

论著·临床研究

ACE2 基因多态性与儿童原发性 肾病综合征的相关性研究

邱明瑜¹ 谢琴芳¹ 王丽娜¹ 于力²

(1. 广州市南沙中心医院儿科, 广东 广州 511457; 2. 广州市第一人民医院儿科, 广东 广州 510180)

[摘要] **目的** 血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 基因多态性与高血压病、糖尿病肾病等多种疾病相关, 是否参与儿童原发性肾病综合征 (PNS) 的发病尚不明确, 该研究探讨广东汉族儿童 ACE2 基因 A9570G 多态性与 PNS 的相关性。**方法** 选取广东汉族 PNS 患儿 66 例为肾病组, 健康体检者 60 例为对照组, 采用聚合酶链反应-限制性核酸内切酶片段长度多态性技术分析肾病组与对照组的 ACE2 基因 A9570G 基因型分布和等位基因频率。**结果** 在女性和男性, 两组间等位基因频率及基因型分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。肾病组按糖皮质激素治疗反应分为激素敏感组和激素耐药组, 亚组分析发现, 在女性, 激素敏感组 GG 基因型频率低于激素耐药组 (17% vs 45%, $P<0.05$), 激素敏感组 G 等位基因频率亦低于激素耐药组 (31% vs 61%, $P<0.05$); 在男性, 激素敏感组 G 基因型/G 等位基因频率低于激素耐药组 (36% vs 64%, $P<0.05$)。**结论** ACE2 基因 A9570G 多态性与儿童 PNS 的发生无明确关联, 但可能与 PNS 患儿对糖皮质激素治疗的反应有关, G 等位基因可能是儿童 PNS 激素耐药的遗传易感因素。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 232-236]

[关键词] 原发性肾病综合征; 血管紧张素转换酶 2; 基因多态性; 糖皮质激素治疗反应; 儿童

Association between angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphisms and childhood primary nephrotic syndrome

QIU Ming-Yu, XIE Qin-Fang, WANG Li-Na, YU Li. Department of Pediatrics, Nansha Central Hospital of Guangzhou City, Guangzhou 511457, China (Wang L-N, Email: wanglina_11@yeah.net)

Abstract: Objective Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms have been shown to be implicated in hypertension, diabetic nephropathy, and other diseases. However, it remains unclear whether ACE2 gene polymorphisms are involved in the development of primary nephrotic syndrome (PNS) in children. The aim of this study was to assess the association between A9570G polymorphisms of ACE2 gene and PNS in a group of Han children in Guangdong Province, China. **Methods** The genotype distribution and allele frequency of ACE2 gene A9570G in 66 children with PNS and 60 healthy subjects (control group) were analyzed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Results** Allele frequency and genotype distribution showed no significant difference between the PNS and control groups whether in female or in male children ($P>0.05$). The PNS group was classified into the glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant subgroups according to glucocorticoid treatment response. Subgroup analysis revealed that in female children, the frequency of GG genotype was 17% in the glucocorticoid-sensitive group vs 45% in the glucocorticoid-resistant group ($P=0.018$); the frequency of G allele was 31% in the glucocorticoid-sensitive group vs 61% in the glucocorticoid-resistant group ($P=0.023$). In male children, the frequency of G genotype/G allele was 36% in the glucocorticoid-sensitive group vs 64% in the glucocorticoid-resistant group ($P=0.017$). **Conclusions** There is no clear association between ACE2 gene A9570G polymorphisms and childhood PNS, but ACE2 gene A9570G polymorphisms might be associated with glucocorticoid treatment response in children with PNS. The G allele might be a genetic susceptibility factor of glucocorticoid resistance in children with PNS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(3): 232-236]

Key words: Primary nephrotic syndrome; Angiotensin-converting enzyme 2; Gene polymorphism; Glucocorticoid treatment response; Child

[收稿日期] 2014-08-05; [接受日期] 2014-10-16

[作者简介] 邱明瑜, 女, 本科, 住院医师。

[通信作者] 王丽娜, 女, 主任医师。

儿童原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是一种常见的儿科肾脏疾病,是由于多种病因造成肾小球基底膜通透性增高,大量蛋白从尿中丢失的临床综合征,发病机制至今仍未阐明,环境、遗传、治疗等因素可影响其病变的进展和预后。近年来研究发现,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在肾脏疾病的发生发展中发挥重要作用^[1-2],血管紧张素-Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)是RAS主要效应激素,不仅参与调节肾小球内血液动力学的变化,还可引起肾小球系膜细胞增生和细胞外基质增多,而这些均是导致肾小球硬化的关键因素。Ang Ⅱ主要由血管紧张素Ⅰ在血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)作用下生成。血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)是新近发现的活性酶^[3],是RAS新成员,能水解Ang Ⅱ成为血管紧张素1~7(Ang-1~7),是肾脏重要的保护因子。已有研究发现,ACE基因、Ang Ⅱ-1型受体基因等RAS相关基因多态性与儿童PNS的发病及预后有关^[4],然而有关ACE2基因多态性与儿童PNS的关系未见报道。本研究采用聚合酶链反应-限制性核酸内切酶片段长度多态性技术分析ACE2基因A9570G多态性,探讨ACE2基因多态性与儿童PNS的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2012年6月至2014年3月45例在广州市第一人民医院和21例在广州市南沙中心医院住院的PNS患儿共66例,所有患儿均为广东汉族,彼此间无血缘关系。其中男39例,女27例;年龄3~14岁,平均年龄 7.8 ± 3.2 岁;身高 113 ± 18 cm;体重 30 ± 11 kg;体重指数 18 ± 3 ;发病时间7~35 d,平均病程 22 ± 9 d;24 h尿蛋白 4.3 ± 2.1 g;血浆白蛋白 19 ± 5 g/L;血浆胆固醇 7.2 ± 1.5 mmol/L。其中40例表现为单纯型,26例表现为肾炎型。

PNS的诊断及糖皮质激素治疗反应类型依据中华医学会儿科学分会肾脏病学组2009年指南判断^[5]。PNS诊断标准:(1)大量蛋白尿;(2)低蛋白血症,血浆白蛋白低于25 g/L;(3)高脂血症,血浆胆固醇高于5.7 mmol/L;(4)出现不同

程度的水肿。激素敏感的判定:泼尼松足量治疗4周内尿蛋白阴转;激素耐药的判定:泼尼松足量治疗4周以上尿蛋白仍阳性。

入选标准:符合PNS诊断,且无糖皮质激素禁忌症,无肾功能衰竭、血栓及严重感染等并发症,入院前未经糖皮质激素治疗,确诊后糖皮质激素规范治疗时间不少于4周。

对照组来源于同时期上述两家医院健康体检的儿童各30例,共60例,其中男32例,女28例,年龄4~14岁,平均年龄 8.2 ± 2.4 岁,身高 117 ± 18 cm,体重 30 ± 11 kg,体重指数 18 ± 4 。两组性别构成、年龄、身高、体重、体重指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 样本采集和DNA提取

所有患儿空腹抽取静脉血5 mL置于EDTA抗凝试管中,采用Tiangen公司提供的外周血基因组DNA提取试剂盒提取DNA,标化DNA浓度值至20 mg/L,溶于TE缓冲液中,−80℃冻存。

1.3 ACE2基因多态性检测

采用聚合酶链反应-限制性核酸内切酶片段长度多态性技术进行基因分型。上游引物序列为:5'-CATGTGGTCAAAAGGATATCT-3',下游引物序列为:5'-AAAGTAAGGTTGGCAGACAT-3'。酶切反应体系20 μL,包括特异性PCR扩增产物8 μL,Alu I酶1 U,10×buffer(Alu I酶自带)2 μL,消毒双蒸水9 μL。酶切温度:37℃,酶切时间:16 h。酶切产物点样于2%琼脂糖凝胶,以50 bp ladder标志作为判断DNA片段大小的标准物,100 V电泳35 min,在紫外灯下观察电泳条带以鉴定基因型。抽取部分样品测序核实基因型。

1.4 统计学分析

由于ACE2基因位于X染色体,按性别进行分类统计。采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用构成比(%)表示。两组间均数比较采用成组t检验,组间计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACE2基因型测序及酶切电泳结果

基因测序(图1)证实ACE2基因A9570G多态性位于第3内含子第4碱基,纯合子呈单峰,

杂合子呈双峰。AA 基因型的 PCR 产物被酶切成 281 bp 和 185 bp 两个片段，GG 基因型的产物不能被酶切，电泳时仅有 1 个片段，长度为 466 bp，而 AG 杂合子表现为同时具有 281 bp、185 bp 和 466 bp 3 个条带（图 2）。

2.2 PNS 组和对照组 ACE2 基因多态性分析

在女性，PNS 组和对照组均以 AA 基因型最常见，两组基因型分布差异无统计学意义（ $P=0.689$ ）；两组等位基因频率比较差异也无统计学意义（ $P=0.621$ ），见表 1。在男性，对照组和肾病组均以 A 基因型常见，两组等位基因频率 / 基因型分布比较差异也无统计学意义（ $P=0.715$ ），见表 1。

2.3 激素敏感组和耐药组间 ACE2 基因多态性分析

将 66 例 PNS 患儿按糖皮质激素治疗反应分为激素敏感组和激素耐药组进行亚组分析。在女性，激素敏感组 GG 基因型频率低于激素耐药组，差异有统计学意义（ $P=0.018$ ）；激素敏感组 G 等位基因频率亦低于激素耐药组，差异有统计学意义（ $P=0.023$ ），见表 2。在男性，激素敏感组 G 基因型 / G 等位基因频率低于激素耐药组，差异有统计学意义（ $P=0.017$ ），见表 2。

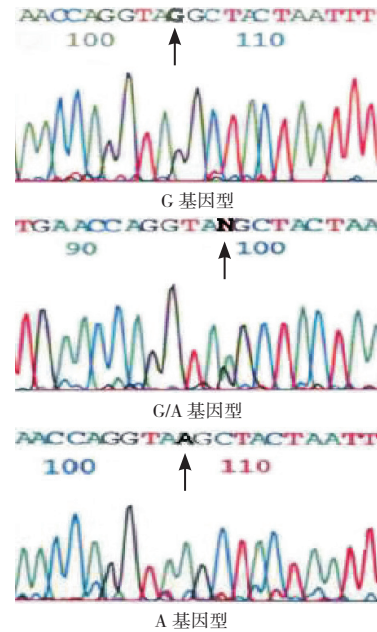


图 1 ACE2 基因 A9570G 多态测序图 图中箭头所指部分为多态性位点，纯合子呈单峰，杂合子呈双峰。

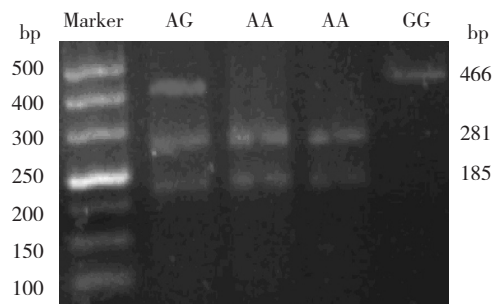


图 2 酶切电泳条带

表 1 PNS 组和对照组间 ACE2 基因型分布和等位基因频率的比较 [n (%)]

组别	女性						男性		
	例数	基因型			等位基因		例数	基因型 / 等位基因	
		GG	AG	AA	G	A		G	A
对照组	28	7(25)	8(29)	13(46)	22(39)	34(61)	32	13(41)	19(59)
PNS 组	27	8(30)	7(26)	12(44)	23(43)	31(57)	39	17(44)	22(56)
χ^2 值			1.101		1.124			1.023	
P 值			0.689		0.621			0.715	

表 2 PNS 亚组间 ACE2 基因型分布和等位基因频率的比较 [n (%)]

组别	女性						男性		
	例数	基因型			等位基因		例数	基因型 / 等位基因	
		GG	AG	AA	G	A		G	A
激素敏感组	18	3(17)	5(28)	10(55)	11(31)	25(69)	28	10(36)	18(64)
激素耐药组	9	4(45)	3(33)	2(22)	11(61)	7(39)	11	7(64)	4(36)
χ^2 值			4.657		3.879			4.875	
P 值			0.018		0.023			0.017	

3 讨论

ACE2 是一种 1 型跨膜糖蛋白, 与 ACE 具有一定序列相似性的羧肽酶, 在肾脏、血管内皮、心、肺等多种器官和组织中均有表达。ACE2 的主要底物为 Ang II, 可将其分解为 Ang-1~7, 后者与其特异受体 Mas 结合, 形成 ACE2-Ang-(1~7)-Mas 通路, 发挥与传统 ACE-Ang II-AT1 通路相拮抗的作用。ACE2 作为 RAS 新发现的关键酶, 近年来迅速成为研究热点。Shiota 等^[6]用链脲佐菌素诱导 ACE2 基因敲除小鼠和野生型小鼠发生糖尿病, 分别在第 4 周和第 18 周检测它们的尿液, 发现 ACE2 基因敲除小鼠较野生型小鼠的蛋白尿出现早、进展快; ACE2 基因敲除小鼠的肾小管间质损害更为严重。Nadarajah 等^[7]发现, 足细胞 ACE2 表达对肾损伤具有明显的保护作用, 可见 ACE2 对肾小球和肾间质具有保护作用。徐志泉等^[8]研究发现, 肾病综合征患儿存在 RAS 的激活, ACE2 可能参与肾病综合征的发病。

ACE2 基因定位于 Xp22^[9], 有 18 个外显子, 本研究中的 SNP 位点 A9570G 位于第 3 内含子, 紧靠外显子的位置, 这个位点的变异可以改变 mRNA 的剪接^[10], 其改变可能对基因的功能产生影响, 从而参与疾病的发生发展。ACE2 基因多态性与高血压、冠心病等疾病的关系已被多个研究证实^[11-12], 与肾脏疾病的关系也越来越受重视, Chaoxin 等^[13]研究发现携带 G 等位基因的男性糖尿病患者容易出现尿蛋白, 提示 G 等位基因可能是肾脏损害的易感因素之一, 而 Currie 等^[14]针对糖尿病肾病与 ACE2 基因多态性的关系的研究, 并未发现阳性结果。有关 ACE2 基因多态性与肾脏疾病的研究结果尚不一致, 有待进一步研究。本研究发现, ACE2 基因 A9570G 多态性在 PNS 患儿和健康儿童中的基因型分布和等位基因频率未见明显差异, 提示该多态性位点与儿童 PNS 的发病无明显关系。进一步行亚组分析发现, 在女性, 激素敏感组 GG 基因型频率和 G 等位基因频率均低于激素耐药组; 在男性, 激素敏感组 G 基因型/G 等位基因频率低于激素耐药组, 提示 ACE2 基因 A9570G 多态性与 PNS 患儿激素治疗反应有关, G 等位基因可能是激素耐药的遗传易感因素, 而糖皮质激素是治疗儿童 PNS 的首选药, 因此, 检测

ACE2 基因 A9570G 多态性有助于儿童 PNS 的疗效评估及预后判断。ACE2 基因 A9570G 多态性如何影响儿童 PNS 对激素治疗的反应目前尚不清楚。有研究发现, 用牛血清白蛋白处理人肾近曲小管上皮细胞可以导致 ACE mRNA 及蛋白水平显著升高, ACE2 mRNA 与蛋白水平下降, 而细胞培养液中 Ang II 生成量增多, 说明在病理状态下产生蛋白尿后, 可能通过上调肾脏 ACE 水平, 下调 ACE2 水平诱导局部 RAS 激活, 加速肾脏病变进程^[15]。因此, 本研究推测, 当儿童 PNS 发生后大量的蛋白尿导致局部 RAS 激活, 由于基因多态性的存在导致患儿局部 RAS 激活的程度和反应有所不同, 特别是局部 ACE2 水平的降低, 导致肾脏病变程度和对药物治疗反应均有所不同。

综上所述, 本研究通过对 PNS 患儿 ACE2 基因 A9570 多态性分析, 发现 ACE2 基因 A9570 多态性与儿童 PNS 的发生无明确关联, 但可能与 PNS 患儿糖皮质激素治疗反应有关, G 等位基因有望作为 PNS 患儿预后的预测指标。但本研究样本量小, 尚需大样本、多中心进一步研究, 并深入探讨其内在机制, 为儿童 PNS 防治提供有效的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Tikellis C, Bernardi S, Burns WC. Angiotensin-converting enzyme 2 is a key modulator of the renin-angiotensin system in cardiovascular and renal disease[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011, 20(1): 62-68.
- [2] Burns WC, Thomas MC. Angiotensin II and its role in tubular epithelial to mesenchymal transition associated with chronic kidney disease[J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 193(1-2): 74-84.
- [3] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9[J]. *Circ Res*, 2000, 87(5): E1-E9.
- [4] Prasun P, Prasad N, Tripathi G, et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with steroid responsiveness in childhood nephrotic syndrome[J]. *Indian J Nephrol*, 2011, 21(1): 26-29.
- [5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(一): 激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(试行)[J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(3): 167-169.
- [6] Shiota A, Yamamoto K, Ohishi M, et al. Loss of ACE2 accelerates time-dependent glomerular and tubulointerstitial damage in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Hypertens Res*, 2010, 33(4): 298-307.
- [7] Nadarajah R, Milagres R, Dilauro M, et al. Podocyte-specific

- over expression of human angiotensin-converting enzyme 2 attenuates diabetic nephropathy in mice[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(3): 292-303.
- [8] 徐志泉, 易著文, 党西强, 等. 原发性肾病综合征儿童 24 小时动态血压与肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮水平的关系 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(10): 788-792.
- [9] Eräranta A, Riutta A, Fan M, et al. Dietary phosphate binding and loading alter kidney angiotensin-converting enzyme mRNA and protein content in 5/6 nephrectomized rats[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 35(5): 401-408.
- [10] Loudianos G, Iovicu M, Dessi V, et al. Abnormal mRNA splicing resulting from consensus sequence splicing mutations of ATP7B[J]. *Hum mutat*, 2002, 20(4): 260-266.
- [11] Patnaik M1, Pati P, Swain SN, et al. Association of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme-2 gene polymorphisms with essential hypertension in the population of Odisha, India[J]. *Ann Hum Biol*, 2014, 41(2): 143-150.
- [12] Vaškū A, Bienertová-Vaškū J, Pařenica J, et al. ACE2 gene polymorphisms and invasively measured central pulse pressure in cardiac patients indicated for coronarography[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2013, 14(3): 220-226.
- [13] Chaoxin J, Daili S, Yanxin H, et al. The influence of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphisms on type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease[J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2013, 17(19): 2654-2659.
- [14] Currie D, McKnight AJ, Patterson CC, et al. Investigation of ACE, ACE2 and AGTR1 genes for association with nephropathy in Type 1 diabetes mellitus[J]. *Diabet Med*, 2010, 27(10): 1188-1194.
- [15] Liu BC, Gao J, Li Q, et al. Albumin caused the increasing production of angiotensin II due to the dysregulation of ACE/ACE2 expression in HK2 cells[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 403(1-2): 23-30.

(本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

2015 年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊, 北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊, 同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 并被《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重, 反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国内外儿科研究及动态、论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊, 每月 15 日出版, 向国内外公开发行人。2014 年起本刊已改为全彩版, 版面编排、设计更加美观。欢迎全国各高等医学院校, 各省、市、自治区、县医院

和基层医疗单位, 各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 20 元, 全年 240 元。邮发代号: 国内 42-188; 国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统, 免审稿费, 审稿周期 3~6 周。欲浏览本刊或投稿, 请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编: 410008

电话: 0731-84327402; 传真: 0731-84327922; Email: ddek7402@163.com; 网址: [http:// www.cjcp.org](http://www.cjcp.org)