短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1680-03

MMP3 -1171 5A/6A 位点基因多态性与 COPD 严重程度的关系

吴 航,况九龙 (330006 江西 南昌,南昌大学第二附属医院呼吸科)

[摘要] **目的** 探讨 MMP2 和 MMP3 基因多态性与 COPD 易感性的关系。**方法** 用聚合酶链反应限制性片段长度多态性方法检测 80 例健康人和 109 例 COPD 患者 MMP2(-735C/T)和 MMP3(-1171 5A/6A)各位点等位基因和基因型。**结果** MMP2 和 MMP3 基因型及等位基因频率分布在 COPD 组和对照组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但 MMP3 6A/6A 基因型在Ⅲ~Ⅳ级 COPD 患者中出现频率较高,与重度、极重度 COPD 的发病风险相关,*OR* 值为 2.677(1.177~6.088)。**结论** MMP3(-1171 5A/6A)位点 6A/6A 基因型可能与重度、极重度 COPD 的发病风险相关联,MMP2(-735C/T)位点基因多态性与 COPD 易感性无关。

[关键词] 慢性阻塞性肺病;MMP2-735C/T;MMP3-1171 5A/6A;基因多态性
[中图法分类号] R363.25;R394.3;R563.802 [文献标志码] A

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)是一种气流受限不完全可逆的肺部慢性疾病,气道炎症、重构以及肺实质的损伤是其主要特征。基质金属蛋白酶(MMPs)能分解肺组织内细胞外基质而引起气管壁损伤、修复、重塑和管腔狭窄,在 COPD 的发生中起着相当重要的作用,其基因多态性与 COPD 发生的关系近年来也得到了广泛研究。MMP2 和 MMP3 的表达水平在 COPD 患者中都有增加,参与了肺组织的重构及肺血管的重构过程,与肺气肿、肺癌以及其他肺疾病的介导密切相关。MMP2 基因启动子区存在-735C/T 基因多态性位点,研究发现该位点 C 等位基因能促进 MMP2 的表达增加,与肺癌的发生风险密切相关[1]。MMP3 存在-1171 5A/6A 位点,通过 NF-κB 对不同等位基因的作用导致其 6A 等位基因比 5A 等位基因转录活性低,6A/6A 基因型 MMP3 转录活性更低[2]。研究显示 6A 等位基因频率和 6A/6A 基因型与 COPD 患者 FEV1 的下降有关[3]。本研究通过对中国江西 189 例汉族人 MMP2 和 MMP3 基因多态性与 COPD 易感性的相关研究,以期能筛选出 COPD 的易感基因,从探索 COPD 遗传机制方面出发,为进一步研究 COPD 的早期预防和治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

COPD 组:收集 2010-2011 年南昌大学第一附属医院、第二附属医院及省人民医院门诊或住院已经确诊的江西籍汉族 COPD 患者 109 例,年龄 55~82(66.9±6.9)岁,经问卷调查了解患者病史、吸烟史,并行体检、X 线胸片检查、基础肺功能和舒张实验测定了解患者肺部及全身情况。并按照 GOLD 分级标准对病例组按严重程度进行分级,其中Ⅰ~Ⅱ级 COPD 患者 36 名,Ⅲ~Ⅳ级 COPD 患者 73 名。对照组:健康对照 80 名,年龄 50~82(66.8±8.0)岁,均为江西籍汉族非亲缘个体。研究对象均签署知情同意书,并经医院伦理委员会批准。2 组均无间质性肺疾病、肺结核、哮喘等呼吸系统疾病及心脏病病史。2 组年龄、性别分布以及吸烟史比较差异均无统计学意义($P>0.05$),2 组 FEV1 占预计值% 及 FEV1/FEVC% 差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 COPD 组与对照组一般情况比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	吸烟史(有/无)	FEV1 占预计值(%)	FEV1/FEVC(%)
COPD 组	109	89/20	66.9±6.9	67/42	40.49±12.81	48.13±9.85
对照组	80	58/22	66.8±8.0	43/37	87.11±11.06	84.91±8.08
P 值		0.14	0.94	0.29	<0.01	<0.01

FEV1 占预计值%:第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比;FEV1/FVC:第 1 秒用力呼气容积占用力肺活量百分比

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 所有受试对象抽取外周静脉血 5 ml,分离出血细胞后存于-80°冰箱待用,用人血液基因组提取试剂盒(购自北京全式金生物技术有限公司)提取抗凝血细胞中基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增目的片段 PCR 反应体系为 25 μl,包括:12.5 μl PCR MasterMix(购自北京天根生物科技有限公司,包含 *Taq*DNA 聚合酶、dNTPs、$MgCl_2$、反应缓冲液、反应增强剂及稳定剂),基因组 DNA 1 μl(浓度为 100 ng/μl),上、下游引物各 0.8 μl(浓度为 100 ng/μl),去离子水 9.9 μl。引物由上海捷瑞生物有限公司合成:-735C/T MMP2 位点上游引物 5′-GGATTCT-TGGCTTGGCGCAGGA-3′,下游引物 5′-GGGGGCTGGGTAAAAT-GAGGCTG-3′,产物长度 391 bp;-1171 5A/6A MMP3 位点上游引物 5′-CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT-3′,下游引物 5′-GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGGAAAGA-3′,产物长度 129 bp。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,然后 94 ℃变

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2008BAI68B00)
[通信作者] 况九龙,E-mail:kuangjl2004@yahoo.com.cn

性 30 s,62 ℃退火(MMP2 -735C/T)或 66 ℃退火(MMP3 -1171 5A/6A)35 s,72 ℃延伸 45 s,共 35 个循环后 72 ℃总延伸 10 min。PCR 扩增完成后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳判定扩增是否成功。

1.2.3 酶切 PCR 扩增产物判断基因型 各扩增产物分别经 *Hinf* Ⅰ(MMP2 -735C/T)、Tth111I(MMP3 -1171 5A/6A)限制性内切酶(限制性内切酶均购自 Fermentas 公司)于 37 ℃水浴 4 h 后取出放入 65 ℃电热恒温水浴箱 30 min 以中止酶切反应。将酶切产物于 4% 的琼脂凝胶下电泳,紫外灯下观察结果并判断基因型。

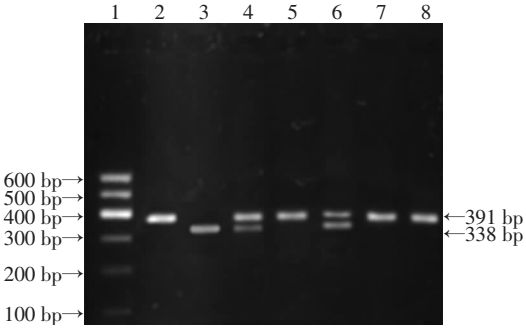
1.3 统计学处理

用 SPSS 18.0 统计软件,研究人群以 Hardy-Weinberg 遗传平衡法检验各组基因频率是否具有群体代表性,临床计量资料采用两样本 t 检验,计数资料用 χ^2 检验, 基因多态性优势比(*OR*)和 95% 可信区间(*CI*)采用 Logistic 回归分析。

2 结果

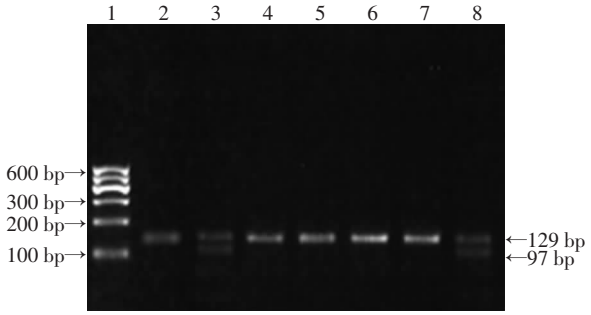
2.1 MMP2 -735C/T 和 MMP3 -1171 5A/6A 各基因型检测结果

MMP2 -735C/T 的 PCR 产物为 391 bp,酶切后 C/C 基因型为 391 bp,C/T 基因型为 391、338 bp 和 53 bp,T/T 基因型为 338 bp 和 53 bp(图 1);MMP3 -1171 5A/6A 的 PCR 产物为 129 bp,酶切后 6A/6A 基因型为 129 bp,5A/6A 基因型为 129、97、32 bp,所有研究对象中未见 5A/5A 基因型(图 2)。



1:DNA 标准;2:PCR 产物;3:T/T 型;4、6:C/T 型;5、7、8:C/C 型

图 1 MMP2 -735C/T 基因 PCR 产物及酶切产物电泳图



1:DNA 标准;2: PCR 产物;3、8:5A/6A 型;4~7:6A/6A 型

图 2 MMP3 -1171 5A/6A 基因 PCR 产物及酶切产物电泳图

2.2 MMP2 和 MMP3 各位点基因型及等位基因频率分布

MMP2 和 MMP3 位点中 COPD 组、对照组及总人数(2 组人数总和)中的各种基因型的分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,P 值均 >0.05,说明本研究人群具有群体代表性。

MMP2(-735C/T)基因型在 2 组中分布:COPD 组 CC 基因型及 C 等位基因频率虽略高于对照组,但 2 组基因型及等位基因频率分布差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。C/C 基因型及 C 等位基因与 COPD 的发病风险亦无相关,见表 2。

MMP3(-1171 5A/6A)基因型在 2 组中分布:COPD 组 6A/6A 基因型及 6A 等位基因频率虽略高于对照组,但 2 组基因型及等位基因频率分布差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。6A/6A 基因型及 6A 等位基因与 COPD 的发病风险亦无相关,见表 2。

表 2 各位点基因型和等位基因频率在 COPD 组和对照组中分布情况

基因位点	基因型/等位基因	COPD 组例数(%)	对照组例数(%)	χ^2	P	*OR*(95% *CI*)[a]
MMP2 -735C/T	基因型					
	T/T	6 (5.5)	3(3.8)			1.000
	C/T	32 (29.4)	31(38.8)	0.80	0.37	0.52(0.12~2.25)
	C/C	71(65.1)	46(57.5)	0.13	0.72	0.77(0.18~3.24)
	T/T+C/T	38(34.9)	34(42.5)			1.000
	C/C	71(65.1)	46(57.5)	1.14	0.29	1.38(0.76~2.50)
	等位基因					
	T	44(20.2)	37(23.1)			1.000
	C	174(79.8)	123(76.9)	0.47	0.49	1.19(0.73~1.95)
MMP3 -1171 5A/6A	基因型					
	5A/6A	49(45.0)	42(52.5)			1.000
	6A/6A	60(55.0)	38(47.5)	1.05	0.31	1.35(0.76~2.41)
	等位基因					
	5A	49(22.5)	42(26.3)			1.000
	6A	169(77.5)	118(73.7)	0.72	0.40	1.23(0.76~1.97)

a:以年龄、性别、吸烟等为自变量的 Logistic 回归分析

2.3 各位点基因型分布与不同严重程度 COPD 发病风险的关联

MMP3 -1171 5A/6A 位点的 6A/6A 基因型在 COPD 患者Ⅲ~Ⅳ级较Ⅰ~Ⅱ级中出现频率更高,与重度、极重度 COPD 的发病风险相关,*OR* 值为 2.677(1.177~6.088);MMP2 -735C/T位点 C/C 基因型在 COPD 患者Ⅰ~Ⅱ级和Ⅲ~Ⅳ级中出现频率较接近,与不同严重程度 COPD 患者发病风险无明显关联,见表 3。

表 3 各位点不同基因型与 COPD 疾病严重程度的风险关联

基因	基因型	Ⅰ~Ⅱ级 COPD 例数(%)	Ⅲ~Ⅳ级 COPD 例数(%)	*OR*(95% *CI*)[a]
MMP2 -735C/T	T/T+C/T	12 (33.3)	26 (35.6)	
	C/C	24 (66.7)	47 (64.4)	0.904(0.389~2.099)
MMP3 -1171 5A/6A	5A/6A	22 (61.1)	27 (37.0)	
	6A/6A	14 (38.9)	46 (63.0)	2.677(1.177~6.088)

a:以年龄、性别、吸烟及疾病严重程度为自变量的 Logistic 回归分析

3 讨论

COPD 是一种复杂的具有多基因遗传倾向的慢性肺部疾病,其发病与多个易感基因有关。近年来大量候选基因作为 COPD 的发病机制被提出来,这些基因包括了在组织重建以及蛋白酶-抗蛋白酶平衡理论中发挥重要作用的基质金属蛋白酶(MMPs)。

MMP2基因位于人类基因组染色体16q21区域，由13个外显子和12个内含子所组成。MMP2广泛表达于肺泡巨噬细胞、肺泡壁、外周气道以及肺小动脉中，在肺组织的重构中发挥了重要作用。研究显示MMP2的表达水平在COPD患者和吸烟者中明显增加，与肺功能的损伤及肺气肿的发生相关[4]，其抑制剂能够通过抑制MMP2对细胞内T细胞活化的调节，抑制抗原特异性CD8(+)T细胞介导的肺损伤[5]。MMP2基因启动子区存在-735C/T基因多态性位点，该位点C等位基因能促进MMP2的表达增加，与肺癌的发生风险密切相关[1]。本研究发现该位点等位基因频率和基因型分布在COPD组和对照组间无统计学差异(均$P>0.05$)，其CC基因型与不同严重程度COPD发病风险亦无明显关系，未能发现MMP2 -735C/T位点基因多态性与COPD易感性相关。原因是否是该位点与其他功能位点基因多态性处于高度连锁不平衡状态，或许是与其相邻位点基因多态性有关，例如有研究曾发现MMP2 -1306 TT基因型与FEV1的下降程度相关[6]。此外，研究对象还可能存在选择性偏差，以及环境、遗传背景等因素差异的影响等，因此还有待于扩大样本的进一步研究。

MMP3又称间质溶素-1，位于人基因染色体11q22区域，能广泛降解细胞外基质蛋白和细胞分子，并引起其他MMPs的活化。MMP3能介导急性肺损伤的发生[7]，且其基因多态性与COPD发生密切相关的α1-抗胰蛋白酶缺乏的气体迁移率有关[8]。Ziora等[9]发现COPD患者痰中MMP3的表达水平以及MMP3/TIMP2率与气道阻塞情况和FEV1呈负相关，认为MMP3可能作用于COPD的发病机制。MMP3基因启动子区1171位点存在5A/6A基因多态性，大量研究发现该位点基因多态性与肺癌、动脉粥样硬化以及心肌梗死等的发病相关[10-12]。研究显示通过NF-κB对不同等位基因的作用导致MMP3 -1171 6A等位基因比5A等位基因转录活性低，6A/6A基因型MMP3转录活性更低[2]。与其他基因型相比6A/6A降解细胞外基质的能力可能更弱，更易诱导细胞外基质更快沉积从而导致气道重构，引起阻塞、管腔狭窄以及气流受限。本研究发现江西籍汉族人COPD患者与健康对照组组间MMP3基因型分布及等位基因频率分布差异无统计学意义(均$P>0.05$)，但6A/6A基因型与重度、极重度COPD的发病风险相关，与Santus等[3]发现的6A/6A基因型与FEV1下降有关的研究存在一致性。这种在不同严重程度的COPD患者中基因型频率分布的差异进一步表明6A/6A基因型可能更易引起细胞外基质沉积，导致气道重构及严重的气流受限。

从基因水平探索MMPs与COPD发生的关系，能为疾病的诊断及预防提供更多的理论支持。尽管我们的研究未能发现COPD患者与健康对照组间MMP2、MMP3基因型分布及等位基因频率分布差异存在统计学意义，但MMP3 -1171 5A/6A位点6A/6A基因型与重度、极重度COPD患者发病风险的关系也为进一步探索MMPs与COPD疾病的研究提供了新的方向。

参考文献：

[1] Zhou Y, Yu C, Miao X, *et al*. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(6): 1117-1121.

[2] Souslova V, Townsend P A, Mann J, *et al*. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-3 gene by transcription factor NF kappaB [J]. PLoS ONE, 2010, 5(3): e9902.

[3] Santus P, Casanova F, Biondi M L, *et al*. Stromelysin-1 polymorphism as a new potential risk factor in progression of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2009, 71(1): 15-20.

[4] Baraldo S, Bazzan E, Zanin M E, *et al*. Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression[J]. Chest, 2007, 132(6): 1733-1740.

[5] Benson H L, Mobashery S, Chang M, *et al*. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 700-708.

[6] van-Diemen C C, Postma D S, Siedlinski M, *et al*. Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts[J]. Respir Res, 2011, 12: 57.

[7] Warner R L, Beltran L, Younkin E M, *et al*. Role of stromelysin 1 and gelatinase B in experimental acute lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(5): 537-544.

[8] McAloon C J, Wood A M, Gough S C, *et al*. Matrix metalloprotease polymorphisms are associated with gas transfer in alpha 1 antitrypsin deficiency[J]. Ther Adv Respir Dis, 2009, 3(1): 23-30.

[9] Ziora D, Dworniczak S, Kozielski J. Induced sputum metalloproteinases and their inhibitors in relation to exhaled nitrogen oxide and sputum nitric oxides and other inflammatory cytokines in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59 (Suppl 6): 809-817.

[10] Sun T, Gao Y, Tan W, *et al*. Haplotypes in matrix metalloproteinase gene cluster on chromosome 11q22 contribute to the risk of lung cancer development and progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (23): 7009-7017.

[11] Djuric T, Zivkovic M, Radak D, *et al*. Association of MMP-3 5A/6A gene polymorphism with susceptibility to carotid atherosclerosis[J]. Clin Biochem, 2008, 41(16/17): 1326-1329.

[12] Wang J, Xu D, Wu X, *et al*. Polymorphisms of matrix metalloproteinases in myocardial infarction: a meta-analysis[J]. Heart, 2011, 97 (19): 1542-1546.

(**收稿**:2012-02-02;**修回**:2012-05-03)

(编辑 邓强庭)