



醛固酮合成酶基因多态性与肥厚型心肌病相关性研究

肥厚型心肌病(HCM)是常染色体显性遗传性疾病,呈家族性或散发性发病,预后较差,首位死亡原因为猝死,占50%,主要死于恶性心率失常。目前认为HCM与多种基因突变有关,其中肾素-血管紧张素-醛固酮系统参与介导心肌细胞增殖,刺激心肌胶原合成和成纤维细胞增生,导致心肌肥厚和纤维化[1][2][3][4][5]。所以编码该系统的各个基因就成为研究心肌肥厚和HCM遗传基础的基因。本研究探讨醛固酮合成酶(CYP11B2)基因-344C/T多态性与HCM的关系,观察CYP11B2基因-344C/T多态性是否影响HCM肥厚基因型的表达。

1 对象和方法

1.1 研究对象

HCM组:选自我院心内科住院病人,符合HCM诊断标准(见下述超声诊断指标),排除其他心血管、内分泌及脑血管疾病,共15例,男10例、女5例,年龄(53.5 ± 16.4)岁。

正常对照组:随机选择我院门诊健康查体者,经询问病史、体检、实验室检查、心电图及X线检查,排除各类心血管、内分泌及脑血管等疾病,共18例,男11例、女7例,年龄(52.2 ± 15.4)岁。

1.2 实验材料

PCR反应缓冲液、脱氧核糖三磷酸(dNTP)、Taq DNA聚合酶、QIA amp DNA Kit均为Gene公司产品, HaeIII限制性内切酶、PUC19 DNA Marker为MBI公司产品, 100 bp DNA Marker为New England公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 测定性别、年龄、血压等指标

1.3.2 心室肥厚的检测 采用128 XP Acuson 超声心动图仪(美国Acuson公司),应用M型超声心动图,按Sahn等[6]描述的标准方法测量舒张末期室间隔厚度(IVST)和舒张末期心室后壁厚度(LVPWT),每个测量3次,取平均值。HCM诊断标准:IVST和LVPWT ≥ 12 mm且IVST:LVPWT $\geq 1.3:1$ 。

1.3.3 基因组DNA的提取 采用DNA Blood Mini Kit(Gene公司),按说明书进行操作。

1.3.4 CYP11B2 基因-344C/T多态性检测

1.3.4.1 引物的合成 根据Kupari等[7]提供的序列,由赛百盛公司合成引物。上游序列:5' CAG GAG GAG ACC CCA TGT GAC 3';下游序列:5' CCT CCA CCC TGT TCA GCC C 3'。

1.3.4.2 目的基因扩增 PCR反应体系30 μ l,含有10 \times Buffer 3 μ l, 25 mmol/L的MgCl₂ 1.2 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.6 μ l, 上游引物和下游引物各1 μ l, Taq DNA聚合酶1 U, 灭菌去离子水22.2 μ l, DNA模板1 μ l。扩增条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min后,进入94 $^{\circ}$ C变性60 s, 68 $^{\circ}$ C退火60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 共35个周期,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶及100 V电压持续电泳30 min。紫外灯下观察电泳带。

1.3.4.3 基因型检测 限制性酶切反应体系30 μ l,包含PCR扩增产物10 μ l, HaeIII 内切酶1 μ l, 10 \times Buffer 3 μ l, 灭菌去离子水16 μ l。酶切条件为37 $^{\circ}$ C 2 h。产物经2.5%琼脂糖凝胶及70 V电压电泳2.5

h. 紫外灯下观察电泳带，进行基因型分析。

1.4 统计学分析

应用SPSS统计软件(2000年版)对资料进行分析处理：各临床参数组间比较采用ANOVA分析，基因型及等位基因频率分布采用卡方检验。

2 结果

2.1 HCM组和对照组临床特征的比较

两组间性别构成、年龄及血压均无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 CYP11B2基因-344C/T多态性分析

CYP11B2基因全长537 bp(图1)，其变异是在转录调节区-344部位发生胸腺嘧啶(T)与胞嘧啶(C)的互换，即T344C。因-344T等位基因缺乏存在于-344C等位基因上的HaeIII 酶切位点，所以，酶切后产生202 bp的片段，即CC型；若不含酶切位点则产生273 bp的片段，即TT型；酶切后产生202和273 bp片段为CT型。各基因型均含有多个小片段(图2)，与国外文献报道一致[7]。

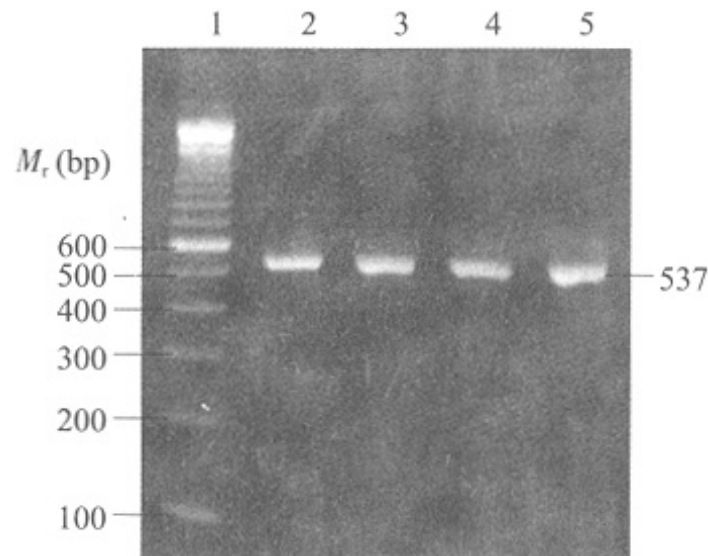


图1 PCR扩增CYP11B2基因的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of CYP11B2 gene amplified by PCR
Lane 1: 100 bp DNA marker; Lane 2-5: CYP11B2 gene (537 bp)

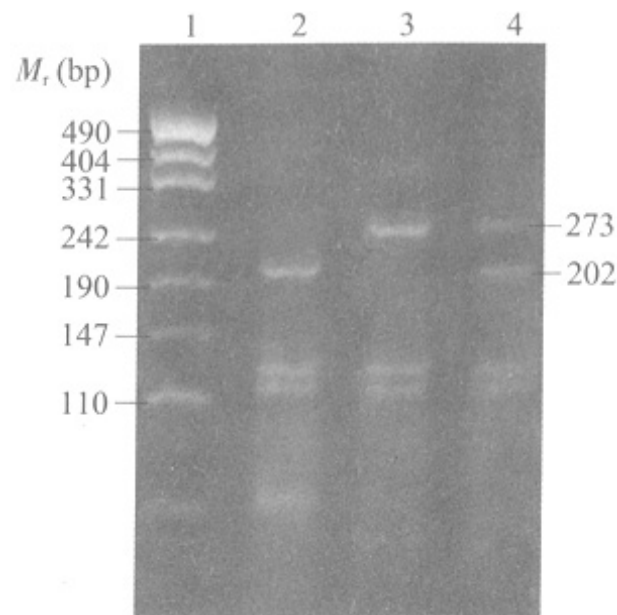


图2 CYP11B2基因-344C/T多态性的电泳图

Fig.2 Electrophoresis of CYP11B2 gene -344C/T polymorphism

Lane 1: PUC19 DNA marker; Lane 2: CC genotype (202 bp); Lane 3: TT genotype (273 bp); Lane 4: CT genotype (273+202 bp)

2.3 HCM组和对照组CYP11B2基因型和等位基因频率比较

HCM组CYP11B2基因-344C/T多态性与对照组相比, CT基因型分布有显著性差异($P < 0.05$, 表1)。

表1 HCM组与对照组间CYP11B2和等位基因频率的比较

Tab.1 CYP11B2 genotype and allele frequencies in HCM and control groups

	Control group (n=18)	HCM group (n=15)	P
Genotype frequency			
TT	10 (0.56)	4 (0.27)	0.095
CT	7 (0.39)	11 (0.73)	0.048
CC	1 (0.05)	0 (0.00)	
Allele frequency			
C	9 (0.25)	11 (0.37)	0.304
T	27 (0.75)	19 (0.63)	

HCM: Hypertrophic cardiomyopathy

3 讨论

CYP11B2是醛固酮合成的关键酶,它是一种线粒体内细胞色素p450氧化酶,主要分布在肾上腺皮质球状带,相应的基因位于8号染色体上(8q22),CYP11B2与一个编码类固醇11 β -羟化酶的相关基因相邻。11 β -羟化酶是皮质醇生物合成所需要的酶,CYP11B2有两种常见的基因变异:一是转录调节区在-344部位,一个被公认为steroidogenic factor-1结合位点,发生胞嘧啶与胸腺嘧啶的互换;另一个变异为发生在第2个内含子的一种基因变换[8]。血浆醛固酮水平不仅受血容量、血钾水平及肾素-血管紧张素系统活力影响,而且受CYP11B基因-344C/T多态性的影响。不同种族其多态性分布不同,日本正常人群T和C等位基因频率分别为0.68和0.32[9],与我国正常人群一致[10],而高加索白人正常人群T和C等位基因频率分别为0.53和0.47[11]。

关于肾素-血管紧张素-醛固酮系统内各基因多态性与HCM的关系,日本人研究得较多。Ishanov等[12]研究认为血管紧张素源T235可能是HCM肥厚心肌的预测因子;Yoneya等[13]和Kawaguchi等[14]均研究发现单发型HCM可能由基因位点决定,ACE基因的D等位基因可能是心肌肥厚的预测因子。但是Patel[15]证明心肌肥厚与CYP11B2基因-344C/T、白介素-6、胰岛素样生长因子-2、转换生长因子- β 1等的多态性无相关关系,仅发现肿瘤坏死因子- α AA型可能是HCM的修饰基因。

通过比较HCM组与对照组CYP11B2基因-344C/T多态性分布,我们发现HCM组中CT的频率(73%)明显高于对照组(39%),CT基因型在两组间的分布频率有显著性差异($P < 0.05$),提示CYP11B2基因-344CT基因型可能是个体对心室肥厚的易感性因素之一。本文与Patel[15]的报道不一致,可能与种族差异或例数偏少,也可能与

当前对HCM的成因和环境因素尚未完全清楚有关。至于CYP11B2基因-344C/T多态性与HCM相关性的机制目前还不清楚,动物实验揭示醛固酮可通过心肌细胞上的盐皮质激素受体而直接作用于动物心脏,刺激心肌胶原合成和成纤维细胞增生,导致心肌肥厚和纤维化[1][2]。

本研究结果对于HCM发病的遗传背景提供了一些有益的新认识,但例数偏少,相信随着样本数增加和研究的深入(家族调查),可能会找到HCM散发或家族遗传的相关基因。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

[1] Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25(5): 563-75.

[2] Young M, Fullerton MJ, Dilley R, et al. Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(6): 2578-83.

[3] Dzau VJ. Local expression and pathophysiological role of rennin-angiotensin in the blood vessels and heart[J]. *Basic Res Cardiol*, 1993, 88(Suppl 1): 1-14.

[4] Katwa LC, Ratajaska A, Cleutjens JP, et al. ACE and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cell of the rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 29(1): 57-64.

[5] Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodeling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure[J]. *Eur Heart J*, 1994, 15(Suppl): D45-52.

[6] Sahn D, Demarao A, Kisslo J, et al. The committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements[J]. *Circulation*, 1978, 58(6): 1072-83.

[7] Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, et al. Associations between human aldosterone synthase gene polymorphisms and left ventricular size, mass and function[J]. *Circulation*, 1998, 97(6): 569-75.

[8] Brand E, Chatelain N, Mulatero P, et al. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension[J]. *Hypertension*, 1998, 32(2): 198-204.

[9] Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, et al. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese[J]. *Hypertension*, 1999, 33(1 Pt 2): 266-70.

[10] 陈爱华, 张文秀, 陆青, 等. CYP11B2和ACE基因多态性与高血压病的相关性研究[J]. *解放军医学杂志*, 2001, 26(增刊): 129-30.

[11] Hautanen A, Toivanen P, Manttari M, et al. Joint effect of an aldosterone synthase gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1999, 100(22): 2213-8.

[12] Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, et al. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Am Heart J*, 1997, 133(2): 184-9.

[13] Yoneya K, Okamoto H, Machida M, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Am Heart J*, 1995, 130(5): 1089-93.

[14] Kawaguchi H. Evaluation of cardiac function by biochemical and molecular biological techniques[J]. *Rinsho Byori*, 1998, 46(4): 354-8.

[15] Patel R, Lim DS, Reddy D, et al. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(12): 2369-77.

参考文献:

- [1] Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25(5): 563-75.
- [2] Young M, Fullerton MJ, Dilley R, et al. Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(6): 2578-83.
- [3] Dzau VJ. Local expression and pathophysiological role of rennin-angiotensin in the blood vessels and heart[J]. *Basic Res Cardiol*, 1993, 88(Suppl 1): 1-14.
- [4] Katwa LC, Ratajaska A, Cleutjens JP, et al. ACE and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cell of the rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 29(1): 57-64.
- [5] Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodeling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure[J]. *Eur Heart J*, 1994, 15(Suppl): D45-52.
- [6] Sahn D, Demarao A, Kisslo J, et al. The committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements[J]. *Circulation*, 1978, 58(6): 1072-83.
- [7] Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, et al. Associations between human aldosterone synthase gene polymorphisms and left ventricular size, mass and function[J]. *Circulation*, 1998, 97(6): 569-75.
- [8] Brand E, Chatelain N, Mulatero P, et al. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension[J]. *Hypertension*, 1998, 32(2): 198-204.
- [9] Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, et al. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese[J]. *Hypertension*, 1999, 33(1 Pt 2): 266-70.
- [10] 陈爱华, 张文秀, 陆青, 等. CYP11B2和ACE基因多态性与高血压病的相关性研究[J]. *解放军医学杂志*, 2001, 26(增刊): 129-30.
- [11] Hautanen A, Toivanen P, Manttari M, et al. Joint effect of an aldosterone synthase gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1999, 100(22): 2213-8.
- [12] Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, et al. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Am Heart J*, 1997, 133(2): 184-9.
- [13] Yoneya K, Okamoto H, Machida M, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Am Heart J*, 1995, 130(5): 1089-93.
- [14] Kawaguchi H. Evaluation of cardiac function by biochemical and molecular biological techniques[J]. *Rinsho Byori*, 1998, 46(4): 354-8.
- [15] Patel R, Lim DS, Reddy D, et al. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(12): 2369-77.