

·临床研究·

[文章编号] 1007-3949(2008)16-09-0732-03

基质金属蛋白酶9基因多态性与2型糖尿病 颈动脉粥样硬化的相关性

潘勇翔¹, 梁丽萍², 刘健翔³

(1. 桂林市第二人民医院心血管科, 桂林医学院 2. 附属医院急诊科, 3. 生物工程研究所, 广西桂林市 541001)

[关键词] 内科学; 2型糖尿病; 基质金属蛋白酶9; 基因多态性; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶9基因C1562T多态性与2型糖尿病患者颈动脉粥样硬化的关系。方法 以中国广西桂林地区汉族人群158例为研究对象,包括60例健康对照者和98例2型糖尿病患者(其中非颈动脉粥样硬化者36例,合并颈动脉粥样硬化者62例),采用聚合酶链反应限制片段多态性分析检测其基因型,比较各组间基因型和等位基因频率,并分析其与2型糖尿病颈动脉粥样硬化的相关性。结果 糖尿病组CT和TT基因型和T等位基因频率与对照组相比差异无显著性,糖尿病合并颈动脉粥样硬化组CT和TT基因型和T等位基因频率与糖尿病非颈动脉粥样硬化组相比显著升高($P < 0.05$);基质金属蛋白酶9T等位基因是2型糖尿病颈动脉粥样硬化的危险因素(OR=2.160,95%CI为1.026~4.547)。结论 基质金属蛋白酶9基因C1562T多态性与2型糖尿病颈动脉粥样硬化有相关性。T等位基因可能是2型糖尿病颈动脉粥样硬化的易感基因。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Association Between Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-9 Gene and Carotid Artery Arteriosclerosis in Type 2 Diabetes Mellitus

PAN Yong-Xiang¹, LIANG Li-Ping², and LIU Jiann Xiang³

(Department of Cardiovascular, the Second Hospital of Guilin, Guangxi 541001, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Matrix Metalloproteinase-9; Gene Polymorphism; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between a 1562C[→]T mutation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene and carotid artery arteriosclerosis in type 2 diabetes mellitus (T2DM) of Guilin. **Methods** A case-control study for 158 Guilin Han Chinese subjects (including 98 type 2 diabetes mellitus and 60 normal control) was performed. The number of the 1562 C[→]T mutation alleles were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. **Results** The frequencies of genotype and allele showed no significant difference between control groups and T2DM group, and the frequency of the T genotype and T allele at 1562 were significantly higher in T2DM with carotid artery arteriosclerosis group than in T2DM without carotid artery arteriosclerosis group and control subjects ($P < 0.05$). The analysis showed that MMP-9 T allele was an important risk factor of carotid artery arteriosclerosis in T2DM (OR=2.160, 95% CI: 1.026~4.547).

Conclusion The T allele of C1562T polymorphism of MMP-9 gene is related to carotid artery arteriosclerosis in Guilin T2DM. The T allele may be a risk factor.

基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)启动子区的C1562T基因变异与动脉粥样硬化关系密切^[1],2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大血管并发症主要表现为动脉粥样硬化。在动脉粥样硬化早期,最早受累的是颈动脉内膜^[2]。本研究就MMP-9第1562外显子C[→]T点突变多态性与T2DM颈动脉粥样硬化的关系进行探讨。

1 对象和方法

1.1 研究对象

2型糖尿病患者98例,其中男50例,女48例,

年龄 64.78 ± 8.31 岁,病程 11.49 ± 3.98 年,符合1999年WHO提出的2型糖尿病诊断及分型标准。根据有无颈动脉粥样硬化分为两组:无颈动脉粥样硬化组36例,其中男16例,女20例,年龄 64.82 ± 8.15 岁,病程 7.89 ± 1.86 年;④颈动脉粥样硬化组62例,其中男34例,女28例,年龄 64.72 ± 8.70 岁,病程 8.18 ± 2.90 年。两组性别、年龄、病程之间差异无显著性,有可比性。选择同期在我院体检的健康个体60名,其中男32名,女28名,年龄 60.40 ± 5.34 岁,为无亲缘关系的健康体检者,与2型糖尿病组相匹配,无心、脑、肝、肾脏病史。所有研究对象均为桂林地区汉族人群,无血缘关系;无肺气肿、自身免疫性疾病、恶性肿瘤及其他内分泌疾病。

[收稿日期] 2008-04-16 [修回日期] 2008-09-10

[作者简介] 潘勇翔,硕士,主治医师,研究方向为糖尿病动脉粥样硬化病变,E-mail为 pyxsky@yahoo.com.cn。梁丽萍,主治医师。

1.2 颈动脉粥样硬化的诊断

参照文献[2], 选用彩色多普勒超声仪(12-5L, 7.5 MHz, 线阵探头), 测量双侧颈动脉内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT), 增厚为 $IMT \geq 1.0$ mm, 斑块为 $IMT \geq 1.3$ mm 或一个管腔狭窄均视为颈动脉粥样硬化。

1.3 基因型检测

取 EDTA 抗凝血 2 mL, 用氯仿饱和酚法提取基因组 DNA。PCR 扩增 MMP-9 C1562T 位点及其侧翼, 引物序列上游 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3', 下游 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3', 由上海生物工程有限公司合成。总反应体积 30 μ L, 其中含 10 \times Buffer 3.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.8 μ L, 12.5 μ mol/L 引物 1 0.2 μ L, 12.5 μ mol/L 引物 2 0.2 μ L, 3 Mu/L TaqDNA 0.3 μ L, DdH₂O 23.3 μ L, 样品 1.2 μ L, 合计 30.0 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 由 PE2400 型 PCR 扩增仪完成。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶于 100 V 电泳 30 min, 使所要的扩增产物与非特异产物尽量分开, 于紫外灯下切取含 435 bp 光亮条带的凝胶, 按照 UNIQ5 柱式 PCR 产物回收试剂盒说明书的操作步骤进行回收纯化(试剂盒购自上海生物工程有限公司)。含限制性内切酶 Pae iv(10 Mu/L) 0.5 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, DdH₂O 14.5 μ L, PCR 扩增产物 3 μ L, 总反应体积 20 μ L。混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, 取出后置于 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 终止反应。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶于 100 V 电泳 30 min, 紫外灯下确定其基因型。

1.4 统计学分析

以 Hardy-Weinberg 平衡检验样本的群体代表性确认各基因频率达到遗传平衡。组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 聚合酶链反应产物酶切鉴定

PCR 产物长度为 435 bp, 酶切后发现 MMP-9 基因存在多态性。MMP-9 基因 1562 位点存在两个等位基因 C 和 T, T 型 MMP-9 可被 Pae iv 酶切为 247 bp 和 188 bp 两个片段。C、T 两种等位基因组合成 CC、CT、TT 三种基因型(图 1)。

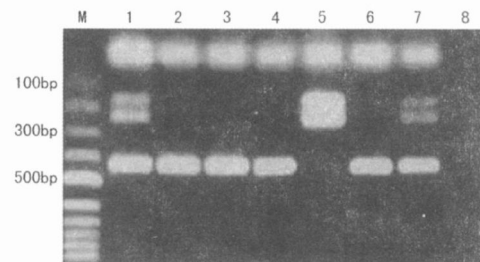


图 1. Pae iv 酶切结果 1 和 7 为 CT 基因型(435 bp、247 bp 和 188 bp), 2、3、4 和 6 为 CC 基因型(435 bp), 5 为 TT 基因型(247 bp 和 188 bp), 8 为阴性对照。

2.2 基质金属蛋白酶 9 基因型和等位基因的分布

对照组和 2 型糖尿病组 MMP-9 基因均存在 C、T 两种等位基因和 CC、CT、TT 三种基因型, 对照组符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。CT 和 TT 基因型和 T 等位基因频率在 2 型糖尿病组、糖尿病无颈动脉粥样硬化组和对照组差异无显著性, 而在糖尿病颈动脉粥样硬化组显著高于对照组($P = 0.039$)。CT 和 TT 基因型 OR = 2.450, 95% CI 为 1.062~5.650; T 等位基因 OR = 2.160, 95% CI 为 1.026~4.547。颈动脉粥样硬化组 CT 和 TT 基因型和 T 等位基因频率也显著高于无颈动脉粥样硬化组($P = 0.021$), CT 和 TT 基因型 OR = 2.640, 95% CI 为 1.024~6.806; T 等位基因 OR = 3.410, 95% CI 为 1.160~10.025(表 1)。

表 1. 基质金属蛋白酶 9 基因型和等位基因频率分布

项 目	对照组 (n = 60)	T2DM 组 (n = 98)	无颈动脉粥样 硬化组(n = 36)	颈动脉粥样 硬化组(n = 62)
基因型频率				
CC	49 (0.73)	71 (0.72)	31 (0.86)	40 (0.65) ^a
CT	10 (0.25)	24 (0.24)	4 (0.11)	20 (0.32) ^a
TT	1 (0.02)	3 (0.04)	1 (0.03)	2 (0.03)
CT 和 TT	11 (0.27)	27 (0.28)	5 (0.14)	22 (0.35) ^a
等位基因频率				
C	108 (0.90)	166 (0.85)	66 (0.92)	100 (0.81) ^a
T	12 (0.10)	30 (0.15)	6 (0.08)	24 (0.19) ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组和无颈动脉粥样硬化组比较。

3 讨论

机体降解细胞外基质主要是 MMP, 其中 MMP-9 被认为在动脉粥样硬化和血管重建过程中起着相当重要的作用^[4], 有研究表明糖尿病患者(尤其合并大血管病变者)血浆和动脉壁中有较高的 MMP-9 表达^[5,6]。人类 MMP-9 基因位于人第 20 号染色体长臂(20q11.2-q13.1), MMP-9 酶原主要由中性白细胞和巨噬细胞产生。

本研究中, CT 和 TT 基因型频率和 T 等位基因频率分布在正常组与 2 型糖尿病组中差异无显著性, 表明 MMP-9 C1562T 与 2 型糖尿病没有明显相关性, 这与刘宽芝等^[7]报道的结果相似, MMP-9 C1562T 基因多态性可能不是桂林地区汉族人群 2 型糖尿病的主要遗传因素。

Marx 等^[5]检测了糖尿病和糖尿病合并大血管病变患者血浆 MMP-9 水平, 在年龄、性别、体质指数均衡下发现较非糖尿病组显著升高。Uemura 等^[6]在糖尿病动物模型中发现 MMP-9 在血管组织和血浆中显著增高, 高糖促进了内皮细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达, 提示糖尿病状态下 MMP-9 活性升高可能有助于糖尿病动脉粥样硬化的发展。有研究表明 MMP-9 C1562T 基因多态性可影响其产物的表达, 并发现在冠心病患者中 MMP-9 的 T 等位基因频率与血浆 MMP-9 浓度水平高度相关^[1,8]。最近研究发现在 MMP 系统中只有 MMP-9 1562CT 和 279RQ 基因多态性与急性心肌梗死有关及 MMP-1/MMP-3 与冠心病有关^[9]。因糖尿病大血管并发症主要为动脉粥样硬化, 而大血管并发症以临床合并心脑血管周围血管疾病为标准存在一定误差。有研究表明在动脉粥样硬化早期, 最早受累的是颈动脉内膜^[2]。本研究以检测颈动脉 IMT 为标准判断动脉粥样硬化, 较为简单可行, 结果发现 2 型糖尿病颈动脉粥样硬化组 T 等位基因和 CT/TT 基因型频率显著高于对照组和无颈动脉粥样硬化 2 型糖尿病组, T 等位基因携带者颈动脉粥样硬化的发生率显著增加, 提示在我国 MMP-9 C1562T 基因多态性与 2 型糖尿病颈动脉粥样硬化存在相关, T 等位基因携带者颈动脉粥样硬化的发生率显著增加, 考虑与 T 等位基因携带者较

C 等位基因携带者 MMP-9 基因启动子的转录活性增加, 其结果导致 MMP-9 表达上调有关^[1]。增高的 MMP-9 可通过其生物学效应来发挥作用: 通过降解血管壁细胞外基质, 有利于血管平滑肌细胞突破周围组织屏障, 从中膜向内膜迁移进行增殖, 摄入脂质分泌更多细胞外基质, 形成动脉粥样硬化斑块; 其次可破坏斑块表面的纤维帽, 使斑块易于发生破裂, 继发血栓形成和机化, 导致动脉粥样硬化损伤进展和斑块扩大; 此外, MMP-9 还可破坏细胞与基质间的相互作用, 诱导血管平滑肌细胞发生凋亡, 从而加速动脉粥样硬化进程^[10]。

无论 2 型糖尿病或动脉粥样硬化都与多种遗传和环境因素有关, 若能采取队列研究、多中心、大样本、结合家系连锁分析等方法进行深入研究, 相信可以明确 MMP-9 C1562T 基因多态性在 2 型糖尿病颈动脉粥样硬化中的作用。

[参考文献]

- [1] Zhang B, Ye S, Hermann SM, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1999, **99**: 1788-794.
- [2] 陈忠, 马根山, 黄峻, 等. 早发冠心病患者颈动脉内膜中膜厚度特点及其预测价值[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12**(1): 81-83.
- [3] 李建初, 袁光华, 柳文仪, 等. 血管和浅表器官彩色多普勒超声诊断学[M]. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1999: 51.
- [4] Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **130**: 61-70.
- [5] Marx N, Froehlich J, Siam L, et al. Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **2**: 283-288.
- [6] Uemura S, Matsushita H, Li W, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress [J]. *Circ Res*, 2001, **12**: 1291-298.
- [7] 刘宽芝, 陈雅静, 王战建, 等. 基质金属蛋白酶 9 基因多态性与 2 型糖尿病血管病变的相关性研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, **12**: 442-444.
- [8] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2003, **4**: 1579-585.
- [9] Home BD, Camp NJ, Carlquist JF, et al. Multiple polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease [J]. *Am Heart J*, 2007, **154**(4): 751-758.
- [10] Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, et al. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **150**: 245-253.

(此文编辑 文玉珊)