

急性冠状动脉综合征患者基质金属蛋白酶 9 基因多态性

陈白玉¹, 李熙芹², 何汉江², 陈晓利¹, 李卿², 匡晓琴¹, 贺莉萍²

(湘南学院 1. 附属医院心内科, 2. 医学检验系, 湖南省郴州市 423000)

[关键词] 内科学; 基质金属蛋白酶 9; 基因多态性; 冠状动脉疾病; 聚合酶链反应; 急性冠状动脉综合征

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 多态性与中国南方汉族人群冠心病的关系。方法 对经冠状动脉造影证实的急性冠状动脉综合征患者 150 例(急性冠状动脉综合征组)、稳定型心绞痛患者 110 例(稳定型心绞痛组)和同期冠状动脉造影阴性、排除冠心病诊断的患者 70 例(对照组)进行研究,采用酶联免疫吸附试验测定血浆基质金属蛋白酶 9 水平,采用聚合酶链反应—限制性片段多态性技术分析基质金属蛋白酶 9 基因中 C1562T 基因多态性,比较各组的基因型和等位基因频率。结果 急性冠状动脉综合征组血浆基质金属蛋白酶 9 水平明显高于稳定型心绞痛组($P < 0.05$)和对照组($P < 0.01$),而稳定型心绞痛组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。急性冠状动脉综合征组基质金属蛋白酶 9 基因 CT、CT+TT 基因型频率以及 T 等位基因频率均高于对照组和稳定型心绞痛组($P < 0.05$ 或 0.01),稳定型心绞痛组与对照组各基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。C1562T 位点 CT/TT 基因型患者血浆基质金属蛋白酶 9 水平显著高于 CC 基因型患者($P < 0.01$)。结论 基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 多态性可能与中国南方汉族人群急性冠状动脉综合征有关,1562T 等位基因是动脉粥样硬化斑块不稳定的易感基因。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship Between Matrix Metalloproteinase-9 Polymorphism (C1562T) and Acute Coronary Syndrome

CHEN Bai-Yu¹, LI Xi-Qin², HE Han-Jiang², CHEN Xiao-Li¹, LI Qin², KUANG Xiao-Qing¹, and HE Li-Ping²

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xiangnan College, Chenzhou 423000; 2. Department of Medical Examination of Xiangnan College, Chenzhou 423000, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase-9; Gene Polymorphism; Coronary Heart Disease; Polymerase Chain Reaction; Acute Coronary Syndrome

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphism (C1562T) and coronary heart disease (CHD) in Han population of South China. **Methods** The study included 150 patients with acute coronary syndrome (ACS group), 110 patients with stable angina pectoris (SAP group) and 70 controls (control group), all of which were confirmed by angiocardiology. Plasma levels of MMP-9 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Promoter C1562T gene polymorphism of MMP-9 was analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Genotype and allele frequency were compared among groups. **Results** Plasma MMP-9 level in ACS group were significantly higher than those of SAP group ($P < 0.05$) and control group ($P < 0.01$), however there was no difference between SAP group and control group ($P > 0.05$). The frequency of CT and CT+TT genotype and T allele were higher in ACS group compared with those in control group and SAP group ($P < 0.05$ or 0.01), but the frequencies of C/T genotypes and alleles were not statistically different between SAP group and control group ($P > 0.05$). Plasma MMP-9 level of CT/TT genotype was higher than that of CC genotype ($P < 0.01$). **Conclusion** The genetic polymorphism in MMP-9 promoter (C1562T) is associated with ACS in the Han population of South China, and T allele is a susceptible gene of instability of atherosclerosis plaque.

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,由于炎症细胞可释放降解基质的物质如基质金属蛋白酶等,使纤维变薄,故局部炎症提示斑块的不稳定性。基质金属

蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 基因启动子区域-1562 位点存在 C/T 置换现象,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。本研究采用多聚酶链反应—限制性内切酶片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术检测 MMP-9 基因的 C1562T 突变频率,探讨 MMP-9 基因多态性与

[收稿日期] 2007-01-24 [修回日期] 2007-03-12

[基金项目] 湖南省卫生厅科学研究资助项目(C2005047)

[作者简介] 陈白玉,副主任医师,主要研究方向为冠心病的防治。

通讯作者李熙芹,教授,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 lixiqin1950@163.com。何汉江,博士研究生,副教授。

中国南方汉族人群冠心病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

所有受试者均为湘南学院附属医院 2003 年 6 月至 2006 年 6 月的住院患者,其中急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者 150 例(ACS 组),男性 85 例,女性 65 例,年龄 40~83 岁,平均 58.6 ± 10.7 岁。150 例 ACS 中急性心肌梗死 60 例,平均年龄 54.7 ± 8.9 岁;不稳定型心绞痛 90 例,平均年龄 62.1 ± 11.8 岁。稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)患者 110 例(SAP 组),其中男性 60 例,女性 50 例,年龄 49~75 岁,平均 59.2 ± 10.4 岁。以上两组全部患者均符合 1979 年 WHO 关于冠心病诊断标准,并且经冠状动脉造影证实左前降支、左回旋支或右冠状动脉中至少有一支血管狭窄 $\geq 50\%$ 。70 例对照者为因胸部不适入院,经生化检查、胸片、心电图、超声心动图及冠状动脉造影检查排除心脏疾患,且肝肾功能正常,排除糖尿病、高血压病、高脂血症及脑血管病(对照组),其中男性 43 例,女性 27 例,年龄 42~76 岁,平均 57.7 ± 10.2 岁。所有研究对象均为中国南方汉族非血缘个体,并排除肝脏疾病、肿瘤及结缔组织疾病。

1.2 一般资料检查

详细询问研究对象的一般情况、高血压病史、2 周服药史、主要心脑血管疾病史、糖尿病史、高血压家族史及吸烟、饮酒史等;测量血压、心率、身高、体重和外周空腹血总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、血糖和尿酸等血液生物化学指标。血糖、血脂及血尿酸测定采用 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。

1.3 血浆基质金属蛋白酶 9 水平检测

受试者停用降脂药物及戒烟 1 周以上,空腹 12 h,平卧 30 min 后取肘静脉血,采用上海森雄科技有限公司的进口分装 ELISA 试剂盒,严格按说明书进行操作。

1.4 聚合酶链反应—限制片长多态性基因分型

取肘静脉血 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。PCR 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'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-

3',下游引物为 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'。PCR 反应体系为 $10 \times \text{Buffer} 2.5 \mu\text{L}$, dNTP(各 10 mmol/L) $0.5 \mu\text{L}$,上下游引物各 $6 \mu\text{mol/L}$, DNA 模板 $0.1 \mu\text{g}$, TaqDNA 聚合酶(BBI 公司产品) 2 u ,加双蒸水至总体积 $25 \mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预变性 2 min ,然后按 94°C 变性 $45 \text{ s} \rightarrow 61.5^{\circ}\text{C}$ 退火 $45 \text{ s} \rightarrow 72^{\circ}\text{C}$ 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 PCR 产物特异性。酶切反应:反应体系包括 PCR 纯化产物(试剂盒购自 QIAGEN 公司) $1 \mu\text{g}$, $10 \times \text{Buffer} 2 \mu\text{L}$,限制性内切酶 Sph iv(New England Biolabs 公司产品) 2.5 u ,加双蒸水至总体积 $20 \mu\text{L}$,置 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。对其中部分病例的 PCR 产物进行切胶纯化,于 ABI377 型全自动测序仪上作 DNA 序列测定,验证 C1562T 位点是否突变。MMP-9 基因突变标准为 CC 基因型(435 bp)、CT 基因型(435 bp、247 bp、188 bp)、TT 基因型(247 bp、188 bp)。等位基因频率 = $(2 \times \text{纯合子数} + \text{杂合子数}) / (2 \times \text{受检人群})$ 。

1.5 统计学方法

各组基因型和等位基因频率比较用 χ^2 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性,全部资料用 SPSS10.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 一般情况比较

三组在年龄、性别、体质指数及冠心病危险因素方面比较,差异均无显著性($P > 0.05$,表 1)。

表 1. 三组间危险因素比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	ACS 组 ($n = 150$)	SAP 组 ($n = 110$)	对照组 ($n = 70$)
年龄(岁)	58.6 ± 10.7	59.2 ± 10.4	57.7 ± 10.2
男/女(例)	85/65	60/50	43/27
体质指数(kg/m^2)	26.6 ± 5.4	26.1 ± 4.8	25.7 ± 4.3
高血压	48.3%	46.0%	0
糖尿病史	28.3%	22.0%	0
高脂血症	36.7%	38.0%	0
吸烟史	26.7%	28.0%	22.5%

2.2 三组血浆基质金属蛋白酶 9 水平比较

急性冠状动脉综合征组(ACS 组)、SAP 组及对

照组血浆 MMP-9 水平分别为 98.32 ± 31.48 、 73.42 ± 18.47 和 59.65 ± 16.47 $\mu\text{g/L}$, 统计学分析表明, ACS 组血浆 MMP-9 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$) 及 SAP 组 ($P < 0.05$), 但 SAP 组与对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 基因型和等位基因频率分布

PCR 扩增产物 435 bp 经 Sph iv 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 片段, 从而存在 3 种可能的基因型, 即纯合子 CC (435 bp)、杂合子 CT (435 bp、247 bp 和 188 bp)、纯合子 TT (247 bp 和 188 bp), 部分样本酶切结果见图 1。PCR 产物纯化后, 并经测序验证。各组之间 TT 和 CC 基因型频率差异无显著性 ($P > 0.05$), CT 及 CT+TT 基因型频率在各组之间比较发现, 对照组和 SAP 组差异无显著

性 ($P > 0.05$), 但 ACS 组高于前两组 ($P < 0.05$ 或 0.01), T 等位基因频率也高于前两组 ($P < 0.05$, 表 1)。研究对象 MMP-9 基因型分布, 经 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡, 表明患者来自同一群体。

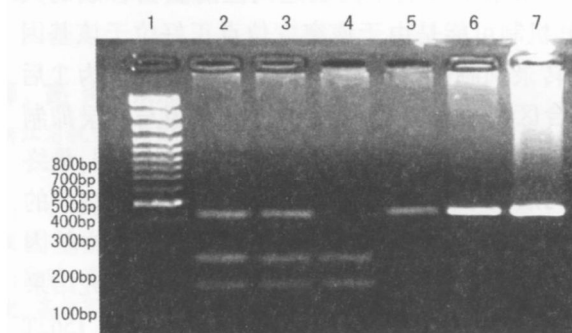


图 1. 聚合酶链反应产物 Sph iv 酶切电泳图 1 为 100 bp DNA Ladder, 2、3 为 CT 基因型, 4 为 TT 基因型, 5~7 为 CC 基因型。

表 1. 三组基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 基因型和等位基因频率分布

组 别	例数	基因型 (例)				等位基因 (例)	
		CC	CT	TT	CT+TT	C	T
ACS 组	150	97 (64.7%)	48 (32.0%) ^{ac}	5 (3.3%)	53 (35.3%) ^{bd}	242 (80.7%)	58 (19.3%) ^{ac}
SAP 组	110	92 (83.6%)	13 (11.8%)	5 (4.5%)	18 (16.3%)	197 (89.5%)	23 (10.5%)
对照组	70	61 (87.1%)	6 (8.6%)	3 (4.3%)	9 (12.8%)	128 (91.4%)	12 (8.6%)

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与稳定型心绞痛组比较。

2.4 基质金属蛋白酶 9 基因型对血浆基质金属蛋白酶 9 水平的影响

C1562T 位点 CT/TT 基因型者血浆 MMP-9 水平 (98.67 ± 34.56 $\mu\text{g/L}$) 高于 CC 基因型者血浆 MMP-9 水平 (71.44 ± 26.23 $\mu\text{g/L}$), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

急性冠状动脉综合征 (ACS) 包括不稳定型心绞痛和急性心肌梗死, 探讨 ACS 遗传易感性的基因标志是近年心血管领域的研究热点^[1,2]。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差异无显著性。造成不同临床表现的主要原因是斑块易损性不同。ACS 主要的发病机制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缺血或坏死。细胞外基质是血管壁的主要成分, 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、厚度和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 ACS 发生。基质金属蛋白酶是一族在细胞外基质降解中起主要作用的锌离子依赖性蛋白酶超家族, 由巨噬细胞、平滑肌细胞及内皮细胞等分泌, 可通过消化纤维帽成分、破坏其结构而加速斑块破裂, 是造成斑块不稳定的重要原因之一^[3]。因此, 近年来关于基质金属蛋白酶与斑块稳定性的关系备受关注。

基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 又称明胶酶 B, 是基质金属蛋白酶的主要成员, 定位于人 16 号染色体, 分子量为 92 kDa, 活化后为 84 kDa, 作用底物广泛, 包括 iv、Ⅲ、Ⅴ和Ⅸ型胶原、明胶及弹性蛋白等, 在动脉粥样硬化斑块细胞外基质降解中起主要作用^[4]。本研究结果表明 ACS 组血浆 MMP-9 水平明显高于对照组, 但 SAP 组与对照组间差异无显著性。Sundstrom 等^[5]研究也表明, ACS 患者外周血 MMP-9 水平明显高于 SAP 患者和正常人群, 并且冠状动脉粥样硬化斑块中 MMP-9 表达增加, 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 可能与斑块稳定性和 ACS 发病相关。

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 以及 MMP-12 均存在基因的多态性。C1562T 多态性位于 MMP-9 基因的启动子部位, 国外有研究认为, 该变异可从转录水平影响基因表达调控酶蛋白合成的数量, 其机制可能是由于该突变位点正好位于该基因与其转录抑制蛋白结合的区域, 当 C 突变为 T 后该结合区域的构型发生了变化, 使基因与转录抑制蛋白结合的能力下降, 从而转录抑制作用减弱, 最终表现为启动子的活性增强, 基因转录增强, 蛋白质的表达量增加^[6]。Morgan 等^[7] 研究发现, T 等位基因的携带者在心肌梗死患者中比率升高。本研究结果表明, ACS 组 MMP-9 基因 CT 基因型频率和 1562T 等位基因频率高于对照组, 但 SAP 组与对照组各基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义, 并且携带 CT/TT 基因型者血浆 MMP-9 水平明显高于 CC 基因型者, 显示中国南方汉族人群中 1562T 等位基因与 ACS 发病有关。综合以往研究报道, T 等位基因可引起 MMP-9 表达增加^[8], 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 ACS 发生, MMP-9 基因 T 等位基因是动脉粥样

硬化斑块不稳定性的易感基因。

[参考文献]

- [1] 陈晓锋, 唐礼江, 朱敏, 江建军, 沈卫峰, 杜于茜, 等. 心肌梗死患者基质金属蛋白酶 9 基因 C1562T 多态性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (6): 775-778.
 - [2] Burzotta F, Leone AM, Paciaroni K, Mazzari MA, Savino M, Schiavoni G, et al. G20210A prothrombin gene variant and clinical outcome in patients with a first acute coronary syndrome [J]. *Haematologica*, 2004, 89 (6): 1 134-138.
 - [3] 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (6): 592-595.
 - [4] 张涛, 郝玉明. 基质金属蛋白酶与冠心病[J]. 临床内科杂志, 2005, 22 (1): 13-15.
 - [5] Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham heart study [J]. *Circulation*, 2004, 109 (23): 2 850-856.
 - [6] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Harfner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2003, 107 (12): 1 579-585.
 - [7] Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease [J]. *J Mol Med*, 2003, 81 (5): 321-326.
 - [8] Fiotti N, Altamura N, Fisicaro M, Carraron N, Uxa L, Grassi G, et al. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to carotid arteries atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (6): 1 330-336.
- (此文编辑 许雪梅)

《医学研究杂志》稿约

《医学研究杂志》原名《医学研究通讯》于 1972 年创刊, 是由卫生部主管, 中国医学科学院主办的国家级医学综合类学术刊物。中国生物医学核心期刊, 中文科技期刊数据库统计源期刊, 中文科技期刊数据库核心期刊, 中国学术期刊全文数据库收录期刊, 中国学术期刊引证报告统计源期刊。月刊。本刊的服务对象是从事医、教、研医务工作者。国际标准刊号: CN11-5453/R, ISSN1673-548X, 月刊。邮发代号: 2-590。编辑部电话、传真: 85637883。投稿邮箱: xyz85637883@126.com。

院士述评栏目: 由两院院士撰写的具有新观点、新技术与新方法的论述性文章。字数在 2000 字左右, 并附 200 字以内个人简历。**专家论坛栏目:** 由国家重点医学科研项目学科带头人、博士生导师等撰写的代表学术前沿的学术论文。字数在 4000~5000 字, 并附 200 字以内个人简历。**论著栏目:** 主要刊登重大课题的研究论文。字数在 4000 字左右。要求中英文摘要、关键词, 并注明所获基金支持项目。**科研成果栏目:** 报道获国家级、卫生部及省市重大医药成果奖项目, 以便广大读者及时了解最新医学科研成果, 指导工作实践。字数在 1500 字左右。**综述与进展栏目:** 主要报道医学领域一些重点学科的最新研究动态进展。也报道全国各省、市、自治区医药卫生科研进展。字数在 4000 字左右。**专题研究栏:** 刊登基础及临床科研课题的研究及某一项医学研究的科学分析与总结。字数在 3000 字左右。要求中英文摘要、关键词。**新技术栏目:** 主要介绍最新医疗技术、产品的应用及推广。字数在 3000 字左右。**中西医结合栏目:** 主要介绍应用中西医结合的方法指导基础研究及临床实践。字数在 3000 字左右。**病例分析栏目:** 主要由临床医生应用临床工作中的诊断、治疗方法, 通过分析一定数量的病例进行科学分析总结, 介绍诊疗经验。字数在 3000 字以内。**科研管理栏目:** 主要刊登医院管理、科研工作的管理方面的研究论文。字数在 3000 字左右。