

PGF_{1α}的平衡对控制血管壁与血小板相互反应和维持循环通畅起着非常重要的作用,血浆 TXB₂增高、6-酮-PGF_{1α}减低,是诊断血栓性或亚临床血栓性病变较理想的指标^[7]。本研究发现,IR模型组大鼠血浆TXB₂水平、PAI-1水平、TXB₂/6-K-PGF_{1α}及PAI-1/tPA比值较正常组明显增高,提示高脂饮食诱导的IR大鼠存在着血栓形成相关因子分泌的异常,纤溶抑制功能的亢进及凝血与纤溶的失衡易导致IR大鼠微循环障碍和血栓形成。

IR时血液表现的高凝状态和微循环障碍等表现,被认为符合中医血瘀证的特征^[8];中医认为,血瘀是IR的重要病机之一,从瘀论治是中医药治疗IR相关性疾病的基本治则^[9,10]。三七为传统活血化瘀中药,具有散瘀止血、补血活血、消肿止痛、滋补强壮等功效;现代药理研究证实三七有抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环、降血脂及血糖、抗炎等作用^[11]。本研究发现,应用三七干预后IR大鼠FINS水平下降,胰岛素敏感性增强,同时,大鼠血浆TXB₂和PAI-1水平、TXB₂/6-K-PGF_{1α}及PAI-1/tPA比值明显降低,提示活血化瘀中药三七可有改善大鼠的胰岛素抵抗,其机制可能通过改善血管内皮功能,调节血栓形成相关分子的分泌、恢复凝血与纤溶系统的平衡有关。

参考文献

1 Alessi MC, Peiretti F, Morange P, *et al.* Production of plasminogen

- activate orinhibitrl by human adipose tissue;possible link between viscera l fat accumulation and vascular disease[J]. Diabetes, 1997, 46 (5):860-867
- 2 Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, *et al.* Hypoadi2 ponectinemia in obesity and type 2 diabetes;close association with insulin resistance and hyperinsuline2mia[J]. J Clin Endocrinol, 2000, 75 (10):453-458
- 3 彭利,李忠业,鲍宜桂.复方鬼箭羽汤对高血压病胰岛素抵抗和血液流变学的影响[J]. 河南中医, 2007,27(4):31-33
- 4 李爱民,赵佳.人参健心胶囊对冠心病糖耐量异常患者胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2009,29(9):830-832
- 5 马建,闫玲玲,刘春燕.益气养阴、活血祛瘀法对2型糖尿病患者胰岛素抵抗作用的疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2010,17(5):444-445
- 6 张军利,贾乘,苑博,等.三七复方纳米颗粒剂抑制血栓形成作用及机制初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):81-83
- 7 李宁,余琦.病毒性疾病的免疫组织化学诊断[J]. 中国医药导报, 2009,6(33):8
- 8 龚理,张荣华,欧阳菁,等.痰饮瘀血与胰岛素抵抗关系浅析[J]. 陕西中医,2006,27(4):458-459
- 9 武雪萍,范虹.糖尿病合并冠心病与胰岛素抵抗及血瘀证的关系[J]. 安徽中医学院学报,2008,8(4):17-19
- 10 李学军,杨叔禹.从瘀论治胰岛素抵抗的研究现状[J]. 中国中医基础医学杂志,2001,7(7):79-80
- 11 冯陆冰,潘西芬,孙泽玲.三七的药理作用研究进展[J]. 中国药师,2008,11(10):1185-1187

(收稿:2011-06-06)

(修回:2011-07-15)

CACNB2 基因多态性与钙离子通道阻滞剂降压疗效的相关性研究

李清贤 孙倩 宋喜发 唐疾飞 王尧杰 牛宇欣 包其郁 张国强 胡云良

摘要 **目的** 探讨钙离子通道辅助β亚基(CACNB2)6个SNP位点多态性对单一钙离子通道阻滞剂(calcium channel blockers,CCB)治疗原发性高血压疗效的影响。**方法** 104例原发性高血压患者同时服用单一钙离子通道阻滞剂(纳欣同)20mg,每日1次,随访6周,采用多重聚合酶链反应(multi-PCR)方法及基质辅助激光解析-飞行时间质谱分析技术(MLD1-TOFMS)对患者CACNB2的6个SNP进行基因分型检测,研究不同SNP位点以及同一SNP不同分型对CCB治疗高血压的疗效差异。**结果** rs11014166 AA基因型患者服用钙拮抗剂的降压有效率高于AT+TT基因型患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。其余5个SNP位点不同基因型患者用钙拮抗剂的降压效果差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** CACNB2 rs11014166多态性与钙拮抗

基金项目:浙江省科技厅课题资助项目(2008C33028);温州市鹿城区科技局课题资助项目(s070116)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院检验科(李清贤、孙倩、王欣、胡云良);心内科(宋喜发、唐疾飞);温州生物信息研究所(牛宇欣、包其郁);温州市鹿城区人民医院(王尧杰);中国科学院北京基因研究所(张国强)

通讯作者:胡云良,电子信箱:huyunliang66@163.com

剂降压疗效相关,AA 基因型人群对钙拮抗剂较为敏感。

关键词 原发性高血压 CACNB2 单核苷酸多态性 钙离子通道阻滞剂

Association of Gene Polymorphisms in CACNB2 with the Efficacy of Calcium Channel Blockers in the Treatment of Hypertension. Li Qingxian, Sun Qian, Song Xifa, et al. Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the association between 6 single nucleotide polymorphisms (SNP) of L-calcium channel auxiliary subunit $\beta 2$ gene (CACNB2) and the efficacy of calcium channel blockers (CCB) in the treatment of essential hypertension. **Methods** A total of 104 EH patients were given 20mg CCB (extended release nifedipine tablets) monotherapy everyday for six weeks. Six SNPs in the CACNB2 determined by multiplex polymerase chain reaction (multi-PCR) and matrix assisted laser desorption ionization time of flight MS (MLDI-TOF MS) to analyze the association of the CCB-efficacy for hypertension with different SNPs and their genotypes. **Results** The AA genotype of rs11014166 was more efficient than AT and AA genotype ($P < 0.05$). Efficacy of genotypes of other five SNPs was not different each other ($P > 0.05$). **Conclusion** The rs11014166 polymorphism of CACNB2 was associated with curative effect of L-calcium channel blockers, which was more effective in patients with AA genotype EH.

Key words Essential hypertension; CACNB2; Single nucleotide polymorphism; Calcium channel blocker

原发性高血压是一种多基因遗传性疾病,由多对等位基因(共显性基因)控制,并受环境因素影响,是心脑血管疾病的主要危险因素。钙离子拮抗剂(CCB)作为临床治疗高血压病的一线药物,是一种公认的有效抗高血压药和动脉扩张药,它通过阻滞 Ca^{2+} 进入细胞内特异性 L 型 Ca^{2+} 通道而发挥作用^[1]。但不同 EH 患者群体及个体对 CCB 呈现不同的降压反应,推测可能与遗传素质的不同有关^[2],本实验选取 CACNB2 的 6 个 SNP 位点,选择服用单一钙离子通道阻滞剂(CCB)的 EH 患者进行临床跟踪随访观察疗效,旨在探讨 CACNB2 基因多态性与 CCB 降压疗效的相关性。

对象与方法

1. 实验对象:于温州医学院附属第二医院、鹿城区人民医院以及温州市部分街道卫生服务中心,随机选取 104 名 EH 患者,按照 2004 年《中国高血压防治指南》高血压诊断标准:未治疗前非同日 3 次测量,收缩压 $\geq 140\text{mmHg}$ 和(或)舒张压 $\geq 90\text{mmHg}$ 者,或者血压 $< 140/90\text{mmHg}$,但正在服用降压药者。男性 60 例,女性 44 例,平均年龄 47.39 ± 9.42 岁。并排除继发性高血压、糖尿病、活动性甲状腺功能亢进、贫血、周围血管疾病、大动脉炎、先天性血管畸形,排除不适合服用 CCB 患者。且所有研究对象签署知情同意书入选。

2. 研究方法:(1)用药方法:对诊断发现的原发性高血压病例服用纳欣同(浙江泰利森药业有限公司生产,批号:090404)20mg,每日 1 次。之前正在服用其他降压药物治疗的病例需在入选后停用原降压药物 2 周之后服用纳欣同。在每一天的同一时间段服用,期间不用其他任何影响血压的药物。(2)观察指标:服药前及服药后的第 2、4、6 周末各随访 1 次,按照血压测量的标准方法由专人在固定时间段测量血压值,

并做以记录。(3)疗效判断标准:治疗 6 周末,收缩压降低值大于等于 20mmHg ,舒张压降低值大于等于 10mmHg ,或者未达到上述标准,但是降至正常范围,均视为治疗有效。(4)标本的采集:治疗前空腹抽取静脉血 5ml,2ml 入 EDTA 抗凝管中, -70°C 低温储存,以备用于标本统一提取基因组 DNA,3ml 用于分离血清检测血脂、血糖、肝肾功能等生化指标。

3. 基因扩增及分型:(1)仪器与试剂:Applied Biosystems 公司的 GeneAMP PCR System 9700; MassARRAY Compact System;人血全基因组 DNA 抽提试剂盒购自 AXYGENT 公司,多重 PCR 引物及延伸引物由 SEQUENOM 公司 Assay Design3.1 程序进行设计由北京擎科公司合成,PCR 引物及延伸引物序列(表 1)。(2)PCR 及 SNP 分型:利用多重 PCR 技术对目的序列进行扩增,采用多重 PCR 技术对所选的 6 个包括 SNP 位点在内的基因序列进行扩增。(按 800 个标本配制 PCR 反应 Mix,加入 6 对引物,每一个标本对应的孔反应体系:总体积 $5\mu\text{l}$ 中含: $10\text{ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA $2\mu\text{l}$; Buffer $0.5\mu\text{l}$; 25mmol/L MgCl_2 $0.4\mu\text{l}$; 25mmol/L dNTP Mix $0.1\mu\text{l}$; $0.5\mu\text{mol/L}$ Primer Mix $1\mu\text{l}$, $5\text{U}/\mu\text{l}$ PCR Enzyme $0.2\mu\text{l}$,剩余加去离子水 $0.8\mu\text{l}$ 至 $5\mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C 预变性 2min, 95°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 45 个循环,最后 72°C 延伸 5min)在上述 PCR 扩增产物中加入 ddNTP,通过单碱基延伸只能延伸一个碱基(约 20bp)对目的 SNP 位点进行延伸(反应体系: iPLEX GOLD-Buffer $0.2\mu\text{l}$; iPLEX Termination mix $0.2\mu\text{l}$; iPLEX Enzyme $0.041\mu\text{l}$; iPLEX Extend Primer Mix $0.94\mu\text{l}$; iPLEX GOLD Buffer $0.2\mu\text{l}$; Nanopure water $0.619\mu\text{l}$; 共 $2\mu\text{l}$ 加入至上一步的体系中共 $9\mu\text{l}$,反应条件:① 94°C 预变性 30s;② 94°C 变性 5s;③ 52°C 退火 5s;④ 80°C 延伸 5s;③④循环 5 次;然后②③④循环 40 次;⑤ 94°C 延伸 5s。)产物通过基质辅助激光解电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)基因分型技术,进行 SNP 分型。

表 1 CACNB2 基因 6 个 SNP 位点的 PCR 延伸及单碱基延伸产物设计

SNP 位点	PCR 引物	单碱基延伸产物
rs11014166_F	ACGTTGGATGAGCTTGTGATCAGCTGTGAC	GGCTATTAGTATTGTTATTTTCTT
_R	ACGTTGGATGGCATTCCCTAAATTCTTGCTG	
rs7069292_F	ACGTTGGATGGCTGCTGGGGATATGAAATG	CAATCCATGTATTCTCTAGGCAC
_R	ACGTTGGATGATTATAGGCCGTGAGCCACCC	
rs10764319_F	ACGTTGGATGACACTAAGACTTTTCACCCC	CTTTTCACCCCTATAGAAAAAC
_R	ACGTTGGATGAAAGTGCTGGGATCACAGGG	
rs7099380_F	ACGTTGGATGGGGCATGGTGCAAAATTTGG	GTGCAAAATTTGGATCAATATCT
_R	ACGTTGGATGAAAGTGCTGGGATCACAGGG	
rs2228645_F	ACGTTGGATGACGTGGTCATGGGAATAATC	TGGGAATAATCTTCCTTTGGCTCTAC
_R	ACGTTGGATGGACATTTGACTCGGAAACCC	
rs235928_F	ACGTTGGATGTCCCAAAAACGTTACAGAGG	GAATCCAGGATGCTGCT
_R	ACGTTGGATGCGCCTATGATTGCCTTCTTC	

4. 统计学方法:应用 SPSS 16.0 统计分析软件,群体代表性检验采用 *Hardy - Weinberg* 平衡法;概率用 *P* 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 质谱分析结果:根据单碱基延伸产物分子质量不同确定其基因型,经 MALDI - TOF 检测分析,在 6

个位点中,除 rs7069292 在人群中只发现两种基因型 TT 和 CT,其余 5 个位点均发现 3 种基因型均可得到 3 种质谱图形(两种纯合型和一种杂合型)单峰为纯合型,双峰为杂合型。以 rs10764319 C/T 多态性的质谱图为例作说明(图 1)。

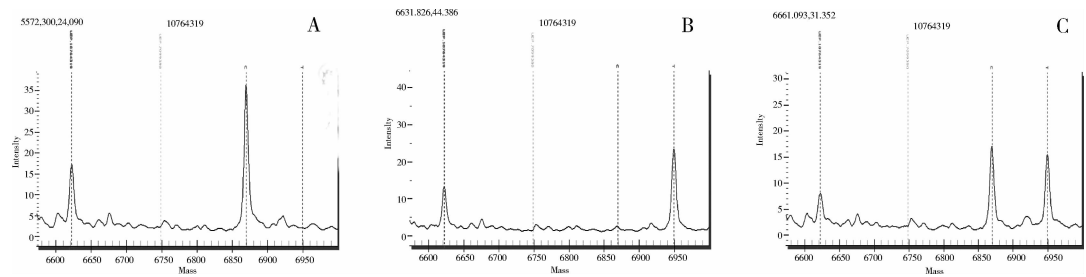


图 1 rs10764319 C/T 多态性的质谱图

A. rs10764319 C/T 多态性的质谱图(CC 纯合型); B. rs10764319 C/T 多态性的质谱图(TT 纯合型); C. rs10764319 C/T 多态性的质谱图(CT 杂合型)

2. 群体代表性检验:高血压患者和血压正常者 CACNB2 基因的 6 个 SNP 位点基因型分布经 χ^2 检验, $P > 0.05$, 符合 *Hardy - Weinberg* 平衡,表明研究对象来自同一群体具有群体代表性。

3. 服用钙拮抗剂者各个位点不同基因型疗效的差异(104 例):对服用单一钙拮抗剂随访 6 周到底的 104 例 EH 病例进行病例自身对照研究,经 R $\times$ C 表卡方检验和四格表卡方检验,结果显示,rs11014166 SNP 携带 AA 基因型的病例对钙拮抗剂有效率显著高于 AT + TT 基因型携带者的有效率,统计学意义差异显著 ($P < 0.05$),其余 5 个位点各基因型之间均无统计学意义 (P 均 > 0.05) (表 2)。

讨 论

钙离子通道分为三型:L 型、N 型、T 型,其中 L

型最重要,主要分布在血管平滑肌和心肌,L 型电压依赖性钙离子通道(L - VDCC)包括 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2\delta$ 和 β 亚单位。其中 $\alpha 1$ 亚基最重要,由它组成亲水孔道调控 Ca^{2+} 内流。Ca 通道药理学、电生理学的差异主要取决于 $\alpha 1$ 亚基的种类^[3]。相关动物实验研究表明,人为地使机体动脉血压升高,可使 $\alpha 1C$ 亚基上调,钙离子通道数目增多,提示血压与钙离子通道数目也呈正相关^[4]。辅助亚基 $\beta 2$ (CACNB2) 编码电压门控离子通道 $\beta 2$ 亚基,定位于染色体 10p12^[5]。主要通过 α 亚基结合调节 L - VDCC 活性^[6 - 10]。改变 Ca^{2+} 内流的数量,影响 $\alpha 1$ 亚基的功能。 $\alpha 1$ 亚基在高血压时表达增加,使钙通道数量增多,从而加速高血压的发展,故能使 $\alpha 1C$ 亚基数目恢复正常的药物,有望用于临床治疗高血压。钙离子拮抗剂通过与钙离子通道靶

表 2 服用钙拮抗剂者各位点不同基因型疗效的差异 (n = 104)

各个 SNP 位点基因型	有效例数	无效例数	χ^2	P
rs11014166				
AA	66 *	9	8.736	0.013
AT	20	8		
TT	0	1		
rs7069292				
TT	82	18	0.871	0.351
CT	4	0		
rs10764319				
CC	24	6	1.324	0.516
CT	42	10		
TT	20	2		
rs7099380				
AA	40	11	1.358	0.507
AG	37	6		
GG	9	1		
rs2228645				
CC	54	12	0.524	0.770
CT	29	5		
TT	3	1		
rs2357928				
AA	41	11	5.037	0.081
AG	36	6		
GG	9	1		

与 AT + TT 组基因型比较, *P < 0.05

位点结合,抑制钙离子通道活性,从而抑制钙离子从膜外向膜内内流,降低细胞收缩,导致血管扩张,从而达到降低血压的目的。

我们的研究通过对 104 例随访 6 周观测血压变化的 EH 病例进行 CACNB2 基因型高血压关系分析,结果发现 rs11014166 携带 AA 基因型钙拮抗剂有效率显著高于 AT + TT 基因型携带者,统计学差异显著 (P < 0.05),rs11014166 的基因 AA 基因型对钙拮抗剂比较敏感,降压效果较其他两种基因型明显,推测 rs11014166 位点多态性可能影响钙拮抗剂对 EH 疗效,该位点位于内含子区域,推测可能通过影响转录过程,影响到基因的表达改变,进而影响蛋白质的功能,导致 $\beta 2$ 与 $\alpha 1$ 亚基结合改变,致使 L - VDCC 活性改变,从而导致血压的变化。我们可以推测,CACNB2 多态性位点的突变,可能会通过影响 CACNA1C 的功能调节,或直接影响 L - VDCC 的功能,进而影响到其与靶位点结合,导致钙拮抗剂药物疗效出现差异。另外近来药物学方面的研究,设计出的一种变异的 β 亚基,通过它影响 $\alpha 1C$ 亚基,进而影响钙离子通

道数目减少钙离子的内流,影响兴奋收缩偶联。其利用 $Ca^{2+}_{v1.2}$ 的变异,或利用变异的 β 或 $\alpha 2\delta$ 亚基,后两亚基自身结构改变或者与 $\alpha 1$ 亚基结合改变影响其对血管上的 $\alpha 1C$ 亚基的调节,间接的特异的减少血管上 L 型钙通道的数量,设计出新型的降压药物^[11]。其余 5 个 SNP 位点治疗疗效在每个位点的不同基因型间的差异无统计学差异,可能是因为样本量少,抽样误差造成,同时部分位点的部分基因样本含量太少,或许并不能真实反应相应携带者的实际药物反应水平,还需进一步扩大样本量,做进一步的研究来验证。

本研究首次在国内探讨了钙离子通道辅助亚基 CACNB2 多态性对钙拮抗剂治疗 EH 患者疗效差异,为 EH 临床个体化有效用药提供药物遗传学依据。

参考文献

- 1 Znirten V. 原发性高血压药物治疗的新进展[J]. 高血压杂志, 2002,10(5):405
- 2 Lifton RP. Genetic determinant of human hypertension[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(19):8545 - 8451
- 3 张朝,翟溯澜. 心肌细胞 L 型钙离子通道分子结构与疾病[J]. 河南大学学报(医学版),2007,26(3):1 - 6
- 4 薛全福,王振纲. 钙通道不同分型与亚基和抗高血压药物的关系[J]. 中国药理学通报,2008,24(5):569 - 572
- 5 Ebert AM, McAnelly CA, Srinivasan A, et al. The calcium channel $\beta 2$ (CACNB2) subunit repertoire in teleosts[J]. BMC Molecular Biology, 2008,9:38
- 6 Varadi G, Lory P, Schultz D, et al. Acceleration of activation and inactivation by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel[J]. Nature,1991,352:159 - 162
- 7 Lory P, Varadi G. Schwartz A. The β subunit controls the gating and dihydropyridine sensitivity of the skeletal muscle Ca^{2+} channel[J]. Biophys J,1992,63:1421 - 1424
- 8 Kldeckner U, Itagaki K, Bodi I, et al. β subunit expression is required for cAMP - dependent increase of cloned cardiac and vascular calcium channel currents[J]. Pflagers Arch,1992,420:413 - 415
- 9 Singer D, Biel M, Lotan I, et al. The roles of the subunits in the function of the calcium channel[J]. Science,1991,253:1553 - 1557
- 10 Wei X, Perez - Reyes E, Lacerda AE, et al. Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel, subunit by skeletal muscle β and γ subunits[J]. J Biol Chem,1991,266:21943 - 21947
- 11 Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, et al. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications [J]. Vascul phamacol,2006, 44(3):131 - 142

(收稿:2011 - 07 - 01)

(修回:2011 - 07 - 07)