· 妇女心血管病专栏 ·

基质金属蛋白酶-9基因多态性与原发性高血压发病的相关性

邢绣荣 华琦 刘荣坤 杨峥 谭静

【摘要】 目的 基质金属蛋白酶(MMP)-9是一种基质降解酶,可能参与了血管的重构。本研究旨在探讨MMP-9基因C-1562T多态性与高血压及性别的相关性。方法 采用聚合酶链反应结合限制性内切酶片段长度多态性分析,分别检测北京宣武医院门诊807例原发性高血压患者和同一地区509例正常对照的MMP-9基因C-1562T多态性。电泳判断基因型并测序。结果 高血压组TT+CT基因型频率和T等位基因频率显著高于正常对照组(28.7% vs 22.6%, 15.4% vs 12.7%; $P<0.05$)。女性中高血压组的TT+CT基因型频率和T等位基因频率显著高于正常对照组(31.0% vs 22.0%, 16.6% vs 12.1%; $P<0.05$),T等位基因对高血压的OR值为1.442(CI: 1.057~1.968)。男性中两组基因型无显著差别。老年女性高血压组的TT+CT基因型频率和T等位基因频率显著高于老年男性高血压组、老年女性正常对照组和非老年女性高血压组。结论 MMP-9基因-1562T等位基因可能是老年女性原发性高血压的危险因素。

【关键词】 高血压;基质金属蛋白酶-9;基因多态性;性别特征

Matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism and essential hypertension

XING Xiurong, HUA Qi, LIU Rongkun, et al

Cardiovascular Department, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, *China*

【Abstract】 Objective Matrix metalloproteinase (MMP)-9 is a matrix-degrading enzyme possibly involved in vascular remodeling. The aim of this study is to evaluate the relationships between MMP-9 gene C-1562T polymorphism with hypertension and gender. Methods Genotype of MMP-9 gene C-1562T polymorphism was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis in 807 patients with essential hypertension and 509 age-matched normal controls. The polymorphism was decided by electrophoresis and sequencing. Results In hypertension group, the frequencies of TT+CT genotype and T allele were significantly higher than those in control group (28.7% vs 22.6%, 15.4% vs 12.7%; $P<0.05$). In female, the frequencies of TT+CT genotype and T allele in hypertension group were notably higher than those in control group (31.0% vs 22.0%, 16.6% vs 12.1%; $P<0.05$). The essential hypertension odds ratio (OR) associated with MMP-9 -1562T allele in female was 1.442 (95%CI: 1.057 to 1.968). The frequencies of genotypes were not significantly different between hypertensive patients and normal controls in male. The frequencies of TT+CT genotype and T allele were significantly higher in elderly female hypertensive patients than elder male ones, elderly female normal control and non-elderly female hypertensive patients. Conclusion The -1562T allele in MMP-9 gene may be a risk factor for primary hypertension in elderly female.

【Key words】 hypertension; matrix metalloproteinase-9; gene polymorphism; gender

原发性高血压(essential hypertension, EH) 是常见的心血管疾病之一,是心、脑、肾等器官损

收稿日期:2009-04-07

基金项目:北京市自然科学基金面上项目资助课题(项目编号:7072032)

作者单位:100053 北京市,首都医科大学宣武医院心脏科

作者简介:邢绣荣,女,1973年7月生,山东省招远人,医学博士,主治医师,现于宣武医院急诊科工作。E-mail:xingxr@126.com

通讯作者:华琦,E-mail:huaqi5371@medmail.com.cn

万方数据

害的主要危险因素。EH的发病系遗传与环境因素共同作用的结果，其中有20%～40%的个体血压变异是由遗传因素决定的，受多种微效基因的影响[1]。高血压与普遍的血管细胞外基质病理生理学异常有关，基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase，MMP)是一组具有许多共同生化性质的可降解细胞外胶原基质的酶，因此MMP在高血压发生发展中的作用日益受到关注。其中MMP-9被认为在动脉硬化和血管重建过程中起着相当重要的作用[2]。但MMP-9基因C-1562T多态性与EH相关性的研究罕见报道。另外，不同性别的高血压发病机制可能有差别，既往的有关研究较少。本研究旨在探讨北京城市汉族人群中，MMP-9基因C-1562T多态性与EH及不同性别高血压易感性的相关性。

1 资料与方法

1.1 对象 (1)选择首都医科大学宣武医院门诊EH患者807例(EH组)，均符合2003年WHO/ISH的高血压诊断标准[3]，血压≥140/90 mmHg。其中男452例，女355例，年龄17～83(49.0±13.5)岁，发现高血压的病程为(6.7±8.3)年。所有患者经问病史、体检、实验室检查和心电图排除继发性高血压、心脏瓣膜病、心肌病、慢性阻塞性肺疾病、糖尿病、高脂血症、冠心病、急性心力衰竭、肝肾功能障碍及肿瘤等疾病。(2)正常对照组509例(N组)，男196例，女313例，年龄22～82(48.5±13.1)岁，为来自同一地区的健康体检者，均进行有关检查排除高血压、冠心病、肿瘤等各种疾病，无高血压病家族史。所有受试者均为汉族人群，研究个体之间无血缘关系。

1.2 血压测量 使用标准水银柱血压计，患者休息15min后测量右上臂坐位血压，以Korotkoff Ⅰ时的血压读数为收缩压，以Korotkoff Ⅴ的血压读数为舒张压，连测3次，间隔2 min，计算3次血压读数的均数。

1.3 MMP-9基因C-1562T分型 所有受试者清晨空腹采肘静脉血5ml置于含2%EDTA-Na_2抗凝液的抗凝管中，3000r/min离心15min，取下层血细胞采用盐析法提取DNA。以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP)技术分析MMP-9基因型，PCR反应引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，序列为上游引物：5′-GCCTGGCACATAGTAGGCCC-3′(20)，下游引物：5′-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3′(20)。PCR 25μl反应体系：10×缓冲液2.5μl，4×dNTP 2μl，引物各1μl(0.4μmol/L)，Taq DNA聚合酶0.4μl，DNA模板1.5μl。PCR扩增程序为95℃预变性3min，34个循环扩增(94℃ 40s，60.5℃ 40s，72℃ 50s)，72℃延伸7min。PCR扩增仪为英国Hybaid Express，Taq酶购自天根生化科技(北京)有限公司。反应完成后，取5μl用2%琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物的扩增情况，若在相应位置有清晰扩增条带，则进行酶切反应。取PCR产物5μl加入5U限制性内切酶Sph Ⅰ(购自Toyota公司)，37℃水浴酶切过夜。酶切产物行3%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外灯下观察电泳结果及照相。从不同的基因型中，随机抽取样本送国家人类基因组北方研究中心进行基因测序核对基因型。

1.4 统计分析 所有计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，计数资料以频数表示。采用SPSS11.5统计软件进行数据分析，两样本均数的比较采用t检验。Hardy-Weinberg遗传平衡用卡方(Chi-square)检验、基因频率之间的比较采用χ^2检验。多因素分析采用Logistic回归分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高血压组与正常对照组的一般情况 见表1。可见两组的年龄无显著差异($P>0.05$)。EH组的收缩压、舒张压、脉压及男/女比例均显著高于N组($P<0.01$)。

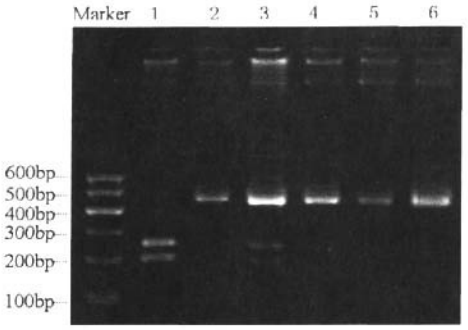
2.2 MMP-9基因C-1562T多态性分析 MMP-9基因-1562位点经Sph Ⅰ限制酶切后分为3种基因型：纯合子CC只有435bp片段；纯合突变子TT产生247 bp和188 bp 2种片段；杂合子CT为一条DNA被酶切，另一条未被酶切，产生435bp、247 bp和188bp 3种片段(图1)。以杂合子为代表显示基因测序结果与酶切结果一致(图2)。

表1 正常对照组与高血压组人群的一般情况

组别	年龄(岁)	性别(男/女)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	脉压(mmHg)
N组(509例)	48.5±13.1	196/313	114.7±11.0	74.4±7.6	40.4±8.8
EH组(807例)	49.0±13.5	452/355*	146.3±16.3*	95.1±10.9*	51.3±15.5*

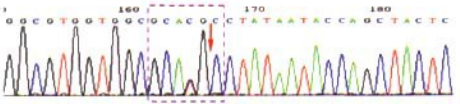
注：两组比较，*$P<0.01$

万方数据



1:TT 基因型,247bp+188bp;2、5:CC 基因型,435bp;3、4:CT 基因型,435+247+188bp;6:PCR 产物,435bp

图 1 MMP-9 基因 C-1562T 多态性 Sph Ⅰ 酶切电泳图



标本测序 165 位置为 CT,证实为杂合子,酶切产物为 3 条带

图 2 MMP-9 基因 C-1562T 杂合子测序结果

2.3 Hardy-Weinberg 平衡检验 N 组和 EH 组中 MMP-9 基因-1562 多态性 CC、CT 与 TT 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡(均 $P>0.05$),说明该多态性的基因型分布频率达到遗传平衡,具有群体代表性。

2.4 MMP-9 基因 C-1562T 多态性与高血压的关系 由于 TT 基因型频率较低,将 TT 与 CT 基因型合并进行统计分析。EH 组 TT+CT 基因型频率和 T 等位基因频率显著高于 N 组($\chi^2=5.859$, $P=0.015$ 和 $\chi^2=4.021$, $P=0.045$;表 2)。由于 EH 组与 N 组性别构成比有显著差异,校正性别因素后,T 等位基因标准化率比较的 $\chi^2=4.276$, $P=0.039$, OR=1.261 (95%CI:1.012~1.571),差异仍具有显著性意义。提示携带 MMP-9 -1562T 等位基因可能与高血压有关。

2.5 MMP-9 基因 C-1562T 多态性与性别的关系 在 N 组和 EH 组中分别比较男性和女性受试者的 MMP-9 基因 C-1562T 多态性无统计学差异,T 等位基因的 P 值分别为 0.520 和 0.266。所有受试者按性别分组后,可见女性中 EH 组的 TT+CT 基因型频率和 T 等位基因频率显著高于 N 组($\chi^2=6.779$, $P=0.009$ 和 $\chi^2=5.377$, $P=0.020$),T 等位基因的 OR=1.442(95% CI:1.057~1.968),提示女性中携带 MMP-9 -1562T 等位基因患高血压的危险增加。男性 EH 组和 N 组之间的该基因多态性无显著差异($P>0.05$;表 2)。以有、无高血压作为因变量,以性别、年龄、心率、血糖、甘油三酯、胆固醇及 MMP-9 C-1562T 基因型为自变量进行逐步 Logistic 回归分析显示:MMP-9 基因 C-1562T 多态性的 OR=1.183(95% CI:1.005~1.392), B=0.168, $P=0.047$;性别的 OR=0.796(95% CI:0.721~0.878), B=-0.708, $P=0.011$,二者均是高血压的独立变量。对回归方程的适配度作卡方检验,$P=0.035$,故此回归模型适配度好,有显著意义。

2.6 MMP-9 基因 C-1562T 多态性与年龄的关系 在 N 组和 EH 组中的不同性别按年龄进行分组,年龄≥60 岁为老年组,年龄<60 岁为非老年组,比较 MMP-9 基因 C-1562T 多态性。结果示老年女性 EH 组的 TT+CT 基因型频率和 T 等位基因频率显著高于老年男性 EH 组、老年女性 N 组和非老年女性 EH 组($P<0.01$;表 3),提示携带 MMP-9 -1562 T 等位基因的老年女性更易于患高血压。

3 讨 论

MMP 是一类含锌的可降解细胞外基质的蛋白酶家族,可分为 5 大类 20 余种。MMP 与其内源性组织抑制剂相互作用,共同维持着细胞外基质的分解与重塑。其中 MMP-9 由巨噬细胞、中性粒细胞、

表 2 不同性别组 MMP-9 基因 C-1562T 基因型与等位基因频率比较[例(%)]

组别		例数	基因型			等位基因	
			CC	TT	CT	C	T
N 组	总	509	394(77.4%)	14 (2.8%)	101(19.8%)	889(87.3%)	129(12.7%)
	男	196	150(76.5%)	7(3.6%)	39(19.9%)	339(86.5%)	53(13.5%)
	女	313	244(78.0%)	7(2.2%)	62(19.8%)	550(87.9%)	76(12.1%)
EH 组	总	807	576(71.4%)*	19 (2.4%)	212(26.3%)	1364(84.6%)	250(15.4%)*
	男	452	331(73.2%)	11(2.4%)	110(24.3%)	772(85.4%)	132(14.6%)
	女	355	245(69.0%)#	8(2.3%)	102(28.7%)	592(83.4%)	118(16.6%)#

注:EH 组与 N 组比较:* $P<0.05$, # $P<0.01$

万方数据

表3 不同年龄组 MMP-9 基因 C-1562T 基因型与等位基因频率比较[例(%)]

	组别	例数	基因型			等位基因	
			CC	TT	CT	C	T
女	EH非老年组	274	201*(73.3%)	6(2.2%)	67(24.5%)	469(85.6%)	79*(14.4%)
	EH老年组	81	44(54.3%)	2(2.5%)	35(43.2%)	123(75.9%)	39(24.1%)
	N非老年组	254	197(77.6%)	6(2.4%)	51(20.0%)	550(87.6%)	63(12.4%)
	N老年组	59	47*(79.7%)	1(1.7%)	11(18.6%)	105(89.0%)	13*(11.0%)
男	EH非老年组	380	276(72.6%)	10(2.7%)	94(24.7%)	646(85.0%)	114(15.0%)
	EH老年组	72	55*(76.4%)	1(1.4%)	16(22.2%)	126(87.5%)	18*(12.5%)
	N非老年组	144	108(75.0%)	6(4.2%)	30(20.8%)	246(85.4%)	42(14.6%)
	N老年组	52	42(80.8%)	1(1.9%)	9(17.3%)	93(89.4%)	11(10.6%)

注:与老年女性EH组比较,* $P<0.01$

血管平滑肌细胞、毛细血管内皮细胞等产生,主要与血管壁细胞外基质的更新有关,故又称基质因子。MMP-9基因位于染色体20q11.2-q13.1,包括13个外显子和12个内含子,共发现10个突变位点。Zhang等[4]研究发现,MMP-9基因C-1562T多态性可能对该基因的表达水平有影响并且和冠状动脉疾病的严重程度有关。具有-1562T等位基因的MMP-9启动子的转录活性是-1562C等位基因的2倍,从而导致细胞外基质降解增强。正常人群MMP-9基因C-1562T多态性频率分布存在种族和地区差异。张雪梅等[5]报道北京地区774例正常人的-1562T等位基因频率为12%,与西班牙人群(10.2%)[6]相近。本研究中正常血压人群的T等位基因频率为12.7%,与张雪梅等的报道近似。

目前大量研究证实,MMP-9基因C-1562T多态性参与了动脉粥样硬化的细胞外基质的降解、中膜平滑肌细胞的增殖、炎症细胞的浸润、板块的破裂等病理过程,促进了冠心病、脑卒中等疾病的发生[7]。但是对于该多态性与高血压的相关关系罕见报道。高血压可能与普遍的血管细胞外基质病理生理学异常有关,MMP-9基因C-1562T多态性可影响血浆MMP-9水平,因此推测该多态性可能与高血压及其并发症的发生有关。目前对于高血压时血浆MMP-9的水平报道不一。Li-Saw-Hee等[8]的研究得出,高血压患者的血浆MMP-9及组织金属蛋白酶抑制因子的浓度均降低。Zervoudaki等[2]也证实高血压患者血浆MMP-9水平较正常血压者偏低。但Tayebjee等[9]在英国斯堪第那维亚心脏试验(ASCOT)的分支研究中得出高血压患者血浆MMP-9水平显著升高,而且血浆MMP-9浓度与心血管危险正相关。具有-1562T等位基因的MMP-9启动子转录活性增强,从而使血浆MMP-9水平升高,细胞外基质出现病理异常,发生高血压及并发症的危险性增加。本研究中高血压组TT+CT基因型频率和T等位基因频率显著高于正常对照组($P<0.05$),说明相对于C等位基因,携带MMP-9-1562T等位基因可能患高血压的风险增加。

Potier等[10]报道雌激素和黄体酮均能够降低主动脉平滑肌细胞内MMP-9的活性,但Crandall等[11]对绝经后妇女研究认为血浆黄体酮与MMP-9呈正相关关系。说明性别可以影响MMP-9生物效应的发挥,但性激素水平与MMP-9的相互影响机制尚未明确。本研究表明,在女性中高血压组的TT+CT基因型频率和T等位基因频率显著高于正常对照组,T等位基因对高血压的OR=1.442(95%CI:1.057~1.968)。而且进行年龄分组后得出,老年女性高血压组的TT+CT基因型频率和T等位基因频率比老年男性高血压患者、非老年女性高血压患者及老年女性正常对照组均明显升高,提示携带MMP-9-1562T等位基因的老年女性患高血压的危险性增加,这可能与老年女性的性激素水平改变有关。故MMP-9 C-1562T基因多态性对高血压易感性的影响可能与性别及性激素水平相关。

总之,MMP-9基因C-1562T多态性与北京城区汉族人群的EH发生可能有关,尤其可能与老年女性EH危险增加相关联,但该基因多态性对EH易感性影响的性别差异机制尚待深入研究。

参考文献

[1] Johnson GC, Todd JA. Strategies in complex disease mapping. Curr Opin Genet Dev, 2000, 10: 330-334.

[2] Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, et al.

万方数据

Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. J Hum Hypertens, 2003, 17:119-124.

[3] Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. J Hypertens, 2003, 21: 1983-1992.

[4] Zhang R, Ye S, Herrmann SM, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinanse B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. Circulation, 1999, 99: 1788-1794.

[5] 张雪梅，缪小平，熊萍，等. 基质金属蛋白酶(MMP)-2和-9功能性单核苷酸多态与胃癌. 癌症，2004，23：1233-1237.

[6] Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, et al. Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. Stroke, 2003, 34:2851-2855.

[7] Zhang B, Dhillon S, Geary I, et al. Polymorphisms in matrix metalloproteinases -1, -3, -9 and-12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. Stroke, 2001, 32: 2198-2202.

[8] Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy. Int J Cardiol, 2000, 75: 43-47.

[9] Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). Am J Hypertens, 2004, 17: 764-769.

[10] Potier M, Karl M, Elliot SJ, et al. Response to sex hormones differs in atherosclerosis-susceptible and -resistant mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285: E1237-E1245.

[11] Crandall C, Palla S, Reboussin B, et al. Cross-sectional association between markers of inflammation and serum sex steroid levels in the postmenopausal estrogen/progestin interventions trial. J Womens Health (Larchmt), 2006, 15: 14-23.

(上接第207页)

参考文献

[1] Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. Circulation, 2004, 109:672-693.

[2] Anon. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet, 1994, 334: 1383- 1389.

[3] Silva M, Matthews MI, Jarvis C, et al. Meta-analysis of drug induced adverse events associated with intensive-dose statin therapy. Clin Ther, 2007, 29: 253-260.

[4] 中华医学会心血管病学分会，中华心血管病杂志编辑委员会，《中国循环杂志》编辑委员会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南. 中华心血管病杂志，2001，29：710-725.

[5] 韩雅玲，栾波. 女性心血管疾病的预防. 见：胡大一，马长生，主编. 心脏病学实践. 北京：人民卫生出版社，2004. 26-29.

[6] Miller VT. Lipids, lipoproteins, women and cardiovascular disease. Atherosclerosis, 1994,108:S73.

[7] Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med, 1996, 335:1001-1009.

[8] Anon. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. N Engl J Med, 1998, 339:1349-1357.

[9] Bays H. Statin safety: an overview and assessment of the data-2005. Am J Cardiol, 2006, 97:6c-26c.

[10] Jacobson TA. Statin safety: evidence from the published literature. Am J Cardiol, 2006,97:52c-60c.

[11] McKermey JM, Davidson MH, Jacobson TA, et al. Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. Am J Cardiol, 2006,97:89c-94c.

万方数据