

## 河南新乡地区汉族群体 MMPs 基因启动子区 5 个 SNPs 与 CHF 发病风险关联性研究\*

张倩 郭利伟 刘亚静 张咏鹤 徐光华 黄艳梅<sup>△</sup>  
(新乡医学院法医学院, 新乡 453003)

**摘要 目的** 探讨河南新乡地区汉族群体基质金属蛋白酶基因启动子区 rs2285053、rs11225395、rs225207、rs243865 及 rs11568818 这 5 个单核苷酸多态性(SNPs)与心力衰竭(CHF)发病的相关性。**方法** 知情同意情况下,采集 160 例 CHF 患者(观察组)和 186 例健康体检者(对照组)外周静脉血提取基因组 DNA,限制性扩增片段长度多态性方法对 5 个 SNPs 进行分型,运用 SHEsis 软件分析数据。**结果** 与对照组相比,MMPs 基因 rs2285053 位点 T 等位基因的频率在观察组中显著降低( $P < 0.05$ ); rs11225395 位点的 T 等位基因和 TT 基因型频率在观察组中也显著降低( $P < 0.05$ ),  $OR = 1.966 [95\% CI(1.236 \sim 3.129)]$ ; 而观察组中 rs225207 的 G 等位基因频率显著增加( $P < 0.05$ ),  $OR = 0.499 [95\% CI(0.320 \sim 3.799)]$ ; rs2285053、rs11225395、rs225207 组成的单体型 CCG 在观察组中的频率增高( $P < 0.05$ )。**结论** rs11225395 和 rs2285053 位点的等位基因 T 有可能降低 CHF 的患病风险;而 rs225207 位点的等位基因 G 及单体型 CCG 可能会增加 CHF 的患病风险。

**关键词** 慢性充血性心力衰竭;基质金属蛋白酶;单核苷酸多态性;限制性扩增片段长度多态性

中图分类号:R541.6 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)02-048-05

### Correlation of MMPs promoter region five single nucleotide polymorphisms with genetic susceptibility of CHF in Han population from Xinxiang city of Henan province

ZHANG Qian, GUO Liwei, LIU Yajing, ZHANG Yonghe, XU Guanghua, HUANG Yanmei<sup>△</sup>  
(Department of Forensic Genetics of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

**Abstract: Objective** To assess the relationship between 5 SNPs including rs2285053, rs11225395, rs225207, rs243865 and rs11568818 at the promoter region of matrix metalloproteinases (MMPs) genes and the risk of chronic heart failure (CHF) in Han population from Xinxiang city of Henan province. **Methods** 5 SNPs sites of 160 CHF patients (observation group) and 186 healthy individuals (control group) were genotyped by PCR-RFLP methods. Then the data was analyzed by SHEsis software. **Results** The frequency of T allele of rs11225395 of patients in the observation group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The frequency of T allele and TT genotype of rs11225395 of patients in the observation group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ )  $OR = 1.96 [95\% CI(1.236 \sim 3.129)]$ . The G allele of rs225207 of patients in the observation group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ),  $OR = 0.499 [95\% CI(0.320 \sim 3.799)]$ . The haplotype CCG consisting of rs2285053, rs11225395 and rs2285053 of patients in observation group was higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** T allele of rs2285053 and rs11225395, G allele of rs225207 and the haplotype CCG may decrease the risk of CHF.

**Keywords:** Matrix metalloproteinases; Chronic heart failure; Single nucleotide polymorphism; Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism

\* [基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(201403131); 河南省教育科学“十二五”规划立项重点课题(2013 - JKGHB - 0035); 新乡医学院大学生科研创新计划课题(2014 - 21)

△ [通信作者] 黄艳梅 E-mail: hym\_cn@ hotmail. com

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一组可以参与到结缔组织的破坏与重构的酶家族。目前人们已经进行了大量关于 MMPs 基因多态性的研究, 其中包括动脉粥样硬化、脑栓塞和肿瘤等, 但关于心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 方面的研究比较少<sup>[1-2]</sup>。我们前期的研究工作发现, rs243866 位点 A 等位基因可降低 MMP-2 转录活性, 从而可以降低 CHF 的发生易感性<sup>[3]</sup>; 而 rs17576 位点 AG 基因型可以引致精氨酸至谷氨酰胺的氨基酸变化, 进而增加个体 CHF 发病风险<sup>[4]</sup>; 此外, rs1799750 位点的 1G 等位基因以及单体型 1G6A 会降低个体 CHF 发病风险<sup>[5]</sup>。虽然在人类的心肌组织中存在着多种 MMPs, 但当 CHF 发生时并不是每一种 MMPs 都会升高。我们查阅中国人类基因组单体型图计划 (简称 HapMap 计划) 数据库以及美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的 dbSNP 数据库又筛选出 MMPs 基因启动子区 rs225207、rs2285053、rs243865、rs11225395 及 rs11568818 5 个 SNPs, 探讨与 CHF 发病风险的关联性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择收治到新乡医学院第三附属医院的 160 例慢性 CHF 患者为观察组, 其中男 84 例, 女 76 例, 年龄 58 ~ 79 岁, 平均年龄 (61.1 ± 8.5) 岁。以同期住院的非 CHF 心脏病患者 (同时除去其患有感染性、血液性、肝肾功能不全、恶性肿瘤等疾病) 186 例为对照组, 其中男 97 例, 女 89 例, 其年龄 52 岁 ~ 78 岁, 平均年龄 (60.7 ± 8.7) 岁, 所有对象知情同意并签署同意书, 且均为三代以上居住在河南新乡地区。

### 1.2 主要仪器与试剂

凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司, 美国)、Qubit 核酸蛋白定量分析试剂盒 (Invitrogen 生物公司)、PCR 仪 (Biometra 公司, 德国)、台式高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 德国)、Taq 酶 (上海生物工程公司)、SNPs 位点扩增引物 (Invitrogen 生物公司)、多功能电泳仪 (Phannacia 公司, 瑞典)、限制性内切酶 Hinf I、Xsp I、EcoR I、Bgl II。

### 1.3 方法

**1.3.1 资料收集** 所有研究对象统一填写调查表, 再由监督人员核校每一份调查表, 确保信息无误。

**1.3.2 生化指标测定** 空腹 10 h 过夜后, 清晨 6:00 取受试者外周静脉血 8 ml, 其中 3 ml 用于血脂等生化指标测定、5 ml 用于基因组 DNA 提取。采用现行标准化方法进行血生化指标检测, 由新乡医学院第三附属医院检验科完成并进行质量控制。

**1.3.3 外周血基因组 DNA 的提取与定量分析** 采用有机酚/氯仿法提取外周血基因组 DNA, Qubit 核酸蛋白定量分析试剂盒检测所提取 DNA 的质以及量, 然后保存到 -20℃ 冰箱备用。

**1.3.4 5 个 SNPs 目的片段 PCR 反应体系** 包含 10 × Buffer, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L 引物, 50 ng ~ 100 ng DNA 模版, 1U Taq Plus DNA 聚合酶, 总体积共为 25 μl。热循环参数: 95℃ 预变性 2 min 后, 94℃ 变性 45 s, 退火温度变异范围 (见表 1) 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共计 32 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

表 1 MMPs 基因 5 个 SNPs 位点基本信息

SNPs	引物序列	退火温度	限制性内切酶
rs2285053	F: GGATTCTTGGCTTGGCCAGGA R: GGGGCTGGTAAAATGAGGCTG	61℃	Hinf I
rs225207	F: GATACGTTCTTACAGAAGGC R: GACAAATCATCTTCATCACC	58℃	Xsp I
rs243865	F: CTTCTAGGCTGGTCTTACTGA R: CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGCT	55℃	Xsp I
rs11568818	F: TGGTACCATAATGCTCTGAATG R: TCGTTATTGGCAGGAAGCACACAATGAATT	55℃	EcoR I
rs11225395	F: GCCAGAGACTCAAGTGGGAGACTACCATGCAGATC R: TTATGATTGCCAGACATTTC	58℃	Bag II

**1.3.5 5 个 SNPs 等位基因及基因型分型** 采用限制性内切酶片段长度多态性 (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术对 SNPs 进行分型。酶切反应总体积 10; 其中包含 PCR 扩增产物 5.0, 相应的内切酶 1U, 1 × 内切酶缓冲液, 最后超纯水补充, 然后 37℃ 水浴 16h; 6% 聚丙烯酰胺凝胶 (polyacryamide gel electrophoresis, PAGE) 电泳检测酶切产物取 3.0 电泳上样, 同时加入 PCR 扩增产物 (未经酶切) 以及 500bp DNA Marker 作为内参, 恒压 400V, 1h (各 SNPs 所用限制性内切酶见表 1), 硝酸银染色。

### 1.4 统计学方法

运用 SHEsis 软件比较每个 SNP 点在观察组与对照组间频率以及频数分布, OR 和 95% 可信区间

(95% CI)、样本的群体代表性应用 Hardy-Weinberg 平衡表示,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MMPs 基因型分布 Hardy-Weinberg 平衡

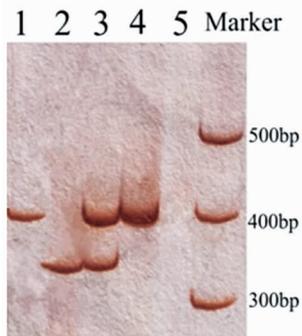
MMPs 基因启动区 5 个 SNP 位点各基因型在对照组中 Hardy-Weinberg 平衡结果表明,rs2285053、rs11225395 及 rs225207 这 3 个 SNP 的基因型频率在观察组和对照组人群中符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.05$ ),其中 rs2285053 位点  $\chi^2 = 0.05, P = 0.95$ ;rs11225395 位点  $\chi^2 = 0.12, P = 0.88$ ;rs225207 位点  $\chi^2 = 0.09, P = 0.90$ 。本文中 rs243865 位点基因型全部为 CC,rs11568818 位点基因型全部为 AA,可能该位点在河南汉族人群中无多态性,因此不予分析。

### 2.2 MMPs 基因启动子区 5 个 SNPs 与 CHF 的相关性分析

**2.2.1 5 个 SNPs 分型及 PCR-RFLP 结果** 本研究根据电泳图谱出现条带判定基因型。本次研究中 rs243865、rs11568818 未表现出多态性。而 rs2285053、rs11225395、rs225207 这 3 个 SNPs 位点等位基因电泳图谱如图 1-3。5 个 SNPs 位点引入的酶切位点及内切酶。见表 2。

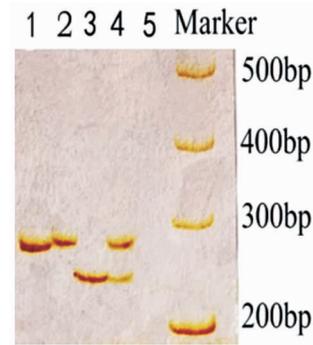
表 2 MMPs 上 5 个 SNPs 位点等位基因及内切酶

SNPs	无酶切位点及等位基因	酶切后片段大小及等位基因	限制性内切酶
rs2285053	391 bp C	338 bp 53 bp T	HinI
rs243865	192 bp C	162 bp 26 bp T	XspI
rs225207	445 bp G	244 bp 201 bp A	XspI
rs11225395	255 bp C	120 bp 30 bp T	Bag II
rs11568818	150 bp A	120 bp 30 bp G	EcoRI



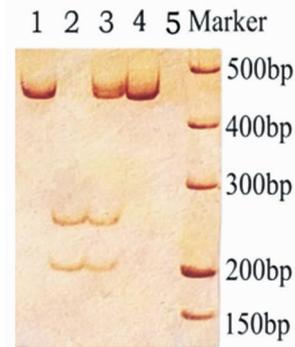
注:1 PCR 产物;2 TT;3 CT;4 CC;5 空白对照

图 1 rs2285053 等位基因 PAGE 电泳图谱



注:1 PCR 产物;2 TT;3 CC;4 CT;5 空白对照

图 2 rs11225395 等位基因 PAGE 电泳图谱



注:1 PCR 产物;2 AA;3 AG;4 GG;5 空白对照

图 3 rs225207 等位基因 PAGE 电泳图谱

**2.2.2 5 个 SNPs 等位基因和基因型频率** MMPs 基因启动子区 5 个 SNPs 的多态性与 CHF 的相关性如表 3、4。结果显示观察组 rs225207 的等位基因 A 的频率显著降低( $P < 0.05$ ),rs2285053 位点 T 等位基因两组比较有统计学意义( $P < 0.05$ );AA 基因型在两组中差异有统计学意义( $P < 0.05$ );rs11225395 位点的 T 等位基因的频率在观察组明显降低( $P < 0.05$ ),TT 基因型频率降低( $P < 0.05$ );rs243865 及 rs11568818 这两个 SNPs 位点的在两组基因型完全一样没有多态性,在此不予分析。

**2.2.3 MMPs 上 3 个 SNPs 位点单倍型** 用 SHEsis 软件统计分析,推断出 rs2285053、rs11225395 及 rs225207 构建成 8 种单体型,通过进一步比较,结果显示,单体型 CCG 的频率在两组间存在显著差异( $P < 0.05$ )。见表 5。

表 3 MMPs 基因启动区 5 个 SNPs 位点基因型在两组中的频率分布 (n/%)

SNPs	rs2285053			rs11225395			rs225207		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AG	GG
观察组	120(75.0)	33(20.6)	7(4.4)	71(44.4)	81(50.6)	8(5.0)	14(8.9)	80(50.0)	66(41.1)
对照组	105(66.0)	45(28.3)	9(5.7)	45(25.9)	104(56.0)	31(18.1)	48(25.8)	94(50.5)	18(23.7)
$\chi^2$	3.723			9.529			9.853		
<i>P</i>	0.155			0.009*			0.007*		
OR(95%CI)	1.941(1.013~3.721)			2.012(1.695~3.948)			2.076(1.583~4.422)		

注:与对照组相比, \* *P* < 0.05

表 4 MMPs 基因启动区 5 个 SNPs 位点等位基因在两组中的频率分布 (n/%)

SNPs	rs2285053		rs11225395		rs225207	
	C	T	C	T	A	G
观察组	273(85.3)	47(14.7)	223(67.9)	97(30.3)	109(34.1)	211(65.9)
对照组	298(80.1)	74(19.8)	201(54.0)	171(46.0)	189(50.8)	183(49.2)
$\chi^2$	4.09		8.264		9.508	
<i>P</i>	0.043*		0.004*		0.002*	
OR(95%CI)	0.683(0.367~1.435)		1.966(1.236~3.129)		0.499(0.320~3.779)	

注:与对照组相比, \* *P* < 0.05

表 5 MMPs 基因启动区 3 个 SNPs 位点单倍型分析 (%)

单体型	CCG	CCA	CTG	CTA	TTA	TCA	TCG	TTG
对照组	20.6	22.6	19.2	19.6	5.2	5.1	5.2	2.5
观察组	42.5	16.6	15.4	12.6	3.2	3.1	6.2	0.0
$\chi^2$	15.955	1.449	0.468	1.595	0.449	0.43	0.088	1.684
<i>P</i>	6.55e-005*	0.229	0.494	0.207	0.503	0.512	0.767	0.194
OR(95%CI)	2.854(1.690~4.820)	0.683(0.367~1.273)	0.766(0.357~1.646)	0.594(0.263~1.342)	0.597(0.130~2.743)	0.599(0.127~2.819)	1.197(0.364~3.939)	0.001(0.000~0.019)

注:与对照组相比, \* *P* < 0.05

### 3 讨论

CHF 是常见的临床综合症,是目前心血管系统疾病患者生活质量低下及死亡的重要原因之一<sup>[6]</sup>。CHF 病因和发病机制仍在进一步的研究当中,其中基因多态性已成为研究热点<sup>[7]</sup>。MMPs 是一类 ECM 降解所必需的蛋白水解酶,可以参与到多种疾病的形成当中,尤其是心血管疾病。随着临床和实验室研究的不断深入,已发现 MMPs 与多种心血管疾病的发生、发展有密切关联,并且其受基因调控<sup>[8]</sup>。

MMP-2 几乎存在于所有心肌细胞,研究表明 MMP-2 可降解肌钙蛋白,损伤心肌收缩力。CHF 患者 MMP-2 水平的改变与死亡率有着直接关系<sup>[9]</sup>,故针对如何改变 MMP-2 活性从而影响 CHF 发病率的研究也越来越多。本文结果显示,在河南

新乡地区汉族群体中观察组 rs2285053 位点 T 等位基因的频率与对照组相比降低。分析其原因可能是 rs2285053 位点 C/T 等位基因的改变,可以使基因启动子区的 Sp1 位点的特异性序列变化,进而影响 MMP-2 基因转录水平<sup>[10]</sup>,减少损害心肌肌原纤维的作用,降低个体 CHF 危险患病风险。

研究证实 MMP-8 的 ApoE 基因敲除后会减少小鼠动脉粥样硬化的程度,降低血清血管紧张素 II 水平,并在病变血管处细胞黏附分子-1 表达减少<sup>[11]</sup>。本文得出观察组 rs11225395 位点的 T 等位基因的频率与对照组相比降低 (*P* < 0.05), *OR* = 1.966,提示 T 等位基因降低个体 CHF 危险。基因功能学提示 rs11225395 基因位于 MMP-8 基因第 2 外显子,C-T 的替换可引起 MMP-8 的前肽结构中第 87 位氨基酸谷氨酸转变为赖氨酸,从而使得 MMP-8 的转录活性增高 2~3 倍,使得细胞外基质

分解明显增加<sup>[12]</sup>,从而降低了心力衰竭的易感性。

研究表明,MMP-13 在某种程度上使 MMP-2 和 MMP-9 激活,进而可以破坏 ECM 和直接损害心肌,但也可以导致纤维连接素以及胶原蛋白降解,产生抑制心肌纤维化的作用<sup>[13]</sup>。本文结果显示,观察组 rs225207 的 G 等位基因的频率与对照组相比明显增加( $P < 0.05$ )。随着 G 等位基因频率的增加,间接下调了 MMP-13 转录水平,可能增加个体 CHF 危险。

多个 SNP 可能会降低单个位点对该疾病的影响,也可能会联合诱发疾病。我们使用 SHEsis 分析 rs17860523、rs11225395 及 rs225207 之间的连锁作用,及其与河南汉族群体 CHF 之间的相关性。得出三者一共构建成 8 种单体型,各个单体型在两组频率均  $> 0.01$ ,结果显示单体型 CCG 的频率在两组中比较差异有统计意义( $P < 0.05$ ), $OR = 2.854(95\% CI = 1.690 \sim 4.820)$ ,相比单个 SNP 的研究更加有意义。说明单体型 CCG 可能是 CHF 个体的预后不良因素之一,而其他观察到的单体型可能与 CHF 个体预后没有相关性( $P > 0.05$ )。

综上所述,本文提示在河南新乡地区汉族群体中 rs225207 位点的 G 等位基因及 rs2285053、rs11225395 及 rs225207 组成的单体型 CCG 可能会增加 CHF 的患病风险;rs11225395、rs2285053 位点的 T 等位基因可能会降低 CHF 的患病风险;而 rs243865、rs11568818 这两个位点在河南新乡地区汉族群体中无多态性。

#### 参考文献:

- [1] Ravassa S, López B, Querejeta R, et al. Phenotyping of myocardial fibrosis in hypertensive patients with heart failure. Influence on clinical outcome[J]. J Hypertens, 2017, 35 (4): 853-861. DOI: 10. 1097/HJH. 0000000000001258.
- [2] Hasei J, Teramura T, Takehara T, et al. TWIST1 induces MMP3 expression through up-regulating DNA hydroxy-methylation and promotes catabolic responses in human chondrocytes[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42990. DOI: 10. 1038/srep42990.
- [3] 殷国田,赵林静,黄艳梅,等. MMP-2 基因多态性与河南汉族群体慢性充血性心力衰竭的相关性[J]. 中国老年学杂志,2014,34(1): 23-26.
- [4] 殷国田,张银珂,黄艳梅,等. 基质金属蛋白酶-9 基因多态性与河南汉族人群慢性心力衰竭的相关性[J]. 广东医学,2015,36(6): 853-856.
- [5] 马国真,刘亚静,徐光华,等. 基质金属蛋白酶基因启动区 3 个单核苷酸多态性与河南汉族群体慢性心力衰竭遗传易感性关联研究[J]. 新乡医学院学报, 2016(7): 568-571.
- [6] Dokainish H, Teo K, Zhu J, et al. Heart Failure in Africa, Asia, the Middle East and South America: The INTER-CHF study[J]. Int J Cardiol, 2016, 204: 133-141. DOI:10. 1016/j. ijcard. 2015. 11. 183.
- [7] Leung M, Wong VW, Hudson M, et al. Impact of Improved Glycemic Control on Cardiac Function in Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2016, 9 (3): e003643. DOI: 10. 1161/CIRCIMAGING. 115. 003643.
- [8] Teplyakov AT, Berezikova EN, Shilov SN, et al. Assessment of the role of matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism in the development of chronic heart failure[J]. Ter Arkh, 2015, 87(4): 8-12. DOI:10. 17116/terarkh20158748-12.
- [9] Buraczynska M, Dragan M, Buraczynska K, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) gene polymorphism and cardiovascular comorbidity in type 2 diabetes patients[J]. J Diabetes Complicat, 2015, 29 (6): 829-833. DOI:10. 1016/j. jdiacomp. 2015. 05. 004.
- [10] Vask A, Goldbergová M, Izakovicová Hollá L, et al. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease[J]. Matrix Biol, 2004, 22(7): 585-591. DOI:10. 1016/j. matbio. 2003. 10. 004.
- [11] Salminen A, strm P, Metso J, et al. Matrix metalloproteinase 8 degrades apolipoprotein A-I and reduces its cholesterol efflux capacity[J]. FASEB J, 2015, 29(4): 1435-1445. DOI:10. 1096/fj. 14-262956.
- [12] Rahimi Z, Zangeneh M, Rezaeyan A, et al. MMP-8 C-799T and MMP-8 C + 17G polymorphisms in mild and severe preeclampsia: Association between MMP-8 C-799T with susceptibility to severe preeclampsia[J]. Clin Exp Hypertens, 2018, 40(2): 175-178. DOI: 10. 1080/10641963. 2017. 1346115.
- [13] Ahram M, Mustafa E, Zaza R, et al. Differential expression and androgen regulation of microRNAs and metalloprotease 13 in breast cancer cells[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(12): 1345-1355. DOI:10. 1002/cbin. 10841.

(收稿日期 2017-11-09)

(本文编辑:石俊强)