

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0215-03

• 流行病学研究 •

湖南汉族冠心病患者与血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性的相关性

毛以林¹, 袁肇凯², 黄献平², 卢芳国², 谭光波², 胡志希²

(湖南中医学院 1. 附属第二医院, 湖南省长沙市 410005; 2. 中医诊断学国家重点学科, 湖南省长沙市 410007)

[关键词] 流行病学; 血管紧张素转化酶基因与冠心病的相关性; 聚合酶链反应; 冠心病; 血管紧张素转化酶; 基因多态性; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$

[摘要] 探讨血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性与湖南汉族人冠心病之间的关系, 采用聚合酶链反应检测 100 冠心病患者和 54 例健康人的血管紧张素转化酶基因型, 同时检测内皮素、血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 和一氧化氮水平。结果发现, 冠心病组血管紧张素转化酶基因型及等位基因频率与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。与插入缺失杂合型 (ID) + 插入纯合型 (II) 相比, 缺失纯合型 (DD) 比值比为 7.27 ($\chi^2 = 13.42$, 95% CI 为 2.38~22.24, $P < 0.01$)。内皮素/一氧化氮比值、血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 水平在冠心病组明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果提示, 湖南汉族人冠心病的发生可能与 DD 型血管紧张素转化酶基因密切相关。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

The Association Between the Deletion/Insertion Polymorphism of Angiotensin Converting Enzyme and Coronary Heart Disease in Hunan Han Population

MAO Yi-Lin¹, YUAN Zao-Kai², HUANG Xian-Pin², LU Fang-Guo², TAN Guang-Bo², and HU Zhi-Xi²

(1. the Second Affiliated Hospital, Changsha 410005; 2. Department of Diagnostics of State Key Subject, Hunan College of Chinese Traditional Medical Science, Changsha 410007, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Angiotensin Converting Enzyme; Gene Polymorphism; Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$; Polymerase Chain Reaction; Nitric oxide; Endothelin

[ABSTRACT] **Aim** To study the association between insertion/deletion (I/D) polymorphism of angiotensin converting enzyme gene and coronary heart disease (CHD) in Hunan Han population. **Methods** By polymerase chain reaction (PCR), 100 patients with CHD and 54 healthy people were detected for their angiotensin converting enzyme (ACE) genotypes and allele frequencies. Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ (Ang II), nitric oxide (NO) and endothelins (ET) were also detected in the above people.

Results The frequencies of DD genotype and allele of CHD group were marked higher than that in control group ($P < 0.01$), the odds rate (OR) of DD genotype compared with ID+ II genotype was 7.27 ($\chi^2 = 13.42$, 95% CI: 2.38~22.24). The levels of Ang $\text{Ang} \text{ II}$ and ET/NO in CHD group are significantly higher than that in control group ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion**

There might be close relationship between DD genotype of ACE gene and CHD in Hunan Han population.

近年来研究表明, 血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 基因插入/缺失 (insertion/deletion, I/D) 多态性与心肌梗死和/或包括其他类型的冠心病 (coronary heart disease, CHD) 有同样的相关性, ACE 基因主要作用于血管水平, D 等位基因可使血管周围组织和血液循环中的 ACE 水平增加, 进而对血管内皮功能产生影响, 是冠心病发病的重要病理生理基础。本研究采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 对 100 例冠心病患者和 54 例正常人的 ACE 基因型进行检测, 同时检测受试者内皮

素 (endothelin, ET)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$) 水平, 以探讨湖南汉族人 ACE 基因型与冠心病发病的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

冠心病组 100 例, 男 55 例, 女 45 例, 年龄 60.85 ± 7.83 岁, 均符合 1979 年 WHO 制定的缺血性心脏病“心绞痛”、“心肌梗死”的诊断标准, 均排除糖尿病、甲状腺疾病及其它脂质代谢改变的疾病。健康对照组 54 例, 男 29 例, 女 25 例, 年龄 59.40 ± 7.22 岁。两组间吸烟、体重指数和血压均有可比性。

1.2 标本采集

所有受试者采血前禁食 12 h, 于清晨 8 时空腹坐位抽取左肘前静脉血 10 mL, 其中 2 mL 以 2%

[收稿日期] 2003-11-06 [修回日期] 2004-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (30271574) 资助

[作者简介] 毛以林, 博士, 讲师, 主要从事心血管病中医证候本质研究, E-mail 为 maoyilin_888888@sina.com。袁肇凯, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病中医证候本质研究。黄献平, 副研究员, 主要从事心血管病中医证候本质研究。

EDTANa₂ 抗凝, 用于抽提基因组 DNA, 其余根据不同的实验要求用于检测生物化学指标。

1.3 血管紧张素转化酶基因多态性分析

引物设计参照 Rigat 等^[1] 方法。引物 1 为 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', 引物 2 为 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' (上海生工合成)。DNA 提取采用苯酚-氯仿提取法。PCR 反应体系: 10 × Buffer 5 μL, 4.5 mmol/L MgCl₂ 5 mmol, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 引物 1 25 pmol, 引物 2 25 pmol, DNA 模板 5 μL (含 DNA 约 100~200 ng), 去离子水补至 50 μL。扩增方法: 轻微摇匀, 微量离心机离心后, 加石蜡油 20 μL, 放置 PCR 仪上, 94℃变性 4 min, 然后 80℃以微量加样器插入石蜡油液面下加入 Taq 酶 2 u (BBI Canada)。每个循环为 94℃变性 1 min, 58℃复性 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 共 30 个循环, 末次循环 72℃延伸 10 min。循环完毕, 取出 PCR 管, 放置 4℃待测。每次 PCR 均设置阴性对照。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 100 bp DNA Marker 作对照, 紫外透射仪上观察结果并摄影。

1.4 血管紧张素Ⅱ、内皮素和一氧化氮水平测定

血管紧张素Ⅱ、内皮素检测采用放射免疫法, 试剂盒由北京中国人民解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所提供。NO 检测采用硝酸还原酶法, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.5 统计学处理

表 1. 冠心病组与对照组血管紧张素转化酶基因型与等位基因频率分布比较

Table 1. Comparison of ACE genotypes and frequencies of allele between CHD group and control group

分 组	n	基因型			等位基因频率	
		Ⅱ	DD	ID	iv	D
冠心病组	100	7 (7%)	35 (35%)	58 (58%)	36.00%	64.00%
对照组	54	16 (29.63%)	11 (20.37%)	27 (50%)	54.63%	45.37%

2.3 血管紧张素Ⅱ、内皮素和一氧化氮水平比较

冠心病组 Ang Ⅱ、内皮素水平和 ET/NO 比值与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$ 或 0.05), NO 水平两组相比差异无显著性 (表 2, Table 2)。

2.4 不同血管紧张素基因型间血管紧张素Ⅱ、内皮素/一氧化氮比值比较

冠心病组与对照组 DD、ID 基因型者血清 Ang Ⅱ水平有显著性差异 ($P < 0.01$ 或 0.05)。两组 ET/NO 以 DD 基因型最高, 其中以 DD 基因型冠心病患者最高; ID 和 DD 基因型冠心病患者 ET/NO 与对照者相比均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01 ; 表 3, Table 3)。

计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验。

2 结 果

2.1 血管紧张素转化酶基因型分布平衡检验

154 例受检者中, DD 型 46 例 (29.87%), ID 型 85 例 (55.19%), Ⅱ型 23 例 (14.94%), I 等位基因频率 42.53%, D 等位基因频率 57.47%, ACE 基因型分布频率观测值与预计值差异不显著, 符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2 = 2.55, P > 0.10$)。

2.2 血管紧张素转化酶基因型、等位基因频率分布

等位基因频率分布及基因型构成比两组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$), DD 基因型频率及 D 等位基因频率冠心病组明显高于对照组。与 ID+Ⅱ基因型相比, DD 基因型 OR 值为 7.27 ($\chi^2 = 13.42, 95\% \text{ CI 为 } 2.38 \sim 22.24, P < 0.01$; 表 1, Table 1)。ACE 基因琼脂糖凝胶电泳图谱 (图 1, Figure 1)。



图 1. 血管紧张素转化酶基因琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 1. Picture of determination of ACE genotypes by PCR amplification

表 2. 血管紧张素Ⅱ、内皮素和一氧化氮水平比较

Table 2. Comparison of Ang Ⅱ, ET and NO levels between CHD group and control group ($\bar{x} \pm s$)

指 标	冠心病组 (n = 100)	对照组 (n = 54)
血管紧张素Ⅱ (μg/L)	64 ± 31 ^b	50 ± 28
内皮素 (μg/L)	72 ± 22 ^b	57 ± 18
一氧化氮 (μg/L)	143 ± 67	151 ± 81
内皮素/一氧化氮	0.6 ± 0.4 ^a	0.5 ± 0.5

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 3. 冠心病组和对照组不同血管紧张素转化酶基因型间血管紧张素 ①、内皮素/一氧化氮比较

Table 3. Comparison of different ACE genotypes with Ang II and ET/ NO in CHD group and control group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	①			ID			DD		
	n	血管紧张素 ① (μg/L)	ET/NO	n	血管紧张素 ① (μg/L)	ET/NO	n	血管紧张素 ① (μg/L)	ET/NO
冠心病组	7	55 ± 11	0.50 ± 0.18	58	54 ± 13 ^a	0.58 ± 0.23 ^a	35	69 ± 18 ^b	0.76 ± 0.30 ^b
对照组	16	47 ± 8	0.56 ± 0.26	27	50 ± 13	0.47 ± 0.29	11	56 ± 7	0.60 ± 0.49

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

血管紧张素转化酶(ACE)在血管的调节和血管平滑肌的增殖中起重要作用,直接影响动脉粥样硬化的形成。研究证明,ACE水平受基因调控,ACE基因第16内含子287 bp片段中的I/D多态性与ACE血清水平有关。国外的研究表明,这一多态性与心肌梗死或包含其它类型的冠心病有密切相关^[2,3]。国内的研究也表明,这一多态性与中国汉族人冠心病的发生有同样的相关性^[4,7]。说明中国汉族人冠心病发病可能与ACE基因I/D多态性有关。本研究发现,湖南汉族人冠心病患者DD基因型及D等位基因频率明显高于健康对照组,且DD基因型OR值为7.27($\chi^2 = 13.42$, 95% CI为2.38~22.24, $P < 0.01$),说明DD基因型可能是湖南汉族人冠心病发生的易感基因之一,这与国内其它地区研究文献报道相一致。

血管紧张素转化酶(ACE)基因的多态性主要作用于血管水平,D等位基因可使血管周围组织和血液循环中的ACE水平增加,尽管ACE DD基因型与冠心病发病的相关性虽较肯定,但其确切的发病机制仍不完全明了。由于ACE是肾素-血管紧张素系统的重要组成成份,一方面促进Ang iv向Ang ①转化,进而促进内皮素释放,使NO分泌减少。因此国内有人以血浆内皮素与NO比值作为内皮细胞功能指标对二者关系进行了探讨,结果表明ET/NO比值DD型比II型明显升高^[8]。国外亦有研究表明,ACE DD基因型患者ET/NO比值升高,认为这是ACE引起冠状动脉痉挛的另一重要作用机制。因此本研究在探讨ACE基因I/D多态性与冠心病关系的同时,也对Ang ①、ET/NO等血管内皮功能进行研究。本研究发现,冠心病组Ang ①水平与健康对照组相比有显著性差异,冠心病DD基因型Ang ①水平明显高

于健康对照组,各组之间也均以DD基因型者ET/NO比值最高,与国内外的研究结果相符合,且冠心病患者明显高于健康对照组^[8-10]。通过对冠心病与Ang ①、ET/NO等反映血管内皮功能指标和ACE基因多态性分布的相关性综合分析,进一步表明湖南人冠心病的发病可能与ACE基因多态性分布密切相关,湖南汉族人DD基因型携带者可能系冠心病的易感人群。

[参考文献]

- [1] Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Research*, 1992, **20** (6): 1433
- [2] Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, et al. Deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation*, 1994, **90** (5): 2199-202
- [3] Cardemann A, Weib T, Schwartz O, Eberbach A, Katz N, Hehrlein FW, et al. Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin iv converting enzyme is associated with coronary heart disease and myocardial infarction in low risk patients. *Circulation*, 1995, **92**: 2796-799
- [4] 隋建华, 李文辉, 彭晓, 雷任义. 血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性与冠心病关系的初步研究. *天津医药*, 1999, **27** (12): 707-709
- [5] 赖玉琼, 熊华峰, 胡晖, 崔金环, 方征, 刘晓松, 等. 血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性与冠状动脉病变. *临床心血管病杂志*, 1999, **15** (10): 452-454
- [6] 胡福莉, 白玉茹, 伍严安, 陈发文, 陈慧, 胡锡衷. 血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性与冠心病的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (4): 300-303
- [7] 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清血管紧张素转化酶水平的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (2): 134-136
- [8] 徐秀英, 叶珏, 杜风和, 张剑峰, 惠汝太. 血管紧张素转化酶基因多态性与内皮功能的研究. *心脏杂志*, 2000, **12** (2): 84-86
- [9] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin iv-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 1990, **86** (4): 1343-346
- [10] Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Gaziano JM, Grodstein F, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) genotype and risk of myocardial infarction (MI). *Clin Res*, 1993, **41**: 216

(此文编辑 文玉珊)