DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.028
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1381-04

论著

G蛋白β3亚单位基因C825T多态性与高血压发病的关系

谭建聪[1],祝之明[1],祝善俊[2],于长青[1],王 琳[1],刘晓莉[1],王海燕[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所高血压内分泌科,重庆 400042;[2]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 观察高血压病(EH)病人G蛋白β3亚单位基因(GNB3)C825T多态性,探讨EH发生的遗传学机制。方法 EH病人112例,设对照组。取血标本提取DNA,用PCR方法扩增目的基因,用限制性内切酶(*Bse*DⅠ)酶切PCR产物用于基因分型,同时观察血脂、体质量指数(BMI)、EH家族史。结果 EH病人GNB3 C825T基因型分布(基因型频率CC=0.34, CT=0.53, TT=0.13)与对照组有显著差别(基因型频率CC=0.59, CT=0.36, TT=0.05。$\chi^2=6.9$, $P<0.05$);Logistic回归分析显示,C825T等位基因与EH关联最密切(OR=2.2, 95%CI 1.1~4.6)。结论 GNB3基因C825T多态性的T等位基因是EH发病的遗传危险因子。

关键词:高血压;基因多态性;G蛋白
中图法分类号:R394.3;R544.1 文献标识码:A

The relationship between G-protein β3 subunit gene C825T polymorphism and the pathogenesis of essential hypertension

TAN Jian-cong, ZHU Zhi-ming, ZHU Shan-jun, YU Chang-qing, WANG Lin, LIU Xiao-li, WANG Hai-yan (Center of Hypertension, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the genetic mechanism of essential hypertension (EH) by means of observation of the polymorphism at position C825T of the gene that encodes the G protein β3 subunit (GNB3). Methods A total of 112 patients with EH and the matched control were selected. DNA was extracted from blood sample. Genotypes of the polymorphisms were determined by polymerase chain reaction (PCR) and the PCR products were digested by restriction endonuclease (*Bse*DⅠ). Blood-lipid, body mass index (BMI) and family history of EH patients were observed. Results There was significant difference in genotype distribution for the GNB3 C825T genotype between patients with EH (CC=0.34, CT=0.53, TT=0.13) and the controls (CC=0.59, CT=0.36, TT=0.05, $\chi^2=6.9$, $P<0.05$). Logistic regression analysis showed that the 825T allele was associated with higher risk of EH (OR=2.2, 95%CI 1.1 to 4.6). Conclusion GNB3 825T allele is a risk factor for the pathogenesis of EH.

Key words: hypertension; gene polymorphism; G-protein

肾上腺素能受体-G蛋白系统是调节心血管功能的重要信号通路,G蛋白的β3亚单位基因(GNB3)第10外显子有C825T多态性,T等位基因替换将导致所编码的41个氨基酸丢失,从而可能通过影响G蛋白功能导致高血压病(Essential hypertension, EH)[1]。本研究对重庆地区部分EH病人GNB3 C825T多态性进行观察,探讨EH发病的遗传学机制。

1 对象和方法

1.1 病例选择

我院高血压科和高血压防治社区的EH患者112例,男62例,女50例,年龄(59±7)岁。病人来自同一地区,非一、二级亲属,均为汉族。EH诊断按1999年WHO/ISH高血压处理指南中的标准,血压≥140/90 mmHg,常规检查排除继发性高血压等。记录收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均动脉压(MAP)、脉压(PP)、体质量指数(BMI)、EH家族史。测血压和抽取血样本前停服影响血压药物两周。另选健康人112名,性别、年龄与病例组匹配,常规检查血压、生化、肾功能、血糖、血脂、尿常规等。

作者简介:谭建聪(1965-),男,湖南省浏阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事高血压基础与临床方面的研究,发表论文28篇。电话:(023)68757443

收稿日期:2002-07-16;修回日期:2003-02-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 方法

GNB3 C825T 多态性测定[2]。

1.2.1 试剂 SK-200 基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K、*Bse*DⅠ 内切酶(上海生工)；dNTP、*Taq* 酶、eNOS 引物、GNB3 引物(上海博亚)。

1.2.2 血样本 所有研究对象早晨空腹抽取外周静脉血 5 ml EDTA 抗凝。

1.2.3 白细胞 DNA 的抽提 全血加双蒸水(1∶4)震荡，5 000 r/min 4 ℃离心，弃上清，沉淀用 TE 悬浮，加细胞裂解液 400 μl，混匀加蛋白酶 K，50 ℃水浴消化 4 h，加氯仿/异戊醇离心，取上层液体加沉淀缓冲液，离心弃上清，沉淀用 NaCl 悬浮，Rnase A 消化，无水乙醇－ 20 ℃沉淀 DNA，离心弃上清，沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次，弃上清，空干，沉淀用 TE 溶解，取部分测定浓度、纯度。

1.2.4 DNA 纯度及浓度测定 取 5 μl DNA＋95 μl DEPC 灭菌水，混匀，紫外分光光度计测定 A_{260}、A_{280} 吸光度值，如果 A_{260}/A_{280} 比值为 1.7～2.0，说明 DNA 纯度较高，可以用于 PCR 反应。DNA 浓度按公式计算。

1.2.5 多聚酶链反应(Polymerase chain reaction，PCR)：PCR 引物

正义链：5′-TGACCCACTTGCCACCCGTGC-3′

反义链：5′-CCACACGCTCAGACTTCATGG-3′

PCR 循环参数按 96 ℃、5 min；94 ℃、1 min；58 ℃、1 min；72 ℃、1 min，循环 35 次；72 ℃、5 min 扩增目的基因。PCR 产物加 Loading buffer 混匀，2% 琼脂糖凝胶 100 V× 30 min 电泳，紫外观测电泳条带分子质量大小，PCR 产物大小 268 bp。

1.2.6 限制性内切酶 *Bse*DⅠ 酶切 PCR 产物(GNB3) 反应体系：内切酶 buffer 2 μl、内切酶 1 μl(约 5 u)、PCR 产物 10 μl、DEPC H_2O 7 μl，37 ℃水浴酶切 4 h。酶切产物 20 μl＋2 μl 10× DNA Loading buffer 混匀，终止酶切反应，2% 琼脂糖凝胶电泳 100 V× 30 min，紫外观测酶切产物(电泳)条带及分子质量大小。*Bse*DⅠ 酶切位点：

5′...C↓CNNG G...3′

3′...G GNNC↑C...5′

没有消化的产物(不能切开即 TT 基因型)为 268 bp 1 条带，完全消化的产物(CC 基因型)为 116 bp 和 152 bp 两条带，杂合子(CT 基因型)为 3 条带。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件将数据进行统计学处理。组间频率比较采用 χ^2 检验；分类变量(基因多态性各组)间的血压、BMI 等比较用单向方差分析(One-way ANOVA)。用逐步 Logistic 回归分析了解不同基因型与 EH 的关系。关联程度用优势比(Odds ratio，OR)及其 95% 可信区间(Confidence interval，CI)表示。

2 结果

2.1 研究对象一般临床特点

EH 组 SBP、DBP、MAP、PP、WHR、BMI、EH 家族史(Family history，FH)均高于对照组(均 $P<0.01$)；甘油三酯(Triglyceride，TG)、总胆固醇(Total cholesterol，Tch)与对照组无显著差别($P>0.05$)，见表 1。

表 1 研究对象的临床特点

Tab 1 The clinical characteristics of subjects

	EH group(n=112)	Control(n=112)
Sex(M/F)	62/50	62/50
Age (Year)	59.0±7.0	61.0±8.0
SBP(mmHg)	155.6±17.1 *	122.3±10.9
DBP(mmHg)	88.4±11.34 *	74.9±7.9
MAP(mmHg)	112.5±10.8 *	90.7±8.4
PP(mmHg)	67.2±13.8 *	47.4±9.4
BMI(kg/m^2)	24.3±3.6 **	23.5±3.1
Tch(mmol/L)	5.1±1.0	4.9±1.0
TG(mmol/L)	1.5±0.8	1.4±1.2
EHFH(%)	43.6 *	32.5

*：$P<0.01$，**：$P<0.05$ *vs* control

2.2 GNB3 基因型群体代表性检验

不同个体的 GNB3 酶切后表现为下列 3 种基因型中的一种：CC、CT、TT，见图 1。能完全被酶切开为两条带，是 CC 纯合子；不能切开的为一条带，是 TT 纯合子；一条能切开为两条带，而另一条不能切开，表现为 3 条带，是 CT 杂合子。群体代表性检验：研究对象 GNB3 基因型分布，经 χ^2 符合 Hardy-Weinberg 平衡，表明患者来自同一群体。

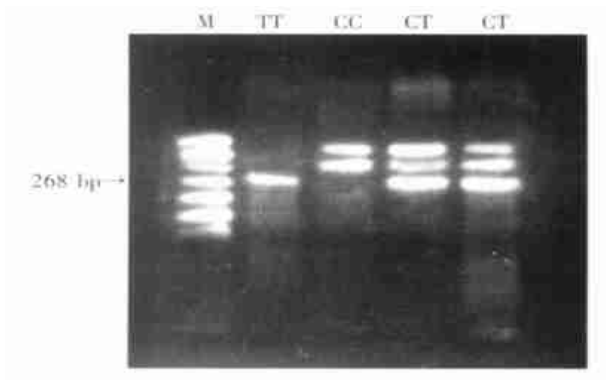


图 1 GNB3 基因 C825T 多态性各基因型

Fig 1 Genotypes of GNB3 C825T polymorphism

2.3 GNB3 各基因型在 EH 组和对照组中的分布

GNB3 基因型在两组人群中的分布有显著差别，EH 组 T 等位基因(CT＋TT)频率显著高于对照组($P<0.001$)，见表 2。

表 2 GNB3 3 种基因型在 EH 组和对照组中的分布

Tab 2 The distribution of GNB3 genotype in EH and control group

	n	CC(%)	CT(%)	TT(%)	T-allele(%)
EH	112	38(34)	60(53) *	14(13) *	44(39) #
Control	112	66(59)	40(36)	6(5)	26(23)

*：$P<0.001$ *vs* control；#：$P<0.001$ *vs* CC genotype

2.4 GNB3 各基因型的血压水平及比较

GNB3 各基因型之间的 SBP、DBP、MAP 均有显著差别(分别 $P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.01$)，而各基因型之间的 PP 水平无显著差别($P>0.05$)，见表 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　GNB3 各基因型的血压水平及比较

Tab 3　The blood pressure of every GNB3 genotype

	CC(38)	CT(60)	TT(14)
SBP (mmHg)	130.05±20.87	141.97±22.12 *	147.50±13.92
DBP(mmHg)	77.88±9.95	85.91±10.97 **	83.33±7.64
MAP(mmHg)	95.27±12.65	104.55±13.96 **	104.72±8.51
PP (mmHg)	52.17±15.17	56.07±14.75	64.17±11.82

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* CC genotype

2.5　逐步 Logistic 回归分析

将研究对象的分类变量-有、无 EH 作为因变量, GNB3 各基因型、BMI、血脂等作为自变量, 进行逐步 Logistic 回归分析, 结果显示, 与 EH 发病关联最密切的是 GNB3 825T 等位基因($P<0.05$, OR=2.2, 95%CI 1.1~4.6); 将分类变量-GNB3 不同基因型作为因变量, 有、无 EH 家族史等作为自变量进行分析, 显示 GNB3 825T 等位基因与家族史的关联为近临界显著水平($P=0.056$), 与血脂、BMI 等无显著性差异。

3　讨论

G-蛋白是一种镶嵌于细胞膜上的异源三聚体, 由α、β 和γ 亚单位组成, 它们又有多种亚型。许多激素和生长因子均通过 G 蛋白偶联的受体发挥作用, 因此 G 蛋白的遗传改变可以通过多种机制导致 EH。既往一些研究显示[3], 血管信号转导功能改变可能是血管阻力增高和 EH 的发病机制。在 EH 病人中, β 肾上腺素能介导的血管扩张受损[4], β 受体介导的腺苷酸环化酶(Adenyl cyclase, AC)激活降低[5], 提示与 AC 激活有关的跨膜信号转导系统异常。G 蛋白直接与 AC 激活有关, 它分为刺激性 G 蛋白(Stimulatory G protein, Gs)和抑制性 G 蛋白(Inhibitory G protein, Gi)等, Gs 激活 AC, Gi 抑制 AC。

G 蛋白的编码基因突变可能影响到其活性。近年研究显示, GNB3 突变与 EH 相关[6]。GNB3 位于染色体 12p13, 第 10 外显子第 825 位 C 被 T 替换(C825T 多态性), 将导致一段核苷酸丢失, 可影响到 mRNA 前体的二级结构[7], 并使其编码的蛋白质中的 41 个氨基酸丢失, 可能导致Gβ3 的活性发生改变, 增加 Gi 信号转导功能[8], 介导 AC 激活降低, cAMP 减少, 引起 VSMC 收缩、增殖生长等, 导致 EH。

有研究显示, GNB3 825T 等位基因携带者动脉对 α_2 肾上腺素能受体刺激的反映性增高, 中性粒细胞的化学趋化应答增强[9,10], 提示 C825T 多态性影响到 G-蛋白活性。近年报道 GNB3 的基因 C825T 多态性与 EH 的关系, 结果不一致。对德国、澳大利亚人的一些研究报道 C825T 多态性与 EH 有关联[11,12], 而来自东亚、法国、美国等的一些研究报道无关联[13,14]。如 Siffert 等[7] 报道 TT 纯合子和 TC 杂合子与 CC 纯合子比较分别有 79% 和 38%患 EH 的可能性, 有 T 等位基因与没有携带 T 等位基因者比较患 EH 病的机会高 50%。但 Snapir 等[15] 的结果相反。造成这种差别的原因可能与下列因素有关: (1)人种、环境、生活习惯等的差别, C825T 多态性在心血管方面的种族差异性已被一些研究证实; (2)临床诊断标准不一致; (3)样本大小、选择偏倚; (4)研究方法和研究手段的差别等。

本实验结果显示, 在 EH 病人中 T 等位基因的频率高于正常血压人, 基因型 TT+CT 占多数, 而在正常血压者 CC 纯合子占多数; 血压随着 T 等位基因携带的数量增加而增高, 表明T 等位基因与血压增高有关。进一步行逐步 Logistic 回归分析显示, T 等位基因与 EH 关联密切。说明在重庆地区的部分汉族人中, GNB3 基因 C825T 多态性的 T 等位基因是 EH 的易患因素, 即携带T 等位基因者通过上述机制导致 G 蛋白功能改变, 从而有更高的 EH 患病风险。对 EH 家族史分析显示, 遗传与T 等位基因的关联达临界显著水平($P=0.056$), 提示与 EH 发病有关的遗传基因改变可能包括了 GNB3 的变异, 即 EH 的遗传是遗传了包括 GNB3 的变异(825T 等位基因)在内的基因改变。因家族史与T 等位基因的关联尚未达显著水平, 还有待今后扩大样本进一步研究。

参考文献:

[1] Kato N, Sugiyama T, Morita H, *et al*. G protein beta3 subunit variant and essential hypertension in Japanese[J]. Hypertension, 1998, 32(5): 935—938.

[2] Schunkert H, Hense H W, Doring A, *et al*. Association between a polymorphism in the G protein β3-subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels[J]. Hypertension, 1998, 32(3): 510—513.

[3] Feldman R D. Defective venous beta-adrenergic response in borderline hypertensive subjects is corrected by a low sodium diet[J]. J Clin Invest, 1990, 85(3): 647—652.

[4] Naslund T, Silberstein D J, Merreml W J, *et al*. Low sodium intake corrects abnormality in beta-receptor-mediated arterial vasodilation in patients with hypertension: correlation with beta-receptor function *in vitro*[J]. Clin Pharmacol Ther, 1990, 48(1): 87—95.

[5] Hepler J R, Gilman A G. G proteins[J]. Trends Biochem Sci, 1992, 17(10): 383—387.

[6] Forte P, Copland M, Smith L M, *et al*. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension[J]. Lancet, 1997, 349(9055): 837—842.

[7] Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, *et al*. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension[J]. Nat Genet, 1998, 18(1): 45—48.

[8] Siffert W, Rosskopf D, Moritz A, *et al*. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension[J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 759—766.

[9] Virchow S, Ansorge N, Rubben H, *et al*. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein β3 subunit 825 T allele[J]. FEBS Lett, 1998, 436(2): 155—158.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[10] Virchow S, Ansorge N, Rosskopf D, *et al*. The G protein beta3 subunit splice variant Gbeta3-s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1999, 360(1): 27—32.

[11] Benjafield A V, Jeyasingam C L, Nyholt D R, *et al*. G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension[J]. Hypertension, 1998, 32(6): 1094—1097.

[12] Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, *et al*. G-protein beta3 subunit variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension[J]. Hypertension, 1999, 33(4): 1049—1051.

[13] Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans[J]. Hypertension, 2000, 35(6): 1297—1300.

[14] Brand E, Herrmann S M, Nicaud V, *et al*. The 825T/C polymorphism of sthe G-protein subunit beta3 is not related to hypertension[J]. Hypertension, 1999, 33(5): 1175—1178.

[15] Snapir A, Heinonen P, Tuomainen T P, *et al*. G—protein beta3 subunit C825T polymorphism: no association with risk for hypertension and obesity [J]. J Hypertens, 2001, 19(12): 2149—2155.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)15-1384-02

糖尿病合并高血压住院健康教育及体会

Health education of hospitalized patients with diabetes combined with hypertension

万 萍, 蔡红卫 (第三军医大学附属西南医院内分泌科, 重庆 400038)

糖尿病合并高血压在临床上非常多见, 二者的患病率都在逐年增高。流行病学研究显示, 在糖尿病人中高血压患病率明显高于非糖尿病人。国外报道糖尿病人中高血压患病率高达 40%~80%[1]。在我国糖尿病患者约 50% 合并高血压。糖尿病患者近 3 000 万, 糖尿病合并高血压患者约 1 500 万。糖尿病合并高血压的患病率在美国约为 30%, 在加拿大约为 50%。可见, 糖尿病患者中高血压的患病率之高已成为世界上许多国家的主要卫生保健问题。现将我院糖尿病合并高血压患者的健康教育体会总结如下。

1 临床资料

我科 2002 年 1 月 1 日至 2002 年 9 月 31 日期间里共收治病人 624 例, 其中糖尿病病人 589 例(均符合 1999 年世界卫生组织制订的糖尿病诊断标准), 高血压病人 305 例(均符合 1999 年 WHO 国际高血压联盟公布的新的诊断标准), 糖尿病合并高血压病人 286 例, 糖尿病合并高血压(不伴糖尿病肾病)的患病率为 48.5%。所有患者入院前血压控制均较差, 血压在(200/120) mmHg 以上有 32 例, 占糖尿病合并高血压患者的 11.2%; 血压在(150~199)/(100~119) mmHg 有 35 例, 占 12.2%; 血压在(130~149)/(85~99) mmHg 有 117 例, 占 40.9%; 血压在 130/85 mmHg 以下有 102 例, 占 35.7%。出院时血压(130~149)/(85~99) mmHg 有 12 例, 占 4.2%; 血压在 130/85 mmHg 以下有 274 例, 占 95.8%。出院后 1 个月复查血压在(130~149)/(85~99) mmHg 有 29 例, 占 10.1%; 血压在 130/85 mmHg 以下有 257 例, 占 89.9%。

作者简介: 万 萍(1977—), 女, 四川省泸县人, 护师, 主要从事糖尿病健康教育方面的研究。电话: (023)68754009

收稿日期: 2002-09-04; 修回日期: 2003-05-09

2 健康教育

2.1 健康教育首先以糖尿病合并高血压的危害为出发点, 选择不同方式进行健康教育

在糖尿病健康教育中, 着重强调糖尿病常会累及大血管与微血管病变, 加速心血管病、肾病及视网膜病变的发生极其发展, 增加糖尿病患者的病死率。让患者明白: 糖尿病患者中 44%死亡因素与高血压有关, 而高血压死亡者 10% 患糖尿病, 35%~75%有并发症的糖尿病患者与高血压有关[2]。让病人在了解其危害性的基础上, 正确对待自己的疾病, 积极参与糖尿病及高血压知识的强化学习, 住院期间定时安排录像观看, 专人负责讲解糖尿病及高血压有关知识, 根据病人的需求选定侧重点, 组织不同的专题讲座, 不定期发放有关糖尿病及高血压的健康教育资料。在学习过程, 针对部分依从性较差、慢性并发症多的患者, 进一步强调糖尿病合并高血压对肌体的影响。临床中部分患者认为糖尿病与高血压不存在联系, 针对这些患者, 邀请医生参与教育, 要医生告诉患者糖尿病合并高血压对肌体产生的影响是极为有害的, 因为高血压不仅是血流动力学紊乱疾病, 而且是一种代谢紊乱综合征, 二者并存能进一步加重钠水潴留, 脂类及糖的代谢异常。在高血压存在时, 会加快糖尿病肾病的发生发展, 而糖尿病肾病的进展加速, 又会引起血压的进一步升高, 从而形成恶性循环。这样就促进心血管病等严重并发症的发生发展, 严重威胁着病人的健康。给病人施加一定的精神压力情况下, 积极疏导, 将病人的压力转化为动力, 鼓励其听从医务人员的治疗, 进行必要的自我保护, 以提高生活质量。

2.2 治疗中期, 病人已经重视自己疾病的基础上, 讲解糖尿病人积极治疗高血压的重要性

严格控制血压对糖尿病合并高血压患者至关重要, 因其可

(下转 1388 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net