

血管紧张素转换酶基因插入/缺失多态性与冠心病关系的研究

谢基明 冯笑梅 秦文斌 王玉珍

作者单位:010017 呼和浩特市,内蒙古自治区医院检验科

【摘要】 目的 研究内蒙古包头地区汉族人群血管紧张素转换酶 (angiotension converting enzyme, ACE)基因插入/缺失(I/D)多态性与冠心病(coronary heart disease, CHD)的关系。方法 应用 PCR 检测 94 例 CHD 患者(CHD 组)及 67 例健康体检者(对照组)的 ACE 基因型。结果 ACE 基因的 I/D 多态性经 PCR 扩增后产生 490 bp 和 190 bp 两种带型,DD 型仅有 190 bp 一种带型,II 型仅有 490 bp 一种带型,DI 型含有 490 bp 和 190 bp 两种带型。插入特异 PCR 进一步验证显示:II 型和 DI 型仅含有 335 bp 片段。CHD 组和对照组的 ACE 基因型 DD、DI、II 的基因型频率分别是:11.7%、50.0%、38.3%和 10.4%、50.7%、38.8%,两组 ACE 基因型分布差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);且 CHD 合并高血压组及未合并高血压组 ACE 基因型分布差异亦均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论 ACE 基因 I/D 多态性与内蒙古包头地区汉族人群 CHD 的发生无关,ACE 的 D 等位基因可能不是 CHD 的一个危险因素。

【关键词】 基因缺失;冠状动脉疾病;血管紧张素转换酶;聚合酶链反应

Relationship between the I/D polymorphism of angiotension converting enzyme gene and coronary heart disease in Hans of Baotou area in Inner Mongolia

XIE Ji-ming, FENG Xiao-mei, QIN Wen-bin, et al. Department of Laboratory, Inner Mongolia Autonomous Region Hospital, Hohhot 010017, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation between the insertion/deletion (I/D) polymorphism of the angiotension converting enzyme(ACE) and coronary heart disease (CHD) in Hans of Baotou area in Inner Mongolia. **Methods** The ACE genotypes of 94 patients with CHD and 67 cases in the control group were detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results** The I/D polymorphism of ACE amplified by PCR produced two types of gene fragments 490 bp and 190 bp. The 190 bp fragment only appeared in DD genotype, the 490 bp fragment only appeared in II genotype, and both 490 bp and 190 bp fragments appeared in the DI genotype. The insertion of specific PCR further proved that types of II and DI just contained 335 bp fragment. The frequencies of DD, DI and II genotypes were respectively 11.7%, 50.0% and 38.3% in CHD group, and 10.4%, 50.7% and 38.8% in the control group. Distribution of ACE genotypes was no statistically significant difference between the CHD group and the control group, nor did the CHD patients with hypertension and without hypertension (all $P > 0.05$). **Conclusion** There is no correlation between the I/D polymorphism of the ACE and the CHD in Hans of Baotou area in Inner Mongolia. And the D allele of ACE may not be a risk factor for CHD.

【Key words】 Gene deletion; Coronary disease; Angiotensin converting enzyme; PCR

冠心病(coronary heart disease, CHD)是危害人类健康的严重的心血管病变,其发病涉及环境和遗传等多种因素。尽管近年来的研究发现许多 CHD 的危险因素,然而近 50% 的患者不能用已知的危险因素进行解释。因此,对于 CHD 的病因学探索需要进一步探讨其发病的遗传基础及易感基因。血管紧张素转换酶(angiotension converting enzyme, ACE)基因位于染色体 17q²³,第 16 位内含子上有一段长 287

bp 的 Alu 插入(insertion, I)/缺失(deletion, D)多态性,存在三种基因型,即纯合子 DD 型、II 型和杂合子 DI 型。Rigat 等^[1]观察到 ACE 基因多态性与血清 ACE 水平高度相关。此后,ACE I/D 多态性与高血压、CHD、糖尿病及并发症的关联研究成为热点。然而,这种关联性研究的结果相互矛盾^[2]。本文对内蒙古包头地区汉族人群 CHD 患者与 ACE 基因多态性之间的关系进行了研究。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2006 年 3 月至 2008 年 3 月来自包头地区汉族人群 CHD 患者 94 例为 CHD 组(包括陈旧性心肌梗死者 31 例,急性心肌梗死者 36 例,根据病史、症状、静息心电图、运动心电图及冠状动脉造影诊断的 CHD 心绞痛者 27 例),其中男 60 例,女 34 例;年龄 62.9 ± 10.8 岁。合并高血压者 46 例,未合并高血压者 48 例。对照组均为汉族门诊健康体检者 67 例,其中男 37 例,女 30 例;年龄 58.2 ± 11.6 岁,已排除心、脑血管及内分泌疾病。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 (1)取冷藏保存的抗凝血,充分混匀使血细胞均匀分布,将混匀的全血 200 μ l 置于 1.5 ml 离心管,向离心管中加入裂解液 A 200 μ l,颠倒混匀。(2)离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 30 s,吸弃上清液,保留管底粉红色沉淀备用。向留有粉红色沉淀的离心管中加入裂解液 A 400 μ l,振荡悬浮沉淀。(3)离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 30 s,吸弃上清液,保留管底白色沉淀(白细胞)备用。向留有白色沉淀的离心管中加入裂解液 B 50 μ l,振荡器振荡使沉淀均匀分布于裂解液 B 中。(4)沸水浴中煮沸 10 min,离心半径 8 cm,10 000 r/min 离心 3 min,上清液中即含有 DNA。

1.2.2 ACE 基因型分析

1.2.2.1 普通 PCR 采用 Rigat[®]设计的引物,上游引物:5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3',下游引物:5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3',反应体积为 10 μ l,于 PE-480 型 PCR 扩增仪上进行扩增反应。94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,35 个循环,每个循环 93 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,终末延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.2.2 插入特异 PCR^[3] 上游引物:5'-TGGGAC-CACAGCGCCCGCCACTAC-3',下游引物:5'-TCGCCAGCCCTCCCATAA-3',PCR 的反应体积为 10 μ l,于 PE-480 型 PCR 扩增仪上进行扩增反应。94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,35 个循环,每个循环 93 $^{\circ}$ C 变性 60 s,78 $^{\circ}$ C 退火 60 s 及 78 $^{\circ}$ C 延伸 60 s。扩增结束后,取上述反应产物 10 μ l,加 2 μ l 载样缓冲液,2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后经透射式紫外灯观察。

1.3 统计学处理 计算各组 ACE 基因型及等位基因频率,确认是否符合 Hardy-Weiberg 平衡,采用 χ^2 检验比较组间频率。

2 结果

2.1 ACE 基因 I/D 多态性的电泳结果 ACE 基因

的 I/D 多态性经 PCR 扩增后产生两种长度的片段,即 490 bp 的插入片段和 190 bp 的缺失片段(图 1)。DD 基因型仅有 190 bp 一种带型,II 型仅有 490 bp 一种带型,DI 型含有 490 bp 和 190 bp 两种带型。对于插入特异 PCR,II 型和 DI 型样本可以扩增出一条 335 bp 的区带(图 2)。

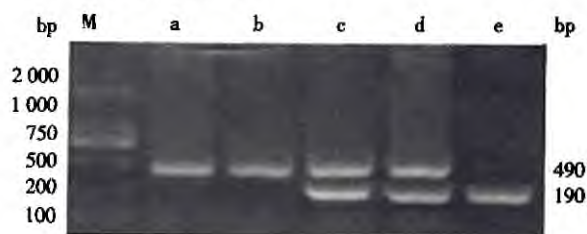


图 1 ACE 基因型 PCR 电泳结果

注: M: Marker 为 DL 2 000, a, b 为 II 型; c, d 为 DI 型; e 为 DD 型

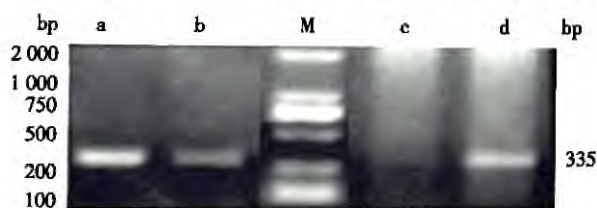


图 2 ACE 基因多态性插入特异 PCR 电泳结果

注: M: marker 为 DL 2 000, a, b 为阳性标本: 其中 a 为 II 型, b 为 DI 型, c 为阴性对照(普通 PCR 确认的 DD 型), d 为阳性对照(插入特异性基因片段)

2.2 Hardy-Weiberg 平衡检验 对 CHD 组和对照组的基因型频率及等位基因频率进行适合度检验,确认符合 Hardy-Weiberg 平衡。CHD 组经检验后 $\chi^2 = 0.178, P > 0.05$, 对照组 $\chi^2 = 0.536, P > 0.05$ 说明两组具有良好的群体代表性。

2.3 ACE 基因多态性在 CHD 组和对照组的分布 CHD 组和对照组中 DD、DI、II 三种基因型频率分别为 11.7%、50.0%、38.3% 和 10.4%、50.7%、38.8%。两组的 ACE 基因型频率及等位基因频率分布差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$, 表 1)。

2.4 ACE 基因多态性在 CHD 合并高血压组和未合并高血压组的分布 CHD 合并高血压组和未合并高血压组中 DD、DI、II 三种基因型频率分别为 15.2%、50.0%、34.8% 和 8.3%、50.7%、41.7%。两组的 ACE 基因型频率及等位基因频率分布差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$, 表 2)。

3 讨论

ACE 基因为单拷贝基因, 含有 26 个外显子和 25 个内含子, 其中第 16 个内含子中存在一个 287 bp 的 Alu 插入片段 I 和缺失片段 D, 该基因多态性

表 1 CHD 组与对照组 ACE 基因型频率及等位基因频率的比较

组别	例数	基因型频率[n(%)]			等位基因频率(%)	
		DD	DI	II	D	I
CHD 组	94	11(11.7)	47(50.0)	36(38.3)	36.7	63.3
对照组	67	7(10.4)	34(50.7)	26(38.8)	35.8	64.2

表 2 CHD 合并高血压组与未合并高血压组 ACE 基因型频率及等位基因频率的比较

组别	例数	基因型频率[n(%)]			等位基因频率(%)	
		DD	DI	II	D	I
合并高血压组	46	7(15.2)	23(50.0)	16(34.8)	40.2	59.8
未合并高血压组	48	4(8.3)	24(50.7)	20(41.7)	33.3	66.7

可通过 PCR 检测。但是据文献^[4]报道, Rigat 创建的检测 ACE 基因 I/D 多态性的方法有 10% 的错配率。因此有必要对 PCR 检测获得的基因型进行进一步确认。在我们的实验中, 首先根据 ACE 基因是否包含 Alu 插入片段与否得到两种 PCR 产物片段, 490 bp 和 190 bp。其中 II 型仅含有 490 bp 一种片段, DD 型仅含有 190 bp 片段, 而 DI 型含有 490 bp 和 190 bp 两种片段。在此实验基础上, 根据 Alu 插入片段序列设计特异引物, 该引物仅能扩增出一条 335 bp 的片段, 据此方法, 我们实验中的误判率约为 3%。采用插入特异 PCR 有效的保证了后续试验的准确性。

关于 ACE 基因多态性与 CHD 关系的研究报道较多, 然而关于两者的关系存在着争论。2004 年 McCarthy 等^[5]报道, 在一项大规模的关于基因多态性与早期 CHD 的研究中, 控制了年龄、性别、体重、糖尿病以及高血压等因素后, 进行多元回归分析后得出 ACE 基因的多态性与 CHD 的发生显著相关。而荷兰的一项对 6 714 人的前瞻性研究表明, ACE 基因的基因型与心肌梗死的发病无关, 而考虑吸烟因素, 携带 DD 基因型比 II 基因型有更大的患 CHD 或心血管疾病的危险^[6]。以上研究结果的不同, 可能由多种原因造成。Harrap 等^[7]就曾指出, ACE 的 DD 基因型在亚洲人群的分布 (14.7%) 远低于其他人群 (32.0%), 而排除种族干扰后, ACE 的基因型与脑血管疾病、心血管疾病患病危险因子 (包括血压) 之间没有关联。在我们的研究中, DD 基因型在 CHD 组和对照组的分布都与 Harrap 等^[7]的报道一致, 我们的分析显示: 内蒙古包头地区汉族 CHD 组和对照组之间的 ACE 基因型差异无统计学意义。此外, 在 CHD 的患者中我们还对合并高血压组及未合并高

血压组进行 ACE 基因型分析, 发现两组差异无统计学意义, 该结果提示 ACE 基因的多态性与高血压之间的关联可能不大, 有待证实。我们的实验结果提示, ACE 的 D 等位基因可能不是 CHD 发病的一个危险因素, 今后的研究应着重于多个基因和多种环境因素的相互作用的角度进行研究。

4 参考文献

- 1 Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene DCEP1. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 1433.
- 2 Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, et al. ACE polymorphisms. *Circ Res*, 2006, 98: 1123-1133.
- 3 Friedl W, Krempler F, Paulweber B, et al. A deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene is not associated with coronary heart disease in an Austrian population. *Atherosclerosis*, 1995, 112: 137-143.
- 4 王谷亮, 韩战营, 朱鼎良, 等. 血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性检测方法的研究. *中华心血管病杂志*, 2001, 29: 239-242.
- 5 McCarthy JJ, Parker A, Salem R, et al. Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes. *J Med Genet*, 2004, 41: 334-341.
- 6 Sayed-Tabatabaei FA, Schut AF, Arias Vasquez A, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and cardiovascular morbidity and mortality: the Rotterdam Study. *J of Med Genet*, 2005, 42: 26-30.
- 7 Harrap SB, Tzourio C, Cambien F, et al. The ACE gene I/D polymorphism is not associated with the blood pressure and cardiovascular benefits of ACE inhibition. *Hypertension*, 2003, 42: 297-303.

(收稿日期: 2009-09-15)

(本文编辑: 张凯)