

文章编号: 1672-3384 (2004) -05-0053-05

内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与 ACEI 降压疗效相关性研究

【作者】 陈改玲 党爱民 刘国仗

中国医学科学院中国协和医科大学阜外心血管病医院 (北京 100037)

【摘要】 目的 探讨原发性高血压患者内皮型一氧化氮合酶基因 (eNOS) G894T 多态性与血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 降压疗效之间的关系。方法 281 例 1-2 级原发性高血压患者经安慰剂治疗 2 周后, 血压符合入选标准者分别给予咪达普利 5~10 mg/d 或贝那普利 10~20 mg/d, 治疗 6 周。用酚-氯仿法提取基因组 DNA, 采用 PCR 结合限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 方法检测 eNOS 基因型, 分析不同基因型组与 ACEI 降压疗效的关系。结果 本研究中 eNOS 3 种基因型频率分别为 GG66.2%、GT27.8%、TT6.0%, 等位基因 G、T 的频率分别为 0.80 和 0.20。ACEI 治疗后, eNOS 基因 GG、GT、TT 组收缩压下降值分别为 (14.51±11.19) mmHg, (16.11±12.31) mmHg, (12.38±14.30) mmHg; 舒张压下降值分别为 (8.95±6.56) mmHg, (9.00±6.92) mmHg, (9.37±4.80) mmHg, 3 组间收缩压与舒张压下降值均无统计学差异。结论 eNOS 基因 G894T 多态性与 ACEI 降压疗效无关。

【关键词】 原发性高血压; 多态性; 一氧化氮合酶基因; 血管紧张素转换酶抑制剂

【中图分类号】 R972.4; R394.6

【文献标识码】 A

Relationship between polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and antihypertensive efficacy with ACEI

【Writers】 CHEN Gai-ling DANG Ai-min LIU Guo-zhang

Division of Hypertension, Fu Wai Hospital, CAMS & PUMC (Beijing 100037)

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between the G894T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in essential hypertensive patients and antihypertensive response to ACE inhibitor. **Methods** 281 patients with essential hypertension were administered imidapril 5 to 10 mg once daily or benazepril 10 to 20 mg once daily for six weeks, respectively. Genotype of eNOS gene were determined by the polymerase chain reaction (PCR) combined with restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Results** The genotype frequencies of eNOS gene were 66.2% for GG, 27.8% for GT, and 6.0 % for TT, the allele frequencies for G and T were 0.80 and 0.20. The reductions of SBP in patients carrying GG, GT, and TT genotypes were (14.51±11.19) mmHg, (16.11±12.31) mmHg, (12.38±14.30) mmHg respectively. The reductions of DBP in patients carrying GG, GT, and TT genotypes were (8.95±6.56) mmHg, (9.00±6.92) mmHg, (9.37±4.80) mmHg, separately. There was no difference in BP reduction among three groups. **Conclusions** The G894T polymorphism of eNOS gene was not possibly related to the response to ACE inhibitor in essential hypertensive patients.

【Key words】 essential hypertension; the endothelial nitric oxide synthase gene; polymorphisms; angiotensin converting enzyme inhibitor

有效控制血压是降低心血管疾病发病率和死亡率的关键。研究表明,不同个体对同一降压药物的反应性存在着明显差异,遗传因素在降压疗效的个体差异上起重要作用。近年将药物基因组学引入抗高血压的治疗研究,有关高血压药效相关基因筛选研究主要集中在肾素-血管紧张素系统(RAS)。部分研究结果提示,RAS基因多态性对个体间的疗效有潜在的预测作用。研究表明,原发性高血压患者内皮型一氧化氮合酶基因(eNOS)第7外显子894位发生G-T颠换,相应蛋白产物第298位上的谷氨酸则被替换成天冬氨酸(Glu298Asp),且该突变与eNOS活性、血浆NO水平相关^[1,2]。进一步研究表明,eNOS基因894T多态性与原发性高血压的发病相关^[3-5]。目前eNOS基因G894T多态性与ACEI降压疗效相关性研究在国内尚未见报道。本研究目的是观察中国汉族原发性高血压患者中,eNOS基因G894T多态性与ACEI降压疗效的关系。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象及研究设计

选择1~2级无血缘关系的汉族原发性高血压患者(1999年WHO/ISH,中国高血压防治指南标准),即坐位收缩压(SBP)<180mmHg且舒张压(DBP)90~109mmHg,年龄18~79岁,男女不限,病人同意参加本研究并签署知情同意书。排除标准包括对咪达普利、贝那普利或其他ACEI有过敏史、单纯收缩期高血压、继发性高血压、近一年有充血性心力衰竭、脑卒中、短暂性脑缺血发作(TIA)或心肌梗死病史、不稳定心绞痛、严重心律失常、严重肝肾功能障碍(血清谷丙转氨酶超过正常值2倍以上或肌酐>3mg/dL)、孕妇、哺乳妇女及今后半年内可能妊娠的患者、未被良好控制的糖尿病及其他研究认为不宜的患者。经安慰剂治疗2周后,血压符合入选标准的患者给予咪达普利5mg/d或贝那普利10mg/d,服药时间为上午8~10时。治疗3周后,如果坐位DBP≥90mmHg,则剂量加倍,继续治疗3周,第6周末观察血压。

1.2 临床观察指标

观察指标有性别、体重指数(BMI)、血压、心率、既往病史、吸烟、饮酒、家族史、血生化参数、心电图、胸片。血压由经过培训的医生用水银柱血压计测量,患者在测量前至少休息5min,共测量3次,重复测量时间间隔为2min,取3次测量值的平均值。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组DNA提取 采取外周静脉血5mL,用低渗法分离白细胞,蛋白酶K消化过夜,用酚-氯仿法提取基因组DNA。

1.3.2 eNOS基因目的片段PCR扩增 正向引物序列5'-CACTCCCCACAGCTCTGCAT-3',反向引物序列5'-CCCAATTTCCAGCAGCATGTT-3',由上海生物工程公司合成。

PCR反应体系总体积20μL,其中基因组DNA100ng,10×buffer2μL,Taq酶1U,dNTP0.4mmol/L,正向、反向引物各10pmol,采用美国PE-2400扩增仪。

PCR的反应条件:eNOS基因为94℃5min预变性后进入35个循环,每个循环中94℃变性30s、61℃退火30s、72℃延伸30s,然后72℃延伸7min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶稳压60V电泳20min,EB荧光染色,紫外灯下检测。

1.3.3 eNOS基因型分析 取PCR产物10μL,加入限制性内切酶BanII 5U,10×电泳缓冲液1.5μL,37℃水浴过夜,酶切产物经2.5%琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察鉴定基因型。

1.4 统计学方法

所有计量资料以均值±标准差表示,不同基因型组间计量资料的比较采用方差分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,遗传平衡检验采用Hardy-Weinberg平衡定律。应用SPSS10.0软件进行统计学处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 eNOS基因第7外显子G894T多态性分析

281例原发性高血压患者的DNA标本经PCR扩增目的片段为332bp(见图1),对所有标本进行

RFLP检测，野生型纯合子（GG 型）存在 BanII 酶切位点，酶切反应后可将其切为 88bp 和 244bp 片段；而突变型纯合子（TT 型）此酶切位点消失，仍为 332bp；GT 型酶切产物同时有 332bp 、88bp 和 244bp 3 种片段（见图 2）。

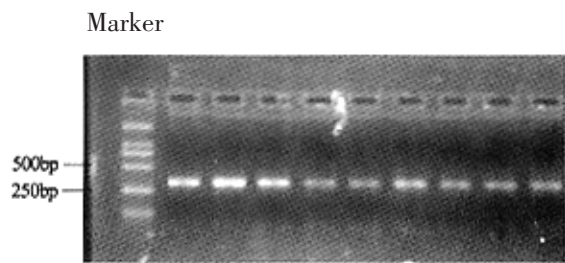
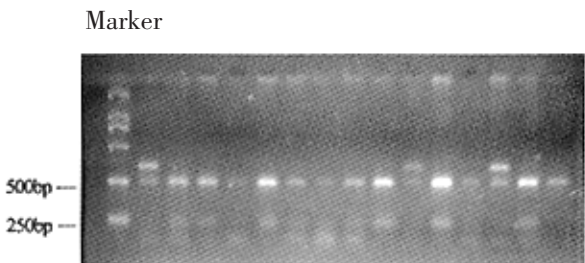


图 1 eNOS 基因 PCR 扩增目的片段 332bp



GT GG GG GG GG GG GG GGGGT GG GG GG GG TT

图 2 eNOS 基因 PCR 产物 2.5%琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 我国汉族原发性高血压患者 eNOS 基因第 7 外显子 G894T 多态性分布

281 例汉族原发性高血压患者中，eNOS 基因 GG 、GT、TT 基因型频率分别为 66.2%、27.8%、6.0%，等位基因 G、T 的频率分别为 0.80 和 0.20。经检验基因型分布符合 Hardy–Weinberg 平衡，说明达到了遗传平衡，具有群体代表性。

2.3 研究对象的一般临床及生化特点

上述 281 例原发性高血压患者完成 6 周治疗期，其中男性 165 例，女性 116 例，平均年龄 (56.27±10.10) 岁。不同基因型组间性别构成、年龄、体重指数、高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、甘油三酯无显著性差异 ($P>0.05$)，见表 1。

2.4 不同基因型组在 ACEI 治疗后血压下降幅度

经 ACEI 治疗后，GG、GT、TT 3 组收缩压下降值分别为 (14.51±11.19) mmHg、(16.11±12.31) mmHg、(12.38 ±14.30) mmHg；舒张压下降值分别为 (8.95±6.56) mmHg、(9.00±6.92) mmHg、(9.37±4.80) mmHg。3 组间收缩压与舒张压下降值均无统计学差异，见表 2。

表 1 不同基因型组临床和生化资料 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	GG	GT	TT
性别 (M/F)	120/66	35/43	10/7
年龄 (岁)	55.00±10.34	56.41±9.73	58.28±10.13
体重指数 (kg/m²)	26.31±3.63	26.38±2.63	25.59±2.46
心率 (bpm)	75.97±7.86	73.19±5.90	74.04±8.08
总胆固醇 (mmol/L)	5.18±1.04	5.20±0.80	5.01±1.27
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	1.46±0.74	1.50±1.13	1.59±0.67
甘油三脂 (mmol/L)	1.35±0.45	1.44±0.49	1.30±0.47
治疗前 SBP (mmHg)	155.75±12.50	153.72±12.54	156.46±13.44
治疗后 SBP (mmHg)	141.24±13.33	137.54±9.51	145.28±13.16
治疗前 DBP (mmHg)	97.01±5.30	96.13±4.24	96.79±4.45
治疗后 DBP (mmHg)	75.66±8.13	73.49±7.08	74.44±7.47

表2 不同基因型组间血压下降幅度比较 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

项 目	GG (n=186)	GT (n=78)	TT (n=17)
Δ SBP (mmHg)	14.51 \pm 11.19	16.11 \pm 12.31	12.38 \pm 14.30
Δ DBP (mmHg)	8.95 \pm 6.56	9.00 \pm 6.92	9.37 \pm 4.80

注: Δ SBP: 收缩压下降幅度; Δ DBP: 舒张压下降幅度

3 讨论

ACEI 是一类疗效确切的抗高血压药物, 其能减少血管紧张素 II 的产生和增加缓激肽在抗高血压作用中起重要作用^[6]。缓激肽与缓激肽 β_2 受体结合刺激内皮细胞释放前列腺素类物质, 激活 eNOS, 促进一氧化氮合成, 从而起到调节血压的作用。影响个体对 ACEI 反应性的因素很多, 研究表明, 环境因素 (如年龄、性别、种族、体内钠水平) 不能完全解释这种异质性^[7], 治疗前血浆肾素活性只能解释不足 10% 的个体差异^[8]。ACEI 等抗高血压药物是通过作用于特定的药物靶体而使血压降低, 而药物靶体多为蛋白质, 遗传变异可能使蛋白质的结构、构型或量发生改变, 进而影响到个体对药物的反应性。因此, 不同人群和不同个体的 DNA 序列变异, 即基因多态性可能与药物治疗的反应相关。国外有较多研究从基因水平来研究 ACEI 降压疗效的个体差异, 研究结果表明, 血管紧张素转换酶 (ACE)、血管紧张素 II 1 型受体 (AT_1) 及血管紧张素原 (AGT) 基因型与 ACEI 降压疗效相关^[8-11]。这些研究结果均显示不同基因型患者对药物的反应有差异。

本研究结果显示, 我国汉族原发性高血压患者 eNOS 基因 G、T 等位基因频率分别为 0.80、0.20, 与日本研究结果接近^[2,12,13]。ACEI 治疗后, eNOS 基因 GG、GT、TT 3 组间收缩压与舒张压下降值均无统计学差异。而国外报道在顽固性高血压组中 eNOS894T 频率较高^[14], 与本研究结果不一致。可能原因: 可能存在种族差异。虽然 eNOS 基因突变可影响 eNOS 活性及血浆 NO 水平^[1,2], 但有诸多的遗传和环境因素影响 ACEI 降压疗效。对于 ACEI

降压效应, eNOS 基因单一基因多态性的影响可能很小, 或不起主要作用, 但不能排除 eNOS 基因其他位点或该基因与 RAS 及激肽释放酶-激肽系统 (KKS) 等系统基因之间存在交互作用, 有待今后进一步研究。

总之, 本研究未发现汉族原发性高血压患者 eNOS 基因 G894T 多态性与 ACEI 降压疗效相关, 因此, 不能根据汉族原发性高血压患者 eNOS 基因型来指导 ACEI 的降压治疗。

【参考文献】

- [1] Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. J Hypertens, 2002, 20: 2023~2027
- [2] Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. Curr Hypertens Rep, 2003, 5 (1): 19~25
- [3] Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. Hypertens, 1998, 32: 3~8
- [4] Shoji M, Tsutaya S, Saito R, et al. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. Life Sci, 2000, 66 (26): 2557~2562
- [5] Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, et al. Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adults: the Bogalusa Heart Study. AM J Hypertens, 2001, 14 (10): 1046~1052
- [6] Linz W, Wiemer G, Gohlke P, et al. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Pharmacol Rev, 1995, 47: 25~49
- [7] akano Y, Oshima T, Watanabe M, et al. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism. and acute response to captopril in

(下转第 13 页)

6.3 换药

治疗失败与依从性差、选择药物不当以及耐药等因素有关,换药必须依据以往用药及耐药试验结果。

6.3.1 换药指征 发生下列情况之一即应换药:①治疗8周后,病毒载量下降未超过1个log。②治疗6个月后病毒载量未能至<50拷贝/mL。③病毒载量测不出后又出现上升,提示发生耐药。④除外并发感染、疫苗接种、检测方法的改变,病毒载量由最低点持续上升3倍或更高。⑤CD₄细胞持续性减少。⑥临床症状恶化。

6.3.2 注意事项 ①下列情况可以单一换药:因药物不良反应而引起服药依从性差时;在依从性好的前提下如发生病毒载量反弹,可能产生耐药,在经过耐药试验证实后可以更换具有耐药的单一药物。②注意交叉耐药:要避免在NNRTI之间交互换药;要避免IDV和RTV之间的互相替换。③要区分病人是不能坚持服药还是对药物的耐受性差,只有在病人对药物不耐受时才可以换药。④如果病人不能选择更换药物,且治疗已经取得某些疗效,也可以继续按原方案进行治疗。⑤如果治疗失败,不要只

更换1种或增加1种药物,最好是全部或至少更换2种以上药物。

【参考文献】

- [1] 徐莲芝. 实用艾滋病防治指南. 天津: 天津科学技术出版社, 2001
- [2] 徐莲芝. 简明艾滋病临床诊疗手册. 北京: 中国医药科技出版社, 2003
- [3] 中国疾病预防控制中心. 艾滋病临床治疗与护理培训教材. 北京: 北京大学医学出版社, 2003
- [4] 宋淑杰主编. 艾滋病社区防治教育. 北京: 中华医学会, 2004
- [5] Moyle G T, et al. Antiretroviral therapy for HIV infection. *Drug*, 1998, 55: 384~404
- [6] John G. Medical care of patients with HIV infection. Maryland: Williams & Wilkins, 1999
- [7] Gazzard B, et al. AIDS care handbook. England: Mediscript LTD, 1999
- [8] Carpenter CCJ, et al. Antiretroviral therapy for HIV infection. *JAMA*, 1998, 280: 78~85
- [9] CDC. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV. *MMWR*, 1998, 47: 39~82
- [10] DHHS. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. DHHS, 2003
- [11] Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens*, 1995, 13: 1602~1609
- [12] Kato N, Sugiyama T, Morita H, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertens*, 1999, 33: 933~936
- [13] 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. *Hum Genet*, 1998, 103: 65~69
- [14] Jachymova M, Horky K, Bultas J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284: 426~430
- (上接第56页)
- essential hypertension. *Am J Hypertens*, 1997, 10 (Suppl. 9): 1064~1068
- [8] Ueda S, Meredith PA, Morton JJ, et al. ACE (I/D) genotype as a predictor of the magnitude and duration of the response to an ACE inhibitor drug (Enalaprilat) in humans. *Circulation*, 1998, 98: 2148~2153
- [9] Stavroulakis GA, Makris TK, Krespi PG, et al. Predicting response to chronic antihypertensive treatment with fosinopril: the role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Cardiovas drugs and therapy*, 2000, 14: 427~432
- [10] O'Toole L, Stewart M, Padfield P, et al. Effect of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene on response to angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with heart failure. *J Cardiovasc pharmacol*, 1998, 32: 988~994