

RANK 基因甲基化与新疆不同民族老年男性高密度脂蛋白胆固醇的相关性

塔吉古丽·木沙, 向红, 白雪, 李杨静, 王红梅

(新疆维吾尔自治区人民医院干部保健二科, 乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的** 探讨 RANK 基因甲基化与高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的相关性。**方法** 2018 年 4 月至 2018 年 5 月对新疆木垒县和洛浦县 65 岁以上的汉族、维吾尔族、哈萨克族居民流行病学调查研究数据,分为病例组和对照组进行研究。调查采用问卷调查、体格检查和实验室检测获取研究对象的一般资料及血生化指标。应用 EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits 进行基因组甲基化修饰,采用 BiQ Analyzer 分析软件对 RANK 基因组标准序列和测序序列进行比对。采用协方差分析,在校正年龄、吸烟、饮酒及高血压、糖尿病患病率后,分析对照组、病例组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率。**结果** 在新疆维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率低于病例组,差异有统计学意义($P < 0.05$);校正年龄、吸烟、饮酒及高血压、糖尿病、肥胖患病率后,在新疆维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率低于病例组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 在新疆维吾尔族、哈萨克族老年男性中,RANK 基因甲基化率增高可能与低高密度脂蛋白胆固醇血症相关。

[关键词] 胆固醇;HDL;DNA 甲基化;民族;老年人

中图分类号:R589.21 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2018.06.004

Correlation between RankANK gene DNA methylation and high density lipoprotein cholesterol in male Elderly Uyghur, Kazak and Han Nationality in Xinjiang Tajguli Musha, Xiang Hong, Bai Xue, Li Yangjing, Wang Hongmei (Senior Ward II, Xinjiang Uyghur Autonomous Region People's Hospital, Urumchi 830001, China)

Corresponding author: Wang Hongmei, Email: 1551029890@qq.com

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between RANK gene methylation and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) by case-control study. **Methods** Data were collected from the epidemiological survey data of Han, Uyghur, Kazak residents aged 65 and over in luopu county, mulei county, xinjiang from April 2018 to May 2018, which were divided into case group and control group. General information and blood biochemical indexes of the subjects were obtained by questionnaire survey and laboratory test. The genomic methylation modification was performed on EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits, BiQ Analyzer was used to compare the RANK genome standard sequence and sequencing sequence. The methylation rate of RANK gene CpG island in the control group was analyzed by covariance analysis after adjusting the prevalence rate of age, smoking, drinking and hypertension and diabetes. **Results** Among elderly uyghur, kazak nationality males of xinjiang, The methylation rate of RANK gene CpG island in the control group was lower than that in the case group, The difference was statistically significant ($P < 0.05$). After adjusting the prevalence rate of age, smoking, drinking and hypertension and diabetes, Among elderly uyghur, kazak nationality males of xinjiang, The methylation rate of RANK gene CpG island in the control group was lower than that in the case group ($P < 0.05$). **Conclusion** Among elderly uyghur, kazak nationality males of xinjiang, a slight increase in RANK methylation may be associated with low HDL cholesterol.

[Keywords] Cholesterol; HDL; DNA methylation; Ethnic groups; Aged

血脂异常是心脑血管疾病的独立而重要的危险因素,它所引起的各种严重疾病已经成为很多国家

的重要致死和致残原因,因此积极调脂治疗对减少心脑血管疾病的发生有着非常重要的意义。

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2015211C199)

作者简介:塔吉古丽·木沙,主治医师,Email:3297156466@qq.com

通信作者:王红梅,主任医师,Email:1551029890@qq.com

研究表明,血脂异常的发病与遗传因素和环境因素有关^[1]。表观遗传学修饰可导致遗传性的表型变异^[2],其中 DNA 甲基化是表观遗传修饰的一种主要修饰方式^[3],是可逆的 DNA 自然化学的修饰方式。环境因素可能通过影响表观遗传修饰的变化,导致血脂异常。国内对核因子 KB 受体活化因子(RANK)基因甲基化的研究较少。本研究旨在探讨 RANK 基因甲基化在新疆老年男性中的分布情况,及其甲基化程度与高密度脂蛋白胆固醇的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究是以自然人群横断面流行病学调查为基础的病例—对照研究。即采用多级随机抽样的方法。2018 年 4 月至 2018 年 5 月,对新疆木垒县和洛浦县有本地正式户口且 65 岁以上的长住汉族、维吾尔族、哈萨克族居民进行流行病学现况调查。调查前事先登记人口,保证应答率,保证入选个体均为无关个体。调查采用问卷调查方法,调查工作主要由经过统一培训的专职人员填写表格、询问病史。所有研究对象均收集一般资料,抽取空腹状态下全血 5 mL,现场离心分离血清和血液有形成分,血清在采血后 1 个月内检测血脂[包括总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、HDL-C、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]、空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FIns)等生化指标,血液有形成分在 -80 ℃ 保存,以提取 DNA。生化检测均在新疆维吾尔自治区人民医院检验科完成并由专人负责。

在以上获得人群样本中随机抽样,最后共有 32 位汉族、28 位维吾尔族、30 位哈萨克族老年男性入选本研究。

按《中国成人超重和肥胖症预防控制指南》标准诊断中心性肥胖:男性腰围 ≥ 85 cm、女性腰围 ≥ 80 cm 者为中心性肥胖。按照《中国成人血脂异常防治指南》标准诊断低高密度脂蛋白胆固醇血症:HDL-C < 1 mmol/L 的个体判断为低高密度脂蛋白胆固醇血症。

在入选研究对象中,汉族低高密度脂蛋白胆固醇血症组(病例组)共 18 例、对照组 14 例;维吾尔族低高密度脂蛋白胆固醇血症组(病例组)共 16 例、对照组 12 例;哈萨克族低高密度脂蛋白胆固醇血症组(病例组)共 16 例、对照组 14 例。

所有研究对象均签署知情同意书。本研究通过新疆维吾尔自治区人民医院医学伦理委员会审查并同意实施。

1.2 研究方法

1.2.1 外周血基因组 DNA 提取 抽取受试者外周血 5 mL, -80 ℃ 保存。应用 PAXgene Blood DNA kit 试剂盒(QIAGEN, 德国),并按照试剂盒中提供的“操作说明”中的标准操作步骤提取外周血基因组 DNA。

1.2.2 RANK 启动子区甲基化检测 使用 Methyl Primer Express v1.0 设计重亚硫酸盐测序引物:上游引物 5'-GGTGCCTTTCTAGAATTTGGTGG-3';下游引物:5'-CCAACCCTAAATTACCCTTCAC-3', PCR 产物长度 376 bp,共 20 个 CpG 位点。

应用 EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits(QIAGEN, 德国)进行基因组甲基化修饰,并对修饰后的 DNA 进行反复洗脱、纯化,洗脱纯化的 DNA 放入 -20 ℃ 保存。取质检合格的上述基因组 DNA 样本进行 PCR 扩增,并将 PCR 扩增产物回收。回收的 PCR 扩增产物送上海生工测序,并采用 BiQ Analyzer 分析软件对 RANK 基因组标准序列和测序序列进行比对。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件包进行数据处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用例数或者百分数表示。组间临床表型计量资料比较采用 *t* 检验(两组间)或单因素方差分析(3 组间),分类资料采用 χ^2 检验。并采用协方差分析,在校正年龄、吸烟、饮酒、血脂及高血压、糖尿病患病率后,分析对照组、病例组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性研究对象临床特征 在汉族研究对象中,病例组、对照组间高血压患病率的差异有统计学意义($P < 0.05$);在哈萨克族研究对象中,病例组、对照组间的高血压患病率、肥胖患病率的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性 RANK 基因甲基化率差异 在新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,RANK 基因 CpG 岛甲基化率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 RANK 基因甲基化与新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性高密度脂蛋白胆固醇相关性 在新疆维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率低于病例组,差异有统计学意义($P < 0.05$);在汉族老年男性中,对照组 RANK 基

表 1 新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族研究对象临床资料分析

项目	汉族		维吾尔族		哈萨克族	
	对照组(<i>n</i> = 14)	病例组(<i>n</i> = 18)	对照组(<i>n</i> = 12)	病例组(<i>n</i> = 16)	对照组(<i>n</i> = 14)	病例组(<i>n</i> = 16)
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	71.57 ± 5.87	70.44 ± 9.01	71.33 ± 7.40	69.38 ± 9.22	72.29 ± 5.99	68.63 ± 9.82
收缩压($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	135.43 ± 20.47	137.33 ± 8.75	137.00 ± 31.05	125.75 ± 15.54	124.86 ± 23.14	125.63 ± 14.01
舒张压($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	78.43 ± 9.30	84.67 ± 12.71	74.83 ± 9.13	81.50 ± 14.31	74.57 ± 10.51	83.00 ± 13.77
肌酐($\bar{x} \pm s$, μmol/L)	72.97 ± 18.94	68.08 ± 10.38	79.41 ± 18.69	79.76 ± 21.68	80.74 ± 16.67	80.23 ± 21.27
不吸烟/吸烟(例/例)	4/10	6/12	6/6	8/8	6/8	6/10
不饮酒/饮酒(例/例)	4/10	10/8	4/8	10/6	2/12	6/10
无高血压/高血压(例/例)	10/4	2/16 ^a	4/8	2/14	12/2	4/12 ^a
无糖尿病/糖尿病(例/例)	10/4	8/10	6/6	10/6	7/7	10/6
不肥胖/肥胖(例/例)	10/4	6/12	5/7	7/9	11/3	4/12 ^a

注:与同民族的对照组比较, ^a*P* < 0.05

表 2 新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性 RANK 基因甲基化率差异

组别	例数	甲基化率($\bar{x} \pm s$, %)
汉族	32	43.44 ± 12.144
维吾尔族	28	44.64 ± 13.259
哈萨克族	30	50.67 ± 13.075
<i>F</i> 值		2.769
<i>P</i> 值		0.068

因 CpG 岛甲基化率低于病例组,差异无统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

采用协方差分析,校正年龄、吸烟、饮酒及高血压、糖尿病、肥胖患病率后,在新疆维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率低于病例组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 3 新疆汉、维吾尔、哈萨克族高密度脂蛋白胆固醇与 RANK 基因甲基化相关性分析

组别	例数	甲基化率($\bar{x} \pm s$, %)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
汉族			0.821	0.418
对照组	14	41.43 ± 10.995		
病例组	18	45.00 ± 13.061		
维吾尔族			2.753	0.011
对照组	12	37.50 ± 8.394		
病例组	16	50.00 ± 13.904		
哈萨克族			2.764	0.010
对照组	14	44.29 ± 10.164		
病例组	16	56.25 ± 13.102		

3 讨论

血清 HDL-C 水平反映了遗传和环境因素间的相互作用,据研究报道,50% 以上人类 HDL-C 水平

的变异由遗传因素所引起^[4]。DNA 甲基化是一种可遗传性的、与心脑血管危险因素相关的可修饰的表观遗传标记,而且人类基因组约 70% 的 CpG 位点存在甲基化。脂质代谢的调控基因众多,本研究的目的是识别与血清脂质水平相关的 DNA 甲基化差异位点。本研究通过在新疆维吾尔族、哈萨克族、汉族自然人群中的研究发现,新疆维吾尔族、哈萨克族老年低高密度脂蛋白胆固醇血症可能与 RANK 基因甲基化率变异有关,RANK 基因甲基化率增高可能是低高密度脂蛋白胆固醇血症的危险因素。

护骨素(OPG)、RANK 和其配体 - 核受体 KB 激活受体配体(RANKL)是 RANKL/RANK/OPG 信号通路中的三个主要蛋白。RANKL/RANK/OPG 系统是一个成骨细胞、破骨细胞相互作用的信号通道,在调节骨代谢过程中起很关键的作用。近年来随着研究的进一步深入,发现 RANKL/RANK/OPG 不仅在参与调节骨代谢,在免疫、炎症、动脉粥样硬化、血管钙化、细胞凋亡及肿瘤转移等方面均起着重要的作用,它还参与了人体内许多疾病发生发展的重要病理生理过程,如冠心病、外周动脉疾病、高血压、糖尿病、类风湿关节炎等^[5-7]。另一项研究报道,通过阻断 RANKL/RANK/OPG 信号通路能够改善胰岛素抵抗,可能预防糖尿病的发生^[8]。

研究发现,RANKL/RANK/OPG 在脂肪代谢中发挥重要作用^[9-11],OPG 可能通过调节脂肪酸摄取基因 CD36、核受体基因 PPARγ、ERK 信号通路调节三酰甘油^[12]。而在本研究中。也发现低高密度脂蛋白胆固醇血症可能与 RANK 基因 CpG 岛甲基化水平增高存在有相关性,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。此外,本研究结果发现,在维吾尔族、哈萨

克族老年人群中,低高密度脂蛋白胆固醇血症患者中 RANK 基因 CpG 岛甲基化水平升高($P < 0.05$),但在汉族人群中没有统计学意义。分析其原因,考虑多种因素有关:DNA 甲基化不是静止的稳定状态,而是能够受到外界刺激发生变化的动态过程,研究提示孕妇产前、产后营养状况均可影响 DNA 甲基化及组蛋白修饰进而影响免疫及代谢系统^[13];另有研究表明:高脂肪饮食、年龄、环境均会影响 DNA 甲基化程度的改变^[14-15],维吾尔族、哈萨克族人群具有特殊的膳食习惯和生活方式,膳食中主要以肉制品和奶制品为主,高脂肪、高蛋白及高嘌呤饮食在膳食中占较大的比例,鱼类和蔬菜水果的摄入量相对较少。维吾尔族膳食结构中粮谷类、畜禽肉类及水果类摄入量达到或接近中国居民平衡膳食宝塔(2016)要求;蔬菜类及蛋类的摄入量低于宝塔建议值;油脂、乳类及盐类的摄入量高于宝塔建议值^[16]。故此研究结果还需要进行深入研究及大样本实验研究的验证。

总之,本研究发现 RANK 基因的甲基化率增高可能与新疆维吾尔族、哈萨克族老年男性低高密度脂蛋白胆固醇血症相关,为探讨低高密度脂蛋白胆固醇血症发生发展的可能遗传机制提供了依据。当然,由于基因的表达受到翻译、转录、蛋白合成过程中多种因素的影响和调控,所以 RANK 基因甲基化在脂质代谢中的作用还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] BRUNHAM L R. HDL as a causal factor in atherosclerosis: insights from human genetics [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2016, 18(12): 71.
- [2] SCHEEN A J, JUNIEN C. Epigenetics, interface between environment and genes: role in complex diseases [J]. *Rev Med Liege*, 2012, 67(5/6): 250-257.
- [3] YAGI S, HIROSAWA M, SHIOTA K. DNA methylation profile: a composer-, conductor-, and player-orchestrated Mammalian genome consisting of genes and transposable genetic elements [J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(3): 265-273.
- [4] HELLER D A, DE FAIRE U, PEDERSEN N L, et al. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(16): 1150-1156.
- [5] HANADA R, HANADA T, SIGL V, et al. RANKL/RANK-beyond bones [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(7): 647-656.
- [6] ROSHANDEL D, HOLLIDAY K L, PYE S R, et al. Genetic variation in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway is associated with bone turnover and bone mineral density in men [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(8): 1830-1838.
- [7] REINHARD H, LAJER M, GALL M A, et al. Osteoprotegerin and mortality in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(12): 2561-2566.
- [8] KIECHL S, WITTMANN J, GIACCARI A, et al. Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus [J]. *Nat Med*, 2013, 19(3): 358-363.
- [9] LUO X H, GUO L J, XIE H, et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(10): 1648-1656.
- [10] AN J J, HAN D H, KIM D M, et al. Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue [J]. *Yonsei Med J*, 2007, 48(5): 765-772.
- [11] HARSLOF T, HUSTED L B, CARSTENS M, et al. The expression and regulation of bone-acting cytokines in human peripheral adipose tissue in organ culture [J]. *Horm Metab Res*, 2011, 43(7): 477-482.
- [12] 罗小河. 骨保护素调控肝脏三酰甘油代谢的机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [13] NAUTA A J, BEN A K, KNOL J, et al. Relevance of pre- and postnatal nutrition to development and interplay between the microbiota and metabolic and immune systems [J]. *Am J Clin Nutr*, 2013, 98(2): 586S-593S.
- [14] JACOBSEN S C, BRINS C, BORK-JENSEN J, et al. Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(12): 3341-3349.
- [15] RINN T, POULSEN P, HANSSON O, et al. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(7): 1159-1168.
- [16] 铁日格力, 徐抒, 袁倩倩, 等. 515 名维吾尔族居民膳食营养状况调查 [J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(4): 523-525.

(收稿日期: 2018-06-19)