

热休克蛋白 60基因多态性和抗体水平及其与冠心病的关系

张晓敏¹, 何美安¹, 王静¹, 程龙献², 周莉¹, 曾和松³, 陈樱², 张莉², 邬堂春^{1*}

(1 华中科技大学同济医学院公共卫生学院环境与健康教育部重点实验室, 湖北 武汉 430030 2 华中科技大学协和医院, 湖北 武汉 430030 3 华中科技大学同济医院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 探讨热休克蛋白 60 (Hsp60) 基因多态性和抗体水平及其与冠心病 (CHD) 的关系。方法 采用病例对照研究, 选取未治疗过的 CHD患者 615例, 对照以年龄 (± 1) 岁和性别以 1:1 与 CHD组匹配共选取 615例。采用间接酶联免疫吸附法测定血浆 Hsp60 抗体水平; TaqMan-MGB 探针检测 hsp60 基因上 rs2340690、rs788016、rs2565163 和 rs2305560 四个单核苷酸位点的多态性 (SNPs)。结果 CHD 组的 Hsp60 抗体水平显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。上述 4 个 SNPs 的基因型频率在 CHD 组和对对照组之间差异均无统计学意义, 采用多元 Logistic 回归分析, 对年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压史、糖尿病史和家族 CHD 史等因素进行校正后, 未发现 4 个 SNPs 的任一基因型与 CHD 的危险度有关联; 多因素协方差分析校正了以上混杂因素后, CHD 组和对对照组 hsp60 基因 4 个 SNPs 不同基因型之间的血浆 Hsp60 抗体水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 Hsp60 抗体可能与 CHD 发病有关, hsp60 基因的多态性和抗体水平与 CHD 风险均没有显著性关系。

关键词: 热休克蛋白 60 抗体; 基因多态性; 冠心病

中图分类号: R541.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)05-0283-04

Heat shock protein 60 (Hsp60) gene polymorphism and its relationship with Hsp60 antibody level and coronary heart disease risk in Chinese

ZHANG Xiaomin¹, HE Meian¹, WANG Jing¹, CHENG Longxian², ZHOU Li¹, ZENG HESong³, CHEN Ying², ZHANG Li², WU Tangchun^{1*}

(1 Education Ministry Key Lab for Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2 Department of Cardiology, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3 Department of Cardiology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the heat shock protein 60 (Hsp60) gene polymorphisms and its relationship with the level of antibody to Hsp60 (anti-Hsp60) and the risk of coronary heart disease (CHD) in Chinese. Methods 615 CHD without treatment and 615 age and sex frequency matched controls were selected for a case-control study. Levels of anti-Hsp60 antibody in plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The genotypes of 4 tagged single nucleotide polymorphisms (tagSNPs) — rs2340690, rs788016, rs2565163 and rs2305560 were tested with TaqMan-MGB probes. Results The results showed that level of anti-Hsp60 was significantly higher in CHD group than that in controls ($P=0.000$), but there was no significant difference in the frequencies of genotypes of 4 selected SNPs between CHD group and control ($P>0.05$). After the adjustment for age, sex, smoking, drinking, hypertension, diabetes and CHD family history etc. with multivariate Logistic regression analysis, no any relation was found between plasma anti-Hsp60 level and genotype of the 4 SNPs ($P>0.05$). Conclusions The results suggested that the plasma level of anti-Hsp60 antibody might be associated with CHD, but there was no significant relation was found between polymorphisms in rs2340690, rs788016, rs2565163 and rs2305560 positions of hsp60 gene and the Hsp60 antibody level or the CHD risk in Chinese.

Key words: Heat shock protein 60 Antibody Gene polymorphism Coronary heart disease (CHD)

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是一种多

因素的疾病, 自身免疫反应被认为是其中重要的发病机制之一^[1]。热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 是一类可能的自身免疫原性蛋白, 在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥重要作用^[2]。有研究发现人类 Hsp60 的 IgG 抗体水平升高与 CHD 及其严重程度密切相关^[3,4], 然而也有研究得出相反的结论^[5,6]。推

收稿日期: 2008-01-24; 修回日期: 2008-07-28

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30430590)

作者简介: 张晓敏 (1970-), 女, 博士生, 研究方向: 分子流行病学。

*: 通讯作者, 教授, Email: wu@mails.tjtu.edu.cn

测这些不一致的结果可能系研究人群的不同以及较小的样本量所致。

最近一篇报道^[7]提示,循环的 Hs60 抗原在不同种族的人群中有显著性差异;遗传变异可能对 Hs60 抗原、抗体的产生有重要影响,某些位于基因内部的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 有可能直接影响蛋白质结构或表达,决定抗原的基础水平或者导致其免疫原性改变,诱导机体产生不同类型和水平的抗体。有研究报道 176 个男性健康个体中, L6 的 -174 位点基因多态性与血清 Hs60 抗体水平明显相关,此位点等位基因 C 的携带者 Hs60 抗体水平明显降低^[8]。迄今为止,尚没有关于中国人群的 h60 基因多态性与其自身抗体水平以及 CHD 关系的报道。本研究共选取了 615 对 CHD 对照人群,旨在了解中国汉族人群中 h60 基因多态性和抗体水平及其与 CHD 的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

CHD 病例主要来自于 2004 年 5 月至 2006 年 10 月武汉城区三大医院住院患者。所有患者诊断依据 WHO 诊断标准或经冠脉造影显示有一支或一支以上冠脉狭窄 $\geq 50\%$ 者,共选取 40~79 岁的未治疗过的 CHD 病人 615 例,有瓣膜病、非动脉粥样硬化性心肌病的患者皆未入选。对照则选自与病例居住区域相同的居民,以相近年龄 (± 1 岁) 和相同性别以 1:1 比例与病例组匹配,共 615 例。正常对照经过询问病史、体格检查、心电图和一般生化指标检查,无 CHD、无恶性疾病、无严重的肝、肾及其他器官疾病者方可入选。采用 Interhear 调查表收集研究对象的一般情况,包括既往史、家族史、生活方式等,并取得研究对象“知情同意书”。抽取空腹肘静脉血 6 ml 注入 EDTA-K₂ 抗凝管,1 000 r/min 离心 10 min 分离出血浆和全血, -80 °C 冻存。

1.2 方法

1.2.1 间接酶联免疫吸附分析法测定 Hs60 抗体如文献所述^[9-11],酶标板包被重组人 Hs60 蛋白 (0.5 μ g/ml),每孔加 100 μ l, 4 °C 过夜。洗涤 3 次,加封闭液 (含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 液) 100 μ l, 37 °C 摇床放置 2 h 洗涤同前。加 1:50 稀释的血浆和倍比稀释的标准品 (兔抗人 Hs60 多克隆抗体),每孔 100 μ l 同时作稀释液对照。每份样品和不同浓度的标准品以及对照均设两个平行孔, 37 °C 摇床放置 2 h 洗涤同前。血样孔加 HRP 羊抗人 IgG (1:3 000),标准孔加 HRP 羊抗兔 IgG (1:3 000),每

孔 100 μ l 放置摇床 37 °C 1 h 洗涤 5 次后加 TMB 显色液 100 μ l 室温 15 min 加 2 mol/L H₂SO₄ 终止液每孔 100 μ l 用酶联免疫检测仪记录 450 nm 读数,以标准品浓度 (U/ml) 的对数值为横坐标,相应 OD 值为纵坐标,以不同稀释度标准品 OD 值减零孔 OD 值绘制标准曲线,并根据标准曲线计算样本血浆抗 Hs60 抗体水平。

1.2.2 h60 基因 tagSNPs 选择 依据 HapMap 数据库关于中国人群 h60 基因的 SNPs 为基础,以最小等位基因频率 (MAF) ≥ 0.2 和 $r^2 \geq 0.8$ 为入选标准,共选取 3 个 SNP 作为 tagSNPs, 分别为 r2304690、r788016 和 r2565163。同时根据本实验室前期对 h60 的测序结果,以 MAF ≥ 0.1 为原则,利用 hSNPedit 软件选取了 r1116734 位点,但由于此 SNP 位点合成探针困难,同时不适合进行限制性片段长度多态性基因分型,所以在与 r1116734 相隔 745 bp 处选取了另一个 SNP 位点 r2305560 替代。

1.2.3 TaqMan 探针基因分型 取 300 μ l 全血按 PUREGENE DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 抽提。采用 AB 公司的 TaqMan 基因分型试剂盒进行四个位点的基因分型。按公司推荐的反应体系和条件在 ABI7900 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应并读板分析。5 μ l PCR 反应体系包含 5~10 ng 基因组 DNA、2.5 μ l 的 2 \times PCR MasterMix、0.125 μ l 的上下游引物和探针 (40 pmol/ μ l)。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min 随即进入 PCR 循环, 95 °C 变性 15 s 退火和延伸温度均为 60 °C 1 min 共 49 个循环。所扩增的目的基因片段由于 SNPs 位点的碱基不同,标记呈不同的荧光,利用荧光发光特点,通过 ABI7900HT 基因分析仪检测, SDS 2.1 软件分析基因分型结果。

1.2.4 生化指标的检测 血糖、血清总胆固醇和甘油三酯的检测均采用临床标准检验方法,应用全自动生化仪分析。

1.3 统计学处理

全部数据应用 SPSS 2.0 软件包进行统计分析。Hs60 抗体水平分布为偏态分布,经对数转换后均为正态分布,所有结果以对数值表示。两组计量资料采用两独立样本均数检验;分类资料组间比较以及各基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验均采用卡方检验;多元 Logistic 回归模型计算不同基因型人群发生 CHD 的 OR 值;多因素协方差分析比较不同基因型人群的抗体水平。

2 结果

2.1 研究人群的一般资料

如表 1 所示, 病例组和对照组年龄和性别差异均无统计学意义; 病例组的空腹血糖和总胆固醇水平显著高于对照组; 病例组和对照组吸烟状况差异显著, 在病例组中过去和现在吸烟人数占 54.0%, 而对照组为 42.9% ($P < 0.01$); 体重指数、血压、甘油三酯和饮酒两组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。另外, 病例组中的高血压、糖尿病、CHD 家族史及 Hs60 抗体水平均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 研究人群的一般情况

变量	对照组 (n=615)	CHD组 (n=615)	P值
年龄 (岁)	58.9 ± 8.87	58.9 ± 8.91	0.995
性别	409 (66.5)	409 (66.5)	1.000
体重指数 (kg/m ²)	24.3 ± 3.3	24.5 ± 3.3	0.346
血压 (mm Hg)			
收缩压	131.5 ± 21.0	132.6 ± 25.0	0.409
舒张压	81.0 ± 11.1	82.5 ± 14.8	0.068
血糖 (mmol/L)	5.29 ± 1.97	6.76 ± 3.54	0.000
总胆固醇 (mmol/L)	4.50 ± 1.10	5.03 ± 1.25	0.000
甘油三酯 (mmol/L)	1.65 ± 1.26	1.72 ± 1.26	0.372
吸烟 (%)			0.000
现在	31.21	25.78	
过去	11.70	28.27	
从未	57.09	45.94	
饮酒 (%)	37.44	39.12	0.404
既往史 (%)			
高血压	31.22	68.94	0.000
糖尿病	6.50	23.98	0.000
CHD家族史 (%)	2.76	8.62	0.000
Hs60 抗体 (U/ml)	1.55 ± 0.21	1.65 ± 0.24	0.000

2.2 Hardy-Weinberg平衡检验

r²340690 和 r²305560 在对照人群的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡规律, P 值分别为 0.40 和 0.34 表明对照人群的 r²340690 和 r²305560 基因分布可反映整体人群基因的分布情况。r⁷88016 和 r²565163 在对照人群中未达到 Hardy-Weinberg 平衡。

2.3 两组基因型频率分布与患 CHD 危险性的关系

由表 2 可见, r²340690、r⁷88016、r²565163 和 r²305560 这四个 SNP 的基因型频率在 CHD 组和对照组之间差异均无统计学意义。采用多元 Logistic 回归分析, 对年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压史、糖尿病史和家族 CHD 史等变量进行校正后, 未发现 4 个 SNP 的任一基因型与 CHD 的危险度有关联。

表 2 h⁶60 基因多态性和 CHD 的关系

基因型	对照组		CHD组		粗 OR (95% CI)	调整 OR (95% CI)
	n	(%)	n	(%)		
r ² 340690						
TT	331	53.91	332	55.99	1.00	1.00
TC	234	38.11	208	35.08	0.89(0.70~1.13)	0.92(0.69~1.22)
CC	49	7.98	53	8.94	1.08(0.71~1.64)	1.24(0.75~2.04)
r ⁷ 88016						
GG	332	54.61	287	53.05	1.00	1.00
AG	221	36.35	201	37.15	1.05(0.82~1.35)	0.95(0.70~1.28)
AA	55	9.05	53	9.80	1.12(0.74~1.68)	1.09(0.68~1.75)
r ² 305560						
CC	338	55.41	342	59.58	1.00	1.00
CT	226	37.05	191	33.28	0.88(0.56~1.38)	1.09(0.64~1.86)
TT	46	7.54	41	7.14	0.84(0.65~1.07)	0.83(0.62~1.10)
r ² 565163						
CC	204	33.17	189	32.20	1.00	1.00
CT	275	44.72	271	46.17	1.01(0.74~1.38)	1.03(0.71~1.49)
TT	136	22.11	127	21.64	1.06(0.82~1.38)	1.07(0.79~1.46)

2.4 h⁶60 基因多态性对血浆 Hs60 抗体水平的影响

如表 3 所示, 采用多因素协方差分析校正了年龄、性别、吸烟、饮酒、体重指数、高血压和糖尿病史等混杂因素后, CHD 组和对照组 h⁶60 基因四个 SNPs 不同基因型之间的血浆 Hs60 抗体水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 h⁶60 不同基因型的血浆 Hs60 抗体水平比较 U/ml

基因型	对照组		CHD组	
	n	Hs60 抗体	n	Hs60 抗体
r ² 340690				
TT	331	1.55 ± 0.22	332	1.65 ± 0.24
TC	234	1.56 ± 0.22	208	1.63 ± 0.26
CC	49	1.52 ± 0.21	53	1.69 ± 0.25
P值		0.814		0.409
r ⁷ 88016				
GG	332	1.54 ± 0.23	287	1.62 ± 0.25
AG	221	1.56 ± 0.21	201	1.66 ± 0.23
AA	55	1.54 ± 0.18	53	1.66 ± 0.22
P值		0.708		0.206
r ² 305560				
CC	338	1.55 ± 0.21	342	1.65 ± 0.24
CT	226	1.56 ± 0.22	191	1.62 ± 0.26
TT	46	1.51 ± 0.23	41	1.66 ± 0.27
P值		0.472		0.525
r ² 565163				
CC	204	1.54 ± 0.20	189	1.66 ± 0.24
CT	275	1.54 ± 0.20	271	1.64 ± 0.25
TT	136	1.56 ± 0.26	127	1.60 ± 0.24
P值		0.893		0.199

3 讨论

很多研究都表明免疫反应参与了 CHD 的发生发展, 而 Hs60 可能作为重要的自身抗原, 参与了动脉粥样硬化的过程, 因许多已知的 CHD 的危险因素, 比如氧化性低密度脂蛋白、高血压、感染和氧化应激等, 都能引起血管内皮细胞和平滑肌细胞 Hs60 的表达增加; 体外实验和动物模型也证实, Hs60 和 Hs60 抗体可通过巨噬细胞和黏附分子促进致炎细胞因子生成, 影响 CHD

的发病进程^[12-13]。尽管 Hs60在 CHD发病机理中的确切作用不是很清楚,有关 Hs60抗体与 CHD关系的流行病学研究结果也不一致^[4-6,14],但本研究是目前有关 Hs60抗体与 CHD关系最大的病例对照研究,不仅年龄和性别有很好的匹配,而且排除了治疗药物的影响。结果显示 CHD组的 Hs60抗体明显高于对照组,提示 Hs60抗体可能与 CHD的发病有关。

人类 hsp60基因位于 2号染色体 2q33.1区,目前 NCB数据库中有 84个 SNP位点,绝大多数位于未转录区和内含子上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> SNP)。目前有关 hsp60基因多态性与疾病的研究极少。2002年对某一法国家庭的研究表明, hsp60基因上的一个错义突变 G+292A多态性与遗传性的痉挛性截瘫有关^[15];另一项研究发现 hsp60基因上的一个 MspI位点多态性与婴儿猝死综合征的发生有关^[16];而 hsp60基因多态性与 CHD的易感性是否相关,目前国内外尚无报道。我们对 hsp60基因 4个位点的多态性与 CHD关系的研究结果发现, hsp60基因上的 4个 SNP的基因型频率在 CHD组与对照组之间较为接近,与患 CHD的危险度之间没有显著性的关联,在校正年龄、性别、吸烟状况、饮酒、高血压史、糖尿病史和家族 CHD史等其他混杂因素后,仍然未发现四个位点中任一基因型的 CHD的危险度有显著性升高 ($P > 0.05$),提示 hsp60基因的多态性可能并不是影响 CHD遗传易感性的因素。由于 CHD是一种多基因的疾病,单基因的某一个或某几个位点的作用对疾病的发生可能只产生微弱影响, hsp60基因上其他 SNP位点的多态性是否有其他重要作用,需要在以后的研究中进一步分析。

蛋白质由基因编码,基因的多态性可能通过改变蛋白质的结构或表达,影响其相应蛋白质的水平或功能,从而导致某些表型的改变。最近 Bross等对 hsp60基因上启动子区 A3172G 3191CC和 C3175G (rs116734)多态性位点和编码区的非同义 SNPs如 A5379G/G559A和 G563A的功能进行了研究,结果未发现上述基因多态性位点影响 Hs60的功能改变^[17]。本研究结果也显示 hsp60四个 SNP位点的基因多态性对血浆 Hs60抗体水平没有明显的影响,但是否可以引起 Hs60蛋白的质的变化如免疫原性的改变、伴侣功能的改变等,尚需要进一步深入探讨。

参考文献:

[1] Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol* 2004 22: 361-403

- [2] Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 22 (10): 1547-1559.
- [3] Zhang X, He M, A, Cheng L, et al. Joint effects of antibody to heat shock protein 60, hypertension and diabetes on risk of coronary heart disease in Chinese [J]. *Clin Chem* 2008 54 (6): 1046-1052.
- [4] Zhu J, Quyyum AA, Rott D, et al. Antibodies to human heat shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis [J]. *Circulation* 2001 103 (8): 1071-1075.
- [5] Huittinen T, Leinonen M, Tenkkanen L, et al. Autoimmunity to human heat shock protein 60, Chlamydia pneumoniae infection and inflammation in predicting coronary risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 22 (3): 431-437.
- [6] Zhu J, Katz R, Quyyum AA, et al. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with coronary calcification levels suggests that of pathogen-triggered autoimmunity in early atherosclerosis [J]. *Circulation* 2004 109 (1): 36-41.
- [7] Shamaei-Tousi A, Stephens JW, Bin R, et al. Association between plasma levels of heat shock protein 60 and cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus [J]. *Eur Heart J* 2006 27 (13): 1565-1570.
- [8] Kiszel P, Fust G, Pesti T, et al. Associations between interleukin-6 genetic polymorphisms and levels of autoantibodies to 60-kDa heat shock proteins [J]. *Hum Hered* 2006 62 (2): 77-83.
- [9] Prohaszka Z, Duba J, Lakos G, et al. Antibodies against human heat shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement activating ability [J]. *Int Immunol* 1999 11 (9): 1363-1370.
- [10] Pockley A G, De Fajó U, Kiessling R, et al. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension [J]. *J Hypertens* 2002 20 (9): 1815-1820.
- [11] Xu Q, Willeit J, Maousi M, et al. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis [J]. *Lancet* 1993 341 (8840): 255-259.
- [12] Tsan M F, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 286 (4): C739-744.
- [13] Erkkila L, Laitinen K, Haasjo K, et al. Heat shock protein 60 autoimmunity and early lipid lesions in cholesterol-fed C57BL/6 B6 mice during Chlamydia pneumoniae infection [J]. *Atherosclerosis* 2004 177 (2): 321-328.
- [14] Kocsis J, Veres A, Vatai A, et al. Antibodies against the human heat shock protein hsp70 in patients with severe coronary artery disease [J]. *Immunol Invest* 2002 31 (3-4): 219-231.
- [15] Hansen J, J, Dur A, Coumou R, Chejka J, et al. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60 [J]. *Am J Hum Genet* 2002 70 (5): 1328-1332.
- [16] Rahim R A, Boyd P A, Ainslie Patrick W J, et al. Human heat shock protein gene polymorphisms and sudden infant death syndrome [J]. *Arch Dis Child* 1996 75 (5): 451-452.
- [17] Bross P, Li Z, Hansen J, et al. Single nucleotide variations in the genes encoding the mitochondrial Hsp60/Hsp70 chaperone system and their disease causing potential [J]. *J Hum Genet* 2007 52 (1): 56-65.