

eHypertension: 前瞻性多组学纵向原发高血压队列

孙伟^{1,2}, 王屹丰^{1,2}, 张海锋^{1,2}, 盛燕辉^{1,2}, 范静依³, 顾明霞^{2,4}, 田芸凡², 张郁青⁵, 马红霞⁶, 印小荣⁴, 孙康云¹, 丁政⁵, 胡志斌⁶, eHypertension 队列项目组, 陈连民^{1,2}, 孔祥清^{1,2}

¹ 心血管病中心, 南京医科大学附属苏州医院, 苏州市立医院, 姑苏学院, 南京医科大学

² 心血管内科, 南京医科大学附属第一医院, 南京医科大学

³ 健康管理中心, 南京医科大学附属苏州医院, 南京医科大学

⁴ 心血管内科, 南京市中心医院

⁵ 心血管内科, 南京医科大学附属江宁医院, 南京医科大学

⁶ 流行病与卫生统计学系, 全球健康中心, 公共卫生学院, 南京医科大学

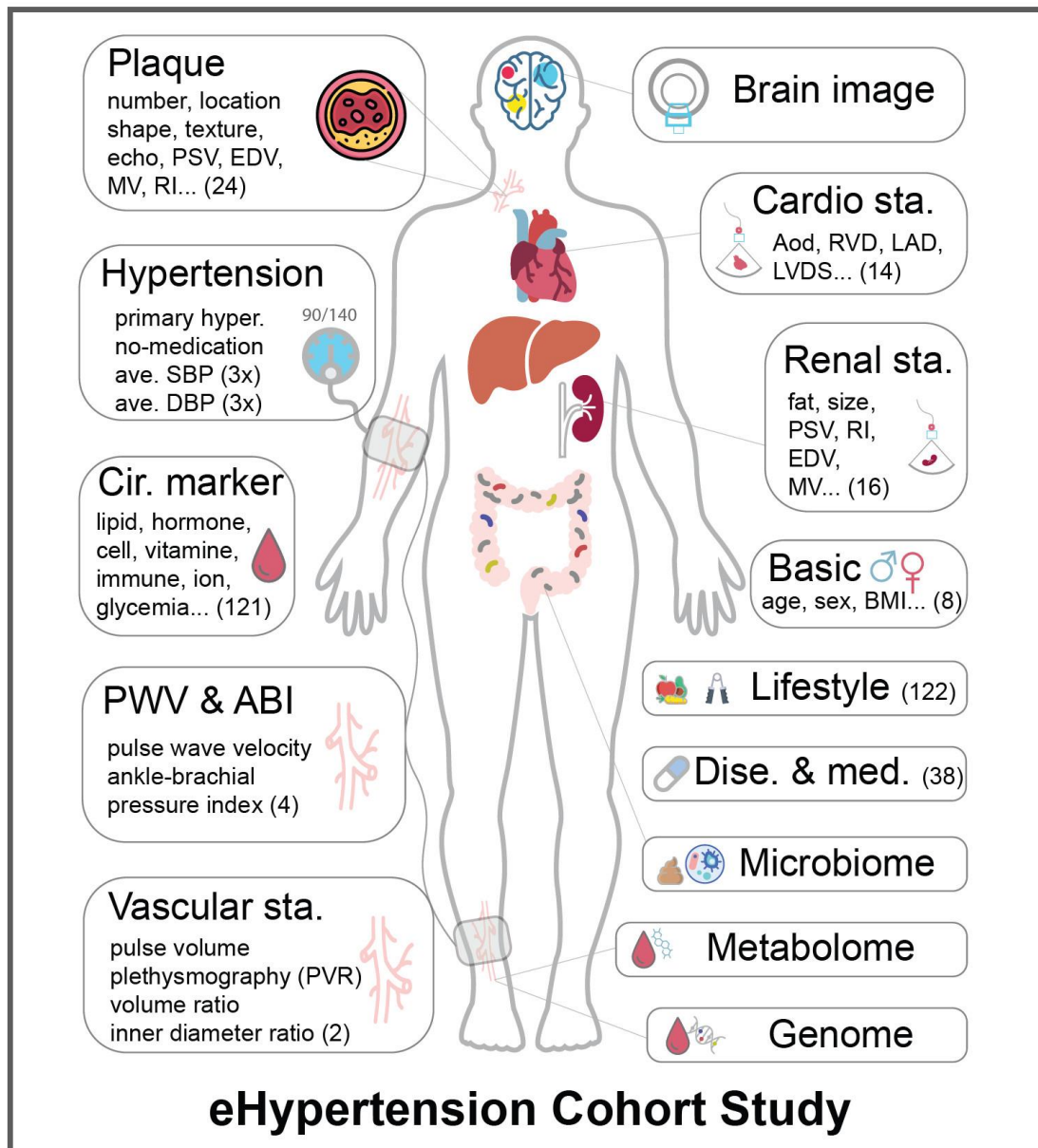
摘要

高血压是心血管病头号杀手, 全球成年人口发病率为 30%左右。由于高血压患者通常还患有其他慢性病, 多种疾病的共呈现可能导致高血压病因探索受到干扰。为此, 我们基于江苏地区多家医院及社区卫生服务中心, 创建了前瞻性多组学纵向原发高血压队列 eHypertension (<https://ehypertension.org>)。以研究高血压的发病机制及潜在临床结局, 并通过开展主流降压药随机干预试验探索指导高血压精准用药的方法。eHypertension 计划从多个中心纳入 2000 名原发高血压患者及 500 名健康对照, 并系统采集表型组、环境暴露组、肠道微生物组、基因组、代谢组等多位组学数据。eHypertension 将从多维组学大数据角度深入探索高血压的发生机制以及精准用药。

关键词

原发高血压, 随访队列研究, 多组学, 精准用药

亮点



- 前瞻性多组学原发高血压随访队列 eHypertension 顶层设计
- eHypertension 队列将作为研究高血压病因学及危害的独特资源
- eHypertension 队列研究将有助于开发指导降压药精准用药的方法

研究背景

高血压是指动脉壁中血液压力升高，通常定义为收缩压大于 140mmHg 和/或舒张压大于 90mmHg。全世界范围内成人高血压的患病率超过 30%，并且一直在升高。高血压是造成心血管疾病，例如心脏疾病和中风，最直接的原因，同时高血压在造成全球死亡的危险因素中排位第一。在中国，大约有 23% 成年人患有高血压。

高血压的发病原因至今仍不清楚，大量的以人群队列为基础的关联研究发现遗传、生活方式以及它们的交互作用在高血压的发生发展中至关重要，目前已经有超过 70 个遗传变异被发现与高血压相关。此外，日常饮食习惯，包括高盐饮食能够造成难治性高血压的发生发展。近期有研究发现肠道微生物组分的个体间差异与血压密切相关，个体内的肠道微生物组的变化与宿主血压的变化同样有关。以上研究为揭示人类高血压的前因后果的机制奠定了基础。

然而，不同的队列有着不同的研究目标，由于研究资源的限制，对于不同类型的数据收集往往需要进行权衡。因此各种类型的队列往往在研究对象的纳入标准与数量、采集数据类型以及随访持续时间等方面都有所不同。值得注意的是，多数类型人群队列并不完全是为高血压研究而设计，血液压力的升高伴随着不同的疾病和药物使用，这往往会对研究结果产生偏倚。到目前为止，一些队列研究都集中在高血压的基因组关联研究上，缺乏不同类型的组学数据，例如微生物组、代谢组、蛋白组和免疫系统概述等，这些多组学的数据能够帮助我们更深入和创新地了解高血压的分子基础。此外，从生化检查指标、体格检查指标、心理社会特征、环境因素到详细的临床信息的深入收集十分重要，例如，有关饮食习惯和医疗信息的数据可以校正无关环境偏倚的分子分析。尽管一些研究只进行关联分析来识别疾病的病因，但是人群队列研究通常不接受治疗，这对于描述疾病发生发展的标志物预测以及药物适用性的评估非常有用。

在此，我们将详尽介绍 eHypertension 队列的研究设计。我们收集新发高血压患相关信息并且对他们进行深入随访。该队列主要目的是从多组学角度研究高血压的病因学和相对应临床结局。与此同时，降压药物的使用在全球范围内使得高血压控制率显著提高，然而，每一类降压药物治疗的有效率仅为 50% 左右。因此，我们还旨在进行降压药物干预设计，利用多层面的信息来获取个体对降压药物反应的可靠的预测标志物。我们相信该队列收集如此丰富和纵深的研究对象表型数据集将有助于研究许多与高血压相关的科学问题。

队列设计

研究对象招募

eHypertension 队列在中国江苏省南部 (30°45'–35°08' 北纬, 116°21'–121°56' 东经) 纳入了 2000 例原发高血压患者及 500 例健康对照。每年，居民前往当地的医疗卫生中心进行体检，相关的临床表型症状，例如收缩压及舒张压，会被记录。研究对象的招募主要是依靠

当地医疗卫生中心的全科医生，他们对健康对照以及未服用降压药的近期体检中诊断为高血压（收缩压和/或舒张压大于 140/90 mmHg）的患者进行宣教纳入队列。

eHypertension 在 7 个当地的医疗卫生中心设置了服务台以便为潜在的研究对象提供知情同意。服务台的研究助理会向潜在研究对象宣讲纳入排除标准，在取得知情同意后，进行数据和生物学样本的采集。纳入标准包括研究对象年龄在 30-85 周岁，因为这一广泛的年龄范围分布可以对原发性高血压的不同病因进行探究。排除标准由一个专家医师团队制定，排除那些尚未诊断糖尿病、心肌梗死和其他慢性疾病等临床症状的个体，从而创建一个相对同质的研究对象群体。图 1 展示了详细的流程以及纳入排除标准。

例如某位研究对象符合纳入排除标准并且签署了知情同意，医生会对他进行一系列的临床检查，包括肾脏，心脏和颈动脉超声；头颅核磁共振扫描以及血管状态评估（图 1）。同时，有经过培训的护士对研究对象进行面对面的基线问卷调查，从而采集包括基本信息（例如年龄，性别和体质指数等），生活方式，环境，健康，心理社会因素等信息。此外，空腹血（12 小时），粪便以及尿液样在完成招募的两天内采集完毕（图 1）。

研究对象的招募从 2021 年开始。从 2021 年的 6 月份到 12 月份，已完成 950（47.5%）例的原发高血压患者以及 300（60%）例健康对照的招募工作。迄今为止，仍然每天有 5 例高血压患者及 2 例健康对照能够被招募。因此，我们预计在 2022 年完成队列招募工作。基于先前我们以队列为基础的相关研究经验，如果对 1000 个组学特征进行评估，我们预计在 Bonferroni 校正后，效应大小（Cohen's d ）为 0.3， t 检验中效能为 80%可能为真正显著（对应 P 值可能在 5×10^{-5} 左右）。在这种情况下，基于来自 R `pwr` 包的 `pwr.t.test` 功能计算对应的样本量应为每组 500 例左右。因此，对于健康对照组来说，500 例样本量将足以进行相应研究。对于原发性高血压患者，我们计划招募 2000 例，这主要是因为我们为高血压患者设计了两类降压药的随机干预（图 1），并且基于目前的数据提示约有 70% 的患者愿意使用降压药物进行治疗，这将高血压患者分为不服用降压药物以及两类降压药物的三个亚组。因此，这样的初始样本量足以评估各类生物学和临床假设检验。

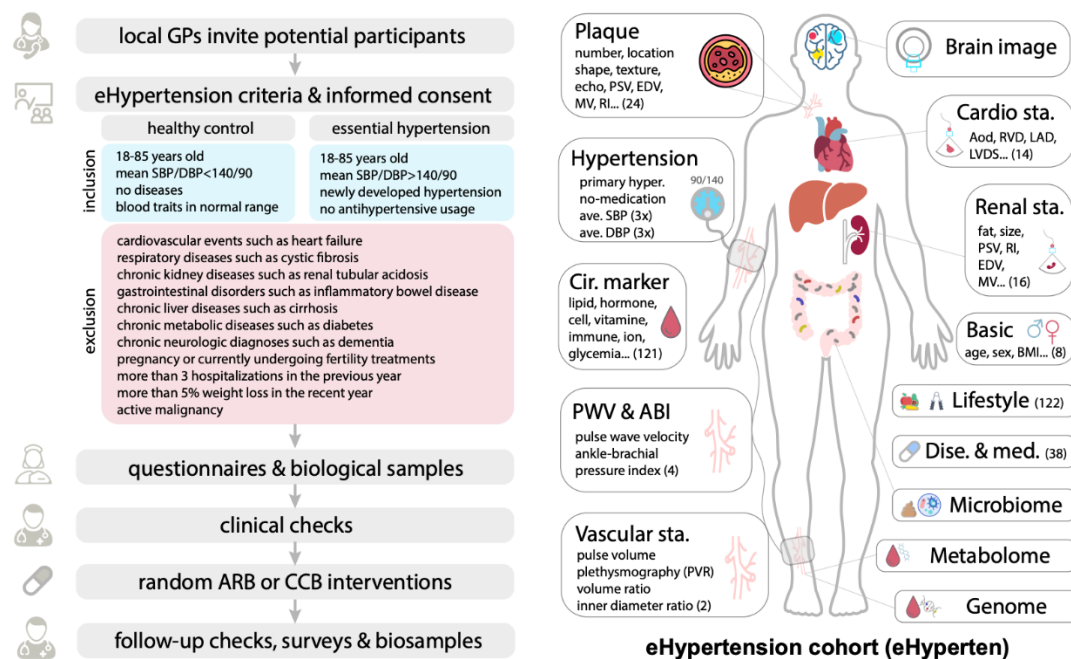


图 1 eHypertension 队列 (eHyperten) 研究对象招募流程及数据收集概述。eHyperten 计划在中国东南部招募 500 例健康对照和 2000 例原发性高血压患者。超过 400 种表型会被记录，包括心理社会特征、体格检查指标、生化参数、环境因素和临床状态。此外，空腹血，尿液和粪便样本被收集用于多组学检测，例如基因组学，宏基因组学，代谢组学及其他。对于原发性高血压患者来说，随机降压药物的干预会实施并且会有达 10 年的长期随访。ABI，踝臂压力指数；ARB，血管紧张素II受体阻滞剂；CCB，钙通道阻滞剂；EDV，舒张末期速度；GP，全科医生；MV，平均流速；PSV，收缩期峰值速度；PWV，脉搏波速度。

研究对象药物干预

原发性高血压患者假如有心血管疾病危险因素，例如吸烟，饮酒和超重等，他们会被建议服用降压药控制血压。对于服用降压药的患者，他们被随机分配服用目前中国常用的两种一线降压药物：钙通道阻滞剂苯磺酸氨氯地平片 (CCB) 或血管紧张素II受体阻滞剂奥美沙坦酯片 (ARB)。随机给药排布由 R (4.1.2 版本) 中的 *sample* 功能产生。患者按照药物说明每天服用 20mg 的奥美沙坦酯片或 5mg 的苯磺酸氨氯地平片。一个月之后，患者会被通知前往当地医疗中心全科医生处进行药物效果评估。如果三次静息状态下诊室血压平均值没有被控制在低于 140/90mmHg，那需要下一个月进行药物转换。如果接下来一个月还是没有降压效果，那需要奥美沙坦酯片和苯磺酸氨氯地平片联合用药 (图 2)。在整个过程中，当地医疗中心全科医生需要对患者服用降压药之后潜在副作用进行评估。基于评估得到的信息，他们需要决定患者后续是否需要继续干预。同时血压以及生物学样本也在每个月或者阶段结束时进行采集。在上述干预过程中，患者是被建议要求坚持长期服药，并且降压药干预对心血管病事件和其他慢性疾病，如肾脏疾病，也会被长期观察记录。

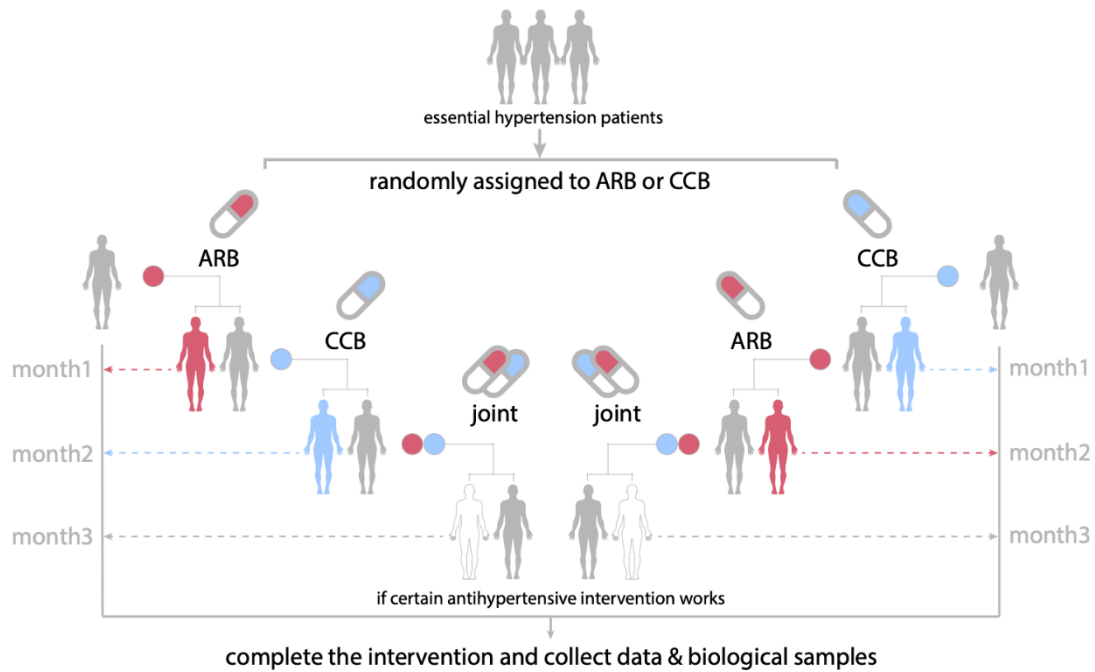


图 2 eHyperten 设计降压药物干预。对于愿意接收药物治疗的患者，他们被随机分配服用目前中国常用的两种一线降压药物：钙通道阻滞剂苯磺酸氨氯地平片（CCB）或血管紧张素II受体阻滞剂奥美沙坦酯片（ARB）。患者按照药物说明每天服用 20mg 的奥美沙坦酯片或 5mg 的苯磺酸氨氯地平片。一个月之后，患者会被通知前往当地医疗中心全科医生处进行药物效果评估。如果三次静息状态下诊室血压平均值没有被控制在低于 140/90mmHg，那需要下一个月进行药物转换。如果接下来一个月还是没有降压效果，那需要奥美沙坦酯片和苯磺酸氨氯地平片联合用药。

研究对象长期随访

高血压患者发生心血管病事件的风险较高。因此，除了短期的降压药物干预，纳入研究的高血压患者会进行长达 10 年的随访来监测他们身体健康状态。图 3 展示了随访的流程。每隔 2 年，随访调查会在当地医疗中心进行。跟基线的情况一样，研究对象会进行同样的检测以及生物学样本的采集。随访的数据采集对于许多临床问题的解决很有必要，例如，是否长期服用降压药物能够降低一些心血管病事件风险？长期服用奥美沙坦酯片后期是否某些疾病的发病率比服用苯磺酸氨氯地平片更高/更低？对于健康对照我们不进行随访，如果后期他们进展为原发性高血压，我们会对他们纳入随访。

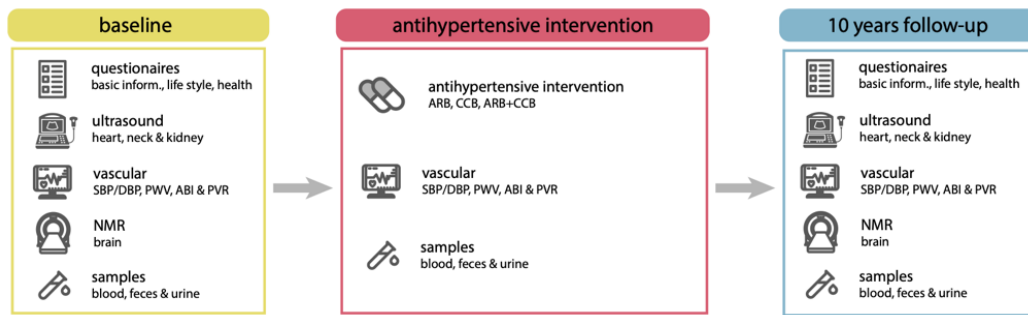


图 3 eHypertension 的纵向设计。纳入研究的高血压患者会进行长达 10 年的监测他们身体健康状态的随访。每隔 2 年，随访调查会在当地医疗中心进行。跟基线的情况一样，研究对象会进行同样的指标以及生物学样本的采集。对于健康对照我们不进行随访，如果后期他们进展为原发性高血压，我们愿意让他们加入。ARB，血管紧张素II受体阻滞剂；CCB，钙通道阻滞剂；DBP，舒张期血压；NMR，核磁共振；SBP，收缩期血压。

研究对象生物学样本采集

粪便样本（至少 10 g）会让纳入研究对象提前在家采集或者在现场采集，然后采集 15 分钟以内放入冰箱（-20°C）。随后，粪便样本会在干冰的条件下进行转运，在实验室进行分装处理后放入-80°C 冰箱保存。粪便样本会分为两种状态进行保存，一种是原始粪便样本，一种为与 50% 甘油混合后保存。

空腹外周血（至少 12 小时）在现场由护士用含有乙二胺四乙酸的抗凝剂的采血管进行采集后放入冰箱（4°C）。随后外周血样本会进行 4000 rpm 离心 10 分钟后将血浆和血细胞进行等份分装后放入-80°C 冰箱以便后期检测。

中段尿在现场收集后 5 分钟内放入冰箱（4°C）。随后尿液进行等份分装后放入-80°C 冰箱以便后期检测。

研究对象问卷调查

本次研究设计了调查问卷来评估研究对象四大类信息，包括基本信息，饮食习惯，生活方式以及疾病诊疗记录，我们的问卷参考了目前世界上一些著名队列的问卷，包括 Lifelines-DEEP 队列，UK Biobank 队列以及 NHANES 队列。值得注意的是，我们的研究对象都是来自于中国的东南部，他们的饮食习惯跟西方有很大的不同，例如，本研究人群通常主食吃米饭以及吃不同种类的特色蔬菜像大蒜和韭菜，但是很少吃奶酪和火腿。此外，本研究人群更喜欢喝白酒和黄酒，而不是红酒和白葡萄酒。表 S1 展示了问卷的详细摘要。为了提高问卷的可信度以及减少数据缺失，我们设计了一款 app，如果有问卷问题没有回答，它会自动提醒。所有问卷调查都是经过专业培训过的人员在现场和研究对象面对面采集信息。调查员对研究对象的食物摄入量是基于回顾性膳食调查辅助参照食物图谱进行描述和评估。

研究对象临床检查

我们关注的是有发生心血管病事件高风险的原发性高血压患者。我们使用各类商业化医疗监测设备来评估他们血管系统和器官的状态。我们总计记录了 65 种临床表型（表 S2）。研究对象经过 5 分钟静坐后，使用血压计（OMRON）进行三次血压和心率的测量。OMRON BP-203RPEIII 用于测量踝臂压力指数和臂踝脉搏波速度（表 S2）。VICORDER 血管状态平台用于脉冲容积记录（PVR）和流量介导的扩张（FMD）的数据采集（表 S2）。超声仪器（Philips CX50）用于评估心脏，肾脏和颈动脉超声（表 S2）。此外，核磁共振成像扫描大脑和下丘脑。这些收集的临床表型是研究心血管病的宝贵资源。

研究对象生物学样本检测

针对外周血，我们检测了 92 种指标（表 S3），包括 ABO 血型；细胞种类和数目；血糖相关参数；脂质、激素和铁水平；肝炎标志物；免疫因子；以及反映心脏、肝脏、肾脏和胆囊功能的各类标记物等。此外，我们还将对外周血样本进行基因组，代谢组和其他的检测，其中，全基因组测序将使用 Illumina NovaSeq 6000 平台，每个样本会产生约 100GB 数据。血浆的非靶向代谢组使用 Agilent 6550 QTOF 平台进行流动注射-飞行时间质谱（FI-MS）检测。

针对尿液，与外周血相似，我们总共检测了 21 种指标（表 S3）。剩余的尿液样本也可用于代谢组学和其他组学分析检测。

粪便主要用于宏基因组测序和菌群培养。针对宏基因组测序，我们将使用 Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 提取粪便组的 DNA，MGI DNBSEQ-T7 平台将用于测序，每个样本将会产生 15GB 数据。此外，通过检测粪便中的细胞类型和其他相关特征可以了解肠道的健康状况（表 S3），表 S3 中所有的检测都是由中国金域医学完成（<http://en.kingmed.com.cn>）。

本研究优势及不足

eHyperten 是一个包含 2000 例原发性高血压患者和 500 例健康对照的前瞻性队列研究。本队列收集了数百种表型，从生化参数、体格检查指标、心理社会特征和环境因素到详细的临床信息。此外，队列还会产生多组学数据，例如肠道微生物组、基因型、代谢组学和蛋白质组学。收集各类表型和深层组学数据是临床研究的丰富资源。据我们所知，这是目前唯一一个可以研究有关环境暴露、社会因素和营养对高血压影响等关键问题的原发性高血压队列。队列前瞻性的设计以及长期随访能够通过连续采集数据来预测原发性高血压心血管病结局。此外，研究通过设置降压药干预能够指导发展个体化精准医学，例如，最近有研究证实大多数非抗生素药物可以被肠道微生物代谢。这种干预在药物选择中十分受用，因为它可以基于微生物组标志物特征来预测降压药疗效。

本研究也存在一些不足。我们通过比较健康对照和患者之间多层次组学数据的差异来揭示高血压的潜在病因。然而，队列本质上是观察性的，这限制了推断因果关系的效力，这个问题可以通过使用因果推理方法来解决，包括孟德尔随机化和中介分析。另外，应进行随机临床研究和实验来验证建立的因果关系。此外，本研究由于研究对象自我分配和排除一些特定医学状况的对象而存在选择偏倚，这些偏倚能够影响推断暴露和疾病关联的效力。最后，对比于一些国家级队列，本队列规模有限。由于大多数的原发性高血压年龄较大，年龄的大跨度可能导致对于年轻患者的统计效力有限。但是，对于纳入了上述一系列的生理及分子检测的新发高血压患者来说，其规模还是相对较大的深度表型队列。

初步结果

研究对象基线特征

从 2021 年的 6 月份到 12 月份，已完成 950 例的原发高血压患者以及 300 例健康对照的招募工作，其中 57% 的患者为女性。纳入研究对象的平均年龄为 63 岁，平均体质指数为 24 kg/m²。表 1 展示了患者和健康对照的基线特征信息。

表 1 原发性高血压患者及健康对照的基线特征

Characteristics	Essential hypertension patients			Healthy controls		
	Total	Male	Female	Total	Male	Female
Age, years (mean/SD)	63.06 (9.34)	64.59 (10.39)	62.14 (8.53)	60.67 (11.64)	58.80 (13.53)	62.73 (9.00)
Sex (n/%)	950 (100%)	409 (43%)	541 (57%)	300 (100%)	157 (52%)	143 (48%)
Smoker, yes (n/%)	187 (20%)	155 (38%)	32 (6%)	47 (16%)	47 (30%)	0 (0%)
BMI, kg/m ² (mean/SD)	24.04 (2.99)	24.37 (3.12)	23.84 (2.91)	23.81 (3.03)	24.39 (3.10)	23.23 (2.92)
Systolic blood pressure, mmHg (mean/SD)	152.48 (11.64)	153.45 (11.59)	151.9 (11.66)	122.82 (13.12)	123.23 (14.12)	122.33 (12.24)
Diastolic blood pressure, mmHg (mean/SD)	90.87 (8.81)	93.23 (8.61)	89.45 (8.64)	74.56 (9.55)	74.19 (10.36)	75.00 (8.19)

各当地医疗中心纳入对象的检测指标不存在批次效应

由于研究对象是基于当地医疗卫生中心招募的，所以我们使用主成分分析来评估是否存在各中心间的批次效应。基于表 S3 所检测的数据，我们使用 Vegan (2.5.5 版本) R 包去计算欧几里德相异度矩阵。随后，基于欧几里德距离矩阵进行经典度量多维标度以获得不同的主坐标。Kruskal–Wallis 检验用于评估各个中心的显著性差异。结果提示各中心的前四个主成分只有细微的差异 (图 4, $P_{\text{Kruskal-Wallis}} = 0.012$)。

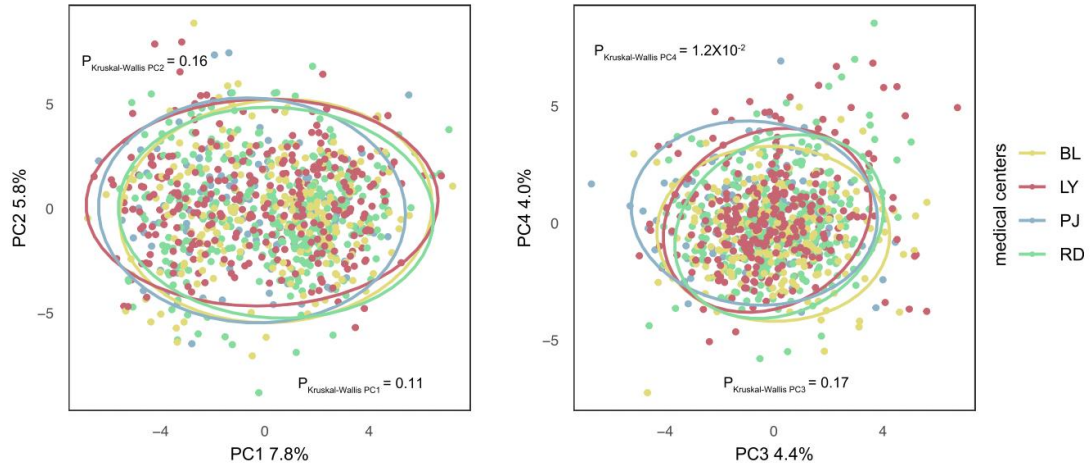


图 4 各当地医疗中心纳入对象的检测指标主成分分析。不同颜色代表不同中心纳入的研究对象。各中心主成分比较采用 Kruskal–Wallis 检验。BL, LY, PJ 和 RD 代表不同的医疗中心的缩写；PC, 主成分。

第一作者：

孙伟，主任医师，副教授、医学博士、硕士研究生导师。现任江苏省医学会高血压分会副主任委员，中华医学会心血管病分会青年委员，江苏省医师协会高血压专业委员会委员，中国医师协会高血压专业委员会青年委员，中国医师协会心血管内科医师分会代谢心脏病学组委员，江苏省安中医疗服务与健康管理中心理事。擅长高血压、结构性心脏病和心衰的药物和介入治疗，主持国家重点研发计划课题 1 项；江苏省六大人才高峰 B 类项目 1 项；获省部级科技进步一等奖 1 项、二等奖 2 项；江苏省卫生厅新技术引进奖一等奖 1 项；南京市科技进步二等奖 1 项。近五年以第一作者和通讯作者发表 SCI 论文 36 篇。获发明专利授权 3 项，实用新型专利授权 6 项。



通讯作者:

陈连民, 博士, 教授, 博士生导师。荷兰格罗宁根大学博士 (cum laude) 及博士后, 南京医科大学/江苏省人民医院海外引进人才 (学术带头人)。主要从事肠道微生物在宿主心血管健康中的作用研究。至今共发表论文 40 余篇, 包括 *Cell* (封面文章), *Nature*, *Nature Medicine*, *Nature Genetics*, *Circulation Research* (封面文章), *Nature Communications* 及 *Cell Reports* (封面文章) 等。主持科研基金 4 项, 获授权专利 3 件, 并担任 *Engineering*, *iMeta* 及 *Medicine in Microecology* 等期刊编委/青年编委。



通讯作者:

孔祥清, 教授, 主任医师, 医学博士, 博士生导师。国家百千万人才、国家有突出贡献中青年专家、江苏省“333 工程”第一层次培养对象、江苏省有突出贡献中青年专家等。现任苏州市立医院党委书记, 江苏省人民医院心内科主任。同时兼任国家标准化心血管与代谢疾病中心主任、中华医学会心血管病学分会常委、中华医学会心血管病学分会结构心脏病学组组长、国家心血管病专家委员会委员、中国医师协会心血管内科分会转化医学副主委、美国心血管造影和介入学会委员 (FSCAI)、欧洲心脏病学学会委员 (FESC) 等职。获首届全国创新争先奖、国家技术发明二等奖 1 项, 教育部科技进步一等奖 1 项, 江苏省科技进步二等奖 1 项, 江苏省科技进步三等奖 1 项, 江苏省卫生厅新技术引进一等奖 3 项等。

