

· 论 著 ·

MMP-9 血清水平及其基因-1562C/T 多态性与儿童哮喘关系的研究*

朱 洪¹, 覃 西¹, 林亚妹², 谭光宏³

(1. 海南医学院附属医院检验科; 2. 海南医学院附属医院血液透析科, 海口 570102;

3. 海南医学院海南省热带病原学重点实验室, 海口 571101)

摘要:目的 探讨基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 血清水平及其基因-1562C/T 多态性与儿童哮喘的相关关系。方法 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(SELISA)测定 65 例哮喘儿童(病例组)和 68 名健康对照儿童(对照组)血清 MMP-9 水平,并采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术检测 MMP-9 基因-1562C/T 多态性。结果 病例组儿童 MMP-9 血清水平(136.53±29.96)ng/mL 明显高于对照组儿童[(45.08±12.53)ng/mL]($P<0.05$)。病例组和对照组 MMP-9 基因-1562 的 CC、CT、TT 基因型构成比分别为 67.7%、29.2%、3.1% 和 73.5%、25.0%、1.5%, 其 C 和 T 基因频率分别为 82.3%、17.7% 和 86.0%、14.0%, 两组的基因型和基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$)。病例组和对照组中不同基因型儿童的 MMP-9 血清水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 MMP-9 血清水平与儿童哮喘的发生、发展相关,而 MMP-9 基因-1562C/T 的多态性与儿童哮喘发病无关。

关键词:基质金属蛋白酶 9; 儿童; 哮喘

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)24-2407-03

Study on association of serum matrix metalloproteinase-9 concentration and gene -1562C/T polymorphism to childhood asthma*

Zhu Hong¹, Qin Xi¹, Lin Yamei², Tan Guanghong³

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China;

2. Department of Hemodialysis, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 5710102, China;

3. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Etiology, Hainan Medical College, Haikou, 571101, China)

Abstract: **Objective** To explore the association of serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) concentration and gene -1562C/T polymorphism to childhood asthma. **Methods** The serum level of MMP-9 was determined by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (SELISA) method in 65 children with asthma (case group) and 68 healthy children (control group), and the polymorphism of MMP-9 gene -1562C/T was detected by polymerase chain reaction and restriction fragment-length polymorphism (PCR-RFLP) analysis technique. **Results** The serum level of MMP-9 in case group (136.53±29.96)ng/mL was higher than that in control group[(45.08±12.53)ng/mL, $P<0.05$]. The frequency of CC, CT, TT genotype in case group and in control group were 67.7%, 29.2%, 3.1% and 73.5%, 25.0%, 1.5%, and the gene frequency of C and T were 82.3%, 17.7% and 86.0%, 14.0% respectively. There were no statistical significance in genotype and gene frequency between case group and control group ($P>0.05$). There were no statistical significance in serum level of MMP-9 of case group and control group among children with different genotypes ($P>0.05$). **Conclusion** The serum level of MMP-9 is closely associated to the occurrence and development of childhood asthma, but the polymorphism of MMP-9 gene -1562C/T have no correlation with the pathogenesis childhood asthma.

Key words: matrix metalloproteinase 9; child; asthma

支气管哮喘(简称为哮喘)的发生机制十分复杂,迄今尚未完全阐明。气道重塑是支气管哮喘不可逆的气流受限和持续性气道高反应的病理基础^[1]。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在气道壁过多沉积是支气管哮喘气道重塑的重要原因之一,与气道壁纤维化、气流受限密切相关^[2-3]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一个锌、钙依赖的内肽酶的超家族,能够降解 ECM 的大部分成分^[4],在这个超家族中, MMP-9 是降解 ECM 的最主要的蛋白酶。有研究显示, MMP-9 与卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱发的哮喘大鼠模型气道炎症细胞的迁移和气流高反应性有关^[5-6]。本组对 65 例哮喘儿童和 68 例健康对照儿童进行研究,比较两组 MMP-9 血清水平、基因-1562C/T 基因型和基因频率,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自 2007 年 1 月至 2010 年 1 月在本院儿科门诊就诊和住院治疗的哮喘儿童 65 例(病例组),男 32 例,女

33 例,年龄 2~13 岁,平均(8.2±2.3)岁,患儿均符合儿童哮喘防治常规诊断标准^[7]。68 例健康对照儿童均来自同期本院健康体检中心体检的儿童(对照组),男 34 例,女 31 例,年龄 4~14 岁,平均(9.7±2.7)岁。两组儿童的年龄差异和性别分布差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 研究方法

1.2.1 MMP-9 血清水平测定 抽取静脉血 5 mL,在 4℃、离心半径 10 cm, 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清,分装-20℃冷冻保存。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA double sandwich method, SELISA)检测血清中 MMP-9 水平,试剂盒购自美国 Biokey 公司。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,采用酶标仪(美国 BioRad-550)以 492 nm 处读取光密度(optical density, OD)值。

1.2.2 MMP-9 基因-1562C/T 检测^[8] 按 Lahiri 等^[9]的方法从外周血中提取 DNA。上游引物:5'-GCC TGG CAC ATA

* 基金项目:海南省卫生厅自然科学招标课题(琼卫 2008-53)。

GTA GGC CC-3', 下游引物: 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'。多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 反应体积为 50 μ L, 含模板 DNA 1.0 μ g、0.2 mmol/L dNTP、4 U TaqDNA 聚合酶、2.0 mmol/L MgCl₂、1 \times PCR 缓冲液、上下游引物各 60 ng。PCR 循环: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 63 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 74 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物加在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 用溴化乙锭染色, 在紫外灯下观察结果。取 PCR 产物 15 μ L, 加 5 U SphI (MBI 产品) 及相应缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 水浴 16 h, 将酶切产物加在 2% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。采用单因素的方差分析对不同组的 MMP-9 血清水平进行比较, 同时用 χ^2 检验比较不同组的基因型和基因频率, 上述分析均采用双侧检验, 以 $\alpha=0.05$ 为统计意义水准。

2 结 果

2.1 病例组和对照组 MMP-9 血清水平 (图 1) 病例组儿童的 MMP-9 血清水平为 (136.53 \pm 29.96) ng/mL, 对照组儿童的 MMP-9 血清水平为 (45.08 \pm 12.53) ng/mL, 统计分析显示, 病例组儿童的 MMP-9 血清水平显著高于对照组儿童 ($t=23.139, P=0.000$)。

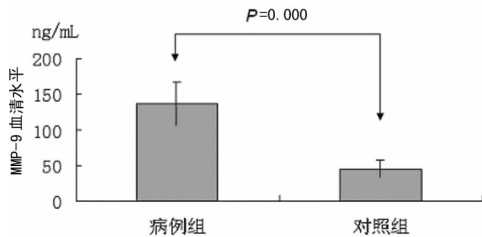


图 1 病例组和对照组 MMP-9 血清水平

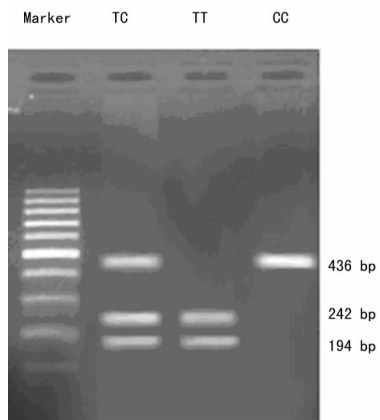


图 2 MMP-9 基因-1562 C/T 多态性的的电泳图

2.2 病例组和对照组 MMP-9 基因-1562C/T 多态性 电泳结果显示 (图 2), TT 基因型可见 194 bp 和 242 bp 两条带; 杂合子 TC 可见 436 bp、194 bp 和 242 bp 三条带; CC 基因型可见 436 bp 单一条带。由表 1 可以看出, 病例组儿童 MMP-9 基因-1562 的 CC、CT、TT 基因型构成比分别为 67.7%、29.2%、3.1%, 对照组儿童 MMP-9 基因-1562 的 CC、CT、TT 基因型分别为 73.5%、25.0%、1.5%, 统计学分析显示, 两组的基因型分布差异无统计学意义 ($\chi^2=0.760, P=0.684$); 病例组儿童 MMP-9 基因-1562 的 C 和 T 基因频率分别为 82.3% 和 17.7%, 对照组儿童 MMP-9 基因-1562 的 C 和 T 基因频率分别为 86.0% 和 14.0%, 统计学分析显示, 两组的基因频率差

异无统计学意义 ($\chi^2=0.692, P=0.405$), 相对危险度 OR = 0.755 (95% CI 为 0.390~1.464)。

表 1 病例组和对照组 MMP-9 基因-1562C/T 多态性

组别	n	基因型[n(%)]			基因频率[n(%)]	
		CC	CT	TT	C	T
病例组	65	44(67.7)	19(29.2)	2(3.1)	107(82.3)	23(17.7)
对照组	68	50(73.5)	17(25.0)	1(1.5)	117(86.0)	19(14.0)
合计	133	94(70.7)	36(27.1)	3(2.3)	224(84.2)	42(15.8)

2.3 不同基因型儿童 MMP-9 血清水平 (图 3) 病例组中 CC 基因型儿童的 MMP-9 血清水平为 (133.59 \pm 29.50) ng/mL, CT 基因型儿童的 MMP-9 血清水平为 (140.67 \pm 31.52) ng/mL, TT 基因型儿童的 MMP-9 血清水平为 (161.56 \pm 13.69) ng/mL。单因素的方差分析显示, 不同基因型儿童的 MMP-9 血清水平差异无统计学意义 ($F=1.093, P=0.342$); 对照组中 CC 基因型儿童的 MMP-9 血清水平为 (44.22 \pm 12.72) ng/mL, CT 基因型儿童的 MMP-9 血清水平为 (46.08 \pm 11.90) ng/mL, TT 基因型儿童的 MMP-9 血清水平为 (58.46 \pm 7.94) ng/mL, 单因素的方差分析显示, 不同基因型儿童的 MMP-9 血清水平差异无统计学意义 ($F=1.319, P=0.274$)。

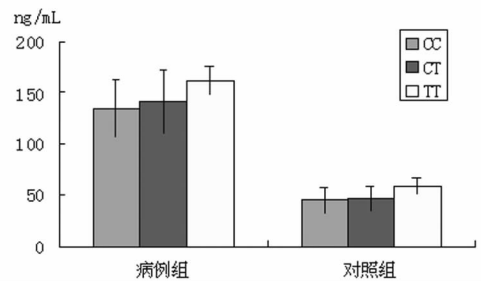


图 3 不同基因型儿童 MMP-9 血清水平

3 讨 论

哮喘的发生机制十分复杂, 迄今尚未完全阐明。气道重塑是哮喘不可逆的气流受限和持续性气道高反应的病理基础^[10]。ECM 在气道壁过多沉积是支气管哮喘气道重塑的重要原因之一。MMP-9 于 1974 年被 Sopata 和 Dancewicz^[11] 发现, 是呼吸系统疾病中主要的 MMP, 具有影响细胞迁移、降解结构蛋白如胶原蛋白和弹性蛋白的能力, 被认为在气道重塑中起着重要的作用^[12-13]。有研究表明, MMP-9 的表达水平与哮喘发作的程度也密切相关^[14]。本组对 65 例哮喘儿童和 68 例健康对照儿童进行研究, 比较两组 MMP-9 血清水平、基因-1562C/T 基因型和基因频率。结果显示, 哮喘儿童的 MMP-9 血清水平显著高于健康对照儿童; 哮喘儿童和健康对照儿童 MMP-9 基因-1562C/T 的基因型和基因频率差异均无统计学意义, 不同基因型儿童的 MMP-9 血清水平差异均无统计学意义。说明 MMP-9 血清水平与儿童哮喘存在一定的关系, 而 MMP-9 基因-1562C/T 多态性与儿童哮喘没有相关关系, 不是易感性基因, 因此需要对其他基因的多态性进行分析。

综上所述, 哮喘是一种复杂的免疫性疾病, MMP-9 参与了哮喘的整个病理过程^[15-16]。本研究发现哮喘儿童 MMP-9 血清水平升高, 与哮喘的发病存在一定的相关性。因此对 MMP-9 进行动态的监测, 有利于病情的估计和判断, 同时对 MMP-9 的研究也具有重大临床意义。相信随着临床研究的不断

断深入, MMP-9 在哮喘中的作用机制也逐渐明确, 也会寻找和研制出有效的相关药物, 为哮喘的治疗和预防带来希望。

参考文献:

- [1] Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma[J]. *Allergol Int*, 2007, 56(4): 331-340.
- [2] 潘春香, 曹亚芹, 罗昌明, 等. 哮喘患者血清 MMP-9 及 TIMP-1 的变化及意义[J]. *江苏医药*, 2010, 36(5): 534-535.
- [3] Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(1): 61-69.
- [4] Donadio AC, Remedi MM, Susperreguy S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and matrix metalloproteinases (MMPs) as regulators of tumor-host interaction in a spontaneous metastasis model in rats[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(6): 1155-1164.
- [5] 乔红梅, 成焕吉, 刘丽, 等. 支气管哮喘患儿血清基质金属蛋白酶-9 和免疫球蛋白 E 含量的检测及相关性分析[J]. *中国妇幼保健*, 2008, 23(34): 4911-4912.
- [6] Liu WJ, Liang ZP, Chen ZY, et al. Role and mechanism of the expression of matrix metalloproteinase 9 and tumor necrosis factor α in upper and lower respiratory tract inflammation in rats[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2011, 46(4): 325-330.
- [7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘防治常规(试行)[J]. *中华儿科杂志*, 2004, 24(2): 100-106.
- [8] Ganter K, Deichmann KA, Heinzmann Al. Association study of polymorphisms within matrix metalloproteinase 9 with bronchial asthma[J]. *Int J Immunogenet*, 2005, 32(4): 233-236.
- [9] Lahiri DK, Schuabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood: Effect of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality[J]. *Biochim Genet*, 1993, 31(7/8): 321-328.
- [10] Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(2): 177-181.
- [11] Sopata I, Dancewicz AM. Presence of a gelatin specific proteinase and its latent form in human leukocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 370(2): 510-523.
- [12] Pinto LA, Depner M, Klopp N, et al. MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children[J]. *Respir Res*, 2010, 11: 23.
- [13] Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion[J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3): 161-168.
- [14] Bosse M, Chakir J, Rouabhia M, et al. Serum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159(2): 596-602.
- [15] 宁方玉, 王晓芝. MMP-9 与支气管哮喘[J]. *滨州医学院学报*, 2007, 30(2): 118-120.
- [16] Tang LF, Du LZ, Chen ZM, et al. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in bronchoalveolar lavage cells of asthmatic children[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2006, 25(1): 1-7.
- (收稿日期: 2011-05-07 修回日期: 2011-06-18)
-
- (上接第 2406 页)
- [11] PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials[J]. *Lancet*, 1998, 352(9124): 257-263.
- [12] Okawara G, Ung YC, Markman BR, et al. Postoperative radiotherapy in stage II or III A completely resected non-small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline[J]. *Lung Cancer*, 2004, 44(1): 1-11.
- [13] Lally BE, Zelterman D, Colasanto JM, et al. Postoperative radiotherapy for stage II or III non-small-cell lung cancer using the surveillance, epidemiology, and end results database[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(19): 2998-3006.
- [14] Douillard JY, Rosell R, De Lena M, et al. Impact of postoperative radiation therapy on survival in patients with complete resection and stage I, II, or III a non-small-cell lung cancer treated with adjuvant chemotherapy: the adjuvant navelbine international trialist association (anita) randomized trial[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 72(3): 695-701.
- [15] Okada M, Nishio W, Sakamoto T, et al. Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78(1): 216-221.
- [16] Buccheri G, Ferrigno D. Serum biomarkers of non-neuroendocrine origin in small-cell lung cancer: a 16-year study on carcinoembryonic antigen, tissue poly-peptide antigen and lactate dehydrogenase. *Lung Cancer* 2000, 30(1): 37-49.
- [17] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(5): 877-885.
- (收稿日期: 2011-03-10 修回日期: 2011-05-17)