

[文章编号] 1007-3949(2004)12-01-0073-04

•临床研究•

血管紧张素原基因启动子区域单核苷酸多态性与心肌梗死的相关性

刘艳¹, 金玮¹, 姜正文¹, 张奎星¹, 盛海辉¹, 金麟¹, 沈亚云¹, 黄薇¹, 于金德

(上海第二医科大学附属瑞金医院心内科, 上海市 200025; 1. 国家人类基因组南方研究中心, 上海市 201203)

[关键词] 内科学; 血管紧张素原基因与心肌梗死的关系; 多重 SnaPshot 反应; 血管紧张素原基因; 单核苷酸多态性; 心肌梗死; 危险因素

[摘要] 为研究血管紧张素原基因启动子区域-217、-20 位和-6 位上的三种单核苷酸多态性与心肌梗死的相关性, 采用多重 SnaPshot 反应, 在中国南方汉人群中, 对 216 例心肌梗死患者和 185 名健康对照者进行 G-217A, A-20C 和 G-6A 多态基因分型。结果发现, G-217A 多态 AA、AG 和 GG 基因型分布和 A、G 等位基因频率在心肌梗死组与对照组之间相比有显著性差异(分别为 10、77、129 比 8、37、140, $P=0.002$; 22.45%、77.55% 比 14.32%、85.68%, $P=0.003$)。G-6A 多态 AA、AG 和 GG 基因型分布在心肌梗死组和对照组之间亦有显著性差异(分别为 147、64、5 比 127、44、14, $P=0.029$), 但 A、G 等位基因频率在两组间无显著性差异($P=0.394$)。A-20C 多态 CC、AC 和 AA 基因型分布在两组间有差异(分别为 6、51、159 比 2、61、122), 但无统计学意义($P=0.067$), C、A 等位基因频率在两组间亦无显著性差异($P>0.05$)。Logistic 回归分析发现, 年龄($P=0.001$)、收缩压($P=0.013$)和血浆甘油三酯浓度($P=0.010$)是该人群发生心肌梗死的独立危险因素, 而高密度脂蛋白胆固醇($P=0.018$)是一种保护因素。结果提示, 在中国南方汉人群中, 血管紧张素原基因 G-217A 和 G-6A 多态可能与心肌梗死的发生相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation between Single Nucleotide Polymorphisms in the Promoter Region of Angiotensinogen Gene and Myocardial Infarction

LIU Yan, JIN Wei, JIANG Zheng-Wen¹, ZHANG Kui-Xing¹, SHENG Hai-Hui¹, JIN Lin¹, SHENG Ya-Yun¹, HUANG Wei¹, and YU Jin-De

(Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025; 1. Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China)

[KEY WORDS] Angiotensinogen Gene; Single Nucleotide Polymorphism; Myocardial Infarction; Risk Factor; Logistic Regression Analysis; South Han Chinese Population

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the correlation between three single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -217, -20 and -6 locus in the promoter region of angiotensinogen (AGT) gene and myocardial infarction (MI) in south Han Chinese population.

Methods ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit was used to genotyping G-217A, A-20C and G-6A polymorphisms in 216 patients with MI and 185 healthy controls. **Results** The AA, AG and GG genotypes of G-217A polymorphism were obviously different between group of MI and group of controls (10, 77 and 129 to 8, 37 and 140, $P=0.002$). Frequencies of A and G alleles were also significantly different between two groups (22.45%, 77.55% to 14.32%, 85.68%, $P=0.003$). The AA, AG and GG genotypes of G-6A polymorphism were obviously different between two groups (147, 64 and 5 to 127, 44 and 14, $P=0.029$). But, frequencies of A and G alleles of G-6A had no significant difference between two groups ($P=0.394$). The CC, AC and AA genotypes of A-20C polymorphism were different between two groups (6, 51 and 159 to 2, 61 and 122), but no statistical difference was found ($P=0.067$). Logistic regression analysis showed that age ($P=0.001$), systolic blood pressure (SBP) ($P=0.013$) and serum concentration of triglyceride (TG) ($P=0.010$) were all independent risk factors for MI. Serum concentration of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ($P=0.018$) was a protective factor for MI. **Conclusions** G-217A and G-6A polymorphisms of AGT gene might be associated with the occurrence of myocardial infarction in south Han Chinese population.

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 对调节血管张力、心脏和血管重构起到重

要作用。作为血管紧张素前体, 唯一的肾素作用底物-血管紧张素原 (angiotensinogen, AGT) 基因与心血管疾病的关系日益受到人们的重视。1992 年 Jerunemaitre 等^[1]首次证实 AGT 基因 M235T 和 T174M 多态与高加索人原发性高血压显著相关。新近又有多项研究表明 AGT 基因与冠心病 (coronary heart dis-

[收稿日期] 2003-06-09

[修回日期] 2003-12-22

[作者简介] 刘艳, 主治医师, 博士研究生, 主要研究方向为冠状动脉粥样硬化易感基因的筛选。E-mail: liuliyanyan@etang.com。金玮, 主治医师, 博士。于金德, 教授, 博士研究生导师。

ease, CHD) 和心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 相关^[2-4]。但对于 AGT 基因与心血管疾病的关系, 国际上一直存在着争议^[5-7]。本研究旨在研究 AGT 基因启动子区域的 G-217A、A-20C 和 G-6A 多态性与中国南方汉族人群心肌梗死的相关性。

1 对象和方法

1.1 研究对象

心肌梗死组 216 例, 男性 172 例, 女性 44 例, 年龄 58.9 ± 9.2 岁。急性心肌梗死的诊断主要根据病史、心电图和血清心肌酶谱的变化, 包括: ①胸骨后或心前区出现严重而持久的胸痛; ②心电图出现持久的异常 Q 波或 ST-T 波出现持续的动态演变; ③血清心肌酶包括门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、肌酸激酶及其同工酶等的浓度出现动态演变。陈旧性心肌梗死的诊断主要根据以往肯定的心肌梗死病史和/或特征性的心电图改变。健康对照组 185 名, 男性 131 例, 女性 54 例, 年龄 52.1 ± 7.3 岁, 经病史、体检、心电图等检查排除冠心病、原发性高血压、糖尿病和脑梗死。对入选者均检测血压、血脂和空腹血糖, 并了解吸烟、饮酒、冠心病和高血压或脑梗死家族史。

1.2 人基因组 DNA 提取

所有患者在入院后的第一天清晨, 空腹采集外周静脉血 5 mL, 用 3.8% 枸橼酸钠按 1:6 抗凝, 采用酚-氯仿法抽提白细胞中的基因组 DNA。

1.3 引物设计

应用 primer 3 软件进行引物设计, 由 Sangon 公司合成。引物序列见表 1 (Table 1)。

表 1. 血管紧张素原基因-217、-20 和-6 位点的 PCR 引物和 SNaPshot 引物序列 (5' → 3')

Table 1. The sequences of the primers designed for -217, -20 and -6 locus of angiotensinogen gene

SNP 位点	PCR 扩增引物序列	SNaPshot 引物序列
G-217A	F: GTTGGCCTCAGGCTGTCAC	TGTAACCTGACCGCTGCACC
	R: CCGGCCTACCTTCTGCTGT	
A-20C	F: GTTGGCCTCAGGCTGTCAC	TCCCTCAGCTATAAATAGGGC
	R: CCGGCCTACCTTCTGCTGT	
G-6A	F: GTTGGCCTCAGGCTGTCAC	ACGGCAGCTTCTTCCCC
	R: CCGGCCTACCTTCTGCTGT	+ 45poly (dT)

F: 正向引物, R: 反向引物。

1.4 G-217A、A-20C 和 G-6A 多态的基因型分析

1.4.1 聚合酶链反应扩增 PCR 反应体系为 15 μ L, 包括 $10 \times$ 缓冲液 1.5 μ L, dNTP 混合物 (10 mmol/L) 0.3 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 0.9 μ L, Hotstar^R Taq DNA 聚合酶 0.1 μ L, PCR 引物 (10 pmol/L) 各 0.5 μ L 和 DNA 模板 (20 mg/L) 1 μ L。采用 Touchdown PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 10 个循环。然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增后, 取 PCR 反应产物 1.5 μ L 做琼脂糖凝胶电泳实验。

1.4.2 SNaPshot 反应 3 个 SNPs 分别组成两个 SNaPshot 反应体系, 每个反应体系 5 μ L, 包括 SNaPshot 荧光混合物 2 μ L, 引物混合物 (终浓度 0.5 μ mol/L) 2 μ L 和纯化的 PCR 产物混合物 1 μ L。G-217A 多态性: 96 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 然后 96 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 25 个循环。最后 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。A-20C 和 G-6A 多态: 96 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 然后 96 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 25 个循环。最后 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。反应产物用 SAP 纯化。

1.4.3 DNA 测序仪测序 每份样品中加入甲酰胺 9 μ L, SNaPshot 荧光标记 0.2 μ L 和 SNaPshot 反应纯化产物 2 μ L, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冷却后在 ABI PRISM^R3700 DNA 测序仪上进行毛细管电泳, 运行 GeneScan^R 3.7 分析软件分析实验结果。

1.5 统计学方法

用 SPSS 10.0 for Windows 软件进行数据分析。组间均数比较采用 t 检验, 组间频数分布比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。Logistic 回归进行危险因素独立性分析, 其风险率用比数比 (odds ratio, OR) 和 95% 可信区间 (95% CI) 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 G-217A、A-20C 和 G-6A 多态性在心肌梗死组和对照组中的分布

G-217A、A-20C 和 G-6A 多态性的基因分型结果见图 1 (Figure 1)。G-217A 多态性的基因型分布和 A、G 等位基因频率心肌梗死组与对照组有显著性差异 ($P < 0.01$)。G-6A 多态性的基因型分布在两组间有显著性差异 ($P < 0.01$), 但 A、G 等位基因频率在两组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。A-20C 多态性的基因型分布在两组间有差异, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), C、A 等位基因频率在两组间亦无显著性差异 ($P > 0.05$; 表 2, Table 2)。

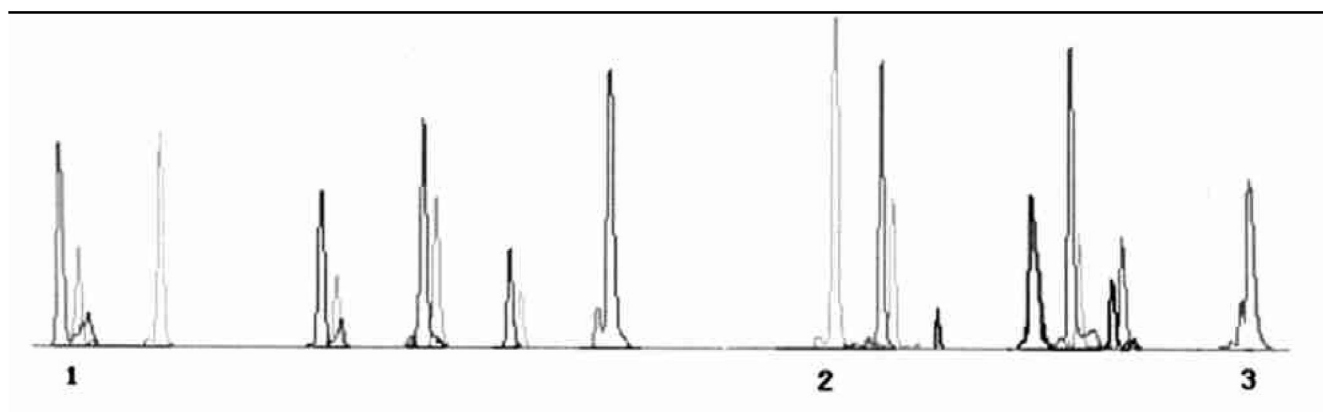


图 1. 血管紧张素原基因启动子区域- 217、- 20 和- 6 位点的波形和基因型 1 为启动子区- 217 bp 处 AG 等位基因, 2 为启动子区- 20 bp 处 AA 等位基因, 3 为启动子区- 6 bp 处 TT 等位基因(即 AA 等位基因)。

Figure 1. The wave and genotypes of - 217, - 20 and - 6 locus in the promoter region of angiotensinogen gene

表 2. 心肌梗死组和对照组 G-217A、A-20C 和 G-6A 多态基因型和等位基因频率的分布

Table 2. Distribution of G-217A, A-20C and G-6A genotypes and alleles frequencies in patients with myocardial infarction and control subjects

	基因型			等位基因频率	
	AA	AG	GG	A	G
G-217A					
对照组 (n= 185)	8	37	140	53 (14. 32%)	317 (85. 68%)
心肌梗死组 (n= 216)	10	77	129 ^a	97 (22. 45%)	335 (77. 55%) ^a
A-20C					
对照组 (n= 185)	2	61	122	65 (17. 57%)	305 (82. 43%)
心肌梗死组 (n= 216)	6	51	159	63 (14. 58%)	369 (85. 42%)
G-6A					
对照组 (n= 185)	127	44	14	298 (80. 54%)	72 (19. 46%)
心肌梗死组 (n= 216)	147	64	5	358 (82. 87%)	74 (17. 13%)

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 Logistic 回归分析心肌梗死的危险因素

心肌梗死组的年龄、体重指数、收缩压、舒张压、空腹血糖、血浆甘油三酯(triglyceride, TG)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)浓度与对照组相比有显著差异(表 3, Table 3)。用 Logistic 回归对上述临床指标及 G-217A 和 G-6A 多态进行危险因素独立性分析, 提示年龄($P = 0.001$)、收缩压($P = 0.013$)和血浆 TG 浓度($P = 0.010$)是心肌梗死的独立危险因素, 其比数比分别为 3.993 (95% CI 为 1.769~ 9.012)、3.268 (95% CI 为 1.290~ 8.281)和 2.289 (95% CI 为 1.401~ 3.740)。而血浆 HDLC 浓度($P = 0.018$)是心肌梗死的一种保护因素, 比数比为 0.006 (95% CI 为 0.000~ 0.408)。

3 讨论

在血管中膜平滑肌细胞和外膜周围脂肪中都有

表 3. 心肌梗死组和对照组的临床资料

Table 3. Features of the patients with myocardial infarction and control subjects

指 标	对照组 (n= 185)	心肌梗死组 (n= 216)
年龄 (岁)	52.10 ± 7.29	58.88 ± 9.17 ^b
体重指数 (kg/m ²)	23.11 ± 2.87	24.46 ± 2.65 ^a
收缩压 (mmHg)	114.99 ± 12.44	137.45 ± 23.12 ^b
舒张压 (mmHg)	76.31 ± 8.07	84.34 ± 14.29 ^b
甘油三酯 (mmol/L)	1.36 ± 0.63	1.84 ± 1.14 ^b
总胆固醇 (mmol/L)	4.59 ± 0.65	4.70 ± 1.10
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	1.36 ± 0.32	1.16 ± 0.31 ^b
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	2.92 ± 0.71	2.92 ± 0.98
空腹血糖 (mmol/L)	4.74 ± 0.56	5.95 ± 1.91 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

AGT 基因 mRNA 表达, 并且中膜 mRNA 表达受交感活性的局部调节。研究表明受损内皮可诱导血管中膜 AGT 基因的表达。内皮受损导致中膜平滑肌细胞直接暴露于刺激 AGT 产生的循环因子, 如血管紧张素 (angiotensin, Ang); 而内皮本身能产生减少血管 AGT 生成的抑制因子。在冠状动脉粥样硬化处, 由于内皮受损激活了 AGT 基因表达, 导致血管局部 RAS 的激活和 Ang 浓度的升高。局部 RAS 对局部组织可产生缓慢持久的维持作用。而 Ang 可通过调节血管张力改变冠状动脉灌注, 刺激血管平滑肌细胞增殖, 影响血管细胞外基质蛋白的形成, 增强冠状动脉管壁对氧化应激的反应。甚至可直接作用于非梗死区心肌的成纤维细胞, 促进成纤维细胞 DNA、RNA 和蛋白质的合成^[8,9]。

研究表明, AGT 基因 5' 调控区 - 222~ + 40 区域的结构与其基因表达调控相关, 尤其是核心启动子区域(位于 - 32~ + 44 区域)的一个顺式作用元件 AGCE 1 (AGT core promoter element 1, 位于 - 25~ - 1 区域)可直接影响 AGT 基因的转录^[10], A-20C 和 G-6A 多态都位于 AGCE 1 上。体外实验表明 G-6A 多态可直接影响 AGT 基因的转录速率, 而 A-20C 多态可增强 AGT 基因的转录表达, A-20C 和 G-18T 多态组成的二种单倍型 CTC 和 ATC 可使 AGT 转录活性增加 2.5 倍^[11]。

本研究结果发现, 南方汉人群 - 217A 等位基因频率为 14.32%, 与孟华等^[12]报道的北方汉人群频率的 14.20% 相似, 但高于高加索人频率 10%^[1]。- 20C 等位基因频率为 17.57%, 与 Sato 等^[13]报道的 19.80% 相似, 但明显高于藏族人群频率 8.25%^[14]。- 6A 等位基因频率为 80.54%, 与日本人频率 80.00% 和藏族人群的 78.00% 相似^[6,14]。但明显高于高加索人频率 46.00%^[3,6]。提示 AGT 基因启动子区域序列在不同种族人群中存在着明显的差异。推测可能由于这种遗传背景的不同加之环境差异, 使 AGT 基因对心血管疾病的发生发展产生了不同的影响。

研究还发现, 心肌梗死组 G-217A 多态的基因型分布及其等位基因频率与对照组相比有显著性差异, G-6A 多态的基因型分布与对照组相比亦有显著性差异, 提示 G-217A 和 G-6A 多态可能与中国南方汉人心肌梗死的发生相关。同时, Logistic 回归分析提示年龄、收缩压和血浆甘油三酯浓度均是心肌梗

死的独立危险因素。G-217A 和 G-6A 多态都位于 AGT 基因启动子区域, 特别是 G-6A 多态位于核心启动子区域, 推测 G-217A 和 G-6A 多态可能通过影响 AGT 基因的转录活性, 改变了血浆 AGT 浓度, 并与其它危险因素共同作用, 诱发和促进冠状动脉粥样硬化的发生和发展, 但其确切机制尚有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charu A, Hunt SC, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*, 1992, **71**: 169-180
- [2] Gardemann A, Stricker J, Humme J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, et al. Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **145**: 309-314
- [3] Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparagon F, Hernandez-Perera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A, et al. Association of angiotensinogen M235T and A(-6) G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: The PROCAGENE Study. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37**: 1536-542
- [4] Fernandez-Arcas N, Dieguez-Lucena JL, Munoz-Moran E, Ruiz-Galdon M, Espinosa-Caliani S, Aranda-Lara P, et al. Both alleles of the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene can be a risk factor for myocardial infarction. *Clin Genet*, 2001, **60**: 52-57
- [5] Ichihara S, Yokota M, Fujimura T, Kato S, Hirayama H, Tsunekawa A, et al. Lack of association between variants of angiotensinogen gene and the risk of coronary heart disease in middle aged Japanese men. *Am Heart J*, 1997, **134**: 260-265
- [6] Province MA, Boerwinkle E, Chakravarti A, Cooper R, Fornage M, Leppert M, et al. Lack of association of the angiotensinogen - 6 polymorphism with blood pressure level in the comprehensive NHLBI family Blood pressure program. *J Hypertens*, 2000, **18**: 867-876
- [7] Ko YL, Ko YS, Wang SM, Chu PH, Teng MS, Cheng NJ, et al. Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease in Chinese. *Hum Genet*, 1997, **100**: 210-214
- [8] 刘东, 杨刚, 吕俊升. 应激性高血压大鼠血浆血管紧张素含量的变化. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**: 131-133
- [9] 申景平, 李瑞峰, 雷立全, 高广道. 心肌梗死大鼠心肌成纤维细胞对血管紧张素的反应. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 115
- [10] Yanai K, Nibut Y, Murakami K, Fukamizu A. A cis-acting DNA element located between TATA box and transcription initiation site is critical in response to regulatory sequences in human angiotensinogen gene. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 15981-986
- [11] Yanai K, Saito T, Hirota K, Kobayashi H, Murakami K, Fukamizu A. Molecular variation of the human angiotensinogen core promoter element located between TATA box and transcription initiation site affects its transcriptional activity. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 30558-562
- [12] 孟华, 邱长春, 朱席琳. 血管紧张素原基因调控序列多态性与原发性高血压相关性分析. *中国医学科学院学报*, 1996, **18**: 343-347
- [13] Sato N, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Nakata Y, Miki T, et al. Association of variants in critical core promoter element of angiotensinogen gene with increased risk of essential hypertension in Japan. *Hypertension*, 1997, **30**: 321-325
- [14] 杨春, 邱长春, 卢圣栋, 洛维俊, 卓玛, 崔超英, 等. 血管紧张素原基因核心启动子区域突变与藏族原发性高血压的关联分析. *中华医学遗传学杂志*, 2000, **17**: 149-152

(此文编辑 文玉珊)