

## 血管紧张素 $\text{AT}_1$ 型受体基因多态性与青年高血压病的相关性

方明<sup>1</sup>, 彭健<sup>2</sup>, 龚五星<sup>1</sup>, 彭澍<sup>1</sup>

(1. 暨南大学医学院附属第三医院心内科; 2. 中山大学附属第五医院心内科, 广东省珠海市 519000)

[关键词] 分子生物学; 遗传因素与早发高血压相关; 病例对照研究; 青年; 血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体; 基因多态性

[摘要] 为探讨血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体基因 A1166C 多态性与青年高血压病的关系, 测定 104 名高血压病患者和 154 名正常血压对照组的血压, 记录高血压病患者的起病年龄。用聚合酶链反应—限制片段长度多态性法鉴定血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体基因 1166 位点基因型; 卡方检验分析病例组与对照组间血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体 1166 位点基因型及等位基因频率的差别; 按起病年龄分层, 分析青年病例组与青年对照组和中老年病例组基因型及等位基因频率的差别。结果发现, 病例组血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体基因 AC+ CC 基因型频率高于对照组 (0.202: 0.097,  $P < 0.05$ ), 比值比为 2.34 (95% 可信区间为 1.15~4.67), 1166C 等位基因频率显著高于对照组 (0.115: 0.052,  $P < 0.01$ ); 青年病例组血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体基因 AC+ CC 基因型频率显著高于青年对照组 (0.405: 0.091,  $P < 0.01$ ), 比值比为 6.82 (95% 可信区间为 2.02~23.08), 1166C 等位基因频率显著高于对照组 (0.229: 0.054,  $P < 0.01$ ); 病例组内青年患者 AC+ CC 基因型频率显著高于中老年患者, 携带 C 等位基因患者的起病年龄显著早于 AA 基因型患者。以上表明血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体基因 1166 位点 AC+ CC 基因型及 C 等位基因与高血压病呈正相关, 并能增加青年人群罹患高血压病的危险性, 其在高血压病早发方面的作用不容忽视。

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

## The Relationships between Angiotensin $\text{AT}_1$ Type 1 Receptor Gene Polymorphism and Hypertension in Youth

FANG Ming<sup>1</sup>, PENG Jian<sup>2</sup>, GONG Wu Xing<sup>1</sup>, and PENG Shu<sup>1</sup>

(1. Molecular Biological Center of 3rd Affiliated Hospital of Jinan University; 2. Cardiology Department of 5th Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[KEY WORDS] Hypertension; Youth; Angiotensin  $\text{AT}_1$  Receptor; Gene; Polymorphism; Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationships between essential hypertensives and the polymorphism of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene in youth. **Methods** 104 hypertensive and 154 normotensive subjects were studied. All subjects were divided into four groups according to the age: young hypertensives, aged hypertensives, young and aged normotensives. The A  $\rightarrow$  C variant at position 1166 (A1166C) of the AT1R gene was identified by polymerase chain reaction (PCR) and PCR/restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) analysis. The frequencies of AC+ CC genotypes and 1166C allele of AT1R gene between hypertensives and normotensives were analyzed by Chi-Square test. **Results** The frequencies of AC+ CC genotypes and 1166C allele of AT1R gene in hypertensives were higher than those in control (AC+ CC genotypes 0.202: 0.097,  $P < 0.05$ ; C allele 0.115: 0.052,  $P < 0.01$ ), the OR (odds ratio) is 2.34 (95% CI: 1.15~4.67). More statistically significant of C1166 allele frequency and the AC+ CC genotype distribution were obtained in youth between the case and the control when age was hierarchically analyzed (AC+ CC genotypes 0.217: 0.088,  $P < 0.01$ ; C allele 0.183: 0.044,  $P < 0.01$ ), the OR reach to 6.82 (95% CI: 2.02~23.08). Further more, in the case group, the frequencies of AC+ CC genotypes and 1166C allele of AT1R gene in youth were higher than those in middle aged and the aged. **Conclusions** 1166 AC+ CC genotypes and 1166C allele of AT1R gene were related to essential hypertension and could increase the fatality of suffering from hypertension in youth.

It plays an important role in patients who suffered from premature essential hypertension.

[收稿日期] 2002-07-31

[修回日期] 2003-03-02

[作者简介] 方明, 男, 1975 年出生, 湖北省黄石市人, 暨南大学医学院 2000 级在读硕士研究生, 研究方向为高血压病分子生物学诊断与治疗, 联系地址: 珠海市人民医院分子生物中心, E-mail: wellfm@163.com。彭健, 男, 1958 年出生, 四川省内江市人, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病临床研究, E-mail: zhuhaipj@163.com。

原发性高血压 (essential hypertension, EH) 是中老年人群最为常见的疾病之一, 近年来流行病学资料和临床研究发现, 原发性高血压的发病率不仅逐年增高, 其起病年龄亦有明显年轻化的趋势。随着对 EH 病因学研究的不断深入和分子生物学技术的进步, 人们越来越多地注意到遗传因素在该病发生中

的地位和作用,而疾病与遗传因素有关的一个重要特征便是发病年龄较早。本文通过研究血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体(angiotensin $\text{①}$ type 1 receptor, AT1R)基因A1166C多态性与珠海地区广东籍汉族人群,尤其是与青年人群原发性高血压的相关关系,旨在从分子生物学水平探讨遗传背景对原发性高血压,特别是早发原发性高血压的影响,以期为该病的预防和治疗提供方向。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

原发性高血压患者来源于2001年8月~2002年6月珠海市人民医院心血管专家门诊病人及心内科住院病人,共104例,其中男58例,女46例,年龄 $54 \pm 11$ 岁,根据1999年WHO/ISH防治指南<sup>[1]</sup>诊断和分类EH,纳入1~2级高血压者,血压为 $(140 \sim 179)/(90 \sim 109)$  mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)。对照组共154例,为同期来医院门诊作常规健康体检的正常血压者,男87例,女67例,年龄 $53 \pm 10$ 岁。两组均为无EH家族史广东籍汉族人群,年龄均为19~69岁之间,经方差齐性检验及卡方检验,两组血压和年龄等临床资料间方差均齐同,且年龄及性别无差异。均排除继发性高血压、严重肝肾功能损害、糖尿病、冠心病以及其他心血管疾患。按照世界卫生组织(WHO)1991年年龄划分标准将本研究18~44岁的人群界定为青年,45岁以上为中老年,籍此对病例组和对照组进行年龄分层。

### 1.2 聚合酶链—限制片长多态性法鉴定血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体1166位点基因型

基因组DNA的提取:取肝素抗凝静脉血2 mL,白细胞分离,低渗溶血,酚/氯仿法提取基因组DNA,TE溶解,−20℃保存待测。目的片段聚合酶链反应扩增:上游引物:5'-CACCATGTTTGTGAGGTTG-3',下游引物:5'-CGAGTTTCTGACATTGTTG-3'。聚合酶链反应体系:总体积20  $\mu$ L,其中模板DNA 1  $\mu$ L,上、下游引物各0.35  $\mu$ mol/L, dNTP 200  $\mu$ mol/L, 10×buffer 2  $\mu$ L, Taq酶(上海生工公司) 2 u。应用PE-2400全自动基因扩增仪扩增目的片段。聚合酶链反应参数为:95℃预变性5 min→55℃退火3 min(加入Taq酶)→72℃延伸2 min,循环1次;然后94℃变性50 s→55℃退火1 min→72℃延伸1 min,循环35次,最后72℃延伸10 min。扩增产物通过1%琼脂糖凝胶电泳20 min, EB染色,紫外灯下检测。聚合酶链反应产物的酶切:酶切体系总反应体积20  $\mu$ L,其中聚合酶

链反应产物10  $\mu$ L,限制性内切酶DdeI 5 u, 10×buffer 2.5  $\mu$ L,灭菌去离子双蒸水7  $\mu$ L, 37℃下反应20 h。产物在100 V电压、1.5%琼脂糖凝胶中电泳30 min, EB染色,紫外灯下鉴定基因型。

### 1.3 基因型判断

聚合酶链反应实验中扩增产物为274 bp的片段。如血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体基因1166位点的碱基A被C替代,则出现一个限制性酶切位点,可被限制性内切酶DdeI水解。在紫外灯下鉴定酶切后的电泳带,如两等位基因均无酶切位点,可见一条274 bp的荧光带,定义为无突变的纯合子AA型;如两等位基因均有酶切位点,可产生165 bp和109 bp两条带,定义为有突变的纯合子CC型;如仅一个等位基因含有酶切位点,则产生274 bp、165 bp和109 bp三条带,定义为部分突变的杂合子AC型(图1, Figure 1)。

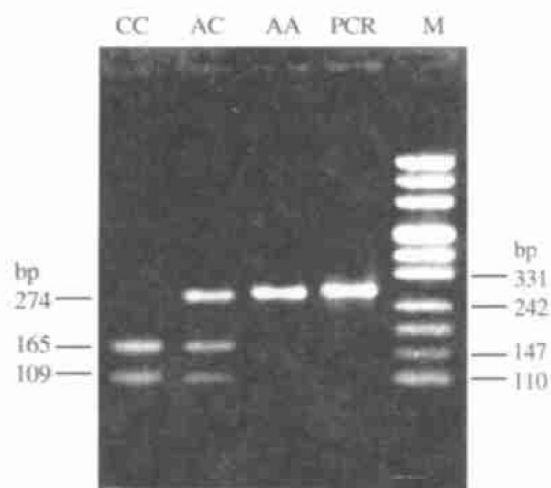


图1. 血管紧张素 $\text{①}$ 1型受体基因聚合酶链反应扩增片段及限制性酶切后片段

Figure 1. PCR and restriction enzyme cutting results of AT1R gene

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 8.0统计软件。正常对照组与病例组之间血压、年龄的比较采用单因素方差分析,基因频率比较采用卡方检验;按照上述年龄标准对病例的起病年龄和对照组年龄分析,用单因素方差分析两组间年龄的差别;病例组内按照上述年龄标准分层,用卡方检验分析青年EH患者基因型频率和等位基因频率。所有计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以含有AT1R-1166C等位基因为暴露因素,分别计算其在普通人群和青年人群中对EH的比值比(OR值)及其95%可信区间。

2 结果

2.1 原发性高血压组与对照组之间血管紧张素 ① 型受体基因型与等位基因频率的比较

154 名正常对照组中发现 AC 型 14 例, CC 型 1 例; 104 名 EH 患者中发现 AC 型 18 例, CC 型 3 例。由于检测出的 CC 基因型数量较少, 统计时将 CC 型与 AC 型合并分析。

病例组 AC+ CC 基因型频率为 0.202, 对照组为 0.097( $P < 0.05$ ); 病例组 C 等位基因频率为 0.115, 对照组为 0.052( $P < 0.01$ ) (表 1, Table 1)。AC+ CC 基因型对 EH 的比值比为 2.34(95% 可信区间为 1.15 ~ 4.67)。

表 1. 原发性高血压组与对照组间血管紧张素 ① 型受体基因型频率及等位基因频率的比较

Table 1. The distribution of AT1R genotype and gene frequencies in hypertensives and controls

分 组	基因型		等位基因	
	AA	AC+ CC	A	C
病例组	83 (0.798)	21 (0.202)	184 (0.885)	24 (0.115)
对照组	139 (0.903)	15 (0.097)	292 (0.948)	16 (0.052)

两组间基因型比较:  $\chi^2 = 5.648$ ,  $P = 0.017$ ; 两组间等位基因比较:  $\chi^2 = 6.987$ ,  $P = 0.007$ 。

2.2 青年原发性高血压组与青年对照组及中老年原发性高血压组间血管紧张素 ① 型受体基因型及等位基因频率的比较

年龄分层后病例组内青年患者 37 例, 其中 AC 型 13 例, CC 型 2 例, AC+ CC 基因型频率为 0.405, C 等位基因频率为 0.229; 对照组内青年患者 44 例, 其中 AC 型 4 例, AC+ CC 基因型频率为 0.091, C 等位基因频率为 0.054, 两组基因型频率和 C 等位基因频率差异有显著性( $P < 0.01$ ); AC+ CC 基因型对 EH 的比值比为 6.82(95% 可信区间为 2.02 ~ 23.08)。病例组内中老年患者共 67 例, 其中 AA 型者 61 例, AC 型者 5 例, CC 型者 1 例, AC+ CC 基因型频率为 0.080, C 等位基因频率为 0.052, 与青年患者比较基因型及 C 等位基因频率差异有显著性( $P < 0.01$ ) (表 2, Table 2)。

2.3 原发性高血压组内不同血管紧张素 ① 型受体 1166 位点基因型患者起病年龄的比较

104 名原发性高血压患者按不同基因型分为两组, AA 型 83 人, AC+ CC 型 21 人, AA 型患者起病年龄( $50 \pm 8$  岁) 大于 AC+ CC 型患者( $40 \pm 8$  岁), 通过单因素方差分析后发现两组起病年龄差异具有显著

性( $P < 0.01$ )。

表 2. 青年原发性高血压组与青年对照组及中老年原发性高血压组间血管紧张素 ① 型受体基因型频率及等位基因频率比较

Table 1. The distribution of AT1R genotype and gene frequencies in young hypertensives, aged hypertensives and young controls

分 组	基因型		等位基因	
	AA	AC+ CC	A	C
青年对照组	40(0.909)	4(0.091)	84(0.955)	4(0.054)
病例组青年	22(0.595)	15(0.405)	57(0.771)	17(0.229)
病例组中老年	61(0.910)	6(0.080)	127(0.948)	7(0.052)

病例组与青年对照组间基因型比较:  $\chi^2 = 11.07$ ,  $P = 0.001$ , 两组间 C 等位基因比较:  $\chi^2 = 13.00$ ,  $P = 0.001$ ; 病例组内青年和中老年间基因型比较:  $\chi^2 = 14.76$ ,  $P = 0.000$ , 两组间 C 等位基因比较:  $\chi^2 = 14.71$ ,  $P = 0.000$ 。

3 讨论

肾素-血管紧张素系统在原发性高血压及其并发症的发生发展中具有重要作用, 血管紧张素 ① 型受体作为肾素-血管紧张素系统级联反应最后作用于靶细胞的共同通路倍受关注。血管紧张素 ① 型受体基因 A1166C 多态性位于 3' 端非翻译区的 5' 末端, 由碱基 A 被 C 替换而形成。自 Bonnardeaux 等<sup>[2]</sup>报道了血管紧张素 ① 型受体基因 A1166C 多态性与原发性高血压的相关性以来, 该基因的这一位点一直是高血压及冠心病领域前沿的研究热点<sup>[3,4]</sup>。但直至目前, 该基因多态性与原发性高血压的关系仍存在较大争议。本研究结果表明, 在珠海地区广东籍汉族人群中, 原发性高血压患者 AC+ CC 基因型频率及 C 等位基因频率均高于正常对照组, 说明血管紧张素 ① 型受体基因 A1166C 多态性与我国广东人原发性高血压相关, 普通人群中 AC+ CC 基因型者较 AA 型者患原发性高血压的风险性增加 2.34 倍, 这与来自澳大利亚<sup>[5]</sup>、波兰<sup>[6]</sup>和俄罗斯<sup>[7]</sup>等地区的报道相符, 并且为这一观点增添了新的客观依据。与此同时国外也有研究得出该等位基因频率与原发性高血压无关联的结论<sup>[8]</sup>, 结论不一致的原因可能与遗传异质性以及研究对象种族、地域和研究方法不同有关。

本研究在对病例组和对照组的年龄进一步分层分析后发现, 45 岁以下青年起病的病例组与青年对照组之间 AT1R-1166 AC+ CC 基因型频率和 C 等位基因频率的差别比分层前更为显著( $P < 0.01$ ), 其患

原发性高血压的风险性比 AA 型者增加了 6.82 倍,提示 C 等位基因能明显增加青年人群罹患原发性高血压的危险性;同时我们还比较了病例组内不同年龄结构人群中 AT1R-1166 位点基因型和 C 等位基因频率,发现青年患者中的 AC+ CC 基因型及 C 等位基因频率要显著高于中老年患者,并且病例组 AC+ CC 基因型患者的起病年龄也显著低于 AA 型患者,表明 C 等位基因在促进原发性高血压早期发生方面的作用不容忽视。此结论与 Bonnardeaux 等<sup>[2]</sup>的研究结果一致。目前国外此领域内针对青年人群原发性高血压的病例对照研究报道较少,国内尚未见报道。

高血压流行病学资料表明,我国原发性高血压的发病率逐年升高<sup>[9]</sup>,并且其起病年龄也日趋年轻化<sup>[10]</sup>,其根本原因尚不清楚。原发性高血压是环境因素参与下的多基因遗传性疾病,目前多数认为血压的水平 40% 由遗传基因决定,60% 受环境因素的影响<sup>[11]</sup>,而早期发病现象是遗传性疾病的共同特点。青年原发性高血压患者作为一个重要的群体,越来越受到广大研究者的重视,随着遗传性关联分析和连锁分析方法的应用,以及转基因高血压动物模型的实验成功,目前深入研究基因与原发性高血压的关联性已经成为目前该病病因学研究的主要方向。我们以及国内外多数分子流行病学研究表明血管紧张素  $\text{②}$ 1 型受体基因 1166 位点多态性与原发性高血压的发生发展存在相关性,本研究尚发现该多态性与早发原发性高血压存在更为紧密的联系,血管紧张素  $\text{②}$ 1 型受体基因 1166 位点 AC+ CC 基因型及 C 等位基因明显增加了青年人群罹患原发性高血压的危险性,并促进原发性高血压的早期发生。已有研究表明,C 等位基因能使血管紧张素  $\text{②}$ 1 型受体对血管紧张素  $\text{②}$ 产生更强的血流动力学反

应<sup>[11]</sup>,提示遗传背景对受体功能造成了影响,而这种影响使具备这种遗传背景的个体原发性高血压的早发成为可能。我们认为,对该位点基因多态性的检测将有助于阐明早发原发性高血压的遗传本质和发病机制,进而对该病的临床分型、预后判断、个体化治疗和易感人群的早期检出及预防产生重要影响。

#### [参考文献]

- [1] Guideline Subcommittee. 1999 world health organization international society of hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens*, 1999, 17: 151-183
- [2] Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Charu A, Clauser E, Tiret L, et al. Angiotensin  $\text{②}$  type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*, 1994, 24: 63-69
- [3] 方明,彭健. 血管紧张素  $\text{②}$ 1 型受体研究进展. *高血压杂志*, 2002, 10 (4): 396-398
- [4] 彭健,彭澍,龚五星. 冠心病患者血管紧张素  $\text{②}$ 1 型受体 A1166/C 基因多态性的相关分析. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (5): 457-460
- [5] Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ. Association of angiotensin  $\text{②}$  type I receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet*, 1997, 51: 31-34
- [6] Dzida G, Sobstyl J, Puzniak A, Golon P, Mosiewicz J, Hanzlik J. Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and angiotensin  $\text{②}$  receptor type 1 genes in essential hypertension in a Polish population. *Med Sci Monit*, 2001, 7: 1236-241
- [7] Chistiakov DA, Kobalova ZD, Tereshchenko SN, Moiseev SV, Nosikov VV. Polymorphism of vascular angiotensin  $\text{②}$  receptor gene and cardiovascular disorders. *Ter Arkh*, 2000, 72: 27-30
- [8] Ashavaid TF, Shalia KK, Nair KG, Dalal JJ. ACE and AT1R gene polymorphisms and hypertension in Indian population. *J Clin Lab Anal*, 2000, 14: 230-237
- [9] 胡永华,李立明,曹卫华,詹思延,李晓晖,吴涛,等. 城乡社区原发性高血压患者情况的流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2000, 21 (3): 177-180
- [10] 唐新华,徐小玲,俞志红,金宏义. 浙江省高血压流行趋势及影响因素分析. *中国慢性病预防与控制*, 2000, 8 (5): 201-203
- [11] 刘力生(主编). 高血压. 北京:人民卫生出版社, 2001; 385-392
- [12] Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJ, et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension*, 2000, 35: 717-721

(此文编辑 朱雯霞)

#### •资料•

### 2001 年《中国科学技术论文统计源期刊》生物医学类(四)

山东中医药大学学报	神经解剖学杂志	生物工程学报
山西医科大学学报	沈阳药科大学学报	生物化学与生物物理进展
伤残医学杂志	肾脏病与透析肾移植杂志	生物化学与生物物理学报
上海第二医科大学学报	生理科学进展	生物物理学报
上海口腔医学	生理学报	生物医学工程学杂志
上海免疫学杂志	生命的化学	生殖医学杂志
上海医学	生命科学研究	生殖与避孕
上海医学检验杂志	生态学报	实验生物学报