

· 论 著 ·

ANP/NPRA 基因多态性与心肌梗死后心力衰竭的相关性研究

张利芸¹, 陈娟¹, 陈曼华¹, 程龙献²(1. 湖北省武汉市中心医院心内科 430014; 2. 华中科技大学同济医学院
附属协和医院心血管病研究所, 武汉 430022)

摘要:目的 探讨心肌梗死后患者心钠素(ANP)T2238C 及利尿钠肽 A 型受体(NPRA)G1023C 基因多态性与心肌梗死后严重心力衰竭(CHF)发生的关系。方法 记录研究人群的临床特征,测定血浆 ANP、脑钠肽(BNP)水平;并采用聚合酶链反应和限制型片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法,分析研究人群的 ANP T2238C 与 NPRA G1023C 基因多态性。结果 TT ANP 基因型在严重心力衰竭组中分布显著高于对照组($P < 0.05$),经多因素 logistic 回归分析校正混杂变量后仍显示差异有统计学意义($P = 0.033$, OR: 1.96, 95% CI: 1.05~3.27)。对照组中,CC NPRA G1023C 基因型患者血浆 BNP 水平显著低于 GG 基因型患者。结论 ANP T2238C 基因多态性显著影响心肌梗死后患者的心力衰竭病程及其预后, NPRA G1023C 基因多态性可能通过调控 BNP 水平作用于心力衰竭的神经体液过程。

关键词:心肌梗死;心力衰竭;多态性;单核苷酸;危险因素;利尿钠肽;利尿钠肽 A 型受体

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.12.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)12-1156-03

Influence of atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor-A polymorphisms
on severe heart failure in post myocardial infarction patients

Zhang Liyun¹, Chen Juan¹, Chen Manhua¹, Cheng Longxian²(1. Department of Cardiology, Wuhan Central Hospital, Hubei 430014, China; 2. Institute of Cardiovascular Disease,
Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate atrial natriuretic peptide (ANP) T2238C polymorphism and natriuretic peptide receptor-A (NPRA) G1023C polymorphism in a Chinese Han population, and their relationship with the risk of severe heart failure in post myocardial infarction patients. **Methods** The levels of plasma ANP and BNP were measured by immunoradiometric assay. The clinical data were collected. The genotypes of ANP T2238C and NPRA G1023C were detected by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods. **Results** The distributions of TT ANP genotype ($P < 0.05$) in severe heart failure group is significantly higher than that in no-affected controls. And the odds ratio (OR) was 1.96 (95% CI 1.05 to 3.27), after adjusting for conventional risk factors. There was no significant difference in the frequencies of genotypes of NPRA G1023C. In no-affected controls, GG genotype of NPRA G1023C polymorphism carriers had higher levels of plasma BNP ($P < 0.05$) than CC carriers. **Conclusion** Our results suggest that the ANP T2238C polymorphism influences process of heart failure in post myocardial infarction patients. NPRA G1023C polymorphism may acts on neurohormonal process by adjusting BNP levels.

Key words: myocardial infarction; heart failure; polymorphism; single nucleotide; natriuretic peptide; natriuretic peptide receptor-A; risk factors

心力衰竭(congestive heart failure, CHF)是多种病因可造成的临床综合征,在众多导致心力衰竭的疾病中,冠心病心肌梗死是最常见的病因,CHF 也是造成心肌梗死预后不良的主要原因之一。CHF 的过程是否受遗传因素的影响,研究者对此还有许多争议,已有的研究中关于 CHF 发生的敏感基因主要包括肾素-血管紧张素-醛固酮系统相关基因, α 、 β 肾上腺素受体相关基因^[1-3], 这些研究结果提供了 CHF 机制的分子遗传学依据。利尿钠肽(natriuretic peptide, NP)是一类在水钠平衡、血流动力学调节及改善心肌重构中都具有重要作用的肽类激素, NP 主要包括结构和功能上相关的 3 种肽:心钠素(atrial natriuretic peptide, ANP), 脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP), C 型利尿钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)。ANP 及 BNP 在 CHF 发生过程中的诊断与预后价值早已得到公认^[4], ANP、BNP 的生理功效主要通过利尿钠肽 A 型受体(natriuretic peptide receptor-A, NPRA)完成。一些研究证明 ANP/NPRA 系统的基因变异与心血管疾病密切相关^[5-6]。本研究旨在探讨心肌梗死后 CHF 进展与 ANP/NPRA 基因多态

性之间的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料 共 1 503 例(男 982 例,女 521 例),来自于武汉市城区四大医院心内科的新发心肌梗死后存活 40 d 以上的患者(2006 年 4 月至 2008 年 8 月),均为汉族黄种人,所有研究对象均签字同意参与该研究。对研究对象随访观察 24 个月,随访结束时因 CHF 而死亡或 CHF 并发症而死亡的患者或纽约心功能评价 III~IV 级的患者入选严重 CHF 组,其余患者入选对照组。为了去除混杂因素,有先天性心脏病、心肌病(不包括缺血性心肌病)、心脏瓣膜病患者排除在外;有终末性疾病如癌症或控制很差的糖尿病、终末性肝肾疾病患者也未入选研究人群,不能确定为与 CHF 有关的死亡患者排除在外。

1.2 研究方法

1.2.1 人群调查 通过面对面调查询问及病历查阅记录研究人群的临床资料,家族史只涉及父母及同胞,有吸烟史者为现在正在吸烟或既往至少有 10 年吸烟史者。所有患者都接受了一定的治疗,药物治疗或手术治疗情况均已进行记录。平均每

3 个月电话询问患者的病情及住院状况,部分病例通过住院病历查询了解病情。

1.2.2 血液样本采集及化验 心肌梗死发生后 40 d,清晨空腹抽取研究人群静脉血液 5 mL(肝素抗凝),-80 °C 冻存,以放射免疫分析测定盒检测患者血浆 ANP、BNP 水平(亚培生物)。

1.2.3 ANP T2238C 基因多态性与 NPRA G1023C 基因多态性的探查 ANP T2238C 基因多态性 PCR 反应如文献[7]所述,上游引物:5'-GGC ACA CTC ATA CAT GAA GCT GAC TTT T-3';下游引物:5'-GCA GTC TGT CCC TAG GCC CA-3'。PCR 扩增产物以限制性核酸内切酶 ScaI 酶解过夜后,经 15%聚丙烯酰胺胶恒压电泳,溴化乙淀显色后紫外线摄影保存结果。可见 TT(纯合子)、CT(杂合子)、CC(纯合子)3 种基因型,分别显示为 2 条带(77 bp 和 56 bp),3 条带(133 bp、77 bp 和 56 bp)和一条带(133bp)。NPR A G1023C 基因多态性 PCR 反应亦如文献[8]所述,上游引物:5'-CCC ACA GTA CTA GGG AAT AGT CAG C-3';下游引物:5'-TAG GAA GGA TGG AGG CTG GCA GAG G-3'。扩增产物以限制性核酸内切酶 TaqI 酶解过夜后,酶解产物经 15%的聚丙烯酰胺胶恒压电泳,溴化乙淀显色后紫外线摄影保存结果。可见 GG(纯合子)、GC(杂合子)、CC(纯合子)3 种基因型,分别显示为 2 条带(162 bp 和 93 bp),3 条带(255 bp、162 bp 和 93 bp)和 1 条带(255 bp)。

1.3 统计学处理 计量资料正态性分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示。ANP、BNP 水平为偏态分布,经对数转换后均为正态分布。正态分布的计量资料比较采用 *t* 检验。计数资料的比较用 χ^2 检

验。等位基因相对风险率以比数比(OR)及 95%可信区间(CI)表示,多因素分析采用 logistic 回归模型,估计相对危险度和风险比。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多因素协方差分析比较不同基因型人群的 ANP、BNP 水平。所有数据均采用 SAS8.2 统计软件包进行分析。

2 结 果

随访结束时共有 283 例(18.8%)患者发生严重 CHF,为严重 CHF 组,其余 1 220 例(81.2%)患者未显示严重 CHF,为对照组。

2.1 研究人群 ANP T2238C 与 NPRA G1023C 基因多态性的分布 本研究观察人群中,TT 纯合子基因型在严重 CHF 组人群中分布显著高于对照组(85.2%、77.9%, $P = 0.04$),采用 logistic 回归模型,对年龄、性别、肥胖、糖尿病史、高血压史、心脏病家族史、吸烟史进行校正后,TT ANP 基因型($P = 0.033$, OR:1.96,95%CI:1.05~3.27)仍显示与心肌梗死后严重 CHF 的发生相关。NPR A G1023C 基因型在两组人群中分布差异无统计学意义(表 1)。

2.2 ANP T2238C 与 NPRA G1023C 基因多态性的分布对血浆 ANP、BNP 水平的影响 采用多因素协方差分析校正了年龄、性别、肥胖、糖尿病史、高血压史、高脂血症、心脏病家族史、吸烟史、肾功能不全等混杂因素后发现,在对照组人群,CC NPR A 基因型患者血浆 BNP 水平显著低于 GG 基因型患者($P = 0.029$),血浆 BNP 水平在 ANP T2238C 各基因型人群中无显著性差异,血浆 ANP 水平在各基因型人群中无显著性差异(表 2、3)。

表 1 严重 CHF 组与对照组 ANP T2238C 与 NRPA G1023C 基因多态性分布

基因分布	对照组(n=1 220)	严重 CHF 组(n=283)	粗 OR(95%CI)	调整 OR(95%CI)
ANP T2 238C 基因型[n(%)]				
CC	95(7.8)	13(4.6)	1.00	1.00
CT	175(14.3)	29(10.2)	1.21(0.60~2.44)	1.52(0.75~2.84)
TT	950(77.9)	241(85.2)	1.85(1.02~3.37)	1.96(1.05~3.27)
NPR A G1023C 基因型[n(%)]				
CC	68(5.6)	22(7.8)	1.00	1.00
GC	126(10.3)	25(8.8)	0.61(0.32~1.17)	0.67(0.41~1.25)
GG	1026(84.1)	236(83.4)	0.71(0.43~1.17)	1.96(1.05~3.27)

表 2 ANP /NPR A 基因多态性与 ANP 水平(ng/L)

基因型	总研究人群		对照组		严重 CHF 组	
	n	Log ₁₀ ANP	n	Log ₁₀ ANP	n	Log ₁₀ ANP
ANP T2238C						
CC	108	2.11±0.26	95	2.03±0.18	13	2.21±0.26
CT	204	2.11±0.25	175	2.05±0.11	29	2.19±0.29
TT	1 191	2.09±0.32	950	2.05±0.22	241	2.21±0.28
NPR A G1023C						
GG	1 234	2.13±0.27	1 005	2.05±0.19	229	2.20±0.26
GC	177	2.14±0.26	149	2.03±0.25	28	2.21±0.17
CC	92	2.13±0.31	66	2.04±0.21	26	2.21±0.20

表 3 ANP/NPRA 基因多态性与 BNP 水平 (ng/L)

基因型	总研究人群		对照组		严重 CHF 组	
	n	Log ₁₀ BNP	n	Log ₁₀ BNP	n	Log ₁₀ BNP
ANP T2238C						
CC	108	2.25±0.26	95	2.10±0.15	13	2.41±0.25
CT	204	2.24±0.28	175	2.11±0.18	29	2.42±0.23
TT	1 191	2.28±0.32	950	2.11±0.19	241	2.40±0.26
NPRA G1023C						
CC	1 234	2.25±0.27	1 005	2.08±0.19	229	2.41±0.27
GC	177	2.24±0.28	149	2.10±0.15	28	2.43±0.26
GG	92	2.25±0.19	66	2.13±0.11*	26	2.45±0.21

* : $P=0.029$, 与对照组比较。

3 讨 论

以往认为心肌梗死后患者发生心力衰竭的主要原因是心肌细胞的坏死缺失,使心肌收缩、舒张功能下降,然而心肌梗死后患者发生 CHF 的症状与预后也不一样,显然在心肌梗死本身的损害之外,还有长期心肌缺血导致心肌坏死和纤维化,心室重构及各种神经体液的调节在 CHF 的发生、发展中也占据重要地位。现在认为,一些影响与 CHF 密切相关的心室重构及神经体液过程的基因多态性位点已显示出与 CHF 的发生及预后相关^[9]。

近年来研究证实,ANP/NPRA 系统不仅可以调节血压及水钠平衡,还可调节细胞生长增殖,抑制心肌肥厚,ANP/NPRA 系统与左心室质量的显著相关性在动物模型中已得到肯定^[5-6]。因此,ANP/NPRA 系统基因是心血管疾病研究的热点基因之一。位于 ANP 前基因外显子 III 的 T2238C 基因多态性定位于一个正常情况下的终止码,一个 C 对 T 的置换造成了终止码变为精氨酸,造成 28 个氨基酸延长了 2 个附加的精氨酸而成为 30 个氨基酸,这一明显的改变有可能导致 ANP 功能上的变化。以往研究证明 ANP T2238C 基因型与非致命性心肌梗死、冠脉病变程度及脑卒中相关,研究也提示在原发性高血压人群 ANP T2238C 基因型与左心室质量相关^[10-11]。在一项活动性 CHF 人群中关于 ANP 基因变异的关联研究发现,在纽约心功能分级 III ~ IV 的人群中,rs5065 即 ANP T2238C 基因多态性与升高的 BNP 及 N 端 BNP 前体水平相关,而在纽约心功能分级 I ~ II 人群中无此相关性^[12]。位于 NPRA 基因外显子 III 的 1023 位 G 至 C 的突变导致 ATG 错义突变至 ATC,即甲硫氨酸突变为异亮氨酸。在日本人群中关于 NPRA G1023C 基因多态性与心血管疾病的研究提示 G1023C 可能与原发性高血压及心肌梗死的发生相关^[8,13]。研究者认为,以大鼠 NPRA 作类比,此突变区可能最终翻译定位于 NPRA 激素结合区的 2 个 α 螺旋结构环上,而突变可能改变构象而影响 NPRA 活性。

本研究发现,携带 TT ANP T2238C 心肌梗死患者更容易发生严重的 CHF。TT ANP T2238C 基因型可作为心肌梗死后心发生严重 CHF 的独立预测危险因素。而 NPRA G1023C 基因多态性在两组人群中分布无显著性差异,即使校正混杂因素之后,仍未发现差异有统计学意义。本次研究也测定了心肌梗死稳定期的 ANP 及 BNP 水平,试图了解 ANP/NPRA 基因多态性是否通过调节 ANP、BNP 水平发挥其功效。然而,多因素协方差分析显示,只有 NPRA G1023C 基因型与对照组的 BNP 水平相关,GG 基因型患者血浆 BNP 水平显著高于 CC 基因型患者,在严重 CHF 组无此相关关系,其原因可能在于严

重 CHF 组人群的 BNP 水平受更多混杂因素如用药、肾功能水平等影响,而严重 CHF 组人群的年龄较大,此方面的个体差异更加显著。本研究未发现 NPRA G1023C 基因型与心肌梗死后 CHF 的关系,有可能此基因型虽可以影响血浆 BNP 水平,但还不足以显著影响梗后 CHF 的严重程度。研究没有发现 ANP T2238C 基因多态性与 NP 水平的任何关联,然而,器官局部 NP 水平改变依然不容忽视,而 NP 功能上的可能改变也需要进一步的实验去证实。有关 ANP/NPRA 基因多态性作用于 CHF 过程的机制仍然无法明确。

此次研究是对心肌梗死后人群 CHF 进展的一次队列研究,提示 ANP T2238C 基因多态性可能是梗后严重 CHF 发生的独立预测因素, NPRA G1023C 可能不是 CHF 发展的独立风险因素,但有可能影响血浆 BNP 水平。进一步的研究还需要更大样本、更长时间的观察调查,ANP/NPRA 基因变异对于 CHF 症状的代偿、心脏重构的影响也需要相关的基础实验研究去证实。

参考文献:

- [1] Mansur AJ, Fontes RS, Canzi RA, et al. Beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms Gln27Glu, Arg16Gly in patients with heart failure [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2009, 39(1): 50-52.
- [2] Bristow MR, Murphy GA, Krause-Steinrauf H, et al. An alpha 2C-adrenergic receptor polymorphism alters the norepinephrine-lowering effects and therapeutic response of the beta-blocker bucindolol in chronic heart failure [J]. Circ Heart Fail, 2010, 3(1): 21-23.
- [3] Wu CK, Luo JL, Tsai CT, et al. Demonstrating the pharmacogenetic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on long-term prognosis of diastolic heart failure [J]. Pharmacogenomics J, 2010, 10(1): 46-53.
- [4] Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review [J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 33-35.
- [5] Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(21): 2703-2705.
- [6] Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, et al. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice (下转第 1161 页)

的直肠前壁、膀胱后壁也通常包含在高剂量区域。Huh 等^[15]发现直肠出血与患者直肠剂量参考点的计算值无差异,但和 TLD 实际测试值有密切关系。而膀胱的充盈,同样会影响剂量的分布^[16]。

由于宫颈癌后装治疗主要是直肠膀胱损伤,出现后使治愈率和患者生存质量受影响,直肠膀胱剂量和体积一直是宫颈癌放射治疗关注的重点。为保证精确定位和精确放疗,在进行放射剂量的评估,除了沿袭 L-Q 模型、生物剂量之外,TPS 与实际剂量之间的误差值得注意。而采用 TLD 在仿真体模上获取剂量数据,为评估直肠膀胱反应提供可靠理论依据。

参考文献:

[1] 胡逸民. 肿瘤放射物理学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2002:899-929.

[2] 田崇彬,张钦富,程晓军,等. 热释光剂量计在辐射防护及医疗照射检测中的应用[J]. 中国辐射卫生,2005,14(3):190-191.

[3] 常冬梅,彭宏论,林东生,等. 热释光剂量计能量响应特性研究[J]. 核电子学与探测技术,2005,25(2):190-192.

[4] 罗素明,邱杰,朱卫国,等. 热释光剂量片测量放疗患者骨盆及头颈剂量方法研究[J]. 中华放射医学与防护杂志,2007,27(4):380-384.

[5] Anagnostopoulos G, Baltas D, Geretschlagler A, et al. In vivo thermoluminescence dosimetry dose verification of transperineal ¹⁹²Ir high-dose-rate brachytherapy using CT-based planning for the treatment of prostate cancer [J]. *Int J Oncol Biol Phys*, 2003, 57(4):1183-1191.

[6] Ebruli C, Demiral AN, Ceting ZR, et al. The variability of applicator position among high dose rate intracavitary brachytherapy applications in cervical cancer patients treated with ring & tandem applicators [J]. *Tumori*, 2007, 93(5):432-438.

[7] Richard P, Christlan K, Elena FF, et al. Present status and future of high-precision image guided adaptive brachytherapy for cervix carcinoma [J]. *Acta Oncologica*, 2008, 47

(12): 1325-1336.

[8] Garipa M, Tunel N, Dalmaz MG, et al. Changes in applicator positions and dose distribution between high dose rate brachytherapy fractions in cervix carcinoma patients receiving definitive radiotherapy [J]. *The British Journal of Radiology*, 2006, 79(4):504-509.

[9] Davidson MT, Yuen J, D' Souza DP, et al. Image-guided cervix high-dose-rate brachytherapy treatment planning; dose custom computed tomography planning for each insertion provide better conformal avoidance of rogan at risk [J]. *Brachytherapy*, 2008, 7(1):37-42.

[10] 郑恭俭, Chavaudea J, 胡逸民, 等. 热释光临床实用剂量学的研究 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 1995, 4(3):211-212.

[11] 李文华, 张书旭, 徐海荣. 宫颈癌后装治疗的剂量分布测试 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2005, 22(3):501-503.

[12] Mark JR, Venselaar JM, Beaulieu L. The evolution of brachytherapy treatment planning [J]. *Med Phys*, 2009, 36(6):2136-2153.

[13] 叶际达, 刘鸿诗, 刘景武, 等. 影响热释光剂量计定度系数的因素 [J]. *核电子学与探测技术*, 1999, 19(4):292-295.

[14] 单锦露, 王阁, 王东, 等. 宫颈癌放疗区域相关断层解剖学观察 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(19):1935-1938.

[15] Huh SJ, Limdo H, Alan YC, et al. Comparison between in vivo dosimetry and barium contrast technique for prediction of rectal complications in high-dose-rate intracavitary radiotherapy in cervix cancer patients [J]. *Strahlenther Onkol*, 2003, 179(3):191-196.

[16] Cengiz M, Gurdalli S, Selek U, et al. Effect of bladder distension on dose distribution of intracavitary brachytherapy for cervical cancer; three-dimensional computed tomography plan evaluation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70(2):464-468.

(收稿日期:2010-11-04 修回日期:2011-01-28)

(上接第 1158 页)

with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(9):1399-1401.

[7] Ramasawmy R, Kotea N, Yong Lu CY, et al. Investigation of the polymorphic ScaI site by a PCR-based assay at the human atrial natriuretic peptides (hANP) gene locus [J]. *Hum Genet*, 1992, 90(2):323-325.

[8] Nakayama T, Soma M, Mizutani Y, et al. A novel missense mutation of exon 3 in the type a human natriuretic peptide receptor gene; possible association with essential hypertension [J]. *Hypertens Res*, 2002, 25(3):395-397.

[9] Bleumink GS, Schut AF, Sturkenboom MC, et al. Genetic polymorphisms and heart failure [J]. *Genet Med*, 2004, 6(6):465-467.

[10] Gruchala M, Cieciewicz D, Wasag B, et al. Association of the ScaI atrial natriuretic peptide gene polymorphism with

nonfatal myocardial infarction and extent of coronary artery disease [J]. *Am Heart J*, 2003, 145(1):125-127.

[11] Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, et al. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans [J]. *Stroke*, 2004, 35(7):814-816.

[12] Vassalle C, Andreassi MG, Prontera C, et al. Influence of ScaI and natriuretic peptide (NP) clearance receptor polymorphisms of the NP System on NP concentration in chronic heart failure [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(14):1886-1888.

[13] Nakayama T, Soma M, Saito S, et al. Missense mutation of exon 3 in the type a human natriuretic peptide receptor gene is associated with myocardial infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9(12):1464-1468.

(收稿日期:2011-01-14 修回日期:2011-03-07)