

瘦素受体基因多态性与云南地区人口高血压及代谢特征的相关性研究

李春城 王先梅 杨丽霞

【摘要】 目的:探讨瘦素受体(Lepr)基因多态性与云南地区汉族人高血压及其临床代谢特征的相关性。 方法:选取云南地区汉族高血压病住院患者 200 例,以体重指数分为超重高血压组 141 例和单纯高血压组 59 例两个亚组,同期选取正常对照组 100 例。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RELP)方法测定 Lepr 基因 Gln223Arg 和 Lys109Arg 多态性,ELISA 法测定血中瘦素水平。 结果:Gln223Arg 位点 A 等位基因的频率在超重高血压组明显高于单纯高血压组,并且有着更高的 BMI($P<0.01$)。超重高血压患者中携带 Lys109Arg 基因型 A 等位基因者低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)高于 G 等位基因者($P<0.01$)。 结论:Gln223Arg 多态性与肥胖密切相关,Lys109Arg 多态性与超重高血压患者脂代谢紊乱相关。

【关键词】 瘦素受体;基因多态性;肥胖;高血压;脂代谢紊乱

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.03.018

Association of leptin receptor gene polymorphisms with hypertension and clinical metabolic characteristics in patients from Yunnan area LI Chun-cheng¹, WANG Xian-mei², YANG Li-xia². 1. KunMing Medical College, Yunnan 650031; 2 Cardiovascular Department of KunMing General Hospital in ChengDu Military Area, Yunnan 650032, China

【Abstract】 Objective: To investigate the association between leptin receptor (Lepr) gene polymorphisms and hypertension and clinical metabolic characteristics in patients from Yunnan area. **Methods:** A cohort of 200 hypertensive patients of Han population from Yunnan area was selected, all of whom were hospitalized. According to body mass index (BMI), the hypertensive patients were assigned to two groups, the hypertension with overweight group consisting of 141 cases ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) and the hypertension without overweight group comprising 59 patients ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$). A total of 100 healthy individuals were chosen as normal control group during the same period. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) method was used for determining Gln223Arg and Lys109Arg Lepr gene polymorphisms, and the method of ELISA for determination of leptin levels in blood. **Results:** The A allele frequency of Gln223Arg variant showed significant difference between the hypertension with overweight group and the hypertension without overweight group ($P < 0.01$), and the hypertension with overweight group had a higher value of BMI. In overweight hypertension group, patients carrying A alleles had higher level of LDL-C than those carrying G alleles ($P < 0.01$). **Conclusion:** The Lepr gene polymorphism Gln223Arg is possibly associated with obesity in Han population from Yunnan area. The Lepr gene polymorphism Lys109Arg is obviously related to lipid metabolism disorders in hypertensive patients with overweight.

【Key words】 Lepr; Gene polymorphism; Obesity; Hypertension; Lipid metabolism disorder

我国高血压患者人数已高达 2 亿,且患病率呈

上升趋势。高血压是心脑血管病最主要的危险因素,严重危害人类健康。研究表明瘦素与高血压密切相关^[1]。瘦素通过瘦素受体(Lepr)发挥作用,Lepr 基因的变异可能参与了高血压的发病机制。

作者单位:650031 昆明医学院(李春城);650032 成都军区昆明总医院心血管内科(王先梅,杨丽霞)

通信作者:王先梅,Email:175973103@qq.com

Lepr 基因多态性具有明显的种族和区域差异,本研究对云南地区汉族原发性高血压病患者进行分析,以探讨 Lepr 基因多态性与高血压及其临床代谢特征的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择 2010 年 9 月至 2011 年 2 月在解放军昆明总医院住院高血压患者,共 200 例,其中男 94 例,女 106 例,平均年龄(65.9 ± 8.1)岁,均符合我国 2010 年修订的高血压诊断标准:收缩压 ≥ 140 mmHg 和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg。排除合并严重肝肾疾病、恶性肿瘤及其他系统疾病。参照世界卫生组织标准,将体重指数(BMI) ≥ 25 kg/m²者作为超重高血压组($n = 141$),其中男 70 例,女 71 例,平均年龄(64.5 ± 7.0)岁,BMI 为(30.01 ± 1.21)kg/m²;单纯高血压组($n = 59$),男 24 例,女 35 例,平均年龄(60.2 ± 6.1)岁,BMI 为(21.65 ± 1.35)kg/m²。对照组 100 例,为同期来院的健康体检者,其中男 52 例,女 48 例,平均年龄(70.0 ± 9.7)岁,BMI 为(20.43 ± 2.56) kg/m²,血压正常,肝肾功能正常,血糖正常,无肥胖症及家族遗传病史。所有研究对象均为云南本地常住人口,系汉族,均无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 受试者夜间禁食 12 h,晨起空腹抽取外周静脉血 2 ml 置于经 EDTA 抗凝管中,1 h 内低速离心 10 min,分离血清与血细胞,−80 °C 冰箱保存待用。

1.2.2 体检 入院常规检测总胆固醇(TC)、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)、血糖。记录血压、身高及体重,计算 BMI。运用 ELISA 法测定血清瘦素水平。

1.2.3 外周静脉血基因组 DNA 提取 采用血液基因组 DNA 试剂盒(北京 TIANGEN 公司,D319-01)提取外周基因组 DNA。

1.2.4 瘦素受体基因多态性分析 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法。PCR 引物由北京英杰生命科技有限公司合成。Gln223Arg 引物:TCCTCTTAAAAAGCCTATCCAGTATTT, AGCTAGCAAATATTTTGTAA GCAAT。PCR 反应体系为 25 μ l,条件为 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。取反应产物 6 μ l 经 2% 琼脂糖凝胶电泳确认,长度为 421 bp,

继以 MspI 内切酶 37 °C 酶切 16 h,经 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,分离酶切产物片段,紫外线透视下观察。

Lys109Arg 引物: 5'-AGTTCAAATAGAGGTCCAAATCA, R5'-TTCTGAGGTTGTGTCACTGGCA。PCR 反应条件同上。取反应产物 6 μ l 经 2% 琼脂糖凝胶电泳确认,长度为 203 bp,继以 PstI 内切酶 37 °C 酶切 16 h,取 6 μ l 经 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,分离酶切产物片段,紫外线透视下观察。

1.2 统计学分析

以 Hardy-Weinberg 平衡来判断样本基因型频率分布具有代表性。采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计算各基因型和等位基因的频率。采用 t 检验、 χ^2 检验、Logistic 回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

高血压组和对照组比较,血压、BMI、血瘦素水平均有显著差异($P < 0.01$);年龄、性别构成、血脂、空腹血糖水平无明显差异。

2.2 Lepr 基因位点 Gln223Arg 和 Lys109Arg 分型结果

Gln223Arg 位点有 3 种基因型,分别为:(1) Gln223Gln(AA),酶切后仅有 421 bp 1 条带;(2) Gln223Arg(AG),酶切后有 421、294 和 127 bp 3 条带;(3) Arg223Arg(GG),酶切后有 294 bp 和 127 bp 2 条带。3 种基因型样本的 PCR 产物测序结果与国内鲁瑾等^[2]的研究资料一致。Lys109Arg 也有 3 种基因型,分别为:(1) Lys109Lys(AA),酶切后有 175 bp 1 条带;(2) Lys109Arg(AG),酶切后有 203 bp 和 175 bp 2 条带;(3) Arg109Arg(GG),酶切后有 203 bp 1 条带。测序结果同国内丁百静等^[3]研究资料一致。

2.3 Lepr 基因位点 Gln223Arg 和 Lys109Arg 多态性分布特点

高血压组 Lepr 基因 Gln223Arg 的 3 种分型 GG、AG 和 AA 基因型频率分别为 0.490、0.520 和 0.015 ($\chi^2 = 1.016$, $P = 0.313$); Lepr 基因 Lys109Arg 的 3 种分型 GG、AG 和 AA 基因型频率分别为 0.585、0.400 和 0.015 ($\chi^2 = 0.097$, $P = 0.765$)。对照组 Gln223Arg 的 3 种分型 GG、AG 和 AA 基因型频率分别为 0.670、0.320、0.001 (χ^2

= 0. 298; $P = 0. 585$); Lys109Arg 的 3 种分型 GG、AG 和 AA 基因型频率分别为 0. 570、0. 320 和 0. 001。两组基因型频率分布与预期频率基本一致 ($P > 0. 05$), 均符合 Hardy-Weinbery 平衡。位点 Gln223Arg 等位基因 A 频率在高血压组明显高于对照组 ($P = 0. 011$); 位点 Lys109Arg 基因型频率在

两组无明显差异 ($P = 0. 133$)。

超重高血压组、单纯高血压组及对照组各基因型及等位基因比较。等位基因 A 的频率在超重高血压明显高于单纯高血压组。Lys109Arg 基因型频率及等位基因频率 3 组间比较无明显差异(见表 1)。

表 1 各组 Gln223Arg 基因型频率和等位基因频率比较

Lepr 基因	组别	n	基因型(n, %)			等位基因(n, %)	
			AA	AG	GG	A	G
G223A	超重高血压组	141	3(2. 1)	86(61. 0)	52(36. 9)	92 ⁽¹⁾ (32. 6)	190(67. 4)
	单纯高血压组	59	0(0. 0)	13(22. 0)	46(78. 0)	13(11. 0)	105(89. 0)
	对照组	100	1(1. 0)	32(32. 0)	67(67. 0)	34(17. 0)	166(83. 0)
L109A	超重高血压组	141	2(1. 4)	50(35. 5)	89(63. 1)	54(19. 1)	228(80. 9)
	单纯高血压组	59	1(1. 7)	30(50. 8)	28(47. 5)	32(27. 1)	86(72. 9)
	对照组	100	1(1. 0)	52(32. 0)	47(57. 0)	54(27. 0)	146(73. 0)

注:与 G223A 单纯高血压组比较, ⁽¹⁾ $P < 0. 01$ 。

AA 基因型频率仅为 0. 010~0. 015,故均将 AA 基因型与 GA 基因型合并统计,为 GA + AA 组。Gln223Arg 基因型中携带 A 等位基因的超重高血压人群的 BMI 较高 ($P = 0. 001$),见表 2。Lys109Arg 基因型中携带 A 等位基因超重高血压人群 LDL-C 高于 G 等位基因者 ($P = 0. 040$),见表 3。

表 2 超重高血压组 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性与一般临床资料的关系

项目	基因型		P 值
	AA + AG	GG	
BMI(kg/m ²)	30. 68 ± 1. 65	28. 58 ± 0. 58	0. 001
SBP(mmHg)	168. 86 ± 16. 79	175. 21 ± 14. 98	0. 382
DBP (mmHg)	94. 20 ± 10. 46	100. 03 ± 12. 76	0. 091
TC(mmol/L)	4. 55 ± 0. 47	4. 64 ± 0. 54	0. 704
TG(mmol/L)	1. 95 ± 0. 27	1. 95 ± 0. 33	0. 94
HDL-C(mmol/L)	1. 38 ± 0. 29	1. 42 ± 0. 44	0. 749
LDL-C(mmol/L)	2. 90 ± 0. 90	2. 44 ± 0. 86	0. 298
空腹血糖(mmol/L)	5. 38 ± 0. 92	5. 30 ± 0. 93	0. 809
瘦素(ng/ml)	10. 06 ± 2. 05	10. 56 ± 2. 91	0. 507

运用 Logistic 回归分析,明确超重高血压人群中 Gln223Arg 基因型多态性与 BMI 的关系。以超重高血压组 BMI 为因变量,以 Gln223Arg 基因型为自变量进行回归分析显示:携带 Gln223Arg 基因 A 等位基因者高 BMI 值危险度是不携带 A 等位基因者的 2. 39 倍 ($P = 0. 015$)。以超重高血压组 LDL-C 为因变量,以 Lys109Arg 基因型为自变量进行归分析显示:携带 Lys109Arg 基因 A 等位基因者

高 LDH-C 的危险度是不含 A 等位基因的 2. 69 倍 ($P = 0. 005$)。

表 3 超重高血压组 Lepr 基因 Lys109Arg 多态性与一般临床资料的关系

项目	基因型		P 值
	AA + AG	GG	
BMI(kg/m ²)	29. 12 ± 0. 93	29. 31 ± 1. 01	0. 235
SBP(mmHg)	155. 38 ± 28. 85	172. 38 ± 29. 96	0. 091
DBP (mmHg)	104. 66 ± 8. 89	105. 27 ± 16. 49	0. 891
TC(mmol/L)	4. 43 ± 0. 36	4. 76 ± 0. 57	0. 093
TG(mmol/L)	1. 88 ± 0. 24	2. 02 ± 0. 33	0. 269
HDL-C(mmol/L)	1. 40 ± 0. 35	1. 40 ± 0. 39	0. 960
LDL-C(mmol/L)	3. 09 ± 0. 73	2. 32 ± 0. 61	0. 040
空腹血糖(mmol/L)	5. 28 ± 1. 01	5. 40 ± 0. 83	0. 714
瘦素(ng/ml)	10. 64 ± 3. 09	9. 98 ± 1. 72	0. 369

3 讨论

1997 年 Matsuoka 等^[4]发现 Lepr 基因的 7 种核苷酸顺序变异,分别是 Lys109Arg、Gln223Arg、Ser343Ser、Ser492Thr、Lys656Asn、Ala976Asp 和 Pro1019Pro,其中 109、223、976、1019 位变异频率较高,分别为 79%、91%、100%、85%。大量文献表明,Gln223Arg 及 Lys109Arg 基因多态性与肥胖、高血压有密切关系。目前这两种多态对瘦素受体基因功能的影响研究较少,机制尚不十分清楚。

本研究发现:(1)位点 Gln223Arg 等位基因 A 频率在高血压组明显高于对照组,提示 A 等位基因可能为高血压危险因素。与 Rosmond 等^[5]、郑以漫

等^[6]的研究结果一致。(2)Gln223Arg 等位基因 A 的频率在超重高血压明显高于单纯高血压组,提示 Gln223Arg 基因多态性可能与肥胖密切相关,且等位基因 A 携带者更易发生肥胖。这与高加索地区研究结果相同^[7],但 Murugesan 等^[8]及 Yiannakouris 等^[9]研究表明 Gln223Arg 基因型 G 携带者更易发生肥胖。(3)Gln223Arg 多态性与超重高血压组 BMI 相关,在超重高血压人群中,携带 A 等位基因者高 BMI 的危险度是不含 A 等位基因者的 2.39 倍。(4)Gln223Arg 多态性与脂代谢无明显相关。Popko 等^[10]认为在波兰人群中,Gln223Arg 与脂代谢明显相关。(5)Lys109Arg 多态性与高血压及肥胖无明显相关,与台湾地区报道一致^[11],但与鲁瑾等^[2]、Rosmond^[5]及 Van Rossum^[12]的报道不同。(6)运用 Logistic 回归分析证实超重高血压人群中 Gln223Arg 基因型 A 等位基因与 BMI 相关,且 Lys109Arg 基因型 A 等位基因与 LDL-C 密切相关。

本实验证实 Lepr 基因多态性与肥胖、高血压及脂代谢相关。然而,也有研究表明它们之间无明确相关^[13-15],可能与种族、地域差异及样本量大小、实验条件限制有关。多位点检测及大样本多地域的研究将有助于 Lepr 基因多态性与高血压及其临床代谢特征的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Canatan H, Bakan I, Akbulut M, et al. Comparative analysis of plasma leptin levels in both genders of patients with essential hypertension and healthy subjects[J]. *Endocr Res*, 2004, 30(1):95-105.
- [2] 鲁瑾, 邹大进. 瘦素受体基因 Gln223Arg 多态性与上海地区人群肥胖的相关性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(45):9142-9145.
- [3] 丁百静, 朴云峰, 关英慧, 等. 瘦素受体基因 Lys109Arg 多态性与慢性肝病的关系[J]. *临床内科杂志*, 2007, 24(12):840-842.
- [4] Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, et al. Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity[J]. *Diabetologia*, 1997, 40(10):1204-1210.
- [5] Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, et al. Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(9):3126-3131.
- [6] 郑以漫, 项坤三, 张蓉, 等. 瘦素受体基因 Gln223Arg 变异与上海地区糖尿病患者代谢紊乱及合并高血压的关系[J]. *中华内科杂志*, 1999, 38(3):174-177.
- [7] Quinton ND, Lee AJ, Ross RJ, et al. A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women[J]. *Hum Genet*, 2001, 108(3):233-236.
- [8] Murugesan D, Arunachalam T, Ramamurthy V, et al. Association of polymorphisms in leptin receptor gene with obesity and type 2 diabetes in the local population of Coimbatore[J]. *Indian Hum Genet*, 2010, 16(2):72-77.
- [9] Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, et al. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(9):4434-4439.
- [10] Popko K, Gorska E, Wasik M, et al. Frequency of distribution of leptin receptor gene polymorphism in obstructive sleep apnea patients[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58 Suppl 5(pt 2):551-561.
- [11] Wang TN, Huang MC, Chang WT, et al. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2006, 14(2):183-187.
- [12] Van Rossum CT, Hoebee B, van Baak MA, et al. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and weight gain in young dutch adults[J]. *Obes Res*, 2003, 11(3):377-386.
- [13] Constantin A, Costache G, Sima AV, et al. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 391(1):282-286.
- [14] de Silva AM, Walder KR, Aitman TJ, et al. Combination of polymorphisms in OB-R and the OB gene associated with insulin resistance in Nauruan males. [J] *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1999, 23(8):816-822.
- [15] Heo M, Leibel RL, Boyer BB, et al. Pooling analysis of genetic data: the association of leptin receptor (LEPR) polymorphisms with variables related to human adiposity[J]. *Genetics*, 2001, 159(3):1163-1178.

(收稿:2011-09-06 修回:2012-02-10)

(本文编辑:丁媛媛)