

· 临床流行病学 ·

MMP-7 和 MMP-9 基因多态与子宫内膜异位症发病风险的关联研究

康山 杜慧 王娜 郭炜 金霞 方淑梅 张健慧 李琰

【摘要】 目的 探讨 MMP-7 和 MMP-9 基因启动子区多态性与中国北方妇女子宫内膜异位症遗传易感性的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术,检测 143 例子宫内膜异位症患者和 160 名健康妇女对照的 MMP-7 基因启动子区-181A/G 多态位点和 MMP-9 基因启动子区-1562C/T 多态位点的基因型。结果 子宫内膜异位症患者 MMP-7 中 G 等位基因频率(7.3%)明显高于对照组(2.8%)($\chi^2 = 6.59, P = 0.01$);子宫内膜异位症患者 A/A、A/G、G/G 三种基因型频率分别为 86.0%、13.3% 和 0.7%,正常对照组则分别为 94.4%、5.6% 和 0%,两者有显著差异($\chi^2 = 6.50, P = 0.039$);与 A/A 基因型相比,携带 G 等位基因能明显增加子宫内膜异位症的发病风险,经年龄校正的 OR 值为 2.71(95% CI: 1.19~6.16)。MMP-9 中 C 和 T 等位基因频率在病例组和对照组分别为 88.8%、11.2% 及 91.9%、8.1%,两组差异无统计学意义($\chi^2 = 1.64, P = 0.20$);病例组 C/C、C/T 和 T/T 基因型频率分别为 78.3%、21% 和 0.7%,对照组则分别为 83.8%、16.2% 和 0%,两者差异亦无统计学意义($\chi^2 = 2.31, P = 0.32$)。与 C/C 基因型相比,携带 T 等位基因未能明显增加子宫内膜异位症的发病风险,经年龄校正的 OR 值为 1.41(95% CI: 0.79~2.52)。结论 MMP-7 基因启动子区-181A/G 多态与子宫内膜异位症发病存在关联,携带 G 等位基因可能增加该病的发病风险;未发现 MMP-9 基因启动子区-1562C/T 多态性则与子宫内膜异位症发病存在关联。

【关键词】 子宫内膜异位症;基质金属蛋白酶;基因多态性;遗传易感性

Study on the association between matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 promoter single nucleotide polymorphism and the risk of endometriosis KANG Shan*, DU Hui, WANG Na, GUO Wei, JIN Xia, FANG Shu-mei, ZHANG Jian-hui, LI Yan. *Department of Obstetrics and Gynecology, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China
Corresponding author: LI Yan, Email: lykx1962@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the association of single nucleotide polymorphism (SNP) in the matrix metalloproteinase-7 (MM-7) and matrix metalloproteinase-9 (MM-9) promoter with the susceptibility to endometriosis. **Methods** The SNP of the MMP-7 and MMP-9 gene promoter region was genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 143 endometriosis patients and 160 unrelated healthy women. **Results** The G allele frequency of MMP-7 among endometriosis was significantly different from the control group ($\chi^2 = 6.59, P = 0.01$). The genotype frequencies of A/A, A/G, G/G in the case were 86.0%, 13.3%, 0.7%, respectively which were significantly different from that of healthy controls (94.4%, 5.6%, 0%) ($\chi^2 = 6.50, P = 0.039$). When comparing it to the A/A genotype, the risk of endometriosis was significantly modified for the G allele carriers with a adjusted odds ratio of 2.71 (95% CI: 1.19-6.16). The frequency of the C and T allele among endometriosis patients and healthy controls were 88.8%, 11.2% and 91.9%, 8.1%, respectively. No significant difference in MMP-9 allele distribution was shown between the cases and the controls ($\chi^2 = 1.64, P = 0.20$) nor the significant difference of genotype distribution observed between endometriosis patients and healthy women ($\chi^2 = 2.31, P = 0.32$). When comparing with the C/C genotype, the risk of endometriosis was not significantly modified for carriers of the T allele and the adjusted odds ratio was 1.41 (95% CI: 0.79-2.52). **Conclusion** Individuals carrying MMP-7 G allele could significantly increase the risk of endometriosis but MMP-9 promoter SNP was not associated with the risk of endometriosis.

【Key words】 Endometriosis; Matrix metalloproteinase; Polymorphism; Susceptibility

子宫内异位症(EM)是一个环境因素与遗传因素共同作用而发生的多基因遗传性疾病^[1,2]。对其候选基因的研究表明,一些与 EM 发病相关的基因多态性可能在其病因学中起一定作用,如谷光甘肽转硫酶^[3]、N-乙酰化转移酶^[4]和细胞色素 P450^[5]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一个蛋白水解酶家族,可降解细胞外基质和基底膜,在肿瘤的转移侵袭过程中起重要作用。由于 EM 的生物学行为具有类似癌细胞的周围浸润、远处转移和种植的恶性特征,因此 MMPs 近年来也成为研究 EM 病因学的靶基因。我们已经对 MMP-1 和 MMP-3 基因多态与 EM 遗传易感性的关系进行了研究,且发现 MMP-1 启动子区 2G 等位基因及 MMP-1 和 MMP-3 基因 2G/6A 单体型可能增加 EM 患病风险^[6]。MMP-7 和 MMP-9 均属于 MMPs 家族的成员,它们的异常表达可能与癌细胞的浸润和转移特性有关^[7,8]。在异位子宫内中也检测到 MMP-7 和 MMP-9 的高表达,提示它们在 EM 的形成中起一定作用^[9,10]。研究发现, MMP-7 启动子区-181 A/G 和 MMP-9 启动子区-1562 C/T 的单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP),均可影响基因的转录活性^[11,12],与肿瘤的遗传易感性有关^[13,14]。本研究采用病例对照研究设计对这两个基因启动子区的多态位点与 EM 的关系进行了探讨。

材料与方法

1. 研究对象:143 例 EM 患者为 2002-2004 年在河北医科大学第四医院妇产科手术治疗患者,受检个体经临床和病理学证实均为 III-IV 级 EM。患者的年龄、月经史、生育史及家族史等资料均有病历详细登记;160 名女性正常对照来自同一地区,包括健康体检者和同一医院由于自愿流产、剖宫产和宫血等住院个体,个体一般情况由采血者直接询问或病历登记。两组人群基本资料见表 1(由于在患者组中家族史的病例数较少,所以未将家族史列入表中)。

表 1 两组年龄、初潮年龄及孕、产次比较

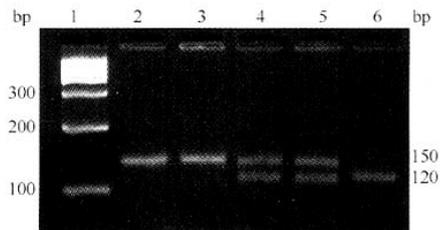
组别	年龄(岁)	初潮年龄(岁)	孕次	产次
EM 组	37.87±7.43	14.49±1.58	2.13±1.52	1.05±0.74
对照组	38.42±6.88	14.12±1.64	2.18±1.55	1.01±0.79
P 值	0.81	0.83	0.86	0.53

2. 方法:

(1)DNA 提取:抽取患者及对照静脉血 5 ml,以枸橼酸钠抗凝,采用蛋白酶 K-氯化钠盐析法提取白细胞 DNA,方法见参考文献[15]。

(2)基因多态检测:MMP-7 和 MMP-9 基因型检测均采用 PCR-RFLP 方法。PCR 反应体积为 25 μl,其中含 100 ng 模板 DNA, 2.0 mmol MgCl₂, 0.2 mmol dNTPs, 0.2 μmol 上、下游引物, 2.5 U Taq-DNA 聚合酶和 2.5 μl 10×PCR 缓冲液。

用于 MMP-7 扩增的上、下游引物序列分别为 5'-TG GTACCATAATGTCCTGAATG-3' 和 5'-TCG TTATTGGCAGGAAGCACACAATGAATT-3'^[10]。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物长度为 150 bp, 该产物经限制性内切酶 EcoRI 37℃ 消化过夜后, 于 4% 琼脂糖凝胶电泳分析基因型。A/A 基因型者经消化后只产生 150 bp 一个片段, G/G 基因型者产生 120 和 30 bp 两个片段, A/G 基因型者产生 150、120 和 30 bp 三个片段(图 1)。



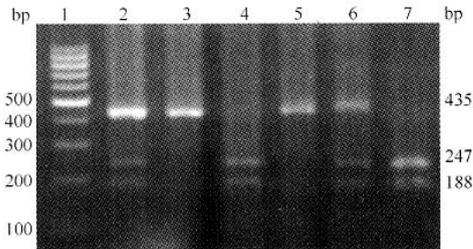
1:DNA 标志物; 2,3:A/A 基因型; 4,5:A/G 基因型; 6:G/G 基因型
图 1 MMP-7 PCR 酶切产物

用于 MMP-9 扩增的上、下游引物序列分别为 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3' 和 5'-CTT CCTAGCCAGCCGGCATC-3'^[11]。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 10 min, 然后 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物长度为 435 bp, 该产物经限制性内切酶 Sph I 37℃ 消化过夜, 于 2% 琼脂糖凝胶电泳分析基因型。C/C 基因型者经消化后产生 435 bp 一个片段, T/T 基因型者产生 247 和 188 bp 两个片段, C/T 基因型者产生 435、247 和 188 bp 三个片段(图 2)。

每一批 PCR 反应均以蒸馏水替代 DNA 作为阴性对照。10% 的 DNA 标本进行了二次分型以确定分型方法的可靠性。每次酶切反应均以一个确定的 G/G 或 C/C 基因型作对照。

3. 统计学分析:病例及对照组年龄差异采用 t 检验;χ² 检验分析两组 MMP-7 和 MMP-9 等位基因

及基因型分布的差异,以非条件 logistic 回归方法计算表示的比值比 (OR) 及其 95% 可信区间 (CI) (年龄作校正)。数据统计用计算机统计分析软件 (SPSS 10.0) 进行处理。



1:DNA 标志物; 3,5: C/C 基因型; 2,6:C/T 基因型; 4,7:T/T 基因型

图2 MMP-9 PCR 酶切产物

结 果

143 例 EM 患者平均年龄为 36.04 岁 ± 6.61 岁 (22~49 岁), 与对照组 (160 名) 35.49 岁 ± 7.84 岁 (21~51 岁) 相比差异无统计学意义 ($t = 0.64, P = 0.52$)。

MMP-7 基因启动子区 -181 A/G SNP: EM 患者和对照组 MMP-7 基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2 = 0.08, P = 0.78$)。EM 患者 G 等位基因频率为 7.3%, 与对照组 (2.8%) 相比差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.59, P = 0.01$)。EM 患者 MMP-7 三种基因型频率 (A/A、A/G、G/G) 分别为 86.0%、13.3% 和 0.7%, 与对照组也有差异 ($\chi^2 = 6.50, P = 0.039$) (表 2)。G/G 基因型只在病例组检测出 1 例。与 A/A 基因型相比, 携带 G 等位基因的个体能明显增加 EM 的发病风险, 经年龄校正的 OR 值为 2.71 (95% CI: 1.19~6.16) (表 2)。

MMP-9 基因启动子区 -1562 C/T SNP: 病例组和对照组 MMP-9 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2 = 0.44, P = 0.51$)。C 和 T 等位基因频率在 EM 和对照组中分别为 88.8%、11.2% 及 91.9%、8.1%, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.64, P = 0.20$)。EM 患者 MMP-9 的 C/C、C/T 和 T/T 三种基因型频率分别为 78.3%、21% 和 0.7%, 与对照组人群 (83.8%、16.2% 和 0%) 相比差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.31, P = 0.32$) (表 2)。与 C/C 基因型相比, 携带 T 等位基因的个体未能明显增加 EM 患者的发病风险, 经年龄校正的 OR 值为 1.41 (95% CI: 0.79~2.52)。

表2 两组人群 MMP-7、MMP-9 基因型和等位基因分布

组别	正常对照 (n = 160)	EM (n = 143)
MMP-7 基因型*		
A/A	151(94.4)	123(86.0)
A/G	9(5.6)	19(13.3)
G/G	0(0)	1(0.7)
MMP-7 等位基因#		
A	311(97.2)	265(92.7)
G	9(2.8)	21(7.3)
MMP-9 基因型▲		
C/C	134(83.8)	112(78.3)
C/T	26(16.2)	30(21)
T/T	0(0)	1(0.7)
MMP-9 等位基因△		
C	294(91.9)	254(88.8)
T	26(8.1)	32(11.2)

* $P = 0.04$, OR 值 95% CI: 2.71 (1.19~6.16), 年龄校正, 相对 A/A 基因型, A/G + G/G 基因型的风险值; # $P = 0.01$; ▲ $P = 0.32$, OR 值 95% CI: 1.41 (0.79~2.52), 年龄校正, 相对 C/C 基因型, C/T + T/T 基因型的风险值; △ $P = 0.13$

讨 论

我们的研究结果显示 MMP-7 基因启动子区 -181A/G 的单核苷酸多态与 EM 的遗传易感性相关, 即 G 等位基因的存在可以增加 EM 的发病风险。而 MMP-9 基因启动子区 -1562C/T 的单核苷酸多态与 EM 的遗传易感性未见明显关联。

MMP-7 是一种基质溶解素, 基因位于 11q21~q22, 其蛋白分子量是 MMPs 家族中最小的一个, 但可降解弹性蛋白、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、IV 型胶原等多种构成细胞外基质和基底膜的重要成分。MMP-7 主要表达在上皮细胞中, 在基质细胞中不表达。肿瘤细胞中 MMP-7 呈高表达, 这种过表达可能和肿瘤浸润转移相关^[16,17]。人类子宫内膜中 MMP-7 只表达于在位内膜增殖期, 而异位内膜增殖期、分泌期均有 MMP-7 表达^[9]。目前, 关于 MMP-7 基因与 EM 关系的研究报道还很少。

MMP-7 基因启动子区 -181A/G 基因多态位点的 G 等位基因可使该基因的转录活性增高^[11]。Giorgio 等在结肠癌中的研究表明 MMP-7 该基因多态位点与其遗传易感性相关^[13], 结肠癌 A/A、A/G 和 G/G 基因型分别为 24%、36% 和 19%, 对照组为 31%、49% 和 9%, 两组相比差异有统计学意义。本研究结果与该研究结果相同, 同样提示了 G 等位基因的存在可以提高 EM 的发病风险, 以年龄校正携带 A/G + G/G 基因型的个体其发病风险为携带 A/A 基因型个体的 2 倍。但本文中对照组人群 MMP-7 基因型频率与 Giorgio 等研究报道的有显著差异。

MMP-9 又称明胶酶 B, 基因位于染色体 20q12~

q13,是 MMPs 中分子量最大的酶。其作用底物主要为明胶、IV、V 型胶原等,其中 IV 型胶原是基底膜的主要成分,而 MMP-9 是破坏 IV 型胶原的主要的酶。大量研究表明,MMP-9 在多种恶性肿瘤细胞中呈现过表达,如食管癌和子宫内膜癌等^[18,19],认为该基因在恶性肿瘤浸润和转移中起重要作用。MMP-9 蛋白表达与 EM 关系的研究也有不少报道,研究显示 EM 中的异位内膜的 MMP-9 表达明显高于在位内膜^[20,21],且 MMP-9 在 EM 的发病进程中可能起重要作用,它促进了异位组织细胞外基质的降解和血管的生成,这也是 EM 疾病进展的关键所在^[22]。

Zhang 等^[12]发现在 MMP-9 基因启动子区-1562 bp 处有一个 C→T 的单核苷酸多态,并在体外实验证实 T 等位基因可使基因蛋白转录活性增高。Matsumura 等^[14]对胃癌的研究显示 T 等位基因可能增加肿瘤的转移浸润能力。本文研究结果没有显示 T 等位基因频率在子宫内膜异位症患者和正常对照组人群中存在差异,且本研究所选用的病例均为 III~IV 级 EM 患者,因此我们的结论没有表明 T 等位基因与 EM 的遗传易感性和疾病的进展程度相关。我们对照组 MMP-9 C/T 基因型频率与国外文献报道的其他种族对照组人群该基因基因型频率相比存在显著差异^[23,24]。

MMP-9 启动子区 C-1562T 多态位点同 EM 发病无显著相关,此结果与异位内膜 MMP-9 的高表达可能并不相矛盾,因为 MMPs 的表达可能受其他调控机制的调节,如酶原激活、基质金属蛋白酶抑制剂和激素水平的调节等。

本实验对 MMP-7 和 MMP-9 基因多态性在 EM 发病风险中的作用进行研究,其方法采用病例对照研究,对照组选择年龄、地域来源、月经史和孕产次与病例组相匹配的人群。由此所得两组人群实验结果的差异应是基因型的差异。但因基因多态性具有地域和种群差异,所以研究结果的局限性为病例对照人群均来自河北省地区,实验所得结论可能不能代表中国女性人群。

综上所述,研究基质金属蛋白酶基因多态性与 EM 发病风险关系,有利于进一步探讨 EMs 的发病机理,为疾病的治疗提供更有效的手段。

参 考 文 献

- 1 Kennedy S, Mardon H, Barlow D. Familial endometriosis. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12: 32-34.
- 2 Kennedy SH. Is there a genetic basis to endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol*, 1997, 15: 309-317.

- 3 Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol Hum Reprod*, 1997, 9: 775-780.
- 4 Satoshi N, Ruth MH, Krina TZ, et al. Association between endometriosis and N-acetyl transferase 2 polymorphism in 2 UK population. *Mol Hum Reprod*, 2001, 11: 1079-1083.
- 5 彭冬先, 何援利, 丘立文, 等. 广东汉族妇女 CYP1A1 基因 Msp I 多态性与子宫内膜异位症的关系. *第一军医大学学报*, 2002, 22: 814-816.
- 6 Kang S, Wang Y, Zhang JH, et al. The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to endometriosis in China. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11: 423-427.
- 7 Ajisaka H, Yonemura Y, Miwa K. Correlation of lymph node metastases and expression of matrix metalloproteinase-7 in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51: 900-905.
- 8 江忠清, 朱凤川, 曲军英, 等. 宫颈癌 MMP-9 表达与肿瘤血管生成、癌细胞增殖及侵袭转移的关系. *癌症*, 2003, 22: 177-184.
- 9 Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL, et al. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol*, 1996, 14: 247-255.
- 10 Szamatowicz J, Laudanski P, Tomaszewska I. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod*, 2002, 17: 284-288.
- 11 Jornsjo S, Whatling C, Walter DH, et al. Allele-specific regulation of Matrix Metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 1834-1839.
- 12 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. *Circulation*, 1999, 99: 1788-1794.
- 13 Ghilardi G, Biondi ML, Erario M, et al. Colorectal carcinoma susceptibility and metastases are associated with matrix metalloproteinase-7 promoter polymorphisms. *Clin Chem*, 2003, 49: 1940-1942.
- 14 Matsumura S, Oue N, Nakayama H, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131: 19-25.
- 15 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1998, 16: 1215.
- 16 郭源, 万远廉, 魏群, 等. 基质金属蛋白酶-7 基因在胃癌中的表达. *中华普通外科杂志*, 2000, 15: 82-84.
- 17 Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, et al. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancer. *Gut*, 1999, 45: 252-258.
- 18 Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*, 2000, 88: 2201-2209.
- 19 Aglund K, Rauvala M, Puistola U, et al. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol*, 2004, 94: 699-704.
- 20 Chung HW, Wen Y, Chun SH, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril*, 2001, 75: 152-159.
- 21 于云英, 郭新华, 钱金花, 等. 基质金属蛋白酶 9 及其组织抑制剂 TIMP-3 在子宫内膜异位症的表达. *现代妇产科进展*, 2003, 12: 25-27.
- 22 Ria R, Loverro G, Vacca A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32: 199-206.
- 23 Zhang B, Dhillon S, Geary I, et al. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 2001, 32: 2198-2202.
- 24 Kim JS, Park HY, Kwon JH, et al. The roles of stromelysin-1 and the gelatinase B gene polymorphism in stable angina. *Yonsei Med J*, 2002, 43: 473-481.

(收稿日期: 2005-04-11)
(本文编辑: 张林东)