

重庆市部分高血压患者一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与相关危险因素的研究

谭建聪 祝之明 祝善俊 于长青 刘晓莉 王海燕 王琳

【摘要】 目的 了解重庆市部分高血压病患者内皮一氧化氮合酶(eNOS)基因 G894T 多态性和高血压相关危险因素的关系。方法 高血压患者 226 例,设对照组。取血标本提取 DNA,用聚合酶链反应(PCR)方法扩增目的基因,用限制性内切酶(Ban II)酶切 PCR 产物用于基因分型,同时按照流行病学方法制作规范的调查表,调查内容包括体重指数、膳食、精神心理、疾病家族史等方面情况。结果 eNOS 各基因型(GG、GT 或 TT)在高血压组与对照组中的分布差异无显著性($P > 0.05$),但在高血压相关的危险因素中(钠盐摄入、性格、打鼾等)分布有差别,T 等位基因携带者高血压相关危险因素较多。logistic 回归分析显示 894T 等位基因与高血压发病无关联。结论 eNOS 基因 G894T 多态性在重庆市高血压发病中不起直接重要作用,但可能通过影响相关危险因素参与高血压发病机制。

【关键词】 高血压;基因多态性;一氧化氮合酶

Study on the relationship between nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and hypertension related risk factors in patients with essential hypertension in Chongqing city TAN Jian-cong*, ZHU Zhi-ming, ZHU Shan-jun, YU Chang-qing, LIU Xiao-li, WANG Hai-yan, WANG-Lin. *Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between genetic anomaly and risk factors in hypertension, a polymorphism at position G894T of the gene encoding the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) together with hypertension related risk factors were observed in patients with essential hypertension (EH) in Chongqing city. **Methods** Two hundred and twenty-six patients with EH and matched controls were selected. Genotypes of polymorphisms were determined by polymerase chain reaction (PCR), while PCR products were digested by restriction endonuclease (Ban II). Questionnaire referred to life style, dietary, smoking, alcohol consumption, psychological and mental state, waist-to-hip ratio (WHR), etc was administered. **Results** There was no significant difference noticed in genotype distribution for the eNOS gene G894T genotype between hypertensive groups and controls, but difference was found among certain related risk factors, such as salt intake, snoring and WHR, etc. Logistic regression analysis showed no association between 894T allele and hypertension. **Conclusion** Although the polymorphism of eNOS gene G894T did not seem to play an important and direct role in the pathogenesis of EH it might have indirect effects through certain risk factors.

【Key words】 Hypertension; Gene polymorphism; Nitric oxide synthase

一氧化氮(nitric oxide, NO)是调节血管紧张度的重要物质。近年一些研究报道,在原发性高血压患者中合成 NO 的酶——内皮 NO 合酶(endothelial NO synthase, eNOS)的活性下降^[1]。编码 eNOS 的基因第 7 外显子的 G894T 多态性的 T 等位基因替换会导致所编码的第 298 位谷氨酸(glutamic acid, Glu)被天冬氨酸(asparagic acid, Asp)替换

(Glu298Asp),由此可能影响所编码的 eNOS 活性^[2],但许多研究报道 eNOS 基因 G894T 多态性与高血压发病无直接关联,至于 G894T 多态性与高血压危险因素是否有关,尚未见报道。本课题对重庆市高血压患者 eNOS 基因 G894T 多态性和高血压相关危险因素进行研究,探讨基因与危险因素之间相互作用共同导致高血压发病机制。

对象与方法

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所高血压内分泌科(谭建聪、祝之明、于长青、王海燕),肾内科(刘晓莉),神经内科(王琳),第三军医大学新桥医院心内科(祝善俊)

1. 病例选择:选择大坪医院高血压内分泌科和高血压防治社区的重庆市高血压患者 226 例(男 122 例,女 104 例),平均年龄(59 ± 7)岁。患者来自同一

地区,非一、二级亲属,均为汉族。高血压诊断按 1999 年 WHO/ISH 高血压处理指南中的标准,血压 $\geq 140/90$ mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),常规检查排除继发性高血压,无糖尿病、肾病等。实验前停药影响血压药物两周。另选健康人 226 名作为对照组,性别、年龄与病例组配对(表 1)。

表1 研究对象高血压相关危险因素的特点

危险因素	高血压组	对照组
SBP(mm Hg $\bar{x} \pm s$)	155.6 \pm 17.1**	122.3 \pm 10.9
DBP(mm Hg $\bar{x} \pm s$)	88.4 \pm 11.34**	74.9 \pm 7.9
MAK(mm Hg $\bar{x} \pm s$)	112.5 \pm 10.8**	90.7 \pm 8.4
PK(mm Hg $\bar{x} \pm s$)	67.2 \pm 13.8**	47.4 \pm 9.4
WHR($\bar{x} \pm s$)	0.9 \pm 0.1*	0.8 \pm 0.1
BMI(kg/m ² $\bar{x} \pm s$)	24.3 \pm 3.6*	23.5 \pm 3.1
TC(mmol/L $\bar{x} \pm s$)	5.1 \pm 1.0	4.9 \pm 1.0
TG(mmol/L $\bar{x} \pm s$)	1.5 \pm 0.8	1.4 \pm 1.2
吸烟(%)	45.7	40.9
饮酒(%)	44.3*	34.7
经常锻炼(%)	40.1*	47.4
口味偏咸(%)	39.8*	30.9
打鼾(%)	74.3*	67.6
性格急躁(%)	65.9**	49.2
高血压家族史(%)	43.6**	32.5

* 与对照组比较 $P < 0.05$; ** 与对照组比较 $P < 0.01$

2. 高血压危险因素调查:按照流行病学调查方法制作规范的调查表,内容包括生活习惯(吸烟与否、吸烟量及年限、饮酒与否、饮酒种类、饮酒量及年限、是否经常体育锻炼、锻炼方式及时间、有无打鼾及程度等)、膳食(主食种类及量、副食种类及量、口味咸淡等)、精神心理(有无性格急躁、紧张、压抑等)等方面,各项目编号,专人调查填写,统一规范询问、填表方法,测量记录收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、身高(cm)、体重(kg)、体重指数(BMI)、腰臀比(WHR)、心率、心脏杂音、心电图、胸片、超声心动图等。

3. 限制性片段长度多态性(RFLP)分析:eNOS 基因 G894T 多态性^[3]。

(1)试剂:SK-200 基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K、Ban II 内切酶(上海生工产品);dNTP、Taq 酶、eNOS 引物(上海博亚产品)。

(2)血液样本:所有研究对象早晨空腹抽取外周静脉血 5 ml EDTA 抗凝。

(3)白细胞 DNA 的抽提:全血加双蒸水(1:4)震荡 5000 r/min 4℃离心,弃上清,沉淀用 TE 悬浮,加细胞裂解液 400 μ l 混匀加蛋白酶 K 50℃水浴消化 4 h,加氯仿/异戊醇离心,取上层液体加沉淀缓冲液,离心弃上清,沉淀用 NaCl 悬浮,RNaseA 消化,无水乙醇 -20℃沉淀 DNA,离心弃上清,沉淀用 75%

乙醇洗涤 2 次,弃上清,烘干,沉淀用 TE 溶解,取部分测定浓度、纯度。

(4)DNA 纯度及浓度测定:取 5 μ l DNA + 95 μ l DEPC 灭菌水,混匀,紫外分光光度计测定吸光度值(A) A_{260} 、 A_{280} ,如果 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~2.0 之间,说明 DNA 纯度较高,可以用于 PCR 反应。DNA 浓度按公式计算。

(5)聚合酶链反应(PCR):PCR 引物 eNOS 正义链 5'-TCCCTGAGGAGGGCATGAGGC-3';反义链 5'-TGAGGGTCACACAGGTTTCCT-3';PCR 产物大小 248 bp。PCR 循环参数按 96℃ 5 min;94℃ 1 min;58℃ 1 min;72℃ 1 min 循环 35 次;72℃ 5 min 扩增目的基因。PCR 产物加 loading buffer 混匀,2% 琼脂糖凝胶 100 V \times 30 min 电泳,紫外灯观测电泳条带及分子量大小。

(6)限制性内切酶(Ban II)酶切 PCR 产物(eNOS 基因):反应体系:内切酶 buffer 10(10 \times) 2 μ l 内切酶 1 μ l(约 5 U),PCR 产物 10 μ l,DEPC H₂O 7 μ l,37℃ 水浴酶切 4 h。酶切产物 20 μ l + 2 μ l 10 \times DNA loading buffer 混匀,终止酶切反应,2% 琼脂糖凝胶电泳 100 V \times 30 min,紫外灯观测酶切产物(电泳)条带及分子量大小。

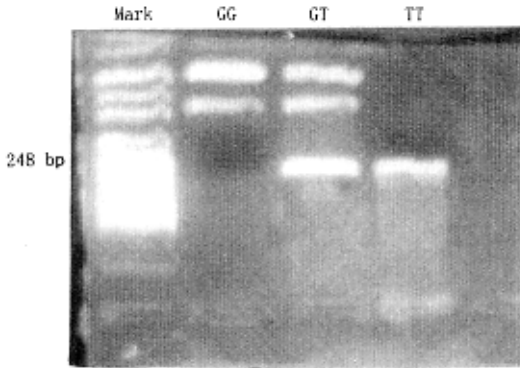
4. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件将数据进行统计学处理。组间频率比较采用 χ^2 检验,组间血压、BMI 等比较用单向方差分析(one-way ANOVA)。用逐步 logistic 回归分析了解不同基因型及各危险因素与高血压发病的关系。

结 果

1. 研究对象一般临床特点及相关危险因素的比较及相关性检验:高血压组 SBP、DBP、平均动脉压(MAP)、脉压(PP)、WHR、BMI、高血压家族史均显著高于对照组(P 值均 < 0.01);甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。经 χ^2 检验,高血压组饮酒、锻炼少、膳食偏咸、打鼾、性格易激动者较对照组多(P 值均 < 0.01) (表 1)。相关分析显示,WHR 与 SBP、DBP、MAP、PP 均呈显著正相关(分别 $r = 0.29, P < 0.01$; $r = 0.31, P < 0.01$; $r = 0.28, P < 0.01$ 和 $r = 0.20, P < 0.05$)。

2. eNOS 基因 G894T 多态性群体代表性检验:eNOS 酶切有三种基因多态性(GG、GT、TT(图 1))。群体代表性检验:研究对象 eNOS 基因型分布经 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明患者来自同一群

体。



注 :TT, GG 为纯合子 ;GT 为杂合子

图1 eNOS 基因 G894T 多态性各基因型

3. eNOS 各基因型在高血压组和对照组中的分布 :eNOS 各基因型及 T 等位基因频率在两组人群中的分布差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。

表2 eNOS 基因型在高血压组和对照组中的分布

组别	eNOS 基因型			T 等位基因频率 (GT + TT, %)
	GG (%)	GT (%)	TT (%)	
高血压组	65	22	13	24
对照组	70	23	7	19

注 :eNOS 各基因型在各组人群中的分布差异无显著性 ($P > 0.05$)

4. eNOS 各基因型之间高血压相关危险因素比较 :在高血压患者中 ,eNOS 各基因型之间的危险因素中锻炼 (经常或不经常)、膳食钠盐、打鼾、打鼾程度、性格方面的分布差异有显著性 ,T 等位基因携带者危险因素较多 ;而在对照组中分布差异均无显著性 (表 3 示 GG、GT、TT 三种基因型分别在两组中各危险因素的分布经 χ^2 检验后的 P 值)。

表3 eNOS 各基因型在高血压组和对照组中各环境因素中分布比较 (P 值)

危险因素	高血压组	对照组
吸烟	0.150	0.684
饮酒	0.410	0.880
体育锻炼	0.006	0.415
口味咸淡	0.042	0.345
打鼾与否	0.047	0.340
打鼾程度	0.041	0.780
性格	0.043	0.880

5. logistic 回归分析 :将研究对象的分类变量——有、无高血压作为应变量 ,eNOS 各基因型、WHR、BMI、性格等作为自变量进行分析 ,调整性别和年龄后 ,结果显示 ,与高血压发病有关联的是性格急躁、WHR 增大、口味偏咸 (分别 $P < 0.01$, $OR = 1.98$, 95% $CI : 1.37 \sim 2.86$; $P < 0.05$, $OR = 1.20$, 95%

$CI : 1.10 \sim 2.64$; $P < 0.05$, $OR = 1.12$, 95% $CI : 1.01 \sim 2.24$) 打鼾与否及程度、饮酒与高血压发病的关联已接近显著水平 ,eNOS 基因 G894T 等位基因、BMI 等与高血压发病无关联。

讨 论

1. eNOS 基因 G894T 多态性与高血压关系 :编码 eNOS 的基因位于染色体 7q 35 ~ 36, 有 26 个外显子和 25 个内含子 ,长 21 kb。迄今发现有至少 7 个多态性位点 ,但只有位于第 7 外显子的 G894T 的替换可导致所编码的氨基酸替换 (第 298 位的 Glu 被 Asp 替换),可能影响编码的 eNOS 活性 ,进而影响 NO 合成^[4]。Shoji 等^[2]发现在高血压患者中 ,携带 G894T 者的 DBP 高于不带 G894T 者 ,提示 G894T 变异体与高血压遗传易感性有关。Miyamoto 等^[5]的研究也支持这一结果。而一项对白种人的研究显示^[6], G894T 在高血压患者中高于正常人。但 Tsujita 等^[3]在日本人中未观察到这些差别 ,认为 eNOS 基因 G894T 多态性不是日本人高血压遗传易感性的主要因素。近年研究报道^[7] ,从 298Asp 编码的蛋白质产物比从 Glu298 编码的蛋白质产物容易裂解 ,因而 G894T 多态性可能有直接的功能效应 ,但有研究表明^[8,9] G894T 多态性并不影响内皮依赖的血管舒张。

本研究显示 ,G894T 多态性与血压无关联 ,各基因型频率分布在高血压和正常人之间无差别 ,提示 G894T 多态性在重庆市人群高血压发病中不起直接重要作用。eNOS 基因多态性的效应最终要通过影响 NO 的生成来实现 ,但目前尚无明确结果表明 eNOS 多态性、血浆 NO 水平和高血压之间有相关性。虽然本研究结果显示 G894T 多态性在高血压中不起重要作用 ,但可能在高血压的相关危险因素发挥作用 ,eNOS 基因还存在有其他多态性 ,因此仍不能排除其他 eNOS 基因变异与高血压的关联。

2. eNOS 基因 G894T 多态性与高血压相关危险因素 :大量研究表明 ,一些因素是高血压发病的重要原因 ,可促进突变基因的显性表达。本研究中 ,盐摄入多、性格急躁、打鼾、WHR 大者血压较高 ,与大多数研究结果一致^[10,11]。进一步 logistic 回归分析显示与高血压发病关联密切的是性格急躁、WHR 大和盐摄入多。性格易激动者交感神经系统兴奋性高 ;高钠摄入对 NO 的产生和作用有抑制效应^[12]。本研究发现 WHR 增加是比 BMI 增加更有意义的危险因素 ,提示体重增加能否影响血压水平关键是 WHR

的增加,即只要腹部脂肪堆积,就会增加高血压发病的风险。其原因可能是腹部脂肪堆积引起胸部的呼吸、循环系统功能改变,或是腹部脂肪堆积反映了内脏器官、大动脉壁的脂肪堆积。logistic 回归分析未能显示吸烟、饮酒等危险因素与高血压发病关联显著,可能与样本例数较少及两组人群中吸烟、饮酒的比例相差不太大等因素有关。进一步将基因型与危险因素结合起来分析,发现在高血压患者中 eNOS 各基因型正好在两组有差别危险因素中分布不同,T 等位基因携带者饮食偏咸、性格急躁、打鼾者较多,而在正常血压者中无这种差别,这种巧合可能有内在的联系,提示在重庆市人群 eNOS 基因 G894T 等位基因虽在高血压发病中不起直接重要的作用,但可能通过遗传影响性格、WHR 等危险因素间接参与高血压发病,详细机制还有待深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Forte P, Copland M, Smith LM, et al. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*, 1997, 349:837-842.
- 2 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.
- 3 Tsujita Y, Baba S, Yamauchi R, et al. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: the suita study. *J Hypertens* 2001, 19:1941-

1948.

- 4 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.
- 5 Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998, 32:3-8.
- 6 Lacolley P, Gautier S, Poirier O, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphism, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 1998, 16:31-35.
- 7 Schneider MP, Erdmann J, Delles C, et al. Functional gene testing of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial NO synthase. *J Hypertens* 2000, 18:1767-1773.
- 8 Lason N, Hutchinson R, Boerwiche E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension*, 2000, 35:1297-1300.
- 9 Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001, 38:1054-1061.
- 10 Liu L, Kanda T, Sagara M, et al. Leisure-time physical activity and other factors in relation to blood pressure in Japanese-Americans in Hawaii, USA. *Hypertens Res* 2001, 24:145-151.
- 11 Davidson S, Judd F, Jolley D, et al. Cardiovascular risk factors for people with mental illness. *Aust N Z J Psychiatry* 2001, 35:196-202.
- 12 Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, et al. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 2000, 101:856-861.

(收稿日期 2002-10-21)

(本文编辑:尹廉)

· 会 讯 ·

第三届全国伤害预防控制学术会议征稿通知

第三届全国伤害预防控制学术会议定于 2004 年 10 月 9~12 日在广州市召开。会议主题:伤害与暴力——不可忽视的公共卫生问题。会议内容:(1)道路交通伤害、青少年伤害、老年伤害、跌倒、烧伤、溺水与窒息;(2)自杀、他杀、家庭暴力、工作场所暴力、学校暴力、虐待与疏忽;(3)职业伤害、职业中毒、旅行伤害、休闲娱乐伤害、消费品与玩具伤害;(4)急救、院前救治、社区卫生服务的伤害防治与康复;(5)社区安全、安全教育与安全促进;(6)伤害的预防控制策略、突发伤害事件的应急措施;(7)伤害的界定标准、心理伤害的内涵与测量;(8)伤害监测、干预效果评价、疾病负担、敏感问题的定性访谈等。

征稿要求:(1)格式:题目、作者、单位、摘要、关键词、材料与与方法、结果、讨论、参考文献(不超过 10 条);(2)摘要:论著写“结构性摘要”按目的、方法、结果、结论四段式撰写,综述写“指示性摘要”;(3)作者:姓名、出生年、性别、籍贯、学位、职称、主要研究方向;(4)论著:4000 字以内,题目、作者、单位、摘要、关键词和图表需中英文,专论、综述和方法学 5000 字以内(参考文献 15 条以内),短篇论著 2000 字以内,经验交流 1000 字左右;(5)稿件将经学术组审定并选择在杂志上刊出(按规定另外收取发表版面费),已发表或不发表的稿件请注明“只交流不刊出”;(6)投稿时请汇稿件审理费 30 元。

截稿日期:2004 年 6 月 30 日(只交流不发表的稿件 2004 年 8 月 31 日)。稿件交送王声教授,邮寄地址:510632 广州市暨南大学医学院, E-mail: wangshengyong@tom.com 或 twshy@jnu.edu.cn 电话:(020)85220831(伤害预防控制中心),(020)85220258(流行病学教研室),传真:(020)85221343 请登录 www.injurycontrol.net

参加会议的代表可获得国家继续教育项目 10 学分。

第三届全国伤害预防控制学术会议筹备组