

血管紧张素转换酶基因插入/缺失多态性与 PAI-1 活性的相关性

张玉玲¹, 阎继锋², 张舒林², 黄振文³, 刘瑞云³

(1. 中山大学附属第二医院心内科, 广东 广州 510120; 2. 河南省胸科医院, 河南 郑州 450003;
3. 郑州大学附属第一医院心内科, 河南 郑州 450052)

摘要:【目的】研究血管紧张素转换酶(ACE)基因插入/缺失(ID)多态性与血浆 PAI-1 活性的关系。【方法】用 PCR 方法扩增 93 例心肌梗死患者及 87 例健康体检者 ACE 基因特异性片段,同时应用发色底物法测定 PAI-1 活性。【结果】①心肌梗死组 ACE DD 基因型频率 32.3% 和 D 等位基因频率 54.3%, 高于对照组 12.6% 和 37.4%, P 均 < 0.01 ; ACE 基因型分布与年龄、性别、体重指数、血压、胆固醇、甘油三脂、血糖等无关。②心肌梗死组血浆 PAI-1 活性 0.85 ± 0.19 AU/mL, 高于对照组 0.66 ± 0.20 AU/mL, $P < 0.01$ 。③心肌梗死组 DD 基因型血浆 PAI-1 活性高于 ID 基因型及 II 基因型 P 均 < 0.01 ; ID 型血浆 PAI-1 活性亦高于 II 型 $P < 0.05$ 。对照组 DD 基因型血浆 PAI-1 活性高于 II 基因型 $P < 0.05$ 而 DD 型血浆 PAI-1 活性虽高于 ID 型, ID 型亦高于 II 型, 但差异无统计学意义。【结论】① ACE DD 基因型可能是心肌梗死发生的独立危险因素; ② PAI-1 水平可能受 ACE 基因 ID 多态性的影响, ACE 基因型可能通过影响纤溶平衡而引起心肌梗死。

关键词: 血管紧张素转换酶; 基因; 基因多态性; PAI-1 活性

中图分类号: R542.220

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)06-0594-04

Relationship Between Insertion/Deletion Polymorphism of Angiotensin I Converting Enzyme Gene and Plasma PAI-1 Activity

ZHANG Yu-ling¹, YAN Ji-feng², ZHANG Shu-lin², HUANG Zhen-wen³, LIU Rui-yun³

(1. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;
2. Henan Provincial Chest Hospital, Zhengzhou 450003, China; 3. Department of Cardiology, The First Affiliated
Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: 【Objective】To explore the relationship between insertion/deletion polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene and plasma PAI-1 activity. 【Method】Ninety-three patients with myocardial infarction (MI) and eighty-seven healthy controls were tested. ACE fragment of genomic DNA was amplified using the polymerase chain reaction (PCR). Plasma levels of PAI-1 activity was determined by spectrophotometric assay. 【Result】(1) The frequencies of DD genotype and D alleles (32.3% and 54.3%) of ACE in MI group were significantly higher than those of control group (12.6% and 37.4%) ($P < 0.01$, respectively). (2) The plasma PAI-1 activity ($0.85 \text{ AU/mL} \pm 0.19 \text{ AU/mL}$) in MI group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). (3) In MI group, the plasma PAI-1 activity showed a significantly higher level in subjects with DD genotype than those with ID and II ($0.71 \text{ AU/mL} \pm 0.17 \text{ AU/mL}$) genotypes ($P < 0.01$, respectively). And the plasma PAI-1 activity was significantly higher in subjects with ID genotype than those with II genotype ($P < 0.05$). In control group, the plasma PAI-1 activity also showed a significantly higher

收稿日期 2004-05-03

基金项目 河南省卫生厅科研基金资助项目(1999)

作者简介 张玉玲(1968-),女,河南濮阳人,硕士,主治医师,黄振文,刘瑞云,教授,导师. E-mail: zhangyuling@yahoo.com.cn

level in subjects with DD genotype than subjects with II genotype ($P < 0.05$). Although it was also higher in subjects with DD genotype than that with ID genotype, and in subjects with ID genotype higher than that with II genotype, but without statistical significance ($P > 0.05$). 【Conclusion】(1) The ID polymorphism of ACE gene is associated with the increased risk for myocardial infarction. (2) The genetic variation of ACE contributes to the balance of plasma PAI-1 activity. This may be one of the pathogenesis mechanisms linking to the ACE ID genotype and MI.

Key words: angiotensin I converting enzyme; gene; gene polymorphism; PAI-1 activity

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(6): 594 - 597]

血管紧张素转换酶 (angiotensin I converting enzyme, ACE) 基因插入/缺失 (insertion/deletion, I/D) 多态性可能为心肌梗死的独立危险因素^[1-3]。研究表明, ACE 基因多态性通过影响血浆 ACE 水平和内皮细胞功能而影响了血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的浓度^[4], Ang II 可以引起血浆血管内皮细胞型纤溶酶原激活剂抑制物 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 水平的增加, 并可诱导 PAI-1 mRNA 的表达^[5], 因此 ACE 基因可能通过影响血清 ACE 水平而影响了纤溶平衡。本研究通过检测心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 组及对照组 ACE 基因 I/D 多态性及循环中 PAI-1 活性, 研究 ACE 基因 I/D 多态性与纤溶活性的关系, 进而探讨 MI 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

共纳入心肌梗死患者 93 例, 所有病例均为 2000 年 9 月至 2001 年 5 月于河南省胸科医院心内科住院病人。符合 1979 年 WHO 颁布的心肌梗死的诊断标准。入选对象还需符合以下条件: ①发生急性心肌梗死至少 2 周以后; ②心功能 I-II 级。合并有严重肝肾功能障碍或血液系统疾病及严重心力衰竭、心律失常等需特殊处理者除外。健康体检者 87 例。心肌梗死组血浆胆固醇及甘油三酯水平虽高于对照组, 但两组性别、年龄及身高、体重、吸烟史、血糖、血压等各项临床参数具有可比性; 且两组 ACE 各基因型之间以上临床参数均相似, 具有可比性 $P > 0.05$ 。

1.2 方法

空腹抽取肘静脉血 4 mL。2 mL 用 0.13 mol/L 枸橼酸钠抗凝, 分离血浆, 将待测血浆用缓冲液稀释, 与等量活性为 5.0×10^{-2} U/mL 的标准品 tPA

(PAI-1 的相对活性为 0) 混匀, 25 °C 放置 20 min, 制备 PAI-1 活性标准品; 将待测血样、PAI-1 标准品及缓冲液加入 96 孔聚丙烯酶标板中; 用缓冲液将发色底物、共价物、纤溶酶原混在一起加入酶标板孔中; 终止液终止反应, 在酶标仪上测定各孔 A_{405} 值, 以 PAI-1 标准品活性做标准曲线, 计算样本 PAI-1 活性 (AU/mL)。

另 2 mL 加入 20 g/L EDTA 抗凝液, 以低渗溶血法取得白细胞, 取白细胞 100 μ L 加入裂解液 52 μ L, 置 55 °C 水浴 1 h, 转 95 °C 以上保温 10 min, 离心 (15 000 r/min) 30 s, 取上清液为模板。按照 Rigat 等^[6]方法设计 1 对引物, 上游引物 (A) 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', 下游引物 (B) 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA -3', 采用 PCR 方法扩增 ACE 基因的特异性片段。PCR 反应体系为 50 μ L, 含模板 DNA 约 300 ng, 引物 A 和 B 各 10 pmol, 3.0 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 0.5 mmol/L dNTPs 和 1 μ L TaqDNA 聚合酶, 置于 PCR 热循环仪 (480 型, 美国 PE 公司) 上扩增, 94 °C 预变性 2 min, 然后按 94 °C 变性 1 min → 58 °C 退火 1 min → 72 °C 延伸 2 min, 循环 35 周期, 最后 72 °C 延长 5 min。扩增产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶 (内含溴乙锭 0.5 μ g/mL) 电泳, 紫外光下观察, 仅仅出现 190 bp 1 条带者为缺失型纯合子 (DD 型), 仅出现 490 bp 1 条带者为插入型纯合子 (II 型), 同时出现 190 bp 和 490 bp 2 条带者为杂合子 (ID 型); 全自动数码相机摄影。

1.3 统计分析

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数间的两两比较采用方差分析, 3 组不同基因型的计数资料比较用行 \times 列表的 χ^2 检验。应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 检验水准, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 心肌梗死组和对照组 ACE 基因型频率、等位基因频率

电泳后心肌梗死组和对照组 ACE 各基因型见图 1。从表 1 可见,心肌梗死组 DD 基因型频率及 D 等位基因频率均高于对照组 ($P < 0.01$)。

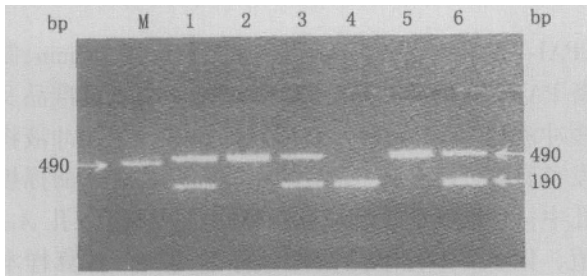


图 1 PCR 扩增后所示 ACE 基因型

Fig.1 PCR amplification of ACE genotype (in 20g/L gelose gel eletrophoresis)

M: marker; Lane 1, 3, 6: ID genotype; Lane 2, 5: II genotype; Lane 4: DD genotype

表 1 心肌梗死组和对照组 ACE 基因型频率、等位基因频率

n	Genotype			Allele frequency	
	DD	ID	II	D	I
Control 93	12.6(11)	49.4(43)	37.9(33)	37.4	62.6
MI 87	32.3 ¹⁾ (30)	44.1(41)	23.6(22)	54.3 ¹⁾	45.7

Compared with control group, $\chi^2 = 10.86, P < 0.01$

2.2 心肌梗死组与对照组及两组不同 ACE 基因型之间 PAI-1 水平

心肌梗死组 PAI-1 活性 (0.85 ± 0.19)AU/mL 明显高于对照组 (0.66 ± 0.20)AU/mL, $t = 6.404$, 差别有统计学意义, $P < 0.01$ 。

从表 2 可知,心肌梗死组 DD 基因型血浆

表 2 心肌梗死组及对照组不同 ACE 基因型 PAI-1 活性
Table 2 Mean plasma PAI-1 levels according to ACE genotype in two groups ($\bar{x} \pm s$)(AU/mL)

	DD	ID	II
Control	0.78 ± 0.20 ¹⁾	0.67 ± 0.19	0.59 ± 0.17
MI	0.96 ± 0.16 ²⁾	0.82 ± 0.18 ³⁾	0.71 ± 0.17

1) Compared with II genotype, $P < 0.05$; 2) compared with ID or II genotype, $P < 0.01$, respectively; 3) compared with II genotype, $P < 0.05$

PAI-1 活性高于 ID 基因型及 II 基因型, ID 型亦高于 II 型,差别均有统计学意义。对照组 DD 基因型血浆 PAI-1 活性高于 II 基因型,差别有统计学意义;而 DD 基因型血浆 PAI-1 活性虽高于 ID 型, ID 型亦高于 II 型,但差别无统计学意义。

3 讨论

肾素 - 血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 在心血管疾病的发生、发展中起重要作用,血管紧张素 I 转换酶 (ACE) 是 RAS 体系中的关键酶, ACE 基因可能是 RAS 中与心血管疾病相关的最主要基因。研究证明^[2,3], ACE 基因 I/D 多态性可能是 MI 发病的独立危险因素。但是, ACE 基因与 MI 之间的具体机制尚未完全阐明。

研究报道^[6], ACE 基因 I/D 多态性与血清 ACE 水平有关。ACE 基因 I/D 多态性影响了血清 ACE 水平, DD 型有较高的血清 ACE 水平。因为 ACE 促进 Ang I 至 Ang II 的转换,因此 ACE 基因 DD 型可能与 Ang I 到 Ang II 的转换增多有关。Ueda 等^[4]已经证明当体内静脉注射 Ang I 时, DD 型个体较 II 型血浆 Ang II 浓度升高,且出现明显增强的升压反应。

目前,在体及离体研究已经证明 RAS 在调节纤溶平衡中起重要作用,用碘标记的 Ang II 与牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 结合,发现可诱导 BAEC 产生剂量依赖性 PAI-1 活性及 PAI-1 mRNA 升高^[5],而应用 ACE 抑制剂治疗可以降低 PAI-1 的活性^[7]。

由于 ACE DD 基因型有较高的血清 ACE 水平,而 ACE 可使 Ang II 生成增多,Ang II 可以诱导 PAI-1 表达,因此 ACE D 等位基因可能与循环中 PAI-1 水平存在一定的关系。ACE D 等位基因可能通过诱发机体产生 PAI-1,促使纤溶活性降低,而促进血栓形成,诱发 MI。Brown 等^[8]在对非 - 美高血压病人中研究发现 ACE D 等位基因与 PAI-1 水平增高有关。Matswbaray 等^[9]报道,在健康日本人中 ACE 基因 I/D 多态性与 PAI-1 活性及 PAI-1 mRNA 有关。

本研究证明,MI 患者 DD 等位基因与 D 等位基因频率均明显高于对照组,与既往国内外报道一致,提示 ACE 基因 I/D 多态性可能为中国人冠心病的独立危险因素。本资料对比分析了 MI 组及对照组 3 种 ACE 基因型之间年龄、性别、浆胆固醇、

甘油三脂、体重指数、血压水平等临床资料均相似而排除传统引起 PAI-1 升高的危险因素后发现, DD 基因型血浆 PAI-1 活性显著高于 ID 型、II 型; 而 ID 型也显著高于 II 型。表明 ACE D 等位基因与血浆 PAI-1 水平增高有关, ACE 基因 DD 型可能引起血浆 PAI-1 水平增高, ACE 基因 I/D 多态性可能通过纤溶受损而影响了 MI 的发病, ACE 基因 I/D 多态性及其对纤溶活性的影响在 MI 的发病中可能具有重要意义。

参考文献:

- [1] Roncaglioni M C, Santoro L, D'Avanzo B, *et al.* For the GISSI-EFRIM Investigators. Role of family history in patients with myocardial infarction. An Italian case-control study[J]. *Circulation*, 1992, 85(6): 2065-72.
- [2] Cambien F, Costerousse O, Tiret L, *et al.* Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1994, 90(2): 669-76.
- [3] Nakai K, Itoh C, Miura Y, *et al.* Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for coronary artery disease in the Japanese [J]. *Circulation*, 1994, 90(5): 2199-202.
- [4] Ueda S, Elliott H L, Morton J J, *et al.* Enhanced pressor

response to angiotensin I in normotensive men with the ACE deletion allele [J]. *Hypertension*, 1995, 25(6): 1266-9.

- [5] Vaughan D E, Lazos S A, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(3): 995-1001.
- [6] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86(4): 1343-6.
- [7] Wright R A, Flapan A D, Alberti K G, *et al.* Effects of captopril therapy on endogenous fibrinolysis in men with recent, uncomplicated myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1994, 24(1): 67-73.
- [8] Brown N J, Gainer J V, Nadeau J H, *et al.* Plasminogen activator inhibitor antigen is increased in hypertensive African Americans with the ACE D allele [J]. *Circulation*, 1999, 92 (Suppl. 1): 446-552.
- [9] Matswbara Y, Hayakawa T, Tsuda T, *et al.* Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with plasma antigen levels of plasminogen activator inhibitor-1 in healthy Japanese population [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002, 11(2): 115-20.

(编辑 黄小延)

(上接第 556 页 from page 556)

需进一步研究。

参考文献:

- Puttemans T, Nemery C. Diabetes: the use of color Doppler sonography for the assessment of vascular complications [J]. *Eur J Ultrasound*, 1998, 7 (1): 15-22.
- Zhu B H, Guan Y Y, He H, *et al.* Erigeron breviscapus prevents defective endothelium dependent relaxation in diabetic rat aorta[J]. *Life Sci*, 1999, 65(15): 1553-9.
- Stitt A W. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 75(1): 95-108.
- Warpeha K M, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy[J]. *Eye*, 2003, 17(3): 305-11.
- Deng D, Evans T, Downey D, *et al.* Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins [J]. *Diabetologia*, 1999, 42 (10): 1228-34.

Ishii H, Jirousek M R, Koya D, *et al.* Melioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC B inhibitor[J]. *Science*, 1996, 272 : 728-31.

- Ishii H, Koya D, King G L. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus [J]. *J Mol Med*, 1998, 76(1): 21-31.
- 王梅, 蓝育青, 刘嫣芬, 等. 糖尿病大鼠视网膜血流变化的彩色多普勒分析[J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2003, 24 (4): 371-4.
- Evans T, Xi D D, Mukherjee K, *et al.* Endothelins, their receptors, and retinal vascular dysfunction in galactose-fed rats [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2000, 48(2): 75-85.
- Goldstein I M, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease[J]. *Vision Res*, 1996, 36(18): 2979-94.

(编辑 黄小延)