

# MMP1 基因在头颈部鳞状细胞癌的表达及预后相关性

刘龙庆<sup>1</sup> 陈志伟<sup>1</sup> 易世杰<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究 MMP1 基因表达水平在头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)患者中的表达情况及预后相关性,并探究可能的作用机制。方法:在 TCGA 公共数据库中下载 HNSCC 的 RNA 测序数据及相关临床数据,对样本中的 MMP1 基因表达数据及其对应的临床信息进行回顾性分析;采用数据库基因芯片数据验证 MMP1 基因与 HNSCC 发生的相关性;生存分析 MMP1 与 HNSCC 患者预后指标(无病生存期与总生存期)的关系;采用基因集富集分析方法探讨 MMP1 基因在 HNSCC 中可能的作用机制。结果:332 例 HNSCC 患者 RNA 测序样本中,MMP1 基因表达与淋巴管浸润、肿瘤分级明显相关( $P < 0.01$ ),表达越高,患者越易发生淋巴结转移,恶性程度越高;数据库基因芯片数据证实 HNSCC 组织中 MMP1 表达水平明显高于正常黏膜组织( $t = 12.622, P < 0.05$ );MMP1 基因高表达组 HNSCC 患者的预后(无病生存期、总生存期)明显差于低表达组( $P < 0.05$ )。基因富集分析提示 MMP1 基因高表达可能在上皮间充质转化、TGF- $\beta$  信号通路、组织缺氧、血管再生、Notch 信号通路、上调 KRAS 基因信号通路影响肿瘤的生物学进程。结论:MMP1 基因高表达与 HNSCC 患者的发生及发展相关,可作为其独立危险因素,具有较大的临床意义。

**[关键词]** 头颈部肿瘤;鳞状细胞癌;基质金属蛋白酶 1;基因表达;预后

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2018.04.011

**[中图分类号]** R739.91 **[文献标志码]** A

## Association between the expression of MMP1 gene and prognosis in head and neck squamous cell carcinoma

LIU Longqing CHEN Zhiwei YI Shijie

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, National Hospital of Enshi Prefecture, Enshi, 445000, China)

Corresponding author: CHEN Zhiwei, E-mail: czwes123@163.com

**Abstract Objective:** The aim of this study is to investigate the expression of MMP1 and prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and to identify the potential mechanism of MMP1 in HNSCC. **Method:** The RNA sequencing data and related clinical data of HNSCC were downloaded from the TCGA public database. The MMP1 gene expression data and corresponding clinical information in the samples were retrospectively analyzed; The data of gene microarray were used to verify the correlation between MMP1 gene and HNSCC. The disease free survival and overall survival of HNSCC were also analyzed; Gene set enrichment analysis was conducted to identify the potential mechanism of MMP1 in HNSCC. **Result:** Among the 332 HNSCC patients, the expression of MMP1 was significantly associated with lymphatic invasion and tumor grade ( $P < 0.01$ ). The higher the expression level of MMP1 was, the more susceptible the patient was to lymph node metastasis. The data confirmed that the expression of MMP1 in HNSCC was significantly higher than that in normal mucosa ( $P < 0.05$ ); HNSCC of patient in MMP1 high expression group proved to have worse disease free survival and overall survival than in MMP1 low expression group ( $P < 0.05$ ); Gene enrichment analysis indicates that the high expression of MMP1 gene might influence the biological process of tumor through epithelial mesenchymal transition, TGF- $\beta$  signaling pathway, hypoxia, angiogenesis, Notch signaling pathway, and up-regulation of KRAS gene signaling pathway. **Conclusion:** The high expression of MMP1 was related with occurrence and development of

<sup>1</sup>恩施州民族医院耳鼻咽喉头颈外科(湖北恩施,445000)  
通信作者:陈志伟,E-mail:czwes123@163.com

[3] 张玉茵,吴洁丽,张家辉,等.不同手术方式喉癌术后患者鼻胃管留置时间对生存质量的影响[J].中国保健营养,2016,26(16):241-242.  
[4] 付伟伟,刘杰,黄沂传,等.喉癌术后应用不同肠内营养制剂的临床观察[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,

2015,29(6):535-537.  
[5] 苏家坤,赵峰,魏小林,等.影响喉癌及下咽癌术后咽痿的多因素分析[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,29(7):581-584.

(收稿日期:2017-12-05)

HNSCC, which can be used as an independent risk factor and has a great clinical significance.

**Key words** head and neck neoplasms; squamous cell cancer; MMP1; gene expression; prognosis

头颈部肿瘤中鳞状细胞癌占 90%~95%, 全球每年大约有 50 万例新发患者, 早期头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 患者的 5 年生存率为 40%~60%, 中晚期 HNSCC 患者的中位生存时间则为 6~9 个月<sup>[1-3]</sup>。HNSCC 发生及发病机制已研究多年, 其分子机制仍不完全清楚<sup>[4-5]</sup>。目前认为吸烟、酗酒和人乳头瘤病毒感染等因素导致的基因异常与 HNSCC 的发生及发展相关<sup>[6-7]</sup>。因此, 从基因水平研究 HNSCC 的病理机制, 对明确其发病机制、提高早期诊断率、改善患者预后至关重要。基质金属蛋白酶家族 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是一类活性依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶, 主要的生理作用是降解细胞外基质, 基质金属蛋白酶 1 (MMP1) 属于其中的胶原酶系列<sup>[8]</sup>。研究表明, MMP1 基因的异常表达可能参与了肿瘤的进展, 其在膀胱癌、前列腺癌、胃癌中的表达及预后价值已有研究报道<sup>[9-11]</sup>。目前对 MMP1 在 HNSCC 中的表达及预后的研究报道鲜见。为此, 本研究采用生物信息学的方法, 利用在 TCGA 公共数据库中下载 HNSCC 的 RNA 测序数据及相关临床数据, 探讨 HNSCC 组织中 MMP1 的表达水平与临床及预后的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据资料收集

在 TCGA 公共数据库 (<https://cancergenome.nih.gov/>) 中下载 HNSCC 样本的 RNA 测序数据 (均使用 Illumina HiSeq 测序技术) 及相关临床数据。564 例 HNSCC 样本 RNA 测序数据, 提取 332 例临床信息完整的病例。本研究以 332 例 HNSCC 样本 RNA 测序数据为分析主体。

### 1.2 MMP1 基因与临床病理学参数的相关性分析

根据基因表达谱数据对样本的 MMP1 基因的表达进行由高到低的排序, 以表达值的中位数, 将 HNSCC 样本分为 MMP1 高表达组 (166 例) 和 MMP1 低表达组 (166 例)。

### 1.3 数据集验证 MMP1 基因与 HNSCC 发生相关性

利用在线工具 oncomine (<https://oncomine.org/>) 选择 Ginos Head-Neck Statistics 数据集, 包含 41 例 HNSCC 患者癌组织及 13 例正常黏膜组织的基因表达谱数据, 该数据集使用 Affymetrix 公司 U133A microarrays 表达谱芯片, 测量了 12624 个基因, 其中 204475\_at 为 MMP1 基因的特异性探针。

### 1.4 MMP1 基因与预后的相关性分析

利用北京大学研发的数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 收集了 TCGA 及 CTEEx 中 9 736 例肿瘤组织及 8 587 例正常组织的 RNA 测序数据, 所有数据均进行标准化处理。该工具可将样本根据指定基因的表达水平分成高表达组和低表达组, 分析两组患者在生存率上的差异。

### 1.5 MMP1 基因富集分析

根据 MMP1 基因的表达水平分成高表达组和低表达组。使用由博得研究所开发的基因富集分析 (Gene set enrichment analysis, GSEA) 2.2.3 软件进行 GSEA 分析, 以 Hall-mark 数据集作为功能基因集, 按缺省加权富集统计的方法, 设置随机组合次数为 1000 次, 分析 MMP1 基因的表达水平对 HNSCC 患者可能的作用机制。本研究中, 将  $P < 0.05$  及错误发现率 (false discovery rates, FDR)  $< 0.05$  的基因集作为显著富集基因集。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义; 生存分析差异比较用 Log-rank 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MMP1 基因与临床病理学参数的相关性

332 例 HNSCC 患者 RNA 测序数据中, MMP1 基因表达水平与年龄、性别、T 分期、N 分期、M 分期、TNM 分期均无明显关系 ( $P > 0.05$ ), 与淋巴管浸润、肿瘤分级显著相关 ( $P < 0.01$ ), 提示 MMP1 基因表达越高, 患者越易发生淋巴结转移, 恶性程度越高。见表 1。

### 2.2 数据集验证 MMP1 基因与 HNSCC 发生的相关性

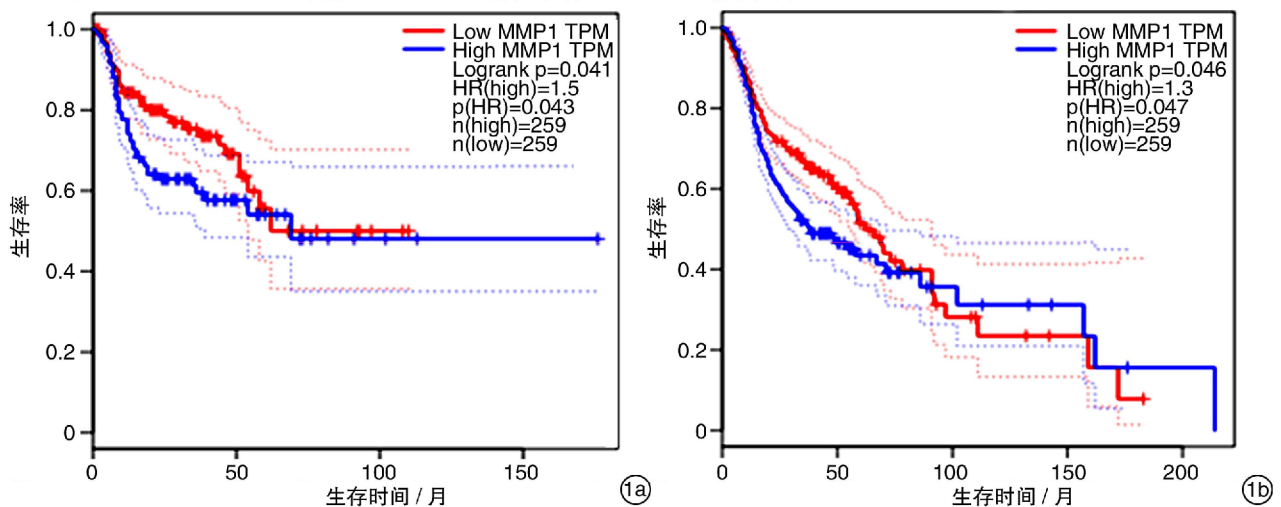
在 Ginos Head-Neck Statistics 数据集, 包含 41 例 HNSCC 患者癌组织及 13 例正常黏膜组织的基因表达谱数据, HNSCC 组织中 MMP1 表达水平明显高于正常黏膜组织 ( $t = 12.622, P < 0.05$ )。

### 2.3 MMP1 基因与预后的相关性分析

利用北京大学研发的数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 分析, 选择肿瘤类型为 HNSCC, MMP1 高表达组 HNSCC 患者无进展生存期明显差于低表达组 (log-rank  $P = 0.041$ ), 见图 1a。MMP1 高表达组 HNSCC 患者总生存期明显差于低表达组 (log-rank  $P = 0.046$ ), 见图 1b。提示 MMP1 为预后不良因素。

表 1 MMP1 基因表达与 HNSCC 患者临床病理特征的相关性分析

临床病理特征	例数	MMP1 表达水平		$\chi^2$ 值	P 值
		高表达(%)	低表达(%)		
年龄/岁					
<60	190	89(46.8)	101(53.2)	0.183	0.222
≥60	142	77(54.2)	65(45.8)		
性别					
男性	239	115(48.1)	124(51.9)	0.271	0.328
女性	93	51(54.8)	42(45.2)		
淋巴管浸润					
是	115	72(62.6)	43(37.4)	11.189	0.001
否	217	94(43.3)	123(56.7)		
肿瘤分级					
G1	33	7(21.2)	26(78.8)	14.103	0.001
G2	217	110(50.7)	107(49.3)		
G3	82	49(59.8)	33(40.2)		
M 分期					
M <sub>0</sub>	8	3(37.5)	5(62.5)	0.474	0.723
M <sub>1</sub>	324	163(50.3)	161(49.7)		
N 分期					
N <sub>0</sub>	171	88(51.5)	83(48.5)	4.532	0.209
N <sub>1</sub>	60	34(56.7)	26(43.3)		
N <sub>2</sub>	97	41(42.3)	56(57.7)		
N <sub>3</sub>	4	3(75.0)	1(25.0)		
T 分期					
T <sub>1</sub>	22	9(40.9)	13(59.1)	4.387	0.223
T <sub>2</sub>	94	40(42.6)	54(57.4)		
T <sub>3</sub>	96	53(55.2)	43(44.8)		
T <sub>4</sub>	120	64(53.3)	56(46.7)		
TNM 分期					
I	14	6(42.9)	8(57.1)	5.754	0.124
II	64	24(37.5)	40(62.5)		
III	81	45(55.6)	36(44.4)		
IV	173	91(52.6)	82(47.4)		



1a: MMP1 高表达组 HNSCC 患者无病生存期明显差于低表达组; 1b: MMP1 高表达组 HNSCC 患者总生存期明显差于低表达组。

图 1 MMP1 基因表达水平与 HNSCC 患者预后的关系



### 2.4 MMP1 基因高表达的功能基因集富集

GSEA 分析结果提示 MMP1 基因高表达样本主要富集了上皮间充质转化、TGF-β 信号通路、组织缺氧、血管再生、Notch 信号通路、上调 KRAS 基因信号通路,提示 MMP1 可能通过以上生物学过程促进肿瘤细胞增殖,影响患者临床及预后,见表 2 及图 2。

### 3 讨论

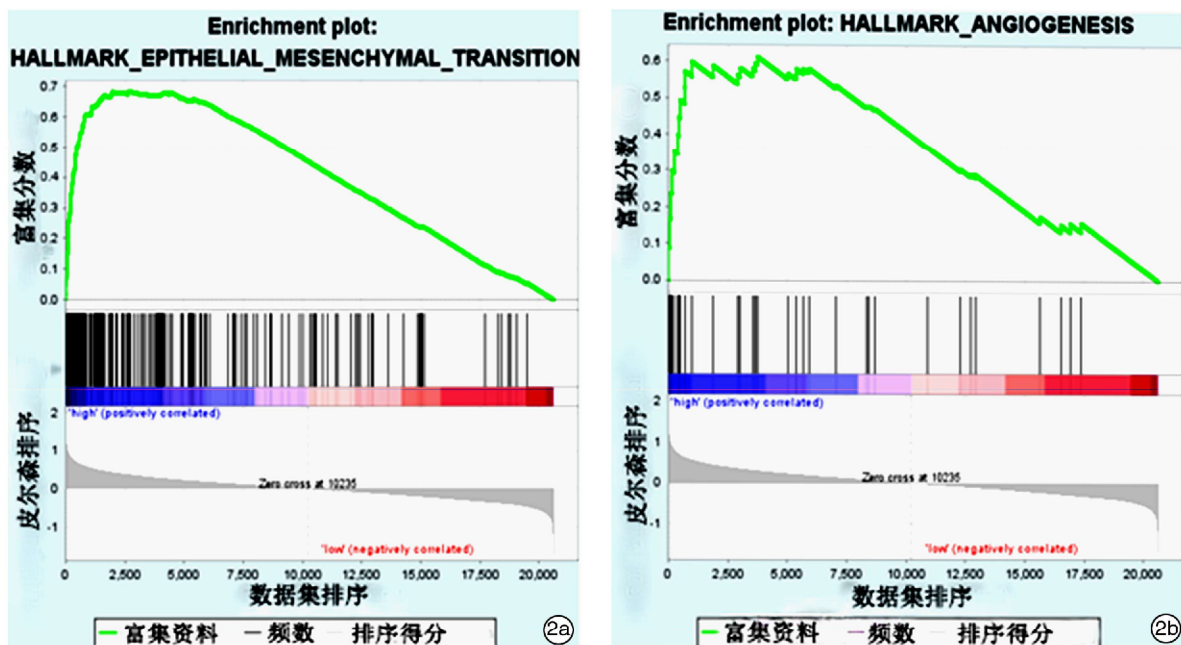
MMPs 家族蛋白几乎能降解细胞外基质中的各种蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中起关键性作用<sup>[12]</sup>。MMP1 基因位于第 11 号染色体 q22.2 区域,含有 10 个外显子,编码的蛋白质含 403 个氨基酸。该基因编码的蛋白水解加工产生成熟的蛋白酶属于间质胶原酶,其主要作用是消化 I、II、III、VI 型胶原和蛋白多糖<sup>[13]</sup>。恶性肿瘤的发生及发展需经过黏附、酶解、移动的过程,其中酶解是肿瘤穿过细胞间质和微血管、淋巴管基膜的必要条件<sup>[14]</sup>。研究报道了

MMP1 在膀胱癌、前列腺癌、胃癌中的表达及预后价值,但是对 MMP1 在 HNSCC 的研究鲜有报道。

本研究提示,MMP1 高表达组 HNSCC 患者在淋巴管浸润、肿瘤分级明显差于低表达组;Ginos Head-Neck Statistics 数据集验证中发现 HNSCC 组织中 MMP1 表达水平明显高于正常黏膜组织;同时 MMP1 高表达组 HNSCC 患者的无病生存率及总生存率明显差于低表达组。结果提示 MMP1 为预后不良因素,可能作为癌基因,为 HNSCC 提供治疗的新的作用靶点。Hu 等<sup>[15]</sup>报道,通过骨形态发生蛋白 6 下调 MMP1 抑制乳腺癌的转移。Juncker-Jensen 等<sup>[16]</sup>报道, MMP1 通过激活内皮细胞蛋白酶激活受体-1,促进血管新生和转移。Langenskiöld 等<sup>[17]</sup>报道, MMP1 是影响结肠癌肿瘤生存率的独立预后因素。这些研究与本研究均已显示出 MMP1 作为一种癌基因,可能在不同类型的人类癌症的发生及发展中具有重要作用。本研究 MMP1 基因高表达样本 GSEA 分析结果提示

表 2 GSEA 分析 MMP1 基因高表达样本相关富集基因集

基因集	基因数	富集分数	P 值	FDR
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	192	0.685	0.006	0.203
HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	50	0.565	0.010	0.169
HALLMARK_HYPOXIA	188	0.502	0.008	0.117
HALLMARK_ANGIOGENESIS	34	0.612	0.012	0.096
HALLMARK_NOTCH_SIGNALING	29	0.543	0.032	0.178
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	135	0.467	0.052	0.200
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	192	0.464	0.045	0.188



仅列出富集分数最高(2a)及错误发生率最低(2b)的基因集。

图 2 MMP1 基因高表达样本相关富集基因集



MMP1 基因高表达样本主要富集了上皮间充质转化、TGF- $\beta$  信号通路、组织缺氧、血管再生、Notch 信号通路、上调 KRAS 基因信号通路等生物学过程参与 HNSCC 的发生及发展。提示 MMP1 基因在 HNSCC 中有着较大的生物学意义,值得进一步深入研究。

综上所述,本研究通过大规模生物数据分析,发现 MMP1 基因在 HNSCC 中的表达明显增高,且其高表达与淋巴管浸润、肿瘤分级、预后明显相关。其高表达是 HNSCC 的独立危险因素之一。

#### 参考文献

- [1] GILDENER-LEAPMAN N, FERRIS R L, BAUMAN J E. Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2013, 49:1089-1096.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108.
- [3] FARKNOA S, DIAMANDIS E P, BLASUTIG I M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer[J]? *BMC Med*, 2016, 14:73.
- [4] THOMPSON L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours[J]. *Ear Nose Throat J*, 2006, 85:74.
- [5] LEEF G, THOMAS S M. Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2013, 49:381-386.
- [6] RAMQVIST T, DALIANIS T. An epidemic of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) due to human papillomavirus (HPV) infection and aspects of treatment and prevention[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31:1515-1519.
- [7] 耿志洋, 郑宏良. 局部晚期下咽癌的治疗进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(9):732-736.
- [8] ROY R, YANG J, MOSES M A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 52878-5297.
- [9] SHIN D H, DIER U, MELENDEZ J A, et al. Regulation of MMP-1 expression in response to hypoxia is dependent on the intracellular redox status of metastatic bladder cancer cells[J]. 2015, 1852: 2593-2602.
- [10] OZDEN F, SAYQIN C, UZUNASIAN D, et al. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139: 1373-1382.
- [11] CAI Q W, LI J, LI X Q, et al. Expression of STAT 3, MMP-1 and TIMP-1 in gastric cancer and correlation with pathological features[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5: 1438-1442.
- [12] 陈应超, 王玮, 李兆龙, 等. MTDH 和 MMP-9 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(1):60-63.
- [13] SINGH W, FIELDS G B, CHRISTORY C Z, et al. Effects of Mutations on Structure-Function Relationships of Matrix Metalloproteinase-1[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:1727.
- [14] RATAJCZAK M, TARNOWSKI M, STANISZEWSKA M, et al. Mechanisms of cancer metastasis: involvement of cancer stem cells[J]? *Minerva Med*, 2010, 101:179-191.
- [15] HU F, ZHANG Y, LI M, et al. BMP-6 inhibits the metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells by regulating MMP-1 expression[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35: 1823-1830.
- [16] JUNCKER-JENSAN A, DENYUQINA E I, ZAIAC E, et al. Tumor MMP-1 activates endothelial PAR1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination[J]. *Cancer Res*, 2013, 73:4196-4211.
- [17] LANGENSKIÖLD M, IVARSSON M L, HOLMDAHL L, et al. Intestinal mucosal MMP-1 a prognostic factor in colon cancer[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48:563-569.

(收稿日期:2017-12-04)