

新疆维吾尔族冠心病 ACE、eNOS 和 FVII 及 ICAM-1 基因的多态性研究

阿不都热依木·玉苏甫¹, 阿衣木姑·阿布拉¹, 阿尼湾·依拉音², 哈木拉提·吾甫尔¹

1. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学研究生院, 乌鲁木齐 830011

摘要 研究了解新疆维吾尔族冠心病患者血管紧张素转换酶(ACE)基因、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因、凝血因子 VII(FVII)基因、细胞黏附分子-1(ICAM-1)基因等的多态性变化。入选已确诊的维吾尔族冠心病患者 124 例和维吾尔族健康志愿者 50 例, 采用聚合酶链式反应-限制性片段多态性(PCR-RFLP)方法, 分别检测及比较维吾尔族冠心病患者及健康志愿者 4 种基因型及其等位基因频率。结果显示, 冠心病组与健康对照组相比, ACE 基因、FVII 基因、ICAM-1 基因在基因型及等位基因频率方面均无显著性差异 ($P>0.05$); 冠心病组在 eNOS 基因型和等位基因频率分布两方面与健康对照组比较, 均有显著性差异 ($P<0.05$)。结论为 ACE 基因、FVII 基因、ICAM-1 基因多态性与新疆维吾尔族冠心病患者的关系不明显, 而 eNOS 基因多态性与维吾尔族冠心病患者有相关性。

关键词 维吾尔族冠心病; ACE 基因; eNOS 基因; FVII 基因; ICAM-1 基因

中图分类号 R541.4, Q78

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)23-0076-06

The Gene Polymorphism of ACE, eNOS, FVII and ICAM-1 Genes in Uighur Patients with Coronary Heart Disease in Xinjiang

YUSUP Abdiryim¹, ABLA Ayimgul¹, IBRAYIM Anwar²,
UPUR Halmurat¹

1. Faculty of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical
University, Urumqi 830011, China

2. Collage of Graduate Student, Xinjiang Medical University,
Urumqi 830011, China

Abstract The gene polymorphism of Angiotensin -Converting Enzyme (ACE) gene, Nitric Oxide Synthase (eNOS) gene, coagulation Factor VII (FVII) gene and Intercellular Cell Adhesion Molecules-1 (ICAM-1) in Uighur patients with Coronary Heart Disease (CHD) in Xinjiang are studied in this paper. The four types of genes related to CHD are compared to each other by using polymerized chain

reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 124 cases of CHD Uighur patients and 50 healthy subjects as verified by diagnosis. The results show that there are no significant differences in genotype distribution and allele frequencies of ACE gene, FVII gene, ICAM-1 gene in Uighur patients with CHD when compared to healthy subjects ($P>0.05$). There are significant differences in genotype distribution and allele frequencies of eNOS gene in Uighur patients with CHD when compared to healthy subjects ($P<0.05$). There is no correlation in genotype distribution and allele frequencies of ACE gene, FVII gene, ICAM-1 gene in Uighur patients with CHD in Xinjiang. Significant correlation is discovered in genotype distribution and allele frequencies of eNOS gene in Uighur patients with CHD in Xinjiang.

Keywords Uighur patients with coronary heart disease; ACE gene; eNOS gene; FVII gene; ICAM-1 gene

0 引言

冠心病(Coronary Heart Disease, CHD)是当今威胁人类健康的主要疾病之一, 其发病率亦逐年上升。CHD 是多种环境因素和遗传因素相互作用所致的多因素疾病, 随着分子遗传学的飞速发展, 越来越多的研究表明, 遗传基因与 CHD 的发

收稿日期: 2009-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660237); 国家杰出青年科学基金项目(30525023); 国家中医药管理局中医科技专项(06-07MZ14)

作者简介: 阿不都热依木·玉苏甫, 研究员, 研究方向为维吾尔医药学的现代研究, 电子信箱: ayusup@126.com; 哈木拉提·吾甫尔(通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S253002398M), 教授, 研究方向为维吾尔医药学的现代研究, 电子信箱: halmurat@263.net



病及预后有密切关系。血管紧张素转换酶(ACE)基因的多态性通过调控人体血管内皮功能而影响 CHD 临床表现的形[1-2]。近来有研究表明,对内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因第 7 个外显子编码的 298 位谷氨酸-天冬氨酸 (Glu-298Asp, G-T 颠换)的错义突变,可引起 eNOS 的构象改变,由螺旋结构变为紧密折叠[3],使其功能受到影响,导致了 NO 合成的下降,从而在 CHD 的发病过程中起到一定的作用。凝血因子 VII(FVII)基因多态性通过调控人体凝血过程而影响 CHD 的临床证型的形成[4]。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)基因外显子 6 469 编码处碱基 C 变异为 T 引起的谷氨酸变为赖氨酸是 CHD 和心肌梗塞的危险因素[5]。本研究以新疆维吾尔族 CHD 患者作为研究对象,对 CHD 患者 ACE 基因、FVII 基因、eNOS 基因及 ICAM-1 基因等基因的多态性进行研究,并阐明以上相关基因多态性在维吾尔族 CHD 患者中的分布特点及其在发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 纳入标准

受试的 CHD 患者须符合西医诊断标准和维医体液辨证分型标准,同时具备以下条件:① 年龄在 40~75 岁;② 新疆地区出生并常住;③ 维吾尔族;④ 彼此无血缘关系。

1.1.2 排出标准

① 严重高血压、糖尿病、恶性肿瘤及肝肾疾病、甲状腺病;② 下列各种心脏病: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;③ 肝炎、结核、艾滋病等传染病;④ 精神系统疾病。

1.1.3 病例选择

CHD 患者 124 例,来自 2007 年 3 月至 2008 年 9 月新疆维吾尔自治区维吾尔医院和喀什地区第二人民医院门诊及住院患者,其中男 63 人,女 61 人,年龄在 42~65 岁,平均年龄 52.16(±6.75)岁。正常对照组 50 例,经体检均无心、肺、肝、肾等疾病的健康人,均为生活在新疆的维吾尔族,其中男 25 人,女 25 人,年龄在 41~52 岁,平均年龄 48.25(±6.71)岁。

1.2 主要仪器

DYY-III-6 型低电压电源电泳仪,DYY-III-32 水平电泳槽(北京六一仪器厂);PE480 型 PCR 仪(美国 Perkin-Elmer 公司);DU640 核酸分析仪(美国 Beckman Counter 公司);M-15E 紫外透射仪(美国 UVP 公司);Polaroid 摄影机(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 主要试剂

TIANamp Blood DNA Kit 提取试剂盒(北京奥科生物技术有限责任公司);50 bp DNA Ladder,100 bp DNA Ladder(宝生物工程大连有限公司);ACE 引物、FVII 引物、ICAM-1 引物、eNOS 引物(宝生物工程大连有限公司);TaKaRa Taq PCR 试剂盒、溴化乙啶(宝生物工程大连有限公司);MspI 限制性内

切酶、Hin6I 限制性内切酶、AccII 限制性内切酶、BanII 限制性内切酶(宝生物工程大连有限公司);琼脂糖,BIOWEST。

1.4 研究方法

1.4.1 基因组 DNA 提取

按照 TIANamp Blood DNA Kit 提取试剂盒操作要求提取基因组 DNA。

1.4.2 ACE 基因多态性检测

1) 引物合成:上游引物 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' 和下游引物 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'。

2) 目的基因扩增:PCR 扩增体系为 25 μL,包括基因组 DNA 1 μL,10×Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,5 U/μL Taq 酶 0.125 μL,20 mmol/L 浓度的上下游引物各 1 μL。扩增条件设置为预变性 94℃,变性 5 min,第 1 个循环 94℃变性 1 min,58℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像仪成像基因型。

1.4.3 eNOS 基因多态性检测

1) 引物合成:上游引物 5'-TCC CTG AGG AGG GCA TGA GGC-3' 和下游引物 5'-TGA GGG TCA CAC AGG TTC CT-3'。

2) 目的基因扩增:PCR 扩增体系为 25 μL,包括基因组 DNA 1 μL,10×Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,5 U/μL Taq 酶 0.125 μL,20 mmol/L 浓度的上下游引物各 1 μL。扩增条件设置为预变性 94℃变性 5 min,第 1 个循环为 95℃变性 1 min,64℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,72℃延伸 5 min。PCR 产物为 457 bp,经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像仪成像基因型。

3) 基因型检测:限制性酶切反应体系为 20 μL,包括 PCR 产物 18 μL,BanII 内切酶 10 U,10×Buffer 2 μL,37℃酶切 16 h。酶切产物经 2.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳带并照像,观察基因型。

1.4.4 FVII 基因多态性检测

1) 引物合成:上游引物 5'-GGG AGA CTC CCC AAA TAT CAC-3',下游引物 5'-ACG CAG CCT TGG CTT TCT CTC-3'。

2) 目的基因扩增:PCR 扩增体系为 25 μL,包括基因组 DNA 1 μL,10×Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,5 U/μL Taq 酶 0.125 μL,20 mmol/L 浓度的上下游引物各 1 μL。扩增条件设置为预变性 94℃变性 4 min。第 1 个循环为 94℃变性 3 min,60℃复性 1 min,72℃延伸 1 min 10 s。以后每个循环为 94℃变性 1 min,60℃复性 1 min,72℃延伸 1 min 10 s,共 29 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物为 312 bp,经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像仪成像基因型。

3) 基因型检测:限制性酶切反应体系为 20 μL,包括 PCR 产物 18 μL,MspI 内切酶 10 U,10×Buffer 2 μL,37℃酶切





研究,因为至今尚无有关这方面的研究报道。本研究表明,与健康对照组相比,CHD 组在 *FVII* 基因型和等位基因频率分布方面均无显著性差异($P>0.05$)。说明 *FVII* 基因 M1M2 基因型及 M1 等位基因与新疆维吾尔族 CHD 没有相关性。

ICAM-1 基因表达的上调在冠心病的发生、发展中可能起着重要的作用。Jiang 等^[5]首次研究发现,*ICAM-1* 基因 C469T (E469K)多态性与德国人冠心病和心肌梗塞相关。该研究入选了 349 例经冠状动脉造影确诊的 CHD 患者(其中包括 179 例急性心肌梗塞患者)和 213 例经冠状动脉造影正常的对照,结果表明 *ICAM-1* 基因 E469K 多态性与冠心病和心肌梗塞的危险性相关。Lawson 等^[19]构建了每种 *ICAM-1* 基因多态变异体 cDNA,并转染到 Cos7 细胞中,用抗 *ICAM-1* 细胞外结构域不同抗原决定簇的多克隆抗体检测,结果表明 *ICAM-1* 基因 G241R/E469K 多态性与 *ICAM-1* 介导的白细胞和内皮细胞之间的黏附作用的改变有关,G/E 基因型可以引起黏附作用增强。饶丹等^[20]报道,*ICAM-1* 基因 C469T 多态性与 CHD 密切相关,T 等位基因可能是 CHD 发病的遗传易感基因,黏附分子 *ICAM-1* 基因多态性可能引发和促进血管等的炎症反应和免疫反应,导致 CHD 的发生、发展。本研究表明,与健康对照组相比,CHD 组在基因型和等位基因频率分布两方面均无显著性差异($P>0.05$),提示 *ICAM-1* 基因 TT 基因型及 T 等位基因与新疆维吾尔族 CHD 未观察到其相关性。

4 结论

综上所述,新疆维吾尔族 CHD 组与健康对照组相比,*ACE* 基因、*FVII* 基因、*ICAM-1* 基因在基因型和等位基因频率分布方面均无显著性差异;维吾尔族 CHD 在 *eNOS* 基因型和等位基因频率分布两方面与健康对照组比较,均有显著性差异。提示 *ACE* 基因、*FVII* 基因、*ICAM-1* 基因多态性与新疆维吾尔族 CHD 之间的关系不明显,而 *eNOS* 基因多态性与新疆维吾尔族 CHD 患者有相关性。

参考文献 (References)

- [1] Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase1)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(6): 1433-1450.
- [2] 赵鹏,曲秀芬,苗润芳,等.血管紧张素-1 转换酶基因多态性与急性心肌梗塞的相关性研究[J]. *中国急救医学*, 2002, 22(8): 444-446.
Zhao Juan, Qu Xiufen, Miao Runfang, et al. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 2002, 22(8): 444-446.
- [3] Miyamoto Y, Saito Y, Kaj Iyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension[J]. *Hypertension*, 1998, 32(1): 3-8.
- [4] Green F, Kelleher C, Wilkes H, et al. A common genetic polymorphism associated with low coagulation factor FVII levels in healthy individuals [J]. *Arterioscler and Thromb*, 1991, 11: 540-546.
- [5] Jiang H, Klein R M, Niederacher D, et al. C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*,

- 2002, 84: 171-177.
- [6] 黄献平,袁肇凯,谭光波,等.冠心病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.
Huang Xianping, Yuan Zhaokai, Tan Guangbo, et al. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2007, 48(1): 65-68.
- [7] Nassar B A, Dunn J, Title L M, et al. Relation of genetic polymorphisms of apolipoprotein E, angiotensin converting enzyme, apolipoprotein B-100, and glycoprotein IIIa and early-onset coronary heart disease [J]. *Clin Biochem*, 1999, 32(4): 275-282.
- [8] 艾力曼·马合木提,迪丽努尔,卡丽毕努尔,等.新疆维吾尔族血管紧张素转换酶 I/D 基因多态性与冠心病关系的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(12): 1143-1143.
Mahemuti Ailiman, Dilinuer, Kalibinuer, et al. *Chinese J Cardiol*, 2004, 32(12): 1143-1143.
- [9] Homler S H, Bickeboller H, Hengstenberg C, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and myocardial infarction a large association and linkage study [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003, 36(6): 955-962.
- [10] van Bockxmeer F M, Mamotte C D, Bruke V, et al. Angiotensin converting -enzyme gene polymorphism and premature coronary heart disease[J]. *Clin Sci*, 2000, 99: 247-251.
- [11] Suzuki T, Okumura K, Sone T, et al. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stentrestenosis[J]. *Int J Cardiol*, 2002, 86(1): 71-76.
- [12] Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese[J]. *Hum Genet*, 1998, 103(1): 65-69.
- [13] 石燕昆,杨丽霞,齐峰,等.内皮型一氧化氮合酶基因 Glu98Asp 多态性与冠心病及冠脉狭窄程度的关系 [J]. *西南国防医药*, 2009, 19(4): 371-373.
Shi Yankun, Yang Lixia, Qi Feng, et al. *Xinnan National Defence Medicine*, 2009, 19(4): 371-373.
- [14] Wang C L, Hsu L A, Ko Y S, et al. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese [J]. *J Formos Med Assoc*, 2001, 100: 736-740.
- [15] Tired L, Rigat B, Visviks S, et al. Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I. Converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE [J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 51: 197-205.
- [16] 陶蓉,于金德,陆林,等.中国人群凝血因子 VII 与心肌梗塞的关系 [J]. *临床心血管病杂志*, 2000, 16(1): 15-17.
Tao Rong, Yu Jinde, Lu Lin, et al. *J Clin Cardiol*, 2000, 16(1): 15-17.
- [17] 蔡强军,陈纪林,袁家颖,等.凝血因子 VII 及其基因多态性与心肌梗塞危险性的研究[J]. *中国循环杂志*, 2000, 15(2): 75-77.
Cai Qiangjun, Chen Jilin, Yuan Jiaying, et al. *Chinese J Circulation*, 2000, 15(2): 75-77.
- [18] 黄献平,袁肇凯,毛以林,等.冠心病血瘀证凝血因子 VII 基因多态性的检测分析[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2006, 4(2): 97-99.
Huang Xianping, Yuan Zhaokai, Mao Yilin, et al. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease*, 2006, 4(2): 97-99.
- [19] Lawson C, Holder A, Rose M. Effect of ICAM21 polymorphism endothelial cells in vitro[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2004, 13(3): S112.
- [20] 饶丹,姜红,曾秋棠,等.黏附分子 *ICAM-1* 基因 C469T 多态性与冠心病的关系[J]. *临床心血管病杂志*, 2005, 21(11): 648-650.
Rao Dan, Jiang Hong, Zeng Qiutang, et al. *J Clin Cardiol* 2005, 21(11): 648-650.

(责任编辑 李慧政)