

血管紧张素 II Ⅰ型受体基因A1166C位点基因多态性与肝硬化的关系

■背景资料

组织局部肾素-血管紧张素系统的激活导致肝硬化发生。血管紧张素原启动子多态性与肝纤维化发生密切相关,但血管紧张素 II Ⅰ型受体的基因多态性与肝硬化之间关系的资料比较缺乏。

黄玉波, 董庆鸣, 宋淑静, 魏红山, 刘志英, 成军, 毛羽, 北京地坛医院 北京市 100011
北京市优秀人才培养专项经费资助课题(No. 20041D0301548)
通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. drliver@163.com
电话: 010-64211031-2359
收稿日期: 2006-05-15 接受日期: 2006-06-08

A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor gene and its role in pathogenesis in liver cirrhosis

Yu-Bo Huang, Qing-Ming Dong, Shu-Jing Song, Hong-Shan Wei, Zhi-Ying Liu, Jun Cheng, Yu Mao

Yu-Bo Huang, Qing-Ming Dong, Shu-Jing Song, Hong-Shan Wei, Zhi-Ying Liu, Jun Cheng, Yu Mao, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Correspondence to: Dr. Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Beijing 100011, China. drliver@163.com
Received: 2006-05-15 Accepted: 2006-06-08

Abstract

AIM: To establish a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method to detect A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene.

METHODS: A1166C polymorphism was detected and analyzed in 50 anti-HBs positive healthy controls in the serum and 46 patients with liver cirrhosis after hepatitis B virus infection. A set of primers was designed according to AT1R gene. The enzyme digestion site for restriction endonuclease *Dde* I was also designed around A1166C. A or C allele was assured based on the enzymatic result of the polymerase chain reaction products.

RESULTS: Sequencing revealed 99% homogeneity between the two homozygous strains and the AT1R gene. The anticipated mutations appeared at position A1166C. As for genotype or allele, there were no significant differences

at position A1166C between the hepatitis group and the liver cirrhosis group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The established method can be applied to detect the A1166C polymorphism of AT1R gene. The mutation at A1166C site has no correlation with liver fibrosis.

Key Words: Polymerase chain reaction; Restriction fragment length polymorphism; Fibrosis; Angiotensin II; Angiotensin II type 1 receptor

Huang YB, Dong QM, Song SJ, Wei HS, Liu ZY, Cheng J, Mao Y. A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor gene and its role in pathogenesis in liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2556-2559

摘要

目的: 建立多聚酶链式反应-限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)法检测血管紧张素 II Ⅰ型受体基因(AT1R) A1166C位点的多态性。

方法: 对50例血清抗HBs阳性的健康对照者及46例HBV感染后肝硬化患者的血管紧张素 II Ⅰ型受体基因A1166C位点基因多态性的多态性进行分析。根据血管紧张素 II Ⅰ型受体基因设计引物, 在A1166C位设计*Dde* I酶切位点, 根据PCR产物酶切结果判断该位点为A或C。

结果: 两株纯合子与AT1R序列同源性在99%以上, 并在A1166C位点出现预期变异; 肝炎和肝硬化两组间A1166C位点无论是基因型还是等位基因均无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: PCR-RFLP的方法可用于AT1R基因A1166C位点基因多态性的检测, 该位点的变异尚未显示其与肝纤维化有关。

关键词: 多聚酶链式反应; 限制性片段长度多态性分析; 纤维化; 血管紧张素 II; 血管紧张素 II 受体

黄玉波, 董庆鸣, 宋淑静, 魏红山, 刘志英, 成军, 毛羽. 血管紧张素 II Ⅰ型受体基因A1166C位点基因多态性与肝硬化的关系. *世界华人消化杂志* 2006;14(25):2556-2559

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2556.asp

0 引言

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (rennin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 中调节血管收缩、维持血容量的主要效应分子, 血管紧张素 II 受体 (angiotensin II receptor, ATR) 介导 Ang II 的生理学效应, 他分为 AT1R 和 AT2R 两种亚型, 主要发挥生物学效应的是 AT1R, 是 RAAS 作用的关键环节。目前, 关于 AT1R 基因多态性的研究较多, 其中 A1166C 位点是一个重要位点。1994 年, Bonnardeaux *et al*^[1] 首先描述了 A1166C 变异, 部分学者认为 CC 基因型与高血压有关^[2-5], 但是其他研究者持不同态度^[6-10]。目前还认为 A1166C 与动脉粥样硬化^[11]、左心室肥大^[7,12]、冠心病^[13] 有关。近年研究发现 AT1R 及其 mRNA 的高表达与肝纤维化有关^[14-15]。那么 A1166C 位点的变异与肝纤维化是否有关呢? 目前, 国内外尚未有报道。为此, 我们建立了多聚酶链式反应-限制性片段长度多态分析 (PCR-RFLP) 检测 A1166C 位点的变异并探讨其在肝纤维化中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 收集 2004-06/12 北京地坛医院住院的抗 HBs 抗体阳性的对照者血清标本 50 份, 男女各 25 例, 年龄 36 ± 4.1 岁。肝硬化血清标本 46 份, 男女各 23 例, 年龄 43 ± 6.3 岁。病例的诊断标准符合 2000 年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》。Taq 聚合酶为上海生工生物工程公司产品, 100 bp DNA ladder 和 *Dde* I 内切酶为 Promega 公司产品, PCR 仪为 ABI 公司 9700 型。质粒提取采用 Sigma 公司 GenElute Plasmid Miniprep Kit。根据 A1166C 位点位于 2 个引物之间设计引物, 由北京赛百盛公司合成。引物序列如下: P1: 5'-GATAATGTAAGCTCATCCACCA-3'; P2: 5'-AATGTGGCTTTGCTTTGCTTG-3'。扩增产物为 257 bp。

1.2 方法 外周血白细胞基因组的提取: 采用华美生物工程公司 ReadyPCR™ 全基因组 DNA 纯化系统, 严格按照试剂盒说明书操作。PCR 反应体系: PCR 系统含 $10 \times$ 缓冲液 3 μ L, 25 mmol/L dNTPs 0.4 μ L, 25 μ mol/L P1 和 P2 各 0.5 μ L, Taq 聚合酶 2 U, 血细胞提取物 4 μ L, 反应总体积为 30 μ L。循环条件: 94℃ 预热 3 min, 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 最后, 72℃

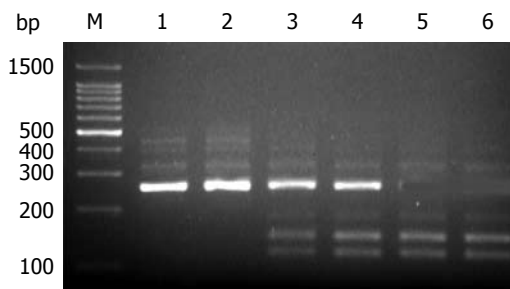


图 1 A1166C PCR 扩增产物 *Dde* I 酶切电泳结果。M: 100 bp DNA ladder; 1, 2: AA 纯合子; 3, 4: AC 杂合子; 5, 6: CC 纯合子。

延伸 7 min。取扩增产物 8 μ L 经 30 g/L 琼脂糖凝胶 (含 1 mg/L EB) 电泳, 在 257 bp 处出现荧光带者为阳性。PCR 产物酶切: *Dde* I 酶切位点为 C^TNAG, 如果 A1166C 位点为 C, 则产生 *Dde* I 酶切位点, 如果为 A, 则酶切失败。取 PCR 产物 8.5 μ L, $10 \times$ 缓冲液 D 1 μ L, *Dde* I 0.5 μ L (5 U), 37℃ 酶切 16 h。取酶切产物 10 μ L 经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 只在 257 bp 处出现条带者为 AA 纯合子, 在 140 bp 和 117 bp 处出现条带者为 CC 纯合子, 在以上 3 个位置均有条带者 AC 杂合子。PCR 产物的分子克隆与测序: 分别取 AA 纯合子 (命名为 DT-A1166) 和 CC 纯合子 (命名为 DT-1166C) 的 PCR 产物, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 直接与 T-easy 载体连接, 转化 XL-1-Blue 细菌, PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒, 采用通用引物, 经双脱氧链末端终止法进行双向测序 (由上海生工生物工程公司完成)。DNA 序列资料采用 Vector NTI 9.0 软件包及 GeneDoc 2.6 分析。

统计学处理 SPSS 10.0 软件包, 计数资料组间差异采用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 认为组间有显著差异。

2 结果

2.1 PCR 产物酶切电泳 分别取 AA 纯合子、AC 杂合子和 CC 纯合子阳性标本 *Dde* I 酶切产物各 2 份经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果与预期相符 (图 1)。

2.2 PCR 产物克隆测序 将 DT-A1166, DT-1166C 和 AT1R 基因 (GenBank 注册号: D13814) 相应序列进行比对发现, DT-A1166 确为 AA 纯合子, DT-1166C 确为 CC 纯合子, 序列同源性在 99% 以上 (图 2)。

2.3 肝病和肝硬化 A1166C 位点基因多态性 肝炎 (恢复期) 和肝硬化标本 A1166C 位点基因多态性检测结果见表 1, 所有标本均未检出 CC 纯合子。

■ 同行评价

血管紧张素 II 作为一种细胞因子在肝纤维化发生学方面起重要的作用。本文作者探讨肝炎和肝硬化患者血管紧张素 II I 型受体基因 (AT1R) A1166C 位点的多态性与肝纤维化发生学的关系是肝纤维化发生学的热点课题, 因而具有科学意义。

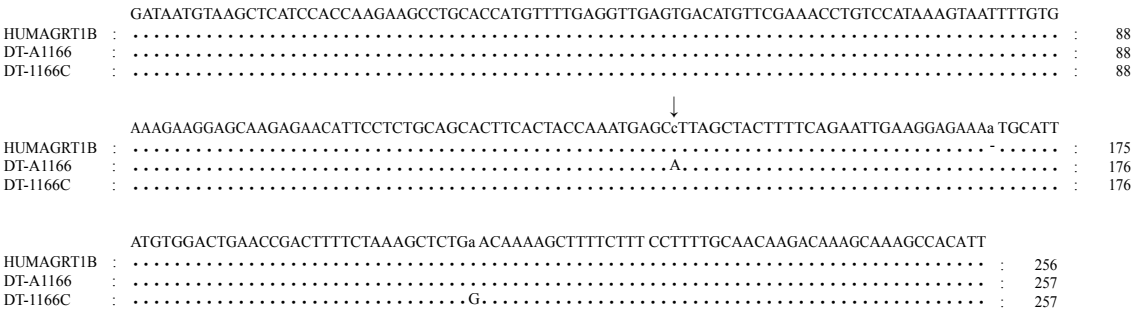


图 2 PCR产物克隆测序比较结果.

两组间无论是基因型还是等位基因均无显著性差异($P>0.05$).

3 讨论

AT1R基因位于第3号染色体长臂2区1-5带上(3q21-q25). 人类只有单一的AT1R基因, 他的编码区只有1个外显子, 无内含子, 有1个开放读码框, 全长1080 bp. AT1R含有359个氨基酸残基, 属于G蛋白家族成员, 并与牛、大鼠的氨基酸顺序高度一致. AT1R是RAAS的重要组成部分, 除了对心血管系统的调节作用, 在心、肾间质纤维化及肝纤维化中的作用也越来越受到重视. 有学者发现AT1R与鼠胰腺的纤维化有关^[16]. AT1R的拮抗剂也可以减轻心脏的纤维化^[17]. 目前已有动物实验研究表明, 大鼠的肝星形细胞(HSC)存在AT1R, 并经测序得到证实, 而且用AT1R拮抗剂治疗肝大鼠纤维化取得了明显的疗效^[18].

肝纤维化形成过程中, HSC的激活和增生, 尤其是HSC表型的激活是肝纤维化形成过程的关键. 近来研究表明, RAAS参与了HSC的激活过程. Wei *et al*^[19]证明了肝纤维化形成时醛固酮合成酶基因-CYP11B2 mRNA在HSC中表达增强, 醛固酮拮抗剂安体舒通对早期肝纤维化具有抑制作用, 同时发现了肝脏激活的HSC表达AT-1受体. 提示Ang II及其受体AT1R在HSC的激活和转化过程中可能具有重要的作用. Lim *et al*^[20]用AT-1受体拮抗剂Losartan治疗肥厚性心肌病大鼠, 取得明显疗效, I型胶原及转化生长因子-β(TGF-β)mRNA表达均减少了50%以上. Yoshiji *et al*^[21]新近发现AT-1受体拮抗剂Candesartan可减轻大鼠肝纤维化, 降低肝纤维化血清标志物和TGF-β mRNA等表达水平.

现有结果显示AT1R可能与肝纤维化有关, 但AT1R的A1166C位点多态性是否与肝纤维化有关, 国内外尚无类似研究资料. 我们建立

表 1 肝炎和肝硬化A1166C位点基因多态性比较结果 (n/%)

基因型	肝炎(恢复期)	肝硬化
AA	45 (90.0)	44 (95.7)
AC	5 (10.0)	2 (4.3)
A等位基因	50 (90.9)	46 (95.8)
C等位基因	5 (9.1)	2 (4.2)

了PCR-RFLP检测AT1R基因A1166C位点的变异, 经过测序证实该方法准确可靠, 可以用于该位点多态性的检测. 但是, 目前尚不明确是否A1166→C的变异会影响RAAS的活性. A1166C位于AT1R的3'非翻译区, 不可能直接影响mRNA的稳定性, 可能是与一种影响AT1R转录、翻译或影响mRNA的稳定性的蛋白因子基因存在共分离的结果^[1]. 本文对50例肝炎和46例肝硬化外周血基因组中AT1R基因A1166C位点基因多态性检测尚未显示其与肝纤维化有关, 究竟该位点的多态性是否会影响RAAS的活性, 还需扩大样本量进行更进一步的深入研究.

4 参考文献

- 1 Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-69
- 2 van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, Tarnow L, Donker AJ, Bilo HJ, Stehouwer CD. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1000-1007
- 3 Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997; 51: 31-34
- 4 Szombathy T, Szalai C, Katalin B, Palicz T, Romics L, Csaszar A. Association of angiotensin II type 1 receptor polymorphism with resistant essential hypertension. *Clin Chim Acta* 1998; 269: 91-100
- 5 Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J,

- Koskenvuo M, Syvanen AC, Vartiainen E, Peltonen L, Kontula K. Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 844-849
- 6 Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, Pasini G, Porteri E, Bettoni G, Zulli R, Agabiti-Rosei E. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996; 28: 1076-1080
- 7 Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N, Nakata Y, Kamitani A, Miki T, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 316-321
- 8 Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens* 1997; 15: 1385-1388
- 9 Lesage S, Velho G, Vionnet N, Chatelain N, Deme-nais F, Passa P, Soubrier F, Froguel P. Genetic studies of the renin-angiotensin system in arterial hypertension associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 1997; 15: 601-606
- 10 Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Suzuki M, Sato T, Funahashi J, Katoh R, Kazama I, Michimata M, Araki T, Hozawa A, Tsuji I, Ogihara T, Yanagisawa T, Imai Y, Matsubara M. A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) and ambulatory blood pressure: the Ohasama Study. *Hypertens Res* 2003; 26: 141-145
- 11 Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 698-703
- 12 Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998; 32: 825-830
- 13 Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P, Bertrand ME. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 486-490
- 14 Wang WW, Yang XS, Li X, Wang J, Tian Y, Yang CH, Lai HW. Changes in the expression of angiotensin II type 1 receptor in the development of liver fibrosis. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 118-122
- 15 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 陈颖伟. 肾素-血管紧张素系统与肝纤维化发生. *中华消化杂志* 2001; 21: 145-147
- 16 Wang XP, Zhang R, Wu K, Wu L, Dong Y. Angiotensin II mediates acinar cell apoptosis during the development of rat pancreatic fibrosis by AT1R. *Pancreas* 2004; 29: 264-270
- 17 Kumagai K, Nakashima H, Urata H, Gondo N, Arakawa K, Saku K. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2197-2204
- 18 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 潘勤, 徐芹芳. 血管紧张素 II 受体阻断剂抗肝纤维化的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 302-304
- 19 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl4. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 20 Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, Roberts R, Marian AJ. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103: 789-791
- 21 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750

电编 张敏 编辑 潘伯荣