

# *MKL1* 基因多态性与高原环境适应性的遗传关联研究

张晴<sup>1</sup>, 平杰<sup>2</sup>, 张昊翔<sup>3</sup>, 康波<sup>3</sup>, 李元丰<sup>2</sup>, 周钢桥<sup>1,2,4</sup>

1. 南京医科大学公共卫生学院流行病学系, 南京 211166
2. 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102206
3. 中国人民解放军陆军第 954 医院, 山南 856100
4. 南京医科大学全球健康中心, 南京 211166

**摘要:**高原环境适应性与遗传因素密切相关, 已有多个基因被报道与高原环境适应性显著相关。巨核细胞白血病因子 1(megakaryoblastic leukemia 1, *MKL1*)是一种转录调节因子, 在平滑肌细胞的表型调变中发挥重要作用。为探讨 *MKL1* 基因是否与高原环境适应性相关, 本研究进行了 *MKL1* 基因多态性与高原环境适应性的遗传关联分析。本研究招募了世居青藏高原的藏族人群( $n = 595$ )和世居平原地区的汉族人群( $n = 442$ ), 并采用 MassARRAY 阵列图谱技术对 *MKL1* 基因的多态性位点 rs59098711 进行基因分型, 比较了其基因型及等位基因型在两组人群中的分布是否存在显著差异。结果发现, 在藏、汉两组人群间 rs59098711 位点的基因型和等位基因型频率存在显著差异( $P < 0.05$ )。进一步通过与公共数据库比较发现, 藏族人群中 rs59098711 的基因型及等位基因型的频率分布与其他人种存在显著差异( $P < 0.05$ )。生物信息学分析表明, rs59098711 位点位于 *MKL1* 基因增强子区域, 与 *MKL1* 基因表达的调控密切相关。同时, 基于公共数据集进行的基因差异表达分析发现, *MKL1* 基因在低压性缺氧环境中显著上调。以上研究结果表明, *MKL1* 基因的多态性位点 rs59098711 与人类的高原适应能力存在相关性。

**关键词:** 高原环境适应性; *MKL1*; 单核苷酸多态性

收稿日期: 2019-02-25; 修回日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(编号: 81730055)和中国科协青年人才托举工程项目(编号: QNRC001)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81730055) and the Young Talent Cultivation Project of China (No. QNRC001)]

作者简介: 张晴, 硕士研究生, 专业方向: 流行病与卫生统计学。E-mail: zhangqingah@163.com

平杰, 博士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: pingjie46@126.com

张晴和平杰并列第一作者。

通讯作者: 李元丰, 博士, 助理研究员, 研究方向: 医学遗传与基因组学。E-mail: liyf\_snp@163.com

周钢桥, 博士, 研究员, 研究方向: 医学遗传与基因组学。E-mail: zhougq114@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-049

网络出版时间: 2019/5/17 10:48:14

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190517.1047.002.html>

# Genetic association of *MKL1* gene polymorphisms with the high-altitude adaptation

Qing Zhang<sup>1</sup>, Jie Ping<sup>2</sup>, Haoxiang Zhang<sup>3</sup>, Bo Kang<sup>3</sup>, Yuanfeng Li<sup>2</sup>, Gangqiao Zhou<sup>1,2,4</sup>

1. Department of Epidemiology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

2. State Key Laboratory of Proteomics, National Center for Protein Sciences at Beijing, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 1002206, China

3. The No.954 Hospital of PLA, Shannan 856100, China

4. Center for Global Health, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**Abstract:** Genetic factors are closely related to the high-altitude adaptation. Several candidate genes have been reported to be significantly associated with high-altitude adaptation. Megakaryocytic leukemia 1 (*MKL1*) is a transcriptional regulator, which plays crucial roles in the phenotypic modulation of smooth muscle cells. To explore whether *MKL1* gene is involved in high-altitude adaptation, we performed genetic association study between *MKL1* gene polymorphisms and high-altitude adaptation. We recruited 595 Tibetans from the Qinghai-Tibet plateau and 442 Hans living at low altitude. The SNP rs59098711 locus in the *MKL1* gene was genotyped using the MassARRAY assays. We compared the genotypes and allele frequency distributions of rs59098711 between the Hans and Tibetans. The results showed that the genotypes of rs59098711 are significantly different between these two populations ( $P < 0.05$ ). We further compared the genotypes of rs59098711 between Tibetans and other ethnic groups using data from various public databases. We also observed that the genotypes of rs59098711 are significantly different between Tibetans and these other populations ( $P < 0.05$ ). Bioinformatics analyses suggested that rs59098711 could be located at the enhancer region and regulate the expression of the *MKL1* gene. Additional study of gene expression data from available public datasets showed that *MKL1* gene was up-regulated in a hypobaric hypoxic environment. Our results suggested that the genetic polymorphism rs59098711 locus of the *MKL1* gene is associated with high-altitude adaptation.

**Keywords:** high-altitude adaptation; *MKL1*; single nucleotide polymorphism

青藏高原是世界上海拔最高的高原,高原低氧性缺氧是生活在该地区的人们面临的主要健康问题<sup>[1]</sup>。在海拔超过 3000 m 时,氧分压只有海平面的 70%;当海拔达到 5000 m 时,氧分压只有海平面的 50%<sup>[2]</sup>。人体对氧气供应的调节能力是影响人类高原适应性的重要因素<sup>[3]</sup>。世居平原的个体进入高原后,人体为应对低氧环境,会增加心输出量(单位时间内心脏左心室或右心室泵出的血液量)、加速血红蛋白及红细胞的生成,并加强肺血管的收缩作用,导致血液黏稠、肺动脉压升高,从而极易诱发急、慢性高原病<sup>[4,5]</sup>。相较于低海拔地区人群,藏族人群在高原经过了长期的自然选择,具有静息通气量增加、低氧诱导的肺血管收缩反应减弱、血氧饱和度

升高及血红蛋白水平降低等一系列性状,表现出较好地适应高原低氧环境的能力<sup>[4,5]</sup>。

藏族人群的高原适应性具有明显的遗传学基础。有研究显示,高原病的发生具有显著的种族差异性,汉族等低海拔地区人群的高原病发生率显著高于世居高原的藏族人群<sup>[6-9]</sup>。此外,与高原适应性相关的多种性状,如静息通气量等,均被发现与遗传因素密切相关<sup>[3,10-12]</sup>。至今,基于基因组学技术,研究人员已发现多个基因(如 *EPAS1*、*EGLN1* 和 *PPARA* 等)与藏族人群的高原低氧适应性密切相关<sup>[13-15]</sup>。然而,这些基因尚不能完全解释高原适应性的遗传学基础,更多的高原适应性相关基因仍有待被发现。

巨核细胞白血病因子 1(megakaryocytic leukemia

1, MKL1), 又被称为心肌蛋白相关转录因子 A (myocardin related transcription factor A, MRTF-A), 是由 *MKL1* 基因编码的蛋白质, 属于转录调节因子家族, 参与平滑肌细胞的表型调变<sup>[16,17]</sup>。近年来研究发现, MKL1 作为一种应激蛋白, 可调节细胞对外界刺激信号的反应性<sup>[18,19]</sup>。体外细胞学和小鼠在体实验等研究表明, 在低氧环境下, MKL1 表达增加, 可上调 ICAM-1 等细胞黏附因子的转录水平, 从而影响小鼠肺组织炎症细胞的聚集及肺血管炎症反应, 进而引发低氧性肺动脉高压<sup>[20]</sup>。在上调 *ICAM-1* 基因转录水平的同时, MKL1 还可下调内皮型一氧化氮合酶基因(eNOS)的转录水平<sup>[21]</sup>。eNOS 编码内皮型一氧化氮合酶(eNOS), 在调节血管紧张度方面发挥重要作用<sup>[22]</sup>。多项研究已报道, eNOS 与高原适应性及高原病的发生存在显著的遗传学关联<sup>[23~28]</sup>。此外, MKL1 还参与内皮素(ET-1)在人类血管内皮细胞中的转录激活<sup>[29]</sup>。ET-1 作为一种强效的血管收缩剂, 与肺动脉高压的发生密切相关<sup>[30~33]</sup>。因此推测, MKL1 可能与高原低氧适应性相关。

为进一步探讨 *MKL1* 与高原适应性的关系, 本研究基于 595 名藏族个体和 442 名汉族个体, 分型检测了 *MKL1* 基因上的功能性单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)rs59098711。研究发现, 该 SNP 位点在世居高原地区的藏族人群与世居平原地区的汉族人群之间存在显著的分布差异, 提示 *MKL1* 基因可能与藏族人群对高原低氧环境的适应能力有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究招募了 595 名藏族个体, 其平均年龄为  $40.08 \pm 14.82$  岁, 世居海拔超过 3500 m 的青藏高原地区。还招募了 442 名汉族个体, 其平均年龄为  $30.42 \pm 12.76$  岁, 世居海拔低于 200 m 的平原地区。所有研究对象均签署了知情同意书。

### 1.2 样本采集及 DNA 提取

采用 EDTK-K2 抗凝管采集肘静脉全血 5 mL,

离心后分离全血和血浆, 储存至  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存。采用 Sangon 公司(上海)的基因组 DNA 提取试剂盒进行全血 DNA 的提取。具体步骤如下: 在 300  $\mu\text{L}$  抗凝全血中加入 600  $\mu\text{L}$  缓冲液 TBP, 充分混匀, 室温放置 1 min 至红细胞完全裂解, 8000 r/min 离心 1 min, 弃上清。加入 180  $\mu\text{L}$  裂解液和 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 溶液, 振荡混匀, 加入 60  $\mu\text{L}$  缓冲液 PR 充分颠倒混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 5 min。室温条件下多次离心后弃去上清。重复乙醇漂洗。50  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解 DNA, 检测其浓度后, 标准化至 20~50 ng/ $\mu\text{L}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 SNP 的选择

基于千人基因组计划数据库(1000 Genomes Project)中东亚人群的基因型数据, 寻找位于 *MKL1* 基因上(Chr.22:40806292~41032690, 人类基因组第 19 版本 hg19)的常见 SNP 位点(最小等位基因频率 > 0.05)。在 *MKL1* 基因内共有 283 个常见 SNP 位点。采用 Haploview 4.2 软件挑选标签 SNPs。利用 HaploReg 在线工具(V4.1, <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>)和 GTEx 数据库(V7, <https://gtexportal.org/>)对标签 SNPs 进行注释, 根据注释信息选择候选位点。

### 1.4 SNP 分型

采用 Array Designer 软件设计 PCR 扩增及延伸引物。rs59098711 上游引物序列为 5'-ACGTTGGA-TGACACAGGGAGACCCCGTTT-3', 下游引物序列为 5'-ACGTTGGATGTCAGCTTCCGGAGCAGCTA-3', 引物由北京华大基因科技股份有限公司合成。采用 Agena 公司(美国)MassARRAY SNP 分型检测方法, 经过多重 PCR 技术、MassARRAYiPLEX 单碱基延伸技术和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, MALDI-TOF)对 rs59098711 位点进行分型检测。最后使用 Typer 4.0 软件对检测结果进行分析, 从而获得 rs59098711 的分型数据。

### 1.5 统计学方法

采用 R 3.4.4 软件进行数据分析, Hardy-Weinberg

(H-W)平衡检验、组间基因型及等位基因型频率分布的比较采用卡方( $\chi^2$ )检验。组间基因表达水平的比较采用两独立样本  $t$  检验。以  $\alpha = 0.05$  作为检验水准。使用 Plink 1.9 软件计算 SNP 位点的遗传分化系数 ( $F_{ST}$ )。

2 结果与分析

2.1 候选位点的选择

在 *MKL1* 基因全长内共找到 283 个常见 SNP 位点。使用 Haploview 4.2 软件,挑选出 10 个标签 SNPs(图 1)。利用 HaploReg 4.1 在线工具发现,所有的标签 SNPs 均位于 *MKL1* 基因的内含子区。其中, *MKL1* 基因第 3 号内含子上的 1 个标签 SNP rs59098711

(Chr.22:40877004, hg19)位于血管内皮细胞(人脐静脉内皮细胞, human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)基因组的增强子区域(图 1)。查询 GTEx 数据库(V7, <https://gtexportal.org/>)发现, rs59098711 与 *MKL1* 基因的表达水平显著相关(false discovery rate, FDR<0.05)。因此,本研究选择 rs59098711 作为候选位点,进行后续的遗传关联分析。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

本研究使用 MassARRAY 阵列图谱技术,在藏族人群( $n=595$ )和汉族人群( $n=442$ )中对 rs59098711 位点进行了分型,所有个体均分型成功。在两组人群中该位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P>0.05$ ),说明群体基因遗传平衡,样本抽样无明显偏差(表 1)。

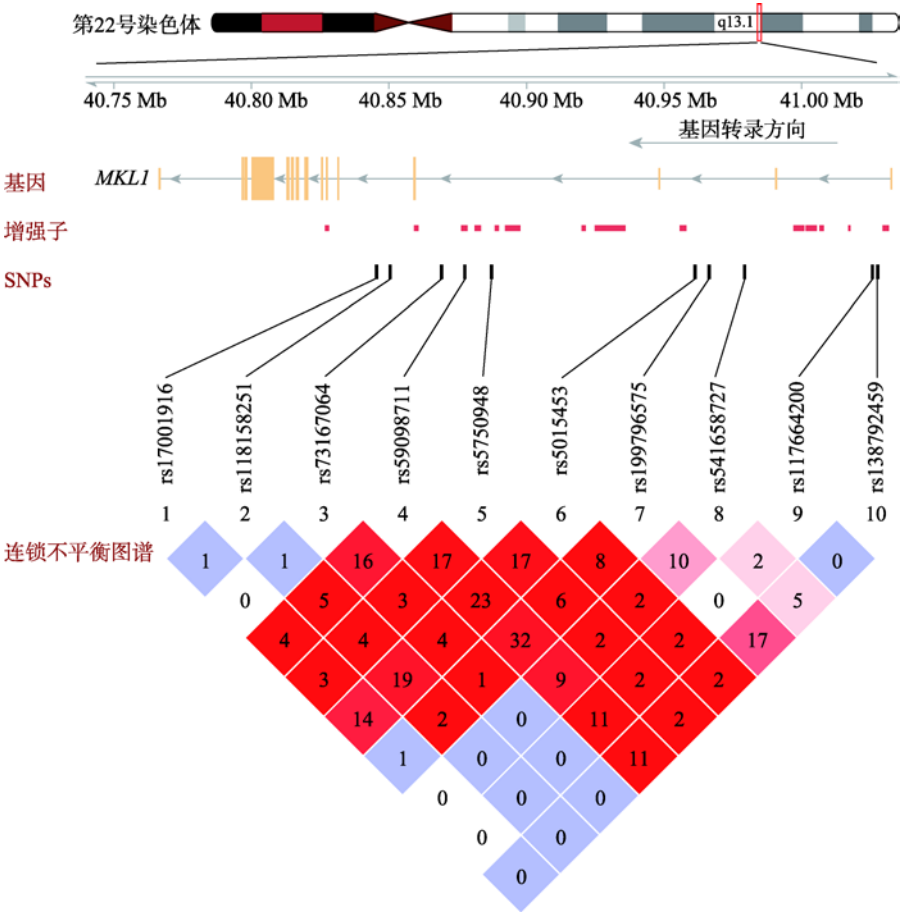


图 1 *MKL1* 基因区域的标签 SNPs

Fig. 1 The tag SNPs at *MKL1* locus

增强子信息来源于“人类表观基因组计划”(Roadmap Epigenomics Project)中人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的染色质数据。连锁不平衡图谱中的数字等于  $100 \times r^2$ , 颜色越红代表  $D'$  值越大, 越蓝代表  $D'$  值越小。

表 1 rs59098711 位点 Hardy-Weinberg 平衡检验  
Table 1 Hardy-Weinberg equilibrium test for rs59098711

rs59098711	藏族人群				汉族人群			
	观察数	理论数	$\chi^2$	<i>P</i>	观察数	理论数	$\chi^2$	<i>P</i>
TT	105	90.08	3.29	0.19	168	171.11	0.20	0.91
TC	253	282.86			214	207.80		
CC	237	222.05			60	63.09		

2.3 在藏族与汉族人群间 rs59098711 位点基因型频率的比较

在藏族和汉族人群间，rs59098711 位点的基因型和等位基因型频率分布存在显著差异，在藏族人群中基因型 CC 和等位基因 C 的频率显著高于汉族人群( $P<0.05$ ；表 2)。根据藏族与汉族人群的基因型频率数据，计算得到 rs59098711 的  $F_{ST}$  值为 0.10，远高于已报道的藏、汉人群间全基因组的平均  $F_{ST}$  值(0.012)<sup>[34]</sup>，提示在藏族人群和汉族人群之间 rs59098711 位点存在遗传分化现象。

2.4 在藏族人群与其他种群间 rs59098711 位点基因型频率的比较

将藏族人群中 rs59098711 的基因型及等位基因型的频率分布，分别与千人基因组计划数据库(1000 Genomes Project)中来自东亚、南亚、欧洲、美洲和非洲的 5 个人群进行比较，结果发现，藏族人群中 rs59098711 的基因型及等位基因型的频率分布与 5 个人群均存在显著差异，在藏族人群中基因型 CC 和等位基因 C 的频率显著高于其他 5 个人群(表 3)。为进一步验证上述结果，将藏族人群与 gnomAD (Genome Aggregation Database)数据库中的 5 个人群也进行了比较，发现了与千人基因组计划数据库相

比较的类似的结果(表 4)。以上结果表明，rs59098711 位点的基因型和等位基因型的频率分布在不同种族之间存在显著差异。

2.5 rs59098711 位点变异影响 MKL1 的表达

SNP 位点 rs59098711 位于 *MKL1* 基因的内含子区，不能改变 MKL1 蛋白的氨基酸序列。然而，非编码区的变异可通过调控基因的表达水平而发挥生物学功能<sup>[35]</sup>。本研究采用 HaploReg 注释，发现在肺组织和人脐静脉内皮细胞中 rs59098711 位点位于增强子区域，提示其具有调节肺血管基因表达水平的功能。进一步查询 3DIV 数据库(<https://www.kobic.kr/3div/>)发现，在肺组织和血管内皮细胞中，rs59098711 位点所在区域与 *MKL1* 基因的启动子区存在染色质相互作用(表 5)。为进一步验证 rs59098711 是否能够调节 *MKL1* 基因的表达，基于 GTEx 数据库，查看了 rs59098711 基因型是否与 *MKL1* 基因的表达水平相关。结果发现，在脑组织中，rs59098711 基因型与 *MKL1* 基因的表达水平存在显著关联( $P=3.2\times10^{-5}$ )。其中，C 等位基因与较低的 *MKL1* 表达水平相关。以上结果提示，rs59098711 位于基因组调控区，可能在 *MKL1* 的转录过程中发挥调控作用，从而影响 *MKL1* 的表达水平，最终影响个体对高原缺氧环境的适应能力。

表 2 在藏族和汉族人群中 rs59098711 位点的基因型和等位基因型频率分布  
Table 2 Distributions of the genotypes and alleles frequencies of rs59098711 in Tibetans and Hans population

	基因型			等位基因型	
	CC	TC	TT	C	T
藏族[例(%)]	237(39.83)	253(42.52)	105(17.65)	727(61.09)	463(38.91)
汉族[例(%)]	60(13.57)	214(48.42)	168(38.01)	334(37.78)	550(62.22)
OR(95% CI)		3.34(2.40~4.66)	6.32(4.40~9.08)		2.59(2.16~3.09)
$\chi^2$		50.71	99.56		109.36
<i>P</i>		$1.07\times10^{-12}$	$1.90\times10^{-23}$		$1.35\times10^{-25}$

表 3 在藏族和千人基因组计划的 5 个人群中 rs59098711 位点的基因型和等位基因型的频率分布

Table 3 Distributions of the genotypes and alleles frequencies of rs59098711 in Tibetans and five populations from 1000 Genomes Project

	基因型			等位基因型	
	CC	TC	TT	C	T
藏族[例(%)]	237(39.83)	253(42.52)	105(17.65)	727(61.09)	463(38.91)
东亚[例(%)]	48(9.52)	229(45.44)	227(45.04)	325(32.24)	683(67.76)
南亚[例(%)]	36(7.36)	177(36.20)	276(56.44)	249(25.46)	729(74.54)
欧洲[例(%)]	24(4.77)	151(30.02)	328(65.21)	199(19.78)	807(80.22)
美洲[例(%)]	6(1.73)	74(21.32)	267(76.95)	86(12.39)	608(87.61)
非洲[例(%)]	46(6.96)	282(42.66)	333(50.38)	374(28.29)	948(71.71)
藏族 vs. 东亚					
OR(95% CI)		4.47(3.16~6.32)	10.67(7.42~15.36)		3.30(2.77~3.93)
$\chi^2$		71.69	162.76		180.87
<i>P</i>		$2.52 \times 10^{-17}$	$2.83 \times 10^{-37}$		$3.12 \times 10^{-41}$
藏族 vs. 南亚					
OR(95% CI)		4.60(3.13~6.77)	17.30(11.89~25.19)		4.60(3.83~5.51)
$\chi^2$		60.57	221.46		273.93
<i>P</i>		$7.11 \times 10^{-15}$	$4.34 \times 10^{-50}$		$1.58 \times 10^{-61}$
藏族 vs. 欧洲					
OR(95% CI)		5.89(3.81~9.12)	30.84(20.73~45.90)		6.37(5.29~7.67)
$\chi^2$		63.5	285.93		379.81
<i>P</i>		$1.61 \times 10^{-15}$	$3.82 \times 10^{-64}$		$1.37 \times 10^{-84}$
藏族 vs. 美洲					
OR(95% CI)		11.55(5.66~23.56)	100.44(58.72~171.82)		11.10(8.82~13.97)
$\chi^2$		45.31	283.20		421.83
<i>P</i>		$1.68 \times 10^{-11}$	$1.51 \times 10^{-63}$		$9.75 \times 10^{-94}$
藏族 vs. 非洲					
OR(95% CI)		5.74(4.08~8.08)	16.34(11.51~23.20)		3.98(3.38~4.69)
$\chi^2$		100.90	243.95		272.37
<i>P</i>		$9.67 \times 10^{-24}$	$5.41 \times 10^{-55}$		$3.45 \times 10^{-61}$

表 4 在藏族和 gnomAD 数据库的 5 个人群中 rs59098711 位点的基因型和等位基因型的频率分布

Table 4 Distributions of the genotypes and alleles frequencies of rs59098711 in Tibetan population and five populations from gnomAD

	基因型			等位基因型	
	CC	TC	TT	C	T
藏族[例(%)]	237(39.83)	253(42.52)	105(17.65)	727(61.09)	463(38.91)
东亚[例(%)]	79(10.17)	356(45.82)	342(44.01)	514(33.08)	1040(66.92)
欧洲[例(%)]	526(5.60)	3185(33.88)	5689(60.52)	4237(22.54)	14563(77.46)
非洲[例(%)]	230(5.32)	1,592(36.86)	2498(57.82)	2052(23.75)	6588(76.25)
拉丁美洲[例(%)]	7(1.66)	110(26.13)	304(72.21)	124(14.73)	718(85.27)
德系犹太人[例(%)]	11(7.59)	48(33.10)	86(59.31)	70(24.14)	220(75.86)



续表 4

	基因型			等位基因型	
	CC	TC	TT	C	T
藏族 vs.东亚					
OR(95% CI)		4.22(3.15~5.66)	9.77(7.10~13.44)		3.18(2.72~3.71)
$\chi^2$		92.14	196.53		212.41
P		8.07×10 <sup>-22</sup>	1.19×10 <sup>-44</sup>		4.09×10 <sup>-48</sup>
藏族 vs.欧洲					
OR(95% CI)		5.67(4.71~6.82)	24.41(20.31~29.34)		5.40(4.83~6.03)
$\chi^2$		338.18	1160.80		889.20
P		1.59×10 <sup>-75</sup>	1.99×10 <sup>-254</sup>		2.18×10 <sup>-195</sup>
藏族 vs.非洲					
OR(95% CI)		6.48(5.25~8.00)	24.51(19.82~30.33)		5.04(4.48~5.67)
$\chi^2$		303.86	868.23		717.41
P		4.76×10 <sup>-68</sup>	7.93×10 <sup>-191</sup>		4.90×10 <sup>-158</sup>
藏族 vs.拉丁美洲					
OR(95% CI)		14.72(7.80~27.79)	98.02(58.84~163.31)		9.09(7.39~11.19)
$\chi^2$		68.83	310.00		433.60
P		1.07×10 <sup>-16</sup>	2.18×10 <sup>-69</sup>		2.67×10 <sup>-96</sup>
藏族 vs.德系犹太人					
OR(95% CI)		4.09(2.12~7.89)	17.65(10.08~30.89)		4.93(3.74~6.52)
$\chi^2$		17.6	100.93		126.65
P		2.72×10 <sup>-5</sup>	9.52×10 <sup>-24</sup>		2.22×10 <sup>-29</sup>

表 5 rs59098711 与 *MKLI* 基因的启动子区存在染色质相互作用

Table 5 Chromatin interactions between rs59098711 and promoter region of *MKLI*

SNP	样本组织类型	相互作用片段的基因组位置(bp)	基因*
rs59098711	Lung	Chr.22:41030000~41035000	<i>MKLI</i>
	HMEC	Chr.22:41030000~41035000	<i>MKLI</i>
	HUVEC	Chr.22:41030000~41035000	<i>MKLI</i>

Lung：肺组织；HMEC：人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell)；HUVEC：人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell)。\*：启动子区与 rs59098711 存在相互作用的基因。

2.6 低压性缺氧环境下 *MKLI* 表达显著上调

基于基因表达公共数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)的数据集(GSE87602)<sup>[36]</sup>进行分析发现，与对照组( $n=2$ )相比，在低压性缺氧环境中培养 14 天的小鼠( $n=3$ )，其肺泡巨噬细胞中 *MKLI* 的表达水平显著增加，表达差异倍数(fold change, FC)为 1.5 倍， $P=0.027$ (图 2A)。此外，进一步对进入高原环境前后人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PMBCs)的表达数据集(GSE103927)<sup>[37]</sup>进

行分析。结果显示，与在平原环境中的样本相比( $n=21$ )，进入高原环境后( $n=13$ )，人外周血单核细胞中 *MKLI* 的表达水平显著增加( $FC=1.2$ ,  $P<0.0001$ ；图 2B)。以上结果提示，*MKLI* 可能在适应高原低氧环境的过程中发挥作用。

3 讨论

本研究通过比较藏族与汉族人群中 *MKLI* 基因的功能性位点 rs59098711 的基因型和等位基因型频

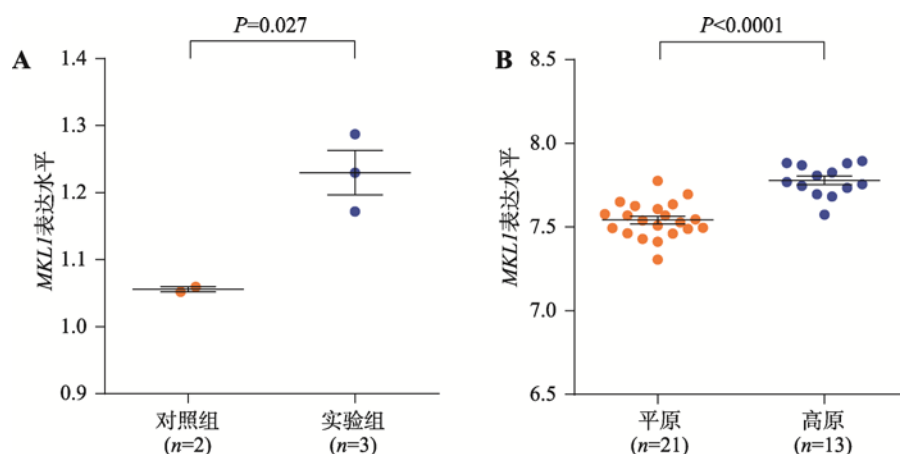


图2 低压性缺氧环境下 *MKLI* 的表达水平上调

**Fig. 2 *MKLI* expression is up-regulated by hypobaric hypoxia**

A: 低压性缺氧环境下小鼠肺泡巨噬细胞中 *MKLI* 的表达水平显著增加。对照组( $n=2$ )为常氧条件下培养的小鼠, 实验组( $n=3$ )为在低压性缺氧环境(模拟高原低氧环境)下培养的小鼠。各自培养 14 天后, 测量并比较两组小鼠肺泡巨噬细胞中基因的表达水平; B: 进入高原后外周血单核细胞中 *MKLI* 的表达水平显著增加。分别测量研究对象在海平面高度( $n=21$ )和进入高原后( $n=13$ )外周血单核细胞中基因的表达水平, 并进行比较。以上基因表达数据均进行了对数( $\log_2$ )转换, 采用两独立样本  $t$  检验分析组间 *MKLI* 基因表达差异是否具有统计学意义。

率分布差异发现, rs59098711 的 CC 基因型和 C 等位基因型在藏族中的频率显著高于汉族人群。进一步通过与公共数据库中的数据进行比较发现, rs59098711 的 CC 基因型和 C 等位基因型在藏族人群中的频率显著高于其他种族, 提示 rs59098711 位点的 C 等位基因型可能在藏族人群中表现出了选择优势, 有助于藏族人群适应青藏高原的生存环境。遗传分化系数  $F_{ST}$  是衡量群体间遗传分化的重要指标, 可以很好的反应 SNP 位点在不同群体间的遗传分化程度。 $F_{ST}$  值在 0~1 范围内, 其值越大, 提示两个群体间的分化程度就越高。Wright 等<sup>[38]</sup>认为, 若  $F_{ST}$  值在 0~0.05 之间, 提示群体间可能不存在遗传分化; 若  $F_{ST}$  值在 0.05~0.15 之间, 提示群体间存在中等程度的遗传分化; 若  $F_{ST}$  值在 0.15~0.25 之间, 提示群体间存在高度的遗传分化; 若  $F_{ST}$  值大于 0.25, 则群体间有极大的遗传分化。本研究结果显示, rs59098711 在藏族与汉族之间的  $F_{ST}$  值为 0.10, 说明该位点在藏汉人群间存在中等程度的遗传分化。以上结果提示, *MKLI* 基因上的 rs59098711 位点可能与人类高原适应性相关。

低压性缺氧是高原地区威胁人体健康的主要因素。与世居低海拔地区的人群相比, 藏族人群已进化出多种适应性特征, 使得他们能够应对高原的缺

氧环境。例如, 藏族人群血红蛋白水平较低, 避免了高血红蛋白水平引起的多种并发症(如高黏血症)<sup>[11,13]</sup>; 藏族人群的缺氧性肺血管收缩程度较弱, 避免了低氧性肺动脉高压和由此诱发的肺水肿<sup>[11]</sup>; 藏族人群的血流量, 以及氧气由血液扩散进入组织细胞中的速率, 均高于低海拔地区的人群<sup>[3]</sup>。有趣的是, 以往遗传学研究中发现的两个最为显著的藏族高原适应性基因 *EPAS1* 和 *EGLN1*, 与上述高原适应性特征均密切相关<sup>[39]</sup>。而 *MKLI* 基因编码的蛋白属于转录因子家族成员, 该蛋白可结合其靶基因(如 *ICAM-1*、*eNOS* 和 *ET-1* 等)的启动子区, 调控靶基因的转录<sup>[20,21,29]</sup>。在缺氧条件下, 肺血管中 *MKLI* 的表达增加, 可促进缺氧条件下血管内皮细胞中 *ICAM-1*、*ET-1* 等基因的转录<sup>[20,29]</sup>, 并抑制 *eNOS* 的转录水平<sup>[21]</sup>, 从而导致血管收缩, 血流量降低, 肺动脉压升高。*MKLI* 是否与藏族人群的其他适应性特征相关, 目前尚未有明确报道, 需要后续进一步的研究探索。根据本研究结果, 藏族人群携带 rs59098711 的 C 等位基因的频率显著高于低海拔人群, 而 rs59098711 的 C 等位基因型又与较低的 *MKLI* 表达水平显著相关, 可以推测, 大多数藏族个体 *MKLI* 的表达水平显著低于低海拔地区个体, 使得藏族个体在高原低氧环境中肺血管收缩程度弱于低海拔地



区个体,从而减少了低氧性肺动脉高压和肺水肿等高原病的发生率。

综上所述,本研究发现 *MKL1* 基因的多态性位点 rs59098711 可能与藏族人群的高原环境适应性相关。未来仍需要开展针对该基因在肺血管内皮细胞中的功能研究,以进一步探索 *MKL1* 在高原环境适应性中的作用及机制。

## 参考文献(References):

- [1] Qi X, Cui C, Peng Y, Zhang X, Yang Z, Zhong H, Zhang H, Xiang K, Cao X, Wang Y, Ouzhuluobu, Basang, Ciwangsangbu, Bianba, Gonggalanzi, Wu T, Chen H, Shi H, Su B. Genetic evidence of paleolithic colonization and neolithic expansion of modern humans on the tibetan plateau. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(8): 1761–1778. [DOI]
- [2] Taylor AT. High-altitude illnesses: physiology, risk factors, prevention, and treatment. *Rambam Maimonides Med J*, 2011, 2(1): e0022. [DOI]
- [3] Beall CM. Two routes to functional adaptation: tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(Suppl. 1): 8655–8660. [DOI]
- [4] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 294–309. [DOI]
- [5] Beall CM. Tibetan and andean patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Hum Biol*, 2000, 72(1): 201–228. [DOI]
- [6] Ren Y, Fu Z, Shen W, Jiang P, He Y, Peng S, Wu Z, Cui B. Incidence of high altitude illnesses among unacclimatized persons who acutely ascended to tibet. *High Alt Med Biol*, 2010, 11(1): 39–42. [DOI]
- [7] Jiang C, Chen J, Liu F, Luo Y, Xu G, Shen HY, Gao Y, Gao W. Chronic mountain sickness in Chinese Han males who migrated to the Qinghai-Tibetan plateau: application and evaluation of diagnostic criteria for chronic mountain sickness. *BMC Public Health*, 2014, 14: 701. [DOI]
- [8] Wu TY. Chronic mountain sickness on the Qinghai-Tibetan plateau. *Chin Med J*, 2005, 118(2): 161–168. [DOI]
- [9] Wu TY, Ding SQ, Liu JL, Yu MT, Jia JH, Duan JQ, Chai ZC, Dai RC, Zhang SL, Liang BZ, Zhao JZ, Qi de T, Sun YF, Kayser B. Reduced incidence and severity of acute mountain sickness in Qinghai-Tibet railroad construction workers after repeated 7-month exposures despite 5-month low altitude periods. *High Alt Med Biol*, 2009, 10(3): 221–232. [DOI]
- [10] Moore LG. Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt Med Biol*, 2001, 2(2): 257–279. [DOI]
- [11] Wu T, Kayser B. High altitude adaptation in tibetans. *High Alt Med Biol*, 2006, 7(3): 193–208. [DOI]
- [12] Grocott M, Montgomery H. Genetophysiology: using genetic strategies to explore hypoxic adaptation. *High Alt Med Biol*, 2008, 9(2): 123–129. [DOI]
- [13] Simonson TS, Yang Y, Huff CD, Yun H, Qin G, Witherspoon DJ, Bai Z, Lorenzo FR, Xing J, Jorde LB, Prchal JT, Ge R. Genetic evidence for high-altitude adaptation in tibet. *Science*, 2010, 329(5987): 72–75. [DOI]
- [14] Xu S, Li S, Yang Y, Tan J, Lou H, Jin W, Yang L, Pan X, Wang J, Shen Y, Wu B, Wang H, Jin L. A genome-wide search for signals of high-altitude adaptation in tibetans. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(2): 1003–1011. [DOI]
- [15] Li Q, Liu SY, Lin KQ, Sun H, Yu L, Huang XQ, Chu JY, Yang ZQ. Association between six single nucleotide polymorphisms of *EGLN1* gene and adaptation to high-altitude hypoxia. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(8): 992–998. 李骞, 刘舒媛, 林克勤, 孙浩, 于亮, 黄小琴, 褚嘉祐, 杨昭庆. *EGLN1* 基因 6 个单核苷酸多态性与高海拔低氧适应的相关性. 遗传, 2013, 35(8): 992–998. [DOI]
- [16] Wang DZ, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schratt G, Richardson JA, Nordheim A, Olson EN. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14855–14860. [DOI]
- [17] Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW, Prywes R. Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(18): 6597–6608. [DOI]
- [18] Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, Nakao K. Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(17): 4134–4148. [DOI]
- [19] Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, Kinoshita H, Gerard RD, Richardson JA, Dimaio JM, Sadek H, Kuwahara K, Olson EN. Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. *Circ Res*, 2010, 107(2): 294–304. [DOI]
- [20] Yuan Z, Chen J, Chen D, Xu G, Xia M, Xu Y, Gao Y. Megakaryocytic leukemia 1 (*MKL1*) regulates hypoxia induced pulmonary hypertension in rats. *PLoS One*, 2014, 9(3): e83895. [DOI]
- [21] Fang F, Yang Y, Yuan Z, Gao Y, Zhou J, Chen Q, Xu Y. Myocardin-related transcription factor A mediates OxLDL-induced endothelial injury. *Circ Res*, 2011, 108(7): 797–807. [DOI]
- [22] Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV,

- Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 1993, 268(23): 17478–17488. [DOI]
- [23] Droma Y, Hanaoka M, Ota M, Katsuyama Y, Koizumi T, Fujimoto K, Kobayashi T, Kubo K. Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema. *Circulation*, 2002, 106(7): 826–830. [DOI]
- [24] Sun YJ, Ming-wu F, Wen-quan N, Guang-ping L, Jing-liang L, Shou-quan D, Ying X, Guo-shu Y, Jian-qun D, Yun-jun P, Wei-ya D, Tian W, Jing-wen C, Xiao-bo L, Zhong-xiang W, Guang-Xue Y, Hui-cheng S, Zhong-hou J, Jun L, Xiao-ming W, Qin S, Qi-xia W, Wen-yu Z, Tong-chun Z, Chang-chun Q. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms associated with susceptibility to high altitude pulmonary edema in Chinese railway construction workers at Qinghai-Tibet over 4 500 meters above sea level. *Chin Med Sci J*, 2010, 25(4): 215–221. [DOI]
- [25] Ahsan A, Norboo T, Baig MA, Qadar Pasha MA. Simultaneous selection of the wild-type genotypes of the G894T and 4B/ 4A polymorphisms of NOS3 associate with high-altitude adaptation. *Ann Hum Genet*, 2005, 69(Pt 3): 260–267. [DOI]
- [26] Wang QQ, Yu L, Huang GR, Zhang L, Liu YQ, Wang TW, Lin H, Ren Q, Liu P, Huang L, Qin J, Wu GM, Li QN, Li YF, Xiong HY. Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and nitric oxide synthase 3 genes as risk factors of high-altitude pulmonary edema: a case-control study and meta-analysis. *Tohoku J Exp Med*, 2013, 229(4): 255–266. [DOI]
- [27] Ahsan A, Mohd G, Norboo T, Baig MA, Pasha MA. Heterozygotes of NOS3 polymorphisms contribute to reduced nitrogen oxides in high-altitude pulmonary edema. *Chest*, 2006, 130(5): 1511–1519. [DOI]
- [28] Zhang H, Chamba Y, Zhao CJ, Bao HG, Ling Y, Wu CX. Function of inducible nitric oxide synthase on adaptability to hypoxia in Tibetan chicken. *Hereditas(Beijing)*, 2009, 31(4): 400–406.  
张浩, 强巴央宗, 赵春江, 鲍海港, 凌遥, 吴常信. 藏鸡诱导型一氧化氮合酶基因低氧适应功能分析. *遗传*, 2009, 31(4): 400–406. [DOI]
- [29] Yang Y, Chen D, Yuan Z, Fang F, Cheng X, Xia J, Fang M, Xu Y, Gao Y. Megakaryocytic leukemia 1 (MKL1) ties the epigenetic machinery to hypoxia-induced transactivation of endothelin-1. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(12): 6005–6017. [DOI]
- [30] Goerre S, Wenk M, Bärtsch P, Lüscher TF, Niroomand F, Hohenhaus E, Oelz O, Reinhart WH. Endothelin-1 in pulmonary hypertension associated with high-altitude exposure. *Circulation*, 1995, 91(2): 359–364. [DOI]
- [31] Jankowich MD, Wu WC, Choudhary G. Association of elevated plasma Endothelin-1 levels with pulmonary hypertension, mortality, and heart failure in africanamerican individuals: the jackson heart study. *JAMA Cardiol*, 2016, 1(4): 461–469. [DOI]
- [32] Shao D, Park JE, Wort SJ. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Res*, 2011, 63(6): 504–511. [DOI]
- [33] Modesti PA, Vanni S, Morabito M, Modesti A, Marchetta M, Gamberi T, Sofi F, Savia G, Mancina G, Gensini GF, Parati G. Role of endothelin-1 in exposure to high altitude: acute mountain sickness and Endothelin-1 (ACME-1) study. *Circulation*, 2006, 114(13): 1410–1416. [DOI]
- [34] Yang J, Jin ZB, Chen J, Huang XF, Li XM, Liang YB, Mao JY, Chen X, Zheng Z, Bakshi A, Zheng DD, Zheng MQ, Wray NR, Visscher PM, Lu F, Qu J. Genetic signatures of high-altitude adaptation in tibetans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(16): 4189–4194. [DOI]
- [35] Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan S, Dolan ME, Cox NJ. Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genet*, 2010, 6(4): e1000888. [DOI]
- [36] Pugliese SC, Kumar S, Janssen WJ, Graham BB, Frid MG, Riddle SR, El Kasmi KC, Stenmark KR. A Time- and Compartment-Specific activation of lung macrophages in hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol*, 2017, 198(12): 4802–4812. [DOI]
- [37] Subudhi AW, Bourdillon N, Bucher J, Davis C, Elliott JE, Eutermoster M, Evero O, Fan JL, Jameson-Van Houten S, Julian CG, Kark J, Kark S, Kayser B, Kern JP, Kim SE, Lathan C, Laurie SS, Lovering AT, Paterson R, Polaner DM, Ryan BJ, Spira JL, Tsao JW, Wachsmuth NB, Roach RC. AltitudeOmics: the integrative physiology of human acclimatization to hypobaric hypoxia and its retention upon reascent. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92191. [DOI]
- [38] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*, 2002, 11(2): 155–165. [DOI]
- [39] Peng Y, Yang Z, Zhang H, Cui C, Qi X, Luo X, Tao X, Wu T, Ouzhuluobu, Basang, Ciwangsangbu, Danzengduojie, Chen H, Shi H, Su B. Genetic variations in Tibetan populations and high-altitude adaptation at the himalayas. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(2): 1075–1081. [DOI]