

肾素-血管紧张素系统基因多态性与冠心病合并慢性心力衰竭的关系

牛云茜¹, 罗礼云¹, 彭健¹, 梅啸², 彭澍³, 龚五星⁴

(1. 中山大学附属第五医院心内二科; 2. 珠海市第二人民医院心内科; 3. 暨南大学附属第三医院心内科;
4. 暨南大学附属第三医院分子生物实验中心, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】探讨中国南方部分汉族人群的冠心病患者中,肾素-血管紧张素系统中的关键成分即血管紧张素转换酶(ACE)及血管紧张素原(AGT)双基因多态性与冠心病合并慢性心力衰竭(CHF)发病的关系。【方法】应用聚合酶链反应及限制性片段长度多态性技术,对 215 例冠心病患者的 ACE 基因插入/缺失(I/D)及 AGT M235T 多态性进行检测。将其中 105 例合并 CHF 者作为病例组,其余 110 例心功能正常者作为对照组。【结果】冠心病合并 CHF 组 DD 基因型及 D 等位基因的频率均高于对照组(前者为 45.7% vs 23.6%,后者为 64.8% vs 43.6%, $P < 0.01$);AGT 基因 M235T 多态性在两组中的分布无统计学差异;联合分析 ACE 与 AGT 基因多态性显示,两组中同时具有 DD 型 ACE 基因及 TT 型 AGT 基因的频率分别为 27.6%及 14.5%,前者明显高于后者。与 II + MM 组合相比,具有该联合基因型的冠心病患者发生 CHF 的 OR 为 5.039,较单基因 ACE DD 型发生 CHF 的 OR 增高。【结论】ACE 基因 I/D 多态性与中国南方部分汉族人群冠心病患者发生 CHF 有关,DD 型 ACE 基因可能是该地区 CHF 发病的遗传危险因素。单独的 AGT 基因 M235T 多态性似与该地区冠心病患者发生 CHF 无关,但联合 ACE 基因分析则发现,ACE 和 AGT 基因在 CHF 的发生中具有协同作用,DD 型基因的冠心病患者若同时携带有 TT 基因,发生 CHF 的机率增高。

关键词:血管紧张素转换酶;血管紧张素原;基因多态性;冠心病;心力衰竭

中图分类号:R34; R541.6+1

文献标识码: A

文章编号:1672-3554(2008)02-0168-05

Relationship between Renin-Angiotensin System Gene Polymorphism and Ischemic Chronic Heart Failure

NIU Yun-qian¹, LUO Li-yun¹, PENG Jan¹, MEI Xiao², PENG Shu³, GONG Wu-xing⁴

(1. Department of Cardiology, The Fifth Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University; 2. Department of Cardiology, The Second People's Hospital of Zhuhai City; 3. Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, Jinan University; 4. Molecular Biological Center, The Third Affiliated Hospital, Jinan University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the relationship between ACE and AGT gene polymorphisms and the onset of ischemic CHF in South Chinese population.【Methods】 ACE gene I/D and AGT gene M235T polymorphisms were analyzed in 215 patients with coronary artery disease, the gene polymorphisms were detected by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods. Genotype distributions were examined in 105 consecutive patients with ischemic CHF and 110 patients with stable angina pectoris and LVEF $> \text{or} = 45\%$. 【Results】 The frequencis of DD genotpye and D allele were higher in the patients with ischemic CHF than in their corresponding controls respectively(DD genotype: 45.7% vs 23.6%; D allele: 64.8% vs 43.6%, $P < 0.01$); The genotype distributions of AGT gene M235T were similar between the patients with and without CHF in CAD. In combined genotype analysis, the genotype of ACE DD+AGT TT was significantly higher in patients with ischemic CHF (27.6% vs 14.5%). The odds ratio estimated by the combined analysis of the ACE DD + AGT TT genotype was 5.039 compared with II + MM combinations, and it was higher than that estimated alone from ACE-DD

genotype; [Conclusions] ACE gene I/D polymorphism plays a role in the development of CHF in CAD patients in South Chinese population, the DD genotype might be one of the genetic risk factors of CHF in this area; The AGT gene M235T polymorphism seems to have no correlation with the onset of CHF in CAD patients solely, but AGT and ACE gene might play an interaction role in the onset of CHF, combined analysis of the ACE-DD and AGT-TT genotype may enhance the predictability of CHF in CAD patients.

Key words: angiotensin-converting enzyme; angiotensinogen; gene polymorphism; coronary artery disease; heart failure

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(2):168-172]

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是严重危害人类健康的常见病, 其病因迄今尚未阐明。CHF 与肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 基因多态性间关系的研究已成为其病因学研究的一个热点^[1], 人们日益关注的因人而异的 CHF 个体化治疗策略亦有赖于 CHF 遗传病因学研究的不断深入与扩展^[2]。但对于 RAS 基因多态性与 CHF 发生、发展的关系, 目前国内外的研究仅处于初步阶段, 且研究结果并不一致, 尤其是对双位点联合研究的观察较少^[3]。RAS 在维持体内水电解质平衡、调节血管张力以及 CHF 的发生、发展过程中起重要作用, 血管紧张素转换酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 和血管紧张素原 (angiotensinogen, AGT) 是 RAS 中的两个关键成分。本研究通过检测 ACE 和 AGT 基因多态性在中国南方部分汉族人群冠心病患者中的分布, 以探讨两基因多态性在冠心病患者发生 CHF 中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

冠心病病人共 215 人, 均来自 2004 年 4 月至 2006 年 12 月在本院及珠海市内几家大型医院心内科住院病员, 其籍贯为中国广东、广西、湖南、云南、福建等省市。所有患者均经冠状动脉造影检查, 冠心病的诊断标准: 左冠状动脉主干、左前降支、左回旋支及右冠状动脉中至少 1 支血管狭窄 $\geq 50\%$ 。病例组为冠心病合并慢性心力衰竭者共 105 例 (合并高血压病者 52 例), CHF 诊断参照修改的 Framingham 标准, 心功能 NYHA 分级 II ~ IV 级、超声心动图检测左室射血分数 $< 45\%$, 年龄 ≥ 18 岁, CHF 病史至少 ≥ 3 个月, 其中男性 69 例, 女性 36 例, 年龄 (59 ± 7) 岁。对照组为研究对象中没有合并 CHF 者, 共 110 例 (合并高血压病

者 57 例), 其中男性 71 例, 女性 39 例, 年龄 (57 ± 9) 岁。排除标准: ①严重肝、肾功能不全; ②严重的急性感染或代谢紊乱; ③急性心力衰竭; ④2 周内未行血运重建的急性心肌梗死者; ⑤合并心瓣膜疾病者。本研究对象间无血缘关系, 均为中国南方汉族成人, 所有研究对象均知情同意。

1.2 检测指标

调查所有研究对象的吸烟、高血压、糖尿病及高血脂史, 测量身高、体重, 检测空腹血糖及血脂、血红蛋白、肝功能、肾功能。

1.3 人基因组 DNA 的提取

抽取外周静脉血 5 mL, 20 g/L EDTA 抗凝, 低速离心分离白细胞, 经细胞裂解液及蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿/异戊醇方法提取基因组 DNA, 无水乙醇沉淀, 保存于 TE 溶液中。

1.4 ACE 基因 I/D 多态性检测

引物序列: P₁, 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'; P₂, 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'。聚合酶链反应体系总体积共 20 μ L, 其中模板 DNA 1 μ L, 10 \times 缓冲液 2 μ L, 0.5 U/ μ L *Pfu* DNA 聚合酶 1 μ L, 10 μ mmol/L 的 P₁ 及 P₂ 各 1 μ L, 2 mmol/L dNTP 2 μ L。在 PE-2400 全自动基因扩增仪上扩增, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 5 min。反应产物在含有溴化乙锭的 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 电压 100 V, 30 min, 紫外灯下观察基因分型^[4]。

1.5 AGT 基因 M235T 多态性检测

引物序列: P₁, 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'; P₂, 5'-CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTCT-3'。聚合酶链反应体系总体积共 30 μ L, 其中模板 DNA 1.5 μ L, 10 \times 缓冲液 3 μ L, 1 U/ μ L *Pfu* DNA 聚合酶 1 μ L, 12 μ mmol/L 的 P₁ 及 P₂ 各 1 μ L, 2 mmol/L dNTP 3 μ L。在 PE-2400 全自动基因扩增仪上扩增, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,

65 °C退火 1 min, 72 °C延伸 1.5 min, 循环 30 次, 72 °C终末延伸 5 min。反应产物经琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察。酶切反应体系总体积共 20 μ L, 其中 PCR 产物 10 μ L, *Tth111 I* 内切酶 (Fermentas 公司) 1 μ L, 10 \times 缓冲液 2 μ L, 无菌去离子水 7 μ L, 混匀后置 37 °C 水浴箱中水浴 16 h。酶切反应产物含有溴化乙锭的 30 g/L 琼脂糖凝胶上电泳^[4]。

1.6 统计分析

应用 SPSS15.0 for Windows 进行统计分析。组间均数比较用 *t* 检验, 基因型分布及等位基因频率比较用 χ^2 检验。基因型及等位基因相对危险度以优势比(OR)及其 95% 置信区间(CI)表示, 应用二项 Logistic 回归分析冠心病患者发生 CHF 的易患因素。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料的比较

两组在年龄、性别构成、病程、既往曾发生心肌梗死的例次、吸烟率、体重指数、收缩压、舒张压、血红蛋白(HGB)、空腹血糖(BS)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、谷丙转氨酶(ALT)等方面无统计学差异。病例组甘油三酯(TG)低于对照组, 血肌酐(Cr)高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检测

本组资料中, 对照组 ACE 及 AGT 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (χ^2 分别为 3.750 和 0.078, $P > 0.05$), 表明该群体为遗传平衡群体, 本研究资料具有群体代表性。

2.3 两组基因型频率及等位基因频率的比较

2.3.1 病例组和对照组 ACE 基因 I/D 多态性分布 病例组 DD 基因型频率明显高于对照组, 与非 DD 型相比, DD 型者发生 CHF 的 OR 为 2.721 (95%CI: 1.517 ~ 4.878)。同时, D 等位基因频率也较对照组高(表 1)。

2.3.2 病例组和对照组 AGT 基因 M235T 多态性分布 两组 TT 基因型频率无统计学差异。同时, T 等位基因频率分布亦无统计学差异(表 2)。

2.4 ACE 基因 I/D 及 AGT 基因 M235T 多态性的联合分析

病例组及对照组中同时具有 ACE 基因 DD 型

表 1 两组 ACE 基因型频率及等位基因频率分布

Table 1 Frequencies of genotypes and alleles of ACE gene I/D polymorphism of two groups

Group	ACE genotype			Allele	
	II	ID	DD	I	D
Ischemic CHF	17(16.2%)	40(38.1%)	48(45.7%)	74(35.2%)	136(64.8%)
Control group	40(36.4%)	44(40.0%)	26(23.6%)	124(56.4%)	96(43.6%)
	$\chi^2=11.601, P < 0.01$			$\chi^2=19.301, P < 0.01$	

表 2 两组 AGT 基因型频率及等位基因频率分布

Table 2 Frequencies of genotype and alleles of AGT gene M235T polymorphism of two groups

Group	ACE genotype			Allele	
	MM	MT	TT	T	M
Ischemic CHF	8(7.6%)	32(30.5%)	65(61.9%)	162(77.1%)	48(22.9%)
Control group	9(8.2%)	47(42.7%)	54(49.1%)	155(70.5%)	65(29.5%)
	$\chi^2=4.427, P < 0.109$			$\chi^2=2.863, P < 0.091$	

及 AGT 基因 TT 型者的频率分别为 27.6% 及 14.5%, 前者高于后者(表 3)。

表 3 两组 ACE I/D 及 AGT M235T 基因型频率分布的联合分析

Table 3 Combined analysis of genotypes frequencies of ACE gene I/D and AGT M235T polymorphisms of two groups

Group	DD+TT	others ¹⁾	DD+ non-TT ²⁾
Ischemic CHF	27.6%	72.4%	21.0%
Control group	14.5%	85.5%	41.8%

1) others include DD+MM, DD+MT, II+MM, II+MT, II+TT, ID+MM, ID+MT, ID+TT, $\chi^2=5.548, P=0.019, OR: 2.742$ (95%CI: 1.134~4.430); 2) non-DD+non-TT include II+MT, II+MM, ID+MM, ID+MT, $\chi^2=11.262, P=0.001, OR: 3.790$ (95%CI: 1.713~8.385)

2.5 非条件 Logistic 回归分析冠心病患者 CHF 的易患因素

以 ACE 基因型、AGT 基因型、性别、年龄、病程、吸烟史、收缩压及舒张压、TC、TG、LDL-C、HGB、空腹血糖为自变量, 以冠心病患者是否发生 CHF 为因变量, 并定义 ACE 基因型、AGT 基因型、性别和吸烟史为分类变量, 用 Forward:Ward 法建立非条件 Logistic 回归模型进行多因素分析, 结果表明, ACE 基因型及 TG 与冠心病患者发生 CHF 相关, 而 AGT 基因型、病程、血压等其他因素被剔除(表 4)。以 II 型为参照, DD 型发病的 OR 为 5.215。联合 ACE 基因型及 AGT 基因型建立回归

模型,结果 ACE 基因型及 AGT 基因型、TC、HGB 被引入方程,其他因素被剔除(表 5)。表明 DD+TT、DD+MT、DI+TT 基因型、HGB、TG 参与总体冠心病患者 CHF 发生的概率。以 II+MM 型为参照,DD+TT 基因型发病的 OR 为 5.039。

表 4 冠心病患者 CHF 易患因素的 Logistic 回归分析
Table 4 Logistic regression analysis of multiple risk factors of ischemic CHF

Variables	B	S.E.	P	OR	95%CI for OR
ACE gene			0.000		
DD	1.651	0.395	0.000	5.215	(2.406, 11.301)
DI	0.777	0.372	0.036	2.175	(1.050, 4.507)
TG	-0.387	0.198	0.001	0.503	(0.341, 0.741)
Constant	0.080	0.391	0.839		

表 5 Logistic 回归分析冠心病患者 CHF 易患因素的交互作用

Table 5 Logistic regression analysis of the interaction risk factors of ischemic CHF

Variables	B	S.E.	P	OR	95%CI for OR
ACE·AGT gene			0.001		
DD+TT	1.617	0.429	0.000	5.039	(2.173, 11.886)
DD+MT	1.512	0.571	0.008	4.537	(1.483, 13.885)
DI+TT	1.239	0.415	0.003	3.453	(1.532, 7.786)
DI+MT	0.297	0.477	0.533	1.346	(0.528, 3.429)
HGB	0.200	0.009	0.022	1.043	(1.003, 1.037)
TG	-0.729	0.209	0.000	1.091	(0.321, 0.726)
Constant	-2.333	1.161	0.045		

3 讨论

不同的冠心病患者在临床表型及预后等方面存在着显著的差别,部分患者发生 CHF 的时间明显较其他患者早,心功能恶化的程度亦较严重。除已知的危险与干预因素影响外,个体基因的不同与变异可能在 CHF 的发生与发展及治疗转归等方面起不容忽视的重要作用^[1,2]。

3.1 ACE 基因 I/D 多态性与 CHF

近年来 ACE 基因 I/D 多态性与心血管疾病遗传易感性及临床表现的关系已受到国内外学者的关注。研究证实,ACE 基因多态性与体内 ACE 水平及左室重构、左室功能有关,DD 基因型的血清 ACE 水平最高^[5,6]。karaali 等^[7]则发现心肌梗死后左

室肥厚 (left ventricular hypertrophy, LVH) 与 ACE 基因多态性相关,DD 基因型增加心梗后 LVH 的风险。俄罗斯学者也曾对发生过心肌梗死的冠心病患者进行研究,结果表明 DD-ACE 基因型及 D 等位基因会增加冠心病患者 CHF 的发生几率,而且该基因型可作为心功能恶化程度的一个标志^[8]。但也有研究发现 DD-ACE 基因型并不增加冠心病患者发生 CHF 的风险^[9]。本研究以 215 例冠心病患者作为研究对象,其中合并 CHF 者的 DD 基因型及 D 等位基因频率明显高于心功能正常者,提示 ACE 基因 I/D 多态性与中国南方部分汉族人群冠心病患者发生 CHF 有关,DD 型 ACE 基因可能是该地区冠心病患者 CHF 发病的遗传危险因素。关于 ACE 基因多态性、ACE 与 CHF 的发病机理仍尚待阐明,多数学者认为 ACE 基因可能是通过影响了血清和内皮细胞中的 ACE 水平而影响了外周或局部循环中的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 和缓激肽浓度。外周 Ang II 具有强大的缩血管作用,且能刺激醛固酮的释放和增强交感神经释放去甲肾上腺素,从而使心室的前、后负荷均明显增加。同时 Ang II 可在局部组织生成并独立发挥调控作用。实验研究表明,肥大心肌中 AGT 及 ACE 的表达,以及 Ang II 的含量均明显增加^[10]。Ang II 可通过其受体刺激心肌细胞肥大和成纤维细胞增殖并使两者的表型改变,从而最终导致心肌重构和心功能恶化。

3.2 AGT 基因 M235T 多态性与 CHF

RAS 中的另一关键成分 AGT 基因 M235T 多态性与较高的血浆血管紧张素原水平、高血压及左室肥厚相关^[11]。关于该基因多态性与 CHF 的关联性研究国内外开展较少,最新的一项研究发现,携带 TT 型 AGT 基因的高血压患者发生 CHF 的危险性增加,且发病年龄较其他基因型者早约十年^[12]。但其与冠心病患者发生 CHF 的关联性资料尚缺乏研究,我们初次探讨了 AGT 基因多态性在冠心病患者发生 CHF 中的作用,结果发现 AGT M235T 基因型的分布在冠心病合并 CHF 组及对照者间无明显差异,提示该人群的 AGT M235T 基因多态性与冠心病患者发生 CHF 似无关。其原因可能是由于心血管疾病在遗传方面的特点是受多个微效基因及基因与基因、基因与环境之间诸多相互作用的影响,而单一基因实难发挥决定性临床表型作用。

3.3 ACE I/D 及 AGT M235T 双基因多态性与 CHF

CHF 是多基因疾病,仅分析单个基因获得的信息量较少,结果不甚可靠。宜选择多个候选基因客观地从不同侧面分析,既需探讨某一基因多态性的作用,更需要对不同候选基因之间的相互作用进行分析。本研究联合分析了 ACE I/D 和 AGT M235T 基因多态性与冠心病患者发生 CHF 的关系,结果表明冠心病合并 CHF 组 ACE-DD + AGT-TT 基因型频率明显高于对照组,进一步应用二项 Logistic 回归分析 CHF 的易患因素发现,ACE 和 AGT 基因在冠心病患者 CHF 的发生中具有协同作用,以 II + MM 型为参照,DD+TT 基因型发病的 OR 为 5.039,高于 ACE-DD 型单基因发生 CHF 的 OR (2.721),DD 型基因的冠心病患者若同时携带有 TT 基因,发生 CHF 的几率明显增高。

本研究进一步佐证了我们之前的观点:肾素-血管紧张素系统基因多态性与 CHF 的发生及病情严重程度存在关联,DD-ACE 基因型是 CHF 发生的危险因素,且携带 DD 基因型的 CHF 患者病情更加严重^[13]。

参考文献:

- [1] 梅 啸,彭 健.肾素-血管紧张素系统多态性与慢性心力衰竭关系的研究进展 [J]. 中国心血管病研究杂志,2005,3(1):76-79.
- [2] 罗礼云,彭 健.肾素-血管紧张素系统及交感神经系统基因多态性与慢性心力衰竭个体化治疗 [J]. 国际心血管病杂志,2007,34(2):125-127.
- [3] Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1)(dipeptidyl carboxypeptidase 1) [J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(6):1433.
- [4] Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, et al. Rapid detection of the hypertension associated Met235-->The allele of the human angiotensinogen gene [J].Hum Mol Genet, 1993, 2(5):609-610.
- [5] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angio-tensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels[J]. J Clin Invest, 1990, 86(4):1343-1346.
- [6] Payne JR, Dhamrait SS, Gohlke P. The impact of ACE genotype on serum ACE activity in a black South African male population [J]. Ann Hum Genet, 2007, 71(Pt 1):1-7.
- [7] Karaali ZE, Agachan B, Yilmaz H, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphisms and effects of left ventricular hypertrophy in Turkish myocardial infarction patients [J]. Acta Cardiol, 2004, 59(5):493-497.
- [8] Gubaev KI, Nasibullin TR, Zakirova AN, et al. Association of polymorphic markers I/D of gene ACE and A1166C of geneAT2R1 with ischemic chronic heart failure in the Russian and Tatar populations of Bashkortostan Republic [J]. Genetika, 2006, 42(12):1712-1717.
- [9] Akbulut T, Bilsel T, Terzi S, et al. Relationship between ACE gene polymorphism and ischemic chronic heart failure in Turkish population [J]. Eur J Med Res, 2003, 8(6):247-253.
- [10] Davis GK, Millner RW, Roberts DH. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene expression in the human left ventricle: effect of ACE gene insertion/deletion polymorphism and left ventricular function [J]. Eur J Heart Fail,2000, 2(3):253-256.
- [11] Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(7):1269-1275.
- [12] Pilbrow AP, Palmer BR, Frampton CM, et al. Angiotensinogen M235T and T174M gene polymorphisms in combination doubles the risk of mortality in heart failure [J]. Hypertension, 2007, 49(2):322-327.
- [13] 彭 健,梅 啸,彭 澍,等.肾素-血管紧张素系统多态性与慢性心力衰竭的关系 [J].中山大学学报:医学科学版,2006,27(4):405-409.

(编辑 孙慧兰)