

早发冠心病血瘀证与血管紧张素转化酶基因单核苷酸多态性的相关性研究

李 琳 李 杰 胡志希 简维雄 王建国 于文欣 凌 智 袁 倩

摘要 **目的** 探讨早发冠心病(coronary heart disease, CHD)血瘀证与血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)基因单核苷酸多态性的相关性。**方法** 从 ACE 基因选取 3 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点 rs4343、rs4293 和 rs4267385, 建立基于飞行时间质谱分析技术的方法, 检测各 SNP 位点的等位基因和基因分型, 对比各组等位基因和各基因型频率。**结果** ACE 基因多态性位点 rs4293、rs4267385 的基因型相似, 而 ACE 基因多态性位点 rs4343 基因型和等位基因的分布与健康对照组比较, I、II 组差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), G 等位基因频率高于与健康对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 基因型频率的相对患病风险分析显示, ACE 基因 SNP 位点 rs4343 基因型的 G 等位基因携带者(GG + AG)患早发 CHD 的风险是非 G 等位基因携带者的 3.6 倍(95%CI: 1.224 - 10.585, $P = 0.02$), 经 Logistic 回归分析校正性别、年龄、TC、TG 等风险因素之后, 差异仍有统计学意义(OR = 3.994, 95%CI: 1.230 - 12.974, $P = 0.021$)。**结论** ACE 基因位点 rs4343 (G2350A) 多态性可能是早发 CHD 发病的危险因素之一, 但可能不是早发 CHD 血瘀证的易感因素。

关键词 早发冠心病; 血管紧张素转化酶基因; 单核苷酸多态性; 飞行时间质谱

Relevant Research on ACE Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Premature Coronary Heart Disease Patients with Blood Stasis Syndrome LI Lin, LI Jie, HU Zhi-xi, JIAN Wei-xiong, WANG Jian-guo, YU Wen-xin, LING Zhi, and YUAN Qian *Institute of Chinese Medical Diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208), China*

ABSTRACT **Objective** To explore the relationship between angiotensin converting enzyme (ACE) gene single nucleotide polymorphisms (SNP) and premature coronary heart disease (PCHD) patients with blood stasis syndrome (BSS). **Methods** rs4343, rs4293, and rs4267385 were selected at SNP from ACE gene. Allele and genotype were detected. Frequencies of allele and genotype were compared by using time-of-flight mass spectrometry technique (TOF-MS). **Results** Compared with the healthy control group, genotype of rs4293 and rs4267385 in ACE gene were similar, but there was statistical difference in polymorphisms and allele frequencies of rs4343 in the I and II group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The frequency of G allele was higher in the 3 groups than in the healthy control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The relative risk analysis showed that the risk for PCHD occurrence in G allele carriers at rs4343 (GG + AG) was 3.6 times the risk in non-G allele carriers (95%CI: 1.224 - 10.585, $P = 0.02$). There was also statistical difference in sex, age, TC, and TG after adjusted Logistic regression analysis (OR = 3.994, 95%CI: 1.230 - 12.974, $P = 0.021$). **Conclusion** The polymorphism at rs4343 (G2350A) might be one of risk factors for PCHD occurrence, but not a predisposing factor for PCHD patients of BSS.

KEYWORDS premature coronary heart disease; angiotensin converting enzyme gene; single nucleotide polymorphisms; time-of-flight mass spectrometry

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金重点项目(No. 11K049); 国家自然科学基金项目(No. 81373550, No. 81202647); 霍英东教育基金会资助项目(No. 131042); 中国博士后科学基金资助项目(No. 2012M521526, No. 2013T60771); 中医诊断学国家重点学科研究生创新基金资助项目(No. 2013ZYD28)

作者单位: 湖南中医药大学中医诊断研究所(长沙 410208)

通讯作者: 胡志希, Tel: 0731 - 88458218, E-mail: 5471313@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.06.0686

冠心病(coronary heart disease,CHD)是严重危害人类生命健康的多发疾病之一,发病率及病死率呈上升趋势,专家预测到 2020 年,CHD 将成为全球最主要的死亡原因^[1]。CHD 发病年龄男性 <55 岁,女性 <65 岁,称为早发 CHD^[2],血瘀证是 CHD 最常见的证型之一^[3-5]。血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)基因被认为与 CHD 的发生密切相关,但此前研究多集中在在 ACE 基因 I/D 多态性,本课题组前期研究示 ACE 基因 DD 型是 CHD 血瘀证的易感基因^[6,7],但关于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点 rs4343、rs4293、rs4267385 尚未见报道,现将研究结果报告如下。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 CHD 诊断标准 至少 1 支冠状动脉直径狭窄 >50%,并参照中华医学会心血管病学会 2007 年 3 月制订的“慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南”和“不稳定性心绞痛与非 ST 段抬高性心肌梗死诊断与治疗指南”^[8]。

1.2 CHD 初步辨证分型标准 参照《中华人民共和国中医药行业标准·中医病证诊断疗效标准》^[9]的辨证分型标准属心血瘀阻证。主症:胸闷心痛,痛如针刺;次症:面色晦暗/口唇青紫/爪甲发青;舌象:舌质紫暗/舌有瘀斑;脉象:细涩/结代;主症 1 项加次症 2 项加舌脉 1 项,为心血瘀阻证。

2 纳入标准 (1)符合上述 CHD 诊断标准及冠心病中医辨证分型标准;(2)早发 CHD 发病年龄男 <55 岁,女 <65 岁;(3)湖南地区出生,汉族;(4)知情同意参与研究者。

3 排除标准 (1)伴严重高血压、糖尿病、恶性肿瘤、肝肾疾病及甲状腺病患者;(2)糖尿病性心脏病、甲状腺功能亢进性心脏病、高血压性心脏病、肺源

性心脏病、贫血性心脏病、系统性硬皮病性心脏病、风湿性心脏病等患者;(3)精神系统疾病患者。

4 一般资料 96 例均为 2013 年 1 月—2013 年 12 月湖南中医药大学第一附属医院、湖南省中医院、湖南省中医药研究院、长沙市砂子塘社区卫生服务中心、长沙市黑石铺社区卫生服务中心和冶金部长沙冶金研究设计院卫生服务中心的患者。早发 CHD 血瘀证组(简称 I 组)21 例(男 8 例,女 13 例),平均年龄(59.24±6.89)岁;早发 CHD 非血瘀证组(简称 II 组)30 例(男 11 例,女 19 例),平均年龄(59.77±7.05)岁;非早发 CHD 血瘀证组(简称 III 组)25 例(男 9 例,女 16 例),平均年龄(60.12±4.97)岁。健康对照组 20 名均为经体查和生化检查符合健康人判断标准,且符合上述年龄、地区和民族条件者,其中男 11 名,女 9 名,平均年龄(57.15±6.74)岁。其中 II 组为经筛选在年龄、性别与 I 组患者差异均无统计学意义的其他疾病血瘀证患者。4 组性别、年龄、体重指数(BMI)、空腹血糖(FBG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与健康对照组比较, I 组总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)差异有统计学意义($P<0.01$)。II 组 TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),差异亦有统计学意义($P<0.01$)。I 组与 II 组比较,TC、TG 的差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

5 检测方法

5.1 提取基因组 DNA 采集 EDTA 抗凝外周血 3.0 mL,使用北京康为全血基因组 DNA 提取试剂盒获取 DNA。DNA 的提取在湖南省重点实验室中医诊断学实验室完成。用紫外分光光度计测定 DNA 纯度和浓度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 位于 1.8~2.0 之间,OD₂₆₀/OD₂₃₀>2.0,则认定 DNA 合格。提取的 DNA 置于-80℃冰箱保存备用。

5.2 引物设计 采用 Sequenom 公司 Assay

表 1 4 组临床资料比较 ($\bar{x}\pm s$)

项目	I 组(21 例)	II 组(30 例)	III 组(25 例)	健康对照组(20 名)
性别(男/女)	8/13	11/19	9/16	11/9
年龄(岁)	59.24±6.89	59.77±7.05	60.12±4.97	57.15±6.74
BMI(kg/m ²)	22.68±3.50	23.59±3.59	23.36±3.18	21.95±2.72
FBG(mmol/L)	4.99±0.76	5.49±1.17	5.29±0.88	5.10±0.38
TC(mmol/L)	5.46±1.13*	4.38±1.04 [△]	6.01±0.99*	3.97±0.92
TG(mmol/L)	1.77±0.66*	1.21±0.45 [△]	1.91±0.68*	1.22±0.19
HDL-C(mmol/L)	1.38±0.65	1.27±0.35	1.39±0.37	1.25±0.36
LDL-C(mmol/L)	2.51±0.71	2.39±0.78	3.56±0.74*	2.38±0.64
SBP(mmHg)	139.55±11.98	131.90±15.63	138.96±15.97	133.21±8.93
DBP(mmHg)	83.35±13.15	78.07±6.36	81.40±10.91	81.84±7.06

注:与健康对照组比较,* $P<0.01$;与 I 组比较,[△] $P<0.01$

Designer 3.1 软件包设计扩增、延伸引物,每个 SNP 位点对应两条 PCR 扩增引物和一条延伸引物(表 2),引物由 Invitrogen 公司合成。

5.3 SNP 等位基因分型 本项目采用 Sequenom 公司 Mass ARRAY 平台 iPLEX Gold Assay 方法进行基因分型实验,该平台是基于基质辅助激光解析电离时间飞行时间质谱的实验技术。步骤如下:将 1 μ L 10ng/ μ L 的 DNA 模板加入 384 孔板中(PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,45 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min),PCR 产物中加入 2 μ L SAP 反应混合物,反应条件:37 $^{\circ}$ C 40 min;85 $^{\circ}$ C 5 min,然后根据 Sequenom 程序进行单碱基延伸反应,条件为:94 $^{\circ}$ C 30 s;94 $^{\circ}$ C 5 s;(52 $^{\circ}$ C 5 s,80 $^{\circ}$ C 5 s,5 个循环),40 个循环;72 $^{\circ}$ C 3 min。在终止反应物中加入 6 mg/孔纯化树脂,混合后加入 16 μ L ddH₂O。将树脂纯化过的延伸产物点制芯片,速度 80 mm/s,将点制的芯片放置在 Sequenom 质谱基因

分析仪芯片槽内,设置为 iPLEX Gold,运行 Sequenom 质谱基因分析仪,进行基因分型。本步骤有上海伯豪生物有限公司完成。

6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件统计分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经正态性检验,方差齐性检验,方差齐者,两组比较采用 *t* 检验,多组比较用方差分析;方差不齐者,用秩和检验。计数资料采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验;相关因素及校正相关危险因素对该相对风险度的影响采用 Logistic 回归分析。各组等位基因分布差异采用 χ^2 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 SNP 分型结果(图 1、2) rs4343、rs4293 都有 G 和 A 两种等位基因,包括 GG、AA、AG 3 种基因型,rs4267385 有 C 和 T 两种等位基因,包括 CC、TC、TT 3 种基因型。

表 2 ACE 基因 SNP 位点扩增引物及延伸引物序列

SNPs 位点	扩增引物	延伸引物
rs4343	F: 5' - ACGTTGGATGCCTACCAGATCTGACGAATG - 3' R: 5' - ACGTTGGATGCATGCCATAACAGGTCTTC - 3'	5' - TTGACGAATGTGATGGCCAC - 3'
rs4293	F: 5' - ACGTTGGATGGGTGGGGAGTTACTTTCTGT - 3' R: 5' - ACGTTGGATGTCATAAACAGCCTAGGGAG - 3'	5' - GGAGTTACTTTCTGTTAAAGGAA - 3'
rs4267385	F: 5' - ACGTTGGATGGATTGCACAGCCCATAAGAG - 3' R: 5' - ACGTTGGATGAGCCAGGTATCTCTCTAGG - 3'	5' - AGAGAAAAAGCCCCAAACA - 3'

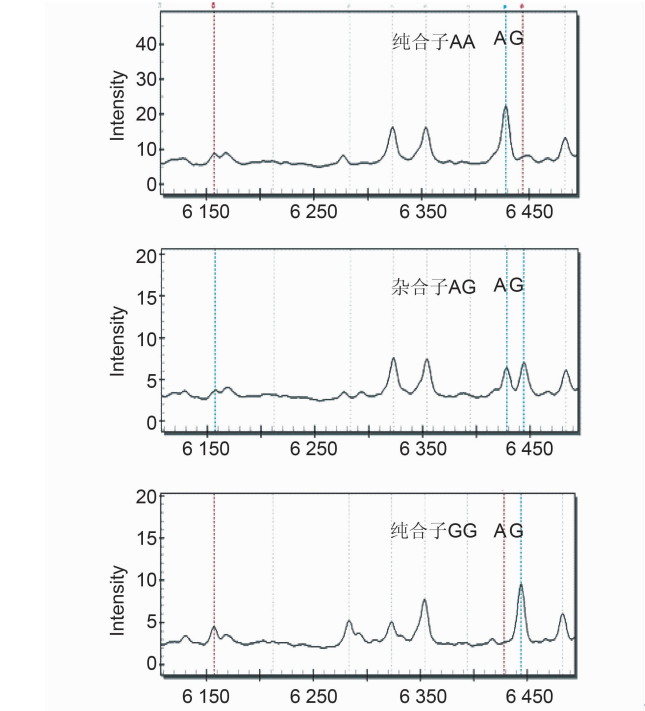


图 1 rs4343 位点基因分型 MALDI-TOF 质谱峰值图

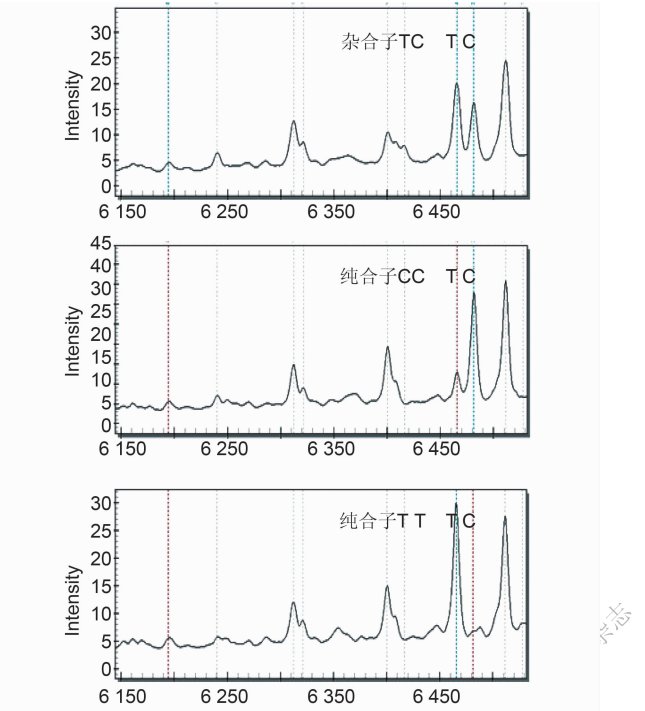


图 2 rs4267385 位点基因分型 MALDI-TOF 质谱峰值图

2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 对研究对象 3 个 SNP 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,基因型分布实际值近似于推算获得的期望值,提示 3 个 SNP 位点处于遗传平衡状态($P > 0.05$),表明用于研究的样本来自遗传平衡的群体,具有良好的代表性。

3 ACE 基因 SNP 位点多态性分型(表 3) 4 组人群中,ACE 基因多态性位点 rs4293、rs4267385 的基因型相似,而 ACE 基因多态性位点 rs4343 基因型和等位基因的分布与健康对照组比较,Ⅰ、Ⅱ组差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); G 等位基因频率高于健康对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 ACE 基因 SNP 位点 rs4343 基因型与早发 CHD 患病风险之间的关系(表 4) 基因型频率的相对患病风险分析显示,ACE 基因 SNP 位点 rs4343 基因型的 G 等位基因携带者(GG + AG)患早发 CHD 的风险是非 G 等位基因携带者的 3.6 倍(95% CI: 1.224 – 10.585, $P = 0.02$),经 Logistic 回归分析校正性别、年龄、TC、TG 等风险因素之后,差异仍有统计学意义(OR = 3.994, 95% CI: 1.230 – 12.974, $P = 0.021$)。而对比早发 CHD 血瘀证患者与健康对照组患者基因型频率的相对患病风险,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

CHD 是指冠状动脉(冠脉)发生粥样硬化引起管腔狭窄或闭塞,导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病,也称缺血性心脏病^[10]。“肾素血管紧张素系统”(renin-angiotensin system, RAS)在动脉粥样硬化的形成中起着重要作用,ACE 是 RAS 的主要成

分,ACE 可催化 10 肽血管紧张素Ⅰ在局部血管壁产生血管紧张素-Ⅱ(Ang Ⅱ),从而引起局部 Ang Ⅱ浓度增高,血管紧张素Ⅱ是有力的缩血管物质,内皮细胞受损时,Ang Ⅱ可使新生内皮、血管平滑肌细胞和细胞间质增生,导致血管硬化^[11]。课题组前期研究示 ACE 基因 DD 型是 CHD 血瘀证的易感基因^[6,7]。本次研究在前期基础上,对 ACE 基因 SNP 位点 rs4343、rs4293 和 rs4267385 进行分型,并探讨其与早发 CHD 血瘀证的相关性。

ACE 基因多态性位点 rs4343(G2350A),位于 17 外显子,与 ACE I/D 多态性位点相距 127bp。Freitas AI 研究示^[12],ACE I/D DD 型和 ACE 11860(rs4343) GG 基因型是葡萄牙 CHD 人群的危险因素,其中 ACE I/D I 等位基因和 ACE 11860 A 等位基因的协同作用可以降低 CHD 的发生,而 ACE 11860(rs4343) GG 基因型则是 CHD 发生的危险因素,特别是早发 CHD 人群。rs4343(G2350A)可独立影响血清或组织中 ACE 的表达水平,是巴基斯坦原发性高血压人群的易感因素^[13],G 等位基因可导致 ACE 水平升高,其影响作用较 rs4340(I/D)更显著^[14]。而高血压是 CHD 的危险因素,因此我们推测 rs4343(G2350A)与早发 CHD 血瘀证相关。而 rs4267385 与 CHD 的相关性在 Ellis KL^[15]的研究中被证实。

课题组前期研究示 ACE 基因 DD 型是 CHD 血瘀证的易感基因^[6,7],本研究在此基础上,从 ACE 基因选取 3 个 SNP 位点 rs4343、rs4293 和 rs4267385,建立基于飞行时间质谱分析技术的方法,检测各 SNP 位点的等位基因和基因分型,对比各组等位基因和各基因型频率。结果认为 ACE 基因位点 rs4343(G2350A)

表 3 ACE 基因位点基因频率和基因型统计

组别	例数	rs4343					rs4293					rs4267385				
		AA	AG	GG	G	A	AA	AG	GG	G	A	CC	TC	TT	T	C
Ⅰ	21	6	9	6	21(50.0)**	21(50.0)**	6	7	8	23(54.8)	19(45.2)	13	7	1	33(78.6)	9(21.4)
Ⅱ	30	9	19	2	23(38.3)*	37(61.7)*	7	19	4	27(45.0)	33(55.0)	18	10	2	46(76.7)	14(23.3)
Ⅲ	25	14	8	3	14(28.0)	36(72.0)	11	11	3	33(66.0)	17(34.0)	11	12	2	34(68.0)	16(32.0)
健康对照	20	12	7	1	9(22.5)	31(77.5)	8	11	1	27(67.5)	13(32.5)	11	9	0	31(77.5)	9(22.5)

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 4 ACE 基因 SNP 位点 rs4343 基因型与早发 CHD 患病风险之间的关系

基因型	校正前模型			校正后模型		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
rs4343 AA	1	—	—	1	—	—
rs4343 AG	3.200	1.040 – 9.842	0.042	3.643	1.061 – 12.516	0.040
rs4343 GG	6.400	0.700 – 58.522	0.100	6.102	0.608 – 61.193	0.124
rs4343AG + GG	3.600	1.224 – 10.585	0.020	3.994	1.230 – 12.974	0.021

多态性可能是早发 CHD 发病的危险因素之一。

目前,常用的 SNP 位点检测方法都是以 PCR 为基础,主要有 SSCP、等位基因特异性探针法、RFLP 等,MALDI-TOF MS 技术是通过激光激发使基质,样品之间发生电荷转移,电离的样品在电场作用下飞过真空管,根据到达检测器的飞行时间不同而被检测,即通过离子的质量电荷之比(M/Z)与离子的飞行时间成正比来分析样品的分子量。它具有高通量、灵敏度好、特异性高等优点,被广泛应用于遗传多态性 SNP 的研究中^[16]。

由于本研究样本数量有限,且仅通过横断面研究,存在一定局限性。因此今后还需要在不同地域和不同种间扩大样本量,并进一步实验来进一步验证该结果;另外 rs4343 基因多态性导致蛋白表型的差异,不同突变形式的蛋白究竟通过何种机制或信号通路影响早发 CHD 血瘀证易感性,值得深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Khor GL. Cardiovascular epidemiology in the Asia-Pacific region[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2001, 10(2): 76-80.
- [2] Serena T, Ame W. Implementation of guidelines to screen relatives of patients with premature coronary heart disease in a hospital setting[J]. Am J Cardiol, 2002, 90(11): 1211-1214.
- [3] 袁肇凯,田松,胡志希,等.长沙地区 CHD 中医证型的临床流行病学研究[J].湖南中医药大学学报, 2008, 28(5): 63-67.
- [4] Wang J, Li J, Yang G. Relationship among peripheral leucocytes, coronary stenosis and Chinese medicine syndromes in patients with coronary heart disease[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2010, 30(2): 130-132.
- [5] 李杰,袁肇凯.冠心病血瘀证的病机研究[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(7): 613-615.
- [6] 毛以林,袁肇凯,黄献平,等. CHD 血瘀证与血管紧张素转换酶基因多态性的相关性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(9): 776-780.
- [7] 黄献平,袁肇凯,谭光波,等. CHD 血瘀证患者血管紧张素转换酶基因多态性的检测分析[J]. 中医杂志, 2007, 48(1): 65-68.
- [8] 中华医学会心血管病学分会. 慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南和不稳定性心绞痛及非 ST 段抬高性心肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(3): 195-200.
- [9] 国家中医药管理局. 中华人民共和国中医药行业标准·中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 18.
- [10] 葛均波,徐永健. 内科学[M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 227.
- [11] Diet F, Pratt RE, Berry GJ, et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease[J]. Circulation, 1996, 94(11): 2756-2767.
- [12] Freitas AI, Mendonça I, Brión M, et al. RAS gene polymorphisms, classical risk factors and the advent of coronary artery disease in the Portuguese population[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2008, 8(1): 15.
- [13] Alvi FM, Hasnain S. ACE I/D and G2350A polymorphisms in Pakistani hypertensive population of Punjab[J]. Clin Exp Hypertens, 2009, 31(5): 471-480.
- [14] McKenzie CA, Sinsheimer JS, Adeyemo AA, et al. SNP haplotypes in the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene: analysis of Nigerian family data using gamete competition models[J]. Ann Human Gene, 2005, 69(2): 227-232.
- [15] Ellis KL, Palmer BR, Frampton CM, et al. Genetic variation in the renin-angiotensin-aldosterone system is associated with cardiovascular risk factors and early mortality in established coronary heart disease[J]. J Human Hypertens, 2013, 27(4): 237-244.
- [16] 张国良,汪文斐,杨辉,等. 应用飞行时间质谱法研究甲型 H1N1 流感人群白细胞介素-1 α 基因单核苷酸多态性[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(19): 3204-3207.

(收稿:2014-06-08 修回:2015-03-03)