

# 一氧化氮合酶基因 G894T 变异与高血压病关系的研究

贾崇奇 赵仲堂 王立华 郝风荣 冯月秋 王束玫 徐晓菲 贾存显

**【摘要】** 目的 探讨内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因第7外显子G894T变异(Glu298Asp)与高血压病的关系。方法 以人群中筛检出的、未经药物治疗的116例高血压病患者及136名血压正常者为研究对象,运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测G894T变异。结果 G894T变异与高血压病显著相关,G894T等位基因频率高血压病组显著高于血压正常组(16.0%:8.8%, $P=0.019$ ), $OR=1.96$ ,95% $CI:1.14\sim3.37$ 。在病例组、对照组及两组合计中,G894T变异基因型的收缩压及舒张压水平皆显著升高( $P<0.05$ )。用多元协方差分析调整年龄、性别、吸烟、饮酒、体重指数、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇后,在病例与对照合计中,G894T变异基因型对收缩压及舒张压水平仍具有正显著影响( $P<0.01$ )。结论 eNOS基因第7外显子G894T变异可能是该研究人群中高血压病发病的重要危险因素之一。

**【关键词】** 一氧化氮合酶;高血压;基因;多态性;遗传学

**Effects of G894T mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene on blood pressure** JIA Chong-qi\*, ZHAO Zhong-tang, WANG Li-hua, HAO Feng-rong, FENG Yue-qiu, WANG Shu-mei, XU Xiao-fei, JIA Cun-xian. \*Department of Epidemiology, College of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China

**【Abstract】 Objective** To analyze the association between G894T(Glu298Asp) mutation at exon 7 in the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension. **Methods** One hundred and sixteen essential hypertensives without taking hypertensive medication and 136 normotensives screened from health workers in a steel factory were selected as subjects in this study. Polymerase chain reaction(PCR) and Ban II restriction enzyme digestion were performed to detect the G894T mutation. **Results** G894T mutation was significantly associated with essential hypertension. The T allele frequency in essential hypertensive group was significantly higher than that in normotensive group(16.0% versus 8.8%, $P=0.019$ , $OR=1.96$ ,95% $CI:1.14\sim3.37$ ). The levels of systolic blood pressure and diastolic blood pressure in the G894T mutant genotypes were all significantly elevated in hypertensive, normotensive, and the total subjects( $P<0.05$ ). After adjusting factors as age, sex, smoking, alcohol drinking, body mass index, triglyceride, serum total cholesterol, serum high density lipoprotein cholesterol by analysis of multiple covariance, significant positive effect of the G894T mutant genotypes on blood pressure in the total subjects( $P<0.01$ ) was noticed. **Conclusion** This study suggested that the G894T mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene might serve as a major risk factor of essential hypertension in this study population.

**【Key words】** Nitric oxide synthase; Hypertension; Gene; Polymorphism; Genetics

高血压病不但是严重危害人类身体健康的疾病,而且是心、脑血管系统疾病的重要危险因素。由于高血压病是多因子疾病,且受遗传与环境因素共同作用,病因关系极其复杂,因此利用分子生物学手段,从基因水平探讨其发病机制则是有效的研究方法。本研究运用聚合酶链反应-限制性片段长度多

态性方法(PCR-RFLP),探讨了内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase eNOS)基因第7外显子G894T变异(Glu298Asp)与高血压病的关系,现报道如下。

## 对象与方法

1. 研究对象:自某工厂三个分厂约2 000名职工健康查体中选出研究对象。其入选标准为:①年龄30~50岁;②收缩压 $\geq 140$  mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)及/或舒张压 $\geq 90$  mm Hg;③调查之前

作者单位 250012 济南 山东大学公共卫生学院流行病学教研室(贾崇奇、赵仲堂、郝风荣、冯月秋、王束玫、徐晓菲、贾存显),济南钢铁厂职工总医院二区分院(王立华)

虽患有原发性高血压,但未坚持规律服用抗高血压药物及降血脂药物,且调查时近一个月未服用该类药物者;④调查时新诊断的原发性高血压患者;⑤排除继发性高血压。对照的入选标准为:①年龄30~50岁;②收缩压<140 mm Hg及舒张压<90 mm Hg;③无心、脑、肾、肝胆、糖尿病、肿瘤等病史,且查体时心电图、尿常规、肝功、血糖等实验检查正常者。依据健康查体登记表,依次筛选入选的病例和对照。

2. 血样采集:取研究对象的空腹肘静脉血5 ml,其中1 ml做EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝,用于基因组DNA提取;4 ml分离血清,用于血脂指标检测。

3. 基因组DNA提取:用常规的蛋白酶K消化,酚/氯仿提纯。

#### 4. G894T变异检测:

(1)PCR扩增:用PCR技术扩增eNOS基因第7外显子中包含有G894T变异的基因序列。引物序列为:上游5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATG-3';下游5'-CAGTCAATCCCTTTGGTGCT-3'。在50 μl的扩增体系中含有100 ng的模板DNA,引物各0.3 μmol/L,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L Mg-Cl<sub>2</sub>,10 mmol/L Tris-HCl(pH=8.4),0.15 mmol/L dNTPs,1 U Ex Taq DNA聚合酶(TaKaRa)。反应条件为94℃变性5 min,32个循环中94℃变性45 s,62℃退火45 s,72℃延伸60 s,最后72℃延伸5 min。

(2)PCR扩增产物酶切及电泳:将PCR扩增产物用Ban II内切酶酶切,2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像分析系统下观察,拍照。

5. 血清生化指标检测:血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)用酶法测定,试剂由北京中生生物工程高技术公司提供。

6. 资料分析:用SAS、STATA软件对计数资料用卡方检验,选用Fisher's确切概率,计量资料用方差分析,多因素分析用多元协方差分析。

## 结 果

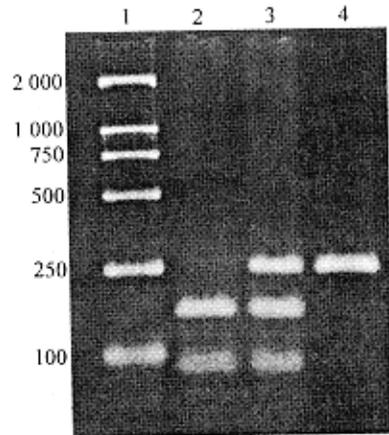
1. 高血压病组与对照组的临床资料分析:将高血压病组与对照组的临床资料对比分析,结果见表1。吸烟、饮酒、体重指数(BMI)、TG、TC高血压病组显著高于对照组,而HDL-C高血压病组显著低于对照组。性别构成及年龄两组之间差异无显著性。

表1 高血压病组与对照组的临床资料

变 量	病例组 (n=116)	对照组 (n=136)	P 值
性别(男/女)	94/22	107/29	>0.05
年龄(岁)	47.905±6.150	46.493±7.373	>0.05
收缩压(mm Hg)	159.655±12.436	121.985±9.255	<0.001
舒张压(mm Hg)	102.069±8.922	79.596±6.887	<0.001
吸烟(%)	59.48	44.85	<0.05
饮酒(%)	47.41	33.09	<0.05
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	26.085±2.843	23.948±2.722	<0.001
TG(mmol/L)	1.636±0.624	1.393±0.561	<0.01
TC(mmol/L)	5.625±1.067	4.772±0.999	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.207±0.316	1.353±0.308	<0.001

注:资料除性别、吸烟、饮酒外均为均数±标准差

2. PCR扩增产物酶切及电泳分析:当编码序列894G突变为T后,失去原有Ban II酶切位点(5'-GA(G)GCC(T)C-3')。所以,用Ban II内切酶(promega)将长度为246 bp无G894T突变的PCR扩增产物切为163 bp和83 bp的两个片段。酶切结果在2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像分析系统下观察,拍照,结果见图1。



1. DNA Marker(TaKaRa, DL2000, 长度分别为2 000、1 000、750、500、250、100 bp) 2. GG纯合子 3. GT杂合子 4. TT纯合子

图1 eNOS基因G894T突变区PCR扩增产物Ban II酶切电泳结果

3. 高血压病组与对照组eNOS基因G894T变异基因型和等位基因频率分析:将高血压病组与对照组eNOS基因G894T变异基因型和等位基因频率对比分析,结果见表2。G894T变异基因型及T等位基因频率在男性高血压病组显著高于对照组,其在女性中高血压病组也高于对照组,但差异无显著性,这可能是由于女性组样本太小之故。将男女两组合并后,G894T变异基因型及T等位基因频率高血压病组亦显著高于对照组。

表2 高血压病组与对照组 eNOS 基因 G894T 变异基因型和等位基因频率

	男		女		合计	
	病例组	对照组	病例组	对照组	病例组	对照组
基因型(%)						
TT	3(3.2)	1(0.9)	4(4.5)	3(3.4)	4(3.4)	2(1.5)
GT	22(23.4)	14(13.1)	7(31.8)	6(20.7)	29(25.0)	20(14.7)
GG	69(73.4)	92(86.0)	14(63.6)	22(75.9)	83(71.6)	114(83.8)
P <sub>1</sub> 值	0.068		0.757		0.062	
P <sub>2</sub> 值	0.033		0.371		0.022	
等位基因频率(%)						
T	14.9	7.5	20.5	13.8	16.0	8.8
G	85.1	92.5	79.5	86.2	84.0	91.2
P 值	0.024		0.427		0.019	
OR 值	2.17		1.61		1.96	
95%CI	1.14~4.11		0.58~4.45		1.14~3.37	

注:TT:突变纯合子;GT:杂合子;GG:正常纯合子;P<sub>1</sub>:三组比较概率;P<sub>2</sub>:TT+GT与GG比较概率

4. eNOS 基因 G894T 变异与血压关系的分析:将 G894T 变异基因类型之间的血压水平对比分析,结果见表 3。在病例组、对照组及两组合计中,G894T 变异基因型的收缩压及舒张压水平皆显著升高。用多元协方差分析调整年龄、性别、吸烟、饮酒、BMI、TG、TC、HDL-C 的影响后,在病例组与对照组中,G894T 变异基因型对收缩压及舒张压水平具有正的影响,但不显著;然而在病例与对照合计中,G894T 变异基因型对收缩压及舒张压水平具有正显著影响,这可能是由于本研究样本较小之故。

表3 eNOS 基因 G894T 变异与血压关系的分析

组别	血压	基因型	n	$\bar{x} \pm s$	F 值	P 值
病例组	收缩压	TT+GT	33	163.485 ± 12.342	4.51	0.036
		GG	83	158.133 ± 12.215		
	舒张压	TT+GT	33	104.848 ± 9.960	4.62	0.034
		GG	83	100.964 ± 8.281		
对照组	收缩压	TT+GT	22	125.682 ± 9.296	4.29	0.040
		GG	114	121.272 ± 9.116		
	舒张压	TT+GT	22	82.500 ± 7.196	4.80	0.030
		GG	114	79.035 ± 6.714		
合计	收缩压	TT+GT	55	148.364 ± 21.753	12.78	0.000 4
		GG	197	136.802 ± 21.055		
	舒张压	TT+GT	55	95.909 ± 14.178	14.03	0.000 2
		GG	197	88.274 ± 13.135		

注:同表 1

### 讨 论

自发现 NO(nitric oxide)是内皮细胞舒血管因子以来,NO 在多个系统生理病理过程中所起的重要作用不断被阐明。血管内皮细胞来源的 NO 与受体结合后,激活靶细胞膜上的鸟苷酸环化酶,使

cGMP 合成增加发挥第二信使作用,具有降低细胞内游离钙、扩张血管、抑制血小板粘附与聚集、抑制白细胞粘附、对抗内皮素的缩血管作用等重要生理功能。

内源性 NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸末端胍基中的一个氮原子氧化生成。NOS 有 3 个亚型,分别由不同基因编码。根据其细胞或组织来源及表达方式分为神经元型(neuronal NOS, nNOS)、诱导型(inducible NOS, iNOS)及内皮型(endothelial NOS, eNOS)。在 NOS 基因与高血压病关系的研究中,eNOS 基因被予以特别关注。因为,动物实验研究显示,该基因对血压的调节起重要作用<sup>[1-4]</sup>;抑制 NOS 可使健康人的血压升高<sup>[5]</sup>;因而被认为是高血压最可能的候选基因。

eNOS 基因位于第 7 号染色体(7q36),含有 26 个外显子,长 21 kb。目前发现的多态性位点中,只有第 7 外显子第 78 位碱基即编码序列第 894 位碱基发生 G 突变为 T(G894T),导致第 298 位氨基酸残基发生谷氨酸被天门冬氨酸替代(Glu298Asp)。尽管目前尚无充分证据表明,此变异可引起 NOS 活性的改变,但有研究显示,由于 Glu298Asp 的变异,可使 NOS 蛋白的构象发生改变<sup>[6]</sup>;并且有研究表明 Glu298Asp 变异与急性心肌梗死<sup>[7]</sup>、冠心病<sup>[8]</sup>及颈动脉硬化<sup>[9]</sup>有关,所以认为 Glu298Asp 变异影响了酶的活性。

关于 Glu298Asp 变异与高血压的关系,目前研究结果不尽一致。有研究显示 Glu298Asp 变异与高血压显著相关<sup>[10-13]</sup>,也有资料表明两者之间无显著相关<sup>[14-16]</sup>。然而,还有资料表明 Glu298 基因型在高血压病患者中高<sup>[17]</sup>,无 894T 等位基因者与有 894T 等位基因者相比,收缩压、舒张压及平均动脉压显著升高<sup>[18]</sup>。

本研究选择一般人群为研究对象,且高血压病例为未经药物治疗的病例,结果显示 G894T 变异与高血压病显著相关,TT 与 GT 基因型及 T 等位基因频率高血压病组显著高于对照组,并且 G894T 变异基因型的收缩压及舒张压水平显著升高。用多元协方差分析调整年龄、性别、吸烟、饮酒、BMI、TG、TC、HDL-C 后,G894T 变异基因型对收缩压与舒张压仍具有正显著影响,说明 G894T 变异可能是该研究人群高血压病发病的重要危险因素。但由于本研究样本较小,因此需要进一步研究加以确定。

另外,本研究显示 T 等位基因频率高血压病组

为16.0% ,正常血压组为8.8% ,高于 Shoji 等<sup>[11]</sup> (高血压病组 12.8% ,正常血压组 8% ) ,而低于 Benjafield, Morris<sup>[15]</sup> (高血压病组 32% ,正常血压组 30% ) 的报道,说明 G894T 变异可能存在种族差异,与有关报道一致<sup>[19]</sup> ,这也可能是 G894T 变异与高血压病关系研究结果不一致的原因之一。

### 参 考 文 献

- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 1995, 377:239-242.
- Shesely EG, Maeda N, Kim HS, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13176-13181.
- Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, et al. Hypotension and reduced nitric oxide elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, 1998, 102: 2061-2071.
- Duplain H, Burcelin R, Sartori C, et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2001, 104:342-345.
- Haynes WG, Noon JP, Walker BR, et al. Inhibition of nitric oxide synthase increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens*, 1993, 11:1375-1380.
- Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate versus glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:2832-2835.
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 1998, 32:521-526.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 1999, 100:1515-1520.

- Lembo G, De Luca N, Battagli C, et al. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2001, 32:735-740.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 1998, 32:3-8.
- Shoji M, Tsutaya S, Saito R, et al. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci*, 2000, 66:2557-2562.
- Kobashi G, Yamada H, Ohta K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet*, 2001, 103:241-244.
- Jachymova M, Horky K, Bultas J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284:426-430.
- Kato N, Sugiyama T, Morita H, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*, 1999, 33:933-936.
- Benjafield AV, Morris BJ. Association analysis of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 2000, 13:994-998.
- Tsujita Y, Baba S, Yamauchi R, et al. Association analyses between genetic polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: the suita study. *J Hypertens*, 2001, 19:1941-1948.
- Lacolley P, Gautier S, Poirier O, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens*, 1998, 16:31-35.
- Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, et al. Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adults: the bogalusa heart study. *Am J Hypertens*, 2001, 14:1046-1052.
- 赵勇, 冯丽媛, 刘力生, 等. eNOS 基因 G894T 突变位点与缺血性脑卒中的关系. *中国急救医学*, 2000, 20:457-458.

(收稿日期 2002-02-10)

(本文编辑:尹廉)

## · 出版信息 ·

### 《益生菌基础与应用》现已出版

由郭兴华等多位专家联袂编著的《益生菌基础与应用》一书,已于2002年10月由北京科技出版社出版发行。该书是一本系统介绍人与动植物益生菌的专著。全书共59万多字,分14章,包括绪论;人和动植物的正常菌群;肠道正常菌群的鉴定方法;人肠道正常菌群的代谢;微生物与微生物、微生物与宿主之间的相互作用;人用益生菌及其制品的作用;人用益生菌制品的生产工艺;益生元;人用益生菌制品的安全性评价;人用益生菌制品的质量控制与审批程序;动物益生菌及其制品;植物益生菌;黏膜免疫;益生菌和益生元的前景展望。该书内容丰富,不仅回顾总结了过去的研究成果,还追踪最新进展,预测未来的发展趋向,是目前国内第一本有关益生菌的综合性著作,对有关科研人员、教师、学生具有重要的参考价值。欲购请汇款至北京西直门南大街16号北京科技出版社(邮编100035),每册定价56元。