

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.06.017

MMP-9 和 MMP-2 基因多态性与原发性肝癌侵袭转移的关系

吴时胜¹, 邵立华², 李尚日¹, 张 飞¹, 谢 鸿¹, 张春秀¹, 刘桂平¹

Correlation of MMP-9 and MMP-2 Gene SNPs with Hepatocellular Carcinoma Invasion and Metastasis

Wu Shisheng¹, Shao Lihua², Li Shangri¹, Zhang Fei¹, Xie Hong¹, Zhang Chunxiu¹, Liu Guiping¹

1. Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Huangshi, Huangshi 435002, China; 2. Department of Gastroenterology, The Fifth Hospital of Wuhan

Abstract: Objective To investigate the association between MMP-9 and MMP-2 gene SNPs of promoter regions and both infiltration and metastasis in hepatocellular carcinoma. **Methods** PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was applied to detect MMP-2 and MMP-9 promoter SNPs in 28 patients with hepatocellular carcinoma (8 cases with metastasis) and 42 healthy people. **Results** The risk of early metastasis of MMP-9-1562TT genotype was increased up to 1.25-fold (95% CI, 3.64~5.69), compared with MMP-9-1562CC or CT genotype, and irrelevant to the age or gender of patients. The risk of liver cancer in population harboring MMP-9-1562TT and MMP-2-1306CC or CT genotypes was significantly higher than in those harboring MMP-9-1562TT, MMP-2-1306CC or TT alone. **Conclusion** MMP-2-1306T/C polymorphism alone is not a risk factor of primary liver cancer, although has synergistic interactions with MMP-9-1562C/T genotype, MMP-2 and MMP-9 gene polymorphism are related to the infiltration and metastasis of primary liver cancer.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Matrix metalloproteinases-9; Matrix metalloproteinases-2; Single nucleotide polymorphism

摘要:目的 探讨原发性肝癌中 MMP-9 和 MMP-2 基因多态性表达与原发性肝癌侵袭转移的关系。**方法** 用聚合酶链反应—限制性片断长度多态性技术,检测 MMP-2 和 MMP-9 启动子基因型在 28 例原发性肝癌患者(其中 8 例有转移)和 42 例健康者中的频率。**结果** 与携带 MMP-9-1562CC 和 CT 基因型相比,携带 MMP-9-1562TT 基因型者早期发生侵袭转移的风险增加 1.25 倍(95% CI: 3.64~5.69),且这种风险增高与研究对象的年龄和性别无关,同时携带 MMP-9-1562TT 和 MMP-2-1306CC 或 CT 基因型的个体,患肝癌的风险性较单一携带的个体显著增高($P < 0.05$)。**结论** MMP-2-1306T/C 多态性单独与原发性肝癌风险无关,但与 MMP-9-1562C/T 多态性可能有基因-基因交互作用。MMP-2 和 MMP-9 基因多态性与原发性肝癌侵袭转移可能相关。

关键词: 原发性肝癌; MMP-2; MMP-9; 基因多态性

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)06-0683-04

0 引言

近年来随着原发性肝癌早期诊断水平的提高,原发性肝癌的手术并发症和死亡率已显著降低,但肝癌细胞早期侵袭转移仍是原发性肝癌术后高复发的主要原因。因此,深入研究原发性肝癌侵袭与转移的机制,寻找一个适合的标志物,以帮助筛选复发、转移的高危对象并采取及时、合理的综合干预措施以控制原发性肝癌的复发转移,具有很重要的现实意义。目前多数研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)与原发性肝癌的侵袭转移密切相关,

特别是 MMP-9 和 MMP-2 被认为在肿瘤的侵袭转移中发挥重要的作用。本研究探讨 MMP-9 和 MMP-2 基因多态性与原发性肝癌浸润转移的相关性,为肝癌预后判断及治疗提供新的思路和手段。

1 资料与方法

1.1 资料

原发性肝癌组 28 例:诊断根据 2001 年 9 月第八届全国原发性肝癌学术会议上通过的原发性肝癌的临床诊断与分期标准。接受过放化疗、有输血史、有其他心肺肾等重要器官疾病者、有高脂血症、高血压、糖尿病者予以排除;正常对照组 42 例:从门诊健康体检人群中筛选无心肝肺肾等疾病,无高脂血症、无高血压、无输血史、无糖尿病的受检者;有转移组 8 例:经 CT 证实有腹膜淋巴结转移或肺等其他远

收稿日期:2011-07-07;修回日期:2011-12-15

作者单位:1. 435002 湖北黄石,黄石市第二医院消化内科;2. 武汉市第五医院消化内科

作者简介:吴时胜(1961-),男,本科,副主任医师,主要从事消化内科的临床工作

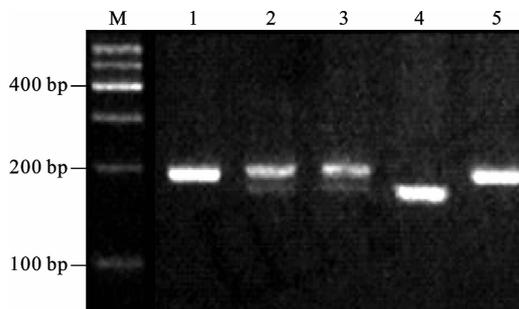
隔器官转移,或者是有门静脉癌栓形成者。所有受检者均无亲缘关系。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提 抽静脉血 3 ml, ACD 抗凝,用低渗法融解红细胞后,加入白细胞裂解液和蛋白酶 K 消化后,采用蛋白酶 K-苯酚-氯仿法抽提基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 根据文献^[1]合成 MMP-9 启动子引物,上游引物 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3',下游引物 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'(由上海生工公司合成),95℃ 预变性 2 min,然后按 94℃ 45 s,61℃ 45 s,72℃ 1 min,重复 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。根据文献^[2]合成 MMP-2 启动子引物,上游引物 5'-CTG ACC CCG AGT CCT ATC TGC C-3',下游引物 5'-TGT TGG GAA CGC CTG ACT TCA G-3'(由上海生工公司合成),94℃ 预变性 2 min,然后按 94℃ 30s,61℃ 35s,72℃ 45 s,重复 35 个循环。PCR 反应体系为 10×buffer 2.5 μl,dNTP(10 mmol/L)0.5 μl,上、下游引物各 5 μl,DNA 模板 5 μl,Taq 酶 2 u,加 ddH₂O 至反应体系为 25 μl。

1.2.3 酶切反应 建立 20 μl 酶切反应体系,其中双蒸水 2.5 μl,缓冲液 2 μl,PCR 产物 15 μl,Pae I 内切酶 5 u,于 37℃ 酶切过夜,酶切产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。具体分型为 MMP-9:CC 型可见 435 bp 1 个基因片断,CT 型可见 435、247 和 188 bp 3 个基因片断,TT 型可见 247 和 188 bp 2 个基因片段。MMP-2:CC 型可见 188 bp 1 个基因片段,CT 型可见 188、162 bp 2 个基因片段,TT 型可见 162 bp 1 个基因片段,见图 1、2。



M:DNA marker; 1,5:CC genotype; 2,3:CT genotype; 4:TT genotype

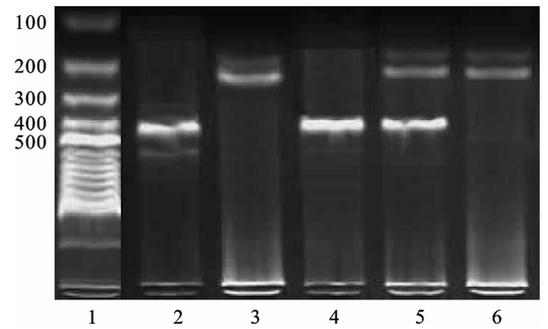
图 1 MMP-2 PCR 产物酶切图

Figure 1 Electrophoresis of MMP-2 PCR products digested by restriction enzyme

1.3 统计学方法

以卡方检验比较各基因型频率在病例组与对照组之间的差异。以比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示各种基因型发生肝癌的风险度。各组基因型和等位基因频率之间比较用 χ^2 检验。计量资料用

$\bar{x} \pm s$,并用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



1:DNA marker;3,6:TT genotype;5:CT genotype;2,4:CC genotype

图 2 MMP-9 PCR 产物酶切图

Figure 2 Electrophoresis for MMP-9 PCR products digested by restriction enzyme

2 结果

2.1 基因型频率分布及其与原发性肝癌的关系

正常对照组中 MMP-2-1306T/C 基因型频率分别为 76.2%(TT)、19.0%(CT)和 4.8%(CC),其分布同样符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P > 0.05$)。原发性肝癌组 TT、CT 和 CC 基因型频率分别为 71.4%、21.4%和 7.1%,与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

在正常对照组中 MMP-9-1562TT、CT 和 CC 基因型频率分布分别为 19.0%、33.3%和 47.6%,其分布与 Hardy-Weinberg 平衡定律计算的结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。在原发性肝癌患者中这 3 种基因型频率分别是 60.7%、21.4%和 17.9%,T 等位基因频率显著高于对照组($P < 0.01$),见表 1。

表 1 患者和对照组 MMP-9 和 MMP-2 各基因型频率分布
Table 1 The frequency of different MMP-9 and MMP-2 genotypes in patients and healthy control

Genotype	Patients group (n=28)n(%)	Control group (n=42)n(%)	OR(95% CI)
MMP-2-1306T/C			
TT	20(71.4)	32(76.2)	1.00
CT	6(21.4)	8(19.0)	1.20(2.76~3.97)
CC	2(7.1)	2(4.8)	10.00(2.88~34.73)
TT	20(71.4)	32(76.2)	1.00
TT+CT	26(92.9)	40(90.5)	1.04(2.03~2.19)
C allele	17.9	14.3	
MMP-9-1562C/T			
CC	5(17.9)	20(47.6)	1.00
CT	6(21.4)	14(33.3)	1.71(2.27~6.63)
TT	17(60.7)	8(19.0)	8.5(2.49~28.99)
CT+TT	23(82.1)	22(52.4)	1.00
TT	17(60.7)	8(19.0)	2.03(1.36~5.60) ^b
T allele	71.4	35.7	

Note:^b: $P < 0.05$,patients group compared with control group

2.2 基因-基因交互作用与原发性肝癌的风险

为了方便比较,将 MMP-2-1306TT 基因型和 MMP-9-1562TT 基因型分别与相应的杂合子基因型合并,同时根据对启动子功能的影响,将 MMP-9-CC+CT 基因型和 MMP-2-1306TT 基因型定为低活性组,以 MMP-9-1562TT 基因型和 MMP-2-1562CC+CT 基因型为高活性组,以效应修饰模型进行基因-基因交互分析。结果发现,携带 MMP-9-1562CC+CT 和 MMP-2-1306CT+CC、MMP-9-1562TT 和 MMP-2-1306TT 以及 MMP-9-1562TT 和 MMP-2-1306CT+CC 基因型者的原发性肝癌发病率分别是携带 MMP-9-1562CC+CT 和 MMP-2-1306TT 基因型者的 0.75 倍(95%CI: 0.58~0.96)、1.64 倍(95%CI: 2.33~6.27)和 1.97 倍(95%CI: 103.31~400.94),风险呈递增趋势,表明 MMP-9 和 MMP-2 两个基因多态在原发性肝癌的发生过程中存在交互作用(似然比检验, $P < 0.05$),见表 2。

表 2 MMP-9 和 MMP-2 各基因型联合作用及其与原发性肝癌的关系

Table 2 The relationship of primary hepatocarcinoma and the combinations between different MMP-9 and MMP-2 genotypes

Genotype		Patients group (n=28)	Control (n=42)	OR(95% CI)
MMP-9	MMP-2	n(%)	n(%)	
CC+CT	TT	4(14.3)	9(21.4)	1.00
CC+CT	CT+CC	1(3.5)	3(7.1)	0.75(0.58~0.96)
TT	TT	16(57.1)	22(52.3)	1.64(2.33~6.27)
TT	CT+CC	7(25.0)	8(19.0)	1.97(103.31~400.94) ^b

Note: ^b: $P < 0.05$, patients group compared with control group

2.3 基因型频率分布及其与原发性肝癌侵袭转移的关系

在原发性肝癌非转移组中 MMP-9-1562TT、CT 和 CC 基因型频率分布为 5.0%、30% 和 65%,其分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。而在转移组中这 3 种基因型频率分别为 62.5%、25% 和 12.5%,表明 T 等位基因频率显著高于非转移组。多因素 Logistic 回归分析结果表明,与携带 MMP-9-1562CC 和 CT 基因型相比,携带 MMP-9-1562TT 基因型者早期发生侵袭转移的风险增加 1.25 倍(95%CI: 3.64~5.69),且这种风险增高与研究对象的年龄和性别无关,见表 3。

在非转移组中 MMP-2-1306C/T 基因型频率分别为 75%(TT)、20%(CT)、5.0%(CC),其分布差异也无统计学意义($P > 0.05$)。转移组 TT、CT 和 CC 基因型频率分别为 62.5%、25% 和 12.5%,与非转移组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 MMP-2 和 MMP-9 各基因型频率在转移组和非转移组中的分布

Table 3 The frequency of different genotypes of MMP-2 and MMP-9 in metastasis group and non-metastasis

Genotype	Metastasis group	Non-metastasis group	OR(95% CI)
	(n=28)n(%)	(n=42)n(%)	
MMP-2-1306T/C			
TT	5(62.5)	15(75.0)	1.00
CT	2(25.0)	4(20.0)	1.50(1.14~1.97)
CC	1(12.5)	1(5.0)	3.00(1.55~5.82)
TT	5(62.5)	15(75.0)	1.00
TT+CT	7(87.5)	19(95.0)	1.10(3.23~3.91)
C allele	25.0	14.3	
MMP-9-1562C/T			
CC	1(12.5)	13(65.0)	1.00
CT	2(25.0)	6(30.0)	4.33(1.42~13.77)
TT	5(62.5)	1(5.0)	0.02(0.48~1.28)
CT+TT	7(87.5)	7(35.0)	1.00
TT	5(62.5)	4(20.0)	1.25(3.64~5.69) ^b
T allele	75.0	20.0	

Note: ^b: $P < 0.05$, metastasis group compared with non-metastasis group

3 讨论

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是细胞生存的重要内环境,在维持正常组织结构与功能及细胞生长、分化过程中起到非常重要的作用。它通过调节与其接触的肿瘤细胞的基因表达,影响肿瘤的代谢、生长及转移。基底膜完整与否是区别良、恶性肿瘤的关键。基质金属蛋白酶(MMPs)几乎能降解所有的细胞外基质及血管基底膜,此外,MMPs 还可以增强血管生长因子的作用,促进新生血管的形成^[2-3],另有报道,有些 MMPs 还可以调节细胞的生长^[4-5]。

活化的 MMP-2 可以降解明胶,IV、V、VII、X 型胶原,但不能降解间质纤维胶原(I、II、III 型)。MMP-2 降解 IV 型胶原有其特殊性,发生在分子中对胃蛋白酶抵抗的片断。Price 等^[6]研究发现, MMP-2 启动子区 1306 T→C 的改变破坏了转录因子 Sp1 的结合位点,从而显著降低启动子活性,携带 CC 基因型的个体 MMP-2 表达水平高于携带 TT 或 CT 基因型的个体。

MMP-9 也可以降解明胶,IV、V、VII、X 型胶原。此外还可以降解弹力纤维,它对完整的基底膜可有降解作用。MMP-9 启动子的 1562 位存在着 C→T 的突变,其多态性所在的启动子区域为一转录抑制因子的识别位点,而 C→T 的突变破坏了抑制因子的识别序列,从而使得具有 1562T 等位基因的 MMP-9 的启动子转录活性是 1562C 等位基因的 2

倍,并且导致其功能发生改变。

本研究表明在原发性肝癌患者中 MMP-9 各基因型频率显著高于对照组。多因素 Logistic 回归分析结果表明,与携带 MMP-9 - 1562CC 和 CT 基因型比较,携带-1562TT 基因型者罹患原发性肝癌的风险增加,这种风险增高与研究对象的年龄和性别无关。这一结果提示,携带-1562TT 基因型可能在原发性肝癌的发生中起一定作用。原发性肝癌组 MMP-2-1306TT、CT 和 CC 基因型频率与对照组比较差异无统计学意义,没有发现该基因单核苷酸多态单独与原发性肝癌风险的关系,但交互作用分析显示,同时具有强启动子活性的 MMP-9-1562TT 和 MMP-2-1306CC 或 CT 基因型者的患病风险增加,表明这两个多态在原发性肝癌的发生中起一定的协同作用。

在原发性肝癌转移组中 MMP-9 - 1562TT、CT 和 CC 基因型频率,T 等位基因频率显著高于非转移组。与携带 MMP-9 - 1562CC 和 CT 基因型相比,携带 MMP-9 - 1562TT 基因型者早期发生侵袭转移的风险增加,且这种风险增高与研究对象的年龄和性别无关。转移组中 MMP-2 - 1306TT、CT 和 CC 基因型频率与非转移组比较差异无统计学意义,表明 MMP-9 - 1562TT 基因可能与肝癌的早期侵袭转移有关。许多研究表明 MMP-2 和 MMP-9 在乳腺癌、肾癌、肺癌以及星形细胞癌等多种肿瘤中高表达,因此被认为在恶性肿瘤的浸润转移中扮演着重要角色^[7-10],吕增发等^[11]运用免疫组织化学的方法,也证实了肝癌组织 MMP - 2、MMP - 9 的表达显著高于正常肝脏组织,且 MMP-2、MMP-9 表达的强弱与肝癌组织的分化、癌组织是否有转移以及癌栓形成有一定关系。戈海泽等^[12]通过测定原发性肝细胞癌患者外周血中 MMP - 2 mRNA、MMP - 9 mRNA 的表达水平,证实了 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 的差异性表达与原发性肝癌临床病理分期及转移密切相关。但是,这些文献并未进一步研究 MMP-2 和 MMP-9 在肝癌中表达水平改变的原因。而基因型的改变与表达水平存在相关性,MMP-2 和 MMP-9 启动子基因多态性可能是 MMP-2 和 MMP-9 表达水平改变的机制。

MMP-9 和 MMP-2 基因多态性与原发性肝癌的发生、发展密切相关,通过荧光定量 PCR 检测外周血 MMP-9 和 MMP-2 基因多态性,可以评价原发性肝癌患者的预后,也可早期采取多种综合治疗措施来延缓原发性肝癌的侵袭转移,提高患者的生活质量。

参考文献:

- [1] Zhang B, Ye S, Herrmann SM, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1999, 99 (14):1788-94.
- [2] Yu C, Pan k, Xing D, et al. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6430-3.
- [3] Huo N, Ichikawa Y, Kamiyama M, et al. MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 177(1):95-100.
- [4] Boulay A, Masson R, Chenard MP, et al. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5):2189-93.
- [5] Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, et al. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (2):577-81.
- [6] Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene; role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10):7549-58.
- [7] Hua P, Gu JM, Xu XF, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its significance in breast carcinoma and corresponding Non-tumor normal tissues [J]. *Zhong Liu Ji Chu Yu Lin Chuang*, 2006, 19(2):113-5. [华平, 古吉敏, 徐祥福, 等. 基质金属蛋白酶-9 在乳腺癌及癌旁正常组织中的表达及意义 [J]. *肿瘤基础与临床*, 2006, 19(2):113-5.]
- [8] Sen T, Dutta A, Maity G, et al. Fibronectin induces matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human laryngeal carcinoma cells by involving multiple signaling pathways [J]. *Biochimie*, 2010, 92(10):1422-34.
- [9] Decock J, Hendrickx W, Drijkoningen M, et al. Matrix metalloproteinase expression patterns in luminal type breast carcinomas [J]. *Dis Markers*, 2007, 23(3):189-96.
- [10] Kim HJ, Park CI, Park BW, et al. Expression of MT - 1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast [J]. *Yonsei Med J*, 2006, 47(3):333-42.
- [11] Lv ZF, Yan QC, Liu YM, et al. Clinical significance of matrix metalloproteinase expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Shanxi Yi Xue Za Zhi*, 2005, 34(6):667-8. [吕增发, 严秦川, 刘玉明, 等. 原发性肝癌中基质金属蛋白酶表达的临床意义 [J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(6):667-8.]
- [12] Ge HZ, Liu SY, Ding X, et al. Expression and clinical significance of peripheral MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA from hepatocellular carcinoma patients [J]. *Guangdong Yi Xue*, 2011, 32 (8):1041-9. [戈海泽, 刘树业, 丁贤, 等. 原发性肝细胞癌患者外周血中 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 的表达及临床意义 [J]. *广东医学*, 2011, 32(8):1046-9.]

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]