论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1252-03

β_2-BKR基因和AGT基因多态性与原发性高血压的相关性研究

董会奕[1],李秋荣[1],王 勤[1],罗振国[2] ([1]北京大学深圳医院心血管内科,深圳 518036;[2]深圳大学生命科学学院,深圳 518060)

提 要:目的 调查缓激肽β_2受体(β_2-bradykinin receptor, β_2-BKR)基因和血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)基因多态性与原发性高血压(essential hypertension, EH)的关系。**方法** 采用病例-对照研究。用MS-PCR和PCR-SSCP方法检测深圳地区EH 97例(EH组)和血压正常者87例(NT组)的β_2-BKR基因-58T/C多态性和AGT基因M235T多态性。**结果** EH组β_2-BKR CC基因型(0.36)和C等位基因频率(0.60)显著高于NT组(0.14,$P=0.000$;0.43,$P=0.001$)。EH组CC+MT(0.19)、TC+MM(0.18)基因型显著高于NT组(0.06,$P=0.009$;0.05,$P=0.006$)。β_2-BKR CC基因型者EH的相对危险度增加($OR=1.913$,95% CI:1.913-3.049,$P=0.006$)。EH组AGT基因型分布与NT组相比无显著性差异($P=0.091$),但M等位基因频率(0.55)显著高于NT组(0.44,$P=0.037$)。**结论** β_2-BKR-58T/C多态性与深圳地区人群的EH相关,CC基因型可能与EH危险增加有关,C等位基因可能与AGT M235T多态性存在基因-基因间的协同作用。

关键词:原发性高血压;缓激肽β_2受体基因;血管紧张素原基因;基因多态性

中图法分类号:R181.33;R394;R544.102 **文献标识码**:A

Association of genetic polymorphism of β_2- bradykinin receptor gene and AGT gene with essential hypertension in Shenzhen population

DONG Hui-yi[1], LI Qiu-rong[1], WANG Qin[1], LUO Zhen-guo[2] ([1]Department of Cardiology, Beijing University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, [2]College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Objective To investigate the association between β_2-bradykinin receptor (β_2-BKR) gene and angiotensinogen gene polymorphism and essential hypertension. Methods The case-control study was conducted using MS-PCR and PCR-SSCP techniques to explore the β_2-BKR gene-58T/C polymorphism and the AGT gene M235T polymorphism in 97 essential hypertensives and 87 normotensives of Shenzhen. Results The genotypes distribution of CC and the alletic frequency of C in EH cases were significantly higher than in controls (0.36 *vs* 0.14, $P=0.000$; 0.60 *vs* 0.43, $P=0.001$). The genotype distributions of CC + MT and TC + MM in EH cases were significantly higher than controls (0.19 *vs* 0.06, $P=0.009$; 0.18 *vs* 0.05, $P=0.006$). The odds ratio for those exposed to CC genotype was 1.913, 95% confidence interval was 1.913 to 3.049, $P=0.006$. No significant difference was seen in the genotype distribution of angiotensinogen gene between EH cases and controls ($P=0.091$), but the alletic frequency of M in EH cases was significantly higher than controls (0.55 *vs* 0.44, $P=0.037$). Conclusion The β_2-BKR gene-58T/C polymorphism might be associated with essential hypertension in Shenzhen population. CC genotype might be associated with the increased risk of EH and C allele might have a gene-gene synergetic effect with M235T polymorphism.

Key words: essential hypertension; β_2-bradykinin receptor gene; angiotensinogen gene; genetic polymorphism

遗传流行病学研究表明,原发性高血压(essential hypertension, EH)是一种遗传因素与环境因素相互作用导致的多基因遗传性疾病。利用分子生物学手段,筛选与血压调控有关的易感基因,是探讨原发性高血压发病机制的有效研究方法。本研究检测缓激肽β_2受体(β_2-bradykinin receptor, β_2-BKR)基因和血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)基因的基因型,探讨基因多态性与EH的关系,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

深圳地区常住居民,无血缘关系。EH组97例,无糖尿病、

作者简介:董会奕(1956-),男,河南省西平县人,硕士,副主任医师,主要从事原发性高血压和心律失常方面的研究。电话:(0755)83923333-6338, E-mail: Donghuiyi1956@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-12-19;修回日期:2006-02-27

缺血性心脏病、肝肾功能障碍等并发疾病。无高血压家族史、身体健康、血压正常的(normotensive)对照组 87 例(NT 组)，性别、年龄与 EH 组配对(表 1)。

表 1　两组人群的基本临床特征

组别	n	年龄(岁)	性别(男/女)	体质量(kg)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
EH 组	97	56.8 ± 8.5	54/43	61.8 ± 9.3	155 ± 18	97 ± 12
NT 组	87	57.2 ± 9.5	48/39	62.2 ± 8.9	113 ± 10	74 ± 8
P		>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

1.2　研究方法

1.2.1　提取 DNA　　空腹 12 h 后采集外周静脉血，EDTA-Na_2 抗凝提取白细胞 DNA。

1.2.2　检测 AGT 基因型　　采用诱变分离聚合酶链反应(mutagenically separated polymerase chain reactions，MS-PCR)方法。引物序列为：P_1：5′-CCAGGGTGCTGTCCACACTGGCTC-CGG-3′，P_2：5′-AAGTGGACGTAGGTGTTGAAAGGGAGGGT-GCTGTCCACACTGGCTTCCA-3′，P_3：5′-TGTGGTCCTC-CCACGCTCTCTGG-3′。PCR 反应体系为 50 μl，反应条件为：94 ℃ 预变性 4 min，接着 94 ℃ 1 min，65 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，共 35 个循环，最后 72 ℃ 延伸 7 min。然后 2% 琼脂糖凝胶电泳，溴乙啶染色，紫外灯下观察结果。

1.2.3　检测 β_2-BKR 基因型　　采用 PCR-单链构象多态性(PCR-single-strand conformation polymorphism，PCR-SSCP)技术。引物序列为：P_1：5′-GCAGAGCTCAGCTGGAGGCG-3′，P_2：5′-CCTCCTCGGAGCCCAGAAG-3′。PCR 反应体系为 50 μl，反应条件为：94 ℃ 预变性 4 min，接着 94 ℃ 1 min，60 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，共 35 个循环，最后 72 ℃ 延伸 7 min。取 10 μl PCR 产物加入 10 μl 变性液，95 ℃ 变性 10 min，然后进行 SSCP 分析。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 20%，电泳缓冲液为 2 × TBE，室温下 120 V电泳 12 h，溴乙啶染色，鉴定结果。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验、χ^2 检验以及 Logistic 回归分析。

2　结果

2.1　AGT 基因

电泳显示 AGT 235MM 纯合型为 1 个 156 bp 的条带，235TT 纯合型为 1 个 134 bp 的条带，235MT 杂合型则同时具有 156 bp 和 134 bp 2 个片段(图 1)。



1：DNA 标准；2、6、7、8、10：MM；3、9、11：MT；4、5：TT

图 1　AGT 基因多态类型

2.2　β_2-BKR 基因

启动子特异性片段为 112 bp。电泳后得到 3 种带形(图 2)，即 CC、TC 和 TT 基因型，CC 为突变型纯合子，TC 为杂合子，TT 为野生型纯合子。



1、4、7、8：TC；2、5：CC；3、6、9、10：TT

图 2　缓激肽受体基因多态类型

2.3　群体代表性检验

经检验，研究人群 AGT 基因型和 β_2-BKR 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡，说明具有群体代表性。

2.4　基因型分布

①EH 组和对照组的 AGT M/T 基因型分布分别为：MM 0.32/0.18；MT 0.46/0.52；TT 0.22/0.30。差异没有统计学意义(P = 0.091)。②EH 组和对照组的 β_2-BKR T/C 基因型分布分别为：TT 0.16/0.28；TC 0.48/0.59；CC 0.36/0.14，差异非常显著(P = 0.000)(表 2)。

表 2　2 组人群基因型分布和等位基因频率的比较

组别	n	AGT 基因型			AGT 等位基因		β_2-BKR 基因型			β_2-BKR 等位基因	
		MM	MT	TT	M	T	TT	TC	CC	T	C
EH 组	97	31	45	21	0.55	0.45	15	47	35	0.40	0.60
NT 组	87	16	45	26	0.44	0.56	24	51	11	0.57	0.43
χ^2		4.790			4.361		20.185			10.883	
P		0.091			0.037		0.000			0.001	

2.5　等位基因频率

①AGT 基因：EH 组 M 等位基因频率显著高于对照组(0.55/0.44，P = 0.037)。②β_2-BKR 基因：EH 组 C 等位基因频率显著高于对照组(0.60/0.43，P = 0.001)(表 2)。

2.6　基因型联合分析

EH 组 CC + MT 基因型或 TC + MM 基因型者显著高于对照组(0.19/0.06，P = 0.009；0.18/0.05，P = 0.006)(表 3)。

表 3　基因型联合分析

基因型	NT 组(n = 87)		EH 组(n = 97)	
	例数	%	例数	%
TT + MM	7	8.04	4	4.12
TC + MM	4	4.59	17	17.52
CC + MM	5	5.74	10	10.31
TT + MT	11	12.64	6	6.18
TC + MT	29	33.33	21	21.65
CC + MT	5	5.74	18	18.56
TT + TT	6	6.89	6	6.19
TC + TT	18	20.68	8	8.24
CC + TT	2	2.29	7	7.22

2.7 基因多态性与 EH 的关系

将研究对象的分类变量(有或无 EH)作为因变量,AGT 基因、β_2-BKR 基因、性别、年龄等指标作为自变量进行 Logistic 回归分析。结果显示,β_2-BKR 基因入选回归方程,CC 基因型与 EH 发生关联最密切($OR = 1.913$,95% CI:1.913 ~ 3.049,$P = 0.006$)。

3 讨论

包括原发性高血压在内的心血管疾病的显著标志是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)和交感神经系统的激活、RAS 与激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)之间的激素失平衡[1]。这种神经-激素系统的激活或激素失平衡对心脏、肾脏等靶器官具有明显的损害作用,可以进一步恶化原发性高血压和心血管疾病的病理过程。近年来一系列大型临床实验研究结果已经显示,干预 RAS 功能的血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)不仅可以控制血压,改善心血管疾病的血流动力学变化,还可以降低这些疾病的发病率和病死率,提高进展性心衰和心肌梗死病人的生存率。更重要的是,ACEI 对高血压及心血管疾病的有利作用并不仅仅是由于它们对血管紧张素转换酶功能的抑制及激肽降解的抑制,还与它们对缓激肽受体的直接作用有关。在 RAS 和 KKS 这两大血压调控系统中,AGT 和 β_2-BKR 是 2 个最关键的成分。许多研究结果显示,β_2-BKR 基因启动子 -58T/C 多态性及 AGT 基因第 2 内含子 M235T 多态性直接影响其编码蛋白的结构和功能,由此参与 EH 的发病机制[2-5]。因此,β_2-BKR 基因和 AGT 基因成为研究高血压遗传机制中的候选基因。

本研究结果显示:①深圳地区血压正常人群中 β_2-BKR 基因启动子 -58T/C 多态性的 TT、TC、CC 基因型分布分别为 0.276、0.586、0.138,T、C 等位基因频率分别为 0.57、0.43。Braun 发现血压正常德国人群中 T、C 等位基因频率分别为 0.405、0.595。Gainer 等[4]发现血压正常非洲裔美国人群中 T、C 等位基因频率分别为 0.38、0.62。这些结果显示,β_2-BKR 基因 -58T/C 多态性具有种族差异。②深圳地区血压正常人群中的 AGT 基因第 2 内含子 M235T 多态性的 MM、MT、TT 基因型分布分别为 0.184、0.517、0.299,M、T 等位基因频率分别为 0.44、0.56。Procopciuc 等[6]发现血压正常罗马尼亚人群中的 MM、MT、TT 基因型分布分别为 0.334、0.476、0.190,M、T 等位基因频率分别为 0.57、0.438。以上结果显示,AGT 基因 M235T 多态性同样存在种族差异。③深圳地区 EH 患者与血压正常人群的 β_2-BKR 基因的基因型分布和等位基因频率具有显著性差异。EH 患者的 CC 基因型分布和 C 等位基因频率高于血压正常人。④深圳地区 EH 患者与血压正常人群的 AGT 基因的基因型分布没有显著性差异,但 M 等位基因频率具有显著性差异,EH 患者的 M 等位基因频率高于血压正常人群。⑤原发性高血压患者与血压正常者的 MT + CC 联合基因型分布、MM + TC 联合基因型分布具有显著性差异。EH 患者的 MT + CC 联合基因型分布、MM + TC 联合基因型分布均高于血压正常者。⑥Logistic 回归分析结果显示,在调整了其他危险因素后,与原发性高血压发生关联最密切的是 β_2-BKR 基因 CC 基因型。

本相关性研究结果提示,β_2-BKR 基因 -58T/C 多态性与深圳地区人群的 EH 相关,CC 基因型可能与 EH 危险增加有关,C 等位基因可能与 AGT 基因 M235T 多态性存在基因-基因间的协同作用。需要对这 2 个基因进行高血压的家系分析中,同时需要对更大样本或其他家族背景的人群进行进一步的研究。

参考文献:

[1] SANCHEZ R, NOLLY H, GIANNONE C, *et al*. Reduced activity of kallikrein-kinin system predominates over renin-angiotensin system overactivity in all conditions of sodium balance in essential hypertensives and family-related hypertension[J]. J Hypertens, 2003, 21(2): 411 -417.

[2] FU Y, KATSUYA T, MATSUO A, *et al*. Relationship of bradykinin B2 receptor gene polymorphism with essential hypertension and left ventricular hypertrophy[J]. Hypertens Res, 2004, 27(12): 933 -938.

[3] CUI J, MELISTA E, CHAZARO I, *et al*. Sequence variation of bradykinin receptors B1 and B2 and association with hypertension[J]. J Hypertens, 2005, 23(1): 55 -62.

[4] GAINER J V, BROWN N J, BACHVAROVA M, *et al*. Altered frequency of a promoter polymorphism of the kinin B2 receptor gene in hypertensive African-Americans[J]. Am J Hypertens, 2000, 13(12): 1268 -1273.

[5] PEREIRA A C, MOTA G F, CUNHA R S, *et al*. Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes[J]. Hypertension, 2003, 41(1): 25 -30.

[6] PROCOPCIUC L, POPESCU T, JEBELEANU G, *et al*. Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene [J]. J Cell Mol Med, 2002, 6(2): 245 -250.

(编辑 薛国文)