

血管紧张素转换酶基因与缺血性脑卒中发病的关系

李才明 张成 卢锡林 冯慧宇 苏全喜 曾纛 张鸿炼 邱淑莲

【摘要】 目的 探讨血管紧张素转换酶(ACE)基因与缺血性脑卒中(IS)发病的关系。方法 ①应用聚合酶链反应(PCR)和变性高效液相色谱技术筛查了 454 例 IS 患者(病例组)和 334 例非 IS 患者(对照组)ACE 基因 I/D 多态性的分布,详细记录卒中危险因素。②选择 40 只 SD 大鼠制备低氧-窒息模型和单纯窒息模型,同时选择 29 只易卒中型自发性高血压大鼠(SHR-SP)。检测血浆血管紧张素 I (Ang I)水平的变化。结果 病例组的 DD、ID、II 型的频率分别为 22.5%、43.4%和 34.1%,对照组为 17.4%、45.5%和 37.1%,ACE 基因 DD 型与大动脉粥样硬化型 IS 相关。SHR-SP 血浆 Ang I 水平 $[(164.49 \pm 34.58) \text{ng/L}]$ 较正常 SD 大鼠 $[(150.92 \pm 24.92) \text{ng/L}]$ 高,但差异无显著性($P > 0.05$);窒息组和低氧-窒息组血浆 Ang I 水平分别为 $(382.84 \pm 62.75) \text{ng/L}$ 和 $(295.90 \pm 55.07) \text{ng/L}$,均显著高于正常 SD 大鼠水平(P 均 < 0.01)。吸烟、酗酒群体内病例组以及伴糖尿病群体的 DD 型和 D 等位基因的相对风险率均高于相应对照组,而 II 型和 I 等位基因的相对风险率均低于相应对照组。结论 DD 基因型是 IS 的易患因子;Ang I 参与了低氧应激过程;ACE 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在 IS 的发病过程中存在协同作用。

【关键词】 脑卒中; 缺血性; 血管紧张素转换酶; 基因; 遗传易感性

Relationship between angiotensin converting enzyme gene and ischemic stroke LI Cai-ming*, ZHANG Cheng, LU Xi-lin, FENG Hui-yu, SU Quan-xi, ZENG Ying, ZHANG Hong-lian, QIU Shu-lian.
*Department of Neurology, Huizhou Central Hospital, Huizhou 516001, Guangdong, China

【Abstract】 **Objective** To study relationship between angiotensin converting enzyme (ACE) gene and ischemic stroke (IS). **Methods** ①Four hundred and fifty-four patients and 334 controls were recruited in our study, their I/D polymorphisms of ACE gene were detected by polymerase chain reaction (PCR) and denaturing high performance liquid chromatogram, and their risk factors of IS were recorded at the same time. ②In addition, 29 stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP) and 40 Sprague-Dawley (SD) rats were enrolled, and hypoxia-apnoea animal models and simple apnoea animal models were used at the same time. Their plasma angiotensin I (Ang I) levels were determined. **Results** The frequencies of DD, ID and II genotype in IS patients were 22.5%, 43.4% and 34.1%, respectively, and 17.4%, 45.5% and 37.1%, respectively in controls. DD genotype was associated with large artery arteriosclerosis (LAA). Plasma Ang I level in SHR-SP group was $(164.49 \pm 34.58) \text{ng/L}$, and it was higher than that in control group $[(150.92 \pm 24.92) \text{ng/L}]$ with no significant difference ($P > 0.05$). Ang I levels in apnoea and hypoxia-apnoea group were $(382.84 \pm 62.75) \text{ng/L}$ and $(295.90 \pm 55.07) \text{ng/L}$, respectively, and they were significantly higher than that in control group (all $P < 0.01$). The relative risks of DD genotype and D alleles in IS patients with smoking, alcohol abuse, or with diabetes mellitus were higher than those in controls, but II genotype and I alleles were lower than those in controls. **Conclusion** DD genotype is a risk factor for IS, Ang I takes part in the course of hypoxia-stress, and it is correlated with smoking, alcohol abuse and diabetes mellitus in the pathogenesis of IS.

【Key words】 ischemic stroke; angiotensin converting enzyme; gene; genetic predisposition to disease

缺血性脑卒中(IS)是严重危害人类健康的疾病,其病因尚不明确,目前多认为血管紧张素转换酶(ACE)基因是 IS 的主要易感基因,但结论不一^[1,2]。我们在既往研究^[3]的基础上,对 ACE 基因进行大范围的筛查,同时应用目前脑卒中与遗传相关性研究

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370510,30170337);广东省医学科研基金资助项目(B2002124,B2005134)

作者单位:516001 广东省惠州市中心人民医院神经内科(李才明,邱淑莲),药理室(张鸿炼);中山大学第一附属医院神经内科(张成,卢锡林,冯慧宇,曾纛);广东药学院第一附属医院神经内科(苏全喜)

作者简介:李才明(1971-),男(汉族),广东省人,博士,副主任医师,主要研究方向为脑血管病(E-mail:caiminglee@tom.com)。

的理想、公认的人类脑卒中动物模型——易卒中型自发性高血压大鼠(SHR-SP),并制备低氧-窒息动物模型,探讨 ACE 基因与 IS 患病的关系,以及基因与环境因素在 IS 发病过程中的交互作用。

1 对象与方法

1.1 临床病例:①病例组:选择 2000 年 9 月—2005 年 3 月在中山大学附属第一医院、惠州市中心人民医院及广东药学院第一附属医院神经内科和急诊科住院的 454 例 IS 患者,其中男 271 例,女 183 例;年龄 27~94 岁,平均 (65.20 ± 12.75) 岁。所有患者均符

合诊断要点^[4],并经临床、CT 和(或)磁共振成像(MRI)扫描确诊。根据患者临床症状和体征及 CT 和(或)MRI 结果,严格按照标准^[5]进行 TOAST (trail of ORG10172 in acute stroke treatment)分型,分为大动脉粥样硬化型(LAA)、心源性脑梗死(CE)、小动脉阻塞型(SAA)、其他明确病因的卒中(SOE)和不明原因的卒中(SUE);同时按照统一标准^[6-8]详细记录每位患者的各种危险因素,包括高血压、糖尿病、高脂血症、心肌梗死、卒中阳性家族史、酗酒和吸烟等。②对照组:选择同期年龄、性别相匹配的其他科住院患者和健康体检者 334 例,其中男 207 例,女 127 例;年龄 35~88 岁,平均(59.57±16.73)岁。均排除高血压病、冠心病、脑血管疾病、糖尿病、癌症和肾功能衰竭等。对病例组和对照组患者 ACE 基因型分布进行了遗传平衡定律检测,符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明他们来自同一群体。

1.2 实验动物:选择 11~22 周龄 SHR-SP 大鼠 29 只,雌 15 只,雄 14 只;体重 220~370 g,平均(214.62±45.65)g;血压(164.23±19.48)mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa),均无偏瘫等脑卒中表现。正常对照组为 Sprague-Dawley (SD)大鼠 40 只(其中 6 只用来制备低氧-窒息模型,6 只用来制备单纯窒息模型),10~16 周龄,雌 21 只,雄 19 只;体重 165~270 g,平均(205.63±42.42)g;血压(120.25±23.17)mm Hg。SHR-SP 大鼠的平均血压显著高于 SD 大鼠,差异有显著性($P=0.031$);两组大鼠体重、周龄和性别构成比差异均无显著性。

1.3 研究方法

1.3.1 gDNA 的提取:取所有临床研究对象的外周静脉血 5 ml,常规酚/氯仿法抽提 gDNA。

1.3.2 基因型检测:引物序列:P1:5'-CTGGAGACCCTCCCATCCTTTCT-3'; P2:5'-GATGTGGCCATCACATTCGTGTCAGAT-3'(上海生工),聚合酶链反应(PCR)体系 30 μ l,常规配制。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用质量分数为 2%的琼脂糖凝胶电泳判断基因型。部分标本应用变性高效液相色谱“DNA Size”模式进行鉴定(柱温为 50 $^{\circ}$ C)。

1.3.3 大鼠低氧-窒息模型制备:参照新生儿缺血缺氧性脑病动物模型^[9]的方法,使大鼠持续吸入体积分数为 8%的 O₂ 3 h 后,用 N₂ 将其窒息处死。窒息组大鼠则仅用 N₂ 窒息处死。

1.3.4 血浆血管紧张素 II (Ang II)活性测定:摘除

大鼠眼球取血 4 ml,注入加有酶抑制剂冰抗凝管中摇匀,低温离心机 2 500 r/min (离心半径 11.5 cm)离心 7 min,分离血浆。Ang II 活性采用放射免疫分析法检测,试剂盒购自北京北方生物技术研究所,严格按照说明书要求操作。

1.4 统计学处理:采用 SPSS10.0 统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 t 检验;计数资料用 χ^2 检验;基因型及等位基因相对风险率[以比值比(OR)及 95%可信区间(CI)表示]采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACE 基因多态类型(图 1,图 2):PCR 可扩增出两种 DNA 片段,490 bp 长的 DNA 片段称为插入型(I 型),190 bp 长的 DNA 片段称为缺失型(D 型)。在群体中可有 DD、ID 及 II 3 种基因型,II 型仅有 490 bp 长的片段,为纯合插入型;DD 型仅有 190 bp 长的片段,为纯合缺失型;ID 型既有 490 bp 长的片段,又有 190 bp 长的片段,为杂合型。

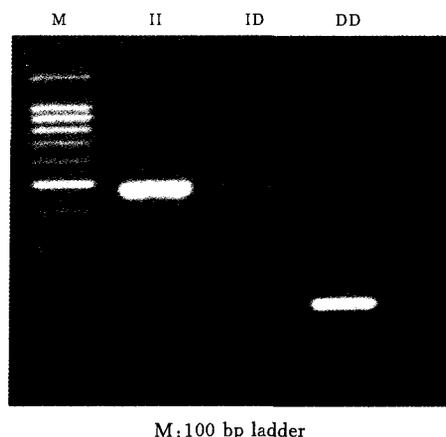


图 1 2%琼脂糖凝胶电泳法检测 ACE 基因多态类型
Figure 1 Type of polymorphism of ACE gene detected by 2% agarose gel electrophoresis

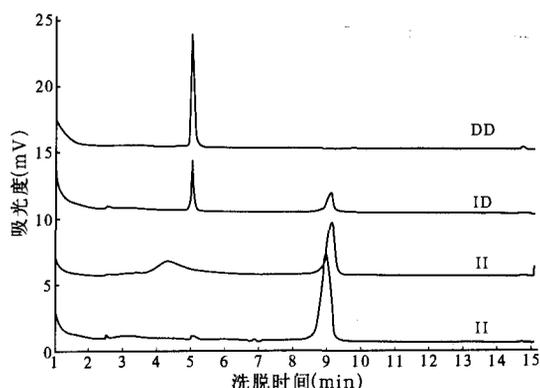


图 2 变性高效液相色谱“DNA Size”模式(柱温为 50 $^{\circ}$ C)色谱图
Figure 2 Graph of denaturing high performance liquid chromatogram in "DNA Size" model($T_m=50^{\circ}$ C)

2.2 病例组和对照组 ACE 基因型分布特征比较(表 1);与对照组比较,病例组 DD 型的频率较高,其患病的 OR 为对照组的 1.379 倍;进一步分析, LAA 组 DD 型的 OR 则为对照组的 1.798 倍;其余各基因型和等位基因频率的差异均无显著性。

表 1 病例组和对照组 ACE 基因型分布特征

Table 1 Distribution of ACE genotypes in IS group and control group

组别	例数(例)	DD	ID	II	D 等位基因	I 等位基因
对照组	334	58(17.4%)	152(45.5%)	124(37.1%)	40.15	59.85
病例组	454	102(22.5%)	197(43.4%)	155(34.1%)	44.20	55.80
LAA	62	17(27.4%)	27(43.5%)	18(29.0%)	49.15	50.85
CE	45	10(22.2%)	21(46.7%)	14(31.1%)	45.55	54.45
SAA	171	37(21.6%)	67(39.2%)	67(39.2%)	41.20	58.80
SOE	6	3(50.0%)	2(33.3%)	1(16.7%)	66.65	33.35
SUE	170	35(20.6%)	80(47.1%)	55(32.4%)	44.15	55.85

2.3 血浆 Ang II 水平测定结果比较:SHR-SP 大鼠的血浆 Ang II 水平 $[(164.49 \pm 34.58) \text{ng/L}]$ 较对照组 $[(150.92 \pm 24.92) \text{ng/L}]$ 高,但差异无显著性($P > 0.05$)。与对照组比较,窒息组和低氧-窒息组的 Ang II 水平均明显升高 $[(382.84 \pm 62.75) \text{ng/L}$ 和 $(295.90 \pm 55.07) \text{ng/L}]$,差异有显著性(P 均 < 0.01);低氧-窒息组的 Ang II 水平较窒息组低,但差异无显著性($P > 0.05$)。

2.4 ACE 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在 IS 发病过程中的协同作用:本研究按照统一标准将 IS 患者和对照组正常人群分为吸烟群体和非吸烟群体、酗酒群体和非酗酒群体;将 IS 患者分为伴糖尿病群体和不伴糖尿病群体^[7,8]。表 2 结果显示:与相应对照组比较,携带有 DD 型和 D 等位基因的吸烟群体中病例组患病的 OR 分别为 1.992 和 1.679,而携带有 II 型和 I 等位基因的吸烟群体中病例组患病的 OR 分别为 0.523 和 0.596;酗酒群体中病例组的 DD 型和 D 等位基因的频率显著升高,它们患病的 OR 分别为 8.130 和 2.488,而携带有 II 型和 I 等位基因的酗酒群体中病例组患病的 OR 分别为 0.389 和 0.402。伴糖尿病群体的各基因型频率差异均有显著

性,DD 型和 D 等位基因的 OR 分别为 2.634 和 1.833;而 II 型和 I 等位基因的 OR 则分别为 0.614 和 0.546。相反,非吸烟、非酗酒和不伴糖尿病群体各基因型和等位基因频率的分布与相应对照群体比较,差异均无显著性。

3 讨论

人体 ACE 基因位于常染色体 17q23,包括 26 个外显子和 25 个内含子,长 21 kb,第 16 个内含子中有一段 287 bp 的相当于 Alu 重复序列的插入/缺失多态性片段,含此片段的 PCR 产物长度为 490 bp,为 I 型,没有此序列的产物长度为 190 bp,为 D 型,从而产生 3 种不同基因型,即 II、ID 和 DD 型。ACE 基因普遍被认为是研究各类心脑血管疾病遗传易感性的主要候选基因。本研究结果表明,LAA 的 DD 基因型频率较对照组高,其 OR 为对照组的 1.798 倍,提示 DD 基因型可能与动脉粥样硬化(AS)有关,为 IS 的易患因子。

血浆和细胞内的 ACE 活性与 ACE 基因 I/D 多态性密切相关,但 DD 基因型是如何引起 LAA 的呢?有研究发现,虽然卒中组与对照组之间 ACE 基因频率无显著差异,但血浆 ACE 活性在脑梗死发病早期显著低于对照组^[10];另有研究发现颅内压增高后 2 h 内血清 ACE 活性显著升高^[11]。

SHR-SP 是自发性高血压大鼠的一个亚系,它可以在高血压形成之前就发生 IS,或虽然已经控制了高血压但仍然会发生 IS,它是研究脑卒中与遗传相关性的较为理想和公认接近于人类脑卒中的一种动物模型^[12]。有研究报道,在高血压急性期,循环系统中肾素-血管紧张素系统(RAS)对血压升高起重要作用,而在慢性阶段,血压的维持主要靠中枢下丘脑 RAS 的激活,循环系统中 Ang II 水平并不与血压的高低成比例^[13]。在我们的研究中也可以看到,SHR-SP 大鼠的平均血压较正常 SD 大鼠显著升高,血浆 Ang II 水平亦相对升高,但差异无显著性,故血浆 Ang II 水平与血压无相关性,考虑与高血压

表 2 各组各基因型患病的 OR 值(95%CI)

Table 2 Odds ratio of every genotype in different groups(95%CI)

组别	病例组/对照组(例/例)	DD	ID	II	D 等位基因	I 等位基因
吸烟群体	117/48	1.992(0.707~5.610)	1.330(0.675~2.622)	0.523(0.263~1.038)	1.679(0.940~2.999)	0.596(0.333~1.064)
非吸烟群体	337/286	1.368(0.927~2.021)	0.829(0.603~1.139)	0.974(0.700~1.355)	1.130(0.590~2.008)	0.885(0.506~1.548)
酗酒群体	57/35	8.130(1.001~6.034)*	1.287(0.552~3.004)	0.389(0.163~0.926)*	2.488(1.358~4.558)*	0.402(0.219~0.736)*
非酗酒群体	397/299	1.263(0.871~1.831)	0.876(0.648~1.186)	0.974(0.711~1.334)	1.085(0.620~1.900)	0.922(0.526~1.613)
伴糖尿病群体	115	2.634(1.705~4.071)*	1.756(1.065~2.895)*	0.614(0.395~0.956)*	1.833(1.046~3.124)*	0.546(0.311~0.956)*
不伴糖尿病群体	339	1.261(0.857~1.854)	1.040(0.772~1.415)	0.813(0.592~1.118)	1.041(0.596~1.819)	0.960(0.550~1.677)

注:与本群体中对照组比较;* $P < 0.05$

时血压升高,负反馈作用于中枢下丘脑,抑制 Ang II 的产生,从而使循环的 Ang II 水平有所降低有关。因此,我们推测,DD 型与 LAA 的 IS 有关,可能是由于 DD 型的人群 ACE 水平高,从而引起 Ang II (包括循环和组织 Ang II)水平亦升高,导致 LAA,最终导致 IS。但使用 ACE 抑制剂,是否可以逆转 AS 的进程,防治 IS 还有待于进一步研究。

低氧或缺血造成的脑组织损伤是临床上最常见的病理生理现象之一,也是常见的应激反应之一。本实验中我们制备缺氧性脑损伤的动物模型,同时设立窒息组,以排除窒息引起 Ang II 活性变化的干扰,而且可粗略了解大鼠在缺氧时 Ang II 的动态变化。本研究结果表明,窒息组和低氧-窒息组 Ang II 水平均显著高于正常 SD 大鼠水平,低氧-窒息组的 Ang II 水平较窒息组低,但差异无显著性。我们认为,血浆 Ang II 水平可能存在一个时相的变化过程,即平衡-打破平衡-重建平衡的发展过程。低氧时,交感-肾上腺髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统功能先亢进,使肾素分泌增多,血浆 Ang II 的水平亦升高;但随着低氧的持续,交感-肾上腺髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统功能受到抑制,使肾素分泌减少,血浆 Ang II 的水平亦随之下降。因此,Ang II 水平的升高和下降,对缺血缺氧性脑损伤可能有保护作用,Ang II 参与了缺氧性脑损伤的病理过程。

目前,关于 ACE 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在 IS 的发生发展过程中是否存在协同作用的研究不多。本研究结果表明,与相应对照组比较,携带有 DD 基因型和 D 等位基因的吸烟、酗酒群体中病例组和伴糖尿病群体的 OR 值大于 1,而携带有 II 基因型的 OR 值则小于 1;相反,非吸烟、非酗酒和不伴糖尿病群体 ACE 基因的各基因型和等位基因频率的分布与相应对照群体比较,差异均无显著性,提示携带有 D 等位基因的吸烟、酗酒和伴糖尿病群体易患 IS,但携带有 I 等位基因的吸烟、酗酒和伴糖尿病群体则不易患 IS,ACE 基因与吸烟、酗酒、糖尿病在 IS 的发病过程中存在协同作用,这与既往的研究结果^[7,8]是一致的,但其机制尚不明确。本研究结果表明,ACE 基因可能通过影响 AS 从而引起 IS,而

吸烟、酗酒亦可以导致 AS,糖尿病可以引起血管病变,故它们可能在 AS 这一环节上起协同作用;另外,ACE 基因的 DD 型可引起血浆 ACE 水平升高,从而可能导致高血压,而酗酒也可以引起高血压,故我们猜测它们在高血压这一环节上亦可能起协同作用。具体的机制仍有待进一步研究。另外,通过戒烟、戒酒,积极有效控制血糖,降低血黏度,改善微循环,尤其是对于携带有危险基因型(如 DD、ID 基因型)的群体,也许可以抑制 IS 的发生发展,甚至复发。

参考文献:

- 1 Sharma P. Meta-analysis of the ACE gene in ischemic stroke [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998, 64(2): 227-230.
- 2 周述旺,李广顺,屈会起,等. 中国人脑梗死 ACE 基因插入/缺失多态性的 Meta-分析 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(8): 454-456.
- 3 李才明,张成,邱淑莲,等. ACE-1 基因多态性与缺血性脑卒中的遗传易感性研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(2): 137-139.
- 4 王新德. 各类脑血管病诊断要点 [J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.
- 5 Kolominsky-Rabas P L, Weber M, Gefeller O, et al. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes, a population-based study [J]. Stroke, 2001, 32(12): 2735-2740.
- 6 中华糖尿病杂志编辑部. 高血压诊断标准和治疗达标水平 [J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(6): 422.
- 7 Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, et al. Cumulative effect of predisposing genotypes and their interaction with modifiable factors on the risk of ischemic stroke in young adults [J]. Stroke, 2005, 36(3): 533-539.
- 8 杨政权,汪培山. 吸烟、饮酒与脑出血的配对病例对照研究 [J]. 疾病控制杂志, 1999, 3(2): 101-102.
- 9 吴婉芳,徐放生. 建立新生儿缺氧缺血性脑病动物模型 [J]. 新生儿科杂志, 1992, 7(6): 265-267.
- 10 Catto S, Carter A M, Barrett J H, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease [J]. Stroke, 1996, 27(3): 435-440.
- 11 林江凯,王宪荣. 急性颅内压增高犬的血管紧张素转换酶的变化 [J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(11): 647-649.
- 12 Arribas S M, Gordon J F, Daly C J, et al. Confocal microscopic characterization of a lesion in a cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat [J]. Stroke, 1996, 27(6): 1118-1122.
- 13 Siragy H M, Carey R M. Angiotensin type-2 receptors: potential importance in the regulation of blood pressure [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(1): 99-103.

(收稿日期:2007-01-31 修回日期:2007-05-28)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

国家一级学会核心期刊,邮发代号:6-38,每期 8.6 元,全年 103.2 元