

证的研究 ·

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

黄献平 袁肇凯 谭光波 毛以林 卢芳国 胡志希 田松 李杰 孙贵香

(湖南中医药大学中医诊断研究所, 长沙市韶山中路113号, 410007)

[摘要] **目的** 探讨血管紧张素转换酶(ACE)基因多态性与冠心病(CHD)心血瘀阻证候及血管紧张素Ⅱ(AgⅡ)的相关关系。**方法** 检测CHD心血瘀阻证组、CHD非心血瘀阻证组、非CHD心血瘀阻证组和健康人对照组ACE基因型(DD、ID、II)和等位基因(D、I)及AgⅡ活性。**结果** CHD心血瘀阻证组DD基因型和D等位基因的频率显著高于其他3组;4组中ACE基因DD型的AgⅡ活性比ACE基因II型显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);CHD心血瘀阻证组ACE基因DD型亦较ID基因型患者的AgⅡ活性显著增高(均 $P<0.01$)。两个心血瘀阻证组3个基因型的AgⅡ活性均明显高于健康人对照组($P<0.01$)。**结论** 提示ACE-DD基因型和D等位基因的频率增高可能与CHD心血瘀阻证有一定内在联系,可能与D等位基因导致AgⅡ异常增多有关。**[关键词]** 冠状动脉疾病;血瘀;血管紧张素Ⅱ;基因多态性

Detective Analysis on Gene Polymorphism of Angiotensin Converting Enzyme in Coronary Heart Disease Patients with Blood Stasis Syndrome

HUANG Xian-ping, YUAN Zhao-kai, TAN Guang-bo, et al.

(Institute of Chinese Medical Diagnostics, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007)

ABSTRACT **Objective** To study the relationship among polymorphism of angiotensin converting enzyme (ACE) gene, angiotensin Ⅱ (Ag Ⅱ) and coronary heart disease (CHD) with blood stasis syndrome. **Methods** Genotype (DD, ID, II), allele (D, I) of ACE and activity of Ag Ⅱ were detected in group of CHD with heart blood stasis syndrome, group of CHD without heart blood stasis syndrome, group of heart blood stasis syndrome without CHD and healthy control group. **Results** The frequency of DD type and D allele in group of CHD with heart blood stasis syndrome was higher than those in other three groups. Ag Ⅱ activity of DD type was higher than that of II type in four groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Ag Ⅱ activity of DD type was higher than that of ID type in group of CHD with heart blood stasis syndrome ($P<0.05$). Ag Ⅱ activity of three gene types in two groups of heart blood stasis syndrome was higher than that in healthy control group ($P<0.01$). **Conclusion** It is suggested that increasing frequency of ACE-DD type and ACE-D allele may be relevant to CHD with heart blood stasis syndrome, which may be related to abnormal increase of Ag Ⅱ due to D allele.

Key Words Coronary artery disease; Blood stasis; Angiotensin Ⅱ; Polymorphism of gene

近年来研究认为,冠心病(CHD)为有明显遗传倾向的多基因疾病,其中血管紧张素转换酶(ACE)基因的多态性通过调控人体血管内皮功能而影响CHD临床表现的形成^[1,2]。但ACE基因多态性与CHD心血瘀阻证形成的相关性如何,是否为CHD“血瘀”病理的相关基因,尚值得深入研究。因此,本项目以CHD患者为研究对象,运用分子流行病学的群体关联分析,研究ACE基因多态性与CHD心血瘀阻证候及血管紧张素Ⅱ(AgⅡ)的相关关系,以期对CHD中医辨证提供分子生物学的依据。

1 研究资料

CHD患者330例、健康人100人均来自对冶金部长沙冶金研究设计院、长沙市砂子塘社区、湖南省韶光电子管厂、湖南省水文队及湖南省畜牧研究所等单位进

行的流行病学调查。所有受试者年龄40~75岁,均为湖南地区出生的汉族人,彼此之间无血缘关系。

CHD诊断标准参照1979年国际心脏病学会和协会及世界卫生组织临床命名标准化联合专题组报告^[3]及第一届全国内科学术会议心血管病专业组关于CHD命名及诊断标准的建议^[3]制定。心血瘀阻证辨证标准参照《中医病证诊断疗效标准》^[3]及国家中医药管理局胸痹急症组和中国中医药学会内科学会心病专业委员会制定的《中医心病诊断疗效标准与用药规范》^[4]中“心血瘀阻证”的辨证标准。

430例受检者临床分为4组:(1)CHD心血瘀阻证组:112例,其中男性50例,女性62例;平均年龄(62.79 ± 7.24)岁。(2)CHD非心血瘀阻证组:108例,其中男性51例,女性57例;平均年龄(63.21 ± 7.82)岁。(3)非CHD心血瘀阻证组:110例,其中男性50例,女性60例;平均年龄(61.27 ± 7.38)岁。(4)健康人对照组:100人,

其中男性45人,女性55人;年龄(60.09±5.84)岁。经统计学分析,4组在性别、年龄方面比较差异无显著性意义(均 $P>0.05$)。

2 研究方法

2.1 ACE 基因多态性检测

2.1.1 血样采取 采血前禁食12小时,于清晨8时空腹坐位左肘前静脉取血,其中2ml以2%EDTA Na₂ [2%EDTA Na₂ 采血=1采(v/v)]抗凝。

2.1.2 DNA 提取 参照《分子克隆指南》^[5],逐步完成溶血、水解、抽提、沉淀、洗涤、干燥、溶解等步骤,取10μl电泳检测,余存4℃冰箱备用。

2.1.3 DNA 检测 取5μl抽提的DNA,用核酸分析仪测定其260nm(OD₁)和280nm(OD₂)的光密度值,检测DNA浓度;取5μl DNA,1%琼脂糖电泳检测DNA纯度。

2.1.4 聚合酶链反应(PCR)引物扩增 (1)引物设计:参照Rigat方法^[1],由上海申友生物有限公司合成。引物1:5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3';引物2:5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'。(2)反应体系:DNA模板5μl(100~200ng);10MM dNTPs 1μl(160mmol/L);引物1 25pmol;引物2 25pmol;25mmol MgCl₂ 4.5μl;10倍缓冲液5μl;Taq酶2U。总反应体积50μl。(3)反应参数:摇匀,离心,加石蜡油20μl,置PCR仪上,94℃变性5分钟,80℃加入Taq酶2μl。每个循环为94℃变性1分钟,58℃复性1分钟,72℃延伸1分钟30秒,共30个循环,72℃延伸10分钟。反应完毕,取出PCR产物,放置4℃保存待测。每次PCR均设置阴性对照,反应体系同上,不加DNA模板,加去离子水5μl,循环参数同上。(4)PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测:制备1.2%琼脂糖电泳(含溴乙锭0.5μg/ml),取PCR产物5μl加上样液1μl,加入上样孔。以79V、8mA,电泳1.5小时。取出凝胶,紫外光观察结果并摄影。(5)PCR产物鉴定及分型:位于ACE基因第16内含子内的I/D基因多态性经PCR扩增出两种DNA片段。一种是490bp长的插入片段,它的ACE基因中第16内含子存在287bp长的Alu重复序列;另一

种是缺乏这一Alu序列的190bp长的缺失片段。这两种片段共组成3种基因型。分型方法如下:缺失型(DD) 190bp,插入型(II) 490bp,插入/缺失型(I/D) 490bp/190bp。

2.2 Ag II 检测

肘静脉取血2ml,迅速注入放置在冰水浴中的酶抑制剂0.3mmol EDTA Na₂抗凝管中,摇匀,即刻4℃1000转/分离心5分钟,分离血浆。-20℃冰箱中保存,采用放射免疫法在冰浴中测定,严格按说明书操作。试剂盒由中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所提供。其灵敏度<10pg/ml,批内变异<15%,批间变异<10%。

2.3 统计学方法

用SPSS11.5软件包,根据分子流行病学要求,基因型、基因分布频率及不同基因型间相对危险度比较采用 χ^2 检验。相关基因与CHD心血瘀阻证及Ag II的相关性用Multinomial Logistic模型分析。

3 结果

3.1 ACE 基因型分布 Hardy-Weinberg 平衡检验

在430例受检者中,DD型132例,ID型239例,II型59例;D等位基因频率58.49%,I等位基因频率41.51%。经 χ^2 检验,本研究中ACE基因型分布频率的观测值与预期值差异无显著性意义($P>0.10$),符合Hardy-Weinberg平衡,说明本项研究的样本来自一个较大的、处于随机婚配平衡状态的群体。

3.2 各组 ACE 基因 I/D 多态性分布比较

表1示,4组的基因型(DD、ID、II)及等位基因(D、I)经R×C的 χ^2 检验,差异均有显著性意义($P<0.01$)。各基因型、等位基因比较,CHD心血瘀阻证组DD基因型和D等位基因的频率显著高于CHD非心血瘀阻证组、非CHD心血瘀阻证组和健康人对照组,而健康人对照组II基因型的频率明显高于CHD心血瘀阻证组、CHD非心血瘀阻证组和非CHD心血瘀阻证组。

3.3 各组总的及不同 ACE 基因型 Ag II 活性比较

表2示,与CHD非心血瘀阻证组、非CHD心血瘀

表1 4组 ACE 基因型、等位基因检测值比较[例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		DD	ID	II	D	I
CHD 心血瘀阻证组	112	54(48.21) **△▲▲	55(49.11) ▲▲	3(2.68) **△▲	163(72.77) **△▲▲	61(27.23)
CHD 非心血瘀阻证组	108	25(23.15)	73(67.59) **	10(9.26) **	123(56.94) *	93(43.06)
非 CHD 心血瘀阻证组	110	33(30.00)	61(55.45)	16(14.55) **	127(57.73) **	93(42.27)
健康人对照组	100	20(20.00)	50(50.00)	30(30.00)	90(45.00)	110(55.00)

与健康人对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与非CHD心血瘀阻证组比较, △ $P<0.01$;与CHD非心血瘀阻证组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$

表2 4组总的及不同 ACE 基因型的 Ag II 活性比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Ag II	DD 型	ID 型	II 型
CHD 心血瘀阻证组	112	67.20 $\pm$ 30.88 * $\triangle\triangle\blacktriangle$	71.57 $\pm$ 24.39 (54) * $\triangle\blacktriangle$	63.31 $\pm$ 18.67 (55) * $\blacktriangle\blacktriangle$	54.19 $\pm$ 17.60 (3) * $\blacktriangle\blacktriangle$
CHD 非心血瘀阻证组	108	52.01 $\pm$ 17.66 **	54.23 $\pm$ 12.46 (25)	52.86 $\pm$ 20.90 (73)	40.21 $\pm$ 15.14 (10) $\blacktriangle\blacktriangle$
非 CHD 心血瘀阻证组	110	56.68 $\pm$ 23.43 **	60.31 $\pm$ 17.48 (33) **	58.43 $\pm$ 24.06 (61) **	42.51 $\pm$ 14.67 (16) * $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$
健康人对照组	100	41.43 $\pm$ 13.58	46.84 $\pm$ 16.74 (20)	46.14 $\pm$ 16.86 (50)	29.98 $\pm$ 11.71 (30) $\blacktriangle\blacktriangle$

与健康人对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与非 CHD 心血瘀阻证组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$; 与 CHD 非心血瘀阻证组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与本组内 DD 型比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 表中括号内为例数

阻证组、健康人对照组相比, CHD 心血瘀阻证组 Ag II 活性显著增高 ($P < 0.01$); CHD 非心血瘀阻证组、非 CHD 心血瘀阻证组较健康人对照组明显增高 (均 $P < 0.01$), 但两组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3个基因型受检者的 Ag II 值均呈现 II < ID < DD 的趋势; 而4组的 Ag II 值均呈现健康人对照组 < CHD 非心血瘀阻证组 < 非 CHD 心血瘀阻证组 < CHD 心血瘀阻证组的趋势。4组中 ACE 基因 DD 型的 Ag II 活性比 ACE 基因 II 型显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); CHD 心血瘀阻证组 ACE 基因 DD 型的 Ag II 活性亦较 ID 基因型显著增高 ($P < 0.05$)。CHD 心血瘀阻证组和非 CHD 心血瘀阻证组3个基因型的 Ag II 活性均明显高于健康人对照组 ($P < 0.01$)。

4 讨论

CHD 是一种多基因疾病, 涉及多个基因的变异, 并与特定环境密切相关。研究表明, 其危险因素中年龄、缺乏体力活动、吸烟、精神压力、饮食、药物为非遗传因素, 而高血压、糖尿病、肥胖、脂质异常、CHD 家族史、A 型行为等为遗传因素。1992年 Cambien 等^[6]首次报道了 ACE 基因 DD 型在心肌梗死患者中分布频率明显高于对照组后, 不同国家的研究者对 ACE 基因多态性与 CHD 的相关性进行了广泛的研究。认为 ACE 基因的多态性在 CHD 的发病中为一种独立的危险因素, 与吸烟、高血压、肥胖、年龄等无明显的相关性^[7,8]。

人类基因组 DNA 只有一个 ACE 基因拷贝, 近年已发现数种 ACE 多态标志, ACE 基因第16内含子有一个287bp 的插入和缺失的多态性, 分别为 I 等位基因和 D 等位基因, 从而产生3个不同的基因型, 即 II、ID 和 DD 基因型。一些研究认为, ACE 基因多态性不仅与心肌梗死相关, 而且 DD 基因型可增加 CHD 的危险性。国内的许多研究也表明, ACE 基因多态性与汉族人 CHD 的发生有同样的相关性, 尤其与 ACE 基因 I/D 多态性密切相关^[9,10]。

关于 CHD 中医证型与 ACE 基因 I/D 多态性的关系, 国内少见报道。中医研究认为, CHD 基本病机为心脉瘀阻, 心血瘀阻证是 CHD 最常见的证型之一。在中医心病证候遗传流行病学研究中, 通过对54名 CHD

心血瘀阻证先证者家系和54例健康人进行家系遗传分析, 结果显示, CHD 心血瘀阻证与亲代双方患病有因果关系, CHD 心血瘀阻证可能是一种具有遗传倾向的“多基因证”^[11], 且可能与 ACE 基因多态性相关^[12]。本项目对心血瘀阻证的研究显示, ACE 各基因型、等位基因比较, CHD 心血瘀阻证组 DD 基因型和 D 等位基因的频率均显著高于 CHD 非心血瘀阻证组、非 CHD 心血瘀阻证组和健康人对照组; 而健康人对照组 II 型基因的频率明显高于 CHD 心血瘀阻证组、CHD 非心血瘀阻证组和非 CHD 心血瘀阻证组。提示 ACE-DD 基因型和 D 等位基因的频率增高, 可能与 CHD 心血瘀阻证有一定内在联系, ACE-DD 基因多态性与 CHD 心血瘀阻的严重程度相关。

近年来的研究表明, Ag II 对动脉粥样硬化的内皮损伤以及血管收缩升高血压起着重要作用^[13]。本研究亦显示3个基因型受检者的 Ag II 值均呈现 II < ID < DD 的趋势; 而4组的 Ag II 值均呈现健康人对照组 < CHD 非心血瘀阻证组 < 非 CHD 心血瘀阻证组 < CHD 心血瘀阻证组的趋势。4组中 ACE 基因 DD 型的 Ag II 活性比 II 型显著增高, CHD 心血瘀阻证组和非 CHD 心血瘀阻证组3个基因型的 Ag II 活性均明显高于健康人对照组。ACE 基因的多态性主要作用于血管水平, D 等位基因可使血管周围组织和血液循环中的 ACE 水平增加, 后者在内皮细胞表面将 Ag I 转化为 Ag II, 从而引起局部 Ag II 的活性增加, 缓激肽失活。缓激肽作用于内皮的 β_2 -激肽受体, 使 NO 浓度增加。同时 Ag II 作用于内皮素-1受体, 促进内皮素释放。内皮素、Ag II 均为缩血管活性物质, 可使血管长期或暂时痉挛, 从而导致心肌梗死或心肌病的发生^[14]。因此, 目前认为 ACE 基因多态性中 D 等位基因导致 Ag II 长期异常增多是引起 CHD 心血瘀阻证的病理生理基础之一。ACE 基因多态性中 D 等位基因与心血瘀阻证的关系可能与 D 等位基因导致 Ag II 长期异常增多有关。

参考文献

[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 carboxypeptidase 1). 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.中国急救医学,2002,22(8):444~446.
- [3]贝政平主编.内科疾病诊断标准.北京:科学出版社,2001:50~57.
- [4]沈绍功,王承德,闫希军主编.中医心病诊断疗效标准与用药规范.北京:北京出版社,2002:1~179.
- [5]Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 著.金冬雁,黎正枫译.分子克隆指南.2版.北京:科学出版社,1992:463~469.
- [6]Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature, 1992, 359(6396):641~644.
- [7]Tiret 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(1):197~205.
- [8]Mattu RK, Needham EW, Galton DJ, et al. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. Circulation, 1995, 91(2):270~274.
- [9]苏伟,朱健华,张大东,等.血管紧张素转换酶基因多态性与CHD关系的研究.南通医学院学报,2002,22(2):145~148.
- [10]卢扬,屈会起.我国心肌梗塞患者ACE基因插入/缺失多态性Meta分析.临床荟萃,2002,17(4):192~194.
- [11]袁肇凯,黄献平,毛以林,等.心血瘀阻证遗传倾向的调查分析.湖南中医学院学报,2003,23(3):54~56.
- [12]施育平,单江,李迪元,等.我国汉族正常人血管紧张素转换酶基因多态性的观察.浙江医科大学学报,1999,28(1):12~15.
- [13]Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. Eur Heart J, 1997, 18(Suppl E):E19~E29.
- [14]乔人立.血管内皮细胞在循环系统中的功能作用.见:韩启德、文允镒主编.血管生物学.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:26~37.
- (收稿日期:2006-02-08;修回日期:2006-03-29)

百灵参麦散治疗不寐24例

石玉山

(北京步步先中医医院,北京市朝阳区成寿寺路郭家村,100078)

中医认为,不寐是由于情志不畅、饮食内伤、年迈体虚等原因引起心神失养、心神不安、心脾两虚、肝郁化火,从而导致经常不能获得正常睡眠为特征的一类病症。我们采用百灵参麦散治疗该病24例,取得较好疗效,现报道如下。

1 临床资料

本组24例均为门诊患者,其中男性11例,女性13例;年龄36~62岁,平均46.5岁;病程3个月~10年,平均6.5年。所有患者均符合中医不寐诊断标准,中医辨证属心脾两虚证,其中轻度5例,中度10例,重度9例。

2 治疗方法

所有患者均给予百灵参麦散治疗,处方:炒麦芽20g,山楂20g,丹参15g,百合10g,灵芝10g,桑椹10g,炒柏子仁10g,冬虫夏草3g。上述药物粉碎成粗粉。服用方法:每晚饭后1次,每次10g,沸水泡5~10分钟后饮用,60天为1个疗程。

3 治疗结果

3.1 疗效标准

临床痊愈:睡眠时间恢复正常或夜间睡眠时间>6小时,睡眠深沉,醒后精力充沛;显效:睡眠明显好转,睡眠时间增加≥3小时而≤6小时,睡眠深度增加;有效:症状减轻,睡眠时间较前增加不足3小时;无效:治疗后失眠无明显改善或反而加重者。

3.2 治疗结果

痊愈8例,显效9例,有效5例,无效2例。总有效率91.7%。

4 典型病例

患者吴某某女,10岁,2006年1月6日就诊。失眠5年,主要

表现为入睡困难,每晚10点左右服用地西洋10mg后上床休息,辗转反侧,睡卧不安,直到凌晨两点左右方能入睡,睡后多梦,似睡非睡,早上4点多钟即醒,每晚累计睡2~3小时。白天自觉乏力、记忆力减退、头晕头痛,脱发,月经量少,面色无光,时有饭后腹胀、纳差、不思饮食、大便溏泻,多方求治用药,疗效不佳。查体:舌质淡、苔白腻,脉沉滑无力,中医诊断:不寐(心脾两虚证)。治则:健脾和胃,消食化滞,养心安神。方用百灵参麦散。患者服用7天后,睡眠质量明显提高,做梦次数减少,每晚累计睡4~5小时,服用15天时地西洋片减为每次5mg,服用35天时停用地西洋片。治疗60天后停用百灵参麦散,患者每晚10点上床休息,25分钟左右即可入睡,很少做梦,凌晨因小便起夜一次,随即入睡,早上7点15分左右自然醒,每晚累计睡8~9小时,白天精神好,体力增强,面色红润,饮食正常,月经正常,二便调,舌质淡红,苔薄白,脉和缓有力。

5 讨论

不寐多由阴阳失调,阳不交阴所致,可分为正虚、邪实两证。虚证可涉及心、肝、脾、肾、胆、胃等诸脏腑,实证则以痰浊、火热、瘀血、食滞为病因。心脾两虚证是不寐中的常见证型,其病因病机为脾气不足,脾失运化,胃气失养致脾胃不和,胃气失降,宿食停滞;浊气上逆,气血生化无源则心血失养,夜不能寐。笔者以和胃化滞,养心安神为法,以山楂,麦芽消食化滞,和胃安神;百合、灵芝、柏子仁益气养阴、健脾安神;丹参、桑椹活血凉血、养心安神。本方配伍合理,可使阴阳平衡,脏腑功能和谐,达到治疗不寐之功效。