

Total Cholesterol and Alkaline Phosphatase are Increased in D/D Type of Angiotensin Converting Enzyme

Sung-Su Kim[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

The polymorphism (insertion, I or deletion, D) of angiotensin converting enzyme (ACE) gene is designated as the presence of a 287 bp Alu repeat. The D/D homozygote carrier is associated with high ACE activity, and this high activity has been implicated with hypertension, coronary artery disease, or diabetic nephropathy. We studied the clinical candidate marker in ACE gene polymorphism using chemical and hematological analysis. The subjects are divided into normotensive and hypertensive groups and ACE genotype in the group was confirmed by PCR method. Chemical analysis was preceded with Hitachi7060, and hematological analysis was performed using Mythic 22. In 116 targeted people, 17 (38.64%) of 44 I/I genotype group are hypertension, 15 (34.09%) in 44 with D/I, but, D/D type in the 28 cases is 15 patients (53.57%) in hypertension. In hypertension group, biochemical analysis (triglyceride, and alkaline phosphatase) and hematological analysis (white blood cell, platelet) are showed high value in D/D genotype of ACE gene. The relationship between hypertension and ACE genotype is the same results as previously reported and we thought that the high laboratory value of white blood cell, platelet, triglycerides, and alkaline phosphatase are also indicator of hypertension in D/D type of ACE.

Key Words: Angiotensin converting enzyme, Blood pressure, Genotyping, Biochemical analysis, Hematological analysis

서 론

급성관상질환은 장년층에서는 일반적인 질환이며 모든 인종과 사회에서 치사율에 결정적인 역할을 한다(Ruff and Braunwald, 2011). 세계적으로 30%의 사망원인이 되고 있으며, 개발도상국에서는 80%에 이르기도 하여 국제적인 문제가 되고 있다(Yusuf et al., 2001). 임상적으로, 심부전인 경우는 좌심실수축도가 20~25% 줄어들고, 40% 이상 줄어드는 경우는 심장에 쇼크가 올 수 있다(Ganz P, 2001).

안지오텐신변환효소(Angiotensin converting enzyme, ACE) 유전자는 renin-angiotensin system (RAS)의 중요한 요소로

서, 고혈압을 유발하는 유전자 중의 하나로서 연구되어 왔다(Qu et al., 2001). ACE 유전자형은 intron 16에서 287 bp의 Alu repeat의 존재의 유무에 따라서 I형과 D형으로 나누어진다. D/D형의 경우 I/I나 D/I 형태와는 다르게 혈청 내에서 높은 ACE의 농도를 유지하는 것으로 보고되고 있다(Rigat et al., 1990; Tiret et al., 1992).

ACE는 zinc metalloproteinase로, 이 고혈압을 일으키는 주요 인자인 ACE의 작용으로는 혈관기능 조절물질인 angiotensin의 활성화가 있다. 체내에 있는 angiotensin은 type 1 (AT I)과 type 2 (AT II) 두 가지 형태가 있는데, ACE의 작용에 의해 비활성인 angiotensin I이 활성형인 angiotensin II로 전환되며, 혈관을 수축시키는 직접적인 원인이 된다고 알려져 있다. 즉 ACE의 발현양이 높을수록 체내에서 혈관의 수축과 aldosterone 분비로 인해 나트륨의 저류가 일어나 혈압이 상승하고 고혈압의 원인이 된다. 또한 ACE는 혈관 확장물질인 bradykinin의 불활성화를 일으켜 혈압상승의 원인이 된다(Erdos and Skidgel, 1987).

ACE는 RAS의 중요 구성인자로(Forsyth et al., 2004), 폐

*Received: July 1, 2012 / Revised: October 2, 2012

Accepted: October 3, 2012

[†]Corresponding author: Sung-Su Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea.
Tel: +82-42-280-2903, Fax: +82-42-280-2904
e-mail: sungsu@dju.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

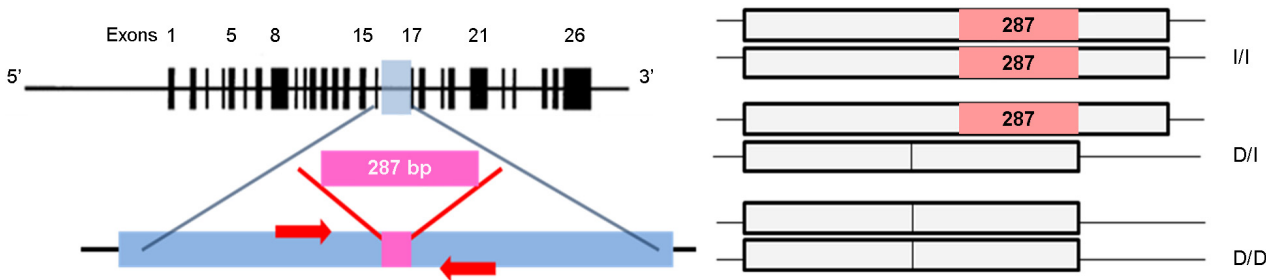


Fig. 1. PCR primer location and its diagram of PCR results according to the presence of type D and I.

와 신장의 endothelial cell과 epithelial cell에 높은농도로 존재한다. ACE와 angiotensin II (AT II)는 혈압과 혈액의 양을 조절하는 기능이 있다고 알려져 있으며(Miller et al., 1977; Reid et al., 1978) AT II의 경우는 동물실험에서 vascular smooth muscle cell 의 증식과 비대(hypertrophy)를 유도한다고 알려져 있다(Campbell-Boswell and Robertson, 1981; Geisterfer et al., 1988).

ACE 유전자는 17번 염색체의 단완(short arm)에 위치하고, 크기는 24,070 bp이며 26개의 exon과 intron으로 구성된다(Rieder et al., 1999). 이중 intron 16에 존재하는 287 bp 분절의 유무에 따라 결손(deletion, D형: 190 bp)과 삽입(insertion, I형: 490 bp)의 유전적인 다형성이 존재하고 있어서(Fig. 1) I/I, D/D, D/I의 세 가지 유전자형을 갖고 이중 I형 대립유전자는 심폐지구력을 결정하는 중요한자로 D형 대립유전자보다 스트레스성 자극에 대해 보다 더 지구성이 강하고 근육대사활동의 효율성이 높은 반면 D/D형은 심장 질환 및 X-linked syndrome 등과 관련성이 깊은 것으로 시사되어 왔다(Cambien et al., 1992; Jones et al., 2002).

심근경색이 있는 경우 ACE 억제제 치료는 병적인 상태나, 심부전 또는 심장으로 인한 사망률을 줄이는 것으로 알려져 있다(Kober et al., 1995; Keavney et al., 2000). 심부전에서의 ACE 유전자의 D/D형은 좌심실의 비대와 심실의 구조적 변형(Zintzaras et al., 2008)이나 울혈성 또는 확장성 심근병(Harn et al., 1995; Lindpaintner et al., 1995)의 위험도를 높이는 것으로 알려져 있다.

ACE 유전자의 유전형에 따라 전형적인 심근경색의 위험인자를 갖지 않는 환자에서 심근경색의 독립위험인자로 작용함이 보고되었으며, D allele이 많을수록 혈중 ACE 농도가 상승하는 것으로 보고되었다(Danser et al., 1995).

본 실험은 ACE 유전자형에 따라 나타나는 고혈압과의 연관성을 확인하고, ACE의 유전자형에 따른 생화학적, 혈

액학적 지표인 total cholesterol (T-CHO), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), Platelet (PLT), Hematocrit (HCT), creatine (CRE), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT), blood urea nitrogen (BUN), triglyceride (TG), hemoglobin (HGB), glucose (GLU), pulse 등을 측정하여, ACE의 유전자형에 따른 검사지표의 변화를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

연구대상

본 연구에서 고혈압군은 수축기 혈압(systolic blood pressure) 130 mmHg 이상이거나 이완기 혈압(diastolic blood pressure) 90 mmHg 이상으로 정의하였으며, 신장이상 그리고 당뇨병 등의 다른 질환을 가진 환자는 포함되어 있지 않다. 정상대조군으로는 수축기 혈압이 130 mmHg 미만이고 이완기 혈압이 90 mmHg 미만이며 당뇨병, 뇌혈관질환, 관상동맥질환 등의 병력이 없고, 이러한 질환의 가족력이 없으며 건강하고 혈연관계가 없는 대전대학교 학생 중 남성 116명을 대상으로 하였다. 본 연구는 모든 참여 대상자들로부터 유전자 검사에 대한 서면 동의서를 받은 후 수행하였다.

혈액 채취 및 DNA 추출

혈액을 채취 전에 식사를 12시간 이상 금한 남성 116명의 혈액 2 cc를 채혈하여 EDTA tube에 넣어 응고를 방지하고 그 중에 200 μ l의 혈액을 사용하여 DNA를 분리하였다. DNA 추출은 LaboPass™ Blood mini kit (Cosmo Genetech, Korea)를 사용하여 시행하였다.

DNA 증폭과 대립유전자 특이 중합효소반응

ACE 유전자의 intron 16의 삽입/결손(I/D)으로 생기는 유전적인 다형성을 확인하기 위해서 각각의 primer ACE-F (5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3')와 ACE-R (5'-GAG GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3')를 이용하여 증폭하였다. 중합효소 연쇄반응 용액은 DNA template 1 µg을 이용하여 시행하였다. 결과의 해석은 190 bp의 띠만 보이는 경우를 D/D, 287 bp 삽입되어 존재하여 1개의 띠만 보이는 490 bp의 경우를 I/I, 190 bp과 490 bp이 2개의 띠로 같이 보이는 경우를 D/I로 판독하였다 (Fig. 2).

혈청을 이용한 생화학적 검사

혈액 3 cc를 채혈한 후, SST tube에 넣고 원심분리기를 이용하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청 500 µl를 가지고, HITACHI 7060 (Hitachi chemical Co. America, Ltd)을 이용하여 생화학 검사를 하였다. 생화학 검사 항목은 T-CHO, ALT, AST, ALP, CRE, γ-GT, BUN, TG, Glucose를 포함하는 9가지 검사를 시행하였다.

혈액을 이용한 혈액학적 검사

남성 116명의 혈액 2 cc를 이용하여 EDTA tube에 넣은 후, Mythic 22 (Orphée SA-Medical, Swiss)를 이용하여 혈액학적 검사를 하였다. 혈액학적 검사는 WBC 수치, RBC 수치, platelet 수치, hematocrit 수치, hemoglobin 수치, 총 5가지 검사를 시행하였다.

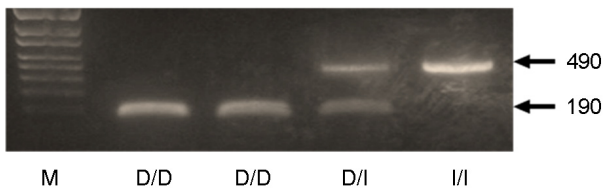


Fig. 2. Detection of I or D ACE genotype. M represents a 100 bp DNA ladder plus.

통계적 분석

모든 실험 결과는 Origin 8.0을 이용하여 평균과 표준 편차(mean ± SD)로 표기하였으며, 실험군과 대조군의 유의한 차이가 있는지 알아보기 위해 *P*-value는 student's *T*-test를 시행하여 얻었다.

결 과

ACE 유전자형에 따른 고혈압의 분포

이환기 혈압이 130 mmHg를 기준으로 높은 경우는 고혈압으로 생각을 하고 집단을 나눈 후 집단에 따른 ACE 유전자의 유전형 확인을 진행하였다. 대상 인원 116명의 ACE 유전자형의 분포는 I/I 유전자형이 44명(38%), D/I 유전자형이 44명(38%), D/D 유전자형이 28명(24%)이었다. I/I 유전자형인 44명 중 고혈압은 17명(38.64%), D/I 유전자형인 44명 중 고혈압은 15명(34.09%), D/D 유전자형인 28명 중 고혈압은 15명(53.57%)로 고혈압과 ACE 유전자의 D allele이 깊은 관련이 있음을 확인할 수 있었다(Table 1). 맥박의 경우는 D/D, I/I 유전자형이나 D/I 유전자형의 집단간에는 별 다른 차이를 보이지 않았음을 알 수 있다(Table 2).

ACE 유전자형에 따른 생화학 검사 결과

생화학 검사항목은 T-CHO, ALT, AST, ALP, CRE, γ-GT, BUN, TG, Glucose를 포함하는 9가지 검사를 시행하였다. 대부분의 생화학적 지표 항목들은 D/I나 I/I 같은 ACE의 유전자형과 관계없이 정상혈압군과 고혈압군과의 유의성이 거의 없었지만, ALP (*P*-value: 0.035), TG (*P*-value: 0.007),

Table 1. Distribution of blood pressure in different ACE genotype

Genotype	D/D type	D/I type	I/I type
No. of person	28	44	44
Normal blood pressure	13	29	27
High blood pressure	15	15	17

Table 2. Pulse rate per minute in different ACE genotype

Genotype	D/D type		D/I type		I/I type	
	High	Normal	High	Normal	High	Normal
Pulse	77.2 ± 11.5	78.3 ± 14.5	72.3 ± 8.9	80.7 ± 12.0	74.9 ± 9.9	75.0 ± 9.8

Mean ± SD.

항목에서는 D/D 유전자형인 경우 정상혈압군에서 보다 고혈압군에서 높은 *P*-value를 보였으며 Glucose (*P*-value: 0.079), T-CHO (*P*-value: 0.113), γ -GT (*P*-value: 0.174)는 관련성이 높음을 알 수 있었다(Table 3).

ACE 유전자형에 따른 혈액학적 검사 결과

혈액학적 검사는 WBC 수치, RBC 수치, platelet 수치,

hematocrit 수치, hemoglobin 수치 등, 총 5가지 검사를 시행하였다. 혈액학적 지표 중 RBC 수치, hematocrit 수치, hemoglobin 수치 항목들은 ACE의 유전자형과 관계없이 정상혈압군과 고혈압군과의 유의성이 거의 없었지만, WBC 수치(*P*-value: 0.082)와 platelet 수치 항목(*P*-value: 0.053)에서는 D/D 유전자형과 D/I 유전자형인 경우 정상혈압군에서 보다 고혈압군에서 높은 측정값을 보였으며,

Table 3. Biochemical analysis in different ACE genotype

Genotype	D/D			D/I			I/I		
	High	Normal	<i>P</i> -value	High	Normal	<i>P</i> -value	High	Normal	<i>P</i> -value
Blood pressure									
AST (IU/L)	24.3 ± 8.1	21.8 ± 6.6	0.363	21.5 ± 7.7	22.3 ± 6.8	0.624	22.8 ± 7.8	22.4 ± 6.5	0.962
ALT (IU/L)	24.0 ± 19.6	17.9 ± 7.1	0.278	19.1 ± 11.7	16.6 ± 9.1	0.653	16.9 ± 10.7	19.6 ± 15.3	0.487
γ -GT (IU/L)	48.1 ± 32.3	34.6 ± 16.9	0.174	37.8 ± 29.2	37.4 ± 27.7	0.650	45.8 ± 31.7	34.5 ± 17.2	0.190
ALP (IU/L)	162.9 ± 44.7	125.3 ± 44.6	0.035*	165.3 ± 60.4	153.8 ± 57.8	0.699	149.8 ± 37.4	145.3+/-56.3	0.748
CRE (mg/dl)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.568	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.880	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.876
BUN (mg/dl)	10.5 ± 2.2	11.1 ± 3.1	0.556	12.0 ± 2.9	10.1 ± 3.6	0.056	10.5 ± 3.8	10.9 ± 3.5	0.723
TG (mg/dl)	126.0 ± 59.2	72.8 ± 36.4	0.007*	95.3 ± 52.4	98.9 ± 60.9	0.947	102.6 ± 68.8	109.9 ± 62.2	0.723
T-CHO (mg/dl)	169.0 ± 33.7	149.3 ± 30.3	0.113	165.6 ± 29.2	152.2 ± 19.0	0.401	155.7 ± 53.0	168.1 ± 28.1	0.382
Glucose (mg/dl)	81.0 ± 16.6	69.8 ± 15.9	0.079	73.9 ± 20.6	77.1 ± 11.0	0.320	78.8 ± 15.2	73.2 ± 12.1	0.214

AST, Aspartate Aminotransferase; ALT, Alanine Aminotransferase; γ -GT, gamma-Glutamyl Transferase; ALP, Alkaline Phosphatase; CRE, Creatinine; BUN, Blood Urea Nitrogen; TG, Triglyceride; T-CHO, Total Cholesterol
Mean ± SD; *, *P*<0.05

Table 4. Hematological analysis in different ACE genotype

Genotype	D/D			D/I			I/I		
	High	Normal	<i>P</i> -value	High	Normal	<i>P</i> -value	High	Normal	<i>P</i> -value
WBC (10 ³ / μ l)	8.0 ± 1.5	7.0 ± 1.3	0.082	8.8 ± 2.7	7.2 ± 1.8	0.059*	7.6 ± 2.2	7.3 ± 1.8	0.737
RBC (10 ⁶ / μ l)	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.4	0.675	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.3	0.599	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.4	0.467
HGB (g/dl)	15.5 ± 0.7	15.9 ± 1.0	0.218	15.8 ± 0.5	15.9 ± 0.8	0.130	15.7 ± 0.8	15.6 ± 1.2	0.496
HCT (%)	46.5 ± 2.1	47.8 ± 3.1	0.205	47.1 ± 1.9	47.5 ± 2.4	0.102	47.0 ± 1.8	46.7 ± 3.3	0.624
PLT (10 ³ / μ l)	273.1 ± 55.2	233.8 ± 47.4	0.053*	286.1 ± 56.5	247.9 ± 47.1	0.029*	270.8 ± 41.8	272.2 ± 54.7	0.879

WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; PLT, platelet
Mean ± SD; *, *P*<0.05

D 형태의 ACE 유전형과 관련성이 있음을 알 수 있었다 (Table 4).

고 찰

RAS는 체내에서 혈압조절 및 나트륨과 칼륨을 포함하는 수분, 전해질 대사의 역할을 수행하고 혈관수축을 비롯하여 전반적인 혈관에 대한 작용에 관여하기 때문에 고혈압의 발생과 유지에 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(MacGregor et al., 1981).

RAS에서 중요한 역할을 수행하는 구성요소 가운데 하나인 ACE 유전자의 다형성이 고혈압 발생에 원인을 제공할 것인가에 대한 연구는 전 세계적으로 많은 학자들에 의해 수행되었으나 인종간의 유전적 차이에 의해 상반된 결과를 보여주고 있다(O'Donnell et al., 1998; Higaki et al., 2000).

현재까지 알려진 ACE 유전자 내에 존재하는 다형성은 13종류로 보고된 바 있다(Zhu et al., 2000). 이들 가운데 ACE 다형성과 심혈관계질환을 비롯한 여러 종류의 유전 질환과의 관련성 연구에 가장 많이 이용된 것이 I/D 다형성 분석이다. Rigat 등(Rigat et al., 1990)의 보고에 따르면 D/I 다형성에서 D 대립인자형을 가진 군이 I형을 가진 군보다 혈장 내의 ACE 활성도에 차이가 있다는 것을 보고하였다. 이후 비록 상반된 결과지만 D/I 다형성과 혈압과의 연관성에 대한 연구들이 지속적으로 진행되어 왔다(Zhu et al., 2001; Bouzekri et al., 2004).

ACE 유전자의 I/D 다형성 분석 결과, D/I 유전자형 분포는 정상혈압군과 고혈압 환자군 사이에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 대립인자형의 비교 분석에서도 D형을 가진 군이 다른 유형을 가진 군보다 고혈압과의 유의한 관련성을 나타낸다는 Morris 등(Morris et al., 1994)의 백인 집단에 대한 이전의 보고와 일본인을 대상으로 한 D/I 유전자의 다형성 분포 차이에서 Yoshida 등(Yoshida et al., 2000)의 결과와 일치하는 유의한 결과를 보였다. 한편 한국인 집단에 분포하고 있는 D 대립인자형의 빈도는 40.5%로서 일본인(40.0%)과 중국인 집단(38.0%)과는 유사하게 조사되었으며(Say et al., 2005), 흑인(63.0%) 및 백인 집단(64.0%) 보다는 매우 낮게 나타난 반면 중남미인 집단(34.0%)에 비해 비교적 높은 빈도를 보였다(Vargas-alarcon et al., 2003).

대부분의 생화학적 지표 항목들은 ACE의 유전자형과 상관없이 정상혈압군과 고혈압군의 유의성이 거의 없

었지만, ALP, TG 항목에서는 D/D 유전자형인 경우 정상혈압군에서 보다 고혈압군에서 높은 측정값을 보였으며, D/D 유전자형과 관련성이 높음을 알 수 있었다. 혈액학적 검사는 WBC 수치와 platelet 수치 항목에서는 D/D 유전자형과 D/I 유전자형인 경우 정상혈압군에서 보다 고혈압군에서 높은 측정값을 보였으며, D 형태의 ACE 유전형과 관련성이 있음을 알 수 있었다.

이러한 결과를 통해서 ACE 유전자형 중에 D/D 유전자형을 가진 경우에는 고혈압을 가진 사람에서 정상적인 혈압을 가진 군보다 여러 생화학 검사종목에서도 깊은 관계가 있다고 생각되며, WBC 수치와 platelet 수치 항목과 같은 혈액학적인 검사 결과는 D 유전자형을 가지고 있는 D/D 유전자형 D/I 유전자형의 경우에 연관성이 있음을 알 수 있었다.

그러나 본 연구의 한계점으로는 첫째, ACE 유전자와 혈압과의 관련성 연구에 필요한 ACE 활성도 측정이 대상자를 상대로 수행되지 못하여 기존의 보고와 같이 ACE 유전자 다형성과 ACE 활성도 간의 연관관계를 분석하지 못한 점이다. 둘째, 연구 대상자의 수가 적지는 않지만 환자군에 대한 대조군의 대상자의 수가 충분하지 못했다는 점이다. 따라서 이러한 제한점을 고려할 때 보다 많은 대조군의 추가적인 분석 및 ACE 유전자 다형성과 ACE 활성도 그리고 혈압과의 관련성에 관한 종합적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2011년도 대전대학교 신진교수연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

REFERENCES

- Bouzekri N, Zhu X, Jiang Y, McKenzie CA, Luke A, Forrester T, Adeyemo A, Kan D, Farrall M, Anderson S, Cooper RS, Ward R. Angiotensin I-converting enzyme polymorphisms, ACE level and blood pressure among Nigerians, Jamaicans and African-Americans. *Eur J Hum Genet.* 2004. 12: 460-468.
- Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas R, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992. 359: 641-644.
- Campbell-Boswell M, Robertson AL, Jr. Effects of angiotensin II

- and vasopressin on human smooth muscle cells *in vitro*. *Exp Mol Pathol*. 1981. 35: 265-276.
- Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995. 92: 1387-1388.
- Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest*. 1987. 56: 345-348.
- Forsyth JS, Reilly J, Fraser CG, Struthers AD. Angiotensin converting enzyme activity in infancy is related to birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004. 89: F442-444.
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 1988. 62: 749-756.
- Harn HJ, Chang CY, Ho LI, Liu CA, Jeng JR, Lin FG, Jent W. Evidence that polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene may be related to idiopathic dilated cardiomyopathy in the Chinese population. *Biochem Mol Biol Int*. 1995. 35: 1175-1181.
- Higaki J, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Ogiwara T. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men: the Suita Study. *Circulation* 2000. 101: 2060-2065.
- Jones A, Montgomery HE, Woods DR. Human performance: a role for the ACE genotype? *Exerc Sport Sci Rev*. 2002. 30: 184-190.
- Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, Delepine M, Lathrop M, Peto R, Collins R. Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. Lancet* 2000. 355: 434-442.
- Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, Videbaek J, Cole DS, Auclert L, Pauly NC. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. N Engl J Med*. 1995. 333: 1670-1676.
- Lindpaintner K, Pfeiffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 1995. 332: 706-711.
- MacGregor GA, Markandu ND, Roulston JE, Jones JC, Morton JJ. Maintenance of blood pressure by the renin-angiotensin system in normal man. *Nature* 1981. 291: 329-331.
- Miller ED, Jr., Ackerly JA, Vaughan ED, Jr., Peach MJ, Epstein RM. The renin-angiotensin system during controlled hypotension with sodium nitroprusside. *Anesthesiology* 1977. 47: 257-262.
- Morris BJ, Zee RY, Schrader AP. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest*. 1994. 94: 1085-1089.
- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998. 97: 1766-1772.
- Qu H, Lu Y, Lin S. Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2001. 35: 408-411.
- Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*. 1978. 40: 377-410.
- Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG, Nickerson DA. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet*. 1999. 22: 59-62.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990. 86: 1343-1346.
- Ruff CT, Braunwald E. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2011. 8: 140-147.
- Say YH, Ling KH, Duraisamy G, Isaac S, Rosli R. Angiotensinogen M235T gene variants and its association with essential hypertension and plasma renin activity in Malaysian subjects: a case control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2005. 5: 5: 7.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*. 1992. 51: 197-205.
- Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Pavón Z, Fragoso JM, Juárez-Cedillo T, Villarreal-Garza C, Granados J. Angiotensin-converting enzyme gene (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican populations. *Hum Biol*. 2003 Dec. 75: 889-896.

- Yoshida K, Ishigami T, Nakazawa I, Ohno A, Tamura K, Fukuoka M, Mizushima S, Umemura S. Association of essential hypertension in elderly Japanese with I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene. *J Hum Genet.* 2000. 45: 294-298.
- Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001. 104: 2746-2753.
- Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet.* 2001. 68: 1139-1148.
- Zhu X, McKenzie CA, Forrester T, Nickerson DA, Broeckel U, Schunkert H, Doering A, Jacob HJ, Cooper RS, Rieder MJ. Localization of a small genomic region associated with elevated ACE. *Am J Hum Genet.* 2000. 67: 1144-1153.
- Zintzaras E, Raman G, Kitsios G, Lau J. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2008. 168: 1077-1089.
-