维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0836 - 04

血管紧张素 II - 2 型受体基因 A1675G 多态性与原发性高血压的相关性研究

周 平,李法琦,马厚勋

(重庆医科大学附属第一医院老年病科 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究血管紧张素 II - 2 型受体(AT2R)基因 A1675G 单核苷酸多态性(SNPs)与中国汉族人群原发性高血压(Essential Hypertension,EH)的关系,探讨 AT2R 基因在 EH 发病机制中的作用。方法:应用等位基因特异性引物 PCR 方法检测 181 例 EH 患者(EH 组)和 187 例健康人(对照组)的 AT2R 基因型,比较各组间的等位基因频率及基因型分布差异,分析 AT2R 基因 A1675G 多态性与高血压的关系。结果:AT2R 基因 A1675G 的 A 等位基因频率在 EH 组明显高于对照组(53.3% vs 44.4%),但两组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。在男性组中,EH 组的 A 等位基因频率明显高于对照组(53.6% vs 42.9%,$P > 0.05$);而在女性组中,EH 组和正常对照组间各基因型(AA,AG,GG)频率及等位基因频率分布的差异均无显著性意义($P > 0.05$)。结论:AT2R 的 A 等位基因频率在 EH 组的分布较正常对照组高,但无统计学意义,尚不能确定 AT2R 基因 A1675G 多态性与中国人原发性高血压的发生存在相关性。

【关键词】高血压;血管紧张素 II - 2 型受体;基因多态性;PCR

【中国图书分类法分类号】R554.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 15

Relationship Between A1675G Polymorphism of Angiotensin II type 2 - receptor Gene and Essential Hypertension

ZHOU Ping et al

(*Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To explore the role of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) at position A1675G of angiotensin II type 2 - receptor (AT2R) in patients with essential hypertension (EH) in the Chinese Han nationality population. Methods: Genotypes of the polymorphisms of AT2R gene in 181 patients with EH (EH group) and 187 healthy volunteers (control group) were determined by the allele - specific primer polymerase chain reaction (PCR). We analyzed genotype distribution and allele frequency of AT2R gene between EH group and control group were compared so as to evaluate the contribution of polymorphism of AT2R gene to hypertension. results: There was a significant increase in allele frequency of A1675 in EH group compared with control group (53.3 % vs 44.4 %), but the difference in two groups was of no statistical significance($P > 0.05$). This study showed a significant increase in allele frequency of A1675 (53.6% vs 42.9%, $P > 0.05$) in male essential hypertensive patients. There were no differences in genotypes (AA, AG, GG) distribution and allele frequency of AT2R A1675G between female EH group and control group ($P > 0.05$). conclusion: The frequency of A allele in essential hypertension is higher than that in control group, but there is no statistical significance. The relationship between AT2R gene A1675G polymorphism and essential hypertensive patients of the Chinese Han nationality population.

【Key words】Hypertension; Angiotension II type - 2 receptor; Gene polymorphism; PCR

人类研究原发性高血压(Essential hypertension,EH)的遗传因素已有几十年的历史,所采用的研究对象和方法各异,但研究结果均表明遗传因素在 EH 发病中有重要作用。作为心血管功能活动最重要的调节体系之一,肾素 - 血管紧张素系统(RAS)在高血压的发生、发展中起重要作用,而血管紧张素 II (AngII)与靶细胞表面的两种不同 AngII 亚型受体(AngII type - 1 receptor, AT1R 和 AngII type - 2 receptor, AT2R)结合引起不同的生理效应。本文就中国汉族人群 AT2R 基因 A1675G 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)与 EH 相关

作者介绍:周 平(1971 -),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:老年心血管疾病基础与临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

性进行研究,以期从分子生物学水平上阐明其发病机制,为 EH 的诊断、治疗及易患性研究提供依据。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

随机选择无亲戚关系的汉族高血压病个体 181 例(男 110 例 女 71 例)作为高血压病研究对象,排除继发性高血压,年龄范围在 35 岁~90 岁,平均年龄 65.7±12.05 岁;同时选择无亲戚关系的汉族健康志愿者 187 例(男 119 例,女 68 例)作为正常对照组,年龄范围在 33 岁~90 岁,平均年龄 62.9±11.9。高血压病诊断均符合 1999 年世界卫生组织/国际高血压协会诊断标准:收缩压≥140mmHg 和(或)舒张压≥90mmHg。正常对照组入选标准:血压<140/90mmHg;无心、脑、肾、肝胆、糖尿病及肿瘤等病史,日心电图、尿常规、肝、肾功能及血糖、血脂正常者。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取 采取 EDTA 抗凝外周静脉全血 1ml,用 DNA 专用提取试剂盒法(上海华舜生物工程有限公司)抽提白细胞基因组脱氧核糖核酸(DNA)。

1.2.2 目的片段 PCR 扩增

1.2.2.1 引物序列选取及设计 根据研究需要通过美国 NCBI(美国国家生物信息中心)的 GenBank 获取 AT2R 基因序列及其相应位点的 SNP 信息(GenBank NO. U20860. Human angiotensin…[gi:747969])。利用 Primer5.0 软件设计符合研究需要的引物。引物由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列:上游(5'端)引物 P_1:5'-GAA GCC TCC CAG TGG ACA GAC-3';下游(3'端)引物 P_2:5'-CCT AAC AAA TTA ACA TAA AAG AAT C-3';等位基因特异性上游(5'端)引物(野生型)-1675A:5'-ACT GTA TTT TGC AAA ACT CCT A-3';等位基因特异性下游(3'端)引物(突变型)-1675G:5'-GAA ACA GCA GCT AAA TAA TTC-3'(有下划线的字母表示等位基因特异性引物(3'端)设计的 SNPs 位点),如图 1 所示。

1.2.2.2 PCR 反应体系 仪器:SPRT001 型 PCR 仪,WD-9403D 型紫外分析仪。试剂:HotStart Taq DNA Polymerase,10×PCR Reaction Buffer,dNTPs(含 dATP,dTTP,dCTP,dGTP 各 2.5mmol/L),$MgCl_2$(15mmol/L)(购于北京天为时代生物有限公司),DNA Marker DL2000(大连宝生物公司),溴乙锭、琼脂糖(北京同正公司)。PCR 体系设计:10×Buffer 2μl,dNTP 1μl(各 250μmol/L),$MgCl_2$ 1.2μl(1.5mmol/L),HotStart Taq 0.2μl(0.5U),Primers 4μl(四条引物各 1μl,相当于 0.5μmol/L),DNA 模板 1μl,灭菌双蒸水 10.6μl,反应总体积 20μl。PCR 循环设计:94℃预变性 5min;94℃变性 30s,56℃退火 30s,72℃延伸 30s,共循环 40 次后,72℃终末延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳监测扩增产物:配制 2% 琼脂糖溶液,在 80V 恒压下电泳 45 min,溴乙锭(终浓度 0.5μg/ml)染色 15min,紫外灯下监测,记录基因型结果。



图 1 等位基因特异性引物 PCR 技术检测 AT2R A-1675G SNP 的原理图

注:P_1:上游引物 P_2:下游引物 SNP:单核苷酸多态性位点-1675A:等位基因特异性上游引物-1675G:等位基因特异性下游引物

1.3 统计学处理

使用 SAS 统计软件,两组(EH 组/对照组)的临床特性资料以均数±标准差表示,两组间的计量资料用 t 检验,基因型频率与等位基因频率采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为统计学有显著性差异。

2 结 果

2.1 EH 组与对照组临床指标

两组间性别构成、年龄、总胆固醇(TC)均无显著性差异。收缩压(SBP)和舒张压(DBP)具有显著性差异,EH 组高于对照组,见表 1。

2.2 EH 组和对照组 AT2R A1675G SNP 比较

受检者 DNA 经 PCR 扩增后,可能会产生 3 个片段:390bp,270bp,162bp,则 AT2R 的 A1675G 多态性的基因型可有纯合子 AA(2 个片段组成:390bp,162bp)和 GG(2 个片段组成:390bp,270bp),杂合子 AG(3 个片段组成:390bp,270bp,162bp)。详见图 2。

表 1 EH 组与对照组临床指标

	EH 组	对照组
年龄	65.7±12.05	62.9±11.90
性别构成	110/71	119/68
TC	4.72±1.08	4.88±1.00
SBP	156±14.44	119.5±10.97*
DBP	88.4±10.79	75±7.13*

*:$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

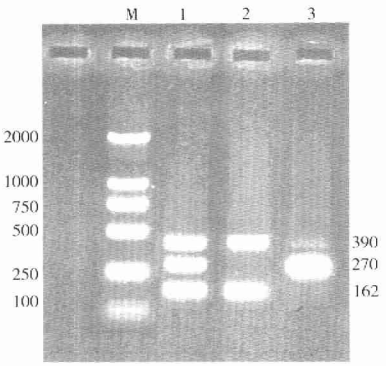


图 2 AT2R 基因 A1675G 扩增产物电泳图

M:marker 1:AT2R 基因 1675AG 型 2:AT2R 基因 1675AA 型

3:AT2R 基因 1675GG 型

AT2R 基因 A1675G 多态性等位基因频率:在本研究人群中,AT2R 基因 A1675G 的等位基因频率分别为:48.6%(A)和 51.4%(G)。EH 组与正常对照组相比较,A 等位基因频率在 EH 组明显高于正常对照组(53.0% vs 44.4%),但两组间差异无显著性意义($\chi^2=2.76$, $P>0.05$)。见表 2。

表 2 EH 组与对照组 AT2R 基因 A1675G 基因型频率和等位基因频率分布比较

组别	例数	等位基因频率	
		A 例数(%)	G 例数(%)
EH 组	181	96(53.0)	85(47.0)
正常对照组	187	83(44.4)	104(55.6)
总体	368	179(48.6)	189(51.4)

表 3 男亚组 EH 组与对照组 AT2R 基因 A1675G 基因型频率和等位基因频率分布比较

组别	例数	等位基因频率	
		A 例数(%)	G 例数(%)
EH 组	110	59(53.6)	51(46.4)
正常对照组	119	51(42.9)	68(57.1)
总体	229	110(48.0)	119(52.0)

*:$P<0.05$

AT2R 基因位于 X-染色体,男性存在两种等位基因及基因型 A/AA、G/GG,而女性存在三种基因型(AA、AG、GG)及两种等位基因(A、G),故将男、女分组进行比较,结果:男亚组中,A 等位基因频率在 EH 组明显高于正常对照组(53.6% vs 42.9%),两组间差异无显著性意义($\chi^2=2.66$, $P>0.05$)。女亚组,A1675G 基因型频率构成比差异及等位基因频率在 EH 组和正常对照组间差异均无显著性意义($\chi^2=3.09$, $P>0.05$;$\chi^2=0.36$, $P>0.05$)。详见表 3 和表 4。

表 4 女亚组 EH 组与对照组 AT2R 基因 A1675G 基因型频率和等位基因频率分布比较

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		AA 例数(%)	AG 例数(%)	GG 例数(%)	A 例数(%)	G 例数(%)
EH 组	71	16(22.5)	42(59.2)	13(18.3)	37(52.1)	34(47.9)
正常对照组	68	17(25.0)	30(44.1)	21(30.9)	32(47.1)	36(52.9)

3 讨 论

目前 RAS 成为 EH 相关基因的研究热点,但大多数的研究主要针对 AT1R 基因型及其相关作用,对 AT2R 的功能、调节和信号通道知之甚少。1994 年,Koike 等[1] 从成年女性的白细胞中得到人类 AT2R DNA,编码一段 363 个氨基酸残基的蛋白质,与鼠具有高度同源性。随后研究发现人类 AT2R 基因位于 X-染色体,约 5kb[2],包含两个内含子(152bp 和 1207bp),三个外显子(分别为 68bp、95bp 和 >2300bp),完整蛋白质编码区域位于外显子 3 上[3],调控因子位于内含子 1 和启动区域[4]。最新发现,外显子 2 启动部位前 29bp 有内含子 1 的突变(A1675G),该区域对 AT2R 基因的转录激活有重要作用[4]。详见图 3。

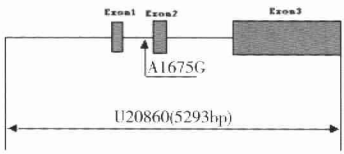


图 3 AT2R 基因及 SNP 位置示意图

AT1R 和 AT2R 只有 30% 的同源性,同属 G 蛋白耦联家族,对 AngII 具有相似高的亲和力,对于 AT2R 的生理功能尚不太明确。Ichiki[5] 等在缺失编码 AT2R 基因的小鼠中发现,这种小鼠血压升高,对 AngII 引起的加压效应增强,由此得出:AT2R 调节中枢神经系统的功能(包括行为),其介导 AngII 对心血管的作用可能与 AT1R 相反。1999 年,Yamada

维普资讯 http://www.cqvip.com

等[6]发现 AT2R 介导细胞凋亡。AT2R 在成人体内分布较少,在某些病理条件下(如血管损伤后内皮的形成,心肌梗死后或心脏重构),存在于内皮的 AT2R 将上调[7~9],故认为人类 AT2R 与心血管疾病存在相关性。

本课题研究了中国汉族人群中 AT2R 基因 A1675G 多态性与 EH 的相关性,结果发现 EH 患者中 A 等位基因型频率明显高于正常对照组(53.0% vs44.4%),但差异无显著性($P>0.05$),还不能说 G 等位基因具有保护作用,与 Jones 等[10]的报道不太一致。由于 AT2R 基因位于 X-染色体上,又将男、女分组进行比较,结果发现:男亚组中,A1675G 等位基因频率在 EH 组和正常对照组间的差异无显著性意义($P>0.05$)。女亚组中,A1675G 基因型频率构成比差异及等位基因频率差异均无显著性意义($P>0.05$)。由此可见,尚不能确定 AT2R 基因 A1675G 多态性与中国汉族人群 EH 有相关性。在本研究人群中,A1675G 等位基因频率:A 为48.6%、G 为 51.4%,G 等位基因频率高于 Schmieder 等[11]的报道(A:57.0%,G:43.0%)。高血压组 A、G 等位基因频率 53.0%、47.0% 与 Alfakih 等[12]的报道基本一致(A:54.0%,G:46.0%),但正常对照组却存在很大差异(本研究,A:44.4%,G:55.6%;Alfakih 的研究,A:59.0%,G:41.0%)。另有研究发现,在年青男性高血压组中,携带 A 等位基因患者的左室后壁、室间隔厚度、左室质量指数(LVMI)等数值均明显高于携带 G 等位基因患者的[11],且在男性左室肥厚患者中,A 等位基因频率明显增高(60.3% vs46.0%)[13]。也有研究认为在 EH 患者中,携带 AT2R+1675A 基因者患冠状血管疾病的危险性增大[10]。但有研究认为,只有女性患者携带 AT2R+1675A 基因更易发生冠状血管缺血和心肌梗死,在男性中并未得到相同的结论[13]。

本研究发现,尚不能确定 AT2R 基因 1675 位点多态性与中国汉族人群 EH 有内在联系,,正常对照组的 G 等位基因频率较高,这与国外有关报道不一致。基因多态性研究结果多样化的原因可能与遗传异质性、研究对象地域和种族不同有关。AT2R 基因 1675 位点多态性与 EH 的相关性及其与 LVH、心肌梗死等疾病的相关性,有待在汉族人群中进一步研究。

参 考 文 献

[1] Koike G, Horiuchi M, Yamada T, et al. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. Biochem. Biophys [J]. Res. Commun, 1994; 203: 1842-1850.

[2] Martin MM, Elton TS. The sequence and genetic organization of the human type 2 angiotensin II receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995;209:554-562.

[3] Ichiki T, Inagami T. Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene [J]. Circ Res, 1995;76:693-700.

[4] Warnecke C, Willich T, Holzmeister J, et al. Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements [J]. BiochemJ, 1999;340:17-24.

[5] Ichiki, T, Labosky PA, Shiota C, et al. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor [J]. Nature, 1995;377: 748-750.

[6] Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death [J]. Proc. Nat. Acad. Sci, 1996;93: 156-160.

[7] Janiak P, Pillon A, Prost JF, et al. Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury [J]. Hypertension, 1992;20:737-745.

[8] Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, et al. Regulation of gene transcription of angiotension II receptor subtypes in myocardial infarction [J]. JClin Invest, 1995;95:46-54.

[9] Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, et al. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. JPharmacol Exp Ther. 1998;284:323-336.

[10] Jones A, Dhamrait SS, Payne JR, et al. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension. Hypertension, 2003; 42(4):500-506.

[11] Schmieder RE, Erdmann J, Delles C, et al. Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene(+1675G/A) on left ventricular structure in humans [J]. JAm Coll Cardiol, 2001; 37(1):175-182.

[12] Alfakih K, Maqbool A, Sivanthan M, et al. Left Ventricle Mass Index and the Common, Functional, X-Linked Angiotensin II Type-2 Receptor Gene Ploymorphism (-1332G/A) in Patients With System Hypertension [J]. Hypertension, 2004;43:1189-1194.

[13] Herrmann SM, Nicaud V, Schmidt-Petersen K, et al. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and cardiovascular phenotypes: the GLAECO and GLAOLD studies [J]. Eur J Heart Fail., 2002; 4(6):707-712.