

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)04-0364-03

开滦煤矿汉族人群原发性高血压遗传学调查

沈志霞¹ 李宏芬¹ 任 燕¹ 王秀艳² 吴寿岭³(华北煤炭医学院附属开滦医院: ¹ 检验科, ² 神经内科, ³ 心脏内科, 河北 唐山 063000)

Genetic investigation of essential hypertension of Han populations in Kailuan coal mine

SHEN Zhi-Xia¹, LI Hong-Fen¹, REN Yan¹, WANG Xiu-Yan², WU Shou-Ling³¹Department of Clinical Laboratory, ²Department of Neurology,³Department of Cardiology, Affiliated Kailuan Hospital, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

【Abstract】 AIM: To study the role that the angiotensinogen (AGT) gene plays in the pathogenesis of essential hypertension (EH) and investigate the possible association between the AGT gene and the susceptibility to EH in Han populations of Kailuan coal mine. **METHODS:** The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the genotype frequency and polymorphism of the T704C SNP of AGT gene in 1224 individuals. The relationship between the AGT gene and the susceptibility to ET family was analyzed. **RESULTS:** The prevalence of hypertension in the individuals with family EH history was higher than the ones without family EH history (23.3% vs 14.8%, $P < 0.01$). The prevalence of hypertension in the individuals carrying the homozygote for C alleles was higher compared to the individuals with wild type TT genotype ($OR = 5.30$, 95% CI 2.40 ~ 11.74); although the prevalence in the individuals carrying TC genotype was higher than the ones carrying TT genotype, there was no statistically difference ($P > 0.05$); the difference in the individuals with family EH history was more remarkable ($OR = 13.56$, 95% CI : 2.96 ~ 62.18). **CONCLUSION:** Hereditary factor plays an important role in the development of EH and AGT gene may be one of the most key susceptibility genes of EH in Han populations of Kailuan coal mine.

【Keywords】 angiotensinogen; hypertension; family medical history

【摘要】目的: 研究血管紧张素原(AGT)基因在开滦煤矿汉族人群原发性高血压发病中的作用, 探讨可能与高血压家族

收稿日期 2006-08-24; 接受日期 2006-10-10

作者简介 沈志霞, 硕士, 副主任检验师。Tel: (0315) 3025860 Email:

lhf650823@yahoo.com.cn

史有关的遗传易感性。方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法检测 1224 例开滦煤矿汉族人 AGT 基因 T704C 单核苷酸多态性, 结合家族史分析了原发性高血压的家族遗传易感性及同 AGT 基因型之间的关系。结果: 研究人群中, 有家族史的高血压患病率为 23.3%, 明显高于无家族史患病率的 14.8% ($P < 0.01$) 相对于野生 TT 基因型, 携带有突变纯合子 CC 基因型的高血压患病率较高 ($OR = 5.30$, 95% CI 2.40 ~ 11.74) 而携带 TC 基因型的患病率虽亦高于 TT 基因型, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在有高血压家族史的研究人群中表现更显著 ($OR = 13.56$, 95% CI 2.96 ~ 62.18)。结论: 遗传因素在开滦煤矿汉族人群原发性高血压发病中起重要作用, AGT 基因可能是其重要易感基因之一。

【关键词】 血管紧张素原 高血压 家族史

【中图分类号】 R181.32 **【文献标识码】** A

0 引言

原发性高血压(essential hypertension, EH)是遗传因素和环境因素共同作用的结果。流行病学研究显示, 高血压有明显的家族聚集性。据估计, 人群中 20% ~ 40% 的血压变异是由遗传决定的, 而 95% 的原发性高血压为多基因遗传病。肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)在高血压的发病和发展中具有重要作用, 编码该系统蛋白质的基因也成为重要的高血压后选基因, 血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)作为该系统的关键因素, 其基因多态性与原发性高血压的关系成为近年来国内外学者们研究热点之一, 但可能由于研究人群的种族和地区差异、研究对象的入选标准不统一及研究方法等的不同, 并未取得一致的结论^[1-5]。我们检测了 1224 例开滦煤矿汉族人群的 AGT 基因多态性, 结合高血压家族史, 旨在探讨可能与高血压有关的遗传易感性。

1 对象和方法

1.1 对象 调查对象均为开滦(集团)有限责任公司在职员工体格检查者, 其员工来自全国各地, 筛选出汉族, 居住唐山 20 a 以上, 年龄在 20 ~ 60(平均 40 ± 8) a 的员工 1224(男 589, 女 635)例, 其中有高血压家族史的 472 例, 无家族史的 652 例, 检出原发性高

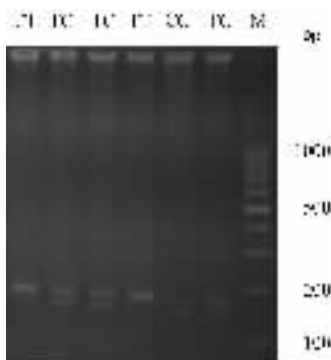
血压 220 例,有和无高血压家族史者各 110 例。依据《1999 WHO/ISH 高血压处理指南》的建议确定 EH 患者,除先证者外,家族中另有或超过两名高血压患者即为有高血压家族史。

1.2 方法

1.2.1 提取基因组 DNA 所有个体均抽取静脉血 5 mL, EDTA 抗凝,低渗法分离白细胞,氯仿/异戊醇法提取 DNA。

1.2.2 基因扩增 ① 引物序列:按参考文献 [6] 设计引物,上游:5'-CGTTTGTGCAGG GCCTGGCTCTC-3',下游 5'-AGGCTGCTGTCCACACTGGACCC-3'(AC 为非配对碱基)。AGT 基因第 2 外显子 704 位点 T 突变为 C,产生一个适合酶切的半位点,与之相应的另一个“半位点”是通过两个非配对碱基(下划线)的引入来完成,这两个非配对碱基并不影响引物的延伸;

② PCR 反应体系:总体积 25 μ L, 无菌去离子双蒸水 13.2 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 溶液 1.5 μ L, dNTP 混合物 3 μ L (2.5 mmol/L), 上、下游引物 2.5 μ L (2.5 mmol/L), Taq 酶 0.8 μ L (83.35 nkat/L) 模板约 0.5 μ g (260:280 > 1.7); ③ PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 66 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min; ④ PCR 产物酶切:总体积 20 μ L, 无菌去离子双蒸水 7.6 μ L, Buffer B 2 μ L, Psy I (亦称 Thr1 III) 内切酶 2.4 μ L (166.70 nkat/L), PCR 扩增产物 8 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜; ⑤ DNA 多态性分析:酶切产物于 25 g/L 琼脂糖凝胶 (EB 染色) 电泳,与 Marker 对照,在紫外灯下观察结果。电泳结果分型:AGT 基因 TT 为野生型,因无酶切位点,显示一条 163 bp 的扩增片段,CC 突变纯合子有一个酶切位点则显示两条 140 bp, 23 bp 片段,TC 为突变型杂合子,显示 163 bp, 140 bp, 23 bp 三条片段。由于 23 bp 片段太小,电泳凝胶紫外灯下观察不到(图 1)。



M: 100 bp Ladder; TT 型: 仅有 163 bp 片段, TC 型: 有 163, 140 bp 片段; CC 型: 仅有 140 bp 片段。

图 1 AGT 基因 PCR-RFLP 结果

统计学处理:全部资料采用 EXCEL97 建库,用 SPSS12.0 统计软件包进行分析。单因素分析采用 χ^2 检验,基因型风险率以比数比(OR)及 95% 可信区间(95% CI)表示;以 Logistic 回归进行危险因素分析,计算校正其他危险因素(包括性别、年龄、体质指数、血清总胆固醇、甘油三酯、尿酸、吸烟、饮酒、打鼾等,有关其与 EH 的相关性,将另见他文报道)后的 OR 值。

2 结果

2.1 高血压家族史与原发性高血压的关系 有高血压家族史的 472 人中,原发性高血压患病率为 23.31%,无家族史的 652 人中,原发性高血压患病率为 14.81%,有家族史的原发性高血压患病率明显高于无家族史的患病率,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 AGT 基因型与原发性高血压的关系 携带野生 TT 基因型的患病率为 16.76%,携带突变纯合子 CC 基因型的高血压患病率为 50.00%,其风险增大了 4.97 倍,且经调整了其他危险因素后,风险性有所增加,达 5.3 倍,携带 TC 基因型高血压患病率增加不明显($P > 0.05$ 表 1)。

表 1 AGT 基因型与原发性高血压关系的比较

基因型	EH	n	患病率(%)	OR 值(95% CI)	调整 OR 值(95% CI)
TT	59	352	16.76	1	1
TC	142	834	17.03	1.02(0.73~1.42)	1.09(0.76~1.58)
CC	19	38	50.00	4.97(2.48~9.95)	5.30(2.40~11.74)

2.3 按家族史分层后 AGT 基因型与原发性高血压关系的比较 在无家族史组中,与携带野生 TT 基因型的人群相比,携带突变 CC 基因型高血压患病风险增加了 4.49 倍,携带 TC 基因型患病风险率增加,但差异并无统计学意义($P > 0.05$);在有家族史组中,与携带野生 TT 基因型的人群相比,携带突变 CC 基因型高血压患病风险增加了 13.56 倍,携带 TC 基因型患病风险率增加,差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 2)。

3 讨论

原发性高血压有明显的家族性和种族性,有家族史的发病率明显升高。一项来自 1432 例青年人的研究^[7]表明,有 EH 家族史的人群,10 a 后收缩压明显比无家族史组高。本研究结果亦提示,有家族史的高血压患病率明显高于无家族史的患病率,进一步证明

了高血压家族史是原发性高血压的危险因素之一。其可能的发病机理是^[8]:有高血压家族遗传因素者, 无论是否患高血压, 均有显著的胰岛素抵抗、超重和血脂、尿酸代谢紊乱。而胰岛素抵抗、超重均受遗传因素影响, 肥胖的遗传缺陷使机体超重或肥胖后产生胰岛素抵抗, 影响血压和机体代谢。

表2 按家族史分层后 AGT 基因型与原发性高血压关系的比较

家族史	基因型	EH	n	患病率 (%)	OR 值 (95% CI)	调整 OR 值 (95% CI)
无	TT	26	216	12.03	1	1
	TC	76	513	14.82	1.27(0.79-2.05)	1.47(0.85-2.54)
	CC	8	23	34.78	3.89(1.51-10.09)	4.49(1.52-13.29)
有	TT	33	136	24.25	2.34(1.33-4.13)	1
	TC	66	321	20.56	1.89(1.16-3.09)	0.88(0.51-1.54)
	CC	11	15	73.33	20.10(5.96-67.77)	13.56(2.96-62.18)

人类 AGT 由肝脏产生, 是 RAS 中唯一初始底物, 经肾素分解, 形成血管紧张素 I (Ang I), 再经血管紧张素转换酶作用, 形成有生物活性八肽血管紧张素 II (Ang II), 可引起血管收缩, 刺激肾脏对钠重吸收, 最终导致血压升高。外周血循环及局部组织中 AGT 微小浓度变化都将十分敏感地影响 Ang II 的浓度。AGT 基因第 2 外显子 ±704 位核苷酸处的胸腺嘧啶 (T) 被胞嘧啶 (C) 所替代, 导致了编码产物第 235 位氨基酸由蛋氨酸 (Met) 变为苏氨酸 (Thr), 即 T704C 突变 (通常亦称 M235T 突变)。自 Jeunemaitre 等^[1]首次发现 AGT 基因 T704C 多态性与高血压相关以来, 随后学者们从不同角度进一步研究, 但其在高血压中确切的发病机制至今未明。本研究结果表明: 携带有突变纯合子 CC 基因型与携带野生型 TT 基因型相比, 高血压患病风险增加了 4.97 倍, 在调整了其他危险因素 (性别、年龄、体重指数、血清总胆固醇、甘油三酯、尿酸、吸烟、饮酒、打鼾等) 之后, 患病风险有所增加, 达 5.3 倍, 证实 AGT 基因型的分布在原发性高血压发病中可能起重要作用。但是 AGT 基因 T704C 位点并不位于肽链的剪切位点, 也不在启动子区域, 因此有研究^[9]认为该位点可能与其他位点的基因突变存在连锁不平衡, 这可能影响到 AGT 转录的基础速率, 而 AGT 在血浆中的浓度是 Ang II 的限速因子, 通过这一机制可能解释 T704C 突变与高血压患病风险性增高有关。

一项涉及到 4013 例日本人的研究^[4]提示, AGT 基因 T704C 多态性在高血压家族史 T704C 等位基因

频率明显增加, 并且存在着种族差异。国内耿茜^[5]等亦曾报道, 中国苏皖地区家族性原发性高血压的发病者群, C 等位基因具有更高的发病危险。为进一步探讨高血压家族史的分子基础, 本研究按有无高血压家族史进一步分层, 将不同基因型高血压患病风险进行对比, 结果发现: 在无家族史的人群中, 携带 CC 基因型与携带 TT 基因型相比, 其患病风险仅增加 4.49 倍, 而在有高血压家族史的研究人群中, 其高血压患病风险增加了 13.56 倍, 提示 AGT 基因多态性与高血压家族史有关, 可能是原发性高血压的遗传易感因素之一。

我们结合高血压家族史, 对 AGT 基因与原发性高血压的关系进行了初步探讨, 但原发性高血压是多基因和多环境共同作用的复杂疾病, 对不同种族人群研究相矛盾的结果亦反映了高血压单一基因的低效性。要彻底阐明高血压的分子遗传机理, 仍需做大量细致的工作。

【参考文献】

- [1] Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen [J]. Cell, 1992, 71: 169-180.
- [2] Sethi AA, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, et al. Angiotensinogen polymorphisms and elevated blood pressure in the general population: the Copenhagen City Heart Study [J]. Hypertension, 2001, 37(3): 875-881.
- [3] Paul M. The rennin-angiotensin system as the basic principle for hypertension and coronary heart diseases-role of genetic factors [J]. Z-Kardiol, 2000, 89(4): 264-268.
- [4] Ishikawa K, Baba S, Katsuya T, et al. T+31C polymorphisms of angiotensinogen gene and essential hypertension [J]. Hypertension, 2001, 37(2): 281-285.
- [5] 耿茜, 杨笛, 方五旺等. MS-PCR 法重新评估血管紧张素原 M235T 多态性与家族性原发性高血压的相关性 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(2): 160-161.
- [6] Kiema TR, Kauma H, Rantala AO, et al. Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure [J]. Hypertension, 1996, 28(6): 1070-1075.
- [7] Dekkers JC, Treiber FA, Kapuku G, et al. Differential influence of family history of hypertension and premature myocardial infarction on systolic blood pressure and left ventricular mass trajectories in youth [J]. Pediatrics, 2003, 111(6): 1387-1393.
- [8] 黄成群. 高血压遗传因素与胰岛素抵抗 [J]. 高血压杂志, 1997, 5(2): 97-99.
- [9] Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, et al. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension [J]. Am J Hum Gene, 1997, 60(6): 1448-1460.