

血管紧张素转换酶、内皮型一氧化氮合酶和载脂蛋白 E 基因多态性与冠心病的相关性

梁茜¹, 董吁钢², 杨希立¹, 杨光³, 崔金环³

(1. 佛山市第一人民医院心血管内科, 广东 佛山 528000; 2. 中山大学附属第一医院心血管内科, 广东 广州 510080;
3. 佛山市第一人民医院临床研究所, 广东 佛山 528000)

摘要:【目的】研究血管紧张素转换酶(ACE)基因插入/缺失多态性、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因 G894T 多态性和载脂蛋白 E(ApoE)基因多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的关系。【方法】应用基因芯片技术分析 133 例冠心病患者和 122 例对照者 ACE、eNOS 和 ApoE 基因多态性, 对比两组基因型及等位基因频率。【结果】冠心病组 ACE DD 基因型频率比对照组显著升高, 28.6% vs 13.1%, $P < 0.01$, ACE 基因多态性与冠心病危险性相关。两组 eNOS 和 ApoE 基因型频率差异无统计学意义($P > 0.05$), eNOS 和 ApoE 基因多态性与冠心病危险性无明显相关。【结论】ACE 基因多态性可能是中国人冠心病的危险因素, 基因芯片技术可能是研究多种易感基因与冠心病相关性的一种高效、敏感的方法。

关键词: 冠状动脉疾病; 血管紧张素转换酶; 内皮型一氧化氮合酶; 基因芯片

中图分类号: R345; R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0396-05

Relationship of Angiotensin-converting Enzyme, Endothelial Nitric Oxide Synthase and Apolipoprotein E Gene Polymorphisms with Coronary Disease

LIANG Qian¹, DONG Yu-gang², YANG Xi-li¹, YANG Guang³, CUI Jin-huan³

(1. Department of Cardiology, The First People's Hospital of Foshan City, Foshan 52800, China; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Clinical Research, The First People's Hospital of Foshan City, Foshan 52800, China)

Abstract: 【Objective】 To study angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) G894T polymorphism and apolipoprotein E(ApoE) gene polymorphism in relation to coronary heart disease(CHD). 【Methods】 ACE, eNOS, and ApoE gene polymorphisms of 133 patients with CHD and 122 controls were analyzed by gene chip technology. The allele frequency and genotype distribution were compared between the two groups. 【Results】 The frequency of DD genotype of ACE gene in patients with CHD was higher than that of control (28.6% vs 13.1%, $P < 0.01$). The ACE gene polymorphism was associated with an increased risk of CHD. The difference of eNOS and ApoE genotype distribution between the two groups was not significant ($P > 0.05$). The eNOS and ApoE gene polymorphisms were not associated with an increased risk of CHD. 【Conclusion】 The ACE gene polymorphism may be a risk factor of CHD in Chinese. Gene chip technology may be an effective and sensitive method to study the relationship of gene polymorphisms and CHD.

Key words: coronary disease; ACE; eNOS; ApoE; gene chip

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):396-400]

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是由遗传和环境因素共同作用所致的复杂疾病, 发病过

程与多基因之间和基因-环境之间的相互作用等有关。可能存在多个与冠心病相关的基因, 这些基

收稿日期: 2006-01-12

基金项目: 广东省佛山市科技攻关项目(200508036)

作者简介: 梁茜(1966-), 女, 广东佛山人, 硕士生, 副主任医师. E-mail: sisi1212@21cn.com

因单个起作用或联合作用,还可能与传统易感因素共同作用而增加冠心病的危险性。使用传统的PCR技术须分别检测多种易感基因,不利于冠心病的快速诊断,且敏感性、重复性较差。本研究基于此考虑应用基因芯片技术,同时检测血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme,ACE)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)和载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因多态性在冠心病发生发展中的改变。

1 对象与方法

1.1 对象

佛山地区汉族冠心病患者133人,选自2004年8月-2005年5月住院病例,符合1979年世界卫生组织关于缺血性心肌病的命名和诊断标准,全部经冠状动脉造影证实;年龄(64±8)岁。男100例,女33例,其中心肌梗死65例,不稳定型心绞痛68例。对照组佛山地区汉族122例:健康体检者、疑似冠心病人群冠脉造影正常者,并除外心血管疾病和糖尿病家族史者;男91例、女31例,年龄(63±9)岁。本研究人群个体间无血缘关系。血脂异常指血清总胆固醇(TC)>220 mg/dL、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)>140 mg/dL、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)<35 mg/dL或/和甘油三酯(TG)>150 mg/dL。高血压指收缩压≥140 mmHg,或舒张压≥90 mmHg。糖尿病符合1999年WHO糖尿病诊断标准,肥胖指体质质量指数(BMI)>24 kg/m²。冠心病组和心肌梗死亚组血压、血浆TCH及LDL-C水平虽高于对照组,但两组性别、年龄及身高、体重、吸烟史、血糖等各项临床参数具有可比性, P > 0.05。

1.2 试剂

由中国上海百傲科技有限公司提供BaiO BE系列基因芯片检测仪和基因芯片检测的试剂。

1.3 人基因组DNA的提取

被检者抽取肘静脉血2 mL,用EDTA抗凝,用快速裂解法提取基因组DNA。

1.4 ACE、eNOS和ApoE基因特异片段的PCR扩增

分别在各扩增液管中加入Taq酶管溶液0.8 mL。在各扩增液管中分别加入阴性对照管溶液、阳性对照管溶液或抽提好的样品上清液,混匀。把各管放入PCR仪中,按下列条件扩增:94 25 s,

25 s, 72 25 s, 做40个循环,最后72 5 s。取各管PCR扩增产物于98 热变性5 min,取出后迅速放入冰盒,-20 放置。

1.5 杂交显色

在杂交舱中基因芯片与已变性PCR扩增产物混合物混匀杂交,向杂交舱中加入显色液溶液,44 放置40 min。

1.6 检测

将显色载玻片置于BaiO基因识读仪上进行检测,图像由该公司Array Doctor软件分析可自动输出检测结果,最后检测出ACE、eNOS和ApoE基因的多态性位点。为考察基因芯片检测结果的准确性,我们从基因芯片检测样本中随机抽取3份,送上海生物工程服务有限公司测序分析3份样本中ACE、eNOS和ApoE基因的基因型。测序结果与基因芯片检测结果完全一致。

1.7 数据整理和统计学分析

以基因计数法计算各组病例和对照组的基因型和等位基因频率。用SPSS 11.0软件包作统计学处理。判别冠心病组和对照组基因型及等位基因频率是否符合Hardy-Weinberg平衡。冠心病组与对照组基因型和等位基因频率之间的比较及联合基因型分析用²检验。各组ApoE基因型与血脂浓度的关系进行方差分析。

2 结果

2.1 ACE、eNOS和ApoE基因多态性检测

2.1.1 基因型频率适合度检测 冠心病组、心肌梗死亚组及对照组基因型频率的检测结果显示皆达到Hardy-Weinberg平衡。

2.1.2 冠心病组ACE基因型 ACE DD基因型频率与对照组相比差异有统计学意义,DD基因型与冠心病明显相关,两组D等位基因频率差异无统计学意义。心肌梗死亚组ACE基因型:ACE-DD基因型频率与对照组差异有统计学意义,DD基因型与心肌梗死明显相关。两组D等位基因频率差异亦无统计学意义(表1,2)。

2.1.3 冠心病组eNOS基因型 eNOS-TT基因型频率冠心病组与对照组差异无统计学意义, P = 0.09 > 0.05。两组T等位基因频率差异无统计学意义。心肌梗死亚组eNOS基因型:TT基因型频率与对照组差异无统计学意义, P = 0.09 > 0.05。两组T

等位基因频率差异亦无统计学意义(表 1, 2)。

表 1 血管紧张素转换酶和内皮型一氧化氮合酶基因的基因型频率分布

Table 1 Distribution of angiotensin- converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase genotype frequencies

Group	n	ACE genotype(%)			eNOS genotype(%)		
		II	ID	DD	GG	GT	TT
CHD	133	30.08	41.35	28.57 ¹⁾	85.71	9.02%	5.27% ²⁾
MI	65	24.62	46.15	29.23 ¹⁾	87.69	10.77	4.62 ²⁾
Control	122	45.90	40.98	13.12	86.89	12.30	0.81

1) Compared with control group, P< 0.01; 2) Compared with control group, P>0.05

表 2 血管紧张素转换酶和内皮型一氧化氮合酶基因的等位基因频率分布

Table 2 Distribution of angiotensin- converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase allele frequencies

Group	n	ACE allele (%)		eNOS allele (%)	
		I	D	G	T
CHD	100	0.51	0.49 ¹⁾	0.90	0.10 ¹⁾
MI	65	0.48	0.52 ¹⁾	0.92	0.08 ¹⁾
Control	122	0.56	0.44	0.93	0.07

1)compared with control group, P>0.05

2.1.4 冠心病 ApoE 基因型 E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4 基因型频率与对照组差异无统计学意义, P>0.05。E2、E3 和 E4 等位基因频率与对照组差异无统计学意义。心肌梗死亚组 ApoE 基因型: E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4 基因型频率与对照组差异无统计学意义, P>0.05。E2、E3 和 E4 等位基因频率与对照组差异无统计学意义, 冠心病组 6 种 ApoE 基因型的血脂水平差异无统计学意义(表 3)。

表 3 两组载脂蛋白 E 基因型与血脂水平的比较

Table 3 The comparison of apolipoprotein E genotypes and serum lipid profile between the two groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	Genotype	n	TCH	TG	LDL- C	HDL- C
			($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	($\bar{x} \pm s$, mmol/L)
CHD	E2/E2	2	3.29 ±0.53	1.66 ±0.63	1.65 ±0.67	1.15 ±0.36
	E2/E3	30	4.88 ±1.35	1.83 ±1.60	2.94 ±0.88	1.01 ±0.23
	E3/E3	82	5.14 ±1.59	1.67 ±1.24	3.46 ±1.29	1.09 ±0.42
	E2/E4	4	5.99 ±1.03	2.23 ±0.78	3.42 ±1.12	1.02 ±0.19
	E3/E4	13	4.96 ±1.15	1.23 ±0.58	3.32 ±1.12	0.97 ±0.34
	E4/E4	2	6.52 ±1.68	2.23 ±0.63	4.33 ±1.32	1.21 ±0.15
Control	E2/E3	23	4.99 ±1.09	1.34 ±0.56	2.68 ±0.67	1.32 ±0.24
	E2/E4	2	7.41 ±1.69	1.32 ±0.65	2.61 ±0.71	1.41 ±0.49
	E3/E3	79	5.37 ±0.94	1.53 ±0.50	2.69 ±0.62	1.30 ±0.23
	E3/E4	16	5.52 ±1.15	1.37 ±0.48	2.74 ±0.46	1.26 ±0.11
	E4/E4	2	4.63 ±0.27	0.87 ±0.26	3.04 ±0.50	1.14 ±0.13

ApoE gene polymorphism was not associated with lipid levels of CAD, TCH: F=1.41, P=0.23; TG: F=0.64, P=0.61; LDL- C: F=2.59, P=0.03; HDL: F=0.46, P=0.81, multiple comparisons of LDL- C, P>0.05

2.2 ACE、eNOS 和 ApoE 基因联合检测

为了评估 ACE、eNOS 和 ApoE 基因在冠心病中的相互作用, 我们对不同的基因组合进行分析(表 4)。ACE- DD 和 eNOS- TT 型联合, 并无进一步增加 CHD 组的危险性, P> 0.05。ACE DD 型和 ApoE E3/E4+E4/E4 型联合, 并无进一步增加 CHD 组的危险性, P> 0.05。eNOS- TT 型和 ApoE E3/E4+E4/E4 基因型联合并无进一步增加 CHD 组的

危险性, P> 0.05。

表 4 冠心病组与对照组基因型联合分析

Table 4 Analysis of combined genotypes in patients with coronary artery disease and controls

Genotype	χ^2	P
ACE DD + eNOS TT	0.42	0.52
ACE DD + ApoE E3/E4+E4/E4	0.01	0.92
eNOS TT + ApoE E3/E4+E4/E4	0.60	0.44

3 讨论

3.1 ACE基因多态性与冠心病的相关性

ACE通过最终生成血管紧张素和灭活缓激肽而促进血管收缩,刺激心肌和血管平滑肌增生,造成内皮功能失调,从而参与冠心病和心肌梗死的发病。近年来对于ACE I/D多态性与冠心病的关系,国内外做了大量的研究,结果却不尽相同。Samani等^[1]分析了14个对白种人和日本人的相关研究,结果进一步支持DD基因型增加心肌梗死的危险性。Nassar等^[2]研究ACE基因多态性与冠心病无相关性。我们研究提示ACE基因DD型与冠心病明显相关,ACE基因多态性是冠心病的危险因素,与Samani等^[1]报道相符。本研究还发现D等位基因的频率与国内多个中心的结果相符,但低于高加索人种的频率^[3],可能这是中国人冠心病发病率比西方人低的原因。

3.2 内皮型一氧化氮合酶基因多态性与冠心病的相关性

内皮型一氧化氮合酶(eNOS)是左旋精氨酸一氧化氮途径的关键酶,eNOS催化生成的NO具有舒张血管、调节血流、抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移和清除超氧自由基、抑制血小板聚集、粘附和白血细胞的趋化激活等重要功能,是心血管系统抗动脉粥样硬化、防止血栓形成和维持正常血管舒缩反应中必不可少的保护因子^[4]。有研究发现eNOS基因第7外显子中的G894T突变和冠心病的发病及心肌梗死的风险有关。Colombo等^[5]的研究显示G894T错义突变与意大利人冠心病的存在和严重程度相关。而Rossi等^[6]所做的GENICA研究,意大利1106个冠脉造影证实的冠心病患者与119个无心血管危险因素的对照者,eNOS基因G894T突变与冠心病无关。本研究提示冠心病组和心肌梗死亚组eNOS TT基因型与冠心病无明显相关,可能须增加样本量进一步研究。

3.3 ACE和eNOS通过“反馈调节”协同作用

本研究使用基因芯片技术联合检测ACE和eNOS基因,主要考虑ACE和NO在调节内皮功能和血管紧张度方面起重要作用。Wiemer^[7]报道增加NO或NO释放的化合物可抑制纯化的ACE活性,从而刺激NO从鼠的颈动脉中释放出来,使血管紧张素转变成减少。这种ACE表达/活性及

NO系统的反向关系在长期抑制ACE的高血压鼠中亦可见到,表现为抑制血管及心脏ACE表达和活性与上调eNOS表达及增加血管释放NO相关。基于考虑ACE-DD+eNOS-TT患者有可能造成NO活性降低而ACE活性增高,冠心病的危险性明显增高。国内外这方面研究不多。我们使用基因芯片联合分析ACE和eNOS基因在冠心病发生发展中的作用,提示eNOS TT基因型在中国南方人冠心病包括心肌梗死与正常对照者相比差异无显著性,ACE-DD和eNOS-TT型联合,并无进一步增加CHD组的危险性。因病例数少,需进一步研究。

3.4 ApoE基因多态性与冠心病的相关性

载脂蛋白E在体内脂蛋白代谢中起着非常重要的作用。由于ApoE基因遗传具有多态性,即3个等位基因E2、E3、E4单个核苷酸的点突变,它们所转录的蛋白质结构中氨基酸的变化,使其对LDL受体亲和力不同,而影响脂蛋白代谢和血脂水平,可促使LDL浸润和存留在血管壁上,逐步演变为动脉粥样硬化形成冠心病。Chen等^[8]研究表明ApoE的E3/E4、E4/E4基因型及E4等位基因与冠心病及其严重程度密切相关。而Mansur等^[9]研究结果有不同。本研究提示未发现ApoE E3/E4及E4/E4基因型及E4等位基因与冠心病相关,冠心病组6种ApoE基因型的血脂水平无显著性差异,与Mansur^[9]报道相符,提示中国南方汉族冠心病患者血脂异常与ApoE基因多态性可能无关,而与脂蛋白受体异常及其它多种遗传因子参与可能有关。

3.5 基因芯片技术在冠心病预防和治疗的前景

本研究应用基因芯片技术,将中国人的ACE、eNOS和ApoE基因型探针固定于同一张基因芯片表面,通过碱基互补配对原理进行杂交,然后通过扫描系统,检测探针分子杂交信号强度,其特点是高效、快速、自动微型化、高通量、高度并行性及高度敏感性,有着广泛的应用前景。我们考虑下一步仍需要进行大样本量及不同地域人种基因型的检测。有理由认为,及早对具有冠心病易感基因的人群进行有关健康饮食和生活习惯的宣传,将可降低该人群冠心病的发病率和死亡率。因病人的遗传背景不同,对冠心病治疗的效果可能因人而异。我们期望在目前冠心病常规的硝酸酯类、ACE抑制剂等使用方面可根据患者的基因型进行个体化治疗和病情随访。根据不同的基因类型,从分子心

脏病学角度进行早期干预是我们这项研究的最终目的。

参考文献:

- [1] SAMANI N J, THOMPSON J R, O TOOLE L, et al. A meta - analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin - converting enzyme gene with myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1996, 94 (4) : 708- 712.
- [2] NASSAR B A, DUNN J, TITLE L M, O NEILL B J, et al. Relation of genetic polymorphisms of apolipoprotein E, angiotensin converting enzyme, apolipoprotein B-100, and glycoprotein IIIa and early - onset coronary heart disease [J]. *Clin Biochem*, 1999, 32(4): 275- 282.
- [3] FATINI C, ABBATE R, PEPE G, et al. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile [J]. *Eur Heart J*, 2000,21(8):633- 635.
- [4] LEFER A M. Nitric oxide:nature s naturally occurring leukocyte inhibitor [J]. *Circulation*, 1997, 95 (3):553- 554.
- [5] COLOMBO M G, ANDREASSI M G, PARADOSSI U, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298 - >

Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease [J]. *Heart*, 2002, 87 (6):525- 528.

- [6] ROSSI G P, CESARI M, ZANCHETTA M, et al. The T- 786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(6): 930- 937.
- [7] WIEMER G, LINZ W, HATRIK S, et al. Angiotensin- converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats[J]. *Hypertension*,1997, 30(5):1183- 1190.
- [8] CHEN Q, REIS S E, KAMMERER CM, et al. ApoE polymorphism and angiographic coronary artery disease severity in the Women s Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 169 (1): 159- 167.
- [9] MANSUR A P, ANNICCHINO - BIZZACCHI J, FAVARATO D, et al. Angiotensin- converting enzyme and apolipoproteins genes polymorphism in coronary artery disease[J]. *Clin Cardiol* ,2000, 23(5):335- 340.

(编辑 黄小延)

(上接第 386 页 from page 386)

alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause- effect relationship? [J]. *Dig Liver Dis*, 2004, 36 (3):165- 173.

- [4] 方继伟,范建高. 二甲双胍对 NAFLD 的治疗作用及其机制[J].*国外医学消化系疾病分册*, 2004,24 (6):372- 374.
- [5] 高志强,陆付耳,董 慧,等.二甲双胍干预高脂饲养所致大鼠脂肪肝的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005,13 (2):101- 104.
- [6] MARCHESINI G, BRIZI M, BIANCHI G, et al. Metformine in non- alcoholic steatohepatitis [J]. *Lancet*, 2001,358 (9285):893- 894.
- [7] LI Z, YANG S, LIN H, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2003, 37 (2):343- 350.
- [8] KOTEISH A, MAE D A. Animal models of steatohepatitis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002, 16 (5):679- 690.
- [9] ANDR P, CATHERINE M, OLIVIER B, et al. Rat pro- inflammatory cytokine and cytokine related mRNA

quantification by real - time polymerase chain reaction using SYBR green[J]. *BMC Immunology*, 2004, 5 (1):3- 14.

- [10] CHEN Y P, HIGGINS J A, GUNDERSEN- RINDAL D E. Quantitation of a glyptapanteles indiensis polydnavirus gene expressed in parasitized host, *Lymantria dispar*, by real- time quantitative RT- PCR[J]. *J Virol Methods*, 2003, 114 (2):125- 133.
- [11] 吴明玮,洗励坚,李晓梅,等. 二氢嘧啶脱氢酶、胸苷酸合成酶、c- myc 和 p53 基因在小鼠肝组织中表达的昼夜节律性研究[J]. *癌症*, 2004, 23 (3):235- 242.
- [12] YASUO M, AYAKO K, ATSUHIKO T, et al. Relationship between serum tumor necrosis factor- and insulin resistance in obese men with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diab Res Clin Prac* , 2001, 52 (2):119- 123.
- [13] HUI J M, HODGE A, FARRELL G C, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- alpha or adiponectin? [J]. *Hepatology*, 2004, 40 (1):185- 194.

(编辑 王晓鹰)