

分类号:  
学 号: 2014109044

密 级: 内部 4 年  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### PFKP 基因甲基化状态与新疆哈萨克族 高血压的相关研究

学 位 申 请 人	秦嘉治
指 导 教 师	王 忠 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	内科学
研 究 方 向	高血压及冠心病的发病机制 及防治研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2017 年 5 月

分类号：  
学 号：2014109044

密 级：内部 4 年  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### PFKP 基因甲基化状态与新疆哈萨克族 高血压的相关研究

学 位 申 请 人	秦嘉治
指 导 教 师	王 忠 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	内科学
研 究 方 向	高血压及冠心病的发病机制 及防治研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2017 年 5 月

**The correlation study between the methylation status of the  
PFKP and the hypertension of Kazak**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Medicine**

By

**Qin Jiazhi**

**(Internal Medicine)**


Dissertation Supervisor: Prof. Wang Zhong

May, 2017

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名:  时间: 2017年 6月 5日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名:  时间: 2017年 6月 5日

导师签名:  时间: 2017年 6月 5日

## 中文摘要

**目的:** 本论文研究目的是, 探讨人血小板磷酸果糖激酶(PFKP)基因body区的甲基化状态对该基因mRNA表达的影响, 和分析PFKP基因body区甲基化状态与哈萨克族高血压的相关性以及其与高血压的易感因素之间的相关性。

**方法:** (1) 从前期导师科研团队流行病学调查数据库中, 按照配对原则选取哈萨克族高血压患者 162 人(男性 81 人, 女性 81 人), 血压正常者 162 人(男性 81 人, 女性 81 人), 以此 324 人为研究对象, 并调出其血压、腰围(WC)、臀围(HC)、腰臀比(WHR)、体重指数(BMI)、血脂、血糖(FPG)等指标的数据, 并挑出相对应的血液样本, 待进行下一步实验验证;

(2) 先进行小样本预实验验证, 哈萨克族高血压患者 12 人(男性 6 人, 女性 6 人), 血压正常者 12 人(男性 6 人, 女性 6 人), 采用焦磷酸测序检测血小板磷酸果糖激酶(PFKP)基因 body 区的甲基化状态并分析其差异性; 采用 Real-timePCR 对该基因 mRNA 表达水平进行检测, 并分析其与甲基化状态的相关性。

(3) 再行按照配对原则选取哈萨克族高血压患者 150 人(男性 75 人, 女性 75 人), 血压正常者 150 人(男性 75 人, 女性 75 人), 以此 300 人为研究对象, 进行扩大样本量焦磷酸测序的检测 PFKP 基因 body 区的甲基化状态, 并分析其与高血压易感因素的相关性。

**结果:** (1) 对 PFKP 进行小样本预实验焦磷酸测序验证分析, 结果发现位于 PFKP 基因 body 区的 cg24754223 位点在女性高血压组( $P=0.003$ )和整体高血压组( $P=0.032$ )中的甲基化水平比较正常对照组显著降低, 而在男性高血压组( $P=0.15$ )中甲基化水平比较男性正常对照组并未具有统计学差异, 但高血压组甲基化水平较正常对照组呈现降低的趋势( $40.16 \pm 18.37$  vs  $53.33 \pm 7.42$ )。

(2) 经 Real-timePCR 检测 PFKP 基因 mRNA 水平的表达, 并对其与甲基化率在不同组别中进行相关分析得出: 在总体、女性、病例及对照组别中, 甲基化率与 mRNA 水平存在一定相关性但相关性并不大( $P > 0.05$ ); 只有在男性组别中甲基化率与 mRNA 存在着明显的负相关关系( $P < 0.05$ )。

(3) 在扩大样本量焦磷酸测序检验中, 女性组与男性组两组别中尿酸、同型半胱氨酸、吸烟、饮酒构成统计学意义( $P < 0.05$ ), 而组别中其他特征比较均未构成统计学意义( $P > 0.05$ ); 在病例组与对照组之间, 年龄、BMI、尿酸、空腹血糖、低密度脂蛋白及同型半胱氨酸均存在统计学差异( $P < 0.05$ )

(4) 通过扩大样本利用焦磷酸测序对 PFKP 基因 body 区 DNA 甲基化状态验证, 我们实验得出相比与正常对照组, PFKP 基因 body 区的 cg24754223 位点的甲基化水平在总体组(病例组 VS 对照组,  $44.48 \pm 19.13$  vs  $51.75 \pm 19.42$ ;  $P=0.01$ )、女性组(病例组 VS 对照组,  $46.71 \pm 19.07$  vs  $53.64 \pm 21.31$ ;  $P=0.022$ )、在男性组中(病例组 VS 对照组,  $42.30 \pm 19.05$  vs  $49.91 \pm 17.32$ ;  $P=0.047$ )均是明显降低的。

(5) 在男性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率与年龄呈负相关关系( $R=-0.205$ ,

P=0.001), 而在女性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率与 BMI 呈负相关关系 (R=-0.195, P=0.014)。

(6)在大样本焦磷酸测序检验中, ROC 曲线对 PFKP 基因 body 区甲基化与高血压的关系进行预测评估结果显示: 在男性组别中 (AUC=0.633, P=0.03) 还有女性组别中 (AUC=0.602, P=0.027) 均表示 PFKP 基因 body 区甲基化状态对高血压病的发生发展有着一定的预测价值。

**结论:**本研究采用焦磷酸测序方法检测了 PFKP 基因 body 区 DNA 甲基化状态及 RT-RPCR 检测其基因 mRNA 表达水平, 结论 1. PFKP 基因 body 区的甲基化状态与 PFKP 基因 mRNA 表达水平存在一定关联, 但由于实验样本量的限制需进一步实验分析其具体相关性; 2. 在高血压组中 PFKP 基因 body 区的甲基化状态比较正常对照组呈现出明显降低, 提示 PFKP 基因 body 区的低甲基化状态增加了高血压的发生风险; 3. PFKP 基因 body 区的甲基化状态与年龄及 BMI 呈现出相关关系, 说明 PFKP 基因 body 区甲基化与年龄及 BMI 之间的联系可以影响高血压的状态。

**关键词:**PFKP, DNA 甲基化, 哈萨克族, 高血压

## Abstract

**Objective:** Our study aims to investigate the contribution of the platelet isoform of phosphofructokinase (PFKP) gene body DNA methylation affected the gene expression. And analyzed the correlation of the PFKP gene body methylation state and hypertension of Kazak, as well as the correlation of the PFKP gene body methylation state and the risk factors of hypertension.

**Methods:** 1. In the study we first conducted an epidemiological investigation and then established the database of Kazakh population. Firstly, 12 hypertension patients include 6 males and 6 females and 12 normal people with 6 males and 6 females were enrolled in our study. A questionnaire was used to collect data of baseline information, blood pressure, waist circumference (WC), hip circumference (HC), waist-to-hip ratio (WHR), body mass index (BMI), blood lipids, plasma glucose (FPG). The peripheral blood monocytes were drew by density gradient centrifugation.

2. With pyrophosphate sequencing and real-time PCR method for small sample (12 patients with high blood pressure (6 men and 6 women), 12 normal people (6 men and 6 women), to detected the gene methylation status and the levels of mRNA, and analyze correlation between the methylation status and the levels of mRNA.

3. Afterward, we used pyrophosphate sequencing for large sample (150 patients with high blood pressure (75 men and 75 women), and 150 normal people (75 men and 75 women), to detection of gene methylation status, and analyze correlation with the methylation status

**Results:** 1. Analyzing sequence PFKP pyrophosphate, we found that the levels of methylation of cg24754223 sited PKFP gene body area in female hypertension group ( $P = 0.003$ ) and the overall hypertension group ( $P = 0.032$ ) decreased significantly in the comparison of normal control group, and the levels of methylation in the male hypertension group ( $P = 0.15$ ) did not have statistically significant in the comparison of normal control group, but the level of hypertension group methylation showed a trend of lower than normal control group ( $40.16 \pm 18.37$  vs  $53.33 \pm 7.42$ ).

2. With detecting via Real – time PCR, we found that there was a certain correlation between the methylation rates and mRNA levels but the correlation was not obvious ( $P > 0.05$ ); only there was a significant negative correlation ( $P < 0.05$ ) in the male group.

3. With Pyrophosphate sequencing of large sample, we found the uric acid, homocysteine, smoking and drinking had the statistical difference ( $P < 0.05$ ) in females and males groups, and other characteristics in the group is not constitute a statistical significance ( $P > 0.05$ ); we found the age, BMI, cholesterol, low density lipoprotein cholesterol (hdl-c), homocysteine, uric acid and fasting blood-glucose had significant statistical difference in case-control ( $P <$

0.05)

4. With Pyrophosphate sequencing of large sample, the levels of methylation of cg24754223 sited PKFP gene body area in female hypertension group ( $P = 0.022$ )、 male hypertension group ( $P=0.047$ ) and the overall hypertension group ( $P = 0.01$ ) decreased significantly in the comparison of normal control group.

5. With Pyrophosphate sequencing of large sample, the levels of methylation of PKFP gene body area in male group had a linear relation with age ( $R = -0.205$   $P = 0.011$ ), and the levels of methylation of PKFP gene body area in females group had a linear relation with BMI ( $R = -0.195$   $P = 0.014$ ).

6. ROC curve for PFKP genomic methylation and the relationship between hypertension and prediction evaluation results show that in the male groups ( $AUC = 0.633$ ,  $P = 0.03$ ) and female groups ( $AUC = 0.602$ ,  $P = 0.027$ ), which suggested methylation status of PFKP body has an important predictive value for the occurrence of hypertension development.

**Conclusion:** In this study, we confirmed: 1. there was a certain correlation between the levels of PFKP gene body methylation and the mRNA levels of PFKP. But as a result of the limitation of the experimental sample, this correlation did not get specific affinity. 2. The levels of PFKP gene body methylation in case groups were lower than what in control groups, which implied the lower levels of PFKP gene body methylation increase the EH risk. 3. The levels of PFKP gene body methylation had a linear relation with age and BMI, which suggested the connection between the levels of PFKP gene body methylation and age、 BMI can influence the state of hypertension.

**Key words:** PFKP, Kazak, DNA methylation, Hypertension

# 目 录

中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
主要符号表及缩略词.....	VI
前言.....	1
材料与方法.....	3
1. 研究对象.....	3
2. 主要材料.....	4
3. 研究方法.....	5
4. 质量控制.....	13
5. 统计学分析.....	13
结果.....	14
1. 小样本预实验结果.....	14
1.1 高血压组与对照组的一般临床资料比较.....	14
1.2 焦磷酸测序验证.....	14
1.3 Real-timePCR 检测.....	15
2 大样本验证结果.....	16
2.1 高血压组与对照组的一般临床资料比较.....	16
2.2 扩大样本焦磷酸测序验证结果.....	18
2.3 DNA 甲基化率与各项临床资料的线性相关关系.....	18
2.4 男性和女性组别中甲基化率与高血压之间 ROC 曲线关系.....	20
讨论.....	22
结论.....	25
参考文献.....	26
综述.....	31
致谢.....	38
作者简介.....	39
导师评阅表.....	40

## 主要符号表及缩略词

英文缩写	英文全称	中文译名
SBP	systolic blood pressure	收缩压
DBP	diastolic blood pressure	舒张压
HDL-C	high density lipoprotein-cholesterol	高密度脂蛋白胆固醇
LDL-C	low density lipoprotein-cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇
TC	total cholesterol	总胆固醇
TG	Triglyceride	甘油三酯
FPG	fasting plasma glucose	空腹血糖
BMI	body mass index	体质量指数
WC	waist circumference	腰围
HC	hip circumference	臀围
WHR	waist-to-hip ratio	腰臀比
PBMC	peripheral blood mononuclear	单个核细胞
DEPC	Diethy pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
Sec	Second	秒
Min	Minute	分钟
H	Hour	小时

## 前 言

### (Introduction)

随着中国经济社会的不断进步发展,中国民众的生活质量不断提高,人均寿命的提升,人们的健康已经受到心血管疾病的严重威胁。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)调查研究<sup>[1]</sup>,每年大约有 1700 多万人死于心血管疾病,这一数据大概占到全球非传染性疾病总死亡人数的 46%。在我国心血管病的患病状况也不容小觑,据调查我国目前大约有 2.9 亿的心血管病患者,其中患有高血压病的人数可占绝大多数,约为 2.7 亿,而这数据目前仍然在不断的刷新<sup>[2]</sup>。有研究者调查,在我国心血管疾病成为最主要的死亡原因,所以对于此类疾病的预防治理工作刻不容缓。而影响心血管病发病风险的主要危险因素有高血压病、糖脂代谢紊乱、吸烟、肥胖、不合理的饮食以及运动锻炼缺乏。而高血压是最主要的危险因素之一,其所导致的急性心肌梗死、缺血性脑卒中、心功能衰竭、肾功能不全、失明等并发症<sup>[3-6]</sup>,危害性极大,可严重影响人们生活质量。许多的研究结论表明,高血压病是可以通过早期预防,有效控制的疾病,通过标准的药物还有个人行为有效干预,积极有效的降低血压水平,使其控制在合理的正常范围,是能够大大的减少心脑血管不良事件的发生,改善患者的远期预后。近年来,虽然经过各方面的努力,高血压疾病的预防保健工作有了一定发展,但是总体情况仍然不容乐观,高血压病的防治工作有待进一步的加强。

原发性高血压及其相关的并发症过早死亡的重要原因之一<sup>[7]</sup>,其高患病率已经成为心血管系统和肾脏疾病的主要危险因素。高血压病的流行分布呈现比较特殊的地理分布差异,常常表现为寒冷(海拔偏高)区域的高血压病患病率高于温暖(海拔偏低)区域,我国的各项研究显示北方罹患高血压的人群普遍较南方偏多,并且高血压病的发病在不同民族和种族中的患病率也明显不同。新疆位于我国的最西北部,地理面积辽阔,是个多民族聚居的地区,研究证实,新疆的高血压患病率高于全国的平均水平<sup>[8]</sup>,尤其是哈萨克族族人,其罹患高血压病的人数高于其他民族。近年来,随着哈萨克族人饮食结构和生活环境、方式的改变,该民族的高血压的患病率一直处于较高的水平,高于同地区其他民族。马等人<sup>[9]</sup>的流行病学调查研究指出,新疆地区哈萨克族人群的高血压病患病率可高达 36.7%,其高于本地区汉族人群(33.9%)和维吾尔族人群(27.8%)。新疆哈萨克族人具有其独特的生活方式,至今为止仍然存在大部分族人保留着传统的游牧生活,并且哈萨克族人生活地域常分布于海拔较高,冬季持续时间长的地区,喜好饮含盐量较高的奶茶,喜食牛羊肉,蔬菜摄入量较少。特殊的生活环境还有饮食习惯,这可能是哈萨克族人高血压病的较高患病率原因之一。因此,探究哈萨克族高血压病发病机制显得及其的重要。

原发性高血压是一种错综复杂的疾病,流行病学研究已经证明,其是一种受到遗传因素、环境因素以及它们之间相互作用影响的疾病<sup>[10-12]</sup>。在 2010 年全球有 940 万人死于高血压为基础的疾病<sup>[11]</sup>。据估计,原发性高血压的遗传倾向大约在 20-60%<sup>[13]</sup>,越来

越多的研究显示表观遗传修饰在原发性高血压的发生发展起着非常重要的角色<sup>[14,15]</sup>。然而,能够确定参与高血压遗传性的基因仅仅是少数,还有很大一部分遗传性还是未知的,这造成原发性高血压的病因和发病机制同样也是未知的<sup>[14]</sup>。

为了进一步描述原发性高血压的遗传性,了解基因与环境之间的相互作用以及表观遗传学变化,这可能是导致原发性高血压的易感性的原因<sup>[16]</sup>。事实上,越来越多的证据表明,表观遗传学在高血压病的管理机制中有着极为重要作用<sup>[17]</sup>。而 DNA 甲基化是表观遗传调控的重要机制之一,其在基因表达的调控起着极为重要的作用,同时环境的因素已被证明可以影响 DNA 甲基化状态<sup>[18,19]</sup>。

DNA 甲基化作为一种稳定的表观遗传标记,常常发生在 CpG 岛,CpG 岛是基因组中富含 GC(鸟嘌呤和胞嘧啶)的 DNA 序列,常位于多数基因的启动子区和第一外显子区<sup>[20]</sup>,长约 1kb。在正常的生理条件以及一些疾病发生环节中,DNA 甲基化可以通过影响染色质结构、DNA 构象稳定性以及与蛋白质相互作用方式等起到调控基因表达的作用,并且是一个可逆过程<sup>[21]</sup>。同时,DNA 甲基化属于一种异常的表观遗传修饰,这可能是环境改变和遗传因素之间的联系桥梁<sup>[22]</sup>。有学者研究表明,基因 body 区的甲基化状态被证明与基因表达呈正相关关系。虽然基因 body 区的 CpG 岛(CGI)的功能仍有待阐明,但是基因 body 区的甲基化是与人类以及其他动物的活跃转录是有一定的相关性的<sup>[23,24]</sup>。

磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase; PFK)是糖酵解作用里一种重要的酶,是一种由 4 个次级单位组成的异位酵素,可受多种活化剂与抑制剂调控,共分为三型:PFKL(肝型)、PFKM(肌型)、PFKP(血小板型)<sup>[25,26]</sup>。人血小板型磷酸果糖激酶(PFKP)是否在促进有氧糖酵解的过程中扮演重要角色仍有待证明,但是有研究发现抑制 PFKP 的表达后可以诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡而损害细胞的增值,而且可以减少糖酵解、磷酸戊糖途径以及核苷酸生物的合成<sup>[27,28]</sup>。还有学者发现在患有自身免疫疾病的病人中,抗人类蛋白 S 抗体(Anti-hPS)通过 PFKP 诱导在人体冠状动脉内皮细胞中的组织凝血酶表达,而 PFKP 的沉默表达可以导致人类冠状动脉内皮细胞中的组织凝血活酶上调,抗人类蛋白 S 抗体可能直接有助于血栓阻塞<sup>[29]</sup>。PFKP 基因 body 区的低甲基化状态与冠状动脉性心脏疾病的风险性密切相关。本文则探究 PFKP 基因 body 区的甲基化与高血压风险之间的联系,为了评估 PFKP 甲基化状态是否与高血压相关,来期待这能够对哈萨克族高血压病的病因机制的探讨提供新方向。

## 材料与方法

### (Materials and Methods)

#### 1. 研究对象

##### 1.1 研究对象来源

在本课题组前期甲基化高通量芯片筛选研究成果中得出,位于 PFKP 基因 body 区的 Cg24754223 呈现出低甲基化状态(见下表)。

PFKP 基因低甲基化位点

靶基因位点	基因名称	发生区域	染色体	甲基化状态
Cg24754223	PFKP	Body	10	Hypomethylated

故于前期导师科研团队 2012 年 11 月至 2015 年 4 月对新疆维吾尔自治区哈萨克族聚集区调查现场进行高血压流行病学调查的资料库中筛选研究对象,并检测其 PFKP 基因 body 区的甲基化状态。要求其在当地长期居住三代人以上,并且仍然保持着传统哈萨克族民族的生活方式和饮食习惯的哈萨克族人为流行病学研究对象。

##### 1.2 研究对象分组

在导师科研团队流行病调查的资料库,选取至少三代在本地居住且无血缘关系以及无异族通婚史的哈萨克族居民为研究对象,按照年龄相近,性别相同,民族、居住地相同的配对原则,根据血压水平进行分组。第一步预实验部分,分为高血压组 12 例,男 6 例,女 6 例,平均年龄(50.2±6.1)岁;血压正常对照组 12 例,男 6 例,女 6 例,平均年龄(49.8±6.9)岁。第二部分实验,分为高血压组 150 例,男 75 例,女 75 例,平均年龄(58.55.25±10.23)岁;血压正常对照组 150 例,男 75 例,女 75 例,平均年龄(46.11±11.54)岁。

##### 1.3 纳入与排除标准

###### 1.3.1.

###### ①预实验部分高血压组的纳入标准

(1)均符合收缩压 $\geq 160$ mmHg 和(或)舒张压 $\geq 100$ mmHg,即高血压 2 级以上(符合《中国高血压防治指南 2010》的诊断标准<sup>[30]</sup>),且发现血压升高持续 1 年以上。

(2)选取年龄范围在 35-60 岁之间。

(3)仍然保持传统的哈萨克族生活和饮食习惯。

(4)流行病学调查前 1 个月内每日摄取不少于 250 克的碳水化合物,并维持饮食和体重的相对稳定,未服用降压药物、抗血小板聚集药物、硝酸酯类药物等药物。

②实验第二部分高血压组的纳入标准(由于实验数据库中资料限制,我们将高血压组纳入标准放宽)

(1)均符合收缩压 $\geq 150$ mmHg 和(或)舒张压 $\geq 95$ mmHg,即高血压 1 级以上(符合《中国高血压防治指南 2010》的诊断标准<sup>[30]</sup>),且发现血压升高持续 1 年以上。

- (2) 选取年龄范围在 28-78 岁之间。
- (3) 仍然保持传统的哈萨克族生活和饮食习惯。
- (4) 流行病学调查前 1 个月内每日摄取不少于 250 克的碳水化合物, 并维持饮食和体重的相对稳定, 未服用降压药物、抗血小板聚集药物、硝酸酯类药物等药物。

### 1.3.2

#### ①预实验部分正常对照组纳入标准

- (1) 均符合收缩压 < 140mmHg 和舒张压 < 90mmHg。
- (2) 选取年龄范围在 35-60 岁之间。
- (3) 既往无高血压病史, 未服用降压药物的患者。

#### ②实验第二部分正常对照组纳入标准

- (1) 均符合收缩压 < 130mmHg 和舒张压 < 85mmHg。
- (2) 选取年龄范围在 28-78 岁之间。
- (3) 既往无高血压病史, 未服用降压药物的患者。

### 1.3.3 排除标准

- (1) 排除曾接受减肥、降压、调脂等任何治疗的高血压患者, 排除其他家族性遗传病史者。
- (2) 排除心肌病、心脏瓣膜病、心功能 2 级或以上者。
- (3) 排除合并任何急性感染性疾病, 排除合并脑出血或脑梗塞患者以及明显肝肾功能异常者。
- (4) 排除妊娠、哺乳期或长期服用其他药物史者

## 2. 主要材料

### 2.1 主要实验仪器

- |                        |                  |
|------------------------|------------------|
| (1) -80℃ 冰箱            | Haier 公司, 中国     |
| (2) -20℃ 冰箱            | Haier 公司, 中国     |
| (3) 1000u1、200u1 微量加样器 | Eppendorf 公司, 德国 |
| (4) 压力灭菌锅              | 上海医疗设备厂, 中国      |
| (5) 1.5ml 离心管          | Corning, 美国      |
| (6) 冻存管、冻存盒            | Corning, 美国      |
| (7) 一次性吸头及吸管           | Corning, 美国      |
| (8) 电泳仪                | BIO-RAD, 美国      |
| (9) 电泳槽                | BIO-RAD, 美国      |
| (10) 高速离心机             | 日立公司, 中国         |
| (11) 恒温水浴锅             | 德州仪器厂, 中国        |
| (12) 震荡器               | 德州仪器厂, 中国        |

- |               |                     |
|---------------|---------------------|
| (13) 焦磷酸系列分析仪 | Qiagen 德国           |
| (14) 超微量分光光度计 | Nanodrop ND-2000 美国 |

## 2.2 主要实验试剂

- |                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| (1) DNA 提取试剂盒 (DP318) | TIANGEN, 中国     |
| (2) 无水乙醇              | 东港田化工, 中国       |
| (3) 琼脂糖               | 上海玉博生物公司, 中国    |
| (4) 氯仿                | 河北华旭化工, 中国      |
| (5) 异丙醇               | 杨子化工, 美国        |
| (6) Trizol            | 北京百欧捷科贸有限公司, 中国 |

其他试剂包括 75% 乙醇, 无 RNase 的水、双蒸水。

## 3. 研究方法

### 3.1 一般资料选取

于前期导师科研团队的数据库中挑选 324 例的研究对象资料 (高血压组 162 例, 女性 81 例, 男性 81 例; 对照组 162 例, 男性 81 例, 女性 81 例), 资料内容包括研究对象的姓名、年龄、生活方式、饮食习惯、职业、个人病史、个人药物使用史、吸烟史、饮酒史、膳食情况、家族史等, 并且挑选与研究对象编号相对应的血样本, 存至 -80°C 冰箱, 待试验。

### 3.2 DNA 的抽提

严格按照天根试剂盒 DP318 的说明进行 DNA 抽提,

3.2.1. 取血液样品 400 $\mu$ l, 加入 600 $\mu$ l 体积的细胞裂解液 CL, 颠倒混匀, 10,000rpm 离心 1min, 吸去上清, 留下细胞核沉淀 (如果裂解不彻底, 可重复以上步骤一次), 向离心收集到的细胞核沉淀中加 200 $\mu$ l 缓冲液 GS, 振荡直至彻底混匀。

3.2.2. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 溶液, 混匀。

3.2.3. 加 200 $\mu$ l 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀, 56°C 放置 10min, 其间颠倒混匀数次, 溶液应变清亮 (如溶液未彻底变清亮, 请延长裂解时间至溶液清亮为止)。

3.2.4. 加 200 $\mu$ l 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。

3.2.5. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附 CB3 中 (吸附柱 CB3 放入收集管中), 12,000 rpm 离心 30sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB3 放入收集管中。

3.2.6. 向吸附柱 CB3 中加入 500 $\mu$ l 缓冲液 GD (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB3 放入收集管中。

3.2.7. 向吸附柱 CB3 中加入 600 $\mu$ l 漂洗液 PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000rpm 离心 30sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB3 放入收集管中。

3.2.8. 重复操作步骤 7。

3.2.9. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 2min, 倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置 30 分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

3.2.10. 将吸附柱 CB3 转入 1.5ml 离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加 50  $\mu$ l 洗脱缓冲液 TB，室温放置 5min，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心 2min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50 $\mu$ l，体积过小影响回收效率。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱 CB3 中，室温放置 2min，12,000 rpm 离心 2min。将抽提好的 DNA 放置  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。

### 3. 3RNA 的提取

准备试剂：氯仿，异丙醇，75%乙醇，无 RNase 的水（溶液均需用 DEPC 处理过的水配制）。

#### 3.3.1. 匀浆处理

直接取新鲜的血液 200 $\mu$ l，加倍体入 600 $\mu$ l 红细胞裂解液，混匀后室温放置 10min，10 000rpm 离心 1min。弃上清，收集白细胞沉淀。每 1ml 血液收集的白细胞沉淀中加入 1ml Trizol。

3.3.2. 将匀浆样品在  $20^{\circ}\text{C}$  放置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3.3.3. 可选步骤： $4^{\circ}\text{C}$  10 000rpm 离心 10min，取上清。

离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织样品时，上层是大量油脂，应除去。取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

3.3.4. 每使用 1ml Trizol 加 0.2ml 氯仿，盖好管盖，剧烈震荡 15s，室温放置 3min。如不能涡旋混匀，可手动颠倒混匀 2min 代替。

3.3.5.  $4^{\circ}\text{C}$  10 000rpm 离心 10min，样品会分成三层：红色的有机相，中间层和上层无色的水相，RNA 主要在水相中，把水相（约 600 $\mu$ l，约为所用 Trizol 试剂的 60%）转移到新管中。（如要分离蛋白质和 DNA，可保留黄色的有机相）

3.3.6. 在得到的水相溶液中加入等体积的异丙醇，混匀， $-20^{\circ}\text{C}$  放置 20-30min。

植物或动物组织 RNA 提取中，容易沉淀出大量的蛋白等污染物，导致电泳检测时看不到 RNA。可以按以下步骤操作减轻污染：在上清中加入 1/2 体积的异丙醇，1/2 体积的 RNA 助沉剂，然后进行以下操作。

3.3.7.  $4^{\circ}\text{C}$  10 000rpm 离心 10min，去上清。

离心前 RNA 沉淀经常是看不见的，离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

3.3.8. 加入 1ml 75%乙醇（DEPC 水处理过的水配制）洗涤沉淀。每使用 1ml Trizol 至少加 1ml 乙醇。

3.3.9.  $4^{\circ}\text{C}$  10 000rpm 离心 2min，弃上清；短暂快速离心，用移液器小心吸弃上清，注意不要吸弃沉淀。

3.3.10. 室温放置晾干（不要晾得过干，RNA 完全干燥后会很难溶解，大约晾干 2-3min 左右即可）。加入适量 DEPC 水（根据实验需要，可加 30-100 $\mu$ l 水）或 0.5%SDS，用枪头吸打几次，充分溶解 RNA。如 RNA 用于酶切反应，勿使用 SDS 溶液。RNA 也可用 100% 的去离子甲酰胺溶解， $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

### 3.4 小样本预实验的焦磷酸测序

采用已经被选取出进行甲基化及表达谱芯片筛选的哈萨克族原发性高血压组 12 例和正常对照组 12 例，进行焦磷酸测序验证。引物 引物采用 PyroMark Assay Design 2.0 设计。

Gene	引物名称	引物序列
PFKP	cg24754223-PFKP-F	GGGAGGGTTTGTAGTTAATTTATT
	cg24754223-PFKP-R-bio	ACAAAAAACCCTATTTCTACAAACACA
	cg24754223-PFKP-S	GGGTTTAAATTAAGTTGGG

#### 3.4.1. DNA 重亚硫酸化

##### 3.4.1.1 样本均一化

3.4.1.1.1 使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计，确定样本浓度。

3.4.1.1.2 确保样本的浓度大于 50ng/μL，样本的总量大于 1μg。

##### 3.4.1.2 试剂准备

3.4.1.2.1 在 BW 缓冲液中加入 30mL 的 100%乙醇，储存于室温。

3.4.1.2.2 在 BD 缓冲液中加入 27mL 的 100%乙醇，储存于 2-8℃。

3.4.1.3 每份重亚硫酸混合液加入 800 μL 无酶水，混匀至完全溶解，大约需要 5min。溶解重亚硫酸混合液需要将溶液加热至 60℃。

3.4.1.4 根据 Table 1，在 200 μL PCR 管中在配制重亚硫酸化反应试剂。

Table 1 Bisulfite reaction setup

Component	Sample (1μg-2μg) Volume per reaction
DNA solution	Variable* (maximum 20μL)
RNase-free water	Variable*
Bisulfite Mix	85
DNA Protect Buffer	35
Total volume	140

\* The combined volume of DNA solution and RNase-free water must total 20μL.

3.4.1.5 关闭 PCR 管，将重亚硫酸化反应试剂混合完全。DNA 保护缓冲液应变成蓝色，即说明混匀充分，PH 值正确。

3.4.1.6 根据 Table 2 设定反应程序。使用带热盖的热循环仪。如果热循环仪不允许设定反应体积 (140 μL)，将反应体积设定为仪器所允许的最大值。

Table2. Bisulfite conversion thermal cycler conditions

Set	Time	Temperature
Denaturation	5min	95°C
Incubation	25min	60°C
Denaturation	5min	95°C
Incubation	85min	60°C
Denaturation	5min	95°C
Incubation	175min	60°C
Hold	Indefinite*	20°C

\* Converted DNA can be left in the thermal cycler overnight without any loss of performance.

### 3.4.2. 转化后 DNA 的纯化

3.4.2.1 重亚硫酸转化完毕，将 PCR 管瞬时离心。将反应液转移到 1.5mL 的离心管中。

3.4.2.2 每个样本中加入 310  $\mu$ L BL 缓冲液。涡旋混匀并瞬时离心。利用 Zymo

3.4.2.3 每个样本中加入 250  $\mu$ L 100%乙醇。涡旋混匀 15s，然后瞬时离心将管壁的液滴离心至管底。

3.4.2.4 将 MinElute® DNA 离心柱和收集管置于架子上，将步骤 11.2.4 中的各管内的所有液体转移至离心柱中。

3.4.2.5 最大转速离心 1min。弃液，并将离心柱重新放回到收集管上。

3.4.2.6 在每个离心柱中加入 500  $\mu$ L BW 缓冲液。最大转速离心 1min。弃液，并将离心柱重新放回到收集管上。

3.4.2.7 在每个离心柱中加入 500  $\mu$ L BD 缓冲液，关上盖子，室温孵育 15min。

注意：尽量避免 BD 缓冲液暴露于空气，防止酸化。

3.4.2.8 最大转速离心 1min。弃液，并将离心柱重新放回到收集管上。

3.4.2.9 在每个离心柱中加入 500  $\mu$ L BW 缓冲液。最大转速离心 1min。弃液，并将离心柱重新放回到收集管上。

3.4.2.10 重复步骤 2.9。

3.4.2.11 在每个离心柱中加入 250  $\mu$ L 100% 乙醇，最大转速离心 1min。

3.4.2.12 将离心柱置于新的 2mL 收集管上，最大转速离心 1min，去除残留的液体。

可选步骤：将离心柱置于 60°C 孵育 5min，使液体蒸发完全。

3.4.2.13 将离心柱置于 1.5mL 离心管上，加入离心柱薄膜的中央加入 15  $\mu$ L EB 缓冲液，轻轻关盖。

3.4.2.14 室温孵育 1min。最大转速离心洗脱 DNA

注意：纯化后的 DNA 在 2 - 8°C 最长存放 24 h。- 20°C 长期保存。

### 3.4.3. 扩增反应

3.4.3.1 将 EPIK Amplification Mix and primer solutions 置于室温或冰上。

3.4.3.2 根据 Table 3 配制反应体系。

Table 3 Reaction composition using EPIK Amplification Mix

Component	Volume per reaction
Bisulfite-treated DNA	10ng-20ng
Forward primer(10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Reverse primer(10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
2 x EPIK Amplification Mix	12.5 $\mu$ L
Water (dH2O)	Up to 25 $\mu$ L

3.4.3.3 轻轻吹打反应液上下颠倒混匀完全，将混合液分到每个 PCR 管。

3.4.3.4 在每个 PCR 管中加入重亚硫酸化的 DNA (10 - 20ng/反应)。

3.4.3.5 根据 Table 4 设置反应程序。

Table 4 Optimized cycling protocol when using EPIK Amplification Mix

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 $^{\circ}$ C	2min	1
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	15s	
Annealing	56 $^{\circ}$ C	15s	40
Extension	72 $^{\circ}$ C	30s	

3.4.3.6 将 PCR 管置于热循环仪中，开始反应。

3.4.4. 焦磷酸测序反应

3.4.4.1 反应准备

3.4.4.1.1 设置分析程序

3.4.4.1.2 设置反应程序

3.4.4.2 样本准备

3.4.4.2.1 通过磁珠捕获 PCR 产物

生物素标记的 PCR 产物被捕获至链亲和素包被的琼脂糖磁珠上。每个样本的终反应体系为 80 $\mu$ L。根据 Table 5 配置反应体系。

Table 5 Reaction composition using streptavidin-coated Sepharose beads

Component	Volume per sample
Biotinylated PCR product	5-20 $\mu$ L
Streptavidin Sepharose	1.5 $\mu$ L
PyroMark Binding Buffer	40 $\mu$ L
High-purity water	Variable *
Total volume	80

\* The volume of water depends on the amount of PCR product used. Allow all reagents and solutions to equilibrate to room temperature before starting. All steps are performed at room temperature, unless stated.

实验开始前,所有的试剂需放置在室温稳定。除非另有说明,所有的实验步骤都需在室温进行。

3.4.4.2.1.1 轻轻晃动装有链亲和素包被的琼脂糖磁珠的瓶子,直到得到均一性的溶液。

3.4.4.2.1.2 为待测样本制备包含有链亲和素包被的琼脂糖磁珠,Binding 缓冲液,高纯水的混合液。

3.4.4.2.1.3 将步骤 11.4.1.2 中配制的混合液加入 96 孔板的对应孔中。

3.4.4.2.1.4 在每孔中加入 5 - 20 $\mu$ L 优化的标记生物素的 PCR 产物。

3.4.4.2.1.5 将 PCR 板封膜,保证孔间无渗漏。

3.4.4.2.1.6 将 PCR 板置于振荡仪上以 1400rpm 的速度水平振荡 10-15min。

3.4.4.3 链分离

3.4.4.3.1 务必使 PyroMark Q96 Vacuum Workstation 安装正确和安全。

3.4.4.3.2 在五个槽中分别加入以下试剂 (Figure 1):

约 110mL 70% 乙醇 (1)

约 90mL 0.2M NaOH (2)

约 110mL Wash Buffer (3)

约 110mL 高纯水 (4)

约 110mL 高纯水 (5)

3.4.4.3.3 打开真空泵

3.4.4.3.4 通过将过滤针伸入高纯水 (位置 P) 中清洗。用 180mL 的高纯水冲洗针头。

4.3.5 在 P 槽中重新加入 180mL 高纯水。

3.4.4.3.6 关上工作站开关,将 Tool 放回到位置 P。

3.4.4.3.7 在 96 孔板的每孔中预先加入 40 $\mu$ L 含有 0.4 $\mu$ M 测序引物的 Annealing Buffer。

4.3.8 轻轻混匀,将 PCR 板和 PyroMark Q96 低位板放置于实验台上。务必在加样时使两块板的方向一致。

3.4.4.3.9 打开真空泵开关。

3.4.4.3.10 仔细将抽滤针放置到 PCR 板中捕获包含固定模板的磁珠,保持 15s。小心拿起抽滤装置。

3.4.4.3.11 保证孔中没有液体残留,所有的磁珠均被捕获至探针头上。

3.4.4.3.12 将抽滤装置放入 70%乙醇中 (槽 1),冲洗 5s。

3.4.4.3.13 将抽滤装置放入变性液 (0.2M NaOH) 中 (槽 2),冲洗 5s。

3.4.4.3.14 将抽滤装置放入 Wash Buffer 中 (槽 3),冲洗 10s。

3.4.4.3.15 将抽滤装置超过 90° 竖直拿起,保持 5s,尽量沥干探针。

3.4.4.3.16 把吸头放在 PyroMark Q96 低位板上方,关闭泵。

3.4.4.3.17 将磁珠轻轻释放至包含 0.4 $\mu$ M 测序引物的 40 $\mu$ L Annealing Buffer 中,保证吸头触及孔底部。

3.4.3.18 将抽滤装置置于高纯水中 (槽 4),搅动 10s。

- 3.4.4.3.19 将吸头置于高纯水 (Parking 槽) 中, 打开泵。用 180mL 高纯水冲洗吸头。
- 3.4.4.3.20 将抽滤装置超过 90° 竖直拿起, 保持 5s, 尽量沥干探针。
- 3.4.4.3.21 关闭泵, 将抽滤装置放回 Parking 槽中。
- 3.4.4.3.22 如果实验超过一块板, 在各槽中重新加入相应试剂 (步骤 11.4.3.2), 从 11.4.3.3 重复所有操作步骤。
- 3.4.4.3.23 关闭抽滤泵。
- 3.4.4.4 测序引物退火
  - 3.4.4.4.1 将 PyroMark Q96 低位板放入预热 PyroMark Q96 Sample Prep 低位热板中, 80°C 加热 2min。
  - 3.4.4.4.2 将 PyroMark Q96 低位板从热板中取出, 使样本冷却至室温, 至少 5min。然后可以在 PyroMark Q96 ID 上机。
- 3.4.4.5 试剂准备
  - 3.4.4.5.1 将冻干的酶与底物分别溶于 620μL 纯水中。
  - 3.4.4.5.2 轻轻混匀, 不要涡旋。
  - 3.4.4.5.3 让混合物及试剂仓达到室温。
  - 3.4.4.5.4 将试剂仓的标签正对操作者。
  - 3.4.4.5.5 将试剂加入试剂仓的各隔间。
  - 3.4.4.5.6 打开 PyroMark 96 ID 仪器盖和内盖, 插入试剂仓, 保持其标签朝外。
  - 3.4.4.5.7 确认试剂仓正确插入, 关上盖子。
  - 3.4.4.5.8 根据 PyroMark Q96 ID 使用说明准备并开始焦磷酸测序。
- 3.4.4.6 运行
  - 3.4.4.6.1 放入 PyroMark Q96 低位板
  - 3.4.4.6.2 放入试剂仓
  - 3.4.4.6.3 开始运行程序
  - 3.4.4.6.4 此次运行可以在窗口中监控, 停止。
- 3.4.4.7 实验完成
  - 3.4.4.7.1 反应结束后, 打开仪器和内盖, 取出试剂仓。
  - 3.4.4.7.2 倒掉 PyroMark Q96 试剂仓中剩余的溶液。
  - 3.4.4.7.3 用高纯水冲洗试剂仓 4 次。
  - 3.4.4.7.4 用高纯水冲洗试剂仓针管的外部。
  - 3.4.4.7.5 为了洗净针管, 在试剂仓的各隔间中加满纯水, 用手指按住各隔间的顶端置于水槽上。确认洗净每根针管。针管末端应喷射出细柱状水。
  - 3.4.4.7.6 当确认所有的针管已洗净, 将试剂仓置于纸上晾干。PyroMark Q96 试剂仓晾干后, 将其置于无尘的倒扣烧杯中。
  - 3.4.4.7.7 退出 PyroMark Q96 软件。
- 3.4.4.8 结果分析

3.4.4.8.1 具体分析方法参照 PyroMark Q96 使用说明。

### 3.5 小样本 Real-timePCR 检测

同样采用已经被选取出哈萨克族原发性高血压组 12 例和正常对照组 12 例，共 24 例血样进行实时定量 PCR 检测。

#### 3.5.1 cDNA 第一链合成

3.5.1.1 从-80℃冰箱中取出 RNA，在 4℃下解冻，然后在 0.2 ml PCR 管中配制反应溶液：

总RNA	<b>0.5ug</b>
5x Reaction Mix	<b>4</b>
iScript Reverse transcriptase	<b>1</b>
H <sub>2</sub> O	<b>X ul</b>
RNA tmplate	<b>X ul</b>
总 volume	<b>20ul</b>

3.5.1.2 将 PCR 管置于 25℃5min，42℃孵育 30min，85℃变性 5min，4℃保温。

#### 3.5.2. SYBR Green qPCR

##### 3.5.2.1

2×SYBR Green PCR buffer	<b>5 ul</b>
Forward primer(10μ M)	<b>0.5 ul</b>
Reverse primer(10μ M)	<b>0.5 ul</b>
Template	<b>5 ng</b>
ddH <sub>2</sub> O	<b>X ul</b>
总 volume	<b>10 ul</b>

3.5.2.2 将 PCR 管子置于 PCR 仪中进行反应，50℃孵育 2min，然后 95℃，10min；接着进行 40 个循环：95℃，15 秒；60℃，1min，最后添加溶解曲线。进行结果数据处理分析。

### 3.6 扩大样本焦磷酸测序检测

选取抽提好的剩余 300 例 DNA 样本（病例组 150 例和对照组 150 例），按照 3.4 焦磷酸测序实验步骤进行大样本的测序验证。

## 4. 质量控制

### 4.1 样本筛选

实验样本均由本课题组成员，严格按照纳入标准和排除标准进行，保证了样本筛选的科学性、真实性，客观的反应实际情况。

### 4.2 数据检查

数据资料均录入 Excel 数据库，进行双人录入，所录入数据均进行二次数据核对，保证数据的正确性，减少误差。

### 4.3 焦磷酸检测及 PT-PCR 质控

焦磷酸检测及PT-PCR的实验过程均严格质量控制。包括预处理前的质量控制与预处理后的质量控制。总体评价各项质控指标符合检测的质量要求。

## 5. 统计学分析

用SPSS17.0统计软件进行统计学处理，连续计量资料符合正态分布用均数±标准差表示，两组间比较应用独立样本t检验；不符合正态分布用中位数（四分位数）表示，两组间比较应用“Mann-Whitney test”检验；计数资料用频数、构成比表示，组间比较行×列表进行卡方检验或者Fisher's确切概率法；双变量正态分布资料用Pearson相关分析；分类变量采用Logistic回归分析；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结果

### (Results)

#### 1. 小样本预验证

##### 1.1 高血压组与对照组的一般临床资料比较

先行选取符合条件的哈萨克族 24 人，高血压组 12 人，其中男性 6 人，女性 6 人，平均年龄(50.2±6.1)岁；对照组 12 人，其中男性 6 人，女性 6 人，平均年龄(49.8±6.9)岁。两组间性别及年龄构成无统计学意义 ( $P>0.05$ )，组间比较具有可比性，收缩压、舒张压、BMI 差异有统计意义 ( $P<0.05$ )，而其他资料如甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、空腹血糖、尿酸、同型半胱氨酸等资料差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 1

表 1 对照组与高血压组研究对象的基本资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数 (男/女)	年龄 (岁)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)
对照组	12 (6/6)	49.8±6.9	25.8±2.3	116.2±9.8	75.0±5.2
高血压组	12 (6/6)	50.2±6.1	30.2±6.6*	163.3±18.7*	103.3±7.8*
组别	脉压 (mmHg)	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
对照组	41.3±9.0	1.28 (0.82, 1.95)	5.18 (4.05, 5.82)	2.2±0.6	1.3±0.3
高血压组	60.0±16.5 <sup>a</sup>	1.11 (0.82, 1.74)	5.02 (4.41, 5.44)	2.8±0.7	1.4±0.3
组别	空腹血糖 (mmol/L)	尿酸 (umol/L)	Hcy (umol/L)	吸烟 [例(%)]	饮酒 [例(%)]
对照组	5.5±0.8	186.7±56.4	12.37 (9.66, 13.80)	3 (25%)	3 (25%)
高血压组	5.6±0.6	206.1±87.0	12.71 (9.21, 16.11)	4 (33.3%)	6 (50%)

注：BMI：体重指数；LDL-C：低密度脂蛋白；HDL-C：高密度脂蛋白；Hcy：同型半胱氨酸。

与对照组比较，\* $P<0.05$

##### 1.2 焦磷酸测序验证

对 PFKP 进行小样本预实验焦磷酸测序验证分析，结果发现位于 PFKP 基因 body 区的 cg24754223 位点的在女性高血压组 ( $P=0.003$ ) 和总体体高血压组 ( $P=0.032$ ) 中的甲基化水平显著降低，而在男性高血压组 ( $P=0.15$ ) 中甲基化水平比较男性正常对照组并未具有统计学差异，但高血压组甲基化水平较正常对照组呈现降低的趋势 (40.16±18.37 vs 53.33±7.42)。见图 1-2-1 及表 2。

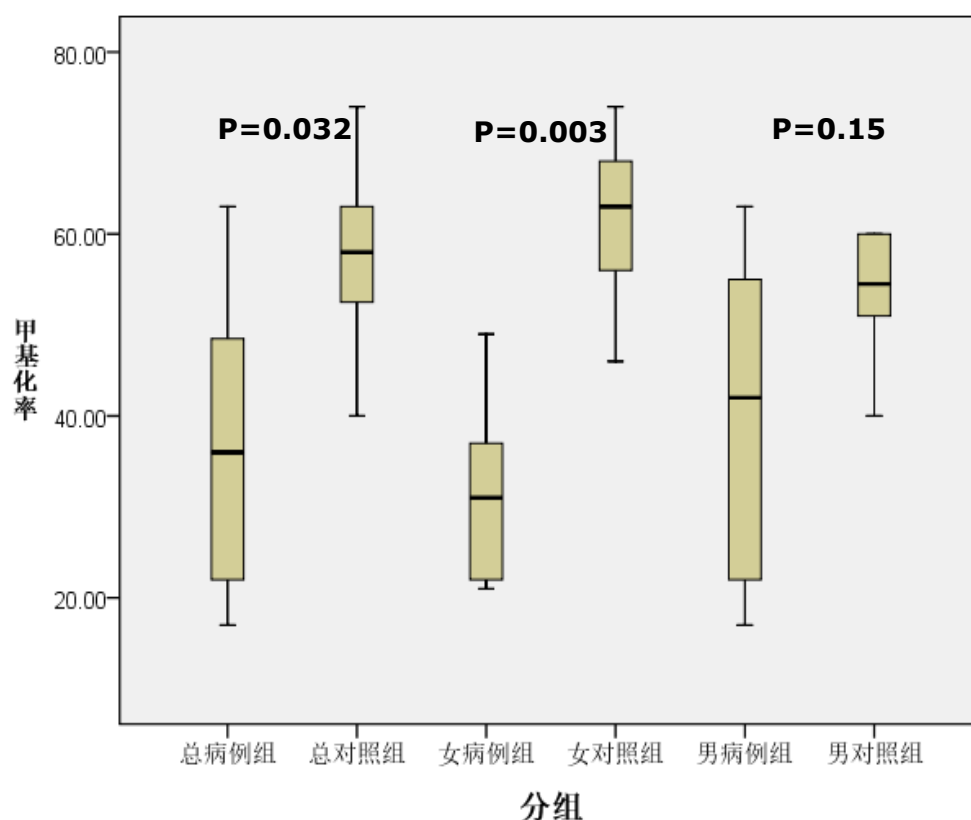


图 1-2-1 人血小板磷酸果糖激酶 (PFKP) 基因 body 区甲基化情况, 纵坐标为每组样本基因的甲基化率情况, 横坐标为实验分组情况

Figure 1-2-1 The methylation status of PFKP body, Ordinate represents the rate of methylation and abscissa represents the groups.

表 2 对照组与高血压组基因甲基化率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	女性 (%)	男性 (%)	整体 (%)
高血压组	31.8±10.8 (6 例)	40.16±18.37 (6 例)	36.0±15.0 (12 例)
对照组	61.6±9.8 <sup>a</sup> (6 例)	53.33±7.42 <sup>b</sup> (6 例)	57.5±9.3 <sup>a</sup> (12 例)

注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P<0.01; <sup>b</sup>P>0.05; <sup>a</sup>P 和 <sup>b</sup>P 已经 Logistic 回归分析调整年龄, 性别, 吸烟史, 饮酒史, BMI 等混杂因素

### 1.3 Real-timePCR 检测

经 Real-timePCR 检测 PFKP 基因 mRNA 水平的表达, 并对其与甲基化率在不同组别中进行相关分析得出: 在总体、女性、病例及对照组别中, 甲基化率与 mRNA 水平存在一定相关性但相关性并不大 ( $P>0.05$ ); 只有在男性组别中甲基化率与 mRNA 存在着较为明显的负相关关系 ( $P<0.05$ ), 并且得到决定系数  $R^2=0.71$ , 说明在男性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率可以解释其 mRNA 表达水平变异性的 71%, 另外 29% 的变异不能用甲基化率来解释。(见表 3 及 图 1-3-1)。

表 3 PFKP 基因 body 区甲基化率与其 mRNA 水平的相关关系

分组	相关系数	P 值
总体组别 (n=24)	r=-0.307	0.145
男性组别 (n=12)	<b>r=-0.843</b>	<b>0.001</b>
女性组别 (n=12)	r=0.116	0.719
病例组别 (n=12)	r=-0.276	0.385
对照组别 (n=12)	r=0.193	0.537

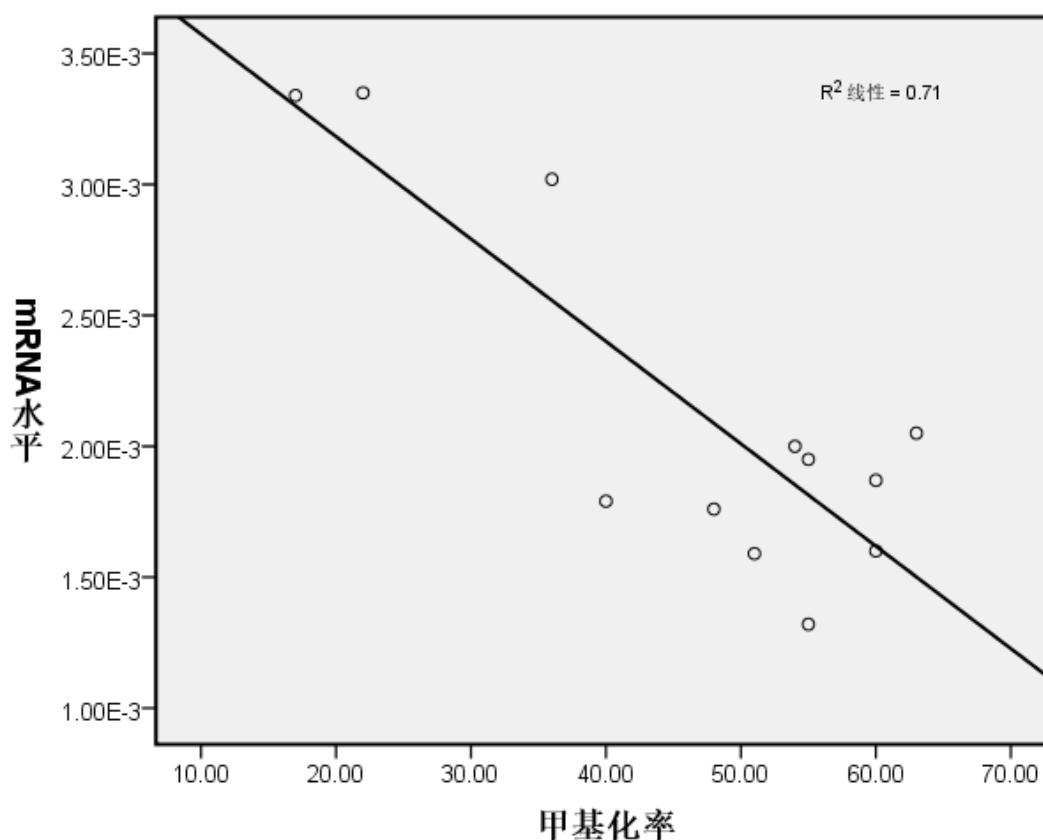


图 1-3-1 PFKP 基因 mRNA 表达水平与甲基化率的相关关系

Figure1-3-1 the correlation between the expression level of mRNA of the PFKP and the CpG methylation

## 2. 大样本的焦磷酸测序验证

### 2.1 高血压组与对照组的一般临床资料比较

选取哈萨克族 324 人（包括之前小样本验证的 24 人），高血压组 162 人，其中男性 81 人，女性 81 人，平均年龄 (58.55±10.23) 岁；对照组 162 人，其中男性 81 人，女性 81 人，平均年龄 (46.11±11.54) 岁。但由于实验过程 4 例样本未能得到相应的结

果, 故最终高血压组 160 人, 其中男性 81 人, 女性 79 人, 平均年龄(57.95±10.14)岁; 对照组 160 人, 其中男性 81 人, 女性 79 人, 平均年龄(46.40±11.21)岁。我们发现在病例组与对照组之间, 年龄、BMI、尿酸、空腹血糖、低密度脂蛋白及同型半胱氨酸均存在统计学差异 (P<0.05)。(见表 4)

表 4 高血压组与对照组的各项临床指标之间比较 (总体组)

	总体 ( $\bar{x} \pm s$ )	男性 ( $\bar{x} \pm s$ )	女性 ( $\bar{x} \pm s$ )	P 值	高血压 ( $\bar{x} \pm s$ )	对照组 ( $\bar{x} \pm s$ )	P 值
年龄(岁)	52.18±12.14	52.33±13.79	52.02±10.20	0.82	57.95±10.14	46.40±11.21	<b>0.001</b>
性别(男/女)	162/158				81/79	81/79	1.00
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	26.39±4.27	26.72±4.76	26.90±4.70	0.174	27.49±4.47	25.29±3.78	<b>0.001</b>
吸烟(是/否)	90/230	85/77	5/153	<b>0.001</b>	41/106	48/108	0.583
喝酒(是/否)	89/231	77/85	12/146	<b>0.001</b>	39/108	47/109	0.488
尿酸(mmol/L)	251.82±82.34	290.24±75.30	212.42±69.83	<b>0.001</b>	260.28±77.26	243.35±86.54	0.066
FPG(mmol/L)	5.55±1.13	5.62±1.21	5.49±1.06	0.304	5.72±1.23	5.39±1.01	<b>0.01</b>
TC(mmol/L)	1.28±0.97	1.30±0.86	1.26±1.12	0.714	1.25±0.68	1.32±1.20	0.465
TG(mmol/L)	5.11±1.17	4.96±1.01	5.26±1.29	<b>0.022</b>	5.23±1.06	4.99±1.26	0.069
LDL-C(mmol/L)	2.92±0.86	2.92±0.86	2.92±0.85	0.986	3.09±0.85	2.74±0.82	<b>0.001</b>
HDL-C(mmol/L)	1.64±0.45	1.57±0.47	1.70±0.42	<b>0.013</b>	1.68±0.46	1.59±0.43	0.066
HCY(mmol/L)	13.62±5.36	15.18±5.86	12.01±4.25	<b>0.001</b>	15.36±5.91	11.87±4.06	<b>0.001</b>
甲基化率(%)	48.12±19.59	46.10±18.55	50.18±20.45	0.063	44.48±19.13	51.75±19.42	<b>0.01<sup>c</sup></b>

注: BMI: 体重指数; FPG: 空腹葡萄糖; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白; HDL-C: 高密度脂蛋白; HCY: 同型半胱氨酸。<sup>c</sup>已经 Logistic 回归分析调整年龄, 性别, BMI、LDL-C、HCY 等混杂因素。

表 5 高血压组与对照组的各项临床指标之间比较 (男性组及女性组)

特征	高血压	对照组	P 值	高血压	对照组	P 值	
男性				女性			
年龄(岁)	59.63±10.91	45.02±12.48	<b>0.001</b>	年龄(岁)	56.22±9.03	47.81±9.61	<b>0.001</b>
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	27.00±3.47	25.14±3.77	<b>0.001</b>	BMI(kg/m <sup>2</sup> )	28.00±5.27	25.44±3.80	<b>0.001</b>
吸烟(是/否)	44/37	45/36	0.588	吸烟(是/否)	2/77	3/76	0.351
喝酒(是/否)	50/31	39/49	<b>0.019</b>	喝酒(是/否)	3/76	6/73	0.364
尿酸(mmol/L)	296.95±66.30	283.53±83.22	0.258	尿酸(mmol/L)	222.68±69.52	202.15±69.05	0.064
FPG(mmol/L)	5.75±1.05	5.48±1.36	0.147	FPG(mmol/L)	5.68±1.39	5.30±0.49	0.024
TC(mmol/L)	1.26±0.75	1.34±0.85	0.529	TC(mmol/L)	1.22±0.60	1.30±1.48	0.657
TG(mmol/L)	5.03±0.99	4.90±1.04	0.435	TG(mmol/L)	5.44±1.08	5.08±1.46	0.086
LDL-C(mmol/L)	3.00±0.82	2.83±0.89	0.203	LDL-C(mmol/L)	3.19±0.87	2.65±0.75	<b>0.001</b>
HDL-C(mmol/L)	1.66±0.49	1.49±0.44	<b>0.018</b>	HDL-C(mmol/L)	1.71±0.44	1.69±0.41	<b>0.883</b>
HCY(mmol/L)	17.34±6.43	13.01±4.26	<b>0.001</b>	HCY(mmol/L)	13.33±4.54	10.70±3.50	<b>0.001</b>
甲基化率(%)	42.30±19.05	49.91±17.32	<b>0.047<sup>d</sup></b>	甲基化率(%)	46.71±19.07	53.64±21.31	<b>0.022<sup>e</sup></b>

注: BMI: 体重指数; FPG: 空腹葡萄糖; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白; HDL-C: 高密度脂蛋白; HCY: 同型半胱氨酸。<sup>d</sup>P 已经 Logistic 回归分析调整年龄, 饮酒史, BMI、HDL-C、HCY 等混杂因素; <sup>e</sup>P 已经 Logistic 回归分析调整年龄, BMI、LDL-C、HDL-C、HCY 等混杂因素

## 2.2 扩大样本焦磷酸测序验证

通过扩大样本利用焦磷酸测序对 PFKP 基因 body 区 DNA 甲基化状态验证, 我们实验得出相比与正常对照组, PFKP 基因 body 区的 cg24754223 位点的甲基化水平在总体组 (病例组 VS 对照组,  $44.48 \pm 19.13$  vs  $51.75 \pm 19.42$ ;  $P=0.01$ )、女性组 (病例组 VS 对照组,  $46.71 \pm 19.07$  vs  $53.64 \pm 21.31$ ;  $P=0.022$ )、在男性组中 (病例组 VS 对照组,  $42.30 \pm 19.05$  vs  $49.91 \pm 17.32$ ;  $P=0.047$ ) 均是明显降低的 (见表 4, 5 及图 2-2-1)。

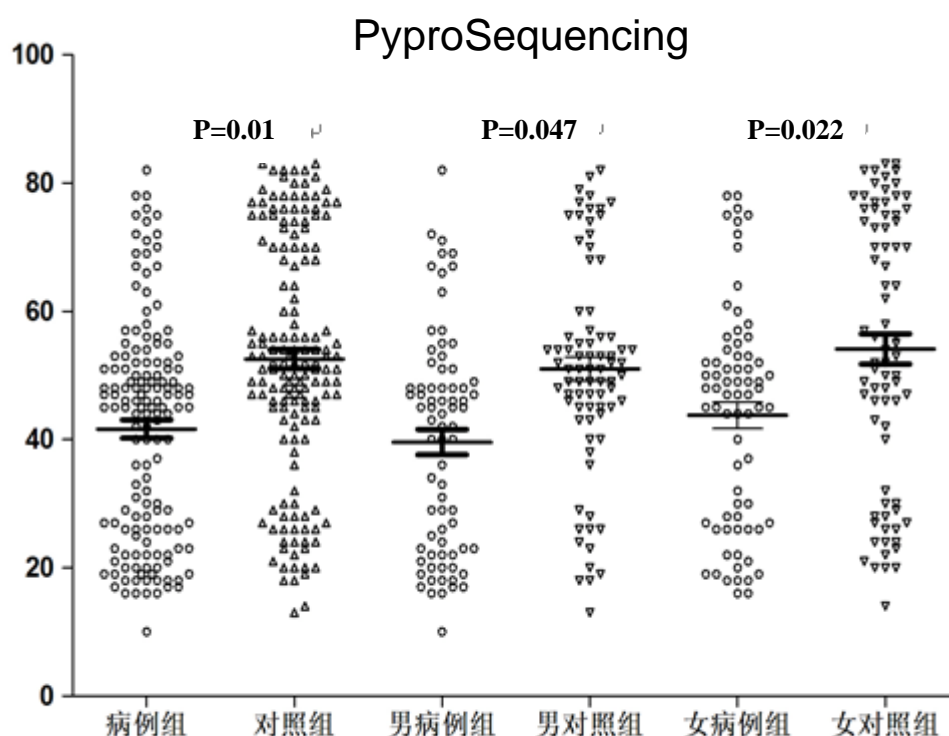


图 2-2-1 病例组与对照组之间的甲基化率比较 (总体、男性、女性)

Figure 2-2-1 the methylation levels between case group and control group (overall, male and female)

## 2.3 DNA 甲基化率与各项临床资料的关系

我们对 PFKP 基因 body 区甲基化率与各项临床资料做了线性相关检测, 并采用 Pearson 相关分析发现在男性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率与年龄呈负相关关系 ( $R=-0.205$ ,  $P=0.001$ ), 而在女性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率与 BMI 呈负相关关系 ( $R=-0.195$ ,  $P=0.014$ ); (见表 6、图 2-3-1)

表 6 PFKP 基因 body 区甲基化率与各项临床指标的相关关系

指标	总体组别		男性组别		女性组别		高血压组别		对照组别	
	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值
年龄	-0.085	0.128	<b>-0.205</b>	<b>0.011</b>	0.051	0.524	0.133	0.094	-0.111	0.164
BMI	-0.082	0.144	-0.006	0.937	<b>-0.195</b>	<b>0.014</b>	-0.070	0.377	0.004	0.957
尿酸	-0.070	0.210	-0.043	0.588	-0.005	0.949	-0.139	0.080	0.024	0.764
FPG	-0.088	0.026	-0.075	0.034	-0.092	0.252	-0.040	0.956	-0.133	0.093
TG	0.005	0.902	0.057	0.469	-0.026	0.745	0.026	0.748	-0.019	0.814
TC	-0.031	0.582	-0.030	0.705	-0.056	0.487	0.025	0.754	-0.043	0.591
LDL-C	-0.061	0.281	-0.071	0.372	-0.052	0.519	0.036	0.655	-0.082	0.300
HDL-C	-0.032	0.569	-0.032	0.687	-0.063	0.429	-0.019	0.813	-0.007	0.929
HCY	-0.008	0.890	-0.008	0.917	-0.067	0.404	0.075	0.346	0.075	0.672

注：BMI：体重指数；FPG：空腹葡萄糖；TG：甘油三酯；TC：总胆固醇；LDL-C：低密度脂蛋白；HDL-C：高密度脂蛋白；HCY：同型半胱氨酸；.

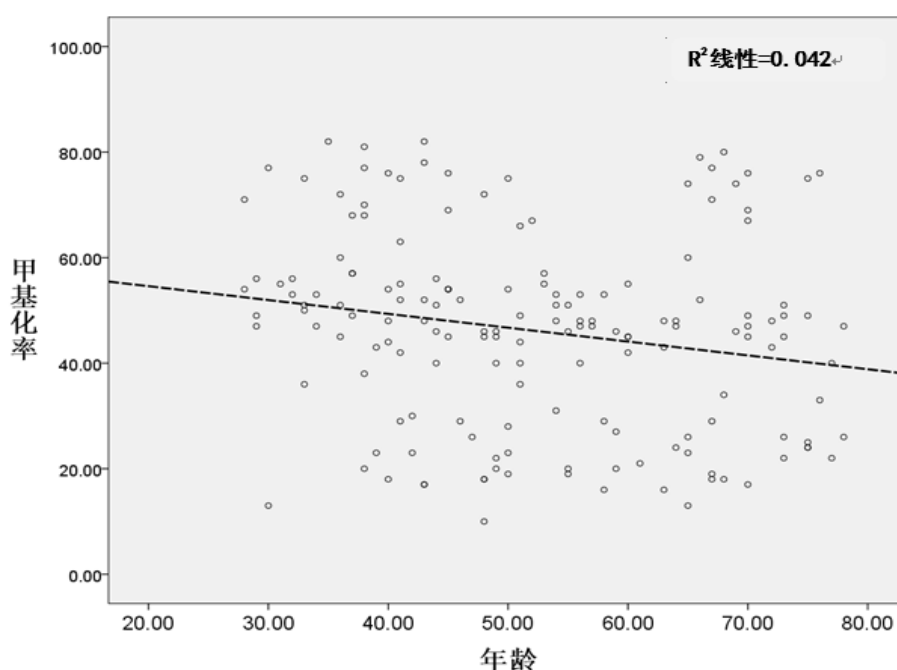


图 2-3-1 PFKP 基因 body 区甲基化率与年龄的线性关系（男性组别）

Figure 2-3-1 the linear relationship of methylation rate of PFKP body with the age (in males)

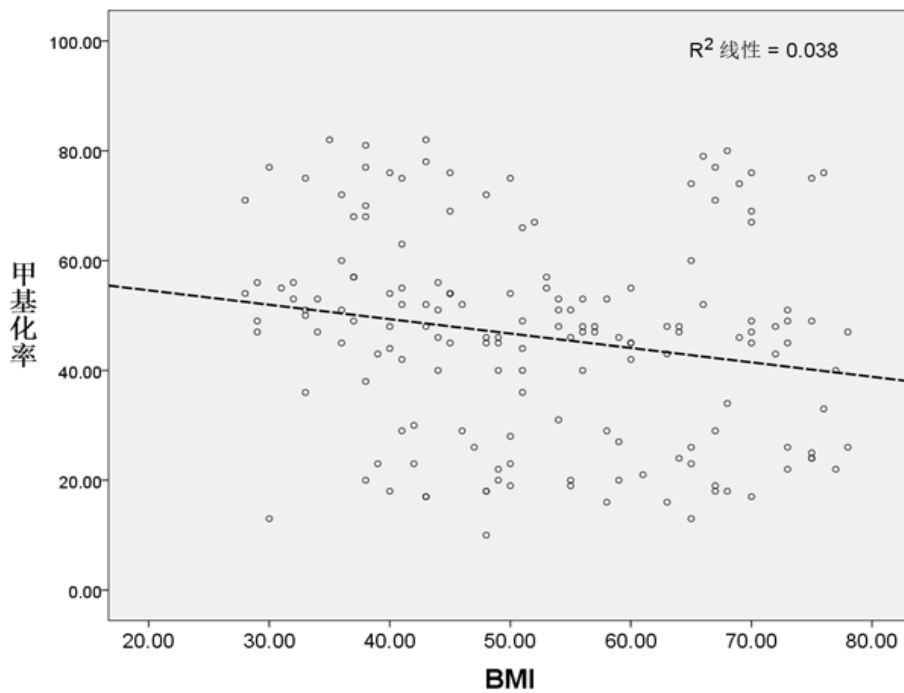


图 2-3-2 PFKP 基因 body 区甲基化率与 BMI 的线性关系(女性组别中)

Figure 2-3-1 the linear relationship of methylation rate of PFKP body with the BMI (in females)

#### 2.4 男性、女性两组别中甲基化率与高血压之间 ROC 曲线关系

此外，我们利用 ROC 曲线对 PFKP 基因 body 区甲基化与高血压的关系进行了预测评估。结果显示：男性组（AUC=0.633，P=0.03）还有女性组（AUC=0.602，P=0.027），可以表示 PFKP 基因 body 区甲基化状态对高血压病的发生发展有着一定的预测价值（见图 2-4-1）。

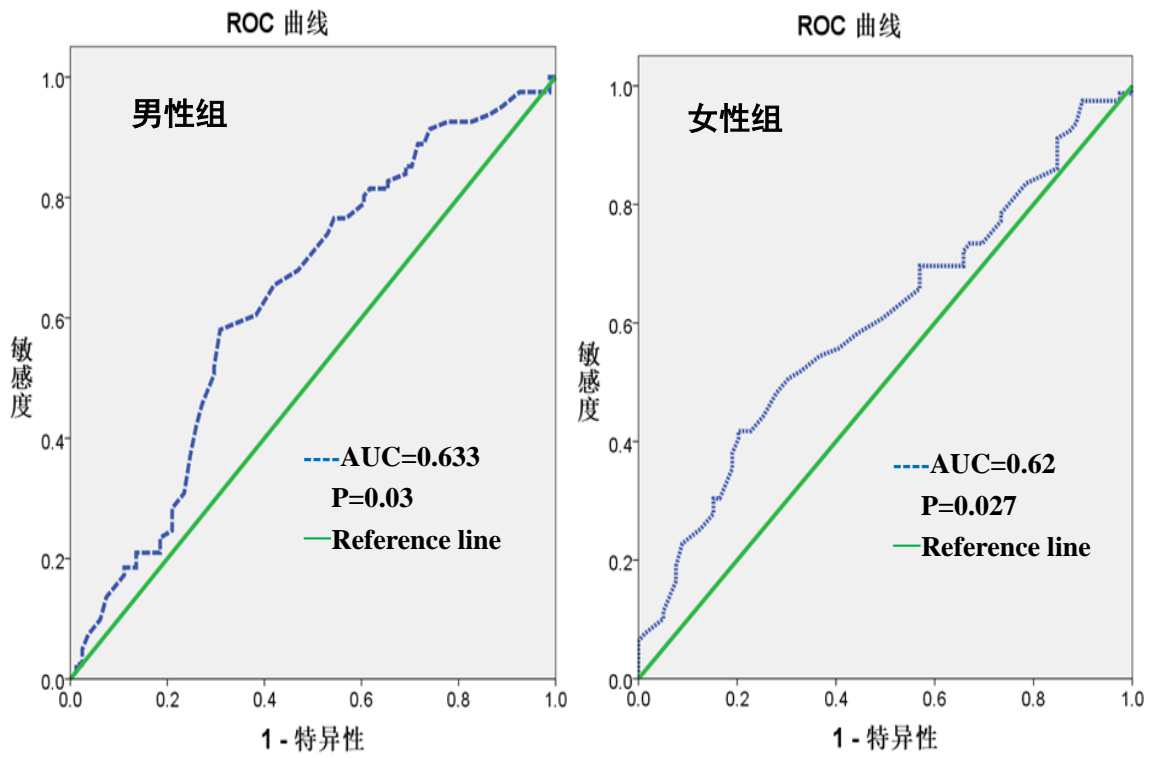


图 2-4-1 PFKP 基因体的甲基化率在高血压病中的 ROC 曲线

Figure 2-4-1 the ROC curve of methylation rate of PFKP in hypertension

## 讨 论

### (Discussion)

目前研究表明,心血管疾病已经发展为一种危害人类生命健康的全球公众性疾病,成为威胁人类健康的最主要疾病之一<sup>[31]</sup>。每年全球大概有 1700 万人是因为心血管病而失去生命的,这占总死亡的 30%<sup>[32]</sup>。冠心病、心衰、脑卒中、高血压等类似心脑血管疾病现有患病人数达 2.9 亿,全球有高达 940 多万人因心血管疾病而死亡,可以说 10 个成年人中就有 2 名心血管疾病患者,而且心血管病的死亡率呈上升趋势<sup>[32,33]</sup>。在中国一年内也有 330 万人死于心血管疾病,即每 13 秒钟就有 1 人死于心血管病,这可比每 6 分钟就有 1 人死于车祸的频率高得多得多<sup>[34]</sup>。而随着社会不断的发展,随之而来的人们生活方式确实越来越不健康,这只能会导致高血压、高血脂、高血糖等心血管疾病的主要危险因素的发生,其中,高血压与脑卒中和的心肌梗死发生显著相关<sup>[35-37]</sup>。

在中国疾病预防控制中心更新的数据中,我国 15 岁及以上人群高血压患病率可高达 24%<sup>[38]</sup>。此外,流行病学研究表示,目前仍然有 9600 万的隐匿性高血压患者和 3.86 亿的高血压前期患者<sup>[39,40]</sup>。从上述数据我们不难看出,高血压仍为我国非常沉重的社会负担。而在众多高血压的患者中有绝大部分(95%)属于原发性高血压,尽管原发性高血压的确切机制尚未明确。因此,探究原发性高血压的发病机制,进而对原发性高血压进行防治已经是迫在眉睫。

高血压病的流行分布呈现地理分布差异,我国的研究显示南方罹患高血压的人群较北方偏少。新疆位于中国的西北部,地理面积大,是个多民族聚居的地区,研究证实,新疆的高血压患病率高于全国的平均水平<sup>[8]</sup>,尤其是哈萨克族族人,罹患高血压的人群往往较其他民族偏高。近年来,随着哈萨克族人饮食结构和生活环境、方式发生改变,该民族的高血压的患病率仍一直处于较高的水平,高于同地区其他民族。哈萨克族人具有其独特的生活方式,至今仍有大部分族人保留着传统的游牧生活。哈萨克族人生活地域常分布于海拔较高,冬季持续时间长的地区,喜好饮含盐量较高的奶茶,喜食牛羊肉,蔬菜摄入量较少。因此,研究哈萨克族高血压发病机制显得尤为重要。特殊的饮食习惯和生活环境,可能是哈萨克族人高血压患病率较高的原因之一。

随着社会的发展,人们普遍对原发性高血压这类疾病的认识也越来越深入。高血压是一种错综复杂的疾病,是遗传和环境因素相互作用引起的以血压升高为主要临床表现的综合征<sup>[12]</sup>。近年来,表观遗传学被假定成基因表达与环境二者之间的联系桥梁<sup>[41]</sup>,因此表观遗传调控机制在高血压的研究中受到研究学者的更加关注。表观遗传学已经成为疾病病因研究中的重要内容,其是一种基因碱基序列不变,但基因的表达情况出现可遗传变化的调控机制<sup>[42]</sup>。其可能是基因与环境因素共同影响所引起,主要表现形式包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、基因组印记、非编码 RNA 等调控方式,其中任何一种方式的调控改变都可以改变基因的表达,其中 DNA 甲基化是目前研究最为深入也是最重要的表观修饰形式<sup>[43-45]</sup>。DNA 甲基化是目前研究最为深入同时也是最重要的表观修饰形式,在高血

压发病机制探索中起着至关重要的作用。

### 3.1 PFKP 基因 body 区对 PFKP 基因 mRNA 表达的影响

基因 body 区 CpG 岛 (CGI) 的功能仍有待阐明, 但是有研究表明基因 body 区甲基化状态是经常与人类和其他动物的活跃转录相关的<sup>[46]</sup>。大量调查显示异常的 DNA 甲基化与多种类型的癌症的发病机理具有明确相关性, 包括结直肠癌<sup>[47]</sup>、肺癌<sup>[48]</sup>和白血病<sup>[49]</sup>。然而, 很少有证据表明 DNA 甲基化与 EH 的风险。有些观察者发现 DNA 的低甲基化水平状态与高血压的发展具有一定的相关趋势, 并且这一趋势正在不断的进行。此外, 子痫前期患者的胎盘中, 被证实 DNA 甲基化状态是与孕妇高血压具有相关性的<sup>[50]</sup>。11 $\beta$ -HSD2、Adrb1 和 ADD1 等基因的异常的 DNA 甲基化状态已经被证实参与原发性高血压的发生发展<sup>[51, 52]</sup>。

在早期的研究中基因 body 区的甲基化率被认为“孤立的推动者”<sup>[53]</sup>。Jingo D 等研究基因 body 区甲基化与基因表达被发现呈正相关<sup>[54]</sup>, 基因 body 区的高甲基化状态在人类组织及各型细胞中经常表现为基因的高表达水平<sup>[55]</sup>。在心力衰竭及冠心病等疾病中一发现基因 body 区的异常甲基化状态, DNA 基因 body 区甲基化状态对基因的表达具有重大的意义<sup>[56, 57]</sup>。而在我们研究得到在男性组别中甲基化率与 mRNA 存在着明显的负相关关系, 并且得到决定系数  $R^2=0.71$ , 说明在男性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率可以解释其 mRNA 表达水平变异性的 71%, 另外 29% 的变异不能用甲基化率来解释。但本实验实验验证样本量较小, 只能说明 PFKP 基因 body 区甲基化状态对其 mRNA 表达水平起到一定调控作用, 但具体如何调控仍需进一步大样本实验验证。

### 3.2 高血压病患者 PFKP 基因 body 区存在着低甲基化状态

而经过进一步扩大样本量进行焦磷酸测序验证后发现, 高血压组 PFKP 基因 body 区的甲基化水平较正常对照组是明显偏低, 并且 PFKP 基因 body 区甲基化水平均与高血压病引起的血压升高呈负相关相关, 这表明 PFKP 基因 body 区甲基化在高血压病发生风险中充当一定的角色。此外, 利用 ROC 曲线对 PFKP 基因 body 区甲基化与高血压的关系进行了预测评估, 结果显示 PFKP 基因 body 区甲基化状态对高血压病的发生发展有着重要的预测价值。PFKP 为磷酸果糖激酶 (PFK) 的一种亚型, 虽然其是否在促进有氧糖酵解的过程中扮演重要角色仍有待证明, 但有研究表明 PFKP 能够改变机体内环境的代谢机制, 从而导致机体某些组织因子活动异常, 造成疾病的发生。研究者发现抗人类蛋白 S 抗体 (Anti-hPS) 通过 PFKP 诱导在人体冠状动脉内皮细胞中的组织凝血酶表达, 而 PFKP 的沉默表达可以导致人类冠状动脉内皮细胞中的组织凝血活酶上调, 在患有自身免疫疾病的病人中, 抗人类蛋白 S 抗体可能直接有助于血栓阻塞<sup>[29]</sup>, PFKP 低表达水平与冠状动脉性心脏疾病的风险性密切相关。抗人类蛋白抗体与 PFKP 结合, 抑制 PFKP 的表达从而导致冠状动脉内皮细胞的组织凝血因子上调, 造成血管内皮环境异常。还有人调查显示, PFKP 沉默表达可以导致细胞周期停滞和细胞凋亡, 还可以减少糖酵解、三羧酸循环还有核苷酸生物的合成<sup>[27]</sup>, 而糖酵解过程会影响体内葡萄糖、ATP 等能量物质的代谢平衡。消减糖酵解过程产生的 ATP 可以抑制蛋白激酶调节血管内皮细胞中  $Ca^{+}$  的转运, 使血管内皮细胞中  $Ca^{+}$  的浓度增加, 从而

引起血管内皮细胞的收缩<sup>[28]</sup>。上述种种机制均与高血压的发生发展密切联系,但是,PFKP 如何具体调控血压的变化,函需我们进行更深层次的实验去探索。

### 3.3 PFKP 基因 body 区甲基化状态与易感因素共同影响高血压状态

本实验得出在男性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率与年龄呈负相关关系, DNA 甲基化和年龄之间的联系已经被证实会影响高血压的状态<sup>[58]</sup>; 在女性组别中 PFKP 基因 body 区甲基化率与 BMI 呈负相关关系, PFKP 为肥胖疾病的一个候选基因<sup>[59]</sup>, 而肥胖又能促进高血压的发生发展, 这表明高血压疾病受到遗传和环境因素的影响, 其中包括 DNA 甲基化、年龄和肥胖。

综上所述, 本研究首次对哈萨克族高血压患者 PFKP 基因 body 区的低甲基化状态对基因的 mRNA 表达水平进行了验证, 可以初步提示 PFKP 基因低甲基化状态可能对 PFKP 在哈萨克族原发性高血压的表达调控起一定作用, 但 DNA 甲基化在高血压发病中的相关机制仍有待进一步研究。DNA 甲基化是可遗传的, 也是可改变的, 高血压 DNA 甲基化的相关机制仍需进一步被阐明<sup>[60]</sup>。我们就可以利用药物或改变相关危险因素来改变 DNA 甲基化水平, 从而达到防治高血压的目的。

## 结 论

### (Conclusion)

1. PFKP基因body区的甲基化状态与PFKP基因mRNA表达水平存在一定关联，但由于实验样本量的限制需进一步实验分析其具体相关性。
2. 在高血压组中PFKP基因body区的甲基化状态比较正常对照组呈现出明显降低，提示PFKP基因body区的低甲基化状态增加了高血压的发生风险。
3. PFKP基因body区的甲基化状态与年龄、BMI呈现出线性关系，说明PFKP基因body区甲基化与年龄及BMI之间的联系可以影响高血压的状态。

## 参考文献

### (Reference)

- [1] Geneva WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. 2015.
- [2] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告-2014概要[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(7): 617-622.
- [3] Campbell NR, Niebylski ML. Prevention and control of hypertension: developing a global agenda [J]. *Current opinion in cardiology*, 2014, 29(4): 324-330.
- [4] Wright JT, Williamson JD, Whelton PK, et al. A randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control [J]. *The New England journal of medicine*, 2015, 373(22): 2103-2116.
- [5] Sanfilippo KM, McTigue KM, Fidler CJ, et al. Hypertension and obesity and the risk of kidney cancer in 2 large cohorts of US men and women [J]. *Hypertension*, 2014, 63(5): 934-941.
- [6] Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension[J]. *Blood pressure*, 2014, 23(1): 3-16.
- [7]. Lawes CM, Vander Hoorn S and Rodgers A; International Society of Hypertension: Global burden of blood-pressure-related disease, 2008, *Lancet* 371: 1513-1518,
- [8] 刘芬, 马依彤, 杨毅, 等. 新疆不同民族高血压现况的流行病学调查[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(46): 3259-3263.
- [9] 马晓佳, 张眉, 郭淑霞, 等. 新疆农村地区维吾尔族、哈萨克族与汉族人群高血压患病率[J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21(12): 1164-1168.
- [10]. Xi B, Cheng H, Shen Y, et al: Physical activity modifies the associations between genetic variants and hypertension in the Chinese children. *Atherosclerosis* 225: 376-380, 2012.
- [11]. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K,. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and riskfactor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2224–2260.
- [12]. Qi Y, Zhao H, Wang Y, Wang Y, Lu C, Xiao Y, Cao J, Jia N, Wang B, Niu W. Replication of the top 10 most significant polymorphisms from a large blood pressure genome-wide association study of northeastern Han Chinese East Asians. *Hypertens Res* 2014; 37: 134–138.
- [13]. Kurtz TW, Spence MA Genetics of essential hypertension. *Am J Med* 94:77–84.
- [14] Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Genetic variants in novel pathways

- influence blood pressure and cardiovascular Disease risk. *Nature* 2011; 478: 103–109.
- [15]. He J, Bazzano LA, Chen CS, Chen J, Rao DC, et al. (2007) GenSalt: rationale, design, methods and baseline characteristics of study participants. *J Hum Hypertens* 21: 639–646.
- [16]. Svetkey LP, Harris EL, Martin E, Vollmer WM, Meltesen GT, et al. (2011) Modulation of the BP response to diet by genes in the renin-angiotensin system and the adrenergic nervous system. *Am J Hypertens* 24: 209–217.
- [17]. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415–428.
- [18]. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 2006; 24: 2549–2556.
- [19]. Wu Q, Ohsako S, Ishimura R, Suzuki JS, Tohyama C. Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2. *Biol Reprod* 2004; 70: 1790–1797.
- [20] Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5): 351–360.
- [21] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 6-21.
- [22] Davis CD, Uthus E0. DNA Methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions [J]. *Exp Biol Med*( Maywood), 2008, 229( 10):988 -995.
- [23]. Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV and Jordan IK: On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* 3: 462-474, 2012.
- [24]. Zemach A, McDaniel IE, Silva P and Zilberman D: Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328: 916-919, 2010.
- [25] El Sayed S M, El-Magd R M A, Shishido Y, et al. 3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects[J]. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2012, 44(1): 61-79.
- [26]. Benjamin S, Radermacher M, Kirchberger J, et al. 3D structure of phosphofructokinase from *Pichia pastoris*: Localization of the novel  $\gamma$ -subunits[J]. *Journal of structural biology*, 2009, 168(2): 345-351.
- [27] Park Y Y, Kim S B, Han H D, et al. Tat - activating regulatory DNA - binding protein regulates glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating the platelet isoform of phosphofructokinase through microRNA 520[J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 182-191.
- [28] Wang J, Zhang P, Zhong J, et al. The platelet isoform of phosphofructokinase contributes to metabolic reprogramming and maintains cell proliferation in clear cell renal

- cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 27142.
- [29].Chen C, Liao D, Wang J, et al. Anti-human protein S antibody induces tissue factor expression through a direct interaction with platelet phosphofructokinase[J]. *Thrombosis research*, 2014, 133(2): 222-228.
- [30]中国高血压防治指南修订委员会.中国高血压防治指南2010[J].中华高血压杂志,2011, 19 (8) : 701 – 743 .
- [31].Geneva WHO.Global status report on noncommuncable disaeses 2011
- [32]卫生部心血管病防治研究中心。中国心血管病报告.2012
- [33].He J,Gu D,Xu X,et al.Major causes of death among men and women in China.The New England journal of medicine.2008;353:1124-1134
- [34].陈伟伟,高润霖,刘力生等.中国心血管病报告 2013 摘要 [J].中国循环杂志, 2014, 29(7) :487–491.
- [35]李琛,谢江柳,张红霞等.体重指数与血压关系的研究 [J].中国实用医药, 2011, 6(13) : 63–64.
- [36]于连龙,刘岩,胡藩等.短期体重干预对 2 型糖尿病患者糖脂代谢的影响[J].卫生研究, 2012, 41(2) :232 – 234.
- [37]李剑虹,王丽敏,黄正京,等.中国成年人体重指数与心血管危险因素关系的研究 [J].中华流行病学杂志, 2014, 35(9) :977 –980.
- [38]严若华,王杨,王文,等.几何级数法在估计我国 2012 年 15 岁以上人群高血压患病率中的应用[J].中国循环杂志, 2013, 28(7): 519-522.
- [39] Sega R, Trocino G, Lanzarotti A, Carugo S, Cesana G, Schiavina R, et al. Alterations of cardiac structure in patients with isolated office, ambulatory, or home hypertension: Data from the general population (pressione arteriale monitorate a Toro associazioni [pamela] study). *Circulation*.2001;104:1385-1392
- [40]陈捷赵,武峰,崔艳丽,胡大一我国14省市中老年人肥胖超重流行现状及其与高血压患病率的关系.中国民族医学2005;40:2830-2834
- [41] Ladd-Acosta C, Fallin M D. The role of epigenetics in genetic and environmental epidemiology[J]. 2015.
- [42] Cowley AW Jr, Nadeau JH, Baccarelli A, Berecek K, Fornage M, Gibbons GH,Harrison DG, Liang M, Nathanielsz PW, O'Connor DT, Ordovas J, Peng W,Soares MB, Szyf M, Tolunay HE, Wood KC, Zhao K, Galis ZS. Report of the NationalHeart, Lung, and Blood Institute Working Group on epigenetics and hypertension.*Hypertension* 2012; 59: 899–905.
- [43].Ooi SKT,Bcstor TH. The colorful history of active DNA demcthy- lation[J]. *Cell*, 2008,133(7):45-48.
- [44].Mcchan RR. DNA mcthylation in animal development}J}. *SeminCell Dev Biol*, 2003,

14(1):53-65.

[45]. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA }J}. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 (1):R17-29.

[46]. Zemach A, McDaniel IE, Silva P and Zilberman D: Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328: 916-919, 2010.

[47]. Kim MS, Lee J and Sidransky D: DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29: 181-206, 2010.

[48]. Kerr KM, Galler JS, Hagen JA, Laird PW and Laird-Offringa IA: The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma. *Dis Markers* 23: 5-30, 2007.

[49]. Akalin A, Garrett-Bakelman FE, Kormaksson M, et al: Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. *PLoS Genet* 8: e1002781, 2012.

[50]. Kulkarni A, Chavan-Gautam P, Mehendale S, Yadav H and Joshi S: Global DNA methylation patterns in placenta and its association with maternal hypertension in pre-eclampsia. *DNA Cell Biol* 30: 79-84, 2011.

[51]. Friso S, Pizzolo F, Choi SW, et al: Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis* 199: 323-327, 2008.

[52]. Zhang LN, Liu PP, Wang L, et al: Lower ADD1 gene promoter DNA methylation increases the risk of essential hypertension. *PLoS One* 8: e63455, 2013.

[53]. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, et al: Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6: e1001134, 2010.

[54]. Jingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV and Jordan IK: On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* 3: 462-474, 2012.

[55]. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, et al: Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466: 253-257, 2010.

[56]. Movassagh M, Choy MK, Knowles DA, et al: Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation* 124: 2411-2422, 2011

[57] Xu L, Zheng D, Wang L, et al: GCK gene-body hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease. *Biomed Res Int* 2014: 7, 2014.

[58] Zhang LN, Liu PP, Wang L, et al: Lower ADD1 gene promoter DNA methylation increases the risk of essential hypertension. *PLoS One* 8: e63455, 2013.

[59] Liu YJ, Liu XG, Wang L, Dina C, Yan H, Liu JF, Levy S, Papasian CJ, Drees BM, Hamilton JJ, Meyre D, Delplanque J, Pei YF, Zhang L, Recker RR, Froguel P,

Deng HW: Genome-wide association scans identified CTNBL1 as a novel gene for obesity. *Human Molecular Genetics* 2008, 17(12):1903-1813.

[60].Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome [J].*Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11:607—620.

## 综述

### (Review)

#### 血小板型磷酸果糖激酶与心血管疾病的相关性

**摘要:** 随着中国经济社会的不断进步发展,人们的健康已经受到心血管疾病的严重威胁。血小板型磷酸果糖激酶(PFKP)为磷酸果糖激酶蛋白家族的一员,其在糖酵解过程中扮演着关键性的作用。这个基因在某些癌症代谢编程中发挥着作用,包括透明细胞肾细胞癌、膀胱和癌症,乳腺癌和肺癌。DNA 甲基化是表观遗传修饰的重要机制之一,DNA 甲基化修饰不改变 DNA 序列,可以通过改变 DNA 与转录基因的结合,进而调节基因的表达与沉默。心血管是多种危险因素导致的复杂疾病,近年来不少研究证明血小板型磷酸果糖激酶与心血管疾病关系密切,其中包括冠心病、肥胖、血管内皮变化等,并且 PFKP 甲基化状态可能参与高血压的发生发展。

**关键词:** 血小板型磷酸果糖激酶, 心血管疾病, DNA 甲基化

心血管疾病是危害人类健康的主要疾病,现已成为全球首位死亡原因,并且呈逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。心血管疾病,又称为循环系统疾病,是一系列涉及循环系统的疾病,循环系统指人体内运送血液的器官和组织,主要包括心脏、血管(动脉、静脉、微血管),可以细分为急性和慢性,一般都是与动脉硬化有关,但目前心血管疾病的发病机制尚不明确<sup>[2]</sup>。心血管是多种危险因素导致的复杂疾病,如动脉粥样硬化、冠心病、高血压、心力衰竭为中老年人的常见病、多发病,严重危害人们健康<sup>[3,4]</sup>。磷酸果糖激酶(PFK)是一种糖酵解作用里一种重要的酶,是一种由4个次级单位组成的异位酵素,可受多种活化剂与抑制剂调控。在糖酵解作用里,PFK是负责将果糖-6-磷酸与ATP转变成为果糖-1,6-双磷酸与ADP。人类体内共有3个生产此酵素的基因:PFKL肝型、PFKM肌型、PFKP血小板型<sup>[5,6]</sup>。血小板型磷酸果糖激酶(PFKP)为磷酸果糖激酶蛋白家族的一员,其在糖酵解过程中扮演着关键性的作用。这个基因在某些癌症代谢编程中发挥着作用,包括透明细胞肾细胞癌、膀胱和癌症,乳腺癌和肺癌。DNA 甲基化修饰不改变 DNA 序列,可以通过改变 DNA 与转录基因的结合,进而调节基因的表达与沉默。近年来不少研究证明血小板型磷酸果糖激酶与心血管疾病关系密切,其中包括冠心病、肥胖、血管内皮变化等,并且 PFKP 甲基化状态可能参与高血压的发生发展。本文将就血小板型磷酸果糖激酶与心血管疾病的相关性进行阐述。

#### 1. 血小板型磷酸果糖激酶(PFKP)与冠心病

蛋白S是一种维生素K依赖的蛋白,主要由肝细胞和巨噬细胞合成,并且作为一种辅助因子参与活性蛋白C催化的抗凝反应<sup>[7]</sup>。蛋白S的缺乏可以增加血管血栓的风险<sup>[8]</sup>。获得缺乏性蛋白S已经证明可以导致自身免疫疾病以及许多其他疾病的发生<sup>[9,10]</sup>,其中包括人类免疫缺陷病毒(HIV)感染<sup>[11,12]</sup>、雌激素缺乏<sup>[13]</sup>和恶性肿瘤<sup>[14]</sup>。目前大部分患有

蛋白 S 缺乏的病人中（如抗磷脂综合症和全身性红斑狼疮），抗人类蛋白 S 自身抗体在被提出<sup>[15,16]</sup>。感染过水痘的病人可以产生一种抵抗蛋白 S 的自身抗体，而这可以导致血栓栓塞等并发症的发生。这种自身免疫抗体可以直接抑制磷脂质与抗血素、蛋白 C 或者蛋白 S 的结合，这已经被证实在血管栓塞疾病中充当非常重要的角色<sup>[17,18]</sup>。此外，这些自身免疫抗体可能直接调节许多凝血因子的表达和（或）活动，包括血管系统中的组织因子。

组织因子是一种跨膜蛋白，可在脉管结构外围许多细胞中持续表达，但在血管内皮细胞或者外周血细胞中通常不表达。然而，通过某些药物的特殊刺激，血管内皮细胞和单核细胞由于转录活动可以表达组织因子<sup>[19,20]</sup>。在很多血栓形成条件中包括冠状动脉粥样硬化，组织因子活动的增加可以被视为血栓形成的机制<sup>[21,22]</sup>。越来越多证据表明，在患有自身免疫系统疾病的病人中，自身免疫抗体可以刺激细胞中组织因子的表达<sup>[23,24]</sup>。但是，这些自身抗体是调节组织因子表达的机制仍然是未知的。自身抗体与不同的自身抗原交叉反应，从而拥有某些共同的结构特性<sup>[25,27]</sup>。

抗人类蛋白 S 自身抗体是与临床上血栓症密切相关的，我们可以推断抗人类蛋白 S 抗体通过某些定的分子途径导致血栓的形成<sup>[28]</sup>。血小板型磷酸果糖激酶在大部分哺乳动物中的糖酵解过程的关键酶，而其可以调节组织因子的表达。抗人类蛋白 S 抗体可以与血小板型磷酸果糖激酶交互作用，抗人类蛋白 S 抗体可以抑制血小板型磷酸果糖激酶的活动，而血小板型磷酸果糖激酶的沉默表达可以导致组织因子的上调，造成血管血栓的阻塞<sup>[29]</sup>。

## 2. 血小板型磷酸果糖激酶（PFKP）与血压变化

磷酸果糖激酶作为糖酵解过程的一种限速酶，催化 6-磷酸果糖和 ATP 分解成 1,6-二磷酸果糖和 ADP。1,6-二磷酸果糖作为一种信号因子，可以激活感丙酮酸酶、抑制线粒体氧化磷酸化和调节活性氧水平等生物过程<sup>[30,31]</sup>。人类体内共有 3 个生产此酵素的基因：PFKL 肝型、PFKM 肌型、PFKP 血小板型。在正常组织中，PFKL 主要在肝脏和肾脏中表达而 PFKM、PFKP 则分别主要在骨骼肌和血小板中表达<sup>[32,33]</sup>。在肿瘤和癌症细胞系中，PFKM 或 PFKP 或两种型都是高度表达的<sup>[34]</sup>。转录学研究已经确认 PFKP 为一种非常重要得可以上调糖酵解过程的基因<sup>[35]</sup>。然而，目前还不清楚 PFKP 是否为 PFK 的主要形式，还有 PFKP 是如何在调节新陈代谢和细胞中起作用的。Jun 等学者进行 PFKP 基因敲除实验，得到抑制 PFKP 的表达不仅可以引起细胞周期停滞和细胞凋亡导致细胞增值的损害，而且还能够导致糖酵解过程、磷酸戊糖途径和核苷酸生物合成等生物途径的减少，并伴随着三羧酸循环途径的激活<sup>[36]</sup>。

糖酵解过程会影响体内葡萄糖、ATP 等能量物质的代谢平衡，而过程中产生的 ATP 可以通过细胞内钙离子信号通路调节游离钙离子与依赖蛋白激酶钙离子之间的转运。脱氧葡萄糖、丙酮酸盐、 $\beta$ -羟基丁酸或碘乙酸等糖分解抑制剂的暴露可以增加细胞内钙离子浓度的增加，蛋白激酶的抑制可以引起类似游离钙离子的增加。细胞外脱氧葡萄糖的缺乏可以引起钙离子的增高，这表明糖酵解的抑制可以触发细胞内质网中钙离

子储存释放。1, 4, 5-三磷酸肌醇受体抑制剂 2-氨基乙氧基联苯硼酸可以抑制铈酸钾 93 和脱氧葡萄糖诱导的钙离子反应。钙离子释放以后, 从外源的细胞突触形成钙离子“波浪”向细胞的中心区域聚集。脱氧葡萄糖的聚集可以导致钙离子浓度的限制。消减糖酵解过程产生的 ATP 可以抑制蛋白激酶调节血管内皮细胞中  $\text{Ca}^{+}$  的转运, 使血管内皮细胞中  $\text{Ca}^{+}$  的浓度增加, 从而引起血管内皮细胞的收缩, 造成血压的变化<sup>[37]</sup>。但是, PFKP 具体如何调控血压的变化仍需更深层次的实验去探究。

### 3. 血小板型磷酸果糖激酶 (PFKP) 与肥胖

磷酸果糖激酶作为糖酵解过程的一种限速酶, 催化 6-磷酸果糖和 ATP 分解成 1, 6-二磷酸果糖和 ADP。糖酵解的第一步是葡萄糖磷酸化为 6-磷酸葡萄糖。不同细胞类型中所含有的酶也不一样, 在所有的细胞中, 皆有己糖激酶(Hexokinase)进行催化, 而在肝细胞和胰腺中, 则另外含有一种称为葡(萄)糖激酶(HexokinaseIV)的酵素。磷酸化过程消耗一分子 ATP, 后面的过程证明, 这是回报很丰厚的投资。细胞膜对葡萄糖通透, 但对磷酸化产物 6-磷酸葡萄糖不通透, 后者在细胞内积聚并继续反应, 将反应平衡向有利于葡萄糖吸收的那一面推移。之后 6-磷酸葡萄糖会在磷酸己糖异构酶的催化下生成 6-磷酸果糖。(在此果糖也可通过磷酸化进入糖酵解途径)接着 6-磷酸果糖会在磷酸果糖激酶的作用下被一分子 ATP 磷酸化生成 1, 6-二磷酸果糖, ATP 则变为 ADP。这里的能量消耗是值得的, :首先此步反应使得糖酵解不可逆地继续进行下去, 另外, 两个磷酸基团可以进一步在醛缩酶的参与下分解为磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛。磷酸二羟丙酮会在磷酸丙糖异构酶帮助下转化为 3-磷酸甘油醛。两分子 3-磷酸甘油醛会被  $\text{NAD}^{+}$  和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的氧化下生成 1, 3-二磷酸甘油酸(1, 3-BPG)。下一步反应, 1, 3-二磷酸甘油酸转变为 3-磷酸甘油酸。此反应由磷酸甘油酸激酶催化, 高能磷酸键由 1, 3-二磷酸甘油酸转移到 ADP 上, 生成两分子 ATP。在此, 糖酵解能量盈亏平衡。两分子 ATP 消耗了又重新生成。ATP 的合成需要 ADP 作原料。如果细胞内 ATP 多(ADP 则会少), 反应会在此步暂停, 直到有足够的 ADP。这种反馈调节和重要, 因为 ATP 就是不被使用, 也会很快分解。反馈调节避免生产过量的 ATP, 节省了能量。磷酸甘油酸变位酶推动 3-磷酸甘油酸生成 2-磷酸甘油酸, 最终成为磷酸烯醇式丙酮酸。磷酸烯醇式丙酮酸是高能化合物。最后, 在丙酮酸激酶的作用下磷酸烯醇式丙酮酸生成一分子 ATP 和丙酮酸。此步反应也受 ADP 调节。它的活性增加会打破糖酵解和糖原合成之间的平衡, 促进葡萄糖的利用, 从而增加脂肪的生成, 最终导致肥胖<sup>[38]</sup>。

### 4. DNA 甲基化与高血压

DNA 甲基化是一种较为常见的表观遗传修饰方式, 也是表观遗传学研究最清楚、最重要的形式之一。在正常的生理条件以及一些疾病发生过程中, DNA 甲基化能够通过影响基因与转录基因的结合, 从而调节基因的表达和沉默。目前, 众多的研究显示 DNA 甲基化与癌症<sup>[39]</sup>、心血管疾病<sup>[40]</sup>、自身免疫性疾病<sup>[41]</sup>、代谢性疾病<sup>[42]</sup>等多种疾病的发生密切相关。随着全基因组甲基化芯片技术的发展, 关于高血压全基因组甲基化的研究也逐渐开展, 郭军等<sup>[43]</sup>通过选取中国汉族人群中原发性高血压 6 例和血压正常者 4 人,

抽取外周静脉血提取全基因组 DNA，采用高通量 DNA 甲基化芯片实验，共筛选出 627 个差异甲基化基因，其中有 132 个基因位点甲基化程度增高，495 个基因位点甲基化程度降低，选取 TTBK1、LRP、FZD7、NDUSF8、SYCE1、USFP1、ABCG4 和 ZNF540 等 8 个可能与基因进行了亚硫酸氢盐测序 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 验证，结果提示 ABCG4 基因的甲基化差异最为显著，提示 ABCG4 基因启动子的异常甲基化与原发性高血压相关。2013 年 Wang 等<sup>[44]</sup>从 14-23 岁男性非裔人群中选取 7 例高血压患者和 7 名正常者为研究对象，利用 Illumina Human Methylation 27K BeadChip 芯片对外周血 DNA 进行甲基化芯片高通量实验，发现 SULF1 基因的 CpG 位点甲基化存在差异，提示 DNA 甲基化水平的异常可能在高血压的发生发展中起到重要的作用。Li<sup>[45]</sup>等人选取哈萨克族高血压患者 12 人及血压正常者 12 人采用 Illumina Infinium 450K BeadChip 甲基化芯片对外周外周血 DNA 进行甲基化芯片高通量实验筛选差异性甲基化基因，结合甲基化芯片筛选的差异甲基化基因，利用 GO 富集分析和 KEGG 富集分析对这些基因进行了生物学功能分析，不难看出这些差异甲基化基因参与了不同的生物学通路，包括肾素血管紧张素醛固酮调节、血管平滑肌收缩机制、炎症介质、类固醇激素代谢、代谢通路、PI3K-AKT-mTOR 信号通路、白细胞趋化作用、Notch 信号通路、血管内皮生长因子信号通路、钙离子信号通路、MAPK 信号通路以及 AMPK 信号通路等，都是高血压病研究中较为重要的生物学通路。同时我们也发现同一生物学通路大都由多个基因参与，而某一基因也同时通过多个生物学通路来发挥作用。因此，结合生物信息学分析，从这些差异甲基化基因中调挑选出可能与高血压相关的基因：血小板源性生长因子受体  $\alpha$  (PDGFRA)，血小板类磷酸果糖激酶 (PFKP)，叉头框 K2 (FOXP2)，鸟嘌呤核苷酸交换分子 TRIO，泛素化连接酶 E3 蛋白 (CUL3)，输卵管蛋白-1 (OVGP1)，神经介素 U 受体-1 (NMUR1)。这提示提示 PFKP 基因的 DNA 甲基化水平的异常可能在高血压的发生发展中起到重要的作用。

## 5 展望

心血管疾病是危害人类健康的主要疾病，影响心血管病发病风险的主要危险因素有高血压病、糖脂代谢紊乱、吸烟、肥胖、不合理的饮食以及运动锻炼缺乏。而血小板型磷酸果糖激酶 (PFKP) 又参与许多代谢疾病的发生发展，并且 PFKP 基因甲基化在哈萨克族高血压病中存在着差异性。但血小板型磷酸果糖激酶在心血管疾病的发生发展中处于何种的地位，又是如何调控血压变化的，仍需我们进行更深层次的实验去探究。

## 参考文献

### (Reference)

- [1] Geneva WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014.
- [2] Ash GI, Eicher JD, Pescatello LS. The promises and challenges of the use of genomics in the prescription of exercise for hypertension: the 2013 update. *Curr Hypertens Rev*, 2013, 9(2): 130-47
- [3] Wright JT, Williamson JD, Whelton PK, et al. A randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control [J]. *The New England journal of medicine*, 2015, 373(22): 2103-2116.
- [4] Sanfilippo KM, McTigue KM, Fidler CJ, et al. Hypertension and obesity and the risk of kidney cancer in 2 large cohorts of US men and women [J]. *Hypertension*, 2014, 63(5): 934-941.
- [5] El Sayed S M, El-Magd R M A, Shishido Y, et al. 3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects[J]. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2012, 44(1): 61-79.
- [6]. Benjamin S, Radermacher M, Kirchberger J, et al. 3D structure of phosphofructokinase from *Pichia pastoris*: Localization of the novel  $\gamma$ -subunits[J]. *Journal of structural biology*, 2009, 168(2): 345-351.
- [7]. Walker FJ. Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin Thromb Hemost*. 1984;10:131-8. [PubMed: 6234659]
- [8]. Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48(Suppl1):S53 - 66. [PubMed: 21054189]
- [9]. D'Angelo A, Della Valle P, Crippa L, Pattarini E, Grimaldi LM, Vigano D'Angelo S. Brief report: Autoimmune protein S deficiency in a boy with severe thromboembolic disease. *N Engl J Med*. 1993; 328:1753 - 7. [PubMed: 8497285]
- [10]. Suh CH, Hilliard B, Li S, Merrill JT, Cohen PL. TAM receptor ligands in lupus: protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R146. [PubMed: 20637106]
- [11] Sorice M, Griggi T, Arcieri P, Circella A, d'Agostino F, Ranieri M, et al. Protein S and HIV infection. The role of anticardiolipin and anti-protein S antibodies. *Thromb Res*. 1994; 73:165 - 75. [PubMed: 7910706]
- [12]. Kiser KL, Badowski ME. Risk factors for venous thromboembolism in patients with human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy*. 2010; 30:1292 - 302. [PubMed: 21114396]
- [13]. van Ommen CH, Fijnvandraat K, Vulsma T, Delemarre-Van De Waal HA, Peters M. Acquired protein S deficiency caused by estrogen treatment of tall stature. *J Pediatr*. 1999; 135:477 - 81. [PubMed: 10518082]
- [14]. Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Catastrophic antiphospholipid syndrome associated with malignancies (case report and review of the literature). *Lupus*. 2007; 16:59 -

64. [PubMed:17283588]
- [15]. Guermazi S, Regnault V, Gorgi Y, Ayed K, Lecompte T, Dellagi K. Further evidence for the presence of anti-protein S autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000; 11:491–8. [PubMed: 10937810]
- [16]. Regnault V, Boehlen F, Ozsahin H, Wahl D, de Groot PG, Lecompte T, de Moerloose P. Antiprotein S antibodies following a varicella infection: detection, characterization and influence on thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:1243–9. [PubMed: 15946215]
- [17]. Phillips WG, Marsden JR, Hill FG. Purpura fulminans due to protein S deficiency following chickenpox. *Br J Dermatol*. 1992; 127:30–2. [PubMed: 1386247]
- [18]. D'Angelo A, Della Valle P, Crippa L, Pattarini E, Grimaldi LM, Viganò D'Angelo S. Brief report:autoimmune protein S deficiency in a boy with severe thromboembolic disease. *N Engl J Med*. 1993; 328:1753 – 7. [PubMed: 8497285]
- [19]. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood*. 1993; 81:2618 – 25. [PubMed: 8166780]
- [20]. Gregory SA, Morrissey JH, Edgington TS. Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. *Mol Cell Biol*. 1989; 9:2752 – 5. [PubMed:2503712]
- [21]. Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. *J Thromb Haemost*. 2013;11(Suppl 1):277 – 84. [PubMed: 23809131]
- [22]. Muhlfelder TW, Teodorescu V, Rand J, Rosman A, Niemetz J. Human atheromatous plaque extracts induce tissue factor activity (TFa) in monocytes and also express constitutive TFa. *Thromb Haemost*. 1999; 81:146 – 50. [PubMed: 10348707]
- [23]. Winckers K, ten Cate H, Hackeng TM. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Rev*. 2013; 27:119 – 32. [PubMed: 23631910]
- [24]. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 1998;79:276 – 81. [PubMed: 9493575]
- [25] Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, Tsuneoka H, Matsui T, Yamamoto M, Ichihara K. Antiphospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res*. 2012; 130:667 – 73. [PubMed: 22196362]
- [26]. Jarjour WN, Minota S, Roubey RA, Mimura T, Winfield JB. Autoantibodies to nucleolin crossreact with histone H1 in systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*. 1992; 16:263 – 6. [PubMed:1454059]
- [27]. Ruf J, Ferrand M, Durand-Gorde JM, De Micco C, Carayon P. Significance of thyroglobulin antibodies cross-reactive with thyroperoxidase (TGPO antibodies) in individual patients and immunized mice. *Clin Exp Immunol*. 1993; 92:65 – 72. [PubMed: 8467565]
- [28]. Erkan D, Zhang HW, Shriky RC, Merrill JT. Dual antibody reactivity to beta2-glycoprotein I and protein S: increased association with thrombotic events in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2002; 11:215–20. [PubMed: 12043884]
- [29]. Chen C, Liao D, Wang J, et al. Anti-human protein S antibody induces tissue factor

- expression through a direct interaction with platelet phosphofructokinase[J]. *Thrombosis research*, 2014, 133(2): 222-228.
- [30]. Diaz-Ruiz R, Averet N, Araiza D, Pinson B, Uribe-Carvajal S, Devin A and Rigoulet M. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *The Journal of biological chemistry*. 2008; 283:26948-26955.
- [31]. Murakami K and Yoshino M. Effect of fructose 1,6-bisphosphate on the iron redox state relating to the generation of reactive oxygen species. *Biometals*. 2015; 28:687-691.
- [32]. Dunaway GA, Kasten TP, Sebo T and Trapp R. Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *The Biochemical journal*. 1988; 251:677-683.
- [33]. Koster JF, Slee RG and Van Berkel TJ. Isoenzymes of human phosphofructokinase. *Clinica chimica acta*. 1980; 103:169-173.
- [34]. Sanchez-Martinez C and Aragon JJ. Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. *FEBS letters*. 1997; 409:86-90.
- [35]. Minton DR, Fu L, Chen Q, Robinson BD, Gross SS, Nanus DM and Gudas LJ. Analyses of the Transcriptome and Metabolome Demonstrate That HIF1 $\alpha$  Mediates Altered Tumor Metabolism in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PloS one*. 2015; 10:e0120649.
- [36]. Wang J, Zhang P, Zhong J, et al. The platelet isoform of phosphofructokinase contributes to metabolic reprogramming and maintains cell proliferation in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 27142.
- [37] Aromolaran A S, Zima A V, Blatter L A. Role of glycolytically generated ATP for CaMKII-mediated regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in bovine vascular endothelial cells[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, 293(1): C106-C118.
- [38] Liu YJ, Liu XG, Wang L, Dina C, Yan H, Liu JF, Levy S, Papasian CJ, Drees BM, Hamilton JJ, Meyre D, Delplanque J, Pei YF, Zhang L, Recker RR, Froguel P, Deng HW: Genome-wide association scans identified CTNBL1 as a novel gene for obesity. *Human Molecular Genetics* 2008, 17(12):1903-1813.
- [39] Paska AV, Hudler P. Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view[J]. *Biochimica medica*, 2015, 25(2): 161-176.
- [40] Glier MB, Green TJ, Devlin AM. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(1): 172-182.
- [41] Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases[J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17(12): 714-724.
- [42] Ronn T, Ling C. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes[J]. *Epigenomics*, 2015, 7(3): 451-460.
- [43] 郭军, 蔡军, 李自成. 原发性高血压患者 ABCG4 基因启动子的甲基化差异分析[J]. *中国生理生理杂志*, 2011, 27(11): 2067-2071.
- [44] Wang XL, Bonita Falkner, Zhu HD, et al. A genome-wide methylation study on essential hypertension in young African American males[J]. *PLoS One*. 2013, 8(1): e53938.
- [45]. 李小雷. 哈萨克族高血压患者差异甲基化基因筛选[硕士学位论文]. 新疆: 石河子大学医学院, 2016.

## 致 谢

白驹过隙，时光荏苒，回顾过往，展望未来，感慨良多。从懵懂无知到成熟稳重，得力于三年研究生生活学习，回首攻读硕士研究生的经历，每一天我都过得很充实，收获颇多。这一切离不开家人的支持、老师的教导和同学们对我的陪伴、关心与帮助。借此机会向曾经给予我无私帮助的、支持的老师、家人以及同学表示我最诚挚的感谢和祝福。

首先要感谢我的导师王忠教授，求学两年多以来，导师虽然日常工作繁忙，但都能每次不厌其烦的给予我学术和生活上的指导和关怀。经常教导我们“做人，做事，做学问”，让我明白了行事必先做人。本研究及学位论文是在导师的亲切关怀和悉心指导下完成的，每一个环节都倾注了导师大量的心血和汗水！导师治学严谨，学识渊博；严于律己，宽以待人！正所谓：“师者，所以传道授业解惑也”，导师不仅在学习上对我谆谆教诲，在生活上，对我呵护备至，更是身体力行教我许多做人的道理，谨以最诚挚的感谢献给尊敬的导师，真诚的祝愿导师身体健康、阖家幸福！

同时要感谢陈少泽老师为本课题的顺利完成，包括立题、设计、实施及论文的撰写给予的无私指导与帮助，也感谢石河子大学医学院第一附属医院心内二科的全体医护人员，感谢他们在学习、工作和生活中给予的帮助和鼓励！

感谢石河子大学医学院第一附属医院中心实验室周婷主任、周侃老师、周迪老师在我实验过程中给予我耐心的指导，使我的实验能够顺利完成。

感谢与我朝夕相处的同学，尤其要感谢同学在学习和生活中始终与我风雨同舟，给予我许多热情的帮助，在此致以真诚的谢意！

感谢论文评审和答辩工作的各位教授专家的指导！

最后，感谢我的父母，正是他们始终如一的爱，在背后一直默默地无条件地支持着我，才有我今天的成长，感谢他们的支持与理解。

## 作者简介

秦嘉治，男，汉族，生于 1988 年 09 月，籍贯河北省黄骅市，2014 年 7 月毕业于河北医科大学临床学院临床医学专业。同年考入石河子大学医学院，攻读内科学硕士研究生。主要研究方向为高血压及冠心病的发病机制及防治研究，在校期间已修完全部研究生课程。

### 在学期间主要参与的研究项目

1. 国家自然科学基金项目《DNA 甲基化与新疆哈萨克族原发性高血压的相关性研究》(项目编号: 81460075)

### 学习期间发表的文章

1. 秦嘉治, 王忠, 陈少泽, 等. 人输卵管糖蛋白-1 基因甲基化状态与哈萨克族原发性高血压的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2016,32(24):3990-3994. (中文核刊)
2. Zhong Wang, Jiazhi Qin, Shaoze Chen, et al. Lower methylation of the PFKP gene body is associated the risk of Essential Hypertension in Kazak. (拟投稿)

## 石河子大学硕士研究生学位论文

### 导师评阅表

研究生姓名	秦嘉治	学制	3年
专业	内科学	研究方向	高血压及冠心病的发病机制及防治研究

**学术评语:**

该生课题为《PFKP基因甲基化状态与哈萨克族高血压相关性研究》，该课题以人群相对稳定的新疆哈萨克族组人群为研究对象，在高血压流行病学调查基础上，采用采用了焦磷酸测序及荧光定量PCR研究，结果显示：1. PFKP因body区的甲基化状态与PFKP基因mRNA表达水平存在一定关联，但由基于实验样本量的限制需进一步实验分析其具体相关性。2. 在高血压组中PFKP基因body区的甲基化状态比较正常对照组呈现出明显降低，提示PFKP基因body区的低甲基化状态增加了高血压的发生风险。3. PFKP基因body区的甲基化状态与年龄、BMI呈现出线性关系，说明PFKP基因body区甲基化与年龄及BMI之间的联系可以影响高血压的状态。

该硕士学位论文立意新颖，构思严谨，从实验设计、资料收集、数据处理到总结分析，研究目标明确，整个过程思路清晰。论文撰写观点明确，论据充分，条理性逻辑性强，文字表达准确，语句通顺，逻辑严密，体现出该研究生具备严肃的科学态度和严谨求实的科研作风，具有本学科扎实的理论基础和专业知识，结合国内外研究文献报道，得出客观、科学、合理的结论。

该生学位论文及综合素质已达到硕士生毕业水平，同意申请毕业论文答辩及授予硕士学位。

指导教师签字:

王忠

2017年6月5日