

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.04.015

基于 AT1R 基因位点与环境因素交互作用的原发性高血压痰湿壅盛型证候实质研究

吴传云¹, 周雪梅¹, 董梅², 黄开泉², 徐慧¹, 苏瑀¹, 陈雪功¹, 董昌武^{1*}

(1. 安徽中医药大学中医临床学院, 安徽省合肥市梅山路 103 号, 230038; 2. 安徽中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 从基因位点与环境因素的交互作用方面探讨原发性高血压痰湿壅盛型的证候特征。方法 选择原发性高血压痰湿壅盛型患者 100 例 (痰湿壅盛组), 同期选取体检合格者 100 例做对照 (对照组)。采用多重高温连接酶检测反应基因分型技术检测各组患者 AT1R 基因的 A1166C 及 T573C 位点多态性, 利用多因素降维分析法分析环境因素与血管紧张素 II 受体 1 (AT1R) 基因多态性交互作用对原发性高血压痰湿壅盛证形成的影响。结果 痰湿壅盛组与对照组比较, 环境危险因素中的家族史、饮食、体重指数 (BMI) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组受试者 AT1R 基因 T573C、A1166C 位点不同基因型比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。BMI、饮食及家族史与 AT1R 基因 T573C 位点交互作用与痰湿壅盛证形成有关, 交互危险度为 29.99 ($P < 0.01$)。结论 BMI、饮食及家族史与 AT1R 基因 T573C 位点组成的交互对原发性高血压痰湿壅盛形成具有重要作用。

关键词 原发性高血压; 痰湿壅盛型; AT1R 基因多态性; 环境因素; 交互作用

临床上 95% 高血压病为原发性高血压 (essential hypertension, EH), 长期发展可并发脑血管意外、高血压性心脏损害或心力衰竭、肾功能衰竭等^[1]。EH 的发病是环境因素与遗传因素相互作用的结果, 机制复杂^[2]。EH 的遗传特质非常明显, 至少有 30% ~ 40% 的 EH 与基因息息相关^[3], 基因多态性是造成高血压病各种异质性的原因之一。证候的形成是机体遗传因素与外环境共同作用于机体的结果, 亦具有个体差异^[4]。因此, 证候在不同个体之间表现出差异症状群, 也许表明证候存在遗传多样性, 即证候之间存在着不同的基因表达谱, 或者不同证候的关键基因与环境因素之间存在交互作用。本研究以肾素-血管紧张素系统关键基因血管紧张素 II 受体 1 (AT1R) 的 A1166 及 T573 位点为切入点, 利用多因素降维分析法 (MDR) 分析 EH 痰湿壅盛型患者 AT1R 基因多态性及与 EH 发病危险因素交互作用, 从分子流行病学的角度进行关联分析, 揭示 EH 痰湿壅盛型中

医证候表型的可能机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取安徽中医药大学第一附属医院心内科 2010 年 12 月至 2013 年 7 月符合纳入标准的门诊和住院 EH 痰湿壅盛型患者 100 例 (痰湿壅盛组), 同期选取体检合格者 100 例做对照 (对照组)。

1.2 病例纳入标准

1) 符合《中国高血压防治指南 2010 修订版》^[5] 中 EH 的诊断标准, 并符合痰湿壅盛型的中医辨证标准^[6]。2) 年龄 > 18 岁; 3) 连续 3 次非同日坐位时收缩压 ≥ 140 mmHg 或舒张压 ≥ 90 mmHg。4) 取血前未服用 β 受体阻滞剂、血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素受体拮抗剂; 若曾服用上述药物, 则已停药 5 个半衰期。5) 在停药期间使用 α 受体阻滞剂替代。6) 患者知情同意。

1.3 病例排除标准

1) 合并严重的瓣膜性心脏病、心肌病, 6 个月内发生过不稳定性心绞痛者; 2) 合并肾功能和

基金项目: 国家自然科学基金 (81173196)

* 通讯作者: dew1018@aliyun.com, (0551) 65169153

肝功能损害者; 3) 妊娠及哺乳期妇女; 4) 有酗酒、滥用药物或精神疾病史者; 5) 恶性肿瘤患者或伴有明显的其他系统疾病者; 6) 因残疾或其他原因不易随访和不合作者。

1.4 环境危险因素的收集

调查所有受试者的家族史、吸烟、饮酒、饮食、体重指数 (BMI) 情况。

1.5 基因多态性的检测

清晨对空腹受试者取肘正中静脉血 2 ml, EDTA 抗凝, -20°C 保存, 1 周内提取 DNA, -80°C 保存。采用多重高温连接酶检测反应基因分型技术 (iMLDR) 多重 SNP 分型试剂试剂盒 (8-16x, 上海天昊生物科技有限公司, 批号 G0103S) 对 200 个样本 AT1R 2 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点进行分析。连接产物上 ABI3730XL 测序仪, 测序仪上收集的原始数据用 GeneMapper 4.1 (applied biosystems, USA) 分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较使用 t 检验; 分类资料使用 χ^2 检验, 并计算 OR 值及 95% 置信区间; 遗传平衡检验采用 Hardy-weinberg 平衡定律, 计算研究对象总体的等位基因频率。均交互作用使用 MDR 检测方法, 采用 version 2.0 软件包。

2 结果

2.1 两组受试者环境危险因素比较

表 1 示, 痰湿壅盛组与正常对照组比较, 环境危险因素中的家族史、饮食、BMI 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而吸烟、饮酒差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 两组受试者环境危险因素比较 (例)

危险因素	分类	痰湿壅盛组 (100 例)	对照组 (100 例)	P 值
家族史	有	71	22	<0.01
	无	29	78	
吸烟	是	28	33	0.44
	否	72	67	
饮酒	是	14	9	0.27
	否	86	91	
饮食	普通清淡	30	64	<0.01
	喜咸辛辣	70	36	
BMI	<24	50	87	<0.01
	24~28	46	8	
	>28	4	5	

注: BMI, 体重指数

2.2 两组受试者 AT1R 基因多态性分布情况

本研究对 AT1R 基因 A1166 及 T573 位点进行 SNP 测序。表 2、表 3 示, T573C 位点可见 TT、TC 及 CC 基因型; A1166C 位点可见 AA、AC 基因型, 未见 CC 基因型。两组受试者 AT1R 基因 T573C、A1166C 位点不同基因型比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明群体基因遗传平衡, 数据来自同一蒙德尔群体, 具有群体代表性。AT1R 基因 T573C、A1166C 等位基因比较差异亦无统计意义 ($P > 0.05$)。

表 2 两组受试者 AT1R 基因 T573C 位点多态性分布情况

组别	例数	基因型			等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
痰湿壅盛组	100	55	38	7	148	52
对照组	100	44	44	12	132	68
P 值		0.96			0.88	

表 3 两组受试者 AT1R 基因 A1166C 位点多态性分布情况

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AC	CC	A	C
痰湿壅盛组	100	97	3	0	197	3
对照组	100	93	7	0	193	7
P 值		0.07			0.07	

2.3 AT1R 基因多态性与环境因素的交互作用对 EH 痰湿壅盛证的发病影响

选择差异有统计学意义的环境危险因素家族史、饮食、BMI 与 AT1R 基因两个位点 A1166C 及 T573C 进行交互作用研究。在交叉验证一致性均是 10/10 时, 四因素模型在测试样本准确度略高, 且具有统计学意义 ($P < 0.01$), 故选其为最佳模型。表 4 示, BMI、饮食及家族史与 AT1R 基因 T573C 位点交互作用与痰湿壅盛证形成有关, 交互危险度为 29.99。

表 4 痰湿壅盛组环境因素与 AT1R 基因交互作用

影响因子	训练样本 准确度	测试样本 准确度	交叉验证 一致性	P 值	OR (95% CI)
家族史* BMI	0.780	0.780	10/10	<0.01	16.61 (8.11, 34.02)
家族史* BMI* 饮食	0.816	0.790	10/10	<0.01	19.53 (9.55, 39.95)
BMI* 饮食* 家族史* T573C	0.845	0.825	10/10	<0.01	29.99 (13.90, 64.71)
BMI* 饮食* 家族史* T573C* A1166C	0.846	0.785	10/10	<0.01	27.56 (12.94, 58.71)

注: BMI, 体重指数

3 讨论

EH 的发病是内外环境多种因素造成的, 如 35 岁以上者年龄每增加 10 岁, 高血压病相对危险度增加 29.3% ~ 42.5%, 而 60% 的 EH 患者有高血压家族史^[1]; 每日钠盐摄入量平均增加 2 g, 舒张压及收缩压分别上升 2.0 及 1.2 mmHg^[2]; 肥胖者高血压患病率是非肥胖者的 2 ~ 6 倍, 体重每增加 10 kg, 收缩压及舒张压分别升高 2 ~ 3 mmHg 和 1 ~ 3 mmHg^[3]; 饮酒量与高血压病发病呈正相关, 日饮白酒量每增加 100 g, 高血压病发病危险率增高约 19% ~ 26%^[4]。证候是机体内外环境因素共同作用于机体的反应状态, 并随病程的进展而发生相应的变化^[5]。本研究发现, 在 EH 痰湿壅盛组与对照组之间, 家族史、饮食、BMI 差异存在统计学意义, 对 EH 证候差异的形成有关。

肾素-血管紧张素系统可通过多种途径影响血管容积、心血管重塑和体内盐、水平衡, 因而在调节血压方面起着关键作用^[6]。编码 RAS 的基因是 EH 最具可能性的易感基因。血管紧张素 II (AngII) 通过 AT1R 介导发挥其生理作用, 且 AngII 是已知内源性升压物质中作用最强的激素之一^[7]。在 AT1R 被发现与 EH 发病的相关性后, 即成为 EH 易感基因的研究热点^[8]。MDR 方法将多位点基因型和环境因素之间的基因-基因、基因-环境的交互作用转换成具有两个水平的新变量 (低危、高危), 将高维结构降低到一维, 使高阶交互作用的分析更易实现^[9]。因此, MDR 适用于多因素复杂疾病的基因-基因、基因-环境交互作用所呈现的整体涌现性, 符合中医证候的多维整体观。

本研究将 AT1R 基因两个位点 A1166C、T573C 与 EH 环境危险因素在各证候之间进行交互作用分析, 选出 EH 证候的最佳诊断模型。在研究时发现, 将所有环境因素集中与 AT1R 基因位点进行 MDR 检测时, 痰湿壅盛证的最佳诊断模型具有内外环境因素与 AT1R 基因 T573C 位点的交互, 痰湿壅盛证中 BMI、饮食及家族史与 AT1R 基因 T573C 位点具有较强的交互作用 ($P < 0.01$), 但未发现与 AT1R 基因 A1166C 位点具有交互作用。因此, 运用 MDR 方法发现 EH 证候的最佳诊断模型可行, 通过分析方法的调整, 或者引入更多的相关基因及

位点, 将有助于 EH 证候实质研究。

参考文献

- [1] HEALY F, LIN W, FENG R, et al. An association between pulmonary hypertension and impaired lung function in infants with congenital diaphragmatic hernia [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2014; 13. doi: 10.1002/ppul.23035.
- [2] ALVI FM, HASNAIN S. ACEI/D and G2350A polymorphisms in Pakistani hypertensive population of Punjab [J]. 2009, 31 (5): 471-480.
- [3] IACOVIELLO M, FORLEO C, SORRENTINO S, et al. Alpha-and beta-adrenergic receptor Polymorphism in hypertensive and normotensive offspring [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2006, 7(5): 316-321.
- [4] 王萍, 杨海燕, 王丽萍, 等. 从表观遗传学开展复杂性疾病证候本质的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(5): 1208-1210.
- [5] 刘力生. 中国高血压防治指南 2010 修订版 [J]. *中华心血管杂志*, 2011, 39(7): 576-616.
- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 73-77.
- [7] 熊友珍, 王旋. 高血压的危险因素及研究进展 [J]. *湖南环境生物职业技术学院学报*, 2008, 14(1): 7-10.
- [8] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010 [J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19(8): 701-743.
- [9] 中国肥胖问题工作组. 中国成人超重和肥胖症预防与控制指南(节录) [J]. *营养学报*, 2004, 26(1): 1-4.
- [10] 马冠生, 朱丹红, 胡小琪, 等. 中国居民饮酒行为现状 [J]. *营养学报*, 2005, 27(5): 16-19.
- [11] 董昌武, 高尔鑫. 论疾病易感基因多态性与中医证候的多样性 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(11): 2355-2356.
- [12] 廖梦阳, 程龙献, 廖玉华. 肾素-血管紧张素系统的回顾 [J]. *临床心血管病杂志*, 2012, 28(2): 83-87.
- [13] HIGUCHI S, OHTSU H, SUZUKI H, et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2007, 112(8): 417-428.
- [14] BONNARDEAUX A, DAVIES E, JEUNEMAITRE X, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension [J]. *Hypertension*, 1994, 24(1): 63-69.
- [15] 袁芳, 刘盼盼, 徐进, 等. 基因-基因(环境)交互作用分析方法的比较 [J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2012, 25(4): 115-119.

Exploration on Nature of Primary Hypertension with Dampness and Phlegm Retention Syndrome from Interaction between the AT1R Gene Locus and Environmental Factors

WU Chuanyun¹, ZHOU Xuemei¹, DONG Mei², HUANG Kaiquan², XU Hui¹, SU Yu¹, CHEN Xuegong¹, DONG Changwu¹

(1. Clinical Medical School, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui 230038; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the syndrome feature of primary hypertension with dampness and phlegm retention syndrome from the view of interaction between gene locus and environmental factors. **Methods** One hundred cases of primary hypertension with dampness and phlegm retention syndrome (the dampness and phlegm retention group) were selected. At the same time, 100 cases of physical fitness were selected as comparison (the control group). Polymerase chain reaction-ligase detection reaction genotyping techniques were adopted to examine polymorphism of A1166C and T573C locus in AT1R gene of patients in each group. Multifactor dimensionality reduction analysis was applied to analyze the effect of the interaction between environment and angiotensin II receptor1 (AT1R) gene polymorphism on the formation of primary hypertension of dampness and phlegm retention syndrome. **Results**

Among the environmental risk factors, there were statistically significant differences in family history, diet, and body mass index (BMI) between the dampness and phlegm retention group and the control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in different genotypes of A1166C and T573C locus in AT1R gene between subjects in two groups ($P > 0.05$). The interaction between BMI, diet, family history and AT1R gene T573C locus is related with the formation of dampness and phlegm retention syndrome, and the interaction risk level was 29.99 ($P < 0.01$).

Conclusion The interaction between BMI, diet, family history and AT1R gene T573C locus had important effect on the formation of primary hypertension with dampness and phlegm retention syndrome.

Keywords primary hypertension; dampness and phlegm retention syndrome; AT1R gene polymorphism; environmental factors; interaction

(收稿日期: 2015-03-11; 修回日期: 2015-06-05)

编辑: 邓 媛

欢迎订阅 2016 年《国际中医中药杂志》

《国际中医中药杂志》为中华医学会、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中华医学会系列杂志,系国内外公开发行的专业学术期刊。本刊自 2008 年起成为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。

《国际中医中药杂志》以反映国内外中医药研究最新进展,促进国内外中医药学术交流为己任,以中医药科研、临床、生产、管理工作为主要对象,介绍中医药学相关领域的新进展、新技术和新方法。本刊现主要栏目有“专题论坛”“国外传统医学”“论著”“短篇论著”“综述”,此外不定期设有“国外药政法规”栏目。报道内容涉及中医药动态、临床与实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、思路与方法、医学教育、专家经验、临证心得、综述等。

本刊为月刊,大 16 开,96 页。国内外公开发行,每期定价 12 元,全年 144 元。ISSN: 1673-4246; CN: 11-5398/R。国内邮发代号: 2-611(中国邮政集团公司北京市报刊发行局);国外发行代号: BM6563(中国国际图书贸易集团有限公司)。全国各地邮局均可订阅。可从本刊编辑部直接订阅。

地址:北京市东直门内南小街 16 号中国中医科学院中医药信息研究所,国际中医中药杂志编辑部;邮编:100700;电话:010-64089579;网址: <http://gjzy.cintcm.com.cn>;邮箱: guowaiyixue@aliyun.com;微信号: gjzyzy。