

地贫,惟一可行的办法就是不断输血,但输血不能从根本上解除疾病,只能暂时延长患者的寿命;而造血干细胞移植技术,由于其费用惊人而让一般家庭难以承受,难以推广。由中国国家计生委倡导的出生缺陷干预工程近几年在广东局部高发地区也开始了试点,该工程项目是指通过科学的医疗技术分阶段对人口出生缺陷进行干预。本研究结果有助于更深入地了解该地区地中海贫血基因突变的类型、频率和分布,对于珠海市地中海贫血的遗传咨询、携带者筛查、优化产前诊断、提高人口素质有一定的参考价值。

参考文献

[1] 王小金,肖鸽飞,郭晓莉,等.广东省珠海市户籍人群中β-地中海贫血的分子流行病学调查[J].中国优生与遗传杂志,2003,11(5):10-11.

[2] 吴冠芸.α-地中海贫血的早期产前基因诊断[J].中国医学科学院学报,1984,12(6):389-393.
[3] 杜传书.地中海贫血研究的现状与未来[J].中华医学遗传学杂志,1996,13(5):257-258.
[4] 周玉球,李莉艳,肖鸽飞,等.珠海市户籍人群中α-地中海贫血的分子流行病学调查[J].中华医学遗传学杂志,2002,19(4):358-360.
[5] 褚玉新,王晓春,胡朝晖.广东省β-地中海贫血基因突变类型研究[J].中国地方病学杂志,2010,29(2):78-79.

(收稿日期:2011-04-19)

• 临床研究 •

中国苗族人群血管紧张原和血管紧张素转化酶基因多态性与原发性高血压的关系

祝有国¹,符辉明²,向亚东¹(湖南省湘西自治州人民医院:1.核医学科;2.肾内科 416000)

【摘要】 目的 研究血管紧张素原(AGT)基因 M235T 分子变异和血管紧张素转化酶(ACE)基因 I/D 多态性与原发性高血压(EH)的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 EH 组 159 例和健康对照组 147 例 AGT 基因多态性,采用 PCR 技术检测 EH 组 159 例和健康对照组 147 例 ACE 基因多态性。**结果** EH 组 AGT-TT 基因型频率(63.53%)明显高于对照组(45.580%),差异有统计学意义($P < 0.05$),ACE-DD 型基因频率(36.48%)明显高于对照组(17.69%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** AGT 基因的突变与苗族人群 EH 的发病具有相关性,对男性 EH 影响可能更大。ACE-D 基因与苗族人群 EH 的发病相关联。

【关键词】 原发性高血压; 血管紧张素原; 血管紧张转换酶; 聚合酶链反应; 基因; 多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.12.039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)12-1488-03

原发性高血压(EH)的发生发展与遗传因素和多种环境因素相关,肾素-血管紧张素系统(RAS)在维持体液平衡、摄盐、和血压调节方面起着重要作用,其中血管紧张素原(AGT)是该系统的唯一初始底物。AGT 和血管紧张素转化酶(ACE)是 RAS 的重要组成部分,AGT 和 ACE 基因多态性的变异可以改变血浆 AGT 和 ACE 含量水平。人 AGT 基因定位于 1 号染色体长臂 42-43 区,AGT C DNA 由 1455 个核苷酸组成,编码含有 485 个氨基酸蛋白质。AGT 基因由 5 个外显子和 4 个内含子构成全长 13×10^3 ,至今已发现 AGT 基因有 15 种变异,其中第 2 外显子上第 704 位核苷酸 T-突变导致第 235 位氨基酸由蛋氨酸变成苏氨酸(M235T)。目前对于 M235T 等位基因的研究较多^[1]。人 ACE 基因定位于染色体 17q23 区,有 26 个外显子和 25 个内含子,其中第 16 内含子中有一个 287 bp 的 DNA 片段所存在插入[Insertion, I/缺失(deletion, D)]多态性^[2]。AGT 基因型 M235T 突变和 ACE 基因第 16 内含子插入或缺失与 EH 的关系是目前许多学者研究的热点,但有关与苗族人群相关性报告不多,本研究旨在探讨 AGT 和 ACE 基因多态性与苗族人群 EH 发病关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 健康对照组 147 例均为同期健康体检者,男 83 例,女 64 例;平均年龄(57.6±10.3)岁。经详细询问病史,查体 X 线胸片、ECG、B 超及血生化检查排除 EH,且无心脑血管病或糖尿病家族史。

1.1.2 EH 组 159 例均为 2007 年 3 月至 2011 年 1 月在本院肾内科住院患者,男 96 例,女 63 例,平均年龄(59.2±10.6)岁。高血压诊断标准:血压 140/90 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)排除继发性高血压、冠心病和脑梗死患者。以上两组均为苗族,家族婚姻史为世代族内通婚。来源于湖南省西部吉首市、怀化市及重庆市秀山县、贵州省铜仁地区等毗邻地区的苗族聚居区。

1.2 方法

1.2.1 人基因组 DNA 的抽取 抽取外周静脉血 5 mL 以乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)抗凝,用 6% Dextran(M6.0 万)分离白细胞、蛋白酶 K 消化细胞核,氯仿抽取和乙醇沉淀,双重水重溶基因组 DNA。具体步骤参考《分子克隆实验指南》。

1.2.2 AGT 基因 M235T 分子变异和 ACE 基因 I/D 多态性检测 AGT 基因 M235T 分子变异检测采用 PCR/RFLP 方法分析,引物位于 AGT 基因第 2 外显子内,由 Gibco-BRL 公司合成,其序列 5'-CGTTTGTGCAGGGCGTGGCTCTC-3'和 5'-AGGGTGTCTCCACAACCTGGACCC-5' (AC 为非配对碱基),在 AGT 基因第 2 外显子内 704 外核苷酸 T 转变 C,并不改变限制性酶切位点,但产生一个适合被 Tth^[11](C>NNGTC)酶切的“半位点”,与之相应的另一个“半位点”的引入是通过存在两个非配对碱基的 PCR 引物来完成。PCR 反应终体积为 50 μL。PCR 循环参数(94 °C 4 min;94 °C 30 s,68 °C 1 min,72 °C 1 min,30 cycles,72 °C 8 min)扩增目的基因。PCR 产物经 Tth112(Promega 公司)限制性内切酶酶切(具体操作过程

参照产品说明书)取酶切产物 10 μL 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。DNA 用溴化乙锭(EB)染色,在 UV 透射仪上观察结果:仅有 163 bp 带的纯合子型(MM),仅有 140 bp 带的纯合子型(TT),具有 163 bp 和 140 bp 两种带的杂合子型(MT)。ACE 基因 I/D 多态性检测采用 PCR 方法分析,引物位于 ACE 基因的第 16 内含子内,由 Samgon 公司合成,其序列为 5'-TGG-GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3'和 5'-TCG CCA CGC CTC CCA TCG CCA TAA-3'。PCR 反应终体积为 50 μL。PCR 循环参数(95 °C 5 min,95 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1 min,35 °C cycles,72 °C 5 min)扩增目的基因。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。EB 染色,在 UV 透射仪上观察结果。ACE 有 3 种基因型:仅有 190 bp 带的纯合子缺失型(DD),仅有 490 bp 带的纯合子插入型(II),具有 190 bp 和 490 bp 两种带的杂合子型(DI)。

1.3 统计学方法 数据统计采用 SPSS10.0 软件进行处理,卡方检验和非配对 t 检验分别比较计数资料和计量资料;计量采用资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,基因型和等位基因频率采用频率计数法计算,组间频数比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 AGT 基因和 ACE 基因多态性分布及其与对照组比较 159 例 EH 患者,TT 型 101 例,MT 型 41 例,MM 型 17 例,DD 型 58 例,DI 型 71 例,II 型 30 例;147 例健康对照组,67 例 TT,55 例 MT 型,25 例 MM 型,26 例 DD 型,73 例 DI 型,48 例 II 型。EH 组中 TT 型和 DD 型显著高于与对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。EH 组 TT 等位基因型和 DD 等位基因型分布与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、2。

表 1 AGT 基因型与等位基因频率[n(%)]

| 组别 | n | AGT 基因型 | | | 等位基因频率 | |
|------|-----|-------------|------------|------------|--------|---------|
| | | TT | MT | MM | T | M |
| EH 组 | 159 | 101(63.53)* | 41(25.79)* | 17(10.69)* | 76.42* | 23.582* |
| 对照组 | 147 | 67(45.58) | 55(37.41) | 25(17.01) | 64.288 | 35.72 |

注:对照组比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 ACE 基因型与等位基因频率[n(%)]

| 组别 | n | AGT 基因型 | | | 等位基因频率 | |
|------|-----|------------|------------|------------|--------|-------|
| | | DD | DI | II | T | M |
| EH 组 | 159 | 58(36.48)* | 71(44.65)* | 30(18.87)* | 58.80* | 41.2* |
| 对照组 | 147 | 26(17.69) | 73(49.66) | 48(32.65) | 42.52 | 57.48 |

注:对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 按性别分组后,男性 EH 患者 M235T 基因突变频率显著高于健康对照组,而在女性 EH 患者 M235T 基因突变频率与健康对照组之间差异无统计学意义。见表 3。

表 3 不同性别组的 AGT 等位基因频率(%)

| 组别 | 男 | | 女 | |
|------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 健康对照组 (n=83) | EH 组 (n=96) | 健康对照组 (n=64) | EH 组 (n=63) |
| M235 | 30.54 | 20.57 | 38.76 | 33.43 |
| T235 | 60.46 | 79.43 | 61.24 | 66.57 |

2.3 T 和 D 等位基因造成 EH 的相对危险性分析 T 和 D

等位基因造成的 EH 相对危险性:T 和 D 等位基因分别比 M 和 I 等位基因(T 和 D 等位基因的相加作用):TT 比 MT 和 MM 基因型(T 等位基因为隐性作用),DD 比 DI 和 II 基因型(D 等位基因为隐性作用);TT 和 MT 比 MM 基因型(T 等位基因为显性作用,DD 和 DI 比 II 等位基因(D 等位基因为显性作用),分别计算比值比(OR 值及 95% 可信区间), $P < 0.05$ 说明 T 和 D 等位基因可能作为 EH 的各自独立的危险因素,见表 4。

表 4 T 和 D 等位基因造成 EH 的相对危险性分析

| 项目 | OR 值(95% 可信区间) | P |
|-------------------|--------------------|--------|
| T 等位基因比 M 等位基因* | 1.872(1.198~2.986) | <0.05 |
| TT 型比 MT 和 MM 型# | 2.764(1.318~6.179) | <0.051 |
| TT 和 TM 型比 MT 型△ | 2.075(1.012~4.613) | <0.05 |
| D 等位基因比 I 等位基因* | 1.969(1.235~2.97) | <0.05 |
| DD 型比 DI 型和 II 型# | 2.819(1.282~6.179) | <0.05 |
| DD 型和 DI 型比 II 型△ | 2.166(0.997~4.651) | <0.05 |

注:* T、D 等位基因为相加作用;# T、D 等位基因为隐性作;△ T、D 等位基因为显性作用。

3 讨 论

AGT 经肾素分解,可形血管紧张素 I,再经 AGT 作用,形成有生物活性的八肽血管紧张素(Ang),后者可引起血管收缩,刺激肾脏对钠重吸收,最终导致血压升高。血浆 AGT 浓度 Ang 形成的限速因子,血浆 AGAT 水平随 235T 等位基因数量的增加而增加,血浆 AGT 的增加又可引起 Ang II 水平的过度增高,从而使血压升高,是 RAS 活性的一个重要决定因素。

本研究选择湖南西部及重庆市、贵州省毗邻地区苗群人群为对象,进行联合基因的研究。本研究结果发现,血管紧张素原 T235 等位基因频率在 EH 组中明显高于对照组,TT 基因型的发病风险明显高于 MM 型,且随着 T 等位基因的增加,发生原发性高血压的风险也增加。T 等位基因频率(76.42)与台湾地区、日本和黑人人群的研究结果相似(77.7~86.60)^[3-5];与中国其他地区的分布差异有统计学意义^[6]。提示在中国苗族人群中 AGTM235T 基因多态性与 EH 的发生有关系,TT 基因型可能是中国苗族人群 EH 的易感基因型。根据按性别分组后结果分析,AGT 可能直接对男性存在 EH 危险,而对女性起间接作用,因为 AGT 基因启动子 5'/侧区存在雌激素调控因子,故性别可能调节与 AGT 相关的 EH 易感性。ACE 基因多态性与多种心血管疾病有关,主要作用于血管水平,D 等位基因使血管的 ACE 水平增加,引起局部 Ang 活性增加缓激肽失活,导致血管长期或暂时痉挛,使心肌梗死发生^[7]。因此,ACE 可能与局部循环密切相关,而对全身循环影响不大。本研究结果提示中国苗族人群中 EH 患者 ACE 基因 DD 型明显高于对照组,表明 ACE 基因多态性与高血压有关联,这与国外报道不一致^[8-9]。进一步分析 T·D 等位基因造成的 EH 相对危险性(OR)值也表明,T·D 等位基因可能作为 EH 相对的各自独立危险因素。

EH 是一种多基因和多环境因素疾病,单一基因的作用可能不足以成为其致病机制,或许对高血压的发生、发展只产生微弱的影响。本研究与以往的研究结果有所不同,可能是由于 AGT 和 ACE 基因多态性的分布存在种族和地区差异,对不同种族人群研究相矛盾的结果也反映了高血压单一基因的低效

性。因此结合高血压家族史或进行家系分析,并关联其他的相关基因,对进一步寻找未知基因,阐明 EH 的分子生物学机制具有重要意义。

参考文献

[1] Jiang X, Sheng HH, Lin G, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms on blood pressure response to antihypertensive treatment[J]. Chin Med J, 2007, 120(9): 766-782.

[2] Sobstyl J, Dzida G, puiniak A, et al. Angotensin-converting enigma gene inserton /deletion poly morphism in polish patients wish myocardial infaretion[J]. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med, 2002, 57(2): 21-28.

[3] Sheu WH, Lee WJ, Jeng CY, et al. Angiotensinogen gene polymorphism is associated with insulin resistance in non-diabetic men with or without coronary heart disease[J]. Am Heart J, 1998, 136(1): 125-131.

[4] Ichihara S, Yokota M, Fujimura T, et al. Lack of association between variants of angiotensinogen gene and the risk of the coronary artery disease in middle-aged Japanese

men[J]. Am Heart J, 1997, 134(2 Pt 1): 260-265.

[5] Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, et al. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children[J]. J Clin Invest, 1995, 95(3): 948-953.

[6] 魏向龙, 王谷亮, 李迪元, 等. 原发性高血压血管紧张素转换酶和血管紧张素原基因遗传倾向[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(6): 432-434.

[7] Cambien F, Poirier O, Lecerf L. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin_converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction[J]. Nature, 1992, 359(6369): 641-644.

[8] Harrap SB, Davidson HR, Cornor JM, et al. The Angiotensin-converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure[J]. Hypertension, 1993, 21(4): 455-460.

[9] Morise T, Takeuchi Y, Takeda R. Angiotensin converting enzyme polymorphism and essential hypertension [J]. Lancet, 1994, 343(8889): 125.

(收稿日期: 2011-03-18)

• 临床研究 •

3 126 例血培养结果的细菌学分布及耐药性分析

马红英¹, 赵江花², 吕春兰¹, 赵文申²(1. 北京市怀柔区中医医院检验科 101400; 2. 河北省邯郸市中心医院检验科 056001)

【摘要】 目的 统计分析 2008~2010 年 3 126 例血培养标本中分离的病原菌分布及耐药情况, 指导临床合理使用抗生素。方法 采用全自动血培养仪 Bact/Alert 120 及专用血培养瓶, 阳性血培养转种血/中国兰培养基和巧克力培养基, 细菌鉴定采用 VITEK 2 COMPACT 全自动细菌分析仪, 药敏试验采用 K-B 法。结果 血培养阳性率为 16.86%, 检出致病菌共 527 株, 革兰阳性球菌以凝固酶阴性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌占优势, 革兰阴性杆菌以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌居多, 真菌以白色念珠菌居多; 凝固酶阴性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁、阿米卡星、米诺环素较敏感, 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对亚胺培南、美洛培南、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星较敏感。结论 河北省邯郸市中心医院血液标本细菌检出率较高, 以革兰阳性菌为主, 抗生素耐药率高。了解血液感染细菌的分布特征和耐药性, 对减少院内感染, 指导临床合理使用抗生素有重要意义。

【关键词】 血培养; 细菌分布; 耐药性

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 12. 040 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)12-1490-03

血液培养是临床医师诊治菌血症、败血症的重要依据, 近年来, 随着抗生素、免疫抑制剂、各种侵袭性操作及各种介入性治疗手段的应用, 使机体防御功能明显下降, 感染机会增加, 条件致病菌所致菌血症、败血症在医院中的发生率有上升的趋势, 且分离菌对临床常用抗生素的耐药性较高, 常导致经验治疗失败^[1]。为了解血培养分离菌的分布及对常用抗生素的耐药情况, 作者对 2008~2010 年送检的 3 126 例血培养标本中的细菌分布和对抗生素的耐药情况进行回顾性分析, 以供临床治疗参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008~2010 年河北省邯郸市中心医院住院和门诊的 3 126 例疑为败血症患者的血培养标本, 其中男 1 737 例, 女 1 389 例, 同一患者连续多次分离同一菌株不重复计入。成人抽取静脉血 8~10 mL, 儿童抽取静脉血 1~5 mL, 立即送检。

1.2 仪器与试剂 血培养采用法国生物梅里埃的全自动血培养仪 Bact/Alert 120 及专用血培养瓶, 分离培养所用血/中国兰培养基、巧克力培养基、沙氏培养基购自天津金章, 鉴定采用 VITEK 2 COMPACT 全自动细菌分析仪及配套的细菌鉴定卡, 药敏采用 K-B 法, 培养基和药敏纸片由英国 Oxoid 公司生产。

1.3 方法 将接种好的血培养瓶置于 Bact/Alert 120 全自动血培养仪中, 仪器报警提示阳性者立即转种相应培养基, 同时取肉汤培养物直接作革兰染色镜检, 并将结果初步报告临床。采用 VITEK 2 COMPACT 全自动细菌分析仪进行细菌鉴定, 小部分菌株采用传统方法鉴定。K-B 法药敏操作和结果判断按照临床和实验室标准委员会(CLSI)文件, 用头孢西丁纸片监测耐甲氧西林葡萄球菌, 用阿莫西林/克拉维酸与头孢他定、头孢噻肟组合筛选产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)。标准菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853), 由中国协和医院惠赠。