

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.02.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 02-0042-05

MMP-7、MMP-9 基因多态性与 结直肠癌发病的关系研究*

魏双琴, 李迎春, 张成, 徐继, 金丽雯

(上海市浦东新区健康医学院附属周浦医院 消化内科, 上海 201318)

摘要: 目的 探讨癌胚抗原 (CEA)、糖类抗原 199 (CA199)、基质金属蛋白酶-7 (MMP-7) -181A/G、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) P574R 基因多态性与结直肠癌发病的关系。**方法** 以 500 例健康体检志愿者作为研究对象, 按血清 CEA、CA199 水平将其分为高表达组和正常组, 并统计结直肠癌的发病率。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法分析 MMP-7 基因 -181A/G 位点、MMP-9 基因 P574R 单核苷酸多态性分布频率, 分析其与临床资料关系。**结果** 高表达组结直肠癌发病率高于正常组 ($P < 0.05$), 高表达组 MMP-7 GG+AG 基因型比例多于正常组 ($P < 0.05$), 高表达组中 G 等位基因频率高于正常组 ($P < 0.05$), 两组 MMP-9 PP、PR+RR 基因型表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结直肠癌患者 MMP-7 GG+AG 基因型频率高于健康人群 ($P < 0.05$), 结直肠癌患者 MMP-9 PR+RR、PP 基因型频率与健康人群比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), MMP-7、MMP-9 基因多态性与结直肠癌 TNM 分期、淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。**结论** CEA、CA199 对结直肠癌的早期诊断有一定临床价值, MMP-7 基因 -181 GG+AG、MMP-9 P574R PP 基因型可能与结直肠癌的发生、发展有关。

关键词: 基质金属蛋白酶-7; 基质金属蛋白酶-9; 单核苷酸多态性; 结直肠癌

中图分类号: R574

文献标识码: A

Correlations of MMP7 and MMP9 gene polymorphisms with incidence of colorectal cancer*

Shuang-qin Wei, Ying-chun Li, Cheng Zhang, Ji Xu, Li-wen Jin

(Department of Gastroenterology, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China)

Abstract: Objective To investigate the associations of CEA, CA199, MMP7 gene -181A/G polymorphism, MMP9 gene P574R polymorphism with the incidence of colorectal cancer. **Methods** A total of 500 cases of healthy physical examination were raised and divided into high-expression group and normal group according to the serum levels of CEA and CA199, and the incidence of colorectal cancer was statistically detected. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism was used to analyze the frequency of MMP7 gene -181A/G and MMP9 gene P574R single nucleotide polymorphisms (SNPs). And the correlations of the SNPs with clinical indexes were analyzed. **Results** The incidence of colorectal cancer in the high-expression group was higher than that in the normal group ($P < 0.05$) and the patients with MMP7 GG +AG genotype were more in the high-expression group than in the normal group ($P < 0.05$). G allele frequency in the high-expression group was higher than that in the normal group ($P < 0.05$). There was no obvious difference in the MMP9 PP or PR+RR genotype expression between the two groups ($P > 0.05$). The frequency of MMP7 GG+AG genotype in colorectal cancer patients was higher than that in the healthy people ($P < 0.05$), while the frequency of MMP9 PR+RR or PP genotype was not significantly different

收稿日期: 2016-08-08

* 基金项目: 上海市浦东新区科技发展基金 (No: PKJ2015-Y31)

between the patients and the healthy people ($P > 0.05$). *MMP7* and *MMP9* gene polymorphisms were associated with TNM staging and lymphatic metastasis ($P < 0.05$). **Conclusions** CA199 and CEA have some clinical value in early diagnosis of colorectal cancer. *MMP7*-181 GG+AG and *MMP9* P574R PP genotypes may be related to the occurrence and development of colorectal cancer.

Keywords: matrix metalloproteinase 7; matrix metalloproteinase 9; single nucleotide polymorphism; colorectal cancer

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一^[1],大量研究证实结、直肠癌的发生、发展与多种基因的突变、DNA异常修复等有关^[2-3]。由于饮食习惯和生活环境的改变,结直肠癌的发病率和死亡率逐年上升,有数据显示结直肠癌死亡人数占癌症患者死亡的9%^[4],结直肠癌患者就诊时,肿瘤已经进展至中、晚期,术后5年生存率差强人意,因此结直肠癌的早期诊断对提高患者生存期至关重要^[5]。目前大量研究证实,多种易感基因多态性与结直肠癌的发生、发展有关,其中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是常见的基因多态性形式之一^[6]。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原199(carbohydrate antigen 199, CA199)对结直肠癌的诊断有一定临床价值。本研究通过体检筛查发现CEA、CA199升高的健康人群,检测结直肠癌基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, *MMP-7*)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, *MMP-9*)基因的多态性,经过随访后分析基因多态性与结直肠癌发病的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般材料

选取2013年1月-2014年12月上海市浦东新区周康地区2个社区,年龄18~70岁的500例健康体检人群。利用全自动化学发光免疫分析法检测血清CEA、CA199水平,CEA>5 ng/ml、CA199>37 μ/ml者为高表达组(103例),低于上述水平者为正常组(397例)。其中,高表达组男性65例,女性38例;平均年龄(48.1±8.3)岁。正常组男性214例,女性183例;平均年龄(46.5±7.7)岁。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 收集两组人群静脉血2 ml,乙二胺四乙酸抗凝后,使用美国Promega公司Wizard Genomic DNA Purification kit试剂盒提取基因组

DNA。具体步骤如下:静脉血标本中加入800 μl细胞溶解液,充分混匀后,10 000 r/min离心30 s,弃上清,加入300 μl细胞核溶解液,反复吹打后加150 μl蛋白沉淀剂,10 000 r/min离心3 min,将上清移至装有200 μl异丙醇的EP管中,上下颠倒混匀,10 000 r/min离心1 min,加入无水乙醇1 ml,10 000 r/min离心5 min后即可得DNA。

1.2.2 易感基因MMP-7、MMP-9多态性检测 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms, PCR-RFLPs)方法,分析*MMP-7*基因-181A/G位点、*MMP-9*基因P574R SNPs分布频率。*MMP-7*正向引物:5'-TGCTACCATAATGTCCTGAATG-3',反向引物:5'-TCGTTATTGGCAGGAAGCACACAATGAATT-3';*MMP-9*正向引物:5'-GCTGGACTCGGTCTTTGAGGATC-3',反向引物:5'-TTGAGCCTCCTTGACTGATGGG-3'。25 μl反应体系: Taq酶0.15 μl,引物各0.5 μl, DNA模板1.0 μl, Mg²⁺ 3 μl, 脱氧核糖核苷三磷酸2 μl, ddH₂O补充至25 μl。扩增条件: 94℃预变性10 min, 94℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共30次循环, 72℃继续延伸5 min, 使用限制性内切酶BamH I酶切*MMP-7*、*MMP-9*聚合酶链反应产物。

1.3 随访

随访1次/3个月,问卷调查收集人群吸烟、饮酒、排便或大便性状改变、大便隐血、体重下降等症状。检查电子结肠镜、超声内镜或窄带成像放大内镜等1次/6个月,进行结直肠癌的早期诊断。共随访2年,统计结直肠癌的发病率和结直肠癌发病患者的临床资料。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验;计数资料以率表示,用 χ^2 检验或Fisher's确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-7、MMP-9 基因型

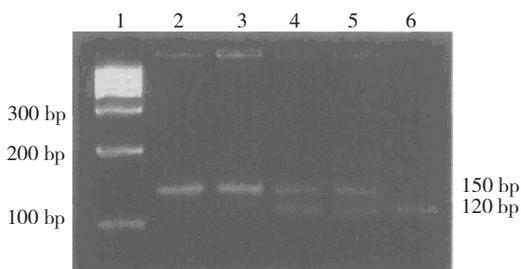
根据琼脂糖凝胶电泳条带型,判断产物基因型:MMP-7 基因 -181 电泳条带 150 bp 为 AA 型, 30 和 120 bp 为 GG 型, 30、120 和 150 bp 为 AG 型; MMP-9 P574R 电泳条带 112 bp 为 RR 型, 19 和 93 bp 为 PP 型, 19、93 和 112 bp 为 PR 型。见图 1。

2.2 两组人口学分布特征

高表达组与正常组在年龄、性别方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。两组在体重指数 (body mass index, BMI)、饮酒史、吸烟、家族史等方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组结直肠癌发病率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 高表达组与正常组患者 MMP-7、MMP-9 基因型分布

103 例高表达组中 MMP-7 GG+AG 基因型占 62.1% (64/103), AA 基因型占 27.9% (39/103), A、G 等位基因所占比例分别为 41.7% (86/206) 和 58.3% (120/206); 正常组中 MMP-7 基因 -181A/G 位点 GG+AG 基因型占 41.1% (163/397), AA 基因型占 59.9% (236/397), A、G 等位基因所占比例分别为 63.5% (504/794) 和 36.5% (290/794)。高表达组中



1: 100 bp DNA 标记物; 2、3: AA 基因型; 4、5: AG 基因型; 6: GG 基因型

图 1 MMP-7 基因 -181 典型电泳条带图

MMP-7 GG+AG 基因型比例高于正常组 ($\chi^2=14.97$, $P=0.000$), 高表达组中 G 等位基因频率高于正常组 ($\chi^2=31.92$, $P=0.000$)。高表达组中 MMP-9 PP、PR+RR 基因型所占比例分别为 57.3% (59/103) 和 42.7% (44/103), P、R 等位基因所占比例分别为 81.6% (168/206) 和 18.4% (38/206); 正常组中 PP、PR+RR 基因型所占比例分别为 55.7% (221/397) 和 44.3% (176/397), P、R 等位基因所占比例分别为 79.6% (632/794) 和 20.4% (162/794)。两组 MMP-9 PP、PR+RR 基因型表达比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.086$, $P=0.768$), 两组 P、R 等位基因表达比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.153$, $P=0.695$)。

2.4 结直肠癌患者 MMP-7、MMP-9 基因型分布

高表达组结直肠癌发病率为 12.6%, 高于正常组的 5.0% ($\chi^2=12.313$, $P=0.002$), 33 例结直肠癌患者 MMP-7 GG+AG、AA 基因型分别占 72.7% (24/33) 和 27.3% (9/33), 结直肠癌患者 GG+AG 基因型频率高于健康人群的 39.6% (185/467) ($\chi^2=22.670$, $P=0.000$), 结直肠癌患者 G 等位基因所占比例为 66.7%, 高于健康人群的 34.4% ($\chi^2=13.891$, $P=0.000$); 结直肠癌患者 MMP-9 PR+RR、PP 基因型分别为 69.7% (23/33) 和 30.3% (10/33), PR+RR 基因型频率与健康人群的 65.1% (304/467) 比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.288$, $P=0.591$), 结直肠癌患者 P 等位基因所占比例为 48.9%, 与健康人群 P 等位基因的 47.0% 比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.054$, $P=0.815$)。在多因素分析中控制其他变量, 分析结直肠癌患者临床病理参数与 MMP-7、MMP-9 基因型的关系, TNM 分期与 MMP-7 GG+AG、AA 基因型有关 ($P < 0.05$), 淋巴结转移患者 MMP-7 GG+AG 基因型比例高于 AA 基因型 ($P < 0.05$); 结直肠癌患者 MMP-9 PP、PR+RR 基因型差异与 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤直径有关 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 两组人口学分布特征比较

组别	男 / 女 / 例	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	家族史 / 例		BMI / 例		饮酒 / 例		吸烟 / 例		结直肠癌发病 / 例	
			有	无	<25 kg/m ²	≥ 25 kg/m ²	是	否	是	否	结肠癌	直肠癌
高表达组 (n=103)	65/38	48.1 ± 8.3	15	88	34	69	33	70	49	54	5	8
正常组 (n=397)	214/183	46.5 ± 7.7	46	351	125	272	108	289	163	234	14	6
t/χ ² 值	2.808	1.849	0.676		0.087		0.944		1.421		12.310	
P 值	0.093	0.065	0.410		0.767		0.331		0.233		0.002	

表2 结直肠癌患者 MMP-7、MMP-9 基因型分布 (n=33)

基因	肿瘤部位 / 例		分化程度 / 例		TNM 分期 / 例		淋巴结转移 / 例		肿瘤直径 / 例		CEA / (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	CA199 / (KU/L, $\bar{x} \pm s$)
	结肠	直肠	高、中分化	低、未分化	I、II	III、IV	是	否	< 5 cm	≥ 5 cm		
MMP-7												
GG+AG	13	10	6	13	3	24	15	2	12	17	23.6 ± 7.89	54.6 ± 23.5
AA	6	4	5	9	4	2	3	13	3	1	20.3 ± 5.39	49.6 ± 18.2
t 值	-		-		-		-		-		1.525	0.723
P 值	1.000		1.000		0.011		0.000		0.308		0.135	0.474
MMP-9												
PP	9	7	11	8	3	18	16	5	4	18	26.4 ± 8.28	65.3 ± 23.2
PR+RR	10	7	9	5	7	5	3	9	6	5	23.2 ± 5.73	56.5 ± 18.9
t 值	-		-		-		8.192		-		1.399	1.251
P 值	1.000		1.000		0.016		0.004		0.049		0.170	0.219

3 讨论

结直肠癌是胃肠道常见的恶性肿瘤,遗传异质性、环境因素、饮食习惯等因素被认为与结直肠癌的发生、发展密切相关^[7],其中癌基因和抑癌基因失衡、基因突变、错配修复基因等遗传因素的研究对结直肠癌的诊疗有很重要的临床价值^[8]。SNP是人类基因突变的普遍形式^[9],对SNP与结直肠癌易感性的研究是结直肠癌早期诊断、靶向治疗的方向。目前,已发现多种易感基因多态性与结直肠癌的发病密切相关,为结直肠癌的早期诊断和靶向治疗提供了新的方向^[10-11]。CEA、CA199是诊断结直肠癌常见的肿瘤标志物,血液中CEA、CA199水平升高常提示肿瘤可能存在,然而仍有部分健康人群CEA、CA199表达水平高于医学检测值,但无肿瘤发生,对这类人群仍需警惕结直肠癌的可能性。因此,本研究通过统计分析CEA、CA199高表达人群结直肠癌发病率,评价MMP-7、MMP-9基因的多态性与结直肠癌的遗传易感性。

本研究中高表达组结直肠癌发病率为12.6%,高于正常组的5.0%,提示CEA、CA199对结直肠癌的早期诊断仍有一定的临床价值,与既往的研究结果相似^[12]。基质金属蛋白酶是降解细胞外基质的主要蛋白之一,与肿瘤侵袭、转移等密切相关,既往研究发现,MMP-7、MMP-9与胃癌、食管癌、结直肠癌等消化系统肿瘤密切相关^[13-15]。MMP-7基因定位于11q21-q22,其转录起始点上游181bp处是其发生多态性位点的位置,MMP-7基因-181A/G处表达

G等位基因时,启动子的转录活性增强,从而导致肿瘤的早期转移与侵袭^[16]。本研究中,高表达组MMP-7 GG+AG基因型表达比例高于正常组,高表达组中G等位基因频率高于正常组,这可能解释了CEA、CA199高表达人群结直肠癌发病率高于正常人群的原因,结直肠癌患者GG+AG基因型频率多于健康人群,G等位基因所占比例高于健康人群,提示MMP-7基因-181 GG+AG基因型可能增加结直肠癌的发病风险,与GHILARDI等^[17]研究结果相似。有学者发现,MMP-7基因-181 G等位基因启动子活性强于A等位基因,MMP-7基因-181G等位基因通过增强MMP-7 mRNA转录,使MMP-7蛋白表达增加^[18],而且大量临床试验证实MMP-7与结直肠癌的TNM分期、淋巴结转移有关,本研究也进一步证实MMP-7基因型与TNM分期、淋巴结转移有关。

MMP-9是含有Ca²⁺、Zn²⁺的降解细胞外基质的水解蛋白酶,含有C-1562T、P574R等多个基因多态性位点,C-1562T、P574R分别位于基因启动子和蛋白编码区域,MMP-9 P574R多态位点位于第10外显子区^[19]。有研究表明,MMP-9 574P等位基因携带者会增加肺癌、胃癌淋巴结转移风险^[20],但对MMP-9 P574R基因多态性与结直肠癌易感性的相关性研究,不同学者得出的结论迥异^[21-22]。本研究结果表明,高表达组与正常组MMP-9 P574R等位基因表达无差异,但在结直肠癌患者中MMP-9 P574R基因型与肿瘤的TNM分期、淋巴结转移、肿瘤直径有关,携带P等位基因结直肠癌患者肿瘤更容易发生侵袭、

转移。本研究不足之处在于随访时间仅 2 年，结直肠癌患者的样本量只有 30 多例，未对患者术后生存期、放化疗敏感性等临床资料进行分析，以及未对 MMP 在结直肠癌发生、发展中的具体机制加以探讨，下一步的研究方向将针对这些不足之处予以探讨。

综上所述，CEA、CA199 对结直肠癌的早期诊断有一定的临床价值，MMP-7-181A/G、MMP-9 P574R 位点基因多态性与结直肠癌易感性有关，MMP-7 基因 -181 GG+AG、MMP-9 P574RPP 基因型可能与结直肠癌的发生、发展有关。

参 考 文 献:

- [1] CHEAL S M, XU H, GUO H F, et al. Theranostic pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer xenografts in mice using picomolar affinity 86 Y- or 177 Lu-DOTA-Bn binding scFv C825/GPA33 IgG bispecific immunoconjugates[J]. *European Journal of Nuclear Medicine Molecular Imaging*, 2016, 43(5): 925-937.
- [2] HAHN M M, VOER R M D, HOOGERBRUGGE N, et al. The genetic heterogeneity of colorectal cancer predisposition-guidelines for gene discovery[J]. *Cellular Oncology*, 2016: 1-20.
- [3] CATARINELLA M, MONESTIROLI A, ESCOBAR G, et al. IFN gene/cell therapy curbs colorectal cancer colonization of the liver by acting on the hepatic microenvironment[J]. *Embo Molecular Medicine*, 2016, 31(2): 651-652.
- [4] ZAUBER A G, WINAWER S J, O'BRIEN M J, et al. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal cancer deaths[J]. *New England Journal of Medicine*, 2012, 366(6): 687-696.
- [5] DU M, LIU S, GU D, et al. Clinical potential role of circulating microRNAs in early diagnosis of colorectal cancer patients[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(12): 2723-2730.
- [6] KAIDONIS G, GILLIES M C, ABHARY S, et al. A single-nucleotide polymorphism in the microRNA-146a, gene is associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in Caucasian patients[J]. *Acta Diabetologica*, 2016: 1-8.
- [7] PONCE C G, BLANCH R S, HERAS B S D L, et al. Clinical guideline seom : hereditary colorectal cancer[J]. *Clinical Translational Oncology*, 2015, 17(12): 962-971.
- [8] BAENA R, SALINAS P. Diet and colorectal cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2015, 71(Supplement 10): 10-12.
- [9] WEISS L A. Autism genetics: emerging data from genome-wide copy-number and single nucleotide polymorphism scans[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2014, 9(8): 795-803.
- [10] 阮玉凤, 孙璟, 吴方, 等. COX-2 基因多态性与结直肠癌发病风险的关系研究 [J]. *国际消化病杂志*, 2013, 33(4): 260-263.
- [11] 沈宏, 赵冬雨, 张宁. 修复基因 XRCC1 Arg194Trp 位点多态性与结直肠癌易感性的相关性分析 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2014(4): 476-478.
- [12] 钟武, 张磊昌, 钟世彪, 等. 结直肠癌患者术前 CEA、CA199 浓度与临床病理特征及预后的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(4): 499-504.
- [13] YANG B, SU K, GAO J, et al. Expression and prognostic value of matrix metalloproteinase-7 in colorectal cancer[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2012, 13(3): 1049-1052.
- [14] LI C Y, YUAN P, LIN S S, et al. Matrix metalloproteinase 9 expression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology Medicine*, 2013, 34(2): 735-741.
- [15] LIU Y, LIU H, LUO X, et al. Overexpression of SMYD3 and matrix metalloproteinase-9 are associated with poor prognosis of patients with gastric cancer[J]. *Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology Medicine*, 2015, 36(6): 4377-4386.
- [16] 庄建新. MMP-7 基因多态性与结直肠癌相关性研究 [D]. 南昌: 南昌大学医学院, 2014.
- [17] GHILARDI G, BIONDI M L, ERARIO M, et al. Colorectal carcinoma susceptibility and metastases are associated with matrix metalloproteinase-7 promoter polymorphisms[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(11): 1940-1942.
- [18] MORENO-ORTIZ J M, GUTIÉRREZ-ANGULO M, PARTIDA-PÉREZ M, et al. Association of MMP7-181A/G and MMP13-77A/G polymorphisms with colorectal cancer in a Mexican population[J]. *Genetics Molecular Research Gmr*, 2014, 13(AOP): 3537-3544.
- [19] XIN L, HOU Q, XIONG Q I, et al. Association between matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and endometriosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomedical Reports*, 2015, 3(4): 559-565.
- [20] 陈健. MMP-9 基因多态性与胃癌关系的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [21] YANG Z H, LI S N, LIU J X, et al. MMP-9 polymorphisms are related to serum lipids levels but not associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese population[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(10): 9399-9404.
- [22] 刘金星. MMP-9 基因多态性与结直肠癌相关性研究 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2011.

(童颖丹 编辑)