

ATP2B1 基因单核苷酸多态性及基因-吸烟交互作用与原发性高血压的关联研究

宋娟娟 张海英 周宏博 李天晓 邓颖

【摘要】 目的 探讨ATP2B1基因单核苷酸多态性及基因-吸烟交互作用与原发性高血压的关联性。方法 以医院资料为基础采用病例对照方法,分析哈尔滨医科大学附属第二医院1 280例原发性高血压住院患者和1 010名当地汉族健康体检对照者。使用德国QIAGEN公司试剂盒提取人血全基因组DNA,应用Snapshot技术检测ATP2B1基因rs17249754位点和对照位点rs6253单核苷酸多态性,利用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。结果 ATP2B1基因rs17249754位点等位基因G的频率在病例组和对照组间的差异有统计学意义($OR=1.223, 95\%CI: 1.083 \sim 1.381, P=0.001$),调整性别、年龄、BMI、吸烟、饮酒后,差异有统计学意义($OR=1.212, 95\%CI: 1.070 \sim 1.373, P=0.003$)。对照位点rs6253等位基因频率在两组间的差异无统计学意义。在不同的生物学模式下,基因型频率的分布均表现出显著差异性:加性模型 $OR=1.469, 95\%CI: 1.121 \sim 1.925, P=0.005$;显性模型 $OR=1.324, 95\%CI: 1.029 \sim 1.704, P=0.029$;隐性模型 $OR=1.123, 95\%CI: 1.031 \sim 1.223, P=0.008$ 。病例组中,吸烟者所占的比例显著高于对照组($P=0.005$)。调整性别、年龄、BMI、饮酒后,基因位点rs17249754和吸烟的交互作用对原发性高血压的影响无统计学意义($OR=1.024, 95\%CI: 0.614 \sim 1.707$)。结论 ATP2B1基因rs17249754位点单核苷酸多态性与北方汉族人群原发性高血压的易感性显著关联;基因与吸烟的交互作用未发现与原发性高血压相关联。

【关键词】 原发性高血压; ATP2B1基因; 单核苷酸多态性; 吸烟; 交互作用

Association between polymorphism of ATP2B1 gene, its interaction with smoking and essential hypertension—a case-control study Song Juanjuan¹, Zhang Haiying¹, Zhou Hongbo², Li Tianxiao^{2,3}, Deng Ying¹. 1 Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, 2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, 3 Grade 2009, Seven-Year Program Basic Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Corresponding author: Deng Ying, Email: ldlrrr@163.com

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. D201204).

【Abstract】 Objective To investigate the association between polymorphism of ATP2B1 gene, its interaction with smoking and susceptibility of essential hypertension. **Methods** A case-control study was conducted to elucidate the role of ATP2B1 gene variants related to the risk of essential hypertension. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). Two SNPs, — rs17249754 and rs6253, were examined on 1 280 patients and 1 010 healthy controls, using a Snapshot method. Statistical analyses were performed with SPSS Windows software (version 19.0; SPSS, Chicago, IL). **Results** A significant difference was found in rs17249754 allele frequency between cases and controls ($OR=1.223, 95\%CI: 1.083-1.381, P=0.001$). After adjustment for age, sex, BMI, smoking and drinking, the difference was still statistically significant ($OR=1.212, 95\%CI: 1.070-1.373, P=0.003$). In addition, data from genotype distribution analysis under different models showed that appeared significant associations between ATP2B1 gene polymorphism and essential hypertension (additive model $OR=1.469, 95\%CI:$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.027

基金项目:黑龙江省自然科学基金(D201204)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第二医院急诊医学科(宋娟娟、张海英、邓颖),生物化学与分子生物学教研室(周宏博、李天晓),2009级基础七年制(李天晓)

通信作者:邓颖, Email: ldlrrr@163.com

1.121-1.925, $P=0.005$; dominant model $OR=1.324$, 95% CI : 1.029-1.704, $P=0.029$; recessive model $OR=1.123$, 95% CI : 1.031-1.223, $P=0.008$). In this study, the proportion of smokers in cases was significantly higher than that in controls ($P=0.005$), but no associations between rs17249754-smoking interaction and essential hypertension were found after the adjustment for gender, age, BMI and alcohol consumption ($OR=1.024$, 95% CI : 0.614-1.707). **Conclusion** Our research findings showed that the polymorphism of ATP2B1 gene rs17249754 was significantly associated with the incidence of essential hypertension in Han population of northeastern China. However, the interaction between rs17249754 and smoking did not seem to have contributed to the occurrence of the essential hypertension.

【Key words】 Essential hypertension; ATP2B1 gene; Polymorphism; Smoking; Interaction

原发性高血压是遗传因素和环境因素共同作用引起的复杂性疾病^[1,2]。近年来GWAS发现了多个高血压的遗传危险因素,其中ATP2B1基因多态性与高血压发生具有显著的相关性。欧洲和亚洲(韩国、日本)人群中,ATP2B1基因多态性均与原发性高血压的发生存在密切关联^[3-8]。我国学者在北方(北京)和南方人群中同样发现ATP2B1基因多态性与原发性高血压的易感性存在密切关联^[9,10],并认为汉族人群的基因型频率存在南北地区梯度^[11,12]。为此本研究以医院资料为基础采用病例对照方法,分析东北地区汉族人群ATP2B1基因单核苷酸多态性与原发性高血压的关联性。由于吸烟是导致高血压的一个重要危险因素,因此将进一步分析基因-吸烟交互作用与原发性高血压危险性的关系。

对象与方法

1. 研究对象:来自2012年5月至2013年5月哈尔滨医科大学附属第二医院住院和参加健康体检的东北地区汉族人群,共2 290人(男性1 227人,女性1 063人)。所有研究对象均为独立个体,无血缘关系,且长期居住于东北地区。病例组为随机选取的因原发性高血压住院治疗患者,均符合1999年WHO/ISH高血压诊断标准,即SBP \geq 140 mmHg, DBP \geq 90 mmHg,或者正在服用降压药物者。排除继发性高血压、心肌病、心瓣膜疾病、先天性心脏病及肾功能衰竭者。对照组为同期健康体检者,SBP $<$ 140 mmHg, DBP $<$ 90 mmHg,且无高血压病家族史。吸烟人群定义为每天吸烟 \geq 5支,时间 $>$ 6个月或戒烟 $<$ 1年者。调查人员经培训合格,以面对面的方式完成调查,收集并统计分析所有受试对象的性别、年龄、身高、体重、BMI、吸烟、饮酒等资料。

2. 基因多态性位点的选择:以SNP位点间不存在连锁不平衡(LD)以及最小等位基因频率(MAF) \geq 0.05的标准,参照以往关于高血压GWAS报道结果^[3-10],进行ATP2B1基因多态性位点的选

择。通过对国际人类基因组计划(HapMap)中国汉族人群ATP2B1基因的数据分析,发现rs17249754与rs2681472、rs2681492、rs11105378、rs11105364有很强的连锁性($D' > 0.95$, $r^2 > 0.88$),且在同一个单倍体区域内,因此本研究选择rs17249754代替整个单倍体区域内的SNP位点。同时选取rs6253为对照位点,验证选取样本有无人群分层作用的影响。

3. 基因组DNA提取:取空腹EDTA抗凝的静脉血300 μ l,应用血液基因组DNA抽提试剂盒(德国QIAGEN公司生产)提取基因组DNA,严格按试剂盒说明书操作。提取的人全基因组DNA产物均经1.5%琼脂糖凝胶电泳确认后于-20 $^{\circ}$ C保存。

4. 基因型分析:采用Snapshot方法检测rs17249754位点的多态性。①PCR扩增引物序列为F:CTG GCT GAG CAA TGT TGG TA, R:GTA GCT TGC AGT GGC AAT CA。PCR反应总体积25 μ l,其中10 \times PCR buffer 2.5 μ l, MgCl₂(50 mmol/L)0.8 μ l, dNTP(10 mmol/L)0.5 μ l,上下游引物各0.5 μ l,模板DNA 1 μ l, Taq酶(5 U) 0.2 μ l, ddH₂O 19 μ l;反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,56 $^{\circ}$ C复性30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共33个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。②PCR扩增产物按照虾碱酶方法纯化,总体积为10 μ l,其中包括2 μ l PCR产物,0.3 μ l SAP(1 U/ μ l),0.2 μ l Exo I(20 U/ μ l),ddH₂O 7.5 μ l,振荡混匀后37 $^{\circ}$ C孵育90 min,75 $^{\circ}$ C保温15 min灭活SAP和Exo I酶,4 $^{\circ}$ C保存24 h。③使用SNaPshot(ABI)试剂盒进行单碱基延伸反应,微测序引物序列为AAG ACC TTC TTA AAT TAC TCC A,反应体系总体积为3 μ l,其中包括1.5 μ l SNaPshot混合液,1 μ l PCR产物,0.5 μ l微测序引物;反应条件:96 $^{\circ}$ C变性10 s,51 $^{\circ}$ C复性5 s,60 $^{\circ}$ C延伸30 s,共25个循环,最后4 $^{\circ}$ C保存。④进行延伸产物纯化,反应体系总体积为5 μ l,其中包括3 μ l延伸产物,0.3 μ l SAP(1 U/ μ l),ddH₂O 1.7 μ l,振荡混匀后37 $^{\circ}$ C孵育1 h,75 $^{\circ}$ C保温15 min灭活SAP酶,4 $^{\circ}$ C保存24 h。⑤最后每个反应体系中加入1 μ l上述纯化延伸产物,与Genescan™-

120LIZ Size Standard 0.2 μl 和去离子甲酰胺 8.8 μl 混合均匀后, 95 °C 变性 5 min, 再利用 ABI 公司的 ABI3730 测序仪和 GeneMapper 4.0 软件对 SNP 位点进行基因分型。基因分型检出率 99.9%。

5. 统计学分析: 数据处理分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的差异采用 *t* 检验。采用 χ^2 检验分析病例组与对照组的基因频率分布是否符合 Hardy-Weinberg (H-W) 遗传平衡定律, 以及基因型、等位基因频率、性别、吸烟、饮酒在两组间的分布差异, 并计算 OR 值及 95%CI。条件 logistic 回归模型分析吸烟与基因型的交互作用。所有统计采用双侧概率检验 ($\alpha = 0.05$), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般特征比较: 病例组吸烟、饮酒人数显著高于对照组 ($P < 0.05$); 两组在年龄、性别、BMI 分布的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 两组人群一般特征比较

特 征	对照组(n=1 010)	病例组(n=1 280)	P 值
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	59.69 ± 9.70	60.46 ± 9.18	0.058
男性	553(54.75)	674(52.66)	0.318
BMI($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	24.18 ± 4.67	25.24 ± 4.73	0.331
吸烟	359(35.54)	529(41.33)	0.005
饮酒	259(25.64)	391(30.55)	0.010

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%)

2. ATP2B1 基因等位基因频率分布的差异: 本研究显示, 位点 rs17249754 和 rs6253 的基因型频率分布符合 H-W 遗传平衡定律 ($P > 0.05$), 样本具有群体代表性。rs17249754 和 rs6253 的最小等位基因频率分别为 0.338 3 和 0.335 5, 与 HapMap 中亚洲人群分布的特点相符合 (表 2)。rs17249754 的危险等位基因 G 分布的频率病例组高于对照组, χ^2 检验差异有统计学意义 ($P = 0.001$); 校正性别、年龄、BMI、吸

表 2 不同种族间 ATP2B1 最小等位基因频率的比较

SNP	最小等位基因	目前研究		HapMap			
		病例组	对照组	非洲人群	美洲人群	亚洲人群	欧洲人群
rs17249754	A	0.338 3	0.384 7	0.17	0.12	0.36	0.14
rs6253	T	0.335 5	0.334 7	0.31	0.19	0.34	0.34

烟、饮酒后, 上述差异仍有统计学意义 ($P = 0.003$)。两组间对照位点 rs6253 等位基因 G 分布的频率则无统计学意义 ($P = 0.949$), 见表 3。

3. 不同遗传模型的 ATP2B1 基因型分布的差异: 3 种生物学模型 (加性模型、显性模型和隐性模型), 经 logistic 回归校正性别、年龄、BMI、吸烟、饮酒后, 进一步分析位点 rs17249754 基因型分布在病例组与对照组的差异 (表 4)。显性模型和隐性模型研究显示, rs17249754 多态性与原发性高血压显著相关 ($P < 0.05$)。加性模型数据显示, 危险等位基因纯合子 GG 显著增加了患病的风险 ($P < 0.05$), 而杂合子 GA 与原发性高血压的易感性则无关联 ($P > 0.05$)。

4. rs17249754 位点单核苷酸多态性和吸烟的交互作用与原发性高血压的关系: 调整性别、年龄、BMI、饮酒后, rs17249754 和吸烟的交互作用对原发性高血压的影响无统计学意义 ($OR = 1.024, 95\%CI: 0.614 \sim 1.707$), 结果见表 5。

讨 论

原发性高血压是一种复杂的多基因遗传疾病, 其病因至今仍不是十分明确。而细胞膜离子转运异常可能为发病机制之一。研究发现, 在高血压大鼠模型和高血压人群中, 存在细胞内钙离子失衡^[13], 即细胞内 Ca^{2+} 浓度增加使血管平滑肌收缩, 血管反应性增强, 导致血压升高。ATP2B1 基因位于人类染色体的 12q21.3 位置上, 编码质膜 Ca^{2+} -ATP 酶 1

表 3 两组人群 ATP2B1 危险等位基因频率分布的差异

SNP	位置	危险等位基因	等位基因频率		调整后等位基因频率	
			P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)
rs17249754	12:90060586	G	0.001	1.223(1.083 ~ 1.381)	0.003	1.212(1.070 ~ 1.373)
rs6253*	12:28115941	G	0.949	1.004(0.887 ~ 1.136)	0.922	0.994(0.879 ~ 1.124)

注: * 对照位点

表 4 两组人群在不同遗传模型中 ATP2B1 基因型分布的差异

rs17249754 基因型	病例组 (n=1 280)	对照组 (n=1 010)	加性模型		显性模型		隐性模型	
			P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)
AA	139(0.109)	143(0.142)	-	-	0.029	1.324(1.029 ~ 1.704)	0.008	1.123(1.031 ~ 1.223)
AG	588(0.459)	491(0.486)	0.153	1.213(0.931 ~ 1.581)	-	-	-	-
GG	553(0.432)	376(0.372)	0.005	1.469(1.121 ~ 1.925)	-	-	-	-

表5 rs17249754位点单核苷酸多态性和吸烟的交互作用

基因型	吸烟	病例组	对照组	OR值(95%CI)
GA+GG	有	463	301	1.865(1.305~2.664)
AA	有	66	58	1.341(0.958~1.877)
GA+GG	无	678	566	1.358(0.840~2.196)
AA	无	73	85	1

(PMCA1),而后者在组织中普遍存在,能够将细胞内的Ca²⁺转运到细胞外,保持细胞内Ca²⁺的正常浓度水平^[14,15]。

2008年JMGP(H Japanese Millennium Genome Project for Hypertension)在1484例日本个体中进行了单核苷酸多态性和候选基因分析,首次发现ATP2B1基因为高血压易感基因^[3]。2009年CHARGE(Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology)在29136例欧洲人种起源的6个群体中进行了多种DNA基因芯片的基因筛查,结果显示ATP2B1基因与SBP、DBP及高血压相关联^[4]。此结果被Global Bpgen协会在34433例欧洲人群中验证^[5]。同年KARE(Korean Association Resource)在8842例韩国个体中进行了全基因组关联研究,发现ATP2B1基因附近的rs17249754与SBP、DBP有关联^[6]。2010年在1484例日本个体中又发现ATP2B1基因的rs11105378和rs2681472与高血压密切相关,且rs11105378与高血压的关联度更强^[7]。2011年ICBP(International Consortium for Blood Pressure)在29个欧洲人种起源的69395例个体中进行了高血压Meta分析,结果显示,ATP2B1基因的rs17249754与SBP和DBP密切相关,并且在所有与高血压关联的变异基因中,ATP2B1基因表现了最强的作用^[8]。同年我国学者通过对上海和北京地区人群进行全基因组关联研究,发现了ATP2B1基因的rs2681472与高血压相关联^[9];2012年又通过对7个研究的东亚地区人群(包括15909例病例与18529例对照个体)进行Meta分析,发现ATP2B1基因的rs2681472与高血压存在密切关联^[10]。

本研究通过对HapMap中国汉族人群ATP2B1基因的数据分析,发现上述文献提及的位点中rs17249754与rs2681472、rs2681492、rs11105378、rs11105364有很强的连锁性($D' > 0.95, r^2 > 0.88$),且在同一个单倍体区域内,因此选择rs17249754位点进行本研究可代替整个单倍体区域内的SNP位点。ATP2B1基因的rs17249754的等位基因频率在病例组和对照组分别为0.3383和0.3847,与“千人基因组计划”公布的亚洲人群数据(0.36)相符合。本研

究结果显示,rs17249754等位基因频率在病例组和对照组的差异有统计学意义($OR=1.223, 95\%CI: 1.083 \sim 1.381, P=0.001$),校正性别和年龄等混杂因素后,上述差异仍有统计学意义($OR=1.212, 95\%CI: 1.070 \sim 1.373, P=0.003$)。logistic回归模型结果显示,显性模型中rs17249754多态性与原发性高血压显著相关($OR=1.324, 95\%CI: 1.029 \sim 1.704, P=0.029$);隐性模型中rs17249754多态性与原发性高血压显著相关($OR=1.123, 95\%CI: 1.031 \sim 1.223, P=0.008$);加性模型中危险等位基因纯合子GG显著增加了患病风险($OR=1.469, 95\%CI: 1.121 \sim 1.925, P=0.005$),而杂合子GA与原发性高血压的易感性则无关联($OR=1.213, 95\%CI: 0.931 \sim 1.581, P=0.153$),此结果说明ATP2B1基因rs17249754位点等位基因G是原发性高血压发病的一个重要因素。

吸烟是导致高血压的一个重要危险因素。2010年在我国162个监测点调查了98526名≥18岁居民,吸烟率为28.3%(95%CI: 27.2%~29.4%)^[16]。2013年在山西、甘肃、青海、新疆四省(区)84个行政村调查了5486名15~69岁居民,吸烟率为20.9%,且汉族人群高于少数民族人群^[17]。本研究吸烟者在病例组占41.33%,对照组占35.55%,两组间的差异有统计学意义($P=0.005$),吸烟可增加原发性高血压发生风险。此外本研究采用交互作用模型理论,探讨ATP2B1基因rs17249754位点与吸烟的交互作用及原发性高血压的关系。在调整性别、年龄、BMI、饮酒后,基因位点rs17249754和吸烟的交互作用对发生原发性高血压的影响无统计学意义($OR=1.024, 95\%CI: 0.614 \sim 1.707$)。由于高血压受到多基因与环境因素等共同作用,多基因之间与基因-环境的交互作用还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hunt SC, Hasstedt SJ, Kuida H, et al. Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins[J]. Am J Epidemiol, 1989, 129(3): 625-638.
- [2] Garcia EA, Newhouse S, Caulfield MJ, et al. Genes and hypertension[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(21): 1679-1689.
- [3] Kohara K, Tabara Y, Nakura J, et al. Identification of hypertension-susceptibility genes and pathways by a systemic multiple candidate gene approach: the millennium genome project for hypertension[J]. Hypertension Res, 2008, 31(2): 203-212.
- [4] Levy D, Ehret GB, Rice K, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension[J]. Nat Genet, 2009, 41(6):

- 677-687.
- [5] Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure[J]. *Nat Genet*, 2009, 41: 666-676.
- [6] Cho YS, Go MJ, Kim YJ, et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits [J]. *Nat Genet*, 2009, 41: 527-534.
- [7] Tabara Y, Kohara K, Kita Y, et al. Common variants in the ATP2B1 gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project [J]. *Hypertension*, 2010, 56: 973-980.
- [8] Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk [J]. *Nature*, 2011, 478: 103-109.
- [9] Liu C, Li H, Qi Q, et al. Common variants in or near FGF5, CYP17A1 and MTHFR genes are associated with blood pressure and hypertension in Chinese Hans [J]. *J Hypertens*, 2011, 29(1): 70-75.
- [10] Xi B, Tang W, Wang Q. Polymorphism near the ATP2B1 gene is associated with hypertension risk in East Asians: a meta-analysis involving 15 909 cases and 18 529 controls [J]. *Blood Press*, 2012, 21: 134-138.
- [11] Xu S, Yin X, Li S, et al. Genomic dissection of population substructure of Han Chinese and its implication in association studies [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85(6): 762-774.
- [12] Chen J, Zhen H, Bei JX, et al. Genetic structure of the Han Chinese population revealed by genome-wide SNP variation [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85(6): 775-785.
- [13] McCarron DA. Is calcium more important than sodium in the pathogenesis of essential hypertension? [J]. *Hypertension*, 1985, 7(4): 607-627.
- [14] Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme [J]. *FASEB J*, 1994, 8(13): 993-1002.
- [15] Brini M, Carafoli E. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(2): pii: a004168.
- [16] Zhang M, Wang LM, Li YC, et al. Cross-sectional survey on smoking and smoking cessation behaviors among Chinese adults in 2010 [J]. *Chin J Prev Med*, 2012, 46(5): 404-408. (in Chinese)
张梅, 王丽敏, 李镒冲, 等. 2010年中国成年人吸烟与戒烟行为现状调查 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(5): 404-408.
- [17] Zhang L, Cui Y, Wang C, et al. Survey on status of smoking, passive smoking and quitting smoking in rural areas of the midwestern provinces in China [J]. *Chin J Epidemiol*, 2013, 34(2): 137-139. (in Chinese)
张荔, 崔颖, 王超, 等. 中国中西部农村地区居民吸烟、被动吸烟及戒烟现状调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(2): 137-139.

(收稿日期: 2013-10-28)

(本文编辑: 张林东)