

论著·临床研究

# 基质金属蛋白酶-9 基因多态性与儿童幽门螺杆菌相关性胃十二指肠疾病的关系

单庆文<sup>1</sup> 经承学<sup>1</sup> 王琳琳<sup>1</sup> 吕自力<sup>2</sup> 唐清<sup>1</sup> 云翔<sup>1</sup> 连淑君<sup>1</sup>

(广西医科大学第一附属医院,1. 儿科; 2. 病理科, 广西 南宁 530021)

**[摘要]** 目的 研究基质金属蛋白酶-9(MMP-9)基因启动子多态性与儿童幽门螺杆菌(Hp)相关性慢性胃炎、十二指肠溃疡的易感性和临床特征的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)和测序方法,对100例慢性胃炎及32例十二指肠溃疡儿童和102例健康对照组儿童的MMP-9基因-1562 C/T多态性进行检测。采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测胃黏膜MMP-9 mRNA的表达。结果 MMP-9基因-1562 C/T多态性位点的基因型和等位基因频率在病例组和对照组儿童中的分布无明显差别。在慢性胃炎组中,C/C基因型携带者发生Hp感染的风险是T等位基因(C/T+T/T)携带者的3.1倍。MMP-9基因-1562 C/T多态性不影响MMP-9 mRNA在胃黏膜中的表达水平。结论 MMP-9基因-1562 C/T多态性与儿童慢性胃炎和十二指肠溃疡的发生无相关性,该基因位点的C/C基因型携带者可能与Hp易感性相关。

[中国当代儿科杂志,2010,12(4):262-266]

**[关键词]** 基质金属蛋白酶-9;基因多态性;幽门螺杆菌;胃十二指肠疾病;儿童

**[中图分类号]** R725.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)04-0262-05

## Relationship between gene polymorphisms in MMP-9 and Helicobacter pylori-related upper gastrointestinal disease in children

SHAN Qing-Wen, JING Cheng-Xue, WANG Lin-Lin, LU Zi-Li, TANG Qing, YUN Xiang, LIAN Shu-Jun. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Email: shanqw333@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship of the promoter of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene polymorphisms with the susceptibility and clinical features of Helicobacter pylori (H. pylori)-related chronic gastritis and duodenal ulcer in children. **Methods** One hundred children with chronic gastritis, 32 children with duodenal ulcer and 102 healthy children were enrolled. The promoter of MMP-9-1562 C/T gene polymorphisms were genotyped by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and sequencing. MMP-9 mRNA expression in gastric mucosa was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** The genotype distributions and allele frequencies of MMP-9-1562 C/T gene polymorphisms were similar in gastric upper gastrointestinal disease and healthy subjects. The relative risk for H. pylori infection in C/C genotype carriers was 3.1 times as high as that in T allele (C/T + T/T) carriers in children with chronic gastritis. MMP-9-1562 C/T gene polymorphisms did not affect MMP-9 mRNA expression level. **Conclusions** These data suggest that MMP-9-1562 C/T gene polymorphisms are not associated with susceptibility to chronic gastritis and duodenal ulcer in children. The C/C genotype of MMP-9-1562 C/T gene polymorphism might be associated with H. pylori infection. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(4):262-266]

**Key words:** Matrix metalloproteinase-9; Gene polymorphism; Helicobacter pylori; Upper gastrointestinal disease; Child

近年研究发现人群的不同遗传背景可能造成对某些疾病存在易感性,研究人类基因多态性可以了解各种基因的不同基因型在人群中的分布,有助于从基因水平阐明各种疾病在不同种族、不同人群存在不同发病率和不同临床表现、临床特点的内在机

制,从而筛查出疾病的易感人群,并有可能制定出个体化的治疗方案。幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)感染是全世界最常见的胃肠道感染之一,常可导致胃黏膜的持续定植和慢性炎症,并造成消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤发生的

[收稿日期]2009-10-16; [修回日期]2009-12-03  
[基金项目]广西青年科学基金资助项目(No. 0991030)。  
[作者简介]单庆文,男,博士,副教授,副主任医师。

危险性增加<sup>[1-2]</sup>。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)基因的启动子序列改变可能影响其转录水平的表达,最终可能影响到体内MMP-9的最终生物学效应。本研究拟探讨儿童宿主MMP-9基因-1562C/T位点的多态性对Hp感染的胃黏膜中的表达水平的影响,以及Hp感染的易感性和感染后的胃十二指肠疾病发生的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2006年10月至2007年10月在广西医科大学第一附属医院门诊就诊的具有上消化道不适主诉症状患儿共132例入选病例组,1个月内使用过抗生素、胃酸抑制剂(或铋剂)、非甾体类抗炎药(NSAID)及免疫抑制剂者作为排除标准。经胃镜检查后诊断为慢性胃炎者100例,十二指肠溃疡者32例;年龄3~18(12.5±4.3)岁,其中<5岁组5例,5岁~组18例,10岁~组39例,15岁~组70例;男女比率约为2.2:1(男91例,女41例)。取无任何消化道不适主诉症状的同期中小学生健康体检者102例为健康对照组;年龄5~18(11.5±4.5)岁,其中<5岁组8例,5岁~组21例,10岁~组40例,15岁~组33例;男女比率约为1.9:1(男67例,女35例)。病例组与对照组的年龄及性别比较均差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 标本采集

征得家长同意并签署知情同意书,所有病例均进行胃镜检查,按照全国小儿消化系统疾病会议的胃镜诊断标准进行诊断<sup>[3]</sup>,若诊断为慢性胃炎或十二指肠溃疡者则在胃窦距门口3~5 cm处大弯侧及小弯侧活检胃黏膜4块,其中2块立即置于冻存管投入液氮中保存,再移入超低温冰箱保存备用;1块黏膜行Hp快速尿素酶试验;1块置于10%甲醛中固定后行常规病理组织学检查及Hp检测。所有研究对象均在空腹状态下采肘静脉血3 mL,其中1.5 mL分离血清后行Hp IgG抗体ELISA检测;另1.5 mL用2.5% EDTA抗凝,置-4℃冰箱保存用于DNA提取。

### 1.3 确定胃窦粘膜慢性炎症程度及Hp阳性状态

胃窦粘膜慢性炎症程度根据1996年Sydney胃炎标准<sup>[4]</sup>对病变的分级分为无、轻、中、重4级。根据2003年中华医学消化病学会在安徽桐城制定的《幽门螺杆菌共识意见》<sup>[5]</sup>中的Hp感染的诊断标准确定病例组及对照组病例的Hp感染状态。

### 1.4 PCR-RFLP法鉴定MMP-9基因-1562C/T位点基因型

酚氯法提取血液基因组DNA,PCR扩增MMP-9基因(435 bp) F: 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3', R: 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3',反应体系25 μL,反应体系含基因组DNA模板1 μL, Taq酶0.125 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, 10 μM dNTP 2 μL, 10 μM上、下游引物各0.5 μL, 灭菌注射用水18.375 μL。94℃预变性3 min后进入循环。循环条件: 94℃变性30 s, 65℃退火30 s, 72℃延伸1 min,共32个循环。72℃最后延伸5 min。限制性内切酶酶切: PCR产物10 μL, Sph I 1 μL, 10×Taq I Buffer 2 μL, 0.1% BSA 2 μL, 灭菌注射用水5 μL。37℃水浴箱中温育16 h。以灭菌注射用水替代DNA模板作为阴性对照。以一个确定的基因型作为阳性对照。取酶切产物10 μL与1 μL 10×加样缓冲液混匀,于3%琼脂糖凝胶,电压为6 V/cm电泳120 min,取出琼脂糖凝胶板,置于凝胶电泳成像分析系统下观察。

### 1.5 RT-PCR检测MMP-9 mRNA相对表达水平

随机选取病例组合并Hp感染者(其中慢性胃炎28例、十二指肠溃疡20例)的胃窦黏膜1块(<10 mg),提取总RNA,逆转录合成cDNA后进行PCR扩增。MMP-9(216 bp) F: 5'-GAAGATGCTGCTGTTCAGCG-3', R: 5'-ACTTGGTCCACCTGGT-TCAA-3'; β-actin(114 bp) F: 5'-CGCGAGAAGGT-GACCCAGATC-3', R: 5'-ATCACGATGCCAGTGG-TACGG-3'。25 μL反应体系含cDNA模板2 μL, Ex Taq Hot Start Version 0.125 μL, 10×Ex Taq Buffer 2.5 μL, 10 μM dNTP 2.5 μL, 10 μM上、下游引物各0.25 μL, 灭菌注射用水17.4 μL。反应条件: 94℃预变性1 min, 94℃变性30 s, 58℃(β-actin为60℃)退火30 s, 72℃延伸1 min,共38个循环(β-actin为32个循环), 72℃最后延伸5 min。PCR产物电泳后在凝胶电泳成像分析系统上计算MMP-9与β-actin(作为内参照)表达的灰度值,并计算两者比值作为MMP-9 mRNA的相对表达量。

### 1.6 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件包进行统计处理,基因型分布和等位基因频率比较采用 $\chi^2$ 检验(各群体之间MMP-9-1562C/T基因型分布的实际值与预测值比较须符合Hardy-Weinberg平衡,说明群体基因遗传平衡,数据来自于同一蒙德尔群体,才具可比性)。MMP-9 mRNA相对表达水平用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MMP-9 基因-1562C/T 位点的基因型及序列测定

电泳显示该基因位点的 C/C 基因型仅有 435 bp 片段, T/T 基因型有 247 bp、188 bp 两个片段, C/T 基因型有 436 bp、247 bp、188 bp 3 个片段, 见图 1。对酶切电泳为 C/C、T/T、C/T 基因型的 PCR 产物分别进行 DNA 测序, 结果提示在-1562 位碱基处对应的基因型分别为纯合 C/C、T/T 和杂合 C/T, 见图 2。

### 2.2 与其他地区健康对照组人群中基因型、等位基因频率分布的比较

本研究中该位点基因型及等位基因频率的分布与其他地区及种族总的比较及组间比较中差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

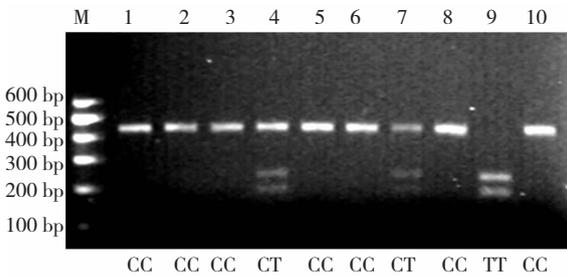


图 1 MMP-9-1562C/T 基因型产物琼脂糖凝胶电泳

M: 100 bp DNA 分子量标准; 基因分型见泳道下方标注。

表 1 健康对照组人群中 MMP-9-1562 位点基因型、等位基因分布比较 [例(%)]

地区	例数	基因型			$\chi^2$ 值	P 值	等位基因		$\chi^2$ 值	P 值
		C/C	C/T	T/T			C	T		
广西(本研究)	102	76(74.5)	26(25.5)	0(0)			178(87.3)	26(12.7)		
荷兰 <sup>[6]</sup>	169	120(71.0)	46(27.2)	3(1.8)			286(84.6)	52(15.4)		
河北 <sup>[7]</sup>	160	134(83.8)	26(16.3)	0(0)			294(91.9)	26(8.1)		
日本 <sup>[8]</sup>	224	156(69.6)	63(28.1)	5(2.2)	8.980	0.175	375(83.7)	73(16.3)	3.121	0.373

表 2 病例组与对照组 MMP-9-1562 位点基因型、等位基因分布的比较 [例(%)]

组别	例数	基因型			$\chi^2$ 值	P 值	等位基因		$\chi^2$ 值	P 值
		C/C	C/T	T/T			C	T		
对照组	102	76(74.5)	26(25.5)	0(0)			178(87.3)	26(12.7)		
慢性胃炎组	100	77(77.0)	19(19.0)	4(4.0)	0.653	0.163	173(86.5)	27(13.5)	0.755	0.686
十二指肠溃疡组	32	27(84.4)	4(12.5)	1(3.1)			58(90.6)	6(9.4)		

### 2.4 基因多态性与 Hp 感染易感性的相关分析

对照组、慢性胃炎组及十二指肠溃疡组的 Hp 阳性率分别为 55.8% (57/102)、56.0% (56/100)、

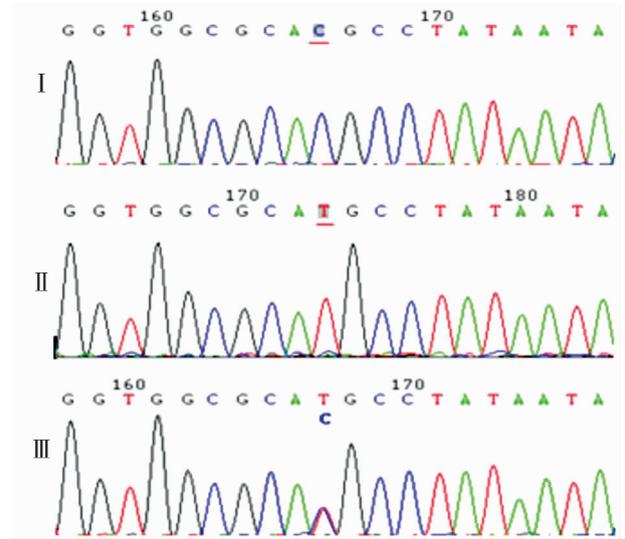


图 2 DNA 测序图

I: C/C 基因型; II: T/T 基因型; III: C/T 基因型

### 2.3 病例组与对照组的基因型、等位基因频率分布差异的比较

MMP-9-1562C/T 位点的基因型分布在对照组、慢性胃炎组及十二指肠溃疡组总的比较及组间比较中差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。该基因位点的 C、T 等位基因的分布在 3 组总的比较及组间比较中差异亦均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

65.6% (21/32)。经卡方检验, 3 组阳性率总的比较及组间阳性率的比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。MMP-9-1562C/T 位点的基因型在 Hp 阳性

与阴性的对照组、慢性胃炎组及十二指肠溃疡组的分布比较中差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表3。在MMP-9-1562C/C纯合子与T等位基因携带者(C/T + T/T)在Hp阳性及阴性病例中的分布比较显示,慢性胃炎组携带C/C基因型者在Hp阳性病例中的分布频率较在阴性病例中更常见(85.7% vs 65.9%  $\chi^2 = 5.457, P < 0.05; OR: 3.103, 95\% CI: 1.172 \sim 8.220$ );但在对照组和十二指肠溃疡组病例中未发现这种趋势。

表3 MMP-9-1562C/T位点基因型在Hp阳性及阴性的病例组和对照组中分布比较 [例(%)]

组别	例数	MMP-9-1562C/T位点基因型			$\chi^2$ 值	P值
		C/C	CT	T/T		
对照组	102					
Hp(-)		36(80.0)	9(20.0)	0(0)	0.111	0.258
Hp(+)		40(70.2)	17(29.8)	0(0)		
慢性胃炎组	100					
Hp(-)		29(65.9)	13(29.5)	2(4.5)	5.912	0.052
Hp(+)		48(85.7)	6(10.7)	2(3.6)		
十二指肠溃疡组	32					
Hp(-)		10(90.9)	1(9.1)	0(0)	0.764	0.682
Hp(+)		17(81.0)	3(14.3)	1(4.8)		

## 2.5 基因型分布与不同疾病的胃窦黏膜炎症程度的关系

MMP-9-1562C/T位点的基因型在慢性胃炎组及十二指肠溃疡组的胃窦黏膜慢性炎症分级分布比较中差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表4。

表4 MMP-9-1562C/T位点基因型在不同程度胃窦黏膜炎症分级中的分布比较 [例(%)]

组别	例数	MMP-9-1562C/T位点基因型			$\chi^2$ 值	P值
		C/C	CT	T/T		
慢性胃炎组	100					
轻度		46(78.0)	10(16.9)	3(5.1)	0.759	0.684
中重度		31(75.6)	9(22.0)	1(2.4)		
十二指肠溃疡组	32					
轻度		9(90.0)	1(10.0)	0(0)	0.886	0.642
中重度		17(77.3)	4(18.2)	1(4.5)		

## 2.6 Hp感染状态下基因多态性对胃窦黏膜MMP-9 mRNA表达水平的影响

慢性胃炎组及十二指肠溃疡组合并Hp感染的MMP-9-1562C/T位点各基因型携带者胃窦黏膜中MMP-9 mRNA相对表达量比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表5。

表5 MMP-9 mRNA相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	MMP-9基因型		t值	P值
		C/C	C/T+T/T		
慢性胃炎组	28	1.43 ± 1.16	1.57 ± 1.12	0.264	0.794
十二指肠溃疡组	20	1.49 ± 0.83	1.38 ± 0.95	0.176	0.862

## 讨论

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组对细胞外基质成分有特异性降解作用的锌依赖性蛋白水解酶,它们分子大小各异,作用底物不尽相同。MMP-9是MMPs家族中分子量最大的酶,其基因位于染色体20q11.1~q13.1,分子量为92 KDa,作用底物主要是IV、V型胶原、明胶等,其中IV型胶原是基底膜的主要成分,因此,MMP-9在组织重塑、细胞迁移、血管生成和炎症等各种生理病理过程中发挥关键作用。

本研究3组研究对象的MMP-9基因-1562C/T多态性位点的基因型分布均符合Hardy-Weiberg平衡,可基本排除因为抽样误差造成的偶然性。研究显示广西地区健康对照组人群与其他地区人群MMP-9基因-1562C/T多态性位点基因型和等位基因频率分布比较差异无统计学意义,所有地区的人群均显示以C/C基因型最常见,其次为C/T、T/T基因型,显示T等位基因较少见<sup>[6-8]</sup>。说明该基因的多态性位点基因型及等位基因频率在不同地域中的分布无明显差别。

本研究显示在慢性胃炎儿童中,MMP-9基因-1562位点C/C基因型携带者发生Hp感染的风险是T等位基因(C/T + T/T)携带者的3.1倍,显示C/C基因型可能与Hp的易感性相关,但在对照组人群和十二指肠溃疡组病例中未发现这种趋势。推测儿童发生Hp感染而导致的早期慢性胃炎过程中,由于T等位基因较C/C基因型的转录活性高,Hp感染可能诱发MMP-9基因-1562位点T等位基因携带者产生更多的MMP-9,在疾病早期MMP-9所起的作用可能主要是清除细菌,使部分儿童可能得益于这种作用而自发清除Hp,而Hp自发清除现象在儿童人群中还是较常见的;反之,C/C基因型携带者因无法清除Hp而造成了感染的持续存在<sup>[9-12]</sup>。但在成人胃癌患者的Hp易感性研究中未发现这种等位基因相关性<sup>[6,8]</sup>,考虑可能是由于疾病后期(消化性溃疡或胃癌)MMP-9的表达所起主要作用(如组织降解和重塑等)发生了改变。

本研究显示在与对照组人群比较中,MMP-9基因-1562C/T多态性位点的不同基因型携带者在慢

性胃炎组及十二指肠溃疡组病例中的分布差异均无统计学意义,基因型分布的频率与不同疾病中胃窦黏膜慢性炎症程度亦无相关性。说明在本研究人群中该基因的多态性与临床表现类型无关。

成人的研究发现, Hp 相关性胃炎个体胃黏膜的 MMP-9 水平较 Hp 阴性胃炎者明显增高,胃癌患者的胃黏膜中 MMP-9 水平亦增高,这种改变可能基于 Hp 感染已经在受检者胃内存在数十年造成的慢性炎症过程,因为 Hp 没有被清除,炎症募集的细胞将刺激释放更多的 MMP-9,后者趋化更多的炎症细胞产生更多的 MMP-9 而形成一个恶性循环,导致组织降解和重塑,严重者最终可造成胃癌的发生<sup>[11,13-15]</sup>。为此,本研究进一步探讨了 Hp 感染存在时不同的 MMP-9 基因-1562C/T 多态性位点基因型是否对胃黏膜 MMP-9 mRNA 的表达产生影响,结果显示在 Hp 感染的胃十二指肠疾病的病例中,虽然在慢性胃炎病例中 T 等位基因携带者胃窦黏膜 MMP-9 表达水平呈很轻微的增高趋势,但该基因-1562C/T 多态性位点的不同基因型或等位基因携带者的胃窦黏膜 MMP-9 mRNA 的相对表达量差异均无统计学意义,这与在成人胃癌患者中的研究结果相类似<sup>[6]</sup>。

总之,本研究显示 MMP-9 基因-1562C/T 多态性位点 C/C 基因型携带者可能与 Hp 的易感性相关,但未显示该基因多态性与其转录水平的高低及疾病发生的种类存在联系,表明可能还存在其他的多态性位点或更重要的因素对 MMP-9 表达的起调节作用,例如在 Hp 感染所造成的胃黏膜局部炎症中产生的细胞因子或不同的 Hp 菌株感染等,这些都有待于将来进一步的研究。

#### [参 考 文 献]

[1] Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1995, 9(Suppl 2):59-69.  
[2] 卢燕鸣,曹兰芳,孔宪明. 小儿幽门螺杆菌相关性疾病[J]. 中

国当代儿科杂志, 2002, 4(6):567-568.  
[3] 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 小儿慢性胃炎、消化性溃疡胃镜诊断标准[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(3):189.  
[4] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis: The updated Sydney System[J]. *Am J Surg Pathol*, 1996, 20(10):1161-1181.  
[5] 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌共识意见(2003·安徽桐城)[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2004, 9(1):59-60.  
[6] Kubben FJ, Sier CF, Meijer MJ, van den Berg M, van der Reijden JJ, Griffioen G, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(6):744-751.  
[7] Shan K, Lian-Fu Z, Hui D, Wei G, Na W, Xia J, et al. Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-7, -9 and the risk of endometriosis and adenomyosis in China[J]. *Mol Human Reprod*, 2006, 12(1):35-39.  
[8] Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(1):19-25.  
[9] Granstrom M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(2):468-470.  
[10] Thomas JE, Dale A, Harding M, Coward WA, Cole TJ, Weaver LT. *Helicobacter pylori* colonization in early life[J]. *Pediatr Res*, 1999, 45(2):218-223.  
[11] Bergin PJ, Raghavan S, Svensson H, Starckx S, Van-Aelst I, Gjertsson I, et al. Gastric gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 is rapidly increased in *Helicobacter felis*-induced gastritis[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, 52(1):88-98.  
[12] Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis[J]. *Circulation*, 1999, 99(14):1788-1794.  
[13] Kubben FJ, Sier CF, Schram MT, Witte AM, Veenendaal RA, van Duijn W, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection favourably affects altered gastric mucosal MMP-9 levels[J]. *Helicobacter*, 2007, 12(5):498-504.  
[14] Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Geleziunas R, Wada A, et al. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor  $\kappa$ B [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(4):983-992.  
[15] Bergin PJ, Anders E, Sicheng W, Erik J, Jennie A, Hans L, et al. Increased production of matrix metalloproteinases in *Helicobacter pylori*-associated human gastritis[J]. *Helicobacter*, 2004, 9(3):201-210.

(本文编辑:黄 榕)