

汉族人群 MMP-9 基因单核苷酸多态性与 PACG 的相关性

蔡 晖¹, 石华宗¹, 杨豫湘²

作者单位:¹(435000) 中国湖北省黄石市第二医院眼科;
²(435005) 中国湖北省黄石市第五医院眼科
作者简介:蔡晖,本科,副主任医师,研究方向:青光眼、白内障
的临床及基础研究。
通讯作者:蔡晖. caihui2015yk@163.com
收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-09-04

Correlation between extracellular MMP-9 polymorphism and genetic susceptibility of PACG in a Han Chinese population

Hui Cai¹, Hua-Zong Shi¹, Yu-Xiang Yang²

¹Department of Ophthalmology, Second Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, Hubei Province, China; ²Department of Ophthalmology, Huangshi No. 5 Hospital, Huangshi 435005, Hubei Province, China

Correspondence to: Hui Cai. Department of Ophthalmology, Second Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, Hubei Province, China. caihui2015yk@163.com.

Received:2018-05-29 Accepted:2018-09-04

Abstract

• **AIM:** To analyze the association of extracellular matrix metalloprotease 9 (MMP-9) single nucleotide polymorphism (SNP) with genetic susceptibility of primary angle-closure glaucoma (PACG) in a Han Chinese population.

• **METHODS:** Totally 200 PACG patients (PACG group) and 200 healthy people (normal control group) were collected in our hospital from January 2014 to December 2016. Peripheral venous blood was collected and extracted for genomic DNA, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique (PCR-RFLP) was applied to detect the alleles and genotypes of rs2250889, rs2274755 and rs2664538 sites in MMP-9 gene. The frequency distribution of alleles and genotypes in the two groups were calculated by chi-square test, and its association with genetic susceptibility of PACG was analyzed.

• **RESULTS:** There were no statistical differences in age, gender, body mass index, diastolic blood pressure and systolic blood pressure in the two groups ($P>0.05$). The genotype frequencies of rs2250889, rs2274755 and rs2664538 sites in MMP-9 gene were in line with Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype and allele frequency distribution of rs2250889 and rs2664538 sites

were significantly different between the PACG group and the normal control group ($P<0.05$), while the genotype and allele frequency distribution of rs2274755 sites in the two groups had no statistical difference ($P>0.05$). The subjects whose rs2250889 site carrying the CC genotype was susceptible to PACG. Similarly, the rs2664538 site carrying the GG genotype was susceptible to PACG.

• **CONCLUSION:** The rs2250889 and rs2664538 polymorphisms of MMP-9 are correlated with the risk of PACG in a Han Chinese population, while the rs2274755 polymorphism is not related to genetic susceptibility of PACG.

• **KEYWORDS:** primary angle-closure glaucoma; matrix metalloprotease 9; single nucleotide polymorphism; susceptibility; rs2250889; rs2664538

Citation: Cai H, Shi HZ, Yang YX. Correlation between extracellular MMP-9 polymorphism and genetic susceptibility of PACG in a Han Chinese population. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(10):1859-1862

摘要

目的: 探讨基质金属蛋白酶 9 (extracellular matrix metalloprotease 9, MMP-9) 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与汉族人群原发性闭角型青光眼 (primary angle closure glaucoma, PACG) 易感性的关联。

方法: 选取我院 2014-01/2016-12 收治的 200 例汉族 PACG 患者作为 PACG 组,同时招募 200 例汉族体检健康者作为正常对照组。常规外周静脉采集,提取全血基因组 DNA,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 检测两组受检者 MMP-9 基因 rs2250889、rs2274755 及 rs2664538 位点等位基因及基因型,分析等位基因和基因型频率分布及其与 PACG 易感性之间的关系。

结果: 两组受检者年龄、性别、体质量指数、血压等一般资料差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。MMP-9 基因 rs2250889、rs2274755 及 rs2664538 位点基因型频率均符合哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。两组受检者 rs2250889 和 rs2664538 位点基因型及等位基因频率分布差异均有统计学意义 ($P<0.05$),而 rs2274755 位点基因型及等位基因频率分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。rs2250889 位点中携带 CC 基因型人群为 PACG 的易感人群。同样,rs2664538 位点中携带 GG 基因型人群为 PACG 的易感人群。

结论: 汉族人群中, MMP-9 基因 rs2250889 和 rs2664538

位点多态性与 PACG 的发病存在一定关联,而 rs2274755 位点多态性与 PACG 的易感性无关。

关键词:原发性闭角型青光眼;基质金属蛋白酶 9;基因单核苷酸多态性;易感性;rs2250889;rs2664538

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.24

引用:蔡晖,石华宗,杨豫湘. 汉族人群 MMP-9 基因单核苷酸多态性与 PACG 的相关性. 国际眼科杂志 2018;18(10):1859-1862

0 引言

青光眼 (glaucoma) 是全球第二大致盲眼病,我国最常见的青光眼类型是原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma, PACG)^[1]。PACG 是一种不可逆性致盲眼病,以特征性视神经萎缩及视野缺损为主要临床特征^[2]。流行病学研究发现, PACG 的发病与种族、年龄、性别及眼解剖结构等因素密切相关^[3]。研究表明,50 岁及以上人群 PACG 患病率较 50 岁以下人群明显升高,且患病率随年龄的增长而逐渐升高^[4]。最新研究发现, PACG 的发生与小梁网组织细胞外基质的结构和功能及代谢密切相关^[5-6]。基质金属蛋白酶 9 (extracellular matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 又称明胶酶 B,是基质金属蛋白酶家族 (matrix metalloproteinases, MMPs) 成员之一,参与维持正常细胞外基质的结构和功能^[7]。目前,关于 MMP-9 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 PACG 遗传易感性的关系尚未见报道。本研究选取我院 2014-01/2016-12 收治的 200 例汉族 PACG 患者作为 PACG 组,同时招募 200 例汉族体检健康者作为正常对照组,拟通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 检测两组受检者 MMP-9 基因 rs2250889、rs2274755 及 rs2664538 位点等位基因及基因型,探讨其与 PACG 遗传易感性之间的关系。

1 对象和方法

1.1 对象 选取我院 2014-01/2016-12 收治的汉族 PACG 患者 200 例作为 PACG 组,同时招募汉族体检健康者 200 例作为正常对照组。PACG 组纳入标准:(1)年龄 >30 周岁;(2)典型青光眼视野缺损;(3)典型青光眼视神经损害;(4)眼压 >21 mmHg;(5)窄房角, ≥180° 房周的房角关闭;(6)排除各种继发性青光眼,如由葡萄膜炎、眼外伤、晶状体半脱位等引起的青光眼。正常对照组纳入标准:(1)年龄 >30 周岁;(2)无青光眼的症状和体征;(3)无青光眼病史及家族史;(4)无其它眼内疾病。两组受检者的一般临床资料比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。本研究已获得所有患者知情同意,并得到本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有研究对象均于清晨空腹采集外周静脉血 5 mL,使用乙二胺四乙酸钠盐抗凝,颠倒摇匀,将所得血细胞置于 -80℃ 超低温冰箱保存。

1.2.2 全血基因 DNA 提取 参照 Takara 公司全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA,采用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定样本的 DNA 浓度,随后将 DNA 放置于 -80℃ 保存备用。

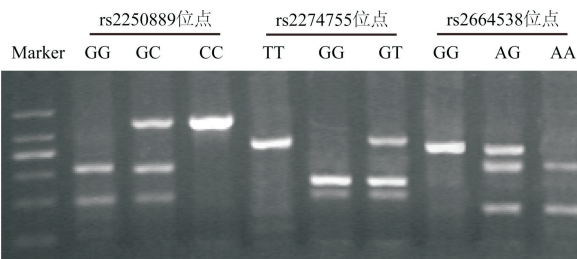


图 1 本组受试者 PCR-RFLP 检测结果。

1.2.3 PCR-RFLP 检测 MMP-9 基因位点 参照 Takara 公司 EmeraldAmp PCR Master Mix 试剂盒进行普通 PCR 反应。PCR 扩增引物由 Takara 公司合成,引物序列见表 2。PCR 反应体系:PCR Master Mix 10 μL,正向和反向引物各 0.5 μL,去离子水 8 μL。PCR 扩增条件:98℃ 预变性 2 min,98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 37 个循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 冷却 30 min。随后采用新英格兰 NEB 公司限制性内切酶切割 PCR 产物,2.0% 琼脂糖电泳检测产物大小。

统计学分析:采用 SPSS21.0 统计软件包和 UNPHASED 3.1.5 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。基因型频率、等位基因频率等计数资料的组间比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-9 基因位点检测结果 本组受试者 PCR-RFLP 检测结果显示,rs2250889 位点未变异,可被 Bsa I 内切酶识别,GG 基因型产生 2 个片段,GC 基因型则产生 3 个片段,而 CC 基因型只有 1 个片段;rs2274755 位点未变异,可被 Bcl I 内切酶识别,GG 基因型产生 2 个片段,GT 基因型则产生 3 个片段,而 TT 基因型只有 1 个片段;rs2664538 位点未变异,可被 CviA II 内切酶识别,AA 基因型产生 2 个片段,AG 基因型则产生 3 个片段,而 GG 基因型只有 1 个片段,见图 1。

2.2 MMP-9 基因位点的多态性分析 采用哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 对基因型频率进行检验,结果表明 MMP-9 基因 rs2250889、rs2274755 及 rs2664538 位点基因型频率均符合哈迪-温伯格平衡。两组受检者 rs2250889 位点基因型和等位基因频率分布比较,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 11.34, 14.66$, 均 $P < 0.001$, 表 3)。两组受检者 rs2274755 位点基因型和等位基因频率分布比较,差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 2.18, 3.69$, $P = 0.36, 0.24$, 表 4)。两组受检者 rs2664538 位点基因型和等位基因频率分布比较,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 9.24, 10.77$, $P = 0.03, 0.01$, 表 5)。

2.3 MMP-9 基因 rs2250889 和 rs2664538 位点与 PACG 易感性分析 rs2250889 位点中 PACG 组 CC 基因型人群比例显著高于正常对照组,故携带 CC 基因型人群为 PACG 的易感人群。同样,rs2664538 位点中 PACG 组 GG 基因型人群比例显著高于正常对照组,故携带 GG 基因型人群为 PACG 的易感人群。

3 讨论

青光眼是临床中一种常见的眼病,其致盲率仅次于白内障,具有较高的遗传患病风险。PACG 是青光眼中发病率较高的一种类型,我国成年人 PACG 的患病率约

表 1 两组受检者的一般临床资料比较

组别	例数	女/男(例)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	体质量指数($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	血压($\bar{x}\pm s$,mmHg)	
					舒张压	收缩压
正常对照组	200	114/86	57.4±5.1	21.8±3.1	78.5±9.9	113.2±15.6
PACG组	200	121/79	55.5±6.2	22.7±2.8	75.4±7.6	115.4±17.8
t/χ^2		2.52	1.93	1.46	2.21	3.57
P		0.98	0.76	0.52	0.54	0.69

注:正常对照组:汉族体检健康者。

表 2 引物序列

SNP 位点	引物类型	引物序列(5'-3')
rs2250889	正向引物	TTCCTGAGAAGCTTAGGGGAGCAG
	反向引物	AGAGGGAGCACGTACTCTCTAGAACC
rs2274755	正向引物	GGAAAATCCAAGAGACCTGGGCGGG
	反向引物	GAATTGCAGGCCACACAGCACTAGT
rs2664538	正向引物	CTTCGAGGGCCGCTCTACTCTGCC
	反向引物	GGCGGAGTCACGGTCTCTGAGGA

表 3 两组受检者 rs2250889 位点基因型和等位基因频率分布比较

例(%)

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	GC	CC	G	C
正常对照组	200	106(53.0)	67(33.5)	27(13.5)	279(69.8)	121(30.2)
PACG组	200	78(39.0)	62(31.0)	60(30.0)	218(54.5)	182(45.5)

注:正常对照组:汉族体检健康者。基因型分布比较; $OR(95\%$ 可信区间):1.86(1.39~2.36);等位基因频率分布比较; $OR(95\%$ 可信区间):1.91(1.43~2.55)。

表 4 两组受检者 rs2274755 位点基因型和等位基因频率分布的比较

例(%)

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	GT	TT	G	T
正常对照组	200	113(56.5)	50(25.0)	37(18.5)	276(69.0)	124(31.0)
PACG组	200	119(59.5)	53(26.5)	28(14.0)	291(72.8)	109(27.2)

注:正常对照组:汉族体检健康者。基因型分布比较; $OR(95\%$ 可信区间):0.52(0.40~1.08);等位基因频率分布比较; $OR(95\%$ 可信区间):0.83(0.61~1.13)。

表 5 两组受检者 rs2664538 位点基因型和等位基因频率分布比较

例(%)

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
正常对照组	200	128(64.0)	54(27.0)	18(9.0)	310(77.5)	90(22.5)
PACG组	200	115(57.5)	48(24.0)	37(18.5)	278(69.5)	122(30.5)

注:正常对照组:汉族体检健康者。基因型分布比较; $OR(95\%$ 可信区间):1.26(1.04~1.85);等位基因频率分布比较; $OR(95\%$ 可信区间):1.51(1.10~2.08)。

为 1.4%,女性患者数量显著高于男性^[8-9]。PACG 的发病与虹膜、晶状体及房角之间的解剖空间密切相关^[10]。PACG 发病主要是由于虹膜和小梁网粘连,导致房水在小梁网处的外流通道堵塞所致。研究显示,短眼轴、前房较浅及晶状体较厚的人群更容易发生 PACG^[11]。PACG 的患病率随年龄的增加而升高,可能是因为晶状体增厚及向前移动导致房角狭窄所致^[4]。

基质金属蛋白酶家族是一类细胞外基质成分,是具有特异性降解作用的锌依赖蛋白水解酶家族^[7]。MMP-9 又称明胶酶 B,是基质金属蛋白酶家族成员之一,可参与细胞外基质成分的降解、重构、血管生成,肿瘤细胞迁移及炎症反应等各种生理和病理过程^[12-13]。研究发现,血清中 MMP-9 的高表达与冠状动脉斑块不稳定、冠状动脉粥样硬化及支架内再狭窄密切相关^[14];MMP-9 活性升高与心

肌缺血再灌注损伤中心肌顿抑有关^[15];MMP-9 在胃癌、肺癌、肾癌和子宫内膜癌等组织呈高表达,且与肿瘤预后密切相关^[16]。此外,高表达的 MMP-9 可促进肿瘤新生血管生成,从而加速肿瘤的生长和侵袭^[17]。

MMP-9 基因位于人类 20 号染色体长臂 1 区 3 带 12 亚带,由 13 个外显子组成,全长 7 654 个核苷酸。截至目前,共发现 155 个 MMP-9 基因 SNP 位点,其中以 rs6558394、rs3918242、rs2274755、rs2250889 及 rs2664538 位点的研究最为广泛。现已证实,汉族人群中,rs3918242 位点多态性与慢性心力衰竭的发病风险密切相关^[18];rs2274755 位点多态性与原发性开角型青光眼易感性相关联^[19];rs2664538 位点多态性与新加坡人群 PACG 无明显相关性,而与台湾人群 PACG 发病存在一定相关性^[20-21]。

本研究选取我院 200 例汉族 PACG 患者作为 PACG

组,同时招募200例汉族体检健康者作为正常对照组,采用PCR-RFLP技术检测两组受检者中MMP-9基因rs2250889、rs2274755及rs2664538位点等位基因及基因型。结果发现,rs2250889和rs2664538位点基因型及等位基因频率分布在PACG组和正常对照组差异显著,提示汉族人群中rs2250889和rs2664538位点多态性与PACG遗传易感性相关,这与既往文献报道的台湾人群^[21]结果一致,而与新加坡人群^[20]不一致,亦表明PACG发病与种族密切相关。本研究两组受试者中rs2274755位点基因型及等位基因频率分布无统计学差异,这与既往研究^[19]结果一致。我们进一步分析MMP-9基因rs2250889和rs2664538位点与PACG易感性的关系,发现rs2250889位点中携带CC基因型人群为PACG的易感人群。同样,rs2664538位点中携带GG基因型人群为PACG的易感人群。

综上所述,本研究表明汉族人群中MMP-9基因rs2250889和rs2664538位点多态性与PACG的发病风险存在一定关联,而rs2274755位点多态性与PACG的遗传易感性无关。本研究不足之处在于临床样本量偏少,后期仍需大规模人群流行病学研究论证上述结论的可靠性。

参考文献

- 1 Pose-Bazarrá S, Azuara-Blanco A. Role of lens extraction and laser peripheral iridotomy in treatment of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2018;29(1):96-99
- 2 Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet* 2017;26(R1):R21-R27
- 3 Cheng JW, Zong Y, Zeng YY, et al. The prevalence of primary angle closure glaucoma in adult Asians; a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(7):e103222
- 4 Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040; a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014;121(11):2081-2090
- 5 Zhou Y, Aref AA. A Review of Selective Laser Trabeculoplasty: Recent Findings and Current Perspectives. *Ophthalmol Ther* 2017;6(1):19-32
- 6 Lai J, Choy BN, Shum JW. Management of Primary Angle-Closure Glaucoma. *Asia Pac J Ophthalmol(Phila)* 2016;5(1):59-62
- 7 Naim A, Pan Q, Baig MS. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *J Clin Exp Hepatol* 2017;7(4):367-372
- 8 He M, Foster PJ, Ge J, et al. Prevalence and clinical characteristics of glaucoma in adult Chinese; a population-based study in Liwan District, Guangzhou. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(7):2782-2788

- 9 Cheng JW, Cheng SW, Ma XY, et al. The prevalence of primary glaucoma in mainland China; a systematic review and meta-analysis. *J Glaucoma* 2013;22(4):301-306
- 10 Ku JY, Nongpiur ME, Park J, et al. Qualitative evaluation of the iris and ciliary body by ultrasound biomicroscopy in subjects with angle closure. *J Glaucoma* 2014;23(9):583-588
- 11 Chen S, Wang W, Gao X, et al. Changes in Choroidal thickness after trabeculectomy in primary angle closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(4):2608-2613
- 12 Chang JJ, Emanuel BA, Mack WJ, et al. Matrix metalloproteinase-9: dual role and temporal profile in intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2014;23(10):2498-2505
- 13 Grzelczyk WL, Szemraj J, Józefowicz-Korczyńska M. The Matrix Metalloproteinase in Larynx Cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2016;70:1190-1197
- 14 Zhang MM, Chang XW, Hao XQ, et al. Association between matrix metalloproteinase 9 C-1562t polymorphism and the risk of coronary artery disease; an update systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2018;9(10):9468-9479
- 15 Zheng XZ, Zhou JL, Ye J, et al. Cardioprotective effect of novel sulphonamides-1,3,5-triazine conjugates against ischaemic-reperfusion injury via selective inhibition of MMP-9. *Chem Biol Drug Des* 2016;88(5):756-765
- 16 Verma S, Kesh K, Gupta A, et al. An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(17):7393-7400
- 17 Zhao K, Yao Y, Luo X, et al. Lyg-202 inhibits activation of endothelial cells and angiogenesis through Cxcl12/Cxcr7 pathway in breast cancer. *Carcinogenesis* 2018;39(4):588-600
- 18 Cong Y, Guo X, Liu X, et al. Association of the single nucleotide polymorphisms in the extracellular matrix metalloprotease-9 gene with PACG in southern China. *Mol Vis* 2009;15:1412-1417
- 19 Suh W, Won HH, Kee C. The association of single-nucleotide polymorphisms in the MMP-9 gene with normal tension glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Curr Eye Res* 2018;43(4):534-538
- 20 Aung T, Yong VH, Lim MC, et al. Lack of association between the Rs2664538 polymorphism in the MMP-9 gene and primary angle closure glaucoma in Singaporean subjects. *J Glaucoma* 2008;17(4):257-258
- 21 Wang IJ, Chiang TH, Shih YF, et al. The association of single nucleotide polymorphisms in the MMP-9 genes with susceptibility to acute primary angle closure glaucoma in Taiwanese patients. *Mol Vis* 2006;12:1223-1232