

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2004)12-01-0054-03

脑梗死患者血管紧张素转化酶基因多态性与血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平研究

周赛君, 朱蓓蕾, 金得辛, 夏君慧, 叶好好, 张旭

(温州医学院附属第一医院神经内科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 神经病学; 血管紧张素转化酶基因多态性与血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平; 聚合酶链反应; 脑梗死; 血管紧张素转化酶; 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 基因多态性

[摘要] 探讨脑梗死患者血管紧张素转化酶基因多态性与血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平的关系。应用聚合酶链反应测定 173 例高血压脑梗死患者血管紧张素转化酶基因插入/缺失(D/I)多态性以及用酶联免疫吸附测定法测定血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平, 并与正常对照组比较。结果发现, 脑梗死组血管紧张素转化酶 DD 基因型频率为 0.39, 明显高于对照组的 0.24 ($P < 0.01$)。进一步分析发现这种异常与发病年龄 ≤ 60 岁组血管紧张素转化酶 DD 基因型频率明显增高有关。脑梗死组中血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平为 $29.8 \pm 10.2 \text{ ng/L}$, 与对照相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 但血管紧张素转化酶 DD 基因型者血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平显著高于对照组和同组 DI 基因型和 II 基因型者($P < 0.01$)。发病年龄 ≤ 60 岁血管紧张素转化酶 DD 基因型者血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平增高最明显。结果提示, 血管紧张素转化酶 DD 基因型是脑梗死发病危险因素, 发病年龄小于 60 岁的脑梗死者可能与血管紧张素转化酶 D 等位基因频率增高、血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平增高有关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Level of Plasma Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ in Relation to Cerebral Infarct

ZHOU Sai-Jun, ZHU Bei-Lei, JIN De-Xin, XIA Jun-Hui, YE Hao-Hao, and ZHANG Xu

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China)

[KEY WORDS] Cerebral Infarct; Angiotensin-Converting Enzyme; Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ Gene Polymorphism; Polymerase Chain Reaction; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and level of angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ (Ang $\text{Ang}(\text{I})$) in plasma with cerebral infarct (CI) in Chinese Han nationality. **Methods** 173 patients with cerebral infarct and 116 control subjects in Chinese Han were examined using polymerase chain reaction (PCR) and genetic methods. Plasma Ang $\text{Ang}(\text{I})$ level determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Results** ACE DD genotype appeared more common in patients of cerebral infarct compared with normal controls (0.39 versus 0.24, $P < 0.01$), and it is important in frequency of ACE DD genotype abnormal increase in group of cerebral infarct onset age within 60 years. There were no significantly different in plasma Ang $\text{Ang}(\text{I})$ level between cerebral infarct and control subjects, but cerebral infarct with ACE DD genotype group higher plasma Ang $\text{Ang}(\text{I})$ level significantly higher than control group and cerebral infarct with ACE DI and II genotype ($P < 0.01$), the level of plasma Ang $\text{Ang}(\text{I})$ were increased most remarkably in group of cerebral infarct onset age within 60 years. **Conclusions** The ACE gene deletion polymorphism might serve as a risk factor for cerebral infarct in Chinese Han nationality while the level of plasma Ang $\text{Ang}(\text{I})$ increased might related to group of cerebral infarct onset age within 60 years. Relate to gene deletion polymorphism.

近年来脑血管病家族聚集性较高的发现和分子生物学技术的进展, 使多基因遗传方式在脑梗死发生发展中的作用越来越受到重视。肾素-血管紧张素系统是参与体内血压调节的重要系统, 而血管紧

张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)是该系统中的关键酶之一。ACE 基因的遗传变异影响体内 ACE 水平, 国内外学者对 ACE 基因多态性与高血压、脑梗死三者间的关系进行了深入研究, 结果却差异较大。ACE DD 基因型影响血浆 ACE 水平, 与脑梗死的发生有密切关系^[1]。为进一步探讨 ACE 基因在脑梗死发生发展中的遗传机制, 对脑梗死患者 ACE 基因插入/缺失多态性与血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ (angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ Ang $\text{Ang}(\text{I})$) 水平的关系进行分析。

[收稿日期] 2003-07-14 [修回日期] 2003-12-25

[基金项目] 温州市科委资助项目(S990302D)

[作者简介] 周赛君, 主治医师, 主要从事神经病学研究, E-mail: zsj@wzmc.net。金得辛, 主任医师, 主要从事脑血管病及经颅多普勒超声研究。张旭, 主任医师, 主要从事神经免疫学及分子生物学研究。

1 对象和方法

1.1 对象

脑梗死患者 173 例, 男性 102 例, 女性 71 例, 年龄 56.4 ± 10.6 岁。所有患者均符合全国第四届脑血管病会议标准^[2]和 WHO 制定的原发性高血压病诊断标准^[3]。有糖尿病史(或糖耐量异常)和冠心病、糖尿病家族史者予以剔除。正常对照者 116 例, 男性 70 例, 女性 46 例, 年龄 54.6 ± 9.7 岁。所有对照者均无糖尿病、高血压及脑卒中家族史。

1.2 标本采取及基因组 DNA 提取

晨取空腹血 5 mL, 以 1:10(v/v) 含 2% EDTA 和生理盐水为抗凝剂, 取其中 3 mL 用常规酚-氯仿法提取 DNA, 使纯度达到 A_{260}/A_{280} 大于 1.8, -4°C 保存, 待检。其余迅速检测血浆 Ang II 水平。

1.3 血管紧张素转化酶基因多态性检测

PCR 正链引物: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTT TCT-3', 负链引物: 5'-GATGTGGCCATCACATTTCG TCAGA-3'。按 Tietz 等^[4]方法, 总反应体积为 50 μL , 4 μL dNTP、2 μL 引物、5 μL 模板 DNA、2 μL Taq DNA 聚合酶, 用液体石蜡覆盖, 在 DNA 扩增仪上进行反应, 循环条件为 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 35 个循环后补为 72°C 10 min, 取 10 μL PCR 产物于 2% 琼脂凝胶上电泳(4 V/cm, 1 h), 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果。

1.4 血浆血管紧张素 II 水平测定

用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血浆 Ang II 水平。

1.5 统计学处理

用直接计数法计算等位基因及基因型频率, 以 Hardy-Weinberg 遗传定律检验确定研究样本的群体代表性。组间基因型与等位基因比较用 χ^2 检验。两组间 Ang II 水平比较采用 t 检验, 组内各基因型 Ang II 水平比较采用方差分析。

2 结果

2.1 血管紧张素转化酶基因型、等位基因频率分布

PCR 扩增出两种 DNA 片段, 一种是 490 bp 片段, 称之为插入型(I 型), 另一种是 190 bp 片段, 称之为缺失型(D 型), 因此, 在群体中可有 DD、DI 及 II 三种基因型。本研究脑梗死组和正常对照组 ACE 各基因型间均符合 Hardy-Weinberg 平衡法则, 吻合良好($P > 0.05$)。脑梗死组 ACE DD 基因型和 D 等位基因频率均明显高于正常对照组($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。

表 1. 脑梗死组与对照组血管紧张素转化酶基因型、等位基因频率比较

Table 1. The frequency of ACE genotype in cerebral infarct and control group

分组	n	基因型			等位基因频率	
		DD	DI	II	D	I
对照组	158	28 (24.1%)	51 (44.0%)	37 (31.9%)	0.46	0.54
脑梗死组	235	67 (38.7%) ^a	80 (46.3%)	26 (15.0%)	0.62 ^a	0.38

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 脑梗死患者血浆血管紧张素 II 水平变化

脑梗死组血浆 Ang II 水平为 29.8 ± 10.2 ng/L, 与对照组的 28.3 ± 7.4 ng/L 相比差异无显著性。脑梗死 ACE DD 基因型者血浆 Ang II 水平明显高于对照组和同组其他基因型者($P < 0.01$)。而对照组各基因型间血浆 Ang II 水平差异无显著性(表 2, Table 2)。

表 2. 脑梗死和对照组不同血管紧张素转化酶基因型间血浆血管紧张素 II 水平比较

Table 2. The level of plasma Ang II in cerebral infarct and control group with different age (ng/L)

分组	n	血管紧张素 II
对照组		
DD	28	27.0 ± 6.6
DI	51	28.6 ± 7.6
II	37	28.9 ± 7.9
脑梗死组		
DD	67	$33.7 \pm 10.9^{\text{ab}}$
DI	80	27.2 ± 8.5
II	26	27.9 ± 10.2

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与同组其他基因型比较。

2.3 脑梗死患者不同发病年龄血管紧张素转化酶基因型分布及血浆血管紧张素 II 水平比较

发病年龄 ≤ 60 岁组 ACE DD 基因型携带者血浆 Ang II 水平明显高于对照组、同龄 DI 和 II 基因型以及发病年龄 > 60 岁组的所有基因型($P < 0.01$; 表 3, Table 3)。不同发病年龄组 ACE 基因型分布存在显著性差异。脑梗死发病年龄 ≤ 60 岁组, ACE DD 基因型分布明显高于同龄对照组($P < 0.05$), 而发病年龄 > 60 岁组未见相似结果(表 4, Table 4)。

3 讨论

血管紧张素转化酶(ACE)基因插入/缺失的多态性影响 ACE 活性。在肾素-血管紧张素系统中 ACE 不仅作用于 Ang I 的羧基末端, 脱去组氨酰亮

表 3. 脑梗死和对照组血管紧张素转化酶各基因型不同发病年龄血浆血管紧张素 Ⅱ水平比较

Table 3. The level of plasma Ang Ⅱ in cerebral infarct and control group with different age and ACE genotype

分 组	发病年龄 ≤60 岁			发病年龄 > 60 岁		
	DD	DI	II	DD	DI	II
对照组	26.42 ± 5.54	28.43 ± 7.66	29.94 ± 8.81	27.55 ± 7.49	28.90 ± 7.80	26.86 ± 5.22
脑梗死组	38.09 ± 11.04 ^{ab}	27.67 ± 8.76	28.88 ± 11.98	28.82 ± 8.62	26.34 ± 8.12	26.08 ± 5.64

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与同组其他基因型比较。

表 4. 脑梗死患者不同发病年龄血管紧张素转化酶基因分布

Table 4. The frequency of ACE genotype in cerebral infarct and control group with different age

分组	发病年龄 ≤60 岁			发病年龄 > 60 岁		
	DD	DI	II	DD	DI	II
对照组	13	33	25	15	18	12
脑梗死组	35 ^a	53	17	32	27	9

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

氨酸,形成具有很强活性的 Ang Ⅱ。还能使舒缓激肽的羧基末端脱去苯丙氨酰精氨酸使缓激肽失活,血管内膜增生。ACE 基因变异是通过影响 Ang Ⅱ使血压增高引起脑梗死?还是通过血管内膜增生引起血管堵塞?或两者兼而有之?一直是困惑的问题,也是本研究的目的。

Markus 等^[5]采用年龄、性别配对法对 101 例脑梗死研究后,认为 ACE D 等位基因是腔隙性脑梗死一个新的独立危险因素。但 Pullicino 等^[6]却认为该结论是在对脑梗死分组错误的前提下得出的。本研究结果发现 ACE DD 基因型和 D 等位基因频率在脑梗死组明显高于对照组,提示 ACE DD 基因型或 D 等位基因可能在脑梗死中起作用。

许贻白等^[7]研究发现急性脑血管病患者中 ACE DD 基因型患者血浆 Ang Ⅱ水平显著高于 II 基因型患者。谈红等^[8]在冠心病患者 ACE 基因多态性研究中也发现 DD 基因型出现频率明显高于对照组,且 DD 基因型患者具有较高的血清 ACE 水平。本文发现 ACE 基因 DD 型患者血浆 Ang Ⅱ水平显著高于 DI 型和 Ⅱ型患者,与上述结论一致,支持 ACE 基因多态性可能通过 Ang Ⅱ水平差异在脑血管病的发病机制中起作用。

Doi 等^[9]对 181 例血栓性脑梗死患者的研究发现,发病年龄 ≤60 岁患者 ACE DD 基因型和 D 等位基因频率明显高于年龄 > 60 岁患者和同龄对照组。本研究也有相似结果,60 岁以前发病的脑梗死患者

D 等位基频率为 0.59,明显高于同龄对照组的 0.41。此外还发现,脑梗死发病年龄 ≤60 岁 ACE DD 基因型者血浆 Ang Ⅱ水平明显高于同龄其他基因型和 60 岁以上发病者。提示发病年龄 ≤60 岁脑梗死患者 D 等位基因可能通过增高 Ang Ⅱ水平起作用。

我们认为 ACE 基因插入/缺失多态性对脑梗死的影响可能是多方面的,在发病年龄 ≤60 岁脑梗死者,ACE D 等位基因可能通过增高 Ang Ⅱ水平起作用,而对于年龄在 60 岁以上者可能是两者兼而有之。目前已有实验表明 Ang Ⅱ受体拮抗剂氯沙坦可抑制血管损伤后内膜增生^[10],这些都可能为脑梗死的防治提供广阔的前景。

[致谢]衷心感谢温州医学院附属第一医院检验科的大力协作。

[参考文献]

- [1] 张旭,夏君慧,金得辛,林捷,叶好好. 血管紧张素转化酶基因多态性与脑梗死危险因素的关系. 中华流行病学杂志, 2001, 12: 435-438
- [2] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点. 中华神经科杂志, 1996, 29: 379-381
- [3] Guidelines subcommittee. 1999 world health organization international society of hypertension guidelines for the management of hypertension. J Hypertens, 1999, 17: 151-183
- [4] Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet, 1992, 51: 197-205
- [5] Markus H, Barley J, Lunt R, Bland M, Jeffery S, Carter Nick D, et al. Angiotensin converting enzyme gene deletion polymorphism: a new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. Stroke, 1995, 26: 1329-1333
- [6] Pullicino P, Kwen P, Greenberg S, Becker AL, Glenister N. Angiotensin converting enzyme gene and lacunar stroke. Stroke, 1996, 27: 568-570
- [7] 许贻白,王贤军,诸金水,王亚仙,戴利成,等. 血管紧张素转化酶基因多态性与急性脑血管病的关系. 中华神经科杂志, 1998, 6: 152-155
- [8] 谈红,张国元,尤乃祯,黄超,刘建平. 冠心病患者血管紧张素转化酶基因多态性及其与血管紧张素转化酶水平的关系. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6: 134-136
- [9] Doi Y, Yoshinari M, Yoshizumi H, Ibayashi S, Wakisaka M, Fujishima M. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infarction. Atherosclerosis, 1997, 132: 145-150
- [10] 张玉平,李建军,刘颖,王晶. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管内膜增生和基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11: 36-40

(此文编辑 文玉珊)