

MMP 家族基因与宫颈癌的关系研究

吴椒虹 马必东 陈育梅 陈新艳 吕杰强

【摘要】 目的 利用癌症基因组图谱(TCGA)数据库中宫颈癌的相关数据,研究人乳头瘤病毒(HPV)阳性宫颈癌人群与 HPV 阴性宫颈癌人群的基质金属蛋白酶(MMP)家族相关免疫基因的变化。方法 从 TCGA 数据库中收集宫颈癌患者 137 例及相关数据信息,分为 HPV 阴性宫颈癌组和 HPV 阳性宫颈癌组。利用 EdgeR 计算分析所有样本的转录组测序(RNA-Seq)数据,寻找两组之间差异表达的基因;并利用基因本体(GO)对表达差异的基因进行生物功能富集分析;利用 RNA-Seq 及拷贝数变异等数据,对 MMP 家族相关免疫基因进行分析;利用 Kaplan-Meier 分析评估 MMP 家族免疫特征基因对患者总生存期和无进展生存期的影响。结果 通过 EdgeR 计算分析发现,两组之间有 2 368 个基因的表达差异有统计学意义($P < 0.01$);其中有 823 个基因表达上调,1 545 个基因表达下调。通过 GO 进行功能富集分析发现,表达上调的差异基因主要富集在免疫反应通路上。MMP 家族 3 个免疫基因的变化在拷贝数变异和 mRNA 表达上相关联,当基因的拷贝数扩增时,mRNA 表达相应上调,反之亦然。MMP-1、MMP-3、MMP-13 基因对 HPV 宫颈癌患者的总生存期和无进展生存期均无明显影响。结论 与 HPV 阴性宫颈癌患者相比,HPV 阳性宫颈癌患者中有大量差异表达的基因,表达上调的基因主要富集在免疫通路上,其中免疫基因 MMP-1、MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表达与拷贝数变异类型相关联;有多种免疫通路上的基因都会影响 MMPs 家族免疫基因的改变,从而诱发癌症。

【关键词】 宫颈癌 人乳头瘤病毒 富集分析 基质金属蛋白酶 免疫基因

Association between MMP family genes and cervical cancer. WU Jiaohong, MA Bidong, CHEN Yumei, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Clinical College of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

【Abstract】 Objective To investigate the association between metalloproteinase (MMP) family-related genes and cervical cancer. Methods The data of 137 patients with cervical cancer were collected from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, including 7 HPV-negative cases and 130 HPV-positive cases. The RNA-Seq data of all samples were analyzed by edgeR calculation, the differential expression genes were selected and the gene ontology(GO) was used for functional enrichment analysis. CNV and other data of the MMP family genes were explored and demonstrated further. Kaplan-Meier analysis was used to assess the impact of MMP family immune signature genes on overall survival and progression-free survival in patients. Results Using edgeR analysis, 2 368 differentially expressed genes were found in two group ($P < 0.01$). Functional enrichment analysis by GO revealed that genes with differential expression were significantly enriched in immune response pathways. According to comprehensive analysis, we found that the three core MMP family immune genes were associated with CNV and mRNA expression. When CN amplified, mRNA expression was up-regulated, and vice versa. MMP-1, MMP-3 and MMP-13 genes was not correlated with overall survival and progression-free survival of patients with HPV-positive cervical cancer. Conclusion Compared with HPV-negative cervical cancer patients, there are a large number of differentially expressed genes in HPV-positive cervical cancer patients, which mainly concentrated in the immune pathway. The expression of immune genes MMP-1, MMP-3 and MMP-13 are related to the CNV type. There are many genes on the immune pathway would influence the changes of the MMPs family genes, thus inducing the generation of cancer.

【Key words】 Cervical Cancer HPV Enrichment analysis MMP Immune genes

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.2.2018-2181

基金项目:浙江省自然科学基金(LY16C120001)

作者单位:325000 温州医科大学第三临床学院(温州市人民医院)妇产科(吴椒虹、陈育梅、陈新艳);温州市中医院肿瘤科(马必东);温州医科大学附属第二医院妇科(吕杰强)

通信作者:吕杰强, E-mail: jieqianglu@126.com

宫颈癌是指发生在子宫阴道及子宫颈管的恶性肿瘤,是女性常见的恶性肿瘤之一。在发展中国家,宫颈癌是女性中比较高发的癌症,仅低于乳腺癌,位居第二^[1]。宫颈癌发生的主要原因是人乳头瘤病毒(HPV)感染^[2]。HPV 感染的宫颈癌患者大多都是由于 HPV 的持续感染所导致,且人体自身的免疫系统无法清除 HPV。已有研究证明,HPV 的 E6 和 E7 蛋白表达,是宿主的信号转导和细胞运输的关键免疫调节剂^[3]。当 HPV 侵袭人体时,机体会对病毒作出相应的应答反应,此过程涉及多种信号通路,如磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K-AKT)信号通路、转化生长因子 β (TGF- β)信号通路、细胞死亡肿瘤坏死因子(Cell Death TNF)信号通路、细胞外基质受体相互作用(ECM-receptor interaction)信号通路等,上述几种通路都是重要的免疫通路,常常是癌症发生的重要途径。其中,M-receptor interaction 信号通路中主要的家族成员是基质金属蛋白酶(MMP),MMP 除了参与正常生理过程中细胞外基质的分解,还能破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中起关键性作用。本研究主要利用癌症基因组图谱(TCGA)中宫颈癌的相关数据进行研究,了解 HPV 阳性宫颈癌人群与 HPV 阴性宫颈癌人群差异表达的基因并分析其功能路径,重点探讨宫颈癌中 MMP 家族相关免疫基因的变化,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 资料来源 从 TCGA 数据库中收集了 137 例宫颈癌患者的临床及数据信息(具体网站:<https://cancergenome.nih.gov> 和 <http://www.cbioportal.org>)。根据是否感染 HPV,将 137 例患者分为两组:一组为 HPV 阴性宫颈癌组(7 例);另一组为 HPV 阳性宫颈癌组(130 例,HPV16、18 高危型)。

1.2 方法

1.2.1 差异基因表达分析 利用 EdgeR 统计软件(版本 3.18.1),采用 the exact negative binomial test 检验方法,计算分析 137 例患者的转录组测序(RNA-Seq)数据,寻找 HPV 阳性宫颈癌人群与 HPV 阴性宫颈癌人群之间差异表达的基因,通过 P 值($P < 0.01$)来确定表达差异显著的基因。以 $-\log_{10}(P\text{-value 值})$ 为纵坐标, $\log_2(FC, \text{表达量差异倍数})$ 为横坐标,绘制差异表达基因的火山图。

1.2.2 差异基因功能富集分析 利用 Biomart 数据库(<http://plants.ensembl.org/biomart>),对差异基因进行基因本体(GO)生物功能富集分析,寻找富集基因的相关通

路。以富集显著性为横坐标,以通路名称为纵坐标,分别绘制出表达上调基因与表达下调基因生物功能的富集分析柱状图。

1.2.3 综合分析 在 cBioPortal(<http://www.cbioportal.org/>)上使用 OncoPrinter 软件(版本 1.0.1),从表达差异的基因群中筛选出有显著性差异的免疫通路基因;对其 RNA-Seq 数据、拷贝数和突变进行综合分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件。采用 Kaplan-Meier 法计算生存率并绘制生存曲线,生存期的比较采用 log-rank 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因表达分析 将 137 个样本分为 HPV 阳性宫颈癌组(130 例)和 HPV 阴性宫颈癌组(7 例)。两组间有 2 368 个基因的表达差异有统计学意义($P < 0.01$);与 HPV 阴性宫颈癌组相比,HPV 阳性宫颈癌患者中有 823 个基因表达上调,包括 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13,3 个基因的差异倍数均 ≥ 2 倍;1 545 个基因表达下调,见图 1(插页)。

2.2 差异基因功能富集分析 分别对表达上调的 823 个基因和表达下调的 1 545 个基因生物功能进行富集分析,结果见图 2。表达上调的差异基因在“免疫反应”“DNA 复制”“先天免疫反应”“免疫反应调节”“补充激活途径”这 5 个通路中富集较显著。上述 5 个通路中有 4 个与免疫通路相关,其中在“免疫反应”的通路中富集最显著。表达下调的差异基因主要在“依赖 DNA 转录调节”通路上显著富集,显著富集的通路中没有上述相关的免疫通路,甚至没有富集到免疫通路上。

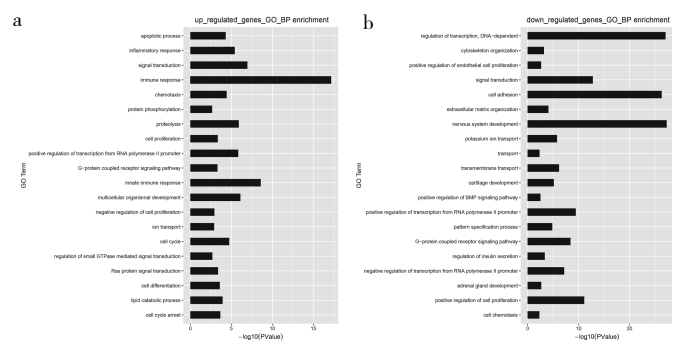


图 2 HPV 阴性宫颈癌患者与 HPV 阳性宫颈癌患者之间差异基因的 GO 生物功能的富集分析(a 与 b 分别为表达上调基因与表达下调基因 GO 富集分析的柱状图;图中横坐标表示富集显著性;纵坐标表示富集程度较高的通路名称)

2.3 MMP 家族 3 个免疫基因的综合聚类分析 见图 3、4(插页)。

由图 3a 可见,将 130 例 HPV 阳性宫颈癌者分别根据生命状态和疾病状态分组,从上述免疫通路中筛选出不同组别中差异表达的免疫基因进行重叠分析,筛选出 22 个共有差异表达的基因,其中包含了 MMP 基因家族的 MMP-1、MMP-3、MMP-13。由图 3b 可见,HPV 阴性宫颈癌组中,MMP-1、MMP-3、MMP-13 mRNA 表达和拷贝数均无变化;在 HPV 阳性宫颈癌组中,MMP-1、MMP-3、MMP-13 分别有 13%、12% 和 11% 的样本发生了基因表达和(或)拷贝数变化,3 个基因表达变化的趋势一致,当基因拷贝数扩增时,mRNA 的表达相应上调,反之亦然。也有极少数样本出现拷贝数的深度缺失和错义突变。由图 3c 可见,基因的表达热图可反映 mRNA 的表达情况,基因表达上调时,热图中显示的颜色加深。此项综合分析结果显示,MMP 家族 3 个免疫基因拷贝数变异类型与 mRNA 的表达具有一致性。

由图 4 可见,HPV 阳性宫颈癌组中,基因组区域的频繁增益及扩增与基因表达量的增加是一致的,拷贝数增加,基因表达量也明显增加;与 HPV 阴性宫颈癌组相比,任何一种拷贝数变异类型,HPV 阳性宫颈癌组中的 MMP-1、MMP-3、MMP-13 的表达量均明显增加。

2.4 MMP 相关的免疫基因与宫颈癌患者复发及生存的关系 见图 5(插页)。

由图 5 可见,利用 Kaplan-Meier 法分析 MMP-1、MMP-3、MMP-13 对患者总生存期的影响,只有 MMP-1 基因变化的患者与无 MMP-1 基因变化的患者相比,其存活的时间可能更长,但差异无统计学意义($P > 0.05$);有 MMP-3 或 MMP-13 基因变化的 Kaplan-Meier 分析结果与 MMP-1 一致,总生存期比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。含有其中任何一个 MMP 基因变异的患者与无任何基因改变的患者相比,总生存期差异无统计学意义($P > 0.05$)。MMP-1、MMP-3、MMP-13 对患者无进展生存期的变化无明显影响。

3 讨论

大多数宫颈癌是由 HPV 感染导致的。HPV 感染主要是影响机体的免疫系统,当免疫通路上的基因发生改变时,就会影响免疫系统对 HPV 的清除能力,使病毒持久性感染,最终导致肿瘤的生成。由此可见,免疫系统在肿瘤进展方面起着至关重要的作用。

本研究对差异表达的基因进行功能富集的结果表明,表达上调的基因主要在免疫相关的通路中显著富集;而表达下调的基因没有在免疫相关的通路上显著富集,说明 HPV 主要导致了人体免疫途径相关基因表达的

上调,HPV 对免疫途径的基因影响较大。由于 HPV 导致的宫颈癌主要是由于 HPV 侵袭人的表皮和黏膜鳞状上皮细胞,不断突破上皮下基底膜,浸润间质,最终形成宫颈癌。整个过程涉及细胞外基质和基底膜的降解^[4],而 MMP-1、MMP-3、MMP-13 属于 MMP 家族的成员,该酶是一种蛋白质水解酶,在肿瘤转移过程中发挥重要作用^[5]。

MMP 家族成员是人体内降解细胞外基质的关键酶系,已有研究表明 MMP 与宫颈癌有很强的相关性^[6]。身体中的大多数细胞都表达 MMP,在正常细胞中,MMPs 的表达很低,维持健康的结缔组织重塑。然而,在病理条件下,MMP 的表达水平显著增加,导致结缔组织被破坏^[7]。有研究显示,MMP-1 增加肿瘤的遗传易感性可能主要是通过细胞微环境的改变来影响细胞的转化与肿瘤的发生。例如,MMP 释放出 TGF- α 的细胞膜结合前体,而 TGF- α 是另一种与细胞转化和癌症发生有关的重要生长因子^[8]。Brummer 等^[9]发现在宫颈癌组织中 MMP-1 的表达增多,并且随着肿瘤分级和分期的升高而增加,在宫颈癌新生血管发芽时 MMP-1 的表达显著增强,在宫颈癌血管新生中发挥着重要作用,从而促进肿瘤的生长和转移。

本研究观察到 MMP 家族 3 个基因——MMP-1、MMP-3、MMP-13 是重要的免疫基因,其 mRNA 表达与拷贝数变异类型相关联。此外,这 3 个基因全部分布在 Chr11 染色体上的 q22.2 区域中,而这个染色体区域是已知的 HPV 的频繁整合位点。这 3 个免疫基因拷贝数变异发生在已知的 HPV 整合位点上,表明至少在一些患者中病毒的整合是基因组扩增的驱动力,最后导致基因的表达增加。但是在数据分析中发现,有些患者的 MMP 3 个基因 mRNA 表达虽然增加,但是并没有观察到结构的变异,说明可能存在其他的机制导致其 mRNA 表达的提高。MMP 家族的免疫基因变化对宫颈癌患者的总生存期和无进展生存期没有显著影响,需要更多样本作进一步分析。

虽然研究中主要探讨了 3 个核心免疫基因的特征性变化,但是基因富集的免疫途径中有很多其他基因,这些基因与 MMP-1、MMP-3、MMP-13 的关系及所在通路如图 6 所示:MMP 的 3 个核心基因处在 TNF 信号通路的最下游,但是与多个免疫通路相关联。其中 ErbB/RAS/PI(3)K 信号通路中的 KRAS 是一个重要的癌症驱动基因。已有研究表明,HPV 阴性宫颈癌患者在 KRAS 等关键致癌基因中显示出高频率的激活突变,而且 KRAS 突变也是肺腺癌中最常见的驱动基因^[10]。KRAS

下游的基因磷酸酯酶 D1(PLD1)是一种重要的特异磷脂酶,能催化卵磷脂生成磷脂酸和胆碱,G 蛋白偶联受体和受体酪氨酸激酶的刺激,均可以激活这种水解,该过程与许多细胞通路有关,包括信号转导、膜转运和有丝分裂的调节,包括免疫反应中的嗜酸性粒细胞 CCR3 信号^[11];已有报道 PLD1 与乳腺癌、卵巢癌和胃癌等多种癌症相关^[12-14]。

综上所述,免疫系统在癌症的发展过程中发挥着重要的作用,与 MMP 相关的互作基因在免疫系统中都是一个关键的基因位点,任何一个基因的变化都有可能影响 MMP 表达,从而诱发肿瘤的形成。MMP 免疫基因在肿瘤发展的过程中至关重要,未来可以成为肿瘤研究和开发抗肿瘤药物有吸引力的靶点。

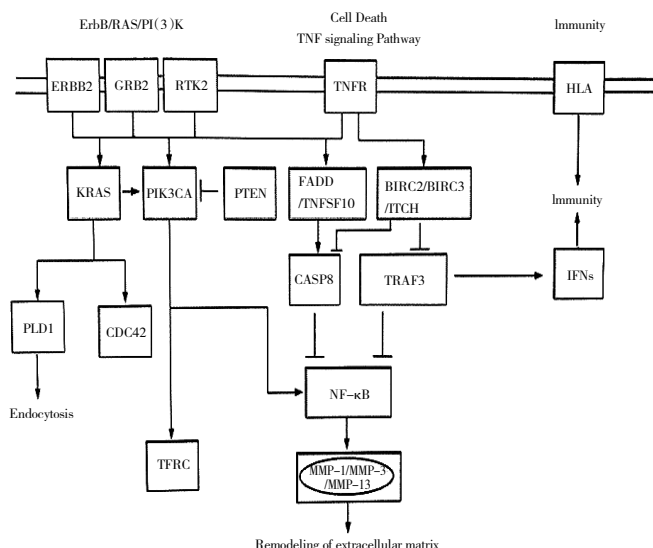


图 6 MMP-1、MMP-3、MMP-13 基因与免疫相关途径的通路关系

4 参考文献

[1] Small Jr W, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: A global health crisis[J]. *Cancer*, 2017, 123(13):2404-2412.
[2] Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, et al. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2001, 19(7):1906-1915.

[3] 蒋桔莲,陈健,钟倩怡,等. 宫颈癌及癌前病变患者 HPV 感染与机体免疫状态的研究[J]. *浙江医学*, 2015, 37(19):1578-1581.
[4] 唐田娟. 基质金属蛋白酶基因多态性同宫颈患病风险的 meta 分析[D]. 广西医科大学, 2015.
[5] Lahmann C, Young AR, Wittern KP, et al. Induction of mRNA for matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human skin in vivo by solar simulated radiation[J]. *Photochemistry & Photobiology*, 2010, 73(6):657-663.
[6] 罗春芳,朱润庆,王晖,等. 环氧化酶-2 和基质金属蛋白酶-9 在宫颈癌中的表达及其临床意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(7):526-530.
[7] Paula Borden, Renu A. Heller. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases[J]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 1997, 7(1-2):159-178.
[8] Gomes JR, Omar NF, Neves JD, et al. Immunolocalization and activity of the MMP-9 and MMP-2 in odontogenic region of the rat incisor tooth after post shortening procedure[J]. *Journal of Molecular Histology*, 2011, 42(2):153-159.
[9] Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, et al. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation—an immunohistochemical study[J]. *Gynecologic Oncology*, 2002, 84(2):222-227.
[10] Greulich H. The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies[J]. *Genes & Cancer*, 2010, 1(12):1200-1210.
[11] Zhang Y, Frohman MA. Cellular and physiological roles for phospholipase D1 in cancer[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(33):22567-22574.
[12] Kang DW, Min DS. Platelet derived growth factor increases phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression via NFkappaB signaling pathway and enhances invasion of breast cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2010, 294(1):125-133.
[13] Cho JH, Hong SK, Kim EY, et al. Overexpression of phospholipase D suppresses taxotere-induced cell death in stomach cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(5):912-923.
[14] Luquain C, Singh A, Wang L, et al. Role of phospholipase D in agonist-stimulated lysophosphatidic acid synthesis by ovarian cancer cells[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(10):1963-1975.

(收稿日期:2018-08-27)

(本文编辑:马雯娜)