

• 论 著 •

天津滨海地区脑梗死与血管紧张素转化酶多态性相关性研究^{*}刘 津¹, 刘运德², 李 雪², 王彤宇¹, 李海平¹, 鲍会静², 李志军¹

(1. 海洋石油总医院检验科, 天津 300452; 2. 天津医科大学医学检验学院, 天津 200302)

摘要:目的 探讨天津滨海地区脑梗死发生与血管紧张素转化酶(ACE)多态性位点 rs4646994 和 rs35397082 基因多态性的相关性。**方法** 采用基因测序及 DNA 电泳技术分别检测 53 例脑梗死患者和 53 例健康志愿者的 ACE 的单核苷酸多态性(SNP)。同时收集各组血清样本, 行血清 ACE 检测。**结果** 健康对照组和脑梗死患者组, rs35397082 均为插入缺失型。对于 rs4646994, 健康对照组中 rs4646994 的插入型 SNP 有 45 例(84.91%), 缺失型为 8 例(15.09%); 脑梗死患者组中插入型 47 例(88.68%), 缺失型为 6 例(11.32%), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。健康对照组血清 ACE 水平与脑梗死患者组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 脑梗死患者组低于健康对照组。**结论** ACE 基因 rs4646994 和 rs35397082 多态性与天津滨海地区健康人及急性脑梗死无显著关联, 二者血清水平差异不是由这两个位点差异所致, ACE 基因的这两种 SNP 不是天津滨海地区急性脑梗死发生的独立危险因子。

关键词:脑梗死; 血管紧张素转化酶; 基因; 多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2142-03

The association between cerebral infarction and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in Binhai area Tianjin^{*}

Liu Jin¹, Liu Yunde², Li Xue², Wang Tongyu¹, Li Haiping¹, Bao Huijing², Li Zhijun¹

(1. Department of Clinical Laboratory, China National Offshore Oil Corporation General Hospital, Tianjin 300452, China; 2. Department of Laboratory Medical, Tianjin Medical University, Tianjin 200302, China)

Abstract: Objective To study the association between the cerebral infarction and the angiotensin converting enzyme(ACE) gene rs4646994 and rs35397082 polymorphisms in Binhai area, Tianjin. **Methods** Gene sequencing and DNA electrophoresis were used for the detection of the ACE gene single nucleotide polymorphisms(SNPs)(rs4646994 and rs35397082). 53 samples from patients with acute cerebral infarction and 53 samples from healthy volunteers were used in our study. Serum sample were collected from each group and tested by ACE ELISA. **Results** There were only deletion type of rs35397082 SNP in both of the control and cerebral infarction group. In the control group, the number of insertion type of rs4646994 was 45(84.91%), deletion type was 8(15.09%) and in the patients group, the number of insertion was 47(88.68%) and the deletion was 6(11.32%). There was no significant difference between the patients group and the healthy donors($P > 0.05$). The concentration of ACE in control group was higher than the patients with acute cerebral infarction($P < 0.05$). **Conclusion** There is no significant association between the ACE gene polymorphisms(rs35397082 and rs4646994) and cerebral infarction in Binhai area, Tianjin. The different concentration of ACE is not caused by these two SNPs. In this study, these two SNPs are not the risk factors of the cerebral infarction in Tianjin based on our study.

Key words: cerebral infarction; angiotensin converting enzyme; gene; polymorphism

近年来, 肾素-血管紧张素系统(RAS)的生理功能与心脑血管的关系始终是医学研究的热点之一。血管紧张素转化酶(ACE)是该系统的关键酶之一, 广泛表达于附睾、十二指、肠、肺、肝、胰、脾、甲状腺、肾脏和大动脉等, 主要存在于肺毛细血管内皮细胞及肺囊泡中, 可将血管紧张素 I 裂解为 8 肽的血管紧张素 II, 并可以降解血管缓激肽^[1-2]。作为肾素-血管紧张素系统关键酶, ACE 对血管重塑、动脉粥样硬化、缺血性中风等心脑血管疾病具有重要作用^[3-6]。脑血管疾病家族聚集性的特点以及分子生物学技术发展, 使多基因遗传方式在脑梗死发生中作用越来越受重视。国内外学者对 ACE 基因多态性与脑梗死关系进行大量深入研究, 但结果差异较大^[7-13]。为进一步探讨 ACE 基因在脑梗死发生、发展中的遗传机制, 对脑梗死与 ACE 基因 rs4646994 和 rs35397082 单核苷酸多态性进行研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 10 月至 2014 年 5 月海洋石油总医院神经内科住院的脑梗死患者, 诊断符合第四届全国脑血管病会议修订的标准, 并经头颅 CT 和 MRI 扫描证实, 共计 53 例(脑梗死患者组), 其中男 36 例, 女 17 例, 平均(67.0 ± 10.0)岁。健康对照组来源于同期健康体检者, 共 53 例, 其中男 36 例, 女 17 例, 平均(60.7 ± 10.7)岁。本研究所涉及的所有实验均得到医院伦理委员会的许可, 在患者同意下采集血液样本。实验中的健康对照组以及脑梗死患者组均为天津本地汉族人, 并排除有缺血性心脑血管病史, 高血压, 代谢性疾病, 肝肾功能不全疾病。

1.2 ACE 基因单核苷酸多态性检测

1.2.1 引物设计合成 根据文献[14]的引物序列进行引物合成, 见表 1。

* 基金项目: 天津市滨海新区卫生局卫生科技一般扶持项目(2012BWKY016)。 作者简介: 刘津, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验工作研究。

表 1 引物合成

基因名称	基因编号	引物序列 5'-3'	产物长度(bp)
rs35397082	NC_000017	ATG TGC CTG GGT GTC TGG AT CCC TGG TAC TTC AGC CTG TC	267
rs4646994	AF118569	GAG CCA CTC CCA TCC TTT CT GGC CAT CAC ATT CGT CAG AT	182/469

1.2.2 模板提取 应用人全血基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司 DP318-03)进行模板提取。

1.2.3 目的基因分析 基因组扩增、测序及结果统计分析由北京阅微基因技术有限公司执行。反应体系 25 μ L; PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 按 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 的程序完成 35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min; 取扩增产物 1 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析检测, 结果良好, 进行测序分析。

1.3 血浆 ACE 水平检测 血浆 ACE 水平的测定用人 ACE ELISA 检测试剂盒检测(北京鼎国昌盛生物技术有限公司), 按试剂盒说明进行操作。

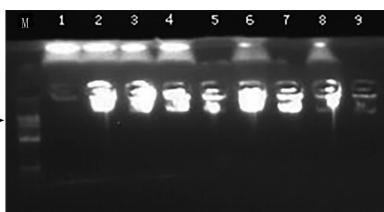
1.4 统计学处理 采用 IBM SPSS20.0 软件进行统计学分析, 计数资料的组间比较用 χ^2 检验或 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ACE 基因单核苷酸多态性 ACE 基因 rs4646994 即 ACE 基因插入/缺失多态性(I/D), 该基因第 16 内含子由于存在一个 287 bp 的 Alu 片段的插入或缺失, 呈现 ACE rs4646994 多态性; rs35397082 是指在 ACE 基因第 22198 bp 和 22199 bp 之间插入或缺失 C 核苷酸。

2.2 SNP 检测结果

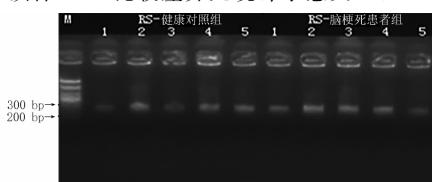
2.2.1 脑梗死患者及健康人全血基因组 DNA 电泳 见图 1 所示, 为应用人全血基因组提取试剂盒所提取 DNA 电泳图。



M: DNA 标记物; 1~9: 收集样本, 其中 1~5 为健康对照组, 6~9 为脑梗死患者组。

图 1 人全血基因组 DNA 电泳

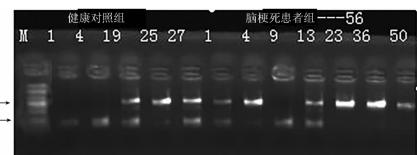
2.2.2 ACE 基因 rs35397082 多态性 健康对照组和脑梗死患者组 rs35397082 SNP PCR 扩增电泳图, 见图 2。实验结果表明, 在两组人群中, 该基因多态性仅存在缺失型, 见图 3、4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 而未见插入型, 通过 SPSS 软件分析健康对照组与脑梗死患者组中 rs35397082 该种 SNP 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



M: DNA 标记物; 1~5: 健康对照组和脑梗死患者组样本, 均为缺失型。

图 2 ACE 基因 rs35397082 多态性 PCR 扩增电泳图

2.2.3 ACE 基因 rs4646994 多态性 如图 5 所示, 为健康对照组与脑梗死患者组 rs4646994 多态性 PCR 扩增电泳图。结果表明, 健康对照组中, 插入型 SNP 为 45 例(84.91%), 缺失型 SNP 为 8 例(15.09%); 脑梗死患者组中插入型为 47 例(88.68%), 缺失型为 6 例(11.32%), 见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。两组人群中, 插入型与缺失型 SNP 比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.33, P = 0.78$), 证明 ACE 基因 rs4646994 多态性与脑梗死的发生无明显相关性。见图 6(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



M: DNA 标记物; 健康对照组 1、4 及脑梗死患者组 9 为缺失型; 健康对照组 19、25、27, 脑梗死患者组 1、4、13、23、36、50 为插入型。

图 5 ACE 基因 rs4646994 多态性 PCR 扩增电泳图

2.3 ACE 血清水平检测 ACE 在肾素/血管紧张素/醛固酮系统(RASS)和激肽系统(KKS)中发挥着重要的作用。研究发现, ACE 通过不同的遗传机制在心脑血管疾病的发生、发展中发挥作用, 其多态性决定血浆与血细胞内 ACE 水平。本文分别检测 53 例脑梗死患者与健康人血清中 ACE 水平。脑梗死患者组的 ACE 水平为 0.0(0.0~61.16) pg/mL; 低于健康对照组 478.6(163.1~801.5) pg/mL, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。因此, 如上位点的基因多态性与血清 ACE 水平无关, 其可能与 ACE 其他位点的基因多态性相关。

3 讨 论

人类血管紧张素转化酶基因由 26 个外显子和 25 个内含子组成, 位于 17 号染色体短臂 2 区 3 带(17q23), 外显子长度 88~481 bp, 内含子长度 150~200 bp^[12]。90 年代初, 研究者获得 ACE 基因的结构, 同时在对其研究过程中, 发现该基因存在多种多态性标志, 如 T5941C, A240T, T93C, T1237C, I/D 等。本研究所涉及的两种 ACE 基因多态性 rs35397082 和 rs4646994 分别位于 ACE 基因 16 内含子和 22 内含子, 其中 rs4646994 多态性表现为 16 内含子中一个 287 bp 的 Alu 片段的缺失或者插入引起, 又被称为 ACE 基因 I/D 多态性。

作为肾素-血管紧张素系统的关键酶, ACE 基因多态性与脑梗死的相关性被广泛关注, 国内外学者也对其进行大量研究, 但结果依然存在较多争议性。Karagiannis 等^[9]利用聚合酶链反应技术, 对 100 例脑梗死白种人以及 100 例年龄、性别匹配的健康者进行 ACE 基因 I/D 多态性检测, 发现 ACE 基因 DD 基因型在脑梗死组与对照组之间分布差异无统计学意义($P > 0.05$), 而其 I, D 等位基因在两组别中亦差异无统计学意义($P > 0.05$)。这一研究结果与吴恩等^[13]研究结果相似, 认为 ACE 基因 I/D 多态性与海南汉族人群脑梗死并无明显相关性。这一结果与之前日本学者 Seino 等^[11]结论不一致: 对 26 例脑梗死患者以及 28 例健康人研究发现, 在脑梗死患者组中 ACE 基因 DD 基因型以及 D 等位基因均明显高于对照组, 由

此指出 ACE 基因 DD 基因型为脑梗死的独立危险因素。张旭等^[8]对 165 例脑梗死患者以及 106 例健康对照组 ACE 基因 I/D 多态性研究, 得到相似结果, 同时发现不同部位脑梗死 DD 基因型以及 D 等位基因亦存在差异性。除此外, 白雪莹等^[14]研究 88 例急性脑梗死患者和 81 例健康人, 发现 rs35397082 的插入型的多态性只存在于脑梗死患者组中, 比例高达 40.91%, 认为 rs35397082 的插入型为脑梗死发生的一个相对独立的危险因素。

本研究中, 对 53 例健康人和 53 例脑梗死患者, 进行 ACE 基因 rs4646994 多态性(即 I/D 多态性)进行检测。结果发现, 健康对照组中 rs4646994 的插入型 SNP 有 45 例(84.91%), 缺失型为 8 例(15.09%); 脑梗死患者组中插入型 47 例(46.59%), 缺失型为 6 例(11.32%), 差异无统计学意义($P=0.78$), 由此认为该基因多态性与脑梗死无明显相关性。这一结论与之前 Karagiannis 等^[9]的结果相似。同时, 还对另一 ACE 基因多态性 rs35397082 进行研究。研究发现, 在健康对照组和脑梗死患者组均只存在缺失型 SNP(100%), 而无插入型, 两组人群中该基因多态性差异无统计学意义($P>0.05$), 认为 ACE 基因 rs35397082 多态性与脑梗死的发生无相关性, 不是脑梗死的独立危险因素。此结果与白雪莹等^[14]的研究存在差异, 认为造成这种结果的原因是由于 SNP 具有明显地域性的特点。因此, 认为在天津滨海地区, ACE 基因 rs35397082 多态性与脑梗死的发生无相关性, 不是脑梗死的独立危险因素。

ACE 参与血管活性肽血管紧张素Ⅱ以及缓激肽的代谢, 调节血管紧张与平滑肌细胞增殖, 其在血清水平可能与其基因位点 SNPs 突变相关。因此, 在研究中, 检测了脑梗死患者组与健康对照组血清 ACE 水平。本研究所涉及的两个 SNPs 位点与 ACE 水平无相关性, 其 ACE 水平差异可能由其他 SNPs 位点所致。

国内外学者对 ACE 基因多态性与脑梗死相关性研究结果存在一定的差异, 一方面可能是由于种族遗传背景, 样本大小、地域分布等不同而导致结果各异; 另一方面, 脑梗死发生机制复杂, 可能有多个基因共同参与疾病的发生、发展^[15-20]。因此对 ACE 基因多态性与脑梗死相关性的研究, 需要以群体为基础的大样本的基因遗传和基因结构分析, 研究其相关机制以为疾病预防、诊断、治疗、随访以及判断预后提供准确依据。

参考文献

- [1] Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, et al. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(1): 44-50.
- [2] Wang BY, Candipan RC, Arjomandi M, et al. Arginine restores nitric oxide activity and inhibits monocyte accumulation after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28(6): 1573-1579.
- [3] Akman B, Tarhan C, Arat Z, et al. Renin-angiotensin system polymorphisms: a risk factor for progression to end-stage renal disease in vesicoureteral reflux patients[J]. *Ren Fail*, 2009, 31(3): 196-200.
- [4] Abchee A, El-Sibai M, Youhanna S, et al. The I allele of the angiotensin converting enzyme I/D polymorphism confers protection against coronary artery disease[J]. *Coron Artery Dis*, 2010, 21(3): 151-156.
- [5] Saidi S, Zammiti W, Slamia LB, et al. Interaction of angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein E gene polymorphisms in ischemic stroke involving large-vessel disease[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2009, 27(1): 68-74.
- [6] Szolnoki Z, Maasz A, Magyari L, et al. Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke[J]. *Neuromolecular Med*, 2006, 8(3): 353-360.
- [7] Um JY, Joo JC, Kim KY, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and traditional Sasang classification in Koreans with cerebral infarction[J]. *Hereditas*, 2003, 138(3): 166-171.
- [8] 张旭, 夏慧慧, 金得辛, 等. 血管紧张素转换酶基因多态性与脑梗死危险因素的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2001, 22(6): 435-438.
- [9] Karagiannis A, Balaska K, Tziomalos K, et al. Lack of an association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and ischaemic stroke[J]. *Eur Neurol*, 2004, 51(3): 148-152.
- [10] 李昕, 步天栩, 王金和, 等. 脑卒中患者血管紧张素转化酶基因插入/缺失多态性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(8): 825-827.
- [11] Seino Y, Ikeda U, Maeda Y, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Levels in Subjects with Cerebral Infarction[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 1998, 5(3): 263-267.
- [12] 周赛君, 朱蓓蕾, 金得辛, 等. 血管紧张素转换酶基因多态性与中青年脑梗死的关系[J]. 中国脑血管病杂志, 2004, 20(5): 218-220.
- [13] 吴恩, 金水晶, 张勇, 等. 海南汉族高血压及高血压脑梗塞与 ACE 基因多态性的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2008, 17(5): 441-444.
- [14] 白雪莹, 徐晨, 杨立顺, 等. 天津地区急性脑梗死发生与血管紧张素转化酶基因多态性及血浆浓度的相关性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(13): 1925-1927.
- [15] 崔金环, 杨光, 苏锡康, 等. 脑梗死患者 AGT、ACE 和 MTHFR 基因多态性的研究[J]. 医学临床研究, 2008, 25(10): 1752-1754.
- [16] Um JY, Moon KS, Lee KM, et al. Polymorphism of angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen, and apolipoprotein E genes in Korean patients with cerebral infarction[J]. *J Mol Neurosci*, 2003, 21(1): 23-28.
- [17] Um JY, Kim HM, Park HS, et al. Candidate genes of cerebral infarction and traditional classification in Koreans with cerebral infarction[J]. *Int J Neurosci*, 2005, 115(6): 743-756.
- [18] 霍阳, 高旭光, 滕智平, 等. 脑梗死与 ACE、APOE、MTHFR 和 Fg β 四种基因多态性的关系研究[J]. 中国卒中杂志, 2006, 12(1): 846-851.
- [19] 崔天盆, 赵瑞生, 刘昌勤, 等. 血管紧张素转换酶和载脂蛋白 E 基因多态性与脑梗塞的关系[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(5): 336-338.
- [20] 杜明艳, 封靖, 杜会山, 等. ACE、AGT 基因联合多态性与高血压合并脑梗塞相关[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(11): 1189-1193.

(收稿日期: 2015-05-04)

