

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0405-04

· 临床研究 ·

## 中国苗族人群血管紧张素原和血管紧张素转化酶基因多态性与冠心病的关系

祝有国, 王福军, 符自清, 向亚东

(湖南省湘西自治州人民医院, 湖南省吉首市 416000)

[关键词] 冠状动脉粥样硬化; 血管紧张素原; 血管紧张素转化酶; 聚合酶链反应; 基因多态性

[摘要] 目的 研究血管紧张素原(AGT)基因 M235T 分子变异和血管紧张素转化酶(ACE)基因 I/D 多态性与冠状动脉粥样硬化的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测冠心病(CHD)组 151例和正常对照组 127例 AGT 基因多态性,采用聚合酶链反应技术检测 CHD 组 151例和正常对照组 127例 ACE 基因 I/D 多态性。结果 CHD 组 AGT-TT 基因型频率为 76.26%, 显著高于对照组 44.10% ( $P < 0.01$ ), ACE-DD 基因型频率为 35.10%, 显著高于对照组 14.96% ( $P < 0.01$ )。结论 在中国苗族人群中, AGT 基因 TT 基因型和 ACE 基因 DD 基因型是 CHD 发病既相互独立又具有协同作用的危险因素。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Association Between the Gene Polymorphism of Angiotensinogen and Angiotensin Converting Enzyme and Coronary Artery Disease

ZHU You-Guo, WANG Fu-Jun, FU Zi-Qing and XIANG Ya-Dong

(The People's Hospital of the Western Hunan Tujia miao Autonomous Prefecture, Jishou 416000, China)

[KEY WORDS] Coronary Atherosclerosis; Angiotensinogen; Angiotensin Converting Enzyme; Polymerase Chain Reaction(PCR); Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relation between the polymorphisms of angiotensinogen (AGT) genotype M235T and angiotensin-converting enzyme(ACE) genotype I/D and coronary atherosclerosis. **Methods** The study population was consisted of 151 patients with coronary heart disease(CHD), the healthy control group was consisted of 127 without CHD. Patients with CHD were compared with those persons in the healthy control group. AGT gene polymorphism was tested with polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technology and ACE gene polymorphism was tested with PCR. **Results** The ratio of AGT-TT and ACE-DD genotype in CHD group was separately 76.26% and 35.10%, which was significantly higher than the control group (44.10% and 14.96%). There was significant difference of the AGT-TT genotype between the CHD group and the control group ( $P < 0.01$ ); so was ACE-DD genotype between the two group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** In the population of Chinese miao nationality, the gene polymorphisms of genotype AGT-TT and genotype ACE-DD are two risk factors of CHD morbidity and they are both independent of each other but also mutually coordinated.

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 的发生发展与遗传因素和多种环境因素相关, 凡参与冠状动脉粥样硬化、血栓和血管收缩发病机制的因子都会促进 CHD 发展, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 基因变异可能是其危险因素之一。血管紧张素原 (angiotensinogen, AGT) 和血管紧张素转化酶 (angiotensin conversion enzyme, ACE) 是 RAS 的重要组成部分。人 AGT 基因定位于 1 号

染色体长臂 42-43 区, AGT C DNA 由 1455 个核苷酸组成, 编码含有 485 个氨基酸蛋白质。AGT 基因由 5 个外显子和 4 个内含子构成全长 13 kb, 至今已发现 AGT 基因有 15 种变异, 其中第 2 外显子上第 704 位核苷酸 T 突变导致第 235 位氨基酸由蛋氨酸变成苏氨酸 (M235T)。目前对于 M235T 等位基因的研究较多<sup>[1]</sup>。人 ACE 基因定位于染色体 17q23 区, 有 26 个外显子和 25 个内含子, 其中第 16 内含子中有一个 287 bp 的 DNA 片段存在插入 (insertion, I) 缺失 (deletion, D) 多态性<sup>[2]</sup>。AGT 基因型 M235T 突变和 ACE 基因第 16 内含子插入或缺失与 CHD 的关系是目前许多学者研究的热点, 但有关与苗族人群相关性报告不多, 本研究旨在探讨 AGT 和 ACE 基因多态性与苗族人群 CHD 发病关系。

[收稿日期] 2009-11-13 [修回日期] 2010-04-18

[作者简介] 祝有国, 副主任医师, 研究方向为生物分子变异与冠心病的关系。联系电话为 0743-8268172, E-mail 为 zhuyouguo111@163.com。王福军, 主任医师, 研究方向为心电图异常改变与心脏疾病的关系, 联系电话为 0743-8268156。符自清, 副主任检验师, 研究方向为分子生物学检测方法学, 联系电话为 0743-8235333。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

正常对照组 127 例,为同期健康体检者,男 71 例,女 46 例,平均年龄为  $58.1 \pm 10.8$  岁。经详细询问病史,查体 X 线胸片、ECG、B 超及血生化检查排除 CHD,且无心脑血管病或糖尿病家族史。冠心病(CHD)组 151 例,为 2005 年 3 月至 2009 年 9 月在我院心内科住院患者,男 96 例,女 55 例,平均年龄为  $59.7 \pm 11.3$  岁。其中不稳定型心绞痛患者有 83 例,心肌梗死患者 68 例,均用 SPECT 心肌灌注显像和冠状动脉造影检查确诊。以上两组均为苗族,家族婚姻史为世代族内通婚。来源于湖南省西部吉首市、怀化市及重庆市秀山县、贵州省铜仁地区等毗邻地区的苗族群聚区。

### 1.2 人基因组 DNA 的抽取

抽取外周静脉血 5 mL 抗凝 (EDTA-Na<sub>2</sub>),用 6% Dextran(M 60 万)分离白细胞、蛋白酶 K 消化细胞核,氯仿抽取和乙醇沉淀,双蒸水重溶基因组 DNA。具体步骤参考《分子克隆实验指南》。

### 1.3 AGT 基因 M235T 分子变异和 ACE 基因 I/D 多态性检测

AGT 基因 M235T 分子变异检测采用 PCR/RFLP 方法分析,引物位于 AGT 基因第 2 外显子内,由 Genco-BRL 公司合成,其序列为 5'-CGT TTG TGC AGG GCG TGG CTC TC-3' 和 5'-AGG GTG CTG TCC ACA ACT GGA CCC-3' (AC 为非配对碱基),在 AGT 基因第 2 外显子内 704 外核苷酸 T 转变 C,并不改变限制性酶切位点,但产生一个适合被 *Thl11iv* (C>NNGTC) 酶切的“半位点”,与之相应的另一个“半位点”的引入是通过存在两个非配对碱基的 PCR 引物来完成。PCR 反应终体积为 50  $\mu$ L。PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8 min 扩增目的基因。PCR 产物经 *Thl11iv* (Promega 公司)限制性内切酶酶切(具体操作过程参照产品说明书)取酶切产物 10  $\mu$ L 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。DNA 用溴化乙锭 (EB) 染色,在 UV 透射仪上观察结果:仅有 163 bp 带为 MM 纯合子型,仅有 140 bp 带的为 TT 纯合子型,具有 163 bp 和 140 bp 两条带的为 MT 杂合子型。ACE 基因 I/D 多态性检测采用 PCR 方法分析,引物位于 ACE 基因的第 16 内含子内,由 Sangon 公司合成,其序列为 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAG-3' 和 5'-TCG CCA CGC CTC CCA TCG CCA TAA-3'。PCR 反应终体积为 50  $\mu$ L。PCR 循

环参数为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min 扩增目的基因。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。EB 染色,在 UV 透射仪上观察结果。ACE 有 3 种基因型:仅有 190 bp 带为纯合子缺失型 (DD),仅有 490 bp 带的为纯合子插入型 (II),具有 190 bp 和 490 bp 两种带的杂合子型 (DI)。

### 1.4 统计学方法

数据统计采用 SPSS10.0 软件进行处理,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $\chi^2$  检验和非配对 *t* 检验分别比较计数资料和计量资料;基因型和等位基因频率采用频率计数法计算,组间频数比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 冠心病组和对照组的临床特点

CHD 组与对照组比较,体质指数、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDLc)、载脂蛋白 B (ApoB)、脂蛋白 (a) [Lp(a)]、血糖 (BS)、高血压、糖尿病和心脑血管疾病家族史均有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1. 研究对象的临床特点

指 标	CHD 组 (n = 151)	对照组 (n = 127)
体质指数 (kg/m <sup>2</sup> )	30.17 $\pm$ 2.76 <sup>a</sup>	22.59 $\pm$ 3.73
TC (mmol/L)	6.97 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	4.51 $\pm$ 1.74
TG (mmol/L)	2.76 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>	1.60 $\pm$ 0.82
HDLc (mmol/L)	1.87 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.53
ApoA1 (g/L)	1.93 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	1.33 $\pm$ 0.73
ApoB (g/L)	1.53 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.69
Lp(a) (g/L)	2.19 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.73
BS (mmol/L)	6.02 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	4.61 $\pm$ 1.10
高血压病史 (是/否)	54/97 <sup>a</sup>	29/98
⊕型糖尿病史 (是/否)	37/114 <sup>a</sup>	11/116
心脑血管病家族史 (是/否)	98/83 <sup>a</sup>	31/95

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

### 2.2 两组 AGT 基因和 ACE 基因多态性分布及其比较

CHD 组中 TT 基因型和 DD 基因型显著高于对照组;而 II 基因型显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。T 等位基因和 D 等位基因分布 CHD 组与对照组差异

有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 2)。

表 2 AGT 基因 M 235T 和 ACE 基因 iv /D 多态性在研究人群中的分布 (例)

分 组	n	AGT 基因型			ACE 基因型		
		TT	MT	MM	DD	DI	II
CHD 组	151	115 (76.16%) <sup>a</sup>	27 (17.88%)	9 (5.96%)	53 (35.10%) <sup>a</sup>	67 (44.37%)	31 (20.53%)
对照组	127	56 (44.10%)	51 (40.15%)	20 (15.75%)	19 (14.96%)	63 (49.61%)	45 (35.48%)
总计	278	171 (61.51%)	78 (28.06%)	29 (10.43%)	72 (25.90%)	130 (46.76%)	76 (27.34%)

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

### 2.3 T 和 D 等位基因造成 CHD 的相对危险性分析

T 和 D 等位基因分别比 M 和 iv 等位基因 (T 和 D 等位基因为相加作用): TT 比 MT 和 MM 基因型 (T 等位基因为隐性作用), DD 比 DI 和 II 基因型 (D 等位基因为隐性作用); TT 和 MT 比 MM 基因型 (T 等位基因为显性作用), DD 和 DI 比 II 等位基因 (D 等位基因为显性作用), 分别计算比数比 (OR 值及 95% 可信区间), 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。说明 T 和 D 等位基因可能作为 CHD 的各自独立的危险因素 (表 3)。

表 3 T 和 D 等位基因造成 CHD 的相对危险性分析

项 目	OR 值 (95% 可信区间)	P
T 等位基因比 M 等位基因 <sup>a</sup>	1.872 (1.198-2.986)	< 0.01
TT 型比 MT 和 MM 型 <sup>b</sup>	2.764 (1.318-6.179)	< 0.01
TT 和 TM 型比 MT 型 <sup>c</sup>	2.075 (1.012-4.613)	< 0.01
D 等位基因比 I 等位基因 <sup>a</sup>	1.969 (1.235-2.97)	< 0.01
DD 型比 DI 型和 II 型 <sup>b</sup>	2.819 (1.282-6.179)	< 0.01
DD 型和 DI 型比 II 型 <sup>c</sup>	2.166 (0.997-4.651)	< 0.01

a 为 T、D 等位基因相加作用; b 为等位基因隐性作用; c 为 T、D 等位基因显性作用。

## 3 讨论

目前研究认为 CHD 为多基因遗传性疾病, 遗传和环境共同参与其发病过程。作为传统的危险因素, 吸烟、脂代谢异常、肥胖、高血压、糖尿病等无法对所有 CHD 的遗传危险性做出解释。近年来, 国内外学者研究发现, AGT 和 ACE 基因多态性的变异可以改变血浆 AGT 和 ACE 含量水平<sup>[3,4]</sup>。Winkelmann 等<sup>[5]</sup>研究了 AGT M 235T 基因变异对 CHD 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 AngⅡ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, AngⅡ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 CHD 发生发展都具有促进作用。ACE 的主要功能是催化无活性的 AngⅠ转化为具有强烈血管加压作用的 AngⅡ, 导致血管收缩, 血管中膜平滑肌细胞增殖及动脉粥样硬化的发生。也可使缓激肽失活, 一氧化氮合成减少, 引起血管壁硬化、管腔狭窄、内皮依赖性舒张功能受损, 在动脉粥样硬化的过程中起到重要作用<sup>[6]</sup>。

按照遗传学规律, 一种疾病产生与遗传关系密切。但目前对于 AGT 基因和 ACE 基因多态性联合基因研究与 CHD 的关系研究还较少, 本研究选择湖南西部及重庆市、贵州省毗邻地区苗族人群为对象, 进行联合基因的研究。本研究结果发现, AGT 235TT 基因型及 T 等位基因频率和 ACE DD 基因型及 D 等位基因频率在 CHD 组中显著高于对照组, 且 ACE II 基因型显著低于对照组。CHD 组 TT 型和 DD 型基因频率较正常对照组明显增高 ( $P < 0.01$ ), TC、TG、LDLC 水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 HDLC 的水平明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且 ACE 基因 DD 型组与 DI 和 II 型组比较差异有显著性, TT 型和 DD 型与 TC、AG、LDLC 浓度明显正相关, 与 HDLC 明显负相关。结果提示 TT 型基因和 DD 型基因可能是影响脂质代谢变化的关键, 可能是 CHD、高血压病与脂质代谢异常之间联系的关键, 是造成脂质代谢异常的重要原因之一, 与血管性疾病的发病及血栓形成有着极为密切的关系, 与国内学者报道的汉族人群的结果基本相同。进一步分析 T、D 等位基因造成的 CHD 相对危险性 (OR) 也表明, T、D 等位基因可能作为 CHD 相对的各自独立危险因素。提示中国苗族人群 AGT M 235T 基因变异和 ACE 基因 iv /D 多态性与 CHD 的发生具有密切相关性。可能是 CHD 发病的危险因子, 这与国内外多数学者研究结果基本相似<sup>[7,8]</sup>。Kamtani 等<sup>[9]</sup>发现 AGT 235TT 型在心肌梗死患者的频率显著高于

对照组,与 235MM、235MT 相比,235TT 型患者心肌梗死的相对危险性估计值达 11.75 (95% CI 11.00 ~ 31.06), AGT-TT 型和 ACE-DD 型联合进一步增加心肌梗死的危险性。总之,在中国苗族人群中, AGT 基因 M 235T 变异和 ACE 基因 iv /D 多态性是 CHD 发病危险性的重要遗传标志,对评价 CHD 的危险因素和识别 CHD 的易感人群提供了依据。血管紧张素系统基因多态性与冠性病的关系的研究在不同种族、不同地区中结论不尽相同,所以要在不同种族不同地区研究的同时,加大样本的例数,特别是不同种族内家族样本的基因标记分析,对 CHD 的危险因素深入的研究。

#### [参考文献]

- [1] Jiang X, Sheng HH, cink G, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphism on blood pressure response to antihypertensive treatment [J]. *Chin Med J*, 2007, **120** (9): 782-766
- [2] Sobstyl J, Dzila G, puzniak A, et al. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in polish patients with myocardial infarction [J]. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska*, 2002, **57** (2): 21
- [3] Brand E, chatelain N, Paillard E, 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
- [4] Ni T, Chen X, Xu X. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease therapeutic implications [J]. *Drugs*, 2002, **62** (7): 977.
- [5] Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, et al. Angiotensinogen M 235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease [J]. *Am Heart J*, 1999, **137** (4): 698-705
- [6] Rush JW, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008, **33** (1): 162-9
- [7] 牛云茜, 罗礼云, 彭健, 等. 肾素-血管紧张素系统基因多态性与冠心病合并心力衰竭的关系 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2008, **29** (2): 168-172
- [8] Gross CM, Perrot A, Geier C, et al. Recurrent in-stent restenosis is not associated with the angiotensin-converting enzyme D/I angiotensin- $\text{II}$  receptor 1A U66c polymorphism [J]. *J Invasive Cardiol*, 2007, **19** (6): 216-264
- [9] Kamitani A, Bakugui H, Higaki J, et al. Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis [J]. *Hypertension*, 1995, **25**: 950-953

(此文编辑 李小玲)