

## 肾素-血管紧张素系统基因多态性与慢性心力衰竭的关系

彭 健<sup>1</sup>, 梅 啸<sup>1</sup>, 彭 澍<sup>2</sup>, 龚五星<sup>3</sup>, 牛云茜<sup>1</sup>, 罗礼云<sup>1</sup>( 1. 中山大学附属第五医院心内二科, 广东 珠海 519000; 2. 暨南大学附属第三医院心内科, 广东 珠海 519000;  
3. 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】探讨中国南方汉族人群中, 血管紧张素转换酶(ACE)及血管紧张素原(AGT)双基因多态性与慢性心力衰竭发病的关系。【方法】用聚合酶链反应及限制性片段长度多态性技术检测 111 例慢性心力衰竭患者和 110 例健康者的 ACE 基因 I/D 及 AGT 基因 M235T 的多态性。【结果】慢性心力衰竭组 DD 基因型与 D 等位基因的频率均高于对照组。DD 基因型 0.468 比 0.227,  $P < 0.01$ ; D 等位基因 0.667 比 0.436,  $P < 0.01$ 。AGT 基因 M235T 多态性在慢性心力衰竭组及对照组的分布无统计学差异。ACE 及 AGT 双位点多态性联合分析显示慢性心力衰竭组 DD+TT 基因型频率显著高于对照组(0.351 比 0.117,  $P < 0.01$ ), 与 II+MM 型者相比, 具有该联合基因型者发生慢性心力衰竭的风险优势比(OR)为 6.799, 高于单基因分析的 ACE-DD 型者(OR =3.948)。【结论】ACE 基因 I/D 多态性与中国南方汉族人群慢性心力衰竭的发生有关, ACE 基因 DD 型可能是该地区慢性心力衰竭发病的遗传危险因素; 单独 AGT 基因 M235T 多态性与慢性心力衰竭的发生似无明显关系, 但 AGT 及 ACE 基因在慢性心力衰竭的发生中具有交互作用, DD 型者若同时携带 TT 基因型, 发生慢性心力衰竭的危险性增高。

关键词: 血管紧张素转换酶; 血管紧张素原; 基因, 多态性; 心力衰竭

中图分类号: R541.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0405-05

## Relationship Between Renin-angiotensin System Gene Polymorphisms and Chronic Heart Failure

PENG Jian<sup>1</sup>, MEI Xiao<sup>1</sup>, PENG Shu<sup>2</sup>, GONG Wu-xing<sup>3</sup>, NIU Yun-qian<sup>1</sup>, LUO Li-yun<sup>1</sup>

( 1. Department of Cardiology, The Fifth Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China; 2. Department of Cardiology, The Third Hospital of Jinan University, Zhuhai 519000, China; 3. Molecular Biological Center of The Third Hospital of Jinan University, Zhuhai 519000, China )

**Abstract:**【Objective】To investigate the relationship between angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion (I/D) polymorphism and angiotensinogen (AGT) gene M235T polymorphism and the onset of chronic heart failure (CHF) on South Han Chinese population.【Methods】Polymerase chain reaction (PCR) and PCR combined with restrictive fragment length polymorphism (RFLP) were used to detect the I/D polymorphism of ACE gene and M235T variant of AGT gene in 111 patients with CHF and 110 healthy controls. The distribution of the genotypes and alleles of ACE and AGT of two groups were tested.【Results】The genotype distribution of the ACE gene I/D polymorphism differed significantly in the patients with CHF and the contrast ( $\chi^2=20.175, P < 0.01$ ). The frequencies of DD genotype and D allele in the patients with CHF were higher than the latter (DD genotype: 0.468 vs 0.227,  $\chi^2=14.158, P < 0.01$ ; D allele: 0.667 vs 0.436,  $\chi^2=23.700, P < 0.01$ ). The genotype distribution of the AGT gene M235T variant had no statistical difference between the experimental group and the contrast. In combined genotype analysis, the genotype of ACE-DD+AGT-TT was significantly higher in CHF patients (0.351 vs 0.117,  $\chi^2=16.694, P < 0.01$ ). The odds ratio estimated by the combined analysis of the ACE-DD and AGT-TT genotypes was 6.799 compared with II+MM combinations, and it was higher than that estimated separately from the ACE-DD (OR=3.948).

收稿日期: 2006-02-25

基金项目: 珠海市委科技基金资助项目(PC20041037)

作者简介: 彭 健(1956-), 男, 四川内江人, 教授, 主任医师, 硕士生导师. E-mail: pengjianzh@163.com

【Conclusion】The I/D polymorphism of ACE gene are associated with the occurrence of CHF in South Han Chinese population, and the genotype ACE- DD might be one of the genetic risk factors of CHF. The M235T polymorphism of AGT gene seems to have no correlation with the occurrence of CHF solely, but AGT and ACE may play an interaction role in the onset of CHF, and the DD genotype individual together with TT genotype may have more risk of CHF.

Key words: angiotensin- converting enzyme; angiotensinogen; gene, polymorphism; heart failure

[J SUN Yat- sen (Med Sci), 2006,27(4):405- 409]

慢性心力衰竭是大多数心血管疾病的最终归宿,也是该类疾病中最主要的病残和病死原因,其病因迄今尚未完全阐明。近年来,遗传因素在慢性心力衰竭发生发展中的作用已逐渐引人关注,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)基因多态性与其关系正成为研究热点<sup>[1]</sup>。本研究通过检测 RAS 两大关键成分即血管紧张素转换酶(angiotensin- converting enzyme, ACE)和血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)的基因多态性在中国南方汉族正常人及慢性心力衰竭患者中的分布,探讨两基因在慢性心力衰竭发病中的作用,明确两基因协同作用对其的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

慢性心力衰竭组 111 例,男 73 例,女 38 例,年龄(62±13)岁,均来自 2004 年 4 月至 2005 年 12 月在本院及珠海市内几家大型医院心内科住院病员。入选标准:慢性心力衰竭诊断参照 Framingham 标准,心功能 NYHA 分级 ~ 级,超声心动图左室射血分数(LVEF) <45%; 年龄 18 岁; 慢性心力衰竭病史至少 3 个月。其中冠心病 60 例(合并高血压病 39 例),高血压心脏病 17 例,扩张型心肌病 16 例,风湿性心脏病 9 例,老年性退行性心瓣膜病 3 例,肺源性心脏病 3 例,酒精性心肌病、甲亢性心脏病及二尖瓣脱垂各 1 例。排除标准: 严重肝、肾功能不全; 严重的急性感染或代谢紊乱; 急性心力衰竭。对照组 110 例,男 75 例,女 35 例,年龄(62±13)岁,为同期来我院作常规体检的健康体检者,经病史、体查、心电图、活动平板试验、血生化、心脏彩色多普勒超声以及心脏 ECT 等检查排除心血管疾病、严重肝肾疾病、甲状腺疾病及糖尿病。本研究对象间无血缘关系,均为中国南方汉族成人,均知情同意。

### 1.2 基因组 DNA 抽提及体外扩增

#### 1.2.1 基因提取 取 EDTA 抗凝的外周静脉血 2

mL, 低渗法分离白细胞,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 缓冲液中。

1.2.2 ACE 基因 I/D 多态性检测 引物序列: P<sub>1</sub> 5 - CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT - 3 ; P<sub>2</sub> 5 - GATGTGGCCATCACATTCGTGAT - 3<sup>[2]</sup>。聚合酶链反应体系总体积共 20 μL,其中模板 DNA 1 μL (约 0.2 μg), 10×缓冲液 2 μL, Pfu DNA 聚合酶 1 μL (0.5 U/μL), P<sub>1</sub> 及 P<sub>2</sub> 各 1 μL (10 μmol/L), dNTP 2 μL (2 mmol/L)。在 PE-2400 全自动基因扩增仪上扩增, 94 变性 1 min, 58 退火 1 min, 72 延伸 1.5 min, 循环 30 次, 72 终末延伸 5 min。反应产物经琼脂糖凝胶电泳, 见图 1。

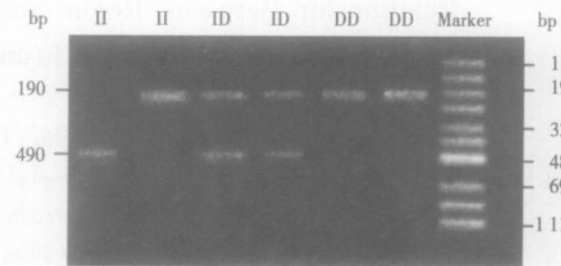


图 1 ACE 基因 I/D 多态性

Fig.1 ACE gene insertion/deletion(I/D) polymorphism  
II, ID, DD: three genotypes of ACE gene I/D polymorphism

1.2.3 AGT 基因 M235T 多态性检测 引物序列: P<sub>1</sub> 5 - CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC - 3 , P<sub>2</sub> 5 - CCGTTTGTGCAGGGGCTGGCTCTCT - 3<sup>[3]</sup>。聚合酶链反应体系总体积共 30 μL, 其中模板 DNA 1.5 μL (约 0.3 μg), 10×缓冲液 3 μL, Pfu DNA 聚合酶 1 μL (1 U/μL), P<sub>1</sub> 及 P<sub>2</sub> 各 1 μL (12 μmol/L), dNTP 3 μL (2 mmol/L)。在 PE-2400 全自动基因扩增仪上扩增, 94 变性 1 min, 65 退火 1 min, 72 延伸 1.5 min, 循环 30 次, 72 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 μL, 其中 PCR 产物 10 μL, Tth111 I 内切酶 (Fermentas 公司) 10 U, 10×缓冲液 2 μL, 混匀后置 37 水浴箱中水浴 16 h。

酶切反应产物经琼脂糖凝胶电泳,见图2。

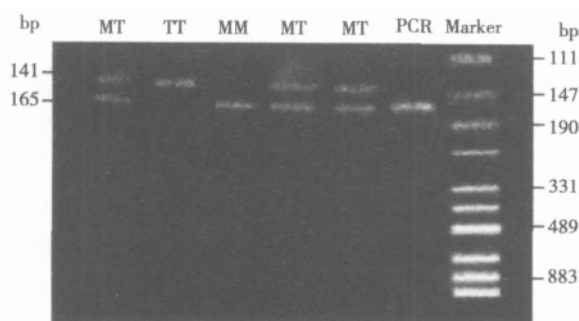


图2 AGT 基因 M235T 多态性

Fig.2 AGT gene M2355 polymorphism

MM, MT, TT: three genotypes of AGT gene M2355 polymorphism;  
PCR: AGT gene fragment after polymerase chain reaction

### 1.3 统计分析

实验设计为成组设计。采用基因计数法计算两组基因型与等位基因的频率。两组间比较采用成组设计资料的 t 检验, 频数间比较采用  $\chi^2$  检验。基因型相对风险率以优势比(odds ratio, OR) 及其 95%置信区间(confidence interval, CI) 表示,

$P < 0.05$  为差异具有统计学意义。均应用 SPSS13.0 for Windows 统计软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 两组一般临床资料的比较

两组年龄、性别构成、生化指标(血红蛋白、空腹血糖、总胆固醇、甘油三酯、谷丙转氨酶、血肌酐)等方面差异均无统计学意义。

### 2.2 Hardy-Weinberg 平衡检测

对照组 ACE、AGT 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $\chi^2$  分别为 2.472 和 1.831,  $P > 0.05$ ), 表明各基因频率达到遗传平衡, 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 两组 ACE 基因 I/D 多态性分布 慢性心力衰竭组 DD 基因型频率显著高于对照组 ( $\chi^2 = 14.158, P < 0.01$ ); D 等位基因频率也较对照组显著增高( $\chi^2 = 23.700, P < 0.01$ ), 见表 1。

表1 慢性心力衰竭组与正常对照组 ACE I/D 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 in chronic heart failure (CHF) group and normal control group

Group	n	Genotype				Allele	
		II	ID	DD	non-DD	I	D
CHF	111	15(0.135)	44(0.396)	52(0.468)	59(0.532)	74(0.333)	148(0.667)
Control	110	39(0.357)	46(0.418)	25(0.227)	85(0.773)	124(0.564)	96(0.436)

2.3.2 两组 AGT 基因 M235T 多态性分布的比较 慢性心力衰竭组及对照组 TT 基因型频率差异无统

计学意义( $\chi^2 = 2.518, P = 0.113$ ); 两组 T 等位基因频率差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.986, P = 0.321$ ), 见表 2。

表2 慢性心力衰竭组与正常对照组 AGT M235T 基因型频率及等位基因频率分布

Table 2 Frequencies of genotypes and alleles of AGT gene M235T polymorphism in chronic heart failure (CHF) group and normal control group

Group	n	Genotype				Allele	
		MM	MT	TT	non-TT	M	T
CHF	111	6(0.054)	29(0.261)	76(0.685)	35(0.315)	41(0.185)	181(0.815)
Control	110	3(0.027)	43(0.391)	64(0.582)	46(0.418)	49(0.223)	171(0.777)

2.3.3 两组 ACE 基因 I/D 及 AGT 基因 M235T 多态性联合分析 慢性心力衰竭组同时具有 ACE-DD 及 AGT-TT 基因型者的频率明显高于对照组 ( $\chi^2 = 16.694, P < 0.01$ ), 见表 3。以是否发生慢性心力衰竭为应变量, 以 ACE 基因型 ( $x_1$ )、AGT 基因型

( $x_2$ )、收缩压 ( $x_3$ ) 及舒张压 ( $x_4$ ) 为自变量, 并定义  $x_1$  及  $x_2$  为分类变量, 用 Enter 法建立非条件 Logistic 回归模型, 结果表明, ACE 基因型、收缩压及舒张压均参与增加慢性心力衰竭发生的概率 ( $P$  分别为 0.007、0.021 及 0.001), 而 AGT 基因型  $P = 0.805$ , 被

剔除。以 II 型为参照, ID 型发病的 OR 为 2.871 (95%CI:1.235 ~6.678, P=0.014), DD 型发病的 OR 为 3.948 (95%CI:1.661 ~9.381, P=0.002)。进一步以 ACE 基因型 ( $x_1$ )、ACE 基因型及 AGT 基因型 ( $x_1 \times x_2$ )、收缩压 ( $x_3$ )及舒张压 ( $x_4$ )为自变量,以后退 Wald 法建立回归模型, 结果表明, ACE 基因型与 AGT 基因型间交互作用有统计学意义 (P=0.002)。以 II+MM 型为参照, DD+TT 基因型发病的 OR 为 6.799 (95%CI:2.618 ~17.655, P=0.000); DI+TT 发病的 OR 为 2.928(95%CI:1.205 ~7.117, P=0.018)。

表 3 慢性心力衰竭组与正常对照组 ACE I/D 及 AGT M235T 基因型频率分布联合分析

Table 3 Combined analysis of genotypes frequencies of ACE gene I/D and AGT gene M235T polymorphisms in chronic heart failure (CHF) and normal control group n(proportion)

Group	DD+TT	Others	DI+TT	II+MM
CHF	39(0.351)	72(0.649)	29(0.261)	1(0.009)
Control	13(0.118)	97(0.882)	29(0.264)	1(0.009)

### 3 讨 论

RAS 在调节血管张力、水电解质平衡、心脏和血管重塑方面起重要的作用, 其关键成分包括 ACE 和 AGT。慢性心力衰竭患者血浆和心肌组织中, 可以检测到高表达的 ACE mRNA、ACE、AGT 和 Ang, 且存在个体差异<sup>[3-5]</sup>, 这提示 ACE 和 AGT 基因多态性与慢性心力衰竭的发病可能有关。

位于 ACE 基因第 16 内含子的一段 287 bp 序列的 I/D 多态性是迄今为止研究得最多的与慢性心力衰竭发病相关的候选基因<sup>[6]</sup>。Raynolds 等<sup>[7]</sup>最先报道 ACE 基因 DD 型与缺血性心肌病及扩张型心肌病引起的心衰有关。新近 Cuoco 等<sup>[8]</sup>的研究亦证明 ACE 基因 DD 型与慢性心力衰竭的发病相关。研究表明, 衰竭心脏中只有 ACE 基因表达增加, 而另一种促进 Ang 生成的重要糜蛋白酶的基因表达却没有增加, 故 Ang 浓度变化更多依赖于 ACE<sup>[9]</sup>。ACE 基因 I/D 多态性影响血浆及心肌 ACE 水平的强度依次为 DD>ID>II<sup>[10]</sup>。高表达的 Ang 通过多种途径使心肌新的收缩蛋白合成增加, 在血管中使平滑肌细胞增生管腔变窄, 同时降低血管内皮细胞分泌一氧化氮的能力, 使血管舒

张受影响。这些不利因素长期作用促进心肌重塑, 加重心肌损伤和心功能恶化。本研究的 111 例慢性心力衰竭患者中, DD 型及 D 等位基因频率分别为 0.468 和 0.667, 显著高于对照组的 0.227 和 0.436, 提示 ACE 基因 I/D 多态性与中国南方汉族人群慢性心力衰竭的发生相关, ACE-DD 型可能是该地区人群慢性心力衰竭发病的遗传危险因素。部分研究表明 ACE 基因 I/D 多态性与慢性心力衰竭发病似无关<sup>[11-13]</sup>。造成这种差异的原因可能是多方面的, 除了种族和地区的差异, 可能还与入选标准或试验设计以及统计学分析的角度有关, 如年龄、性别构成、样本量等。值得注意的是, RAS 通常受到严格的负反馈抑制, 单独 ACE 基因 I/D 多态性还不足以对心肌组织产生很强的生物学效应, 据推测需在心肌的某种生长机制被激活的特定情况下, ACE I/D 多态性才能对心脏功能产生具有临床意义的影响, 而这种激活的机制还有待于更加深入的探索<sup>[14]</sup>。

RAS 中另一关键成分 AGT 的基因 M235T 多态性 (外显子 2 核苷酸 704 处胸腺嘧啶 T 被胞嘧啶 C 所取代, 导致编码产物第 235 号氨基酸由蛋氨酸 M 变异为苏氨酸 T) 与多种心血管疾病有关, 其 TT 型及 T 等位基因被认为是高血压病、冠心病、扩张型心肌病等的发病危险因素。研究表明, AGT T 等位基因与血浆及心肌组织 AGT 高水平相关, 而 AGT 浓度的微小变化即可引起 Ang 生成量的明显改变, 因此, 有学者推测 AGT TT 型或 T 等位基因可能与慢性心力衰竭的发病存在一定的联系, 但目前仅有的一项研究表明, 单独 AGT 基因 M235T 多态性与慢性心力衰竭的整体人群发病似无关<sup>[15]</sup>。本组资料显示, 慢性心力衰竭组与对照组 3 种基因型分布及 T 等位基因频率分布无统计学差异, 提示单独 AGT 基因 M235T 多态性与中国南方地区人群慢性心力衰竭发病似无明显相关。我们认为, 包括慢性心力衰竭在内的大多数心血管疾病为多基因及多环境因素疾病, 单一基因或单一位点的作用尚不足以成为其致病机制, 或许对其发生发展只产生微弱的影响。

遵循基因多态性与疾病相关性的遗传学分析规律, 在很多情况下, 某一疾病与某一个单位点并无相关性, 而与多位点却具相关性。本研究将 AGT 基因 M235T 与 ACE 基因 I/D 多态性行联合分析, 结果表明, AGT M235T 变异与慢性心力衰竭有关,

DD+TT 基因型频率显著高于对照组 (0.351 比 0.118)。进一步非条件 Logistic 回归分析表明上述两位点多态性具有交互作用, 与 II+MM 基因型相比, 具有该联合基因型者发生慢性心力衰竭的 OR 6.799, 高于单基因分析的 ACE-DD 型者 OR3.948, 提示 DD 型者若同时携带 TT 基因型, 发生慢性心力衰竭的危险性增高。这与 Goldbergova 等<sup>[15]</sup>的类似研究结论相一致。

人们过去多注意环境因素和不良生活习惯及各原发心脏疾病与慢性心力衰竭之间的病因关系, 缺乏将慢性心力衰竭作为一个总的群体来研究的资料。近年来, 人们越来越多地注意到遗传因素在慢性心力衰竭发生发展中的地位和作用<sup>[1]</sup>。本研究将慢性心力衰竭作为一总的群体进行研究, 并首次进行了其与 ACE I/D 及 AGT M235T 双位点基因多态性的联合分析, 这不仅有助于更好地了解慢性心力衰竭的病因学特征, 尚对慢性心力衰竭高危人群的筛查与早期重点防治具有一定的临床意义。然而, 慢性心力衰竭病因学的复杂性决定了可能并不存在明显的主效基因, ACE 基因 I/D 及 AGT 基因 M235T 多态性仅为众多与慢性心力衰竭发病相关联基因的一部分, 仅此两种基因多态性的联合分析尚不能解释所有慢性心力衰竭的发病机制。

#### 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] 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): 1433-1436.
- [3] KATSUYA T, KOIKE G, YEE T W, et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease[J]. Lancet, 1995, 345(8965): 1600-1603.
- [4] HUANG W, XIE C, ZHOU H, et al. Association of the angiotensin - converting enzyme gene polymorphism with chronic heart failure in Chinese Han patients [J]. Eur J Heart Fail, 2004, 6(1): 23-27.
- [5] ABRAHAM M R, OLSON L J, JOYNER M J, et al. Angiotensin - converting enzyme genotype modulates pulmonary function and exercise capacity in treated patients with congestive stable heart failure [J]. Circulation, 2002, 106(14): 1794-1799.
- [6] SCHUT A F, BLEUMINK G S, STRICHER B H, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of heart failure in hypertensive subjects[J]. Eur Heart J, 2004, 25(23): 2143-2148.
- [7] RAYNOLDS M V, BRISTOW M R, BUSH E W, et al. Angiotensin- converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Lancet, 1993, 342(8879): 1073-1075.
- [8] CUOCO M A, PEREIRA A C, de FREITAS H F, et al. Angiotensin - converting enzyme gene deletion polymorphism modulation of onset of symptoms and survival rate of patients with heart failure [J]. Int J Cardiol, 2005, 99(1): 97-103.
- [9] SERNERI G G N, BODDI M, CECIONI I, et al. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function[J]. Circ Res, 2001, 88(9): 961-968.
- [10] NIU T H, CHEN X, XU X P. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease[J]. Drugs, 2002, 62(7): 977-993.
- [11] COVOLO L, GELATTI U, METRA M, et al. Angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and heart failure: a case-control study[J]. Biomarkers, 2003, 8(5): 429-436.
- [12] Di PASQUALE P, CANNIZZARO S, SCALZO S, et al. Cardiovascular effects of I/D angiotensin - converting enzyme gene polymorphism in healthy subjects: Findings after follow-up of six years [J]. Acta Cardiol, 2005, 60(4): 427-435.
- [13] 黄文艳, 孙 明, 周宏研. 血管紧张素转换酶基因多态性对血浆血管紧张素 水平及心衰的影响 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2004, 29(2): 198-200.
- [14] SCHUNKERT H. Controversial association of left ventricular hypertrophy and the ACE I/D polymorphism - is the mist clearing up? [J]. Nephrol Dial Transplant, 1998, 13(5): 1109-1112.
- [15] GOLDBERGOVA M, SPINAROVA L, SPINAR J, et al. Association of two angiotensinogen gene polymorphisms, M235T and G(-6)A, with chronic heart failure[J]. Int J Cardiol, 2003, 89(2-3): 267-272.

(编辑 黄小延)