

NLRP3 基因多态性与哈萨克族老年原发性高血压的关系

马秀英¹, 戴晨², 张源明¹, 王梦茹¹, 郭小亚¹, 董建¹

1. 新疆医科大学第一附属医院高血压科, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 新疆医科大学第一附属医院肾内科, 新疆 乌鲁木齐 830054

摘要: 目的 探讨 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体基因多态性与新疆哈萨克族老年高血压的关系。方法 随机选取 2016 年 2 月至 2017 年 3 月在新疆医科大学第一附属医院住院的新疆哈萨克族原发性高血压患者 230 例(高血压组),及同期哈萨克族健康体检者 220 例(对照组)。采用 TaqMan 探针法测定所有对象的 NLRP3 rs10754558、rs3806268 位点的基因型和等位基因,分析各位点基因型及等位基因的分布在两组间的差异。结果 NLRP3 基因 rs10754558 位点 GG 基因型在高血压组明显高于对照组(17.4% vs 9.1%, $P=0.040$),等位基因 G 频率明显高于对照组(43.1% vs 34.5% $P=0.010$),两组在隐性模型(GG vs GC + CC)的分布差异有统计学意义($P=0.010$)。rs3806268 位点高血压组与对照组基因型分布及显性模型(AA vs AG + GG)、隐性模型(GG vs AA + AG)、相加模型(AG vs AA + GG)的分布差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。采用 Logistic 校正了混杂因素干扰后,rs10754558 的 GG 基因型仍为高血压病的危险因素($OR=2.436, 95\% CI:1.238 \sim 4.792, P=0.01$)。结论 NLRP3 rs10754558 位点基因多态性与哈萨克族高血压遗传易感性相关。NLRP3 rs3806268 位点基因多态性与哈萨克族高血压发生无相关性。

关键词: Nod 样受体蛋白 3; 哈萨克族; 高血压; 基因多态性; 基因型分布; 等位基因; 隐性模型; 显性模型; 相加模型

中图分类号: R 544.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2018)05-0585-04

Relationship between NLRP3 gene polymorphism and elderly primary hypertension in Kazak nationality

MA Xiu-ying*, DAI Chen, ZHANG Yuan-ming, WANG Meng-ru, GUO Xiao-ya, DONG Jian

* Department of Hypertension, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China

Corresponding author: ZHANG Yuan-ming, E-mail: zyndxx@163.com

Abstract: Objective To study the relationship between gene polymorphism of nodlike receptor protein3 (NLRP3) inflammasome and elderly primary hypertension in Xinjiang Kazak nationality. **Methods** A total of 230 patients who were hospitalized in Heart Center of First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University between February 2016 and March 2017(hypertension group) and 220 Kazak health subjects for physical examination at the same time(control group) were randomly selected. TaqMan probe method was used to detect the genotypes and alleles of NLRP3 loci rs10754558 and rs3806268, and the difference for genotypes distribution and alleles frequency of each locus were analyzed in two groups. **Results** At NLRP3 gene rs10754558 locus, the genotype GG in hypertension group was significantly higher than that in control group(17.4% vs 9.1%, $P=0.040$), and the G allele frequency in hypertension group was significantly higher than that in control group(43.1% vs 34.5%, $P=0.010$), and there was significant difference in the distribution of recessive model(GG vs GC + CC) between hypertension group and control group($P=0.010$). At NLRP3 gene rs3806268 locus, there were no significant differences in genotype distribution and the distributions of recessive model(GG vs AA + AG), dominant model(AA vs AG + GG) and additive model(AG vs AA + GG) between two groups(all $P>0.05$). Logistic regression analysis showed that genotype GG at rs10754558 locus was still a risk factor for primary hypertension ($OR=2.436, 95\% CI:1.238 - 4.792, P=0.01$) after correcting the interference of confounding factors. **Conclusions** The gene

polymorphism in rs10754558 locus of NLRP3 may be associated with the genetic susceptibility to hypertension in Kazak. The gene polymorphism in rs3806268 locus of NLRP3 is not associated with the occurrence of hypertension in Kazak.

Key words: Nodlike receptor protein 3; Kazak; Hypertension; Gene polymorphism; Genotype distribution; Allele; Dominant model; Recessive model; Additive model

Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体是一种能被病原相关分子模式 (PAMP) 和危险相关分子模式 (DAMP) 激活的蛋白复合体^[1]。研究已证实, NLRP3 炎症小体是一种炎症标志物, 可能成为高血压早期预测的潜在生物标志物和治疗靶点^[2]。目前已经证明 NLRP3 基因多态性与许多炎性疾病相关, 如动脉粥样硬化、2 型糖尿病, 炎症性肠病等^[3]。NLRP3 基因多态性与高血压相关研究较少见, 本文运用 TaqMan 探针技术对 NLRP3 基因多态性进行分析, 探讨 NLRP3 基因多态性与新疆哈萨克族高血压的关系, 期为高血压病与炎症反应的关系提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2016 年 2 月至 2017 年 3 月新疆医科大学第一附属医院住院的新疆哈萨克族原发性高血压 (EH 组) 患者 230 例, 男 111 例, 女 119 例, 年龄 (66.5 ± 6.7) 岁, 体质指数 (BMI) (25.6 ± 3.9) kg/m^2 , 高血压诊断为: 年龄 ≥ 60 岁、血压持续或非同日坐位收缩压 ≥ 140 mm Hg 和 (或) 舒张压 ≥ 90 mm Hg, 通过物理检查、心脏超声、心电图、生化检测及病史调查排除继发性高血压、糖尿病、冠心病、肝肾功能不全、心脏其他疾病、肿瘤、炎症性疾病。选取同期年龄、性别相匹哈萨克族健康体检者 (NT 组) 220 例, 男 113 例, 女 107 例, 年龄 (66.3 ± 6.2) 岁, BMI (24.7 ± 3.5) kg/m^2 , 入选标准: 血压 $< 135/85$ mm Hg, 且未曾服用过任何抗高血压药物。所有研究对象长期在新疆居住, 且无血缘关系。所有研究对象在入组前签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 测量临床指标 所有研究对象的血压、身高、体重的测量由专业培训人员统一完成, 总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 由新疆医科大学第一附属医院检验中心统一完成。

1.2.2 DNA 的提取 采晨起外周静脉血 3 ml, 乙二胺四乙酸抗凝。3 000 r/min 离心 10 min 后, 分离中间白细胞层; 用全血 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司生产] 并按照试剂盒标准实验步骤提取基因组 DNA。用核酸定量仪对提取的 DNA 纯度和浓度进行检测, 符合标准: OD260/OD280 为

1.7 ~ 1.9, 且 OD260/OD230 > 2.0 ; 琼脂糖凝胶电泳检测电泳检测胶图中 DNA 条带单一、清晰、无杂质, 没有弥散、拖尾现象。将所有样本 DNA 浓度稀释至 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。DNA 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.3 TaqMan 探针基因分析 SNP 检测: QuantStudio™ 6 型实时荧光定量 PCR (TaqMan) 仪 (ABI 公司, 美国) 进行检测。操作步骤: (1) 配置预混液: 将通用型荧光定量 PCR 预混液和探针配置成预混液的形式, 每孔反应液体系为通用型荧光定量 PCR 预混液 10 μl , 探针 1 μl , 配置时试剂量比理论试剂量多 10% ~ 15%。(2) 加样: 混匀配置好的预混液后, 在避光环境下将预混液分装到光学 96 孔板中, 每孔反应体系为 11 μl , 然后 DNA 模板单独加, 每孔加基因组 DNA 11 μl 。(3) 基因分型: 加样完毕后用光学封板膜封板, 并离心 1 min。保证孔中无气泡, 将离心后的 96 孔板置于 TaqMan 仪上, 扩增反应条件: 60 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 扩增结束后 TaqMan 仪自动给出基因分型结果。通用型荧光定量 PCR 预混液、探针、购自美国 ABI 公司, 光学封板膜、光学 96 孔板购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件对数据处理, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以频数表示。Hardy-Weinberg 平衡检验、基因频率之间的比较采用 χ^2 检验; 不同基因型的血压及其他计量指标差异采用两独立样本的 t 检验。采用多因素非条件 Logistic 回归分析来评价各因素与高血压的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 EH 组收缩压、舒张压、TG、LDL-C、BMI 显著高于 NT 组 (P 均 < 0.05), 两组年龄、性别、TC、HDL-C 比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡分析 Hardy-Weinberg 平衡结果显示两组 NLRP3 rs10754558、rs3806268 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 (P 均 > 0.05), 样本具有群体代表性。见表 2。

2.3 基因型和等位基因频率分布的比较 NLRP3 基因 rs10754558 位点 GG 基因型在 EH 组明显高于

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床资料	EH 组 (n = 230)	NT 组 (n = 220)	P 值
男/女 (例)	111/119	113/107	>0.05
年龄 (岁)	66.5 ± 6.7	66.3 ± 6.2	>0.05
收缩压 (mm Hg)	173.3 ± 19.1	119.3 ± 13.4	<0.05
舒张压 (mm Hg)	105.2 ± 15.5	82.1 ± 7.8	<0.05
BMI (kg/m ²)	25.6 ± 3.9	24.7 ± 3.5	<0.05
TC (mmol/L)	4.8 ± 0.53	4.6 ± 0.49	>0.05
TG (mmol/L)	1.84 ± 1.01	1.38 ± 0.86	<0.05
LDL-C (mmol/L)	2.63 ± 0.74	2.22 ± 0.43	<0.05
HDL-C (mmol/L)	1.29 ± 0.38	1.34 ± 0.75	>0.05

表 2 两组 rs10754558 和 rs3806268 基因型分布的

组别	H-W 平衡检验						P 值
	rs10754558			rs3806268			
	GG	GC	CC	AA	AG	GG	
EH 组							
实验人数	40	118	72	75	121	34	0.19
预期人数	42.6	112.8	74.6	79.8	111.4	38.8	
NT 组							
实验人数	20	112	88	72	100	48	0.24
预期人数	26.3	99.5	94.3	67.7	108.7	43.7	

表 3 两组 NLRP3 基因多态性分布比较 例 (%)

SNP	基因型	EH 组 (n = 230)	NT 组 (n = 220)	OR 值	P 值	
rs10754558	基因型					
		CC	72 (31.3)	88 (40.0)	1	
		GC	118 (51.3)	112 (50.9)	1.288 (0.859 ~ 1.930)	0.257
		GG	40 (17.4)	20 (9.1)	2.444 (1.314 ~ 4.547)	0.040
	显性模型	CC	72 (31.3)	88 (40.0)	1	
		GC + GG	158 (68.7)	132 (60.0)	0.684 (0.464 ~ 1.707)	0.054
	隐性模型	GG	40 (17.4)	20 (9.1)	1	
		GC + CC	190 (82.6)	200 (90.9)	2.100 (1.188 ~ 3.731)	0.010
	相加模型	GC	118 (51.3)	112 (50.9)	1	
		CC + GG	112 (48.7)	108 (49.1)	0.984 (0.680 ~ 1.425)	0.971
rs3806268	等位基因					
		C	262 (56.9)	288 (65.5)	1	
		G	198 (43.1)	152 (34.5)	1.432 (1.095 ~ 1.875)	0.010
	基因型					
		AA	75 (32.6)	72 (32.7)	1	
		AG	121 (52.6)	100 (45.5)	1.162 (0.765 ~ 1.764)	0.523
		GG	34 (14.8)	48 (21.8)	0.680 (0.394 ~ 1.173)	0.171
	显性模型	AA	75 (32.6)	72 (32.7)	1	
		AG + GG	155 (67.4)	148 (67.3)	0.746 (0.498 ~ 1.118)	0.180
	隐性模型	GG	34 (14.8)	48 (21.8)	1	
	AA + AG	196 (85.2)	172 (78.2)	1.609 (0.991 ~ 2.612)	0.067	
相加模型	AG	121 (52.6)	100 (45.5)	1		
	AA + GG	109 (47.4)	120 (54.5)	0.751 (0.518 ~ 1.088)	0.133	
等位基因						
	A	271 (58.9)	244 (55.5)	1		
	G	189 (41.1)	196 (44.5)	0.842 (0.647 ~ 1.096)	0.203	

NT 组 (17.4% vs 9.1%, $P = 0.040$), 等位基因 G 频率明显高于 NT 组 (43.1% vs 34.5%, $P = 0.010$), 两组在隐性模型 (GG vs GC + CC) 的分布差异有统计学意义 ($P = 0.010$)。rs3806268 位点两组基因型分布及显性模型 (AA vs AG + GG)、隐性模型 (GG vs AA + AG)、相加模型 (AG vs AA + GG) 的分布差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 3。

2.4 高血压危险因素 Logistic 回归分析 将高血压作为因变量, NLRP3 基因 rs10754558 隐性模型 (GG vs GC + CC)、BMI、TG、LDL-C 水平作为自变量, 调整混杂因素后 Logistic 回归分析显示, NLRP3 rs10754558 位点的 GG 基因型仍为高血压病的危险因素 ($OR = 2.436, 95\% CI: 1.238 \sim 4.792, P = 0.01$)。

3 讨论

高血压是其他心血管疾病发生发展之前最常见和最重要的危险因素^[4]。哈萨克族是中国高血压发病率最高的民族之一, 对新疆哈萨克族高血压进行流

行病学调查显示, 其患病率与同地区其他民族相比明显偏高, 且知晓率、治疗率、控制率偏低。本研究选取新疆哈萨克族为研究对象, 因其地域与风俗习惯的原因, 与外界通婚的情况罕见, 故有遗传同源性, 且此民族具有相似的生活方式及饮食习惯, 遗传异质性及较少, 有良好的遗传模式。

NLRP3 炎症小体是一种胞内模式识别受体, 是目前研究最多的 Nod 样受体 (NLR) 家族成员。NLRP3 可被多种外源性或内源性刺激信号激活, 激活后可诱导半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase-1) 的成熟, 促进白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 等促炎细胞因子的分泌^[5]。IL-1 β 具有上调血管紧张素 II (Ang II) 受体表达的功能, 使 Ang II 的作用增强, 促进钠离子在血管及肾脏中的滞留, 进而引起血管的收缩和血管的重建, 最终导致高血压的发生发展^[6]。遗传变异可以影响到 NLRP3 炎症小体的功能, NLRP3 基因位于 1 号染色体 (1q44), 查询 NCBI 数据库发现, 目前为止人类 NLRP3 基因的 SNPs 位点有一千多个。突变

发生在核苷酸寡聚结构域(NACTH)区域的比较多见,其结果可造成 NLRP3 结构的改变,使其在静息状态下因不能进行自我抑制而始终处于激活状态,引起持续性的核因子 κ B (nuclear factor, NF κ B)、caspase-1 激活,导致了自发性的 IL-1 β 和 IL-18 的分泌^[7]。NLRP3 3 号外显子 Q705K 位点(rs35829419)基因多态性对女性心肌梗死具有保护作用^[8]。NLRP3 rs10754558 的遗传多态性可能增加中国人群患缺血性卒中的风险^[9]。Deng 等^[10]研究发现 NLRP3 基因 rs3806268 与中国人群原发性痛风的患病风险相关。

本研究结果发现,NLRP3 基因 rs10754558 不同基因型与哈萨克族高血压关系密切,且 GG 基因携带者在高血压组中高于正常人群,说明 G 等位基因可能与高血压的易感性增加相关。隐性模型,相对于基因频率来说,高血压组较对照组明显升高。且调整了 BMI、LDL-C、TG 后,差异有统计学意义。而未发现 NLRP3 基因 rs3806268 不同基因型与新疆哈萨克族高血压的相关性。Kunnas 等^[11]对芬兰人群研究发现,在 50 岁的研究者中,NLRP3 基因 rs7512998 C 等位基因携带者比 T 等位基因携带者的收缩压和舒张压升高明显,在 NLRP3 rs7512998 等位基因受试者中,其血压升高可能与损伤的线粒体及老化相关活性氧(ROS)产生的 NLRP3 活化的修饰有关,rs10754558 多态性的 G 等位基因可改变 NLRP3 mRNA 稳定性,在 rs10754558 中,含 G 等位基因的特异性构建体活性比含 C 等位基因的高 1.3 倍^[12]。NLRP3 rs10754558 的 GG 基因型的患者更易于发展成冠心病,且 PCI 术后疾病的预后不良^[13]。有研究显示,NLRP3 rs10754558 G 等位基因基因与糖尿病的易感性相关,且 GG 基因型与低密度脂蛋白水平与胰岛素抵抗相关^[14]。Toll 样受体(TLR)是跨膜蛋白,对细胞表面和内溶酶体区域的免疫监视起到非常重要的作用,可识别出广泛的微生物结构和内源性危险信号。在大多数细胞类型中,炎性细胞的激活可被 TLR 激动剂[如脂多糖(LPS)]引发,其诱导 NLRP3 表达的升高^[15]。一旦被激活,NLRP3 可以响应危险信号并形成 NLRP3 炎性体。Schneider 等^[16]研究发现年龄依赖性血压增加与 TLR4 基因 rs4986790 基因型相关,可能表明炎症小体作用的增加与血压升高有关。本研究结果说明 NLRP3 基因 rs10754558 的 GG 基因型与哈萨克族高血压的发生关系密切,但 rs3806268 与哈萨克族高血压的发生无相关性。说明新疆哈萨克族高血压患者的血压升高可能与炎症反应相关,其中也涉及 NLRP3 炎症小体的作用。

参考文献

- [1] Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(3): 213-220.
- [2] De Miguel C, Rudemiller NP, Abais JM, et al. Inflammation and hypertension; new understandings and potential therapeutic targets[J]. Curr Hypertens Rep, 2015, 17(1): 507.
- [3] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. Nature, 2012, 481(7381): 278-286.
- [4] Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, et al. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome[J]. AJP: Heart and Circulatory Physiology, 2012(6): 1219-1230.
- [5] Elinav E, Henao-Mejia J, Flavell RA. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses[J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(1): 4-13.
- [6] Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, et al. Inflammasomes: far beyond inflammation[J]. Nat Immunol, 2012, 13(4): 321-324.
- [7] Griffin D. The Immune Response in Measles; Virus Control, Clearance and Protective Immunity[J]. Viruses, 2016, 8(10): 282.
- [8] Varghese GP, Fransén K, Hurtig-Wennlöf A, et al. Q705K variant in NLRP3 gene confers protection against myocardial infarction in female individuals[J]. Biomed Rep, 2013, 1(6): 879-882.
- [9] Zhu Z, Yan J, Geng C, et al. A Polymorphism within the 3'UTR of NLRP3 is associated with susceptibility for ischemic stroke in Chinese population[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(6): 981-988.
- [10] Deng J, Lin W, Chen Y, et al. rs3806268 of NLRP3 gene polymorphism is associated with the development of primary gout[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 13747-13752.
- [11] Kunnas T, Määttä K, Nikkari ST. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome gene polymorphism rs7512998 (C > T) predicts aging-related increase of blood pressure, the TAMRISK study[J]. Immun Ageing, 2015, 12: 19.
- [12] Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(4): 779-785.
- [13] Zhou D, Wang X, Chen T, et al. The NLRP3 rs10754558 polymorphism is associated with the occurrence and prognosis of coronary artery disease in the Chinese Han population[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 3185397.
- [14] Zheng Y, Zhang D, Zhang L, et al. Variants of NLRP3 gene are associated with insulin resistance in Chinese Han population with type-2 diabetes[J]. Gene, 2013, 530(1): 151-154.
- [15] Zhang A, Wang P, Ma X, et al. Mechanisms that lead to the regulation of NLRP3 inflammasome expression and activation in human dental pulp fibroblasts[J]. Mol Immunol, 2015, 66(2): 253-262.
- [16] Schneider S, Koch W, Hoppmann P, et al. Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with age-dependent systolic blood pressure increase in patients with coronary artery disease[J]. Immun Ageing, 2015, 12: 4.