

· 论 著 ·

## 宁夏回族人群 eNOS 基因多态性与原发性高血压关联性分析\*

杨波,夏晶,纳小菲,李敏

(宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室,银川 750021)

**摘要:**目的 探讨在宁夏地区回族人群中 eNOS 基因 4 个 SNP 位点与原发性高血压(EH)的关联性。方法 采用 PCR-RFLP 方法对 134 例 EH 患者及 115 例健康个体 eNOS 基因 rs2070744(T>C)、rs1799983(G>T)、rs1800780(A>G)和 rs3918181(A>G)共 4 个 SNP 位点进行检测。EH 组与对照组间基因型频率、等位基因频率的差异比较采用  $\chi^2$  检验,并采用 SHEsis 在线分析软件对单倍型进行分析。结果 EH 组和健康对照组间,rs1800780 位点和 rs1799983 位点基因型频率的分布差异有统计学意义( $P<0.05$ )。rs1799983 位点等位基因频率的分布差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其等位基因 G 的频率在 EH 组低于健康对照组,且 OR 值为 3.851(95%CI:2.236~6.631)。4 个 SNP 位点共检出 15 种单倍型,其中单倍型 CGAG、TTAG、TGGG、TTGG、TTGA 在宁夏回族健康人群及 EH 患者中差异有统计学意义( $P<0.05$ )。单倍型 CGAG、TGGG 的 OR 值为 0.352、0.600,95%CI 小于 1;单倍型 TTAG 的 OR 为 2.689,95%CI 大于 1。结论 rs1799983 位点等位基因 G 为宁夏回族人群易患 EH 的危险因子,单倍型 CGAG 与 TGGG 可降低回族 EH 的患病风险,而单倍型 TTAG 可增加回族 EH 的患病风险。

**关键词:** eNOS 基因;原发性高血压;宁夏;回族;SNP

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.23.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)23-2697-03

## Association between four SNPs of eNOS gene and EH in Ningxia Hui population\*

Yang Bo, Xia Jing, Na Xiaofei, Li Min

(Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

**Abstract:** Objective To investigate the correlation between 4 SNPs of eNOS gene and EH in Ningxia Hui population, and to provide theory basis for taking precautions against. Methods Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) genotyping method were carried out to examine SNPs at rs2070744(T>C), rs1799983(G>T), rs1800780(A>G) and rs3918181(A>G) sites of eNOS gene, including 134 EH patients and 115 healthy individuals in Ningxia Hui population. For EH patient-control haplotype analyses, SHEsis online haplotype analysis software was applied. Results The genotypic frequencies of rs1800780 and rs1799983 had significant difference between patients group and normal group( $P<0.05$ ); The allele frequency of rs1799983 had significant difference between patients group and normal group( $P<0.05$ ); and the frequency of G allele in EH group was less than healthy controls, which OR value was 3.851(95%CI:2.236-6.631). According to the four SNP sites 15 kinds of haplotype were detected, of which haplotype CGAG, TTAG, TGGG, TTGG, TTGA in Ningxia Hui healthy people and in patients with EH had a statistics difference( $P<0.05$ ). haplotype CGAG, TGGG OR of 0.352, 0.600, 95%CI less than 1; haplotype TTAG OR 2.689, 95%CI greater than 1. Conclusion haplotype with the emergence of CGAG, TGGG may reduce the risk of EH Hui nationality. haplotype the emergence of TTAG may increase the risk of EH Hui nationality.

**Key words:** eNOS gene; EH; Ningxia; Hui nationality; SNP

原发性高血压(essential hypertension, EH)主要受环境和遗传因素的共同影响。其中遗传因素,即易感基因可能对高血压病的发生起决定性作用,占 30%~70%<sup>[1]</sup>。近年研究发现内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因多态性与 EH 的发生有关,eNOS 于血管内产生 NO 及协助调节血管功能。

宁夏是中国最大的回族聚居区,由于其风俗习惯受伊斯兰教的影响,要求婚姻中男女双方必须都是穆斯林,即“回回通婚”,因此,宁夏回族形成了中国独特的遗传资源。以往对宁夏回族人群的群体遗传学研究结果表明,宁夏回族的遗传结构与其他地区民族间存在一定的差异。本研究对宁夏回族健康人群与原发性高血压患者 rs2070744、rs1799983、rs1800780 和 rs3918181 共 4 个 SNP 位点进行检测,探讨这些位点的突变与宁夏地区回族人群 EH 易感性的关联性。

## 1 材料与方法

1.1 材料来源 收集宁夏不同地区回族体检健康人群及 EH

患者的外周静脉血样本,其中 EH 组 134 例(男 76 例,女 58 例),诊断参照 WHO 标准(1999 年)。正常对照组 115 例(男 76 例,女 39 例)。个体均无血缘关系,追溯 3 代均为回族,且在宁夏地区居住 3 代以上。

1.2 基因组 DNA 提取 常规酚/氯仿提取法提取基因组 DNA,溶于 TE 缓冲液中备用。

1.3 引物设计 根据 Genebank 中 eNOS 基因序列设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。rs2070744 位点扩增引物上游序列:5'-ATG CTC CCA CCA GGG CAT CA-3',下游序列:5'-GTC CCC GAG TCT GAC ATT AGG G-3'; rs1799983 位点扩增引物上游序列:5'-GAG ATG AAG GCA GGA GAC AGT-3',下游序列:5'-TCC ATC CCA CCC AGT CAA T-3'; rs1800780 位点扩增引物上游序列:5'-GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC-3',下游序列:5'-CAG GAT TGT CGC CTT CAC TC-3'; rs3918181 位点扩增引物上游序列:5'-CAA CAG TGC AGG TGA ATC TCA-3',下游序列:5'-CAA

\* 基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(NZ1042)。 作者简介:杨波(1970~),硕士,副教授,主要从事生物化学及分子生物学相关研究。

ACA TTA CCC GCA TCC T-3'。

**1.4 PCR 反应** 反应体系 15  $\mu\text{L}$ , 其中 DNA 模板(40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.3  $\mu\text{L}$ ,  $2\times$  Reaction Mix 7.5  $\mu\text{L}$ , Golden DNA Polymerase (2.5  $\text{U}/\mu\text{L}$ ) 0.12  $\mu\text{L}$ , 灭菌三蒸水 6.18  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min 后进行 30 个循环, 每个循环为: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57~65  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 PCR 产物 3  $\mu\text{L}$ , 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

**1.5 限制性内切酶** 限制性内切酶 NgoM $\text{IV}$ 、Ban $\text{II}$ 、Msp $\text{I}$ 、Rsa $\text{I}$  均购自美国 Fermentas 公司。

**1.6 酶切反应** 酶切体系均为 10  $\mu\text{L}$ 。包括 PCR 产物 4  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  酶切缓冲液 1  $\mu\text{L}$ , 限制性内切酶 3 U, 加灭菌三蒸水补充至 10  $\mu\text{L}$ 。酶切温度均为 37  $^{\circ}\text{C}$ , 反应时间均为 3 h; 取酶切产物 6  $\mu\text{L}$  用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

**1.7 基因型记录与分析** 各 SNP 位点酶切产物及所对应的基因型见表 1。

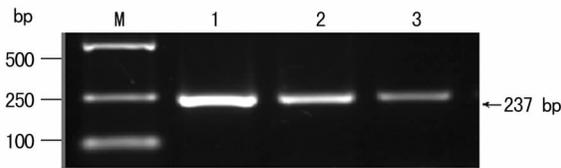
**1.8 统计学处理** 统计分析均采用 SPSS17.0 软件进行。各位点基因型频率的 Hardy-Weinberg 平衡符合度采用  $\chi^2$  检验。基因型频率、等位基因频率分布差异比较采用  $\chi^2$  检验。单倍型分析采用 SHEsis 在线分析软件(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)。

**2 结果**

**2.1 PCR 扩增结果** 各位点 PCR 结果分别见图 1~4。

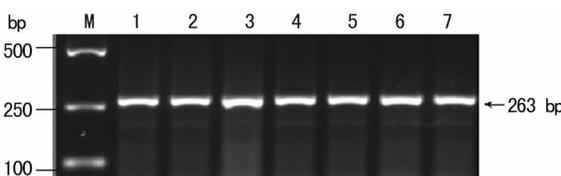
表 1 各位点不同基因型产生的酶切片段

SNPs	限制性内切酶	基因型	酶切片段(bp)
rs2070744(T>C)	NgoM $\text{IV}$	CT	237, 204, 33
		CC	204, 33
		TT	237
rs1799983(G>T)	Ban $\text{II}$	GT	263, 169, 94
		GG	169, 94
		TT	263
rs1800780(A>G)	Msp $\text{I}$	AG	266, 167, 99
		GG	167, 99
		AA	266
rs3918181(A>G)	Rsa $\text{I}$	AG	174, 150, 24
		GG	150, 24
		AA	174



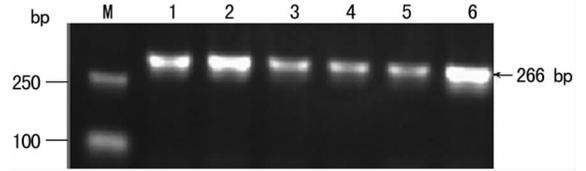
M: D2000 Marker; 1~3: PCR 产物。

图 1 rs2070744 位点 PCR 产物电泳图



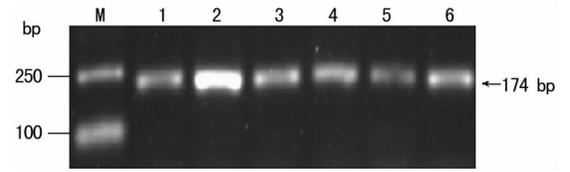
M: D2000 Marker; 1~7: PCR 产物。

图 2 rs1799983 位点 PCR 产物电泳图



M: D2000 Marker; 1~6: PCR 产物。

图 3 rs1800780 位点 PCR 产物电泳图



M: D2000 Marker; 1~6: PCR 产物。

图 4 rs3918181 位点 PCR 产物电泳图

**2.2 酶切结果** 各位点酶切结果见图 5~8(M: D2000 Marker, 各泳道上方字母为基因型), 均检出 3 种基因型。

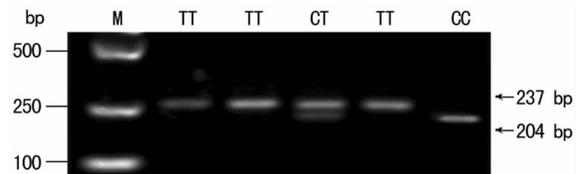


图 5 rs2070744 位点酶切图

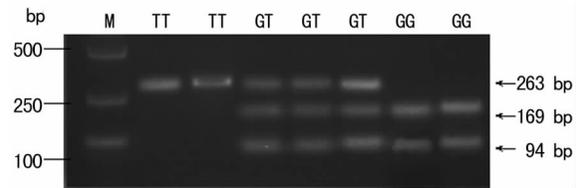


图 6 rs1799983 位点酶切图

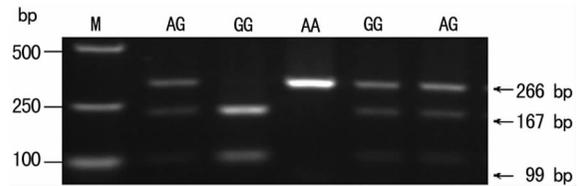


图 7 rs1800780 位点酶切图

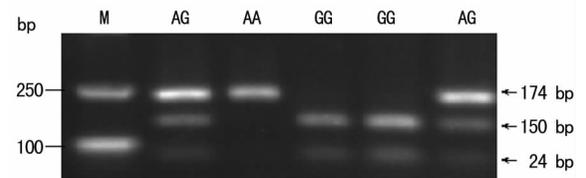


图 8 rs3918181 位点酶切图

**2.3 基因型与等位基因频率分布** 各 SNP 位点的基因型频率在 EH 组与对照组中的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 具有群体代表性。EH 组与对照组间基因型与等位基因频率的比较结果见表 2。在对照组与 EH 患者中, rs1800780 位点和 rs1799983 位点基因型频率的分布差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。rs1799983 位点等位基因频率的分布差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), rs1799983 位点等位基因 G 的频率在 EH 组 (74.3%) 低于对照组 (91.7%), 而等位基因 T 的频率在 EH 组 (25.7%) 高于对照组 (8.3%)。结果提示, rs1799983 位点等位基因 G 为宁夏回族人群易患 EH 的危险因子, 等位基因 T 为

表 2 EH 患者与对照组各 SNP 位点基因型频率与等位基因频率

SNPs	基因型或位点	对照组[n(%)]	EH 组[n(%)]	$\chi^2$	P	OR(95%CI)
rs2070744	TT	88(76.5)	116(86.6)	5.198	0.074	—
	CT	24(20.9)	14(10.4)	—	—	—
	CC	3(2.6)	4(3.0)	—	—	—
	C	30(13.0)	22(8.2)	3.094	0.079	0.596(0.334~1.066)
	T	200(87.0)	246(91.8)	—	—	1.677(0.938~2.998)
rs1799983	GG	97(84.3)	70(52.2)	28.961	0.000	—
	GT	17(14.8)	59(44.0)	—	—	—
	TT	1(0.9)	5(3.7)	—	—	—
	G	211(91.7)	199(74.3)	26.012	0.001	3.851(2.236~6.631)
	T	19(8.3)	69(25.7)	—	—	0.260(0.151~0.447)
rs1800780	AA	20(17.4)	19(14.2)	6.422	0.040	—
	AG	56(48.7)	86(64.2)	—	—	—
	GG	39(33.9)	29(21.6)	—	—	—
	A	96(41.7)	120(45.5)	0.690	0.406	1.163(0.814~1.662)
	G	134(58.3)	144(54.5)	—	—	0.860(0.602~1.228)
rs3918181	AA	15(13.0)	19(14.2)	0.482	0.786	—
	AG	40(34.8)	51(38.1)	—	—	—
	GG	60(52.2)	64(47.7)	—	—	—
	A	70(30.4)	89(33.2)	0.438	0.508	1.136(0.778~1.660)
	G	160(69.6)	179(66.8)	—	—	0.880(0.602~1.285)

—:表示无数据。

保护因子。rs2070744 位点及 rs3918181 位点基因型频率及等位基因频率的分布差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.4 单倍型分析** 对 rs2070744、rs1799983、rs1800780 和 rs3918181 位点单倍型进行分型,共检出 15 种单倍型,见表 3。其中单倍型 CGAG、TTAG、TGGG、TTGG、TTGA 在宁夏回族健康人群及 EH 患者中差异有统计学意义( $P<0.05$ )。单倍型 CGAG、TGGG 的 OR 值为 0.352、0.600,95%CI 小于 1;单倍型 TTAG 的 OR 值为 2.689,95%CI 大于 1;结果显示单倍型 CGAG 与 TGGG 的出现可能会减少回族 EH 的患病风险。单倍型 TTAG 的出现可能会增加回族 EH 的患病风险。

表 3 EH 患者与对照组间单倍型频率

单倍型	频率(%)		$\chi^2$	P	OR(95%CI)
	EH 组	对照组			
CGAG	0.036	0.097	7.371	0.006	0.352(0.161~0.770)
CTAG	0.016	0.005	—	—	—
CGAA	0.000	0.007	—	—	—
CTAA	0.000	0.009	—	—	—
CGGG	0.000	0.013	—	—	—
CGGA	0.028	0.000	—	—	—
TGAG	0.204	0.190	0.295	0.586	1.132(0.724~1.768)
TTAG	0.161	0.069	10.816	0.001	2.689(1.466~4.932)
TGAA	0.034	0.041	0.134	0.714	0.841(0.331~2.131)
TGGG	0.217	0.322	6.180	0.012	0.600(0.400~0.899)
TGGA	0.224	0.248	0.227	0.633	0.903(0.595~1.372)
CTGA	0.002	0.000	—	—	—
TTAA	0.012	0.000	—	—	—
TTGG	0.034	0.000	8.177	0.004	—
TTGA	0.032	0.000	7.724	0.005	—

—:表示无数据。

### 3 讨 论

eNOS 主要表达于平滑肌细胞、内皮细胞及巨噬细胞中<sup>[2]</sup>。是调控血管功能的关键,因为它既能产生让血管扩张的 NO,又能产生让血管收缩的超氧化物。

Senthil 等<sup>[3]</sup>认为位于 eNOS 基因启动区的 rs2070744(T>C)突变可能影响 eNOS 基因转录的起始过程,使 eNOS 基因合成减少,影响血压变化。Kajiyama 等<sup>[4]</sup>发现 eNOS 基因 rs2070744(T>C)变异与高血压无正性相关。本研究结果也显示 rs2070744(T>C)变异与宁夏回族人群高血压无关。国内 Li 等<sup>[5]</sup>发现 rs2070744(T>C)的 C 等位基因与中国汉族人 EH 相关。王丛等<sup>[6]</sup>也发现在蒙古人群中 2070744(T>C)等位基因与高血压相关。Jachymova 等<sup>[7]</sup>对捷克波西米亚地区的高加索人群中 119 例高血压患者和 85 例正常对照者 eNOS 的 rs1799983 多态性进行研究,发现 rs1799983 多态性与 EH 密切相关。国内 Zhang 等<sup>[8]</sup>研究认为 rs1799983(G>T)的 T 等位基因可能是中国新疆维吾尔族人群 EH 的易感基因。徐新娟等<sup>[9]</sup>研究发现 eNOS 基因 rs1799983 多态性可能与新疆巴里坤哈萨克族男性高血压有关,本研究结果也显示 rs1799983 多态性与宁夏回族人群高血压有关。牡丹华等<sup>[10]</sup>对 eNOS 基因 rs1800780 位点多态性与 EH 的相关性研究显示,rs1800780 位点多态性与 EH 的发生相关,本研究结果也显示 rs1800780 位点多态性与宁夏回族人群高血压的发生相关。rs3918181 位点多态性与 EH 的相关性研究较少,本研究结果显示 rs3918181 多态性与宁夏回族人群高血压无关。以上不同研究结果可能是由于宁夏回族长期受饮食结构、生活习惯、地域环境和遗传因素等影响,其遗传多态性与其他民族存在一定的差异。

本研究结果显示,rs1800780 位点和 rs1799983 位点基因型频率的分布差异有统计学意义。rs1799983 位点等位基因频率的分布差异有统计学意义,等位基因 G 为宁夏回族人群易患 EH 的危险因子。单倍型 CGAG、TTAG、TGGG、TTGG、TTGA 在宁夏回族健康人群及 EH 患者中(下转第 2702 页)

身的运动。如此看来,在已知初值和边界约束条件下,生命进化形成的“捕捉”运动感受的规定性所产生的感受器效应,就如同吸引子一样,在自然进化的法则下显得尤其的重要。激活生命体的自律性运动形成与生命系统结构的逐级分叉相关联的契合<sup>[18]</sup>,构成了自组织心理治疗最为关键的技术。值得注意的是,这种运动激活长程关联的有效性,可以精确地发生在从平衡到非平衡的过渡点上,这为引导性转变提供了可选择时机。有趣的是,个体的差异性为生命运动提供了多样化的选择,从这个角度出发,技术隐喻的关联不是主要的,而是机遇性的事情。

#### 参考文献:

- [1] 埃德蒙德·胡塞尔. 倪梁康,译. 逻辑研究(第二卷)[M]. 上海:上海译文出版社,1998:378-398.
- [2] J·皮亚杰. 生物学与认识[M]. 尚新建,译. 北京:生活·读书·新知三联书店,1989:4-6.
- [3] 外尔. 对称[M]. 冯承天,陆继宗,译. 上海:上海科技教育出版社,2005:24-40.
- [4] M. S. Gazzaniga. 认知神经科学-关于心智的生物学[M]. 周晓林,高定国,译. 北京:中国轻工业出版社,2011:17-38.
- [5] Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, et al. A default mode of brain function[J]. *Academy of Sciences of the United States of America*,2001,98(2):676-682.
- [6] Petridou N, Gaudes CC, Dryden IL, et al. Periods of rest in fMRI contain individual spontaneous events which are related to slowly fluctuating spontaneous activity[J]. *Human brain Mapping*,2013,34(6):1319-1329.
- [7] 郁伟林,李小青,汤伟军. 气功态时脑运动皮质低频活动同步性的静息 fMRI 研究[J]. *中国医学计算机成像杂志*,2005,11(6):370-373.
- [8] Moser EI, Kropff E, Moser MB. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system[J]. *Annual review of neuroscience*,2008,31(19):69-89.
- [9] Harrar V, Harris LR. Simultaneity constancy: detecting events with touch and vision[J]. *Experimental Brain Research*,2005,166(3-4):465-473.
- [10] 姜乾金. 医学心理学:理论、方法与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:20-21.
- [11] Thayer JF, Lane RD. Claude bernard and the heart-brain connection; further elaboration of a model of neurovascular integration[J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*,2009,33(2):81-88.
- [12] Eckel-Mahan KL, Patel VR, Mohny RP, et al. Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*,2012,109(14):5541-5546.
- [13] Fontana A, Copetti M, Mazzocchi G, et al. A linear mixed model approach to compare the evolution of multiple biological rhythms[J]. *Statistics in Medicine*,2013,32(7):1125-1135.
- [14] Anholt RRH, Mackay TFC. 行为遗传学原理[M]. 北京:科学出版社,2012:41-49.
- [15] Hasenkamp W, Wilson-Mendenhall CD, Duncan E, et al. Mind wandering and attention during focused meditation: a fine-grained temporal analysis of fluctuating cognitive states[J]. *Neuroimage*,2012,59(1):750-760.
- [16] Martin A, Nowak. 进化动力学:探索生命的方程[M]. 李镇清,王世畅,译. 北京:高等教育出版社,2010:157-176.
- [17] 埃尔温·薛定谔. 生命是什么[M]. 罗来欧,罗辽复,译. 长沙:湖南科学技术出版社,2011:1-16.
- [18] 伊·普里戈金,伊·斯唐热. 从混沌到有序:人与自然的对话[M]. 曾庆宏,沈小峰,译. 上海:上海译文出版社,2005:183-258.

(收稿日期:2013-03-08 修回日期:2013-04-22)

(上接第 2699 页)

差异有统计学意义。单倍型 CGAG 与 TGGG 可能会减少回族 EH 的患病风险。单倍型 TTAG 可能会增加回族 EH 的患病风险。

#### 参考文献:

- [1] 王芬,俞敏,何青芳. 原发性高血压候选基因多态性的分子流行病学研究进展[J]. *浙江预防医学*,2011,23(5):23-28.
- [2] 何念海,赵文利. 中国儿童感染性腹泻诊治进展[J]. *实用儿科临床杂志*,2010,25(22):1694-1696.
- [3] 连彩兰. 原发性高血压的发病机制[J]. *实用医技杂志*,2006,13(17):3119-3120.
- [4] Kajiyama N, Saito Y, Miyamoto Y, et al. Lack of association between T786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension[J]. *Hypertens Res*,2000,23(6):561-565.
- [5] Li DB, Hua Q, Pi L. The relationship of rs2070744 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to essential hypertension[J]. *J Capital Univer Med Sci*,2006,27(2):226-229.
- [6] 王丛,孙刚,闰旭龙,等. 蒙族高血压患者内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因多态性研究[J]. *中国分子心脏病学杂志*,2006,6(2):81-84.
- [7] Jachymova M, Horky K, Buhar J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2001,284(9):426-430.
- [8] Zhang LP, Wang SZ, Zhao XX, et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene(G894T) polymorphism and essential hypertension in uygurpopulations[J]. *Chin J Cardiol*,2006,34(5):403-407.
- [9] 徐新娟,汪师贞,林仁勇. 新疆哈萨克族高血压患者内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性研究[J]. *高血压杂志*,2004,12(2):131-134.
- [10] 牡丹华,吴江,高鹏,等. NOS3 基因多态性与合并高血压病的缺血性卒中关系的研究[J]. *中风与神经疾病杂志*,2008,25(2):132-134.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)