

血管紧张素转换酶基因多态性与脑梗死危险因素的关系

张旭 夏君慧 金得辛 林捷 叶好好

【摘要】 目的 探讨血管紧张素转换酶(ACE)基因多态性与中国汉族人脑梗死危险因素关系。方法 应用聚合酶链反应(PCR)测定 165 例脑梗死、101 例高血压患者和 106 例正常对照者 ACE 基因插入/缺失(I/D)多态性,用比色法测定血清 ACE 水平,并调查脑梗死经典的危险因素。结果 脑梗死组 DD 型基因频率为 0.43,高于高血压组的 0.31($\chi^2 = 4.03, P < 0.05$)和正常对照组的 0.17($\chi^2 = 19.86, P < 0.01$),且 D 等位基因亦明显高于高血压组和正常对照组($\chi^2 = 7.14, 32.85, P < 0.01$)。基底节、丘脑梗死者其 DD 型基因频率和 D 等位基因亦高于对照组($\chi^2 = 18.30, 12.41, 29.00, 12.10, P < 0.01$)。脑梗死组血清 ACE 水平明显高于正常对照组($F = 2240.06, P < 0.01$),其中 DD 基因型血清 ACE 水平又高于同组 DI 基因和 II 基因($F = 8.83, P < 0.01$)。结论 ACE 基因缺失多态性可能是中国人汉族脑梗死独立危险因素,循环 ACE 活性与基因缺失多态性相关。

【关键词】 脑梗塞;血管紧张素基因转换酶;基因;危险因素

The relationship between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and risk factors for cerebral infarct ZHANG Xu, XIA Junhui, JIN Dexin, et al. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism and risk factors of cerebral infarct (CI) in Chinese Han nationality. **Methods** One hundred and sixty-five cases with cerebral infarct, 101 cases of essential hypertension patients with 106 normal persons in Chinese Han serving as controls were detected using polymerase chain reaction (PCR) and genetic methods. ACE contents in serum were measured by colorimetric method. Risk factors of cerebral infarct were assessed by standard questionnaire, physical examination and blood tests. **Results** ACE DD genotype appeared more common in patients of cerebral infarct when comparing with essential hypertension groups (0.43 versus 0.31 $\chi^2 = 4.03, P < 0.05$) and normal controls (0.43 versus 0.17 $\chi^2 = 19.86, P < 0.01$). D:I allele frequency appeared to be 0.66:0.34 in cerebral infarct patients and 0.41:0.59 in controls ($\chi^2 = 32.85, P < 0.01$). In basal ganglia infarct and thalamus infarct groups, ACE DD genotype and allele ratio distribution were remarkably different to that in normal subjects ($\chi^2 = 18.30, 12.41, P < 0.01$). The mean levels of serum in cerebral and hypertension were higher than in normal controls ($F = 2240.06, P < 0.01$), and serum ACE activity in ACE DD genotype was significantly higher than that in ACE DI and II genotype in cerebral group ($F = 8.83, P < 0.01$). **Conclusions** The ACE gene deletion polymorphism might serve as an independent risk factor for cerebral infarct in Chinese Han nationality while circulation ACE activity might be related to gene deletion polymorphism.

【Key words】 Cerebral infarct; Angiotensin-converting enzyme; Genetics; Risk factor

随着脑血管病分子遗传学研究的深入,寻找其相关致病基因,成为近年研究重点。血管紧张素转换酶(ACE)基因异质性与脑梗死的关系渐受重视,被认为是重要的候选基因。我们采用聚合酶链反应(PCR)技术,对 165 例脑梗死患者进行 ACE 基因插入/缺失(insertion/deletion, I/D)定性检测,同时调

查脑梗死已知主要危险因素,旨在探讨 ACE 基因 I/D 多态性与脑梗死危险因素的关系。

对象和方法

一、研究对象

1. 脑梗死组:系住院患者共 165 例(男 94 例,女 71 例),年龄 39~72 岁,平均(55.3±10.1)岁。符合全国第四届脑血管病会议标准^[1],并经临床、CT

或 MRI 扫描确诊,其中皮层性脑梗死 20 例,基底节区梗死 86 例,丘脑梗死 51 例,脑干梗死 8 例。入院时收缩压(SBP)为(21.91 ± 2.64) kPa(1 mm Hg = 0.133 kPa),舒张压(DBP)为(12.93 ± 1.29) kPa。

2. 高血压组:共 101 例(男 59 例,女 42 例),年龄 35~71 岁,平均(53.7 ± 9.9)岁。符合 WHO 制定的高血压病诊断标准^[2];SBP ≥ 18.62 kPa 和(或)DBP ≥ 11.97 kPa,并经头颅 CT 或 MRI 扫描排除无症状性脑梗死。入院时 SBP 为(23.66 ± 1.79) kPa, DBP 为(13.24 ± 1.25) kPa。其中 II 级 43 例、III 级 58 例。

3. 正常对照组:系体检正常者和自愿献血者共 106 人(男 64 人,女 42 人),年龄 37~69 岁,平均(53.9 ± 10.0)岁。所有对照者均无糖尿病、高血压、脑卒中史及家族史。排除肝、肾疾病、糖尿病及内分泌疾病等病史。

以上 3 组均为汉族,年龄及性别构成上差异无显著性(年龄: $F = 1.01, P > 0.05$,性别: $\chi^2 = 0.31, P > 0.05$),且无血缘关系,无异族通婚家族史。脑梗死和高血压病患者详细调查吸烟、饮酒及家族史,测量身高、体重,计算体重指数(BMI) = 体重/身高²(kg/m²),并检测肝、肾功能、血脂系列和糖耐量试验,有继发性高血压、糖尿病史(糖耐量异常)或糖尿病家族史、肝、肾疾病者予以剔除。

二、实验方法

1. ACE 基因多态性检测:① PCR 引物设计:根据国际互联网检索 ENTREZ 及 EMBL 数据库设计。正链引物:5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3';负链引物:5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA-3';② 模板 DNA 提取:所有受检者均为本地区汉族人,入院后次日晨取空腹外周血 5 ml,以 1:10(v/v) 2% 乙二胺四乙酸钠盐生理盐水溶液为抗凝剂,用常规酚/氯仿法提取 DNA;③ ACE 基因扩增:按 Tirer 等^[3]方法,总反应体积为 50 μ l, 4 μ l dNTPs, 2 μ l 引物(100 μ l), 5 μ l 模板 DNA, 2 μ l Taq DNA 聚合酶(1 U/2 μ l),用液体石蜡覆盖,在 DNA 扩增仪上进行反应,循环条件为 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环后补为 72℃ 10 min,取 10 μ l PCR 产物于 2% 琼脂凝胶上电泳 4 V/cm, 1 h,溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果。

2. 血清 ACE 活性测定:用比色法,药盒购自海军总医院,操作按说明书。脑梗死和高血压患者停用 ACE 抑制剂及硝酸酯类药物 1 周后,清晨空腹采

血。

3. 血脂测定:取空腹血 3 ml,凝结后取血清测定血脂浓度。总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)采用酶法,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)用磷酸镁沉淀法,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)据 Freidewald 公式计算。载脂蛋白 A(Lp(a))、载脂蛋白 B(Lp(a))用免疫比浊法,脂蛋白(a)[Lp(a)]用双抗体夹心酶联免疫吸附法。本院化验室系市质控中心,通过卫生部鉴定,按血脂异常防治建议^[4],定 TC ≥ 5.72 mmol/L, TG ≥ 1.71 mmol/L, LDL-C ≥ 3.64 mmol/L 为升高, HDL-C ≤ 0.91 mmol/L 为降低。

三、统计学处理

用 SAS 6.04 软件包进行分析,基因频率采用基因计数法计算,研究对象与 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律的符合程度用 χ^2 检验,临床表型计数资料间比较用 χ^2 检验。不同基因型间危险因素比较采用方差分析,组间比较用 Student-Newman-Keuls 检验。以非条件 logistic 回归分析独立危险因素。

结 果

1. 正常人、高血压与脑梗死患者 ACE 基因型和等位基因频率:PCR 扩增出两种类型 DNA 片段:插入型(I 型)片段,长 490 bp,这类人 DNA 模板中 ACE 基因第 16 内含子中存在 287 bp 长的 Alu 重复序列,缺失型(D 型)片段,长 190 bp,是由于缺乏 Alu 重复序列而扩增出的。因此,在群体中可有 DD、DI 及 II 3 种基因型,本组 3 种基因型频率符合 Hardy-Weinberg 的遗传平衡规律,其分布及 D、I 等位基因频率见表 1。表 1 显示,脑梗死组 D 等位基因明显高于高血压组($\chi^2 = 7.14, P < 0.01$),而后者又高于正常对照组($\chi^2 = 7.47, P < 0.01$)。在不同部位脑梗死亚组中,基底节、丘脑梗死的 DD 基因型频率分别为 0.45、0.43,高于正常对照组的 0.17($\chi^2 = 18.30, 12.41, P < 0.01$),且其 D 等位基因频率分别为 0.69、0.67 亦高于正常对照组,差异有显著性($\chi^2 = 29.00, 12.10, P < 0.01$)。而皮层、脑干梗死组的 DD 型基因频率及等位基因频率与正常对照组差异无显著性($\chi^2 = 3.43, 0.33, 3.71, 0.49, P > 0.05$)。

2. ACE 基因多态性与血清 ACE 水平关系:脑梗死和高血压组血清 ACE 水平分别为(499.98 ± 32.84) U、(495.66 ± 29.10) U,较正常对照组的(266.75 ± 28.62) U 高,差异有显著性($F = 2\ 240.06,$

表1 脑梗死、高血压与对照组 ACE 基因型、等位基因频率比较

分 组	例数	基因型			DD 型与对照组比较			D:I 等位基因与对照组比较	
		DD	DI	II	OR 值	95% CI	P 值	比率	P 值
对 照 组	106	18	51	37				0.41:0.59	
高 血 压 组	101	31	48	22	2.17	1.07~4.42	0.02	0.54:0.46	<0.01
脑 梗 死 组	165	71	76	18	3.69	1.97~6.99	<0.01	0.66:0.34	<0.01

$P < 0.01$)。此外,脑梗死组和高血压组 DD、DI、II 3 种基因型血清 ACE 水平亦均明显高于正常对照组,差异有显著性 ($F = 425.86, 865.72, 617.53, P < 0.01$)。脑梗死组中 DD 基因型的血清 ACE 水平为 $(511.79 \pm 35.57) U$ 又高于同组 DI 基因型的 $(490.99 \pm 26.96) U$ 和 II 基因型的 $(491.07 \pm 29.12) U$, 差异有显著性 ($F = 8.83, P < 0.01$), 而 DI、II 基因型之间血清 ACE 水平间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。虽然 DD 基因型脑梗死患者与高血压患者间血清 ACE 水平差异无显著性 ($P > 0.05$), 但进一步分析可见伴有高血压的 DD 型脑梗死患者其血清 ACE 水平则明显高于 DD 型高血压患者 ($t = 3.31, P < 0.01$)。同高血压组或正常对照组中,不同 ACE 基因型的血清 ACE 水平,差异无显著性 ($F = 1.82, 0.13, P > 0.05$)。

3. ACE 基因多态性与脑梗死危险因素关系: 单因素方差分析显示,脑梗死组中已知危险因素在不同 ACE 基因型间差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。

4. 多因素非条件 logistic 回归分析: 对 165 例病例和 106 人对照进行非条件 logistic 回归,分析不同 ACE 基因型与脑梗死关系,结果单因素分析显示 DD 基因型的 OR 值为 3.69 (95% CI : 1.97~6.99) ($\chi^2 = 18.62, P < 0.01$),多因素 logistic 回归分析显示,DD 基因型在年龄、SBP、DBP 之外为独立的危险

因素(表 3)。此外,DD 基因型与 DBP 之间存在交互作用,多因素 logistic 回归分析 OR 值为 10.92 (95% CI : 2.82~42.14) ($\chi^2 = 12.03, P < 0.00$),当 DD 基因型和舒张压增高两种危险因素共同存在时,其发生脑梗死的危险性要增加至 10.92 倍。

讨 论

人的 ACE 基因组 DNA 全长 21 kb,包含 26 个外显子,定位在染色体 17q23 位点^[5],ACE 基因多态性是脑梗死独立危险因素抑或通过其他脑梗死危险因素增加脑梗死的危险性?这是 ACE 基因多态性与脑梗死关系的关键所在。

ACE 基因 I/D 多态性与脑梗死关系国外已有研究,但所得结果不尽一致。Sharma 等^[6]在对 100 例急性期脑梗死患者及相应的 73 例对照人群 ACE 基因多态性研究中发现,DD 基因型虽然脑梗死组高于对照组,但差异无统计学意义,认为 ACE 基因多态性与脑梗死发生无关。而 Markus 等^[7]研究则发现 ACE 基因多态性不但与脑血管疾病显著相关,而且 DD 基因型是腔隙性脑梗死的独立危险因素。本研究中脑梗死、高血压患者 DD 基因型及 D 等位基因发生频率均显著高于正常对照组。此外,基底节梗死、丘脑梗死者,其 DD 基因型频率和 D 等位基因明显高于正常对照组。提示 ACE 基因缺失多态

表2 脑梗死组 ACE 基因型与脑梗死患者危险因素比较

危险因素	基 因 型			F 值	P 值
	DI (n = 71)	DI (n = 76)	II (n = 18)		
SBP (kPa)	21.47 ± 2.33	22.33 ± 2.74	21.83 ± 3.17	2.02	0.14
DBP (kPa)	12.84 ± 1.23	12.89 ± 1.38	13.40 ± 1.08	1.41	0.24
TC (mmol/L)	5.17 ± 1.02	5.16 ± 1.00	4.72 ± 0.94	1.61	0.20
TC (mmol/L)	1.63 ± 0.80	1.71 ± 0.74	1.63 ± 0.86	0.20	0.82
LDL-C (mmol/L)	2.61 ± 0.67	2.58 ± 0.54	2.76 ± 0.64	0.60	0.55
HDL-C (mmol/L)	1.09 ± 0.46	1.11 ± 0.43	1.15 ± 0.38	0.13	8.78
LDL-C/HDL-C	2.98 ± 1.68	2.85 ± 1.73	2.63 ± 1.01	0.34	0.71
apo A (g/L)	1.10 ± 0.22	1.07 ± 0.22	1.14 ± 0.20	0.86	0.42
apo B (g/L)	0.93 ± 0.36	0.93 ± 0.35	1.10 ± 0.36	1.84	0.16
apo A1/apo B	1.42 ± 0.77	1.39 ± 0.78	1.15 ± 0.42	0.96	0.38
Lp(a) (g/L)	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.20	0.82
BMI (kg/m ²)	25.66 ± 2.63	25.46 ± 2.24	24.94 ± 2.71	0.50	0.61

表3 脑梗死与 ACE 基因型的多因素 logistic 回归分析

危险因素	OR 值	95% CI	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	1.29	1.01~1.64	4.21	<0.01
SBP(kPa)	13.91	6.38~30.40	13.08	<0.01
DBP(kPa)	6.01	2.94~12.24	5.78	0.04
DD 基因型	5.50	2.16~14.01	6.21	<0.01

性可能与中国人脑梗死、高血压发病有一定相关性, DD 基因型不仅增加脑梗死、高血压发病风险, 而且还与脑梗死部位有关。

循环 ACE 活性在 ACE 基因缺失情况下较高, 这已被近年来的诸多研究所证实^[8]。Rigat 等^[9]研究表明, DD 型人群平均血清 ACE 水平最高, DI 型次之, II 型最低, 并推测 D 型等位基因对 ACE 基因的表达起激活作用, 而 I 型等位基因起抑制作用。我们的结果与之相似, 本组 DD 基因型脑梗死患者血清 ACE 水平明显高于 DI 基因型和 II 基因型, 即缺失多态性与血清中 ACE 水平相关, 血清 ACE 水平变化可能是由基因水平的遗传特性所控制。

在与脑梗死已知的有关危险因素分析中, 未发现 ACE 基因 DD、DI、II 3 型间存在差异。多因素 logistic 回归显示, DD 基因型是年龄、SBP、DBP 之外为脑梗死的一个独立危险因素。此外, 还发现其与 SBP 存在交互作用, 伴 DBP 增高的 DD 基因型携带者, 其发生脑梗死的危险性将比原来明显增加, 这对脑梗死防治有重要指导意义。脑梗死的遗传特性确实病因中起一定作用, 有所变化的环境因素, 首先在具有遗传易感性的人群中发病。将有关饮食和生活习惯的劝导给予早期鉴别出携带脑梗死易感基因的人, 其效果比将之给予广大公众要好得多, 因为

这些人更具患脑梗死的危险。

参 考 文 献

- 1 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点. 中华神经科杂志, 1996, 29: 379-381.
- 2 Guidelines subcommittee. 1999 world health organization-international society of hypertension guidelines for the management of hypertension. J Hypertens, 1999, 17: 151-183.
- 3 Tired L, Rigat B, Visvikis S, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet, 1992, 51: 197-205.
- 4 诸骏仁, 陶寿淇. 血脂异常防治建议. 中华心血管病杂志, 1997, 25: 169-172.
- 5 郑豪义, 戴玉华, 邱长春. 血管紧张素转换酶基因的插入/缺失多态性与其血清水平及心肌梗塞的关系. 中华心血管病杂志, 1997, 25: 34-36.
- 6 Sharma P, Carter ND, Barley J, et al. Molecular approach to assessing the genetic risk of cerebral infarction: deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme. J Hum Hypertens, 1994, 8: 645-648.
- 7 Markus H, Barley J, Lunt R, et al. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism: a new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. Stroke, 1995, 26: 1329-1333.
- 8 Arbustini E, Grasso M, Fasani R, et al. Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with myocardial infarction. Br Heart J, 1995, 74: 584-591.
- 9 Rigat B, Hubert C, Alhenc GF, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest, 1990, 86: 1343-1346.

(收稿日期 2001-04-10)

(本文编辑: 段江娟)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

医学文稿中缩略语使用须知

文题一般不使用缩略语, 正文内也尽量不用。必须使用缩略语时, 于首次出现处先叙述中文全称, 然后于括号内注明英文全称及缩略语。缩略语不宜移行。

关于出示获基金资助证明的说明

凡在我刊刊登的文稿所涉及的科研项目、科研课题, 获得国家或部、省级以上各种基金资助, 请将资助证明(复印件)寄给本刊编辑部。谢谢协助。