

综述

内皮功能障碍在高同型半胱氨酸致动脉粥样硬化中作用及机制的研究进展

武成艳, 段旭磊, 王立波, 王学惠*

新乡医学院第一附属医院心内科, 新乡医学院心脏诊疗中心, 新乡 453100

摘要: 高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)被认为是心血管疾病的独立危险因素, 但其致病的具体分子机制尚未完全明确。内皮功能障碍是动脉粥样硬化的关键始动环节, 而这在HHcy所致血管疾病中可普遍被观察到。HHcy促进氧化应激、抑制一氧化氮产生、抑制硫化氢信号通路、促进内皮间充质转化、激活凝血途径, 促进蛋白质N-同型半胱氨酸化和细胞低甲基化等都可引起内皮功能的破坏。本文综述了HHcy与内皮功能障碍间的具体联系, 并强调了最新证据内皮间充质转化参与调节HHcy致血管毒性, 有望为其临床治疗提供新的思路。

关键词: 高同型半胱氨酸血症; 内皮功能障碍; 内皮间充质转化; 动脉粥样硬化

Research progress on the role and mechanism of endothelial dysfunction in hyperhomocysteine-induced atherosclerosis

WU Cheng-Yan, DUAN Xu-Lei, WANG Li-Bo, WANG Xue-Hui*

Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University; Heart Center of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China

Abstract: Hyperhomocysteinemia (HHcy) is considered to be an independent risk factor for cardiovascular diseases, but the molecular mechanisms underlying its pathogenesis are not fully understood. Endothelial dysfunction is a key initiating factor in the pathogenesis of atherosclerosis, which is commonly observed in almost all HHcy-induced vascular diseases. HHcy promotes oxidative stress, inhibits nitric oxide production, suppresses hydrogen sulfide signaling pathway, promotes endothelial mesenchymal transition, activates coagulation pathways, and promotes protein N-homocysteination and cellular hypomethylation, all of which can cause endothelial dysfunction. This article reviews the specific links between HHcy and endothelial dysfunction, and highlights recent evidence that endothelial mesenchymal transition contributes to HHcy-induced vascular damage, with a hope to provide new ideas for the clinical treatment of HHcy-related vascular diseases.

Key words: hyperhomocysteinemia; endothelial dysfunction; endothelial mesenchymal transition; atherosclerosis

随着人们生活水平的不断提高及社会人口的老龄化, 心血管疾病特别是缺血性心脏病, 成为全球死亡的主要原因, 其占全球总死亡人数和医疗费用的85%^[1]。而冠状动脉粥样硬化性心脏病是最常见的缺血性心脏病, 它是冠状动脉内皮功能受损或功能障碍后形成血管壁斑块导致管腔狭窄或阻塞, 造

成心肌缺血、缺氧或坏死而引起的心脏病^[2]。早在20世纪末, Refsum等根据大量临床和流行病学研究数据就已提出高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)是心血管疾病、冠状动脉、脑血管和外周血管动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)以及动脉和静脉血栓栓塞的独立危险因素^[3, 4]。据统

This work was supported by the Medical Science and Technique Foundation of Henan Province, China (No. SB201901060).

*Corresponding author. E-mail: 121045@xxmu.edu.cn

计,在普通人群中约 5%~10% 患有轻至中度 HHcy^[5]。有前瞻性研究表明,同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平每增加 5 $\mu\text{mol/L}$ 可能导致血管风险增加约 33%^[5]。因此, Hcy 作为一种心血管疾病相关标记物被人们广泛研究。我们团队曾选取 2016 年 1 月至 2018 年 4 月在我院就诊的患有冠心病且行冠状动脉造影的 619 例患者为研究对象,以观察 Hcy 与冠心病的关系,结果也证明血清 Hcy 水平升高是冠心病的危险因素^[6]。

1 Hcy 的生理代谢

Hcy 是蛋氨酸代谢过程中形成的含硫非蛋白质氨基酸。蛋氨酸被三磷酸腺苷激活,通过蛋氨酸腺苷转移酶生成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, AdoMet/SAM),它是一种重要的中间代谢产物,在细胞内存在的甲基化反应中, SAM 作为直接的甲基供体发挥着重要生理作用。SAM 通过甲基转移酶转化为 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosylhomocysteine, AdoHcy/SAH), SAH 通过腺苷同型半胱氨酸水解酶的可逆反应水解为腺苷和 Hcy。Hcy 的代谢有三种途径。其一, 依赖叶酸的转甲基途径。N-5,10-亚甲基四氢叶酸经亚甲基四氢叶酸还原酶 (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 还原为 N-5-甲基四氢叶酸,它作为甲基供体,维生素 B₁₂ 作为辅助因子,由蛋氨酸合酶将 Hcy 再甲基化为蛋氨酸。其二,非依赖叶酸的转甲基途径 (甜菜碱循环)。Hcy 通过甜菜碱-同型半胱氨酸甲基转移酶重新甲基化为蛋氨酸,这种途径主要发生在肝脏和肾脏。其三,转硫途径。Hcy 在胱硫醚 β 合酶 (cystathionine β -synthase, CBS) 的催化下,以维生素 B₆ 为辅酶,生成胱硫醚。进一步以维生素 B₆ 为辅酶,在胱硫醚 γ 裂解酶 (cystathionine γ -lyase, CSE) 催化下生成半胱氨酸。

在机体内,无论 Hcy 的代谢障碍、遗传或营养缺陷都会导致 HHcy。如 MTHFR、蛋氨酸合酶、CBS 中任何一个酶遗传缺陷,叶酸和维生素 B₁₂、维生素 B₆ 的营养缺乏、肾功能衰竭等都会导致 HHcy。HHcy 作为血管疾病的危险因素,最早是 1969 年由 McCully KS 发现的,两名因 CBS 缺乏、维生素 B₁₂ 代谢缺陷而患有 HHcy 的儿童出现了 Hcy 尿症和动脉硬化斑块^[7]。这一发现引起了人们对 Hcy 致血管损伤的广泛研究。在生理状态下,循环中 Hcy 浓度通常维持在 5~15 $\mu\text{mol/L}$ 之间,将

Hcy 浓度分别在 16~30 $\mu\text{mol/L}$ 、31~100 $\mu\text{mol/L}$ 和 > 100 $\mu\text{mol/L}$ 定义为轻度、中度和重度 HHcy^[5]。

2 内皮功能障碍与 AS

血管内皮细胞是一层动态的单层细胞,是血管壁保持稳态的主要成员。它具有调节血管张力、通透性、凝血、纤维蛋白溶解、炎症和细胞生长等多种功能^[8]。如果内皮功能受损,则会引发一系列事件。首先,内皮细胞将无法调节血管张力和维持细胞氧化还原平衡,随后可引发炎症反应,称为内皮激活,内皮细胞的活化导致黏附分子和趋化因子的上调,后者介导循环中单核细胞的募集,浸润到内膜后,单核细胞转化成巨噬细胞,吞噬氧化的低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL),形成泡沫细胞,而泡沫细胞是 AS 斑块的核心^[9,10]。此外,内皮细胞激活后释放的细胞因子和生长因子作用于邻近组织,导致 AS 病变的结构重塑,并形成纤维肌斑块,可进一步进展为纤维帽^[9,10]。最后,内皮促炎状态还可能会导致斑块结构的不稳定和破裂,且伴有坏死核心血栓内容物的管腔释放,导致 AS 血栓性栓塞^[11]。故认为内皮功能障碍是 AS 的关键起始病理事件。除此外,内皮功能障碍还与高血压^[12]、糖尿病^[13]、缺血再灌注损伤^[14] 和神经退行性疾病^[15] 等有关。

3 HHcy 与内皮功能障碍的关联

3.1 HHcy 诱导氧化应激、炎症

氧化应激通常是由于细胞活性物质的形成与抗氧化防御之间的不平衡而产生^[16]。氧化应激与多种疾病相关,如心血管疾病、慢性阻塞性肺疾病、神经退行性疾病、癌症、认知障碍等^[16]。与生理最相关的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 包括超氧阴离子、羟基自由基和过氧化氢,它主要在线粒体内膜通过电子传递链氧化磷酸化过程产生。生理浓度的 ROS 是维持血管稳态的重要信号分子,通过控制多种细胞类型的表型来维持血管壁稳态。而过量的 ROS 产生会导致细胞氧化应激,引起内皮功能障碍,加剧血管疾病进展。大量证据表明,氧化应激在 HHcy 诱导的内皮功能障碍和 AS 中发挥重要作用。HHcy 通过促进 ROS 的产生以及损害相关的抗氧化系统诱导产生氧化应激。首先,HHcy 通过铜离子等金属阳离子催化的自氧化过程促进 ROS 的产生^[17]。HHcy 也可通过上调烟酰胺腺嘌呤二核

苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 (NADPH oxidases, NOX) 的表达, 进而促进 ROS 的产生^[18, 22]。在一项动物实验中, 给予 C57BL 小鼠 1% 蛋氨酸饮水 4 个月构建 HHcy 模型, 发现高蛋氨酸组比对照组小鼠表达更高的 NOX 活性, 具体表现为 NOX-1、p22、p47 蛋白表达显著升高^[18]。p22、p47 分别为 NADPH 的亚基。在高蛋氨酸喂养 *ApoE*^{-/-} 小鼠 12 周构建的 HHcy 模型中, 同样出现模型组比单纯高脂喂养组 p22、p47 蛋白表达上调^[22]。我们团队也研究发现, 在 Hcy 介导的 AS 中 NOX4 起决定性作用, 阻断 NOX4 可能是抑制 Hcy 诱导内皮细胞氧化损伤的关键靶点^[19]。此外, Hcy 本身具有抗氧化剂活性, 与酶类、非酶类抗氧化剂的减少有关, 如 Hcy 增加时, 谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶的表达降低^[23, 20], 谷胱甘肽、维生素 A、C、E、B₁₂^[23] 表达减少。Ji 等人^[20] 在 3% 蛋氨酸饮食构建的 HHcy 大鼠模型中, 发现高蛋氨酸大鼠组的超氧化物歧化酶表达水平明显降低, 丙二醛表达水平升高^[20]。有趣的是, ROS 本身作为超氧化物, 还可以激活其他氧化酶刺激 ROS 的产生, 进一步导致氧化应激, 形成正反馈^[21]。

HHcy 的促炎作用主要与 ROS 的产生有关。ROS 中超氧阴离子和过氧化氢是核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的激动剂, 可以促进 HHcy 相关的炎症反应。HHcy 也可直接促进 NF- κ B 家族转录因子 p65 和 p50 亚基的核内移, 及抑制核因子抑制蛋白 (inhibitor of kappa B, I κ B) 的降解, 引发炎症反应^[24]。通过 Hcy 处理人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 构建内皮损伤模型, 人们发现 HHcy 可诱导 NF- κ B 蛋白表达明显上调^[25]。在 Hcy 处理人主动脉内皮细胞 (human aortic endothelial cells, HAECs) 后, 胞内 ROS 水平增加, NOX4、NF- κ B 蛋白表达增加^[26]。而在动物实验中, 利用高蛋氨酸饮食构建 HHcy 模型, 也发现高蛋氨酸组小鼠 NF- κ B 的 p65 亚基蛋白表达增加, 肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 上调, 巨噬细胞聚集和血管平滑肌细胞增殖等^[27, 28]。此外, HHcy 也被证明可增加细胞间黏附分子-1、单核细胞趋化蛋白-1 和血管黏附分子-1 等炎症因子的表达, 进而促进炎症细胞与内皮的相互作用, 诱导血管慢性炎症反应^[26]。这些观察结果均表明, HHcy 通过促进氧化应激、炎症的发生, 损伤内皮细胞功能, 进而诱导相关血管疾病。

3.2 HHcy 减少 NO 合成并降低其生物利用度

内源性 NO 是血管内皮细胞的关键舒张因子, 通过一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的催化活性使精氨酸氧化而产生。NO 在维持血管功能中起着重要作用, 它具有调节血管张力、炎症、抑制血管生长、血小板活化和凝血等功能。不对称二甲基精氨酸 (asymmetric dimethylarginine, ADMA) 是 NOS 的内源性抑制剂, 可与 L-精氨酸竞争结合 NOS 活性部位, 从而减少 NO 合成。而 ADMA 除了抑制 NO 生成外, 还促进 NOS 脱偶联, 导致超氧阴离子及其它 ROS 生成增加, ROS 水平升高与 NO 反应形成过氧硝酸盐加合物, 反过来引起 NO 的生物利用度进一步降低。Dovinová 等人^[29] 观察到给予外源性 NO 抑制剂 7-NI 可降低和改善自发性高血压大鼠血浆中 ADMA、Hcy、ROS 水平。循环中 ADMA 浓度升高也被证实与动脉粥样硬化性血管疾病相关^[30]。Toyomasu 等人^[31] 发现 Hcy 水平与 ADMA 呈高度相关。有趣的是, 在喂养高蛋氨酸饮食 17 个月形成 HHcy 的猴子身上发现血浆中 ADMA 水平明显升高, 且出现内皮功能障碍, 形成血管的 AS^[32]。此外 HHcy 还可能通过诱导氧化应激使 ADMA 水平升高, 诱导内皮功能障碍^[23]。HHcy 还可通过单独抑制二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase, DDAH) 损害 NO 合成, DDAH 是一种参与 ADMA 代谢的酶, 是 NOS 的内源性抑制剂。而在 DDAH $\downarrow$ / ADMA $\uparrow$ / NOS $\downarrow$ / NO $\downarrow$ 这条通路上, HHcy 引起 DDAH 基因启动区的高甲基化修饰, 导致 DDAH mRNA 表达下调, 可能对 DDAH 活性下降也发挥部分作用。DDAH 的损害导致 ADMA 升高, 其竞争性抑制 NOS, 使 NO 生成减少。另外, 氧化应激也被证明通过降低 DDAH 活性, 诱导 ADMA 升高。HHcy 促进氧化应激进而增强 DDAH 的降解, 降低 DDAH 活性进而诱导内皮功能障碍。

3.3 HHcy 抑制硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 信号

H₂S 是由内源性产生的一种信号分子。它主要是以 Hcy、半胱氨酸为基质, 分别在 CBS、CSE、3-巯基丙酮酸硫转移酶三种酶的催化下合成。已知 CBS、CSE 的缺乏会导致 HHcy, 然而这些酶的遗传缺陷也可能导致低水平的 H₂S。H₂S 是一种无色气体, 带有臭鸡蛋气味, 在很长一段时间里, 人们只知道 H₂S 的神经毒性和环境危害, 而忽视了 H₂S 参与内皮稳态的生理精细调节, 它具有调节血管舒

张功能、协调血管生成和重塑、抗炎、抗 AS、器官保护等功能。近年来, H_2S 的研究越来越多, 其缺乏可能会导致高血压、AS 等心血管疾病的发展^[23]。有趣的是, H_2S 还可能通过潜在的抗内皮间充质转化 (endothelial mesenchymal transition, EndMT) 作用, 进而发挥抗 AS 作用^[33]。当机体处于 HHcy 状态时, 导致 CBS 和 CSE 下调, 诱导 H_2S 耗竭, 而减少的 H_2S 解除了对内皮细胞的保护作用, 进而导致内皮功能障碍, 随后诱发 HHcy 相关的血管疾病。研究发现, 体外补充 NaHS 可通过抑制基质金属蛋白酶 -9 的表达进而改善 HHcy 相关神经血管疾病^[34]。在 HHcy 大鼠模型中, 给予补充外源性 H_2S 也可以保护内皮细胞损伤^[35]。

然而低水平的 H_2S 是否会对内皮细胞病理状况产生致病、促进或附带影响, 还需要进一步研究。由于 NO 和 H_2S 是由相同的内皮细胞产生并释放到同样的环境中, 因此它们之间可能相互作用以增强或抑制自身的生物效应。但其具体作用及潜在机制尚不清楚, 需要进一步的研究来更好地理解信号传导机制。

3.4 HHcy促进EndMT

AS 斑块是脂质、间充质细胞、免疫细胞和细胞外基质等的积累。而间充质细胞 (包括肌成纤维细胞、成纤维细胞、纤维细胞、平滑肌细胞) 的积累是斑块形成的重要部分。间充质细胞在 AS 斑块中发挥关键作用, 包括促炎分子的分泌, 基质、胶原蛋白和基质金属蛋白酶的产生等^[36, 37]。而 AS 斑块中间充质细胞的来源多年来一直被广泛研究。2016 年, Evrard 等人^[38]利用内皮特异性谱系跟踪系统发现与斑块相关的间充质细胞大量来源于内皮细胞。这种内皮细胞经历一系列分子事件后失去内皮细胞形态和特征基因表达, 而获得间充质细胞相关表型特征和基因表达的过程, 被称之为 EndMT^[37]。EndMT 是器官发育、再生和慢性纤维化疾病的普遍特征。它与最广义的上皮间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 类似, 它是一种特殊形式的 EMT。EndMT 的内皮细胞代表标志物有 VE-Cadherin、CD31、vWF; 间充质细胞标志物有 α -SMA、N-Cadherin、Vimentin、FSP-1。同时 Evrard 等^[38]还发现 EndMT 的程度与动脉粥样斑块不稳定性相关。近些年, 越来越多的证据表明, EndMT 参与了心血管疾病的发生、发展, 包括 AS、肺动脉高压、瓣膜疾病和血管损伤后重构、心肌纤维化

等^[39]。目前认为, EndMT 的激活主要涉及以下几种信号通路: TGF- β 信号、氧化应激和炎症、细胞代谢、非编码 RNA、表观遗传学、Wnt/ β -连环蛋白信号、Notch 信号、成纤维细胞生长因子等^[36]。

近年来, 有学者研究发现 EndMT 可能参与调节 HHcy 介导的内皮功能障碍^[40, 41]。He 等人^[40]利用 800 μ mol/L Hcy 处理牛主动脉内皮细胞 (bovine aortic endothelial cells, BAECs) 构建内皮功能障碍模型, 发现经 Hcy 处理后 BAECs 的细胞形态由鹅卵石样内皮细胞转变为纺锤丝样纤维细胞, 且出现 VE-Cadherin 蛋白表达下调, α -SMA、Vimentin 蛋白表达上调, 即发生 EndMT 过程。此外, 该研究还发现经典的 TGF- β /Smad、氧化应激通路均有参与诱导 EndMT 过程, 而灵芝三萜类药物可通过以上途径抑制 Hcy 诱导 EndMT 过程进而减轻 HHcy 诱导的内皮功能障碍^[40]。有趣的是, Huang 等人^[41]利用 1 mmol/L Hcy 处理人 HUVECs, 同样发现内皮细胞向间充质细胞的形态学转变, VE-Cadherin 蛋白表达下调、 α -SMA 蛋白表达上调, 即 EndMT 现象, 红景天苷类药物可抑制以上过程^[41]。而在肾脏系统中, 早有 Li 等人^[42]观察到 HHcy 模型小鼠的肾小球足细胞出现了 EMT, 即 HHcy 组小鼠的足细胞上皮标志物裂隙膜相关蛋白 P-cadherin 和 ZO-1 表达降低, 而间充质标志物 FSP-1 和 α -SMA 表达升高, 提示足细胞发生 EMT 过程, 且该过程依赖于 NOX/HIF-1 α 信号通路, 给予生长素治疗后可抑制以上 EMT 过程。此外, Zhang 及其同事^[43]也在体内实验进一步验证了 HHcy 通过激活 NOX 诱导肾小球足细胞发生 EMT 的假说。当然, 在体外实验中 Li 等人^[44]也同样发现 40 μ mol/L 的 HHcy 诱导足细胞发生了显著的 EMT, 表现为上皮标志物 P-cadherin 和 ZO-1 的表达显著下降, 而间充质标志物 FSP-1 和 α -SMA 的表达显著增加, 当生长激素浓度为 25 ng/mL 时, HHcy 则不能诱导足细胞发生 EMT。以上实验结果均为 EndMT 可能参与调控 HHcy 诱导内皮功能障碍提供了实验依据。

但目前对于 HHcy 是否通过 EndMT 调控内皮功能障碍的证据有限, 尚未在动物实验及临床研究中开展, 还需要进一步探究。EndMT 或许将是今后治疗 HHcy 相关血管疾病的一个新靶点, 为以后的临床治疗提供了新的思路。

3.5 HHcy激活凝血途径、促进血栓形成

内皮通过维持促凝血和抗凝血之间的平衡来实

现止血。在静止状态下, 内皮通过调节血栓调节蛋白、硫酸乙酰肝素和糖胺聚糖在内的几种分子来维持血液流动的抗血栓表面。在体外研究中, HHcy 已被证明可促进凝血因子 V 的激活, 抑制血栓调节蛋白依赖性蛋白 C 的激活, 损害血管性血友病因子 (von Willebrand Factor, vWF) 的分泌, 并诱导组织因子, 以上机制均会促进凝血发生。HHcy 也被证实与血管损伤部位的血小板反应过度有关^[45]。此外, 人体体检报告显示, 血浆 Hcy 水平升高与凝血和血小板活性增强呈正相关, 表明人类 HHcy 患者更容易在血管损伤部位形成血栓^[45]。具体机制为, HHcy 可促进血小板膜磷脂分解代谢和细胞外分泌型溶血磷脂酶 D 的分泌, 从而激活整合素由外向内信号传导, 加剧血栓形成^[45]。在临床观察脑静脉血栓复发患者的研究中, 发现这类人群常伴有 HHcy^[46]。在患 HHcy 的模型小鼠中, 也观察到血小板加速活化, 血小板聚集、扩散和血块回缩明显, 促血栓形成^[45]。此外, 血浆 Hcy 浓度升高可改变纤维蛋白溶解系统的组分, 如纤溶酶原和纤溶酶, 使其纤溶活性降低, 导致血栓栓塞性显著增加^[47]。而在深静脉血栓形成和外周动脉疾病患者中, 共同发现了凝血级联反应的激活, 他们往往伴有 Hcy 水平升高, 而 HHcy 已然成为一项独立危险因素^[48]。类似地, 在连续性卒中患者中发现伴有 Hcy 水平升高, 纤维蛋白原水平升高, 抗凝血酶 III 水平降低, 蛋白 C 缺乏等, 这使血液进入促凝状态^[49]。

3.6 HHcy 诱导脂蛋白代谢障碍

Hcy 是一种含硫氨基酸, 而含硫氨基酸代谢会影响磷脂酰胆碱代谢, 进而诱导脂质代谢紊乱^[50, 51]。研究发现, 在体外给予细胞补充 Hcy 后, 上调了细胞脂肪酸和甘油三酯的含量, 并诱导脂肪酸组成的改变^[51]。在动物模型中发现, HHcy 诱导的 H₂S 合成障碍有利于脂肪变性^[50]。CBS 基因敲除家兔 (即 HHcy 模型) 相比野生型家兔, 表现出 LDL、甘油三酯、总胆固醇水平更高, CBS 基因敲除家兔肝细胞内还伴有微囊泡状细胞质脂滴积聚^[52]。液相色谱-质谱法对血中氨基酸代谢组靶向分析表明, 总胆固醇与蛋氨酸呈显著相关, 其机制可能与 HHcy 促进胆固醇的吸收与合成、诱导脂代谢障碍有关^[53]。而 CBS 缺乏症患者大多出现增强的脂质过氧化, 表现为磷脂酰乙醇胺和溶血磷脂酰乙醇胺中的中链和长链多不饱和脂肪酸含量增高^[54]。与 LDL 相反, 血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 浓度

与 AS 性疾病呈负相关。HDL 是参与从外周组织中去除多余胆固醇的主要脂蛋白, 将其输送到肝脏, 再分布到其他组织或从体内清除。有趣的是, 在志愿者和动物模型中均发现 HHcy 与血浆中 HDL 的降低有关, 与心血管疾病风险增加相关^[55, 50]。这表明 HHcy 与 HDL 代谢障碍有关, 意味着反向转运胆固醇受阻, 导致总胆固醇水平升高。

HHcy 诱导脂代谢紊乱在 AS 中发挥作用, 可能主要依赖于 HHcy 诱导氧化应激的产生及内皮功能障碍。当内皮功能障碍时, LDL 进入内膜, 在氧化应激作用下发生氧化形成氧化 LDL, 并在内膜下聚集, 继而被巨噬细胞所吞噬形成泡沫细胞, 而泡沫细胞是动脉粥样斑块的核心成分。

3.7 HHcy 与蛋白质 N-同型半胱氨酸化

在蛋白质生物合成过程中, Hcy 可能被甲硫氨酰-tRNA 合成酶错误编辑生成同型半胱氨酸硫代内酯 (homocysteine thiolactone, HTL), 这是一种具有化学反应性的五元环状硫酯。目前认为 Hcy 的毒性机制之一就是其代谢产物 HTL 对蛋白质的翻译后修饰^[56]。HTL 与蛋白质赖氨酸残基的 ϵ -氨基形成共价复合物 (称为 N-同型半胱氨酸化), 最终导致修饰后蛋白质的结构和功能改变^[56]。Hcy 的代谢物 HTL、N-同型半胱氨酸化蛋白质在对保持血管稳态重要的通路中独特地调节基因表达, 诱导内皮功能障碍和血管疾病相关的新基因表达^[57]。既往研究表明, 内皮细胞迁移对于血管损伤的修复至关重要, HDL 具有内皮愈合功能, 在心血管疾病中, HDL 可被 N-同型半胱氨酸修饰成 N-Hcy HDL, 从而减弱 HDL 介导的内皮愈合^[58]。在脑血管中, N-同型半胱氨酸化使脑内微管相关蛋白聚集和缠结, 损伤血管功能, 增加血管性痴呆或阿尔茨海默病的发病率^[59]。在凝血系统中, 纤维蛋白原结构的改变可能与 HTL 对纤维蛋白原分子的还原作用或与 N-同型半胱氨酸化产生的巯基有关, 从而导致凝血功能异常^[60]。此外, 研究发现, N-同型半胱氨酸化与 AS 的相关性与其内皮细胞毒性、炎症反应、血栓形成等机制有关^[61]。众所周知, 给予 *ApoE*^{-/-} 小鼠正常饮食喂养一定周期会形成 AS 斑块, 但给予高蛋氨酸饮食喂养后, 病变处的 HTL 和 N-同型半胱氨酸化蛋白明显积累, 从而加速 AS 的进程^[62]。故 N-同型半胱氨酸化被认为是有助于 HHcy 相关血管病理学的重要危险因素^[61]。HTL 是一种对所有细胞均可产生强毒性且反应性强的化合物, 被认为是血

管疾病的独立危险因素^[63, 60]。在细胞培养液中补充 HTL 诱导细胞凋亡清楚地证明了 HTL 的细胞毒性。HTL 水平升高与心血管疾病、中风、AS、神经系统异常等有关。AnandBabu 及其同事^[64]发现 HHcy、HTL 作用于人视网膜色素上皮细胞,可诱导细胞的促凋亡,促氧化,增强氧化应激、炎症、趋化和新生血管形成,导致年龄相关性黄斑变性的发生。综上, Hcy 的代谢物 HTL、N-同型半胱氨酸化蛋白均可损伤血管内皮功能,加剧 HHcy 相关血管疾病的进展。

3.8 HHcy与细胞低甲基化

Hcy 代谢在调节细胞甲基化能力中起决定性作用。在蛋氨酸循环中, SAH 水解为 Hcy 和腺苷这个反应是可逆的,在生理条件下反应主要向水解方向进行,但当处于 HHcy 时该反应向相反方向进行,导致 SAH 积累,抑制转甲基酶、SAM。而 SAM 是细胞内直接的甲基供体,发挥重要的生理功能。所以,当机体环境处于 HHcy 时, SAM/SAH 比率降低,可能导致细胞整体低甲基化状态。

DNA 甲基化是基因表达、表观遗传调控的关键机制。DNA 甲基化是指 DNA 序列复制后,由 SAM 作为甲基供体,在 DNA 甲基转移酶的催化下,通过共价结合将甲基基团转移到 CpG 二核苷酸位点的胞嘧啶碱基上的一种修饰过程。它在未改变 DNA 序列基础上导致 DNA 序列的空间构型发生改变,从而进行遗传基因的修饰,继而影响蛋白结合^[65]。DNA 甲基化在维持正常细胞功能、遗传印记过程中起着极其重要的作用^[65]。许多动物、植物、真菌基因组都被 DNA 胞嘧啶的甲基化所标记。由 SAH 积累引起的细胞低甲基化可导致 DNA 甲基化受损,并导致与 HHcy 背景下的内皮功能障碍相关的基因表达模式紊乱,损害与血管稳态有关的重要甲基化反应,形成相关血管疾病。此外,有证据表明, HHcy 通过 DNA 去甲基化上调致病基因和下调保护基因而发挥致病作用,包括对 DNA 甲基转移酶 1、DNA 甲基转移酶 3 α 、DNA 甲基转移酶 3 β 等转录水平的影响,从而改变表观遗传特征^[66–68]。Hcy 通过诱导 DNA 甲基化水平降低,调控 DNA 甲基转移酶,诱导丙二醛水平升高、细胞间黏附分子-1 表达上调以及超氧化物歧化酶、eNOS 水平降低等^[69]。这些变化增加氧化应激,损伤内皮功能,促进 AS 形成。HHcy 通过干扰 SMAD7 基因启动子区 DNA 甲基化水平,诱导 SMAD7 表达降低,促炎因

子表达上调(肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 、NF- κ B),促进血管炎症反应^[70],加剧 AS 形成。经 HHcy 处理后的人类内皮细胞也处于低甲基化状态^[71]。据报道, B 类清道夫受体 1 作为 HDL 的主要受体具有抗 AS 的作用。研究发现, Hcy 调控 DNA 甲基转移酶 3 β ,诱导 B 类清道夫受体 1 表达减少,促进泡沫细胞中脂质积累,加速 AS 的形成^[72]。

此外, Hcy 代谢紊乱也会影响蛋白质甲基化,它是一种翻译后修饰,参与转录控制、RNA 加工、DNA 修复、端粒维持和信号转导等重要过程。值得注意的是, SAH 在细胞内大量积累可引起蛋白精氨酸低甲基化,这比 DNA 低甲基化更为显著。Hcy 参与调节脑缺血中内皮损伤和关键基因的甲基化状态,血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)通过下调凝血功能发挥脑缺血保护作用,然而, HHcy 可导致 TM 基因高甲基化,进而诱导 TM 基因沉默,这可能在脑梗死的发生、发展中起重要作用^[73]。在细胞研究中, HHcy 诱导低甲基化应激来降低特定的表观遗传组蛋白 H3K27me3 含量,并激活促炎 NF- κ B 途径,导致黏附分子和炎性细胞因子表达增加,促进内皮功能障碍和活化,致 AS 形成^[74]。因此,在 HHcy 的情况下,细胞甲基化能力紊乱会导致蛋白质低甲基化,诱导内皮功能障碍。然而, Whalen 及其同事^[74]探讨了轻度 HHcy 对 *ApoE*^{-/-} 小鼠血管甲基化指数、AS 进展及 H3K27me3 含量的影响。结果显示轻度的 HHcy 不足以诱导血管低甲基化应激 AS 的进展,只有较高的血浆 Hcy 蓄积才会表现出血管毒性并促进特异性表观遗传失调。综上,蛋白质甲基化紊乱是否参与调控 HHcy 致内皮功能障碍,还值得进一步探索。

4 关于HHcy治疗结果阴性的争议

目前临床上降低 HHcy 的治疗方案较单一,主要通过口服叶酸及维生素 B 进行治疗。尽管对 HHcy 的特异性治疗最适合于找到潜在病因,但无论病因如何,应用叶酸及维生素 B 治疗后 2~6 周内, 90% 以上的患者能降低其 Hcy 浓度,但对于心血管的终点事件是否有效,不同大型临床研究得出的结论不同^[5]。在一项 1 066 例患者的临床研究中,以每天“2.5 mg 叶酸 + 50 mg 维生素 B₆ + 1 mg 维生素 B₁₂”的联合治疗组与安慰剂组进行日常治疗对比,随访 5 年,发现虽然治疗组 Hcy 水平降低,但与安慰剂组对比血管疾病患者发生重大心血管事件

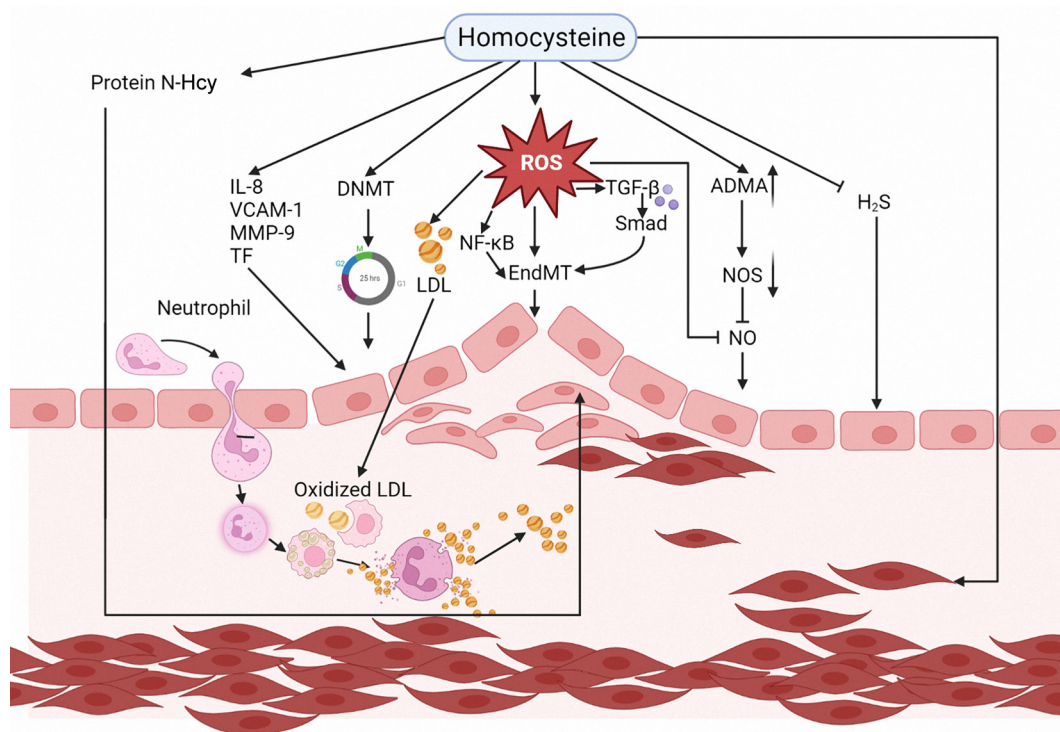


图 1. 同型半胱氨酸诱导内皮功能障碍机制图

Fig. 1. Diagram of the mechanism of homocysteine (Hcy)-induced endothelial dysfunction. IL-8: interleukin-8; VCAM: vascular cell adhesion molecule; MMP-9: matrix metalloproteinase-9; TF: tissue factor; LDL: low density lipoprotein; ROS: reactive oxygen species; NF- κ B: nuclear factor kappa-B; EndMT: endothelial mesenchymal transition; TGF- β : transforming growth factor β ; ADMA: asymmetric dimethylarginine; NOS: nitric oxide synthase; NO: nitric oxide synthase; H₂S: hydrogen sulfide.

的风险并不能降低^[75]。在另一项 12 064 例患者的双盲随机对照试验中,以每天“2 mg 叶酸 + 1 mg 维生素 B₁₂”的联合治疗组与安慰剂组对比,随访 10 年,发现联合治疗能大幅降低 Hcy 水平,但对于心血管终点事件(冠心病死亡、心肌梗死或冠状血管再生)并没有有益效果^[76]。所以,叶酸虽然能降低大多数患者的 Hcy 水平,但对心血管结局事件是否有益,目前研究结果还尚并未明确。故寻找治疗 HHcy 相关血管疾病的新靶点迫在眉睫。

5 总结与展望

HHcy 被认为是心血管疾病的独立危险因素,但目前叶酸及复合维生素 B 降低 Hcy 的方案,对于心血管终点事件疗效并不理想,其在降低循环中 Hcy 水平的同时是否能降低细胞内 Hcy 水平,目前不得而知。如若细胞内高 Hcy 状态持续存在,则对细胞毒性将继续发挥作用,导致相关血管疾病。本文概括了目前 HHcy 与内皮功能障碍间的联系的几种假说: HHcy 促进氧化应激与炎症、对 NO 产生

的干扰及降低其生物利用度、抑制 H_2S 信号通路、促进 EndMT、激活凝血途径、脂蛋白代谢障碍、蛋白 N- 同型半胱氨酸化、细胞低甲基化等 (图 1)。其中 EndMT 是参与调控 HHcy 致内皮功能障碍的新分子证据, 在其中发挥的作用还尚未完全确定, 需要进一步探究, 将来有望成为临床治疗 HHcy 相关血管疾病的新靶点。

参考文献

- 1 Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati
E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ,
Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ,
Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J,
Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin
VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM,
He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum
N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello
A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula
J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi
M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, P Ribeiro AL, Rigotti

- N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, M Tleyjeh I, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhke L, Murray C, Fuster V. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study. *J Am Coll Cardiol* 2020; 76(25): 2982–3021.
- 2 Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118(4): 620–636.
- 3 Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274(19):1526–1533.
- 4 Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31–62.
- 5 Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 345(9176): 407–413.
- 6 Wang XH (王学惠), Zhao WG, Li HD, Liu HB, Ai SZ, Zeng X, Wang LB, Zhang YC. Analysis of gender difference in coronary heart disease by homocysteine and lipoprotein A. *Chongqing Med (重庆医学)* 2019; 48(19): 3270–3274 (in Chinese).
- 7 McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56(1): 111–128.
- 8 Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol* 2022; 22(9): 576–588.
- 9 Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell* 2022; 185(10): 1630–1645.
- 10 Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci* 2020; 20(1): 21–30.
- 11 Liu X, Ma J, Ma L, Liu F, Zhang C, Zhang Y, Ni M. Overexpression of tissue factor induced atherothrombosis in apolipoprotein E^{-/-} mice via both enhanced plaque thrombogenicity and plaque instability. *J Mol Cell Cardiol* 2019; 127: 1–10.
- 12 Konukoglu D, Uzun H. Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2017; 956: 511–540.
- 13 Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17(1): 121.
- 14 Korkmaz-Icöz S, Kocer C, Sayour AA, Kraft P, Benker MI, Abulizi S, Georgevici AI, Brlecic P, Radovits T, Loganathan S, Karck M, Szabó G. The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor canagliflozin alleviates endothelial dysfunction following *in vitro* vascular ischemia/reperfusion injury in rats. *Int J Mol Sci* 2021; 22(15): 7774.
- 15 Fang YC, Hsieh YC, Hu CJ, Tu YK. Endothelial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* 2023; 24(3): 2909.
- 16 Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757–772.
- 17 Richard E, Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, Oyarzábal A, Pérez B, Rodríguez-Pombo P, Desviat LR. Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 1246069.
- 18 Chan SH, Hung CH, Shih JY, Chu PM, Cheng YH, Lin HC, Hsieh PL, Tsai KL. Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling. *Redox Biol* 2018; 14: 116–125.
- 19 Li HD (李慧丹), Zhao WG, Wang XH. Research on the role of Nox4 in homocysteine-mediated atherosclerosis. *Med Inf (医学信息)* 2019; 32(15): 45–47 (in Chinese).
- 20 Ji XW, YU HJ, Zhou GH, Bo Wu, Zhu YY, Wu TH, Zhang F, Jin SN, Cho KW, Wen JF. Physcion, a tetra-substituted 9,10-anthraquinone, prevents homocysteine-induced endothelial dysfunction by activating Ca²⁺- and Akt-eNOS-NO signaling pathways. *Phytomedicine* 2021; 81: 153410.
- 21 Lai WK, Kan MY. Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab* 2015; 67(1): 1–12.
- 22 Liu SJ, Tao J, Duan FQ, Li HJ, Tan HM. HHcy induces pyroptosis and atherosclerosis via the lipid raft-mediated NOX-ROS-NLRP3 inflammasome pathway in apoE^{-/-} mice. *Cells* 2022; 11(15): 2438.
- 23 Esse R, Barroso M, de Almeida IT, Castro R. The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art. *Int J Mol Sci* 2019; 20(4): 867.
- 24 Carluccio MA, Ancora MA, Carluccio MMM, Scoditti E, Distanti A, Storelli C, Caterina RD. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(4): H2344–H2354.
- 25 Ji CL, Yi H, Huang J, Zhang WZ, Zheng MZ. Propofol alleviates inflammation and apoptosis in HCY-induced HUVECs by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep* 2021; 23(5): 333.
- 26 Hu HM, Wang CY, Jin Y, Meng Q, Liu Q, Liu ZH, Liu KX, Liu XY, Sun HJ. Catalpol inhibits homocysteine-induced oxidation and inflammation via inhibiting Nox4/NF-κB and GRP78/PERK pathways in human aorta endothelial cells.

- Inflammation 2019; 42(1): 64–80.
- 27 Chen L, Lei L, Li TY, Yan JT, Jiang JG. A20 alleviates the vascular remodeling induced by homocysteine. *Am J Transl Res* 2018; 10(12): 3991–4003.
- 28 Seaks CE, Weekman EM, Sudduth TL, Xie K, Wasek B, Fardo DW, Johnson LA, Bottiglieri T, Wilcock DM. Apolipoprotein E ϵ 4/4 genotype limits response to dietary induction of hyperhomocysteinemia and resulting inflammatory signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 2022; 42(5): 771–787.
- 29 Dovinová I, Hrabárová E, Jansen E, Kvandová M, Majzúnová M, Berenyiová A, Barančík M. ADMA, homocysteine and redox status improvement affected by 7-nitroindazole in spontaneously hypertensive rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 1478–1483.
- 30 Lee TS, Lu TM, Chen CH, Guo BC, Hsu CP. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction and accelerates atherosclerosis by disturbing the asymmetric dimethylarginine/dimethylarginine dimethylaminotransferase 2 pathway. *Redox Biol* 2021; 46: 102108.
- 31 Toyomasu K, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Nakamura S, Nohara Y, Morikawa N, Sakaue A, Hamamura H, Yamamoto M, Fukumoto Y. Impact of combined elevations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine on all-cause death - The Tanushimaru Study. *J Cardiol* 2021; 78(2): 129–135.
- 32 Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad D, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6): 1557–1564.
- 33 Liu HT, Zhou ZX, Ren Z, Yang S, Liu LS, Wang Z, Wei DH, Ma XF, Ma Y, Jiang ZS. EndMT: Potential target of H₂S against atherosclerosis. *Curr Med Chem* 2021; 28(18): 3666–3680.
- 34 Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced blood-brain barrier permeability by inhibiting MMP-9. *Int J Neurosci* 2022; 132(11): 1061–1071.
- 35 Zhao ZQ, Liu X, Shi S, Li H, Gao F, Zhong X, Wang YW. Exogenous hydrogen sulfide protects from endothelial cell damage, platelet activation, and neutrophils extracellular traps formation in hyperhomocysteinemia rats. *Exp Cell Res* 2018; 370(2): 434–443.
- 36 Kovacic JC, Dimmeler S, Harvey RP, Finkel T, Aikawa E, Krenning G, Baker AH. Endothelial to mesenchymal transition in cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73(2): 190–209.
- 37 Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2018; 114(4): 565–577.
- 38 Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, Nomura-Kitabayashi A, Pandey G, Purushothaman KR, d'Escamard V, Li JR, Hadri L, Fujitani K, Moreno PR, Benard L, Rimmele P, Cohain A, Mecham B, Randolph GJ, Nabel EG, Hajjar R, Fuster V, Boehm M, Kovacic JC. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun* 2016; 7: 11853.
- 39 Gorelova A, Berman M, Ghouleh IA. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2021; 34(12): 891–914.
- 40 He JZ, Sun Y, Jia YL, Geng XQ, Chen RY, Zhou H, Yang BX. *Ganoderma triterpenes* protect against hyperhomocysteinemia induced endothelial-mesenchymal transition via TGF- β signaling inhibition. *Front Physiol* 2019; 10: 192.
- 41 HuangYP, Han XD, Tang JY, Long X, Wang XY. Salidroside inhibits endothelial-mesenchymal transition via the KLF4/eNOS signaling pathway. *Mol Med Rep* 2021; 24(4): 692.
- 42 Li C, Xia M, Abais JM, Liu X, Li N, Boini KM, Li PL. Protective role of growth hormone against hyperhomocysteinemia-induced glomerular injury. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2013; 386(6): 551–561.
- 43 Zhang C, Xia M, Boini KM, Li CX, Abais JM, Li XX, Laperle LA, Li PL. Epithelial-to-mesenchymal transition in podocytes mediated by activation of NADPH oxidase in hyperhomocysteinemia. *Pflugers Arch* 2011; 462(3): 455–467.
- 44 Li CX, Xia M, Han WQ, Li XX, Zhang C, Boini KM, Liu XC, Li PL. Reversal by growth hormone of homocysteine-induced epithelial-to-mesenchymal transition through membrane raft-redox signaling in podocytes. *Cell Physiol Biochem* 2011; 27(6): 691–702.
- 45 Han LL, Miao YT, Zhao Y, Zhang XZ, Ma XL, Du X, Kong W, Xu QB, Liu JL, Dai KS, Feng J, Wang X. The binding of autotaxin to integrins mediates hyperhomocysteinemia-potentiated platelet activation and thrombosis in mice and humans. *Blood Adv* 2022; 6(1): 46–61.
- 46 Prajapati K, Sailor V, Patel S, Rathod M. Pernicious anaemia: cause of recurrent cerebral venous thrombosis. *BMJ Case Rep* 2021; 14(5): e239833.
- 47 Kolodziejczyk-Czepas J, Talar B, Nowak P, Olas B, Wachowicz B. Homocysteine and its thiolactone impair plasmin activity induced by urokinase or streptokinase *in vitro*. *Int J Biol Macromol* 2012; 50(3): 754–758.
- 48 Çaytemel C, Demir FT, Büyükbabani N, Türkoğlu Z, Uzuner EG. Multifactorial painful leg ulcers due to hyperhomocysteinemia, plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G heterozygote gene mutation, and beta thalassemia minor: a case report. *Int*

- J Low Extrem Wounds 2019; 18(3): 339–341.
- 49 Narayan S, Chandrasekaran A, Basu D, Hanumanthappa N, Aghoram R, Dutta TK, Rejul V. Prothrombotic factors have significant association with arterial and venous strokes in Indian Tamilians. *J Appl Lab Med* 2021; 6(1): 101–112.
 - 50 Blachier F, Andriamihaja M, Blais A. Sulfur-containing amino acids and lipid metabolism. *J Nutr* 2020; 150(Suppl 1): 2524S–2531S.
 - 51 Visram M, Radulovic M, Steiner S, Malanovic N, Eichmann TO, Wolinski H, Rechberger GN, Tehlivets O. Homocysteine regulates fatty acid and lipid metabolism in yeast. *J Biol Chem* 2018; 293(15): 5544–5555.
 - 52 Zhang T, Lu R, Chen YB, Yuan YG, Song SZ, Yan KN, Zha YW, Zhuang WW, Cheng Y, Liang JY. Hyperhomocysteinemia and dyslipidemia in point mutation G307S of cystathionine β -synthase-deficient rabbit generated using CRISPR/Cas9. *Lipids Health Dis* 2020; 19(1): 224.
 - 53 Wang XF, Zhang YX, Ma HY, Yuan YG, Song SZ, Yan KN, Zha YW, Zhuang WW, Cheng Y, Liang JY. Targeted profiling of amino acid metabolome in serum by a liquid chromatography-mass spectrometry method: application to identify potential markers for diet-induced hyperlipidemia. *Anal Methods* 2020; 12(18): 2355–2362.
 - 54 Minno AD, Anesi A, Chiesa M, Cirillo F, Colombo GI, Orsini RC, Capasso F, Morisco F, Fiorelli S, Eligini S, Cavalca V, Tremoli E, Porro B, Di Minno MND. Plasma phospholipid dysregulation in patients with cystathionine- β synthase deficiency. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020; 30(12): 2286–2295.
 - 55 Velez-Carrasco W, Merkel M, Twiss CO, Smith JD. Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *J Nutr Biochem* 2008; 19(6): 362–370.
 - 56 Sharma GS, Singh LR. Conformational status of cytochrome c upon N-homocysteinylation: Implications to cytochrome c release. *Arch Biochem Biophys* 2017; 614: 23–27.
 - 57 Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylation of protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids* 2015; 47(7): 1319–1339.
 - 58 Kameda T, Horiuchi Y, Shimano S, Yano K, Lai SJ, Ichimura N, Tohda S, Kurihara Y, Tozuka M, Ohkawa R. Effect of myeloperoxidase oxidation and N-homocysteinylation of high-density lipoprotein on endothelial repair function. Effect of myeloperoxidase oxidation and N-homocysteinylation of high-density lipoprotein on endothelial repair function. *Biol Chem* 2021; 403(3): 265–277.
 - 59 Bossenmeyer-Pourrié C, Smith AD, Lehmann S, Deramecourt V, Sablonnière B, Camadro JM, Pourrié G, Kerek R, Helle D, Umoret R, Guéant-Rodriguez RM, Rigau V, Gabelle A, Sequeira JM, Quadros EV, Daval JL, Guéant JL. N-homocysteinylation of tau and MAP1 is increased in autopsy specimens of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Pathol* 2019; 248(3): 291–303.
 - 60 Genoud V, Quintana PG, Gionco S, Baldessari A, Quintana I. Structural changes of fibrinogen molecule mediated by the N-homocysteinylation reaction. *J Thromb Thrombolysis* 2018; 45(1): 66–76.
 - 61 Jakubowski H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiol Rev* 2019; 99(1): 555–604.
 - 62 Jakubowski H, Boers GH, Strauss KA. Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation of protein levels in humans. *FASEB J* 2008; 22(12): 4071–4076.
 - 63 Moshtaghie E, Nayeri H, Moshtaghie AA, Asgary S. The effect of homocysteine thiolactone on paraoxonase and aryl esterase activity of human serum purified paraoxonase 1 *in vitro* experiments. *ARYA Atheroscler* 2022; 18(2): 1–6.
 - 64 AnandBabu K, Sen P, Angayarkanni N. Oxidized LDL, homocysteine, homocysteine thiolactone and advanced glycation end products act as pro-oxidant metabolites inducing cytokine release, macrophage infiltration and pro-angiogenic effect in ARPE-19 cells. *PLoS One* 2019; 14(5): e0216899.
 - 65 Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet* 2022; 38(7): 676–707.
 - 66 Fu Y, Wang X, Kong W. Hyperhomocysteinemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets. *Br J Pharmacol* 2018; 175(8): 1173–1189.
 - 67 Wang WM, Jin HZ. Homocysteine: a potential common route for cardiovascular risk and DNA methylation in psoriasis. *Chin Med J* 2017; 130(16): 1980–1986.
 - 68 Schumann NAB, Mendonça AS, Silveira MM, Vargas LN, Leme LO, de Sousa RV, Franco MM. Procaine and S-adenosyl-L-homocysteine affect the expression of genes related to the epigenetic machinery and change the dna methylation status of *in vitro* cultured bovine skin fibroblasts. *DNA Cell Biol* 2020; 39(1): 37–49.
 - 69 Feng PN, Liang YR, Lin WB, Yao ZR, Chen DB, Chen PS, Ouyang J. Homocysteine induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells via regulating methylation of SORBS1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(20): 6948–6958.
 - 70 Wei LH, Chao NX, Gao S, Yu YT, Shi L, Ma XB, Liao N, Lan K, Luo Y, Xie ZY, Li YY. Homocysteine induces vascular inflammatory response via SMAD7 hypermethylation in human umbilical vein smooth muscle cells. *Microvasc Res* 2018; 120: 8–12.
 - 71 Esse R, Teerlink T, Koolwijk P, Tavares de Almeida I, Blom

- HJ, Castro R. Folinic acid increases protein arginine methylation in human endothelial cells. *Nutrients* 2018; 10(4): 404.
- 72 Guo W, Zhang HP, Yang A, Ma PJ, Sun L, Deng M, Mao CY, Xiong JT, Sun JM, Wang N, Ma SC, Nie LH, Jiang YD. Homocysteine accelerates atherosclerosis by inhibiting scavenger receptor class B member1 via DNMT3b/SP1 pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2020; 138: 34–48.
- 73 Yang ZF, Wang LZ, Zhang W, Wang XX, Zhou SN. Plasma homocysteine involved in methylation and expression of thrombomodulin in cerebral infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 73(4): 1218–1222.
- 74 Whalen CA, Mattie FJ, Florindo C, Zelst BV, Huang NK, Tavares de Almeida I, Heil SG, Neuberger T, Ross AC, Castro R. No effect of diet-induced mild hyperhomocysteinemia on vascular methylating capacity, atherosclerosis progression, and specific histone methylation. *Nutrients* 2020; 12(8): 2182.
- 75 Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354(15): 1567–1577.
- 76 Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group; Armitage JM, Bowman L, Clarke RJ, Wallendszus K, Bulbulia R, Rahimi K, Haynes R, Parish S, Sleight P, Peto R, Collins R. Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA* 2010; 303(24): 2486–2494.