

[文章编号] 1007-3949(2006)14-08-0677-04

•临床研究•

血管紧张素原基因 M235T 多态性与冠状动脉病变的关系

贾永平¹, 任洁², 吕吉元¹

(1. 山西医科大学第一医院心内科, 山西省太原市 030001;

2. 太原市中心医院冠心病监护病房, 山西省太原市 030009)

[关键词] 内科学; 血管紧张素原; 限制片长多态性; 基因多态性; 冠状动脉病变; 基因型; 等位基因频率

[摘要] 目的 研究我国山西及周边地区人群血管紧张素原基因 M235T 多态性与冠状动脉病变的关系。方法 选择 152 名行冠状动脉造影的住院患者为研究对象, 根据冠状动脉病变支数和积分分组, 应用聚合酶链反应结合限制片长多态性对患者的基因型和等位基因进行分析并比较。结果 冠状动脉病变支数和积分不同者, 其 TT 基因型分布和 T 等位基因频率不同, 该差异有显著性(χ^2 分别为 29.537、28.560、31.970 和 31.771, 均 $P < 0.01$)。病变支数和积分与 T 等位基因频率均呈正相关关系(r 分别为 0.396 和 0.395, 均 $P < 0.01$)。结论 血管紧张素原基因变异与冠状动脉病变支数和冠状动脉积分均具有相关性。T 等位基因频率越高, 冠状动脉病变支数越多, 冠状动脉积分越高。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship Between the Angiotensinogen Gene M235T Polymorphism and Coronary Vessel Disease

JIA Yong-Ping¹, REN Jie², and LV Ji-Yuan¹

(1. Department of Cardiology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; 2. Coronary Care Unit of Taiyuan Central Hospital, Taiyuan 030009, China)

[KEY WORDS] Angiotensinogen; Gene Polymorphism; Restriction Enzyme Digestion; Genotype; Allele Frequency; Coronary Vessel Disease; Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between the angiotensinogen gene M235T polymorphism and coronary vessel disease in Chinese people from Shanxi and its vicinity. **Methods** Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme digestion was used to study 152 patients who were accepted coronary angiography. Genotype and allele frequency of the patients was compared according to the number of coronary vessel disease and mean coronary heart disease (CHD) scores. **Results** The TT genotype and T allele frequency are different in the patients for the variation of the number of coronary vessel disease and mean CHD scores($\chi^2 = 29.537, 28.560, 31.970, 31.771$ respectively, $P < 0.01$). Positive correlation is existed in T allele frequency and the number of disease or scores($r = 0.396, 0.355$ respectively, $P < 0.01$). **Conclusions** There is an association between gene variants of the angiotensinogen and the number of coronary vessel disease and mean CHD scores. The number of coronary vessel disease and mean CHD scores will be higher gradually with the increase of T allele frequency.

近年来,一些研究发现肾素-血管紧张素系统基因变异与冠心病(coronary heart disease, CHD)发病相关。而血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)作为肾素-血管紧张素系统中的一个重要组成部分,其基因变异更应受到关注。与冠心病相关的 AGT 基

因变异主要是在 AGT 基因第 2 个外显子+704 位置上的胸腺嘧啶核苷酸(T)变成了胞嘧啶核苷酸(C),导致第 235 个密码子编码的甲硫氨酸(Met)变成了苏氨酸(Thr),即 M235T,从而形成 235M(野生型)和 235T(变异型)2 个等位基因,构成了纯合子 235MM、235TT 和杂合子 235MT 型 3 种基因型。很多的研究已表明 AGT 基因变异与冠心病具有相关性^[1-4],T 等位基因是冠心病发病的危险因素,但对于 T 等位基因与冠状动脉病变程度的关系却研究极少,本研究应用聚合酶链反应-限制片长多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP),分析 AGT 基因的 M235T 多态性,旨在

[收稿日期] 2005-12-06 [修回日期] 2006-06-16

[基金项目] 山西省自然科学基金项目资助(20021111)

[作者简介] 贾永平,博士,教授,研究方向为冠心病的诊断和介入治疗,联系电话为 0351-4044111, E-mail 为 JiaYongPing6010@yahoo.com。任洁,硕士,主治医师,研究方向为冠心病基础与临床,联系电话为 0351-5656189, E-mail 为 rj_1969@163.com。吕吉元,博士,教授,研究方向为冠心病的介入治疗,联系电话为 0351-4044111, E-mail 为 JYLJI@hotmail。

探讨山西及周边地区人群 AGT 基因多态性与冠状动脉病变的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

选择病人共 152 例,其中男性 98 例,女性 54 例,年龄 59.45 ± 10.46 岁,均为 2004 年 2~11 月在本院住院且经冠状动脉造影的患者。所有入选者均询问高血压、糖尿病、高血脂病史以及家族史,调查吸烟、饮酒等生活习惯;测身高、体重,计算体质指数;检测血糖、血脂水平(包括胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白)。

1.2 冠状动脉造影

全部进行选择性冠状动脉造影检查,结果按病变支数分为无病变、单支病变、双支病变和三支病变共 4 组;按积分分为 0 分、4 分以下、4 分~ 和 8 分~ 共 4 组。冠状动脉病变血管损害程度采用 Gensini 法记分^[5],选用 8 支主要的血管段,包括左主干、前降支近段、前降支中段、第一对角支、回旋支近段、回旋支中段、右冠状动脉近段和右冠状动脉中段共 8 支血管,若间隔支、第二对角支、钝缘支及前降支远段中任一血管的直径超过上述 8 支血管中的任一血管,即用该支血管取代直径较小的血管。

血管评分:所选血管按其最狭窄处评分。0 分:狭窄 < 25%; 1 分:狭窄 25%~49%; 2 分:狭窄 50%~74%; 3 分:狭窄 75%~99%; 4 分:100% (完全闭塞);最后总分为 8 支血管记分的总分,若一支血管段多处狭窄,即以该段血管最狭窄处记分。

1.4 血管紧张素原基因多态性的检测

1.4.1 基因组 DNA 提取 抽取外周静脉血 2~3 mL, EDTA 抗凝低渗法裂解红细胞,分离白细胞,酚-氯仿法抽提基因组 DNA,纯度 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 。

1.4.2 聚合酶链反应引物 AGT 基因扩增引物序列按 Ishigami 等^[6]报道,由 TaKaRa 公司合成。上游引物序列为 5'-CGT TTG TGC AGG GCC TGG CTC TC-3';下游引物序列为 5'-AGG GTG CTG TCC ACA CTG GAC CG-3' (AC 为非配对碱基)。

1.4.3 目的 DNA 片段聚合酶链反应扩增 聚合酶链反应体系为 50 μ L,其中含基因组 DNA 1 μ g、dNTP 200 μ mol/L、EX Taq 酶 2.0 Unit、10 \times EX Taq Buffer(含 $MgCl_2$) 5 μ L、P1 54.25 pmol 和 P2 54.25 pmol(以上除 DNA 外,均由 TaKaRa 公司提供)。用 PE 9600 扩增仪扩增,循环参数:93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,接 10 个循环的 93 $^{\circ}$ C 变性 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 退火 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸

各 30 s,再接 20 个循环的 90 变性 \rightarrow 55 退火 \rightarrow 72 延伸各 30 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色检测。

1.4.4 限制性内切酶消化 酶切反应体系为 20 μ L,其中包括 PCR 产物 6 μ L,内切酶 Tth111-I 1 μ L (12 u/ μ L, TaKaRa 公司提供),10 \times K Buffer 2 μ L,三蒸水 11 μ L。混匀后 65 $^{\circ}$ C 恒温消化 3 h。

1.4.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳分型 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分型,180 V 恒压,电泳 3 h。银染分析电泳结果,并拍照。

1.5 统计学处理

基因型及等位基因频率分布采用 χ^2 检验,相关性用双变量相关分析,所有数据均用 SPSS 软件包进行处理, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 血管紧张素原基因多态性的比较

聚合酶链反应扩增产物为 163 bp 的 DNA 片段,经限制性内切酶 Tth111-I 消化后,产生 140 bp 片段。若 2 个等位基因均含内切酶识别位点,酶切后只产生 140 bp 片段定为 TT 型,若只有 1 个等位基因含内切酶识别位点,酶切后产生 163 bp 和 140 bp 2 个片段定为 MT 型,若 2 个等位基因均无识别位点,则不被酶切,定为 MM 型(图 1)。

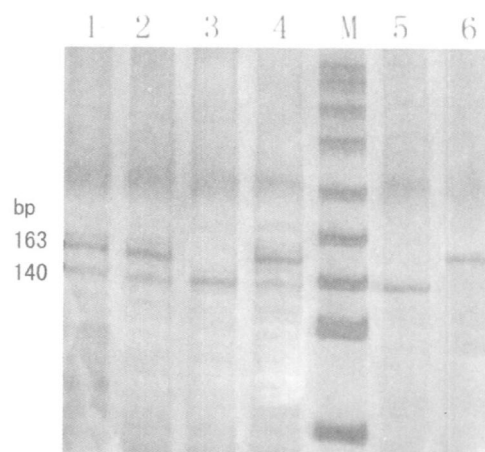


图 1. 血管紧张素原基因的多态性 1、2 和 4 为 MT 型,3 和 5 为 TT 型,6 为 MM 型,M 为 pUC19 DNA/MspI (Hpa II) Marker。M 条带从上往下分别为 501、489、404、331、242、190、147、111 和 67 bp。

2.2 按病变支数分组血管紧张素原基因多态性的比较

4 组基因型和等位基因频率分布差异均有显著性(均 $P < 0.01$)。对 4 组基因型和等位基因频率分别进行两两比较($\alpha' = 0.0083$)发现,无病变组与双支病变组及三支病变组、单支病变组与三支病变组

之间的基因型,无病变组与双支病变组及三支病变组、单支病变组与双支病变组及三支病变组之间的等位基因频率差异有显著性,其余均无差异(表 1)。

表 1. 按血管病变支数分组各组血管紧张素原基因型及等位基因频率的比较

分组 (n)	基因型			等位基因	
	MM	MT	TT	M	T
无病变组 (52)	11 (21.2%)	23 (44.2%)	18 (34.6%)	45 (43.3%)	59 (56.7%)
单支病变组 (32)	6 (18.8%)	13 (40.6%)	13 (40.6%)	25 (39.1%)	39 (60.9%)
双支病变组 (30)	1 (3.3%)	7 (23.3%)	22 (73.3%)	9 (15.0%)	51 (85.0%)
三支病变组 (38)	2 (5.3%)	4 (10.5%)	32 (84.2%)	8 (10.5%)	68 (89.5%)

4 组间总体比较 $P < 0.01$, 基因型和等位基因 χ^2 分别为 28.560 和 31.771。

2.3 按病变积分分组血管紧张素原基因多态性的比较

4 组基因型和等位基因频率差异均有显著性(均 $P < 0.01$)。对 4 组基因型和等位基因频率分别

进行两两比较($\alpha' = 0.0083$)发现,0 分组与 4 分~ 组及 8 分~ 组、4 分以下组与 4 分~ 组及 8 分~ 组的基因型和等位基因频率比较差异有显著性(均 $P < 0.01$),其余均无差异(表 2)。

表 2. 按冠状动脉积分分组各组血管紧张素原基因型及等位基因频率的比较

分组 (n)	基因型			等位基因	
	MM	MT	TT	M	T
0 分组(52)	11(21.2%)	23(44.2%)	18(34.6%)	45(43.3%)	59(56.7%)
4 分以下组(31)	6(19.4%)	12(38.7%)	13(41.9%)	24(38.7%)	38(61.3%)
4 分~ 组(38)	2(5.3%)	9(23.7%)	27(71.1%)	13(17.1%)	63(82.9%)
8 分~ 组(31)	1(3.2%)	3(9.7%)	27(87.1%)	5(8.1%)	57(91.9%)

4 组间总体比较 $P < 0.01$, 基因型和等位基因 χ^2 为分别 28.560 和 31.771。

2.4 冠状动脉积分、病变支数与 T 等位基因的相关性分析

Pearson 相关系数 r 分别为 0.396 和 0.395, 均 $P < 0.01$, 故认为冠状动脉积分与 T 等位基因、病变支数与 T 等位基因都存在正相关关系, 冠状动脉积分越高、病变支数越多, T 等位基因频率越高。

3 讨论

目前的研究认为, 冠心病为多基因遗传性疾病, 遗传和环境共同参与其发病过程, 肾素—血管紧张素系统在冠心病的发病中占有相当重要的地位, 血管紧张素原(AGT)是肾素—血管紧张素系统中唯一的初始底物, 可以在肾素及血管紧张素转化酶的作用下形成血管紧张素(Ang)Ⅱ。Ang Ⅱ具有收缩血管、调节水盐代谢和醛固酮生物合成的作用。Ang Ⅱ还可刺激血管平滑肌细胞生长、心肌细胞和内膜增生, 提高交感神经活性, 增加冠状动脉阻力, 甚至可能诱发心律失常。

目前认为 AGT 基因多态性可以改变血浆 AGT 水平^[7]。Winkelmann 等^[8]研究了 AGT M235T 基因变异对冠心病和心肌梗死后存活者血浆 AGT 水平的影响, 发现血浆 AGT 水平随 235T 等位基因数量的增加而增加。而血浆 AGT 的增加又可引起 Ang Ⅱ水平的过度增高, 从而使血压升高, 心脏后负荷增加, 导致心肌肥厚。Ang Ⅱ的过度增高还可使内皮功能失调, 诱发心肌缺血及粥样斑块破裂。也可使低密度脂蛋白在血管壁滞留、氧化及被吞噬细胞吞噬, 这些对冠心病发生发展都具有促进作用。

本研究发现, 由于病变支数和冠状动脉积分的不同, TT 基因型和 T 等位基因频率差异也有显著性, 总体比较均 $P < 0.05$, 经双变量相关性分析发现, 冠状动脉积分与 T 等位基因、病变支数与 T 等位基因 Pearson 相关系数 r 分别为 0.396 和 0.395, P 均 < 0.01 , 表明病变支数、冠状动脉积分和 T 等位基因均呈正相关关系, 病变支数越多、冠状动脉积分越高, T 等位基因频率越高。而 Gardemann 等^[9]在分析 AGT 基因多态性与冠心病的发生及其程度的关系中

发现,T 和 M 等位基因频率在没有或有单支、双支、多支血管病变的病人中无明显区别,在 ≥ 62 岁的个体中 MM、MT 和 TT 基因型平均冠状动脉得分也无差异,而在 62 岁以下的个体中 TT 基因型得分明显高于 MM 基因,MT 基因型居于二者之中。此结论与本研究有所差异。

各研究结果存在差异的原因可能与人群的种族、研究对象的选择及研究方法有关。本研究采用 PCR-RFLP 方法检测 AGT 基因突变,在 PCR 扩增的过程中选择了 TaKaRa 公司的 Ex Taq 酶(Hot Start Version),与相关研究中所用的普通 Taq 酶比较有效避免了非特异性扩增,提高了扩增的效率和特异程度,增加了结果的准确性。在限制性内切酶酶切过程中,我们严格掌握反应体系各成分的比例、反应时间和反应温度,从而避免了因酶切不彻底造成的结果误差。另外,所选病例全部采用 Judkins 法进行选择冠状动脉造影术,造影结果由两位经验丰富的主任医师进行判断,冠状动脉病变血管损害程度采用 Gensini 法积分,结果比较可靠。但客观存在的种族因素是不可避免的。Olivieri 等^[2]发现 AGT 235T 等位基因频率在亚洲与高加索人群中具有相当大的差异,分别为 0.63~0.79 和 0.35~0.41,因此认为被研究者种族不同及种族的变异对结论会有很大的影响。在日本和中国人群中由于种族的变异基因型也有所区别。

肾素-血管紧张素系统在心血管疾病发生和发展中的作用已日益引起关注,许多研究提示 AGT T 等位基因为冠心病发病的危险因素,本研究又得出 AGT 基因变异与冠状动脉病变相关的结论。T 等位基因发生频率越高,冠状动脉病变支数越多、程度越重。通过对 AGT M235T 基因多态性与冠状动脉病

变关系的研究,对评价冠状动脉病变的危险因素和识别冠状动脉病变的易感人群提供了依据,也为冠状动脉病变的有效预防提供了理论基础。但该研究例数偏少,更准确的结果有待扩大样本量进一步研究得出。另外,对二者关系的研究还需进一步、多方面进行探讨,以求得出更加完善的结果。

[参考文献]

- [1] Perez JC, Esparragon F, 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 PROCA-GENE study, prospective cardiac gene[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37** (6): 1536-542
- [2] Olivieri O, Stranieri C, Girelli D, Pizzolo F, Grazioli S, Russo C, et al. Homozygosity for angiotensinogen 235T variant increase the risk of myocardial infarction in patients with multivessel coronary artery disease[J]. *J Hypertens*, 2001, **19** (5): 879-884
- [3] Ortega E, Aceituno A, Esparragon FJ, Perera O, Nuez F, Espinosa A, et al. The involvement of the renin-angiotensin system gene polymorphisms in coronary heart disease[J]. *Rev Esp Cardiol*, 2002, **55** (2): 89-91
- [4] Buraczynska M, Pijanowski Z, Spasiewicz D, Nowicka T, Sodoski T, Czekajka T, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms: assessment of the risk of coronary heart disease[J]. *Kardiol Pol*, 2003, **58** (1): 1-9
- [5] Fujiwara R, Kutsumi Y, Havashi T. Relation of angiographically defined coronary artery disease and plasma concentration of insulin, lipid, and apolipoprotein in normolipidemic subjects with varying degrees of glucose tolerance[J]. *Am J Cardiol*, 1995, **75** (2): 122-126
- [6] Ishigami T, Umemura S, Wamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, et al. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis[J]. *Circulation*, 1995, **91** (4): 951-954
- [7] Brand E, Chatelain N, Paillard F, Tiret L, Visvikis S, Lathrop M, et al. Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis[J]. *Eur J Hum Genet*, 2002, **10** (11): 715-723
- [8] Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohm BO, Maier V, et al. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease[J]. *Am Heart J*, 1999, **137** (4): 698-705
- [9] Gardemann A, Streicker 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[J]. *Atherosclerosis*, 1999, **145** (2): 309-314

(此文编辑 朱雯霞)