

ANP 和 NPR - C 基因多态性与高血压病的相关性研究

胡大春 邵剑春 赵晓丽 王 玮 钱 净 陈爱华 张鸿青 郭 皓 蒋 杰 李海燕

摘 要 **目的** 探讨 ANP 和 NPR - C 基因多态性与高血压病的相关性。**方法** 用病例 - 对照相关性研究,选择 3 代居住云南的汉族为研究对象,用基因芯片技术,对 100 例高血压病患者及 97 例健康对照者进行 ANP T2238C 和 NPR - C A - 55C 位点基因多态性分析。**结果** (1) 云南汉族 97 例健康人群中 ANP T2238C 位点的 TT、TC 基因型频率分别是 0.959、0.041,未检出 CC 基因型;T 和 C 等位基因频率分别是 0.979、0.021。(2) NPR - C A - 55C 的 AC、CC 基因型频率分别是 0.763、0.237,未检出 AA 基因型;A 和 C 等位基因频率分别是 0.381、0.619。(3) ANP T2238C(TT、TC、CC)基因型多态性频率与对照组比较,差异无显著性意义。(4) NPR - C A - 55C 位点的 CC 基因型频率(0.540)与对照组(0.237)比较差异有极显著性意义($\chi^2 = 18.973$, $P = 0.000$),OR = 3.777 (95% CI:2.050 ~ 6.960)。**结论** 云南汉族 NPR - C A - 55C CC 基因型可能与高血压病易感性相关。

关键词 高血压病 心钠素 钠肽受体 C 基因多态性 相关性

Association between the Polymorphisms of Candidate Genes ANP /NPR - C and Essential Hypertension. Hu Dachun, Shao Jianchun, Zhao Xiaoli, Wang Wei, Qian Jing, Chen Aihua, Zhang Hongqing, Guo Hao, Jiang Jie, Li Haiyan. Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Kunming, The Key Clinical Molecular Biology Laboratory of Kunming, Yunnan 650011, China

Abstract Objective To investigate the association between the polymorphisms of candidate genes (including ANP and NPR - C) and essential hypertension (EH). **Methods** The strategy was case - control association study. The population studied was the living people of Han nationality in Yunnan of China. The specific genotypes for ANP T2238C and NPR - C A - 55C were isolated using genic microarray chip in 100 patients with EH and 97 healthy controls. The relative risk of hypertension was estimated by Odd Ratio. **Results** (1) In the control group of the Han's living in Yunnan, the frequencies of the TT and TC genotypes were 0.959, 0.041 respectively, and the genotype CC was not detected, and the frequencies of T and C alleles were 0.979, 0.021 respectively, for ANP T2238C. (2) The frequencies of the AC and CC genotypes were 0.763, 0.237 respectively, and the genotype AA was not detected, and the frequencies of A and C alleles were 0.381, 0.619 respectively, for NPR - C A - 55C. (3) There was no significant difference in terms of the frequencies of genotypes for ANP T2238C (TT, TC, CC) between the patients and the controls. (4) The frequency (0.540) of CC for NPR - C A - 55C in the patients was significant higher than that in the controls (0.237) with $\chi^2 = 18.973$, $P = 0.000$, OR = 3.777 (95% CI:2.050 ~ 6.960). **Conclusion** The genotype CC for NPR - C A - 55C is associated with the susceptibility to EH.

Key words Essential hypertension; Atrial natriuretic peptide; Natriuretic peptide clearance receptor; Polymorphism; Association

心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 是钠肽家族的 3 个成员之一。可通过与其受体结合,改变环磷酸腺苷 (cAMP) 或环磷酸鸟苷 (cGMP) 等信号分子水平,或影响离子通道,参与多种生理功能,包括血压的调节、孕酮的分泌,肾素、抗利尿激素及内皮素的释放等,具有强大的利钠/利尿、舒张血管、降低血压以及对抗肾素 - 血管紧张素系统和其他一些激素的作用^[1]。ANP 基因位于 1 号染色体短臂 36.2 区域 (1p36.2),有 3 个外显子^[2]。转基因动物实验研究显示,血液 ANP 水平从正常的 10 倍增加到 100 倍

时,血压降低 20 ~ 28 mmHg,这种降压作用可能是外周血管阻力的降低所致。相反,基因敲除动物随着 ANP 水平的降低,发展成为钠敏感高血压^[3]。不能活化鸟苷环化酶的钠肽受体 C (natriuretic peptide clearance receptor, NPR - C) 广泛分布于血管平滑肌细胞、肾小球、脑垂体、肾上腺、血小板等多种组织,并与 ANP 有很强力的亲和力,其基因位于 5 号染色体短臂 14 - 13 区域 (5p14 - p13),有 8 个外显子^[1,3]。NPR - C 基因敲除的纯合子动物,血压较对照组降低 8 mmHg^[3]。但 ANP T2238C 和 NPR - C A - 55C 位点基因多态性与高血压病的相关性鲜见报道。本课题用基因芯片技术,分析了 97 例健康对照者及 100 例高血压病患者的 6 个高血压病相关基因的多态性 (共 18 个位点),探讨了它们与高血压病的相关性。现将

基金项目:昆明市重点科技计划项目 (昆科计字 04S06013 - 03)

作者单位:650011 昆明市临床疾病分子生物学重点实验室/昆明市第一人民医院

其中 ANP T2238C 和 NPR - C A - 55C 位点基因多态性与高血压病相关性研究的内容报道如下。

材料与方法

1. 研究对象:研究对象入选条件:a. 云南汉族的界定:父系、母系 3 代均为汉族,均居住在云南境内。b. 病例组:云南汉族,参照 2004 年《中国高血压防治指南》,用以下标准筛选高血压病研究对象:①至少连续 3 次收缩压 (SBP) $\geq 140\text{mmHg}$ (18.62kPa) 和 (或) 舒张压 (DBP) $\geq 90\text{mmHg}$ (11.97kPa),或近期接受抗高血压药物治疗至少 1 年;②30 ~ 70 岁以内患高血压病;③无临床或实验室信息提示有继发性高血压。c. 对照组:云南汉族,与病例组无血缘关系,SBP $< 140\text{mmHg}$ (18.62kPa) 和 (或) 舒张压 DBP $< 90\text{mmHg}$ (11.97kPa),无高血压病家族史,年龄 ≥ 40 岁。

2. 样本含量的估计:根据文献等位基因多态性频率分布和对高血压病的相对危险度,估计病例组和对照组样本含量各需 89 例。

3. 样本来源:病例组:从 2002 年 1 月 ~ 2007 年 3 月在笔者医院住院和门诊就诊的患者中抽取了符合样本入选条件的 100 例高血压患者作为研究对象。对照组:从同期来笔者医院进行健康体检者中抽取符合对照组入选条件的 97 例健康者作为对照组。

4. 病例组和对照组的基本特征检测指标:性别、年龄、体重指数 (BMI)、高血压病史、收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP)、血清总胆固醇 (TC)、血清三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL - C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL - C)、空腹血糖 (FPG)。

5. 基因多态性检测:用上海百傲生物技术有限公司提供基因芯片检测 ANPT2238C (TT、TC、CC) 和 NPR - C A - 55C (AA、AC、CC) 位点基因多态性。按基因芯片操作说明书进行操作。主要仪器:离心机为上海安亭产品,型号:centrifuge TGL - 16G。核酸蛋白检测仪为 eppendorf 产品,型号:Biophotometer。PCR 扩增仪为 BIO - RAD 公司产品,型号:MyCycler™。生物芯片识读器为上海百傲生物技术有限公司产品,型号:Biochip Reader。基因分析软件由上海百傲生物技术有限公司提供。

6. 统计学分析:用直接计数法计算 ANP T2238C 和 NPR - C A - 55C 位点基因型或等位基因的人群分布频率。样本的代表性用基因型多态性频率的 Hardy - Weinberg 平衡 χ^2 检验。基因多态性分布频率的比较用 χ^2 检验。用 Odd Ratio (OR) 估计相对危险度。显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。计数资料、计量资料用 SPSS13.0 统计软件包完成。

结 果

1. 病例组和对照组的基本特征:100 例云南汉族高血压病患者和 97 例健康对照的基本特征见表 1。高血压病组和对照组的高血压病史、收缩压和舒张压差异有极显著性意义 ($P < 0.01$);HDL - C、LDL - C

和 FPG 差异有显著性意义 ($P < 0.05$);其余特征差异无显著性意义。

表 1 100 例云南汉族高血压病患者和 97 例健康对照的基本特征

项目	病例组 (n = 100)	对照组 (n = 97)
性别 (男性/女性)	48/52	42/55
年龄 (岁)	57.71 $\pm$ 9.97	55.05 $\pm$ 10.64
BMI (kg/m ²)	23.79.5 $\pm$ 2.99	24.24 $\pm$ 4.50
病史 (岁)	7.72 $\pm$ 4.73	0.00 ^{△△}
SBP (mmHg)	171.47 $\pm$ 13.01	115.66 $\pm$ 10.99 ^{△△}
DBP (mmHg)	100.74 $\pm$ 8.34	73.49 $\pm$ 8.15 ^{△△}
TC (mmol/L)	4.91 $\pm$ 0.80	4.83 $\pm$ 0.78
TG (mmol/L)	1.78 $\pm$ 0.93	1.88 $\pm$ 1.35
HDL - C (mmol/L)	1.25 $\pm$ 0.29	1.51 $\pm$ 0.59 [△]
LDL - C (mmol/L)	2.91 $\pm$ 0.73	2.46 $\pm$ 0.83 [△]
FPG (mmol/L)	5.40 $\pm$ 1.78	4.75 $\pm$ 0.57 [△]

[△] $P < 0.05$; ^{△△} $P < 0.01$

2. 基因型多态性频率的 Hardy - Weinberg 平衡检验:高血压病和对照组 ANP T2238C (TT、TC、CC) 和 NPR - C A - 55C (AA、AC、CC) 基因型多态性频率的 Hardy - Weinberg 平衡检验, $P > 0.05$, 样本有代表性。

3. 云南汉族 ANP T2238C 和 NPR - C A - 55C 基因型及等位基因与高血压病的相关性:100 例云南汉族高血压病患者 ANP T2238C 和 NPR - C A - 55C 6 个位点的基因型和等位基因多态性频率分布见表 2。云南汉族 100 例高血压病患者中, ANP T2238C (TT、TC、CC) 基因型多态性频率与对照组比较, 差异无显著性意义。NPR - C A - 55C 位点的 CC 基因型频率 (0.540) 与对照组 (0.237) 比较差异有极显著性意义 ($\chi^2 = 18.973, P = 0.000$), OR = 3.777 (95% CI: 2.050 ~ 6.960), $M - H$ 检验 $\chi^2 = 17.632, P = 0.000$; C 等位基因频率 (0.770) 与对照组 (0.619) 比较差异有极显著性意义 ($\chi^2 = 10.663, P = 0.0010$)。

讨 论

钠肽 (natriuretic peptides, NP) 家族有 3 个成员, 它们分别是 ANP、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 和 C 型钠肽 (C - type natriuretic peptide, CNP)。ANP 于 1984 年由 de Bold 等和 Kangawa 等人^[4] 从人和大鼠的心房组织中分离到, 由 28 个氨基酸组成, 现称心钠素。正常情况下, ANP 主要由心房组织合成与分泌, 心房张力增加时, ANP 分泌增加。ANP 可通过与其受体结合, 改变 cAMP 或 cGMP 等信号分子水平, 或影响离子通道, 参与包括血压的调节、孕酮的分泌, 肾素、抗利尿激素及内皮素的释放等多种生理功

表 2 云南汉族高血压病与对照组 ANP/NPR - C 基因型和等位基因多态性频率

基因型/等位基因	对照组 (n = 97)		病例组 (n = 100)		χ^2	P
	n	GF/AF	n	GF/AF		
ANP T2238C					0.181	0.6700
TT	93	0.959	97	0.970		
CT	4	0.041	3	0.030		
CC	0	0.000	0	0.000		
NPR - C A - 55C					18.973	0.0000
AA	0	0.000	0	0.000		
AC	74	0.763	46	0.460		
CC	23	0.237	54	0.540		
ANP T2238C					0.178	0.6730
T	190	0.979	197	0.985		
C	4	0.021	3	0.015		
NPR - C A - 55C					10.663	0.0010
A	74	0.381	46	0.230		
C	120	0.619	154	0.770		

能。钠肽受体分为 2 个主要类型,一类为能活化鸟苷环化酶的钠肽受体 A(NPR - A)与钠肽受体 B(NPR - B);另一类为不能活化鸟苷环化酶的 NPR - C^[1]。NPR - C 以单体(monomers, 66kDa)和二聚体(dimers, 130kDa)形式存在,广泛分布于血管平滑肌细胞、肾小球、脑垂体、肾上腺、血小板等多种组织。NPR - C 可与 BNP 和 CNP 结合,但与 ANP 亲和力最强^[1]。传统认为, NPR - C 仅起到对钠肽的清除作用^[5]。新近的研究显示 NPR - C 与腺苷环化酶 cAMP 信号系统偶联,并发挥复杂的生理功能^[1]。NPR - C 水平影响着血浆钠肽的水平、ANP 的半衰期、利钠效应和血压水平等。在细胞水平, NPR - C 可直接调节钠肽的生理效应。由于钠肽家族及其受体通过强大的利钠利尿、舒张血管、对抗肾素 - 血管紧张素系统等机制,在血压调节中发挥着重要作用。其基因突变,有可能会影响相关钠肽的转录和蛋白翻译,改变其受体 - 配体的结合能力,从而导致血压升高的发生。因此,钠肽及其受体的基因多态性引起了人们的关注,成为高血压病的重要候选基因。

对转基因动物和基因敲除动物的实验研究均显示,随着血液 ANP 水平升高或降低,血压发生与 ANP 水平相反方向的改变^[3]。对 ANP 基因的研究发现,存在 5'非编码区 - 664 处 C→G 突变、外显子 1 内 G191A 和 D/I 突变、外显子 2 内的 C1364A 突变、外显子 3 内的 T1766C 突变、T2238C 突变等。对 - 664 处 C→G 突变、G191A、C1364A、T1766C 多态性的研究发现, - 664C 纯合子基因型在原发性高血压中的频率较高;1364A 等位基因频率在非洲籍美国人中较

高,但在中国人中并未发现其与盐敏感有关^[3]。目前国内外文献中未见 T2238C 突变与高血压病相关性的研究报道。本研究结果显示,云南汉族高血压病组和对照组人群中的 ANP T2238C 多态性 C 等位基因频率分别为 0.015 和 0.021,未检测到 CC 基因型。Maggie C. Y. Ng 等^[6]报道香港中国人 ANP T2238C 位点 C 等位基因频率为 0.007。鉴于 ANP 基因 T2238C 位点突变在所研究的人群中发生率很低,推测其等位基因多态性在高血压病的发病机制中作用可能不大,这也许是目前难以见到 ANP 基因 T2238C 突变与高血压病相关性研究报道的部分原因。

1999 年, Sarzani R 等对 NPR - C 基因的研究发现,在 5'非编码区 - 55 处存在 A→C 突变(NPR - C A - 55C);在转录起始位点上游 4 个核苷酸处,存在 6 个核苷酸长度的随机重复多态性(variable number of tandem repeat, VNTR)。对这些多态性的研究发现,在 NPR - C A - 55C 多态性中, - 55C 纯合子基因型携带者 ANP 水平较低,而收缩压较高;VNTR 多态性中, 5/6 基因型携带的高血压患者中,血压水平较高^[3]。本研究结果显示 NPR - C A - 55C 位点的 CC 基因型频率(0.540)是对照组(0.237)的 2 倍以上,相对危险度 OR 达到 3.777 (95% CI: 2.050 ~ 6.960), NPR - C A - 55C 位点突变显示出与高血压病有较强的正性相关,提示 NPR - C A - 55C 位点突变可能参与了高血压病的发生,其机制尚不清楚。但根据 Sarzani R 等的研究结果(- 55C 纯合子基因型携带者 ANP 水平较低,而收缩压较高)及 NPR - C 的生理功能之一是清除血浆 ANP,可以推测 NPR - C A - 55C 位点基因突变,可能会影响到 NPR - C 的表

达,或许是使 NPR - C 的表达上调,进而使 ANP 水平降低,导致血压的升高,确切病理机制有待于进一步深入探讨。

参考文献

- 1 Madhu B. Anand - Srivastava. Natriuretic Peptide Receptor - C Signaling and Regulation. *Peptides*,2005,26:1044 - 1059
- 2 Nemer M, Chamberland M, Sirois D, *et al.* Gene Structure of Human Cardiac Hormone Precursor, Pronatriodilatin. *Nature*,1984,312:654 - 656
- 3 Tomohiro N. The Genetic Contribution of the Natriuretic Peptide System to Cardiovascular Diseases. *Endocrine Journal*,2005, 52: 11 - 21
- 4 Kangawa K, Matsuo H. Purification and Complete Amino Acid Se-

quence of alpha - Human Atrial Natriuretic Polypeptide (alpha - hANP). *Biochemistry Biophysics Research Communication*,1984,118: 131 - 139

- 5 Potter LR, Sarah AH. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate - Dependent Signaling Functions. *Endocrine Reviews*,2006,27:47 - 72
- 6 Maggie CY Ng, Wang Y, So WY, *et al.* Ethnic Differences in the Linkage Disequilibrium and Distribution of Single - Nucleotide Polymorphisms in 35 Candidate Genes for Cardiovascular Diseases. *Genomics*,2004, 83:559 - 565

(收稿:2010 - 03 - 22)

清胰汤对急性胰腺炎患者腹腔内压力增高的治疗作用

张立军 于则利 夏 峰

摘 要 目的 评价清胰汤对急性胰腺炎患者腹腔内高压状态的治疗作用;探讨对急性重症患者特别是Ⅱ型病例采取外科手术干预的最佳时机,以减少多脏器衰竭、腹腔内感染等严重并发症,提高重症胰腺炎患者的生存率。**方法** 分析笔者医院自 2001 年 1 月 ~ 2008 年 12 月期间诊治的 216 例急性胰腺炎的临床资料,其中重症胰腺炎患者 76 例(Ⅰ型 50 例、Ⅱ型 26 例),全部患者均测定结合应用清胰汤的综合治疗前后的腹腔内压力变化,并与病因、临床资料等分析腹腔内压力的改变与病程进展情况及预后的关系。**结果** 轻型急性胰腺炎患者的腹腔内压力为 0 ~ 10cm 水柱,均值 3.5 ± 1.8 cm 水柱;重症患者的腹腔内压力为 5 ~ 30cm 中,均值 16.5 ± 3.8 cm 水柱;两组有显著性差异。结合清胰汤的综合保守治疗后,轻型急性胰腺炎患者的腹腔内压力在 3 ~ 10 天内降至正常,平均值 3.8 ± 1.5 天;重症Ⅰ型患者的腹腔内压力在治疗后 7 ~ 14 天后,47 例降至正常,均值 6.5 ± 3.8 天,3 例患者中转手术治疗,2 例死亡;在Ⅱ型病例,7 ~ 14 天内降至正常者为 11 例,15 例患者仅降至 5 ~ 18cm 水柱,8 例患者进行了手术治疗,死亡 4 例。3 组资料的两两比较有显著性差异。**结论** 急性胰腺炎患者均可出现腹腔内压力增高,但轻型与重型患者腹腔内压力增高程度及持续时间有显著差异,重症急性胰腺炎的患者合并腹腔内压力增高症的患者预后不佳,腹腔内压力显著而持续的增高可作为评价是否早期手术干预治疗的指标之一。清胰汤对于腹腔内压力的降低有较明显的效果,可能改善 SAP 的预后。

关键词 急性胰腺炎 急性重症胰腺炎 腹腔内压力 腹腔内高压症 清胰汤 预后

Effect of Chinese Traditional Medicine Qingyitang on the Intra - abdominal Pressure in Patients with Acute Pancreatitis. Zhang Lijun, Yu Zeli, Xia Feng. *Department of General Surgery, Beijing Tongren Hospital, Affiliated to Capital University of Medicine Science, Beijing 100730, China*

Abstract Objective To observe the effect of Chinese traditional medicine Qingyitang in reducing the increased intra - abdominal pressure in patients with severe acute pancreatitis(SAP), and analyze the correlation with the intra - abdominal pressure in order to select time for operation for cases with SAP. **Methods** From Jan 2001 to Dec 2008,216 patients with acute pancreatitis(AP) admitted to our hospital were selected prospectively. According to the value of urinary bladder pressure measurement, we divided the whole patients into three groups (Mild, SAPⅠ and SAPⅡ). Intra - abdominal pressure before and after Qingyitang using was monitored by stomach tube or via - rectum based on conservative therapy, respectively. The risk factors and prognosis of intra - abdominal hypertension were analyzed to promote the recognition of abdominal compartment syndrome and treat it timely. **Results** The level of UBP was significantly high in patients with AP in all groups, and the intra - abdominal pressure score of patients with SAP significantly increased in SAPⅡ groups. IAP in all IAH patients was decreased after being treated with Qingyitang. The number of the emergency operation and the complications in IAH group (IAP > 20cm) were significantly much more than those of lower IAH group (IAP 11 ~ 20cm; IAP 0 ~ 11cm). **Conclusion** Intra - abdominal hypertension has strong correlation with prognosis of SAP, and maybe is one of indicators for surgical approach. The Chinese traditional medicine Qingyitang can decrease the intra - abdominal pressure in cases with AP, and would contributed to reducing sig-