

NGHIÊN CỨU KIỂU GENE CONNEXIN-37 VÀ MỐI LIÊN QUAN CỦA NÓ TRONG BỆNH TĂNG HUYẾT ÁP

Lê Hữu Song*; Nguyễn Trọng Chính*; Nguyễn Đức Hải*
Trần Thị Thanh Huyền*; Nguyễn Thị Thuý*

TÓM TẮT

Để tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến gen connexin 37 với bệnh tăng huyết áp (THA), 42 bệnh nhân (BN) THA và 30 người khỏe đã được đưa vào nghiên cứu. Phân tích gen connexin 37 bằng kỹ thuật RFLP-PCR. 48/72 BN (66,66%) mang kiểu gen Cx37*1 và 23/72 BN (31,9%) có kiểu gen Cx37*1/2 và chỉ có 1 BN mang kiểu gen Cx37*2. Tần suất xuất hiện kiểu gen Cx37*1 giảm và Cx37*1/2 tăng trên nhóm BN THA so với nhóm chứng (62,9% so với 73,3% và 35,7% so với 26,6%). Kiểu gen Cx37*1/2 làm tăng nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường; rối loạn mỡ máu và có liên quan đến tiền sử gia đình. Kiểu gen Cx37*1/2 liên quan đến tăng nồng độ đường máu, tuổi khởi phát mắc bệnh THA. Như vậy, kiểu gen Cx37 có liên quan với bệnh THA.

* Từ khóa: Tăng huyết áp; Connexin 37; RFLP-PCR.

ANALYSIS OF CONNEXIN-37 GENOTYPE AND ITS ASSOCIATION IN PATIENT WITH HYPERTENSION

SUMMARY

To study the association between connexin-37 gene mutation and hypertension, 42 patients with hypertension and 30 healthy control were enrolled in this study. Connexin-37 gene was analyzed by using Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR) assay. There are 48/72 (66,66%) cases with homozygote C (Cx37*1), 23/72 (31.9%) heterozygote C/T (Cx37*1/2) and only 1 patients having homozygote T at nt 1019 (Cx37*2). The Cx37*1 genotype was decreased and Cx37*1/2 genotype was increased in patients compared to control group (62.9% vs 73.3% and 35.7% vs 26.6%). Cx37*1/2 genotype is significantly associated with risk of concurrent diabetes; lipid disorder and family history. Cx37*1/2 genotype is also associated with serum glucose level, age at onset of hypertension. Thus, Cx37 genotype is associated with concurrent diabetes, lipid disorder, family history and age at onset of hypertension.

* Key words: Hypertension; Connexin-37; RFLP-PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự hình thành và phát triển các mảng vữa xơ trong hệ tuần hoàn rất phức tạp, đó là phức hợp tương tác giữa các tế bào nội mạc ở thành mạch và trao đổi giữa tế bào

qua các liên kết hở (hở). Liên kết hở là các kênh trong màng tế bào, các kênh này có chức năng kết nối tế bào xung quanh và cho phép vận chuyển thụ động nhiều phân tử nhỏ đi qua (phân tử LDL). Những kênh

*

**

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

đó được hình thành là nhờ thành phần protein gọi là connexins (Cxs).

Gần đây, người ta đã xác định được biến đổi gen Cx37 tại vị trí 1019, khi đó C đã chuyển thành T. Đột biến này là nguyên nhân làm thay đổi trình tự axit amin, từ proline chuyển thành serine tại vị trí aa 319 [2]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy khi gen Cx37 có dạng 1019C/T, nó làm tăng mức độ dày lên của màng trong động mạch cảnh, trong khi đó các BN có mảng vữa xơ thường có alen C nhiều hơn [3].

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu tìm hiểu mối liên quan của đột biến gen Cx37 với hình thành các mảng vữa xơ, nhưng cho đến nay có rất ít số liệu về đột biến gen Cx37 trong bệnh THA.

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào đề cập đến mối liên quan giữa tính đa hình của gen connexin 37 với bệnh tim mạch nói chung và bệnh THA nói riêng. Do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm khảo sát sơ bộ tần suất các alen của connexin 37 trên BN THA.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

72 BN đưa vào nghiên cứu và chia thành 2 nhóm:

Nhóm 1: 42 BN THA nguyên phát được chẩn đoán dựa theo tiêu chuẩn của WHO/ISH (2003), đang điều trị tại Khoa Nội Cán bộ A1, Bệnh viện TWQĐ 108.

Nhóm 2: 30 người khỏe mạnh, không có bệnh tim mạch, nội tiết, tuổi và giới tương đương với nhóm BN nghiên cứu.

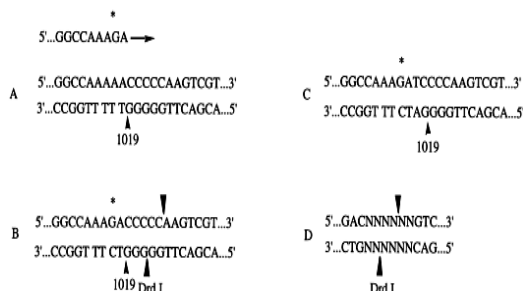
2. Phương pháp nghiên cứu.

Nghiên cứu tiến cứu, mô tả cắt ngang.

* Các xét nghiệm thường quy để chẩn đoán bệnh: huyết học, sinh hoá, miễn dịch, siêu âm, MRI...

* Xét nghiệm phân tích gen connexin 37 tiến hành tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108. Nguyên lý dựa trên kỹ thuật nhân gen kết hợp tính đa hình của một đoạn giới hạn (RFLP-PCR). Các cặp mồi sử dụng: PF: 5'-CTGGACCCACCCCTCAGAATGGCCAAAGA-3' và PR: 5'-AGGAAGCCGTA-GTGCCTGGTGG-3'. Thành phần phản ứng PCR gồm 20 ng ADN template, 1,25 U Taq ADN polymerase, 200 µM dNTP, 1 × Buffer (chứa 10 mmol/l Tris-HCl pH 8,3, 50 mmol/l KCl) và 1,5 mmol/l MgCl₂. Chu kỳ nhiệt như sau: 94°C trong 1 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ gồm: 94°C trong 1 phút, 63°C trong 1 phút, và kéo dài ở 72°C trong 1,5 phút và cuối cùng duy trì 72°C trong 5 phút.

Các sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme *DrdI* ở 37°C trong 3 giờ, sau đó chạy điện di trong thạch agarose 2% và đánh giá kết quả trên máy đọc UV [3].



Hình 1: Nguyên lý của phương pháp RFLP-PCR sử dụng để phân tích gen Cx37 tại điểm 1019. Mồi (primer) được thiết kế có một nucleotide không giống với trình tự gốc để tạo nên một vị trí cho enzyme *Drd* cắt.

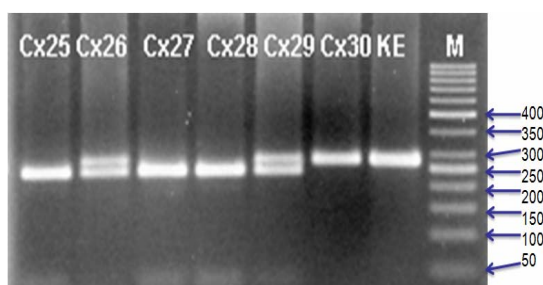
4. Thống kê.

Đánh giá tần suất các alen bằng cách đếm và ghi chép theo bảng χ^2 test. Mối liên quan được tính toán và trình bày dạng tỷ suất chênh OR và khoảng tin cậy (CI).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen Connexin 37.

Tiến hành tách chiết DNA tổng số từ máu của BN và nhóm chứng. Tiến hành chạy PCR, sau đó sử dụng enzyme *DrdI* cắt ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Sản phẩm cuối cùng đã được chạy điện di trên thạch agarose 2%.



Hình 2: Một số hình ảnh xác định đột biến gen connexin 37 bằng RFLP-PCR. Cx25-30 là các mẫu nghiên cứu, KE: không cắt enzyme; M: thang chuẩn. C x 26 và 29 có 2 band với kích thước 240 và 275 b: kiểu gen dị hợp tử Cx37*1/2; Cx25, 27 và 28 có 1 band = 240 bp = đồng hợp tử Cx37*1. Cx30 có 1 band = 275 bp = đồng hợp tử Cx37*2.

2. So sánh phân bố các kiểu gen Cx37 trên các nhóm nghiên cứu.

Bảng 1: So sánh tần suất phân bố các alen của gen connexin 37 trên 2 nhóm nghiên cứu.

NHÓM NGHIÊN CỨU	Cx37*1 (%)	Cx37*2 (%)	Cx37*1/2 (%)
THA (n = 42)	26 (61,9)	1 (2,4)	15 (35,7)
Bình thường (n = 30)	22 (73,3)	0	8 (26,6)
Tổng (n = 72)	48 (66,66)	1 (1,38)	25 (31,96)

Đã xác định được 3 kiểu gen của Cx, trong đó kiểu gen Cx37*1 có tỷ lệ cao nhất (66,66%), sau đó đến Cx37*1/2 (31,96%) và chỉ có 1 BN mang kiểu gen Cx37*2 (1,38%). Tỷ lệ BN THA mang kiểu gen Cx37*1/2 có xu hướng cao hơn so với nhóm khoẻ mạnh, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (35,7% so với 26,6%).

3. Mối liên quan giữa kiểu gen connexin 37 với tình trạng bệnh.

** Mối liên quan với bệnh đái tháo đường kết hợp:*

BN THA mang kiểu gen Cx37*1/2 có nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường kết hợp cao hơn so với BN mang kiểu gen Cx37*1 {OR = 2,8, CI 95% (0,53 - 14,7)}.

Bảng 2: Mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với bệnh đái tháo đường kết hợp.

NHÓM	ĐÁI THÁO ĐƯỜNG KẾT HỢP	KHÔNG
Cx37*1/2 (n = 15)	6	9
Cx37*1 (n = 26)	5	21
Tổng (n = 41)	11	30

** Mối liên quan với rối loạn mỡ máu:*

Tương tự, nguy cơ có rối loạn mỡ máu cũng cao hơn ở nhóm BN THA có kiểu gen Cx37*1/2 {OR = 4,07, CI 95% (0,87 - 19,4), p < 0,05}.

Bảng 3: Mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với rối loạn mỡ máu.

NHÓM	CÓ RỐI LOẠN MỠ MÁU	KHÔNG
Cx37*1/2 (n = 11)	9	6
Cx37*1 (n = 26)	7	19
Tổng (n = 41)	16	25

** Mối liên quan đến tiền sử gia đình:*

Nhóm BN THA có kiểu gen Cx37*1/2 thường có người trong gia đình bị THA hơn là nhóm có kiểu gen Cx37*1 {OR = 4,3, CI 95% (0,51 - 52,99)}.

Bảng 4: Mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với tiền sử gia đình có người THA.

	Có tiền sử gia đình	Không
Cx37*1/2 (n = 15)	4	11
Cx37*1 (n = 26)	2	24
Tổng (n = 41)	6	35

** Mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với tuổi mắc bệnh.*

So với nhóm có kiểu gen Cx37*1, những BN có kiểu gen Cx37*1/2 có tuổi bắt đầu bị THA trẻ hơn (52 ± 6 so với 58 ± 8 tuổi, p < 0,05).

BÀN LUẬN

Các protein tạo thành liên kết hở “connexin” biểu hiện phổ biến trên nhiều cơ quan chịu trách nhiệm về phát triển bệnh THA như hệ nội tiết, thận, não, tim và mạch. Tuy nhiên, có rất ít tài liệu nghiên cứu về sự biến đổi connexin trong bệnh THA [7]. Mặc dù số lượng đối tượng nghiên cứu còn hạn chế, chỉ có 42 BN THA và 30 người khỏe mạnh nhưng chúng tôi cũng đã thấy được một số kết quả rất đáng quan tâm. Cụ thể có 48/72 (66,66%) người

mang kiểu gen Cx37*1, 23/72 (31,9%) có kiểu gen dị hợp tử (Cx37*1/2) và chỉ có 1 BN mang kiểu gen đồng hợp tử T tại vị trí 1019 (Cx37*2). Tần suất xuất hiện kiểu gen Cx37*1 có xu hướng giảm và Cx37*1/2 tăng lên trên nhóm BN THA so với nhóm chứng (62,9% so với 73,3% và 35,7% so với 26,6%).

1. Kết quả của chúng tôi khác biệt so với nghiên cứu khác: Florinda Listi và CS gặp 40,4% dân số mang kiểu gen Cx37*1; 43,5% mang kiểu gen Cx37*1/2 và có tới 15,9% mang kiểu gen Cx37*2 [8]. Tuy nhiên, để khẳng định tần suất phân bố kiểu gen Cx37 trên quần thể người Việt Nam cần phải khảo sát trên số lượng đủ lớn.

2. Phân tích mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với tình trạng mắc bệnh nhồi máu cơ tim người ta thấy alen 1019T gặp nhiều hơn trên nhóm bệnh so với nhóm chứng (43,8% so với 34,4%). Tỷ lệ mang alen 1019T trong nghiên cứu này là 20,3% ở BN THA so với 13,4% trên người khỏe mạnh.

Nghiên cứu chức năng đã chứng minh ảnh hưởng của đột biến tại vị trí 1019 gen Cx37 làm thay đổi axit amin tại codon 319 của protein này. Protein này bố trí tại đầu carbon phía trong tương bào của kênh liên kết hở. Sự chuyển đổi từ proline sang serine có thể làm thay đổi đáp ứng với cơ chế điều hoà như phosphoryl hoá chẳng hạn. Khi tạo ra một vị trí phosphoryl hoá mới, có thể làm tăng khả năng điều biến chức năng của liên kết hở. Điều đó có thể làm thay đổi chức năng tế bào nội mạch, dẫn tới sự tổn thương trong bệnh vữa xơ mạch máu và THA [9, 10].

3. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường kết hợp, rối loạn mỡ máu, tiền sử gia đình, cũng như với tuổi mắc bệnh. Tuy nhiên, do số lượng nghiên cứu còn ít, bệnh THA còn do nhiều nguyên nhân và thường kết hợp với nhiều bệnh cảnh khác nên cần phải nghiên cứu trên phạm vi rộng hơn và bổ sung thêm số liệu về tình trạng vữa xơ động mạch để hiểu hơn về vai trò của các kiểu gen Cx37 trong bệnh lý tim mạch này.

KẾT LUẬN

Mặc dù với số liệu còn hạn chế, nhưng kết quả nghiên cứu là những số liệu đầu tiên về phân bố kiểu gen Cx37 trên quần thể người Việt Nam và trên BN THA. Kết quả cho thấy mối liên quan giữa kiểu gen Cx37 với một số đặc điểm như: bệnh đái tháo đường kết hợp, rối loạn mỡ máu, tuổi khởi phát bệnh, tiền sử gia đình. Tuy nhiên, để có độ tin cậy cao hơn, cần phải nghiên cứu trên số đối tượng lớn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. R. Ross. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999, 340, pp.115-126.
2. G. Richard, J.P. Lin, L. Smith et al. Linkage studies in erythrokeratodermias: fine mapping, genetic heterogeneity, and analysis of candidate genes. J. Invest. Dermatol. 1997, 109, pp.666-671.
3. M. Boerma, L. Forsberg, L. Van Zeijl et al. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development. J. Intern. Med. 1999, 246, pp.211-218.
4. H.I. Yeh, Y. Chou, H.F. Liu, S.C. Chang, C.H. Tsai. Connexin 37 gene polymorphism and

coronary artery disease in Taiwan. *Int. J. Cardiol.* 2001, 81, pp.251-255.

5. Y. Yamada, H. Izawa, S. Ichihara *et al.* Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes, *N. Engl. J. Med.* 2002, 347, pp.1916-1922.

6. A. Hirashiki, Y. Yamada, Y. Murase *et al.* Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low or high-risk subjects defined by conventional risk factors. 2003, 41, pp.1429-1437.

7. Xavier *et al.* Vascular Gap Junctions in Hypertension. *Hypertension.* 2006, 48, pp.804-811.

8. Florinda Listi, Giuseppina Candore, Domenico Lio, Mariangela Russo, Giuseppina Colonna-Romano, Marco Caruso, Enrico Hoffmann, Calogero Caruso. Association between C1019T polymorphism of connexin 37 and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *International Journal of Cardiology.* 2005, 102, pp.269-271.

9. R. Bruzzone, T.W. White, D.L. Paul. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 1996, 238, pp.1-27.

10. C.D. Cooper, J.L. Solan, M.K. Dolejsi, P.D. Lampe. Analysis of connexin phosphorylation sites. *Methods.* 2000, 20, pp.196-204.