**汉族类风湿关节炎患者CD4+ T细胞的全基因组DNA甲基谱分析**

Shicheng Guo1$, Ting Jiang1,2$, Rongsheng Wang1,2, Yi Shen1,2, Xiao Zhu3, Yan Wang1, Fengmin Bai1,2, Qin Ding1,2,Xiaodong Zhou4, Guangjie Chen5×, Dongyi He1,2×

1Department of Rheumatology, Shanghai Guanghua Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Shanghai 200052, China.

2Arthritis Institute of integrated Traditional and Western medicine, Shanghai Chinese Medicine Research Institute, Shanghai 200052, China.

3Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan Scientific Research Center, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

4 University of Texas Medical School at Houston, 6431 Fannin, MSB5.270, Houston, TX 77030, USA

5Department of Immunology and Microbiology, Shanghai JiaoTong UniversitySchool of Medicine, Shanghai 200025, China

所有作者之间没有潜在的不公开的利益冲突

**通讯作者：**

何东仪，中国上海长宁区光华中西医结合医院，风湿免疫科，200052。电话: +86-21-55664885，传真: +86-21-55664885，邮箱: [dongyihe@medmail.com.cn](mailto:dongyihe@medmail.com.cn)

陈广洁，中国上海交通大学医学院，免疫和微生物学系，200025，电话: +86-21-63846590，邮箱: [guangjie\_chen@163.com](mailto:guangjie_chen@163.com)

**摘要:**

**背景：**RA是关节慢性炎症的自身免疫性疾病能引发关节的慢性炎症。最新的证据表明表观遗传学改变参与RA的发病。**方法：**为了充分了解RA CD4+T细胞异常的DNA甲基化，我们进行了12个RA病人与12个对应的正常人的CD4+T细胞的全基因组甲基化比较研究。胞嘧啶的甲基化状态用Illumina450K甲基化芯片进行量化。**结果：**DNA甲基化分析显示RA 病人的CD4+T细胞存在383个高甲基化和 785低甲基化基因(P<3.4×10-7)。基因本体论分析表明，在RA的发病机制中，基因启动子的剪接和蛋白修饰可能在RA的发病机制中起重要作用。此外，结果表明人的HLA区域*H*LA-DRB6， HLA-DQA1 和HLA-E经常过度甲基化，但RA患者HLA-DQB1基因在CpG岛区高甲基化在CpG边缘区域域低甲基化。在MHC区域之外，HDAC4、 NXN、TBCD 和TMEM61是最高甲基化的基因，而ITIH3，TCN2、PRDM16、SLC1A5 和 GALNT91是低甲基化基因。**结论：**全基因组甲基化谱显示RA病人CD4+ T 细胞存在DNA甲基化的改变。

**关键词：**

DNA甲基化，类风湿性关节炎，CD4+ T细胞，全基因组，Illumina甲基化450K芯片

**引言：**

类风湿性关节炎（RA）是一种自身免疫性疾病主要损害滑膜组织同时产生关节的慢性炎症。自身免疫性疾病使人体的免疫系统错误地将自己的组织误认为是外来入侵者的。在全世界约0.5-1%的人口受到RA的影响，相应的经济负担很重。

在过去的几十年，RA的发病机制已被广泛研究。RA最重要的致病源是单核苷酸多态性（SNP）。被认为是RA显著相关的基于SNP的全基因组关联研究（GWAS）发现多个SNPs位点。尽管这样，我们以前的工作表明，即使是像甲状腺癌高家族性的风险疾病，几个重要的SNPs可能只有有限的预测能力。如预期，大量的拷贝数的变化与RA的易感性有显着的关联。从遗传学研究和系统性自身免疫性类风湿疾病如SLE、痛风和SSc积累的证据常常表现出一些临床特点和基因危险因素。因此，从理论上讲，这些复杂的疾病可能会具有在基因组水平的一些类似的缺陷。

目前估计RA的遗传率为约20% - 50%，这在有无抗环瓜氨酸肽抗体的RA患者中是显著不同的，表明流行病学因素在RA的病因学中有着重要的角色。此外，SLE和SjS的CD4+ 或 CD8+ T细胞的DNA全基因组甲基化已经表现出了大量的改变。因此，可以假定DNA甲基化在RA的发病中是有意义的。DNA甲基化是最重要的表观遗传学改变之一。我们以前的研究发现DNA甲基化在基因和microRNA表达调节中发挥重要的作用，在癌症的开始和进展，癌症的诊断和转归中发挥重要的角色。

以往的研究表明几个重要的免疫相关基因在RA基因组中异常甲基化。然而，RA病人的全基因组DNA甲基化谱的还是非常有限的，尤其是在亚洲人口和不能进行的公共区域中。从候选基因发现更多的RA相关的DNA甲基化区域和识别缺失的RA遗传是一个很大的问题。在目前的研究中，我们进行了12例RA 和相匹配的12名健康志愿者的CD4 + T细胞的全基因组DNA甲基化谱分析。

**方法：**

**患者和对照组：**

12例RA病人和12例正常对照进行研究，平均年龄病人是42.83，正常人是 43.75 ，二者无统计学差异 (p = 0.95)。所有患者均符合美国风湿病学会RA的分类标准。该研究是由光华医院学术顾问委员会批准。样本采集时同时收集临床资料。

**分离PBMCs和CD4+ T细胞：**

RA和正常对照组的血液标本采用标准流程、密度梯度离心制备PBMCs（Amersham Biosciences）并立即进行细胞培养。CD4 + T细胞用无接触的T细胞分离试剂盒（miltenyibiotec）、从新鲜分离的外周血单个核细胞通过过滤表达CD8、CD14、CD16、CD56、CD19、CD36，CD123，γ/δT细胞受体和血型糖蛋白A的细胞制备。CD4+ T细胞纯度是95–98%，用流式细胞仪特异性抗体进行检测。全基因组DNA用QIAGEN试剂盒（Qiagen, Germantown, MD）和EZ DNA甲基化酶试剂盒进行亚硫酸氢钠处理制备（Zymo, Orange, CA）。

**人甲基化Illumina Infinium450芯片**

亚硫酸氢钠转换的病人和正常人DNA样本使用Nanodrop扫描分光光度计量化准备（Thermo, Wilmington, DE）。每个样品用500 ng的全基因组亚硫酸氢钠转化DNA进行变性、粉碎、放大，甲基化信号用humanmethylation450k芯片（Illumina Infinium，San Diego，CA，USA）进行检测。采用标准的DNA甲基化450K分析渠道（SMAP）来进行甲基化基因芯片分析。基因组工作室（Illumina）用来产生信号强度和监测内部控制规范（ICN）的P值和背景减法（BS）。

用R包的“lumi”进行质量控制和标准化。在进一步分析之前移除ChrX和ChrYSNPs 探针或位点。此外，探针检测P值> 0.01超过样本的5%也将被过滤掉，而其他样品探针小于5%标记为缺失值（NA）避免之后统计和生物信息学进一步分析的歧义。整体信号强度，M值的分布和检测网站数量被来衡量芯片的质量。在差异甲基化位点识别之前删除显著的异常样品/芯片。用“lumi”包装信号强度进行颜色偏差的调整和分位数归一化处理（QN）。最后，β值混合分量的归一化（BMIQ）调整了不同类型的探针造成的偏差（I型和II型）。

**数据分析:**

应用主成分分析法（PCA）和聚类分析法对样本间的相关性进行分析。在主成分分析中，有2个样本被筛选出来，因为它们在主成分分析中明显不同。通过配对t检验的基础上的β值的归一化数据的差异甲基化位点进行鉴定。原始P值通过错误发现率（FDR）= 0.05多重检验校正进行调节。临床特征与不同的甲基化位点之间的关联性用线性回归显著阈值为0.005表示。用DAVID 生物信息学资源进行基因本体论分析。通过字符串推断差异甲基化基因的相互作用(version 10.0)。人类的GRCH37 / hg19标记用于生物信息学分析和结果表述。所有的方法和分析在R下进行(version 3.2.1)。数据沉积在基因表达数据库（GEO加入：GSE71841）。

**结果：**

我们采用基于微珠芯片的高通量筛选法研究RA患者和正常人的全基因组CD4+ T细胞的DNA甲基化，允许482421个CpG位点同时跨越21231个基因的启动子区域（99% RefSeq基因）。在这个项目中收集和入组24个生物复制品（12个RA患者和12个匹配的健康对照组）（表1）。检测值P值在0.01之上的1067个探针被过滤删除。443个探针从大于5% 的样本珠数<3的数据集上删除。29021个SNPs探针（dbSNP数据库版本：142）被移除降低分析的偏差。因为多重对比或位于X染色体或Y染色体，删除11245和8510个探针，最终在24个样本保存了435226个探针。

为了确保我们的研究细胞均来源于CD4+T细胞，我们预计了我们的甲基化信号进入PC1和PC2的全血细胞尺寸。分析表明，我们的样品明显聚集在CD4+细胞疏远其他种类的细胞，如CD8 + T细胞、CD14、CD19 +等。表明样品采集过程中成功地制备出了样品（图1A）。

更重要的是，在我们的研究中确保发现不同的甲基化模式不受RA患者和对照组的T细胞亚群的潜在差异的影响，我们发现许多基因与已知的特定的T细胞亚群的相关的甲基化谱，如IL4、IL13（Th2），IFNγ（Th1）和IL17F（Th17）。这些CpG位点在病例和对照之间没有发现显著差异，提示RA患者和对照组在T细胞亚群之间无差异。同时，PCA分析我们的甲基化450K，结果表明PC1和PC2解释总方差的29.9%和14%， 13大主成分可以解释80%的方差。这些结果表明，有限的临床信息或人口学标志和我们的数据是可信的，为进一步的生物信息学和生物统计学的分析做准备（补充图1）。

**RA全基因组DNA甲基化谱**

我们确定了RA与正常对照组相比CD4+ T细胞810个低甲基化CpG位点，392个高甲基化，代表了在RA患者低甲基化和高甲基化的785 和383个基因P<3.4×10-7（配对t检验，率＜0.05，补充表1）。

基于显著差异甲基化位点的聚类分析显示RA和正常对照组之间的明显分离（图1B）。在RA中低甲基化CpG位点比高甲基化CpG位点更多显示全基因组低甲基化。差异甲基化基因的相互作用是基于字符串10.0，结果表明DMGs是高度交互的而不是功能分离（图2）。基因本体论分析表明在RA患者选择性剪接（P = 1.2×10-7，FDR）、磷蛋白（P = 1.7×10-2，FDR）明显异常（表2），提示在RA的发病过程中，甲基化修饰的剪接和蛋白修饰异常可能在RA的发病中起重要作用。此外，免疫反应（p值= 3.2×10-5）和白细胞单核细胞（P= 0.02）相关的基因本体论也明显丰富。

更重要的是，结果表明，在RA患者人类白细胞抗原（HLA）区域出现频繁的低甲基化，包括*HLA-DRB6* (P=6.61×10-10), *HLA-DQA1* (P=7.09×10-9)、*HLA-E* (P=3.24×10-7)，然而，HLA-DQB1基因表现出不同的甲基化谱在CpG岛区显著的高甲基化和在CpG陆架区低甲基化（表3）。MHC区域的外面，在RA最高甲基化的基因包括*HDAC4* (P=1.47×10-7)，*NXN* (P=5.5×10-9), *TBCD* (P=4.48×10-8) and *TMEM61* (P=1.7×10-7)，而最显着的低甲基化的基因包括*ITIH3* (P=1.16×10-7)，*TCN2* (P=1.57×10-8)， PRDM16 (P=3.1×10-9)， SLC1A5 (P=2.94×10-7) 和GALNT9 (P=8.26×10-9)。

**DNA甲基化与疾病特征的相关性**

如表1所示，我们的病人有大量的临床特征。识别临床相关的DNA甲基化位点，为RA的病理机制提供了重要的见解和有价值的相应的临床应用。进行分析临床特征和识别差异甲基化位点。 我们发现 OR5A2 (cg02981094, P=2.6×10-4)， ALDH9A1 (cg03984859, P=2.8×10-4) 和C5orf32 (cg02070114, P=2.2×10-4)甲基化水平 和RA的疾病进程显著相关。此外，ZC3H11A (cg02337583)甲基化水平与RA病人的类风湿因子显著相关(P=8.9×10-4)。更重要的是，OAS2的甲基化水平（cg00085448）明显与RA患者的HZPG 相关（P = 4.1×10-4）。此外C16orf71 (cg04705084)，LOC100129716 (cg00598143)和miR-762 (cg02558026)与DAS 28 显著相关，P值分别为 5.8×10-3，5.2×10-3， 和 7.5×10-3。五个位点包括SLC38A8 (cg01740650， P=3.0×10-3)， C18orf19 (cg00448482， P=3.0×10-3)， COL18A1 (cg04760448，P=1.9×10-3)，BAT3 (cg05649229，P=4.9×10-3) and PLD3 (cg07071106, P=4.4×10-3) 与ESR显著相关。最后，我们发现HSPA12A (cg06942850)与压痛关节数（TJC）显著相关P值为of 3.2×10-3。

**讨论**

总之，我们用Illumina甲基化450K芯片描述汉族RA患者CD4+ T细胞全基因组DNA甲基化变化。基于严格的测量和分析，RA和对照组CD4+ T细胞之间1202个CpG位点显著差异。

癌症的DNA甲基化变化通常含有千种不同的甲基化位点，系统性自身免疫性风湿性疾病似乎只有少数的差异甲基化区。我们的甲基化数据主成分分析也显示在RA和对照组没有明显的分离，表明在RA和正常人的CD4+ T细胞不会有这么多的不同甲基化区域。Kazuhisa及其同事用人甲基化450K芯片进行了一项RA的成纤维样滑膜细胞（FLS）全基因组DNA甲基化比较，识别了1859个差异甲基化位点。Matlock和同事在SLE 和正常对照组的CD4+ T细胞发现341个不同的甲基化位点。nezam及其同事在SJS和正常对照组的CD4+ T细胞发现了753差异甲基化位点。虽然在这些数据中已经进行了多个测试校正，我们相信仍有大量的差异甲基化位点会是假阳性。因此，RA发病机制候选的差异甲基化位点是有限的。 与Kazuhisa’s的研究比较，在RA的发病机制有81个共同的差异甲基化CpG位点可能是非常重要的。不同种族人群的全基因组DNA甲基化谱可能为RA患者的甲基化改变提供特定的种族特异性信息。

在这个研究中，我们没有在另一个独立的队列执行验证，因为先前的研究表明甲基化450K芯片精度度很高。我们也没有进行基因表达分析，因为复杂的疾病甲基化的功能不仅在基因表达也与替代表达、基因稳定性、 SNPs与遗传变异的相互作用等一些重要的功能相关。另一方面，我们要强调的是不仅在PBMC也在血细胞亚群RA的表观遗传机制应给予更多的精度。

在下一步，我们将完成RACD8+、 CD17+等 T细胞的全基因组甲基化谱，从免疫细胞提供表观遗传的贡献。此外，我们的数据将提供一个比较SLE、痛风和其他自身免疫性疾病CD4+T细胞的甲基化谱的机会。我们注意到[Jeffries](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jeffries%20MA%5Bauth%5D)从高加索种群确定了RA和正常对照组CpG位点之间的761个差异甲基化位点。我们比较了我们和Jeffries的研究异常的甲基化位点发现GALNT9在这两项研究中都有，GALNT9被证明在RA患者低甲基化。虽然在我们的两项研究中只有一个基因是相同的，我们认为这是可以接受的，因为小样本和低的统计效率使我们和Jeffries的研究确定的差异甲基化位点只是总的差异甲基化位点的一小部分。

在我们的研究中DNA甲基化能被RA的许多基因、环境暴露和临床特征所影响，会给我们和Jeffries的研究带来许多差异。我们的研究表明在不同的人群基于表观遗传学的关联研究或生物标志物鉴定确实需要大样本，最终可以找到共享的表观遗传生物标志物。

全基因组DNA甲基化模式显示在RA患者CD4+T细胞DNA甲基化存在显著的改变。

**作者贡献**

DH 和 GC, SG 对概念、设计、提交最终批准的版本有贡献。SG和 TJ贡献多个微阵列数据集的综合分析，批量效应消除与统计分析。TJ, YL, RW, YS, XZ, YW, FB, QD和XZ 收集样品，并帮助数据整理、统计和起草手稿。所有作者阅读并批准了最后的手稿。

**致谢**

我们感谢在这项研究中所有参与主体的合作。这项工作是由中国国家自然科学基金 (81273979)，上海中医药临床基地建设(ZY-LCPT-1)，上海市中西医结合密集型中西医结合治疗RA(zxbz2012-05) 和上海传统中医风湿病学临床强化学科建设(ZYXK2012012)资助。

**参考文献**

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 2003: 423: 356-361.

2. Acosta-Colman I, Palau N, Tornero J et al. GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLCO1C1 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis. Pharmacogenomics 2013: 14: 727-734.

3. Eleftherohorinou H, Hoggart CJ, Wright VJ et al. Pathway-driven gene stability selection of two rheumatoid arthritis GWAS identifies and validates new susceptibility genes in receptor mediated signalling pathways. Human molecular genetics 2011: 20: 3494-3506.

4. Guo S, Wang, Y.-L., Li, Y., Jin, L., Xiong, M., Ji, Q.-H. and Wang, J. Significant SNPs have limited prediction ability for thyroid cancer. CANCER MEDICINE 2014: doi: 10.1002/cam4.211.

5. Song X, Guo S, Chen Y et al. Association between HLA-DQA1 gene copy number polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Chinese Han population. J Genet 2014: 93: 215-218.

6. Chen JY, Wang CM, Chang SW et al. Association of FCGR3A and FCGR3B copy number variations with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in Taiwanese patients. Arthritis Rheumatol 2014: 66: 3113-3121.

7. Frisell T, Holmqvist M, Kallberg H et al. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. Arthritis and rheumatism 2013: 65: 2773-2782.

8. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. Genome research 2010: 20: 170-179.

9. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J et al. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis and rheumatism 1990: 33: 1665-1673.

10. Altorok N, Coit P, Hughes T et al. Genome-wide DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheumatol 2014: 66: 731-739.

11. Wang X, Wang L, Guo S et al. Hypermethylation reduces expression of tumor-suppressor PLZF and regulates proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancers. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2013: 27: 4194-4203.

12. He Y, Cui Y, Wang W et al. Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-mir-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Neoplasia 2011: 13: 841-853.

13. Guo S, Yan F, Xu J et al. Identification and validation of the methylation biomarkers of non-small cell lung cancer (NSCLC). Clinical epigenetics 2015: 7: 3.

14. Guo S, Tan L, Pu W et al. Quantitative assessment of the diagnostic role of APC promoter methylation in non-small cell lung cancer. Clinical epigenetics 2014: 6: 5.

15. Glossop JR, Haworth KE, Emes RD et al. DNA methylation profiling of synovial fluid FLS in rheumatoid arthritis reveals changes common with tissue-derived FLS. Epigenomics 2015: 7: 539-551.

16. Liebling MR. Methylation of the CTLA-4 promoter and Treg cell dysfunction in rheumatoid arthritis: comment on the article by Cribbs et al. Arthritis Rheumatol 2015: 67: 1406.

17. van Steenbergen HW, Luijk R, Shoemaker R et al. Differential methylation within the major histocompatibility complex region in rheumatoid arthritis: a replication study. Rheumatology (Oxford) 2014: 53: 2317-2318.

18. Glossop JR, Emes RD, Nixon NB et al. Genome-wide DNA methylation profiling in rheumatoid arthritis identifies disease-associated methylation changes that are distinct to individual T- and B-lymphocyte populations. Epigenetics 2014: 9: 1228-1237.

19. Chen G, Zhang X, Li R et al. Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. Arthritis and rheumatism 2010: 62: 2900-2908.

20. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature protocols 2009: 4: 44-57.

21. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic acids research 2015: 43: D447-452.

22. Karouzakis E, Gay RE, Gay S et al. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis and rheumatism 2012: 64: 1809-1817.

23. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL et al. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases 2013: 72: 110-117.

24. Jeffries MA, Dozmorov M, Tang Y et al. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Epigenetics 2011: 6: 593-601.

25. Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E et al. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. Epigenomics 2011: 3: 771-784.

26. Lev Maor G, Yearim A, Ast G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. Trends in genetics : TIG 2015: 31: 274-280.

27. Rizwana R, Hahn PJ. CpG methylation reduces genomic instability. Journal of cell science 1999: 112 ( Pt 24): 4513-4519.

28. Shoemaker R, Deng J, Wang W et al. Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. Genome research 2010: 20: 883-889.

29. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. Nat Biotechnol 2013: 31: 142-147.

图列说明

图1.RA全基因组DNA甲基化谱及不同甲基化位点的生物信息学

A，PCA分析表明，我们研究的CD4+T与从 GSE35069 来源的CD4+细胞聚集，表明样品制备良好。B，基于在RA和对照组差分甲基化位点分离样品的聚类分析。

图2.差异甲基化基因的基因-基因相互作用分析

通过蛋白质-蛋白质相互作用字符串10的数据库推断相互作用。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表1：入组的RA和正常对照样本的特点** | | | | | | | | | | | | | |
| SSID | 年龄 | 性别 | COD  (Year) | RF  (IU/mL) | Anti-CCP  (RU/ml) | ESR  (mm/h) | SJC | TJC | PGA | DAS28 | Control | 年龄 | 性别 |
| RA0001 | 47 | 男 | 6 | <20 | 158.21 | 29 | 4 | 6 | 70 | 5.27 | HP0001 | 47 | 男 |
| RA0010 | 37 | 才 | 0.8 | 22.2 | 792.81 | 14 | 0 | 0 | 10 | 1.99 | HP0010 | 35 | 女 |
| RA0011 | 52 | 男 | 0.2 | 2260 | 104.86 | 46 | 10 | 12 | 60 | 6.35 | HP0011 | 52 | 男 |
| RA0012 | 56 | 男 | 1.5 | 1000 | 1600 | 140 | 10 | 11 | 85 | 7.39 | HP0012 | 56 | 男 |
| RA0002 | 40 | 女 | 3 | 198 | 789.54 | 36 | 1 | 1 | 30 | 3.77 | HP0002 | 39 | 女 |
| RA0003 | 47 | 男 | 3 | 152 | 270.38 | 140 | 18 | 19 | 90 | 8.35 | HP0003 | 46 | 女 |
| RA0004 | 23 | 女 | 1.5 | <20 | 71.42 | 24 | 3 | 4 | 45 | 4.46 | HP0004 | 23 | 女 |
| RA0005 | 28 | 女 | 11 | 127 | 306.09 | 54 | 18 | 18 | 80 | 7.48 | HP0005 | 27 | 女 |
| RA0006 | 39 | 女 | 20 | <20 | <25 | 66 | 3 | 3 | 50 | 5.09 | HP0006 | 40 | 女 |
| RA0007 | 25 | 女 | 4 | 1020 | 1540.83 | 23 | 18 | 19 | 55 | 6.59 | HP0007 | 27 | 女 |
| RA0008 | 57 | 女 | 10 | <20 | <25 | 78 | 3 | 3 | 60 | 5.34 | HP0008 | 57 | 女 |
| RA0009 | 39 | 女 | 15 | 1200 | 178.88 | 75 | 22 | 26 | 70 | 8.17 | HP0009 | 38 | 女 |

COD：病程；SJC： 肿胀关节数；TJC：关节压痛数； PGA：病人的整体评价；DAS 28：28个关节的疾病活动评分

**表2在RA中的差异甲基化基因本体论分析**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 总数 | 频率(%) | P值 | 倍的富集 | Benjamini |
| 选择性剪接 | 415 | 47.64 | 2.5244E-10 | 1.26 | 1.23191E-07 |
| 剪接变体 | 417 | 47.87 | 1.38522E-10 | 1.27 | 3.11674E-07 |
| 替代产品 | 398 | 45.69 | 3.72753E-08 | 1.23 | 9.31881E-07 |
| 固有免疫应答 | 52 | 18.14 | 4.1045E-07 | 1.44 | 3.20146E-05 |
| 先天免疫应答的调节 | 41 | 11.93 | 2.6667E-05 | 1.30 | 0.001039486 |
| Rho GTPases信号 | 16 | 1.84 | 0.000304882 | 2.88 | 0.013928772 |
| 白细胞单核细胞 | 72 | 8.26 | 0.00165455 | 1.43 | 0.028321431 |

**表3.RA的HLA基因的差异甲基化状态**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 基因 | CpG位点 | P值 | Delta-Beta | Ratio-Beta | Case | Control | 染色体 | 开始 | 结束 | CpG Shore | Type |
| HLA-DOA | cg00540941 | 4.70E-08 | -0.18 | 0.65 | 0.34 | 0.52 | chr6 | 32974843 | 32974844 | N\_Shore | II |
| HLA-DQA1 | cg02919082 | 7.09E-09 | -0.38 | 0.44 | 0.30 | 0.67 | chr6 | 32605694 | 32605695 | NA | II |
| HLA-DQA1 | cg04054303 | 9.83E-12 | -0.47 | 0.40 | 0.31 | 0.78 | chr6 | 32606445 | 32606446 | NA | II |
| HLA-DQB1 | cg02902672 | 1.62E-08 | -0.63 | 0.18 | 0.14 | 0.76 | chr6 | 32635360 | 32635361 | S\_Shelf | II |
| HLA-DQB1 | cg04777551 | 1.44E-08 | -0.46 | 0.47 | 0.41 | 0.87 | chr6 | 32628953 | 32628954 | N\_Shelf | II |
| HLA-DQB2 | cg02964065 | 1.99E-07 | 0.08 | 1.11 | 0.77 | 0.69 | chr6 | 32729545 | 32729546 | Island | I |
| HLA-DRB1 | cg00211215 | 1.60E-07 | 0.66 | 3.39 | 0.94 | 0.28 | chr6 | 32552246 | 32552247 | Island | I |
| HLA-DRB1 | cg04026937 | 1.60E-10 | -0.62 | 0.08 | 0.05 | 0.66 | chr6 | 32549361 | 32549362 | N\_Shelf | II |
| HLA-DRB1 | cg06032479 | 3.67E-08 | 0.20 | 1.27 | 0.92 | 0.73 | chr6 | 32552026 | 32552027 | Island | I |
| HLA-DRB1 | cg06204447 | 4.05E-08 | -0.18 | 0.76 | 0.57 | 0.74 | chr6 | 32546665 | 32546666 | NA | II |
| HLA-DRB6 | cg00103771 | 6.61E-10 | -0.64 | 0.24 | 0.20 | 0.84 | chr6 | 32525805 | 32525806 | NA | II |
| HLA-DRB6 | cg04688450 | 5.38E-09 | -0.34 | 0.44 | 0.27 | 0.62 | chr6 | 32526366 | 32526367 | NA | II |
| HLA-DRB6 | cg06559318 | 1.17E-08 | -0.82 | 0.05 | 0.04 | 0.85 | chr6 | 32526260 | 32526261 | NA | I |
| HLA-E | cg02678305 | 4.74E-08 | -0.05 | 0.89 | 0.39 | 0.43 | chr6 | 30460322 | 30460323 | S\_Shelf | II |
| HLA-E | cg03725115 | 3.24E-07 | -0.02 | 0.72 | 0.05 | 0.07 | chr6 | 30458102 | 30458103 | Island | I |

Deta-beta代表RA和正常对照组的不同。 Ratio-beta代表RA患者与正常对照组比较的平均甲基化水平的倍数变化。