

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0589-04

•临床研究•

冠心病患者基质金属蛋白酶 1 基因多态性

姜红菊, 张梅, 李大庆, 张运

(山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250014)

[关键词] 内科学; 基质金属蛋白酶 1 基因多态性; 聚合酶链反应; 冠心病; 基质金属蛋白酶 1; 基因多态性

[摘要] 目的 研究基质金属蛋白酶 1 基因多态性与冠心病的关系。方法 运用聚合酶链反应检测 62 例冠心病患者(急性冠状动脉综合征 35 例, 稳定型心绞痛患者 27 例)及 31 例正常对照者基质金属蛋白酶 1 基因型, 并运用高频超声技术检测双侧颈动脉。结果 急性冠状动脉综合征患者基质金属蛋白酶 1 基因 2G/2G 型、2G 等位基因频率均明显高于稳定型心绞痛患者及正常对照者, 颈动脉脂质型斑块基质金属蛋白酶 1 基因 2G/2G 型、2G 等位基因频率均明显高于纤维型和钙化型斑块, 基因型及等位基因频率分布差异均有统计学意义。结论 急性冠状动脉综合征、稳定型心绞痛患者及正常对照者基质金属蛋白酶 1 基因分布存在不同。2G/2G 型、2G 等位基因与动脉粥样硬化斑块不稳定性可能有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

A Study on the Relationship between Polymorphism of Matrix Metalloproteinase 1 and Coronary Heart Disease

JIANG Hong Ju, ZHANG Mei, LI Da Qing, and ZHANG Yun

(Department of Cardiology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250001, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Matrix Metalloproteinase 1; Gene Polymorphism; Acute Coronary Syndrome; Stable Angina

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between polymorphism of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) and coronary heart disease. **Methods** This study enrolled 35 patients with acute coronary syndrome, 27 patients with stable angina (SA), 31 normal volunteers. The carotid arteries were performed with echocardiography. With PCR, genotypes of MMP-1 were scored according to the patterns of DNA bands. **Results** The frequency of MMP-1 2G/2G type and allele T was significantly higher in ACS group than SA group and control group. The frequency of MMP-1 2G/2G type and allele T was significantly higher in fatty plaque than fibrous plaque and calcify plaque. **Conclusion** There was association between the acute coronary syndrome and the 2G/2G type of MMP-1.

目前研究认为, 动脉粥样硬化炎症反应可发生于全身动脉系统。炎症反应时, 由于炎性细胞可释放降解基质的物质如基质金属蛋白酶等, 使纤维帽变薄, 故局部炎症提示斑块的不稳定性。检测炎性因子, 可反映不稳定性斑块的存在。基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase 1, MMP-1) 基因转录起始点上游-1607 bp 处鸟嘌呤(G)插入/缺失的不同, 可能引起其组织水平不同, 从而对动脉粥样硬化组织的降解不同, 影响动脉粥样硬化的病程。这种碱基序列的不同提示人群中存在遗传性冠心病事件的易

感性。本研究探讨了基质金属蛋白酶 1 的基因多态性与冠心病的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

93 名受试者分为 3 组: 急性冠状动脉综合征患者 35 例, 其中男 25 例, 女 10 例, 年龄 41~86 岁, 平均年龄 58.7 ± 10.1 岁。其中急性心肌梗死 19 例, 平均年龄 54.4 ± 11.3 岁, 不稳定型心绞痛 16 例, 平均年龄 61.1 ± 8.5 岁。符合 ACC/AHA 诊断标准^[1]。④稳定型心绞痛患者 27 例, 其中男 20 例, 女 7 例, 年龄 50~73 岁, 平均年龄 61.5 ± 7.9 岁。符合 ACC/AHA 诊断标准^[2]。④正常对照组 31 例, 其中男 22 例, 女 9 例, 年龄 32~90 岁, 平均年龄 54.1 ± 12.6 岁。排除高血压、冠心病、糖尿病、高脂血症及脑血管病。

[收稿日期] 2004-09-17 [修回日期] 2005-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助(60271015)

[作者简介] 姜红菊, 硕士研究生, 副主任医师, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病介入治疗, 现在济南铁路中心医院工作。张梅, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向心功能及动脉粥样硬化。张运, 博士, 主治医师, 教授, 博士研究生导师, 中国工程院院士, 从事心血管疾病的基础和临床研究。

1.2 一般资料检查

详细询问病史,重点是冠心病危险因素、等危因素及冠心病病史。测量受试者身高、体重及安静状态下的右侧肱动脉血压,并进行系统的体格检查。入院第二天空腹 12 h 后静脉取血 5 mL,离心分离血清,采用速率散射光比浊法在特种蛋白分析仪上测定 C 反应蛋白,采用生物化学法测定血糖、血脂和肝肾功能。

1.3 颈动脉超声检查

使用飞利浦 SONOS-5500 型彩色多普勒超声诊断仪,周围血管高频探头 4~10 MHz。患者取仰卧位,依次检查右侧和左侧颈动脉。自颈动脉起始处作纵向探查,依次观察颈总动脉,颈总动脉分叉处、颈内动脉和颈外动脉,尽可能检查到颈动脉最高位置。然后将探头转动 90°,沿血管走行做横向扫描。观察动脉内膜有无增厚及斑块部位、大小和回声特点。然后启用脉冲波多普勒,取样容积置于管腔中央,记录血流频谱。测量指标:颈动脉后壁内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT),是在颈总动脉分叉前 1 cm 处的血管后壁,于舒张末期测量。④斑块分型,是根据动脉粥样硬化的不同二维超声表现将斑块分型:脂质型斑块(Ⅰ型)为超声显示均匀的低回声内膜增厚;纤维脂质型斑块(Ⅱa型)为超声显示表面有连续轮廓的回声较强的纤维帽,斑块内部脂质沉积有明显的低回声区,如伴有斑块内出血则表现为无回声区;纤维型斑块(Ⅱb型)为超声显示局部较均匀的强回声,斑块表面有连续的回声轮廓;钙化型斑块(Ⅲ型)为斑块内纤维化、钙化,局部回声增强,后方伴声影或有明显的声衰减;溃疡型斑块(Ⅳ型)为斑块表面不规则,有时呈“穴状”或“壁龛”样影像,溃疡边缘回声低。⑤斑块积分,记录斑块发生的部位、类型,并计算各组颈动脉病变的发生率,记录斑块厚度采用 Crouse 氏^[3]方法,计算颈动脉斑块积分,即不考虑各个斑块的长度,而分别将同侧颈总动脉及其分叉、颈内动脉各个孤立性动脉粥样硬化斑块的最大厚度相加,从而得到该例动脉斑块积分。颈动脉斑块粥样硬化指数^[4],无斑块为 0 级;1 级为一个斑块,占管腔<50%;2 级为中度斑块占管腔 30%~50%或多个小斑块;3 级为一个大面积斑块占管腔 50%,或多个斑块至少一个中度斑块。双侧颈动脉斑块分级的总和为斑块指数。

1.4 基质金属蛋白酶 1 基因多态性检测

取患者静脉血 2~3 mL,以枸橼酸钠盐抗凝,所用试剂盒由大连宝生物公司提供。以酚抽提法提取血白细胞 DNA。1%琼脂糖凝胶电泳荧光法估测

DNA 浓度,稀释为 20 µg/L,4℃下保存备用。采用 PerKier-Elmer 公司 PCR 扩增仪进行聚合酶链反应,参照 Tiet 等的方法并加以改良,扩增 MMP-1 基因特异片段。参照文献^[5]进行引物设计,由大连宝生物公司生产。A 为 5'-TCGTGAGAATGTCTTCCCATT-3', B 为 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC-3'。反应体系为 0.05% WI(Life Technologies Inc), 20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP, 50 mmol/L KCl, Taq 酶 1 u, A、B 引物各 10 pmol, 1.5 mmol/L MgCl₂, 总反应体系 25 µL。95℃变性 0.5 min, 55℃退火 0.5 min, 72℃延伸 0.5 min, 35 个循环。然后每 15 µL 产物混合 2 µL 10×NE Buffer 2、0.2 µL BSA、0.3 µL Xmn iv、2.5 µL 超纯水,此混合物消化 2.5 h。扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非配对 *t* 检验;计数资料以百分比表示,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般情况比较

三组间 CRP 水平有显著性差异,而性别、年龄及冠心病危险因素无明显差异(表 1, Table 1)。

表 1. 三组间危险因素比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of risk factors in the three groups

指 标	急性冠状动脉 综合征组 (n=35)	稳定型心绞痛 (n=27)	正常对照组 (n=31)
年龄(岁)	58.7±10.1	61.5±7.9	54.1±12.6
男/女(例)	25/10	20/7	22/9
高血压史	31.6%	46.5%	0
糖尿病史	21.2%	27.9%	0
高脂血症史	36.8%	39.5%	0
吸烟史	36.8%	32.3%	6.7%
收缩压(mm Hg)	132.9±14.5	140.4±11.2	120.4±12.8
舒张压(mm Hg)	83.2±11.4	88.5±6.5	75.3±7.4
血糖(mmol/L)	6.05±1.76	5.78±1.69	4.56±0.91
TC(mmol/L)	5.09±0.8	85.10±0.88	4.24±0.23
TG(mmol/L)	1.77±0.69	1.93±0.79	1.09±0.38
HDL(mmol/L)	1.05±0.28	1.05±0.27	1.52±0.41
LDL(mmol/L)	3.11±0.68	2.98±0.80	1.10±0.50
CRP(mmol/L)	1.65±1.81 ^a	0.66±1.15 ^a	0.25±0.19

a: *P* < 0.05, 与正常对照组比较。

2.2 基因型及等位基因频率比较

基质金属蛋白酶 1(MMP-1)启动子 G 碱基的插

入/缺失多态性, PCR 产物分别为 149 bp(2G) 和 148 bp(1G)。三组间 MMP-1 型 2G/1G、2G/2G 及 1G/1G 基因型频率分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。2G

等位基因频率分别为 89.2%、66.7% 和 48.4%, 1G 等位基因频率分别为 17.1%、33.3% 和 51.6%, 三组间比较有显著性差异($P < 0.05$; 表 2, Table 2)。

表 2. 基质金属蛋白酶 1 基因型和等位基因频率分布

Table 2. MMP-1 genotype and allele frequencies

分组	n	基因型			等位基因频率	
		2G/2G	2G/1G	1G/1G	2G	1G
急性冠状动脉综合征组	35	12 (34.3%) ^a	17 (48.6%) ^a	6 (17.1%) ^a	82.9% ^a	17.1% ^a
稳定型心绞痛组	27	8 (29.6%) ^a	10 (37%) ^a	9 (33.4%) ^a	66.7% ^a	33.3% ^a
正常对照组	31	6 (19.4%)	9 (29%)	16 (51.6%)	48.4%	51.6%

a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

2.3 不同基因型颈动脉斑块类型分布

2G/2G 基因型颈动脉粥样硬化斑块以脂质型及纤维脂质型多见(表 3, Table 3)。1G/2G 基因型和 2G/2G 基因型颈动脉内膜中膜厚度、斑块积分、斑块指数及斑块发生率明显高于 1G/1G 基因型(表 4, Table 4)。

表 3. 不同基因型颈动脉斑块类型计数

Table 3. The number of carotid atherosclerotic plaque in various notype

基因型	脂质型	纤维脂质型	纤维型	钙化型	溃疡型
2G/2G	10	5	2	0	3
2G/1G	1	29	4	2	1
1G/1G	0	1	21	5	0

表 4. 不同基因型颈动脉粥样硬化超声比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4. Comparison of carotid atherosclerotic plaque in various genotype with high frequency ultrasound

基因型	内膜中膜厚度 (mm)	斑块积分	斑块指数	斑块发生率
1G/1G	0.73 \pm 0.21	0.59 \pm 1.71	0.32 \pm 0.90	20.3%
1G/2G	0.89 \pm 0.14 ^a	2.56 \pm 1.33 ^a	1.03 \pm 1.09 ^a	40.4% ^a
2G/2G	1.23 \pm 0.43 ^{ab}	5.99 \pm 2.78 ^{ab}	2.76 \pm 2.13 ^{ab}	100% ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与 1G/1G 基因型比较; b: $P < 0.05$, 与 1G/2G 基因型比较。

3 讨论

细胞外基质(ECM)是一种多功能蛋白和糖蛋白复合体,与器官系统内细胞和组织的结构完整性相关。血管基底膜为血管提供支持结构,由细胞外基质分子如Ⅰ型胶原、层粘连蛋白和纤维连接蛋白构成。基质金属蛋白酶(MMP)是一组降解细胞外基质分子的锌依赖性酶,可降解基底膜的细胞外基质成分。

正常血管壁内皮细胞与基底膜紧密结合构成血

管壁的高度选择性屏障,内皮细胞不分泌 MMP。当发生动脉粥样硬化时,循环中的单核细胞与内皮细胞粘附,在血管壁中迁徙、吞噬脂质、衍化为巨噬细胞的过程中,不仅自身可分泌大量 MMP,还分泌多种细胞因子如白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 等,以自分泌、旁分泌形式作用于内皮细胞、血管平滑肌细胞,促进 MMP 分泌。巨噬细胞释放的活性氧可激活 MMP 的酶原。斑块中巨噬细胞可分泌多种 MMP,它们能降解所有细胞外基质,并参与了动脉粥样硬化病变重构的全过程,导致血管管腔的狭窄或扩张,引发心血管事件。

急性冠状动脉综合征包括不稳定型心绞痛和急性心肌梗死。冠状动脉造影和血管镜检查表明不稳定型心绞痛与稳定型心绞痛患者的冠状动脉狭窄程度无显著差异。造成不同临床表现的主要原因是斑块稳定性不同。急性冠状动脉综合征主要的发病机制^[6]为粥样硬化斑块不稳定,破裂后诱发血栓形成并闭塞管腔,造成远端血管供应区心肌的缺血或坏死。单核/巨噬细胞向斑块内浸润并释放 MMP 又是不稳定斑块形成、破裂的最关键环节^[7]。因此,近年来关于 MMP 与斑块稳定性的关系受到重视。

研究发现在易发生破裂的斑块肩部有巨噬细胞的聚集及结缔组织的减少,并且有 MMP 的过表达^[8]。过表达的 MMP 降解细胞外基质,使斑块易发生破裂。急性冠状动脉综合征患者巨噬细胞为稳定型心绞痛的 4 倍,并且巨噬细胞主要分布在斑块破裂区,与 MMP 活性部位一致,可见 MMP 在急性冠状动脉综合征发病中的重要地位。MMP-1 主要降解 IV、Ⅶ、Ⅹ型胶原蛋白。Nikkari 等^[9]报道人类动脉粥样硬化斑块脂质核心强烈表达 MMP-1。局部血压增高,血流剪切力增强可使血管壁合成 MMP 增加。研究发现,压力最大处 MMP-1 的免疫活性是压力最

小处的2倍。人类动脉粥样硬化斑块,尤其是机械张力最高之处,也是斑块最常破裂之处,MMP-1表达增加7倍。由此可见,MMP-1的表达与斑块破裂存在正相关。

动脉粥样硬化是多基因疾患。基因的多态性与其表达有密切关系。MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-12均存在基因的多态性。MMP-1转录起始点上游的第-1607位置存在G碱基的插入/缺失多态性,G碱基的插入形成了Ets转录因子单股链的核心序列-5'-GGA-3',包含2G的启动子较1G的启动子在转录活性上有显著差异,此MMP-1基因的多态性与多种疾病有关。黑素瘤及胸部癌的2G纯合子较正常人更多见,且存在统计学差异,研究表明2G/2G基因型肿瘤患者的组织中MMP-1表达明显高于其他基因型^[10,11],与肿瘤的侵袭、转移相关,但也有研究^[2]认为在CMM(Cutaneous Malignant Melanoma)中,其基因型与正常对照组无明显差异,结果可能与入种有关。国内外均有研究表明斑块破裂部位存在MMP-1的高表达,但未见有关基因型与斑块不稳定之间关系的报道。我们研究发现急性冠状动脉综合征患者2G/2G基因型、2G等位基因频率明显高于稳定型心绞痛组和正常对照组,考虑可能存在MMP-1高表达,从而加速纤维帽降解,引起斑块稳定性降低。本研究也发现不同的基因型颈动脉斑块类型不同,2G/2G基因型也与颈动脉粥样硬化严重程度有关。颈动脉粥样硬化与冠心病有良好的相关性,颈动脉斑块的不稳定可预示冠状动脉斑块的不稳定。本研究运用超声从斑块形态学上揭示MMP-1基因多态性与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系,还从冠心病的临床表现上揭示了两者的关系。MMP冠心病易感性基因可能对小斑块破裂进展性管腔狭窄与深破裂导致心肌梗死的作用途径是不同的^[9],深破裂可能也依赖于多种冠心病易患因素,包括大的脂质核、局部血流动力学变化、巨噬细胞炎症因子的表达,破裂后缺血事件的发生也依赖于个体的凝血

状况。

总之,从本研究可以看出,MMP-1转录起始点上游基因多态性表现了不同的表达,此多态性与动脉粥样硬化的斑块稳定性相关。但本研究有一定的局限性,主要表现在动脉粥样硬化为多基因病,应该根据其病理生理改变,选择多个候选基因从不同的侧面分析,并逐一剖解,整体分析,可进一步明确每一基因多态性的作用。研究的样本要大,要具有充分的代表性。因此,MMP-1基因多态性与冠心病的关系还需进一步研究以更明确。

[参考文献]

- [1] Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2000, **36**: 1 970-962
- [2] Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J, Douglas JS, Fihn SD, Gardin JM, et al. ACC/AHA/ACP/ASIM guideline for the management of patients with chronic stable angina. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **33**: 2 092-197
- [3] Crouse JR, Harpold GH, Kahl FR, Toole JF, McKinney WM. Evaluation of a scoring system for extracranial carotid atherosclerosis extent with B-mode ultrasound. *Stroke*, 1986, **17**: 270
- [4] Sutton-Tyrrell K, Alcorn HG, Wolfson SK, Kelsey SF, Kuller LH. Predictors of carotid stenosis in older adults with and without isolated systolic hypertension. *Stroke*, 1993, **24**: 355
- [5] Shu Ye, Sahar Dhillon, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM, Pickering RM, et al. Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism. *Cancer Research*, 2001, **61**: 1 296-298
- [6] Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek J, Virmani R, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*, 1997, **336**: 1 276-282
- [7] Van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture: pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular Research*, 1999, **41**: 334-344
- [8] Zhang B, Ye S, Hemmann SM, Eriksson P, DeMaat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1999, **99**: 1 788-794
- [9] Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, et al. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*, 1995, **92**: 1 393-398
- [10] Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res*, 1999, **59**: 4 225-227
- [11] Nishioka Y, Kobayashi K, Sagae S, Ishioka S, Nishika A, Matsushima M, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter in endometrial carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 2000, **91**: 612-615

(此文编辑 文玉珊)