

· 实验研究 ·

中国北方汉族人基质金属蛋白酶 1、9、12 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病易感性的研究

张荣葆 何权瀛 杨瑞红 卢冰冰 刘玉京

【摘要】 目的 探讨基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)基因多态性与慢性阻塞性肺疾病(COPD)易感性的关系。方法 采用病例对照研究方法,收集 147 例吸烟 COPD 患者和 120 名吸烟非 COPD 正常对照。调查研究对象的性别、年龄、吸烟史、职业粉尘接触史、临床症状、体格检查、测定肺通气功能和支气管舒张试验。应用聚合酶链反应、限制性内切酶分析法比较 MMP-9 (-1562 C/T)、MMP-1(-1607 1G/2G)、MMP-12(-82 A/G)、MMP-12(-357 Asn/Ser)基因多态性在 COPD 组和吸烟非 COPD 对照组的差异。结果 MMP-12 基因型 Asn/Asn 和 CT/Asn/Asn 可增加患 COPD 的危险性。OR 值分别为 2.361(95% CI: 1.369~4.017)和 2.433(95% CI: 1.159~5.342);CC/1G1G/SerSer 对 COPD 患病有保护作用。OR 值为 0.457(95% CI: 0.231~0.911)。结论 CT 和 Asn/Asn 两基因型同时存在,可增加 COPD 的易感性,CC、GG 和 SerSer 三基因型同时存在对患 COPD 有防护作用;多基因联合作用对多基因遗传病发病的影响比单个易感基因的作用更重要。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;基质金属蛋白酶;基因多态性

Study on matrix metalloproteinase 1, 9, 12 polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease among Han nationality in Northern China ZHANG Rong-bao, HE Quan-ying, YANG Rui-hong, LU Bing-bing, LIU Yu-jing. Respiratory Medicine Department of Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

【Abstract】 **Objective** To study the association between the functional polymorphism of matrix metalloproteinases(MMPs) and the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** 147 COPD patients and 120 healthy smoking controls were selected. Spirometry and chest X-rays had been taken. Questionnaires including sex, age, smoking history, occupational exposure were completed. MMP-9 (-1562 C/T), MMP-1(-1607 1G/2G), MMP-12 (-82 A/G), MMP-12(-357 Asn/Ser) alleles were determined using PCR-RFLP method. Independent samples T test analysis was carried out to compare patients' age, smoking index, FEV₁/FVC, FEV₁% pred with that of healthy controlled group. The frequencies of genotypes and alleles between groups were analyzed by chi-square tests and multilogistic regression. **Results** MMP12 Asn/Asn, CT/Asn/Asn were risk factors for smoking-induced COPD. The ORs were 2.361 (95% CI: 1.369-4.017) and 2.433 (95% CI: 1.159-5.342) respectively while CC/1G1G/SerSer seemed to be a protective factor for smoking-induced COPD, with OR as 0.457 and 95% CI as 0.231-0.911. **Conclusion** Asn/Asn, CT/Asn/Asn might be susceptible genotypes while CC/GG/SerSer might serve as protective genotype.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; Matrix metalloproteinases; Polymorphisms

吸烟是引起慢性阻塞性肺疾病(COPD)的最主要危险因素。有 80%~90% 的 COPD 是由长期、大量吸烟引起的^[1]。然而,在重度吸烟者中最终仅有 20% 会发生 COPD^[2], 大部分人即使终生吸烟也不会罹患 COPD, 这提示吸烟者中存在 COPD 易感者。基质金属蛋白酶(MMPs)主要参与正常和异常组织的重建、修复和炎症反应,在 COPD 的发病中起重

要作用,MMPs 基因多态性可以影响其表达。本研究的目的是探讨 MMPs 1、9、12 基因多态性与 COPD 易感性的关系。

对象与方法

1. 对象:147 例 COPD 患者(COPD 组)为 2002 年 11 月至 2003 年 8 月在我院门诊就诊和呼吸科病房住院的患者。2002 年 11 月至 2003 年 11 月在我院门诊体检筛查的肺功能正常的吸烟者 120 人作为

对照组。

2. 临床调查方法:通过 COPD 门诊经问卷调查了解 COPD 筛查者的病史、吸烟史,进行体检、X 线胸片检查、基础肺功能和支气管舒张试验测定。COPD 组入选标准为符合 2002 年中华医学会呼吸病学分会制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》的诊断标准^[3],并需排除哮喘、肺间质纤维化、支气管扩张等肺部疾病,无肺部及其他部位恶性肿瘤史。对照组入选标准为有长期吸烟史,肺功能正常,并排除哮喘、肺间质纤维化、支气管扩张等肺部疾病,无肺部及其他部位恶性肿瘤史。吸烟程度用吸烟指数来评价,吸烟指数为吸烟年数×每日吸烟量(包数),用包·年表示。

3. 分子遗传研究方法:所有受试者抽取外周静脉血 5 ml,酚-氯仿法提取基因组 DNA;聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法检测 MMP-1 基因启动子区域第 1607 位 G 插入和缺失多态(1G/2G);MMP-9 基因第 1562 位 C/T 多态;MMP-12 基因第 82 位 A/G 多态;MMP-12 基因第 357 位 Asn/Ser 多态。25 μ l PCR 反应体系包括:22 μ l master mix(购自天为时代公司),100 ng/ μ l 上、下游引物各 1 μ l,1 μ l(浓度为 100 ng/ μ l)基因组 DNA。MMPs 1、9、12 基因多态性位点的引物序列及酶切片段长度见表 1,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。MMP-1 1607(1G/2G)、MMP-9 1562(C/T)、MMP-12 82(A/G)、MMP-12 357(Asn/Ser)扩增产物分别用 Alu I、Bbu I、Pvu II、Mun I 限制性内切酶进行酶切;取酶切产物 20 μ l 电泳,紫外灯下观察结果并照相分析。

4. 统计学分析:应用 SPSS 10.0 统计软件分析,以非配对 *t* 检验比较 COPD 组和对照组间年龄、吸

烟指数、FEV₁/FVC、FEV₁% pre 的差异;以 χ^2 检验分析两组间的基因型频率的差异;以是否患 COPD 作为因变量,以年龄、吸烟指数、MMPs 基因型作为自变量经 logistic 多元回归分析比较在各种混杂因素同时存在的情况下何种因素与 COPD 的发病有关系。

结 果

1. COPD 组和对照组的一般情况比较:COPD 组 147 例,处于临床稳定期,对照组 120 人,两组均为北方汉族人。经统计学分析,两组性别、吸烟指数的差异无统计学意义。对照组年龄较 COPD 组小 2 岁多,*P* 值为 0.003(表 2)。

2. Hardy-Weinberg 平衡检验结果:MMP-1 G/2G $\chi^2 = 0.044$, *n* = 2, *P* > 0.5; MMP-9 C/T $\chi^2 = 2.62$, *n* = 2, *P* > 0.25; MMP-12 A/G $\chi^2 = 0.032$, *n* = 2, *P* > 0.5; MMP-12 Asn/Ser $\chi^2 = 0.416$, *n* = 2, *P* > 0.5; 差异均无统计学意义。

3. 对照组与 COPD 组 MMPs 基因多态性比较结果:对照组中 MMP-1 基因 1607 位基因型 1G/1G 显著多于 COPD 组 ($\chi^2 = 11.317$, *P* = 0.001)。MMP-9 1562 位 C/T 基因型在 COPD 组的分布显著多于对照组 ($\chi^2 = 6.378$, *P* = 0.012)。MMP-12 82 位各基因型在两组间分布差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。MMP-12 357 位 Asn/Asn 基因型在 COPD 组的分布多于对照组 ($\chi^2 = 10.179$, *P* = 0.001)。Ser/Ser 基因型在对照组的分布多于 COPD 组 ($\chi^2 = 11.085$, *P* = 0.001)。CT 与 Asn/Asn 同时存在的情况出现在 COPD 组的频率高于对照 ($\chi^2 = 8.475$, *P* < 0.05)。CC、GG 与 Ser/Ser 基因型同时存在的情况出现在对照高于 COPD 组 ($\chi^2 = 8.116$, *P* < 0.05)(表 3)。

表1 MMPs 1、9、12 基因多态性位点引物序列及酶切片段长度

MMPs 基因	引物序列	产物长度 (bp)	酶切片段长度 (bp)
MMP-1 1607(1G/2G)	5'-TGA CTT TTA AAA CAT AGT CTA TGT TCA-3'	269	269(GG)
	5'-TCT TGG ATT GAT TTG AGA TAA GTC ATA GC-3'		241+28(G)
MMP-9 1562(C/T)	5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3'	560	560(C)
	5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'		300+260(T)
MMP-12 82(A/G)	5'-GAG ATA GTC AAG GGA TGA TAT CAG C-3'	199	199(A)
	5'-AAG AGC TCC AGA AGC AGT GG-3'		175+24(G)
MMP-12 357(Asn/Ser)	5'-GGG ATA ATT TGG CTC TGG TCT TCA A-3'	204	180+24(Asn)
	5'-CCA TGG GAA CCA TAG AAA AGA-3'		204(Ser)

表2 COPD 组和对照组一般情况比较($\bar{x} \pm s$)

特征	COPD 组	对照组	P 值
例数	147	120	
性别(男/女)	135/12	110/10	0.944
年龄(岁)	67.75 ± 6.93	65.02 ± 7.69	0.003
年龄范围(岁)	55~85	55~80	
吸烟指数(包·年)	35.08 ± 14.10	31.76 ± 12.76	0.056
FEV ₁ % 预计值	0.53 ± 0.18	0.94 ± 0.16	0.000
FEV ₁ /FVC%	0.53 ± 0.11	0.79 ± 0.09	0.000

4. MMPs 基因型与 COPD 的关系:应用多元 logistic 回归分析考虑年龄、性别、吸烟指数混杂因素的影响, MMP-12 Asn/Asn、CT/AsnAsn、CC/1G1G/SerSer 与 COPD 患病存在相关性。其中 MMP-12 Asn/Asn、CT/AsnAsn 可增加罹患 COPD 的危险性, OR 值分别为 2.361 和 2.433, 95% CI 分别为 1.369~4.017、1.159~5.342。CC/1G1G/SerSer 对 COPD 患病有保护作用, OR 值为 0.457, 95% CI 为 0.231~0.911(表 4)。

讨 论

MMPs 参与正常和异常组织重建、修复和炎症反应,是蛋白酶抗蛋白酶系统的重要组成部分,目前已经成为备受关注的 COPD 候选基因。很多学者对 COPD 患者肺内 MMPs 的表达和活性进行了研

究。研究发现吸烟的 COPD 患者 BALF 中 MMP-1、MMP-9 的表达水平比非吸烟、吸烟非 COPD 者高^[4]。把 MMP-12 基因敲除的野生小鼠和基因未敲除小鼠放入吸烟箱内 6 个月,结果基因未敲除小鼠肺组织出现肺气肿病变,而基因敲除的野生小鼠无肺气肿发生,证明 MMP-12 在吸烟肺气肿发病中起关键作用^[5]。将人胶原酶基因(MMP1)植入动物肺内,可使动物发生肺气肿的改变, MMP-1 转基因小鼠肺脏病理与人肺气肿病理改变惊人的相似^[6]。

MMPs 基因多态性可以影响基因的表达。MMP-1 基因启动子区域在 1607G 位插入鸟嘌呤(G)创建了一个转录因子的结合位点^[7]。基因型为 1607 2G 时 MMP-1 的表达水平增高。我们的研究未发现高分泌型 MMP-1 1607 2G/2G 与 COPD 的发病有关。MMP-1 1G/1G(MMP 正常分泌型)主要分布于对照组,对 COPD 发病可能有保护作用。但是当考虑到吸烟、年龄对患病的影响时则无法确定这种保护作用。

MMP-9 C-1562T 的 T 等位基因与 MMP-9 基因表达的升高有关^[8],这是因为 T 等位基因与转录抑制因子的亲和性降低。本研究发现 COPD 组 MMP-9 1562 C/T 型较对照组明显增多,但在考虑

表3 COPD 组和对照组 MMPs 1、9、12 基因型频率分布

基因型	COPD 组		对照组		χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
	例数	构成比(%)	人数	构成比(%)			
MMP-1							
1G/1G	15	10.20	31	25.83	11.317	0.001	0.395(0.224~0.697)
1G/2G	62	42.18	40	33.33	2.189	0.139	1.265(0.922~1.736)
2G/2G	70	47.62	49	40.84	1.231	0.267	1.166(0.887~1.534)
MMP-9							
CC	106	72.11	98	81.67	3.348	0.067	0.883(0.774~1.007)
CT	41	27.89	19	15.83	6.378	0.012	1.859(1.129~3.062)
TT	0	0	3	2.50	3.717	0.054	1.026(0.997~1.055)
MMP-12							
AA	140	95.24	114	95.00	0.008	0.928	1.024(0.611~1.714)
AG	7	4.76	6	5.00			
GG	0	0	0	0			
MMP-12							
Asn/Asn	131	89.12	89	74.17	10.179	0.001	1.202(1.066~1.354)
Asn/Ser	15	10.20	20	16.67	2.423	0.120	0.612(0.328~1.143)
Ser/Ser	1	0.68	11	9.17	11.085	0.001	0.074(0.100~0.567)
CT/AsnAsn 两基因型同时存在	38	25.85	14	11.67	8.475	0.004	2.640(1.353~5.151)
CC/GG/SerSer 三基因型同时存在	11	7.48	23	19.17	8.116	0.004	0.554(0.337~0.912)

表4 COPD 组和对照组 MMPs 1、9、12 基因型频率分布(多元 logistic 回归分析)

基因型	COPD 组		对照组		χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
	例数	构成比(%)	人数	构成比(%)			
MMP-12 Asn/Asn	131	89.12	89	74.17	10.179	0.002	2.361(1.369~4.017)
CT/AsnAsn	38	25.85	14	11.67	8.475	0.027	2.433(1.159~5.342)
CC/1G1G/SerSer	11	7.48	23	19.17	8.116	0.026	0.457(0.231~0.911)

吸烟和年龄的影响后,此差异无统计学意义。MMP-9 表达增高型 MMP-9 1562 T/T 在两组的分布差异无统计学意义,可能与携带此基因型的个体过少(两组共有 3 例)有关,不足依据此结果说明该基因型对 COPD 发病无影响。MMP-12 A-82G 多态性中的 A 等位基因与转录活化蛋白(AP-1)有更高的亲和性,使 MMP-12 的表达升高^[9]。但在我们的研究中,MMP-12 各基因型在两组的分布均无差异,提示 MMP-12 A82G 与 COPD 的发病可能无关。

MMP-12 Asn357Ser 多态性已经证实,但它对蛋白质功能表达的影响尚不清楚^[10]。然而,它是在非保守区的氨基酸的替换,用酸性侧链(Asn)代替羟基侧链(Ser),因此可能会对蛋白溶解活性有影响。我们的研究发现 AsnAsn 与 COPD 发病有关,而 SerSer 对 COPD 患病有保护作用,而且考虑吸烟和年龄的影响后仍肯定基因型 AsnAsn 与 COPD 发病有关。

Joos 等^[10]对 590 名长期吸烟者的 MMPs 基因多态性(MMP-1、MMP-9、MMP-12)进行了研究,他们发现 MMP-1 1607 2G2G 基因型与肺功能快速下降呈负相关。这不仅与我们的结果不同,而且与 MMP-1 1607 2G2G 基因型在 COPD 患者肺内高表达相矛盾。分析两者不同的原因可能为:①研究的临床表型不同,我们研究的是 COPD 患病与否,即 COPD 的易感性与 MMPs 的关系,而 Joos 等研究的是肺功能快速下降与否即疾病进展的严重程度与 MMPs 的关系,两者有明显的不同;②我们研究的对象是中国北方汉族人,而 Joos 等研究对象是高加索人,两者的遗传背景明显不同。

COPD 是一种复杂的多基因遗传病,与单基因疾病不同,并非一种基因决定一种性状。COPD 的性状-慢性、进行性气流受限,除受多种基因影响外,也受外界环境因素的影响,并且二者间存在复杂的相互作用。发现 COPD 易感基因和探索多基因多态性的联合方式,正是揭示 COPD 这一复杂多基因遗传病形成奥秘的最重要的策略。对于多基因疾病,每个基因对遗传性状、疾病形成的贡献是不同的,如果单独去考察单个基因的作用,它对于遗传性状的影响作用可能是微弱的,然而当多个基因的多态性联合在一起时即可最终决定了疾病的发生和发展。在遗传易感性的研究中,不仅要尽可能地解引发疾病的各种易感基因,还需要评价多个基因多个多态性间相互作用的方式和结果,以及在 COPD

发病中所起的作用,只有这样才能最终揭示 COPD 这一复杂多基因遗传病遗传易感性的全貌。

本研究对 MMPs 多基因的联合作用与 COPD 易感性的关系进行了初步探讨,CT 和 AsnAsn 基因型同时存在的情况于 COPD 组显著增多。CC、1G1G 和 serser 基因型同时存在的情况于对照组显著增多,对 COPD 有保护作用。考虑吸烟和年龄的混杂因素后,CT/AsnAsn 型、CC/1G1G/SerSer 型与 COPD 仍有明显的相关性。这比单个易感基因的发现更为重要,更符合多基因遗传病的特点。但 MMPs 多基因型间的相互作用方式尚待进一步探讨。

本研究发现了一些与 COPD 患病有关的 MMPs 基因,它们本身有可能是致病基因,还有可能是这些基因与真正致病基因位点处于连锁不平衡,即检测基因与致病基因在染色体上位置较近,遗传至多代后,两个基因位点仍然紧密相关,因此应继续深入研究以揭示真正的致病基因。本研究仅仅是从 COPD 发病机制中蛋白酶抗蛋白酶失衡这一方面入手,选择 MMPs 基因多态性作为 COPD 易感性研究的方向,因此尚有一定局限性。

参 考 文 献

- 1 Doll R, Peto R, Wheatley K, et al. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *Br Med J*, 1994, 309: 901-911.
- 2 Bascom R. Differential susceptibility to tobacco smoke: possible mechanisms. *Pharmacogenetics*, 1991, 1: 102-106.
- 3 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组, 慢性阻塞性肺疾病诊治指南. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25: 453-460.
- 4 Finlay G, Russell K, McMahon K, et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*, 1997, 52: 502-506.
- 5 Hautamaki R, Kobayashi D, Senior R, et al. Requirement for macrophage metalloelastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, 1997, 277: 2002-2004.
- 6 D'Armiento J, Dalal S, Berg R, et al. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell*, 1992, 71: 955-961.
- 7 Rutter J, Mitchell T, Buttice G, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an ETS binding site and augments transcription. *Cancer Res*, 1998, 58: 5321-5325.
- 8 Zhang B, Ye S, Herrmann S, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1999, 99: 1788-1794.
- 9 Jormsjo S, Moritz J, Walter D, et al. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res*, 2000, 86: 998-1003.
- 10 Joos L, He JQ, Shepherdson MB, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 569-576.

(收稿日期: 2005-01-08)

(本文编辑: 孙强正)