

## 闽东地区畲族人群血管紧张素转换酶基因多态性与颈动脉内膜中膜厚度的相关性

林妙春<sup>1</sup>, 郑建明<sup>2</sup>, 洪永强<sup>3</sup>, 叶晓峰<sup>2</sup>

(福建省宁德市闽东医院 1. 中心实验室, 2. 神经内科, 3. 超声医学科, 福建省福安市 355000)

[关键词] 血管紧张素转换酶; 基因多态性; 内膜中膜厚度

[摘要] **目的** 调查畲族健康人群血管紧张素转化酶(ACE)基因插入/缺失(I/D)多态性分布情况,并探讨其与颈动脉内膜中膜厚度(IMT)的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)和限制性片段长度多态性(RFLP)对畲族( $n=200$ )和汉族( $n=224$ )人群 ACE I/D 多态性位点进行分析,测定甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等指标,应用超声射频信号血管内膜中膜分析技术检测颈动脉内膜中膜厚度(IMT),分析各基因型和等位基因频率与颈动脉 IMT 的关系。**结果** 畲族和汉族健康人群 ACE 基因多态性的分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。畲族 ACE II 基因型分布频率和颈动脉 IMT 分别为  $0.365, 510 \pm 113 \mu\text{m}$ , ID 基因型分布频率和颈动脉 IMT 分别为  $0.465, 544 \pm 129 \mu\text{m}$ , DD 基因型分布频率和颈动脉 IMT 分别为  $0.17, 584 \pm 181 \mu\text{m}$ ; 汉族 ACE II 基因型分布频率和颈动脉 IMT 分别为  $0.540, 528 \pm 139 \mu\text{m}$ , ID 基因型分布频率和颈动脉 IMT 分别为  $0.371, 554 \pm 182 \mu\text{m}$ , DD 基因型分布频率和颈动脉 IMT 分别为  $0.089, 591 \pm 218 \mu\text{m}$ 。ACE 基因型分布频率在这两个民族健康人群中差异显著,颈动脉 IMT 在 ACE 不同基因型间具有差异性。**结论** ACE 基因多态性具有种族差异性;颈动脉 IMT 增厚与 ACE 不同基因型具有显著的相关性。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

### Association Between Polymorphism of Angiotensin Converting Enzyme Gene and Carotid Intima-media thickness in She Population

LIN Miao-Chun<sup>1</sup>, ZHENG Jian-Ming<sup>2</sup>, HONG Yong-Qiang<sup>3</sup>, and YE Xiao-Feng<sup>2</sup>

(1. Department of Central Laboratory, 2. Department of Neurology, 3. Department of Ultrasound Medicine, Mindong Hospital of Ningde City, Fu'an, Fujian 355000, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Converting Enzyme; Gene Polymorphism; Intima-media Thickness

[ABSTRACT] **Aim** To study the incidence of the insertion/deletion (I/D) polymorphism of angiotensin converting enzyme (ACE) gene in She population and investigate the association between polymorphism of ACE gene and carotid intima-media thickness (IMT). **Methods** The polymorphism of ACE gene was genotyped by polymerase chain reaction (PCR) in 200 She population and 224 Han population. The sample was characterized for relevant clinical and biochemical parameters. Carotid IMT was measured by quality intima-media thickness (QIMT). Association of genotype and allele frequencies with carotid IMT were analyzed. **Results** The frequency of ACE gene polymorphism was consistent with Hardy-Weinberg law. ACE II genotype frequency and carotid IMT in She population were  $0.365$  and  $510 \pm 113 \mu\text{m}$ , ID genotype frequency and carotid IMT in She population were  $0.465$  and  $544 \pm 129 \mu\text{m}$ , DD genotype frequency and carotid IMT in She population were  $0.17$  and  $584 \pm 181 \mu\text{m}$ . ACE II genotype frequency and carotid IMT in Han population were  $0.540$  and  $528 \pm 139 \mu\text{m}$ , ID genotype frequency and carotid IMT in Han population were  $0.371$  and  $554 \pm 182 \mu\text{m}$ , DD genotype frequency and carotid IMT in Han population were  $0.089$  and  $591 \pm 218 \mu\text{m}$ . The frequency of ACE gene poly-

[收稿日期] 2015-07-04

[修回日期] 2015-10-20

[基金项目] 福建省中青年教育科研项目(JB13130);宁德市科技计划项目(20130100);福建省医学创新课题(2014-CXB-25)

[作者简介] 林妙春, 硕士, 实验员, 研究方向为分子生物学, E-mail 为 270434932@qq.com。洪永强, 主任医师, 研究方向为血管疾病超声诊断、产前超声诊断、介入性超声诊治。通讯作者郑建明, 博士, 副主任医师, 研究方向为心脑血管疾病, E-mail 为 zheng-jianming@foxmail.com。

morphism had significant difference between the two races. There were variabilities in the three genotypes of carotid IMT.

**Conclusion** The polymorphism of ACE gene had ethnic differences, and the thickening of carotid IMT was significantly relevant to the three genotypes of ACE.

肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 在调节水盐代谢维持血容量与血管张力以及调控心血管肾脏功能等方面起着极其重要的作用。该系统基因变异是动脉硬化进展中的重要危险因素<sup>[1]</sup>。血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 被认为是在该机制中起到决定作用的一种酶<sup>[2]</sup>。该酶是一种外肽酶, 主要功能是催化血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II 使缓激肽失活。其最常见的变异是 ACE 基因 16 内含子一段 287 bp 的 Alu 序列的插入 (insertion, I) 和缺失 (deletion, D) 多态性。内膜中层即弹力层决定了动脉僵硬程度, 颈动脉内膜中层厚度 (intima-media thickness, IMT) 是评价大血管病变的指标之一, 可用于评价早期动脉粥样硬化<sup>[3-4]</sup>, 国内的研究也显示颈动脉 IMT 是动脉僵硬度的危险因素<sup>[5]</sup>。在动脉僵硬发生发展中, 有关畲族人群 RAAS 系统基因多态性和动脉 IMT 的研究不多, 本研究旨在探讨 ACE 基因多态性与畲族人群颈动脉 IMT 的相关性, 为前瞻性研究提供一定的数据。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

畲族健康体检者 200 例, 其中男 108 例, 女 92 例, 年龄  $52.10 \pm 12.44$  岁, 来源于福建省福安市畲族自然村; 汉族健康体检者 224 例, 其中男 127 例, 女 97 例, 年龄  $50.06 \pm 11.28$  岁, 来源于福建省宁德市闽东医院同期健康体检者。入选标准: 经详细询问病史、查体、B 超及血生化检查无异常者。两组年龄、性别构成差异无统计意义。

### 1.2 实验试剂

血液基因组 DNA 提取试剂盒 (Sigma 公司), 琼脂糖购于上海生工公司, PCR 引物由上海生工公司合成并经 HPLC 纯化。PCR 试剂盒、Sma I 内切酶、BamH I 内切酶、DNA 低分子量标准均为 Fermentas 产品, 购于厦门鹭隆生物科技发展有限公司。

### 1.3 DNA 提取

按血液基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书操作步骤, 取含 EDTA 的抗凝血 300  $\mu$ L, 进行基因组 DNA 的提取。提取的 DNA 用紫外分光光度计测定

浓度及纯度,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 ACE 基因分型

ACE 基因多态性采用 PCR 分型, ACE 引物<sup>[6]</sup>: 上游为 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3', 下游为 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'; PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L, 包含 12.5  $\mu$ L PCR 混合缓冲液 (含 DNA 聚合酶), 1  $\mu$ L DNA 模版, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 的上游引物和下游引物, 其余用灭菌双蒸水补足。PCR 反应程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,  $58^{\circ}\text{C}$  (ACE I/D) 复性 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延长 30 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。该扩增程序是在 Eppendorf PCR 仪上完成。PCR 产物用 3% 琼脂糖电泳, 凝胶成像系统观察结果。

### 1.5 颈动脉 IMT 的测量

运用百胜 MyLab70Xvision 彩色多谱勒超声诊断仪使用 QIMT 及 QAS 技术进行颈动脉 IMT 检测。

### 1.6 统计学方法

基因型分布频率采用  $\chi^2$  检验, 用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律验证。计数资料采用  $\chi^2$  检验; 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 不同基因型间颈动脉 IMT 差异采用多因素方差分析; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ACE 基因分型

ACE 基因 I/D 多态性有三种基因型: 仅有 190 bp 条带的纯合子缺失型 (DD 型), 仅有 490 bp 条带的纯合子插入型 (II 型), 具有 190 bp 和 490 bp 两条带的杂合子型 (ID 型) (图 1)。

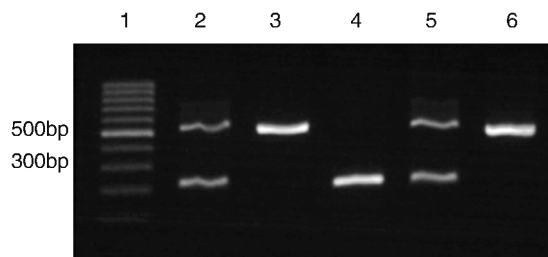


图 1. ACE 的 PCR 扩增产物 1 为 DNA 分子量标准, 2 和 5 为 ID 型, 4 为 DD 型, 3 和 6 为 II 型。

Figure 1. The DNA fragments of ACE

2.2 样本基本资料和基因型频率

畚族人群年龄、男女比例、体质指数等在不同基因型之间差异无显著性。畚族人群 ACE 基因型频率和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。两个民族间各基因型和等位基因频率

差异显著( $P<0.01$ ;表 1)。畚族人群 ACE ID 和 DD 基因型颈动脉 IMT 高于 II 基因型( $P<0.05$ ),汉族人群 ACE DD 基因型颈动脉 IMT 高于 II 基因型( $P<0.01$ ;表 2)。

表 1. 汉族与畚族 ACE 基因型和等位基因频率(例)  
Table 1. Genotype and allele frequencies of ACE in Han and She populations( Case)

民族	基因型			等位基因	
	II	ID	DD	I	D
畚族	73(0.365)	93(0.465)	34(0.170)	239(0.598)	161(0.402)
汉族	121(0.540)	83(0.371)	20(0.089)	325(0.725)	123(0.275)
P 值	0.0006			<0.01	

表 2. 不同基因型颈动脉 IMT 和其他生化指标  
Table 2. Carotid IMT and other biochemical indicators of different genotypes

指 标	畚族( $n=200$ )			汉族( $n=224$ )		
	II( $n=73$ )	ID( $n=93$ )	DD( $n=34$ )	II( $n=121$ )	ID( $n=83$ )	DD( $n=20$ )
BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	23.9±3.4	22.4±3.6	24.2±2.6	22.5±2.8	23.7±3.2	23.5±3.4
TC( $\text{mmol}/\text{L}$ )	5.47±0.33	5.09±0.16	5.28±0.24	5.11±1.17	4.97±0.89	5.30±1.03
TG( $\text{mmol}/\text{L}$ )	1.35±0.23	1.86±0.21	1.78±0.31	1.59±0.82	1.62±0.68	1.76±1.19
HDL( $\text{mmol}/\text{L}$ )	1.56±0.38	1.55±0.51	1.56±0.34	1.50±0.17	1.54±0.29	1.56±0.31
LDL( $\text{mmol}/\text{L}$ )	3.23±0.26	2.79±0.11	2.80±0.12	2.90±0.37	3.17±0.79	3.18±0.29
血糖( $\text{mmol}/\text{L}$ )	5.77±0.30	5.43±0.17	5.56±0.18	5.82±0.70	5.45±0.18	5.71±0.36
SBP( $\text{mmHg}$ )	109.±10.0	113.8±12.3	117.4±11.2	119.5±7.9	116.5±10.7	124.3±12.6
DBP( $\text{mmHg}$ )	82.6±8.3	84.4±7.5	85.3±6.9	87.2±10.1	85.4±13.3	81.7±10.5
颈动脉 IMT( $\mu\text{m}$ )	510±113	544±129 <sup>a</sup>	584±181 <sup>a</sup>	528±139	554±182	591±218 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与同组 II 基因型比较。

3 讨 论

ACE 基因多态性分布的种族与地区差异性明显,早在上个世纪 90 年代就已发现其 D 等位基因频率在白种人、黑人和亚洲人中差异显著,分别为 0.562、0.603 和 0.39<sup>[6]</sup>。国内龚洪涛等<sup>[7]</sup>的研究中汉族健康人群 ACE D 等位基因频率为 0.37,与本研究畚族人群 ACE D 等位基因发生频率 0.402 较为接近,而与汉族则差异较大。ACE 基因 I/D 多态性是 ACE 最常见的基因突变类型,能显著影响血浆和细胞的 ACE 水平。国外学者 Gunes 等<sup>[8]</sup>研究土耳其人发现,血浆 ACE 的水平和活性 DD 基因型明显高于 II 基因型和 ID 基因型,可导致血管收缩、血压升高。ACE 基因 ID 基因型和 DD 基因型与美国人、日本人的盐敏感性高血压也均有关系<sup>[9]</sup>。目前国内的研究中也发现 ACE 基因多态性在心脑血管相

关疾病<sup>[10-11]</sup>的发生发展中有重要的影响意义。  
ACE 基因突变与血压升高密切相关,还可能与颈动脉 IMT 增高具有相关性。ACE 基因突变致 Ang II 异常是导致血管壁两个主要结构蛋白(胶原蛋白和弹性蛋白)失衡的危险因子<sup>[12]</sup>。Ang II 刺激胶原形成,减少弹性蛋白合成。血管壁的稳定性、弹性、顺应性依赖于这两个主要的结构蛋白,两者的产生与分解是缓慢、动态的过程。这种平衡的破坏主要是由炎症刺激产生的,并导致异常胶原蛋白的过量生成和正常弹性蛋白的大量减少,最终引起血管僵硬<sup>[13]</sup>。一项 Meta 分析显示,任何年龄的平均 IMT≥1 mm 均可显著增加心肌梗死和/或脑血管病的风险<sup>[14]</sup>。而在心血管病患者颈动脉 IMT 增厚的相关因素分析中,吸烟、年龄、高血压、糖尿病、高血脂与颈动脉 IMT 的增厚明显相关,收缩压的增高对颈动脉 IMT 的增厚影响显著<sup>[15]</sup>。本研究中以上

提及与颈动脉 IMT 增厚的相关因素在不同基因型间差异不显著,因此可以排除生理生化因素对颈动脉 IMT 的影响,仅探讨 ACE 基因型与颈动脉 IMT 的相关性。

本研究中,不同基因型人群中颈动脉 IMT 随着 D 等位基因增多而有相应的增厚,且差异显著。有研究显示,校正年龄和体质指数后,平均 IMT 在 ID 和 DD 基因型中分别比 II 基因型高 0.02 mm 和 0.03 mm,表明 D 等位基因携带者相比非 D 等位基因携带者有较高的 IMT,但是该研究结果差异并不显著<sup>[16]</sup>。目前关于 I/D 基因多态性与动脉僵硬度相关性的研究还存在矛盾,在希腊雅典的一项研究中,针对健康、低风险的人群进行 ACE 基因型检测,DD、ID 和 II 3 种基因型频率分别是 39.4%、43.6% 和 17%;并与 PWV 进行相关性分析,结果显示携带 D 等位基因个体相对 II 基因型个体 PWV 低,表明 D 等位基因携带者有较低主动脉僵硬度<sup>[17]</sup>。

以上研究结果存在争议的原因可能是地域、种族的差异以及纳入研究的标准不同。然而目前的研究均表明 ACE 基因多态性与颈动脉 IMT 具有一定的相关性。因此,本研究探讨 ACE 基因多态性的分布在畚族和汉族间的差异以及对 IMT 的影响,为心脑血管疾病前瞻性的研究提供一定的参考依据,在推动疾病治疗和预防手段上有一定的意义。

#### [参考文献]

- [1] Pojoga L, Gautier S, Blanc H, et al. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension[J]. *Am J Hypertens*, 1998, 11 (7): 856-860.
- [2] Lim S. Blockade of renin-angiotensin-aldosterone system in kidney and heart disease: How much do we need[J]. *Acta Med Indones*, 2008, 40 (1): 34-37.
- [3] Peter S, Grobbee D, Bots M. Carotid intima-media thickness: a suitable alternative for cardiovascular risk as outcome[J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2011, 18 (2): 167-174.
- [4] Naqvi TZ, Lee MS. Carotid intima-media thickness and plaque in cardiovascular risk assessment[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2014, 7 (10): 1 025-038.
- [5] 杨继贺, 丁琼, 张源明, 等. 新疆维吾尔族、汉族原发性高血压患者动脉僵硬度与尿微量白蛋白及血浆醛固酮水平的相关性[J]. *中华高血压杂志*, 2012, 20 (6): 557-560.
- [6] Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular renal risk[J]. *J Hypertens*, 1997, 15 (12 Pt 2): 1 579-592.
- [7] 龚洪涛, 马先林, 杜凤和. 血管紧张素转换酶和醛固酮合成酶基因多态性与原发性高血压病的关系研究[J]. *中国全科医学*, 2011, 14 (23): 2 609-611.
- [8] Gunes HV, Ata N, Degirmenci I, et al. Frequency of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Turkish hypertensive patients[J]. *Int J Clin Pract*, 2004, 58 (9): 838-843.
- [9] Lynch A, Tang W, Shi G, et al. Epistatic effects of ACE I/D and AGT gene variants on left ventricular mass in hypertensive patients: the Hyper GEN study[J]. *Human Hypertens*, 2012, 26 (2): 133-140.
- [10] 祝有国, 王福军, 符自清, 等. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (5): 405-408.
- [11] 张皓, 朱榆红. 血管紧张素转化酶 I/D 多态性与脑血管疾病的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (12): 1 145-148.
- [12] Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (5): 932-943.
- [13] Fritze O, Romero B, Schleicher M, et al. Age-related changes in the elastic tissue of the human aorta[J]. *J Vasc Res*, 2012, 49 (1): 77-86.
- [14] van den Oord SC, Sijbrands EJ, ten Kate GL, et al. Carotid intima-media thickness for cardiovascular risk assessment: systematic review and meta-analysis[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228 (1): 1-11.
- [15] 张和细, 龚辉. 1214 例心血管住院患者颈动脉内膜中膜增厚相关因素分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (2): 173-177.
- [16] Islam MS, Lehtimäki T, Juonala M, et al. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensinogen (AGT) genes and their associations with blood pressure and carotid artery intima media thickness among healthy Finnish young adults-the Cardiovascular Risk in Young Finns Study[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 188 (2): 316-322.
- [17] Dima I, Vlachopoulos C, Alexopoulos N, et al. Association of arterial stiffness with the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in healthy individuals[J]. *Am J Hypertens*, 2008, 21 (12): 1 354-358.

(此文编辑 文玉珊)