

# 血管紧张素转换酶基因多态性与自发性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的相关性研究

马刘佳, 郑云锋, 康平, 胡国良

延安大学附属医院神经外科, 陕西省延安市 716000

**摘要:**目的 探讨血管紧张素转换酶(ACE)基因插入/缺失(I/D)位点多态性与自发性蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)的关系。方法 166例自发性SAH患者按照是否合并CVS分为CVS组72例和对照组94例,采用ELISA法检测患者血清ACE水平,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测ACE基因I/D位点多态性。结果 SAH后13 d内血清ACE水平无显著变化(均 $P > 0.05$ )。CVS组患者入院时血清ACE基线水平高于对照组( $t = 2.136$ ,  $P = 0.048$ )。ACE组和对照组比较,两组ACE基因I/D位点基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义( $\chi^2 = 7.086$ ,  $P = 0.029$ ;  $\chi^2 = 6.080$ ,  $P = 0.014$ )。多因素logistic回归法分析结果显示对于自发性SAH患者,携带ACE基因I/D位点D等位基因是发生CVS的危险因素( $OR = 1.473$ , 95%  $CI$ : 1.068 ~ 2.610,  $P = 0.021$ )。结论 对于自发性SAH患者,ACE基因I/D位点多态性可能与CVS发生相关。

**关键词:**自发性蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;血管紧张素转换酶;基因多态性

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.05.012

## A study on the association between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and cerebral vasospasm in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage

MA Liu-Jia, ZHENG Yun-Feng, KANG Ping, HU Guo-Liang. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China

Corresponding author: HU Guo-Liang, E-mail: sherosily@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the association between angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion (I/D) polymorphism and cerebral vasospasm (CVS) in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** A total of 166 patients with spontaneous SAH were divided into CVS group (72 cases) and control group (94 cases) depending on presence or absence of CVS. The serum ACE level of the patients was determined by ELISA, and the ACE gene I/D polymorphism was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Results** There was no significant change in serum ACE level within 13 days after SAH (all  $P > 0.05$ ). The baseline serum ACE level of the patients in the CVS group was higher than that in the control group ( $t = 2.136$ ,  $P = 0.048$ ). There were significant differences in genotype and allele distribution frequency of the ACE gene I/D site between the CVS group and the control group ( $\chi^2 = 7.086$ ,  $P = 0.029$ ;  $\chi^2 = 6.080$ ,  $P = 0.014$ ). A multivariate logistic regression analysis showed that carrying the D allele at the ACE gene I/D site was a risk factor for CVS in patients with spontaneous SAH (odds ratio [ $OR$ ] = 1.473, 95% confidence interval [ $CI$ ]: 1.068 ~ 2.610,  $P = 0.021$ ). **Conclusions** The ACE gene I/D polymorphism may be correlated with the development of CVS in patients with spontaneous SAH.

**Key words:** spontaneous subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; angiotensin-converting enzyme; gene polymorphism

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)患者最

基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-306)

收稿日期:2019-04-08;修回日期:2019-09-02

作者简介:马刘佳(1983-),男,硕士研究生,主治医师,研究方向:脑血管病和肿瘤。

通信作者:胡国良,主治医师, E-mail:sherosily@163.com。

常见的并发症之一,直接影响远端脑血管灌注,严重者可导致脑梗死发生,显著增加 SAH 患者的病残率和死亡率<sup>[1-3]</sup>。因此,早期识别与预防 CVS 发生对 SAH 患者远期预后具有重要意义。有研究发现 SAH 患者血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)表达异常,并与 CVS 存在一定时间相关性,提示 ACE 可能参与 CVS 发生过程<sup>[4,5]</sup>。本研究以 166 例自发性 SAH 患者为研究对象,探讨 ACE 基因插入(insertion, I)/缺失(deletion, D)多态性及其血清水平与 CVS 的相关性,为临床工作提供参考。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

连续性选择 2014 年 10 月至 2017 年 1 月于我院神经外科治疗的自发性 SAH 患者纳入研究,纳入标准:①年龄 > 18 岁或 ≤ 80 岁;②SAH 诊断明确,并经头颅 CT/MR 检查确认;③首次发病,且由发病到住院 < 24 h;④出生并长期生活于陕西地区的汉族人,彼此无血缘关系;⑤一般临床资料完整;⑥患者及家属完全知情同意。排除标准:①创伤性 SAH;②病情严重,发病早期即出现脑疝、死亡;③合并其他严重神经、精神疾病;④合并严重肝肾功能障碍、自身免疫疾病、严重感染、恶性肿瘤、严重凝血功能障碍,或近期口服抗血小板、抗凝药物;⑤妊娠期女性。本研究共纳入 166 例患者,其中男 97 例,女 69 例,平均年龄( $50.2 \pm 11.4$ )岁。本研究通过本院伦理委员会审核批准。

所有研究对象按照有无合并 CVS 分为 CVS 组和对照组,其中 CVS 组 72 例,包括男 42 例,女 30 例,平均年龄( $48.9 \pm 10.2$ )岁;对照组 94 例,包括男 55 例,女 39 例,平均年龄( $51.1 \pm 12.7$ )岁,两组患者性别,年龄差异均无统计学意义( $\chi^2 = 2.005$ ,  $P = 0.157$ ;  $t = 0.643$ ,  $P = 0.521$ )。CVS 的诊断标准:SAH 发病 3 d ~ 2 周内;患者临床症状经治疗好转或稳定后再次恶化或进行性加重;经颅多普勒(transcranial Doppler, TCD)超声检查大脑中动脉峰值平均血流速度(peak mean flow velocity, PMFV)  $\geq 140$  cm/s,或大脑后动脉 PMFV  $\geq 90$  cm/s,并排除再出血、脑积水、感染和电解质紊乱等因素后可诊断为 CVS。

### 1.2 研究方法

1.2.1 一般临床资料 收集所有入组患者临床资料,主要包括患者性别、年龄、体重指数、吸烟

史、饮酒史、高血压史、糖尿病史、Fisher 分级和 Hunt-Hess 分级等。

1.2.2 血清 ACE 测定 分别于入院时,及入院后第 4、7、10、13 天抽取外周静脉血,采用 ELISA 法检测患者血清 ACE 水平,试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,严格按照使用说明进行操作。

1.2.3 基因组 DNA 提取 采集清晨空腹时外周静脉血用于实验室检查,部分样本采用 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取全血基因组 DNA。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应体系主要包括:上下游引物各 1  $\mu$ l (上游:5'-CTGGAGACCACTCC CATC-CTTTCT-3'; 下游:5'-GATGTGGCCATCACATTTCGT-CAGAT-3',均由上海生工生物技术有限公司合成)、dNTP 混合物 2  $\mu$ L、TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L、模板 DNA 1  $\mu$ l、10 × Buffer 2.5  $\mu$ l。反应条件:95℃ 预变性 4 min,然后按照变性 95℃ 20 s、退火 65℃ 30 s、延长 72℃ 50 s 的顺序循环 30 周期,最后 72℃ 延长 3 min。

1.2.5 基因型判读 取 PCR 扩增产物进行电泳,紫外灯下观察并摄片,有且只有 1 条 490 bp 电泳带记为 II 基因型,有且只有 1 条 190 bp 电泳带记为 DD 基因型,490 bp 和 190 bp 电泳带同时存在时记为 ID 基因型,见图 1。

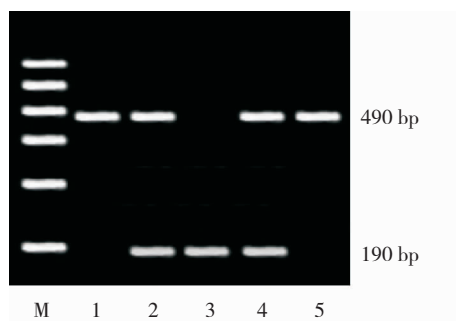


图 1 ACE 基因 I/D 多态性 PCR-RFLP 结果

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理,计量资料结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组均数比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验,两组均数比较采用  $t$  检验;计数资料结果以构成百分比(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。基因型分布采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。单因素分析  $P < 0.05$  的参数采用二分类多因素 logistic 回归分析法评价

ACE 基因多态性与 SAH 患者 CVS 的相关关系。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般临床资料比较

如表 1, 本研究结果显示, CVS 组患者年龄、性别、体重指数、高血压、糖尿病、吸烟、饮酒等指标与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 两组在发热、Hunt-Hess 分级和 Fisher 分级三项指标上差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.2 两组患者血清 ACE 水平动态变化

如表 2, CVS 组患者入院时及入院第 4、7、10、13 天血清 ACE 水平均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但两组血清 ACE 水平随时间推移均无显著变化 ( $P > 0.05$ )。

表 1 两组患者一般临床资料比较 [ $n(\%)$ ;  $\bar{x} \pm s$ ]

项目	CVS 组 ( $n=72$ )	对照组 ( $n=94$ )	$t/\chi^2$	$P$
年龄 (岁)	48.9 $\pm$ 10.2	51.1 $\pm$ 12.7	1.196	0.248
男性	42 (58.3)	55 (58.5)	0.001	0.982
体重指数 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	23.7 $\pm$ 4.1	24.0 $\pm$ 3.8	0.468	0.645
高血压	44 (61.1)	46 (48.9)	2.435	0.119
糖尿病	9 (12.5)	8 (8.5)	0.706	0.401
吸烟	28 (38.9)	30 (31.9)	0.872	0.350
饮酒	16 (22.2)	16 (17.0)	0.709	0.400
发热	16 (22.2)	7 (7.4)	7.457	0.006
Hunt-Hess 分级			6.855	0.009
I + II	50 (69.4)	81 (86.2)		
III + IV + V	22 (30.6)	13 (13.8)		
Fisher 分级			6.638	0.010
I + II	39 (54.2)	69 (73.4)		
III + IV	33 (45.8)	25 (26.6)		

表 2 两组患者血清 ACE 水平动态变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数 ( $n$ )	入院时	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天	F	$P$
CVS 组	72	295.5 $\pm$ 48.4	296.5 $\pm$ 50.3	291.0 $\pm$ 47.6	288.0 $\pm$ 53.2	293.9 $\pm$ 50.4	0.357	0.845
对照组	94	279.8 $\pm$ 45.8	279.4 $\pm$ 49.2	275.1 $\pm$ 47.2	269.2 $\pm$ 51.8	277.8 $\pm$ 46.8	0.774	0.546
$t$		2.136	2.196	2.142	2.297	2.129		
$P$		0.048	0.042	0.047	0.035	0.048		

2.3 不同基因型患者血清 ACE 水平动态变化

如表 3, 不同基因型患者入院时, 及入院第 4、7、10、13 日血清 ACE 水平差异具有统计学意义 ( $P$

$< 0.05$ ); 但每种基因型患者血清 ACE 水平随时间推移均无显著变化 ( $P > 0.05$ )。

表 3 不同基因型患者血清 ACE 水平动态变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数 ( $n$ )	入院时	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天	F	$P$
II	47	260.7 $\pm$ 39.2	246.4 $\pm$ 47.0	255.4 $\pm$ 40.9	237.8 $\pm$ 46.6	248.3 $\pm$ 35.4	0.998	0.411
ID	70	286.4 $\pm$ 45.1	293.0 $\pm$ 48.4	281.5 $\pm$ 50.7	278.7 $\pm$ 53.0	286.7 $\pm$ 48.6	0.872	0.482
DD	49	311.7 $\pm$ 57.2	316.7 $\pm$ 54.4	308.0 $\pm$ 48.8	313.3 $\pm$ 57.2	317.5 $\pm$ 60.5	0.242	0.918
F		13.820	24.783	14.682	24.774	23.705		
$P$		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		

2.4 ACE 基因 I/D 位点多态性与 CVS 的关系

ACE 组和对照组比较, 两组 ACE 基因 I/D 位点基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

2.5 多因素 logistic 回归分析

如表 5, 采用二分类多因素 logistic 回归法分析, 结果显示对于自发性 SAH 患者, 携带 ACE 基因 I/D 位点 D 等位基因是发生 CVS 的危险因素。

表 4 ACE 基因 I/D 位点多态性与 CVS 的关系 [ $n(\%)$ ]

基因型/等位基因	CVS 组 ( $n=72$ )	对照组 ( $n=94$ )	$\chi^2$	$P$
II	17 (23.6)	30 (31.9)		
ID	26 (36.1)	44 (46.8)	7.086	0.029
DD	29 (40.3)	20 (21.3)		
I	60 (41.7)	104 (55.3)		
D	84 (58.3)	84 (44.7)	6.080	0.014

表 5 多因素 logistic 回归分析结果

变量	$B$	$SE$	Wals	$OR$	95% $CI$	$P$
D 等位基因	0.387	0.208	3.467	1.473	(1.068 ~ 2.610)	0.021
发热	0.223	0.320	0.486	1.250	(1.014 ~ 4.115)	0.035
高 Hunt-Hess 分级	0.632	0.462	1.873	1.882	(1.234 ~ 3.035)	0.011
高 Fisher 分级	0.515	0.368	1.960	1.674	(1.166 ~ 3.310)	0.017

### 3 讨论

本研究发现 ACE 基因 I/D 多态性与自发性 SAH 后 CVS 发生密切相关,携带 D 等位基因是 CVS 发生的危险因素,可显著增加 CVS 发病风险。

CVS 的具体发生机制复杂,可能涉及炎症反应、血管舒张/收缩因子失衡、血管壁结构变化等多方面因素<sup>[6,7]</sup>。

ACE 是肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的重要成员之一,有研究发现 SAH 患者脑脊液 ACE 水平显著增高,并与 CVS 发生具有一定时间相关性,表现为出血后脑脊液 ACE 水平逐渐增高,于 1 周时达到高峰,之后逐渐降至基线水平<sup>[4]</sup>。然而,SAH 患者血清 ACE 水平动态变化过程目前研究尚无统一结论,多数研究结果显示 SAH 后血清 ACE 水平随时间无明显变化<sup>[8]</sup>。但王平等<sup>[9]</sup>研究发现 SAH 后血清 AT II 水平立即开始逐渐增高,24 h 达到高峰,1 周时逐渐回落。本研究 CVS 和对照组血清 ACE 水平在发病 13 d 内与基线比较均无明显变化,但 CVS 组患者入院时基线血清 ACE 水平较对照组显著升高,提示 SAH 患者血清 ACE 水平可能与 CVS 存在一定相关性。

既往研究证实 ACE 基因 I/D 多态性与 ACE 生成及活性密切相关,DD 基因型人群血清 ACE 水平最高,ID 基因型次之,II 基因型最低<sup>[10]</sup>,本研究结果与既往研究相符,携带 DD 基因型患者血清 ACE 水平在各时间点均为最高。同时,还有研究发现 ACE 基因 I/D 多态性与缺血性卒中和脑出血易感性相关<sup>[11,12]</sup>。但是,目前关于 ACE 基因 I/D 多态性与 SAH 易感性研究相对较少,且结论不一,与 SAH 后 CVS 相关性研究更鲜有报道。本研究结果显示 ACE 基因 I/D 多态性与自发性 SAH 后 CVS 发生密切相关,DD 基因型是 CVS 发生的危险因素,可显著增加 CVS 发病风险。该结果间接说明了 CVS 组患者血清 ACE 水平较对照组明显升高的原因。另外,多因素分析结果还显示发热、高 Hunt-Hess 等级和高 Fisher 等级与 SAH 患者发生 CVS 密切相关,提示对于合并发热、高 Hunt-Hess 等级和高 Fisher 等级的自发性 SAH 患者,更加需要仔细评估其发生 CVS 的可能性,及时予以相关处理,选择更合适的治疗方案。

最后,需指出,一方面,本研究尚存在诸多不足,本研究纳入样本量较小,其结果期待多中心大样本研究证据进一步验证;另一方面,CVS 发病机

制十分复杂,不仅与局部复杂多变病理生理状况相关,还可能是多基因共同表达的结果,ACE 基因多态性与其他因素、其他基因相互作用的具体机制有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Pepa GMD, Scerrati A, Albanese A, et al. Protective effect of external ventricular drainage on cerebral vasospasm. A retrospective study on aneurysmal SAH treated endovascularly [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2014, 124: 97-101.
- [2] Wu L, Chen G. Signaling Pathway in Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage: News Update [J]. Acta Neurochir Suppl, 2016, 121: 161-165.
- [3] 李泽,张志银,刘志刚,等. 运动诱发电位对脑动脉瘤蛛网膜下腔出血后迟发性脑血管痉挛的诊断性意义分析[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(6): 611-615.
- [4] 庞刚,肖泉,曾敬初,等. 蛛网膜下腔出血后脑脊液血管紧张素转换酶的变化[J]. 广西医学, 2001, 23(6): 1323-1325.
- [5] Griessenauer CJ, Tubbs RS, Foreman PM, et al. Association of renin-angiotensin system genetic polymorphisms and aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2018, 128(1): 86-93.
- [6] Boulouis G, Labeyrie MA, Raymond J, et al. Treatment of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur Radiol, 2017, 27(8): 3333-3342.
- [7] 邹长林. 炎症在蛛网膜下腔出血中的作用及机制研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(1): 83-86.
- [8] 肖泉,唐秀文,庞刚,等. 蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛与血管活性物质的关系[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2002, 2(5): 292-294.
- [9] 王平. 蛛网膜下腔出血后患者脑血管痉挛与血浆内皮素血管紧张素及一氧化氮变化的相关性分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014(16): 24-25.
- [10] Das S, Roy S, Sharma V, et al. Association of ACE gene I/D polymorphism and ACE levels with hemorrhagic stroke: comparison with ischemic stroke [J]. Neurol Sci, 2015, 36(1): 137-142.
- [11] Zhao J, Qin X, Li S, et al. Association between the ACE I/D polymorphism and risk of ischemic stroke: an updated meta-analysis of 47, 026 subjects from 105 case-control studies [J]. J Neurol Sci, 2014, 345(1-2): 37-47.
- [12] Malueka RG, Dwianingsih EK, Sutarni S, et al. The D allele of the angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism is associated with worse functional outcome of ischaemic stroke [J]. Int J Neurosci, 2018, 128(8): 697-704.