

## HSP70-hom 单核苷酸多态性与高血压的关系

唐小平<sup>1</sup>, 杨颖丞<sup>1</sup>, 万沁<sup>2</sup>, 陈庄<sup>1</sup>, 代雨岑<sup>3</sup>, 段建<sup>3</sup>, 李厚谊<sup>3</sup>, 陈枫<sup>1</sup>

(泸州医学院附属医院 1. 医学实验中心, 2. 内分泌科, 3. 泸州医学院临床医学院, 四川省泸州市 646000)

[关键词] HSP70-hom; 单核苷酸多态性; 人群分布; 高血压

[摘要] **目的** 探讨 HSP70-hom(2437 T/C)单核苷酸多态性的人群分布特点及其与高血压的关系。**方法** 通过流行病学调查收集样本。采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性的方法检测样本 HSP70-hom 单核苷酸多态性。总计 1291 例(男 446 例,女 845 例),其中高血压组 359 例(男 138 例,女 221 例),对照组 455 例(男 134 例,女 321 例),另外排除糖尿病、肝、肾、心脏病、肿瘤史者等 477 例。**结果** HSP70-hom 单核苷酸多态性的人群分布情况为基因型 CC 6%、CT 38% 和 TT 56%,等位基因 C 25% 和 T 75%,在男女性别之间 3 种基因型的分布具有统计学差异( $\chi^2 = 7.96, P = 0.029$ ),等位基因的分布也具有显著差异( $\chi^2 = 3.97, P = 0.046$ )。男性高血压组和男性对照组 CC + CT 和 TT 基因型的分布差异显著( $\chi^2 = 4.25, P = 0.039$ ),等位基因 C 和 T 的分布也具有统计学意义( $\chi^2 = 4.769, P = 0.029$ ),而女性高血压组与女性对照组 CC + CT 和 TT 基因型及等位基因 C 和 T 的分布均无统计学差异。**结论** HSP70-hom 单核苷酸多态性与男性高血压发病有关,TT 基因型和 T 等位基因可能是其易感因素。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

### Relationship Between HSP70-hom Single Nucleotide Polymorphisms and Hypertension

TANG Xiao-Ping<sup>1</sup>, YANG Ying-Cheng<sup>1</sup>, WAN Qin<sup>2</sup>, CHEN Zhuang<sup>1</sup>, DAI Yu-Cen<sup>3</sup>, DUAN Jian<sup>3</sup>, LI Hou-Yi<sup>3</sup>, and CHEN Feng<sup>1</sup>

(1. *Experimental Medicine Center, 2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China*; 3. *Clinical Medicine College, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China*)

[KEY WORDS] HSP70-hom; Single Nucleotide Polymorphism; Population Distribution; Hypertension

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between HSP70-hom (2437 T/C) single nucleotide polymorphism and hypertension, and to analyze the population distribution of this polymorphism. **Methods** Samples were collected through epidemiological surveys. The HSP70-hom single nucleotide polymorphisms were detected by the method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Samples of 1291 cases (male 446 cases, female 845 cases) were analyzed, including 359 cases (male 138 cases, female 221 cases) in hypertension group, and 455 cases (male 134 cases, female 321 cases) in control group, excluding 477 cases with diabetes, liver, kidney, heart disease and cancer etc.

**Results** The distributions of HSP70-hom single nucleotide polymorphism in the population were genotype CC 6%, CT 38% and TT 56%, allele C 25% and T 75%. The distribution of the 3 genotypes had statistical difference between men and women ( $\chi^2 = 7.96, P = 0.029$ ), and the distribution of alleles also had significant difference between men and women ( $\chi^2 = 3.97, P = 0.046$ ). The distribution of CC + CT and TT genotypes had significant difference ( $\chi^2 = 4.25, P = 0.039$ ), and the distribution difference of allele C and T also had statistical significance ( $\chi^2 = 4.769, P = 0.029$ ), between male hypertension group and male control group. While all genotypes and alleles had no significant difference between female hypertension group and female control group. **Conclusion** HSP70-hom single nucleotide polymorphism is associated with male hypertension, and TT genotype and T allele may be the susceptible factors.

[收稿日期] 2014-12-31

[修回日期] 2015-06-10

[基金项目] 中华医学会临床医学科研专项资金-施贵宝内分泌糖尿病研究项目(12020160276);四川省科学技术厅与泸州市人民政府、泸州医学院联合科研专项资金计划项目(14JJC01283-LH11);泸州市人民政府-泸州医学院科技战略合作科技项目(2013LZLY-J04)

[作者简介] 唐小平,硕士,检验技师,研究方向为疾病的分子机制,E-mail 为 xiaopingtang@yeah.net。杨颖丞,学士,研究方向为疾病的分子机制。通讯作者陈枫,教授,硕士研究生导师,研究方向为疾病免疫机制,E-mail 为 chenf6305@foxmail.com。

高血压是一种全球性疾病,患病人数不断增加,2010年我国成年人高血压患病率达到33.5%,估计患病人数约为3.3亿;高血压患病率随年龄增高而上升,而且男性高于女性<sup>[1-2]</sup>。高血压被认为是一种由多个效应基因和一系列环境因素共同产生效应而导致的慢性疾病。全基因组关联研究发现了许多高血压的易感性基因,目前已能成功对单基因高血压和继发性高血压进行基因检测<sup>[3]</sup>,然而到目前为止只有很小的一部分基因在人群中被证实<sup>[4-5]</sup>。心脑血管疾病已经成为我国居民的首位死亡原因,而高血压是心脑血管疾病的第一位危险因素。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类高度免疫原性和高度保守的蛋白,在动脉粥样硬化的形成和发展中有着重要的作用。HSP70被认为是HSP家族中最丰富的一种,也是当前研究最深入的一种。近年研究<sup>[6]</sup>认为,HSP70与炎症和机体免疫反应有正相关性,也就是说炎症和机体免疫反应增多则HSP70合成也随之增加。研究表明HSP70基因多态性与一些自身免疫性疾病的发病有紧密联系。本文主要探讨HSP70-hom单核苷酸多态性与高血压之间的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

研究对象来自于中国20个社区(大项目20个社区,本文为四川泸州地区)糖尿病流行病学调查项目,该项目经上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会进行伦理认证,全部调查和取样征得受试者同意并签署知情同意书。本文研究样本均来自无亲缘关系的40岁以上四川泸州汉族人群,共计1291例,其中男性446例,女性845例。流行病学调查内容主要包括问卷调查(即年龄、性别、工作、病史、遗传史、家族疾病史等)、查体(即身高、体重、血压等)和血糖(空腹血糖、餐后2h血糖)、血脂(胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇)、以及肝肾功能等基线调查。高血压组(359例,男138例,女221例)的纳入采用2000年中国高血压治疗指南建议的标准:即收缩压 $\geq 140$  mmHg或舒张压 $\geq 90$  mmHg,或正在服降压药的已诊断高血压患者;血压检测用电子血压计,完成1次测量后,松开臂带,让测量对象稍微活动一下手臂,静坐1 min,进行下一次测量,总共测量3次,取平均值。对照组为各项检测均无异常者(455例,

男134例,女321例);排除糖尿病、肝、肾、心脏病、肿瘤史者等477例。

### 1.2 DNA提取

从血凝块研究样本中提取基因组DNA,操作按照试剂盒(试剂盒代码:ZP314,北京庄盟公司)说明书进行,并用微量核酸蛋白定量仪(NanoDrop1000)测定DNA的浓度和纯度。

### 1.3 PCR扩增

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物合成:正向:GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG,反向:GTAACCTAGATTCAGGTCTGG(上海生工生物公司合成),扩增产物片段大小为878 bp。PCR反应试剂购自天根科技生物有限公司,反应体系为DNA模板3  $\mu$ L,上下游引物各1  $\mu$ L,2  $\times$  MasterMix 12.5  $\mu$ L,双蒸水补至总体积25  $\mu$ L。PCR扩增采用降落PCR,反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,68 $^{\circ}$ C退火(每个循环降0.5 $^{\circ}$ C)30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,30个循环;94 $^{\circ}$ C变性30 s,45 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

### 1.4 限制酶切反应

使用限制性内切酶NcoI(NEB)对PCR扩增产物进行酶切反应,反应体系为:PCR产物2  $\mu$ L,10  $\times$  Buffer 1  $\mu$ L,NcoI 0.25  $\mu$ L,双蒸水6.75  $\mu$ L,反应条件为37 $^{\circ}$ C水浴1~4 h。

### 1.5 琼脂糖凝胶电泳

将酶切产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳30 min,电泳结果用凝胶成像仪(BIO-DAD)进行观察,并根据电泳结果判断基因型。同时,分别选取3种基因型的PCR产物各3例进行基因测序分析(上海生工公司)。

### 1.6 统计学分析

基因型分布进行Hardy-Weinberg平衡检验;计数资料比较采用Pearson's  $\chi^2$ 检验。数据均使用IBM SPSS 19.0统计软件进行数据处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基因型判断

根据设计的引物,PCR扩增产物片段大小为878 bp,如果多态性位点为C碱基,则不含有NcoI限制酶酶切识别位点(5'...CCATGG...3'),不能被酶切;而多态性位点为T碱基则能够被NcoI酶切成551 bp和327 bp两个片段。因此,酶切产物

电泳后成像只有 878 bp 一条目的带的为 CC 基因型,有 551 bp 和 327 bp 两条目的带的为 TT 基因型,有 878 bp、551 bp 和 327 bp 三条目的带的为 CT 基因型(图 1);并且酶切反应判断结果与测序结果相一致。

### 2.2 HSP70-hom 单核苷酸多态性基因型和等位基因分布

人群 HSP70-hom 单核苷酸多态性基因型总体分布为 CC 6%,CT 38%,TT 56%,Hardy-Weinberg 平衡检验结果  $P > 0.05$ ,说明基因型分布具有人群代表性,而且 T 等位基因所占比例高于 C 等位基因。3 种基因型在高血压组与对照组的分布无显著差异( $\chi^2 = 2.093, P = 0.351$ ),等位基因 C 和 T 在两

组间的分布也无统计学意义( $\chi^2 = 1.233, P = 0.267$ ;表 1)。但是 3 种基因型和等位基因频率在男女性别间的分布均具有显著性差异( $P < 0.05$ ;表 2)。

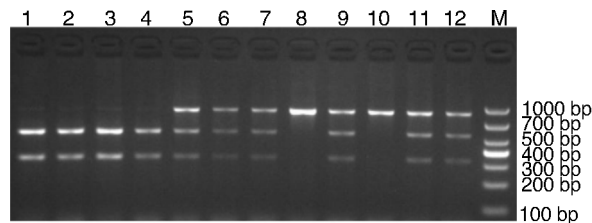


图 1. 酶切产物电泳图 M 为 DNA 标准分子量;1、2、3、4 为 TT 基因型;5、6、7、9、11、12 为 CT 基因型;8、10 为 CC 基因型。

Figure 1. Electropherogram of enzyme-digested product

表 1. HSP70-hom 单核苷酸多态性基因型和等位基因分布(例)

Table 1. Frequency of HSP70-hom genotype and allele among populations (cases)

项 目	基因型			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
总体人群	77(6.0%)	491(38.0%)	723(56.0%)	645(25.0%)	1937(75.0%)
对照组	34(7.5%)	168(36.9%)	253(55.6%)	236(25.9%)	674(74.1%)
高血压组	18(5.0%)	133(37.0%)	208(57.9%)	169(23.5%)	549(76.5%)
$\chi^2$		2.093			1.233
P		0.351			0.267

表 2. 不同性别间 HSP70-hom 单核苷酸多态性基因型分布(例)

Table 2. Frequency of HSP70-hom genotype and allele between the genders (cases)

项 目	基因型			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
男性	16(3.6%)	170(38.1%)	260(58.3%)	202(22.6%)	690(77.4%)
女性	61(7.2%)	321(38.0%)	463(54.8%)	443(26.2%)	1247(73.8%)
$\chi^2$		7.960			3.970
P		0.029			0.046

### 2.3 不同性别高血压与 HSP70-hom 单核苷酸多态性

由于在高血压组进行性别分组后 CC 基因型的比例低,所以例数较少,而总体人群显示等位基因 C 和 T 的分布有显著差异,因此将 CC 和 CT 基因合并(CC + CT)作统计分析。结果表明:比较男性高血压组和男性对照组基因型及等位基因频率的分布,CC + CT 和 TT 基因型在两组间的分布具有统计学差异,并且相对于 CC + CT 基因型,TT 基因型发生高血压的风险增加[比值比(odds ratio, OR) > 1];而且 C 和 T 两种等位基因频率在两组间也具有明显差异,T 等位基因相对于 C 等位基因发生高血压的风险增加(OR > 1;表 3)。比较女性高血压组和

女性对照组基因型和等位基因频率的分布发现均无统计学差异(表 4)。

表 3. HSP70-hom 单核苷酸多态性与男性高血压发病的关系(例)

Table 3. Association of the HSP70-hom single nucleotide polymorphisms with hypertension in males (cases)

项 目	基因型		等位基因	
	CC + CT	TT	C	T
对照组	60(44.8%)	74(55.2%)	66(24.6%)	202(75.4%)
高血压组	45(32.6%)	93(67.4%)	47(17.0%)	2297(83.0%)
$\chi^2$		4.250		4.769
P		0.039		0.029
OR		1.676		1.592
95% CI		1.024 ~ 2.742		1.047 ~ 2.421

表 4. HSP70-hom 单核苷酸多态性与女性高血压发病的关系(例)

Table 4. Association of the HSP70-hom single nucleotide polymorphisms with hypertension in females (cases)

项 目	基因型		等位基因	
	CC + CT	TT	C	T
对照组	142(44.2%)	179(55.8%)	170(26.5%)	472(73.5%)
高血压组	106(48.0%)	115(52.0%)	122(27.6%)	320(72.4%)
$\chi^2$	0.730		0.167	
<i>P</i>	0.392		0.682	
OR	0.861		0.945	
95% CI	0.610 ~ 1.214		0.719 ~ 1.241	

### 3 讨 论

高血压是一种主要以血压升高为临床表现的慢性复杂疾病,发病机制与遗传和环境因素均相关。目前临床上比较公认的高血压的病因因素主要包括:遗传、年龄、环境与职业、肥胖、吸烟和高钠饮食,而超过一半的高血压病人有高血压家族史。HSP70 是机体受到不良环境因素作用下诱导合成的一类重要生物活性分子,促进机体从各种应激中恢复和保护其免遭这些应激因素的损害<sup>[7]</sup>。HSP70 主要由 HSP70-1、HSP70-2、HSP70-hom 基因编码,3 个基因在表达调控方面各异且均存在多态性。HSP70 基因多态性可能影响 HSP70 的表达,并与某些疾病和环境损伤的易感性有关<sup>[8-9]</sup>。HSP70-hom 基因在 1097、2437 和 2763 位点存在多态性<sup>[10]</sup>。

本文采用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性的方法分析了汉族人 HSP70-hom(2437 T/C)单核苷酸多态性,研究结果显示 HSP70-hom 单核苷酸多态性在该地区男女性别间有明显差异,这表明该位点的多态性与性别可能有一定的关系。进一步通过病例-对照研究的方法探讨了 HSP70-hom(2437 T/C)单核苷酸多态性与高血压发病的关系,结果发现该位点的多态性与人群整体高血压的发病无关。由于该位点 3 种基因型在男女性别之间的分布不同,因此,本文分别分析了该位点的多态性与男性高血压和女性高血压发病之间的关系,统计分析表明,HSP70-hom(2437 T/C)位点 TT、TC 和 CC 三种基因型在男性高血压组和男性对照组中的分布差异显著,男性高血压组 TT 基因型和 T 等位基因的比例高于男性对照组,因此该多态性与男性高血压的发生可能有密切关系,TT 基因型和 T 等位基因可能是男性高血压的易感因素。但其与女性高血压的发生无关。已有的研究发现 HSP70 多态性与自身免疫性疾病<sup>[11]</sup>、帕金森综合征<sup>[12]</sup>、动脉粥样

硬化<sup>[13]</sup>、肿瘤<sup>[14]</sup>等疾病有关。近年来研究表明高血压和血清中 HSP70 抗体的增高呈正相关,进一步证实了 HSP70 和高血压有一定的关系<sup>[15]</sup>,而且血清 HSP70 可以作为妊娠高血压疾病前期诊断的重要指标<sup>[16]</sup>。余祖善等<sup>[17]</sup>研究发现,HSP70-2 基因在自发性高血压大鼠组中表达上调,认为 HSP70-2 基因可能和高血压相关。目前对于 HSP70 基因多态性与高血压之间关系的研究较少。李瑞芳等<sup>[18]</sup>研究表明 HSP70-1 基因 C/C 基因型与人群血压高值有关联,HSP70-2 基因 G/G 基因型与高温作业工人血压高值有关联。

总之,关于 HSP70 与高血压的关系正在被不断地研究,但相关的作用机制仍需更加深入的探讨,男性和女性高血压发生的比例和易感因素都呈现各自的特点。本文研究结果表明 HSP70-hom(2437 T/C)单核苷酸多态性与女性高血压的发生无相关性,而与男性高血压的发生可能相关,但这种相关性的具体作用机理还需进一步探讨。高血压常常是多基因多因素共同作用的结果,因此,该位点多态性是否由于协同性别等遗传因素影响高血压的发生?还是协同男性的生活习惯和职业等环境因素共同作用于高血压?都需要更进一步的深入研究。

### [参考文献]

- [1] 李镒冲,王丽敏,姜勇,等. 2010 年中国成年人高血压患病情况[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(5): 409-413.
- [2] 徐融,李瑾,章昕. 浙江省杭州市西湖区高血压流行现状及危险因素分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(2): 173-176.
- [3] 宋卫华,惠汝太. 高血压分子遗传学研究现状[J]. 中国循环杂志, 2012, 27(2): 155.
- [4] Yang HC, Liang YJ, Wu YL, et al. Genome-wide association study of young-onset hypertension in the Han Chinese population of Taiwan[J]. PLoS One, 2009, 4(5): 54-59.
- [5] Emily M, Mailund T, Hein J, et al. Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies[J]. Eur J Hum Genet, 2009, 17(10): 1231-240.
- [6] Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(6): 1055-059.
- [7] 郭堂春,贺涵贞,张国高. 热应激反应的研究现状与展望[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18(6): 365-367.

(下转第 186 页)

- cedures[J]. *Am J Cardiol*, 2011, 108(8): 1 061-067.
- [6] Iaitskiy NA, Zverev OG, Volkov AB, et al. Coronary collateral circulation in infarction-related artery in patients with acute myocardial infarction with rise and without rise of ST segment[J]. *Vestn Khir Im II Grek*, 2014, 173(1): 66-68.
- [7] Fatemi O, Paranilam J, Rainow A, et al. Red cell distribution width is a predictor of mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2013, 35(1): 57-64.
- [8] Goncalves SC, Labinaz M, Le May M, et al. Usefulness of mean platelet volume as a biomarker for long-term outcomes after percutaneous coronary intervention[J]. *Am J Cardiol*, 2011, 107(2): 204-209.
- [9] Rentrop KP, Thornton JC, Feit F, et al. Determinants and protective potential of coronary arterial collaterals as assessed by an angioplasty model[J]. *Am J Cardiol*, 1988, 61: 677-684.
- [10] 侯方杰, 邢明清, 戴红艳, 等. 瑞舒伐他汀对冠状动脉侧枝循环形成的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(12): 1 251-254.
- [11] Seiler C. The human coronary collateral circulation[J]. *Eur J Clin Invest*, 2010, 11: 465-476.
- [12] Nathoe HM, Koerselman J, Buskens E, et al. Determinants and prognostic significance of collaterals in patients undergoing coronary revascularization[J]. *Am J Cardiol*, 2006, 98(1): 31-35.
- [13] Weidinger F. Coronary collaterals: an elusive network [J]. *Heart*, 2014, 100(8): 607-608.
- [14] Meier P, Schirmer SH, Lansky AJ, et al. The collateral circulation of the heart[J]. *BMC Med*, 2013, 11: 143.
- [15] Szczepanska-Sadowska E, Cudnoch-Jedrzejewska A, Ufnal M, et al. Brain and cardiovascular diseases: common neurogenic background of cardiovascular, metabolic and inflammatory diseases[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2010, 61(5): 509-521.
- [16] Vayú A, Sarnago A, Fuster O, et al. Influence of inflammatory and lipidic parameters on red blood cell distribution width in a healthy population [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2015, 59(4): 379-385.
- [17] Fukuta H, Ohte N, Mukai S, et al. Elevated plasma levels of B-type natriuretic peptide but not C-reactive protein are associated with higher red cell distribution width in patients with coronary artery disease[J]. *Int Heart J*, 2009, 50(3): 301-312.
- [18] Duran M, Gunebakmaz O, Uysal OK, et al. The relation between mean platelet volume and coronary collateral vessels in patients with acute coronary syndromes[J]. *J Cardiol*, 2013, 61(4): 295-298.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 166 页)

- [8] 李芳泽, 周 舫, 蒋长征, 等. 热应激蛋白 70 基因多态性与急性高原反应的关系[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2004, 22(6): 413-415.
- [9] 肖成峰, 李芳泽. HSP70 家族基因多态性及其与疾病易感性之间的关系[J]. *国外医学·遗传学分册*, 2003, 26(4): 205-208.
- [10] Morano KA. New tricks for an old dog: the evolving world of HSP70[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2007, 1113(1): 1-14.
- [11] Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, et al. Extracellular heat shock proteins in cell signaling[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(19): 3 689-694.
- [12] Ryan JL, Jones RJ, Kenney SC, et al. Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells [J]. *Infect Agent Cancer*, 2010, 5(27): 1-15.
- [13] Bogunia-Kubik K, Uklejewska A, Dickinson A, et al. HSP70-hom gene polymorphism as a prognostic marker of graft-versus-host disease [J]. *Transplantation*, 2006, 82(8): 1 116-117.
- [14] Giacconi R, Caruso C, Lio D, et al. 1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(8): 866-873.
- [15] Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, et al. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension [J]. *J Hypertens*, 2002, 20(9): 1 815-820.
- [16] 赵 青, 高廷孝, 席作明, 等. 血清 HSP70、HS-CRP 联合检测在妊娠高血压疾病早期诊断中的应用[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(12): 2 015-016.
- [17] 余祖善, 陈长曦, 杨德业, 等. HSP7012: 新的高血压致病相关基因 [J]. *中华高血压杂志*, 2007, 15(7): 583-586.
- [18] 李瑞芳, 孙建娅, 张 萍, 等. 高温工人 HSP70 基因多态性与高血压易感性 [J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(5): 597-600.
- (此文编辑 曾学清)