基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0435-04

AT1R 基因 A1166C 多态性与重庆地区高血压病的相关性研究

向 林,柳 青,雷 寒
(重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究重庆地区人口血管紧张素Ⅱ的Ⅰ型受体(Angiotensin Ⅱ type Ⅰ,AT1R)A1166C 基因多态性与原发性高血压的关系 方法:用多聚酶联反应(Polymerase chain reaction,PCR)结合限制性片段长度多态性(Restriction fragment length poly morphism,RFLP)方法对 104 例原发性高血压(Essentiac hypertension,EH)患者和 100 例健康体检者进行 AT1R(A1166C)的基因多态性分析。结果:EH 组 AC 基因型频率明显高于正常对照组(0.240 vs 0.005,$P<0.05$),EH 组 C1166 等位基因频率明显高于正常对照组(0.130 vs 0.025,$P<0.05$);而 EH 组中的 AA 基因型频率明显低于正常对照组(0.750 vs 0.950,$P<0.05$);EH 组中还发现了较罕见的 CC 纯合子基因型。结论:高血压组和正常对照组 AT1R 基因的 AC、AA 基因型频率有显著性差异,而其它指标无显著性差异。重庆地区原发性高血压与 AT1R 基因的 A1166C 多态性有密切的关系。

【关键词】原发性高血压;血管紧张素Ⅱ-Ⅰ型受体;基因多态性
【中国图书分类法分类号】R544.1;Q753 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

作者介绍:向 林(1973-)男,硕士,
研究方向:遗传性疾病的基因研究。
通讯作者:柳 青,女,研究员,E-mail:qingliu5566@yahoo.cn。
基金项目:教育部科研基金资助项目教计司[2000]65 号文。
重庆市科委科研基金资助项目渝科委计[2000]50 号文
重庆市卫生局科研基金资助项目 99-4005。

SDHD and Men1 mutations was frequently detectable in Chinese patients with pheochromocytoma and paraganglioma[J]. Endocrine,2006,30(3):307-312.

[5] Gimm O,Armanios M,Dziema H,et al. Somatic and occult germ-line mutations in SDHD,a mitochondrial complex Ⅱ gene,in nonfamilial pheochromocytoma[J]. Cancer Res,2000,60(24):6822-6825.

[6] Pollard P J,Bri è re J J,Alam N A,et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations [J]. Hum Mol Genet,2005,14(15): 2231-2239.

[7] Gimenez-Roqueplo A P,Favier J,Rustin P,et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway [J]. Am J Hum Genet,2001,69(6):1186-1197.

[8] Selak M A,Armour S M,MacKenzie E D,et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase [J]. Cancer Cell,2005,7(1): 77-85.

[9] Aguiar R C,Cox G,Pomeroy S L,et al. Analysis of the SDHD gene, the susceptibility gene for familial paraganglioma syndrome (PGL1),in pheochromocytomas[J]. J Clin Endocrinol Metab,2001,86(6):2890-2894.

[10] Lee S,Nakamura E,Yang H,et al. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer [J]. Cancer Cell,2005,8(2):155-167.

[11] Neumann H P,Bausch B,McWhinney S R,et al. Germline mutations in nonsyndromic pheochromocytoma[J]. N Engl J Med,2002,346(19):1459-1466.

[12] Amar L,Bertherat J,Baudin E,et al. Genetic Testing in Pheochromocytoma or Functional Paraganglioma[J]. J Clin Oncol,2005,23(34):8812-8818.

[13] Neumayer C,Moritz A,Asari R,et al. Novel SDHD germ-line mutations in pheochromocytoma patients[J]. Eur J Clin Invest,2007,37(7):544-551.

[14] Korpershoek E,Van Nederveen F H,Dannenberg H,et al. Genetic analyses of apparently sporadic pheochromocytomas: the Rotterdam experience[J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1073:138-148.

[15] Castellano M,Mori L,Giacch è M,et al. Genetic mutation screening in an Italian cohort of nonsyndromic pheochromocytoma/paraganglioma patients [J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1073 :156-165.

[16] KyölaS,Nord B,Elder E E,et al. Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids,Merkel cell carcinomas,pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas[J]. Genes Chromosomes Cancer,2002,34(3):325-332.

[17] Ma R C,Lam C W,Chan W B,et al. A Chinese family with familial paraganglioma syndrome due to succinate dehydrogenase deficiency [J]. Hong Kong Med J,2007,13(2):151-154.

(责任编辑:关蕴良)

Association between the angiotensin Ⅱ type I receptor gene A1166C polymorphism with the essential hypertension in chongqing

XIANG Lin, et al

(*The Clinical Research Center, the First Affilited Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the relationship of the angiotensin Ⅱ type I receptor (AT1R) gene polymorphisms with the essential hypertension (EH) in Chongqing. *Methods*: The AT1R gene polymorphism (an A→C transversion at nucleotide position1166) were detected by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in 104 EH patients and 100 normal controls. *Results*: The frequencies of AC genotype and C1166 allele of AT1R gene of the EH patients were obviously higher than those of the normal controls (AC genotype: 0.240 vs 0.005, $P<0.05$; Callele: 0.130 vs 0.025, $P<0.05$), There were both having significance difference, but the frequency of the AA genotype was obviously lower than the normal controls. Furthermore, we discovered infrequent CC genotype in EH patients. The items of rest have no significative difference in two groups. *Conclusion*: A1166C polymorphism of AT1R gene was associated with essential hypertension in Chongqing.

【Keywords】Essential Hypertension; Angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor; Gene polymorphism

在高血压病的发生过程中，肾素-血管紧张素系统(Renin-Angiotensin-System, RAS)起着非常重要的作用。血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, AngⅡ)是RAS系统中最为重要的生物学活性分子，当AngⅡ与各种组织细胞膜上的特异性血管紧张素Ⅱ的Ⅰ型受体(Angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor, AT1R)结合后发挥它的生物学作用。为揭示重庆地区人群高血压病是否与AngⅡⅠ型受体(AT1R)相关我们进行了如下研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 原发性高血压组 2005年6月至2006年12月，收集重庆医科大学附属第一医院心内科住院的原发性高血压(Essentiac hypertension, EH)病人104例。纳入标准：(1)收缩压(SBP)≥140 mmHg或舒张压(DBP)≥90 mmHg；(2)排除继发性高血压；(3)严格筛选病人，且无冠心病、糖尿病、心肌病，无严重肝肾疾病及心肺功能不全。

1.1.2 正常对照组 正常对照组100例来自本院健康体检正常人群。纳入标准：(1)收缩压(SBP)<140 mmHg、舒张压(DBP)<90 mmHg；(2)未服用任何降压药物；(3)无冠心病、糖尿病、心肌病，无严重肝肾疾病及心肺功能不全。

1.2 方法

1.2.1 所有的高血压病组和正常对照组实验对象都在清晨安静状态下先测量血压、身高和体重，后抽取肘静脉外周抗凝血6~8 ml。

1.2.2 用饱和盐析法提取外周血白细胞DNA：先用红细胞裂解液溶解红细胞，3 000 r/min离心，弃上清液。再重复一次，保留管底白细胞沉淀。再加入白细胞裂解液、蛋白酶K液、10%SDS，37℃水浴过夜。次日取出，加饱和NaCl溶液沉淀蛋白质，充分震荡混匀，3 000 r/min离心，取上清液。重复1次。最后用异丙醇析出DNA，10℃以下，4 000 r/min离心获得DNA，用TE溶液保存。

1.2.3 目的片段扩增及其酶切电泳分型 引物序列为，上游引物5'-ATAATGTAAGCTCATCCACC-3'；下游引物5'-GAGATTGCATTTCTGTCACT-3'。多聚合酶联反应(PCR)总体积30 μl，其中DNA模板约100 ng；脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)200 μmol/L；上下游引物各20 pmol；10×缓冲液3 μl，Taq酶1.5 U。反应参数为95℃预变性3 min后，进入循环：94℃变性40 s、60℃退火50 s、72℃延伸60 s，共27个循环；最后72℃延伸8 min，4℃暂存。酶切体系15 μl：取PCR反应产物4 μl，10×缓冲液1.5 μl，1%小牛血清白蛋白(BSA)1 μl，限制性内切酶*Dde* Ⅰ5 U，去离子水8.2 μl，37℃过夜。第2 d取酶切产物4 μl行2%琼脂糖凝胶电泳，溴乙锭染色，90 V电压下电泳50 min，在凝胶成像分析系统上照像并保存分析。

1.2.4 统计学处理 高血压病组和正常对照组经Hardy-Weinberg平衡定律检验均为平衡群体。所有数据以均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$)，两组间均数比较用t检验；多组间均数比较用方差分析q检验；基因型频率及等位基因频率采用χ^2检验。SPSS11.0统计分析软件进行处理，$P<0.05$有统计学意义。

2 结 果

2.1 RFLP电泳图谱及两组AT1R基因型的检测结果

PCR产物为360 bp片段，C等位基因经酶切后

会出现 220 bp 和 140 bp2 个电泳条带。因此，酶切产物经过电泳后 AA 基因型只出现 360 bp 的 1 个电泳条带，CC 基因型会出现 220 bp 和 140 bp 的2个电泳条带，AC 基因型则出现 360 bp、220 bp 和 140 bp 3 个电泳条带（见图 1）。

104 例 EH 患者中 AA 型 78 例、AC 型 25 例、CC 型 1 例；100 例健康体检者中 AA 型 95 例、AC 型 5 例，未发现 CC 型。其中 AA、AC 基因型频率和 C 等位基因频率在两组间的差异有统计学意义（$P<0.05$）（见表 1）。

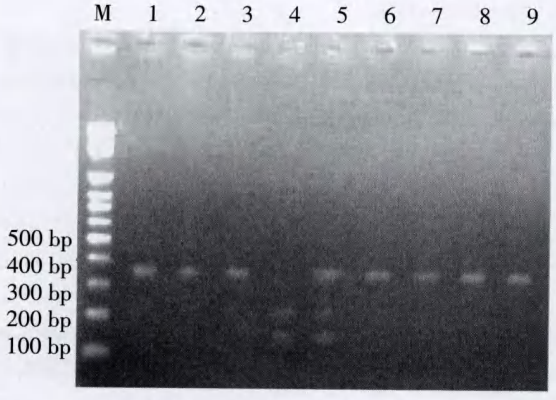


图 1　AT1R 基因扩增产物酶切后 A1166C 多态性电泳图谱
M 为 PCR marker（100~2 000 bp,100 bp/梯度）；1,2,3,6,7,8,9 为 AA 型；4 为 CC 型；5 为 AC 型

2.2　整个 EH 组和有 C 等位基因的 EH 患者组及男、女性别比例的比较结果

有 C 等位基因的 EH 患者组和整个 EH 组的收缩压值分别为（166.35±13.56）mmHg 和（167.74±15.85）mmHg；舒张压分别为（101.56±13.86）mmHg 和（99.79±12.32）mmHg。经统计学检验这两个指标在两组间没有统计学差异；而带 C 等位基因的男、女 EH 患者比例分别为 34.6%和 65.4%，它们之间有统计学差异的。见表 2

2.3　实验对象的几个基本指标数据结果

例数、年龄、性别比、体重指数、舒张压和收缩压 6 项临床指标在高血压组和正常对照组的比较中，除 EH 组收缩压和舒张压显著性高于正常对照组（$P<0.05$）外，其余指标两组间均无显著性差异，见表 3。

表 1　EH 组与对照组 AT1R 基因型及等位基因频率比较

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AC	CC	A	C
正常对照组	100	95(0.950)	5(0.050)	0	195(0.975)	5(0.025)
EH 组	104	78(0.750) *	25(0.240) *	1(0.010)	181(0.870)	27(0.130) *

注："*"表示与正常对照组比较 $P<0.05$

表 2　EH 组和有 C 等位基因的 EH 患者组及男、女性别的血压比较

组别		例数（男 / 女）	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)
EH 组		104(48/56)	167.74 ± 15.85	99.79 ± 12.32
有 C 等位基因的 EH 患者组		26(9/17)	166.35 ± 13.56	101.56 ± 13.86
	其中男性	34.6%(9/26)	167.82 ± 13.24	102.44 ± 13.49
	其中女性	65.4%(17/26) *	165.39 ± 14.63	100.80 ± 14.17

注："*" 表示与 EH 组中带 C 等位基因的男性比例比较 $P<0.05$

表 3　各项临床指标在高血压组和正常对照组中的比较

项目	正常对照组	原发性高血压组
例数	100	104
年龄(岁)	57.1 ± 10.3	56.5 ± 8.2
性别比（男/女）	42/58	48/56
体重指数（kg/m^2）	22.55 ± 1.53	21.89 ± 2.08
收缩压(mmHg)	125.34 ± 14.32	167.74 ± 15.85*
舒张压(mmHg)	79.65 ± 10.47	99.79 ± 12.32*

注："*" 表示与正常对照组比较 $P<0.05$

3 讨 论

原发性高血压是一种多基因遗传性疾病。目前研究认为，AT1R 在 RAS 血压调节过程中起着非常重要的作用。它与 AngⅡ结合后主要表现为促进醛固酮的分泌增加，促进肾小管对水钠的重吸收，引起血管舒缩和血压增高。Fossum 等[1]在高加索人群中分析了 7 个心血管疾病的侯选基因发现，AT1R 1166AA 基因型对高血压病有保护作用。但来自印度和我国香港的调查显示该位点的多态性与高血压病发生无相关性[2,3]。国内外对 AT1R 基因多态性与高血压病关系的研究结论不一致，可能与不同遗传背景和不同的环境因素造成的 AT1R 与高血压病相关性的差异[4-9]。在本次研究中，两组经 Hardy-Weinberg 平衡定律检验均为平衡群体。我们的结果显示 EH 组中 A1166→C 的频率和 C 等位基因频率明显高于正常对照组，提示AT1R 基因该位点可能与重庆地区原发性高血压相关。我们还将 EH 组中 26 个 C1166 突变者的DBP 和 SBP 单独统计分别与整个 EH 组的 DBP 和 SBP 进行比较发现，他们之间均没有显著性差异（$P>0.05$）；而有 C1166 等位基因的 EH 患者中的男、女分组之间确有统计学差异，结果显示 A1166C 等位基因的突变率女性高于男性，提示 C1166 基因对女性的影响明显大于男性，与林从容等人的结论相一致[9]。Spiering 研究认为，AT1R 基因 A1166→C 的突变与缓解原发性高血压患者的舒张压相关联[10]。但是我们的研究结果显示携带 C1166 等位基因的 EH 患者与整个 EH 组之间比较却没有显著性差异，这可能与种族差异有关。

我们推测，RAS 中的几个主要基因（包括 AGT、ACE、AT1R 等基因）或与其他未知基因的协同作用，形成微效累加效应，再加上环境因素的影响，最终导致了 EH 的发生。另外，AT1R 还通过重要的非血流动力学作用参与了心、脑、肾、动脉等高血压病多种靶器官的损害，这些器官的损伤是影响高血压病预后的重要因素[11-12]。因此，针对 AT1R1166 位点突变与这些靶器官损伤的关系研究，目前已经成为国内外学者研究的重要方向。

参 考 文 献

[1] Fossum E, Berge K E, Hoieggen A, et al. Polymorphisms in candidate genes for blood pressure regulation in young men with normal or Elevated screening blood pressure[J]. Blood Press, 2001, 10(2): 92-100.

[2] Ashavaid TF, Shalia KK, Nair KG, et al. ACE and AT1R gene polymorphisms and hypertension in Indian population[J]. J Clin Lab Anal, 2000, 14(5): 230-237.

[3] Thomas G N, Tomlinson B, Chan J C, et al. Renin 2 angiotens in system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE in sertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2001, 24(2): 356-361.

[4] Paradis P, Dali-Youcef N, ParadisF W, et al. Over expression of angiotensin Ⅱ type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 97 (2): 931-936.

[5] Ste'phany G, Madeleine V, Pierre L, et al. A1166C polymorphism of angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor: blood pressure and arterial stiffness in hypertension[J]. Journal of Hypertension, 2004, 22(11): 2135-2142.

[6] Jiang Zhen, Zhao Wen sheng, Yu Feng, et al. Association of angiotensin Ⅱ type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension[J]. Chinese Medical Journal, 2001, 114(12): 1249-1251.

[7] M R Abdollahi, T R Gaunt, H E Syddall, et al. Angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor gene polymorphism: anthropometric and metabolic syndrome traits[J]. J Med Genet, 2005, 42: 396-401.

[8] Tsuyoshi Morisawa, Yosuke Kishimoto, Masayuki Kitano, et al. Influence of angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor polymorphism on hypertension in patients with hypercholesterolemia[J]. Clinica Chimica Acta, 2004, 304: 91-97.

[9] 林从容，吴可贵，谢良地，等. Ⅰ型血管紧张素Ⅱ受体基因多态性与福建地区高血压的关系[J]. 中华医学遗传学杂志，2000, 17(4): 299-300.

[10] Spiering W, Kroon A A, Fuss-Lejeune M M, et al. Angiotensin Ⅱ sensitivity is associated with the angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor gene A1166C polymorphism in essential hypertensives on a high Sodium diet[J]. Hypertension, 2000, 36(3): 411-416.

[11] Canavy Ⅰ, Henry M, Morange PE, et al. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of France[J]. Thromb Haemost, 2003, 83(2): 212-221.

[12] Van Geel PP, Pinto Y M, Voors, et al. Angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin Ⅱ in human arteries[J]. Hypertension, 2003, 35: 717-721.

（责任编辑：关蕴良）