

1 材料与方法

1.1 对象 收集新乡医学院第三附属医院心血管内科2014年1月至2015年7月收治的124例CHF患者作为研究对象(CHF组),其中男64例,女60例,年龄57~80岁,平均(62.0±8.5)岁,49例吸烟;患者病程1~3 a,均具有典型的心力衰竭症状,诊断标准参考 Framingham 标准^[4],且左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)≤45%,纽约心脏协会(New York heart association, NYHA)心功能分级Ⅱ~Ⅳ级。收集同期新乡医学院第三附属医院门诊健康体检者144例为对照组,其中男76例,女68例,年龄45~79岁,平均(60.7±8.8)岁,53人吸烟。研究对象均排除有感染性疾病、糖尿病、严重肝肾疾病、恶性肿瘤等患者;均来自河南且在该地区生活3代以上的汉族人群,个体间无血缘关系;2组研究对象年龄、性别、吸烟情况比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。研究对象均知情同意并签署同意书。

1.2 主要仪器与试剂 GEVivid 7 彩色多普勒超声(美国通用公司),多功能电泳仪(瑞典 Phannacia 公司),凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),UV-260 紫外分光光度计(日本岛津公司),台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司);Taq 酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),MMPs 基因启动区 SNP 位点扩增引物(Invitrogen 生物公司上海英潍捷基贸易有限公司),限制性内切酶 *Bgl* II、*Xmn* I、*Pvu* II(西班牙 MBI 生物公司)。

1.3 方法

1.3.1 生物化学指标测定 所有研究个体采集外周静脉血 8 mL,其中 3 mL 用于血脂等生物化学指标测定,5 mL 用于外周血白细胞的 DNA 提取。血生物化学指标检测由新乡医学院第三附属医院检验科采用现行标准化方法完成并统一进行质量控制。

1.3.2 基因组 DNA 的提取与定量 常规酚/氯仿法提取血样基因组 DNA,采用 UV-260 紫外分光光度仪检测 DNA 的质与量,4℃保存备用。

1.3.3 SNPs 等位基因分型 PCR 反应体系:总体积为 25 μL,含 1× Buffer,1.5 mmol·L⁻¹ Mg²⁺,0.08 mmol·L⁻¹ 三磷酸脱氧核苷(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP),1 U Taq DNA 聚合酶,50~100 ng 基因组 DNA 模版,10 μmol·L⁻¹ 引物。热循环参数:95℃预变性 2 min,95℃变性 30 s,退火 45 s(各 SNP 引物序列及退火温度见表 1),72℃延伸 45 s,32 个循环后,72℃继续延伸 10 min。为进行基因型检测的质量控制,每批 PCR 反应均以消毒超纯水替代模板 DNA 作为阴性对照,并随机挑取

15% DNA 标本进行重复实验,符合率为 100%。

对 PCR 产物进行酶切,采用限制性内切酶片段长度多态性(polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法判定 SNP 的等位基因及基因型,各 SNP 所用限制性内切酶见表 1。酶切反应体系:PCR 产物 5.0 μL,内切酶 1 U,10× Buffer 1.0 μL,ddH₂O 补足总体积至 10.0 μL,37℃水浴 16 h;酶切产物取 3.0 μL 上样,用质量分数 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳(polacryamide gel electrophoresis, PAGE)进行检测,恒压 300 V 1 h,电泳同时加入 100 bp DNA Marker 及 PCR 扩增产物(未酶切)作为内参。

表 1 MMPs 基因启动区 3 个 SNP 位点扩增引物序列、退火温度及限制性内切酶

Tab. 1 Primer sequences, annealing temperature and restriction enzyme for detecting three SNP of MMP promoter region

SNP	引物序列	退火温度	限制性内切酶
rs1799750	上游: TTCACCCCTCTAATATGAAGAGCC	55℃	<i>Bgl</i> II
	下游: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCAGA		
rs3025058	上游: GGTTCCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAGA	60℃	<i>Xmn</i> I
	下游: CTTCTCGGAATTCACATCACTGAAACCACT		
rs227610	上游: GAGATAGTCAAGGGATGATATCA	60℃	<i>Pvu</i> II
	下游: AAGAGCTCCAGAAGCACTGG		

1.4 统计学处理 采用 SHEsis 软件^[5]进行 CHF 组与对照组间频数及频率分布比较和单体型推断,关联强度用比值比(odd ratio, OR)和 95% 可信区间(confidence interval, CI)表示。Hardy-Weinberg 检验样本的群体代表性,采用 SHEsis 软件分析 3 个多态连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)紧密程度。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布者,经平方根转换后进行 *t* 检验。所有统计检验均为双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组生物化学指标比较 结果见表 2。2 组总胆固醇(cholesterol total, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)及 LVEF 比较差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 CHF 组与对照组生物化学指标比较

Tab. 2 Comparison of biochemical indexes between CHF group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	HDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	BNP/ (ng·L ⁻¹)	LVEF/%
对照组	144	5.4±0.9 ^a	1.6±1.0 ^a	1.3±0.4 ^a	3.2±0.7 ^b	42.5±18.6 ^b	68.2±10.3 ^b
CHF 组	124	4.3±1.1	1.2±0.8	1.1±0.6	2.7±0.8	658.3±37.1	33.7±6.8

注:与 CHF 组比较^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.2 MMPs 基因型分布 Hardy-Weinberg 平衡检验 MMPs 基因启动区 3 个 SNP 位点各基因型在对

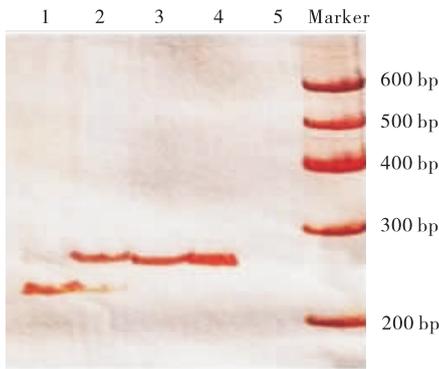
对照组中 Hardy-Weinberg 平衡结果表明,rs1799750 及 rs3025058 2 个 SNP 的基因型频率在 CHF 组和对照组人群中符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$),其中 rs1799750 位点 $\chi^2 = 0.04, P = 0.93$; rs3025058 位点 $\chi^2 = 0.12, P = 0.89$; 本研究中 rs227610 位点基因型全部为 GG,可能该位点在河南汉族人群中无多态性,因此不予分析。

2.3 MMPs 基因启动区 3 个 SNP 与河南汉族群体 CHF 发病风险的相关性

2.3.1 PCR-RFLP 结果及基因型分析 rs1799750、rs3025058 及 rs227610 3 个 SNP 位点无酶切位点片段大小分别为 229、130 及 199 bp,酶切后片段大小分别为 201 和 28 bp、97 和 33 bp、175 和 24 bp,结果见表 3。根据电泳出现条带判定 SNP 等位基因及基因型,部分位点等位基因电泳图谱见图 1。

表 3 MMPs 基因启动区 3 个 SNP 等位基因判断及内切酶
Tab.3 Alleles and restriction enzyme of three SNPs of MMP promoter region

SNP	限制性内切酶	酶切后片段大小及等位基因		无酶切位点及等位基因	
rs1799750	<i>Bgl</i> II	201 bp	28 bp	1G	229 bp
rs3025058	<i>Xmn</i> I	97 bp	33 bp	5A	130 bp
rs227610	<i>Pvu</i> II	175 bp	24 bp	A	199 bp



1:1G;2:1G2G;3:2G;4:未酶切;5:空白对照。

图 1 rs1799750 位点等位基因 PAGE 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis map of allele PAGE of rs1799750 site

2.3.2 2 组各 SNP 等位基因和基因型频率分布

MMPs 基因启动区 rs1799750 及 rs3025058 与 CHF 的相关性见表 4。与对照组相比,CHF 组的 rs179975 位点的 1G 等位基因频率显著降低 ($P < 0.001$),1G1G 基因型频率也显著降低 ($P < 0.001$); $OR = 0.338 [95\% CI (0.220, 0.519)] < 1$ 。2 组 rs3025058 位点等位基因频率和基因型频率分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但 $OR = 0.386 [95\% CI (0.007, 1.931)] < 1$ 。

2.3.3 MMPs 基因启动区 2 个 SNP 单体型分析

LD 紧密程度结果显示, $D' = 0.075, r^2 = 0.000$ 。rs1799750 与 rs3025058 构建成 4 种单体型,其中 3 种单体型(1G6A、2G5A、2G6A)频率 > 0.01 (表 5)。2 组 1G6A 单体型频率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.951, P < 0.01$), $OR = 0.37 [95\% CI (0.26,$

$0.80)] < 1$,进一步说明单体型 1G6A 可能降低个体 CHF 患病风险。

表 4 2 组 MMPs 基因启动区 3 个 SNP 位点基因型及等位基因频率分布

Tab.4 Frequencies distribution of genotype and alleles of three SNP of MMPs promoter region in the two groups

SNP	基因型及等位基因频率		χ^2	P	OR(95% CI)
	CHF 组	对照组			
rs1799750					
1G1G	5(0.047)	14(0.101)	32.450	<0.001	-
1G2G	27(0.255)	79(0.568)			
2G2G	74(0.698)	46(0.331)			
1G	37(0.175)	107(0.385)	25.645	<0.001	0.338(0.220,0.519)
2G	175(0.825)	171(0.615)			
rs3025058					
5A5A	0(0.000)	1(0.007)	1.264	0.531	-
5A6A	2(0.017)	4(0.030)			
6A6A	121(0.983)	130(0.963)			
5A	2(0.009)	6(0.022)	1.443	0.230	0.386(0.077,1.931)
6A	244(0.991)	264(0.978)			
rs227610					
AA	0(0.000)	0(0.000)	-	-	-
AG	0(0.000)	0(0.000)	-	-	-
GG	124(1.000)	144(1.000)	-	-	-
A	0(0.000)	0(0.000)	-	-	-
G	248(1.000)	288(1.000)	-	-	-

注:“-”:无多态性,不予分析。

表 5 2 组 MMPs 基因 2 个 SNP 单体型频率分布

Tab.5 Frequencies distribution of haplotype of two SNPs of MMPs promoter region in the two groups

单体型	CHF 组	对照组	χ^2	P	OR(95% CI)
2G6A	0.805	0.607			
1G5A	0.000	0.010	0.736	0.553	0.41(0.13,2.58)
1G6A	0.185	0.370	7.951	0.005	0.37(0.26,0.80)
2G6A	0.010	0.013	0.567	0.658	0.46(0.05,4.14)

3 讨论

CHF 是心血管系统常见的危重病症之一,其发生的机制主要涉及神经内分泌系统的激活、心室重构和细胞因子水平的失衡等。心室重构是导致心肌异常僵硬及心脏泵功能衰竭的主要原因。心室重构的首要条件是 ECM 成分合成或降解代谢失衡, MMPs 通过影响 ECM 降解平衡而参与许多病理生理过程。随着对 CHF 的基础和临床研究不断深入,ECM 在心室重构中的重要性已得到公认^[6]。MMPs 亚型基因启动子区的多态性可以影响到转录因子与 MMPs 基因启动区结合,进而影响转录效率。故本研究探讨 MMPs 基因 SNP 与 CHF 的遗传易感性关系及临床意义。

MMPs 的表达调控主要包括转录水平、MMPs 前体激活、MMPs 组织抑制因子(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)抑制作用。大多数 MMPs 基因在活跃的生理状态或病理性组织重构发生时才表达,因此,MMPs 在转录水平的表达调控至关重要。有文献表明,MMP-1 在血管形成、伤口愈

合和纤维化等方面起重要作用^[7],最近也有报道MMP-1 过表达可导致转基因鼠胶原破坏^[8]。另外,人类心力衰竭时,MMP-1 的表达水平增高^[9]。较为重要的是,MMP-1 亚型基因启动子区的多态性可以影响到转录因子与MMP-1 基因启动区结合,进而影响转录效率。

MMP-3 又称基质分解素1,为MMPs 中最重要的一种,为MMPs 家族中表达最为显著的成员,可对ECM 中的多数成分起到特异性降解效果^[10]。研究发现,MMP-3 基因启动子区多态性可能以等位基因特异方式调节MMP-3 基因的转录^[11]。MMP-12 主要由巨噬细胞以酶原的方式分泌,作用于多种ECM。最近研究表明,MMP-12 有抑制血管生成的作用,且血管内皮生长因子可以激活MMP-12^[12]。故MMP-3、MMP-12 也可能参与心血管疾病的发展过程。

本研究结果显示,CHF 组较对照组 rs1799750 位点的1G 等位基因频率及1G1G 基因型频率显著降低,提示1G 基因型可能降低个体CHF 发病风险。基因功能研究提示,在MMP-1 基因启动子-1 607 bp 位点1G 等位基因与2G 等位基因因缺失一个G 碱基,未能形成转录调控因子(E26 transformation-specific, Ets)的核心结合序列,因而显著降低转录活性并下调MMP-1 表达水平。朱小芳等^[13]研究表明,CHF 患者MMP-1 的表达水平明显增高,本研究结果也支持此结论。因此,可以推测rs1799750 位点的1G 等位基因通过下调MMP-1 水平来降低CHF 发病风险,但需要进一步研究CHF 组及对照组 rs1799750 位点和血清MMP-1 水平的关系进行验证。

rs1799750 及 rs3025058 2 个 SNP 推断出的单体型中,与2G6A 单体型相比,单体型1G6A 可能会降低个体CHF 发病风险, $OR = 0.37 [95\% CI (0.26 \sim 0.80)]$ 。一个核苷酸多态位点与CHF 的形成可能有关,也可能无关,但单个SNP 能够揭示的信息比较局限,2 个或多个位点可能会共同抑制或诱发左室重构,也可能会相互抑制,从而减弱单个位点对该疾病的影响。OLSEN 等^[14]研究发现,对于多位点的单体型研究比单位点的SNP 更有意义,本研究与此结果一致。

综上所述,本研究提示河南汉族群体中 rs1799750 位点1G 等位基因以及其与 rs3025058 位点组成的单体型1G6A 可能降低个体CHF 的患病风险,有助于对CHF 疾病的基因诊断、风险性估计和针对性治疗,也为弄清CHF 的发病机制、寻找CHF 新的治疗策略提供科学依据和新途径。

参考文献:

- [1] CONSOLI C, GATTA L, IELLAMO F, et al. Severity of left ventricular dysfunction in heart failure patients affects the degree of serum-induced cardiomyocyte apoptosis. Importance of inflammatory response and metabolism[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(6):2859-2866.
- [2] 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心力衰竭的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(1):23-26.
- [3] 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.
- [4] XANTHAKIS V, SUNG J H, SAMDARSHI T E, et al. Relations between subclinical disease markers and type 2 diabetes, metabolic syndrome, and incident cardiovascular disease: the Jackson Heart Study[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(6):1082-1088.
- [5] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. *Cell Res*, 2005, 15(2):97-98.
- [6] TATE M, ROBINSON E, GREEN B D, et al. Exendin-4 attenuates adverse cardiac remodeling in streptozocin-induced diabetes via specific actions on infiltrating macrophages[J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111(1):1.
- [7] MACCOLL E, KHALIL R A. Matrix metalloproteinases as regulators of vein structure and function: implications in chronic venous disease[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 355(3):410-428.
- [8] AL SHAMMARI B, SHIOMI T, TEZERA L, et al. The extracellular matrix regulates granuloma necrosis in tuberculosis[J]. *J Infect Dis*, 2015, 212(3):463-473.
- [9] GATTA L, ARMANI A, IELLAMO F, et al. Effects of a short-term exercise training on serum factors involved in ventricular remodeling in chronic heart failure patients[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 155(3):409-413.
- [10] 任志国. 基质金属蛋白酶-3 基因多态性与汉族人结肠癌的相关性[J]. *河北医科大学学报*, 2014, 35(9):1006-1009.
- [11] TEPLIAKOV A T, BEREZIKOVA E N, SHILOV S N, 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.
- [12] WANG P, CHEN S H, HUNG W C, et al. Fluid shear promotes chondrosarcoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase 12 via IGF-2 and VEGF signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2015, 34(35):4558-4569.
- [13] 朱小芳, 金平. 扩张型心肌病慢性心力衰竭患者血浆基质金属蛋白酶-1 水平与心室重构及心功能的关系[J]. *山东医药*, 2014, 54(3):55-57.
- [14] OLSEN V, ROHDE L E, BECK-DA-SILVA L, et al. QRS widening rates and genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in a cohort of patients with chronic heart failure[J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(3):345-351.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟月)