

2 型糖尿病患者基质金属蛋白酶-12 基因多态性与缺血性卒中的相关性研究

林芳, 任阳, 冯琳, 刘伟

延安大学附属医院老年病科, 陕西省延安市 716000

摘要:目的 探讨 2 型糖尿病患者基质金属蛋白酶 12 (MMP-12) 基因多态性与缺血性卒中的相关性。方法 选择 2013 年 1 月至 2015 年 12 月在本科治疗的 217 例 2 型糖尿病合并缺血性卒中患者作为病例组, 按照 TOAST 分型结果将病例组患者分为大动脉粥样硬化性卒中 (LAA) 组 88 例和非大动脉粥样硬化性卒中 (n-LAA) 组 129 例, 选择同期在我院体检的无缺血性卒中的 2 型糖尿病患者 100 例作为对照组, 采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析 (PCR-RFLP) 法比较 MMP-12 (-82 A/G) 和 MMP-12 (-1082 A/G) 基因型多态性在各组间的差异。结果 病例组和 n-LAA 组 MMP-12 (82 A/G) 基因型和等位基因与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。LAA 组 (G/G + A/G) 基因型频率显著高于对照组 (22.73% vs 11.00%, $P = 0.031$); G 等位基因频率也高于对照组 (18.18% vs 10.05%, $P = 0.033$)。n-LAA 组 MMP-12 (-1082 A/G) 基因型和等位基因与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。病例组和 LAA 组 (G/G + A/G) 基因型频率均显著高于对照组 (33.64% vs 22.00%, $P = 0.036$; 37.50% vs 22.00%, $P = 0.020$); 两组 G 等位基因频率也均高于对照组 (25.58% vs 17.00%, $P = 0.017$; 30.68% vs 17.00%, $P = 0.002$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示 MMP-12 -82 A/G 等位基因 G 和 MMP-12 -1082 A/G 等位基因 G 均是 2 型糖尿病患者发生 LAA 的危险因素 ($OR = 1.107$, 95% CI 1.010 - 1.371, $P = 0.031$; $OR = 1.285$, 95% CI 1.142 - 1.817, $P = 0.010$)。结论 对于 2 型糖尿病患者, MMP-12 基因 -82 位点 G 等位基因和 -1082 位点 G 基因多态性与大动脉粥样硬化性卒中密切相关。

关键词: 2 型糖尿病; 缺血性卒中; 基质金属蛋白酶-12; 基因多态性

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.010

Association between matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and ischemic stroke in patients with type 2 diabetes

LIN Fang, REN Yang, FENG Lin, LIU Wei. Department of Geriatrics, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shanxi 716000, China

Corresponding author: LIN Fang, E-mail: linfang198009@163.com; LIU Wei, E-mail: 3081548@qq.com

Abstract: Objective To investigate the association between matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) gene polymorphisms and ischemic stroke in patients with type 2 diabetes. **Methods** A total of 217 patients with type 2 diabetes complicated by ischemic stroke who were treated in our department from January 2013 to December 2015 were enrolled as case group, and according to the TOAST type, they were divided into large artery atherosclerosis (LAA) group (88 patients) and non-LAA group (n-LAA group, 129 patients). A total of 100 patients with type 2 diabetes who had no ischemic stroke and underwent physical examination in our hospital during the same period of time were enrolled as control group. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was used to measure the differences in MMP-12 (-82 A/G) and MMP-12 (-1082 A/G) gene polymorphisms between groups. **Results** There were no significant differences in the frequencies of MMP-12 (82 A/G) genotypes and alleles between the case group and the control group, as well as between the n-LAA group and the control group ($P > 0.05$). Compared with the control group, the LAA group had significantly higher frequencies of (G/G + A/G) genotypes (22.73% vs 11.00%, $P = 0.031$) and G allele (18.18% vs 10.05%, $P = 0.033$). There were no significant differences in the frequencies of MMP-12 (-1082 A/G) genotypes and alleles between the n-

收稿日期: 2016-10-20; 修回日期: 2017-01-05

作者简介: 林芳 (1980-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事老年病神经方面治疗的研究。E-mail: linfang198009@163.com。

通信作者: 刘伟, 本科, 副主任医师, E-mail: 3081548@qq.com。

LAA group and the control group ($P>0.05$). Compared with the control group, the case group and the LAA group had significantly higher frequencies of (G/G + A/G) genotypes (33.64%/37.50% vs 22.00%, $P=0.036$ and $P=0.020$) and G allele (25.58%/30.68% vs 17.00%, $P=0.017$ and $P=0.002$). The multivariate logistic regression analysis showed that G allele at MMP-12 -82A/G ($OR=1.107$, 95% CI 1.010 - 1.371, $P=0.031$) and G allele at MMP-12 -1082A/G ($OR=1.285$, 95% CI 1.142 - 1.817, $P=0.010$) were risk factors for the development of LAA in patients with type 2 diabetes. **Conclusions** For patients with type 2 diabetes, gene polymorphisms of G allele in MMP-12 (-82 A/G) and MMP-12 (-1082 A/G) may be closely associated with LAA.

Key words: type 2 diabetes; ischemic stroke; matrix metalloproteinase-12; gene polymorphism

我国最新的全国公民死亡原因调查结果显示缺血性卒中已成为我国公民致死、致残最主要的疾病之一。积极做好缺血性卒中的防治工作,减少缺血性卒中的发生,对降低社会经济负担,提高我国公民健康水平均有重要意义。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在人体内广泛表达,可有效降解细胞外基质^[1,2]。有研究发现缺血性卒中患者急性期可伴随血清多种 MMPs 的升高,包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 MMP-10 等,还有些研究发现多种 MMPs 基因多态性与缺血性卒中发生密切相关^[3,4]。MMP-12 作为 MMPs 家族的一员,既往研究主要认为其参与多种肿瘤的转移,近年来有研究发现 MMP-12 可能参与动脉粥样硬化斑块的形成和进展过程^[5-7]。2 型糖尿病作为缺血性卒中的重要危险因素,尤其在动脉粥样硬化斑块的形成、发展过程中起到显著的促进作用,本研究以 2 型糖尿病患者作为主要研究对象,比较 MMP-12 基因多态性与缺血性卒中之间的关系,为脑卒中预防提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 选择 2013 年 1 月至 2015 年 12 月我科治疗的 217 例 2 型糖尿病合并缺血性卒中患者作为病例组。

入组标准:①年龄 45~80 岁;②出生并长期生活于陕西地区的汉族人;③2 型糖尿病诊断符合 2007 年《中国 2 型糖尿病防治指南》诊断标准^[8];④缺血性卒中诊断符合 2010 年《中国急性缺血性卒中诊治指南》诊断标准^[9]。

排除标准:①外伤导致的卒中;②肝、肾等重要脏器合并严重器质性病变或功能障碍;③近期服用影响凝血功能相关药物;④合并颅内或全身感染;⑤恶性肿瘤患者;⑥妊娠期妇女;⑦精神病、有意识障碍。

参照 TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke

Treatment) 分型标准^[10]将病例组患者分为大动脉粥样硬化性卒中 (large artery atherosclerosis, LAA) 88 例和非大动脉粥样硬化性卒中 (n-LAA) 组 129 例。

1.1.2 对照组 参照病例组患者的年龄和性别构成比例,选择 100 例同期于我院体检中心接受体检的 2 型糖尿病患者作为对照组,所有对照组成员已行头颅 CT 和 (或) MR 检查,排除缺血性卒中、脑出血、颅脑肿瘤及其他恶性肿瘤可能。

本研究通过本院伦理委员会审核批准,所有入组患者充分知情同意。

1.2 主要仪器与试剂

2720 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司);高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司);DY-1 稳压稳流电泳仪 (江苏省兴化市分析仪器厂);纯水和超纯水系统 (美国 Millipore 公司);人血 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技公司);所有引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.3 基因多态性检测方法

采集所清晨空腹时外周静脉血,采用氯仿饱和酚法提取基因组 DNA。应用聚合酶链反应-限制性片段多态性 (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) 法检测 MMP-12 基因多态性。MMP-12 基因多态性包括两个位点,其引物序列分别为 MMP-12 -82A/G:上游引物 5'-GAG ATA GTC AAG GGA TGA TAT CAG C-3',下游引物 5'-AAG AGC TCC AGA AGC AGT GG-3';MMP-12 1082 A/G:上游引物 5'-GGG ATA ATT TGG CTC TGG TCT TCA A-3',下游引物 5'-CCA TGG GAA CCA TAG AAA AGA-3'。PCR 反应体系 (25 μ L) 包括:10 \times Buffer 2.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L,dNTP 混合物 2 μ L,TaqDNA 聚合酶 0.25 μ L,模板 DNA 1 μ L,不足部分由灭菌蒸馏水补足。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,然后按照 95 $^{\circ}$ C 20 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s 顺序循环 30 周期,最后

72℃ 延长 3 min。MMP-1 和 MMP-9 的扩增产物分别使用限制性内切酶 Pvu II 和 Mfe I 进行酶切,酶切体系(20 μL)包括:PCR 产物 17 μL,10 × Buffer 2 μL 和内切酶 1 μL,反应条件为 37℃ 16 h,然后 65℃ 10 min 终止反应。最后取酶切产物进行电泳,紫外灯下观察并摄片。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理,本研究计量资料均服从正态分布,结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 Dunnett-*t* 检验;计数资料结果以构成百分比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。基因型分布采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。采用多因素 Logistic 回归分析法综合评价各因素与缺血性卒中间的关系。

P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本临床资料比较

病例组与对照组比较,两组患者在年龄、性别、体重指数(BWI)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及空腹血糖(FBG)等方面差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。而在吸烟(46.54% vs 33.00%)和高血压(29.03% vs 14.00%)两方面,两组间差异均有统计学意义($\chi^2 = 5.146, P = 0.023; \chi^2 = 8.411, P = 0.004$)。将病例组分为 LAA 组和 n-LAA 组后,两个亚组分别与对照组比较,各项参数中同样仅吸烟和高血压 2 项与对照组相比差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 患者基本临床资料比较

指标	病例组(<i>n</i> = 217)	病例组(<i>n</i> = 217)		对照组(<i>n</i> = 100)
		LAA 组(<i>n</i> = 88)	n-LAA 组(<i>n</i> = 129)	
年龄(岁)	61.24 ± 7.46	61.83 ± 7.58	60.83 ± 7.19	61.82 ± 7.81
男性 <i>n</i> (%)	142(65.44)	59(67.05)	83(64.34)	66(66.00)
吸烟 <i>n</i> (%)	101(46.54) ^a	42(47.73) ^a	59(45.74) ^a	33(33.00)
高血压 <i>n</i> (%)	63(29.03) ^a	28(31.82) ^a	35(27.13) ^a	14(14.00)
BWI (kg/m ²)	24.11 ± 3.71	24.32 ± 3.60	23.97 ± 3.82	23.91 ± 3.20
SBP (mmHg)	136.15 ± 18.21	138.32 ± 19.02	134.67 ± 17.52	136.32 ± 19.38
DBP (mmHg)	87.62 ± 12.46	88.39 ± 12.88	87.09 ± 12.03	87.93 ± 11.59
TG (mmol/L)	1.54 ± 0.62	1.58 ± 0.56	1.51 ± 0.66	1.56 ± 0.70
TC (mmol/L)	4.11 ± 0.97	3.97 ± 1.04	4.21 ± 0.93	4.00 ± 1.06
LDL-C (mmol/L)	2.65 ± 0.82 ^a	2.64 ± 0.80	2.66 ± 0.83	2.40 ± 0.92
HDL-C (mmol/L)	1.19 ± 0.21	1.18 ± 0.22	1.20 ± 0.20	1.18 ± 0.25
FBG (mmol/L)	4.86 ± 1.38	4.93 ± 1.41	4.81 ± 1.36	4.78 ± 1.55

注:a 为与对照组比较,*P* < 0.05。

2.2 基因型和等位基因分布

病例组 MMP-12 (-82A/G) 基因型和等位基因与对照组比较均无统计学意义。将病例组分为 LAA 组和 n-LAA 组后分别与对照组进行比较,LAA 组(G/G + A/G)基因型频率显著高于对照组(*P* = 0.031);G 等位基因频率显著高于对照组(*P* = 0.033)。n-LAA 组基因型和等位基因与对照组比较差异均无统计学意义。对于 MMP-12 基因 -1082 位点,病例组和 LAA 组(G/G + A/G)基因型频率均显著高于对照组(*P* = 0.036; *P* = 0.020);G 等位基因频率显著高于对照组(*P* = 0.017; *P* =

0.002);n-LAA 组基因型和等位基因与对照组比较差异均无统一学意义。见表 2。

2.3 多因素 Logistic 回归分析

采用二分类多因素 Logistic 后退逐步回归法分析,结果显示对于 2 型糖尿病患者,除吸烟和高血压外,MMP-12 基因-82 位点等位基因 G (*OR* = 1.107, 95% *CI* 1.010 - 1.371, *P* = 0.031)和 -1082 位点等位基因 G (*OR* = 1.285, 95% *CI* 1.142 - 1.817, *P* = 0.010)均是发生大动脉粥样硬化性卒中的独立危险因素。见表 3。

表 2 MMP-12 基因型和等位基因分布

基因型和等位基因	病例组(<i>n</i> = 217)	病例组(<i>n</i> = 217)		对照组(<i>n</i> = 100)
		LAA 组(<i>n</i> = 88)	n-LAA 组(<i>n</i> = 129)	
-82A/G				
A/A	176(81.11)	68(77.27)	107(82.95)	89(89.00)
G/G + A/G	41(18.89)	20(22.73) ^a	22(17.05)	11(11.00)
等位基因(%)				
A	85.25	81.82	86.82	89.50
G	14.75	18.18 ^a	13.18	10.50
1082A/G				
A/A	144(66.36)	55(62.50)	89(68.99)	78(78.00)
G/G + A/G	73(33.64) ^a	33(37.50) ^a	40(31.01)	22(22.00)
等位基因(%)				
A	74.42	69.32	77.91	83.00
G	25.58 ^a	30.68 ^a	22.09	17.00

注:a 为与对照组比较,*P* < 0.05。

表 3 多因素 Logistic 回归分析结果

变量	OR	95% CI	<i>P</i> 值
吸烟	1.372	1.163 - 2.165	0.008
高血压	1.163	0.917 - 1.392	0.094
-82 位点 G 等位基因	1.107	1.010 - 1.371	0.031
-1082 位点 G 等位基因	1.285	1.142 - 1.817	0.010

3 讨论

越来越多基础研究结果显示多种 MMPs 与动脉粥样硬化密切相关,其中就包括 MMP-12。目前研究认为关于 MMP-12 参与动脉粥样硬化的可能机制包括:①参与动脉内皮损伤的起始阶段,Matsumoto 等^[11]比较高胆固醇饮食组和对照组日本兔主动脉中 MMP-12 的表达情况,结果显示高胆固醇饮食组主动脉可见泡沫细胞,组织中 MMP-12 水平也明显升高。②破坏血管基底膜,增加单核/巨噬细胞进入血管内膜,Yamada 等^[5]研究发现 hMMP-12 转基因组实验兔血管内膜单核巨噬细胞浸润多于对照组。③参与血管内弹力层的降解,释放出大量肽类物质进一步增加单核巨噬细胞增殖聚集^[12]。④MMP-12 是不稳定斑块的因素之一,Morgan 等^[13]研究发现 MMP-12 参与动脉斑块纤维帽的降解,可增加斑块破裂的风险。近年来有临床研究发现 MMP-12 可能与缺血性卒中及无症状颈动脉粥样硬化相关^[14],本研究因多数患者入院时超过急性检测时间窗 24 h,MMP-12 血清水平资料记录不完整,未对各组血清 MMP-12 进行比较。

MMP-12 的基因定位于人染色体 11q22.2 ~ 22.3,全长 1800 bp,包含 9 个内含子和 10 个外显

子,关于其表达调控主要表现在转录水平^[15,16]。MMP-12 -82A/G 多态是 MMP-12 基因多态性研究较多的一个位点,-82A/G 多态位于 MMP-12 基因转录启动子上游 82 处,可通过调控 MMP-12 与转录因子之间亲和力,参与 MMP-12 表达调控。目前关于 MMP-12 -82A/G 多态与缺血性卒中之间相关性的研究结果差异较大,如李卫玲等^[6]研究结果显示动脉粥样硬化性脑梗死组患者与健康对照组比较,MMP-12 -82A/G 基因型和等位基因差异均无统计学意义。Chehaibi 等^[16]根据缺血性动脉组患者是否合并 2 型糖尿病分成两个亚组,结果显示合并糖尿病组 MMP-12 -82A/G 基因型 G/G + A/G 多于对照组,等位基因 G 也明显多于对照组。还有研究通过比较 2 型糖尿病患者与健康正常人发生动脉粥样硬化时 MMPs 表达和分布情况,发现在糖尿病动脉粥样硬化病变血管及粥样斑块中 MMPs 表达增强及基质降解活性增强,解释了糖尿病患者易于发生动脉粥样硬化斑块破裂的原因,也提示对于 2 型糖尿病患者,MMPs 与缺血性卒中发作密切相关^[17]。这些研究结果提示 MMP-12 参与缺血性卒中的机制是复杂的,可能是多因素共同参与的结果。因此,本研究将 2 型糖尿病患者作为研究人群,探索 MMP-12 基因多态性与缺血性卒中间的关系,结果表明在 2 型糖尿病患者人群中,缺血性卒中组 MMP-12 -82A/G 的基因型和等位基因与对照组比较均无统计学意义,但 LAA 组 MMP-12 -82A/G 基因型 G/G + A/G 频率显著高于对照组,等位基因 G 显著高于对照组。MMP-12 1082A/G 多态是近年来新发现的 MMP-12 表达调

控位点,已有研究表明-1082A/G多态与多种肿瘤转移及COPD发生发展相关^[16],本研究观察其与缺血性卒中的相关性,结果显示病例组和LAA组(G/G+A/G)基因型频率和G等位基因均显著高于对照组,n-LAA组基因型和等位基因与对照组比较差异无统一学意义。本研究还采用多因素Logistic回归分析法综合分析2型糖尿病患者发生LAA的危险因素,结果显示MPP-12基因-82位点等位基因G和-1082位点等位基因G均是2型糖尿病患者发生LAA的危险因素,再次表明MMP-12和大动脉粥样硬化卒中之间存在相关性。

综上所述,MMP-12-82A/G和-1082A/G多态性均是2型糖尿病患者发生大动脉粥样硬化性卒中的危险因素。MMP-12基因多态性与其他因素相互作用可能是未来缺血性卒中防治工作的研究热点。

参 考 文 献

- [1] Chaturvedi M, Kaczmarek L. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 563-573.
- [2] 朱勇冬. 血清胱抑素C、基质金属蛋白酶-9及同型半胱氨酸与脑梗死关系的研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(3): 233-236.
- [3] Orbe J, Rodriguez JA, Orset C, et al. MMP-10 as a new profibrinolytic agent in experimental stroke through TAFI-mediated mechanism [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(6): E11-E12.
- [4] Kunte H, Kunte G, Busch MA, et al. Differences in carotid plaque content of macrophages, T cells and MMP-9 between patients with embolic and hemodynamic cerebral ischemia due to symptomatic carotid stenosis [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2): 456-460.
- [5] Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, et al. Matrix Metalloproteinase 12 Accelerates the Initiation of Atherosclerosis and Stimulates the Progression of Fatty Streaks to Fibrous Plaques in Transgenic Rabbits [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(5): 1419-1429.
- [6] 李卫玲, 金笑平, 朱敏, 等. 基质金属蛋白酶-12血清水平及启动子区-82A/G多态性与急性动脉粥样硬化性脑梗死的关系 [J]. *中华神经科杂志*, 2012, 45(9): 641-646.
- [7] Scholtes VPW, Johnson JL, Nicholas J, et al. Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6): 167-168.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版) [J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 30(8): 26-89.
- [9] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010 [J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(2): 16-19.
- [10] Adams HP Jr, Biller J. Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification. [J]. *Stroke*, 2015, 46(5): 114-117.
- [11] Matsumoto SI, Kobayashi T, Katoh M, et al. Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. [J]. *American Journal of Pathology*, 1998, 153(1): 109-119.
- [12] Anna M, Qingzhong X, Stefan K, et al. Influence of matrix metalloproteinase-12 on fibrinogen level. [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(2): 351-354.
- [13] Morgan AR, Rerkasem K, Gallagher PJ, et al. Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics. [J]. *Stroke*, 2004, 35(6): 1310-1315.
- [14] Arslan Y, Ilker Burak Arslan, Pekcevik Y, et al. Matrix Metalloproteinase Levels in Cervical and Intracranial Carotid Dolichoarteriopathies [J]. *J Stroke Cerebrov*, 2016, 25(9): 2153-2158.
- [15] 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.
- [16] Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1965-1975.
- [17] Tsioufis C, Bafakis I, Kasiakogias A, et al. The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus [J]. *Current Top Med Chem*, 2012, 12(10): 1159-1165.