

论著·临床研究

FRA-2 mRNA 表达及 DNA 甲基化水平与代谢综合征的相关性研究

杜晴晴¹, 侯泽鑫¹, 李 军², 胡 颖³, 曹国磊⁴, 李思源¹

1. 石河子大学医学院, 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院第一附属医院内分泌代谢科, 石河子 832002; 3. 新疆医科大学第四附属医院神志科, 乌鲁木齐 830099; 4. 新疆医科大学附属肿瘤医院呼吸神经内科, 乌鲁木齐 830011

[摘要] **目的**·探讨 Fos 相关抗原-2 (Fos-related antigen-2, *FRA-2*) mRNA 表达水平及 DNA 甲基化水平与代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的关系。**方法**·采用病例-对照研究方法, 纳入 2020 年 6 月—2021 年 6 月于石河子大学医学院第一附属医院内分泌代谢科就诊的有 MS 危险因素 (肥胖、高血脂、高血压、高血糖) 的患者 160 例, 分为 MS 组 (危险因素 ≥ 3 项, $n=80$) 和非 MS 组 (危险因素 1~2 项, $n=80$); 另选取同期健康体检者纳入对照组 (危险因素 0 项, $n=80$)。收集并记录年龄、体质量指数 (body mass index, BMI)、腰围 (waist circumference, WC)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、收缩压 (systolic blood pressure, SBP) 等一般资料, 测定空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG)、三酰甘油 (triacylglycerol, TAG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、空腹胰岛素 (fasting serum insulin, FINS)、胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) 等临床生化指标, 反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 *FRA-2* mRNA 表达水平, 碱基特异性裂解和基质辅助激光解析电离时间飞行质谱仪 (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 测定 *FRA-2* DNA 甲基化水平。3 组之间性别比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 年龄比较采用方差分析, 临床生化指标、*FRA-2* mRNA 表达水平、*FRA-2* DNA 甲基化水平比较采用协方差分析; Spearman 法分析 *FRA-2* DNA CpG 单元甲基化水平与 MS 相关临床生化指标之间、*FRA-2* mRNA 表达水平与 *FRA-2* DNA 甲基化水平之间的相关关系; 采用线性回归分析 *FRA-2* DNA 甲基化水平与 MS 危险因素个数的关系。**结果**·与对照组及非 MS 组相比, MS 组年龄、BMI、WC、DBP、SBP、FPG、TAG、TC、LDL-C、HOMA-IR 上升 (均 $P<0.05$), HDL-C 降低 ($P=0.000$), *FRA-2* mRNA 表达水平下降 ($F=49.155$, $P=0.000$)。与对照组相比, 非 MS 组和 MS 组 4 个 *FRA-2* DNA CpG 单元甲基化水平上升 (均 $P<0.05$); 与非 MS 组相比, MS 组 5 个 *FRA-2* DNA CpG 单元甲基化水平上升 (均 $P<0.05$)。线性回归分析结果显示, MS 危险因素个数与 *FRA-2* DNA 甲基化水平呈正相关 ($\beta=0.012$, $P=0.000$)。Spearman 法分析结果显示, 测定的 10 个 *FRA-2* DNA CpG 单元中 CpG 3、CpG 8、CpG 9.10、CpG 12.13.14、CpG 19 与 WC、SBP、DBP、FPG、TAG、HDL-C 之间都存在相关性 (均 $P<0.05$); *FRA-2* mRNA 表达水平与 *FRA-2* DNA 甲基化水平呈负相关 ($r=-0.607$, $P=0.000$)。**结论**·*FRA-2* 基因甲基化水平与 MS 的发生有一定的相关性, *FRA-2* DNA 甲基化水平增高从而下调 mRNA 表达可能在 MS 发生中发挥作用。

[关键词] 代谢综合征; Fos 相关抗原-2; 甲基化; 相关性

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.03.013 **[中图分类号]** R589.1 **[文献标志码]** A

Correlation between *FRA-2* mRNA expression, DNA methylation level and metabolic syndrome

DU Qingqing¹, HOU Zexin¹, LI Jun², HU Ying³, CAO Guolei⁴, LI Siyuan¹

1. Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, The First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, China; 3. Department of Psychology, The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830099, China; 4. Department of Respiratory Neurology, Xinjiang Medical University Cancer

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技攻关计划 (2021AB031); 石河子大学成果转化与技术推广项目 (CGZH201911)。

[作者简介] 杜晴晴 (1997—), 女, 硕士生; 电子邮箱: xjduqq@163.com。

[通信作者] 李 军, 电子邮箱: xjljun@163.com。

[Funding Information] Science and Technology Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2021AB031); Achievement Transformation and Technology Extension Project of Shihezi University (CGZH201911)。

[Corresponding Author] LI JUN, E-mail: xjljun@163.com。



Hospital, Urumqi 830011, China

[Abstract] Objective To investigate the relationship between Fos-related antigen-2 (*FRA-2*) mRNA, DNA methylation levels and metabolic syndrome (MS). **Methods** A case-control study was used to include 160 patients with MS risk factors (obesity, hyperlipidemia, hypertension and hyperglycemia) who were admitted to the Department of Endocrinology and Metabolism of the First Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine from June 2020 to June 2021. They were divided into MS group (number of MS risk factors ≥ 3 , $n=80$) and non-MS group (number of MS risk factors 1–2, $n=80$). In addition, healthy subjects at the same period were included in the control group (0 risk factor, $n=80$). The age, body mass index (BMI), waist circumference (WC), diastolic blood pressure (DBP), and systolic blood pressure (SBP) were collected and recorded; Fasting plasma glucose (FPG), triacylglycerol (TAG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), fasting serum insulin (FINS) and homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) were determined. *FRA-2* mRNA expression level was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and *FRA-2* DNA methylation level was determined by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Kruskal-wallis *H* test was used for gender comparison, ANOVA was used for age comparison, and covariance analysis was used for comparison of clinical biochemical indicators, *FRA-2* mRNA expression level and *FRA-2* DNA methylation level. Spearman method was used to analyze the correlation between the methylation level of *FRA-2* DNA CpG unit and MS-related clinical biochemical indexes, and between the expression level of *FRA-2* mRNA and the methylation level of *FRA-2* DNA. The relationship between *FRA-2* DNA methylation level and the number of MS risk factors was analyzed by linear regression analysis. **Results** Compared with the control group and the non-MS group, the age, BMI, WC, DBP, SBP, FPG, TAG, TC, LDL-C and HOMA-IR in the MS group were increased (all $P<0.05$), while HDL-C was decreased ($P=0.000$); the expression of *FRA-2* mRNA in the MS group was decreased ($F=49.155$, $P=0.000$). Compared with the control group, the methylation levels of four *FRA-2* DNA CpG units in the non-MS group and the MS group were increased (all $P<0.05$). Compared with the non-MS group, the methylation levels of five *FRA-2* DNA CpG units in the MS group were increased (all $P<0.05$). The results of linear regression analysis showed that the number of MS risk factors was positively correlated with the level of *FRA-2* DNA methylation ($\beta=0.012$, $P=0.000$). Spearman method analysis results showed that among the 10 detected *FRA-2* DNA CpG units, CpG 3, CpG 8, CpG 9.10, CpG 12.13.14 and CpG 19 were correlated with WC, SBP, DBP, FPG, TAG and HDL-C (all $P<0.05$). The mRNA expression level of *FRA-2* was negatively correlated with the DNA methylation level of *FRA-2* ($r=-0.607$, $P=0.000$). **Conclusion** There is a certain correlation between the methylation level of *FRA-2* gene and the occurrence of MS. Increasing the methylation level of *FRA-2* DNA and thus down-regulating the mRNA expression may play a role in the occurrence of MS.

[Key words] metabolic syndrome (MS); Fos-related antigen-2 (*FRA-2*); methylation; correlation

近年来, 西方生活方式在全球范围内日益流行, 代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的患病率也随之上升, 其在一些发展中国家城市人口中的患病率往往高于发达国家, 已成为一个全球性的威胁健康的重要问题。MS 是肥胖或超重、高血糖、胰岛素抵抗等多种代谢异常构成的复杂的代谢异常症候群。MS 促进冠状动脉粥样硬化性心脏病、卒中及恶性肿瘤等疾病的发生, 这些疾病造成的医疗保健成本和潜在的经济活动损失成本, 数以万亿计^[1-2]。

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式。有研究^[3]发现, DNA 甲基化可能通过在启动子区域的 CpG 序列添加甲基来发挥作用, 参与哺乳动物发育、代谢、稳态调节及肥胖和多种疾病的发生。DNA 甲基化也可能与 MS 的发生有关^[4]。Fos 相关抗原-2 (Fos-related antigen-2, *FRA-2*) 属于转录因子激活蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 家族, 存在于动物的多种组织和细胞, 参与细胞增殖、分化等过程; *FRA-2* 的异常表达可导致疾病的发生和发展^[5]。*FRA-2* 参与哺乳动物能量平衡、糖脂代谢及胰岛素抵抗的调节, 与

MS、糖尿病、动脉粥样硬化等的发生有关^[6-9]。到目前为止, *FRA-2* mRNA 及 DNA 甲基化水平与 MS 的相关关系尚不清楚。本研究拟探讨 *FRA-2* mRNA 及 DNA 甲基化水平与 MS 的关系, 探究 MS 发生的分子机制以寻找 MS 防治的潜在靶点。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取 2020 年 6 月—2021 年 6 月石河子大学医学院第一附属医院内分泌代谢科就诊的患者, 根据《中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)》^[10] 对 MS 的定义, 将有 MS 危险因素 (高血糖、高血脂、高血压、肥胖) ≥ 3 项的患者纳入 MS 组 ($n=80$), 有 MS 危险因素 1~2 项的患者纳入非 MS 组 ($n=80$)。MS 的诊断标准满足以下 ≥ 3 项: ①腰围 (waist circumference, WC) 女性 ≥ 85 cm, 男性 ≥ 90 cm。②确诊高血压, 或收缩压 (systolic blood pressure, SBP) ≥ 130 mmHg 或舒张压 (diastolic blood pressure, DBP) ≥ 85 mmHg

(1 mmHg=0.133 kPa)。③ 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) <1.04 mmol/L。④ 三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) \geq 1.7 mmol/L。⑤ 确诊 2 型糖尿病或空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) \geq 6.1 mmol/L。另外选取同期的健康体检者纳入对照组 (无 MS 危险因素, $n=80$)。各组排除具有以下情况人群: ① 各种严重肝、肾、心血管疾病者。② 长期服用激素、免疫抑制剂者。③ 近期有外伤或手术者。④ 妊娠及哺乳期者。收集患者年龄、性别、体质量指数 (body mass index, BMI) 等资料。本研究经石河子大学医学院第一附属医院医学伦理委员会批准 (伦理审查号: KJ2020-142-01), 所有参与的患者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集及生化检测 所有研究对象均禁食 12~14 h, 晨起空腹抽取静脉血 2 管, 每管约 2 mL。一管为 EDTA 抗凝管, 备以后续 DNA 及 RNA 提取; 另一管为真空采血管, 经过混匀后 $9\,000\times g$ 离心 10 min, 离心管收集上清液备用, 然后均置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存。使用全自动生化分析仪 (AU5800, 美国贝克曼公司) 测定 FPG、TAG、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、HDL-C, 使用全自动电化学发光免疫分析仪 (COBAS e 601, 德国罗氏) 测定空腹胰岛素

(fasting serum insulin, FINS)。使用稳态模型评估法来计算胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR), 公式为 $\text{HOMA-IR}=\text{FINS}\times\text{FPG}/22.5$ 。

1.2.2 RT-PCR 方法检测 *FRA-2* mRNA 表达 TRIzol 法提取 RNA, 后按照 cDNA 第一链合成试剂盒 (美国 APEX BIO 公司) 说明书合成 cDNA 模板, 进行 PCR 扩增。反应条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s、 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 进行 35 个循环。加入 1 对内参 (β -actin) 的特异性引物, 同时扩增内参 DNA (引物序列见表 1)。使用 GelDoc EZ 全自动凝胶成像分析系统 (美国 UVB 公司) 和 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析 *FRA-2* mRNA 相对表达水平。

1.2.3 MALDI-TOF-MS 法检测 *FRA-2* DNA 甲基化水平 取 200 μL 血液样本, 提取 DNA, 使用 NanoDrop 分光光度仪定量检测基因组 DNA 的浓度及纯度, 以保证其 DNA 浓度 $>50\text{ ng}/\mu\text{L}$, 纯度 $[D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})]$ 位于 1.7~2.0 之间。依据 EZ DNA 甲基化修饰处理试剂盒 (D5001, 美国 Sequenom 公司) 以及美国 Sequenom 公司推荐的方式对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰, 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, 进行 20 个循环。PCR 扩增 DNA, 反应条件如下: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热 4 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 3 min, 接下来 45 个循环 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min)。PCR 产物在 384-pad 光谱芯片 (美国 Sequenom 公司) 上测定。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences for PCR

Target gene	Primer sequence(5'→3')
RT-PCR	
<i>FRA-2</i>	up-stream: CCAGATGAAATGTCATGGC
	down-stream: CTCGGTTTGGTAGACTTGGA
β -actin	up-stream: CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT
	down-stream: ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCG
MALDI-TOF-MS	
<i>FRA-2</i>	up-stream: AGGAAGAGAGGTAGGTTTAGGAGAGGGGTGTG
	down-stream: CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTACAACCCCAAACTTAATAAAAC

Note: RT-PCR—reverse transcription-polymerase chain reaction; MALDI-TOF-MS—matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry.

使用 MassARRAY 质谱仪 (美国 SEQUENOM 公司) 收集质谱图, 使用 EpiTYPER v1.0.5 软件生成各 CpG 单元的甲基化数据。经由对比甲基化峰与非甲基化峰的强度来计算所检测基因各 CpG 单

元相对的甲基化率。共检测了 10 个 CpG 单元, 分别为 CpG 1、CpG 3、CpG 4.5、CpG 6.7、CpG 8、CpG 9.10、CpG 11、CpG 12.13.14、CpG 15.16.17、CpG 19。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差分析示 3 组间年龄差异有统计学意义, 余资料采用协方差分析以校正年龄对组间临床指标的影响; 非正态分布定量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示, 采用 Kruskal-Wallis H 检验; 每增加 1 个危险因素, $FRA-2$ DNA 甲基化水平变化量采用线性回归分析; 指标间相关关系采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 3 组间一般及临床资料比较

Tab 2 Comparison of general and clinical data among the three groups

Clinical data	Control group ($n=80$)	Non-MS group ($n=80$)	MS group ($n=80$)	P value
Gender(male/female)/ n	41/39	40/40	41/39	0.984
Age/year	49.81 \pm 9.13	50.08 \pm 15.10	55.90 \pm 7.96	0.001
BMI/($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	22.36 \pm 1.41	24.94 \pm 2.83	29.15 \pm 3.19	0.000
WC/cm	80.91 \pm 4.34	92.91 \pm 10.28	103.82 \pm 9.14	0.000
DBP/mmHg	72.28 \pm 4.01	80.71 \pm 15.00	93.45 \pm 14.68	0.000
SBP/mmHg	118.90 \pm 7.10	130.34 \pm 20.22	144.08 \pm 18.02	0.000
FPG/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.29 \pm 0.48	5.88 \pm 1.92	10.40 \pm 3.74	0.000
TAG/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.15 \pm 0.17	1.54 \pm 1.04	2.18 \pm 0.77	0.000
TC/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.92 \pm 0.51	3.90 \pm 0.76	5.12 \pm 1.04	0.000
LDL-C/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.68 \pm 0.64	2.05 \pm 0.61	2.52 \pm 0.88	0.000
HDL-C/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.35 \pm 0.31	1.18 \pm 0.31	1.00 \pm 0.19	0.000
FINS/($\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.35 (1.13, 2.30)	1.41 (0.98, 2.36)	1.91 (1.14, 2.84)	0.016
HOMA-IR	2.38 (1.63, 3.91)	2.55 (1.54, 4.45)	5.83 (3.05, 10.28)	0.000

2.2 组间 $FRA-2$ mRNA 表达水平比较

与对照组及非 MS 组相比, MS 组 $FRA-2$ mRNA 表达水平降低 (均 $P=0.000$) (图 1)。

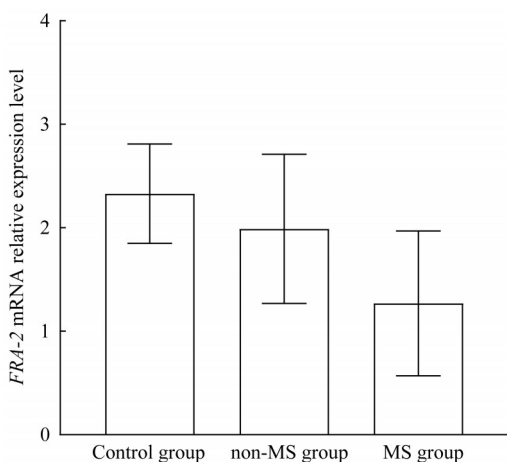


图 1 3 组间 $FRA-2$ mRNA 相对表达水平比较

Fig 1 Comparison of relative expression levels of $FRA-2$ mRNA among the three groups

2 结果

2.1 组间一般资料比较

Kruskal-Wallis H 检验显示, MS 组年龄高于对照组及非 MS 组 ($P < 0.05$)。使用协方差分析校正年龄对组间临床指标的影响后, 发现 MS 组 BMI、WC、DBP、SBP、FPG、TAG、TC、LDL-C、HOMA-IR 均高于对照组及非 MS 组 ($P < 0.05$), HDL-C 低于对照组及非 MS 组 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

2.3 组间 $FRA-2$ DNA 甲基化水平比较

协方差分析结果 (表 3、图 2) 显示: 与对照组相比, 非 MS 组及 MS 组 CpG 1 ($P=0.014$, $P=0.016$)、CpG 3 ($P=0.006$, $P=0.000$)、CpG 12.13.14 (均 $P=0.000$)、CpG 19 (均 $P=0.000$) 甲基化水平上升; 与非 MS 组相比, MS 组 CpG 4.5、CpG 6.7、CpG 8、CpG 9.10、CpG 15.16.17 甲基化水平上升 (均 $P=0.000$)。

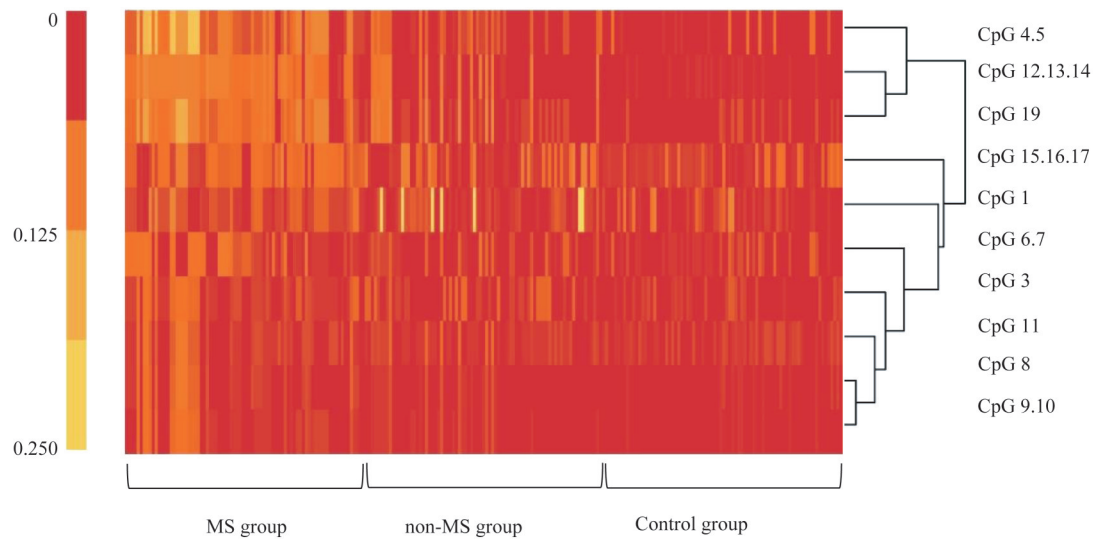
2.4 $FRA-2$ DNA 甲基化水平与 MS 危险因素个数的关系

以 $FRA-2$ DNA 甲基化水平 (10 个 CpG 单元的平均甲基化率) 为因变量, 以 MS 的危险因素个数为自变量进行线性回归分析。结果 (图 3) 显示, MS 危险因素个数与 $FRA-2$ DNA 甲基化水平呈正相关 ($\beta=0.012$, $P=0.000$), 即危险因素每增加 1 个, $FRA-2$ DNA 甲基化水平上升 0.012%。

表3 各 CpG 单元 DNA 甲基化水平比较

Tab 3 Comparison of DNA methylation levels in each CpG unit

CpG unit	Control group	non-MS group	MS group	P value
CpG 1	0.02±0.04	0.04±0.07	0.04±0.04	0.027
CpG 3	0.01±0.02	0.02±0.03	0.03±0.03	0.000
CpG 4.5	0.02±0.03	0.02±0.03	0.10±0.07	0.000
CpG 6.7	0.02±0.02	0.02±0.02	0.04±0.04	0.000
CpG 8	0.00±0.01	0.01±0.01	0.03±0.03	0.000
CpG 9.10	0.00±0.01	0.01±0.01	0.03±0.03	0.000
CpG 11	0.02±0.01	0.02±0.02	0.03±0.03	0.026
CpG 12.13.14	0.00±0.01	0.03±0.05	0.10±0.04	0.000
CpG 15.16.17	0.04±0.03	0.05±0.05	0.07±0.04	0.000
CpG 19	0.01±0.02	0.04±0.05	0.10±0.06	0.000



Note: Each column displays one topic, and each row displays one CpG unit. The color represents methylation levels, with yellow at 100% and red at 0.

图2 FRA-2 DNA 甲基化水平聚类分层

Fig 2 FRA-2 DNA methylation level clustering stratification

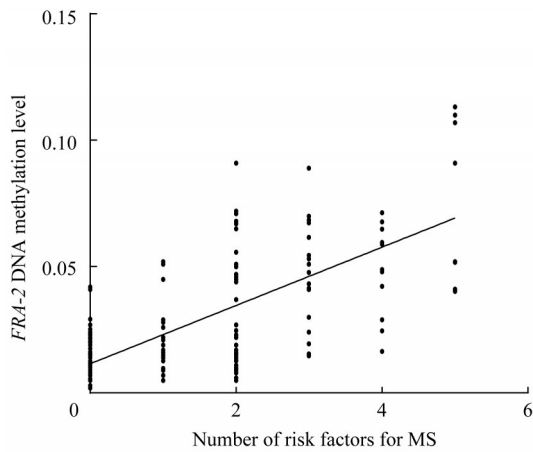


图3 FRA-2 DNA 甲基化水平与 MS 危险因素个数的关系
Fig 3 Relationship between FRA-2 DNA methylation level and the number of MS risk factors

2.5 FRA-2 DNA 甲基化水平与 MS 危险因素的相关性分析

Spearman 相关分析结果（表 4）显示，CpG 3、CpG 4.5、CpG 6.7、CpG 8、CpG 9.10、CpG 12.13.14、CpG 19 甲基化水平均与 WC、SBP、DBP、FPG、TAG 呈正相关；CpG 1 和 CpG 15.16.17 甲基化水平与 WC、DBP、TAG 呈正相关；CpG 1、CpG 3、CpG 4.5、CpG 8、CpG 9.10、CpG 12.13.14、CpG 19 甲基化水平与 HDL-C 呈负相关（均 $P<0.05$ ）。

2.6 FRA-2 DNA 甲基化水平与 mRNA 表达的相关性分析

Spearman 相关分析的结果（图 4）所示，FRA-2 DNA

表4 FRA-2 DNA 甲基化水平与 MS 危险因素的相关性分析

Tab 4 Correlation analysis between FRA-2 DNA methylation level and MS risk factors

CpG unit	WC		SBP		DBP		FPG		TAG		HDL-C	
	r value	P value	r value	P value	r value	P value	r value	P value	r value	P value	r value	P value
CpG 1	0.188	0.004	0.190	0.003	0.201	0.002	0.124	0.055	0.157	0.015	-0.175	0.007
CpG 3	0.218	0.001	0.298	0.000	0.183	0.004	0.226	0.000	0.136	0.035	-0.165	0.010
CpG 4.5	0.401	0.000	0.342	0.000	0.322	0.000	0.553	0.000	0.240	0.000	-0.277	0.000
CpG 6.7	0.204	0.001	0.098	0.130	0.193	0.003	0.301	0.000	0.179	0.006	-0.100	0.121
CpG 8	0.346	0.000	0.242	0.000	0.263	0.000	0.572	0.000	0.306	0.000	-0.133	0.040
CpG 9.10	0.501	0.000	0.320	0.000	0.348	0.000	0.539	0.000	0.401	0.000	-0.275	0.000
CpG 11	0.059	0.362	-0.058	0.375	-0.028	0.669	0.116	0.073	-0.003	0.958	-0.024	0.714
CpG 12.13.14	0.573	0.000	0.367	0.000	0.401	0.000	0.668	0.000	0.417	0.000	-0.338	0.000
CpG 15.16.17	0.166	0.010	0.111	0.086	0.279	0.000	0.101	0.120	0.208	0.001	-0.110	0.090
CpG 19	0.538	0.000	0.383	0.000	0.484	0.000	0.603	0.000	0.349	0.000	-0.255	0.000

甲基化水平（10个CpG单元的平均甲基化率）与FRA-2 mRNA表达水平呈负相关（ $r=-0.607$ ， $P=0.000$ ）。

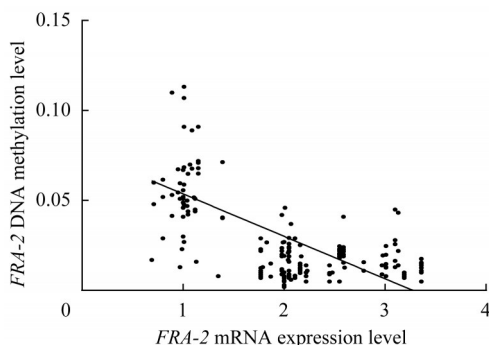


图4 FRA-2 DNA 甲基化水平与 mRNA 表达水平的相关性

Fig 4 Correlation between FRA-2 DNA methylation level and mRNA expression level

3 讨论

DNA 甲基化是一种重要的修饰方式，可以调控基因表达，在不改变分子一级结构的前提下发挥重要的生物学作用，其与高血糖、高血压等心血管疾病的危险因素增多有关^[11]。既往研究^[12]发现，FRA-2蛋白参与了糖脂代谢紊乱及MS的发生。目前关于FRA-2 mRNA及DNA甲基化表达水平与MS相关性的报道较少。

赵天明等^[13]通过流行病学分析发现，随年龄的增加MS的患病率上升。本研究结果显示，与对照组及非MS组相比，MS组年龄更高；可能是由于随着年龄增加，机体器官功能有所减退，MS危险因素的成分增加，患病概率增大。CHIURAZZI等^[14]研究显示，MS人群表现为中心性肥胖、高血压、高血

糖、高血脂及胰岛素抵抗的特征，与对照组及非MS组比较，MS组WC、DBP、SBP、FPG、TAG、TC、LDL-C、HOMA-IR上升，HDL-C降低；我们的研究数据与该研究相似。

通过RT-PCR对研究对象FRA-2 mRNA进行检测发现，MS组FRA-2 mRNA表达水平显著低于对照组及非MS组，提示MS的发生发展可能与FRA-2 mRNA表达下调有关。SAMBLAS等^[4]的研究发现，甲基化参与肥胖人群代谢及循环紊乱，缺氧诱导因子3A（hypoxia inducible factor 3A，HIF3A）、胰岛素样生长因子结合蛋白3（insulin-like growth factor binding protein-3，IGFBP-3）、固醇调节元件结合转录因子1（sterol regulatory element binding factor 1，SREBF1）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、昼夜节律钟（clock circadian regulator，CLOCK）等基因的甲基化水平可作为预测和评估MS的重要标志。我们进一步用MALDI-TOF-MS对外周血中FRA-2 DNA甲基化水平进行检测。结果表明，与对照组相比，MS组多个CpG单元甲基化水平上升，可以推测在MS发生中，FRA-2 DNA高甲基化可能起到重要作用。相关分析结果显示，FRA-2基因9个CpG单元甲基化水平与WC、DBP、TAG呈正相关，7个CpG单元甲基化水平与SBP及FPG呈正相关，7个CpG单元甲基化水平与HDL-C呈负相关；推测FRA-2可能通过DNA高甲基化的形式参与血糖、血脂、血压等的调节，进而参与MS发生发展的过程。既往研究^[15]发现，FRA-2与糖尿病患者的FPG、TG的调节有关；本研究结果与之相似。

此外，本研究还发现，FRA-2 DNA高甲基水平与

MS人群SBP及DBP升高之间存在相关性;该结果与以往研究^[12]不同,可能与纳入研究对象危险因素个数的差异性不同的遗传背景有关。近年来,有研究^[16-17]报道,DNA甲基化可通过影响肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)参与高血压的发生,但*FRA-2*是否经该通路发挥作用有待进一步研究。全贞玉等^[18]认为,MS的发生及严重程度与危险因素个数有关。本研究通过线性分析发现,危险因素每增加1个,*FRA-2* DNA甲基化水平上升0.012%,提示MS患者*FRA-2*基因甲基化程度可能受危险因素个数的影响。XIE等^[19]研究发现,外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear

cells, PBMCs)中,DNA甲基化水平对mRNA表达有调节作用,DNA可通过高甲基化的方式下调mRNA的表达,从而参与疾病的发生。本研究发现*FRA-2* DNA甲基化水平与mRNA表达呈负相关,提示*FRA-2*基因在MS中可能具有相似的致病机制,但其具体的分子机制及信号通路,还需要进一步探索。

综上所述,本研究发现*FRA-2*基因甲基化水平与MS发生具有一定的相关性,DNA甲基化水平增高从而下调mRNA表达可能在MS发生中发挥作用。未来需要设计更大样本量的多中心研究及前瞻性研究,以明确*FRA-2*与MS发生的因果关系及*FRA-2*参与MS发生的机制。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] SAKLAYEN M G. The global epidemic of the metabolic syndrome[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2018, 20(2): 12.
- [2] 陈树春. 钠-葡萄糖共转运蛋白2抑制剂对代谢综合征的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(12): 1233-1235.
- [3] GREENBERG M V C, BOURCHIS D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 590-607.
- [4] SAMBLAS M, MILAGRO F I, MARTÍNEZ A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss[J]. *Epigenetics*, 2019, 14(5): 421-444.
- [5] BIRNHUBER A, BIASIN V, SCHNOEGL D, et al. Transcription factor Fra-2 and its emerging role in matrix deposition, proliferation and inflammation in chronic lung diseases[J]. *Cell Signal*, 2019, 64: 109408.
- [6] DROSOS I, CHALIKIAS G, PAVLAKI M, et al. Differences between perivascular adipose tissue surrounding the heart and the internal mammary artery: possible role for the leptin-inflammation-fibrosis-hypoxia axis[J]. *Clin Res Cardiol*, 2016, 105(11): 887-900.
- [7] JIANG L, SU H R, WU X Y, et al. Leptin receptor-expressing neuron Sh2b1 supports sympathetic nervous system and protects against obesity and metabolic disease[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1517.
- [8] WRANN C D, EGUCHI J, BOZEC A, et al. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 1010-1021.
- [9] PAN S, LI M Y, YU H B, et al. microRNA-143-3p contributes to inflammatory reactions by targeting FOSL2 in PBMCs from patients with autoimmune diabetes mellitus[J]. *Acta Diabetol*, 2021, 58(1): 63-72.
- [10] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315-409.
- [11] PEARCE M S, MCCONNELL J C, POTTER C, et al. Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles[J]. *Int J Epidemiol*, 2012, 41(1): 210-217.
- [12] 侯泽鑫, 李思源, 曹国磊, 等. 新疆维吾尔族代谢综合征患者血清FOS相关抗原2蛋白浓度变化及与危险因素个数的关系[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(7): 717-720.
- [13] 赵天明, 王增武, 张林峰, 等. 北方农村35岁及以上人群代谢综合征患病情况调查[J]. *中华疾病控制杂志*, 2015, 19(5): 439-442, 446.
- [14] Chiurazzi M, Cozzolino M, Orsini R C, et al. Impact of genetic variations and epigenetic mechanisms on the risk of obesity[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9035.
- [15] LI J, LI S Y, HU Y, et al. The expression level of mRNA, protein, and DNA methylation status of FOSL2 of Uyghur in Xinjiang in type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 5957404.
- [16] LIN J B, LIN S W, WU Y H, et al. Hypomethylation of the angiotensin II type 1 receptor (*AGTR1*) gene along with environmental factors increases the risk for essential Hypertension[J]. *Cardiology*, 2017, 137(2): 126-135.
- [17] 岳薇薇, 胡大春. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统在高血压遗传病理机制中的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(22): 4440-4444.
- [18] 全贞玉, 姜允吉, 金海英, 等. 内脂素与代谢综合征及其组分的相关性[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2014, 22(5): 602-604.
- [19] XIE F F, DENG F Y, WU L F, et al. Multiple correlation analyses revealed complex relationship between DNA methylation and mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Funct Integr Genomics*, 2018, 18(1): 1-10.

[收稿日期] 2021-11-25

[本文编辑] 崔黎明