

· 临床研究 ·

脑利钠肽基因型和生活习惯与高血压关系的病例对照研究

靳 钰¹, 侯允天^{2*}, 王志方¹, 刘志强¹, 苏淑红¹, 王 奕¹, 张海照¹(¹河南省新乡市中心医院心内3科, 新乡 453000; ²解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853)

【摘要】目的 研究脑利钠肽(BNP)基因 T-381C 单核苷酸多态性和生活习惯与原发性高血压的关系。方法 用病例-对照研究设计, 选取高血压病例(高血压组)和与之年龄、性别匹配的按 1:1 配对的健康对照各 796 例(对照组), 运用 PCR-限制片段多态(RFLP)技术检测 BNP 基因启动子区第 381 位点的 T/C 基因多态性, 并比较不同基因型、生活习惯与高血压发病风险的关系。结果 两组人群 BNP 基因 T-381C 等位基因的分布差异无显著性($\chi^2=2.29, P=0.13$); 高血压组 CC 基因型频率明显高于对照组, TC 基因型频率低于对照组, 三种基因型分布比较差异有统计学意义($\chi^2=48.81, P<0.05$)。与携带 TT 或 TC 基因型者比较, 携带 CC 基因型个体患高血压的风险增加(OR=1.98, 95%CI 1.39~2.38)。吸烟显著增加了高血压风险(OR=2.30, 95%CI 1.70~2.91), 经常嗜酒(≥ 2 次/周)增加高血压风险, OR 处于临界值(OR=1.53, 95%CI 1.19~1.89), 高盐饮食的作用较明显(OR=1.97, 95%CI 1.48~2.31), 同时有吸烟、饮酒与高盐饮食习惯且携带 CC 基因型者发生高血压的风险增高, 体育锻炼是保护性因素。结论 原发性高血压与 BNP 基因 T-381C 多态性、生活习惯及它们之间的相互作用有关。

【关键词】 利钠肽; 脑; 生活方式; 高血压; 多态性; 单核苷酸

【中图分类号】 R544.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)03-0241-04

Relationship of brain natriuretic peptide genotypes and life style with susceptibility to essential hypertension: a case-control study

JIN Yu¹, HOU Yuntian^{2*}, WANG Zhifang¹, LIU Zhiqiang¹, SU Shuhong¹, WANG Yi¹, ZHANG Haizhao¹(¹Third Department of Cardiology, Xinxiang Municipal Central Hospital, Xinxiang 453000, China; ²Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the association of brain natriuretic peptide(BNP) gene T-381C polymorphism and life style with the risk of essential hypertension(EH). **Methods** A case-control study was carried out. The BNP gene T-381C polymorphism was determined by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP) among 796 patients with EH and 796 age- and sex-matched controls. The association between the genetic polymorphism and the risk of EH was examined by a multivariate analysis. **Results** The C allele frequency of BNP was 37.9% and 34.3%, and T allele frequency of BNP 62.1% and 65.7% respectively in EH and control groups, with no statistical difference between the two groups($\chi^2=2.29, P=0.13$). The frequency of TT, CT, and CC genotypes of BNP was 48.2%, 27.5% and 24.2% respectively in EH group, and 44.8%, 41.7% and 13.4% in control group respectively. There was significant difference in the genotype distribution between the two groups($\chi^2=48.81, P<0.05$). Compared with TT or TC genotype, homozygosity for the CC genotype significantly increased the risk of EH development(OR=1.98, 95%CI 1.39-2.38). The logistic regression analysis suggested that smoking(OR=2.30, 95%CI 1.70-2.91), frequent drinking(OR=1.53, 95%CI 1.19-1.89) or taking high salt diet(OR=1.97, 95%CI 1.48-2.31) increased the risk of EH. The coexistence of smoking, frequent drinking and taking high salt diet in the CC subgroup had higher risk of EH. Physical exercise was a protection factor. **Conclusion** The development of EH is associated with BNP gene T-381C polymorphism, life style and their interaction. Polymorphism of BNP gene T-381C may play a role in essential hypertension.

【Key words】 brain natriuretic peptide; life style; hypertension; single nucleotide polymorphism

目前已经证实, 约80%左右的高血压是由多个基因的遗传变异与环境因素共同作用所致的多基因疾病^[1], 具有很明显的地理分布差异。河南省豫北地区是我国高血压的高发区之一, 发病率高达25%以

上。为了解该地区高血压高发的原因、有效地开展高血压的预防工作, 我们对该地区进行环境因素调查的同时, 采用分子流行病学方法对一些基因的多态性及其和环境因素相互作用与高血压易感性的关

系进行了研究。随着对脑利钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 生理功能及基因表达调控等研究不断深入, 影响BNP代谢途径的主要基因多态性位点已被证实, 我们对BNP基因启动子区-381位点的T/C多态性是否与高血压相关及与生活习惯有交互关系进行了研究。

1 对象与方法

1.1 对象

运用病例-对照研究设计。祖籍为河南豫北地区的无血缘关系的汉族人群, 通过体格检查、临床诊断、实验室检查和详细的问卷调查等进行评估入选。问卷调查的内容有: 研究对象人口统计学资料、一般社会资料、过去史、家族史、生活方式和社会心理因素等。所有受试者在纳入研究前均签署了知情同意书。调查表由专人进行质量控制。连续入选2008年1月至2010年1月间豫北地区各三甲医院心内科门诊或住院的高血压患者796 (男504, 女292) 例 (高血压组)。入选标准: 根据2004年中国高血压防治指南高血压诊断标准: 未治疗前非同日3次测量取血压平均值, 收缩压 (systolic blood pressure, SBP) > 140 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 和 (或) 舒张压 (diastolic blood pressure, DBP) > 90 mmHg者。或者既往有高血压病史、正在用降压药治疗者, 虽血压 < 140/90 mmHg, 也可入选。排除糖尿病、严重贫血、甲状腺功能异常、肿瘤、肝肾疾病、各种心脑血管疾病及危重病患者不能耐受检查者。对照按1:1配对原则, 选择居住于当地、同性别、年龄相差5岁以内的居民和同期指定医院体检中心的健康体检者, 共796例 (对照组)。入选标准: 根据2004年中国高血压防治指南: SBP < 140 mmHg, DBP < 90 mmHg者, 经过病史调查、体格检查及一般生化检查提示无高血压家族史, 常规化验无异常, 排除标准同上。

1.2 方法

1.2.1 两组临床各种参数测定 两组研究对象均于取血前24h禁酒及高脂饮食, 空腹12~14h后取外周静脉血8 ml, EDTA抗凝, -20℃冰箱保存, 用全自动生化分析仪 (日立公司 日本) 抽取5 ml抗凝血, 测定血脂, 包括总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein, LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein, HDL-C)、空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、肌酐 (creatinine, Cr), 同时测量血压、体重, 并计算体质质量指数 (body

mass index, BMI)。血压以清晨空腹静卧, 连续测定2次取其平均值为研究数值。对患者上述检查均由医务人员操作, 征得研究对象同意并签定知情同意书。

1.2.2 BNP基因片段扩增 取剩余3 ml外周静脉血, 用血液基因组DNA提取试剂盒 (北京天维时代科技有限公司) 提取白细胞DNA, DNA置于-20℃冰箱保存; 用2×TaqPCR MasterMix PCR扩增试剂盒 (北京天维时代科技有限公司) 进行扩增。BNP基因分型参照文献[2]报道的方法进行。PCR-RFLP引物为5'-CTGTGAGTCACCCCGTGCTC-3'和5'-GGCAGG AACGCGCTGGAGAC-3'。反应在MJ PTC-220PCR仪 (M. J. Research公司) 中进行, PCR反应体系为25 μl, 按下述程序进行扩增: 94℃预变性3 min, 然后进行35个循环 (94℃变性45 s; 65℃退火45 s; 72℃延伸1 min;), 最后72℃延伸10 min。PCR产物用Hpa II内切酶 (Fermentas, 美国) 37℃消化15 h, 3%琼脂糖凝胶 (含0.5 mg/L溴化乙啶) 电泳1 h后, 用紫外分析仪观察结果, 最后进行基因型判断。

1.2.3 脑利钠肽T-381C基因型分析 BNP基因扩增目的片段大小为186 bp, 经酶切后有3种基因型: TT基因型纯合子: (139+48) bp; CC基因型纯合子: (71+68+48) bp; TC基因型杂合子: (139+71+68+48) bp。相应产生3种不同的电泳条带 (图1)。

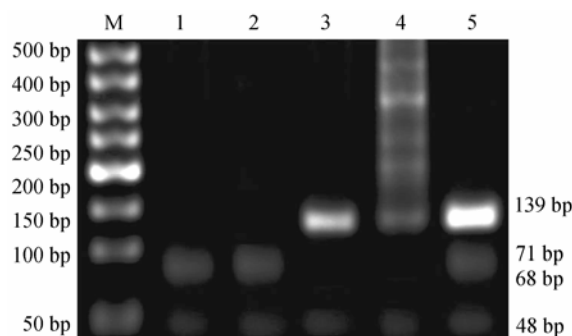


图1 PCR扩增的BNP基因片段经Hpa II限制酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果

M: DNA分子量标准; 1,2: CC基因型; 3,4: TT基因型; 5: TC基因型

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 定性资料用百分率表示。组间频率比较用 χ^2 检验, 组间连续变量比较采用单因素方差分析或独立样本 t 检验。判读基因型后, 计算各组基因型频率及等位基因频率, 以Hardy-Weinberg平衡检验, 确认基因型频率符合Hardy-Weinberg平衡, 采用非条件Logistic回归分析不同生活习惯下不同基因型高血压风险, 计算OR及95%CI进行危险度评价, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者一般临床资料比较

两组性别和年龄比例, TC, LDL-C, BMI 和 Cr 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组比较, 高血压组的 TG 和 FBG 水平及吸烟、饮酒和高盐饮食比例明显增高 ($P<0.05$), 而 HDL-C 水平和体育锻炼比例明显降低 ($P<0.05$; 表 1)。

表 1 两组患者一般临床资料比较 ($n=796$)

项目	高血压组	对照组
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	62 $\pm$ 9	63 $\pm$ 9
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	5.1 $\pm$ 0.6	5.0 $\pm$ 0.8
TG (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.9 $\pm$ 0.8	1.6 $\pm$ 0.6*
LDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	3.0 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.7
HDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3*
BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	24.4 $\pm$ 2.8	24.1 $\pm$ 2.6
FBG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	5.4 $\pm$ 0.7	5.2 $\pm$ 0.8*
Cr(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	98 $\pm$ 33	92 $\pm$ 50
收缩压(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	152 $\pm$ 17	122 $\pm$ 11*
舒张压(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	97 $\pm$ 9	77 $\pm$ 8*
吸烟率(%)	52.0	30.2*
体育锻炼(%)	61.1	67.8*
饮酒率(≥ 2 次/周, %)	46.9	36.2*
高盐饮食(%)	35.6	21.6*

注: TC: 总胆固醇; TG: 甘油三脂; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; BMI: 体质量指数; FBG: 空腹血糖; Cr: 肌酐。与对照组比较, * $P<0.05$

2.2 两组人群 BNP 基因型分布特征比较及不同基因型与高血压患病风险分析

两组人群 T 等位基因和 C 等位基因分布差异无显著性 ($\chi^2=2.29$, $P=0.13$)。高血压组 CC 基因型频率明显高于对照组, TC 基因型频率明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=48.81$, $P<0.05$; 表 2)。与携带 TT 或 TC 基因型者比较, 携带 CC 基因型的个体患高血压的风险增加, 经 TG、FBG 和 HDL-C 水平

及吸烟、饮酒和高盐饮食和体育锻炼比例等校正后, 提示 CC 基因型是高血压的危险因素 (OR = 1.98, 95%CI 1.39~2.38) (表 2)。

表 2 BNP 的 T-381C 基因型和等位基因频率分布

[$n=796$, $n(\%)$]

组别	基因型			等位基因	
	TT	TC	CC	T	C
对照组	357(44.8)	332(41.7)	107(13.4)	1046(65.7)	546(34.3)
高血压组	384(48.2)	219(27.5)	193(24.2)*	988(62.1)	604(37.9)

注: 与对照组比较, * $P<0.05$

2.3 BNP 基因 T-381C 基因型与生活习惯对高血压风险的联合作用

将上述分析发现有统计学意义的因素作为自变量, 选择非条件 Logistic 回归模型进行多因素分析, 结果表明, 高血压组吸烟人数比例显著高于对照组 (52.0% vs 30.2%; $P<0.05$), 吸烟显著增加了高血压风险 (OR=2.30, 95%CI 1.70~2.91), 高盐饮食的作用较明显 (OR=1.97, 95%CI 1.48~2.31), 经常饮酒 (≥ 2 次/周) 增加了高血压发生的危险性 (OR=1.53, 95%CI 1.19~1.89), 体育锻炼是保护性因素 (OR=0.73, 95%CI 0.61~0.89)。在拥有 CC 基因型者中吸烟、高盐饮食和经常饮酒均增加高血压发生危险性 (OR 分别为 5.02, 3.79 和 2.73; 表 3)。

3 讨 论

BNP 主要作用是拮抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统的不良作用, 有利尿、消除水钠潴留、抑制血管收缩肽的产生和作用, 促进血管舒张和抑制交感神经过度反应^[3], 属于利钠肽家族中的一员^[4], 该基因与心脑血管疾病的关系已成为目前研究的热点。相关研究提示 BNP 基因可能是高血压的候选基因。影响 BNP 代谢途径的主要基因多态性或等位基因已

表 3 不同生活习惯下 BNP 基因多态性与高血压易感性的关系 (n)

生活习惯		BNP-381 位点的 T/C 多态性								
		高血压组	对照组	OR (95%CI)						
					TT+TC			CC		
					高血压组	对照组	OR (95%CI)	高血压组	对照组	OR (95%CI)
吸烟习惯	无	382	556	1.00	354	499	1.00	28	57	1.00
	有	414	240	2.30 (1.70~2.91)	249	190	1.73 (1.29~2.30)	165	50	5.02 (3.71~9.69)
体育锻炼	低	310	256	1.00	232	227	1.00	78	29	1.00
	高	486	540	0.73 (0.61~0.89)	371	462	0.77 (0.59~1.01)	115	78	0.54 (0.33~0.90)
高盐饮食	无	513	624	1.00	411	537	1.00	102	87	1.00
	有	283	172	1.97 (1.48~2.31)	192	152	1.59 (1.21~2.10)	91	20	3.79 (2.00~5.91)
饮酒	<2 次/周	423	508	1.00	373	455	1.00	50	53	1.00
	≥ 2 次/周	373	288	1.53 (1.19~1.89)	230	234	1.18 (0.89~1.43)	143	54	2.73 (1.52~4.02)

被发现,其中的许多变异可影响在体或离体条件下BNP的生理功能。目前国内外对BNP基因多态性和高血压关系的研究仍处于起始阶段,相关文献报道较少。Lanfear等^[5]对多个BNP相关基因位点的多态性研究发现,BNP基因T-381C多态性与血清BNP水平相关。Mukoyama等^[6]研究证实原发性高血压患者比正常血压人群的血清BNP水平高。Lajer等^[7]对1型糖尿病患者的研究也发现,BNP基因T-381C多态性与血清NT-proBNP水平相关,CC或CT型与TT型携带者相比其血清NT-proBNP水平升高约50%。本研究通过796例高血压患者(高血压组)及796例健康对照者(对照组)BNP基因的T-381C多态性分析,发现两组间基因型比较差异有统计学意义($P<0.05$),BNP基因T-381C多态性与原发性高血压有显著性关联,与上述研究结果基本一致。本研究还发现TT或TC型与CC型携带者比较,携带CC基因型的个体患高血压的风险增加,其中携带CC基因型的个体患高血压的风险约是TT或TC基因型的1.98倍,提示CC基因型可能是高血压的易感基因,与上述研究结果略有不同。出现这种差异的原因可能是单个基因所起的作用有限及试验本身有一定误差,同时,各个研究对病例的入选标准不一、样本量大小不同,研究对象也存在种族差异,也可导致结果存在一定的差异。高血压是多因素、多基因性疾病,遗传因素的影响是基因与环境、基因与基因之间及基因内部不同位点之间协同作用的结果,还有待于我们在样本量、样本构成、研究方法、人种及地理差异等方面进行进一步的综合分析。

BNP基因T-381C多态性是否通过影响其他临床指标的表达或通过某些特殊的环境因素而影响高血压的发病等,文献报道较少。本研究对研究对象的生活习惯进行调查,并对生活习惯、基因型与高血压的交互关系进行了研究。结果发现,高血压组吸烟、饮酒和高盐饮食比例明显增高,参加体育活动的人数比例明显低于对照组,同时我们还发现携带CC基因型的个体同时有吸烟、饮酒和高盐饮食习惯者高血压风险明显增高。吸烟可以通过引起多种炎症因子的升高,如C-反应蛋白、白介素-6和肿瘤坏死因子- α 等促进炎症反应,干扰脂蛋白代谢及影响血管内皮舒缩功能等而影响高血压的发生发展,但并不是每一个吸烟者均会发展为高血压,这与不同个体的遗传背景不同有关。膳食中钠盐摄入过多,将导致钠水潴留,循环血量增加,就会激活肾素-血管

紧张素系统,从而引起交感神经系统活动增强,使周围小血管痉挛收缩,血管外周阻力增加,血压升高。饮酒和血压水平以及高血压患病率之间呈线性关系,同时还增加了服用降压药的抵抗性。加强体育锻炼来控制体重对高血压患者来说是非常重要的。据报道每次60min,每周3次以上进行体育锻炼,持续10周,不仅有降压作用,还能降低患心血管疾病的危险并能改善糖、脂质代谢,消除与高血压发病密切相关的肥胖及内脏脂肪蓄积等因素而达到降压的目的。

综上所述,高血压的发病可能与BNP基因多态性以及生活习惯及其它们之间的交互作用相关。BNP基因T-381C多态性影响原发性高血压易感性,可能是通过某些因素如遗传因素、环境因素等影响BNP基因启动子的功能,调控基因的转录,改变血清BNP水平而实现,但其具体的作用机制目前还不清楚,有待于进行大样本多中心的研究。

【参考文献】

- [1] Yan W, Wu F, Morser J, *et al.* Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(15): 8525-8529.
- [2] Meirhaeghe A, Sandhu MS, McCarthy MI, *et al.* Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(11): 1343-1350.
- [3] 刘泽, 吴军, 冯德光, 等. 老年慢性心力衰竭患者血浆脑钠肽、D-二聚体和纤维蛋白原浓度变化[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2010, 9(4): 363-364.
- [4] 高枫, 苏伟, 龚少愚, 等. B型脑利钠肽和Tei指数在高血压早期左心室舒张功能不全诊断中的意义[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2009, 11(10): 747-749.
- [5] Lanfear DE, Stolker JM, Marsh S, *et al.* Genetic variation in the B-type natriuretic peptide pathway affects BNP levels[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2007, 21(1): 55-62.
- [6] Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, *et al.* Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone[J]. *Lancet*, 1990, 335(8692): 801-802.
- [7] Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, *et al.* Polymorphisms in the B-type natriuretic peptide(BNP) gene are associated with NT-proBNP levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22(11): 3235-3239.

(编辑: 王雪萍)