

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.31.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 31-0019-06

临床研究 · 论著

基质金属蛋白酶 3-1612 基因多态性与 急性缺血性脑卒中的关系*

李永芳¹, 李艾帆¹, 张玉超², 姜晓蕊¹, 崔传举¹, 袁树华¹, 贺颖³, 郑红³

(1. 河南大学附属郑州市第一人民医院 神经内科, 河南 郑州 450000; 2. 河南大学附属
郑州市第一人民医院 优生遗传室, 河南 郑州 450000; 3. 郑州大学基础医学院
医学遗传与细胞生物学系, 河南 郑州 450001)

摘要: 目的 探讨基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 启动子 -1612 (5A/6A) 基因多态性与急性缺血性脑卒中 (AIS) 的关系, 并进一步探讨其作用机制。**方法** 采用 SNaPshot 微测序技术, 检测 300 例急性缺血性脑卒中患者和 300 例健康对照者 MMP-3 基因 -1612 (5A/6A) 基因型和等位基因频率差异是否存在统计学意义, 并且根据 TOAST 分型将 AIS 组分为大动脉粥样硬化型 (LAA)、小动脉闭塞型 (SAO)、心源性栓塞型 (CE)、其他明确病因型 (SODE) 及其他不明原因型 (SUE) 亚组, 探讨各亚组 MMP-3 基因 -1612 (5A/6A) 基因型和等位基因频率差异是否存在统计学意义。**结果** ①携带 MMP-3-1612 的 5A/5A 基因型数目在 AIS 组较对照组增加 ($P < 0.05$)。② MMP-3 启动子区的 5A/5A 基因型数目在 LAA 型脑梗死增加 ($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示: 在调整传统危险因素后, MMP-3 启动子区的 -1612 (5A/6A) 基因多态性可增加脑梗死的发病风险。**结论** AIS 组 MMP-3 启动子区 -1612 基因多态性与急性缺血性脑卒中相关, 5A/5A 基因型可能是急性缺血性脑卒中遗传性危险因素, 其作用机制可能与动脉粥样硬化相关, 但因本实验样本有限, 仍需大样本研究证实。

关键词: 基质金属蛋白酶 3; 基因多态性; 脑卒中

中图分类号: R743.3

文献标识码: A

Study on relationship between MMP3-1612 polymorphism and acute ischemic stroke*

Yong-fang Li¹, Ai-fan Li¹, Yu-chao Zhang², Xiao-rui Jiang¹, Chuan-ju Cui¹,
Shu-hua Yuan¹, Ying He³, Hong Zheng³

(1. Department of Neurology, 2. Eugenic and Genetic Department, Zhengzhou First People's Hospital Affiliated to Henan University, Zhengzhou, Henan 450000, China; 3. Department of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: Objective To investigate the association between 1612 (5A/6A) polymorphism of MMP3 gene and acute ischemic stroke (AIS). **Methods** SNaP shot minisequencing was used to study whether there was a significant difference in MMP3-1612 genotype and allele frequency between 300 AIS patients and 300 healthy controls. The AIS cases were divided into five subtypes: large-artery atherosclerosis (LAA), small-artery occlusion (SAO), cardioembolism (CE), stroke of other determined etiology (SODE) and stroke of other undetermined etiology (SUE). The differences in MMP3-1612 genotype and allele frequency were studied among the five subtypes. **Results** For

收稿日期: 2018-02-01

* 基金项目: 河南省郑州市普通科技攻关项目 (No: 20150001)

[通信作者] 李艾帆, E-mail: liaifan68@163.com

the *MMP3* gene-1612 (5A/6A) polymorphism, 5A/5A genotype was significantly increased in the AIS group as compared to the control group ($P < 0.05$). 5A/5A genotype of *MMP3* promoter was significantly increased in the LAA subtype of AIS ($P < 0.05$). Multiple stepwise logistic regression analysis showed that the 1612-5A/6A polymorphism of *MMP3* gene was significantly associated with AIS after adjustment of the conventional risk factors. **Conclusions** The 1612 polymorphism of *MMP3* gene is associated with acute ischemic stroke, the 5A/5A genotype may be the risk factor of acute ischemic stroke. The mechanism may be related to arteriosclerosis. But large samples will be studied to confirm our conclusion.

Keywords: *MMP3*; polymorphism; acute ischemic stroke

近年来,很多研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)参与了急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)过程中的炎症反应及继发性脑损伤^[1]。MMPs 是一族在细胞外基质降解及再塑中发挥重要作用的锌离子依赖的中性蛋白酶家族,研究表明其在动脉粥样硬化过程中发挥着重要作用^[2-3],而动脉粥样硬化又在 AIS 发病过程中扮演重要角色^[4],因此笔者推测 MMPs 可能通过参与动脉粥样硬化过程从而在 AIS 发挥作用。MMP-3 是 MMPs 家族中重要成员,可激活多种 MMPs 的生物活性^[5],笔者推测 MMP-3 启动子 -1612 (5A/6A) 基因多态性可能是 AIS 的易感因素。本研究旨在通过基因测序技术,探讨 MMP-3 启动子基因多态性与 AIS 的关系并探讨其机制,从而为 AIS 的遗传易感基因提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取 2015 年 4 月 -2016 年 7 月郑州市第一人民医院神经内科住院并且确诊的 AIS 患者 300 例及同期住院的健康个体 300 例,其性别、年龄均与 AIS 组相匹配。根据第 4 届脑血管病学术会议的修订的诊断标准, AIS 的诊断经临床检查(体征、病史、CT/MRI)确诊。所有研究个体之间无血缘关系。所有参与个体均已签署知情同意书,并获得郑州市第一人民医院伦理委员会的批准。AIS 根据 TOAST 分型^[6],本室将其分为 5 个亚组:大动脉粥样硬化型(LAA)、小动脉闭塞型(SAO)、心源性栓塞型(CE)、其他明确病因型(SODE)及其他不明原因型(SUE)亚组,分别研究其与 *MMP-3* 基因多态性相关程度。排除标准:癫痫、癌症、出血性脑血管病及肝肾功能不全者、慢性炎症、帕金森症及综合征。

1.2 基因型判定

1.2.1 标本采集及 DNA 的抽提 抽取所有研究患者的晨起空腹静脉血 3 ml,将其置 EDTA-Na₂ 抗凝管中,

并放置于 -20℃ 冰箱保存备用。本实验提取 DNA 所用试剂为 TIANGEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒。

1.2.2 SNaPshot 多重单碱基延伸反应 PCR 引物序列参照文献设计,由生工生物工程(上海)有限公司合成。MMP-3-1612 正向引物:5'-TTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAGA-3',反向引物:5'-TTATCTGTTGGGCTCCACTGTTTCTTCC-3'。MMP-3-1612 反应条件:95℃ × 5 min, 95℃ × 5 min, 95℃ × 30 s, 54℃ × 30 s, 72℃ × 40 s, 共 35 个循环, 72℃ × 7 min, 4℃ 保存。应用限制性内切酶 *Tth111 I* 在 65℃ 孵育 24 h,经琼脂糖凝胶电泳鉴定其基因型。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用独立样本 *t* 检验,计数资料及各组间的等位基因频率和基因型频率的比较采用 χ^2 检验,本实验采用 SHEsis 软件进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,采用非条件 Logistic 回归分析,所得的相对风险度(\hat{OR})及 95%CI 对疾病发生的相对危险度及相关程度进行研究, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较

本研究对两组的年龄、性别等基本信息、危险因素及临床检验资料进行比较。研究结果显示, AIS 组与对照组之间在性别、年龄构成方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。对两组之间危险因素研究发现, AIS 组危险因素如高血压、糖尿病、冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)患者的比例与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$), AIS 组均高于对照组。两组间的生化指标如血糖、低密度脂蛋白、同型半胱氨酸在两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 MMP-3-1612 位点的凝胶电泳结果

野生型 6A/6A 基因型含有 120 bp 1 个条带;

表 1 两组一般临床资料比较 (n=300)

组别	男/女/ 例	年龄/ (岁, $\bar{x} \pm s$)	总胆固醇/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	三酰甘油/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	血糖/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	低密度脂蛋白/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)
AIS 组	163/137	59.69 ± 12.55	4.47 ± 1.15	1.70 ± 1.32	6.37 ± 2.65	1.05 ± 0.43
对照组	145/155	58.69 ± 11.71	4.42 ± 0.84	1.76 ± 1.61	5.51 ± 1.72	1.19 ± 0.35
χ^2 值	2.162	1.002	0.638	0.527	4.69	4.402
P 值	0.142	0.317	0.524	0.590	0.000 [†]	0.000 [†]

组别	高密度脂蛋白/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	同型半胱氨酸/ (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	高血压 例 (%)	糖尿病 例 (%)	冠心病 例 (%)
AIS 组	2.62 ± 1.06	17.95 ± 9.09	97 (32.3)	56 (18.7)	32 (10.7)
对照组	2.67 ± 0.91	15.52 ± 6.29	21 (7.0)	13 (4.3)	6 (2.0)
χ^2 值	0.546	3.806	59.34	63.23	46.29
P 值	0.586	0.000 [†]	0.000 [†]	0.001 [†]	0.004 [†]

注: † 组间比较, P < 0.05

5A/6A 基因型含有 120 bp 和 97 bp 2 个条带; 5A/5A 基因型者, 只含有 97 bp 1 个条带。见图 1。

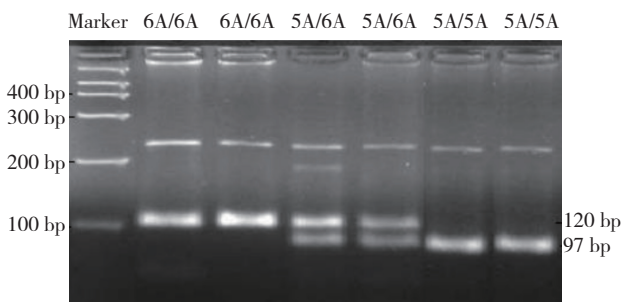


图 1 MMP-3-1612 电泳图

表 2 基因型频率与等位基因频率在两组间的比较 例 (%)

组别	基因型			等位基因		显性基因		隐性基因	
	6A/6A	5A/6A	5A/5A	6A	5A	6A/6A	5A/6A+5A/5A	6A/6A+5A/6A	5A/5A
AIS 组	216 (72.0)	39 (25.0)	45 (3.0)	471 (84.5)	84 (15.5)	216 (72.0)	84 (28.0)	255 (97.0)	45 (3.0)
对照组	213 (71.0)	75 (21.0)	12 (8.0)	501 (81.5)	87 (18.5)	213 (71.0)	87 (29.0)	288 (92.0)	12 (8.0)
χ^2 值		2.825	0.327		1.482		5.823		0.025
P 值		0.414	0.011 [†]		0.167		0.786		0.007 [†]
OR		1.174	0.370		0.808		0.952		0.356
95%CI (下限, 上限)		0.799, 1.725	0.168, 0.814		0.597, 1.093		0.668, 1.357		0.162, 0.779

注: † 与对照组比较, P < 0.05

2.4 MMP-3-1612 位点多态性与 AIS 亚型的相关性

根据 TOAST 分型法^[6], 将 AIS 组分为 LAA 组 (104 例)、SAO 组 (156 例)、CE 组 (20 例)、SODE 组 (5 例)、SUE 组 (15 例), 分别研究 MMP-3-1612 位点

2.3 MMP-3-1612 位点多态性分型结果

运用 SHEsis 软件检测发现, MMP-3 基因位点 -1612 多态性基因型分布在 AIS 组和对照组中处于 Hardy-Weinberg 平衡 (P = 0.837 和 0.103), 具有群体代表性。MMP-3-1612 的基因型和等位基因频率分布结果显示, AIS 组中的 5A/5A 基因型数目与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), AIS 组高于对照组。在隐性模式中, AIS 组中的 5A/5A 基因数目与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05) AIS 组高于对照组。见表 2。

与不同亚型的相关性, 其中 SODE 型分别为烟雾病 2 例, 凝血功能障碍 3 例。结果显示 5A/5A 基因型数目在 LAA 组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 基因型数目有升高。见表 3。

表 3 AIS 各亚型基因型频率与等位基因频率比较 例 (%)

组别	6A/6A	5A/6A	5A/5A	5A 等位 基因	基因频率 间的比较	χ^2 值	P 值	\hat{OR}	95%CI	
									下限	上限
LAA (n=104)	41 (28.8)	8 (7.7)	55 (63.5)	5 (6.7)	5A/6A vs 6A/6A	2.451	0.345	0.234	0.145	0.569
					5A/5A vs 6A/6A	0.099	0.001 [†]	2.345	1.876	2.964
					5A vs 6A	2.351	0.335	0.567	0.193	3.137
SAO (n=156)	115 (73.7)	28 (18)	13 (8.3)	1 (6.1)	5A/6A vs 6A/6A	1.158	0.234	0.356	0.161	0.682
					5A/5A vs 6A/6A	3.705	0.560	0.224	0.066	0.759
					5A vs 6A	1.860	0.242	0.807	0.563	1.157
CE (n=20)	12 (60)	6 (30)	2 (10)	2 (5.0)	5A/6A vs 6A/6A	3.823	0.567	0.678	0.207	0.907
					5A/5A vs 6A/6A	6.712	0.850	0.196	0.020	0.223
					5A vs 6A	3.489	0.508	0.577	0.263	1.157
SODE (n=5)	3 (60)	2 (40)	0 (0)	2 (0.0)	5A/6A vs 6A/6A	5.583	0.767	0.798	0.207	1.307
					5A/5A vs 6A/6A	13.500	0.990	0.096	0.012	1.123
					5A vs 6A	5.123	0.718	0.607	0.363	1.297
SUE (n=15)	10 (66.7)	4 (26.6)	1 (6.7)	2 (0.0)	5A/6A vs 6A/6A	2.224	0.267	0.478	0.207	0.907
					5A/5A vs 6A/6A	6.875	0.860	0.186	0.098	1.223
					5A vs 6A	2.934	0.435	1.341	0.561	3.203

注: † 两两比较, P < 0.05

2.5 MMP-3-1612 位点多态性基因型与脑梗死的关系

以 MMP-3-1612 基因多态性、低密度脂蛋白、血糖、高同型半胱氨酸、高血压、糖尿病、冠心病为自变量, 以脑梗死为因变量, 采用 Logistic 回归模型进行多因素分析, 结果显示 MMP-3-1612 基因多态性、低密度脂蛋白升高、血糖升高、高同型半胱氨酸、高

血压、冠心病、糖尿病均可增加 LAA 亚型的发病风险。见表 4。

2.6 MMP-3-1612 位点测序结果

为检验 SNaPshot 微测序技术分型结果的准确性, 本实验随机抽取 3 种基因型的部分样本进行测序。结果显示, SNaPshot 微测序技术的基因分型结果与测序结果完全一致。见图 2。

表 4 MMP-3-1612 位点的 Logistic 多因素回归分析

因素	b	S _b	\hat{OR}	95%CI		P 值
				下限	上限	
MMP-3-1612 基因多态性	1.977	0.642	2.650	1.260	5.591	0.002
低密度脂蛋白	1.397	0.627	1.975	0.852	3.658	0.026
血糖	0.239	0.048	1.27	1.156	1.395	0.000
高同型半胱氨酸	0.059	0.015	1.061	1.030	1.092	0.000
高血压	1.697	0.230	5.459	3.480	8.570	0.000
糖尿病	2.141	0.399	8.150	3.353	17.637	0.000
冠心病	0.152	0.022	1.164	1.120	1.220	0.000

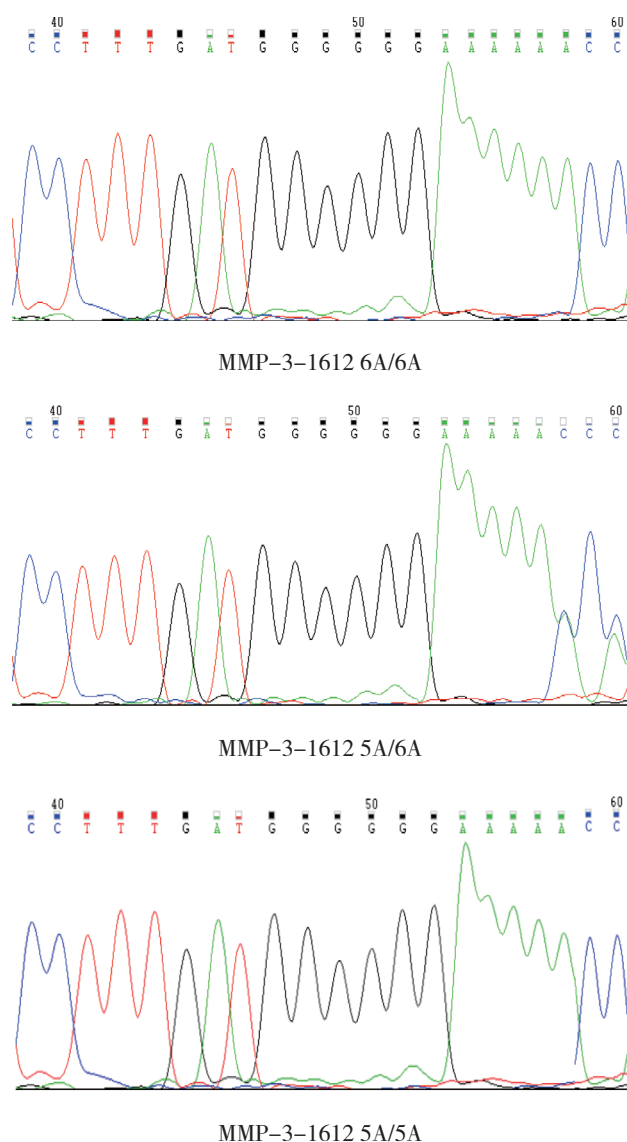


图 2 MMP-3-1612 位点基因型测序图

3 讨论

缺血性脑卒中的发生与环境因素和多个遗传因素相关, 基因变异也是缺血性脑卒中的重要发病因素之一。研究已经表明脑血管疾病发生与年龄、性别、遗传因素有关, 且与高血压、吸烟、糖尿病、高血脂症、冠心病、高同型半胱氨酸血症等有直接相关性^[7]。本项研究性别、年龄相匹配的 AIS 组与对照组比较发现, AIS 组的血糖、高密度脂蛋白水平、同型半胱氨酸和对照组比较差异有统计学意义, 且 AIS 组高血压、糖尿病、冠心病患者发病率较对照组增加, 这与上述 AIS 的发病机制及危险因素的研究结果相符。在缺血性脑卒中预防中, 可注意控制血压、血糖、血脂、同型半胱氨酸等危险因素, 从而减少缺血性脑卒中的发生。

MMPs 在组织修复、细胞迁移、血管生成、组织形态形成及生长过程中扮演重要角色, 生理条件下, MMPs 与金属蛋白酶特定组织抑制剂之间保持平衡, 如果平衡破坏可能导致一系列病理过程, 如动脉粥样硬化, MMPs 具有降解基质蛋白作用, 可导致斑块破裂、出血形成血栓, 可影响缺血性脑卒中发病过程^[2-3]。MMP-3 是 MMPs 家族重要成员, 它具有广泛的底物特异性, 可降低 II、IV 和 IX 型胶原蛋白、纤维结合蛋白、胶质、蛋白聚糖、板层、和弹性蛋白活性, 也可激活其他的 MMPs, 如胶原酶、基质裂素和明胶酶 -B, 对结缔组织重塑至关重要^[8-9]。

国外的研究如 BETON 等^[10] 和 GHILARDI 等^[11] 研究发现 MMP-3 启动子 5A/6A 等位基因的 6A 基因与动脉粥样硬化关系密切, 其表达增加可加速动脉粥样硬化进程。而 FLEX 等^[11] 研究 MMP-3 启动子基因多态性发现, 缺血性脑卒中患者与年龄性别匹配的对照组比较, MMP-3 启动子 5A/5A 基因型在病例组中高于对照组, 考虑 5A 等位基因与急性缺血性脑卒中关系密切, 是急性缺血性脑卒中危险因素。国内的研究如黄小亚等^[12] 研究发现急性动脉硬化型脑梗塞患者 MMP-3 水平增加, MMP-3 启动子 5A 等位基因可能为急性动脉硬化型脑梗死的遗传易感基因。本研究在调整传统危险因素后, Logistic 回归分析显示, MMP-3-1612 基因多态性可增加脑梗死的发病风险, 提示 MMP-3-1612 位点基因突变与急性缺血性脑卒中中相关。并且研究发现 AIS 组 5A/5A 基因型个体数目较对照组增加, 认为携带 5A/5A 基因型的个体可能增加患缺血性脑卒中的发病风险, 这与 FLEX 等^[11] 和黄小亚等^[12] 的研究结果一致, 而与国外研究不一致, 考虑与种族差异有关。分析原因, 推测可能由于 MMP-3-1612 5A/5A 基因导致 MMP-3 基因转录水平增高, 增加了斑块裂解, 导致动脉粥样斑块转化为小且更容易破裂的斑块, 从而增加急性缺血性脑卒中发生的概率。

马爱军等^[13] 研究认为, MMP-3-1612 血清水平在 LAA 型脑卒中急性期升高, 且 5A 等位基因携带者 (5A/5A+5A/6A) 患 LAA 型脑卒中的风险大于 6A/6A 基因型携带者, 认为 MMP-3-1612 基因多态性与 LAA 型脑卒中易感性相关, 而本研究对 AIS 组各亚型进行分析时同样发现, LAA 型脑梗死 5A/5A 基因型数目增加。而 LAA 型为大动脉粥样硬化型, 动脉粥样硬化为发病主要原因, 同样证实 5A/5A 基因可能通过参与动脉粥样硬化过程从而增加急性缺血性脑卒中风险, 但

因亚组样本有限, 仍需大样本研究证实。

本实验结果发现 5A/5A 基因型可能为急性缺血性脑卒中的遗传危险因素, 可能成为急性缺血性脑卒中预防的重要靶点。但由于缺血性脑卒中是一种复杂的疾病, 由多个微效易感基因及环境因素共同累加作用, 且其危险因素与糖尿病、冠心病等存在重叠, 可能会对实验结果产生干扰。本研究急性缺血性脑卒中的易感基因, 样本含量较小, 有必要在以后研究中扩大样本, 进行多位点, 并进一步研究不同地区和不同种族的人群进行验证, 也可进一步从 mRNA 和蛋白水平进行更深入的研究, 从而更深入的研究及探明该基因对急性缺血性脑卒中发生的作用及其机制, 从而为急性缺血性脑卒中的基因水平治疗提供更可靠的理论依据。

参 考 文 献:

- [1] GHILARDI G, BIONDI M L, DEMONTI M, et al. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis[J]. *Stroke*, 2002, 33(10): 2408-2412.
- [2] AMANTEA D, TASSORELLI C, PETRELLI F, et al. Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(18): 2098-2117.
- [3] ZOPPO G J. The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207(1): 46-49.
- [4] 朱卫香, 刘彦敏, 韩亚军, 等. 缺血性脑卒中患者血清基质金属蛋白酶-9、超敏 C 反应蛋白水平与颈动脉粥样硬化的相关性[J]. *疑难病杂志*, 2014, 13(11): 1111-1117.
- [5] LAKHAN S E, KIRCHGESSNER A, TEPPER D, et al. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke[J]. *Front Neurol*, 2013, 4(3): 32.
- [6] MCARDLE P F, KITTNER S J, AY H, et al. Agreement between TOAST and CCS ischemic stroke classification[J]. *Neurology*, 2014, 83(18): 1653-1660.
- [7] 贾建平, 等. 神经病学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 199-200.
- [8] YANG Y, THOMPSON J F, TAHERI S, et al. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(7): 1104-1114.
- [9] FRANKOWSKI J C, DEMARS K M, AHMAD A S, et al. Detrimental role of the EP1 prostanoid receptor in blood-brain barrier damage following experimental ischemic stroke[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17956.
- [10] BETON O, ARSLAN S, ACAR B, et al. Association between MMP-3 and MMP-9 polymorphisms and coronary artery disease[J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(6): 709-714.
- [11] FLEX A, GAETANI E, PAPAEO P, et al. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2004, 35(10): 2270-2275.
- [12] 黄小亚, 朱敏, 金笑平, 等. 基质金属蛋白酶-3 血清水平与启动子基因 5A/6A 多态性与动脉粥样硬化型脑梗塞的关系[J]. *中华神经遗传学杂志*, 2008, 12(6): 653-656.
- [13] 马爱军, 潘旭东, 范凌燕, 等. MMP-3 基因多态性与脑卒中 TOAST 亚型的相关性研究[R]. 北京: 国际神经病学会议, 2013.

(张西倩 编辑)