

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.28.020

MMP-9 基因多态性与缺血性脑卒中发病及预后的相关性研究 *

孔祥丽¹ 张世俊¹ 李军朝¹ 张 雷¹ 李亚军¹ 欧阳松^{2,3Δ}

(1 西安医学院第一附属医院神经内科 陕西 西安 710077; 2 中南大学湘雅医院 湖南 长沙 410008;

3 Department of Microbial Infection and Immunity, The Ohio State University Columbus, OH 43210 USA)

摘要 目的:研究基质金属蛋白酶 9(MMP-9)基因多态性与缺血性脑卒中(IS)发病及预后的相关性,为 IS 的防治提供新的理论依据。**方法:**选取治疗的 IS 患者 100 例,根据 TOAST 分型标准分为大动脉粥样硬化型(LAA)组 41 例,小动脉阻塞型(SAO)组 59 例,并选取健康体检者 40 例作为对照组,采用 PCR-RFLP 法检测各组 MMP-9 基因 C1562T、R279Q 多态性,并对 IS 患者进行 3 个月的随访,采用 Logistic 回归分析 C1562T、R279Q 多态性与 IS 患者预后的相关性。**结果:**LAA 组、SAO 组 MMP-9 基因 C1562T 位点 T 等位基因、C/T+T/T 基因型频数均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),LAA 组、SAO 组 C1562T 位点 C 等位基因、C/C 基因型频数及 R279Q 位点等位基因和基因型频数与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);Logistic 回归分析显示,MMP-9 各型别基因与预后无明显相关性($P>0.05$)。**结论:**MMP-9 基因 C1562T 的 T 等位基因是 IS 发病的易感基因之一,但 MMP-9 基因多态性与 IS 患者的预后并无明显相关性。

关键词:缺血性脑卒中;基质金属蛋白酶 9;C1562T;R279Q;基因多态性

中图分类号:R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)28-5489-04

Correlation of MMP - 9 Gene Polymorphism with the Pathogenesis and Prognosis of Patients with Ischemic Stroke*

KONG Xiang-li¹, ZHANG Shi-jun¹, LI Jun-chao¹, ZHANG Lei¹, LI Ya-jun¹, OUYANG Song^{2,3Δ}

(1 Xi'an medical school first affiliated hospital neurology, Xi'an, Shaanxi, 710077, China; 2 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China; 3 Department of Microbial Infection and Immunity, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA)

ABSTRACT Objective: To study the relation of MMP-9 gene polymorphism with the pathogenesis and prognosis of patients with IS, so as to provide a new theoretical basis for IS prevention. **Methods:** The selected 100 patients were divided into the LAA group (41 cases), and the SAO group (59 cases) according to TOAST classification standard. Another 40 healthy people was selected as the control group. PCR-RFLP method was applied to detect their MMP-9 gene C1562T and R279Q polymorphism. All patients were followed up for 3 months. Logistic regression model was applied to analyze the relationship between C1562T and R279Q polymorphism and prognosis of IS patients. **Results:** MMP-9 C1562T gene loci alleles T, C/T + T/T genotype frequency in the LAA group and the SAO group were higher than in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). C1562T loci alleles C, C/C genotype frequency and R279Q loci alleles and genotypes frequency of LAA group and SAO group had no statistical difference when compared with that of the control group ($P>0.05$). Multi-factor unconditioned Logistic regression analysis showed that all genotypes of MMP-9 had no obvious correlation with prognosis ($P>0.05$). **Conclusion:** MMP-9 C1562T T allele was one of the susceptibility genes to IS, but MMP-9 gene polymorphism had no significant correlation with the prognosis.

Key words: Ischemic stroke; Matrix metalloproteinases 9; C1562T; R279Q; Gene polymorphism

Chinese Library Classification(CLC): R743.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2017)28-5489-04

前言

缺血性脑卒中(Ischemic stroke, IS)是人类疾病死亡的三大原因之一,给人类生存健康带来严重威胁。IS 的诊断及治疗手段较多,但对于减少致残率及死亡率收效甚微。IS 是一种复杂的多病性因素疾病,其中遗传因素占重要部分。当前开发基因预防、诊断及治疗是有 IS 家属史者的新希望。近年研究发现,基

质金属蛋白酶 9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)基因多态性与缺血性脑血管性疾病的发病及预后密切相关^[1,2]。国内外多项研究提示,MMP-9 是判断脑梗死患者近期预后的重要指标之一^[3,4]。但临床对于 MMP-9 基因多态性与 IS 发病及预后的相关性研究尚无报道。本课题采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测 100 例 IS 患者

* 基金项目:陕西省卫生厅科研基金项目(2010H27);西安医学院第一附属医院基金项目(XYFY10-14)

作者简介:孔祥丽(1980-),女,主治医师,硕士研究生,研究方向:脑血管病, E-mail: kongxiangli_8019@163.com, 电话:18186229214

Δ 通讯作者:欧阳松,男,博士研究生,主要从事脑血管疾病基础与临床研究

(收稿日期:2016-05-09 接受日期:2016-06-30)

MMP-9 基因 C1562T、R279Q 多态性,并与 40 例健康对照组比较,探讨 MMP-9 基因 C1562T、R279Q 多态性与 IS 发病及预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取在本院住院治疗的 IS 患者 100 例作为研究对象。纳入标准:①符合《中国急性期缺血性脑卒中诊治指南(2014)》中相关诊断标准^[5],并经影像学检查确诊;②符合最新的 IS 治疗标准(Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, TOAST)中的大动脉粥样硬化型(Large-artery atherosclerosis, LAA)、小动脉阻塞型(Small-artery occlusion, SAO)分型标准^[6];③首次发病,且发病至入院时间短于 72h;④患者均无血缘关系;⑤已经过 1 周的降脂药物洗脱期;⑥签署知情同意书。排除标准:①TOAST 分型标准中其他明确病因中风型、明原因中风型及心源性脑梗死型患者;②蛛网膜下腔出血、有明确原因的继发性脑出血者;③伴有严重心、肝、肾及血液系统疾病。男 62 例,女 38 例,年龄 42~69 岁,平均(57.69±7.59)岁;分组:LAA 组

41 例,SAO 组 59 例。另外选取同期在本院的健康体检者 40 例作为对照组,男 24 例,女 16 例,年龄 43~70 岁,平均(58.13±7.21)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 IS 组及对照组均抽取晨起空腹静脉血 2 mL, EDTA 抗凝, -20℃低温保存,以备提取 DNA。

IS 组另外抽取晨起空腹静脉血 5 mL, 不加抗凝剂, -20℃低温保存,以备生化检查。

1.2.2 基因组 DNA 提取 采用 DNA 提取试剂盒[柏维力(上海)生物工程有限公司生产]提取基因组 DNA,严格按照试剂盒要求操作。

1.2.3 引物设计及合成 参考文献^[3,4]设计 MMP-9 基因上的 C1562T 位点和 R279Q 位点的引物,并由上海生物工程公司合成,引物序列见表 1。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应体系为 30 μL,正负引物各 1.8 μL, 2× Taq PCR Master Mix 15 μL, DNA 模板 3 μL。PCR 扩增条件见表 1。

表 1 MMP-9 基因引物序列及扩增条件
Table 1 MMP-9 gene primers and amplification conditions

Locus	Primer sequences (5'~3')	Amplification conditions
C1562T	GGTGGTGAGGATGAAACGAGAG	95℃ 5min, 95℃ 35s, 55℃ 30s, 72℃ 45s (35~40 cycles), 72℃ 5min
	CCTATTTGGGAAAAACCTGCTA	
R279Q	TCACCCTCCCGCACTCTGG	94℃ 5min, 94℃ 30s, 60℃ 1min, 72℃ 1min(30~38 cycles), 72℃ 10min
	CGGTCGTAGTTGGCGGTGG	

1.2.5 电泳 取 PCR 反应产物 8 μL, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司生产)观察。

1.2.6 限制性酶切 酶切反应体系共 20 μL, 限制性内切酶(*Sph* I 酶, *Msp* I 酶, 美国 New England Bio Lab 公司生产) C1562T 0.25 μL、R279Q 1.5 μL。37℃水浴 5 h, 取 10 μL 内切酶产物, 经 1.5% 和 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3 预后评价标准

对患者进行 3 个月的随访, 评价患者预后情况。预后包括康复、残疾、死亡。残疾采用 Barthel Index 评价^[7], BI>60 分为非依赖, BI≤60 分为依赖。死亡、依赖为预后差, 非依赖和康复为预后好。

1.4 统计学方法

计数资料采用 χ^2 或秩和检验; 基因型分布经 Hardy-Weinberg 平衡定律检验群体代表性; 性别、年龄、病史、血脂、血糖、并发症及基因型别对预后的影响进行多因素非条件 Logistic 回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡定律检验

LAA 组、SAO 组患者与对照组 MMP-9 基因 C1562T 和 R279Q 基因型分布的 χ^2 值分别为 2.32、1.54、1.05 和 3.12、1.27、0.65(均 $P>0.05$), 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

2.2 MMP-9 基因多态性检测结果

基因 C1562T 多态性: PCR 扩增产物片段长度为 662 bp, *Sph* I 酶切后, T/T 型 2 条带(193 bp、469 bp), C/T 型 3 条带(193 bp、469 bp、662 bp), C/C 型 1 条带(662 bp), 见图 1。R279Q 多态性: PCR 扩增产物片段长度为 300 bp, *Msp* I 酶切后, G/G 型 2 条带(130 bp、170 bp), G/A 型 3 条带(130 bp、170 bp、300 bp), A/A 型 1 条带(300 bp), 见图 2。

2.3 MMP-9 基因 C1562T、R279Q 等位基因和基因型频数分布

LAA 组、SAO 组 MMP-9 基因 C1562T 位点 T 等位基因、C/T+T/T 基因型频数均高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), C 等位基因、C/C 基因型频数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。LAA 组、SAO 组与对照组 MMP-9 基因 R279Q 位点等位基因和基因型频数比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表 2。

2.4 多因素非条件 Logistic 回归分析

100 例 IS 患者在 3 个月的随访中, 死亡 8 例, 依赖 22 例。其中高血压、高血脂及 MMP-9 C1562T 等位基因差异比较有统计学意义($P<0.05$), 入选主效应模型变量。多因素非条件 Logistic 回归分析显示, 高血压是影响预后的独立危险因素($P<0.05$), MMP-9 各型别基因与预后无明显相关性($P>0.05$)(表 3)。

3 讨论

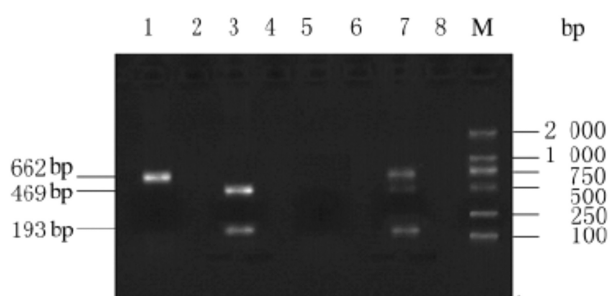


图1 PCR-Sph I 酶切的 MMP-9 C1562T 多态位点基因分型

Fig.1 PCR-Sph I enzyme of MMP - 9 C1562T polymorphism loci genotyping

M: DL 2000 Marker. 1: C/C, 3: T/T, 7: C/T

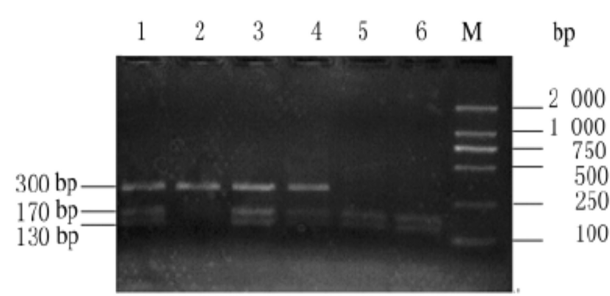


图2 PCR-Msp I 酶切的 MMP-9 R279Q 多态位点基因分型

Fig. 2 PCR-Msp I enzyme of MMP - 9 R279Q polymorphism loci genotyping

M: DL 2000Marker. 1、3、4: C/A, 2: A/A, 5、6: GG

表2 MMP-9 基因 C1562T、R279Q 等位基因和基因型频数分布

Table 2 MMP - 9 gene C1562T and R279Q allele and genotype frequency distribution

Groups	Cases	MMP-9 C1562T				MMP-9 R279Q			
		C/C	C/T+T/T	T	C	C/G	G/A+A/A	G	A
LAA	41	34(82.93)	14(34.15)*#	9(21.95)*#	38(92.68)	12(29.27)	28(68.29)	23(56.09)	15(36.58)
SAO	59	50(84.75)	12(20.34)*	8(13.56)*	53(89.83)	18(30.51)	39(66.10)	35(59.32)	23(38.98)
Control	40	34(85.00)	6(15.00)	3(7.50)	37(92.50)	13(32.50)	27(67.50)	23(57.50)	16(40.00)

Note: Compared with the control group *P<0.05, comparison between the LAA group and the SAO group #P<0.05.

表3 多因素非条件 Logistic 回归分析结果

Table 3 Multi-factor unconditioned Logistic regression analysis results

Risk	β	S_x	Wals χ^2	OR	P	95%CI
Hypertension	0.97	0.25	14.35	3.26	0.02	1.32~2.36
Total cholesterol	0.17	0.05	3.05	1.17	0.12	0.62~1.23
C1562T	0.81	0.39	2.58	2.24	0.53	0.64~1.08

缺血性脑卒中是脑卒中的主要类型, 约占全部脑卒中的70%左右^[8]。随着分子生物学研究的发展, 临床逐步认识到遗传因素在 IS 发生、发展中起着举足轻重的作用。MMP 是一组锌依赖的蛋白水解酶族, MMP-9 是 MMP 家族的重要成员^[9]。大量研究发现, MMP-9 可促进细胞外间质降解而参与脑梗死后出血转化及脑缺血后再灌注损伤等过程^[10]。近年临床对于 MMP-9 与缺血性脑卒中的关系, 逐渐从血清学检测发展到基因水平的研究。Mallolas 等^[11]研究报道, MMP-9 启动子部位的基因多态性与心血管疾病的发生、发展有关。但国内对于 MMP-9 基因多态性与 IS 发病及预后的关系研究鲜有报道。

MMP-9 基因启动子的 1562 处存在 C→T 变异。当 C 突变为 T 后, 基因转录增强, 蛋白质的合成及释放增加, 细胞外间质降解增加, 这是动脉粥样硬化斑块形成、破裂及脑缺血后再灌注损伤的主要原因, 同时也是脑血管阻塞的分子机制^[12]。Vafadari 等^[13]研究发现, MMP-9 基因 C1562T 的 T 等位基因和 C/T+T/T 基因型频率在 IS 患者中明显高于健康对照组, 且随着 IS 病情的加重, T 等位基因和 C/T+T/T 基因型频率增加。岳蕴华等^[14]对维吾尔族 IS 患者研究发现, TOAST 分型中大动脉粥样硬化型患者 T 等位基因与 C/T+T/T 基因型携带率高于小动脉阻塞型患者及健康对照组。Garvin 等^[15]研究报道, 携带

有 T 等位基因与 C/T+T/T 基因型的心血管疾病高危者比携带 CC 基因型及 C 等位基因者患脑梗塞的危险性增加。本研究中, LAA 组、SAO 组 MMP-9 基因 C1562T 位点 T 等位基因、C/T+T/T 基因型频数均高于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05)。我们推测, LAA 组 C 突变为 T, 导致基因转录增强, MMP-9 的合成及释放增加, 这加速了细胞外间质的降解, 进而导致脑梗死发生。由此提示, MMP-9 基因 C1562T 的 T 等位基因与 IS 的发病有关。

临床对于 MMP-9 基因多态性的研究多集中在 C1562T 上, 对于 R279Q 的研究较少。R279Q 是位于 MMP-9 第 6 外显子区域的多态位点, 存在 A→G 变异。由于第 6 外显子区域的多态位点是酶的催化区域, 当 A 突变为 G 后, mRNA 编码的精氨酸被谷氨酸替代, 影响蛋白质功能的表达。Turner 等^[16]研究认为, 基因 C1562T C→T 的变异及基因 R279Q A→G 变异分别影响着蛋白质的表达及功能, 二者对脑梗塞的发生发展均有重要影响。Buraczynska 等^[17]研究报道, IS 患者 R279Q 的 G 等位基因与 G/A+A/A 基因型频数高于健康对照组。而 Gołab 等^[18]研究却得到相反结论, IS 患者无论大动脉粥样硬化型还是小动脉阻塞型患者, R279Q 的 G 等位基因与 G/A+A/A 基因型频数与对照组比较均无明显差异。本研究中, LAA 组、SAO 组

MMP-9 基因位点等位基因和基因型频数与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。由此提示,MMP-9 基因 R279Q 多态性与 IS 的发病无明显相关性。

国外对于 MMP-9 基因多态性对 IS 患者预后的影响存在较大争议。Weiner 等^[9]对 MMP-9 基因 C1562T 多态性与 IS 预后的关系研究时,Cox 回归分析显示 MMP-9C1562T 的 T 等位基因是 IS 预后的独立危险因素。国内学者刘丹^[20]等对 IS 患者 MMP-9C1562T 不同基因型别的预后进行比较,Logistic 回归分析显示,MMP-9 C1562T 基因型别与 IS 患者预后无明显相关性($P>0.05$)。本研究中与刘丹等报道基本相似,Logistic 回归分析显示,MMP-9 各型别基因与预后无相关性($P>0.05$),其原因有待进一步研究。

综上所述,MMP-9 基因 C1562T 的 T 等位基因是 IS 发病的穿易感基因之一,但 MMP-9 基因多态性与 IS 患者的预后并无明显相关性。临床可对 IS 高危人群进行基因型检测,对于发现携带 MMP-9 基因 C1562T 的 T 等位基因者,及早给与药物干预,减少 IS 发病。

参考文献(References)

- [1] Ishida, Yuko, Kuninaka, Yumi, Nosaka, Mizuho, et al. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination [J]. International journal of legal medicine, 2015, 129(5): 1043-1048
- [2] Lee Min Jun, Cho, Young-Ah, Hwang, Hyun Jin, et al. Development of in-cell imaging assay systems for MMP-2 and MMP-9 based on trans-localizing molecular beacon proteins[J]. Archives of pharmacal research, 2015, 38(6): 1099-1107
- [3] Kuroki T, Tanaka R, Shimada Y, et al. Exendin-4 Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Activation and Reduces Infarct Growth After Focal Cerebral Ischemia in Hyperglycemic Mice [J]. Stroke, 2016, 45(3): 112-117
- [4] Yin Yi-jun, Wang Hong-liang, Wu Qin. Advances in ischemic stroke patients serum MMP - 9 and ox - LDL level of detection and clinical significance [J]. International journal of laboratory medicine, 2012(17): 2058-2059
- [5] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性期缺血性脑卒中诊治指南(2014)[J].中华神经科杂志, 2015, 60(4): 1-5
Neurology branch of Chinese medical association cardiovascular epidemiology group. China's guidelines of diagnosis and treatment of acute ischemic stroke (2014) [J]. Chinese neuroscience journal, 2015, 60(4): 1-5
- [6] Han SW, Kim SH, Lee JY, et al. A new subtype classification of ischemic stroke based on treatment and etiologic mechanism [J]. Eur Neurol, 2007, 57(2): 96-102
- [7] Zhang Xiao-ning, Yue Yun-hua, Bai Xu-dong, et al. In patients with acute ischemic stroke the changes of serum levels of MMP - 9 and TIMP - 1 and its clinical significance [J]. Journal of stroke and neurological diseases, 2013, 30(11): 1008-1011
- [8] Golab, Piotr, Kielbus, Michal, Bielewicz, Joanna, et al. The effect of recombinant tissue plasminogen activator on MMP-2 and MMP-9 activities in vitro [J]. Neurological Research: An Interdisciplinary Quarterly Journal, 2015, 37(1): 9-13
- [9] Li, Yan,Zhou, Guo-Min.MMP-9 inhibition facilitates amacrine cell loss after ouabain-induced retinal damage [J]. Experimental Eye Research, 2015, 135: 174-181
- [10] Collazos J, Asensi V, Martin G, et al. The effect of gender and genetic polymorphisms on matrix metalloprotease (MMP) and tissue inhibitor (TIMP) plasma levels in different infectious and non-infectious conditions[J]. Clin Exp Immunol, 2015, 182(2): 213-219
- [11] Mallolas J, Rodrí guez R, Gubern C,et al. A polymorphism in the promoter region of the survivin gene is related to hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke [J]. Neuromolecular Med, 2014, 16(4): 856-861
- [12] Zhang X, Cao X, Xu X, et al. Correlation between the-1562C/T polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 gene and hemorrhagic transformation of ischemic stroke [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 1043-1047
- [13] Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in Translation: From Molecule to Brain Physiology, Pathology and Therapy [J]. J Neurochem, 2015, 42(11): 114-120
- [14] Yue Yun-hua, Bai Xu-dong, Zhang Xiao-ning, et al. Matrix metalloproteinases 9 serum level and gene - 1562 - c > T polymorphism and Uighur acute ischemic cerebral apoplexy clinical classification relationship [J]. Chinese journal of hardening of the arteries, 2014, 22(1): 55-60
- [15] Garvin P, Jonasson L, Nilsson L, et al. Plasma Matrix Metalloproteinase-9 Levels Predict First-Time Coronary Heart Disease: An 8-Year Follow-Up of a Community-Based Middle Aged Population[J]. PLoS One, 2015, 10(9): 138-144
- [16] Turner RJ, Sharp FR. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2016, 10(4): 56-62
- [17] Buraczynska K, Kurzepa J, Ksiazek A, et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)Gene Polymorphism in Stroke Patients [J]. Neuromolecular Med, 2015, 17(4): 385-390
- [18] Gola b P, Boguszevska CA, Kielbus M, et al. The rtPA increases MMP-9 activity in serum during ischaemic stroke [J]. Neurol Neurochir Pol, 2014, 48(5): 309-314
- [19] Weiner GM, Ducruet AF. A novel adhesion molecule that regulates the secretion of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils and protects the blood-brain barrier after ischemic stroke [J]. Neurosurgery, 2014, 75(4): 21-22
- [20] Liu Dan, Wang Ya-chun, Sun Hong-ying, et al. MMP - 2 and MMP - 9 gene polymorphism and clinical classification and prognosis of ischemic stroke[J]. Chinese journal of practical neurological diseases, 2011, 14(7): 3-5