

基质金属蛋白酶-9 基因多态性与喉癌易感性及预后的研究*

沈晓辉¹ 汤夏冰² 王俊国¹ 高下¹

[摘要] 目的:探讨 MMP-9 基因多态性与喉癌易感性及临床病理特征和预后的关系。方法:应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,检测 142 例喉癌患者和 200 例健康对照者 MMP-9-1562C/T 单核苷酸多态性位点的基因型。结果:携带 MMP-9-1562CC 基因型者患喉癌的风险高于携带 MMP-9-1562CT/TT 基因型者($P < 0.05, 95\%CI = 1.02 \sim 2.77$);MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者年龄、性别、T 分期、临床分期及淋巴结转移无相关性;Kaplan-Meier 生存分析结果显示,MMP-9-1562CC 基因型患者的生存率低于 TT 和 CT 基因型患者($P < 0.01$);COX 回归分析显示,携带 MMP-9-1562CC 基因型的患者预后不良。结论:MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌的发病风险相关;MMP-9-1562C/T 基因多态性可能是影响预后的独立危险因素。

[关键词] 喉肿瘤;基质金属蛋白酶类;基因多态性;预后

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.013

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

Correlation of MMP-9 polymorphism with susceptibility and prognosis of laryngeal carcinoma

SHEN Xiaohui¹ TANG Xiabing² WANG Junguo¹ GAO Xia¹

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University School of Medicine, Nanjing, 210008, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Wuxi People's Hospital)

Corresponding author: GAO Xia, E-mail: xiagaogao@hotmail.com

Abstract Objective: To investigate the correlation of MMP-9 single nucleotide polymorphism(SNP) with susceptibility, clinicopathological characteristics and prognosis of laryngeal carcinoma. **Method:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the MMP-9-1562C/T SNP genotype in 142 patients with laryngeal carcinoma and 200 healthy controls. **Result:** The MMP-9-1562CC genotype significantly increased the risk for laryngeal carcinoma compared to MMP-9-1562CT/TT genotype($P < 0.05, 95\%CI = 1.02 \sim 2.77$). MMP-9-1562C/T polymorphism did not correlate to age, sex, T stage, N stage and clinical stage. Univariate analysis indicated that the overall survival rate in patients with MMP-9-1562CC genotype was lower than that in MMP-9-1562CT/TT genotype. Multivariate analysis indicated that the patients with MMP-9-1562CC genotype had unfavourable prognosis. **Conclusion:** MMP-9-1562C/T polymorphism was closely correlated with the risk for laryngeal carcinoma, and it may be an independent prognostic factor.

Key words laryngeal neoplasms; matrix metalloproteinases; single nucleotide polymorphism; prognosis

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其发病率呈不断增加趋势,死亡率亦居高不下。浸润和转移是恶性肿瘤的主要生物学行为,不仅降低治疗的效果,而且影响患者的预后。基质金属蛋白酶(MMPs)是一类与肿瘤浸润和转移关系十分密切的水解酶。基质金属蛋白酶 9(MMP-9)是 MMPs 家族中重要成员,能有效降解细胞外基质和基膜的主要成分 IV 型胶原蛋白,从而破坏基膜的完整性,与肿

瘤的浸润、转移密切相关^[1]。研究表明,MMP-9-1562C/T 基因多态性与诸多肿瘤关系密切。本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,检测 MMP-9 启动子区 1562 位点的基因型,以探讨 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌易感性及临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2004-04—2008-02 南京大学医学院附属鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科有完整随访资料的 142 例喉癌患者外周血标本(喉癌组),患者术前未经任何治疗,术后病理证实为鳞状上皮细胞癌。142 例患者中,男 134 例,女 8 例;年龄 33~83 岁,

* 基金项目:南京市医学科技发展项目基金资助(No: YKK11099)

¹ 南京大学医学院附属鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科(南京, 210008)

² 无锡市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:高下, E-mail: xiagaogao@hotmail.com

平均(67.3±9.6)岁;声门上型 49 例,声门型 83 例,声门下型 10 例;TNM 分期(UICC 2002)T1~T2 期为 71 例,T3~T4 期为 71 例;临床分期:I+II 期 57 例,III+IV 期 85 例;颈部淋巴结转移 35 例;病理学分级:低分化 8 例,中分化 88 例,高分化 46 例。随访时间为 12~81 个月,中位时间 54 个月。本组资料中死于原发肿瘤或转移者 53 例。死于其他疾病的不包括在本研究所选资料内。同时收集 200 例同期健康体检者作为对照组,喉癌组与对照组年龄及性别差异无统计学意义($P>0.05$)。所有研究对象均抽取 5 ml 外周静脉血,并置于-80℃冰箱中保存。

1.2 方法

采用 PCR-RFLP 方法。提取外周血基因组 DNA,用紫外分光光度计测定其浓度和纯度。DNA 浓度=OD260×50 mg/L×稀释倍数,DNA 纯度=OD260/OD280,在 1.6~1.8 之间说明 DNA 纯度合格。运用 Primer 5.0 软件设计引物:上游 5'-CATCTTCTCTTCAAACCTCTACCC-3',下游 5'-ATGGCTCATGCCCGTAATC-3',目的片段长度为 435 bp,引物交由 Invitrogen 公司合成。PCR 条件为:94℃ 预变性 2 min,然后 94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s 进行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。取适量 PCR 产物经限制性核酸内切酶 sph I 于 37℃ 酶切过夜。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,并观察结果。MMP-9-1562C/T 突变后可被限制性核酸内切酶识别,产生纯合子 CC 基因型有 435 bp 1 个片段,TT 基因型有 247 bp 和 188 bp 2 个片段,而杂合子 CT 则有 435 bp、247 bp 和 188 bp 3 个片段。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理。卡方检验用于 Hardy-Weinberg 平衡检验、喉癌组及对照组基因型和等位基因型分布的差异。以比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)来表示基因型之间的相对风险度。生存资料的统计采用非参数统计的乘积极限法(Kaplan-Meier),经 Log-Rank 检验和多因素比例风险回归(Cox 回归)进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌发病风险的关系

在对照组中,MMP-9-1562TT、CT 和 CC 基因型频率分别为 2.5%(5/200)、28.5%(57/200)和 69.0%(138/200),其分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P=0.78$);在喉癌组中 MMP-9-1562TT、CT 和 CC 基因型频率分别为 1.4%(2/142)、19.7%(28/142)和 78.9%(112/142);C 等位基因频率明显高于对照组(88%比 83%, $P<$

0.05)。由于 TT 基因型频率在喉癌组和对照组中均很低,故将该基因型与 CT 基因型合并进行分析。CC 基因型者罹患喉癌的风险是 CT 和 TT 基因型的 1.68 倍($P<0.05$,95% CI 为 1.02~2.77)。

2.2 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者临床病理参数的关系

MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者临床病理特征的关系见表 1。MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者年龄、性别、T 分期、临床分期及淋巴结转移均无相关性($P>0.05$)。

表 1 MMP-9-1562C/T 基因型频率与喉癌患者临床病理参数的关系 例(%)

参数	例数	基因型频率	
		CC	CT+TT
年龄/岁			
≤50	50	41(82.0)	9(18.0)
>50	92	71(77.2)	21(22.8)
性别			
男	134	107(79.9)	27(20.1)
女	8	5(62.5)	3(37.5)
T 分期			
T1+T2	71	58(81.7)	13(18.3)
T3+T4	71	54(76.1)	17(23.9)
临床分期			
I+II	57	49(86.0)	8(14.0)
III+IV	85	59(69.4)	26(30.6)
淋巴结转移			
有	35	30(85.7)	5(14.3)
无	107	82(76.6)	25(23.4)

2.3 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者预后的关系

喉癌患者术后生存情况与 MMP-9-1562C/T 基因多态性的关系曲线见图 1。CC 基因型患者生存率为 49.4%,TT 和 CT 基因型患者生存率为 84.2%,两者差异有统计学意义($P<0.01$)。在 COX 比例风险回归模型分析中,MMP-9-1562C/T 基因多态性是影响患者预后的独立因素(Wald=4.949, $P<0.05$)。

3 讨论

MMPs 属于依赖锌的内肽酶家族,因其具有降解细胞外基质的活性而命名,MMP-2 和 MMP-9 是该家族中的重要成员。MMP-2 和 MMP-9 可表达于多种细胞,主要有炎性细胞、肿瘤组织内的间质细胞及肿瘤细胞本身。诸多研究显示,MMP-2 和 MMP-9 在大部分人类恶性肿瘤中过度表达,促进肿瘤细胞的浸润、转移,且与患者的预后有关^[2]。我们前期研究中发现,MMP-9 在喉癌组织中过度

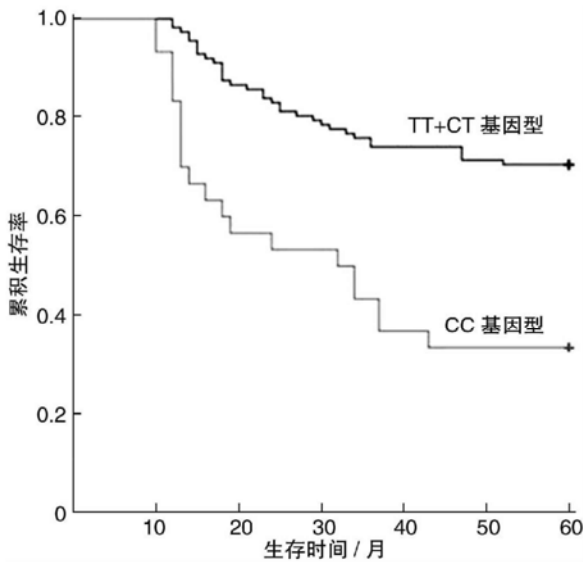


图 1 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者预后的关系

表达,并且与患者 T 分期、临床分期和淋巴结转移密切相关,同时发现 MMP-9 与患者预后有关^[3]。MMP-9 启动子区单核苷酸基因多态性可以调节基因表达及对多种疾病有易感性。诸多研究显示,MMP-9-1562C/T 基因多态性与人类肿瘤关系密切。González-Arriaga 等^[4]发现,MMP-9-1562C/T 基因多态性与肺癌的发生、发展有关,携带 MMP-9-1562CC 基因型者发生肺癌的风险明显增高。亦有研究显示,MMP-9 启动子区 1562 位点的基因突变在前列腺癌的产生中起重要作用,但主要存在于 Gleason 评分为 6 分及以下的前列腺癌中,并且 MMP-9-1562C/T 基因多态性是影响患者预后的独立危险因素^[5-6]。MMP-9-1562C/T 基因多态性在头颈部肿瘤中的研究较少,Vairaktaris 等^[7]研究表明,MMP-9-1562C/T 基因多态性与口腔癌关系密切。另有研究显示,MMP-9-1562C/T 基因多态性与鼻咽癌的产生无关^[8]。然而,国内外鲜见 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌关系的报道。

本研究表明,MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌的发病风险相关,携带 MMP-9-1562CC 基因型者罹患喉癌的风险是携带 MMP-9-1562CT/TT 基因型者的 1.68 倍。同时发现,MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者年龄、性别、T 分期、临床分期及淋巴结转移无相关性。可能由于本研究病例数有限,尚需进一步扩大样本量,明确 MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者临床病理参数之间的关系。

单因素生存分析显示,MMP-9-1562CC 基因型患者的生存率明显低于 TT 和 CT 基因型患者,

而多因素生存分析显示,MMP-9-1562C/T 基因多态性是影响患者预后的独立危险因素,携带 MMP-9-1562CC 基因型的患者可能预后不良。提示 MMP-9-1562C/T 基因多态性在喉癌预后中起着重要作用,与 Sfar 等^[6]在前列腺癌中的研究结果一致。

综上所述,MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌的发病风险相关。MMP-9-1562C/T 基因多态性与喉癌患者年龄、性别、T 分期、临床分期及淋巴结转移无关。进一步扩大样本量深入研究 MMP-9-1562C/T 基因多态性在喉癌发生、发展中的作用机制,可能为喉癌患者提供更有效的基因治疗新策略。MMP-9-1562C/T 基因多态性是影响预后的独立危险因素,可能成为预测喉癌患者生存率的参考指标和抗肿瘤治疗的新靶点。

参考文献

- [1] RA H J, PARKS W C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity[J]. *Matrix Biol*, 2007, 26: 587-596.
- [2] TURPEENIEMI-HUJANEN T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers[J]. *Biochimie*, 2005, 87: 287-297.
- [3] 汤夏冰,沈晓辉,钱晓云,等. 高迁移率族蛋白 B1 和基质金属蛋白酶-2、9 在喉癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 27(4): 181-187.
- [4] GONZÁLEZ-ARRIAGA P, PASCUAL T, GARCÍA-ALVAREZ A, et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 121-121.
- [5] DOS REIS S T, PONTES J Jr., VILLANOVA F E, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: susceptibility and prognostic implications for prostate cancer[J]. *J Urol*, 2009, 181: 2320-2325.
- [6] SFAR S, SAAD H, MOSBAH F, et al. TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 172: 38-44.
- [7] VAIRAKTARIS E, VASSILIOU S, NKENKE E, et al. A metalloproteinase-9 polymorphism which affects its expression is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34: 450-455.
- [8] NASR H B, MESTIRI S, CHAHED K, et al. Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and-9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 384: 57-63.

(收稿日期:2013-10-12)