

· 现场调查 ·

17 染色体微卫星多态与原发性高血压
关系的多因素分析

付凌雨 赵彦艳 时景璞 李春义 刘洪 周波

【摘要】 目的 探索 D17S1878 和 D17S932 位点多态性是否与原发性高血压存在关联。方法 在高血压高发区收集 67 个原发性高血压家系的流行病学资料,应用遗传分析仪分析 D17S1878、D17S932 位点的多态性,进行表型不一致家系同胞的病例对照研究,应用 logistic 回归方法进行多因素分析。结果 高血压受累同胞与非高血压受累同胞相比,年龄、男性、饮酒、平均收缩压、平均舒张压、BMI、总胆固醇、HDL-C、LDL-C 均显著高于非高血压受累同胞 ($P < 0.05$)。D17S1878 多态性位点共有 11 个等位基因,其等位基因频率在家系高血压者与非高血压者的分布,经 Fisher's 确切检验差异具有统计学意义 ($P = 0.017$)。D17S932 多态性位点共有 9 个等位基因,其等位基因频率在家系高血压者与非高血压者的分布,经 Fisher's 确切检验差异无统计学意义 ($P = 0.559$)。logistic 多因素分析结果显示,两个位点均没有进入模型,而年龄 ($OR = 1.044, 95\% CI: 1.019 \sim 1.069$)、饮酒 ($OR = 2.644, 95\% CI: 1.778 \sim 3.932$)、性格急躁 ($OR = 3.078, 95\% CI: 1.721 \sim 5.504$)、甘油三酯 ($OR = 1.305, 95\% CI: 1.016 \sim 1.676$)、LDL-C ($OR = 1.787, 95\% CI: 1.296 \sim 2.646$) 进入模型,是原发性高血压的危险因素。结论 在原发性高血压家系中, D17S1878、D17S932 多态性位点可能与原发性高血压无关联。

【关键词】 原发性高血压; 微卫星多态; 遗传易感性

Multivariate analysis on the relationship between polymorphisms on chromosome 17 and essential hypertension FU Ling-yu*, ZHAO Yan-yan, SHI Jing-pu, LI Chun-yi, LIU Hong, ZHOU Bo. *Department of Clinical Epidemiology, the First Affiliated Hospital, Chinese Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: ZHAO Yan-yan, Email: yyzhao@mail.cmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the relationship of polymorphisms of D17S1878, D17S932 sites and essential hypertension. **Methods** Sixty-seven pedigrees were collected at the region with high prevalence of hypertension. The polymorphisms of D17S1878 and D17S932 sites were genotyped using Genetic Analyzer and GeneScan Software. Case-control study in sibs with different phenotype was carried out and logistic analysis was used for multivariate analysis. **Results** There were significant differences on the distributions of age, male, drinking, average systolic pressure, average diastolic pressure, the characteristics of rash, body mass index (BMI), total cholesterol amount, triglyceride, low density lipoprotein (LDL) between the hypertensive-affected sibs and the normotensive sibs ($P < 0.05$). There was significant difference between the affected hypertensive and normotensive sibs in the D17S1878 site ($P < 0.05$), while there was no significant difference in D17S932 ($P > 0.05$). After non-conditional logistic analysis, data showed that both sites were not included in the model, while age ($OR = 1.044, 95\% CI: 1.019-1.069$), drinking ($OR = 2.644, 95\% CI: 1.778-3.932$), the characteristics of rash ($OR = 3.078, 95\% CI: 1.721-5.504$), triglyceride ($OR = 1.305, 95\% CI: 1.016-1.676$), LDL-C ($OR = 1.787, 95\% CI: 1.296-2.646$), as risk factors, were included in the model. **Conclusion** The polymorphisms of D17S1878 and D17S932 possibly were not associated with essential hypertension.

【Key words】 Essential hypertension; Microsatellite; Genetic susceptibility

基金项目: 国家科技攻关计划资助项目(2002BA711A08, 2004BA720A04); 国家自然科学基金资助项目(30671736)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属第一医院临床流行病学教研室(付凌雨、时景璞、周波); 中国医科大学遗传教研室(赵彦艳、李春义、刘洪)

通讯作者: 赵彦艳, Email: yyzhao@mail.cmu.edu.cn

原发性高血压(EH)是遗传因素和环境因素相互作用,以血压升高为主要表现的复杂疾病。由于EH是多个环境因素和多个遗传基因交互作用的结果,所以尽管国内外大量的学者针对EH病因研究开展了许多工作,但是到目前为止,关于EH的病因研究仍无定论。人类的17号染色体在EH的发生中发挥着重要作用,无论是动物试验还是人群研究都提示其在EH发生中的重要作用^[1-6],但是对于其定位尚存在差异^[2,7]。本研究从2001年开始在辽宁省彰武县开展针对EH病因研究。选择EH家系,调查相关的环境和行为危险因素,同时在17号染色体上选择D17S1878和D17S932微卫星多态性位点,应用logistic回归模型进行该地区人群遗传与环境因素的多因素分析。

对象与方法

1. 研究对象:从2003年1月起至2005年12月止,在辽宁省西部地区彰武县,选取符合诊断标准的EH患者,EH诊断执行1999年WHO规定标准,收缩压(SBP)≥140 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)和(或)舒张压(DBP)≥90 mm Hg为EH,排除继发性高血压。如果EH患者家庭里连续两代人有EH,第一代有一人为EH,第二代人中有两人为EH,排除继发性高血压,就可确认为EH家系,收集家系成员的血液样本和资料。共收集家系67个,第二代的同胞共242人,其中男124人(51.24%)、女118人(48.76%),均为汉族。

2. 流行病学调查:采用统一设计的调查表对选定家系的先证者及其亲属进行调查,内容包括:一般状况(年龄、性别、子女数等)、吸烟、饮酒、家族史、既往史、性格等。测量血压、身高、体重、腰围、臀围,计算BMI和腰臀比值(WHR);进行血糖、血清总胆固醇(TC)、HDL-C、TG、LDL-C等生化指标的测定。变量规定:吸烟指平均每天吸香烟1支,连续1年以上;饮酒指每周至少饮用同一类酒1次以上。

血压的测量按国际通用测量方法和质量控制规定进行。血压测量前被测者休息3~5 min,在测量前30 min内禁止吸烟和饮用茶,每人连续测量3次,测量时被测者取坐位,坐于靠背椅上裸露右上臂,肘部置于心脏同一水平,相隔2 min重复测量,取平均值作为最后的血压值。家系中疑似EH患者,多次测量血压及站立测量血压,然后由经验丰富的心血管专科医生明确或排除EH。血清学检测: TG应用

甘油磷酸氧化酶法,血清TC、HDL-C、LDL-C应用终点酶法,血清钾、钠应用电极法,血清钙应用偶氮砷法。

3. 表型不一致的同胞对的病例对照研究:67个高血压家系中,分别进行表型不一致家系同胞的病例对照研究。以受累同胞为病例组,非受累同胞为对照组,进行病例对照研究比较,分析两组之间流行病学资料特征和相关EH危险因素的差异。

4. 基因型检测:①DNA提取与PCR:晨起空腹抽取静脉血5 ml,2% EDTA抗凝,饱和氯化钠法提取外周血基因组DNA。微卫星D17S1878和微卫星D17S932多态位点的PCR引物均由NCBI网站上获得。微卫星D17S1878:上游引物:5'-ACG TCA TAG TCT CTC TAA ACC GTG C-3',下游引物:5'-GTG CTG ACT GGA AAT CTC AAG G-3';微卫星D17S932:上游引物:5'-TAG AAA GTG GTC ACC CTC CC-3',下游引物:5'-TGC AAG ACT GCG TCT CAA A-3'。6-FAM(6-carboxy-fluorescein, PE公司, USA)荧光标记引物。PCR反应体系:DNA(约20 ng/μl)1.0 μl;2×Hotstart工作液5.0 μl;上游引物0.5 μl;下游引物0.5 μl;无菌水补至10 μl。PCR反应条件:D17S1878,94℃ 5 min;94℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 30 s,循环40次;72℃延伸10 min。D17S932,94℃ 5 min;94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s,循环40次;72℃延伸10 min。PCR产物通过等体积酚/氯仿抽提纯化,3 mol/L NaAc(pH值5.2)和无水乙醇沉淀,真空抽干,加水至原体积。②基因型分析:对所有家系成员进行DNA的STR位点检测,取1 μl PCR纯化产物、0.5 μl内标(GeneScan-500 internal standard, PE公司, USA)及12 μl甲酰胺(PE公司, USA),充分混匀,在9600型PCR仪上95℃变性3 min后,置于冰上骤冷,在ABI PRISM™ 3100型遗传分析仪(PE公司, USA)上进行毛细管电泳。电泳介质为POP-4胶,电泳条件为15 kV电泳24 min。毛细管为47 cm×50 μm(内径)。应用ABI PRISM™ 3100型遗传分析仪 GeneScan Analysis 2.02软件进行基因型自动分析。

5. 统计学分析:用SPSS 12.0统计软件对数据进行基本统计量描述及相关危险因素分析;非条件logistic回归用于多因素分析。

结 果

1. 表型不一致家系同胞的流行病学特征和血清

学指标比较:在辽宁省彰武地区收集 67 个家系,在表型不一致的同胞对(242 人)之间进行 EH 相关的流行病学特征和血清学指标的比较,结果见表 1。统计结果显示,在表型不一致的同胞对中,性别、年龄、饮酒、性格急躁以及血脂代谢异常在 EH 组和非 EH 组分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 EH 者的 BMI 值、SBP、DBP、TC、TG、LDL-C 等指标均高于家系成员中的非 EH 者($P < 0.05$)。

表1 表型不一致家系成员和同胞对的流行病学特征和各测量指标的比较($\bar{x} \pm s$)

变 量	高血压同胞 ($n = 200$)	血压正常同胞 ($n = 42$)	P 值
性别(男/女)	110/90	14/28 ^a	<0.05
年龄(岁)	45.15 ± 10.94	38.98 ± 11.18 ^a	<0.05
吸烟(从不/过去/现在)	109/15/76	29/0/13	>0.05
饮酒(从不/过去/现在)	114/12/74	36/1/5 ^a	<0.05
食盐摄入过量(否/适量/过量)	15/67/118	2/19/21	>0.05
性格急躁(是/否)	131/69	19/23 ^a	<0.05
睡眠(正常/不正常)	127/73	28/14	>0.05
平均 SBP(mm Hg)	157.90 ± 27.21	118.43 ± 28.15 ^a	<0.05
平均 DBP(mm Hg)	97.64 ± 15.04	76.27 ± 18.10 ^a	<0.05
BMI(kg/m ²)	25.66 ± 3.78	24.04 ± 3.21 ^a	<0.05
WHR	0.90 ± 0.07	0.88 ± 0.10	>0.05
血糖(mmol/L)	4.57 ± 1.67	4.32 ± 1.82	>0.05
TC(mmol/L)	5.08 ± 1.51	4.09 ± 1.73 ^a	<0.05
TG(mmol/L)	1.88 ± 1.57	1.22 ± 1.00 ^a	<0.05
HDL-C(mmol/L)	1.41 ± 0.56	1.25 ± 0.57	>0.05
LDL-C(mmol/L)	2.65 ± 0.91	2.13 ± 0.97 ^a	<0.05
Na ⁺ (mmol/L)	108.41 ± 58.78	105.88 ± 59.95	>0.05
K ⁺ (mmol/L)	3.21 ± 1.78	3.16 ± 1.81	>0.05
Ca ²⁺ (mmol/L)	2.27 ± 0.74	2.04 ± 0.83	>0.05

注:^a 有统计学意义

2. 微卫星多态性位点与 EH 的关联性分析:

(1)D17S1878 与 EH 的关联性分析:在表型不一致的同胞对中,分析 D17S1878 在 EH 者与非 EH 者之间分布,结果见表 2。检测结果显示,D17S1878 是二核苷酸多态,本研究的家系成员中该位点共有 11 个等位基因,其中 237 bp 即(CA)₁₈ 为频率最高的等位基因型(42.42%),在家系成员中杂合度为 0.682。Fisher's 检验结果显示,D17S1878 位点的等位基因频率在 EH 成员中与非 EH 成员中分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。

(2)D17S932 与 EH 关联性分析:在表型不一致的同胞对中,分析 D17S932 在 EH 者与非 EH 者之间分布,结果见表 3。D17S932 是二核苷酸多态,检测结果显示,本研究的家系成员中分布共有 9 个等位基因,其中 166 bp 即(CA)₁₁ 为频率最高的等位基因型(25.11%),经计算其在家系成员中杂合度为 0.815。Fisher's 检验结果显示,D17S932 位点的等位基因频率在 EH 成员中与非 EH 成员中分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3. 多因素分析:表 1 中单因素分析表明,在家系成员不同表型间存在差异的危险因素,即年龄、性别、性格、饮酒、BMI、TC、TG、LDL-C 等;以及在 EH 组和非 EH 组间存在差异的 D17S1878 位点进入 logistic 模型;另外,将在两组间差异没有统计学意义的 D17S932 位点强行进入 logistic 模型,进行多因素分析(表 4)。表 4 结果显示,在对家系成员研究中,最终年龄、饮酒、性格急躁、TG、LDL-C 进入模型,均为 EH 的危险因素,而检测的两个 STR 位点最终并没有进入模型。

表2 D17S1878 在表型不一致同胞对中的分布

组别	等位基因(bp)										合计	
	217	221	223	225	227	229	231	233	235	237		239
高血压同胞	2(0.52)	127(32.73)	13(3.35)	10(2.58)	2(0.52)	4(1.03)	0(0.00)	16(4.12)	39(10.05)	168(43.30)	7(1.80)	388
血压正常同胞	0(0.00)	33(44.59)	1(1.35)	0(0.00)	4(5.41)	0(0.00)	1(1.35)	3(4.05)	3(4.05)	28(37.84)	1(1.35)	74
合计	2(0.43)	160(34.63)	14(3.03)	10(2.16)	6(1.30)	4(0.87)	1(0.22)	19(4.11)	42(9.09)	196(42.42)	8(1.73)	462

注:Fisher's 检验 $P = 0.017$; 括号外数据为人数,括号内数据为百分比(%)

表3 D17S932 在表型不一致家系成员中的分布

组别	等位基因(bp)								合计	
	158	160	162	164	166	168	170	172		174
高血压同胞	2(0.51)	20(5.10)	22(5.61)	64(16.33)	97(24.77)	79(20.15)	79(20.15)	23(5.87)	6(1.53)	392
血压正常同胞	0(0.00)	3(3.85)	1(1.28)	19(24.36)	21(26.92)	18(23.08)	12(15.38)	3(3.85)	1(1.28)	78
合计	2(0.43)	23(4.89)	23(4.89)	83(17.66)	118(25.11)	97(20.64)	91(19.36)	26(5.53)	7(1.49)	470

注:Fisher's 检验 $P = 0.559$; 括号外数据为人数,括号内数据为百分比(%)

表4 高血压危险因素的多因素分析

变量	β	s_e	Wald χ^2	df	s	Exp(β) (95% CI)
年龄	0.430	0.012	12.012	1	0.001	1.044(1.019~1.069)
饮酒	0.972	0.202	23.080	1	0.001	2.644(1.778~3.932)
性格急躁	1.124	0.297	14.377	1	0.000	3.078(1.721~5.504)
TG	0.266	0.128	4.348	1	0.037	1.305(1.016~1.676)
LDL-C	0.580	0.164	12.537	1	0.000	1.787(1.296~2.464)
常数	-1.794	0.506	12.587	1	0.000	0.166

讨 论

迄今为止,许多相关研究已经证实某些基因的多态性位点与EH存在关联,但是由于该病的异质性和群体分层偏倚,至今尚未确定任何能直接影响疾病表型的EH致病基因。由于EH是环境因素和遗传因素相互作用导致的复杂性疾病,目前认为,遗传因素决定个体的易感性,而环境因素的长期积累不仅可促使遗传现象的显现,甚至可以在一定程度上改变遗传特性。本研究人群来自经济相对落后、人口流动性小、人群混居时间长,人群EH患病率高的辽宁省西部地区,是一个较好的遗传研究资源^[8]。

在本次分析中,为了更准确地进行危险因素的比较,我们将RH家系中的父母(第一代)、子女(第三代)的资料排除,进行表型不一致的同胞对(即同代人)的资料比较。本研究小组已经在该地区大人群众中开展了环境和行为危险因素的研究,本研究进行的以家系内血压正常者为对照组进行的分析,可以在同一的遗传背景下探讨环境和行为危险因素对EH的独立作用。经过单因素分析,发现在表型不一致的同胞对中男性、年龄较大者、性格急躁者均较女性、年龄较轻、性格温和的同胞易患EH,这与大多数的研究结果相同。饮酒、血脂代谢异常以及BMI增加是本EH家系人群的重要危险因素,这与大人群众的研究结果相类似^[9],可能与当地人群中有长期大量饮酒、食用动物油的生活习惯有关,具有这类生活习惯者较易患EH。

两个微卫星位点在EH家系中EH同胞与非EH同胞中,D17S1878位点等位基因频率分布差异具有统计学意义,提示该位点可能与EH的发生有关联。而D17S932位点在EH组和非EH组的等位基因频率分布没有显著性,提示该位点与高血压可能无关联。我们利用非条件logistic回归多因素分析探讨遗传因素和环境、行为危险因素的交互作用模型,结果发现不仅D17S932没有进入回归模型,

而且D17S1878也没有进入回归模型,这有可能是受到本次研究的样本量的限制;也有可能D17S1878位点虽然与EH存在关联,但并不是独立的危险因素,而是与其他因素共同作用发挥其危险因子的作用,这有待于扩大样本量深入研究加以证实。

本研究利用特定EH高发区的家系所提供的流行病学和遗传资料,进行遗传与环境因素的多因素分析。虽然受到家系数目和同胞对数目的限制,尚需进一步对该地区大群体的基因型分析,但也为进一步的EH发生机制研究以及干预研究提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Paigen B, Sugiyama F, Churchill GA, et al. Quantitative trait loci analysis of salt-induced blood pressure elevation in C57BL/6J and A/J mice. *Hypertension*, 1999, 34(2): 333.
- [2] Knight J, Munroe PB, Pembroke JC, et al. Human chromosome 17 in essential hypertension. *Ann Hum Genet*, 2003, 67(Pt 2): 193-206.
- [3] Levy D, DeStefano AL, Larson MG, et al. Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17. Genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the framingham heart study. *Hypertension*, 2000, 36(4): 477-483.
- [4] Gu F, Ge D, Huang J, et al. Genetic susceptibility loci for essential hypertension and blood pressure on chromosome 17 in 147 Chinese pedigrees. *J Hypertens*, 2004, 22(8): 1511-1518.
- [5] Cheung BM, Leung RY, Man YB, et al. Association of essential hypertension with a microsatellite marker on chromosome 17. *J Hum Hypertens*, 2005, 19(5): 407-411.
- [6] Wang RY, Chung CM, Fann CS. Genome-wide scan for quantitative ACE activity in Taiwan young-onset hypertension study. *Hum Hered*, 2008, 65(2): 85-90.
- [7] Knight J, Gardner GT, Clark AJ, et al. Investigation of chromosome 17q as a locus for human essential hypertension in African Caribbeans. *J Hum Hypertens*, 2000, 14(6): 385-387.
- [8] 时景璞, 王海龙, 李辉, 等. 辽宁省彰武县农村人群高血压患病率调查. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(7): 547-550.
- [9] 时景璞, 付凌雨, 董卫, 等. 辽宁省彰武县农村人群高血压危险因素调查. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(8): 734.

(收稿日期: 2008-03-05)

(本文编辑: 尹廉)