

中国协和医科大学

博士学位论文

中国北方汉族人群高血压的中间表型及基因组扫描研究

姓名：孙凯

申请学位级别：博士

专业：心血管流行病学

指导教师：顾东风

20040501

缩略语表

(Abbreviations)

缩略语	英文	中文
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	血管紧张素转换酶
ADD1	α -adducin	内收蛋白
AGT	Angiotensinogen	血管紧张素原
AngII	Angiotensin II	血管紧张素 II
AT1	Angiotensin II Receptor Type 1	血管紧张素 II 1 型受体
BMI	Body Mass Index	体重指数
BP	Blood Pressure	血压
CHD	Coronary Heart Disease	冠心病
BUN	Blood serum urea nitrogen	血清尿素氮
Cr	Creatinine	肌酐
DBP	Diastolic Blood Pressure	舒张压
EH	Essential Hypertension	原发性高血压
ENaC	Endothelial Na Channel	内皮钠通道
FCHL	Familial Combined Hyperlipidemia	家族性混合型高脂血症
FFA	Free Fatty Acid	游离脂肪酸
GLU	Glucose	血糖
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol	高密度脂蛋白
IBD	Identity By Descent	亲缘一致性
INSR	Insulin Receptor	胰岛素受体
KLK	Kallikrein	激肽释放酶
LD	Linkage Disequilibrium	连锁不平衡
LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterol	低密度脂蛋白
LPL	Lipoprotein Lipase	脂蛋白酯酶

缩略语表

(Abbreviations)

缩略语	英文	中文
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
QTD	Quantitative Transmission/Disequilibrium Test	数量性状的传递不平衡检验
RAS	Renin-Angiotensin System	肾素-血管紧张素系统
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	限制性片段长度多态性
S.A.G.E.	Statistical Analysis for Genetic Epidemiology	遗传流行病学统计分析
SBP	Systolic Blood Pressure	收缩压
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	单核苷酸多态性
SOLAR	Sequential Oligogenic Linkage Analysis Routines	寡基因连锁的序列分析程序
S-TDT	Sib Transmission/Disequilibrium Test	同胞传递不平衡检验
TC	Total Cholesterol	总胆固醇
TG	Triglyceride	甘油三酯
TDT	Transmission/Disequilibrium Test	传递不平衡检验
Ua	Uric acid	尿酸
VAPR1A	Vasopressin Receptor 1 A	血管加压素 1 型受体
VLDL	Very Low Density Lipoprotein	极低密度脂蛋白

中文摘要

高血压是最常见的心血管病，也是冠心病、脑卒中、心功能不全、肾脏疾病等最主要的危险因素。在我国高血压的患病率逐年增高，已成为重要的公共卫生问题。高血压的病因复杂，年龄、性别、体重指数，盐摄入量，精神紧张、生活方式都可以影响的血压的变化，除了这些环境因素外，遗传因素的影响在人群的血压变异中可以占到 30%—50%。但高血压的遗传变异是复杂的，除少数单基因变异导致的高血压外，绝大多数都不符合孟德尔遗传规律。

高血压的遗传学病因研究是当前医学界的热点和难点。近一二十年来，许多与高血压相关的候选基因不断地被揭示出来，全基因组扫描的结果也揭示出许多高血压的易感位点，然而大多数的研究都存在着人群或种族的差异，许多研究的结果不一致。到目前为止，还没有任何一个基因被认为肯定与高血压相关，这一切都因为高血压具有高度的遗传异质性，遗传迟滞性、易感基因外显不全等而且还受到环境因素的影响。

我们在北京石景山区心血管病防治过程中发现了一个高血压的大家系，该家系结构复杂，规模庞大，目前存活有 300 多人。这样的大家系能提供一个较为单一的遗传背景，是高血压遗传学研究的良好素材。我们对该家系进行了充分的家系分析，从该家系成员血压表型上看，没有出现很早发病或出现十分严重的高血压表现，同时不伴有其他畸形，不符合孟德尔遗传规律。但从其家系结构和规模上看，也不同于一般的高血压核心家系，可能存在着主基因效应。我们决定从高血压的中间表型入手，对该家系进行研究，如果能发现较明显的中间表型的变化，则根据提示，采用候选基因克隆的策略，如果没有明显的中间表型的变化，则采用全基因组扫描的策略，寻找与该家系可能的主基因连锁的易感位点，然后在核心家系中进行验证。

材料和方法：

高血压大家系入选：该家系系谱图中共 7 代 398 人。去除已死亡和失访者，参加本次调查的共 233 人，其中 15 岁以上为本次调查的入选者共 198 例，其中

直系亲属 126 人, 旁系亲属 72 人。高血压诊断标准: 按 1999 年 WHO 高血压诊断标准: $SBP \geq 140\text{mmHg}$ 或 $DBP \geq 90\text{mmHg}$ 或两周内服降压药者。高血压核心家系: 在距离高血压大家系居住地 100 公里的顺义区农村筛选 50 个高血压核心家系。先证者入选标准: 年龄 >15 岁; 父代至少 1 人患高血压; 子代中至少 2 人患高血压; 无继发性高血压的临床症状和生化指征, 排除急、慢性肾小球肾炎、肾盂肾炎、柯兴氏综合征或嗜铬细胞瘤; 无皮质激素使用史 (女性无雌激素使用史); 三次不同时间测量, 静息 $SBP \geq 140\text{mmHg}$ 和/或 $DBP \geq 90\text{mmHg}$ 或两周内服抗高血压药物者。所有家系经初筛并确认后开始正式调查。调查内容包括心血管疾病个人与家族史及环境因素的标准化问卷、人体指标、血压测量和血糖、血脂等生化指标测定。高血压大家系成员放免法检测血浆胰岛素浓度、血浆血管紧张素原浓度, 血浆肾素活性 血浆血管紧张素 II 浓度, 血浆醛固酮浓度。在对高血压大家系上述中间表型研究的基础上, 对高血压大家系进行了全基因组扫描 (该工作作为中德科技合作项目由德国 MDC 完成), 得到两个连锁位点 d9s1810, d12s1682, 我们在这两个位点附近增加微卫星标记的密度, 在核心家系中通过基因扫描技术进行验证。

结果:

高血压大家系中间表型研究:

(1) 将高血压大家系成员分为直系亲属高血压组 (HD), 直系亲属正常血压组 (ND), 旁系亲属高血压组 (HN) 和旁系亲属正常血压组 (NN)。

(2) 各组间高甘油三酯血症患病率没有差别, 高胆固醇血症患病率有 HN 组高于 ND 组。各组之间血浆甘油三酯浓度, 血浆胆固醇浓度和血浆高密度脂蛋白胆固醇浓度都没有差别, 经年龄、性别、吸烟、饮酒等调整后, 各组仍没有差别。

(3) 各组血糖浓度没有差别, 血浆胰岛素浓度 HD 组高于 NN 组和 ND 组, 其余各组之间没有差别。胰岛素抵抗指数 HD 高于 NN 组, 其余各组之间差别没有显著性。经年龄、性别校正后, 仍如此。

(4) 在 RAS 系统, 各组之间血浆血管紧张素原浓度、血浆血管紧张素 II 浓度、血浆肾素活性和血浆醛固酮浓度没有差别。经年龄、性别校正后, 这种趋

势没有变化。

核心家系易感位点基因组扫描研究:

(5) 参数连锁分析显示:在假定的显性或共显性模式下,9号染色体11个位点以及12号染色体10个位点都没有达到连锁所需的强度。

(6) 非参数连锁分析: S.A.GE 4.2/LODPAL 显示两个区域内21个位点同高血压之间都没有连锁关系。将血压按 SBP 和 DBP 分成收缩期高血压和舒张期高血压后,分析显示在 d12s1654 同收缩期高血压之间 LOD score = 1.048。S.A.GE4.2/SIBPAL 模块分析显示: mean test 多点分析结果显示在12号染色体 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 三个位点在不一致性同胞对(受累同胞和非受累同胞组成的同胞对)共享等位基因的频率与孟德尔分离分析期望值的差异有统计学显著性, $P=0.0296$ 、 $P=0.0096$ 、 $P=0.014$, 其余各位点频率的差别无显著性。进一步调整了同胞对间的年龄、性别和 BMI 之间的差异,分别以高血压质量性状和 SBP、DBP 数量性状进行非参数回归分析,结果显示,包括 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 三个位点在内,12号染色体 12p12.2 区域内的10个微卫星标记位点及9号染色体各位点同高血压和 SBP、DBP 之间都没有连锁关系。

(7) 传递不平衡检验:对 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 进行传递不平衡检验, TDT 检验结果没有发现三个位点与高血压性状有传递不平衡的证据。

结论:

(1) 脂代谢、糖代谢以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统诸指标都不是该高血压家系有效的中间表型。

(2) 9号染色体 9p24 区域内的11个微卫星标记位点同高血压或 SBP、DBP 之间不存在连锁关系或传递不平衡关系,基本可认为在中国北方人群中该区域内不存在高血压易感位点或基因。

(3) 虽然未证实12号染色体 12p12.2 区域内存在有与高血压或 SBP、DBP 之间有紧密连锁关系的位点,但不能完全否定该区域存在高血压的易感位点或基因,还需进一步的工作来验证。

关键词: 高血压; 中间表型; 家系; 连锁

Abstract

Background: Essential hypertension (EH) is the most prevalent cardiovascular disorder, and a major risk factor for coronary heart disease (CHD), stroke, cardiac disfunction and renal diseases. The prevalence of hypertension has been increasing worldwide and hypertension is a major public health challenge. The pathogenesis of hypertension is complicated, environmental factors such as age, gender, body mass, salt intake, stress and living style can chronically influence blood pressure. The heritability of hypertension, or the genetic contribution to blood pressure variation, ranges from 30% to 50%. Essential hypertension is one of the complex traits that do not exhibit Mendelian inheritance.

It is very important but difficult to dissect the genetic pathogenesis of hypertension. In the past decade, candidate gene studies provided substantial evidence of the involvement of variants in genes, and genome scan studies also revealed decadal genomic regions that may contribute to blood pressure variation. Tremendous differences were observed in results of candidate and genome scan approaches among different populations. Few genes have been verified to substantially account for hypertension or blood pressure variation, due to heterogeneity and complexity, in which blood pressure or hypertension is influenced by a variety of environmental factors.

An extremely large hypertension family was identified in a village from Shijingshan District of Beijing, where cardiovascular epidemiological studies of Fu Wai Hospital are based. The pedigree covers 7 generations including 398 individuals, and appears to be a unique genetic resource for hypertension genetic study. With this pedigree, we first paid special attention to intermediate phenotype of hypertension, and then applied

genome-wide scan on chromosome 9 and chromosome 12 in order to identify susceptibility genes or genomic regions of hypertension.

Subjects and Methods: The extremely large hypertension family: About 233 family members were surveyed in a genetic epidemiological investigation, one hundred ninety eight family members older than 15 years were involved. The diagnose criteria of hypertension was resting-sitting SBP $\geq$ 140 mmHg and/or DBP $\geq$ 90 mmHg on three different occasions or use of antihypertensive medication in last two weeks.

Nuclear hypertension family: A total of 50 hypertension families were recruited from Shunyi District of Beijing suburb. To be eligible for our study, a proband in each nuclear hypertensive family had to meet the following criteria: Age greater than 15 years; Either of two parents with hypertension; Two or more siblings with hypertension; No clinical and biochemical indexes of secondary hypertension; detail clinical differentiation including clinical laboratory tests on certain patients implemented to exclude patients with other known diseases such as acute or chronic glomerulonephritis and pyelonephritis, Cushing syndrome or pheochromocytoma etc; Without the use of cortisone-based medications or estroprogestinic hormones (by women); and Resting-sitting SBP $\geq$ 140 mmHg and/or DBP $\geq$ 90 mmHg on three different occasions or use of antihypertensive medication. A formal study was conducted after hypertensive families were initially screened and confirmed. Standard questionnaires were used to collect information on demographic characteristics, history of cardiovascular disease, life style factors, and family history of hypertension. Other measurements, including blood pressure, height, weight, and waist and hip circumferences, as well as electrocardiogram, were obtained. The rennin-angiotensin-aldosterone system (plasma rennin activation, plasma angiotensinogen, plasma angiotensin II, and plasma aldosterone), glucose/insulin metabolism (plasma insulin and glucose) were examined especially in extended hypertension family members. Two susceptible loci were detected in nuclear hypertension family by gene

scan.

Results:

Intermediate phenotype of hypertension in the extended family:

(1) All members were classed into 4 groups: HD means hypertensive in descent relatives; ND means normotensive in descent relatives; HN means hypertensive in non-descent relatives; NN means normotensive in non-descent relatives;

(2) For lipid metabolism: there were no significant difference in TG, TC and HDL-c among those groups. After adjusted by age, sex, BMI, smoking index and drinking index, no differences among groups were found.

(3) For glucose/insulin metabolism: there was no significant difference in GLU among those groups. In HD group, the plasma insulin level was significantly higher than that in ND group and NN group. The insulin resistance index differed significantly between HD group and NN group. The result was not changed after adjusting age and sex.

(4) For Ras system, there were no significant differences in plasma rennin activity, plasma angiotensinogen concentration, plasma angiotensin II concentration, and plasma aldosterone concentration among those groups, respectively. After adjusted by age and sex, the findings were not changed.

Gene-scan in nuclear hypertension family:

(5) Parameter model analysis revealed no linkage between hypertension and the 11 loci in chromosome 9 and 10 loci in chromosome 12 under the assumed model.

(6) Non-parameter linkage analysis: S.A.G.E 4.2/LODPAL indicated no linkage between hypertension and the 11 loci in chromosome 9 and 10 loci in chromosome 12. A weak linkage between d12s1654 and SBP was found with lod score=1.048. Using S.A.G.E4.2/SIBPAL analysis, there were significant differences for genetic makers in discordant pairs to share two alleles by IBD($P=0.0296$, $P=0.0096$ and $P=0.014$),respectively. However after adjusted by age, sex and BMI, trait_ regression

analysis showed no linkage between individual locus and hypertension, and no linkage was found between all loci and SBP and DBP in quantitative-trait analysis, either. All loci in the chromosome 9 were not in linkage with hypertension or SBP or DBP by Non-parametric analysis.

(7) Linkage-disequilibrium analysis: Transmission/Disequilibrium Test (TDT) analysis did not support a significant linkage-disequilibrium with hypertension at d12s1591, d12s1654 and d12s363.

Conclusion:

(1) Lipid metabolism, glucose/insulin metabolism, and rennin-angiotensin-aldosterone system might not be appropriate intermediate phenotype of hypertension in the extended hypertension family.

(2) There was no linkage between the 11 loci in chromosome 9 and hypertension.

(3) Preliminary clue revealed a suggestive linkage may exist between hypertension and 12p12.2 genomic region. However, replication studies in large sample are necessary to confirm this finding.

Key Words: hypertension; intermediate phenotype; extended family; linkage

前 言

高血压是最常见的心血管疾病，同时也是其它心脑血管疾病的重要危险因素之一。高血压患病率高，患病人数众多，是危害人类生命健康的重要疾病。高血压不仅是发达国家重要的公共卫生问题，也是发展中国家重要的公共卫生问题。1991 年我国第三次全国高血压抽样调查结果显示平均高血压患病率为 11.26%，较 1980 年第二次抽样调查 7.73% 的平均患病率，十年间增加了 25%。目前我国高血压患者近 1 亿 3 千万，平均每年仍以 350 万人的速度递增。相对于迅速增长的患病率，我国高血压的知晓率、治疗率和控制率都在一个较低水平，根据一项最新的亚洲国际心血管病合作研究，目前国内成人(35~74 岁)高血压的知晓率为 44.7%，治疗率为 28.2%，控制率为 8.1%，其中乡村要大大低于城市。当前，我国处于经济转型时期，城市人口增长迅速。城市人口的生活方式也有较大的改变，体力活动的减少，静坐时间的延长，体重的增加，肥胖比例的提高都进一步加大了高血压患病的危险，使高血压患病率出现了逐年增高的趋势。我国高血压患者的绝对数量巨大，每年花费巨大的医疗费用，加上因高血压而增加的冠心病、脑卒中、糖尿病、肾脏疾病和心衰患病人数，更加使得国家的医疗卫生资源不堪重负。因此高血压已成为一个不容忽视的社会问题。对高血压病因，发生机制及危险因素的研究，探索有效的预防治疗途径，减少高血压对人民生命健康的危害，是一个值得关注的问题。

高血压的病因和发病机制是一个十分复杂的问题，是困扰全世界医疗科研人员的医学难题。血压的调节涉及到人体多个系统，肾脏、神经、内分泌、血液动力学、血管反应性、物质代谢等形成一个整体共同完成对血压的调节。如此复杂的情况决定了对高血压的研究不可能由单一学科来完成，目前对高血压的研究也呈现出多学科交叉合作研究的趋势。流行病学的研究取得了较满意的成果，各种环境因素对高血压的影响，已经较为明确。生理学、生化、分子生物学、临床、动物模型都能从不同的角度研究导致高血压的病因。而一切所取得的成果都

不足以从整体上解释高血压发生的原因,因为到目前为止高血压的遗传学病因还不清楚。对高血压遗传学病因的研究是目前研究的热点,高血压遗传学研究涉及到分子生物学、流行病学、生理学、生化、临床、动物模型和信息学,是一个多学科完整的体系。高血压遗传学研究也是一个逐步提高的过程,对高血压的认识从单一基因学说逐渐发展到目前比较公认的看法,认为高血压是一种多基因参与的、遗传和环境因素相互作用引起的综合征或复杂性状疾病。

人群中个体间血压水平的变异 30%~50%可由遗传因素决定。只有极少数的高血压是由单个基因的变异而导致的,而大多数的高血压是许多微效基因共同作用的结果。对符合孟德尔遗传模式的单基因突变引起的血压失调的研究取得了令人瞩目的成果,已有 17 个致病基因被定位或克隆。

候选基因法(candidate gene)和定位克隆法(positional cloning)的遗传连锁和关联研究在不同种族和人群中相继展开,迄今为止被提出的高血压相关基因有 150 种之多。它们涉及到血压调节的方方面面:肾素-血管紧张素-醛固酮系统,交感神经系统,下丘脑-垂体轴、内皮素、利钠肽、激肽释放酶-激肽系统、类固醇激素、前列腺素、生长因子、激素、骨架蛋白、黏附分子、细胞内信使、脂质代谢、糖代谢、载脂蛋白、离子通道和转运载体等。

在过去的几年中全基因组扫描应用于高血压研究的报告逐渐增多,也取得了一定的成绩。21 个研究中揭示出的与高血压有关的位点涉及到人类全部 23 对染色体。其中 1q, 2p, 3p, 6q, 7q, 11q, 12q, 15q, 16q, 18q, 19p, 这些区域都有两个或以上的研究中发现与高血压有关系。虽然在随后的研究中都没有发现相关的基因变异,但这些研究无疑丰富了高血压的研究成果,给高血压的研究带来令人鼓舞的线索和提示。

高血压的中间表型研究发现:某些中间表型可能比血压更好地显示其遗传方式,前瞻性研究也发现这些中间表型对高血压有很好的预测性。依赖符合孟德尔遗传规律的特殊中间表型,人们成功定位和克隆了一些导致血压失调的突变基因,如主要包括糖皮质激素可治疗性醛固酮增多症(GRA)、Liddle 综合征(假性醛固酮增多症)、盐皮质激素过多症和 Bilginturan 综合征等。

虽然高血压的研究取得了一些成绩,但这还是远远不能令人满意的,人们也

清醒的看到除单基因型高血压外,所有报道的与高血压有关的基因或位点都存在着不一致的报道,还没有一个基因或基因变异被肯定是高血压的致病基因。这跟高血压具有高度的遗传异质性、遗传迟滞性、易感基因外显不全等特点有关。为了克服这些困难,必须扩大研究对象的样本数量或寻找更有效的研究方法和人群。

本研究在既往的工作中发现了一个高血压的大家系,该家系遗传背景单一,患病人数众多,结构复杂,是进行遗传学研究的良好素材。从结构、规模和患病情况进行家系分析,我们怀疑不同于一般高血压核心家系,该大家系可能存在着高血压致病的主基因效应。我们对该家系进行了较为详细的高血压中间表型的研究,希望通过中间表型的研究揭示出该家系致病主基因的线索,以确定基因研究的方向。中间表型的研究涉及到脂代谢,糖代谢,血浆血管紧张素原浓度,血浆肾素活性,血浆血管紧张素 II 浓度,血浆醛固酮浓度。研究结果发现该家系中直系亲属患高血压者除了较血压正常者有更严重一些的胰岛素抵抗外,其余各项中间表型的指标在各组都没有差别。在这样的结果下,我们决定对该家系进行全基因组扫描,以寻找易感位点。鉴于实验条件和资金的限制,全基因组扫描工作没有在国内完成,而是作为中国和德国政府间的科技合作项目,由本实验室公茂莲博士和德国科学家在德国 MDC 共同完成。实验结果反馈回来,全基因组扫描结果显示其中 9 号染色体连锁区域为 9 号短臂 9p24,峰值在 d9s1810,多点连锁分析 lod score 为 1.58。而 12 号染色体连锁区域为 12 号短臂 12p12.2,峰值在 d12s1682,多点连锁分析 lod score 为 2.85。在此基础上,又在该大家系生活的及附近的村子里又收集了 32 个核心家系,对该两个区域扫描后进行连锁分析,结果显示 d9s1810 lod score 未见增加,而 d12s1682 lod score 增至 3.44,呈现出较强的连锁关系。

然而该结果是否在中国北方人群高血压的遗传信息上具有普遍意义,或者仅仅是该高血压大家系所特有,我们无法得出明确的结果。为了验证以上研究结果我们又在距离该家系居住的石景山区有 100 公里左右的顺义地区的农村收集了 50 个高血压的核心家系,增加了微卫星标记的密度,对上述两个区域进行研究,目的有两个,一是验证上述研究结果是否在我国北方人群中具有普遍意义,二是通

过增加微卫星标记的密度,使两个微卫星标记之间的遗传距离小余 2cM,提高研究效率,达到精细定位的目的。

从对上述核心家系进行易感位点精细扫描的结果分析结果中,基本可排除在 9 号染色体 9p24 区域内有与高血压存在紧密连锁的易感位点。同时等位基因共享的亲缘一致性(IBD)分析显示 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 存在共享等位基因频率的差异。我们无法明确验证在 12 号染色体 12p12.2 区域内有与高血压存在紧密连锁的易感位点,对该区域下一个明确的结论,为时尚早。

第一部分 高血压中间表型的研究

背 景

原发性高血压是一种复杂性状疾病，其临床表现和病因个体差异很大。从人们认识到高血压对人的健康有危害至今，已经一百余年，对其病因的研究也伴随着走过了一百余年的道路。既往大量的流行病学研究揭示出了高血压的环境致病因子，如吸烟、饮食、精神紧张等等。也认识到遗传因素在高血压的发病中起到很大的作用，但对其遗传性病因所知甚少。高血压和许多严重的心脑血管疾病如脑卒中、冠心病相关并且是它们的重要危险因素和发病基础，对高血压病因的研究是打开其他心脑血管疾病病因大门的钥匙。高血压是一种具有高度遗传异质性的复杂性状疾病，是由诸多环境因素和遗传因素共同作用而导致的。其家庭聚集性明显，遗传度大约 30—50%，在不同人群差异明显。这种高度的遗传异质性导致对高血压病因研究的困难，将具有不同遗传背景的家庭放在一起研究，会导致研究效率的下降，因而难以得到阳性的结果。解决这个问题的关键，可以从以下三个方面着手：①在大家系中进行研究，因为大家系成员有共同的遗传背景，混杂因素少，前提是家系结构足够大，人员足够多，能提供足够的信息。②在相对隔离的人群中收集高血压核心家系进行研究，相对封闭、隔离的人群，往往有共同的祖先，由于人群流动性小，同外界接触少，婚配的选择性小，外来基因的引入较少，遗传背景单一。③对高血压核心家系按照其按照高血压的某一中间表型进一步分层，将高血压家系分为更细的亚组，得到遗传背景较一致的家系进行研究。

我们在心血管病防治工作中发现了一个高血压的大家系，该家系结构复杂，人口众多，能提供足够的遗传信息。我们对该家系进行了高血压中间表型的研究，为该家系高血压易感基因研究寻找线索。

为该家系高血压易感基因研究寻找线索。

材料与方法

一、研究对象：本次研究所确立的高血压大家系，为稳定居住在北京石景山区的农民家庭。该家系的先证者在 1978 年我院对石景山区农民进行高血压抽样调查时发现，后经 20 余年的随访，其家庭结构基本摸清。其中于 1994 年对该家系进行了一次体检，搜集了部分病人。本次研究于 1999 年底对该家系进行了较为全面的普查，绘制了完整系谱。共 7 代约 398 人进入系谱图（图 1-1），现存活 4 代，年龄在 15 岁以上的家系成员 198 人作为研究对象。高血压诊断标准：按 1999 年 WHO 高血压诊断标准： $SBP \geq 140\text{mmHg}$ 或 $DBP \geq 90$ 或两周内服降压药者。

二、研究内容

（一）流行病学问卷调查：

问卷设计参照世界卫生组织推荐的标准化心血管流行病学调查问卷和国家“863”课题“高血压人类遗传资源收集”标准问卷设计。内容涉及被调查对象的一般情况如年龄、性别、职业、劳动强度、受教育程度，家庭收入情况等；生活习惯如吸烟、饮酒、近年来的饮食状况、食盐摄入量调查，参加体育活动的情况；心血管病、糖尿病、脑卒中、高脂血症和肾脏病的家族史。

（二）体格检查：

人体测量包括身高、体重、腰围、臀围；血压、心率、心肺听诊、心电图及心脏超声。

（三）实验室检查：

血、尿常规，血清 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- ，血浆总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、甘油三酯（TG）、血糖、尿糖、尿酸（UA）、肌酐（CR）、血浆肾素活性、血浆血管紧张素原浓度、血浆血管紧张素 II 浓度、血浆醛固酮浓度、血浆胰岛素浓度。

三、研究方法

- (一) 问卷调查：问卷调查为调查员面对面直接询问被调查对象并填写调查表，调查过程中不能存在诱导性提问，对于不能自己回答问题的老年对象由其直系亲属（如子女）代为回答。

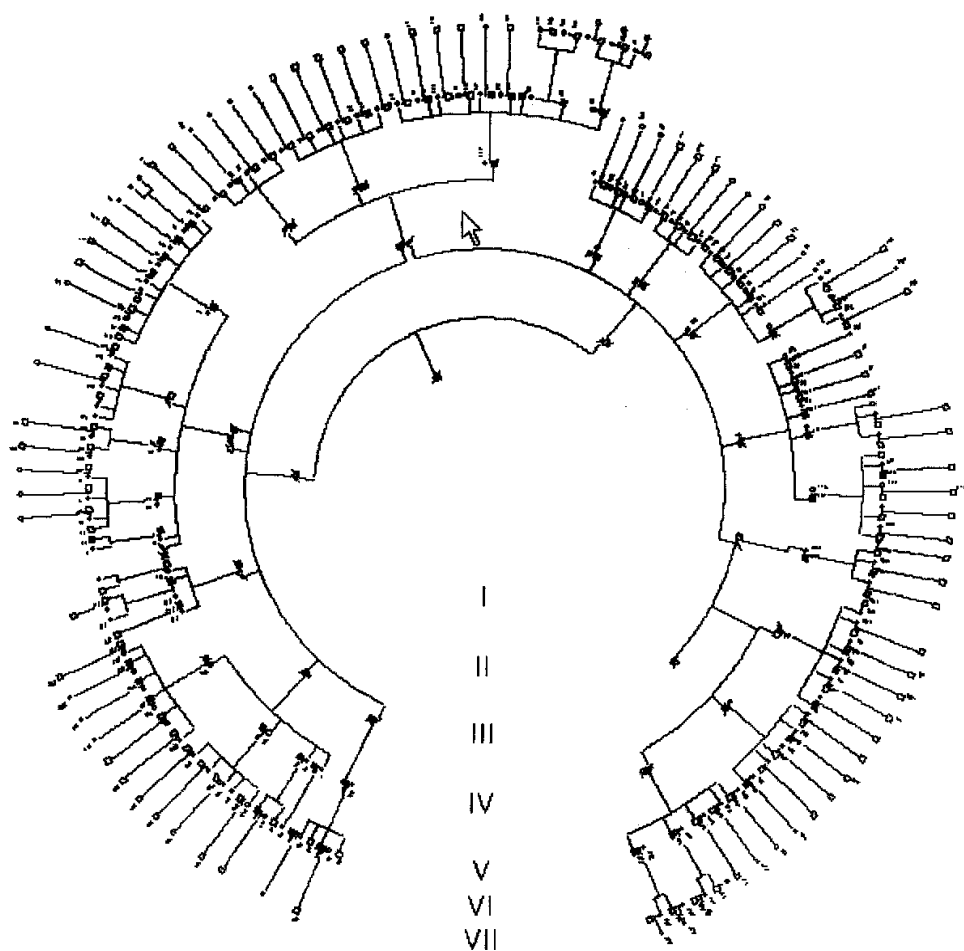


图 1-1 高血压大家系系谱图

(二) 体格检查:

- 1、 血压测量: 要求被调查对象在血压测量前 30 分钟内无吸烟、饮酒、喝咖啡等, 无剧烈体育活动。排空膀胱静坐休息 5 分钟后, 用标准水银血压计测右上臂肱动脉血压 3 次, 每次间隔 2 分钟。以 Korotkoff 第一音记录收缩压, Korotkoff 第五音(消失音)记录舒张压, 缺乏此音者按 Korotkoff 第四音记录。取 3 次测量平均值为被调查者血压值。
- 2、 心电图: 标准 12 导联心电图
- 3、 心脏超声: 惠普 Sonos 5500 彩色多普勒超声机。

(三) 实验室检查

- 1、 静脉血采取: 分别用无抗凝和经 EDTA、枸橼酸钠和肝素抗凝的真空采血管采取受检者空腹 12 小时静脉血, 2 小时内分离血浆, 供生化检测用, 对于不能及时测定的血浆, -70°C 深低温保存。
- 2、 生化指标测定: 以日立 7050 型全自动生化分析仪测定。酶法测定血清空腹血糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、磷酸钨沉淀法测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。
- 3、 血管紧张素原测定: 放免法测定。
- 4、 血浆肾素活性测定: 同上。
- 5、 血管紧张素 II 测定: 同上。
- 6、 血浆醛固酮浓度测定: 同上。
- 7、 血浆胰岛素测定: 同上。

(四) 重要变量定义

- 1、直系亲属: 指与先证者有血缘关系的该家系家庭成员, 如先证者兄弟、姐妹。
- 2、旁系亲属: 指与先证者无血缘关系的该家系家庭成员, 如先证者配偶。
- 3、高血压患者: 按 1999 年 WHO 高血压诊断标准: $\text{SBP} \geq 140\text{mmHg}$ 或 $\text{DBP} \geq 90$ 或两周内服降压药者。

4、血压正常者：按 1999 年 WHO 高血压诊断标准：SBP<140mmHg 和 DBP<90 和两周内未服降压药者。

5、吸烟定义：

吸烟：直至调查前一个月内，每天吸烟 ≥ 1 支（或相等数量的烟叶）且时间 ≥ 1 年

不吸：从未吸烟或从未连续在 1 年以上时间里每天吸烟 ≥ 1 支（或相等数量的烟叶）

过去吸：符合吸烟的定义者，但在最近一年内戒烟未吸。

6、饮酒定义：

饮酒：直至调查前 1 年内，规律饮酒，且每周至少饮一次，包括啤酒、白酒、黄酒。

不饮：从不饮酒或从未在超过一年时间里每周饮酒超过 1 次。

过去饮：符合饮酒的定义者，但在最近一年内未饮。

（五）质控措施：

参加调查的调查员皆为有多年心血管病预防工作经验的临床医师或技师，于调查开始前 2 周内对调查员进行培训，熟悉本次调查的内容、相关变量定义和临床检查项目，考核合格者方能参加工作。血压测量培训按世界卫生组织推荐血压测量录像带进行。对于血压值处于临界状态的调查对象，在本次调查后 3—6 个月进行随访，多次测量血压，以确定准确血压值。所有调查和实验室检查在阜外医院统一进行，放免实验结果为两次测量取平均值。对于有特殊原因不能到阜外医院接受调查的家系成员，由课题组统一派遣调查员到其家中进行问卷和采血。

（六）伦理学证据：

请本院相关领域专家 3—6 位组成伦理委员会，监督本次调查的伦理合法性。请所有参加研究的调查对象阅读知情同意书，同意并签字。对于无法阅读知情同意书的调查对象，有其直系亲属解释后，经其本人同意，由其亲属代签。知情同意书经调查对象、研究者和证人（当地村领导或乡村医师）三方签字后妥善保存。

(七) 数据录入:

以 Foxpro 6.0 编制数据库, 所有数据由专人连续两遍录入并核对作为最后分析数据。

(八) 统计分析:

所有数据分析由 SPSS10.0 完成。计量数据以 $\text{mean} \pm \text{sd}$ 表示, 对于不符合正态分布的数据, 取自然对数转换成正态数据后进行统计分析。以 Student t 检验进行两组间均数的比较, 多组间均数的比较以单因素方差完成, 多组间均数比较有显著差别的数据, 以 Bonferroni 法进行组与组之间均数的比较。以卡方分析进行两组或多组间构成比的比较。

结 果

一、高血压大家系基本结构:

该高血压大家系结构图见:图 1—1, 进入系谱图的共 7 代 398 人。去除已死亡和失访者, 参加本次调查的共 233 人, 其中 15 岁以上为本次调查的入选者共 198 例, 其中直系亲属 126 人, 旁系亲属 72 人。该家系可分为两个大的家族, 两家族在第三代通过一对姨表亲近亲结婚连接。目前家系中最大存活代数 5 代(第五代均年幼未入选)。为研究方便, 我们现以目前存活的最高一代为第一代(系谱图中的第三代)。

二、该家系高血压患病情况

表 1—1 大家系直系亲属血压均值(同北京市民血压均值比较^{\$})

性别	大家系		北京市	
	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)
男	132.4*	85.1*	126.1	77.6
女	126.1	78.9*	122.1	74.2

\$: 为 1991 年全国高血压抽样调查北京市民平均血压值

*: 同北京市民平均血压值比较有显著差别

表 1—2 大家系直系亲属高血压患病率(同北京市患病率比较^{\$})

性别	大家系	北京市	P
男	42.37%	21.45%	<0.01
女	26.87%	19.86%	<0.01
平均	34.12%	20.58%	<0.01

\$: 为 1991 年全国高血压抽样调查北京市民高血压分性别患病率

该家系直系亲属中, 男性家庭成员平均收缩压为 132.4mmHg, 舒张压为 85.1mmHg, 对比 1991 年全国高血压抽样调查时北京市民的血压状况, 男性收缩压和舒张压均值分别为 126.1mmHg 和 77.6mmHg, 两组相比都有显著差别。而女性家庭成员平均收缩压和舒张压分别为 126.1mmHg 和 78.9mmHg, 相对应北京市民该值分别为 122.1mmHg 和 74.2mmHg。舒张压两组有显著差别, 收缩压差别也在临界值附近 ($P=0.057$)。该家系男性家庭成员高血压患病率为 42.37%, 女性为 26.87%, 平均患病率为 34.12%, 对比于北京市民高血压患病率皆有显著差别。由以上结果可知, 该家系成员成年人平均血压较普通北京市民高, 其中达到高血压诊断标准的比例也远较普通北京市民高, 即高血压患者在该家系中有明显的聚集。加之该家系结构庞大, 人员众多, 进行遗传学研究时, 可以将大家系拆分为 10 个核心家系, 每个核心家系约有 20 人, 能够提供足够的信息, 因而是研究高血压遗传病因的良好的材料。

三、该家系成员血清电解质水平

表 1—3 高血压大家系家庭成员血清电解质

	HD	ND	HN	NN
K ⁺ (mmol/L)	4.24±0.429	4.30±0.387	4.32±0.424	4.15±0.410
Na ⁺ (mmol/L)	142.35±4.25	141.86±3.72	142.55±3.48	141.81±4.36
Cl ⁻ (mmol/L)	104.60±3.73	104.70±3.41	105.08±2.74	104.79±3.50

HD: 该家系直系亲属中患高血压者(Hypertensive in Descent Relatives);

ND: 该家系直系亲属中非高血压者(Normotensive in Descent Relatives);

HN: 该家系旁系亲属中患高血压者(Hypertensive in Non-descent Relatives);

NN: 该家系旁系亲属中非高血压者(Normotensive in Non-descent Relatives);

如表 1—3 所示各组血电解质都在同一范围内波动, 各组之间没有明显差别, 家系成员个体中血钾最低为 3.22mmol/L, 最高为 5.30mmol/L, 基本都在成年人血钾正常参考值范围以内。以上结果结合病史及其他临床检验结果, 可排除常见继发性高血压的可能, 可以诊断为原发性高血压。

四、血 BUN, Cr, Ua 与高血压

本研究检测了各组血清 BUN、Cr 和 UA，结果见表 1—4。其中血 BUN 旁系高血压组稍高，但各组差异没有显著性，考虑到年龄、性别对 BUN 的影响，我们对各组年龄和性别做了调整后，旁系正常血压组血浆 BUN 稍高于其他组，但差异仍不显著。血 Cr 值在旁系高血压组最高，旁系正常血压组最低。经年龄、性别调整后，旁系高血压组最高，直系高血压组最低，但两组之间的差别仍不显著。血 UA 值，在旁系高血压组最高，直系正常血压组最低，经年龄和性别调整后，这种趋势不变，各组之间的差别不显著。绝大多数个体，其 BUN、Cr 和 UA 值都在正常参考值范围之内，对于个别超出正常参考值范围之外的个体，结合其血压及尿蛋白等其他检查，也可排除有病理性肾功能损害。

表 1—4 高血压大家系家庭成员各组血清尿素氮、肌酐、尿酸对比

	HD	ND	HN	NN
BUN				
	4.926±0.934	4.903±1.012	5.232±1.196	5.093±1.111
	4.796±0.161	5.016±0.121	5.019±0.232	5.114±0.145
Cr				
	82.800±13.600	80.270±13.660	87.070±14.040	80.230±14.740
	80.843±1.930	81.475±1.458	84.583±2.790	81.046±1.741
Ua				
	225.950±79.900	204.140±79.960	232.590±86.280	218.690±68.130
	220.629±10.704	204.606±8.137	230.310±15.468	223.614±9.653

以上各项数据以 mean±sd 表示，每项第二排为校正年龄、性别后数据，以 mean±se 表示。

五、高血压与血脂

表 1—5 高脂血症者在各组中所占比例

	HD	ND	HN	NN
TG	39.5%(16/26)	37.3%(31/52)	50%(11/11)	48%(24/26)
TC	30.2%(13/30)	13.9%(14/69)	45%(10/12)*	24%(12/38)

*: 同 ND 组比较有显著差别

以血浆 TG>1.70mmol/L 诊断为高 TG 血症, 以血浆 TC>5.68mmol/L 诊断为高 TC 血症, 各组中高 TG 血症和高 TC 血症的比例如表 1—5 所示。

表 1—6 高血压大家系家庭成员各组血脂对比

	HD	ND	HN	NN
TG(mmol/L)				
	1.857±1.242	1.422±0.846	1.976±1.048	1.730±1.105
	1.593±0.154	1.611±0.118	1.757±0.223	1.746±0.136
TC(mmol/L)				
	5.037±0.979	4.755±0.869	5.504±0.968*	4.988±0.979
	4.858±0.141	4.930±0.106	5.180±0.203	4.997±0.127
HDL-c(mmol/L)				
	1.171±0.264	1.249±0.306	1.220±0.295	1.225±0.206
	1.190±0.042	1.237±0.032	1.244±0.061	1.217±0.038

*: 同 ND 组比较, 有显著差别; P<0.05

为探讨该家系高血压是否与血脂代谢异常有关, 我们检测了该家系成员的血脂浓度, 包括甘油三酯(TG), 血清总胆固醇(TC), 和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c), 其基本情况如表 1—6。由于血清 TG 水平呈正偏态分布, 故对其值作正态性转换, 因血清 TG 浓度实测值较小, 直接取对数后许多数值为负, 均数在 0 附

近,所以对所有个体作血清 TG 浓度乘以 10 倍后取自然对数处理,各组间大小趋势不变。TG 和 TC 在该家系的患高血压的两组中略高于血压正常者,而旁系高血压组又略高于直系高血压组, TG 在各组差别很小,没有显著性,旁系高血压组 TC 水平显著高于直系正常血压组,其它各组间没有差别。经过年龄和性别的调整后,旁系的两组 TG 水平都高于直系亲属,但差别没有显著性,旁系高血压组同直系正常血压组之间 TC 水平的差别减小,差别不再有显著性。HDL-c 在该家系直系高血压组的均值为 1.171 mmol/L,略低于其他三组,但各组差别没有显著性。经年龄、性别调整后,依然是直系高血压组略低于其他三组,差别无显著性。

六、 血压与胰岛素抵抗

表 1—7 高血压大家系家庭成员各组血糖及胰岛素对比

	HD	ND	HN	NN
Glu				
	5.940±1.843	5.377±0.813	6.113±1.456	5.422±0.620
	5.616±0.234	5.607±0.254	5.495±0.338	5.416±0.211
Ln(Ins)	2.765±0.518*§	2.505±0.531	2.644±0.534	2.355±0.397
	2.784±0.082*§	2.487±0.064	2.677±0.121	2.353±0.074
Ln(IR)	1.328±0.475*	1.082±0.518	1.227±0.478	0.905±0.401
	1.321±0.101*	1.089±0.061	1.208±0.147	0.902±0.072

*: 同 NN 组比较有显著差别;

§: 同 ND 组比较有显著差别;

该家系四组人群空腹血糖结果见表 1—7,旁系高血压组最高,直系高血压组次之,但各组之间的差别很小,无显著性。经过年龄和性别的调整后,直系亲属的两组空腹血糖平均水平略高于旁系亲属的两组,但各组之间的差别仍然较小,

差别无显著性。在排除各组可能存在的糖尿病患者 (FPG>7.0) 后, 以上结果基本无变化, 各组之间的空腹血糖无显著差别。血浆胰岛素水平在直系高血压组最高 (18.088mmol/L), 旁系高血压组次之 (16.008mmol/L), 直系正常血压组的水平为 14.260mmol/L, 最低的是旁系正常血压组 (11.392mmol/L)。因为血浆胰岛素水平为正偏态分布, 所以对其进行自然对数的转换, 转换后分布转为正态分布, 方差分析显示直系高血压组血浆胰岛素水平显著高于旁系正常血压组 ($P=0.001$), 和直系正常血压组血浆胰岛素水平比较结果差别也较大 ($P=0.05$), 其余各组之间差别无显著性。经过年龄和性别的校正后, 结果同上述结果一致, 直系高血压组血浆胰岛素水平仍显著高于旁系正常血压组 ($P=0.001$), 和直系正常血压组血浆胰岛素水平比较, 结果差异的显著性进一步加大 ($P=0.045$), 其余各组之间无显著差异。以胰岛素抵抗指数作为反映个体胰岛素抵抗状况强度的指标, 因为胰岛素抵抗指数为正偏态分布, 为使分布转为正态分布, 故对其进行自然对数的转换, 然后进行均数间的比较。方差分析显示, 患有高血压的两组 $\text{Ln}(\text{IR})$ 水平较血压正常的两组 $\text{Ln}(\text{IR})$ 水平高, 但只有直系高血压组 $\text{Ln}(\text{IR})$ 水平显著高于旁系正常血压组, 其余各组之间差别无显著性。

七、高血压与 RAS

表 1-8 高血压大家系家庭成员各组 RAS 各指标对比

	HD	ND	HN	NN
AGT				
	120.449±42.050	117.900±36.376	126.208±35.394	114.077±31.800
	119.918±7.240	117.541±4.190	126.562±10.576	114.856±5.199
PRA				
	1.929±1.225	2.174±1.458	1.315±1.017	2.174±1.511
	2.004±0.283	2.064±0.165	1.615±0.414	2.241±0.208
Ang II				
	99.496±61.797	99.267±58.488	110.031±76.137	92.751±56.297
	101.818±12.141	96.929±7.059	117.253±17.748	93.447±8.802

直系高血压组血浆血管紧张素原浓度低于旁系高血压组, 而高于直系正常血压组和旁系正常血压组, 但差别较小, 无显著性。经过年龄和性别的调整后, 这

种趋势依然存在, 各组血浆血管紧张素原浓度无显著差别。血浆肾素活性在正常血压的两组较高, 而在旁系高血压组最低, 但差别不显著。经年龄性别调整后, 直系高血压组血浆肾素活性仍然低于两组血压正常者, 而高于旁系高血压组, 差别同样较小, 无显著性。血浆血管紧张素 II 浓度的检测结果同血浆肾素活性刚好相反, 在高血压的两组浓度较高一些, 正常血压组的浓度较低, 同样的各组血浆血管紧张素 II 浓度的差别也很小, 无显著性。经年龄和性别调整后, 结果同调整前一致。

八、高血压与醛固酮

表 1-9 高血压大家系家庭成员各组血浆醛固酮比较

	HD	ND	HN	NN
Ald				
	0.132±0.060	0.162±0.075	0.131±0.085	0.175±0.093
	0.138±0.016	0.159±0.009	0.142±0.023	0.174±0.011
PRA/Ald				
	19.394±17.635	16.285±14.443	16.601±19.594	15.233±13.834
	19.402±3.118	15.717±1.773	17.896±4.458	15.849±2.242

血浆醛固酮浓度在高血压的两组均值比较接近, 都低于正常血压的两组, 但差别没有显著性, 经过年龄和性别的调整后, 直系高血压组血浆醛固酮浓度最低, 旁系正常血压组最高, 差别无显著性。血浆肾素活性同血浆醛固酮浓度的比值, 在直系高血压组最高, 各组之间无显著差异。

讨 论

高血压是一种具有高度遗传异质性的复杂性状疾病。血压的升高是一个缓慢连续的积累过程，这个过程同时也是机体对血压调节失代偿的过程。持续的高血压，会对血管、肾脏等靶器官造成损伤，所以同时高血压又是心脑血管疾病最普遍也可能是最重要的危险因素，几乎所有重要的心脑血管病包括冠心病、脑卒中糖尿病、周围动脉疾病、肾脏疾病和心衰等同高血压都有关联。这一切决定了我们在心脑血管疾病的研究中无法忽视或避开高血压，对高血压的研究是心脑血管病研究的基础并可能成为一个重要的突破点。

我们在北京石景山区心血管病预防工作中发现了一个具有明显高血压聚集的大家系。该家系结构复杂，人员众多，相对于高血压的核心家系来说，该家系可以提供相对单一的遗传背景，这一点对于具有高度遗传异质性的 hypertension 来说，是非常难得的。为我们进行高血压研究提供了良好的素材。

在充分分析该家系的结构和血压特点后，我们决定从高血压的中间表型入手，对该高血压大家系进行了脂代谢、胰岛素抵抗、血浆肾素活性等等高血压中间表型的研究。所谓高血压中间表型，是指可能跟高血压有关的一些生理特征或生化指标，这些生理特征或生化指标能反映高血压发展早期或中期病理生理变化。Jan A Staessen 认为遗传上的变异导致血压升高的过程中，有多种生理或生化的改变，这些变化是相互影响并能检测到的。他认为多个微效基因变异的联合作用可能导致机体的蛋白、亚细胞的中间表型变化，蛋白、亚细胞的改变又可能导致细胞或组织中间表型的变化，这些不同层次的改变在环境因素的共同作用下最终导致血压的失调¹。一些中间表型目前还难以与血压调节之间建立病因上的关联，仅仅表现为跟血压失调现象的相关。早期对中间表型的研究，多数学者将其看作是一种伴随现象而未予以足够重视。近年来研究发现，许多中间表型符合孟德尔遗传规律，比血压更显著的表现出主基因效应。借助于中间表型的遗传规律，成功的定位出十几个与血压调节相关的基因和位点²⁻¹³。虽然这些单基因遗传的

疾病在人群中占的比例较小，不能解释大的人群的血压变化，但它们的成功无疑丰富了高血压病因的研究，对未来的研究起到了重要的提示作用。

对该高血压大家系中间表型研究，目的是希望通过借助于对中间表型的分析，寻找该家系是否有符合孟德尔遗传规律的主基因的线索，并确定对该家系进行进一步研究的策略。

血脂与高血压：

血脂代谢异常主要是指血清中甘油三酯和总胆固醇以及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)的浓度升高，而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)浓度降低。血脂代谢异常是动脉粥样硬化的主要危险因素之一，其和高血压的关系密切。有研究报道，血清中甘油三酯和胆固醇的水平与高血压相关¹⁴⁻¹⁶。并且适当地降压干预，同时可以降低血清中的胆固醇和甘油三酯的浓度，进而减少心脑血管事件的发生¹⁷。血 LDL-c 水平升高和 HDL-c 水平降低被认为导致胆固醇的运输和代谢的紊乱，直接影响细胞间和细胞外信号传导，并对血小板、内皮细胞和平滑肌细胞造成潜在的损伤，因而是心血管病的重要危险因素。LDL-c 和 HDL-c 水平同血压水平的直接关系的报道较少。但作为血脂代谢异常的一部分，和高血压有明显的聚集关系。

有文献报道，在西方人群中约有15%的人同时患有高血压和脂代谢异常¹⁸。家族混合性高脂血症(Familial Combined Hyperlipidemia FCHL)是遗传性脂代谢紊乱中最普遍的形式，其在人群中的患病率约为0.5%—1%¹⁹⁻²⁰。在一般高血压家系的成年人中，也有约12%成员同时患有脂代谢异常²¹，我们通常将上述情况称为家族性脂代谢紊乱高血压(Familial Dyslipidemic Hypertension FDH)，其在高血压或脂代谢紊乱的家系中都占有一定的比例。

近年来遗传学研究也揭示出在一些人群中高血压和脂代谢紊乱可能存在着共同的遗传学基础。比如脂蛋白酯酶(lipoprotein lipase, LPL)基因突变可能同时跟脂代谢异常，高血压和动脉粥样硬化有关系。LPL是参与血浆脂蛋白代谢的关键酶，可将极低密度脂蛋白(VLDL)和乳糜微粒(CM)中的甘油三酯水解为游离脂肪酸(FFA)。人体内LPL绝大多数分布在毛细血管内皮上，只有很少的一些分布在动脉内皮上。正是这些分布在动脉内皮上少量的LPL，可能导致动脉内皮局部粥样硬化的形成²²。LPL基因突变可以改变VLDL或CM在体内的正常代谢，从而进一步

步引起体内其它物质如胰岛素、去甲肾上腺素、细胞内钠、钙浓度的改变而最终导致血压水平改变²³。在中国南方人群中多发现LPL基因旁侧区域的一些多态标记与高血压或血压性状连锁²³⁻²⁵，顾东风课题组在一个大样本的研究中，将中国人群分为南北两个亚组，得到了一致的研究结果²⁶。

本研究检测了该家系成员的血清TC、TG和HDL-c的浓度，目的是阐明该家系是否同时伴有血脂代谢紊乱，能否以血脂代谢异常作为该家系的中间表型进行研究。研究结果表明直系亲属和旁系亲属，TG水平相差不多，没有显著差异，高血压患者同正常血压者之间也基本在同一个水平。而血清HDL-c水平在该家系直系高血压亲属组水平略低于其它三组，但差别也不是很大，没有达到统计学的显著性。TC水平，旁系高血压组明显高于直系正常血压组。

在人群研究中，血脂的变化受到生活环境的影响很大，特别是饮食习惯的不同，对血清血脂水平影响很大。食物中饱和脂肪酸和醛固酮含量的高低和血清中TC水平显著相关，血清TG水平同食物中碳水化合物特别是双糖或单糖的含量有关。本研究的对象为同一家系的成员，生活环境近似，饮食习惯差别不大，可排除环境造成的血脂水平的差异。考虑到年龄、性别对血脂造成的影响，对各组年龄、性别进行了调整，调整后各组间血清TG、HDL-c水平差别仍没有显著性。旁系高血压组和直系正常血压组之间的差别减少，没有显著性。

血脂水平除了受到年龄、性别的影响外，肥胖，吸烟、饮酒等也对血脂的影响很大，我们对体重指数，吸烟指数，饮酒指数做出调整后，各组血脂水平虽有变化，但各组之间仍没有显著差别。

我们将1.7mmol/L作为血清TG水平的正常值高限，高于该值的诊断为高甘油三脂血症，将5.68mmol/L作为血清TC水平的正常值高限，高于该值的诊断为高胆固醇血症，各组间高甘油三脂的患者所占的比例都较高，但各组构成比之间没有显著差异。高胆固醇血症的构成比，旁系高血压组显著高于其它三组。

该家系血清TG浓度，处在一个较高的水平，未进行年龄和性别的校正前，除直系正常血压组外，其它三组平均TG水平皆高于正常值的高限1.7mmol/L，调整年龄和性别后，旁系的两组TG水平仍在正常值高限以上。

可以看出，该家系较高的血脂水平，源于生活习惯的可能性较大，因为无论

直系还是旁系成员,都有较高水平的血脂升高,且无论是否患有高血压,旁系成员的血脂水平还都略高于直系成员,说明在相似的生活条件下,脂代谢紊乱在该家系没有特异性。脂代谢异常不是该家系有效的中间表型。

胰岛素与血脂

高血压患者常表现有胰岛素抵抗,而且具有高血压家族史的正常血压的子女也常有此现象²⁷⁻²⁹,血浆胰岛素水平跟高血压呈正相关³⁶。自1988年Reavea首次提出胰岛素抵抗综合征(X综合征),并提出胰岛素抵抗与高血压具相关性后,胰岛素抵抗与高血压的关系一直人们研究的热点。虽然高血压是胰岛素抵抗综合征的一个组成部分,但有研究发现,胰岛素抵抗在高血压发生的早期已经存在²⁷,动物实验结果也支持这一点,给予大鼠持续性稳速静脉输入胰岛素,诱发高胰岛素血症,引起大鼠的血压增高³⁴。胰岛素抵抗在高血压的形成中可能起一个重要作用。来自一项流行病学调查报告³⁰,在高血压患者中胰岛素抵抗发生率为58.0%,当高血压患者同时合并有葡萄糖耐量减低(IGT)或2型糖尿病、血脂异常时,其胰岛素抵抗发生率达95.2%,高血压发生胰岛素抵抗的几率明显高于普通人群。

在不同种族中,有关胰岛素抵抗和高血压的关系的研究结果各不一致,在白人和印第安人中二者有较明确的相关性,而在黑人中,二者之间无相关或表现为弱相关³¹。Osei等在三个不同种族的人群中研究胰岛素敏感性与动态血压之间的关系,发现来自加纳的移民、美籍非洲人与白人相比胰岛素敏感指数显著降低,夜间动态血压下降幅度明显减小^{32,33}。另外,高胰岛素血症和高血压存在着共同的终点性疾病,两者同时存在时加重动脉壁的增厚、僵硬,动脉硬化的形成,发生心血管疾病和脑卒中的危险性明显增高³⁵。另一方面,改善胰岛素敏感性可能使血压水平降低,一些增加或改变胰岛素敏感性的药物,如二甲双胍、曲格列酮,在提高胰岛素敏感性的同时,可以使血压下降,支持胰岛素对血压的影响³⁷⁻³⁹。

但高胰岛素血症和胰岛素抵抗通过何种途径影响血压调节的机制目前仍不清楚。人们一般认为①高胰岛素血症导致交感神经兴奋,心输出量增加,血管收缩;②促进肾小管对钠的重吸收;③影响细胞膜内外离子转运,阳离子向细胞内转移,引起小动脉平滑肌对血管加压物质的反应提高,血管收缩;④血管平滑肌肥大,管腔增厚、僵硬;⑤血管扩张功能减低。

胰岛素要发挥其生理作用，必须先与靶细胞上特异的受体结合。胰岛素受体是细胞质膜中的一种糖蛋白。胰岛素与其受体结合后，激活酪氨酸激酶，经一系列生物学作用，从而激活靶细胞内一些介导胰岛素发挥作用的酶，如糖原合成酶去磷酸化后激活。因此胰岛素信号传导通路中任何一个环节发生故障，都会引起胰岛素抵抗，使血压升高。

近来有报道胰岛素受体(INSR)基因突变跟高血压相关。另外，Barroso 报道 PPAR γ 基因的一个常染色体隐性的突变，会导致严重的胰岛素抵抗，糖尿病和高血压⁴⁰。这一些研究结果提示，胰岛素抵抗可以作为高血压研究的一个有效的中间表型。

我们对大家系的研究发现该家系四组人群空腹血糖各组之间的差别很小，无显著性。各组中患糖尿病的比例也没有差别。但血浆胰岛素水平在直系高血压组显著高于旁系正常血压组及直系正常血压组去除掉年龄和性别的影响后，这种结果仍然存在。我们以胰岛素抵抗指数作为反映个体胰岛素抵抗状况强度的指标，方差分析显示，直系高血压组 Ln(IR) 水平显著高于旁系正常血压组，其余各组之间差别无显著性。以上结果提示，该家系的高血压患者相对于血压正常者存在着一定程度胰岛素抵抗，这和许多研究的结果相一致。相比于该家系成员的配偶中的高血压患者，这种胰岛素抵抗的程度并不严重。这说明胰岛素抵抗对该家系中高血压患者血压的升高起到了一定的作用，但该作用并不强烈，不足以使该家系成员的血压值出现明显升高，这样的促进作用在与该家系无关的其他高血压患者中可能也存在。我们猜测，如果该家系存在着与胰岛素抵抗相关的一种或多种基因的变异，那么这些变异所导致的表型的改变只对血压的升高起到一定的促进作用而不是主要作用。

高血压与肾素—血管紧张素—醛固酮系统(RAAS)

人体对血压的调节涉及到许多系统，是一个完整而周密的整体，其中肾脏系统因涉及的水钠的重吸收，是调节血压最直接系统，因水钠调节失调而导致的血压升高过去有肾源性高血压学说(renal theory)，肾素—血管紧张素—醛固酮系统是肾脏调节血压的最重要的环节。

肾脏重吸收钠离子，绝大部分通过 Na^+/K^+ 交换、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$

共转运来完成,只有约 2%的钠离子通过位于髓质集合小管(cortical collecting tubule CCT)的上皮钠通道(epithelial Na^+ channel ENaC)重吸收。而这 2%却是维持体内钠平衡的最重要的环节。EnaC 的活性受到肾素-血管紧张素-醛固酮系统的高度调节。当肾缺血或滤液中钠离子浓度降低,会导致球旁细胞分泌肾素增加,血管紧张素原在肾素作用下形成血管紧张素 I (Ang I)而后者经过肺、肾等组织时在血管紧张素转化酶(ACE, 又称激肽酶 II)的活化作用下形成 Ang II, Ang II 再经酶作用脱去天门冬氨酸转化成 AngIII。在 RAA 系统中 Ang II 是最重要的成分,有强烈的收缩血管作用,其加压作用约为肾上腺素的 10~40 倍,而且可刺激肾上腺皮质球带分泌醛固酮,醛固酮同盐皮质激素受体结合,增加 EnaC 的活性,促进钠离子的重吸收,促使水钠潴留从而使血压升高。它还可反馈性地抑制肾脏分泌肾素。RAA 系统功能失调时高血压就会产生,然而,在高血压患者中,血浆肾素水平增高者仅是少数,近年来发现组织中包括血管壁、心脏、中枢神经、肾皮质髓质中亦有肾素-血管紧张素系统,它们可能在正常肾素和低肾素高压的发病以及高血压时对靶器官的损害起着重要的作用。

肾素-血管紧张素-醛固酮系统的每一个环节出现错误,都可能导致血压调节的失调,因而出现血压的升高或降低。RAA 系统是目前高血压研究最关注的热点,其与高血压关系的研究不胜枚举。同其他候选基因一样编码 RAA 系统各组成产物的基因变异根高血压的关系也存在着人群及种族的差异,结果不一致。但令人感兴趣的是一些研究除发现某些基因的变异或多态跟高血压有关外,还发现一些高血压中间表型的改变。一些研究中报道 AGT 基因多态同血清中血管紧张素原的浓度有关,这种浓度的变化从人群的水平上同血压有关系,较高的血清血管紧张素原的浓度同较高的人群血压水平相关⁴¹⁻⁴⁴。研究还发现无论是血清中还是尿中醛固酮的水平,具有 AGT-6A 突变者较 AGT-6G 者都要高一些⁴⁵。也可以见到 ACE 基因 DD 型跟血管紧张素 II 的活性有关的报道⁴⁶。虽然没有肾素基因的变异影响血浆肾素活性的报道,但许多单基因突变引起血压剧烈变化的综合征中,血浆肾素活性的降低都是重要的表型。反过来,我们通过检测血浆肾素活性、血浆血管紧张素原的浓度或血浆醛固酮等的浓度就可以提示:是否有 RAA 系统的基因突变影响到该家系的血压变化。

在所检测的 RAA 系统的各项指标中，我们没有发现在不同血压组有显著的差别。提示该家系不存在 RAA 系统的变异，或 RAA 系统的基因的变异对这些高血压中间表型的影响较小，不足以在各组产生明显的差别，其对血压的影响也可能只在“微效”的范围内。

小 结

在我们选择的高血压中间表型：脂代谢，胰岛素抵抗，肾素—血管紧张素—醛固酮系统的各项指标方面，在该家系直系亲属患高血压的成员与家系其他成员比较差异都无显著性。以上的各项指标可能不是该家系成员高血压的特殊中间表型。不排除编码以上各指标的基因可能也存在变异，但这些基因不是该家系高血压的主基因，对该家系成员血压的影响只产生“微效”影响。

参考文献

1. Jan A Staessen, Jiguang Wang, Giuseppe Bianchi, Willem H Birkenhäger. Essential hypertension. *Lancet* 2003; 361:1629-41
2. Lifton, R.P., Dluhy, R.G., Powers, M., Rich, G.M., Cook, S., Ulick, S., and Lalouel, J.M. (1992a). A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355:262-265
3. Lifton, R.P., Dluhy, R.G., Powers, M., Rich, G.M., Gutkin, M., Fallo, F., Gill, J.R., Jr., Feld, L., Ganguly, A., Laidlaw, J.C., et al. (1992b). Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat. Genet.* 2, 66-74
4. Mune, T., Rogerson, F.M., Nikkila, H., Agarwal, A.K., and White, P.C. (1995). Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat. Genet.* 10:394-399.
5. Hurley, D.M., Accili, D., Stratakis, C.A., Karl, M., Vamvakopoulos, N., Rorer, E., Constantine, K., Taylor, S.I., and Chrousos, G.P. (1991). Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J. Clin. Invest.* 87, 680-686
6. Geller, D.S., Farhi, A., Pinkerton, N., Fradley, M., Moritz, M., Spitzer, A., Meinke, G., Tsai, F.T., Sigler, P.B., and Lifton, R.P. (2000). Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289, 119-123
7. Geller, D.S., Rodriguez-Soriano, J., Vallo Boado, A., Schifter, S., Bayer, M., Chang, S.S., and Lifton, R.P. (1998). Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat. Genet.* 19, 279-281
8. Hansson, J.H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B., and Lifton, R.P. (1995a). Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.* 11, 76-82.

9. Hansson, J.H., Schild, L., Lu, Y., Wilson, T.A., Gautschi, I., Shimkets, R., Nelson-Williams, C., Rossier, B.C., and Lifton, R.P. (1995b). A *aggredanovo* missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1495–1499.
10. Schuster, H., Wienker, T.E., Bähring, S., Bilginturan, N., Toka, H.R., Neitzel, H., Jeschke, E., Toka, O., Gilbert, D., Lowe, A., et al. (1996a). Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat. Genet.* 13, 98–100.
11. Bähring, S., Nagai, T., Toka, H.R., Nitz, I., Toka, O., Aydin, A., Muhl, A., Wienker, T.E., Schuster, H., and Luft, F.C. (1997). Deletion at 12p in a Japanese child with brachydactyly overlaps the assigned locus of brachydactyly with hypertension in a Turkish family. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 732–735.
12. Mansfield, T.A., Simon, D.B., Farfel, Z., Bia, M., Tucci, J.R., Lebel, M., Gutkin, M., Vialettes, B., Christofilis, M.A., Kauppinen-Makelin, R., et al. (1997). Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31–42 and 17p11–q21. *Nat. Genet.* 16, 202–205.
13. Disse-Nicodeme, S., Achard, J.M., Desitter, I., Houot, A.M., Fournier, A., Corvol, P., and Jeunemaitre, X. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 302–310.
14. Laurenzi M, Mancini M, Menotti A, et al. Multiple risk factors in hypertension: Results from the Gubbio study. *J Hypertens.* 1990;8(suppl 1): s7-s12.
15. Eric T.P. Keulen, Christine Voors-Pette, Tjerk W.A. et al. Familial Dyslipidemic Hypertension Syndrome: Familial combined Hyperlipidemia, and the Role of Abdominal Fat Mass. *AJH* 2001; 14:357–363
16. Criqui MH, Barret-Connor, Holdbrook MJ et al. Clustering of cardiovascular disease risk actors. *Prev Med*, 1980;9: 525–533.
17. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, et al. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation

- on patients with essential hypertension. *N Eng J Med*. 1990;323:22-27.
18. Eaton CB, Feldman HA, Assaf AR et al. Prevalence of hypertension, dyslipidemia, and dyslipidemic hypertension. *J Fam Pract*. 1994 Jan;38(1):17-23.
 19. Nikkila EA, Aro A: Family study of serum lipids and apolipoproteins in coronary artery disease. *Lancet* 1973;78:954–959.
 20. Castro Cabezas M, Bruin de TWA, Erkelens DW: Familial combined hyperlipidemia: 1973–1991. *Netherlands J Med* 1992;40:83–95.
 21. Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, et al: Familial dyslipidemic hypertension. Evidence from 58 Utah families for a syndrome present in approximately 12% of patients with essential hypertension. *JAMA* 1988;259:3579–3586.
 22. Pentikainen MO, Lksjoki R, Oorni K, et al. Lipoprotein lipase in the arterial wall-linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22:211-217.
 23. Pan WH, Chen YC, Yu SL, et al. Correlates and predictive models for blood pressure values in residents of two communities in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1994;93:582-591.
 24. Wu DA, Bu XD, Warden CH, et al. Quantitative trait locus mapping of human blood pressure to a genetic region at or near the lipoprotein lipase gene locus on chromosome 8p22. *J Clin Invest* 1996, 97:2111-2118.
 25. Ma YQ, Thomas GN, Critchley J A.J.H, et al. Association of the D8S282 marker near the lipoprotein lipase gene locus with systolic blood pressure in healthy Chinese subjects. *J Hypertens* 2002;20:2199-2204.
 26. Yang WJ, Huang JF, Yao CL et al. Evidence for linkage and association of the markers near the LPL gene with hypertension in Chinese families. *J Med Genet*. 2003 May;40(5):e57.
 27. Falkner B, Hulman S, Tannenbaum J, et al. Insulin resistance and blood pressure in young black men. *Hypertension*, 1990, 16: 706-711.
 28. Ferrari P, Siccoli MM, Fontana MJ, et al. Abnormalities in insulin sensitivity, vascular resistance and erythrocyte cation transport are independent genetic traits in familial hypertension. *Blood Press*, 1999, 8: 102-109.

29. Grandi AM, Gaudio G, et al. Hyperinsulinemia, family history of hypertension, and essential hypertension. *Am J Hypertens*, 1996, 9 :732-738.
30. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, et al. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders. The Bruneck study. *Diabetes*, 1998, 47 (10) :1643-1649
31. Saad MF, Lillioja S, Nyomba BL, et al. Racial difference in the relation between blood pressure and insulin resistance. *N Engl J Med*, 1991, 324 (11) :733-739
32. Osei K, Schuster DP. Effects of race and ethnicity on insulin sensitivity, blood pressure, and heart rate in 3 ethnic populations: comparative studies in African-Americans, African immigrants, and white-Americans using ambulatory blood pressure monitoring. *Am J Hypertens*, 1996, 9 (12 pt) :1157-1164
33. Osei K. Insulin resistance and systemic hypertension. *Am J Cardiol*, 1999, 84 (1A) :34-36
34. Brands MW, Hall JE, Keen HL. Is insulin resistance linked to hypertension? Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 1998, 25 (1) :70-76
35. Zavaroni I, Bonini L, Gasparini P, et al. Hyperinsulinemia in a normal population as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension, and coronary heart disease: the Barilla factory revisited. *Metabolism*, 1999, 48 (8) :989-994
36. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, et al. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*, 1987, 317 (6) :350
37. Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, et al. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL249653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 1999, 48 :1448-1453.
38. Ogihara T, Rakugi H, Ikegami H, et al. Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *Am J Hypertens*, 1995, 8 :316-320.
39. Tack CJ, Ong MK, Lutterman JA, et al. Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone. *Diabetologia*, 1998, 41 :569-576.
40. Barroso, I., Gurnell, M., Crowley, V.E., Agostini, M., Schwabe, J.W., Soos, M.A., Maslen, G.L., Williams, T.D., Lewis, H., Schafer, A.J., et al. (1999). Dominant negative mutations in

- human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402, 880–883.
41. Pratt JH, Ambrosius WT, Tewksbury DA, Wagner MA, Zhou L, Hanna MP. Serum angiotensinogen concentration in relation to gonadal hormones, body size, and genotype in growing young people. *Hypertension* 1998;32:875–879.
42. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71:169–180.
43. Cooper R, Rotimi C, Ogunbiyi O, Ward R. Angiotensinogen genotype, serum level and hypertension in blacks [abstract]. *Am J Hypertens* 1997;10:33A.
44. Lalouel JM, Rohrwasser A, Terreros D, Morgan T, Ward K. Angiotensinogen in essential hypertension: from genetics to nephrology. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:606–615.
45. Fardella C, Zamorano P, Mosso L, Gomez L, Pinto M, Soto J et al. A(-6)G variant of angiotensinogen gene and aldosterone levels in hypertensives. *Hypertension* 1999;34(Pt 2):779–781.
46. Henskens LH, Spiering W, Stoffers HE, et al. Effects of ACE I/D and AT1R-A1166C polymorphisms on blood pressure in a healthy normotensive primary care population: first results of the Hippocrates study. *J Hypertens* 2003;21:81–86.

第二部分 高血压核心家系 9 号、12 号染色体上微卫星多态与高血压关系的连锁分析

背 景

原发性高血压是导致心脑血管疾病发病和死亡的重要的危险因素。我国高血压患病率近年也有很大升高，因心脑血管死亡或致残的比例也在逐年上升。以往的研究来看，遗传因素对血压的调节影响很大，但具体哪些遗传因素导致高血压的发生还不清楚。

本课题组公茂莲博士对高血压大家系直系亲属94人进行了全基因组扫描，全基因组387个微卫星标记选自Genethon 连锁图谱，平均杂合度为0.8。

多点连锁分析结果显示，在12号染色体短臂D12S1682位点得到LOD score为2.82，提示有连锁存在，为了进一步验证所得到的结果，我们又在该家系居住地附近收集了32个高血压核心家系，两组家系混合后，参数连锁分析显示LOD score升到3.44（如图2-1）。

该结果强烈提示在该区域可能存在着高血压的致病或易感基因。并且该区域同土耳其发现的一个单基因高血压位点的重合非常好（如图2-2），该土耳其家系成员表现为严重的高血压同时伴有短指畸形这一特殊的中间表型，而我们所调查的中国高血压大家系的成员不伴有这一畸形。该实验结果表明在12号染色体短臂D12S1682位点附近可能存在着高血压的易感基因。

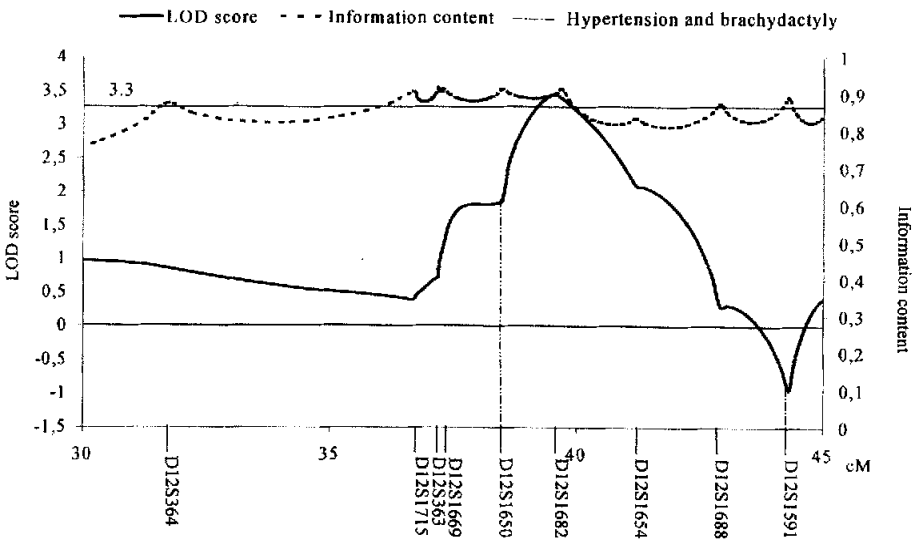


图 2-1 多点连锁分析结果

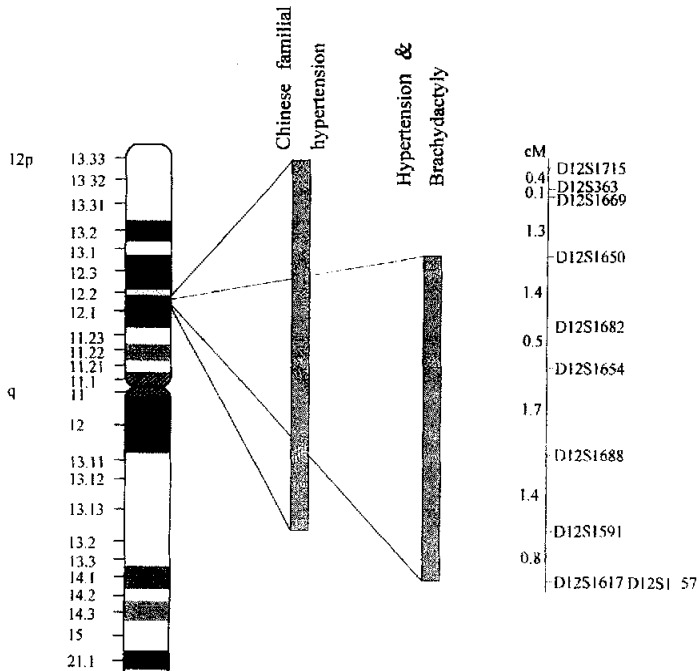


图 2-2 中国家系高血压易感位点同土耳其高血压伴短指家系易感位点重合

材料与方法

一. 研究对象:

本次研究所纳入的高血压核心家系, 为居住在北京顺义区李桥镇的汉族农民家庭。该区距离北京石景山区(本研究第一部分高血压大家系来源地)约 100 公里, 本地农民居住稳定, 流动性小。核心家系家庭结构同高血压大家系的分支核心家系结构类似。结构示意图见图 2-3, 图 2-4。共收集家系 50 个 272 人作为研究对象。高血压诊断标准: 按 1999 年 WHO 高血压诊断标准。核心家系中先证者必须满足以下条件: (1)年龄大于 15 岁; (2)父母一方患病; (3)两个或两个以上同胞患病; (4)无继发性高血压, 如甲亢或急、慢性肾小球肾炎、肾盂肾炎、柯兴氏综合征以及嗜铬细胞瘤引起的高血压; (5)无服用皮质激素史 (女性无雌激素使用史); (6)三次非同日测量, 静息收缩压(SBP) $\geq 140\text{mmHg}$ 和/或舒张压(DBP) $\geq 90\text{mmHg}$ 或长期服用抗高血压药物者。

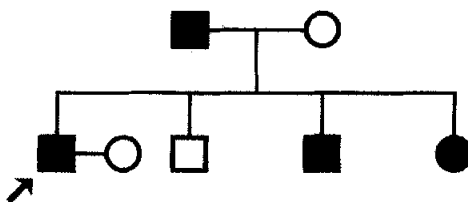


图 2-3 两代高血压家系示意图

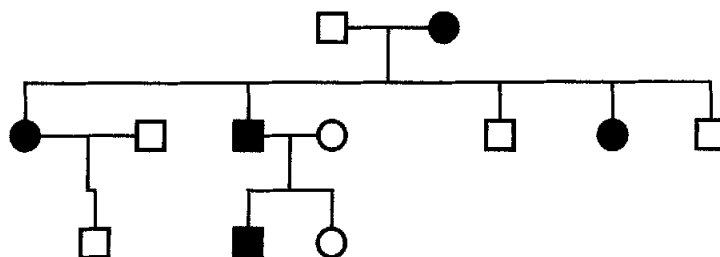


图 2-4 三代人高血压家系示意图

二. 调查内容:

(一) 遗传流行病学问卷调查:

使用高血压大家系病例收集时使用的调查问卷: 内容涉及被调查对象的一般情况如年龄、性别、职业、劳动强度、受教育程度, 家庭收入情况等; 生活习惯如吸烟、饮酒、近年来的饮食状况、参加体育活动的情况; 心血管病、糖尿病、脑卒中、高脂血症的家族史。问卷调查为调查员面对面直接询问被调查对象并填写调查表, 对于不能自己回答问题的老年对象由其直系亲属(如子女)代为回答。

(二) 体格检查:

人体测量包括身高、体重、腰围、臀围; 血压、心率、心肺听诊、心电图及心脏超声。标准同第一部分

(三) 实验室检查:

血、尿常规, 血清 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- , 血浆总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、甘油三酯(TG)、血糖、尿糖、尿酸(UA)、肌酐(CR)。测量方法同第一部分。

(四) 质控措施:

参加调查的调查员部分为参加过高血压大家系病例收集的医务人员, 有

多年心血管病预防工作经验,于调查开始前2周内对新、老调查员统一进行培训,熟悉本次调查的内容、相关变量定义和临床检查项目,考核合格者方能参加工作。血压测量培训按世界卫生组织推荐血压测量录像带进行。对于血压值处于临界状态的调查对象,在本次调查后3—6个月进行随访,多次测量血压,以确定准确血压值。

(五) 伦理学证据:同第一部分。

(六) 数据录入:同第一部分。

三、实验方法

(一) 酚-氯仿法提取外周血基因组 DNA

1. 0.5ml 2% EDTA (pH=7.4) 5ml 全血, 1800 rpm 离心 10 分钟。
2. 吸弃上清血浆, 将血倒入 50ml 离心管中, 加入 5 倍体积的无菌双蒸水 25ml, 混匀。
3. 室温下静置 5~10 分钟, 1800rpm 离心 20 分钟。
4. 弃上清, 加入 10ml 生理盐水, 2500rpm 离心 10 分钟。
5. 倒弃上清, 重复 4 步。
6. 倒弃上清, 加入 2ml 生理盐水。
7. 加 3×MLB 1ml 至 2ml 标本中, 混匀, 置 37℃ 水浴过夜。
8. 加入 3ml Tris 饱和酚, 轻轻振摇, 充分混匀。7000rpm 离心 5 分钟。
9. 转移上层水相至另一 15ml 离心管中。
10. 加等体积 Tris 饱和酚, 重复 8、9 步。
11. 加等体积氯仿: 异戊醇(24: 1), 按 8、9 步抽提。
12. 转移上层水相, 重复 11 步。
13. 将上清转移至一 15ml 离心管中, 加 1/10 体积的 3M 乙酸钠(pH=5.2)混匀后, 再加 2.5 倍体积的冷无水乙醇混匀, 放-20℃ 1hr。
14. 7000rpm 离心 5 分钟。
15. 倒弃上清, 沉淀加入 70%乙醇 0.5ml。
16. 8000rpm 离心 10 分钟。
17. 倒弃上清后, 沉淀(DNA)用 100 或 150 μ l TE 溶解, 移入 0.5ml 离心管,

置于 4℃ 保存。

(二) DNA 的鉴定和定量

1. 取溶解后的 DNA 溶液 1ul, 加蒸馏水到 100 ul, 以蒸馏水为空白对照, 在紫外分光光度计上测定 OD260、OD280 和 OD230。

2. DNA 的鉴定: $OD260/OD280 > 1.7$, $OD280/OD230 > 2.0$, 说明 DNA 纯度合格, 否则需要重新提取。

3. DNA 的定量: $DNA \text{ 浓度} (ug/ul) = OD260 \times 5$ 。

(三) DNA 的贮存:

提取后的 DNA 均溶解于 TE 溶液中。每一个样品都贮存在 1.5ml Eppendorf 管中, 上面注明样品姓名、编号等资料。每管所加 TE 量应根据管中提取的 DNA 量来确定。根据每管 DNA 的浓度, 取少 DNA 溶液加蒸馏水至 100ul, 稀释浓度为 10ng/ul, 表明工作液, 贮存于 -4℃, 实验时取用。其余 DNA 样品分装后长期保存于 -70℃。

(四) 基因组扫描:

1. 创建 Matrix 文件:

在 ABI 377 测序仪进行基因组扫描时, 测序仪会收集样品的荧光信息形成“胶图”供分析使用, 为了减少胶图的本底值, 在基因组扫描工作进行前, 需要先做一个 Matrix 文件来减少不同荧光物质之间可能的相互干扰。在使用一台新的测序仪, 或进行一项新的 Genescan 工作时, 生成一个新的 Matrix 文件是必须的, 因为不同厂家或不同批次的荧光标记, 在荧光的波长或光谱特性上可能稍有差别, 另外不同浓度和组成的聚丙烯酰胺凝胶也会对荧光的分析产生影响, 所以需要用新的 Matrix 文件来进行校正。

不同的荧光组合需要用不同的荧光物质来完成 Matrix 文件制备。本研究中所使用的引物标记的是蓝 (FAM)、黄 (HEX) 和绿 (TET) 三色荧光物质, DNA 标准分型片段 (Size Standard) 采用的是 Genescan-TAMRA350, 所有制备 Matrix 文件选用 6-FAM、HEX、TET、TAMRA 四种标准荧光物质 (Matrix standard)。

将四种标准荧光物质各 1.8ul 分别与 1.0ul 的上样缓冲液混合, 混匀并离心后 95℃ 变性 5 分钟, 然后加样。每一个泳道加一种颜色荧光标记的样品。加样完毕

后,在ABI 377 测序仪上使用4.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳2.5 小时(选用恒压3000V)。电泳结束后,对收集到的信号进行分析,形成 Matrix 文件,存盘备用。以后每次电泳时,调用该 Matrix 文件进行校正。

创建 Matrix 的示意图见图 2—5:

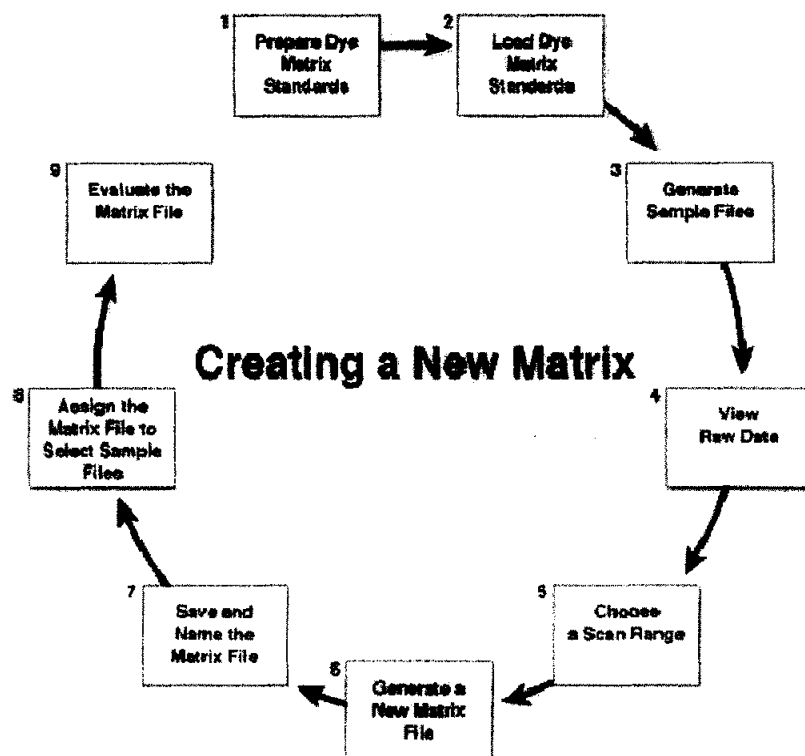


图 2—5 Matrix 文件创建的示意图

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1)、正式电泳前先要铺制 4.5%浓度的聚丙烯酰胺凝胶,每次电泳后用软布蘸洗洁精仔细清洗测序专用无荧光硅化玻璃板,尤其应将扫描区洗干净,晾干,备用。

(2)、取 25ml 4.5%聚丙烯酰胺溶液倒入一个干净小烧杯中,加入 TEMED 溶液 15ul, 10%APS 溶液 125ul, 摇匀,用注射器吸取丙烯酰胺,应避免出现气泡,尤其是扫描区内。

(3)、将玻璃板装入 377 测序仪。上下电泳槽分别加入 700ml 1×TBE 电泳

液, 预电泳 15~20 分钟, 待胶的温度上升至至少 42℃ 以上才可以加样(使用专用的测序仪上样的八道加样器), 之后进行正式电泳。电泳的参数设置值如下:

电压: 3000V 电流: 60mA

功率: 200W 激光功率: 40 mW

由于反应用的四种荧光物质是 FAM、HEX、NED、TAMRA, 因此电泳时 Module 应选为 D, 即 Plate Check D, GS PR36D-2400, GS Run 36D-2400, 所用梳子为鲨鱼梳, 电泳收集时间为 2~2.5 小时。

加样前要先对上样液进行变性处理: 取 1.8ul 上样缓冲液, 加 1.0ul PCR 产物, 混匀, 95℃ 变性 5 分钟, 使 DNA 双链充分解开。变性后立即将样品浸于冰盒中准备加样或置 -20℃ 冰箱保存, 以使 PCR 产物始终保持在低温状态, 避免复性。加样过程中样品也应浸于冰盒中。

加样时取 1~1.5ul 体积经过变性的上样液, 用八道加样器缓慢加到各泳道。一般先加一半样品, 电泳 2 分钟后再加另外一半, 这样可以避免泳道混淆不清, 有利于数据处理。

3. 数据的收集分析

启动与测序仪连用的计算机系统(Macintosh 操作系统), 可以自动监测电泳过程, 将电泳过程以胶图(如图 2-6)的形式记录下来, 并直观地将每一产物的产量及分子量大小用曲线峰谱表示出来, 使用相应的软件系统可将电泳检测到的数据进行处理。Genescan 软件可以对电泳检测到的数据进行分析。PCR 产物片段的大小是通过分子量内标确定的。信息核实无误后, 即可将其转入 Genotyper 软件进行基因分型。每一样品基因型可以用 1, 2, 3... 或 PCR 片断长度大小标记。产生两种类型的基因型, 即纯合子或杂合子(如图 2-7, 2-8 所示)。

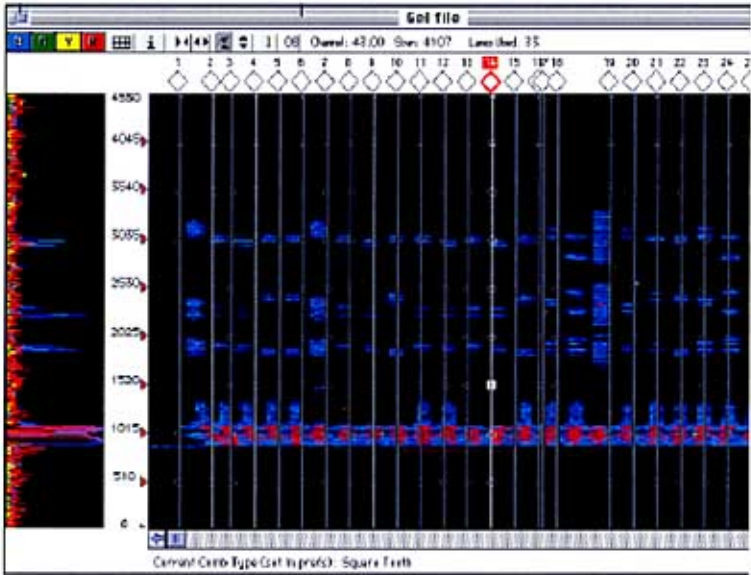


图 2-6 荧光电泳胶图

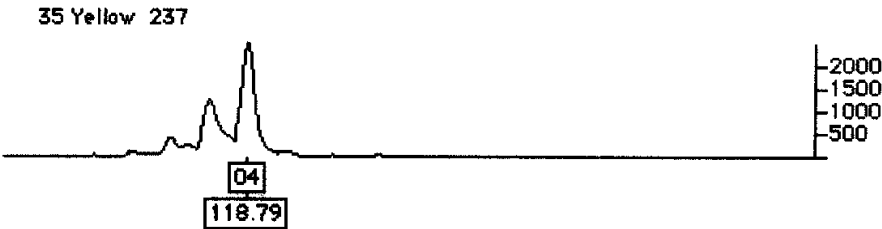


图 2-7 纯合子示意图



图 2-8 杂合子示意图

4. 微卫星多态标记的选择:

根据 GenBank 数据库中公布的 Genethon 微卫星标记, 在 D9S1768 和 D12S1769 号染色体位点附近, 在 9 号和 12 号染色体上分别又选择了 10 个和 11 个微卫星标记位点 (表 2-1)。相比于 CHLC 微卫星标记数据库中每两个标记之间的平均遗传距离为 12cM, 以 4 核苷酸重复序列 (tetra) 的标记为主, 1996 年公布的 Genethon 微卫星标记数据库覆盖整个人类基因组, 每两个标记之间的距离为 0.7cM, 由 2 核苷酸重复序列 (di) 组成, 更适合于基因组的精细扫描。

表 2-1 9 号 12 号染色体上微卫星多态标记

染色体	位点	类型	杂合度	间距	片断范围
9 号	D9S1779	di	63	0.1	124-144
	D9S1813	di	83	8.3	226-264
	D9S1871	di	68	8.8	143-173
	D9S288	di	84	8.8	124-140
	D9S1810	di	77	10.4	202-214
	D9S1686	di	58	12.52	120-140
	D9S1852	di	64	13.62	214-226
	D9S281	di	66	13.62	188-212
	D9S1849	di	82	14.52	219-247
	D9S230	di	81	14.78	251-281
	D9S286	di	87	16.82	139-165
12 号	D12S358	di	77	26.23	238-270
	D12S364	di	61	30.60	299-315
	D12S1715	di	59	35.52	234-256
	D12S363	di	61	36.06	205-215
	D12S1669	di	81	36.06	93-117
	D12S1682	di	77	38.50	123-161
	D12S1654	di	60	41.55	183-189

D12S1688	di	79	42.10	237-253
D12S1591	di	82	43.38	252-300
D12S1617	di	80	44.03	243-261

5. 引物的合成:

确定以上微卫星多态标记后, 由 <http://www.gdb.org/>, 获得 PCR 反应所需的引物序列, 每条正链引物 5' 端分别用蓝 (FAM)、黄 (HEX) 和绿 (TET) 三色荧光物质标记 (表 2)。由上海生物技术工程有限公司合成。由荧光标记的引物所引导的 PCR 反应产物亦带有荧光, 可以被荧光测序仪所识别, 并通过微卫星荧光标记-基因扫描及分型技术, 将产物的片断大小及基因型以不同的峰型表示出来, 由识别软件来识别。

表 2-2. 9 号 12 号染色体上微卫星多态标记的引物序列

位点	荧光	引物序列(5'-3')
D9S1779	FAM	Left=CCCTGCCAGGTGTGCATCTG Right=TCAGGCTCCCTCGTGGCTCT
D9S1813	TET	Left=GGGCCTGGCACTTAATAC Right=AATGGCCTAAATAAACCTGG
D9S1871	TET	Left=ACTATTGTTGGAGGCAGG Right=TTAACTTTTGGGGACAGAA
D9S288	TET	Left=AGCAACCTCAACAGGG Right=AATCATCCAGAAAGGCCA
D9S1810	TET	Left=CTGACAGCAGAGCATCC Right=CAAGCAAACTTTTATTGTGA
D9S1686	HEX	Left=AAATGCGTAATAGCAGAGATCAG Right=TTTAGGGTTGTTGGCATAGA
D9S1852	FAM	Left=GAATCACACATACACCCAC Right=GAAACATCTCTTTTACAAGTAACATT
D9S281	HEX	Left=CCTGGGAGGCTGAAGT Right=CATAGGTTATTGATTAGTTTATAGGC
D9S1849	HEX	Left=ACTTGAGCATCTGTGCATTTTG Right=GAGAAITTAACACCGAAATCACACTG
D9S286	FAM	Left=TGGAGTGCCTCATAC Right=CCACCACCTACATGGC

D9S230	TET	Left=GCTGACAGCAGAGCATCC Right=GCAAGCAAACTTTTATTGTGA
D12S1715	FAM	Left=ACATTGTGTTGGTCGCT Right=GCAGGCAGATTGACT
D12S363	FAM	Left=GAGGGGTGGCATCTCT Right=CTCAAATGAAATCAGCATAAA
D12S1669	HEX	Left=GTTCGCGCTTCAGCCTG Right=GCTTCCAAATCAGCGGTAGT
D12S1682	FAM	Left=GGGACAAGAGTGAGACTTGG Right=CCTTTATTGAAGTAAACTGTGAAGC
D12S1654	FAM	Left=AGCTCATTTTACCTTGGAA Right=GCGAGTGATTATGTCTTT
D12S1688	FAM	Left=GCACAGTTAAGGATAGAGATGCC Right=AAITTTGATTGTCCCACCTTGTC
D12S1591	FAM	Left=GCGCTTTGTACTATGTTACATTT Right=GAAGACGTTGGGTGAATC
D12S1617	FAM	Left=AGCCTGAGGGGCCACAT Right=TGGGCAACTTGGATAAGAAACA
D12S364	TET	Left=CCAGTCCTGAACAGGC Right=CCCTGGAAGTCCCATC
D12S358	HEX	Left=GCCTTTGGGAAACTTTGG Right=GCACAGATGAGATCCCGT

6. 聚合酶链反应 Polymerase Chain Reaction (PCR):

由于荧光测序仪对荧光分辨率极高, 少许含有荧光的产物即可被识别, 因此对 PCR 产物的量要求不高, 但对产物的纯度要求很高, 因为在反应的解链和退火过程中生成的非目的产物也带有荧光, 即使量很少也能影响到测序仪的分辨识别, 造成判读的误差。因此我们在进行 PCR 的时候采用了 Touch-down PCR 反应和手工热启动的技术。

7. Touch-down PCR 反应:

Touch-Down PCR 是一种 PCR 优化方法。它设计多循环反应的程序以使相连的循环退火温度由高逐渐减低, 每一循环减低 0.5℃, 减到适当退火温度后再以恒定的退火温度完成剩余循环。Touch-Down PCR 配合热启动技术可以得到更好的效果。热启动是指 PCR 反应中使用含有热启动特性的 DNA 聚合酶。该酶需要热启动才能激活(95℃ 10 分钟才能激活酶的活性, 无须加入抗 Taq 酶抗体), 没有

热启动过程，则该酶催化性能不高，因此常温下 PCR 不会发生反应，提高了反应的特异性。

8. 手工热启动技术：

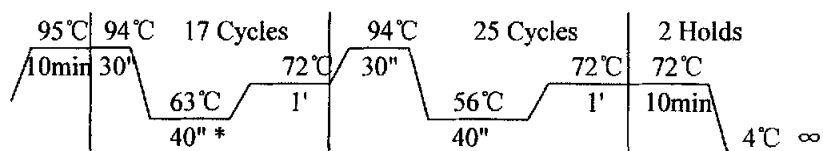
常用的热启动酶为 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶，该酶产量和特异性都很好，但价格昂贵，我们在研究中采用了手工热启动技术，使用普通 Tag 酶取得了类似的效果。手工热启动是指将 PCR 的过程分为两步，第一步先将除 Tag 酶以外的反应体系加热 95℃变性 8 分钟，第二步在变性的过程中加入 Tag 酶，这样 Tag 酶直接加入 95℃的体系中，减少了升温过程中非特异产物的生产，起到了热启动酶的效果。

PCR 反应在 9700 型 PCR 仪上进行，反应体系为 10 μ l，使用 50 ng 基因组 DNA。反应 条件为：先在 95℃变性 10 分钟，随后进行 42 个循环，每一循环包括 94℃变性 30 秒，56℃退火 40 秒，72℃延伸 60 秒。在前 17 个循环中，退火温度由 63℃开始，每个循环降 0.5℃，至第 18 个循环退火温度达到 56℃，其余反应条件不变。扩增反应的最后，72℃延伸 10 分钟。每个 96 孔板中分别加入一个对照标准品 DNA-1347-02 (源自法国 CEPH 家系，即 80 个 3 代多个体家系)。PCR 反应示意图见下图。

表 2—3 PCR 反应体系

名称	原液浓度	加样量(μ l)	体系终浓度
Mg ²⁺	25mM	0.6	3mM
Buffer	10×	0.5	5×
dNTP	2mM	0.2	40 μ M
Primers	5~10 μ M	0.04 μ l	0.02~0.04 μ M
AmpliTaq	5 units/ μ l	0.04 μ l	0.02U/ μ l
Template	50ng/ μ l	1	50 ng/ μ l

Touch-Down PCR 扩增条件:



* 表示每经过一个循环温度下降 0.5 度。

由于各微卫星多肽的引物扩增效率不一致,在 PCR 反应中,根据不同情况具体调整起始退火温度或循环次数,取得满意的扩增产物。

PCR 结束后不需经过任何纯化可以直接在 377 电泳仪上进行电泳(在多数情况下会有引物二聚体形成,但其大小和目的片段相差较大,因此并不影响实验结果)。

(五)、统计学分析

核心家系成员按血压状况分为受累和非受累两组,两组间各血生化指标以 $\text{mean} \pm \text{sd}$ 表示,对于不符合正态分布的资料经正态性校正,两组之间均数的比较进行 t 检验,统计分析使用 SPSS10.0 软件。

参数连锁分析使用 S.A.GE 4.2/MOLD 程序,对位于 9 号染色体短臂和 12 号染色体短臂的各 11 个和 10 个微卫星多态标记进行血压质量和数量性状的连锁分析,计算 Lod score 值。

非参数连锁分析分别使用 S.A.GE/SIBPAL2 4.0 和 S.A.GE/LODPAL 程序:对位于 9 号染色体短臂和 12 号染色体短臂的各 11 个和 10 个微卫星多态标记进行血压质量和数量性状的连锁分析,计算 Lod score 值,将同胞对间经均数矫正的表型乘积与等位基因共享的亲缘一致性(IBD)的平均概率进行回归。

连锁不平衡分析:TDT/S-TDT 比较受累与非受累同胞间基因型的差异。

结 果

一、高血压核心家系成员一般情况：

表 2-4. 高血压核心家系患高血压和非高血压者一般情况比较

	Hypertensive	Normotensive
人数	220	39
性别(男/女)	132/88	17/22
年龄(岁)	52.74±14.42*	45.24±14.03
SBP(mmHg)	153.7167±19.3309*	122.64957±8.9295
DBP(mmHg)	96.2500±9.9869*	80.0427±2.9737
BMI(kg/m ²)	27.8803±4.3741*	25.4816±3.8200
GLU(mmol/dL)	1.7372±0.2323	1.6666±0.2269
HDL_c(mmol/dL)	1.3319±0.3557	1.3521±0.2880
TG(mmol/dL)	2.6615±0.6197*	2.3214±0.5036
TC(mmol/dL)	5.0084±1.1187*	4.5790±0.7906
UA (mmol/dL)	1.4823±0.4146*	1.1660±0.3946

*：与 Normotensive 组比较有显著差别， $P<0.05$

所有家系成员临床指标的检测结果见表 2-4，计量指标均以均数±标准差 (mean±s)表示。以 SPSS10.0 对血压、血糖、血脂，血浆尿酸水平进行正态性检验，其中 TG、GLU 和 UA 呈正偏态分布，对 GLU 和 UA 取自然对数后转化为正态分布，TG 数值较小，许多数值小于 1，直接取对数会出现负数，在两组间均数比较时为避免出现负数故对所有家系成员血清 TG 值乘以 10 倍后再取对数，进行比较，其趋势不变。

二、参数连锁分析结果

参数连锁分析采用 S.A.G.E 4.2/MLOD 模块分别对 9 号 12 号染色体两个区域

内 11 个和 10 个微卫星标记同高血压质量性状之间计算 LOD score, 参数设定按照大家系连锁分析时选取的参数设定, 首先选取遗传模式选择为显性模式, 致病基因 A 和非致病基因 a 频率分别为 0.14 和 0.86, 显性模式下 AA、Aa 和 aa 的外显率分别为 0.7: 0.7: 0.02。结果如表 2-2, 表 2-3, 除 D9S1849、D9S230、D12S364 三个位点未能计算出 LOD score 外, 其余各位点 LOD score 皆为 0, 未达到连锁所需的强度。调整遗传模式, 增加隐性模式和共显性模式后, 进一步分析, 隐性模式参数为 0.14(0.99: 0.2: 0.2), 共显性模式参数为 0.14(0.99: 0.5: 0.2), 在以上参数下分析, 都没有得到连锁所需的强度。

表 2-5 9 号染色体微卫星多态标记参数连锁分析结果

位点	Lod score	P value
D9S1779	0.00	0.8488
D9S1813	0.00	0.8870
D9S1871	0.00	0.8999
D9S288	0.00	0.8999
D9S1810	0.00	0.8497
D9S1686	0.00	0.8405
D9S1852	0.00	0.6684
D9S281	0.00	0.7592
D9S1849	----	----
D9S286	0.00	0.8328
D9S230	----	----

*: 以上结果为显性模式, 致病基因 A 和非致病基因 a 频率分别为 0.14 和 0.86, 显性模式下 AA、Aa 和 aa 的外显率分别为 0.7, 0.7, 0.02 时的计算结果

表 2—6. 12 号染色体微卫星多态标记参数连锁分析结果

位点	Lod score	P value
D12S1715	0.00	0.9082
D12S363	0.00	0.9159
D12S1669	0.00	0.9158
D12S1682	0.00	0.8505
D12S1654	0.00	0.8176
D12S1688	0.00	0.8896
D12S1591	0.00	0.8610
D12S1617	0.00	0.8906
D12S364	----	-----
D12S358	0.00	0.7617

*: 以上结果为显性模式, 致病基因 A 和非致病基因 a 频率分别为 0.14 和 0.86, 显性模式下 AA、Aa 和 aa 的外显率分别为 0.7, 0.7, 0.02 时的计算结果

三、非参数连锁分析结果

1、S.A.GE4.2/LODPAL 分析结果

对 12 号染色体 12p23 区的 10 个微卫星多态与高血压及 SBP 和 DBP 分别以 S.A.GE/LODPAL 进行连锁分析, 以年龄, 性别和 BMI 作为协变量进行调整。S.A.GE/LODPAL 基于受累同胞对连锁分析的设计, 计算 LOD score 时无法将连续性状作为变量, 限于软件的限制, 所以我们将 SBP 和 DBP 分别以 140mmHg 和 90mmHg 作为切点, 对 SBP 和 DBP 调整后进行分析, 结果如下 (表 2—7; 2—8); (图 2—9; 2—10)。除 12 号染色体 d12s1654 同 SBP 之间 LOD score = 1.048 达到建议性的连锁外, 其余位点同高血压、SBP 和 DBP 之间都没有达到建设性连锁所需的强度。

2、S.A.GE4.2/SIBPAL 分析: 结果如表 2—9, 2—10

表 2—7. 12 号染色体微卫星多态标记 LODPAL 分析结果

位点	EH LOD score	SBP LOD score	DBP LOD score
D12S358	-----	-----	-----
D12S 1715	0.121391	0.091289	0.001135
D12S 363	0.015547	0.178714	0.000000
D12S 1669	0.015547	0.178714	0.000000
D12S 1682	0.832204	0.648941	0.262303
D12S 1654	0.960617	1.048001	0.103925
D12S 1688	0.670952	0.468619	0.446802
D12S 1591	0.525561	0.309641	0.817224
D12S 1617	0.040399	0.241869	0.000000
D12S 364	0.650241	0.647932	0.800231

表 2—8. 9 号染色体微卫星多态标记 LODPAL 分析结果

位点	EH lod score	SBP lod score	DBP lod score
D9S1779	0.365305	0.147587	0.194635
D9S1813	0.644970	0.291999	0.101976
D9S1871	0.638491	0.375010	0.152753
D9S288	0.004901	0.009764	0.047860
D9S1810	0.000000	0.000000	0.124057
D9S1686	0.027385	0.068817	0.071904
D9S1852	0.179996	0.035463	0.361993
D9S281	0.473738	0.691289	0.351264
D9S1849	0.000000	0.006086	0.000788
D9S286	---	----	---
D9S230	----	----	----

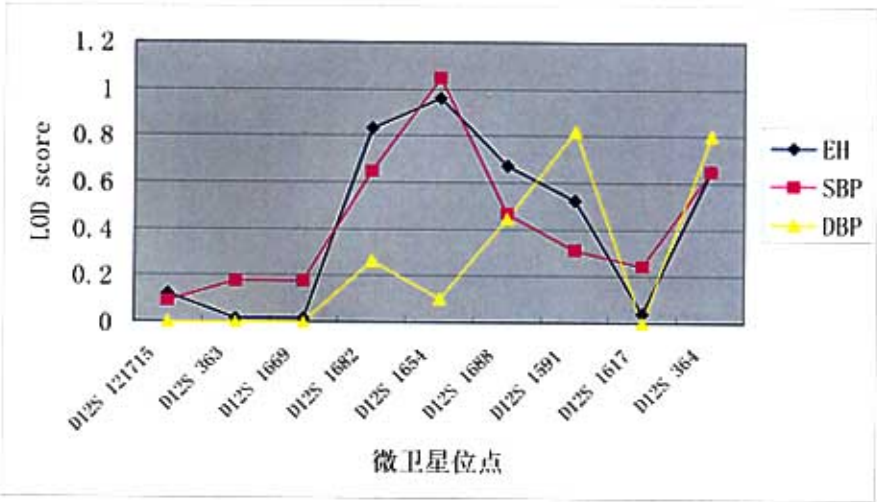


图 2—9 12 号染色体各位点 LOD score 趋势

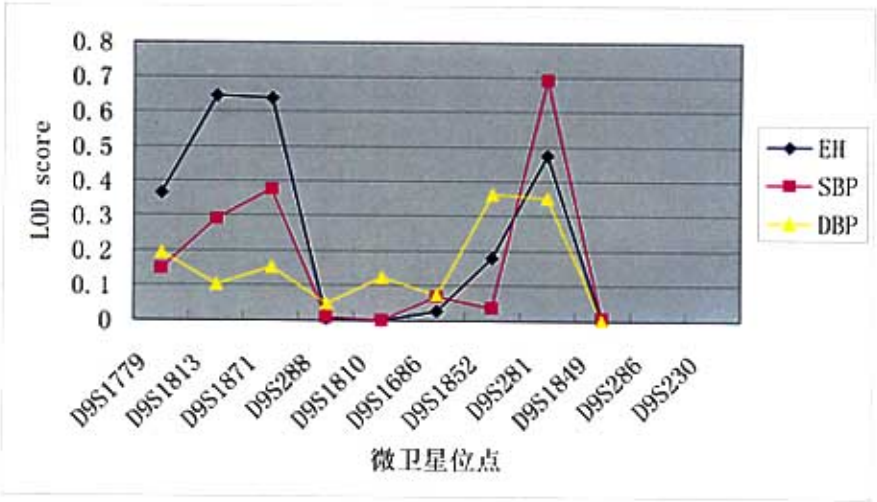


图 2—10. 9 号染色体各位点 LOD score 趋势

表 2—9. 12 号染色体各位点 S.A.GE/SIBPAL 分析结果

位点	EH		SBP		DBP	
	Estimate	P	Estimate	P	Estimate	P
D12S358	-0.0615	0.7837	-569.4237	0.8962	-99.9482	0.8489
D12S1715	-0.0071	0.5399	156.6828	0.3196	30.7842	0.3377
D12S363	0.3494	0.4999	257.8893	0.2781	32.5254	0.3670
D12S1669	-0.4737	0.5000	-419.4077	0.8718	-43.2199	0.7047
D12S1682	0.1438	0.0697	60.9631	0.4241	-0.6240	0.5036
D12S1654	0.0947	0.0718	482.5853	0.1428	81.4824	0.1997
D12S1688	-0.1289	0.9499	48.1515	0.4394	24.1710	0.3636
D12S1591	0.1297	0.05621	311.4543	0.1735	123.5469	0.0477
D12S1617	-0.0254	0.6433	-388.3624	0.8813	-134.9924	0.9661
D12S364	-----	-----	-----	-----	-----	-----

表 2—10. 9 号染色体各位点 S.A.GE/SIBPAL 分析结果

位点	EH		SBP		DBP	
	Estimate	P	Estimate	P	Estimate	P
D9S1779	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D9S1813	-0.0583	0.6687	-143.5199	0.6605	90.1518	0.2099
D9S1871	-0.1656	0.9272	-140.4149	0.6893	-70.6254	0.7749
D9S288	-0.0772	0.6909	181.1698	0.3216	26.9031	0.4173
D9S1810	-0.0390	0.6192	-424.9010	0.9043	-81.7085	0.7765
D9S1686	-0.1278	0.8576	-169.3992	0.7166	-97.7552	0.8373
D9S1852	0.1504	0.1606	593.2507	0.0651	114.4672	0.1822
D9S281	0.1829	0.0582	77.7050	0.3930	33.9025	0.3607
D9S1849	0.1476	0.1169	222.9686	0.2374	66.6824	0.2574
D9S286	0.0248	0.4149	-302.9166	0.8479	-148.6397	0.9349
D9S230	-----	-----	-----	-----	-----	-----

讨 论

本研究分别使用参数连锁分析和非参数连锁分析对位于9号染色体短臂9p24区和12号染色体12p12.2区域内的11个和10个微卫星标记与高血压及SBP和DBP进行了分析,没有发现该区域内的微卫星标记与高血压或SBP、DBP之间有连锁或传递不平衡的证据。

(一) 研究区域的选择:

自1999年Krashkal等¹在美国白人原发性高血压家系完成第一个全基因组扫描进行高血压易感基因定位研究后,全基因组扫描作为一种全新的策略被广大从事高血压病因研究的科研人员所接受。在不同人群中基于全基因组扫描的高血压易感基因定位的研究成果陆续报道出来²⁻⁶。Krashkal的研究中定位了四个与高血压相关的区域涉及到四条染色体(2p22.1-p21, 5q33.3-q34, 6q23.1-q24.1, 15q25.1-q26.1),这些区域该包含了钙调蛋白、钠-钙交换蛋白、 α_{1B} -肾上腺素受体、多巴胺受体、肌浆网磷酸受钙蛋白、雌激素受体、氨肽酶N基因。到目前为止,基因组扫描研究的结果涉及到人类全部23条染色体⁷⁻²³。其中关于中国人群的研究,2号、3号、5号、8号等染色体的某些区域与高血压或血压数量性状之间呈连锁阳性的报道较多²⁴⁻²⁹。关于12号染色体上有高血压易感位点的报道较少,而且集中于符合孟德尔常染色体显性遗传的高血压³⁰。关于9号染色体与高血压或血压数量性状之间有连锁关系的尚未见报道。本研究所选择的两个研究区域分别位于第9号染色体短臂9p24区和12号染色体12p12.2区。这两个区域的选择,来源于本实验室另外一个课题小组对一个高血压大家系进行全基因组扫描的结果,该大家系即本研究第一部分所探讨的来源于北京石景山区的高血压大家系,全基因组扫描工作在德国柏林分子医学中心(MDC)的两个独立实验室完成。扫描工作分两步完成,第一步选择了高血压大家系直系亲属94人做为研究对象,全基因组选择387个微卫星标记进行全基因组扫描,初筛的结果显示有别于既往中国人群的研究结果,2号、3号、8号等染色体皆没有阳性位点出现,而在9号和12号染色体上显示有建议性连锁区域出现,其中9号染色体连锁区域为9号短臂2区4带9p24,峰值在d9s1810,多点连锁分析lod score为1.58。而12号

染色体连锁区域为 12 号短臂 1 区 2 带 12p12.2, 峰值在 d12s1682, 多点连锁分析 lod score 为 2.85。第二步, 在第一步的基础上, 又在该大家系生活的及附近的村子里又收集了 32 个核心家系, 对该两个区域扫描后进行连锁分析, 结果显示 d9s1810 lod score 未见增加, 而 d12s1682 lod score 增至 3.44, 呈现出较强的连锁关系³¹。

考虑到以上结果主要是在一个高血压大家系的基础上得到的, 而且该研究后增加的核心家系也同该家系生活在同一地区, 彼此之间是否具有遗传学上的联系无法明确。因此该结果是否在中国北方人群高血压的遗传信息上具有普遍意义, 或者仅仅是该高血压大家系所特有, 我们无法得出明确的结果。为了验证以上研究结果我们又在距离该家系居住的石景山区有 100 公里左右的顺义地区的农村收集了 50 个高血压的核心家系, 增加了微卫星标记的密度, 对上述两个区域进行研究, 目的有两个, 一是验证上述研究结果是否在我国北方人群中具有普遍意义, 二是通过增加微卫星标记的密度, 使两个微卫星标记之间的遗传距离小余 2cM, 提高研究效率, 以便精细定位。

(二) 扫描结果的分析:

我们在 9 号染色体短臂 9p24 区域内, d9s1810 附近约 15cM 的范围内, 选择了 11 个微卫星标记, 使得平均遗传距离小于 1.5cM。在 12 号短臂 12p12.2 内, d12s1682 附近约 18cM 的范围内, 选择了 10 个微卫星标记, 平均遗传距离小余 1.8cM。一般情况下, 两个位点在遗传距离上不超过 10cM, 它们之间如果存在连锁关系, 是能够通过连锁分析发现的。在遗传距离小余 2cM 这样短的距离下进行连锁分析, 发现阳性位点的效率是很高的。

我们对上述两个区域扫描后, 经过连锁分析, 没有发现达到具有建设性连锁强度的位点。

在大家系的连锁分析中, 采用了参数连锁分析, 由于要验证大家系的分析结果, 所以我们首先采用了参数连锁分析的方法对 9 号和 12 号染色体进行分析, 所选取的参数同大家系分析时采用的一致, 遗传模式选择为显性模式, 致病基因和非致病基因频率分别为 0.14 和 0.86, 显性模式下的外显率分别为 0.7, 0.7, 0.02。在以上参数下, 以 S.A.G.E 4.2/MOLD 进行多位点参数连锁分析, 9 号和 12 号染

色体的两个区域内的各 11 个和 10 微卫星标记都没有得到连锁的证据。引入隐性模式和共显性模式，并调整外显率后，对上述位点重新分析，也没有得到连锁的证据。通常情况下，参数连锁分析对具有明确遗传模式和致病基因频率以及外显率的单基因遗传病有很高的统计效率，对于有明显主基因效应的多基因遗传病，也能够发现建议性或紧密的连锁证据，从而找到明确的易感基因或易感位点。对于病因复杂的多基因疾病如高血压、糖尿病等，其致病原因十分复杂，除遗传因素外，受环境因素的影响也很大。单就其遗传学病因来说，不符合孟德尔遗传规律，可能是很多“微效基因”的联合作用，没有明显的主基因效应，很难估计参数连锁分析所需的各种参数。而且参数连锁分析主要针对符合孟德尔遗传规律的疾病所设计，其遗传模式仅有显性、隐性、共显性等几种模式，对复杂性状疾病来说过于简单，因此，在以参数连锁分析的方法对复杂性状疾病进行检验，检测到连锁的效能大大降低。

为了解决参数连锁分析对复杂性状疾病分析效率低的问题，上世纪七十年代，Haseman 和 Elston 发布了不需要设定遗传模式的非参数连锁分析方法³²，该方法基于同胞对研究所设计，并可对疾病的数量性状进行研究³³。

我们首先以 S.A.G.E 4.2/LODPAL 对 9 号和 12 号染色体的两个区域内的各 11 个和 10 微卫星标记同高血压进行连锁分析，计算 LOD score，两个区域内 21 个位点同高血压之间都没有连锁关系。随后，我们又对两个区域内的微卫星标记同 SBP 和 DBP 之间进行连锁分析，除 12 号染色体 d12s1654 同 SBP 之间 LOD score = 1.048 达到建议性的连锁外，其余位点同 SBP 和 DBP 之间都没有获得连锁的证据。需要指出的是，由于 S.A.G.E 4.2 软件的限制，我们目前所能得到的免费的 S.A.G.E 4.2/LODPAL 模块无法对数量性状进行分析，因此我们将 SBP 和 DBP 分别以 140mmHg 和 90mmHg 作为切点，对 SBP 和 DBP 调整后进行分析。所以分析结果不是两个区域内的微卫星标记同 SBP 和 DBP 数量性状之间的连锁关系，而是微卫星标记同收缩期高血压和舒张期高血压质量性状之间的关系。从上述分析的结果来看，d12s1654 同收缩期高血压之间有一个 LOD score 约为 1 的弱的连锁提示。由于该连锁的 LOD score 较低，其意义的大小较难评价，有待于适当增加研究家系的数量后，再进一步分析，如果随着家系数量的增加，该 LOD score 也

逐步增大, 那么该位点则可能是一个有意义的提示, 否则, 可能为假阳性结果。

S.A.GE4.2/SIBPAL 对核心家系中的同胞对进行分析, mean test 检验同胞对间对等位基因共享的一致性, 多点分析结果显示在 12 号染色体 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 三个位点在不一致性同胞对(受累同胞和非受累同胞组成的同胞对)共享两个等位基因的频率与孟德尔分离分析期望值的差异有统计学显著性, $P=0.0296$ 、 $P=0.0096$ 、 $P=0.014$, 其余各位点频率的差别无显著性。而在一致性受累同胞对(受累同胞组成的同胞对)和一致性正常同胞对(非受累同胞组成的同胞对)间共享两个等位基因的频率与孟德尔分离分析期望值的差异都没有统计学差异。等位基因共享的亲缘一致性(IGD)分析的基础上, 我们进一步调整了同胞对间的年龄、性别和 BMI 之间的差异, 分别以高血压质量性状和 SBP、DBP 数量性状作为性状参数进行回归分析, trait_regression 分析结果显示, 包括 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 三个位点在内, 12 号染色体 12p12.2 区域内的 10 个微卫星标记位点同高血压和 SBP、DBP 之间都没有连锁关系。对 9 号染色体的分析显示一致性受累同胞对、一致性正常同胞对和不一致性同胞对间共享两个等位基因的频率与孟德尔分离分析期望值的差异都没有统计学差异, trait_regression 分析也没有发现 9 号染色体 9p24 区域内的 11 个微卫星标记位点同高血压和 SBP、DBP 之间有连锁的证据。

因为 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 三个微卫星标记位点在亲缘一致性(IGD)分析中, 不一致性同胞对间在共享两个等位基因频率与孟德尔分离分析期望值的差异有统计学差异, 该结果和 trait_regression 分析结果不一致, 所以我们又对这三个位点同高血压质量性状之间进行了传递不平衡检验(TDT), TDT 检验结果没有发现三个位点与高血压性状有传递不平衡的证据。

相对于传统的连锁分析仅能对易感位点和性状之间的连锁关系进行检验, 传递不平衡检验(TDT)可同时对候选基因进行关联和连锁分析, 因而具有更高的灵敏度, 结果不受群体混杂或分层影响。如果能在连锁的基础上经过传递不平衡检验的验证, 其结果将更可靠, 是目前对连锁分析良好的补充, 其在基因组扫描中的应用越来越广。

通过上述参数连锁分析、非参数连锁分析和传递不平衡检验 3 类统计分析的

结果, 可以看到, 对于 9 号染色体 9p24 区域内的 11 个微卫星位点, 我们的结果同大家系的分析结果较一致, 没有发现与高血压存在连锁的证据。但对于 12 号染色体 12p12.2 区域内的 10 个微卫星位点, 3 类统计的结果有一定的差别, S.A.GE 4.2/LODPAL 发现 d12s1654 位点同 SBP 存在建议性弱连锁, 同时等位基因共享的亲缘一致性(IBD)分析显示 d12s1591、d12s1654 和 d12s363 存在共享等位基因频率的差异。而 S.A.GE 4.2/MOLD、S.A.GE4.2/SIBPAL trait_regression 和 TDT 检验未发现该 3 个位点存在与高血压连锁的证据。

从以上分析结果中, 基本可排除在 9 号染色体 9p24 区域内有与高血压存在紧密连锁的易感位点。我们无法明确验证在 12 号染色体 12p12.2 区域内有与高血压存在紧密连锁的易感位点, 对该区域下一个明确的结论, 为时尚早。

小 结

1. 9 号染色体 9p24 区域内的 11 个微卫星标记位点同高血压或 SBP、DBP 之间不存在连锁关系或传递不平衡关系，基本可认为在中国北方人群中该区域内不存在高血压易感位点或基因。
2. 虽然未证实 12 号染色体 12p12.2 区域内存在有与高血压或 SBP、DBP 之间有紧密连锁关系的位点，但不能完全否定该区域存在高血压的易感位点或基因，还需进一步的工作来验证。

参考文献

1. Krushkal J, Ferrell R, Mockrin SC, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Genomewide linkage analyses of systolic blood pressure using highly discordant siblings. *Circulation* 1999;99:1407-1410.
2. Levy D, DeStefano AL, Larson MG, O'Donnell CJ, Lifton RP, Gavvas H et al. Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17 : genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2000;36:477-483.
3. Cheng LS, Davis RC, Raffel LJ, Xiang AH, Wang N, QuinonesMet al. Coincident linkage of fasting plasma insulin and blood pressure to chromosome 7q in hypertensive hispanic families. *Circulation* 2001;104:1255-1260.
4. Hunt SC, Ellison RC, Atwood LD, Pankow JS, Province MA, Leppert MF. Genome scans for blood pressure and hypertension: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Hypertension* 2002;40:1-6.
5. Allayee H, de Bruin TW, Michelle Dominguez K, Cheng LS, Ipp E, CantorRMet al. Genome scan for blood pressure in Dutch dyslipidemic families reveals linkage to a locus on chromosome 4p. *Hypertension* 2001;38:773-778.
6. Xu X, Rogus JJ, TerwedowHA, YangJ, WangZ, ChenCet al. Anextreme-sib-pair genomescan for genes regulating blood pressure. *AmJHumGenet* 1999;64:1694-1701.
7. Caulfield M, Munroe P, Pembroke J, et al. Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. *Lancet*. 2003 Jun 21;361(9375):2118-23.
8. Rice T, Rankinen T, Province MA, Chagnon YC, Perusse L, Borecki IB et al. Genome-wide linkage analysis of systolic and diastolic blood pressure: the Quebec Family Study. *Circulation* 2000;102:1956-1963.
9. Hsueh WC, Mitchell BD, Schneider JL, Wagner MJ, Bell CJ, Nanthakumar E et al. QTL influencing blood pressure maps to the region of PPH1 on chromosome 2q31-34 in Old Order

- Amish. *Circulation* 2000;101:2810–2816.
10. Sharma P, Fatibene J, Ferraro F, Jia H, Monteith S, Brown C et al. A genome-wide search for susceptibility loci to human essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35:1291–1296.
 11. Perola M, Kainulainen K, Pajukanta P, Terwilliger JD, Hiekkalinna T, Ellonen P et al. Genome-wide scan of predisposing loci for increased diastolic blood pressure in Finnish siblings. *J Hypertens* 2000;18:1579–1585.
 12. Zhu DL, Wang HY, Xiong MM, He X, Chu SL, Jin L et al. Linkage of hypertension to chromosome 2q14–q23 in Chinese families. *J Hypertens* 2001;19:55–61.
 13. Atwood LD, Samollow PB, Hixson JE, Stern MP, MacCluer JW. Genome-wide linkage analysis of blood pressure in Mexican Americans. *Genet Epidemiol* 2001; 20:373–382.
 14. Atwood LD, Samollow PB, Hixson JE, Stern MP, MacCluer JW. Genome-wide linkage analysis of pulse pressure in Mexican Americans. *Hypertension* 2001;37(Part 2):425–428.
 15. Angius A, Petretto E, Maestrale GB, Forabosco P, Casu G, Piras D et al. A new essential hypertension susceptibility locus on chromosome 2p24–p25, detected by genomewide search. *Am J Hum Genet* 2002;71:893–905.
 16. Harrap SB, Wong ZY, Stebbing M, Lamantia A, Bahlo M. Blood pressure QTLs identified by genome-wide linkage analysis and dependence on associated phenotypes. *Physiol Genomics* 2002;8:99–105.
 17. Rice T, Rankinen T, Chagnon YC, Province MA, Perusse L, Leon AS et al. Genomewide linkage scan of resting blood pressure: HERITAGE Family Study. Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics. *Hypertension* 2002;39:1037–1043.
 18. Cooper RS, Luke A, Zhu X, Kan D, Adeyemo A, Rotimi C et al. Genome scan among Nigerians linking blood pressure to chromosomes 2, 3, and 19. *Hypertension* 2002;40:629–633.
 19. Kristjansson K, Manolescu A, Kristinsson A, Hardarson T, Knudsen H, Ingason S et al. Linkage of essential hypertension to chromosome 18q. *Hypertension* 2002;39: 1044–1049.
 20. Ranade K, Hinds D, Hsiung CA, Chuang LM, Chang MS, Chen YT et al. A genome scan for hypertension susceptibility loci in populations of Chinese and Japanese origins. *Am J*

- Hypertens 2003;16:158-162.
21. Thiel BA, Chakravarti A, Cooper RS, Luke A, Lewis S, Lynn A et al. A genome-wide linkage analysis investigating the determinants of blood pressure in whites and african americans. *Am J Hypertens* 2003;16:151-153.
 22. Rao DC, Province MA, Leppert MF, Oberman A, Heiss G, Ellison RC, et al. A genome-wide affected sibpair linkage analysis of hypertension: the HyperGEN network. *Am J Hypertens* 2003;16:148-150.
 23. Kardia SL, Rozek LS, Krushkal J, Ferrell RE, Turner ST, Hutchinson R et al. Genome-wide linkage analyses for hypertension genes in two ethnically and geographically diverse populations. *Am J Hypertens* 2003;16:154-157.
 24. Caulfield M, Munroe P, Pembroke J, Samani N, Dominiczak A, Brown M et al. Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. *Lancet* 2003;361: 2118-2123.
 25. Wu DA, Bu XD, Warden CH, et al. Quantitative trait locus mapping of human blood pressure to a genetic region at or near the lipoprotein lipase gene locus on chromosome 8p22. *J Clin Invest* 1996, 97:2111-2118.
 26. Chu SL, Zhu DL, Xiong MM, et al. Linkage analysis of 12 candidate gene loci regulating water, sodium metabolism and membrane ion transport in essential hypertension. *Chin J Cardiol* 2001, 29:194-197.
 27. Qiu C, Zheng Y, Cen W, et al. Analyses on the association of CA-repeat polymorphism and A1166-C variant in the 3'-flanking region of AT1R gene with essential hypertension in Tibetans. *Chin J Med Genet* 2000, 17: 381-385.
 28. He X, Zhu D, Chu S, et al. α -adducin gene and essential hypertension in China. *Clin Exp Hypertens* 2001, 23: 579-589.
 29. Pan WH, Chen JW, Fann C, et al. Linkage analysis with candidate genes: the Taiwan young-onset hypertension genetic study. *Hum Genet* 2000, 107:210-5.
 30. Hou SQ, Li MP, Zheng Y, et al. Association of the angiotensin II type 1 receptor gene locus with essential hypertension in Chinese. *Basic Med Sci and Clin* 2000, 20: 25-29.
 31. Schuster H, Wienker TE. Severe autosomal dominant hypertension and brachyctyly in the

- Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat Genet* 1996,13:98.
32. Gong M, Zhang H, Schulz H, et.al Genome-wide linkage reveals a locus for human essential (primary) hypertension on chromosome 12p. *Hum Mol Genet*. 2003 Jun 1;12(11):1273-7.
33. Haseman JK, Elston RC. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* 1972,2:3-19.
34. S.A.G.E. Statistical analysis for genetic epidemiology, release 2.1. Computer program package available from the department of Biometry and Genetics. 1992, Louisiana State University Medical Center, New Orleans.

高血压遗传学研究的进展

高血压是一种常见的复杂性状疾病，血压的调节是一个涉及到人体多个系统的复杂工程，因而导致高血压的原因也十分复杂，尚未阐明。目前认为高血压是由多种遗传因素和多种环境因素以及基因—基因间，基因—环境间相互作用的结果。

对高血压遗传学研究从人们认识到血压对人体有影响起大约有一个世纪的时间，1923年，Weitz报道在一些家庭中有连续两代人有高血压史，这是关于高血压的最早的家庭聚集性的报道¹。关于高血压遗传性的最著名的争论是上世纪50年代发生于Robert Platt和 George Pickering 爵士之间。Platt基于Weitz等人的报道认为高血压是一种（或一系列）明显的符合孟德尔遗传模式的疾患，而Pickering从人群的血压资料认识到遗传因素是高血压的一种重要的因素，它贯穿于整个血压调节中，而高血压只是整个血压范围这个连续性状中极端的表现而已，直接定义高血压等位基因显得过于激进了。从广义的角度来看，两人都对了。在随后的研究中一些符合孟德尔遗传模式的高血压陆续在分子水平得到证明，而符合单基因遗传的高血压在人群中所占的比例却是微乎其微的，它不能对人群中占绝大多数的高血压作出解释。

这场争论过去50年了，回顾这50年中，遗传学、分子生物学技术取得了飞跃性的进展，特别是上世纪末人类基因组计划的实施和完成，更为人们研究高血压等复杂性状疾病的遗传学机理奠定了坚实的基础。研究手段也得到了很大提高，遗传标记已从第一代的限制性内切酶片段长度多态性（RFLP）发展到第二代的短串联重复序列str（也称为微卫星）到第三代的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)，可以更精细的定位遗传变异，帮助克隆易感基因。研究策略也发展出了关联研究、连锁研究等，目前利用SNP进行全基因组关联分析的研究也已兴起，预计在随后的几年中将逐渐成熟。

伴随着技术的飞速发展,对高血压的遗传学研究也取得了一定的进展。我们认识到遗传因素的影响在高血压的发病中占到30%—50%²,只有极少数的高血压是由单个或少数基因的变异而导致的,而大多数的高血压是许多微效基因共同作用的结果,既来自多个位点大多数微效基因在群体中发生频率都很低,它们之间相互作用,通过数量性状的剂量—效应关系,使血压升高,达到疾病发生的临界阈值,而共同决定了高血压的遗传易感性。但这些进展无论从发展速度还是人们对这些研究的期望上都是难以令人满意的。

高血压既作为一种独立的疾病影响人们的健康,同时又作为脑卒中、冠心病、心功能不全、肾脏疾病等多种疾病的重要危险因素,对其发病和预后都有十分重要的作用。我们研究脑卒中、冠心病等疾病的病因和预防,高血压是一个无法回避和跳跃的重要阶段,同时高血压病因的阐明,也会给脑卒中、冠心病等疾病的研究带来革命性的成果。深入探索高血压病因,从分子水平开展高血压致病或易感基因研究是十分重要的现实课题。现将高血压遗传学研究方面的进展作一综述。

一、 单基因突变引起的高血压

虽然高血压遗传学病因的研究成果不能让人满意,但如果单单就符合孟德尔遗传模式的单基因突变引起的血压调节失调来说,在最近的一二十年中还是成果辉煌的。这一切得益于分子生物学技术的飞速发展,使得高通量的基因组扫描能够进行,短期内可以处理大量的标本。结合连锁分析的进一步完善,迄今为止,已有17种符合孟德尔遗传规律的导致血压调节失调的致病基因被定位或克隆。其中导致高血压的有8个,导致低血压的有9个。尽管这些单基因突变引起的高血压在高血压人群中占的比例很小,但这些致病基因的识别为高血压易感基因研究提供了线索。当然,特殊类型继发性高血压基因研究并未结束,发现新的致病基因、阐明基因突变与高血压发病间联系,探索基因治疗方法等都有待进一步努力。

值得人们关注的是,在已发现的这17个基因中,几乎都是通过肾途径来影响血压调节的。其突变改变了钠的再吸收,功能获得性的突变导致盐的再吸收增加,而使血压增高,最终导致高血压,功能丢失性突变导致盐的再吸收减少而使血压降低,最终导致低血压。从这个角度来看,导致低血压的突变通导致高血压的突

变一样能给我们对高血压易感基因的研究提供线索和提示。

1. 皮质激素抑制性醛固酮增多症 (Glucocorticoid remediable aldosteronism GRA): 醛固酮合成酶 (醛固酮生物合成的限速酶) 基因突变, 8号染色体不等交换产生一个11 β 羟化酶基因和醛固酮合成酶基因的嵌合基因, 此突变使醛固酮合成酶活性增高, 可导致糖皮质激素抑制性醛固酮增多症。GRA为常染色体显性遗传病, 其主要临床表现为高血压、高醛固酮、低肾素^{3,4}。
2. 表征性盐皮质激素增多征 (Apparent mineralocorticoid excess, AME): 11 β 羟类固醇脱氢酶 (11 β HSD) 基因: 该基因突变可导致表征性盐皮质激素增多征。先天性11 β HSD缺乏是常染色体隐性遗传病^{5,6}。到目前为止, 已在15个AME患病家系中找到了11种不同的11 β HSD基因突变型。
3. 妊娠期加重型高血压: 盐皮质激素受体 (Mineralocorticoid Receptor MR) 突变, 该突变发生在盐皮质激素受体的配体区导致常染色体显性遗传性高血压, 以妊娠期高血压加重为主要标志^{7,8}。
4. Liddle 综合征: 敏感性上皮细胞钠通道 β 、 γ 亚单位发生突变, 该病为常染色体显性遗传病。^{9,10}
5. Gordon综合征: 为常染色体显性遗传病, 与肾脏离子转运有关, 该病基因最近已被定位在1号、12号和17号染色体。^{11,12}
6. 高血压伴短指综合征: Schuster等在土耳其东北部一家族中发现一常染色体显性遗传疾病, 患者有短指畸形 (brachydactyly), 伴严重高血压。该病基因已定位于12p11.2-12.2区域^{13,14}。
7. 过氧化物酶增殖-活化受体gamma (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma PPAR γ) 突变: 伴有胰岛素抵抗综合征的高血压, 对利尿药敏感¹⁵。

二、与高血压相关的候选基因

从1992年 Jeunemaitre 等报道血管紧张素原基因多态性与高血压相关¹⁶, 开创了高血压基因多态性关联研究的先河起, 此后这类研究在国内外广泛开展, 相关论文不计其数。迄今为止被提出的高血压相关基因有150种之多。它们涉及到血压调节的方方面面: 肾素-血管紧张素-醛固酮系统, 交感神经系统, 下丘脑-垂体轴、内皮素、利钠肽、激肽释放酶-激肽系统、类固醇激素、前列腺素、

生长因子、激素、骨架蛋白、黏附分子、细胞内信使、脂致代谢、糖代谢、载脂蛋白、离子通道和转运载体等¹⁷。

1. 肾素—血管紧张素—醛固酮系统

血管紧张素原(AGT)基因

定位于人染色体 1q42-43, 基因组序列全长 12kb, 包含 4 个外显子和 4 个内含子, 是单拷贝基因。是第一个被报道同高血压连锁的基因, 也是目前研究最深入, 最有希望被证实为高血压易感基因的基因。1992 年 Jeunemaitre 等首先在原发性高血压家系中使用受累同胞对的方法(Affected Sib-pair)发现 AGT 基因 M235T 多态性与高血压连锁, 随后国内外学者对 AGT 基因进行了大量研究, 又发现 T174M 多态性也与高血压连锁。近年的两个荟萃分析: 一个分析了 11 个研究 5493 个研究对象, 另一个分析了 69 个研究 27906 个研究对象, 两个研究都得出结论发现 AGT 基因 M235T 多态性与高血压的危险增加有关系^{18,19}。这样的结果在随后的高血压候选基因的连锁或关联研究中被证实²⁰⁻²², 同一时期在不同的人群中一下研究却得到了相反的结果^{23,24}。另外, 高血压和血清血管紧张素原水平都被发现同 AGT 基因 235T 及 174M 变异有关¹⁶。AGT 基因 M235T 多态性, 本身没有任何功能性改变, 但同其启动子区 G-6A 突变存在完全连锁不平衡, 相对于-6G 等位基因, 在基因表达的研究中, 发现-6A 突变能增加 AGT 基因的表达, 并且同高血压显著关联²⁵。而由美国国立肺心脏血液研究所(NHLBI)进行的大样本、多中心的研究报告, AGT 基因 G-6A 突变与 M235T 多态与血压水平可能无关²⁶。一些研究中报道 AGT 基因多态同血清中血管紧张素原的浓度有关, 这种浓度的变化从人群的水平上同血压有关系, 较高的血清血管紧张素原的浓度同较高的人群血压水平相关^{27,28}。研究还发现无论是血清中还是尿中醛固酮的水平, 具有 AGT-6A 突变者较 AGT-6G 者都要高一些²⁹。不同人群和种族的大量研究结果没有得出一致的结论。究竟它们之间真实的关系如何, 还需进一步进行大样本、多种族及与其他基因的关联研究才能确定。

肾素—血管紧张素—醛固酮系统其它基因:

血管紧张素转化酶 (ACE) 基因:人 ACE 基因定位在染色体 17q23, 在 16 号内含子存在插入型 (Insertion, I) 或缺失型 (Deletion, D) 多态性。血清 ACE 水平与 ACE 基因多态性之间有显著相关性, 在不同 ACE 基因型人群中依次为 DD>DI>II 型。在人类, 有关 ACE 基因多态性与高血压病关系的研究结果不一致。

血管紧张素 II 1 型受体 (AT1) 基因:人 AT1 受体基因位于染色体 3q22, 在人 AT1 受体基因已检测到 5 种基因变异体, 其中 A1166C 基因多态性似与高血压有关。然而有的研究不能证实 AT1 受体基因位点与高血压有关, 而且上述基因多态性并不改变 AT1 受体的氨基酸序列。ACE 及 AT1 受体基因多态性分析发现, 同时携带 ACE-DD 型和 AT1-C 等位基因者发生心肌梗塞的危险性最高。另一对于 AGT 及 ACE 基因多态性研究发现, 同时携带 AGT-TT 及 ACE-DD 者与分别带一种基因多态性相比, 前者与心肌梗塞关系远比后二者密切, 由此可见基因多态性联合分型可能比单一分型更有价值。

2. 影响离子转运活性的基因突变

α -Adducin 基因 (ADD1)

Adducin 是组成细胞骨架的一种蛋白, 以二聚体(α 、 β)或四聚体($\alpha\alpha\beta\beta$)的形式存在, Adducin 可以影响细胞膜上 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP 酶的活性。编码 α -adducin(ADD1) 的基因定位于人类 4 号染色体 4p16.3, 全长约 85kb, 由 17 个外显子和 16 个内含子组成。编码 β -adducin 基因定位于人类 2 号染色体 2p13-14, 由 13 个外显子和 12 个内含子组成。

Adducin 基因突变同高血压的关系最早来源于动物实验, 在对米兰高血压大鼠 (MHS) 的研究中, 发现 α -adducin 第 316 位氨基酸密码子存在 T-A 突变和第 460 位氨基酸密码子存在 G-T 突变³⁰; 随后的研究中发现 α -adducin, β -adducin 的变异大约可以解释 50% 左右米兰高血压大鼠同普通大鼠血压的差别。Adducin 基因突变可以通过增加 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在细胞膜上的数码并增强其活性而促使大鼠的血压升高³¹。

Adducin 基因突变, 特别是 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性同人类高血压的关系

的研究也在动物实验候有陆续报道,无论是关联研究还是连锁分析都提示 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性同高血压有关联³²⁻³⁴。由美国国家心肺血液研究中心发起的有四个中心参与的“家庭血压计划”项目中的 HyperGEN 研究报道 ADD1 基因 460Trp 多态携带者在高加索人群中可以增加 50%—70% 的患高血压的危险,而在老年、超重并且高甘油三酯的人群中,这种危险增加到 4.2 倍³⁵。

ADD1 基因,被认为是“盐敏感性高血压”的候选基因。病例生理学研究发现 460Trp 突变跟血液中盐的滞留有关系,并且对利尿剂降压作用明显优于正常者³⁶,同时盐负荷后的血压升高幅度也大大高于正常者³⁷。日本 Ohasama 研究发现,在年轻人中 ADD1 基因 Gly460Trp 多态性与低肾素型高血压相关³⁸,460Trp 纯合子携带者更容易表现为低肾素型高血压,钠的重吸收分数也更高一些,类似的结果在其它人群中也可以见到³⁹。

Adducin 基因突变同高血压的关系,也存在着种群间的差异,阳性的结果在高加索人群中较多见,非洲裔美国人、日本、澳洲及加拿大人群中未能验证该基因与高血压相关^{35,40-42}。来自中国安徽和上海的报道也没有发现 ADD1 基因与高血压相关^{43,44}。

要证实 Adducin 基因同高血压的关系,还需要更多,更大规模的研究。

3. 肾上腺素系统的基因突变

G-蛋白 β 3 亚单位基因 (GNB3): β -肾上腺受体-G-蛋白系统是激活心脏和血管平滑肌内的腺苷酰环化酶的基础, G 蛋白可调节 Na^+ - H^+ 交换体功能,促进肾远曲小管细胞外 Na^+ 与细胞内 H^+ 进行交换。编码 G-蛋白 β 3 亚单位的基因定位于人类 12 号染色体 12p13, 研究发现其第 10 外显子内存在 C825T 多态, C 到 T 的突变并不引起编码氨基酸的改变,但该多态中 T 等位基因跟其他突变相关联或导致 GNB3 转录过程中剪切位点发生改变,使第 9 和第 10 外显子之间 498~620 位核苷酸的缺失,其蛋白产物 GNB3 相应的第 167~197 位氨基酸发生了缺失。变异的 GNB3 在信号传导过程中活性增强,导致 Na^+/H^+ 交换活性异常。Siffert 报道相对于 CC 纯合子基因型,具有 TT 纯合或 CT 杂合基因型者发生高血压的危险升高 79% 和 38%⁴⁵,其他学者的重复实验中也发现具有 T 等位基因者,比缺少 T 等位基因者增加 50

%患高血压的机会⁴⁶。同其它高血压候选基因一样,研究发现GNB3跟高血压的关系同样存在着种族或人群差异,不同种族人群中,825T的基因频率差别很大,高加索人群约为25%,亚洲人群约为50%,而在非裔美国黑人中825T的基因频率达到80%。825T多态跟高血压有关联的报道多见于高加索人群^{47,48},而一些关于亚洲人群或美国黑人的研究中则未发现825T跟高血压有关联^{49,50}。除了与高血压有关外,一些研究还发现GNB3 C825T多态跟超重或胰岛素抵抗和动脉粥样硬化有关系^{51,52}。另外,有研究发现T等位基因同左室舒张期灌注受损有关系⁵³,并能增加冠脉血管对 α -2肾上腺素激动剂的反应⁵⁴。

三. 全基因组扫描在高血压易感基因研究中的应用:

全基因组扫描是指在基因组中每隔一定的距离设立一个遗传学标志,通过生物统计学方法计算出每一个遗传学标志是否与特定的生物学性状相连锁,若得到与特定生物学性状相连锁的证据,则该遗传学标志附近可能存在决定该生物学性状的基因。在此基础上,对该区域内进行更精细的基因定位,或以该遗传学标志附近的基因作为候选基因,进一步定位和克隆决定该生物学性状的基因。

用于基因组扫描的DNA多态性标记有3类:(1)限制性内切酶片段长度多态性(RFLP);(2)重复序列多态,特别是那些可通过PCR方法检测的短串联重复片段(STR);(3)单核苷酸多态性(SNP),是DNA序列的单个碱基的差别。目前常用的是STR,亦称微卫星DNA,这种遗传标志具有种类多(约5~10万)、分布广(遍及整个基因组)、呈高度多态性和杂合度、遵循Mendel共显性遗传规律、易用PCR扩增等特点,已被广泛应用于多种疾病的基因组扫描。目前,法国的人类多态性研究中心(CEPH)和美国的Marshfield医学遗传中心分别公布了最新版本的STR图谱,前者包含9000多个STR,后者包含8000多个STR。许多公司已开发出STR的成套试剂盒,包括优化的PCR条件和不同荧光标记的微卫星DNA引物,采用这些引物进行PCR扩增,将扩增产物在测序仪上走聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用基因扫描(Genescan)和基因分型(Genotyper)软件,对电泳结果进行图象及数据处理,判断基因型并计算等位基因频率。

使用受累同胞对(ASP)法进行基因组扫描是定位高血压易感基因的有效方

法。在基因组中分阶段扫描策略较为有效,开始先以低密度(如 20cM)分布的标记进行初始扫描,再在第二阶段对超过低阈值($T=1$)的标记区域用更密集的标记(如每个标记两侧 10cM 再检两个标记)进一步扫描。对常染色体显性遗传采用初始标记为 20cM 比采用相距 10cM 或 40cM 的标记更为有效。

近年来,随着人类基因组计划的迅猛发展,第三代遗传多态性标志—SNP 又引起了人们越来越多的关注。染色体基因组水平上单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性,在人群中的发生频率大于 1%,即为 SNP。人类 DNA 序列变异约 90%表现为 SNP。以前人们估计,在人类基因组中每 1000 个核苷酸有 1 个以上的 SNP,但最近的研究表明,SNP 比人们想像的要更多地存在于基因组中。SNP 可以用于疾病的连锁分析和未知致病基因的定位。SNP 数量大和分布广,在任何已知或未知致病基因附近都可能找到众多的 SNP,并用于遗传病的单倍型诊断。在有适当的家系资料时,SNP 又可用作遗传标记来定位未知基因。与目前广泛使用的微卫星小卫星基因图比较,未来 SNP 图的标记更多,分辨率更高,定位基因也更加准确。有作者计算,有 700~900 个 SNP 的基因图与目前用于基因组扫描的 300~400 个微卫星位点的基因图的分析能力相当,但制作前者要容易得多。而如果采用 1500~3000 个 SNP 作扫描,结果明显优于目前使用的微卫星扫描。

最近几年全基因组扫描在高血压研究中取得了许多成果,一些高血压易感位点被揭示出来,现将这些工作总结如表 3-2。

四. 中间表型

中间表型是指能反映高血压发展早期或中期病理变化的一系列生化或生理性状。基于对高血压这类多基因疾病有较强的异质性的认识,寻找合适的中间表型成为高血压基因研究的重要策略之一。一个理想的中间表型应该具备如下特点:①与原发性高血压相关;②高度遗传;③高外显率;④在高血压后代中表现较早;⑤呈双峰分布;⑥与高血压的发病机理有因果关系;⑦能提示可供检测的候选基因;⑧具可操作性,即便于评估和相对无创,能在高血压先证者家属中方便检测^{55, 56}。虽然完全符合上述理想特征的中间表型并未确认,还是有一些与高血压相关的性状显示部分特征可供参考。

研究发现某些中间表型可能比血压更好地显示其遗传方式, 前瞻性研究也发现这些中间表型对高血压有很好的预测性。近年来, 几个与高血压相关的基因通过家系研究相继被定位克隆, 这些高血压均为单基因型高血压, 分离其基因所依赖的性状均为符合孟德尔遗传规律的中间表型, 如主要包括糖皮质激素可治疗性醛固酮增多症(GRA)、Liddle 综合征(假性醛固酮增多症)、盐皮质激素过多症和Bilginturan 综合征等。

盐敏感因表现有一系列涉及血压调节的内分泌及生化代谢异常,故被认为可能是高血压的一个中间表型而广受关注。Williams 等⁵⁷曾提出过盐敏感中的“非调节型”(non-modulation)这个表型, 其特征为血管紧张素II的输注后对醛固酮分泌及肾血流无调节作用。最近的研究发现该表型与AGT 基因M235T 基因型相关⁵⁸,同时也与年龄、性别和基因型相互作用有关⁵⁹。尿游离皮质醇的增多与盐敏感性高血压相关,并呈双峰分布,可能也是一种有助于定义高血压亚型的中间表型⁶⁰。最新有研究提出肾上腺皮质醇合成的变化是一个关键的中间表型。Connell 等⁶¹发现醛固酮合成酶C344T 多态与高血压,特别是与高醛固酮/肾素比者相关。而这一基因改变直接影响肾上腺11 β 羟化过程,认为其引起的去氧皮质醇与皮质醇转化的改变导致长期低量促肾上腺皮质激素的增加,最终改变了醛固酮对血管紧张素II的反应,导致这一高醛固酮/肾素比表型的产生。

以上候选基因、全基因组扫描以及中间表型的研究是目前高血压遗传学研究的常用策略和方法。在高血压的遗传因素的研究中也取得了一定的成绩。但我们同时也要清醒的认识的到, 高血压病因的研究仍然任重道远。今后多开展一些大规模、高质量的关联或连锁研究, 多关注一下多个基因间相互作用, 以及基因与环境间相互作用, 或许是高血压遗传学研究取得突破的一条可行之路。

参考文献

1. Swales JD: Platt versus Pickering: An episode in recent medical history. London, Keynes Press, 1985.
2. Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. Hypertension : pathophysiology , diagnosis , and management. Laragh JH , Brenner BM (editors) [M] / / New York ,Raven Press. 1990 :81 - 100.
3. Lifton, R.P., Dluhy, R.G., Powers, M., Rich, G.M., Cook, S., Ulick, S., and Lalouel, J.M. (1992a). A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355:262-265
4. Lifton, R.P., Dluhy, R.G., Powers, M., Rich, G.M., Gutkin, M., Fallo, F., Gill, J.R., Jr., Feld, L., Ganguly, A., Laidlaw, J.C., et al. (1992b). Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat. Genet.* 2, 66-74
5. Mune, T., Rogerson, F.M., Nikkila, H., Agarwal, A.K., and White, P.C. (1995). Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat. Genet.* 10, 394-399.
6. Hurley, D.M., Accili, D., Stratakis, C.A., Karl, M., Vamvakopoulos, N., Rorer, E., Constantine, K., Taylor, S.I., and Chrousos, G.P. (1991). Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J. Clin. Invest.* 87, 680-686
7. Geller, D.S., Farhi, A., Pinkerton, N., Fradley, M., Moritz, M., Spitzer, A., Meinke, G., Tsai, F.T., Sigler, P.B., and Lifton, R.P. (2000). Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289, 119-123
8. Geller, D.S., Rodriguez-Soriano, J., Vallo Boado, A., Schifter, S., Bayer, M., Chang, S.S., and Lifton, R.P. (1998). Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat. Genet.* 19, 279-281
9. Hansson, J.H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B., and Lifton, R.P. (1995a). Hypertension caused by a truncated epithelial

- sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat.Genet.* 11, 76–82.
10. Hansson, J.H., Schild, L., Lu, Y., Wilson, T.A., Gautschi, I., Shimkets, R., Nelson-Williams, C., Rossier, B.C., and Lifton, R.P. (1995b). A *aggredenovo* missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1495–11499.
 11. Mansfield, T.A., Simon, D.B., Farfel, Z., Bia, M., Tucci, J.R., Lebel, M., Gutkin, M., Vialettes, B., Christofilis, M.A., Kauppinen-Makelin, R., et al. (1997). Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31–42 and 17p11–q21. *Nat. Genet.* 16, 202–205.
 12. Disse-Nicodeme, S., Achard, J.M., Desitter, I., Houot, A.M., Fournier, A., Corvol, P., and Jeunemaitre, X. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 302–310.
 13. Schuster, H., Wienker, T.E., Bähring, S., Bilginturan, N., Toka, H.R., Neitzel, H., Jeschke, E., Toka, O., Gilbert, D., Lowe, A., et al. (1996a). Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat. Genet.* 13, 98–100.
 14. Bähring, S., Nagai, T., Toka, H.R., Nitz, I., Toka, O., Aydin, A., Muhl, A., Wienker, T.F., Schuster, H., and Luft, F.C. (1997). Deletion at 12p in a Japanese child with brachydactyly overlaps the assigned locus of brachydactyly with hypertension in a Turkish family. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 732–735.
 15. Barroso, I., Gurnell, M., Crowley, V.E., Agostini, M., Schwabe, J.W., Soos, M.A., Maslen, G.L., Williams, T.D., Lewis, H., Schafer, A.J., et al. (1999). Dominant negative mutations in human *PPARG* associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402, 880–883.
 16. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev V, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992, 71:169–180.

17. 朱鼎良.开展高质量的高血压基因多态性关联研究。《高血压》2004, 12 (1) 2-3.
18. Kunz R, Kreutz R, Beige J, et al. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997; 30:1331±1337.
19. Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, et al. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 1999; 17:9±17.
20. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJ. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med*. 1994;330:1629–1633.
21. Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, Clark AJ. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest*. 1995;96:687– 692.
22. Atwood LD, Kammerer CM, Samollow PB. Linkage of essential hypertension to the angiotensinogen locus in Mexican Americans. *Hypertension*.1997;30:326–330.
23. Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Connell J, Grobbee D, Schmidt S, Shunkert H, Schuster H, Sharma AM, Soubrier F. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension*. 1998;31:725–729.
24. Niu T, Xu X, Rogus J, Zhou Y, Chen C, Wang J, Faug Z, Schmitz C, Zhao J, Rao VS, Lindpaintner K. Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J Clin Invest*. 1998;101:188–194.
25. Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M et al. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:1786–1797.
26. Province MA, Boerwinkle E, Chakravarti A, et al. Lack of association of the angiotensinogen-6 polymorphism with blood pressure levels in the comprehensive NHLBI family blood pressure program. *J hypertens* 2000;18:867-876
27. Pratt JH, Ambrosius WT, Tewksbury DA, Wagner MA, Zhou L, Hanna MP. Serum angiotensinogen concentration in relation to gonadal hormones, body size, and genotype in growing young people. *Hypertension* 1998;32:875–879.

28. Cooper R, Rotimi C, Ogunbiyi O, Ward R. Angiotensinogen genotype, serum level and hypertension in blacks [abstract]. *Am J Hypertens* 1997;10:33A.
29. Fardella C, Zamorano P, Mosso L, Gomez L, Pinto M, Soto J et al. A(-6)G variant of angiotensinogen gene and aldosterone levels in hypertensives. *Hypertension* 1999;34(Pt 2):779-781.
30. Bianche G, Tripodi G, Casari G, et al. Two point mutation within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 1994;91:3999-4003
31. Ferrandi M, Salardi S, Tripodi G, Barassi P, Rivera R, Manunta P et al. Evidence for an interaction between adducin and $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-ATPase}$: relation to genetic hypertension. *Am J Physiol* 1999;277(Pt 2):H1338-H1349
32. Glorioso N, Filigheddu F, Cusi D, Troffa C, Conti M, NatalizioMet al. α -Adducin 460Trp allele is associated with erythrocyte Na transport rate in North Sardinian primary hypertensives. *Hypertension* 2002;39(Pt 2):357-362.
33. Casari G, Barlassina C, Cusi D, Zagato L, Muirhead R, RighettiMet al. Association of the α -adducin locus with essential hypertension. *Hypertension* 1995;25:320-326.
34. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 1997;349:1353-1357.
35. Province MA, Arnett DK, Hunt SC, Leidencker-Foster C, Eckfeldt JH, ObermanA et al. Association between the alpha-adducin gene and hypertension in the HyperGEN Study. *Am J Hypertens* 2000;13(Pt 1):710-718.
36. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 1997;349:1353-1357.
37. Barlassina C, Schork NJ, Manunta P, Citterio L, Sciarrone M, Lanella G et al. Synergistic effect of alpha-adducin and ACE genes causes blood pressure changes with body sodium and volume expansion. *Kidney Int* 2000;57:1083-1090.
38. Sugimoto K, Hozawa A, Katsuya T, et al. Alpha-adducin Gly460Trp polymorphism is

- associated with low renin hypertension in younger subjects in the Ohasama study. *J Hypertens* 2002, 20:1779-1784
39. Grant FD, Romero JR, Jeunemaitre X, Hunt SC, Hopkins PN, HollenbergNH et al. Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. *Hypertension* 2002;39:191-196.
40. Kato N, Sugiyama T, Nabika T, et al. Lack of association between the α -adducin locus and essential hypertension in the Japanese population. *Hypertension* 1998;31:730-733.
41. Alam S, Liyou N, Davis D, et al. The 460Trp polymorphism of the human alpha-adducin gene is not associated with isolated systolic hypertension in elderly Australian Caucasians. *J Hum Hypertens* 2000;14:199-203.
42. Busch CP, Harris SB, Hanley AJ, et al. The ADD1 G460W polymorphism is not associated with variation in blood pressure in Canadian Oji-Cree. *J Hum Genet* 1999;44:225-9.
43. Niu T, Xu X, Cordell HJ, et al. Linkage analysis of candidate genes and gene-gene interactions in Chinese hypertension sibpairs. *Hypertension* 1999;33: 1332-1337.
44. He X, Zhu D, Chu S, et al. α -adducin gene and essential hypertension in China. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23: 579-589
45. Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 1998; 18:45-48.
46. Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, et al. G-Protein beta3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33:1049-1051.
47. Hengstenberg C, Schunkert H, Mayer B, Doring A, Lowel H, Hense HW et al. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2001; 49:820-827.
48. Dzida G, Golon-Siekierska P, Puzniak A, Sobstyl J, Bilan A, Mosiewicz J et al. G-protein beta3 subunit gene C825T polymorphism is associated with arterial hypertension in Polish patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR597-CR602.
49. Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 2000;35:1297-1300.

50. Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K et al. Human G-protein beta 3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens* 2000;13:140–145.
51. Poston WS, Haddock CK, Spertus J, Catanese DM, Pavlik VN, Hyman DJ et al. Physical activity does not mitigate G-protein-related genetic risk for obesity in individuals of African descent. *Eat Weight Disord* 2002;7:68–71.
52. Wascher TC, Paulweber B, Malaimare L, Stadlmayr A, Iglseder B, Schmoelzer I et al. Associations of a human G protein γ 3 subunit dimorphism with insulin resistance and carotid atherosclerosis. *Stroke* 2003;34:605–609.
53. Jacobi J, Hilgers KF, Schlaich MP, et al. 825T allele of the G-protein beta3 subunit gene (GNB3) is associated with impaired left ventricular diastolic filling in essential hypertension. *J Hypertens* 1999; 17:1457–1462.
54. Baumgart D, Naber C, Haude M, et al. G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alpha(2)-adrenoceptor activation. *Circ Res* 1999; 85:965±969.
55. Kailasam MT , O'Connor DT , Parmer RJ . Hereditary intermediate phenotypes in African American hypertension [J] . *EthnicHealth* ,1996 ,1 :117 - 128.
56. O'Connor DT , Insel PA , Ziegler MG, et al. Heredity and the autonomic nervous system in human hypertension[J] . *Curr Hypertens Rep* ,2000 ,2 :16 - 22.
57. Williams GH , Dluhy RG, Lifton RP , et al. Non2modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension [J] . *Hypertension* ,1992 ,20 :788 - 796.
58. Hopkins PN , Lifton RP , Hollenberg NK, et al. Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity[J] . *J Hypertens* ,1996 ,14 :199 - 207.
59. Williams GH , Fisher ND , Hunt SC , et al. Effects of gender and genotype on the phenotypic expression of nonmodulating essential hypertension[J] . *Kidney Int* ,2000 ,57 :1404 - 1407.
60. Litchfield WR , Hunt SC , Jeunemaitre X , et al. Increased urinary free cortisol :a potential intermediate phenotype of essential hypertension[J] . *Hypertension* ,1998 ,31 :568 - 574.
61. Connell J , Fraser R , Mackenzie S , et al. Is altered adrenal steroid biosynthesis a key

intermediate phenotype in hypertension[J] ? Hypertension ,2003 ,41 (5) :993 - 9.

表 3-1、单基因遗传的血压失调 (高血压或低血压)

Syndrome	Phenotype.	Mutation.	Mechanism
Glucocorticoid remediable aldosteronism GRA)	HT, serum K ↓, alkalosis, PRA ↓, aldosterone suppressible by dexamethasone	Chimerical gene containing promoter area of AS and coding region of 11βH(dominant)	Chimerical enzyme is regulated by ACTH
Apparent mineralocorticoid excess (AME)	HT, aldosterone ↓, serum K ↓, alkalosis, PRA ↓, suppressible by spironolactone	Absence of 11_HSD (recessive)	Impaired conversion of cortisol (activates MR) to cortisone (inactive at MR)
Hypertension exacerbated by pregnancy	HT accelerated in pregnancy, PRA ↓	Missense mutation in MR receptor (dominant)	Steroids without 21-hydroxyl group (progesterone) and spironolactone stimulate mutant MR receptor
Dominant pseudohypo- aldosteronism type I (PHA 1)	BP ↓, aldosterone ↑, neonatal salt wasting, serum K ↑, acidosis, renal phenotype disappears in adulthood	Mutant MR (usually dominant, but recessive variant identified)	Early in life, normal salt homoeostasis requires two normal copies of MR
Recessive pseudohypo- aldosteronism type I (PHA 1)	BP ↓, aldosterone ↑, neonatal salt wasting, serum K ↑, acidosis, phenotype does not improve with ageing, impaired clearance of lung water (respiratory failure)	Mutated α β or γ subunit of ENaC (recessive)	Loss of function of ENaC

Syndrome	Phenotype.	Mutation.	Mechanism
Pseudohypoaldosteronism type 2 (PHA 2) Syndrome	HT, serum K ⁺ ↑, PRA ↓, normal renal function Phenotype	Mutations in at least one of 3 genes mapped to 1q31-42, 12p13, and 17p11-q21(dominant) Mutation	Volume-expanded HT, probably due increased renal tubular sodium reabsorption Mechanism
Liddle syndrome	Early onset HT, aldosterone ↓, serum K ⁺ ↓, alkalosis, PRA ↓	Mutations of β or γ subunit of ENaC (dominant)	Increased ENaC activity due to reduced ENaC clearance
Hypertension with brachydactyly	Severe HT, abnormal skeletal development of hand, stroke	Mutations mapped to 12p11.2-12.2 (dominant)	Unknown
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR _γ)	HT associated with insulin resistance or diabetes, responsiveness to thiazolidinediones	Missense mutation (dominant)	Desensitisation of PPAR _γ receptor
Defective aldosterone synthesis	BP ↓, aldosterone ↓, Nalloss, K ⁺ retention	Deficient AS or 21 hydroxylase (recessive)	Aldosterone deficiency
Gitelman's syndrome	BP ↓, serum Mg ²⁺ ↓, serum K ⁺ ↓, alkalosis, hypocalciuria, PRA ↑, aldosterone ↑	Mutation of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter in the distal collecting duct (recessive)	Loss of function
Bartter's syndrome	BP ↓, serum K ⁺ ↓, alkalosis, hypercalciuria, PRA ↑, aldosterone ↑	Mutation in ion transporters in thick ascending limb of Henle: Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ , ATP-sensitive K ⁺ channel, or Cl ⁻ channel	Loss of function

表 3-2 近年來高血压研究全基因组扫描结果:

作者	人群	表型	参加者	结果
Krushkal et al	USA	SBP	69discordant sibpairs. White Americans	2p (57 - 59cM); 5q (188 - 192cM) 6q (134 - 155cM); 15q (84 - 101cM)
Xu et al	China	SBP; DBP	207 discordant sibpairs, 258 high concordant sib-pairs and 99 low concordant sibpairs	3p (5.5 cM) (SBP); 11q (63 cM) (SBP) 16q (64 cM) (SBP); 17p (23.5 cM) (SBP); 15q (105 cM) (DBP)
Sharma et al	UK	Hypertension	169 ASPs with early hypertension(<50y). Whites	11q (126 cM)
Hsueh et al	USA	SBP; DBP	28 large pedigrees (436parent-offspring trios, 1326 sibpairs, 1342 avuncular pairs, 1311 first cousin pairs). Amish	2q (205 - 224 cM) (SBP& DBP)
Rice et al	Canada	SBP; DBP	206 nuclear families	1p (87 - 120 cM) (SBP); 2p (96 - 115cM) (SBP); 5p (14 - 46 cM) (SBP); 7q (135 - 150 cM) (SBP); 19p (3 - 7 cM) (SBP)

作者	人群	表型	参加者	结果
Pankow et al	USA	Postural change in SBP or DBP	498 hypertensive sibpairs	18q (66 - 89 cM) (SBP); 6p (34 - 42cM) (SBP & DBP)
Levy et al	USA	Longitudinal SBP and DBP	332 white families (993 parent-offspring trios, 1548 sibpairs, 468 avuncular pairs, 742 first cousin pairs)	17q (60 - 76 cM) (SBP & DBP); 17q (90 - 100 cM) (SBP); 18p (7 cM) (DBP)
Perola et al	Finland	Hypertension	47 ASPs with onset $\leq$ 50 y in at least one sib	1q (170 cM); 2q (184 cM); 3q (165cM); 22q (32 cM); Xp (43 cM)
Zhu et al	China	Hypertension	1273 ASPs with hypertension diagnosed before age 60 y Han Chinese.	2q (140 - 165 cM)
Atwood et al	USA	SBP; DBP	495 individuals in 10 large unselected Mexican American pedigrees	18q (116 cM) (SBP); 21q (37 cM) (SBP); 2p (103 cM) (DBP); 8q (164cM) (DBP)

作者	人群	表型	參加者	結果
Allayee et al	Holland	SBP; DBP	18 extended Dutch families (561 individuals) with familial combined hyperlipidemia	4p (13 - 43 cM) (SBP); 19p (0 - 10 cM) (SBP); 6q (80 - 102 cM) (DBP); 8p (44 cM) (DBP)
Harrap et al	Australia	SBP; DBP	274 adult sibpairs. White	1p (65 - 95 cM) (SBP); 4q (95 - 132 cM) (SBP); 16p (40 - 62 cM) (SBP); X (37 - 52 cM) (SBP)
Rice et al	USA	SBP; DBP	114 African American families (including 138 sib-pairs); 99 White American families (including 370 sibpairs)	2p (86 cM) (SBP) (African Americans); 3p (5 cM) (SBP) (whites); 3q (201 cM) (SBP) (whites); 11q (85 cM) (SBP) (whites); 19p (48.5 cM) (SBP) (African Americans); 12q (95cM) (DBP) (African Americans)
Kristjansson et al	Iceland	Hypertension	120 families with 490 affected subjects (906 related pairs of varying degrees)	18q (80 - 94 cM)

作者	人群	表型	参加者	结果
Hunt et al	USA	Hypertension; SBP; DBP	2959 individuals in 401 families. White Americans	1q (192 cm) hypertension); 6q(89 cm) (SBP); 7p (58 cm) (hypertension); 7q (127cm) (hypertension); 12q (83 cm) (hypetension); 15q (103cm) (hypertension)
Angius et al	Sardinia	Hypertension	Selected subjects from a largeextended pedigree containing 35 hypertensives	2p (26.5 - 27.1 cm)
Thiel et al	USA	SBP; DBP	514 pairs (sib or half-sib) in 211 Afro-American families; 394 pair (sib or half-sib) in 160 white families.	1q (168 - 170 cm) (DBP) (whites); 11q (76 cm) (SBP) (whites); 3q (119 cm) (DBP) (whites)
Rao et al	USA	Hypertension	3403 individuals (1818 ASPs) in 489 white and 599 Afro-American families	2p (63 cm) (Afro-American)

作者	人群	表型	参加者	结果
Kardia et al	USA	Hypertension	989 ASPs in 229 Afro-American and 251 white families with hypertension diagnosed before age 60 y	None
Ranade et al	USA, Hawaii, Taiwan	Concordance or discordance for hypertension or low BP	1123 Chinese sibpairs and 302 Japanese sibpairs (661 concordant for hypertension, 184 concordant for low BP and 580 discordant)	9q (163 cM) (low BP); 10p (30cM) (concordant and discordant sibpairs) 14q (92 cM) (hypertension)

致 谢

值此论文完成之际，谨向敬爱的导师顾东风教授表示衷心感谢。导师渊博的学识、严谨的工作作风、求实的科学态度、孜孜以求的钻研精神，耳濡目染之中使我受益匪浅，将在今后的工作和学习中获益终生。

衷心感谢导师组张红叶教授几年来对我的培养和教诲。几年来张红叶教授对我学习、生活的各个方面给与了无微不至的关心，她在心血管流行病学和遗传流行病学研究中孜孜以求的钻研精神，勤勤恳恳的工作态度是我永远学习的榜样。

衷心感谢导师组黄晓红教授在我课题完成的整个过程都给予了悉心的指导和无私的帮助，倾注了大量的心血。

特别感谢中德实验室惠汝太教授对课题的关心和我工作、学习的指导和帮助。

本课题的完成凝聚了集体的智慧和心血。感谢中德实验室叶珏老师给予的帮助和指导，感谢中德实验室宋丽、鞠振宇、宋燕、邹玉宝、张伟丽、甄一松在课题完成过程中给予的无私帮助。感谢群体遗传学及人群防治研究室王晓玲、杨文杰、赵建功、葛东亮、宿少勇、严卫丽在实验和统计方面给予的支持和帮助！

衷心感谢教育处金铭处长、牛雨老师，人事处侯健处长在学习、工作和生活方面给予我无私的关心、支持和帮助，在此致以深深的谢意！

感谢所有给予我帮助和支持的老师、同学和朋友！

最后谨以此文奉献予我关怀备至的父母和家人，无私之亲情永远是激励我前进的动力。

个人简历

一、个人资料

姓名：孙凯

性别：男

出生年月：1971.03

民族：汉

二、工作和学习经历

1989.9—1994.7 山东医科大学预防医学系，获学士学位

1994.9—1998.7 山东济宁卫生学校 教师

1998.9— 中国协和医科大学阜外心血管病医院，攻读博士学位