

WNK4 基因多态与新疆哈萨克族原发性高血压病的关系

曹菲菲 韩辉 王芬 陈兴栋 吕明 王笑峰 林仁勇 温浩 金力

【摘要】 目的 探讨 WNK4 基因外显子 8 G1155942T 多态性是否为中国新疆哈萨克族人群原发性高血压病的遗传易感因素。方法 应用 TaqMan 探针技术检测 563 例哈萨克族原发性高血压病患者和 346 名血压正常者的 WNK4 基因 G1155942T 位点多态性。采集静脉血测定空腹血糖 (GLU)、TG 和 TC 等生化指标。logistic 回归分析各基因型和等位基因频率与新疆哈萨克族原发性高血压的关系。运用相加模型研究 WNK4 基因 G1155942T 变异与环境之间交互作用对高血压病发病的影响。结果 G1155942T 位点多态性的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。G1155942T 多态位点基因型频率差异有统计学意义 ($P=0.004$), 等位基因频率的分布也有统计学意义 ($P=0.003$)。多元 logistic 回归显示年龄、BMI、TC 及 G1155942T 位点 GT+TT 基因型携带者高血压患病危险显著增高。G1155942T 变异与性别之间交互作用的 OR 值为 3.75 (95%CI: 1.19 ~ 11.80), 与 BMI 之间交互作用的 OR 值为 5.77 (95%CI: 1.93 ~ 17.21), 与 GLU 之间交互作用的 OR 值为 8.67 (95%CI: 1.03 ~ 72.99)。结论 WNK4 基因 G1155942T 多态与原发性高血压发病相关, T 等位基因可能是哈萨克族人群高血压发病的风险因子。WNK4 基因 G1155942T 变异与性别、BMI、GLU 之间对高血压病具有正相加交互作用。

【关键词】 高血压; 基因多态性; 哈萨克族; WNK4 基因

Study on the association between genetic polymorphism on WNK4 genes and essential hypertension among Kazakhs ethnic population, in Xinjiang

CAO Fei-fei^{1,2}, HAN Hui¹, WANG Fen^{1,2}, CHEN Xing-dong³, LU Ming^{1,2,3}, WANG Xiao-feng³, LIN Ren-yong⁴, WEN Hao⁴, JIN Li³. 1 Clinical Epidemiology Unit, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; 2 School of Public Health, Shandong University; 3 MOE Key Laboratory of Contemporary Anthropology and Center for Evolutionary Biology, School of Life Sciences and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University; 4 The First Affiliated Hospital of Xinjiang University

Corresponding author: HAN Hui, Email: hanhui6666@yahoo.cn

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. Y2007C047); Science and Technology Research Programs in Shandong Province (No. 2007GG20002006)

【Abstract】 **Objective** To investigate whether G1155942T polymorphism in WNK4 gene is associated with essential hypertension in a population with Kazakhs ethnicity, in Xinjiang. **Methods** This study covered 563 hypertension patients and 346 normotensive controls. The variant of G1155942T was determined by the TaqMan probe real-time PCR method. Some biochemical indices such as glucose (GLU), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were also measured. All of these results were under logistic regression analysis. Addictive model was applied to assess the interactive effects between WNK4 gene G1155942T mutation and environmental factors on hypertension. **Results** The G1155942T polymorphism was consistent with Hardy-Weinberg expectations in both case and control groups. Genotype and allele frequencies of G1155942T were observed ($P=0.004$, $P=0.003$). Data through logistic regression analysis showed that factors as age, BMI, total cholesterol as well as the GT + TT genotype frequencies of Exon 8 G1155942T polymorphism in WNK4 were responsible for the increased risks for hypertension. Positive interactions between G1155942T mutation and gender, BMI, GLU, the OR were 3.75 (95% CI: 1.19-11.80), 5.77 (95% CI: 1.93-17.21) and 8.67 (95% CI: 1.03-72.99), respectively. **Conclusion** Our result suggested that the Exon 8 G1155942T polymorphism in WNK4 gene was associated with hypertension in the studied Kazakhs ethnic group in Xinjiang and the T allele might be the risk factor for essential hypertension. There were interactive effects between WNK4 gene G1155942T mutation, gender, BMI, and GLU.

【Key words】 Hypertension; Polymorphism; Kazakhs; WNK4 gene

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.04.004

基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2007C047); 山东省科技攻关计划 (2007GG20002006)

作者单位: 250012 济南, 山东大学齐鲁医院临床流行病学研究室 (曹菲菲、韩辉、王芬、吕明); 山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室 (曹菲菲、王芬、吕明); 复旦现代人类学教育部重点实验室 (陈兴栋、吕明、王笑峰、金力); 新疆医科大学第一附属医院 (林仁勇、温浩)

通信作者: 韩辉, Email: hanhui6666@yahoo.cn

原发性高血压(EH)是一种以动脉血压升高为主要特征的全身性疾病,是由遗传因素和环境因素共同作用导致的多基因遗传性疾病^[1]。血压变异的 30%~50%与基因变异有关^[2]。WNK4(with no k=lysine kinase)基因是新近发现的一种丝/苏氨酸蛋白激酶基因,其突变可以使WNK4基因对位于肾脏集合管的Na-Cl共转运体(NCCT)的抑制作用减弱,从而使水钠重吸收增加,进而使血压增高,导致假性低醛固酮血症(PHA II)^[3,4],临床表现为高血压、高血钾和代谢性酸中毒。本研究旨在探讨中国新疆哈萨克族人群WNK4基因第8外显子G1155942T多态是否与EH的发生存在关联。

对象与方法

1. 研究对象:样本来源于2001—2003年在新疆巴里坤县牧区进行高血压病流行病学调查时采集的哈萨克族牧民样本。病例组:去除指标不全者,高血压诊断标准依据《2003年WHO/ISH高血压治疗指南》的分类标准:收缩压(SBP)≥140 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)和(或)舒张压(DBP)≥90 mm Hg,调查前2周内服用降压药者及以往曾被诊断为高血压者也被纳入高血压组。对照组:同一地区的血压正常者,入选标准:SBP<140 mm Hg,DBP<90 mm Hg,无服用降压药史。所有研究对象年龄≥30岁,没有血缘关系,无异族通婚史,均排除继发性高血压、心肌病、心力衰竭、先天性心脏病、风湿性心脏瓣膜病等。本研究经复旦大学生命科学院伦理委员会批准,资料收集及血样采集均经受试者知情同意,遵守伦理学的各项规定。

2. 人体基本参数测定:测定身高、体重,计算BMI(kg/m²);检测外周动脉血压,被检者在安静环境下休息5~10 min,取坐位,使用汞柱式血压计测量右上肢肱动脉血压;以非同日3次测量值的均值为所得血压值。

3. 生化指标测定:调查对象均抽取过夜空腹静脉血,离心取血清,采样当天生化分析仪检测空腹血糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)等生化指标。其余血样-20℃冻存以供提取DNA。

4. DNA提取:受检者抽取外周血5 ml,用2%依地酸二钠(EDTA)抗凝,应用酚-氯仿法抽提基因组DNA,定量化至10 ng/μl。

5. 单核苷酸多态性(SNP)检测:采用TaqMan技术进行基因分型,由Applied Biosystems(ABI)公司设计引物和探针。PCR反应体系6 μl,包括PCR

Master Mix 3.00 μl,引物探针0.04 μl,模板1.00 μl,灭菌双蒸水1.96 μl。反应条件:95℃ 10 min,92℃ 15 s,60℃ 1 min,20个循环;89℃ 15 s,60℃ 90 s,30个循环。扩增之后用ABI PRISM 7900HT荧光定量PCR仪检测荧光分布情况。

6. 统计学分析:对病例组和对照组临床资料进行比较,计量资料经正态性检验均服从正态或近似正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数值变量用非配对的t检验,分类变量用 χ^2 检验。计算WNK4基因G1155942T多态位点基因型频率及等位基因频率,确定其是否符合Hardy-Weinberg平衡,通过 χ^2 检验来进行组间频率比较。采用多元logistic回归模型分析不同基因型频率分布与高血压的关系,以及该变异与各有关环境因素之间交互作用的大小,以上数据分析均采用SAS 9.1软件。

结 果

1. 一般临床资料:本研究病例组563例,男254例,女309例,平均年龄(48.86±10.47)岁。对照组346名,男139名,女207名,平均年龄(46.17±10.18)岁。病例组与对照组比较,性别、GLU差异无统计学意义,年龄、BMI、TG、TC差异有统计学意义(P<0.001)。见表1。

表1 病例组和对照组一般临床资料($\bar{x} \pm s$)

变量	病例组(n=563)	对照组(n=346)	P值
性别			0.148
男(%)	254(45.12)	139(40.17)	
女(%)	309(54.88)	207(59.83)	
年龄(岁)	48.86±10.47	46.17±10.18	0.000
身高(cm)	163.74±8.83	162.98±9.09	0.218
体重(kg)	70.79±12.96	65.26±12.30	<0.0001
BMI(kg/m ²)	26.36±4.20	24.49±3.74	<0.0001
GLU(mmol/L)	5.09±1.26	4.91±1.46	0.055
TG(mmol/L)	1.39±0.94	1.17±0.86	0.000
TC(mmol/L)	5.17±1.52	4.72±1.59	<0.0001

2. WNK4基因G1155942T位点基因型频率及等位基因频率分布特点:病例组和对照组G1155942T多态位点观察到的基因型频率, χ^2 值分别为0.22和0.05(P>0.05),均符合Hardy-Weinberg平衡,说明达到了遗传平衡,具有群体代表性。

病例组GG、GT、TT基因型频率分布分别为93.4%、6.4%和0.2%,G和T等位基因频率分布分别是96.6%和3.4%;对照组GG、GT、TT基因型频率分布分别为97.7%、2.3%和0.0%,G和T等位基因频率分布分别是98.8%和1.2%。由于行×列表中理论频

数 < 1, 故将基因型 GT 和 TT 合并为一组, 为 T 等位基因携带组 (显性遗传效应模型), 两组基因型频率分布 ($P=0.004$) 和等位基因频率比较 ($P=0.003$) 差异均有统计学意义 (表 2)。

表 2 病例组和对照组 G1155942T 多态位点基因型与等位基因频率分布

基因	病例组		对照组		P 值
	例数	频率 (%)	例数	频率 (%)	
基因型					0.006*
GG	526	93.4	338	97.7	
GT	36	6.4	8	2.3	
TT	1	0.2	0	0	
显性模型					0.004
GG	526	93.4	338	97.7	
GT+TT	37	6.6	8	2.3	
等位基因					0.003
G	1088	96.6	684	98.8	
T	38	3.4	8	1.2	

注: * Fisher 检验结果

3. WNK4 基因 G1155942T 多态与各临床指标的关系: 比较不同基因型人群临床生化指标的差异, 结果发现 SBP、DBP 在不同基因型人群中差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GT+TT 基因型携带者的 SBP、DBP 均高于 GG 基因型者, 其他指标未见明显差异 (表 3)。

表 3 病例组和对照组 WNK4 基因 G1155942T 多态不同基因型临床生化指标分析 ($\bar{x} \pm s$)

变量	GG	GT+TT	P 值
人数 (男/女)	368/496	25/20	0.092
年龄 (岁)	47.89 ± 10.50	46.89 ± 9.18	0.533
BMI (kg/m ²)	25.68 ± 4.15	25.11 ± 3.76	0.370
SBP (mm Hg)	146.83 ± 29.72	162.20 ± 31.48	0.001
DBP (mm Hg)	93.18 ± 16.56	99.68 ± 13.99	0.010
GLU (mmol/L)	5.01 ± 1.34	5.34 ± 1.40	0.105
TG (mmol/L)	1.30 ± 0.93	1.29 ± 0.72	0.924
TC (mmol/L)	5.00 ± 1.57	4.97 ± 1.24	0.906

4. 多元 logistic 回归分析: 为明确 WNK4 G1155942T 多态位点不同基因型及各种临床生化指标是否为高血压的独立危险因素, 应用 logistic 回归模型进行分析, 以 GG 基因型为对照对象。逐步回归法拟合模型, 变量入选标准为 0.05, 剔除标准为 0.1, 最终被选入方程的因素有年龄、BMI、TC 和基因型。携带 GT+TT 基因型高血压患病风险是携带 GG 基因型的 3.50 倍 ($\chi^2=9.41, P=0.002, OR=3.50$)。见表 4。

5. WNK4 基因 G1155942T 变异与环境因素之间交互作用分析: 多元 logistic 回归模型分别调整年龄、

BMI、GLU、TG、TC 之后, WNK4 基因 G1155942T 变异与性别之间的交互作用 $OR=3.75$, 与 BMI 之间的交互作用 $OR=5.77$, 与 GLU 之间的交互作用 $OR=8.67$, 即具有该变异的女性患高血压的风险高于男性, 该变异与 BMI 之间、GLU 之间在高血压致病中具有正相加模型交互作用, 有统计学意义 (表 5)。

表 4 高血压与影响因素的多元 logistic 回归分析

指数	β	$s(\beta)$	χ^2 值	P 值	OR 值 (95% CI)
常数	-4.49	-	52.53	0.000	
基因型	1.25	0.41	9.41	0.002	3.50 (1.57 ~ 7.80)
年龄 (岁)	0.02	0.01	11.55	0.001	1.02 (1.01 ~ 1.04)
BMI (kg/m ²)	0.12	0.02	37.93	0.000	1.13 (1.08 ~ 1.17)
TC (mmol/L)	0.16	0.05	11.02	0.001	1.17 (1.07 ~ 1.29)

注: 校正了年龄、性别、BMI、GLU、TG、TC 及基因型

表 5 WNK4 基因 G1155942T 变异与性别、BMI、GLU 之间的交互作用分析

因素	变异	OR 值 (95% CI)
性别	男	GG 1 GT+TT 3.08 (1.00 ~ 9.46)
	女	GG 0.95 (0.71 ~ 1.28) GT+TT 3.75 (1.19 ~ 11.80)
BMI (kg/m ²)	< 24	GG 1 GT+TT 4.52 (1.43 ~ 14.25)
	≥ 24	GG 2.23 (1.66 ~ 2.99) GT+TT 5.77 (1.93 ~ 17.21)
		GLU (mmol/L)

注: * 调整年龄、BMI、GLU、TG、TC

讨 论

WNK4 基因是新近发现的高血压病候选基因, 对维持血压正常具有重要作用。大量关联研究表明^[5-7], WNK4 基因与血压调控有密切关系。人类 WNK4 基因定位于 17q21-q22, 长度为 16 kb, 含有 19 个外显子, 几乎只在肾脏远端肾单位表达^[8]; 该基因的第 7 外显子 (exon 7) 和第 17 外显子 (exon 17) 突变可导致 PHA II。Wilson 等^[8]的研究发现, WNK4 基因 4 个聚集于线圈样盘绕结构域内的错义突变, 导致了蛋白产物极性改变, 这些突变均与 PHA II 有直接关系。WNK4 基因通过影响肾脏远曲小管对钠、氯的重吸收进而调控机体水盐代谢平衡导致高血压^[9]。

为了研究 WNK4 基因与高血压的关系,本研究根据 HAPMAP 数据库选择了 WNK4 基因 G1155942T 多态位点。不同的研究对该多态与高血压关联分析的报道结果相佐。Erllich 等^[5]对 WNK4 基因的 Exon 8 G1155942T 多态位点进行研究,但未发现与高血压相关。孙志军等^[10]以中国东北部高血压病高发地区辽宁省彰武县人群为研究对象,发现 Exon 8 G1155942T 变异与高血压相关。这说明 WNK4 基因多态性与高血压的关系存在着种族或民族差异,应在不同种族或民族间进行研究。

哈萨克族是中国高血压发病率最高的 5 个少数民族之一^[11],本研究所选的研究对象均为长期居住在新疆巴里坤县的哈萨克族牧民,该人群是一个相对隔离群体,与影响血压的环境因素(如生存环境、饮食习惯、生活方式、精神压力)较为一致,能较好的反映遗传因素对高血压患病的影响。本研究用 TaqMan 探针技术对 563 例高血压病患者和 346 名正常血压者的 G1155942T 多态进行基因分型;发现新疆哈萨克族人群中,在显性遗传模型下,GG、GT+TT 基因型在病例组和对照组间分布具有统计学意义($\chi^2=8.26, P=0.004$)。G1155942T 多态位点 T 等位基因在病例组的频率显著高于对照组($\chi^2=8.55, P=0.003$)。这说明 T 等位基因与哈萨克族人群高血压相关,参与了发生发展过程。

本研究比较不同基因型人群临床生化指标的差异,结果发现 GT+TT 基因型携带者的 SBP、DBP 均高于 GG 基因型者。多元 logistic 回归模型在校正了年龄、性别、BMI 及临床指标等混杂因素后,结果显示,年龄、BMI、TC 和不同基因型是高血压的独立危险因素。携带 GT+TT 基因型高血压患病风险是携带 GG 基因型的 3.50 倍。

随着分子流行病学的兴起与进一步发展,疾病候选基因多态性与环境因素之间的交互作用研究已受到越来越多的关注^[12]。目前国内外鲜见关于 WNK4 基因与环境因素之间交互作用在高血压病中效应的报道。本研究运用相加模型,探讨了 G1155942T 变异与性别、年龄、BMI、GLU、TG、TC 等因素之间交互作用对高血压的影响。结果显示,调整年龄、BMI、GLU、TG、TC 之后,WNK4 基因 G1155942T 变异与性别之间交互作用的 $OR=3.75$,与 BMI 之间交互作用的 $OR=5.77$,与 GLU 之间交互作用的 $OR=8.67$,即具有该变异的女性患高血压的风险高于男性,该变异与 BMI 之间、GLU 之间在高血压致病中具有正相加模型交互作用,有统计学

意义。

综上所述,WNK4 基因 G1155942T 多态位点的 GT+TT 基因型和 T 等位基因可能与原发性高血压相关。由于研究条件限制,本研究只针对 WNK4 基因外显子 8,但是否与其他致病基因存在紧密连锁关系,还需要扩大样本量进一步研究。此外,由于高血压是一种多基因和多环境因素疾病,单一基因的作用不足以成为其致病因素,或许对其发生发展只产生微弱的影响,因此,还要针对病因及发病机制进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Luft FC. Geneticism of essential hypertension. *Hypertension*, 2004, 43: 1155-1159.
- [2] Tanira MO, Al Balushi KA. Genetic variations related to hypertension: a review. *J Hum Hypertens*, 2005, 19: 7-19.
- [3] Kahle KT, Rinehart J, Giebisch G, et al. A novel protein kinase signaling pathway essential for blood pressure regulation in humans. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19: 91-95.
- [4] McCormick JA, Yang CL, Ellison DH. WNK kinases and renal sodium transport in health and disease: an integrated view. *Hypertension*, 2008, 51: 588-596.
- [5] Erllich PM, Cui J, Chazaro I, et al. Genetic variants of WNK4 in whites and African Americans with hypertension. *Hypertension*, 2003, 41: 1191-1195.
- [6] Mein CA, Capilfield MJ, Dobson RJ, et al. Genetics of essential hypertension. *Hum Mol Genet*, 2004, 13 Spec 1: R169-175.
- [7] Kamide K, Takiuchi S, Tanaka C, et al. Three novel missense mutations of WNK4, a kinase mutated in inherited hypertension, in Japanese hypertensives: implication of clinical phenotypes. *Am J Hypertens*, 2004, 17: 446-449.
- [8] Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science (New York, NY)*, 2001, 293: 1107-1112.
- [9] Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, et al. WNK4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet*, 2006, 38: 1124-1132.
- [10] Sun ZJ, Ding Q, Li Y, et al. Investigation of the role of WNK4 gene Ala589Ser polymorphism in essential hypertension. *Med J Chin PLA*, 2006, 31: 616-618. (in Chinese)
孙志军, 丁茜, 李妍, 等. WNK4 基因 Ala589Ser 多态在原发性高血压发病中作用的探讨. *解放军医学杂志*, 2006, 31: 616-618.
- [11] PRC National Blood Pressure Survey Cooperative Group. Prevalence and development trends of hypertension in China. *Chin J Hypertens*, 1995, 3: 7-13. (in Chinese)
全国血压抽样调查协作组. 中国人群高血压患病率及其变化趋势. *高血压杂志*, 1995, 3: 7-13.
- [12] Shen J, Wang RT, Xu XP. Application of the interaction models between the polymorphism (s) of metabolic gene (s) and environmental exposure. *Chin J Epidemiol*, 2001, 22: 61-64. (in Chinese)
沈靖, 王润田, 徐希平. 代谢酶基因多态性与环境暴露互作用的分析方法及其应用. *中华流行病学杂志*, 2001, 22: 61-64.

(收稿日期: 2009-10-15)

(本文编辑: 尹廉)