

[文章编号] 1007-3949(2005)13-06-0775-04

•临床研究•

心肌梗死患者基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 多态性

陈晓锋¹, 唐礼江¹, 朱敏², 江建军¹, 沈卫峰³, 杜于茜¹

(温州医学院附属台州医院 1. 心内科, 2. 中心实验室, 浙江省台州市 317000;

3. 上海第二医科大学附属瑞金医院心脏科, 上海市 200025)

[关键词] 内科学; 心肌梗死的遗传因素; 聚合酶链反应限制片长多态性; 基质金属蛋白酶 9; 心肌梗死; 基因多态性

[摘要] 目的 研究基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 多态性与中国汉族人群心肌梗死易感性的关系。方法 以 78 例经冠状动脉造影确诊的心肌梗死患者为研究对象, 以同期冠状动脉造影阴性、排除冠心病诊断的 81 例患者为对照组, 取外周血标本提取 DNA, 用聚合酶链反应方法扩增目的基因, 用限制性内切酶酶切聚合酶链反应产物用于基因分型。比较两组间基质金属蛋白酶 9 基因多态性频率分布的差异。结果 本研究中未发现基质金属蛋白酶 9 的 TT 基因型突变。心肌梗死患者基质金属蛋白酶 9 基因 CT 基因型频率(26.9%) 高于对照组(9.9%), 两组差别有统计学意义($\chi^2=7.743, P=0.005$), 心肌梗死组 1562T 等位基因频率(13.5%) 高于对照组(4.9%), 两组差别也有统计学意义($\chi^2=6.966, P=0.008$)。结论 基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 多态性与中国汉族人群心肌梗死有关, 1562T 等位基因可能是心肌梗死遗传易感性的基因标记之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Matrix Metalloproteinase-9 Polymorphism (C1562T) and the Susceptibility to Myocardial Infarction in Han Population of China

CHEN XiaoFeng¹, TANG LiJiang¹, ZHU Min², JIANG JianJun¹, SHEN WeiFeng³, and DU YuXi¹

(1. Department of Cardiology, 2. Center Lab, Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Taizhou 317000; 3. Department of Cardiology, Shanghai Ruijin Hospital, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase-9; Myocardial Infarction; Gene Polymorphism; Genotype; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between myocardial infarction (MI) and functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C1562T). **Methods** A case-control study of seventy-eight patients with angiographically documented MI and eighty-one control subjects with a normal angiogram was conducted. Genotype was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the common C1562T functional promoter polymorphism of the MMP-9 gene. **Results** The results of individual polymorphisms analysis showed that the frequency of C/T genotype and 1562T allele of MMP-9 gene of MI patients (26.9% and 13.5%) were significantly higher than that in control group (9.9% and 4.9%; $P < 0.01$). **Conclusion** The present findings suggest that the genetic polymorphism in MMP-9 promoter (C1562T) is associated with the susceptibility to MI in the Han population of China.

基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9), 又称明胶酶 B, 定位于人 16 号染色体, 是基质金属蛋白酶家族的重要成员, 其可通过降解血管壁外基质, 影响动脉斑块的稳定性而与冠心病的发病密切相关, 冠心病患者存在 MMP-9 高表达的现象。位于 MMP-9 启动子区的 C1562 基因突变可导致 MMP-9 表达水平增高。国外流行病学关于 MMP-9 基因 C1562T 多态性与冠心病联系的研究报道尚

有争论, 迄今未见国人 MMP-9 基因 C1562T 多态性与冠心病关联的报道^[1-4]。本研究应用聚合酶链反应-限制片长多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 核苷酸分型技术检测心肌梗死患者和对照组 MMP-9 基因的 C1562T 突变频率, 探讨 MMP-9 基因 C1562 多态性与中国汉族人群心肌梗死的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

心肌梗死患者 78 例, 其中男 57 例, 女 21 例, 包括急性心肌梗死 39 例, 陈旧性心肌梗死 29 例, 年龄 48~76 岁, 平均年龄 63.2 ± 10.4 岁。心肌梗死诊断

[收稿日期] 2005-04-04 [修回日期] 2005-11-15

[作者简介] 陈晓锋, 医学硕士, 住院医师, 主要从事冠心病发病机制和防治研究, E-mail 为 fengfeng0011@sohu.com。通讯作者唐礼江, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病发病机制和防治研究, E-mail 为 tanglj@tzhospital.com。朱敏, 实验师, 主要从事分子生物学和遗传学实验研究, E-mail 为 immunol@126.com。

符合 WHO 诊断标准, 根据典型的临床表现, 特征性的心电图改变以及实验室检查发现, 并均经冠状动脉造影证实。对照组为同期因胸痛行冠状动脉造影阴性、排除心肌梗死的患者, 共计 81 例, 其中男 58 例, 女 23 例, 年龄 41~73 岁, 平均 61.3 ± 9.3 岁。所有研究对象均为汉族非血缘个体, 并排除肝脏疾病、肿瘤及结缔组织疾病。

1.2 临床指标观察

详细询问研究对象的一般情况、高血压病史、两周服药史、主要心脑血管疾病病史、糖尿病史、高血压家族史、吸烟、饮酒史等; 测量血压、心率、身高、体重和外周空腹血总胆固醇、甘油三酯、血糖、尿酸等血液生物化学指标。血糖、血脂、血尿酸测定采用 BekmanCX-5WG 全自动生物化学分析仪, 必要时行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)。糖尿病诊断参照 1999 年 WHO 规定标准: 糖尿病症状加任意时间血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L, 或 OGTT 2h ≥ 11.1 mmol/L。高血压诊断执行 1996 年 WHO 规定标准: 收缩压 ≥ 140 mmHg 和/或舒张压 ≥ 90 mmHg 为高血压, 或有高血压史、两周内服用降压药者也为高血压。血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) ≥ 5.72 mmol/L 为高胆固醇血症, 血清甘油三酯 (triglyceride, TG) > 1.7 mmol/L 为高甘油三酯血症, 高脂血症是指 TC 或 TG 有 1 项或 2 项超过以上标准者。

1.3 研究方法

以人类基因组 DNA 为模板, 利用聚合酶链反应方法成功扩增到 435 bp 的特异性片段, 对扩增产物进行限制性内切酶 Sph I 酶切, 酶切产物行琼脂糖凝胶电泳。DNA 的抽提: 肘静脉血 5 mL, EDTA 抗凝, 采用低渗溶血、酚/氯仿法 (饱和酚为 AMRESCO 公司产品) 从白细胞中抽提基因组 DNA, 适量双蒸水溶解, 核酸分析仪测定 DNA 浓度, -80°C 保存。聚合酶链反应扩增 MMP-9 C1562T 位点及其侧翼区, 引物由上海生工公司合成, 上游引物为 5'-GCCTG-GCACATAGTAGGCCG-3', 下游引物为 5'-CITCC-TAGCCAGCCGGCATC-3'。反应体系为 $10 \times$ Buffer 2.5 μL , dNTP (各 10 mmol/L) 0.5 μL , 上下游引物各 6 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板 0.1 μg , Taq DNA 聚合酶 (BBI 公司产品) 2 u, 加双蒸水至总体积 25 μL 。反应条件: 95°C 预变性 2 min, 然后按 94°C 变性 45 s \rightarrow 61.5°C 退火 45 s \rightarrow 72°C 延伸 1 min, 重复 35 个循环; 最后, 72°C 延伸 10 min。反应结束后, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外分析仪检测聚合酶链反应产物特异性。酶切反应体系包括聚合酶链反应纯化产物 (试剂盒购自 QIAGEN 公司) 1 μg , $10 \times$ Buffer 2 μL ,

限制性内切酶 NspI (New England Biolabs 公司) 产品 2.5 u, 加双蒸水至总体积 20 μL ; 置于 37°C 温育 16 h, 终止酶切反应, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, EB 染色, 凝胶成像系统判定结果。MMP-9 基因突变标准为 CC 基因型 (435p)、CT 基因型 (435 bp、247 bp、188 bp)、TT 基因型 (247 bp、188 bp)。对其中部分病例的聚合酶链反应扩增产物进行切胶纯化, 于 ABI 377 型全自动测序仪上作 DNA 序列测定, 验证 C1562T 位点是否突变。等位基因频率 = $(2 \times \text{纯合子数} + \text{杂合子数}) / (2 \times \text{受检人群})$ 。

1.4 统计学方法

各组基因型和等位基因频率比较用 χ^2 检验, 组间均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较

心肌梗死组和对照组在性别、年龄、体质指数、吸烟史及高血压、糖尿病、高脂血症比例等方面均无统计学差异 (表 1, Table 1)。

表 1. 心肌梗死组和对照组的临床特征

Table 1. Features of the patients with myocardial infarction and control subjects

分 组	心肌梗死组 ($n = 78$)	对照组 ($n = 81$)
男/女 (例)	57/21	58/23
年龄 (岁)	63.2 ± 10.4	61.3 ± 9.32
体质指数 (kg/m^2)	24.31 ± 3.18	3.98 ± 2.71
吸烟史 [例 (%)]	36 (46.2%)	33 (40.7%)
高血压 [例 (%)]	49 (62.8%)	42 (51.9%)
糖尿病 [例 (%)]	12 (15.4%)	8 (9.9%)
高脂血症 [例 (%)]	22 (28.2%)	15 (18.5%)

2.2 基质金属蛋白酶 9 基因 1562C/T 基因型和等位基因频率分布

聚合酶链反应扩增产物 435 bp, 经 Sph I 酶切后, T 等位基因被切为 247 bp 和 188 bp 两个片段, 而 C 等位基因由于无酶切位点仍为一个 435 bp 的片段。这样存在 3 种可能的基因型: 纯合子 CC (435 bp)、杂合子 CT (435 bp、247 bp 和 188 bp)、纯合子 TT (247 bp 和 188 bp)。未发现 MMP-9 的 TT 基因型突变 (图 1, Figure 1)。测序结果见图 2 (Figure 2)。

经 Hardy-Weinberg 吻合度检验, 研究对象 MMP-9 基因 C1562T 位点基因型个体数的观察值和期望

值差异无显著性,符合 Hardy-Weinberg 平衡,表明患者来自同一群体。心肌梗死组 1562T 等位基因频率分布与对照组比较差异有统计学意义($\chi^2=6.966$, P

$=0.008$)。心肌梗死组 CT 基因型频率与对照组比较差异也有统计学意义($\chi^2=7.743$, $P=0.005$)。见表 2(Table 2)。

表 2. 心肌梗死组和对照组基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 基因型和等位基因频率分布

Table 2. Distribution of C1562T genotypes and alleles frequencies in patients with myocardial infarction and control subjects

分 组	例数	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	81	73 (90.1%)	8 (9.9%)	0 (0%)	154 (95.1%)	8 (4.9%)
心肌梗死组	78	57 (73.1%)	21 (26.9%) ^a	0 (0%)	135 (86.5%)	21 (13.5%) ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

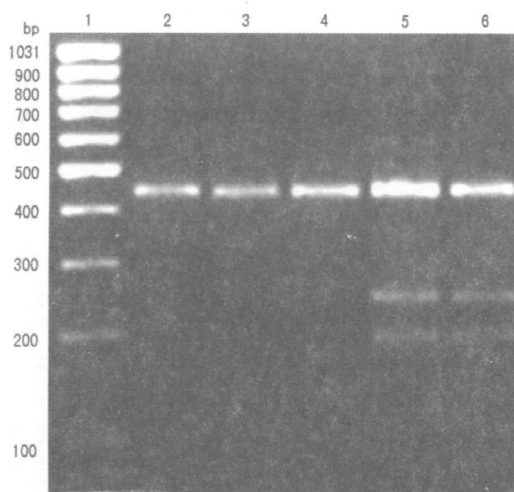


图 1. 聚合酶链反应产物琼脂糖凝胶电泳 1 为 100 bp DNA Ladder, 2-4 为 CC 基因型, 5 和 6 为 CT 基因型。

Figure 1. Electrophoresis of PCR products

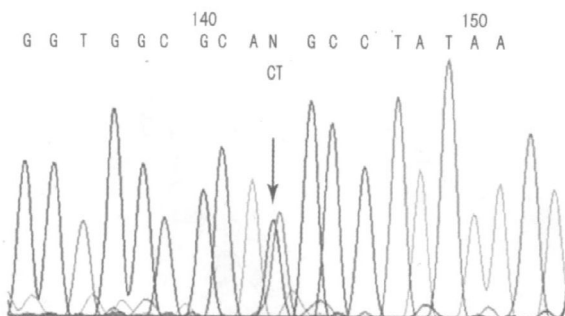


图 2. 心肌梗死患者基质金属蛋白酶 9CT 基因型

Figure 2. CT genotype of MMP-9 with myocardial infarction

3 讨论

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成或降解代谢失衡与许多心血管疾病的发生有关,基质金属

蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一族对细胞外基质成分有特异降解作用的锌依赖性蛋白水解酶,它们分子大小各异,底物不尽相同,在正常人的组织中通常是低水平表达,但在一些正常或病理性重建的过程中表达上调。近年研究表明,MMP 的表达及活性增强参与许多心血管疾病的发展过程,包括充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、冠状动脉介入后血管再狭窄等,尤其在冠状动脉粥样硬化的发生发展中具有重要意义^[1-8]。

急性心肌梗死的发生与冠状动脉粥样硬化斑块的稳定性有关,细胞外基质是血管壁的主要成分,其降解贯穿于动脉粥样硬化的发生发展的整个过程。细胞外基质赋予斑块完整性,含有的胶原具有弹性和韧性,因此细胞外基质的含量、厚度、强度对于防止斑块破裂至关重要。在正常动脉壁上细胞外基质合成与分解处于相对平衡,成分相对稳定,细胞外基质的过度降解使斑块易于破裂导致心肌梗死的发生。冠状动脉粥样硬化斑块内覆盖脂质中心的纤维帽是决定斑块稳定与否至关重要的因素,其将斑块内具有高度成血栓性的物质与血液成分隔开,一旦斑块的结构受损或破损,即可导致二者接触,促使血栓形成,引起血管闭塞,导致心肌梗死。MMP 由巨噬细胞、平滑肌细胞及内皮细胞等分泌,在动脉粥样斑块中增多时降解纤维帽及基底膜的胶原等基质成分,是使纤维帽变薄及加速动脉粥样硬化的重要因素之一。MMP 作为降解细胞外基质的主要蛋白酶,与心肌梗死的关系愈受关注^[9-12]。

基质金属蛋白酶(MMP-9)是 MMP 的主要成员,是血管壁细胞表达和分泌的最主要的 MMP,以前酶原的形式合成,分子量为 92 kDa 大小,活化状态后为 84 kDa,作用底物广泛,包括 iv、Ⅲ、Ⅴ(Ⅰ型胶原及明胶、弹性蛋白等。Ⅴ型胶原是粥样斑块基底膜和纤维帽的重要组成部分,MMP-9 可以高效降解 Ⅴ

型胶原,在血管再生、炎症反应、动脉粥样硬化形成过程中起关键作用。病理研究显示,在人和动物粥样硬化动脉中的 MMP-9 表达明显高于正常动脉, MMP-9 的分解活性多位于斑块肩区、脂质中心边缘及微血管形成区内。提示 MMP-9 可能与冠状动脉粥样硬化稳定性和心肌梗死发病相关^[7,8,13]。

位于 MMP-9 启动子区的 C1562 基因突变可通过影响 MMP-9 的基因转录活性而导致 MMP-9 表达水平增高,携带 1562T 等位基因者血清 MMP-9 水平较高, MMP-9 基因 C1562T 基因多态性与冠状动脉粥样硬化发展密切相关,而迄今少见关于 MMP-9 基因多态性与心肌梗死关联的报道^[2,3]。

本研究结果发现,78 例心肌梗死患者 MMP-9 基因 CT 基因型频率(26.9%)高于对照组(9.9%),两组差别有统计学意义($\chi^2 = 7.743, P = 0.005$),心肌梗死组 1562T 等位基因频率(13.5%)高于对照组(4.9%),两组差别也有统计学意义($\chi^2 = 6.966, P = 0.008$)。结合以往研究报道 T 等位基因可引起 MMP-9 表达增加,提示 C1562T 基因突变可能通过上调 MMP-9 表达,使斑块易于破裂,而导致心肌梗死发生。MMP-9 基因 T 等位基因可能是心肌梗死遗传易感性的基因标记之一,但由于本文为小样本研究,且未设健康对照组,故有必要扩大样本量进一步验证。

[参考文献]

[1] Wang J, Warzecha D, Wilcken D, Wang XL. Polymorphism in the gelatinase B gene and the severity of coronary arterial stenosis. *Clin Sci (Lond)*, 2001, **101**

(1): 87-92

- [2] Zhang B, Shu Ye, StefanMartin Hermann. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1999, **99** (14): 1 788-794
- [3] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, 2003, **107** (2): 1 579-585
- [4] Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *Haplotypic J Mol Med*, 2003, **81** (5): 321-326
- [5] Martin TN, Penney DE, Smith JA, Groenning BA, Dargie HJ, Hillis GS. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms and changes in left ventricular volume following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2004, **94** (8): 1 044-046
- [6] 陈晓锋, 顾振纶, 唐礼江. 基质金属蛋白酶在心脏中作用的研究进展. *中国药理学通报*, 2004, **20** (2): 137-140
- [7] Cho HJ, Chae IH, Park KW, Ju JR, Oh S, Lee MM, et al. Functional polymorphism in the promoter region of the gelatinase B gene in relation to coronary artery disease and restenosis after percutaneous coronary intervention. *J Hun Genet*, 2002, **47** (2): 88-91
- [8] Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: The Framingham Heart Study. *Circulation*, 2004, **109** (23): 2 850-856
- [9] Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol*, 2003, **92** (2-3): 181-186
- [10] 于滢, 杨向红. 基质金属蛋白酶与动脉粥样硬化及斑块破裂的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 592-595
- [11] Renko J, Kalela A, Jaakkola O, Laine S, Hoyhtya M, Alho H. Serum matrix metalloproteinase-9 is elevated in men with a history of myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest*, 2004, **64** (3): 255-261
- [12] 周一军, 张锦, 李莉, 彭扬. 糖尿病患者动脉粥样硬化斑块内基质金属蛋白酶 2 和 9 与斑块稳定的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 69-72
- [13] Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarelli CM, Ceci F, Di Franco M. Serum metalloproteinase-9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Investig Med*, 2003, **51** (5): 295-300

(此文编辑 文玉珊)