

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0157- 04

• 临床研究 •

## 高血压患者血管紧张素 $\text{①}$ 受体基因多态性与颈动脉硬化间的关系

林从容<sup>1</sup>, 吴可贵<sup>1</sup>, 谢良地<sup>1</sup>, 柯晓刚<sup>2</sup>, 叶琼<sup>1</sup>

(福建医科大学附属第一医院 1. 福建省高血压研究所, 2. B 超室, 福建省福州市 350005)

[关键词] 原发性高血压; 基因多态性; 血管紧张素 $\text{①}$ ; 聚合酶链反应; 动脉硬化

[摘要] 为探讨血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体基因多态性与原发性高血压及与高血压颈动脉硬化之间的关系, 将高血压患者( $n=120$ )和正常对照者( $n=86$ )进行血压、身高、体重、空腹血糖及血清总胆固醇和甘油三酯浓度测定, 用饱和盐析法常规提取外周血白细胞 DNA, 采用多聚酶链式反应结合限制性内切酶法检测血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体基因的 C1166 等位基因在正常人和原发性高血压患者中的频率。并测定正常对照组( $n=32$ )和高血压组( $n=68$ )颈总动脉内膜-中膜厚度、管腔内径及壁/腔比值。结果发现, 高血压患者血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体基因 AC 基因型频率比正常对照者高( $P<0.01$ ); 高血压组 C1166 等位基因频率高于正常对照组( $P<0.05$ ); AC 基因型高血压患者颈总动脉内膜-中膜厚度比 AA 基因型高血压患者厚( $P<0.05$ ), AC 基因型高血压患者壁/腔比值大于 AA 基因型高血压患者( $P<0.01$ ), AA 和 AC 基因型高血压患者颈总动脉内径无差别。提示血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体基因 A1166C 多态性与中国人高血压病有关, 并且可能与高血压动脉硬化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Relationship between Angiotensin $\text{①}$ Type 1 Receptor Gene Polymorphism and Carotid Artery Arteriosclerosis in Essential Hypertension Patients

LIN Cong- Rong, WU Ke- Gui, XIE Liang- Di, and YE Qiong

(The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

**MeSH** Essential Hypertension; Gene Polymorphism; Angiotensin  $\text{①}$ ; Polymerase Chain Reaction; Arteriosclerosis

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the relationships between polymorphism of candidate gene and carotid artery arteriosclerosis in essential hypertension (EH) patients, the frequencies of C1166 allele of angiotensin II type 1 receptor ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) gene was determined in normotensives and hypertensives. **Methods** Blood pressure (Bp), body mass index (BMI), fasting serum glucose (Glu), serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were measured in 86 normotensives and 120 hypertensives. Intimal - medial thickness (IMT), diameter (D) and I/D of common carotid artery in 32 normotensives and 68 hypertensives were determined. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by standard method. Polymerase chain reaction (PCR) combined with restriction enzyme digestion was used to detect the polymorphism. **Results** The frequency of AC genotype and C1166 allele of  $\text{AT}_1\text{R}$  gene of EH patients were higher than that of control ( $P<0.01$  and  $P<0.05$ ), EH subjects with AC genotype had increased common carotid artery IMT and I/D than those with AA genotype ( $P<0.05$  and  $P<0.01$ ). **Conclusions** A1166C polymorphism of  $\text{AT}_1\text{R}$  gene were associated with EH in Chinese population. C1166 allele of  $\text{AT}_1\text{R}$  gene may play a role in arteriosclerosis of hypertension.

目前, 有关高血压相关基因的研究十分活跃。由于血管紧张素 $\text{①}$ 在高血压发生、发展中有重要作用, 而血管紧张素 $\text{①}$ 1型 (angiotensin  $\text{①}$  type 1,  $\text{AT}_1$ ) 受体亚型 ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) 介导其绝大多数生物学作用<sup>[1]</sup>, 因此  $\text{AT}_1\text{R}$  基因成为高血压病的一个重要候

选基因。1994 年, Bonnardeaux 等<sup>[2]</sup>发现高血压患者  $\text{AT}_1\text{R}$  的 C1166 等位基因频率显著增高。此后, 其他学者也进行这方面研究, 但研究结论不一致。目前国内这方面的研究很少, 研究的样本数均较少, 结论又不一致<sup>[3,4]</sup>, 且尚未有  $\text{AT}_1\text{R}$  基因多态性与高血压并发症关系的研究, 因此迫切需要扩大样本量做进一步探讨。应用超声检测颈动脉硬化情况, 研究  $\text{AT}_1\text{R}$  基因多态性与中国人高血压病及其动脉硬化的关

[基金项目] 福建省科委基金资助项目(项目编号 98A061)

[作者简介] 林从容, 女, 1970 年 3 月出生, 福建省南安县人。获心血管专业硕士学位, 主要从事高血压病相关基因研究。

系,这在国内尚无报道。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

原发性高血压患者 120 例,来自本院心内科住院病人。高血压符合 WHO 诊断标准,并排除冠状动脉粥样硬化性心脏病、糖尿病及继发性高血压。正常对照者 86 例,来自健康体检者。

### 1.2 临床指标测定

测定血压、身高、体重、空腹血糖、血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 浓度。

### 1.3 动脉相关指标检测

检测 32 例正常人和 68 例原发性高血压患者。采用美国 ACUSON ASPEN 型彩色多普勒超声显像仪,探头频率 9~11 MHz,由专人操作。检测颈动脉时,患者去枕仰卧位,头偏向对侧,探头沿锁骨内侧端纵切,探至颈总动脉分叉点水平时,颈总动脉选择近心端距分叉部位约 1 cm 处,获得清晰的血管图像后,局部放大停顿测量内膜中层复合体厚度及管腔内径。测定动脉后壁第 1 声波界面(血液-内膜)与第 2 声波界面(血管中层-外层)之间的距离,即为内膜-中膜厚度(intimal-medial thickness, IMT)。测定动脉前后壁的第 2 界面距离,即为管腔内径(diameter, D),并计算 I/D 比值。

### 1.4 目的基因扩增

饱和盐析法常规提取外周血白细胞 DNA,扩增目的基因片段。AT<sub>1</sub>R 基因扩增所用的引物序列<sup>[5]</sup>为:引物 1: 5' ATAATGTAAGCTCATCCACC 3'; 引物 2: 5' GAGATTGCATTTCTGTCAGT 3' (引物由上海生工公司合成)。PCR 扩增:PCR 反应总体积 30  $\mu$ L,其中 DNA 模板约 100 ng, dNTP 200  $\mu$ mol/L,上下游引物各 20 pmol, 10 $\times$  buffer(不含 MgCl<sub>2</sub>) 3  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.2 单位。应用 PE-2400 扩增仪(美国 PE 公司)进行扩增反应。

PCR 反应设置为 93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后进入循环: 93 $^{\circ}$ C 变性 40 s  $\rightarrow$  53 $^{\circ}$ C 退火 50 s  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。共进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下检测。

### 1.5 基因型检测

取 PCR 产物 6  $\mu$ L,限制性内切酶 DdeI 6 单位, 10 $\times$  缓冲液 1.5  $\mu$ L(购自 Promega 公司),灭菌去离子双蒸水 6.9  $\mu$ L,反应总体积 15  $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下检

测,Marker 采用 100 bp 的 DNA ladder (MBI 公司)。

### 1.6 统计学分析

用 SPSS 统计软件处理。临床指标比较采用 ANOVA 检验,颈总动脉相关指标比较采用  $t$  检验,基因频率比较用  $\chi^2$  检验。所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 临床指标比较

高血压组收缩压(systolic blood pressure, SBP)为 169.15  $\pm$  28.36 mm Hg,舒张压(diastolic blood pressure, DBP)为 97.98  $\pm$  16.15 mm Hg,对照组 SBP 为 120.48  $\pm$  10.36 mm Hg, DBP 为 76.27  $\pm$  8.44 mm Hg,两组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。高血压组空腹血糖、血脂及体重指数均略高于正常组,但无统计学意义。

### 2.2 AT<sub>1</sub> 受体基因型与等位基因频率比较

共扩增成功 116 例原发性高血压患者和 86 例正常人 DNA 标本。PCR 扩增产物为 360 bp 片段,若扩增片段中存在 A1166  $\rightarrow$  C 碱基替换,则产生 DdeI 切点(C $\blacktriangle$  TNAG),经 DdeI 内切酶消化后产生 220 bp 和 140 bp 两个片段。因此,AA 基因型只有一个片段,AC 基因型有三个片段,CC 基因型有两个片段。本研究检测的所有标本中均未发现 CC 纯合子(图 1, Figure 1)。

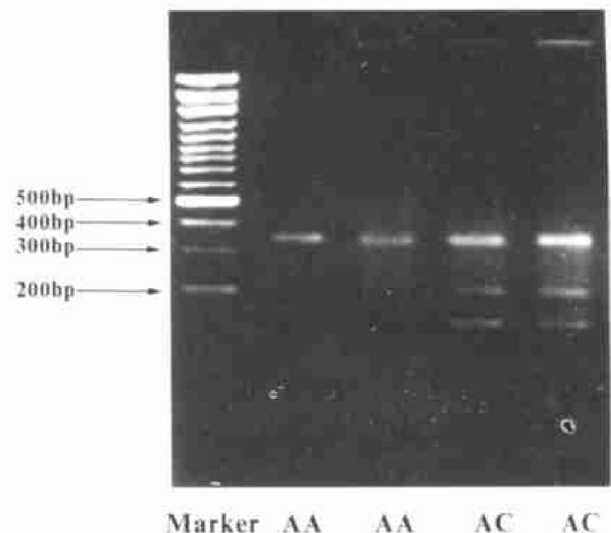


图 1. 经 DdeI 内切酶检测的 AT<sub>1</sub> 受体基因型。

Figure 1. Genotypes of AT<sub>1</sub>R gene detected by DdeI digestion.

高血压组 AC 基因型频率与对照组 AC 基因型频率有显著差异( $P < 0.01$ )。高血压组 C1166 等位

基因频率与对照组 C1166 等位基因也有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 1 (Table 1)。

表 1. 高血压组与对照组 AT<sub>1</sub> 受体基因型及基因频率比较。

Table 1. Comparison of genotypes and allele frequencies of AT<sub>1</sub> R gene between essential hypertensive group and control group (n, %).

Groups	n	Genotypes			Alleles	
		AA	AC	CC	A	C
Control	86	81(94.2)	5(5.8)	0	167(97.1)	5(2.9)
EH	116	95(81.9)	21(18.1) <sup>a</sup>	0	211(90.9)	21(9.1) <sup>b</sup>

a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ , compared with control group.

### 2.3 颈总动脉相关指标比较

与对照组相比, 高血压组颈总动脉 IMT 显著增厚, 管腔内径显著增大, I/D 比值显著增高 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 2 (Table 2)。

表 2. 高血压组与对照组颈总动脉内膜-中膜厚度、管腔及壁/腔比值比较。

Table 2. Comparison of common carotid arterial IMT, D and I/D between essential hypertensive group and control group.

Groups	n	IMT (mm)	D (mm)	I/D
Control	32	0.67 ± 0.11	6.93 ± 0.62	0.08 ± 0.01
EH	68	0.93 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.30 ± 1.01 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.4 高血压组不同 AT<sub>1</sub> 受体基因型颈总动脉相关指标比较

68 例高血压患者行颈总动脉超声检查, 其中 AC 基因型组颈总动脉 IMT、I/D 比值显著高于 AA 基因型组 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ), AC 基因型组颈总动脉管腔内径与 AA 基因型组无显著性差异 (表 3, Table 3)。

表 3. 高血压组不同 AT<sub>1</sub> 受体基因型颈总动脉内膜-中膜厚度、管腔内径及壁/腔比值比较。

Table 3. Common carotid arterial IMT, D and I/D comparison between AT<sub>1</sub> R genotypes in EH group

Genotypes	n	IMT (mm)	D (mm)	I/D
AA	58	0.89 ± 0.21	8.39 ± 1.11	0.10 ± 0.02
AC	10	1.13 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.23 ± 0.95	0.14 ± 0.02 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with AA genotype

### 2.5 多因素对高血压患者颈总动脉内膜-中膜厚

### 度及管腔内径的影响分析

将 SBP、DBP、TC、TG、年龄、体重指数及高血压病程以及 AT<sub>1</sub>R 基因型做多元逐步回归分析结果显示, 年龄是颈总动脉 IMT 的主要影响因素, AC 基因型是颈总动脉 IMT 的一个影响因素; 收缩压是颈总动脉内径的主要影响因素, AC 基因型并非颈总动脉内径的影响因素。

## 3 讨论

肾素-血管紧张素系统调节水盐代谢、血管张力和交感神经系统活性, 在高血压发病机理中有重要作用。血管紧张素 Ⅱ 是其中最重要的成分, 是已知内源性升压物质中作用最强的激素之一。血管紧张素 Ⅱ 还可促进血管平滑肌细胞增殖和迁移, 促进泡沫细胞生成, 促进血小板聚集、粘附<sup>[6]</sup>, 在高血压和动脉硬化形成中有重要作用。血管紧张素 Ⅱ 必需通过其受体发挥作用。血管紧张素 Ⅱ 受体有 I 型 (AT<sub>1</sub>R) 和 Ⅱ 型两种。血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型主要分布于血管平滑肌细胞上, 介导血管紧张素 Ⅱ 的绝大多数生物学作用<sup>[1]</sup>, 血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型基因理所当然成了高血压病研究的重要候选基因。因此, 我们对血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型基因多态性与高血压和动脉硬化之间的关系进行研究。血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型基因定位于 3 号染色体上, 其编码区全长 1 kb, 只有一个外显子, 无内含子结构, 能编码 359 个氨基酸<sup>[7]</sup>。1994 年, Bonnardeaux 等<sup>[2]</sup>发现血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型基因 A1166C 在高血压病患者和正常者之间突变频率存在差异。此后, 澳大利亚学者 Wang 在另一研究中也发现高血压患者 C1166 等位基因频率显著高于正常组<sup>[8]</sup>。也有研究认为高血压患者与正常人的血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型基因的 C 等位基因频率无差异<sup>[9, 10]</sup>。本文研究中国高血压患者 AC 基因型频率高于正常对照组, C 等位基因频率比正常人 C 等位基因频率高, 说明血管紧张素 Ⅱ 受体 1 型基因 A1166C 多态性与中国人高血压病有关。各个研究结论不尽相同, 可能与研究对象来自不同种族、不同地区有关。

本研究中高血压患者颈总动脉 IMT、D、I/D 比值均比对照组大。这是由于血压升高加上非压力性因素如神经、体液、遗传因素, 以及长期的高血压又有利于脂质在大中动脉内膜沉积而发生动脉粥样硬化, 使高血压患者动脉血管包括弹力动脉、肌性动脉均存在血管壁肥厚, 血管壁/腔比值增加。此外, 长期的高血压使大动脉中弹力层发生退行性变, 因而

管腔扩大<sup>[11]</sup>。

本研究以超声检查颈总动脉 IMT、D 及 I/D 作为反映动脉硬化的指标。因为超声检查是一种无创、比较准确和简便的方法,而颈动脉是连接心脑两个重要脏器的管道,位置比较表浅,超声检查干扰少,应用高频探头易获得高质量的声像图,以颈动脉 IMT 作为动脉硬化标志已经是目前比较公认的方法<sup>[12]</sup>。采用颈动脉 I/D 比值能减少个体间 IMT 及 D 指标存在差异的影响,更客观地反映了高血压动脉硬化程度。本研究发现 AC 基因型高血压患者 IMT 比 AA 基因型高血压患者厚, I/D 比值大,即 AC 基因型高血压患者颈总动脉硬化程度比 AA 基因型显著, C1166 等位基因可能是高血压病发生动脉硬化的一个易感因素。AC 基因型高血压患者 D 值与 AA 基因型高血压患者无差异,这可能由于高血压患者动脉管径扩大主要是压力因素引起,而与体液因素如血管紧张素 $\text{②}$ 关系不大。多元逐步回归分析也提示, AC 基因型是高血压患者动脉硬化的一个影响因素,但其作用可能不如年龄及血压对动脉硬化作用大。本研究结果与 Girerd 等<sup>[13]</sup>研究结果不同,他们认为血管紧张素 $\text{②}$ 受体 1 型基因多态性与颈动脉管壁厚度无关。结论不同的原因可能是本研究对象为高血压人群,而他们选择的是无明显心血管病的人群。肾素-血管紧张素系统在高血压和正常人中所处的状态是不同的,高血压患者局部肾素-血管紧张素常处于过度激活状态,因此血管紧张素 $\text{②}$ 受体 1 型基因多态性对高血压患者动脉硬化的影响可能与该多态性对无心血管病人动脉硬化的影响不同。本研究从另一角度支持 Benetos 等<sup>[14]</sup>的实验结果,他们发现血管紧张素 $\text{②}$ 受体 1 型的 C 等位基因是高血压患者主动脉硬化的一个强的独立决定因素,而在正常人群中则无此关系。

综上所述,本研究采用超声检测颈动脉,进行高血压相关基因与高血压动脉硬化关系的研究,丰富了我国高血压相关基因研究的内容和结果,对高血压及动脉硬化并发症的防治策略有一定的指导意义。

#### 参考文献

- [1] Smith RD, Timmemans PB. Human angiotensin receptor subtypes [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1994, **3**: 112- 122
- [2] Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, et al. Angiotensin II type I receptor gene polymorphisms in human essential hypertension [J]. *Hypertension*, 1994, **24**: 63- 69
- [3] 项坤三, 郑泰山, 孙多奇, 等. iv型血管紧张素 II 受体基因多态性与中国人冠心病、高血压及糖尿病的关系 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1998, **15**: 9- 12
- [4] 樊红, 李少英, 顾维娟, 等. 血管紧张素 $\text{②}$ 的 I 型受体与原发性高血压的相关性研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1998, **15**: 101- 103
- [5] Katsuya T, Koite G, Yee TW, et al. Association of angiotensinogen T235 variant with increased risk of coronary heart disease [J]. *Lancet*, 1995, **345**: 1 600- 603
- [6] Stajszyk M, Gminski J. The role of DNA polymorphism in renin-angiotensin system and the pathogenesis of cardiovascular disease [J]. *Postępy Hig Med Dose*, 1997, **51**: 171- 183
- [7] Furuta H, Deng- Fu G, Inagami T, et al. Molecular cloning and sequencing of gene encoding human angiotensin II type I receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **183**: 910- 916
- [8] Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ, et al. Association of angiotensin II type I receptor gene polymorphism with essential hypertension [J]. *Clin Genet*, 1997, **51**: 31- 34
- [9] Szobath T, Szalai C, Katalin B, et al. Association of angiotensin II type I receptor polymorphism with resistant essential hypertension [J]. *Clin Chim Acta*, 1998, **269**: 91- 100
- [10] Schmidt S, Beige J, Walla FM, et al. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type one receptor is not associated with hypertension [J]. *J Hypertens*, 1997, **15**: 1 385- 388
- [11] Boutouyrie p, Taurets, Renets A, et al. Opposing effect of aging on distal and proximal large arteries in hypertensives [J]. *J Hypertens*, 1992, **10** (Suppl): S87- 91
- [12] Heiss G, Sharret AR, Barenas R, et al. Carotid arterosclerosis measured by B mode ultrasound in population: Association with cardiovascular risk factor in the ARIC study [J]. *Am J Epidemio*, 1991, **134**: 250- 251
- [13] Girerd X, Hamon O, Mourad JJ, et al. Lack of association between renin - angiotensin system, gene polymorphisms and wall thickness of the radial and carotid arteries [J]. *Hypertension*, 1998, **32**: 579- 583
- [14] Benetos A, Topouchian J, Richard S, et al. Influence of angiotensin II type I receptor polymorphism in aortic stiffness in never treated hypertensive patients [J]. *Hypertension*, 1995, **26**: 44- 47

(此文 1999- 10- 27 收到, 2000- 05- 15 修回)

(此文编辑 文玉珊)