

• 临床研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-03-0220-03

冠心病患者血管紧张素 AT_1 型受体 A1166/C 基因多态性的相关分析

彭健¹, 彭澍¹, 龚五星²

(暨南大学医学院附属第三医院 珠海市人民医院, 1. 心内科, 2. 分子生物实验中心, 广东省珠海市 519000)

[关键词] 受体, 血管紧张素; 基因表达; 多态性, 限制片段长; 冠状动脉疾病

[摘要] 为研究血管紧张素 AT_1 型受体基因 A1166/C 多态性与冠心病发生的关系及其对血脂水平的影响, 采用聚合酶链反应—限制片段长多态性检测法, 测定 161 例冠心病患者和 167 例对照者的血管紧张素 AT_1 型受体基因型; 血脂水平按常规方法测定。结果发现冠心病组 AA 基因型和 AC 基因型频率与对照组相比均无统计学差异, 且与血脂水平无关。实验结果表明, 血管紧张素 AT_1 型受体基因 A1166/C 多态性与冠心病的发生发展似无直接关系。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Analysis of Association of Coronary Heart Disease and Angiotensin AT_1 type 1 Receptor Gene Polymorphisms

PENG Jian¹, PENG Shu¹, and GONG Wu-Xing²

(1. Department of Cardiology, 2. Molecular Biology Experimental Center, the Third Affiliated Hospital of Medical College, Jinan University, Zhuhai Municipal People's Hospital, Zhuhai 519000, China)

MeSH Receptors, Angiotensin; Gene Expression; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Coronary Disease

ABSTRACT **Aim** To study the association of angiotensin AT_1 receptor (AT_1R) gene A1166/C polymorphisms and coronary heart disease (CHD) and to evaluate the effect of AT_1R gene A1166/C polymorphism on plasma lipid levels.

Methods By Polymerase chain reaction—Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods, AT_1R gene A1166/C genotype of 161 CHD patients and 167 controls were determined. Plasma lipid levels are measured by routine way.

Results There are no statistically differences in AT_1R genotype AC and AA frequencies between aged CHD patients and controls, also no differences are found in plasma lipid levels.

Conclusion AT_1R gene A1166/C polymorphism play no role on the occurrence of CHD and has no effects on plasma lipid levels.

血管紧张素 AT_1 通过两种结构相似的受体发挥作用, 分别为血管紧张素 AT_1 型受体 (angiotensin AT_1 receptor, AT_1R) 和 2 型受体 (AT_2R); AT_2R 主要分布在胚胎组织及未成熟的大脑, 与生长发育及分化有关。 AT_1R 则广泛分布于血管壁、心肌、肺、肾等组织; 目前所知血管紧张素 AT_1 的多数作用是通过 AT_1R 介导的。 AT_1R 基因有 5 种多态性, 即 T537/C、A1062/G、A1166/C、G1517/T 和 A1878/G, 其中与临床关系最密切的是 A1166/C^[1]。冠心病 (coronary heart

disease, CHD) 是人群常见和多发心血管疾病, 严重危害人群的生活、健康和寿命。我们应用聚合酶链反应—限制片段长多态性 (PCR-RFLP) 方法, 检测了一组 CHD 患者与对照者的 AT_1R -A1166/C 基因多态性构型, 目的在于研究分析 AT_1R 基因遗传变异对 CHD 的作用及其对血脂质和脂蛋白水平的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

161 例 CHD 患者分别来自我院和本市外院心内科和心脏监护病房 (CCU) 的住院病人, 包括心肌梗死 49 例, 稳定型心绞痛 43 例, 不稳定型心绞痛 69 例; 其中男性 89 例, 女性 72 例, 平均年龄 57.6 ± 5.9 岁 (38~88 岁)。以 1979 年世界卫生组织 (WHO) 确定的诊断标准为依据, 其中 62 例患者通过冠状动脉

[基金项目] 广东省科技厅重点科研项目基金 [2000(261)66] 和 2000 年珠海市科委重点科技项目基金 [2000(45)36] 资助。

[作者简介] 彭健, 男, 1956 年 11 月出生, 心血管内科主任医师、教授, 硕士研究生导师。珠海市医学会内科学会主任委员, 《中国实用内科杂志》常务编委。彭澍, 女, 1972 年 11 月出生, 内科住院医师, 硕士。龚五星, 男, 1960 年 6 月出生, 硕士, 内科主任医师, 分子生物实验中心主任, 硕士研究生导师。

造影确诊。167 例健康体检者作为对照组, 其中男性 94 例, 女性 73 例, 平均年龄 53.1 ± 4.7 岁 (46~ 78 岁)。继往无冠心病发作史。两组研究对象基线条件互相匹配。均进行血压、血液生物化学、心电图、腹部 B 超等检查, 排除高血压病、肝、肾、甲状腺及糖尿病等。研究个体之间无血缘关系。

1.2 血脂和脂蛋白测定

受试者均禁食 8 h 以上, 于早晨 6~ 7 时取卧位肘静脉血, 分别置于干燥管及肝素抗凝管中。采用标准酶法测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白胆固醇 (HDLc), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 按现行通用公式计算, 即 $LDLC = TC - (TG/2.2 + HDLC)$ (mmol/L)。

1.3 人的基因组脱氧核糖核酸(DNA)的抽提
将上述抗凝血按低渗溶血、酚/氯仿法抽提白细胞基因组 DNA, 适量 TE 溶解, - 70℃保存。

1.4 血管紧张素Ⅱ型受体基因扩增
热启动聚合酶链反应(PCR)法对 AT1R 基因进行扩增, PCR 反应体系包括有 2 μL 基因组 DNA, 16 μmol/L 的 dNTP, 0.35 μmol/L 的引物, 正向引物 P1 为 5'-CACCATGTTTTGAGGTTG-3', 反向引物 P2 为 5'-CGAGTTTCTGACATTGTTG-3'。1.5 mmol/L Mg^{2+} , 10% 二甲基亚砜 (DMSO), 2.4 u Taq DNA 聚合酶, 总反应体积为 20 μL。PCR 反应参数为: 95℃预变性 5 min, 55℃ 5 min, 加入 Taq DNA 聚合酶, 72℃ 2 min, 循环 1 次; 然后 94℃ 50 s → 55℃ 60 s → 72℃ 70 s, 循环 35 次, 最后 72℃延伸 4 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 特异性扩增产物。

1.5 聚合酶链反应(PCR)产物的酶切
包括 15 μL 特异性 PCR 扩增产物和 5 u 的 Hha I 内切酶; 酶切总体积为 20 μL, 35℃消化 20 h。

1.6 血管紧张素Ⅱ型受体基因分型
取 5 μL 上述酶切产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 40min, 紫外灯下观察基因分型。AT1R 基因

型的判定标准是: AA 型为 274 bp; AC 型为 274 bp, 165 bp 和 109 bp; CC 型为 165 bp 和 109 bp。

1.7 统计学处理

血管紧张素Ⅱ型受体(AT1R)基因型与等位基因频率采用频率计数法计算, 组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验, 不同等位基因型间血脂均数比较采用 *t* 检验。用 SPSS 统计软件包进行统计分析。以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 试验结果

应用 PCR-RFLP 方法, 所有研究对象的 AT1R PCR 片段均得到满意扩增, 片段大小为 274 bp。本研究共检测到 2 种 AT1R 基因型, 分别为 AA 型和 AC 型(图 1, Figure 1)。

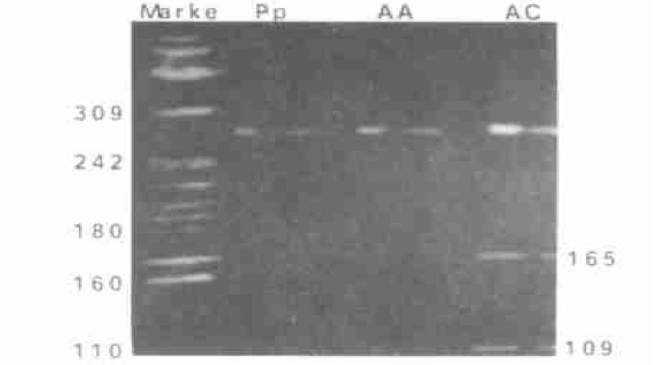


图 1. 血管紧张素Ⅱ型受体基因扩增及基因型酶切片段
Figure 1. DNA product and genotype fragments of AT1R. PCR product is abbreviated to Pp.

2.2 血管紧张素Ⅱ型受体基因型分布

328 例研究对象的 AT1R 基因型和等位基因数量和频率分布见表 1 (Table 1)。两组之间各基因型和等位基因型频率不存在差异 ($P > 0.05$)。

表 1. 两组血管紧张素Ⅱ型受体基因型与等位基因频率比较
Table 1. Comparison of frequency of AT1R genotypes and alleles between CHD and control

Groups	n	Genotypes [n, (%)]			Alleles (%)	
		AA	AC	CC	A	C
Control	167	9 (5.39)	158 (94.61)	0 (0)	52.70	47.30
CHD	161	9 (5.59)	152 (94.41)	0 (0)	52.79	47.21

$P > 0.05$ with in each genotype and allele between the two groups.

2.3 两组血管紧张素Ⅱ型受体各基因型与血脂、脂蛋白水平的关系

冠心病(CHD)组 TC 和 LDLc 水平高于对照组;

同组 AT1R 各基因型之间, 各项血脂水平均无统计学差异(表 2, Table 2)。

表 2. 两组血管紧张素 Ⅱ型受体各基因型与血脂、脂蛋白水平关系的比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 2. Comparison of serum lipid and lipoprotein levels between each genotype of the two groups

Groups	Control		CHD	
	AA	AC	AA	AC
TC	4.58 ±0.40	4.47 ±0.45	5.38 ±0.53 ^a	5.42 ±0.60 ^a
TG	1.34 ±0.22	1.39 ±0.17	1.43 ±0.19	1.45 ±0.16
LDLC	2.38 ±0.27	2.32 ±0.20	3.67 ±0.24 ^a	3.59 ±0.21 ^a
HDLc	1.20 ±0.16	1.19 ±0.21	1.25 ±0.19	1.28 ±0.17

a: $P < 0.05$, compared with control group.

3 讨论

在动物体内血管紧张素受体(ATR)有两种亚型AT1R和AT2R,分别执行不同的功能^[2]。在人类只有单一AT1R基因,AT1R基因位于3号染色体长臂21~25区^[3],它编码一段47 kb的前mRNA,包含有5个外显子。AT1R的多态性位点多位于5'区,与临床关系较密切的基因变异A1166/C位于3'未翻译区(UTR)的5'端^[3],A突变为C产生三种基因型:未突变纯合子AA、突变杂合子AC和突变纯合子CC。该位点参与转录和翻译的调控,从而影响AT1R的生理作用。

目前对ATR与心血管疾病之间相关关系的研究尚处于初步阶段,并未形成一致结论。Stangl等^[4]对1 000名冠心病患者和1 000名对照者进行AT1R基因型测定并进行随访,观察终点为靶血管再成型、心肌梗死或死亡。结果发现A1166/C基因多态性不是冠心病介入术后副反应发生的危险因子,对冠心病远期病程发展和严重程度亦无影响。在西班牙的人群中进行的该项研究得到同样结论^[5]。而对莫斯科人群的研究证实^[6],A1166/C基因变异与原发性高血压、心肌梗死和左室肥厚相关,尤其与原发性高血压相关性较强;A等位基因和AA基因型在疾病初期具有保护作用,C等位基因与其他基因型则是各病的危险因素。这是由于A1166/C基因变异导致功能上的差异而改变血管紧张素Ⅱ反应性所致^[7]。对法国南部人群的检测分析认为,AT1R基因多态性与心肌梗死和血管痉挛性心绞痛相关^[8]。我国在该领域的研究尚少,有限的资料结论尚存在差异^[9]。本研究表明,在冠心病和正常对照组之间AT1R基因频率未发现差异存在,该基因变异对血脂亦无显著影响。

此类研究结论多样化的原因可能与冠心病群体的遗传异质性以及研究对象地域、种族不同有关。另外,肾素-血管紧张素系统中尚有血管紧张素转化酶

(ACE)基因等具有异型性,其与AT1R、AT2R等基因的共同作用可能构成对血管舒缩及其他生物效应的影响。由于肾素-血管紧张素系统多态性基因中大部分独立危险性不高,因此确定某一多态性基因相对稳定的表型来阐明该多态性与心血管疾病的关系非常重要^[6]。当然,入选对象标准、回顾性或抽样分析的偏差也会对结论造成影响。

本研究表明在冠心病的发生发展过程中,AT1R基因多态性的遗传致病作用不大。遗传学研究表明,疾病的发生甚至预后是受多种相关基因共同作用的,而单基因研究殊难全面阐明基因间的相互作用及多基因对表型的共同影响效应。因此,有关冠心病遗传危险因素的研究应进行多基因突变位点联合分析,以期得到各种相关基因变异共同作用下对疾病的患病和临床危险性的总体评估。

参考文献

[1] Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, et al. Angiotensin Ⅱ type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension [J]. *Hypertension*, 1994, **24** (1): 63- 69

[2] Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions [J]. *Regul Pept*, 1995, **59**: 269- 273

[3] Katsuya T, Higaki J, Ogiwara T. Gene loci and polymorphisms of angiotensin Ⅱreceptor [J]. *Nippon Rinsho*, 1999, **57** (5): 1 020- 027

[4] Stangl K, Cascorbi I, Stangl V, et al. A1166/C polymorphism of the angiotensin Ⅱtype 1 receptor gene and risk of adverse events after coronary catheter interventions [J]. *Am Heart J*, 2000, **140** (1): 170- 175

[5] Ruth Alvarez, Reguero JR, Alberto Batalla, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin Ⅱreceptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease [J]. *Cardiol Res*, 1998, **40**: 375- 379

[6] Chistiakov DA, Chugunova LA, Shamkhalova MSh, et al. Polymorphism of gene encoding vascular angiotensin Ⅱreceptor and CHDcroangiopathies in patients with insulin- dependent diabetes mellitus [J]. *Ter Arkh*, 2000, **72** (4): 27- 30

[7] Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, et al. Angiotensin Ⅱtype 1 receptor A1166/C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin Ⅱin human arteries [J]. *Hypertension*, 2000, **35** (3): 717- 721

[8] Canavy I, Henry M, Morange PE, et al. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of France [J]. *Thromb Haemost*, 2000, **83** (2): 212- 216

[9] 项坤三, 郑泰山, 孙多奇, 等. Ⅰ型血管紧张素 Ⅱ受体基因与中国人冠心病、高血压及糖尿病的关系 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1999, **2** (15): 9- 12

(此文 2001- 05- 15 收到, 2001- 07- 20 修回)
(此文编辑 胡必利)