

• 检验技术与方法 •

云南汉族 eNOS/ET-2 基因多态性与高血压的相关性研究*

赵晓丽, 胡大春[△], 王 玮, 邵剑春, 张鸿青, 钱 净, 陈爱华, 郭 皓, 蒋 杰, 李海燕
(云南省昆明市第一人民医院检验科 650011)

摘要:目的 探讨 eNOS、ET-2 基因多态性与高血压的相关性。方法 采用病例-对照相关性研究策略, 选择三代居住在云南的汉族作为研究对象, 用基因芯片检测技术, 对 100 例高血压患者及 97 例健康对照者进行 eNOS Glu298Asp(EE、ED、DD)、ET-2 A985G(AA、AG、GG)位点基因多态性检测。用 Odd Ratio 估计相对危险度。结果 云南汉族 97 例健康人群中: (1) eNOS Glu298Asp 位点的 EE、ED、DD 基因型频率分别是 0.845、0.144、0.011; E 和 D 等位基因频率分别是 0.918、0.082。 (2) ET-2 A985G 位点的 AA、AG、GG 基因型频率分别是 0.020、0.258、0.722; A 和 G 等位基因频率分别是 0.149、0.851。 (3) 云南汉族 100 例高血压患者中, ET-2 A985G(AA、AG、GG)位点基因型多态性频率与对照组比较, 差异无统计学意义。但 ET-2 A985G 位点 G 等位基因频率(0.925)与对照组(0.851)比较, 差异有统计学意义($\chi^2=5.507$ 、 $P=0.019$)、Odd Ratio=2.168(95%CI: 1.123~4.184)。 (4) eNOS Glu298Asp 位点的 DD 基因型频率(0.01)与对照组(0.01)比较, 差异无统计学意义。结论 云南汉族中 eNOS Glu298Asp 突变对高血压的发生意义不大。ET-2 A985G 等位基因可能与高血压的易感性相关。

关键词: 高血压; 一氧化氮合酶; 基因; 多态现象, 遗传; 内皮素-2

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0087-03

血管内皮细胞不仅是血液与血管平滑肌之间的生理屏障, 而且是合成活跃的代谢库, 是人体最大、分泌最多的旁分泌器官。血管内皮细胞能分泌和释放舒张、收缩血管的多种活性因子, 如前列环素、一氧化氮(NO)、内皮素、缓激肽、生长因子、黏附分子、凝血因子等等。这些因子对维持血管动态平衡有重要意义。这些因子释放失衡所导致的血管内皮功能紊乱在高血压病理、生理中有重要作用。体内 L-精氨酸可通过特异性一氧化氮合酶的作用生成 NO 和胍氨酸。NO 作为气体和无机化合物, 其水溶解度可达 3 mmol/L, 可弥散而直接作用于血管平滑肌细胞, 激活鸟苷酸环化酶, 使细胞内 cGMP 水平升高导致血管舒张, 是内皮源性的主要血管舒张因子, 也是体内重要的信号分子。大量的研究显示, NO 参与了高血压的病理机制, 在高血压患者中, 血浆 NO 水平与收缩压和舒张压呈反比^[1]。体内特异性 NO 合酶可分为原生酶和诱导酶两类, 原生酶主要分布在内皮细胞、血小板、脑细胞、肾上皮细胞等, 又称为内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)。eNOS 基因多态性也许与 NO 的释放有关。eNOS 基因位于 7q35-36, 长度为 21 kb, 由 26 个外显子组成, 第 7 外显子 894 位的核苷酸发生 G→T(G894T)点突变, 导致 298 位谷氨酸→门冬氨酸(Glu298Asp), 可能增加了高血压的危险性^[2]。内皮素(ET)是 1988 年由日本学者 Yanagisawadg 等从培养的猪主动脉内皮细胞上清液中分离到的 1 种活性多肽, 由 21 个氨基酸组成, 具有强大的收缩血管作用。现已发现内皮素家族有 3 个异构体, 即 ET-1、ET-2 和 ET-3。ET-1 是血管内皮细胞分泌的主要异构体, 也是表现血管收缩活性的主要异构体^[3]。ET-1 的主要产生部位是血管内皮细胞, 同时也在心脏、肾脏、中枢神经、垂体后叶等分泌; ET-2 由血管内皮细胞、心脏和肾脏分泌; ET-3 则由内分泌腺、消化道和中枢神经系统分泌, 内皮细胞不分泌 ET-3。由于内皮素在调节血压中的重要作用, 内皮素基因也是人们关注的高血压候选基因。1999 年英国剑桥大学的学者 Sharma 等^[4]在寻找 ET-2 基因多态性时, 发现在 ET-2 基因 3'端非翻译区存在的(3'-UTR)A985G

碱基突变, 在未治疗的高血压患者中可作为独立的预测因子。

国内、外有许多学者对 eNOS 等基因突变与血压改变及高血压的相关性进行过研究, 但研究结果因不同种族、不同地区人群及不同研究方法而存在差异。对于 ET-2 A985G 多态性与高血压相关性的研究, 目前鲜见报道。本课题用基因芯片检测技术, 对 100 例高血压患者及 97 例健康对照者进行 eNOS Glu298Asp(EE、ED、DD)、ET-2 A985G(AA、AG、GG)位点基因多态性检测, 并分析其与高血压的相关性, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象 云南汉族的界定, 父系、母系三代均为汉族, 均居住在云南境内。病例组为云南汉族, 参照 2004 年《中国高血压防治指南》, 用以下标准筛选高血压研究对象: (1) 至少连续 3 次收缩压(SBP)≥140 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)和(或)舒张压(DBP)≥90 mm Hg, 或近期接受抗高血压药物治疗至少 1 年。 (2) 30~70 岁患高血压。 (3) 无临床或实验室信息提示有继发性高血压。对照组为云南汉族, 与病例组无血缘关系, SBP<140 mm Hg 和(或)DBP<90 mm Hg, 无高血压家族史, 年龄大于或等于 40 岁。

1.1.2 样本含量的估计 根据基因多态性频率分布和对高血压的相对危险度, 估计病例组 and 对照组样本各 89 例。

1.1.3 样本来源 从 2002 年 1 月至 2007 年 3 月在本院住院和门诊就诊的患者中抽取了符合样本入选条件的 100 例高血压患者作为病例组。从同期来本院进行健康体检者中抽取符合对照组入选条件的 97 例健康者作为对照组。

1.1.4 病例组和对照组的基本特征检测指标 性别、年龄、体质指数(BMI)、高血压史、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、血清总胆固醇(TC)、血清三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹血糖(FPG)。

1.2 基因多态性检测 用上海百傲生物技术有限公司提供的基因芯片检测 eNOS Glu298Asp(EE、ED、DD)、ET-2 A985G(AA、AG、GG)位点基因多态性。按基因芯片操作说明书进行

操作。离心机:centrifuge TGL-16G,上海安亭产品。核酸蛋白检测仪:Biophotometer,Eppendorf 产品。PCR 扩增仪:MyCycler™ Thermal Cycler,BIO-RAD 公司产品。生物芯片阅读器:Biochip Reader,上海百微生物技术有限公司产品。基因分析软件:上海百微生物技术有限公司提供。

1.3 统计学处理 用直接计数法计算 eNOS Glu298Asp(EE、ED、DD)、ET-2 A985G(AA、AG、GG)位点基因型或等位基因的人群分布频率。样本的代表性用基因型多态性频率的 Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验。基因多态性分布频率的比较用 χ^2 检验。用 Odd Ratio 估计相对危险度。显著性检验水准 $\alpha=0.05$ 。计数资料、计量资料用 SPSS13.0 统计软件包完成。

2 结果

2.1 病例组与对照组的基本特征 100 例云南汉族高血压患者和 97 例对照组的基本特征见表 1。病例组和对照组的高血压史、收缩压和舒张压差异有统计学意义($P<0.01$);HDL-C、LDL-C 和 FPG 差异有统计学意义($P<0.05$);其余特征差异无统计学意义。

2.2 基因型多态性频率的 Hardy-Weinberg 平衡检验 病例组和对照组 eNOS Glu298Asp(EE、ED、DD)、ET-2 A985G(AA、AG、GG)基因型多态性频率的 Hardy-Weinberg 平衡检验, $P>0.05$,样本有代表性。

表 1 病例组和对照组基本特征

指标	病例组	对照组
性别(男/女)	48/52	42/55
年龄(岁)	57.71±9.97	55.05±10.64
BMI(kg/m ²)	23.79±2.99	24.24±4.50
高血压史(年)	7.72±4.73	0.00 ^{△△}
SBP(mm Hg)	171.47±13.01	115.66±10.99 ^{△△}
DBP(mm Hg)	100.74±8.34	73.49±8.15 ^{△△}
TC(mmol/L)	4.91±0.80	4.83±0.78
TG(mmol/L)	1.78±0.93	1.88±1.35
HDL-C(mmol/L)	1.25±0.29	1.51±0.59 [△]
LDL-C(mmol/L)	2.91±0.73	2.46±0.83 [△]
FPG(mmol/L)	5.40±1.78	4.75±0.57 [△]

注:△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

表 2 病例组与对照组 AGT/ACE 基因型和等位基因多态性频率

基因型/ 对偶基因	对照组		病例组		χ^2	P
	No	GF/AF	No	GF/AF		
eNOS E298D						
EE	82	0.845	96	0.960		
DE	14	0.144	3	0.030	8.175	0.017 0
DD	1	0.011	1	0.010		
ET-2 A985G						
AA	2	0.020	0	0.000		
AG	25	0.258	15	0.150		
GG	70	0.722	85	0.850	5.907	0.052 0

续表 2 病例组与对照组 AGT/ACE 基因型和等位基因多态性频率

基因型/ 对偶基因	对照组		病例组		χ^2	P
	No	GF/AF	No	GF/AF		
eNOS E298D						
E	178	0.918	195	0.975		
D	16	0.082	5	0.025	4.768	0.029 0
ET-2 A985G						
A	29	0.149	15	0.075		
G	155	0.851	185	0.925	5.507	0.019 0

2.3 云南汉族 eNOS Glu298Asp、ET-2 A985G 基因型及等位基因与高血压的相关性 100 例云南汉族高血压患者 eNOS Glu298Asp(E298D)、ET-2 A985G 位点的基因型和基因多态性频率分布见表 2。云南汉族 100 例高血压患者中,eNOS Glu298Asp 位点的 DD 基因型频率极低,与对照组比较,差异无统计学意义;ET-2 A985G(AA、AG、GG)基因型多态性频率与对照组比较,差异无统计学意义。但 ET-2 A985G 位点 G 等位基因频率(0.925)与对照组(0.851)比较,差异有统计学意义($\chi^2=5.507$ 、 $P=0.019$),Odd Ratio=2.168(95%CI:1.123~4.184),M-H 检验($\chi^2=4.770$ 、 $P=0.029$)。

3 讨论

近年来,国内、外有大量 eNOS Glu298Asp 多态性与高血压相关性的研究,对日本人群的研究显示 eNOS Glu298Asp 多态性与高血压存在阳性相关性,但对凯尔特英国人的研究则显示无阳性相关^[5]。对中国人群的研究结果报道也各不相同。李东宝等^[6]对北京 151 例高血压患者及 310 例健康人的研究显示,eNOS Glu298Asp 多态性的 298Asp 等位基因与中国汉族人群高血压的发生相关。但王琳等^[7]对大连人群的研究、梁茜等^[8]对广东佛山地区汉族人群的研究、谭建聪等^[9]对重庆部分人群的研究,均未发现 eNOS Glu298Asp 多态性与高血压的阳性相关。Tiago 等^[10]对包括各种文字发表的 53 个 eNOS 基因多态性与高血压相关性研究报道进行的 Meta 分析显示,在亚洲人群中,298Asp 等位基因与高血压有一定的相关性,Odds Ratios 为 1.28(95%CI:1.06~1.54),对收缩压和舒张压的贡献为 2 mm Hg;这种相关性可能依赖于血清总胆固醇水平;同时认为,目前有关 eNOS 基因突变与高血压关系报道的数据,不仅存在异质性,也存在发表偏倚。对云南汉族的研究,病例组和对照组中,298Asp 纯合子基因型频率非常低,虽然 298Asp 杂合子基因型和 298Asp 等位基因频率在 2 组间比较,差异有统计学意义,但由于频率均很低,作者认为不足以提示与高血压有相关性。

1999 年英国剑桥大学的学者 Sharma 等^[4]发现,在 ET-2 基因 3'端非翻译区(3'-UTR)A985G 碱基突变,在未治疗的高血压患者中可作为独立的预测因子。迄今,国内、外鲜见 ET-2 A985G 基因多态性与高血压相关性研究报道。云南汉族人群的研究中,对于 ET-2 A985G 位点,在病例组未检测到 AA 基因型,GG 基因型的频率与对照组比较,差异无统计学意义,但 G 等位基因频率高于对照组,G 等位基因的 Odd Ratio 为 2.648(95%CI:1.073~6.536)。ET-2 A985G 等位基因可能与高血压的易感性相关。

参考文献

- [1] Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, et al. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension[J]. *Hypertension*, 1997, 30: 405-408.
- [2] Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension[J]. *Hypertension*, 1998, 32: 3-8.
- [3] Alexei V, Agapitov, William G, Haynes. Role of endothelin in cardiovascular disease[J]. *JRAAS*, 2002, 3: 1-15.
- [4] Sharma P, Hingorani A, Jia H, et al. Quantitative association between a newly identified molecular variant in the endothelin-2 gene and human essential hypertension[J]. *J Hypertens*, 1999, 17(9): 1281-1287.
- [5] Puddu P, Puddu GM, Cravero E, et al. The genetic basis of essential hypertension[J]. *Acta cardiologica*, 2007, 62(3): 281-293.
- [6] 李东宝, 华琦, 皮林. 内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与原发性高血压的相关关系[J]. *高血压杂志*, 2004, 12(4): 326-329.
- [7] 王琳, 陈丹, 薛雨, 等. 内皮型一氧化氮合酶基因 Glu298Asp 多态性与原发性高血压的关系[J]. *国际遗传学杂志*, 2006, 29(5): 336-340.
- [8] 梁茜, 杨希立, 杨光, 等. 血管紧张素转换酶和内皮型一氧化氮合酶基因多态性与高血压的相关性[J]. *临床和实验医学杂志*, 2006, 5(7): 861-862.
- [9] 谭建聪, 祝之明, 祝善俊. 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[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(2): 158-161.
- [10] Tiago V, Pereira, Martina R, et al. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveal evidence of publication bias[J]. *Journal of Hypertension*, 2007, 25: 1763-1774.