

高血压人群血管紧张素转换酶和细胞色素 P450 3A5 基因多态性调查

姜绮霞, 袁洪, 黄志军, 刘晶晶, 李丽军, 阳国平

(中南大学湘雅三医院心内科, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 血管紧张素转换酶; 细胞色素 P450 3A5; 高血压; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨湖南高血压人群血管紧张素转换酶基因和细胞色素 P450 3A5 基因多态性分布。方法 高血压患者 583 名, 其中 403 名娄底和湘潭地区原发性高血压病患者进行血管紧张素转换酶基因多态性检测; 180 名长沙和株洲地区原发性高血压患者进行细胞色素 P450 3A5 基因多态性检测。结果 血管紧张素转换酶基因 I 和 D 等位基因频率分别为 55.8% 和 44.2%, ID 基因型最常见。细胞色素 P450 3A5 基因*1 和*3 等位基因频率分别为 35.0% 和 65.0%, *1*3 基因型最常见。在不同性别高血压人群中上述两种候选基因的基因型和等位基因频率差别均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 湖南地区高血压人群血管紧张素转换酶基因和细胞色素 P450 3A5 基因多态性分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 高血压人群中常见几类降压药物的主要代谢酶或受体的基因多态性存在个体差异, 这为高血压人群单一药物治疗提供了初步的遗传学依据。

[中图分类号] R18

[文献标识码] A

Investigation for Angiotensin Converting Enzyme and Cytochrome P450 3A5 Gene Polymorphism of Hypertensive Patients

JIANG Qi-Xia, YUAN Hong, HUANG Zhi-Jun, LIU Jing-Jing, LI Li-Jun, and YANG Guo-Ping

(Cardiology Department, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Converting Enzyme, Cytochrome P450 3A5, Hypertension, Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To approach polymorphism distribution of angiotensin converting enzyme (ACE) and cytochrome P450 (CYP) 3A5 gene of hypertensive patients in Hunan province. **Methods** There were 583 hypertensive patients. ACE gene polymorphisms of 403 hypertensive patients in Loudi and Xiangtan were investigated. While CYP3A5 gene polymorphisms of 180 hypertensive patients were investigated. **Results** ACE allele frequency was I (55.8%) and D (44.2%), in order with ID as the highest genotype. CYP3A5 allele frequency was*1 (35.0%) and*3 (65.0%), in order with*1*3 as the highest genotype. No sex difference was found in genotypes and allele frequency distributions (all $P > 0.05$). **Conclusion** Polymorphism distribution of ACE and CYP3A5 gene of hypertensive patients in Hunan province reached Hardy-Weinberg genetic balance. hypertension related drug metabolism enzyme and receptor gene polymorphisms showed the individual differences which provided the previous genetrical evidences for single-drug therapy in hypertension population.

随着人类基因组计划的实施和药物基因组学研究的不断深入, 药物相关代谢酶、转运蛋白和受体的基因多态性是影响药物反应个体差异的主要因素。抗高血压药物降压疗效的个体差异同样与个体的基因型密切相关。已有研究表明, 血管紧张素转换酶 (ACE) 基因和细胞色素 P450 3A5 (CYP3A5) 基因多态性对原发性高血压的治疗具有重要的指导意

义。目前尚无大规模同时对以上两种基因的多态性进行流行病学的调查, 本研究应用 PCR 和 PCR-RFLP 对湖南中部地区 403 例原发性高血压患者进行了 ACE 基因和 CYP3A5 基因多态性调查, 以了解以上 2 种基因多态性在我国湖南原发性高血压人群中频率分布特点, 为进行高血压的前瞻性给药研究提供遗传学依据。

[收稿日期] 2009-11-04 [修回日期] 2010-01-15

[基金项目] 国家自然科学基金 (30873126) 资助

[作者简介] 姜绮霞, 硕士, 医师, 现于第二军医大学附属第二医院 (上海长征医院) 心内科工作, Email 为 vivian830505@ yahoo.com.cn。通讯作者袁洪, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高血压个体化治疗和临床心血管药理研究, Email 为 yuanhong01@vip.sina.com。黄志军, 博士, 助理研究员, 主要从事高血压个体化治疗和临床心血管药理研究。

1 对象和方法

1.1 对象

湖南长沙、株洲、娄底和湘潭四个地区原发性高血压病患者 583 人, 汉族, 年龄 18~75 岁, 性别不限。自愿参加试验并能合作者, 经一周停药洗脱期

后,诊断标准参照 2004 年颁布的《中国高血压防治指南》^[1]。排除标准:各类型继发性高血压、严重肝肾功能损害、妊娠妇女、肿瘤、酗酒、吸毒、精神异常及智力障碍者。

1.2 血管紧张素转换酶基因多态性鉴定

从全血中抽提 DNA。设计 PCR 引物,上游引物为 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3',下游引物为 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3',PCR 反应条件为 94℃预变性 5 min 后,94℃变性 1 min,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min,4℃保温,产物经 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。为了避免因 D 等位基因优先扩增和 I 等位基因无效扩增而引起的错分,对所有经上述引物扩增鉴定为 DD 基因型的样本,再用第二对引物进行扩增鉴定,上游引物为 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3',下游引物为 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3',PCR 反应条件为 94℃预变性 5 min 后,94℃变性 1 min,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,72℃延伸 10 min,4℃保温,扩增产物片段大小为 335 bp,产物经 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析,出现 335 bp 条带的最后判断为 ID 基因型。

1.3 细胞色素 P450 3A5 基因多态性鉴定

从全血中抽提 DNA。设计 PCR 引物,上游引物为 5'-CAT GAC TTA GTA GAC AGA TGA-3',下游引物为 5'-GGT CCA AAC AGG GAA CAA ATA-3',PCR 反应条件为 94℃预变性 1 min 后,94℃变性 30 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 32 个循环,最后

72℃延伸 5 min,4℃保温。产物用 Ssp I 进行酶切,2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,* 1* 1 纯合子产生 148 bp,125 bp 和 20 bp 片段,* 1* 3 杂合子产生 168 bp,148 bp,125 bp 和 20 bp 片段,* 3* 3 纯合子产生 168 bp 和 125 bp 片段,20 bp 片段较小,在电泳结果中未显示出。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS11.5 统计软件包进行统计分析。计数资料间比较采用 χ^2 或 Fisher 确切概率法检验。

2 结果

2.1 一般情况

403 名娄底和湘潭地区高血压患者的测试结果均有效,全部纳入分析,其中男性 208 名,女性 195 名,年龄 57.7 ± 17.5 岁,入选时收缩压为 148.0 ± 9.0 mmHg 舒张压为 98.0 ± 5.1 mmHg。180 名长沙和株洲地区高血压患者的测试结果均有效,全部纳入分析,其中男性 92 名,女性 88 名,年龄 63.5 ± 6.4 岁,入选时收缩压为 166.0 ± 10.2 mmHg 舒张压为 97.0 ± 8.5 mmHg。

2.2 血管紧张素转换酶基因多态性分布

403 名高血压患者中 ACE 基因型频率及等位基因频率经检验符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($P > 0.05$),具有群体代表性。基因型以 ID 型最高,II 型次之,DD 型最少。I 等位基因频率高于 D 等位基因频率。在不同性别高血压人群中基因型和等位基因频率差别无统计学意义 ($P > 0.05$ 表 1)。

表 1 ACE 基因型和等位基因在不同性别高血压患者中的频率分布

性别	例数	基因型			等位基因	
		DD	ID	II	D	I
男	208	48(23.1%)	86(41.3%)	74(35.6%)	182(43.8%)	234(56.2%)
女	195	40(20.5%)	94(48.2%)	61(31.3%)	174(44.6%)	216(55.4%)
合计	403	88(21.8%)	180(44.7%)	135(33.5%)	356(44.2%)	450(55.8%)

2.3 细胞色素 P450 3A5 基因多态性分布

180 名高血压患者中 CYP3A5 基因型频率及等位基因频率经检验符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($P > 0.05$),具有群体代表性。基因型以* 1* 3 型最高,* 3* 3 型次之,* 1* 1 型最少。* 3 等位基因频率高于* 1 等位基因频率。在不同性别高血压人群中基因型和等位基因频率差别均无统计学意义 ($P > 0.05$ 表 2)。

3 讨论

遗传因素在高血压的发生、发展中起着重要的作用,同时也是导致药物疗效和不良反应存在个体差异的主要原因。识别高血压易感基因、进行与药物疗效的相关基因多态性流行病学调查是全面阐明高血压发生机制和个体疗效差异的基础,也是制定个体化治疗优化方案的前提。

表 2 CYP3A5基因型和等位基因在不同性别高血压患者中的频率分布

性别	例数	基因型			等位基因	
		* 3* 3	* 3* 1	* 1* 1	* 3	* 1
男	92	37 (40.3%)	45 (49.0%)	10 (10.9%)	119 (64.7%)	65 (35.3%)
女	88	36 (40.9%)	43 (48.8%)	9 (10.2%)	115 (65.3%)	61 (34.7%)
合计	180	73 (40.5%)	88 (48.9%)	19 (10.6%)	234 (65.0%)	126 (35.0%)

ACE是血管紧张素iv(Ang I)转化为血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)的关键酶,在原发性高血压发生、发展中起重要作用。ACE编码基因是高血压候选易感基因之一,研究极为广泛。人类ACE基因位于17号染色体长臂的2区3带(17q23),属单拷贝基因,全长21 kb,含26个外显子及25个内含子。在16内含子中存在一种Alu重复序列(其长度为287 bp)的插入和缺失(I/D)的多态性,构成2种等位基因I和D,以及DD、ID和II 3种DNA基因型。既往研究表明随着ACE中D等位基因的数目增多,血浆中ACE浓度也增高,DD型基因的血浆ACE水平为II型的两倍,杂合子ID型则介于两者之间;并且发现个体ACE水平差异的近50%是由ACE基因多态性决定的。本研究发现,高血压人群基因型以ID型最高,II型次之,DD型最少,I等位基因频率高于D等位基因,这与相关文献[2]报道一致。关于ACE基因与血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)降压效果的研究,各种观点不尽一致。Li等^[3]研究贝那普利疗效和ACE基因型的关系时,发现DD基因型高血压患者的收缩压和舒张压均较II型明显下降。但唐晓鸿等^[4]研究发现,卡托普利的降压疗效与ACE基因I/D多态性无明显相关。Yu等^[5]对该基因多态性与其他两种ACEI类药物(咪达普利和贝那普利)的观察研究同样未发现有明显差异。

CYP3A5基因位于人类第7号染色体q21.1-22.1,全长为31.8 kb,迄今已发现了CYP3A5* 2、CYP3A5* 3、CYP3A5* 4、CYP3A5* 5、CYP3A5* 6等多个突变等位基因^[6,7],其第3内含子6986A→G单核苷酸多态性是引起酶活性差异的主要原因。GG型个体(CYP3A5* 3* 3)是最常见的类型,也称为“突变型”,AA型(CYP3A5* 1* 1)或GA型(CYP3A5* 1* 3)命名为“CYP3A5表达型”,也统称为“野生型”。有研究显示,CYP3A5* 3纯合子的总CYP3A5 mRNA水平比野生型CYP3A5* 1等位基因携带者显著减少,CYP3A5酶表达量明显下降^[8]。这是由于CYP3A5* 3* 3突变引起可变剪切,产生不稳定蛋白质,从而使得突变型纯合子个

体,即携带基因为CYP3A5* 3* 3的人不表达CYP3A5蛋白^[9]。CYP3A5的表达及其活性有很大的个体及种族差异,不同种族的发生频率差异较大,且在人群中的分布具有遗传多态性。CYP3A5* 3等位基因在各种族人群中的发生频率最高,而CYP3A5* 2、CYP3A5* 6最低^[10]。CYP3A5* 3在中国人、日本人、韩国人、南亚人、黑种人、白种人及西班牙人中的发生频率为71%~76%、71%~85%、70%、59%~61%、27%~55%、84%~95%和62%~83%^[11,12]。Hu等^[13]检测了302例中国人CYP3A5* 3等位基因的频率,结果为77.8%。王汉平等^[14]检测了180例中国人CYP3A5* 3等位基因频率为76.1%,并且未能检测到单核苷酸多态性(CYP3A5 6-30597G>A)在人群中的分布,证实了CYP3A5* 3是中国人群体中最重要的CYP3A5等位基因变异体。本研究中,CYP3A5* 3基因的突变频率为65.0%,与文献报道的中国人群相符。目前有关CYP3A5基因多态性和钙离子拮抗剂血药浓度及药效关系的研究较多。Kim等^[15]发现在韩国人群健康受试者中携带CYP3A5* 3* 3者氨氯地平血药浓度低于CYP3A5* 1* 3和CYP3A5* 1* 1基因型者。Jin等^[16]研究证实,CYP3A5表达者对口服维拉帕米的清除率显著升高,药效因此减弱。依据CYP3A5基因多态性来进行钙离子拮抗剂的选择,对提高药物疗效、减少不良反应,达到优化的个体化治疗有重要意义。

[参考文献]

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会. 2004年中国高血压防治指南(实用本)[J]. 高血压杂志, 2004, 12(6): 483-486
- [2] 俞群军, 杨丽君, 毛艳梅, 等. 怀化地区影响高血压病人治疗的药物相关基因分布及其检测[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(2): 175-182
- [3] Li X, Du Y, Du Y, et al. Correlation of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with effect of antihypertensive therapy by angiotensin-converting enzyme inhibitor[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2003, 8(1): 25-30
- [4] 唐晓鸿, 袁洪, 李丽军, 等. 血管紧张素转化酶基因I/D多态性与卡托普利疗效和咳嗽不良反应的关系及其可能机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(5): 376-380

(下转第168页)