RANK 基因甲基化与新疆汉、维吾尔、哈萨克族老年男性肥胖相关性研究

赛娅热·雪克拉提 李杨静 白 雪 向 红 王红梅

摘 要 目的 分析 RANK 基因甲基化变异与肥胖的相关性。**方法** 资料来源于 2018 年 4～5 月对新疆维吾尔自治区木垒县、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,随机抽取 32 例汉族、28 例维吾尔族、30 例哈萨克族老年男性,各分为病例组和对照组。流行病学调查采用问卷调查、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、高血压发生率及血脂后,分析对照组、病例组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率差异。**结果** RANK 基因 CpG 岛甲基化率在 3 个民族间比较差异无统计学意义;在校正年龄、吸烟、饮酒、高血压发生率及血脂后,在新疆维吾尔自治区汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率高于病例组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,RANK 基因甲基化率降低可能与肥胖相关。

关键词 肥胖 Rank 基因 甲基化

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.022

Correlation between RANK Gene DNA Methylation and Obesity in Male Elderly Uygur, Kazak and Han Nationality in Xinjiang. *Saiyare·Xuekelati, Li Yangjing, Bai Xue, et al. The Second Ward of the Health Center for Cadre, The People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830000, China*

Abstract Objective To investigate the correlation between RANK gene methylation and obesity by case-control study. **Methods** Data were collected from the epidemiological survey data of Han, Uygur, Kazak residents aged 65 and over in LuoPu county and MuLei county, Xinjiang from April 2018 to May 2018, which 32 Han, 28 Uygur and 30 Kazakh elderly men were randomly selected and 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 blood lipid. **Results** Among elderly Han, Uygur and Kazak nationality males of Xinjiang. The methylation rate of RANK gene CpG island had no statistics significance ($P>0.05$). After adjusting the prevalence rate of age, smoking, drinking and hypertension and blood lipid among elderly Han, Uygur and Kazak nationality males of Xinjiang. The methylation rate of RANK gene CpG island in the control group was higher than that in the case group ($P<0.05$). **Conclusion** Among elderly Han, Uygur and Kazak nationality males of Xinjiang, a slight decrease in RANK methylation may be associated with obesity.

Key words Obesity; RANK DNA; Methylation

随着社会经济的高速发展以及人们生活水平的日益提高,生活方式和饮食结构逐渐发生改变,肥胖已成为当今社会的公共健康问题。全球约有 17 亿超重人群和 3 亿肥胖者。中国超重及肥胖者人数在过去的 20 年内增长了 4 倍。肥胖是遗传和环境因素共同作用的结果。随着研究的深入,表观遗传与肥胖发生的关系日益受到重视,许多研究揭示了 DNA 甲基化与肥胖之间存在关联性[1～3]。

DNA 甲基化是一种表观遗传修饰方式且为可逆的 DNA 自然化学修饰方式。DNA 甲基化是指以 S-腺苷-L-甲硫氨酸为甲基供体,在 DNA 甲基转移酶的作用下将甲基转移到胞嘧啶的 C-5 上。DNA 甲基化主要发生在基因的 5′端启动子对称 CpG 序列中的 C 碱基上。CpG 岛的甲基化会干扰一些转录因子

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2015211C199)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院干部保健二科

通讯作者:王红梅,主任医师,电子信箱:whmdoctor@163.com

与基因调控区的结合或直接抑制 RNA 聚合酶活性而抑制基因的表达[1]。

DNA 甲基化已经广泛应用于糖尿病、骨性关节炎及各种肿瘤疾病发病机制的研究。目前,在肥胖研究中对 DNA 甲基化的研究还较少。针对核因子 - κB 受体活化因子(receptor activator of NF - κB, RANK)基因甲基化与肥胖之间相关性的研究报道甚少,因此本研究从表观遗传学角度入手,以 RANK 基因为切入点,通过比较新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性肥胖者 RANK 基因启动子区 CpG 位点甲基化状态的差异,来探讨该基因 DNA 甲基化与 3 个民族肥胖的相关性,为肥胖发病机制的进一步研究提供基础。

对象与方法

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,对新疆维吾尔自治区木垒县、洛浦县有本地正式户口、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。共调查研究对象维吾尔族 1080 例(应答率 85%),哈萨克族 1106 例(应答率 88%)及汉族 1300 例(应答率 84%)。

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,包括年龄、静息血压、吸烟饮酒史、糖尿病、高血压病史,抽取空腹状态下全血 5ml,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(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerid, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein - cholesterol, HDL - C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein - cholesterol, LDL - C)、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、血糖等生化指标,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(三级甲等医院)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 例汉族、28 例维吾尔族、30 例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≥85cm、女性腰围≥80cm 者为中心性肥胖。按照随机、对照原则,在入选研究的老年肥胖男性中选择汉族 16 例、维吾尔族 16 例、哈萨克族 15 例作为病例组,在入选研究的老年非肥胖男性中选择汉族 16 例、维吾尔族 12 例、哈萨克族 15 例作为对照组。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学委员会审查并同意实施。

2. 研究方法:(1)外周血基因组 DNA 提取:抽取受试者外周血 5ml, - 80℃保存。应用 PAXgene Blood DNA kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司),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。(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 376bp,共 20 个 CpG 位点。应用 EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits(德国 Qiagen 公司)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。

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)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、高血压发生率后,分析对照组、病例组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

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:在新疆哈萨克族老年男性研究对象中,病例组、对照组间的高密度脂蛋白胆固醇比较差异有统计学意义($P<0.05$);在新疆维吾尔族老年男性研究对象中,病例组、对照组间总胆固醇、糖尿病及高血压发生率比较差异有统计学意义($P<0.05$);在新疆汉族老年男性研究对象中,病例组、对照组间年龄、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、谷丙转氨酶比较差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。

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、维吾尔、哈萨克族老年男性病例组中 RANK 基因甲基率没有差异($F=2.875$, $P=0.067$);对照组中,3 个民族 RANK

表 1　新疆汉、维吾尔、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($n=16$)	病例组($n=16$)	对照组($n=12$)	病例组($n=16$)	对照组($n=15$)	病例组($n=15$)
年龄(岁)	73.75±8.64	68.13±5.57*	71.33±9.59	69.38±7.61	71.80±8.88	68.87±7.77
收缩压(mmHg)	141.00±12.30	132.00±16.04	122.08±20.87	136.94±24.21	128.20±20.77	122.33±16.06
舒张压(mmHg)	80.13±13.55	83.75±9.38	76.25±12.37	80.44±12.89	79.13±13.61	79.00±12.58
甘油三酯(mmol/L)	1.07±0.47	2.76±2.48*	2.05±2.53	1.61±0.96	0.99±0.41	2.56±2.62
总胆固醇(mmol/L)	4.56±1.17	4.52±1.45	3.59±0.49	4.17±0.70*	4.52±1.20	4.52±1.48
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.17±0.32	0.93±0.11	0.96±0.15	0.97±0.17	1.14±0.29	0.93±0.10
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.56±0.81	2.34±0.50*	2.13±0.54	2.31±0.64	2.61±0.77	2.46±0.59*
肌酐(mmol/L)	72.91±16.26	67.53±12.87	79.49±14.36	79.69±23.97	78.82±17.90	82.12±20.41
谷丙转氨酶(mmol/L)	15.75±3.64	20.68±7.89	19.07±9.76	13.69±3.61	16.32±6.02	16.50±8.98
谷草转氨酶(mmol/L)	19.65±11.20	19.07±3.87	19.51±7.06	16.80±3.95	22.83±11.65	17.20±4.07
吸烟(不/吸)	4/12	6/10	7/5	7/9	5/10	7/8
饮酒(不/饮)	6/10	8/8	7/5	7/9	2/13	6/9
糖尿病(无/有)	10/6	8/8	11/1	5/11*	11/4	6/9
高血压(无/有)	8/8	4/12	5/7	1/15*	11/4	5/10*

*$P<0.05$

基因甲基率也没有差异($F=1.007$,$P=0.374$)。新疆汉、维吾尔、哈萨克族老年男性 RANK 基因 CpG 岛甲基化率比较差异无统计学意义($P>0.05$),详见表 2。

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

民族	甲基化率(%)	F	P
汉族($n=32$)	43.44±12.14		
维吾尔族($n=28$)	44.64±13.26	2.769	0.068
哈萨克族($n=30$)	46.22±13.08		

3. RANK 基因甲基化与新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性肥胖相关性:在新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率高于病例组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 3。

表 3　新疆汉、维吾尔、哈萨克族肥胖与 RANK 基因甲基化相关性分析

组别	甲基化率(%)	t	P
汉族			
病例组($n=16$)	38.75±8.47	2.335	0.026
对照组($n=16$)	48.13±13.65		
维吾尔族			
病例组($n=16$)	40.31±8.65	2.121	0.044
对照组($n=12$)	50.42±16.30		
哈萨克族			
病例组($n=15$)	45.67±7.99	2.226	0.034
对照组($n=15$)	55.67±15.45		

采用协方差分析,在校正年龄、吸烟、饮酒、高血压患病率、血脂后,在新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率高于病例组,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 4。

表 4　新疆汉、维吾尔、哈萨克族校正年龄、吸烟、饮酒、高血压发生率、血脂后肥胖与 RANK 基因甲基化相关性分析

组别	校正后甲基化率(%)	F	P	95% CI
汉族				
病例组($n=16$)	35.11±3.28	4.096	0.004	28.35~41.88
对照组($n=16$)	51.76±3.28			44.99~58.53
维吾尔族				
病例组($n=16$)	41.47±1.86	11.861	0	35.59~45.35
对照组($n=12$)	48.88±2.21			44.27~53.48
哈萨克族				
病例组($n=15$)	39.25±2.17	15.416	0	34.76~43.74
对照组($n=15$)	62.08±2.17			57.59~66.57

讨　论

DNA 甲基化属于表观遗传修饰之一,不改变 DNA 序列,只影响基因转录活性。既往研究证实肥胖与多种基因的甲基化有密切相关性[4~7]。Kuehnen 等[2]研究发现,阿片-促黑素细胞皮质素原基因的甲基化率在肥胖儿童血液中显著高于正常者,同时发现该基因的甲基化通过减少促黑素 α 的分泌,进而增加摄食导致肥胖。在肥胖者血液中表现为高甲基化的基因还有生物钟基因,该基因与生物钟节律有关,并影响饥饿激素的分泌[8,9]。另有诸多基因在肥胖者血液中表现为低甲基化水平,如瘦素基因启动子

区甲基化程度降低可促进瘦素表达增加,以对抗肥胖发生[10]。目前,针对 RANK 基因甲基化与肥胖之间相关性的研究报道甚少,因此本研究探讨 RANK 基因甲基化与新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性肥胖相关性。

护骨素(osteprotegerin, OPG)、RANK 及其配体(receptor activator of NF - κB ligand, RANKL)是 RANKL/RANK/OPG 信号通路的 3 个主要蛋白,该信号通路是调节骨代谢的关键通路。正常生理情况下 RANK 通过与其受体 RNA 结合,刺激破骨细胞活化和骨吸收,而 OPG 通过竞争性抑制 RANKL 与 RANK 的结合,从而抑制骨吸收。研究表明,除参与骨代谢外,RANKL/RANK/OPG 信号通路也参与细胞增殖和凋亡、动脉粥样硬化、血管钙化、肿瘤骨转移、炎症和免疫等多种病理生理过程。

有文献报道基因甲基化率存在民族/种族差异,但关于 RANK 基因甲基化率的民族差异,目前尚未见报道[11,12]。本研究首先就维吾尔族、哈萨克族、汉族 3 组间甲基化率进行了单因素方差分析,分析结果证实 3 个民族老年男性中 RANK 基因甲基化率比较差异无统计学意义。DNA 甲基化过程是可逆的,甲基化程度可能受到疾病、环境、年龄等混杂因素的影响。Milagro 等[13]的研究发现基因甲基化程度可能与年龄相关。研究证实,在肥胖者中,甲基化水平高的生物钟基因,与体重指数、腰围呈显著正相关。

本研究采用协方差分析,校正年龄、吸烟、饮酒、高血压发生率以及血脂水平后,在新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,对照组 RANK 基因 CpG 岛甲基化率均高于病例组,证实 RANK 基因甲基化变异与肥胖相关,且在非肥胖者中甲基化水平增高。廖二元教授等的动物模型研究发现,OPG 基因敲除小鼠存在糖脂代谢异常及胰岛素抵抗,此结果提示 RANKL/RANK/OPG 信号通路可能参与糖代谢,并与胰岛素抵抗相关,但其具体机制尚不清楚。最近一项通过 15 年随访研究发现,血液中 RANKL 水平较高的人群患 2 型糖尿病的风险增加,而阻断 RANKL/RANK/OPG 信号通路可能具有预防糖尿病发生的作用。由此推测,在某种程度上,RANK 基因甲基化变异参与调节糖脂代谢,参与老年肥胖的发生、发展。

综上所述,在新疆汉族、维吾尔族、哈萨克族老年男性中,RANK 基因甲基化率降低可能与肥胖相关。这些发现对推动肥胖精准化研究及治疗均具有重要意义。值得注意的是,现有的研究仍然处于探索阶段,虽然已经证明了 RANK 基因甲基化变异可影响肥胖的发生,而引起甲基化状态发生改变的具体机制目前还不清楚,今后拟进一步增大样本量,并深入研究多种基因的 DNA 甲基化发生情况以及 DNA 甲基化与肥胖之间的关系。

参考文献

1 Benton MC, Johnstone A, Eccles D, *et al*. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss[J]. Genome Biol, 2015, 16: 8

2 Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, *et al*. An Alu element - associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity[J]. PLoS Genet, 2012, 8(3): e1002543

3 De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20: 609 - 617

4 Rodríguez - Rodero, Menéndez - Torre, Fernández - Bayón G, *et al*. Altered intragenic DNA methylation of HOOK2 gene in adipose tissue from individuals with obesity and type 2 diabetes[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189153

5 Barajas - Olmos F, Centeno - Cruz F, Zerrweck C, *et al*. Altered DNA methylation in liver and adipose tissues derived from individuals with obesity and type 2 diabetes[J]. BMC Med Genet, 2018, 19(1): 28

6 De Mello VD, Pulkkinen L, Lalli M, *et al*. DNA methylation in obesity and type 2 diabetes [J]. Ann Med, 2014, 46(3): 103 - 113

7 Garaulet M, Sanchez - Moreno C, Smith CE, *et al*. Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationship to CLOCK 311T/C SNP and weight loss[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17435

8 Valladares M, Obregon AM, Chaput JP. Association between genetic variants of the clock gene and obesity and sleep duration[J]. J Physiol Biochem, 2015, 71(4): 855 - 860

9 申文雯, 郑东旖, 刘兆秋, 等. 肥胖儿童食欲调节因子基因启动子区 DNA 甲基化探讨[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(11): 1132 - 1135

10 Chan MA, Ciaccio CE, Gigliotti NM, *et al*. DNA methylation levels associated with race and childhood asthma severity[J]. J Asthma, 2017, 54(8): 825 - 832

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

12 Yi SH, Xu LC, Mei K, *et al*. Isolation and identification of age - related DNA methylation markers for forensic age - prediction[J]. Forensic Sci Int Genet, 2014, 11: 117 - 125

13 Milagro FI, Gomez - Abellan P, Campion J, *et al*. Clock, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake[J]. Chrono Biol Int, 2012, 29(9): 1180 - 1194

(收稿日期:2018 - 11 - 28)
(修回日期:2019 - 01 - 15)