

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.015

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.015

外周血 *PON1* 基因高甲基化、端粒长度变短与脑梗死发病相关

肖健豪¹, 袁倩¹, 张斯淼¹, 李晓东², 段世伟³, 王运良^{1,4}

(1. 郑州大学第二附属医院神经内科, 郑州 450014; 2. 郑州大学附属郑州中心医院神经内科, 郑州 450000;
3. 宁波大学医学院, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315211;
4. 解放军第960医院淄博院区神经内科, 山东 淄博 255330)

[摘要] 目的: 探讨对氧磷酶1(*paraoxonase 1*, *PON1*)基因启动子区甲基化水平和端粒长度与中国山东地区汉族人群脑梗死发病的相关性。方法: 选取152例确诊脑梗死患者为病例组, 152例健康人为对照组, 提取外周静脉血基因组DNA, 使用荧光定量甲基化特异性PCR(quantitative methylation-specific PCR, qMSP)测定受试者的血液*PON1*基因启动子甲基化水平及端粒长度。每个样本的甲基化程度以甲基化参考百分比(PMR)来表示。结果: 病例组中*PON1*甲基化程度显著高于对照组($Z=-3.898$, $P=0.0001$), 性别亚组显示差异主要在男性中更为显著($Z=-3.786$, $P=0.0002$)。病例组患者的端粒长度显著低于对照组($Z=-11.843$, $P<0.0001$), 且男女亚组中端粒长度均显著低于对照组($P<0.05$)。然而, 并没有发现*PON1*甲基化水平与端粒长度的相关性(病例组 $r=0.023$, $P=0.775$; 对照组 $r=-0.157$, $P=0.054$)。结论: *PON1*启动子区高甲基化和端粒长度变短与脑梗死发病相关, 是中国山东地区汉族人群脑梗死发病的危险因素。

[关键词] 脑梗死; DNA甲基化; 端粒长度; *PON1*

Hypermethylation of *PON1* gene and shortening of telomere length in peripheral blood are associated with cerebral infarction

XIAO Jianhao¹, YUAN Qian¹, ZHANG Simiao¹, LI Xiaodong², DUAN Shiwei³, WANG Yunliang^{1,4}

(1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014; 2. Department of Neurology, Zhengzhou Central Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000; 3. Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology Technology Research, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo Zhejiang 315211; 4. Department of Neurology, Zibo District of the 960th Hospital of PLA, Zibo Shandong 255330, China)

Abstract **Objective:** To investigate the correlation between methylation level of promoter region of *PON1* gene, telomere length and cerebral infarction in Shandong Han population of China. **Methods:** A total of 152 patients with

收稿日期 (Date of reception): 2018-12-02

通信作者 (Corresponding author): 王运良, Email: wangyunliang81@163.com; 段世伟, Email: duanshiwei@nbu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 河南省卫生与计划生育委员会科技创新型人才“51282”工程基金 [豫卫科(2016)32号]; 宁波大学王宽诚幸福基金 [宁大政(2000)194号]。This work was supported by the “51282” Project of Health and Family Planning Commission of Henan Province [(2016) 32] and the KC Wong Magna Fund in Ningbo University [(2000) 194], China.

cerebral infarction were assigned to a case group and 152 healthy subjects served as a control group. The quantitative methylation-specific PCR (qMSP) was used to determine the promoter methylation level of *PON1* gene and detection of telomere length. The methylation level was expressed as a methylation reference percentage (PMR). **Results:** The level of *PON1* methylation in the case group was significantly higher than that in the control group ($Z=-3.898, P=0.0001$), gender subgroup showed that the difference was more significant in males ($Z=-3.786, P=0.0002$). Telomere length in the case group was significantly lower than that in the control group ($Z=-11.843, P<0.0001$), telomere length in male and female subgroups was both significantly lower than that in control group ($P<0.05$). However, there was no correlation between *PON1* methylation level and telomere length (the case group: $r=0.023, P=0.775$; the control group: $r=-0.157, P=0.054$). **Conclusion:** Hypermethylation of *PON1* promoter region and shorter telomere length are associated with cerebral infarction and are the risk factors of cerebral infarction in Han population in Shandong area of China.

Keywords cerebral infarction; DNA methylation; telomere length; *PON1*

脑梗死已成为世界第二大死因和第三大致残因素^[1], 其高发病率、病死率和致残率给患者带来了很大的痛苦^[2]。脑梗死是多因素相互作用下与遗传相关的一种疾病^[3], 目前没有特异性的治疗方法, 从多方面寻找其致病机制十分重要。研究^[4-5]发现: 表观遗传学中的DNA甲基化不仅与急性脑梗塞关系密切, 还可作为脑梗死的一种生物学标志物。

对氧磷酶1 (paraoxonase 1, *PON1*) 在血液中与高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 结合, 通过抑制低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的形成可调节体脂的代谢^[6]。研究^[7-9]认为: *PON1* 具有延缓动脉粥样硬化形成、抗氧化应激对机体的损伤、抗炎和神经保护作用, 而脑梗死最常见的两大病因就是动脉粥样硬化和血管神经系统炎症^[10]。因此, *PON* 基因家族也被认为是脑血管病的潜在危险因素^[11]。目前 *PON1* 基因的甲基化研究很少, Lei 等^[12] 在冠心病患者外周血中发现 *PON1* 启动子区多位点低甲基化是预后不佳的危险因素。而 Gómez-Uriz 等^[13] 在西班牙脑梗患者血DNA中的研究认为: *PON1* 基因甲基化与脑梗无相关性, 由于此研究样本量仅为24例, 可靠性相对较低, 仍需进一步系统研究, 但其在亚组中发现 *PON1* 高甲基化与脂肪百分比和膳食指标摄入量有关。

端粒位于真核细胞染色体末端, 起着稳定DNA结构的作用。研究^[14]认为: 端粒长度的损耗可以预测衰老和衰老相关疾病的病死率, 是机体衰老的一种标志。端粒长度缩短可以导致内皮细胞衰老并预测动脉粥样硬化相关疾病的风险^[15]。端粒长度变短也是预测肥胖风险的一个指标, 因为它对氧化应激的损害特别敏感, 而他汀类药物

的降脂治疗和运动锻炼可以显著延缓端粒的长度减少^[16-17]。

考虑到端粒长度和 *PON1* 甲基化在脑血管疾病中有着类似的作用机制, 因此本研究通过对比中国山东地区汉族脑梗死患者与健康人外周血 *PON1* 基因甲基化、端粒长度与脑梗死的关系, 拟探究其相关性。

1 材料与方法

1.1 样本收集和DNA提取

病例组样本来源于山东省淄博市中国人民解放军第960医院, 于2017年12月至2018年3月的随机抽取的住院脑梗死患者152例, 其中男112例, 女40例, 年龄(60.37±12.02)岁。病例组患者均有典型的神经系统阳性体征及影像学证据, 符合1996年国家脑血管病会议指定的诊断标准^[18], 对照组选取同时期门诊体检中心性别、年龄相匹配的健康患者152例, 其中男112例, 女40例, 年龄(60.45±12.23)岁。两组均排除恶性肿瘤、严重感染、结核、心脏疾病、阿尔茨海默病、帕金森病等老年性疾病。对照组额外排除高血压、高脂血症、糖尿病及脑卒中疾病家族史。样本采集时获得两组受试者的知情同意, 并得到郑州大学第二附属医院医学伦理道德委员会同意。符合条件的研究对象均于入院当天或第2天早晨抽取空腹外周静脉血5 mL, 于EDTA抗凝管中充分混匀后将血浆置于-80℃冰箱中保存备用。利用DNA试剂盒 (Omega Bio-Tek, Norcross GA, USA) 按操作步骤提取每一份标本的纯化DNA并移至离心管中, 放置-80℃冰箱中冷藏保存。

1.2 基因选择与引物设计

根据人2013(GRCH38/HG18), 从UCSC基因组浏览器获得*PON1*基因启动子的CpG位点组位置和功能注释(图1A), 经毛细电泳测定目的基因长度125 bp(图1B), *PON1*引物由中国生工生物工程上海股份有限公司设计, 上游引物为5'-GTGAGGAGGACGAAGGTT-3', 下游引物为5'-CCCGACCATAACGAACTAAT-3', β -Actin作为内参。端粒的引物设计和检测参考文献[19]。

1.3 DNA 亚硫酸转化

使用EZ DNA Methylation-Gold甲基化试剂盒(Zymo Research, Orange, CA, USA)对DNA样本进行亚硫酸转化, 甲基化的胞嘧啶(C)无变化, 未甲基化的胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U), 最后尿嘧啶将于PCR反应中转变为胸腺嘧啶(T)(图1C), 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行, 转化后放入-20 °C冰箱备用。

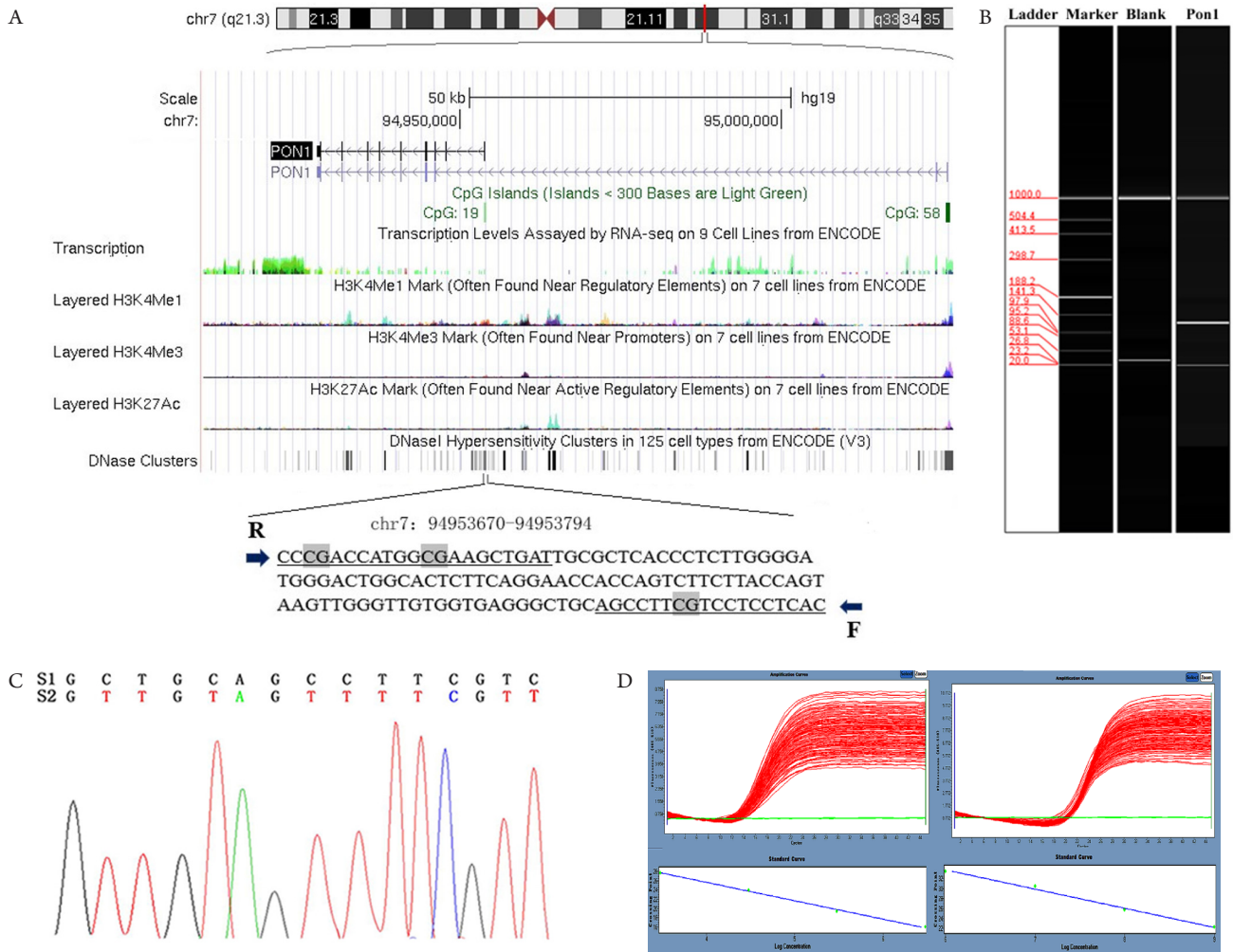


图1 *PON1*基因片段和端粒实验基本信息

Figure 1 *PON1* gene fragment and basic information of telomere

(A)对*PON1*的CpG岛片段上进行甲基化测定, F: 正向引物; R: 反向引物; (B)*PON1*基因的产物片段长度测定, Ladder表示DNA扩增的bps长度, Marker为标准参照, Blank为空白对照; (C)使用桑格测序法测序证实胞嘧啶成功转化为胸腺嘧啶(C→T), S1代表原始序列, S2代表亚硫酸转换后的序列; (D)两组端粒PCR扩增曲线, 下图为标准曲线。

(A) Perform methylation assays on CpG island fragments of *PON1*. F: Forward primer; R: Reverse primer; (B) Determination of product fragment length of *PON1* gene, and Ladder indicates the length of bps amplified by DNA, Marker as standard reference, Blank as blank control; (C) Sanger sequencing was used to confirm the successful conversion of cytosine to thymine (C→T). The uplink S1 represents the original sequence, and the downlink S2 represents the converted sequence; (D) Two groups of telomere PCR amplification curve, the following figure was the standard curve.

1.4 反应体系和 qMSP 扩增

1.4.1 甲基化反应体系

亚硫酸转化后, 按照样本 1 μL , 上下游引物各 0.25 μL , 甲基转移酶 5 μL , ddH₂O 3.5 μL 的反应体系置于 384 孔板上并封膜冰箱内保存, 用完全甲基化的基因组 DNA 作为阳性参照 (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden), 水空白为阴性参照。

1.4.2 端粒反应体系

按照 2 \times 酶混合液 5 μL , 引物 0.5 μL , 样本模板 1.5 μL , ddH₂O 3 μL 的反应体系配置于 384 孔板上并封膜冰箱内保存, 36B4 基因作为对照, 试剂盒内提供完全标准品 (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden), 水空白为阴性对照。

1.4.3 qMSP 扩增反应

于罗氏 480 荧光定量 PCR 仪器 (Roche, Basel, Switzerland) 中按操作步骤全自动检测 qMSP 扩增反应, 用 Ct 值定量方法计算基因的甲基化参考值 (PMR)。同样, 使用该仪器检测外周血细胞的端粒重复拷贝数 (T) 和内参单拷贝基因 36B4 基因的拷贝数 (S) 并进行 PCR 反应, Ct 值表示每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时的循环数, 根据 4 个标准品的 Ct 值设立标准曲线用于分析样本的基因拷贝数 (图 1D)。使用如下公式得到相应的端粒长度: 端粒长度 = 端粒拷贝数 / 对照拷贝数 / 92 \times 6。3 次重复试验后取平均值记录数据。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理, K-S 正态分布检验法检验变量的分布, 数据资料正态分

布用 *t* 检验比较及均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 非正态分布的数据用非参数检验比较及用中位数 (四分位间距) 表示, 用 Spearman 进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者的一般临床病历资料分析

两组在年龄 ($P = 0.951$) 和性别 ($P = 1.000$) 上没有明显差距。病例组中同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 和血糖 (glucose, GLU) 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和 HDL 在脑梗患者中降低 ($P < 0.05$, 表 1), 其余各项指标经分析未见明显差异。

2.2 两组 PON1 甲基化水平对比

PON1 甲基化程度在病例组中显著高于对照组 [1.03 (0.14~3.62) vs 0.25 (0~2.03), $Z = -3.898$, $P = 0.0001$]。性别亚组中, 在男性中, 病例组的甲基化程度显著高于对照组 [1.05 (0.15~4.21) vs 0.22 (0~1.98), $Z = -3.786$, $P = 0.0002$], 而在女性中, 病例组的甲基化程度与对照组没有明显差异 [1.02 (0.02~2.57) vs 0.38 (0~2.34), $Z = -1.190$, $P = 0.234$]。

2.3 两组端粒长度对比

病例组患者的端粒长度显著低于对照组 [0.0447 (0.0432~0.0463) vs 0.0499 (0.0491~0.0517), $Z = -11.843$, $P < 0.0001$]。性别亚组中, 在男性和女性中, 病例组端粒长度均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 两组一般临床资料比较 ($n = 152$)

Table 1 Comparison of general clinical data between the two groups ($n = 152$)

组别	年龄/岁	性别(男/女)	Hcy/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	GLU/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	TG/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$
病例组	60.37 \pm 12.02	112/40	1.18 \pm 0.23	5.70 (5.05~7.36)	1.31 (0.98~1.83)
对照组	60.45 \pm 12.23	112/40	1.14 \pm 0.16	5.36 (5.01~6.29)	1.35 (0.92~1.86)
<i>t/Z</i>	0.061	—	1.835	-2.251	-0.624
<i>P</i>	0.951	1.000	0.047	0.024	0.533
组别	TC/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	HDL/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	LDL/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	CRP/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	
病例组	4.54 \pm 1.13	1.16 \pm 0.31	2.46 \pm 0.78	6.60 (1.70~14.20)	
对照组	5.04 \pm 1.02	1.68 \pm 0.43	2.61 \pm 0.66	4.80 (4.10~6.20)	
<i>t/Z</i>	-4.106	-12.089	-2.027	-1.709	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.071	0.087	

2.4 PON1 甲基化水平与临床指标的相关性检验

PON1甲基化与两组受试者年龄均呈正相关(病例组 $r=0.299$, $P=0.0002$; 对照组 $r=0.437$, $P=0.0001$)。另外, 在病例组中, PON1甲基化与TC和HDL呈负相关(TC: $r=-0.199$, $P=0.014$; HDL: $r=-0.212$, $P=0.009$), 在对照组中, PON1甲基化与GLU呈正相关($r=0.23$, $P=0.005$)。经统计学分析, 两组中端粒长度与PON1甲基化水平不具有相关性(病例组 $r=0.023$, $P=0.775$; 对照组

$r=-0.157$, $P=0.054$; 表2)。

2.5 端粒长度与临床指标进行相关性检验

病例组患者端粒长度与年龄无显著相关性($r=-0.114$, $P=0.162$), 对照组受试者端粒长度与年龄呈负相关($r=-0.234$, $P=0.004$); 在病例组中患者端粒长度和Hcy呈负相关($r=-0.176$, $P=0.03$), 主要在女性中表现的更加明显($r=-0.375$, $P=0.024$; 图2), 余指标均未发现与端粒长度具有相关性。

表2 PON1基因甲基化与端粒长度及临床指标相关性分析

Table 2 Correlation Analysis of methylation of PON1 gene with telomere length and clinical index

组别	端粒长度	年龄/岁	Hcy/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	GLU/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
病例组					
<i>P</i>	0.775	0.0002	0.209	0.655	0.076
<i>r</i>	0.023	0.299	0.103	-0.037	-0.144
对照组					
<i>P</i>	0.054	0.0001	0.224	0.005	0.355
<i>r</i>	-0.157	0.437	0.118	0.23	-0.077
组别	TC/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	HDL/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	LDL/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CRP/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
病例组					
<i>P</i>	0.014	0.009	0.168	0.092	
<i>r</i>	-0.199	-0.212	0.112	0.138	
对照组					
<i>P</i>	0.352	0.372	0.35	0.082	
<i>r</i>	0.077	0.074	0.078	0.149	

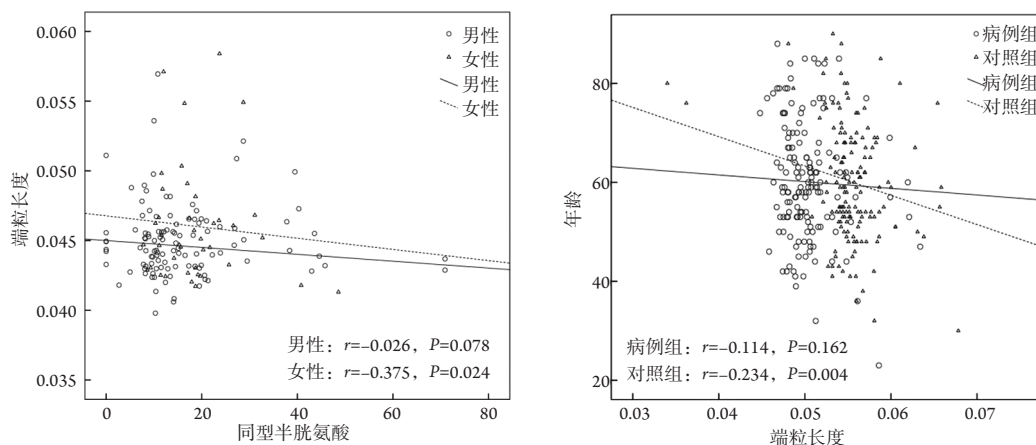


图2 端粒长度与临床指标相关性分析

Figure 2 Correlation analysis of telomere length and clinical indexes

3 讨论

基因启动子区的DNA甲基化作为表观遗传修饰的重要途径,是基因表达调控的有力机制,而高甲基化会阻碍聚合酶与DNA结合的能力从而影响基因的表达^[20]。PON1的含量是脑梗死的一个敏感指标,PON1可以通过延缓动脉粥样硬化进展来降低脑卒中的风险,在脑卒中发病时还可以作为抗炎和抗氧化保护剂来保护受损的脑组织^[21]。前文提到Gómez-Uriz等^[13]的研究发现PON1甲基化与脑梗死无关,但本研究发现病例组PON1基因启动子区甲基化水平明显高于对照组,考虑与其研究的样本量过小有关,本研究发现甲基化差异在男性中表现的更明显。研究^[22]发现:男性PON1-HDL结合的稳定性与转运效率比女性低,导致雄性大鼠对于PON1的mRNA表达的下降比雌性更为敏感。笔者认为PON1的甲基化调控可能同样对男性更加敏感,PON1基因启动子区高甲基化可能降低了PON1的功能表达,导致在脑缺血发生时PON1在血液中的浓度降低,从而降低了神经保护作用。

本研究两组一般生化资料结果均与目前认知和既往研究^[23-24]相符。而PON1与一些异常的临床表型具有相关性,PON1是与HDL相关的一种酯酶,对胰岛素的调节和脂类代谢有重要作用^[25-26]。本研究发现PON1的甲基化与GLU,TC,HDL具有关联性,因此认为PON1的甲基化异常可能通过调节脂类和葡萄糖的代谢而影响了脑梗死的患病风险,这也与文献^[13]所叙述的PON1甲基化水平异常与脂肪构成和膳食指标摄入量有关相对应。进一步分析发现,PON1受试者的年龄呈正相关,目前基因甲基化与衰老的相关性研究^[27-29]也有很多,在外周血和人体组织中均发现了与随年龄增加而出现的特异性甲基化,本研究也为此提供了一个新的线索:衰老是PON1甲基化增高的一个独立影响因素。

端粒长度变短作为人体衰老的一种标志已经被认可^[30],随着血管内皮细胞及其他因素的老化会造成动脉粥样硬化的形成^[31]。本研究在对照组中发现,受试者的端粒长度与年龄呈显著负相关,这也与目前的研究^[30]结论相符。病例组中患者端粒长度与年龄也有预期的趋势,但差异没有统计学意义,考虑到脑梗患者大多长期服用他汀类药物,可能对延缓端粒长度缩短有一定的影响;尽管如此,病例组和对照组中的差异仍然很

显著,这与性别无关。研究^[32]认为:端粒长度与遗传因素有关,个体出生时的端粒相对长度不同会导致个体未来患心血管风险的差异。在国外不同性别人群的一些研究^[33-34]显示:相对端粒长度与脑梗死发病无关,而在中国华中和华东地区的研究^[35-36]认为端粒长度变短是脑梗死后死亡的危险因素。然而相反的是,在中国海南地区人群的研究^[37]发现较长的端粒长度水平与脑梗死相关,考虑与种族差异和地理环境的影响有关。本研究表明中国山东地区汉族端粒长度变短与脑梗死发病具有相关性。

较短的端粒长度可能通过影响多种因素而共同增加了脑梗死的发病风险。在心脑血管疾病中Hcy的升高被认为是一个危险因素,而Hcy的升高在加速生物老化方面同样发挥作用^[38]。本研究发现在女性脑梗死患者中,端粒长度与Hcy呈负相关,较短的端粒长度的个体Hcy更容易升高,从而增加了患心脑血管疾病的风险,考虑女性Hcy受到对端粒长度的影响更加敏感,可能与性别染色体差异及男女激素水平的差异等因素相关,具体机制仍需进一步研究。

近年来发现DNA甲基化与端粒长度之间存在一定的联系。有学者^[39]在小鼠研究中观察到DNA甲基转移酶缺陷细胞中的端粒长度明显增加,推测DNA甲基化在维持端粒完整性方面具有重要的作用。随着端粒的缩短,亚端粒区许多基因启动子的甲基化水平会发生变化,从而导致基因表达的改变,这增加了患衰老相关疾病的风险^[40]。目前已经发现在帕金森和阿尔茨海默病患者中端粒长度磨损与亚端粒甲基化状态相关^[41-42],推测脑梗死中可能也存在此种机制,但遗憾的是本研究中并没有发现PON1的甲基化水平与端粒长度存在相关性,未来仍需进一步去筛查与端粒长度相关的基因甲基化。

本研究仍存在一些局限性:样本收集均在同一个地区,且均为中国汉族人群,收集的样本量较小,没有同时进行mRNA或蛋白表达检测来验证。仍需进行大样本研究来重复实验及进行前瞻性实验才能全面地了解基因甲基化水平和端粒长度与脑梗死的关系。

综上,本研究发现PON1启动子区高甲基化和端粒长度变短是中国山东地区汉族人群脑梗死发病的危险因素,而且PON1甲基化水平异常可能是通过调节脂类和葡萄糖代谢来影响脑梗死的发病风险,而较短的端粒长度影响血Hcy的调节,以上

发现对未来早期筛查和诊断脑梗死, 以及脑梗死预后的治疗提供一些新的理论思路。

参考文献

1. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2014, 383(9913): 245-254.
2. Yang G, Wang Y, Zeng Y, et al. Rapid health transition in China, 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2013, 381(9882): 1987-2015.
3. Soriano-Tárraga C, Jiménez-Conde J, Giral-Steinhauer E, et al. Global DNA methylation of ischemic stroke subtypes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e96543.
4. Krupinski J, Carrera C, Muino E, et al. DNA methylation in stroke. update of latest advances[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2017, 16: 1-5.
5. Hu Z, Zhong B, Tan J, et al. The Emerging Role of Epigenetics in Cerebral Ischemia[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(3): 1887-1905.
6. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans[J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2011, 21(2): 122-130.
7. Précourt LP, Amre D, Denis MC, et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1): 20-36.
8. Singh K, Singh R, Chandra S, et al. Paraoxonase-1 is a better indicator than HDL of Atherosclerosis - a pilot study in North Indian population[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(3): 275-278.
9. Borovkova EI, Antipova NV, Komeenko TV, et al. Paraoxonase: the universal factor of antioxidant defense in human body[J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2017, 72(1): 5-10.
10. Osawa K, Trejo MEP, Nakanishi R, et al. Coronary artery calcium and carotid artery intima-media thickness for the prediction of stroke and benefit from statins[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2018, 25(18): 1980-1987.
11. Zhang G, Li W, Li Z, et al. Association between paraoxonase gene and stroke in the Han Chinese population[J]. *BMC Med Genet*, 2013, 14: 16.
12. Lei HP, Yu XY, Wu H, et al. Effects of PON1 gene promoter DNA methylation and genetic variations on the clinical outcomes of dual antiplatelet therapy for patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, 57(7): 817-829.
13. Gómez-Uriz AM, Goyenechea E, Campión J, et al. Epigenetic patterns of two gene promoters (TNF-alpha and PON) in stroke considering obesity condition and dietary intake[J]. *J Physiol Biochem*, 2014, 70(2): 603-614.
14. Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 247.
15. Chen S, Lin J, Matsuguchi T, et al. Short leukocyte telomere length predicts incidence and progression of carotid atherosclerosis in American Indians: the Strong Heart Family Study[J]. *Aging*, 2014, 6(5): 414-427.
16. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells[J]. *Circulation*, 2004, 110(19): 3136-3142.
17. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length[J]. *Arch Intern Med*, 2008, 168(2): 154-158.
18. 中华神经科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6): 379-380.
Chinese Society of Neuroscience. Diagnostic essentials of various cerebrovascular diseases[J]. *Chinese Journal of Neurology*, 1996, 29(6): 379-380.
19. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): e47.
20. Simon RP. Epigenetic modulation of gene expression governs the brain's response to injury[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 625: 16-19.
21. Zhu H, Zhao T, Liu J. Role of paraoxonase 1 activity and oxidative/antioxidative stress markers in patients with acute cerebral infarction[J]. *Clin Lab*, 2018, 64(6): 1049-1053.
22. Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, et al. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved[J]. *Mol Med*, 2007, 13(3/4): 203-209.
23. Zhang Y, Tuomilehto J, Jousilahti P, et al. Total and high-density lipoprotein cholesterol and stroke risk[J]. *Stroke*, 2012, 43(7): 1768-1774.
24. Reina SA, Llabre MM, Allison MA, et al. HDL cholesterol and stroke risk: the multi-ethnic study of atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(1): 314-319.
25. Sumi A, Nakamura U, Iwase M, et al. The gene-treatment interaction of paraoxonase-1 gene polymorphism and statin therapy on insulin secretion in Japanese patients with type 2 diabetes: fukuoka diabetes registry[J]. *BMC Med Genet*, 2017, 18(1): 146.
26. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, et al. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases[J]. *Biochimie*, 2017, 132: 19-27.
27. Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, et al. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue[J]. *Genome Biol*, 2012, 13(10): R97.
28. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(8): e1000602.

29. Ling C, Poulsen P, Simonsson S, et al. Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component *NDUFB6* in human skeletal muscle[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3427-3435.
30. Rizvi S, Raza ST, Mahdi F. Telomere length variations in aging and age-related diseases[J]. *Curr Aging Sci*, 2014, 7(3): 161-167.
31. De Meyer T, Nawrot T, Bekaert S, et al. Telomere length as cardiovascular aging biomarker: JACC review topic of the week[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(7): 805-813.
32. Matthews C, Gorenne I, Scott S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress[J]. *Circ Res*, 2006, 99(2): 156-164.
33. Schürks M, Prescott J, Dushkes R, et al. Telomere length and ischaemic stroke in women: a nested case-control study[J]. *Eur J Neurol*, 2013, 20(7): 1068-1074.
34. Zee RY, Castonguay AJ, Barton NS, et al. Relative leukocyte telomere length and risk of incident ischemic stroke in men: a prospective, nested case-control approach[J]. *Rejuvenation Res*, 2010, 13(4): 411-414.
35. Ding H, Chen C, Shaffer JR, et al. Telomere length and risk of stroke in Chinese[J]. *Stroke*, 2012, 43(3): 658-663.
36. Zhang W, Chen Y, Wang Y, et al. Short telomere length in blood leukocytes contributes to the presence of atherothrombotic stroke and haemorrhagic stroke and risk of post-stroke death[J]. *Clin Sci*, 2013, 125(1): 27-36.
37. Luo D, Hou Q, Yu J, et al. Telomere length associated with the risks of high-risk and ischemic stroke in southern Chinese Han population[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105915-105922.
38. Shin C, Baik I. Leukocyte telomere length is associated with serum vitamin B12 and homocysteine levels in older adults with the presence of systemic inflammation[J]. *Clin Nutr Res*, 2016, 5(1): 7-14.
39. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(4): 416-424.
40. Buxton JL, Suderman M, Pappas JJ, et al. Human leukocyte telomere length is associated with DNA methylation levels in multiple subtelomeric and imprinted loci[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4954.
41. Guan JZ, Guan WP, Maeda T, et al. Analysis of telomere length and subtelomeric methylation of circulating leukocytes in women with Alzheimer's disease[J]. *Aging Clin Exp Res*, 2013, 25(1): 17-23.
42. Maeda T, Guan JZ, Oyama J, et al. Aging-associated alteration of subtelomeric methylation in Parkinson's disease[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009, 64(9): 949-955.

本文引用: 肖健豪, 袁倩, 张斯淼, 李晓东, 段世伟, 王运良. 外周血 *PON1* 基因高甲基化、端粒长度变短与脑梗死发病相关[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(5): 1002-1009. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.015

Cite this article as: XIAO Jianhao, YUAN Qian, ZHANG Simiao, LI Xiaodong, DUAN Shiwei, WANG Yunliang. Hypermethylation of *PON1* gene and shortening of telomere length in peripheral blood are associated with cerebral infarction[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(5): 1002-1009. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.015