。美国 NIH 的 Wei 等^[46]发现 AMD 患者的 IL-17RC 基因启动子 CpG 区域存在 DNA 低甲基化改变,这在多个大样本的 AMD 患者得到了同样验证。此外还发现 AMD 患者的视网膜、脉络膜中存在 IL17rc 蛋白质和 mRNA 高表达现象,同时外周血中 IL17RC 阳性单核细胞浓度增加,这揭示 IL-17RC 基因启动子 DNA 低甲基化以及 mRNA 及蛋白高表达是 AMD 患者独特现象。同时这意味着甲基化模式与 IL17rc 表达可作为 AMD 诊断的标志物。

然而 Oliver 等^[47]应用 Illumina 人类甲基化 450 微球阵列技术,在对 AMD 患者和年龄匹配对照组外周血进行 IL-17RC 基因启动子 DNA 甲基化区别检测,并未发现两组间甲基化区别现象,否定了 IL17rc 基因甲基化改变可以作为 AMD 诊断的标志物。同样,Pinna 等^[48]在对 39 例早期 AMD 患者,27 例湿性 AMD 患者及 132 例健康者进行全血 DNA 甲基化检测,发现患病组和对照组全血甲基化程度相近,并认为 DNA 甲基化不能作为 AMD 的标志物。

3.2.4 DNA 甲基化与丛生蛋白 丛生蛋白是玻璃膜疣中主要蛋白质成分之一,是一种多功能分泌蛋白,其启动子包括一个 CpG 甲基化作用区域^[49]。丛生蛋白通过调节补体系统抑制炎症反应,以及参与氧化应激过程,使 RPE 细胞免受炎症及氧化应激的破坏。Suuronen 等^[50]应用 DNA

甲基化转移酶抑制剂,使 RPE 细胞 DNA 去甲基化,发现丛生蛋白 mRNA 和蛋白质表达显著增加,同时其分泌也明显增加,这提示丛生蛋白基因中 CpG 岛甲基化水平下降参与了 AMD 发生。

综上所述,AMD 是多因素多病因多机制介导的慢性退行性疾病。维生素 D 具有抗炎,抑制新生血管生成和抗氧化应激的特征,说明维生素 D 具备的功能与 AMD 病理机制之间存在合理生物学联系。DNA 甲基化状态的改变可以影响相关炎症因子及抗氧化酶的表达。同时维生素 D 与 DNA 甲基化之间存在相互作用现象。这些提示维生素 D 缺乏和基因 DNA 甲基化在 AMD 发病中起重要作用,目前需要进一步研究明确维生素 D 缺乏和 DNA 甲基化在 AMD 发病中的作用及机制,以及维生素 D 缺乏、DNA 甲基化和 AMD 发病发展中其他各种危险因素之间相互作用的机制,为进一步治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Klein R, Chou CF, Klein BE, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol* 2011; 129(1): 75-80
- 2 Erke MG, Bertelsen G, Peto T, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in elderly Caucasians; the Tromso Eye Study. *Ophthalmology* 2012; 119(9): 1737-1743
- 3 Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(2): 471-478
- 4 Hewison M. Vitamin D and the immune system; new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2): 365-379
- 5 Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51: 311-336
- 6 Lee V, Rekh E, Hoh Kam J, et al. Vitamin D rejuvenates aging eyes by reducing inflammation, clearing amyloid beta and improving visual function. *Neurobiol Aging* 2012; 33(10): 2382-2389
- 7 Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system; vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(9): 685-698
- 8 Tang J, Zhou R, Luger D, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol* 2009; 182(8): 4624-4632
- 9 Albert DM, Scheef EA, Wang S, et al. Calcitriol is a potent inhibitor of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(5): 2327-2334
- 10 Chung I, Yu WD, Karpf AR, et al. Anti-proliferative effects of calcitriol on endothelial cells derived from two different microenvironments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103(3-5): 768-770
- 11 Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(4): 1433-1439
- 12 Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(4): 1367-1374
- 13 Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, et al. Protective role of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008; 122(12): 2699-2706
- 14 曾瑞翔,张冰雨,雷涛. 维生素 D 缺乏与糖尿病发病的相关研究进展. *中国糖尿病杂志* 2016; 24(6): 568-571
- 15 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357(3): 266-281
- 16 Muscogiuri G, Sorice GP, Ajjan R, et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases Present evidence and future

perspectives. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2012;22(2):81-87

17 Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, et al. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men; a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168(11):1174-1180

18 Millen AE, Meyers KJ, Liu Z, et al. Association between Vitamin D status and age-related macular degeneration by genetic risk. *JAMA Ophthalmol* 2015;133(10):1171-1179

19 Seddon JM, Reynolds R, Shah HR, et al. Smoking, dietary betaine, methionine, and vitamin D in monozygotic twins with discordant macular degeneration; epigenetic implications. *Ophthalmology* 2011;118(7):1386-1394

20 Itty S, Day S, Lyles KW, et al. Vitamin D deficiency in neovascular versus nonneovascular age related macular degeneration. *Retina* 2014;34(9):1779-1786

21 Annweiler C, Drouet M, Duval GT, et al. Circulating vitamin D concentration and age-related macular degeneration; Systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 2016;88:101-112

22 Kim EC, Han K, Jee D. Inverse relationship between high blood 25-hydroxyvitamin D and late stage of age-related macular degeneration in a representative Korean population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(8):4823-4831

23 Wu W, Weng Y, Guo X, et al. The association between serum Vitamin D levels and age-related macular degeneration; a systematic meta-analytic review. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(4):2168-2177

24 Cougnard-Grégoire A, Merle BM, Korobelnik JF, et al. Vitamin D deficiency in community-dwelling elderly is not associated with age-related macular degeneration. *J Nutr* 2015;145(8):1865-1872

25 Ramnath N, Nadal E, Jeon CK, et al. Epigenetic regulation of Vitamin D metabolism in human lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014;9(4):473-482

26 Zhu H, Bhagatwala J, Huang Y, et al. Race/ethnicity-specific association of Vitamin D and global DNA methylation; cross-sectional and interventional findings. *PLoS One* 2016;11(4):e0152849

27 Zhu H, Wang X, Shi H, et al. A genome-wide methylation study of severe vitamin D deficiency in African American adolescents. *J Pediatr* 2013;162(5):1004-1009

28 Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002;416(6880):552-556

29 Zhang H, Chu X, Huang Y, et al. Maternal Vitamin D deficiency during pregnancy results in insulin resistance in rat offspring, which is associated with inflammation and Ikb α methylation. *Diabetologia* 2014;57(10):2165-2172

30 Florath I, Schöttker B, Butterbach K, et al. Epigenome-wide search for association of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with leukocyte DNA methylation in a large cohort of older men. *Epigenomics* 2016;8(4):487-499

31 Suderman M, Stene LC, Bohlin J, et al. 25-Hydroxyvitamin D in pregnancy and genome wide cord blood DNA methylation in two pregnancy cohorts (MoBa and ALSPAC). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;159:102-109

32 He S, Li X, Chan N, et al. Review: epigenetic mechanisms in ocular disease. *Mol Vis* 2013;19:665-674

33 李晓华,何世坤.眼科表观遗传学研究进展.中华眼科杂志 2013;49(6):568-573

34 Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128(4):669-681

35 Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007;447(7143):433-440

36 Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994;3:1487-1495

37 Liu L, Wylie RC, Andrews LG, et al. Aging, cancer and nutrition; the DNA methylation connection. *Mech Ageing Dev* 2003;124(10-12):989-998

38 Hutchinson JN, Fagerness J, Kirby A, et al. (Epi) Genetic analyses of age-related macular degeneration; case-control and discordant twin studies. *Hum Hered* 2014;78(2):59-72

39 Xie CH, Naito A, Mizumachi T, et al. Mitochondrial regulation of cancer associated nuclear DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364(3):656-661

40 Atilano SR, Malik D, Chwa M, et al. Mitochondrial DNA variants can mediate methylation status of inflammation, angiogenesis and signaling genes. *Human Molecular Genetics* 2015;24(16):4491-4503

41 Dib B, Lin H, Maidana DE, et al. Mitochondrial DNA has a pro-inflammatory role in AMD. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853(11 Pt A):2897-2906

42 向艳芳,彭惠.氧化应激及补体在年龄相关性黄斑变性发病中的作用机制.国际眼科杂志 2013;13(8):1579-1582

43 Hunter A, Spechler PA, Cwanger A, et al. DNA methylation is associated with altered gene expression in AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(4):2089-2105

44 Ascella R, Ragazzo M, Straffella C, et al. Age-related macular degeneration; insights into inflammatory genes. *J Ophthalmol* 2014;2014:582842

45 吴文婷,金明. DNA甲基化在眼科疾病中的应用以及中药调节甲基化的研究进展 2014;24(2):149-152

46 Wei L, Liu B, Tuo J, et al. Hypomethylation of the IL17RC promoter associates with age-related macular degeneration. *Cell Rep* 2012;2(5):1151-1158

47 Oliver VF, Franchina M, Jaffe AE, et al. Hypomethylation of the IL17RC promoter in peripheral blood leukocytes is not a hallmark of age-related macular degeneration. *Cell Rep* 2013;5(6):1527-1535

48 Pinna A, Zinellu A, Tendas D, et al. Plasma homocysteine and asymmetrical Dimethyl-L-Arginine (ADMA) and whole blood DNA methylation in early and neovascular age-related macular degeneration; a pilot study. *Curr Eye Res* 2016;41(1):88-96

49 Bonacini M, Coletta M, Ramazzina I, et al. Distinct promoters, subjected to epigenetic regulation, drive the expression of two clusterin mRNAs in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2015;1849(1):44-54

50 Suuronen T, Nuutinen T, Ryhanen T, et al. Epigenetic regulation of clusterin/apolipoprotein J expression in retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357(2):397-401