

· 临床研究 ·

C反应蛋白单核苷酸多态性与睡眠呼吸暂停综合征患者合并高血压的关系

钱小顺¹, 刘伟², 孙静³, 李天志¹, 郭瑞表¹, 孙宝君¹

(解放军总医院南楼临床部: 呼吸内科¹, 保健科³, 北京 100853; ²解放军第302医院呼吸内科, 北京 100039)

【摘要】目的 探讨C反应蛋白(CRP)单核苷酸多态性与阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAHS)合并高血压的关系。**方法** 2006年1月至2012年12月间于解放军总医院行多导睡眠检查, 结果为重度OSAHS的300例男性患者, 其中OSAHS伴高血压者145例, 并随机抽取100例健康男性对照, 采用基因测序的方法, 检测CRP启动区基因rs3091244和rs1205的基因多态性。采用R×C列联表 χ^2 检验统计OSAHS伴高血压组、单纯OSAHS组以及健康对照组之间CRP基因多态性的关系。**结果** OSAHS合并高血压组rs3091244的CT型基因比例增高, 为17%, 而单纯OSAHS组为7%。并且rs3091244的T等位基因频率在OSAHS合并高血压组中也明显增高, 为9%, 而单纯OSAHS组为3%。rs1205的CC基因型在OSAHS合并高血压组中明显升高, 为25%, 而单纯OSAHS组为11%。**结论** CRP的单核苷酸多态性与OSAHS合并高血压有关, rs3091244的CT型基因和rs1205的CC型基因可能通过增加血清CRP水平, 引起体内慢性炎症, 从而在高血压的发生中产生作用。

【关键词】 C反应蛋白质; 睡眠呼吸暂停, 阻塞性; 高血压; 单核苷酸多态性

【中图分类号】 R563.8; R544.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.01.012

Correlation of C-reactive protein polymorphism with hypertension in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome

QIAN Xiao-Shun¹, LIU Wei², SUN Jing³, LI Tian-Zhi¹, GUO Rui-Biao¹, SUN Bao-Jun¹

(¹Department of Geriatric Respiratory Diseases, ³Health Service Office, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Respiratory Diseases, Chinese PLA Hospital No.302, Beijing 100039)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of single nucleotide polymorphism (SNP) of C-reactive protein(CRP) with hypertension induced by obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS). **Methods** A total of 300 male patients diagnosed as severe OSAHS by polysomnography in our department from January 2006 to December 2012 were enrolled in this study. One hundred and forty-five of them were identified having hypertension. Another 100 healthy males randomly sampled served as normal controls. SNPs of the promoter region of CRP rs3091244 and rs1205 were detected in those OSAHS patients with or without hypertension, and health individuals. Statistical analysis was performed to evaluate the correlation between SNP of CRP and OSAHS with or without hypertension. **Results** The frequency of CT genotype in CRP rs3091244 was significantly higher in the OSAHS patients with hypertension than those without (17% vs 7%), so was the frequency of T allele in rs3091244 (9% vs 3%). The frequency of CC genotype in CRP rs1205 was also higher in the OSAHS patients with hypertension than those without (25% vs 11%). **Conclusion** CRP SNP is correlated with hypertension in the OSAHS patients. The CT genotype of CRP rs3091244 and the CC genotype of rs1205 may cause chronic inflammation and promote the occurrence of hypertension through enhancing serum CRP level.

【Key words】 C-reactive protein; sleep apnea, obstructive; hypertension; single nucleotide polymorphism

This work was supported by the Major Clinical Innovative Pre-research Program of Chinese PLA General Hospital (2012FC-CXYY-4006).

Corresponding author: QIAN Xiao-Shun, E-mail: qianxs@yahoo.com

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS)是继发性高血压的首要原因^[1]。慢性炎症是OSAHS引起继发

性高血压的重要因素^[2]。我们以前的研究发现, OSAHS引起慢性炎症存在不均质性, 相同程度的OSAHS引起慢性炎症的程度并不相同, 并且与

收稿日期: 2014-09-05; 修回日期: 2014-12-04

基金项目: 解放军总医院临床重大创新预研项目(2012FC-CXYY-4006)

通信作者: 钱小顺, E-mail: qianxs@yahoo.com

OSAHS相关高血压的发生密切相关,另外,炎症因子的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)在其中起重要作用^[3]。C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是临床上重要的炎症因子,是众多疾病炎症程度的重要判断指标。我们既往的研究发现血清CRP水平与OSAHS相关高血压的发生有关^[4]。本研究主要观察CRP的SNP与OSAHS合并高血压的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2006年1月至2012年12月间于解放军总医院做OSAHS检查的相关患者。按纳入标准募集300例OSAHS患者,均为男性汉族,其中145例合并高血压。本组OSAHS患者合并高血压均在OSAHS发生后1~10(5.4±3.3)年出现。OSAHS的诊断参照2011年中华医学会睡眠呼吸障碍组确定的标准^[5],均为重度患者。高血压诊断标准参照2010年《中国高血压防治指南》^[6],收缩压≥140mmHg(1mmHg=0.133kPa)和(或)舒张压≥90mmHg。根据是否合并高血压,将患者分为OSAHS合并高血压组(145例)和单纯OSAHS组(155例)。同时募集同期健康受试者100例,均为汉族男性,做为健康对照组。

1.2 方法

所有患者均在睡前测量身高、体质量、血压,并进行OSAHS和高血压疾病的询问和嗜睡问卷调查,行≥7h的整夜多导睡眠图(polysomnography, PSG)监测。晨起后抽取静脉血5ml,其中2ml用EDTA抗凝,置于-20℃冰箱用于提取基因组DNA,另外3ml非抗凝血分离血清后用于空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)等指标的检测。

1.3 SNP分析

(1)基因组DNA的抽提:常规酚-氯仿法抽提基因组DNA,紫外分光光度计检测DNA的质与量,

低温冰箱保存。(2)引物合成:引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,各位点引物序列,见表1。(3)多重PCR扩增:PCR反应体系DNA 1μl, 10×PCR缓冲液1.5μl, MgCl₂ 1.5μl, dNTP 0.3μl, 引物混合0.15μl, Taq酶0.3μl, 去离子水补至15μl。扩增条件:95℃ 3min, 94℃ 15s, 60℃ 15s, 共11个循环, 72℃ 30s, 然后进行94℃ 15s, 54℃ 15s, 72℃ 30s, 共24个循环, 最后72℃ 3min。(4)PCR产物纯化:PCR扩增后取3μl PCR产物用Exo I和FastAP纯化(Exo I去除反应产物中的剩余引物, FastAP去除反应中剩余的dNTP)。具体为PCR产物3μl, Exo I 0.2μl, Fast AP 0.8μl, Exo I 缓冲液0.7μl, 去离子水补至7μl, 37℃ 15min, 80℃ 15min, 纯化后进行延伸反应, 预先混好延伸引物。(5)延伸反应:PCR产物2μl, Snapshot Mix试剂1μl, 延伸引物混合2μl, 去离子水补至6μl。条件为96℃ 1min, 然后96℃ 10s, 52℃ 5s, 60℃ 30s, 共30个循环。(6)测序:取1μl延伸产物, 加8μl上样, 95℃变性3min, 立即冰水浴, 上测序仪(型号ABI 3730XL)测序。

1.4 统计学处理

所有数据统计均使用SPSS17.0统计软件包完成。以Hardy-Weinberg平衡检查样本是否具有群体代表性。CRP基因型及等位基因频率采用直接基因计数法计算, 基因频率及基因型频率比较采用R×C列联表χ²检验; 组间的比较采用t检验(正态分布), 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRP的SNP分析

rs3091244的基因类型以CC型和AC型为主, CC型和AC型在各组之间的基因频率分布差异无统计学意义(P>0.05)。但rs3091244的CT型基因在OSAHS合并高血压组与单纯OSAHS组的基因频率分布差异有统计学意义, OSAHS合并高血压组CT型基因比例较单纯OSAHS组增高(P<0.05)。并且OSAHS合并高血压组rs3091244的T等位基因频率也较单纯OSAHS组明显增高(P<0.05; 表2)。

表1 CRP基因SNP位点
Table 1 Position of CRP polymorphism

Position of polymorphism	Sequence of primers	Length of fragments(bp)	Content of GC(%)
rs3091244	F: CTCTATGATTTGGGCTGAAGT R: CCACTTTGGCTATCTATCCTG	120	45.83
rs1205	F:GGTCCAGACAAGGCTGATTC R:TGGACTTTGGGAGTGAGACAT	205	51.71

表2 CRP基因型分析
Table 2 Genotyping analysis of CRP

[n(%)]

Genotype	OSAHS with hypertension group(n = 145)	OSAHS group(n = 155)	Health control group(n = 100)
rs3091244			
CC	81 (56)	85 (55)	60 (60)
AC	37 (26)	56 (36)	28 (28)
CT	25 (17)*	11 (7)	11 (11)
AA	2 (1)	3 (2)	1 (1)
A	41 (14)	65 (21)	30 (15)
C	224 (77)	237 (76)	159 (79)
T	25 (9)*	11 (3)	11 (6)
rs1205			
CC	36 (25)**	17 (11)	15 (17)
CT	61 (42)	76 (49)	46 (46)
TT	48 (33)	62 (40)	39 (39)
C	133 (46)	110 (35)	76 (38)
T	157 (54)	200 (65)	124 (62)

CRP: C-reactive protein; OSAHS: obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. Compared with OSAHS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

rs1205的基因类型有CT型、TT型和CC型3种, CT型和TT型基因在各组之间的基因频率分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。但rs1205的CC基因型在OSAHS合并高血压组中明显高于单纯OSAHS组($P < 0.05$)。各基因型在对照组与单纯OSAHS组和OSAHS合并高血压组之间差异均无统计学意义($P > 0.05$; 表2)。

3 讨论

慢性炎症是OSAHS相关高血压发病的重要原因之一^[7]。CRP是在炎症时由白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)诱导肝脏合成的一种典型的急性时相蛋白,是临床上判断炎症发生、发展和程度的敏感指标^[8]。CRP基因多态性与炎症的程度相关^[9]。我们既往的研究发现,OSAHS相关高血压的发病存在不均质性,相同严重程度OSAHS引起慢性炎症的程度并不相同^[10],CRP和IL-6等炎症因子在OSAHS相关高血压患者中明显升高^[11]。其原因考虑可能与炎症因子的SNP有关。

国外测序研究发现,CRP基因的SNP在不同人群中存在较大差异,在非洲黑人中发现30个SNP^[12],欧美白人中发现13个SNP^[13],亚裔混合人群(中国人、日本人和南亚人)中发现17个SNP^[14]。国内刘海行等^[15]对正常汉族自然人群血清CRP水平按十分位进行分层,观察CRP基因多态性与血清CRP的关系。研究发现血清CRP高水平组中rs3091244T等位基因频率高于低水平组,说明rs3091244T等位基因与汉族自然人群中血清高CRP水平有关。他们还发现rs1205T等位基因携带者中rs3091244T的血清

CRP水平是rs3091244G的21倍,因此认为rs1205对rs3091244的T等位基因高CRP水平有效修正作用。即rs1205T等位基因会使rs3091244T的作用进一步放大。日本学者Morita等^[16]发现,rs3091244T等位基因与正常人血清CRP水平相关,高水平CRP人群中,rs3091244T等位基因频率增高。说明在亚裔人群中rs3091244T等位基因与血清高CRP水平可能具有一定的普遍性。他们还发现rs3091244T等位基因与脉搏波速率(pulse wave velocity, PWV)相关,说明rs3091244T等位基因可能是一个重要的功能基因。

我们的研究发现,在OSAHS合并高血压组中,rs3091244的CT型基因频率高于单纯OSAHS组,提示rs3091244的CT型基因可能与OSAHS合并高血压有关。我们既往的研究发现OSAHS合并高血压组患者血清中CRP水平明显增高,因此认为rs3091244的CT型基因可能通过增加血清CRP水平,引起体内慢性炎症,从而在高血压的发生中产生作用。

我们的研究还发现,rs1205的CC基因型在OSAHS合并高血压组中明显升高,为25%,而单纯OSAHS组为11%,说明其在OSAHS合并高血压的过程中也具有重要作用。刘海行等发现rs1205等位基因会在正常状态时对rs3091244基因的功能有放大作用,我们认为rs1205的CC基因型在疾病状态下也可能具有直接增加血清CRP的作用。

综上所述,我们的研究显示,CRP的SNP与OSAHS合并高血压有关,rs3091244的CT型基因和rs1205的CC型基因可能通过增加血清CRP水平,引起体内慢性炎症,从而在高血压的发生中产生作用。

【参考文献】

- [1] Mohsenin V. Obstructive sleep apnea and hypertension: a critical review[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2014, 16(10): 482.
- [2] Cohen DL, Townsend RR. Obstructive sleep apnea and hypertension[J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2013, 15(10): 703.
- [3] Li TZ, Qian XS, Guo RB, *et al.* Relation between TNF- α polymorphism and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome accompanying hypertension[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2013, 34(12): 1265-1268. [李天志, 钱小顺, 郭瑞表, 等. TNF- α 基因多态性与睡眠呼吸暂停低通气综合征合并高血压的关系[J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34(12): 1265-1268.]
- [4] Li XH, Qian XS, Li TZ, *et al.* Obstructive sleep apnea syndrome complicated by hypertension and insulin resistance[J]. *Acad J Chin PLA Postgrad Med Sch*, 2010, 31(4): 339-340. [黎晓晖, 钱小顺, 李天志, 等. 睡眠呼吸暂停综合征合并高血压与胰岛素抵抗的研究[J]. *军医进修学院学报*[J]. 2010, 31(4): 339-340.]
- [5] Chinese Society of Respiratory, Chinese Medical Association. The Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome (2011 Revision)[J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2012, 35(1): 9-12. [中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(2011年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 9-12.]
- [6] Writing Group of Chinese Guidelines for the Management of Hypertension. 2010 Chinese Guidelines for the Management of Hypertension[J]. *Chin J Hypertens*, 2011, 19(8): 701-743. [《中国高血压防治指南》修订委员会. 中国高血压防治指南2010[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19(8): 701-743.]
- [7] Qian XS, Liu CT. Advances in research of chronic low-grade systemic inflammation caused by obstructive sleep apnea syndrome[J]. *Acad J Chin PLA Postgrad Med Sch*, 2009, 30(3): 399-400. [钱小顺, 刘长庭. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征致慢性低度系统性炎症的研究进展[J]. *军医进修学院学报*, 2009, 30(3): 399-400.]
- [8] Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, *et al.* Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(4): 678-683.
- [9] Kocarnik JM, Pendergrass SA, Carty CL, *et al.* Multi-ancestral analysis of inflammation-related genetic variants and C-reactive protein in the population architecture using genomics and epidemiology study[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7(2): 178-188.
- [10] Qian XS, Li TZ, Sun BJ, *et al.* Correlation between interleukin level and hypertension in obstructive sleep apnea syndrome patients[J]. *Acad J Chin PLA Postgrad Med Sch*, 2009, 30(3): 349-350. [钱小顺, 李天志, 孙宝君, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患者炎症因子水平与合并高血压病关系的研究[J]. *军医进修学院学报*, 2009, 30(3): 349-350.]
- [11] Qian X, Yin T, Li T, *et al.* High levels of inflammation and insulin resistance in obstructive sleep apnea patients with hypertension[J]. *Inflammation*, 2012, 35(4): 1507-1511.
- [12] Crawford DC, Sanders CL, Qin X, *et al.* Genetic variation is associated with C-reactive protein levels in the Third National Health and Nutrition Examination Survey[J]. *Circulation*, 2006, 114(23): 2458-2465.
- [13] Verzilli C, Shah T, Casas JP, *et al.* Bayesian meta-analysis of genetic association studies with different sets of markers[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(4): 859-872.
- [14] Crawford DC, Yi Q, Smith JD, *et al.* Allelic spectrum of the natural variation in CRP[J]. *Hum Genet*, 2006, 119(5): 496-504.
- [15] Liu HH, Zhao D, Wang W, *et al.* Gene sequencing of C-reactive protein and the association between its polymorphisms and serum concentration[J]. *J Cardiol Pulmo Dis*, 2010, 29(6): 521-524. [刘海行, 赵冬, 王薇, 等. C-反应蛋白全基因测序及基因变异与血清水平的关联[J]. *心肺血管病杂志*, 2010, 29(6): 521-524.]
- [16] Morita A, Nakayama T, Doba N, *et al.* Polymorphism of the C-reactive protein (CRP) gene is related to serum CRP level and arterial pulse wave velocity in healthy elderly Japanese[J]. *Hypertens Res*, 2006, 29(5): 323-331.

(编辑: 周宇红)