

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2016.09.11

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2016.09.11>

· 论著 ·

2型糖尿病视网膜病变与基质金属蛋白酶-3基因多态性关系的研究

杨洁¹, 张铁民¹, 崔秀成¹, 马英慧¹, 王红梅²

(1. 承德医学院附属医院眼科, 河北 承德 067000; 2. 河北省秦皇岛市青龙县中医院, 河北 秦皇岛 066500)

[摘要] 目的: 探讨基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinases-3, MMP-3)基因多态位点与承德地区人群2型糖尿病视网膜病变的遗传易感性的关系。方法: 应用病例对照研究方法, 选取195例糖尿病视网膜病变患者(DR组), 其中非增殖性糖尿病视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)组($n=152$)和增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组($n=43$), 205例单纯糖尿病患者(DM组)和261例正常对照组(Control组), 采用限制性片段长度多态性(restrictive fragment length polymorphism, RFLP)-聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法检测MMP-3的基因多态性。结果: MMP-3-1171 5A/6A的等位基因及基因型频率分布在Control组, DM组和DR组之间差异无显著性($P=0.474$ 和 $P=0.407$)。MMP-3-1171 5A/6A的等位基因及基因型频率分布在NPDR和PDR组之间差异无显著性($P=0.724$ 和 $P=0.820$)。结论: MMP-3-1171 5A/6A基因多态性与2型糖尿病视网膜病变的遗传易感性无关。

[关键词] 基质金属蛋白酶-3; 基因多态性; 糖尿病视网膜病变

Correlation of polymorphism of MMP-3 gene with the risk of type 2 diabetic retinopathy

YANG Jie¹, ZHANG Tiemin¹, CUI Xiucheng¹, MA Yinghui¹, WANG Hongmei²

(1. Department of Ophthalmology Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde Hebei 067000;

2. Qinglong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qinhuangdao Hebei 066500, China)

Abstract **Objective:** To determine the correlation between polymorphism at MMP-3 gene and risk of type 2 diabetic retinopathy (DR). **Methods:** In a hospital-based case-control study, MMP-3 SNP was genotyped by polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis in 195 diabetic retinopathy patients, 205 diabetes mellitus patients and 261 healthy persons as control. **Results:** There is no significant difference between the Control groups, DM group and DR group in allele or genotype distributions of MMP-

收稿日期 (Date of reception): 2016-07-09

通信作者 (Corresponding author): 马英慧, Email: myh1979@aliyun.com

3-1171 5A/6A ($P=0.474$ and $P=0.407$). There is no significant difference between the NPDR and PDR group in allele or genotype distributions of MMP-3-1171 5A/6A ($P=0.724$ and $P=0.820$). **Conclusion:** There is no significant difference between the Control groups, DM group and DRgroup in allele or genotype distributions of MMP-3 -1171 5A/6A.

Keywords matrix metalloproteinases-3 (MMP-3); gene polymorphism; diabetic retinopathy (DR)

根据文献报道, 糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是美国等发达国家4个主要致盲疾患之一^[1]。在中国, 随着人们生活水平的不断提高, 糖尿病的发病率已经超过3.2%, 与之相应的, DR也成为近十年来我国发病率急剧升高的主要疾患^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 依赖的内肽酶家族, 其与结缔组织与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解有关, 并与人体的多种生理和病理过程相关。基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinases-3, MMP-3)是基质金属蛋白酶家族中比较关键的成员之一, 它活化后可以降解层粘蛋白、IV型胶原等多种ECM成分, 而且还能激活其他的MMP, 如激活MMP-1、MMP-2等, 从而加速了糖尿病血管并发症的发生。MMP-3基因启动子区的-1171 5A/6A的多态性会影响MMP-3的转录活性^[3-4]。本研究采用病例对照研究方法, 分析MMP-3-1171 5A/6A基因多态性与承德地区人群2型糖尿病视网膜病变遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象均为承德地区汉族人群, 收集2014年5月至2015年10月本院住院的糖尿病患者, 其中单纯糖尿病组(DM组)205例, 平均年龄(49.06 ± 10.28)岁, 糖尿病视网膜病变患者(DR组)195例, 平均年龄(48.78 ± 10.78)岁。入选患者均符合1997年美国糖尿病协会的2型糖尿病的诊断标准; 糖尿病视网膜病变依据国际糖尿病视网膜病变分型标准诊断, 均经散瞳眼底检查及荧光血管造影检查诊断, 并根据糖尿病视网膜病变国际临床分型标准分为非增殖性糖尿病视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)组($n=152$)和增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组($n=43$)。261例健康对照组

(Control组)来自我院同期健康体检的无关个体, 平均年龄(48.25 ± 11.78)岁。本研究经承德医学院附属医院伦理委员会批准, 所有受试者均告知研究目的并签署知情同意书。本研究经承德医学院附属医院伦理委员会批准, 所有受试者均告知研究目的并签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

收集全部受试对象外周血的标本, 蛋白酶K消化-饱和氯化钠盐析法提取基因组DNA^[5]。

1.2.2 MMP-3 基因多态性基因检测

通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对MMP-3基因上的-1171 5A/6A多态位点进行基因分型。引物设计参考文献^[6], 上游引物CTT CCT GGA ATT CAC ATC ACT GCC ACC ACT; 下游引物: GGT TCT CCA TTC CTT TGA TGG GGG GAA AGA。PCR反应体系25 μ L: 10 \times Taq 缓冲液2.5 μ L, dNTPs(10 mM) 0.5 μ L, $MgCl_2$ (25 mM) 1.5 μ L, Taq 聚合酶0.5 μ L (5 u/ μ L), 上游引物1 μ L, 下游引物1 μ L, ddH₂O 17 μ L, DNA 模板1 μ L (10 pmol)。反应条件: 95 $^{\circ}C$ 预变性5 min, 95 $^{\circ}C$ 变性30 s, 63 $^{\circ}C$ 退火30 s, 72 $^{\circ}C$ 复性30 s, 经过30个循环后, 72 $^{\circ}C$ 总延伸8 min。PCR的扩增产物在限制性内切酶PstI 37 $^{\circ}C$ 的消化过夜后, 用2%琼脂糖凝胶电泳分析MMP-3基因型。

1.3 统计学分析

用SPSS18.0软件进行数据处理。使用行 \times 列表 χ^2 比较正常对照组与病例组间基因型分布频率的差异。认为 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

1) MMP-3 基因-1171 5A/6A 基因型判定: 经过PCR扩增后会出现一条129bp的特异性条带, PstI

作为限制性内切酶进行酶切, 6A/6A基因型上无酶切位点, 因此不能被切开, 只有一条129bp条带; 5A/6A基因型会产生129bp、96 bp、32 bp 3个条带; 5A/5A基因型会产生96bp、32bp 2个条带。

2) MMP-3基因-1171 5A/6A基因型和等位基因频率的比较: 本组资料基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡。

3) MMP-3基因启动子区-1171 5A/6A基因多态性和糖尿病视网膜病变的关系: (见表1)。

Control组, DM组, DR组三组的6A/6A, 5A/6A, 5A/5A基因型频率分别为67.4%, 28.4%, 4.2%; 68.8%, 25.9%, 5.4%; 61.5%, 33.8%, 4.6%。三组之间也无显著差异($\chi^2=3.537$, $P=0.474$)。

Control组, DM组, DR组三组6A、5A等位基因频率分别为81.6%, 18.4%; 81.1%, 18.3%; 78.5%, 21.5%, 三组5A和6A等位基因频率之间无显著差异($\chi^2=1.800$, $P=0.407$)(见表2和表3)。

4) 以国际糖尿病视网膜病变分型作为分层

表1 MMP-3-1171 5A/6A SNP的基因型在正常对照组、糖尿病组和糖尿病视网膜病变组中的分布

Table 1 The genotype of MMP-3-1171 5A/6A in diabetes mellitus without diabetic retinopathy patients, diabetic retinopathy patients and their healthy controls

分组	对照组 [n=261 (%)]	糖尿病组 [n=205 (%)]	糖尿病视网膜病变组 [n=195 (%)]	χ^2 值	P 值
MMP-3-1171 5A/6A genotype					
6A/6A	176 (67.4)	141 (68.8)	120 (61.5)	3.537	0.474
5A/6A	74 (28.4)	53 (25.9)	66 (33.8)		
5A/5A	11 (4.2)	11 (5.4)	9 (4.6)		

表2 MMP-3-1171 5A/6A SNP的等位基因型频率在正常对照组、糖尿病组和糖尿病视网膜病变组中的分布

Table 2 The allelotype frequency of MMP-3-1171 5A/6A in diabetes mellitus without diabetic retinopathy patients, diabetic retinopathy patients and their healthy controls

分组	对照组 [n=261 (%)]	糖尿病组 [n=205 (%)]	糖尿病视网膜病变组 [n=195 (%)]	χ^2 值	P 值
-1171 5A/6A allelotype					
6A	426 (81.6)	335 (81.7)	306 (78.5)	1.800	0.407
5A	96 (18.4)	75 (18.3)	84 (21.5)		

表3 MMP-3-1171 5A/6A SNP的基因型和等位基因型频率在非增殖性糖尿病视网膜病变组和增殖性糖尿病视网膜病变组中的分布

Table 3 The genotype and allelotype frequency of MMP-3-1171 5A/6A in nonproliferation diabetic retinopathy patients and proliferation diabetic retinopathy

分组	非增殖性糖尿病视网膜病变组 [n=152 (%)]	增殖性糖尿病视网膜病变组 [n=43 (%)]	χ^2 值	P 值
-1171 5A/6A genotype				
6A/6A	138 (90.7)	39 (90.7)	0.647	0.724
5A/6A	12 (7.9)	4 (9.3)		
5A/5A	2 (1.4)	0 (0)		
-1171 5A/6A allelotype				
6A	288 (94.7)	82 (95.3)	0.052	0.820
5A	16 (5.3)	4 (4.7)		

标准: NPDR组MMP-3-1171 5A/6A位点6A/6A、6A/5A、5A/5A基因型频率分别为90.7%, 7.9%, 1.4%, 与PDR组(90.7%, 9.3%, 0%)相比差别没有统计学意义($\chi^2=0.647$, $P=0.724$)。两组6A、5A等位基因频率分别为94.7%, 5.3%; 95.3%, 4.7%, 相比差异也无统计学意义($\chi^2=0.052$, $P=0.820$)。

3 讨论

糖尿病视网膜病变是2型糖尿病患者最常见并且最严重的微血管并发症之一。DR的基本病理改变包括: 周细胞选择性的丢失; 基底膜的增厚; 微血管瘤的形成; 内皮细胞的增生以及新生血管的形成。

MMPs是一类Zn²⁺依赖的中性蛋白酶。MMP-3又被称为基质溶解素-1, 能降解纤维结合蛋白、IV型胶原蛋白及层粘连蛋白在内的多种细胞外基质成分, 而这些成分被认为是视网膜屏障的基本结构和功能成分, 可能与糖尿病视网膜病变的发生相关。MMP-3基因位于11q22, 在Ye等^[7]的研究中已经证实人类的MMP-3启动子区域5A/6A基因普遍存在着多态性。这个位点的多态性改变会MMP-3基因的转录活性, 因此影响人体内的MMP-3水平。在Medley等^[8]人的研究中发现了大动脉血管患者中MMP-3 5A/5A基因型的人, 其血管壁中MMP-3的表达和mRNA的转录水平与杂合子基因型(5A/6A)相比是增高的, 而基因型为6A/6A的MMP-3的表达和mRNA的转录水平与之相比则是下降的。

我们的研究结果中未发现DR患者中MMP-3(-1171 5A/6A)基因各基因型和等位基因频率与DM组及正常对照组有显著性差异($P>0.05$), 结果提示我们MMP-3(-1171 5A/6A)基因多态性与2型糖尿病视网膜病变的易感性无关。有研究表明MMP-3(-1171 5A/6A)与大血管疾病的发生相关, 因此我们不能忽略MMP-3(-1171 5A/6A)基因多态性与2型糖尿病视网膜病变易感性之间的联系。本结果显示MMP-3(-1171 5A/6A)基因多态性可能与2型糖尿病视网膜病变的易感性无关, 原因有可能在于DR是一种多基因的遗传病, DR的遗传易感性可能是由多个基因决定的, 其发病可能取决于多个基因独立或是叠加效应。另外不同地区、种族的人群的易感性也可能不同。

参考文献

1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group. Results from the early treatment diabetic retinopathy study[J]. *Ophthalmology*, 1991, 98(suppl 5): 739-840.
2. 潘孝仁, 杨文英, 刘光伟, 等. 1994年中国糖尿病患病率及其危险因素[J]. *中华内科杂志*, 1997, 20(11): 1664-1669.
PAN Xiaoren YANG Wenying, LI Guangwei, et al. Prevalence of diabetes and its risk factors in China, 1994[J]. *National Diabetes Prevention and Control Cooperative Group. Diabetes Care*, 1997, 20(11): 1664-1669.
3. Rundek T, Elkind MS, Pittman J, et al. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study[J]. *Stroke*, 2002, 33(5): 1420-1423.
4. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, et al. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis[J]. *Stroke*, 2002, 33(10): 2408-2412.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3): 1215.
6. Armstrong C, Abilleira S, Sitzer M, et al. Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness[J]. *Stroke*, 2007, 38(11): 2895-2899.
7. Ye S, Watts GF, Mandalia S, et al. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis[J]. *Br Heart J*, 1995, 73(3): 209-215.
8. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, et al. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression[J]. *Circ Res*, 2003, 92(11): 1254-1261.

本文引用: 杨洁, 张铁民, 崔秀成, 马英慧, 王红梅. 2型糖尿病视网膜病变与基质金属蛋白酶-3基因多态性关系的研究[J]. *眼科学报*, 2016, 31(3): 153-156. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2016.09.11

Cite this article as: YANG Jie, ZHANG Tiemin, CUI Xiucheng, MA Yinghui, WANG Hongmei. Correlation of polymorphism of MMP-3 gene with the risk of type 2 diabetic retinopathy[J]. *Eye Science*, 2016, 31(3): 153-156. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2016.09.11