

肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性物质及 ACE 基因多态性与高血压病中医证型关系的临床研究*

★ 严威¹ 陈慧^{2**} 李灿东¹ 郑峰³ (1. 福建中医学院中西医结合临床博士研究生 福州 350001; 2. 福建医科大学省立临床学院 福州 350001; 3. 福建省人民医院 福州 350001)

摘要:目的:观察各证型高血压病(EH)患者血浆肾素活性(PRA)、血管紧张素Ⅱ(AT-Ⅱ)、醛固酮(ALD)含量变化规律以及 ACE 基因多态性的分布规律,探讨 PRA、AT-Ⅱ、ALD 以及 ACE 基因多态性在高血压病辨证分型中的应用价值,为中医药防治高血压病提供新的思路。方法:所有病例均来自 2006 年 2 月至 2007 年 6 月福建省人民医院的住院病人,全部病例均经本课题研究者确定符合辨证、诊断和排除标准后采血。高血压病患者 160 例,其中男 93 例,女 67 例,年龄 38~70 岁(包含 38 岁和 70 岁),平均年龄 54.41 ± 7.55 岁,比较不同中医证型间 PRA、AT-Ⅱ、ALD 含量变化规律以及 ACE 基因多态性的分布规律。结果:肝火亢盛型的 PRA、AT-Ⅱ明显高于非肝火亢盛组($P < 0.01$);肝火亢盛组的患者 ACE 基因 DD 型比率以及 D 等位基因频率明显高于非肝火亢盛组($P < 0.01$)。结论:PRA、AT-Ⅱ的测定对高血压病中医辨证客观化有一定的参考价值。DD 型 ACE 基因与肝火亢盛型高血压病可能有一定的关系。

关键词:高血压;中医病机;肾素-血管紧张素-醛固酮系统;肽基二肽酶;辨证分型

中图分类号:R 544.1 **文献标识码:**A

The Clinical Research on RAAS and I/D Genetic Polymorphism of Plasminogen Angiotensin Converting Enzyme Gene Associated with TCM Syndromes of Hypertension

YAN Wei¹, CHEN Hui², LI Chan-dong¹, ZHENG Feng³

1. Clinical Doctor of Poststudent of Integrated Traditional Chinese and western Medicine Fujian University of TCM, Fujian 350001;

2. Provincial Clinical Medical College, Fujian University of Medicine, Fuzhou 350001;

3. People's Hospital of Fujian, Fuzhou 350001

Abstract: Objective: We observe the level of PRA, AsT-II, ALD and I/D genetic polymorphism of plasminogen angiotensin converting enzyme (ACE) gene in different TCM syndrome group, in order to find the new way to the treatment of Chinese medicine of essential hypertension (EH). Methods: Collect 160 Han Chinese patients with EH who was hospitalized in February 2006 - June 2007, of which 93 cases of male, 67 cases of women, The average age is 54.41 ± 7.55 years old. Compare the level of PRA, AT-II, ALD and I/D genetic polymorphism of plasminogen angiotensin converting enzyme (ACE) gene in varying TCM syndrome. Results: (1) The level of PRA, AT-II in Gan Huo Kang Sheng group are higher than that of none Gan Huo Kang Sheng group ($P < 0.01$). (2) The patients who has DD genotype in Gan Huo Kang Sheng group are more than that of none Gan Huo Kang Sheng group ($P < 0.01$) ($P < 0.01$). Conclusions: (1) There is relationship among TCM syndromes of hypertension, PRA, ALD, AT-II and ACE genotypes. (2) There is relationship between DD genotype and Gan Huo Kang Sheng syndrome.

Key words: Hypertension; Pathogenesis (TCM); Renin-angiotensin system; Peptidyl-dipeptidase A; Syndrome differ classification

高血压病(essential hypertension, EH)是临床最常见的心血管疾病之一,在世界范围内大约 10 亿人患高血压病。据 2004 年统计(1),我国 18 岁及以上高血压病的患病率为 18.8%,与 1991 年相比,患病率上升了 31%。目前普遍认为高血压病发病机制有以下几种:交感神经活性亢进,肾素血管紧张

素醛固酮系统的激活,肾脏滞留过多的钠盐,血管的重建,内皮细胞功能受损,胰岛素的抵抗。其中研究较多的是肾素血管紧张素醛固酮系统(RAAS)与高血压病的关系。高血压病在祖国医学中属“眩晕”、“头痛”等疾病范畴(2)。本病病因多由情志,饮食所伤,以及劳倦过度所致;病位在清窍,由脑髓空虚、

* 基金项目:卫生部科学研究基金福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ2008-2-59)

** 通信作者:陈慧, E-mail: chen.hui@medmail.com.cn

失养以及痰火上扰引起,与脾肾肝三脏功能失调有关,其发病以虚证居多。本文就高血压病四种中医证型与 RAAS 中的各项指标之间以及 ACE 基因多态性的关系展开研究,为高血压病中医辨证标准化提供现代医学依据,并且以 PRA, AT-Ⅱ, ALD, 以及 ACE 基因多态性作为客观指标来区分高血压病的不同证型和指导临床辨证施治。

1 方法

1.1 临床资料 研究对象为 2006 年 2 月至 2007 年 12 月福建省人民医院的住院病人,共 160 例,其中男 93 例,女 67 例,平均年龄 54.41 ± 7.55 岁,年龄范围 38~70 岁(包含 38 岁和 70 岁),家族中一级亲属无 EH 病史,并排除糖尿病及其他心脑血管疾病。收集所有研究对象的临床资料及生化指标:年龄、性别、血压、空腹血糖、体重指数、胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白。见表 1。

1.2 高血压病诊断标准 按照 2005 年修订的中国高血压防治指南诊断标准,根据患者的病史、家族史、体格检查及实验室检查做诊断性评估,并排除继发性高血压。

1.3 中医证候诊断标准 依据 2002 年国家食品药品监督管理局颁布的《中药新药临床研究指导原则》中《中药新药治疗高血压病的临床研究指导原则》将高血压病分为肝火亢盛型和非肝火亢盛型(包括阴虚阳亢型、痰湿壅盛型、阴阳两虚型)。本研究肝火亢盛型 88 例,非肝火亢盛型中阴虚阳亢型 40 例,阴阳两虚 10 例,痰湿壅盛型 22 例,由于阴阳两虚型以及痰湿壅盛型人数偏少,故予以三组合并为非肝火亢盛型。

1.4 PRA, AT-Ⅱ, ALD 的测定 每人取一试管,每管加 50ul EDTA-Na₂ 及 25ul 二巯基丙醇,休息 1 夜后,清晨空腹抽取肘静脉血(均为卧位抽血)6 mL,加入制备好的试管中,混匀、离心、取用北京北方免疫试剂研究所提供的试剂盒快速测定;同时由于 β -受体阻滞剂、血管扩张剂、利尿剂以及甾体激素、甘草等影响体内肾素水平,因此一般要在停药 2 周后进行,服用利血平等代谢慢的药物应在停药 3 周后测定,钠摄入量影响 PRA 水平,因此病人测定 PRA 三天前应适当减少食盐摄入量。电脑联机处理数据,由电脑自动处理得出结果。

1.5 抽取研究对象 2ml 静脉血, EDTA(乙二胺四乙酸二钠)抗凝用于基因组 DNA 的提取 所有对象采外周静脉血 2mL,柠檬酸钠抗凝,采用上海皓嘉科技发展有限公司提供的日本 TaKaRa 公司生产单管 PCR 试剂盒(Single-Tube PCR Kit)和 PCR 引物,

引物序列为正引物:5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3',负引物:5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3',用美国 MJ Research INC 公司 PTC200 DNA 扩增仪进行扩增。将柠檬酸钠抗凝的全血 10 μ L 加入含有基因 Trap 液(WB) 100 μ L 的单管 PCR 试剂盒中,旋转数秒,室温放置 10min 以上, WB 在破坏血细胞的同时,与核酸形成电中性的复合体,沉淀回收此复合体,再向清洗后的沉淀中加入 2 倍的 PCR 液和引物,放入 PCR 扩增仪中,初期变性为 94 $^{\circ}$ C, 20 min,继之进行 30 个循环,每个循环变性 94 $^{\circ}$ C, 0.5 min;退火 55 $^{\circ}$ C, 1 min;延伸 72 $^{\circ}$ C, 1 min。取 PCR 产物 8 μ L,加入含有溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳(60 mV, 30 min),经紫外灯下检测, PCR Marker 作为参照,若只有 190 bp 扩增带者为缺失纯合型(DD 型),只有 490bp 扩增带者为插入纯合型(II 型), 190bp 和 490bp 扩增带并存者为插入 P 缺失杂合型(ID 型)。电泳结果经 ABI3700 全自动测序仪证实过的基因型作为阳性对照,以减少错判率。

1.6 统计方法 采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两正态分布样本比较采用 t 检验,计数资料以频数表示,采用 χ^2 检验及卡方分割,检验标准 $\alpha = 0.05$,所有数据差别均用 P 值表示, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 分别表示差异显著和非常显著的统计学意义,均为双侧检验。

2 结果

2.1 各组临床指标及生化指标以及 PRA、AT-Ⅱ、ALD 的比较 将 EH 患者分为肝火亢盛组和非肝火亢盛组,两组间性别、年龄、收缩压、舒张压、空腹血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白以及 ALD 差异无统计学意义。肝火亢盛组 PRA、AT-Ⅱ明显高于非肝火亢盛组($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 各中医证型组之间的
各项生化指标以及 PRA、AT-Ⅱ、ALD 的比较

	非肝火亢盛组 (n=72)	肝火亢盛组 (n=88)
男/女	43/29	50/38
年龄(岁)	58.81 ± 10.08	59.30 ± 12.03
体重指数(kg/m ²)	22.14 ± 3.15	22.44 ± 3.44
收缩压(mmHg)	165.19 ± 13.33	167.43 ± 11.71
舒张压(mmHg)	102.39 ± 6.78	103.16 ± 9.21
空腹血糖(mmol/L)	5.45 ± 0.88	5.39 ± 0.76
胆固醇(mmol/L)	3.98 ± 1.13	3.99 ± 0.92
甘油三酯(mmol/L)	1.44 ± 0.95	1.40 ± 0.99
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.05 ± 0.26	1.06 ± 0.20
低密度脂蛋白	2.66 ± 0.83	2.69 ± 0.77
PRA	0.95 ± 0.16	$1.06 \pm 0.17^{\blacktriangle\blacktriangle}$
AT-Ⅱ	70.21 ± 21.54	$84.99 \pm 14.36^{\blacktriangle\blacktriangle}$
ALD	195.29 ± 14.29	190.97 ± 15.87

注:与非肝火亢盛组比较: $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

2 各中医证型组 ACE 基因差别比较

通过卡方检验,比较得出各证型组之间 ACE 基因多态性分布有明显差异($P < 0.01$),并且通过卡方分割比较,肝火亢盛组的 ACE 基因 DD 型的人数明显多于非肝火亢盛组($P < 0.01$),D 等位基因频率也高于非肝火亢盛型($P < 0.01$),并且拥有 D 等位基因的高血压病患者出现肝火亢盛证型的危险度高{OR2.937,95%CI(1.852-4.655), $P < 0.01$ }。

表 2 各中医证型组 ACE 基因差别比较

	n	ACE 基因型			等位基因	
		NI(%)	ND(%)	DD(%)	NI(%)	ND(%)
肝火亢盛	88	24(27.27)	26(29.55)	38(43.18) ▲▲	74(42.05)	102(57.95) ▲▲
非肝火亢盛	72	34(47.22)	30(41.67)	8(11.11)	98(68.06)	46(31.94)

注:与非肝火亢盛组比较:▲▲ $P < 0.01$ 。

3 讨论

现代医学对高血压的病因和危险因素作了非常深入的研究,虽然原发性高血压的发生机制目前尚不十分清楚,但是目前认为原发性高血压的发病与环境因素、遗传和基因因素最为密切。同时,高血压病的发生与基因存在密切关系,虽然仍未完全清楚,但是目前的研究主要集中在如下几种基因:①ACE 基因(血管紧张素转换酶基因),血管紧张素原基因,血管紧张素 1 型受体基因;②与利钠激素相关的基因;③NOS(NO 合成酶)基因;④SA 基因;⑤其他:如 G 蛋白 beta3-亚单位基因 825T、醛固酮合成酶 C-344T 等,可以筛选的基因还有很多。以 ACE 基因多态性与高血压病的关系的研究最广,ACE(血管紧张素转化酶)(5)是将血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II 的关键酶,可促进缓激肽分解,从而增加血管张力和促进血管平滑肌细胞增殖。国外一些科研机构^[3~5]对 ACE 基因多态性不同基因型其个体血清 ACE 活性差异进行研究,证实人群中 ACE 基因 DD 型者其血清中 ACE 活性最高,ID 型次之,II 型最低,并且得出 D 等位基因和 DD 基因型频率增加是高血压发病的易患因素的结论。此研究首次从基因水平揭示了为何人类不同个体间生物活性物质的功能以及效应可能存在着差异的本质,从而为探讨基因多态性与疾病不同临床表型之间的联系以及对治疗反应性的影响提供了先例。高血压病在祖国医学中属“眩晕”、“头痛”等范畴^[2],现代中医对本病绝大多数按此研究。中医学认为,本病的病因病机与情志失调、饮食不节、内伤虚损等因素有关,病久阴损及阳,出现阴阳两虚。已经有研究表明^[6~8]:肝火亢盛证型以高肾素居多,相当于 Larash 肾素分型的肾素依赖型,而阴虚阳亢证型和阴阳两虚证型相当容量依赖型。此与本研究一致。

本研究发现肝火亢盛组多见 ACE 基因 DD 型,但是如果增加例数,结果是否会有所不同,尚须进一步研究。众多研究显示高血压病的发生与 ACE 基因多态性有密切关系。本文已经在此前论述了肾素-血管紧张素-醛固酮系统与高血压病中医辨证分型的关系,并且多数研究表明阳亢型高血压病患者的血管紧张素 II(AT-II)明显增高,而 DD 型 ACE 基因患者其体内 ACE 的活性较其余人为高^[5]。同时本病中医病因病机中有素禀阳刚之体,容易导致肝气郁结,郁而化火,清窍失宁而致眩晕,头痛之说^[2]。本文通过观察各中医证型组病人的 ACE 基因多态性发现,肝火亢盛组中 ACE 基因为 DD 型的患者明显较其他组为多,个人考虑是否可以认为 ACE 基因型为 DD 型的患者有很大一部分属于素禀阳刚之体,而此种类型的人一旦发生高血压病,属于肝火亢盛型的可能性比较大。并且此类型患者易患眩晕、头痛之疾病的观点,也符合 DD 基因型频率增加是高血压发病的易患因素的研究结果,以上这些均有待于进一步研究。

随着国内对高血压病的不断研究,中医对本病的认识逐渐明朗,中医药治疗高血压病必定进一步发展,希望本研究能为应用现代研究中医药作用机理提供一条新的途径。

参考文献

- [1] 罗雷,荣易生等. 中国居民高血压病主要危险因素的 Meta 分析[J]. 中华流行病学杂志,2003,24(1):50-53.
- [2] 王永炎. 中医内科学[M]. 上海:上海科技出版社,1995:117-124.
- [3] Wing LM, Reid CM, Ryan PB, et al. A Comparison of Outcomes with Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors and Diuretics for Hypertension in the Elderly[J]. New England Journal of Medicine, 2003, 348(7):583-592.
- [4] Benetos A, Gautier S, Ricard S, et al. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients[J]. Circulation, 1996, 94:698-703.
- [5] Giner V, Poch E, Bragulat E, et al. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension[J]. Hypertension, 2000, 35(1 Pt 2):512-517.
- [6] 李泓,张济颖. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统、血浆心钠素水平在原发性高血压中医分型的研究[J]. 天津中医, 1989, 6(3):12.
- [7] 李泓,卜秦利,胡宪蕴. 原发性高血压血浆肾素、血管紧张素、醛固酮及血浆心钠素水平与辨证分型关系[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(5):271.
- [8] 潘其民. Ang II 浓度与原发性高血压中医辨证的关系[J]. 中西医结合杂志, 1990, 10(1):29.

(收稿日期:2009-11-17)