

# MMP-12 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的相关性

刘爽, 赵冬雪

中国医科大学附属盛京医院神经内科, 辽宁 沈阳 110000

**摘要:** **目的** 探讨辽宁地区汉族人群基质金属蛋白酶 12 (MMP-12) 基因的 rs660599 多态性与动脉粥样硬化性脑梗死 (ACI) 的相关性。**方法** 在辽宁地区汉族人群中筛选 213 例 ACI 患者为病例组, 197 例同期健康体检者为正常对照组, 采用改良多重连接酶反应技术 (IMLDR) 检测 MMP-12 基因 rs660599 多态性, 探讨 MMP-12 基因 rs660599 的基因型及等位基因差异。**结果** 病例组与对照组 rs660599 基因型分布 (GG 基因型、GA 基因型和 AA 基因型) 及等位基因 (G 和 A) 频率之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 进一步构建显性模型及隐性模型, 在显性模型及隐性模型下两组差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** MMP-12 基因 rs660599 多态性可能与辽宁地区汉族人群 ACI 无相关性。

**关键词:** 基质金属蛋白酶 12; 动脉粥样硬化性脑梗死; 基因多态性

**中图分类号:** R 743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)09-1168-04

## Relationship between MMP-12 polymorphism and atherosclerotic cerebral infarction

LIU Shuang, ZHAO Dong-xue

Department of Neurology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang, Liaoning 110000, China

Corresponding author: ZHAO Dong-xue, E-mail: doctorzhao80@sina.com

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between rs660599 polymorphism in matrix metalloproteinase 12 (MMP-12) gene and atherosclerotic cerebral infarction (ACI) in Liaoning Han population. **Methods** A total of 213 ACI patients were screened in Liaoning Han population as case group and 197 healthy people were served as control group at the same time. The improved multiplex ligation detection reaction (IMLDR) was used to detect the rs660599 polymorphism in MMP-12 gene to explore the differences in genotype and allele frequencies of rs660599 in MMP12. **Results** There were no significant differences in rs660599 genotype distributions (GG genotype, GA genotype and AA genotype) and allele (G and A) frequency between two groups ( $P > 0.05$ ) and also in them of the constructed dominant and recessive models. **Conclusion** The rs660599 polymorphism of MMP-12 gene may not be associated with ACI in Liaoning Han population.

**Key words:** Matrix metalloproteinase 12; Atherosclerotic cerebral infarction; Gene polymorphism

脑梗死是神经内科的一种常见且严重的疾病, 发病率逐年升高, 预后不良, 严重危害全人类的身心健康。脑梗死的发病机制复杂, 尚不完全明确, 现普遍认为其是由遗传因素、环境因素等多种因素共同作用而导致的一种极其复杂的疾病<sup>[1]</sup>。随着人们对遗传基因研究的深入, 发现除了传统危险因素以外, 遗传因素在缺血性卒中的发病机制中有着重要影响。基质金属蛋白酶 12 (MMP-12) 是一种能够有效降解细胞外基质的金属蛋白酶, 近年来有研究发现 MMP-12 可能参与动脉粥样硬化、脑梗死的发生、发展过程。

目前国内外关于 MMP-12 基因多态性与脑梗死的相关性研究较少, 本研究采用改良多重连接酶反应技术检测辽宁地区汉族人群 MMP-12 基因 rs660599 基因多态性, 旨在探讨其与动脉粥样硬化性脑梗死 (ACI) 的相关性, 以期为脑梗死的发病机制及临床治疗等提供参考。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 病例组: 选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月在中国医科大学附属盛京医院神经内科确诊

为 ACI 患者,共 213 例,其中男 140 例,女 73 例;年龄(64.71 ± 10.61)岁。患者均为辽宁地区汉族人群,彼此无血缘关系,均符合全国第四届脑血管病学术会议修订的诊断标准及脑梗死病因分型(TOAST 分型)标准<sup>[2-3]</sup>,经头颅 CT、MRI 证实,并完善头部磁共振血管成像(MRA)、颈部血管超声、心脏超声等检查。排除标准:(1)出血性梗死;(2)合并肿瘤、甲状腺疾病、自身免疫性疾病,严重营养不良;(3)严重心、肝、肾功能不全;(4)脑栓塞,凝血机制异常、先天血管畸形或动脉炎导致脑梗死;(5)急慢性感染;(6)血液系统疾病;(7)既往有冠心病脑梗死病史。对照组:选取同期健康体检者 197 例,男 112 例,女 85 例;年龄(62.97 ± 8.99)岁;无心脑血管疾病病史;经头颅 CT、MRI 证实;年龄及性别与病例组均匹配;排除标准同病例组。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 所有研究对象均禁食 12 ~ 14 h,晨起抽取空腹静脉血 5 ml,其中 2 ml 加入 EDTA 抗凝, -80 °C 低温保存,用作 DNA 提取,另外 3 ml 进行血糖、血脂等生化学检验。

1.2.2 基因多态性检测 (1)基因组 DNA 提取:采用基因组 DNA 提取试剂盒(天根公司)提取外周血基因组 DNA。(2)聚合酶链反应(PCR):引物序列合成是由上海天昊生物完成。PCR 反应条件:95 °C 2 min,94 °C 20 s,65 °C 40 s(每个循环降低 0.5 °C),75 °C 1.5 min,以上步骤重复 11 次;94 °C 20 s,59 °C 30 s,72 °C 1.5 min,以上步骤重复 24 次;72 °C 延伸 2 min。(3)改良多重连接酶反应技术(IMLDR)过程:10 μl PCR 产物中加入 5 U 虾碱酶(SAP 酶)和 2 U 核酸外切酶 I(Exonuclease I),37 °C 温浴 1 h,然后 75 °C 灭活 15 min。连接酶反应体系:10 × 连接缓冲液 1 μl、高温连接酶 0.25 μl、5' 连接引物混合液(1 μmol/L)0.4 μl、3' 连接引物混合液(2 μmol/L)0.4 μl、纯化后多重 PCR 产物 2 μl、dd H<sub>2</sub>O 6 μl 混匀。连接程序:94 °C 1 min,56 °C 4 min,进行 38 次循环。连接结束后取 0.5 μl 稀释后的连接产物,与 0.5 μl 500 相对分子质量内标(Liz500 sizestandard)、9 μl 甲酰胺变性剂(Hi-Di)混匀,95 °C 变性 5 min 后上 ABI3730XL 测序仪,测序仪上收集的原始数据用 GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems, USA) 来分析。随机选取 10% 的样本进行重复验证,评价基因型结果的准确性。

1.3 统计学分析 数据处理采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。采用  $\chi^2$  检验证实 Hardy-Weinberg 平衡以确定样本的群体代表性。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,

组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以率(%)或构成比(%)表示,采用  $\chi^2$  检验;不同因素对 ACI 发病风险影响预测采用 Logistic 回归分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组一般情况比较 两组在年龄构成、性别组成、甘油三酯水平及 ApoA1 无统计学差异(*P* > 0.05);而常见的脑卒中危险因素如高血压、糖尿病、有吸烟史、饮酒史及合并高低密度脂蛋白血症等在病例组明显高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 1。

2.2 基因型分布及等位基因频率 对病例组和对照组中的每个 SNP 基因型进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,结果显示本研究群体的基因型和等位基因频率均符合遗传平衡(*P* > 0.05),群体代表性好,适合做遗传学分析。MMP-12 基因 rs660599 位点基因型分布在病例组和对照组间未见统计学差异(*P* > 0.05);对 rs660599 位点等位基因频率进行比较发现 A/G 等位基因频率在两组间未见统计学差异(*P* > 0.05)。见表 2。

2.3 rs660599 与 ACI 的相关性 进一步构建模型分析 rs660599 与 ACI 的相关性,发现在显性模型及隐性模型中,病例组的 AA + AG 基因型和 AA 基因型频率与对照组间相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3。

表 1 病例组和对照组一般情况分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

一般资料	病例组( <i>n</i> = 213)	对照组( <i>n</i> = 197)	<i>t</i> / $\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	64.714 ± 10.608	62.965 ± 8.989	1.794	0.072
性别(男/女,例)	140/73	112/85	3.403	0.065
TG(mmol/L)	2.116 ± 0.988	1.994 ± 1.067	1.202	0.514
TC(mmol/L)	5.550 ± 1.165	5.274 ± 0.994	2.570	0.010
HDL(mmol/L)	1.328 ± 0.354	1.365 ± 0.307	1.127	0.261
LDL(mmol/L)	3.674 ± 0.953	3.281 ± 0.739	4.640	0.000
ApoA1(mmol/L)	1.305 ± 0.333	1.351 ± 0.281	1.505	0.133
ApoB(mmol/L)	1.227 ± 0.317	1.092 ± 0.240	4.832	0.000
血糖(mmol/L)	10.020 ± 5.990	7.042 ± 2.378	6.519	0.000
高血压病史[例(%)]	164(77.0)	97(49.2)	34.083	0.000
糖尿病[例(%)]	98(46.0)	42(21.3)	27.744	0.000
吸烟[例(%)]	87(40.8)	45(22.8)	15.194	0.000
饮酒[例(%)]	63(29.6)	39(19.8)	5.238	0.022

注: TG:甘油三酯;TC:总胆固醇;HDL:高密度脂蛋白胆固醇;LDL:低密度脂蛋白胆固醇;ApoA1:载脂蛋白 A1;ApoB:载脂蛋白 B。

表 2 两组 rs660599 位点的基因型和等位基因频率分布 例(%)

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		GG	GA	AA	G	A
病例组	213	162(76.1)	44(20.6)	7(3.3)	368(86.4)	58(13.6)
对照组	197	151(76.6)	40(20.3)	6(3.1)	342(86.8)	52(13.2)
$\chi^2$ 值		0.030			0.031	
<i>P</i> 值		0.985			0.861	

表 3 rs660599 基因多态性与 ACI 的相关性

模型	病例组	对照组	P 值	OR 值	95% CI
显性模型 (AA + AG:GG)	51:162	46:151	0.888	1.033	0.655 ~ 1.631
隐性模型 (AA:GG + GA)	7:206	6:191	0.889	1.082	0.357 ~ 3.276

### 3 讨论

MMPs 是一类结构中含有  $Zn^{+}$  和  $Ca^{2+}$  的蛋白水解酶类,具有细胞外基质重塑和血脑屏障破坏等多方面作用。MMPs 与缺血性卒中的发病、病理生理学及临床预后均具有相关性<sup>[4]</sup>。MMP-12 作为 MMPs 中的一员,是一种最早在鼠巨噬细胞发现的金属蛋白酶,能够降解 IV 型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等多种细胞外基质 (ECM) 及弹性蛋白的作用<sup>[5]</sup>,与肿瘤的转移及侵袭、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、动脉粥样硬化及脑梗死等疾病均具有相关性<sup>[6-7]</sup>。MMP-12 基因定位于染色体 11q22.2 - 22.3, cDNA 全长 1 800 bp, 相对分子量为 54 000, 包括 10 个外显子和 9 个内含子, MMP-12 的表达水平主要发生在转录水平。MMP-12 rs660599 基因多态性意味着在 660599 位置的 A 被 G 所替代。

既往研究结果显示 MMP-12 可促进动脉粥样硬化、脑梗死的发生、发展, Johnson 等<sup>[8]</sup>认为 MMP-12 通过降解 ECM 使纤维帽承受更大的血流动力学压力,从而加剧动脉粥样硬化的进展及斑块的不稳定性;有学者认为 MMP-12 与细胞凋亡具有相关性,细胞凋亡可促进动脉粥样硬化斑块的破裂,从而促进动脉硬化的进展<sup>[9]</sup>;特异性 MMP-12 抑制剂 (RXP470.1) 可通过减少巨噬细胞的凋亡、增加纤维帽的厚度延缓动脉粥样硬化的进展<sup>[8]</sup>。Wang 等<sup>[10]</sup>研究认为人类血小板可表达 MMP-12, MMP-12 通过介导癌胚抗原相关细胞黏附分子 1 (CEACAM1) 从血小板表面的脱落促进血小板的活化,并促进 I 型胶原介导的血小板聚集、黏附和  $\alpha$ -颗粒分泌,从而促进血栓形成。除此之外, MMP-12 与脑梗死后血脑屏障的破坏具有相关性, MMP-12 的抑制剂可通过抑制紧密结合蛋白的降解及减少其他蛋白酶的內源性水平,如组织类型的质粒酶原激活剂和 MMP-9 来保护血脑屏障的完整性,而 MMP-9 也被认为是造成血脑屏障损伤的关键参与者<sup>[11]</sup>。

有研究证实 MMP-12 与颈动脉狭窄密切相关,主要在斑块进展的晚期释放<sup>[12-13]</sup>。有学者认为组蛋白脱乙酰酶 9 (HDAC9) 和 MMP-12 与易破的动脉硬化斑块及 ACI 具有相关性,而 M4 巨噬细胞可能是人类

动脉硬化斑块中 HDAC9 和 MMP-12 表达的来源<sup>[14]</sup>。多项研究证明 MMP-12-82 A/G 基因多态性与缺血性脑卒中显著相关<sup>[15-16]</sup>, Chehaibi 等<sup>[17]</sup>认为 MMP-12 基因多态性与缺血性脑卒中的相关性在糖尿病患者中更为显著, MMP-12 可能是糖尿病患者缺血性脑卒中发病的危险因素。Traylor 等<sup>[18]</sup>分析了一个大样本的全基因组关联研究数据集, 研究显示与非 ACI 的对照组相比, MMP-12 在有颈动脉硬化斑块的病例组中表达显著增加, MMP-12 rs660599 等位基因 A 在两组间差异有统计学意义, 证明 MMP-12 基因多态性与 ACI 相关。而 Li 等<sup>[19]</sup>研究显示在中国汉族人群中 MMP-12 基因多态性与劲动脉斑块的稳定性之间缺乏独立相关性。本试验对病例组和对照组分别进行了 MMP-12 rs660599 位点基因型分析, 结果示 MMP-12 rs660599 基因型频率及等位基因在两组间差异均无统计学意义, 进一步构建模型显示显性模型及隐性模型在两组间仍无统计学意义; 在调整传统的危险因素后, MMP-12 rs660599 基因多态性不增加脑梗死的发病风险。提示 MMP-12 rs660599 位点突变可能不足以构成脑梗死发病的一个独立遗传性危险因子。因既往许多研究结果均显示 MMP-12 基因多态性与缺血性卒中具有相关性, 但本研究结果与 Li 等<sup>[19]</sup>的研究结果相一致, 而与国外研究报道不一致。研究结果的差异可能与种族及地理差异相关, 其次样本量、方法等多种因素可能对结果产生干扰。

由于本研究样本量偏少, 且局限于单中心汉族人群, 所以并不能认为 MMP-12 rs660599 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死一定无相关性, 需扩大样本量、纳入不同研究背景的研究对象、开展多中心研究, 并从 mRNA、蛋白质水平进行深入研究, 从而进一步明确该基因对于 ACI 的作用机制。

### 参考文献

- [1] Markus HS. Stroke genetics [J]. Hum Mol Genet, 2011, 20 (R2): R124 - R131.
- [2] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. 中华神经精神科杂志, 1998, 21 (1): 60.
- [3] 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.
- [4] Chang JJ, Stanfill A, Pourmotabbed T. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in ischemic stroke [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (8): E1323.
- [5] Gronski TJ Jr, Martin RL, Kobayashi DK, et al. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase [J]. J Biol Chem, 1997, 272 (18): 12189 - 12194.

- and the third trimesters of singleton pregnancy[J]. Evidence Based Women's Health Journal, 2014, 4(4): 184 - 188.
- [6] Becker DA, Tang Y, Jacobs AP, et al. Sensitivity of prenatal ultrasound for detection of trisomy 18[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017, 216(1): 1 - 7.
- [7] 温弘, 陈璐, 严恺, 等. 产前诊断 Joubert 综合征一例并文献复习[J]. 浙江大学学报(医学版), 2017, 46(3): 274 - 278.
- [8] de Barros FS, Bussamra LC, Araujo Júnior E, et al. Comparison of fetal cerebellum and cisterna magna length by 2D and 3D ultrasonography between 18 and 24 weeks of pregnancy[J]. ISRN Obstet Gynecol, 2012, 2012: 286141.
- [9] 李学会, 苏建芬, 蒋小亚, 等. 经腹三维超声建立正常胎儿小脑蚓部参考值研究[J]. 临床超声医学杂志, 2017, 19(11): 762 - 765.
- [10] Reddy RH, Prashanth K, Ajit M. Significance of foetal transcerebellar diameter in foetal biometry: A pilot study[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(6): TC01 - TC04.
- [11] Koning IV, Dudink J, Groenenberg IAL, et al. Prenatal cerebellar growth trajectories and the impact of periconceptional maternal and fetal factors[J]. Hum Reprod, 2017, 32(6): 1230 - 1237.
- [12] Sherer DM, Sokolovski M, Dalloul M, et al. Nomograms of the axial fetal cerebellar hemisphere circumference and area throughout gestation[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2007, 29(1): 32 - 37.
- [13] 张浩, 尹西玉, 李晓慧. 三维超声在胎儿小脑蚓部发育异常中的应用价值[J]. 中国临床研究, 2014, 27(6): 733 - 734.
- [14] Brown RN. Reassessment of the normal fetal cisterna magna during gestation and an alternative approach to the definition of cisterna magna dilatation[J]. Fetal Diagn Ther, 2013, 34(1): 44 - 49.
- [15] Takano M, Nakata M, Oji A, et al. Utility of fetal anteroposterior to transverse cerebellar diameter ratio to exclude cerebellar hypoplasia in trisomy 18[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44(6): 1031 - 1035.
- [16] 熊毅, 关云萍, 项宇识. 小脑延髓池径线的超声检查价值及临床意义[J]. 医学综述, 2016, 22(5): 1015 - 1017.

收稿日期: 2018 - 10 - 18 修回日期: 2018 - 12 - 26 编辑: 周永彬

(上接第 1170 页)

- [6] Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages[J]. J Biol Chem, 1993, 268(32): 23824 - 23829.
- [7] Belaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, et al. Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression[J]. J Biol Chem, 1995, 270(24): 14568 - 14575.
- [8] Johnson JL, Devel L, Czarny B, et al. A selective matrix metalloproteinase-12 inhibitor retards atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-knockout mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(3): 528 - 535.
- [9] Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, et al. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death[J]. Am J Pathol, 2000, 157(4): 1259 - 1268.
- [10] Wang J, Ye YJ, Wei GQ, et al. Matrix metalloproteinase-12 facilitated platelet activation by shedding carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 486(4): 1103 - 1109.
- [11] Chelluboina B, Klopfenstein JD, Pinson DM, et al. Matrix metalloproteinase-12 induces blood-brain barrier damage after focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2015, 46(12): 3523 - 3531.
- [12] Del Porto F, Cifani N, Proietta M, et al. MMP-12 and TIMP behavior in symptomatic and asymptomatic critical carotid artery stenosis[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26(2): 334 - 338.
- [13] Arslan Y, Arslan İB, Pekçevik Y, et al. Matrix metalloproteinase levels in cervical and intracranial carotid dolichoarteriopathies[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25(9): 2153 - 2158.
- [14] Oksala NKJ, Seppälä I, Rahikainen R, et al. Synergistic expression of histone deacetylase 9 and matrix metalloproteinase 12 in M4 macrophages in advanced carotid plaques[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2017, 53(5): 632 - 640.
- [15] Zhang GQ, Li W, Guo YY, et al. MMP gene polymorphisms, MMP-1-1607 1G/2G, -519 A/G, and MMP-12-82 A/G, and ischemic stroke: A meta-analysis[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(1): 140 - 152.
- [16] Misra S, Talwar P, Kumar A, et al. Association between matrix metalloproteinase family gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of 29 studies[J]. Gene, 2018, 672: 180 - 194.
- [17] Chehaibi K, Hrira MY, Nouira S, et al. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population[J]. J Neurol Sci, 2014, 342(1/2): 107 - 113.
- [18] Traylor M, Mäkelä KM, Kilarski LL, et al. A novel MMP12 locus is associated with large artery atherosclerotic stroke using a genome-wide age-at-onset informed approach[J]. PLoS Genet, 2014, 10(7): e1004469.
- [19] Li WL, Jin XP, Zhou YL, et al. Lack of independent relationship between the MMP-12 gene polymorphism and carotid plaque susceptibility in the Chinese Han population[J]. Vasc Med, 2012, 17(5): 310 - 316.

收稿日期: 2019 - 01 - 04 修回日期: 2019 - 01 - 30 编辑: 周永彬