

人类MMP3基因5'端转录调控区rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系

陈清波, 高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 姚品芳, 王立东, 李劲

■背景资料

食管癌是世界十大恶性肿瘤之一, 在我国食管癌居癌症死因第4位。我国的河南、河北、山西3省交界的太行山区(林州、磁县、阳城县)是食管癌的高发区。

陈清波, 姚品芳, 湖北省肿瘤医院内镜室 湖北省武汉市 430079

高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 李劲, 中南民族大学生命科学院 湖北省武汉市 430074

王立东, 郑州大学基础医学院癌症研究室 河南省郑州市 450052

陈清波, 湖北省肿瘤医院内镜室主任, 主要从事肿瘤的诊断和研究。

湖北省卫生厅医学研究基金资助项目, No. JX4B36

中南民族大学自然科学基金基金资助项目, No. HZY10012

作者贡献分布: 陈清波与高雯琪对此文所作贡献均等; 此课题由李劲、高雯琪、陈清波及姚品芳设计; 研究过程由高雯琪、陈清波、邓志芳、欧阳刚、胡文娟、刘莹及姚品芳操作完成; 数据分析由李劲、高雯琪及陈清波完成; 本论文写作由高雯琪、陈清波与李劲完成。

通讯作者: 李劲, 副教授, 博士, 430074, 湖北省武汉市洪山区民院路708号, 中南民族大学生命科学院。lijin@mail.scuec.edu.cn
电话: 027-67843181

收稿日期: 2011-07-02 修回日期: 2011-10-11

接受日期: 2011-10-16 在线出版日期: 2011-10-28

Association of the rs522616 single nucleotide polymorphism in the 5'-transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma

Qing-Bo Chen, Wen-Qi Gao, Zhi-Fang Deng, Yang-Gang Ou, Wen-Juan Hu, Ying Liu, Pin-Fang Yao, Li-Dong Wang, Jin Li

Qing-Bo Chen, Pin-Fang Yao, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Wen-Qi Gao, Zhi-Fang Deng, Yang-Gang Ou, Wen-Juan Hu, Ying Liu, Jin Li, School of Life Sciences, South Central University For Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer Research, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Medical Research Project of Health Ministry of Hubei, No. JX4B36; and the Natural Science Foundation of State Ethnic Affairs Commission of China, No. HZY10012

Correspondence to: Jin Li, Associate Professor, School of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Min Yuan Road 708, Hong Shan District, Wuhan 430074, Hubei, China. lijn@mail.scuec.edu.cn

Received: 2011-07-02 Revised: 2011-10-11

Accepted: 2011-10-16 Published online: 2011-10-28

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

Abstract

AIM: To investigate the genetic association between a single nucleotide polymorphism [-774 rs522616 (A/G)] in the matrix metalloproteinase 3 gene and susceptibility to esophageal cancer.

METHODS: Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples of sporadic cases of esophageal cancer in both Henan and Hubei, immigrants from an area of high incidence in Henan, and healthy controls in both Henan and Hubei. The rs522616 polymorphism was genotyped using PCR-RFLP, and genotyping results were analyzed using SPSS software.

RESULTS: The rs522616 (A/G) allele has three genotypes: GG, GA and AA. There were significant differences between healthy controls in Hubei and sporadic cases of esophageal cancer in Henan in genotypes GG and AA ($P = 0.001$, 0.003 ; $OR = 4.249$, 4.424); immigrants from an area of high incidence in Henan and healthy controls in genotype GG ($P = 0.019$, $OR = 0.488$); sporadic cases of esophageal cancer in Henan and sporadic cases of esophageal cancer in Hubei in genotypes GG and AA ($P = 0.04$, 0.001 ; $OR = 1.926$, 0.282); immigrants from an area of high incidence in Henan and sporadic cases of esophageal cancer in Henan in genotypes AG and AA ($P = 0.024$, 0.005 ; $OR = 0.549$, 2.311); and sporadic cases of esophageal cancer in Henan and healthy controls in Henan in genotypes AG and AA ($P = 0.049$, 0.005 ; $OR = 1.65$, 2.311). Moreover, there were significant differences between people in Hubei and those in Henan in genotype AA ($P = 0.001$, $OR = 2.553$), and between healthy controls (including healthy controls both in Henan and Hubei) and sporadic cases of esophageal cancer (including sporadic cases of esophageal cancer both in Henan and Hubei) in genotype AA ($P = 0.001$, $OR = 2.152$).

CONCLUSION: The single nucleotide polymorphism rs522616 in the transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase 3 gene is apparently associated with susceptibility

to esophageal cancer.

Key Words: Matrix metalloproteinase 3; Transcriptional regulatory region; Single nucleotide polymorphism; Esophageal squamous cell carcinoma; Genetic susceptibility

Chen QB, Gao WQ, Deng ZF, Ou YG, Hu WJ, Liu Y, Yao PF, Wang LD, Li J. Association of the rs522616 single nucleotide polymorphism in the 5'-transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3130-3136

摘要

目的: 探寻人类基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)基因单核苷酸多态性与食管鳞癌易感性的关系。

方法: 选择mmp3基因上游转录调控区-774位rs522616(A/G)位点为研究对象。利用蛋白酶K法提取人类外周血基因组DNA; 采用PCR-RFLP的方法对外周血标本进行基因分型, 分别对河南食管鳞癌散发病例、湖北食管鳞癌散发病例以及两地正常人、河南高发区移民的不同人群组合做病例-对照分析。运用SPSS软件(version17.0)对基因分型结果进行数据统计分析。

结果: rs522616(A/G)等位基因有AA、AG、GG 3种分型。湖北正常人群与河南散发人群在AA基因型频率上有显著差异($P=0.001$, $OR=4.249$), 在GG基因型频率有差异($P=0.003$, $OR=4.424$); 湖北正常人群与河南高发区移民在GG基因型频率上有差异($P=0.019$, $OR=0.488$); 湖北散发人群和河南散发人群在GG基因型频率上有差异($P=0.04$, $OR=1.926$)、在AA基因型频率上有显著差异($P=0.001$, $OR=0.282$); 河南散发患者与河南正常人群有在AA基因型频率上有显著差异($P=0.001$, $OR=1.893$)、在AG基因型频率上有差异($P=0.049$, $OR=1.652$); 河南高发区移民与河南散发患者在AA基因型频率上有显著差异($P=0.005$, $OR=2.311$)、在AG基因型频率上有差异($P=0.024$, $OR=0.549$); 另外, 湖北人群(湖北正常人群+湖北散发患者)与河南人群(河南正常人群+河南散发患者)在AA基因型频率有显著差异($P=0.001$, $OR=2.553$); 湖北与河南两地的正常人群与两地的散发病例AA基因型频率有显著差异($P=0.001$, $OR=2.152$)。

结论: MMP3基因上游转录调控区rs522616单

核苷酸多态性与人群食管鳞癌的遗传易感性有明显相关。

关键词: 基质金属蛋白酶3; 转录调控区; 单核苷酸多态性; 食管鳞癌; 遗传易感关联分析

陈清波, 高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 姚品芳, 王立东, 李劲. 人类MMP3基因5'端转录调控区rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系. *世界华人消化杂志* 2011; 19(30): 3130-3136

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3130.asp>

0 引言

食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是世界十大恶性肿瘤之一, 也是我国最常见的癌症之一, 目前其临床治疗效果还相当有限, 5年生存率不到15%^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类依赖锌离子的蛋白水解酶, 迄今为止在人基因组中已经发现了26种。MMPs具有降解细胞外基质等功能, 同时在细胞核内通过对基因的转录调控来调节细胞的生长和凋亡, 影响血管生成和免疫监视, 在肿瘤发生的早期起重要作用^[2,3]。在MMP3基因上众多的SNPs中, 5'端转录调控区的-1171 5A/6A位点备受关注。其启动子区-1171存在的5A和6A的基因多态性与多种肿瘤的易感性相关, 国内外对其进行了大量研究表明, 5A基因型可能与女性乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌以及口腔黏膜下纤维化患病风险相关^[4-6]。国内学者张健慧等^[7]研究结果表明, 5A基因型与食管鳞癌易感呈相关性, 但5A基因型与贲门癌(gastric cardiac adenocarcinoma, GCA)易感性不相关。欧阳刚等^[8-10]利用病例-对照分析, 发现MMP3基因2号外显子单核苷酸多态性rs679620与食管鳞状上皮细胞癌相关。MMP3基因5'调控区SNP多态性与食管癌相关性尚未见报道。本研究利用PCR-RFLP技术对湖北、河南食管鳞癌散发患者以及两地正常人、河南高发区移民的不同人群分组进行MMP3基因SNP分型研究, 旨在发现MMP3基因上游5'端转录调控区的rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 蛋白酶K为默克公司产品, 引物、dNTP购于上海赛百盛基因技术有限公司, Taq聚合酶购于天根生化科技(北京)公司, *EcoR* I 限制性内切酶购于TaKaRa公司。

■研究前沿

食管癌的发生与遗传、环境及生活方式密切相关, 他是多因素作用, 多基因参与, 多阶段发展的疾病。对食管癌的发生和发展的分子遗传机制的研究是我国癌症研究的热点之一。

■相关报道

近有报道, MMP3 也存在于肝细胞核内并参与细胞凋亡的过程。进一步的研究表明, MMP3 含有的多个 NLS(nuclear localization signal) 介导 MMP3 的细胞核内定位; 其多肽链 C 末端的 PEX 区域参与核内 DNA 的结合, 并证实了 MMP3 作为反式因子参与细胞核内基因的转录调控。

1.2 方法

1.2.1 分组: 所有研究对象的血样样本按来源地区(籍贯)和食管鳞癌病理诊断(并排除有其他恶性肿瘤病史)分为 5 组: (1)湖北省食管鳞癌散发患者的 EDTA 抗凝血由湖北省肿瘤医院经胃镜检查 and 病理切片诊断后收集[男 70 例, 女 25 例; 年龄范围 44-82(平均 64.4 ± 9.6) 岁]; (2)湖北正常对照为中国人民解放军广州军区武汉总医院和武汉市中医医院随机收集的非肿瘤患者的 EDTA 抗凝静脉血[男 87 例, 女 40 例; 年龄范围 40-78(平均 55.8 ± 10.6) 岁]; (3)湖北省钟祥的河南高发区(淅川)移民对照随机选自该地区自愿参加内镜普查移民人群的 EDTA 抗凝静脉血[男 70 例, 女 35 例; 年龄范围 40-69(平均 52.3 ± 7.8) 岁], 由湖北省肿瘤医院收集, 并经胃镜检查 and 病理活检证实来自非食管癌患者; (4)河南高发区(安阳市人民医院诊断收治的)食管鳞癌患者[男 92 例, 女 37 例; 年龄范围 40-77(平均 59.6 ± 6.8) 岁]; (5)安阳当地正常对照, 随机选自该地区自愿参与内镜普查人群的 EDTA 抗凝静脉血[男 80 例, 女 40 例; 年龄范围 40-87(平均 54.4 ± 9.7) 岁], 由郑州大学基础医学院癌症研究室提供; 所有标本均为 -70°C 保存。按分层抽样原则, 各实验组的个体年龄均大于 40 岁, 每组男女性别比例按 2:1 抽样, 使之与人群食管鳞癌患者实际性别比例一致; 两两相互匹配(包括年龄、性别和地域匹配)的两肿瘤组和三对照组相互间在年龄、性别分布上分别经 t 检验和 χ^2 检验均无统计学差异($P > 0.05$, $t > 0.05$)。在不同人群的年龄、性别和地域相匹配和针对医院诊断明确的食管鳞癌患者血样全收集及正常对照人群血样随机收集的前提下, 按随机分层抽样原则取样分析, 并利用 Hardy-Weinberg 平衡法检测样本以确保抽样的群体代表性。

1.2.2 设计引物及限制性内切酶筛选: 根据 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 查询 MMP3 基因序列信息, 利用软件 Primer Premier (version 5.0) 设计引物和筛选限制性内切酶。上游引物: 5'-AACAAAGAGGGTCTGTGAAAA-3'; 下游引物 5'-GGTAAGCAATGTAATTCATTTGA-3'。扩增片段长度 142 bp, 退火温度为 46.5°C 。因 rs522616 无酶切位点, 所以在下游引物 3' 端第 2 个碱基人为地由 "C" 改为 "G", 使之与多态性位点形成 GAATTC, 即 *EcoR* I 的酶切识别序列。PCR 扩增片段(142 bp)酶切后片段长度为 119 bp 和 23 bp。

表 1 PCR 扩增体系

成分	体积(μL)
ddH ₂ O	20.50
10 \times Buffer	2.50
100 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	0.25
100 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	0.25
10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP	0.25
Taq 聚合酶	0.25
人体基因组 DNA 模板	1.00
总体积	25.00

1.2.3 基因组 DNA 制备: 抽取 200 μL 抗凝血至于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 无菌蒸馏水裂红后, 经细胞裂解液(内含 NaCl/EDTA、SDS 及蛋白酶 K)裂解, 于 56°C 温箱中孵育 3 h, 氯仿异戊醇抽提 DNA, 以荧光光度计检测 DNA 浓度, 于 -20°C 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增: 按照 Taq 聚合酶使用说明书配置反应体系(表 1)。经温度梯度实验后确定最优 PCR 反应程序: (1) 94°C , 5 min; (2) 94°C , 1 min; (3) 46.5°C , 1 min; (4) 72°C , 15 s; (5) 回到步骤(2), 35 循环; (6) 72°C , 10 min。PCR 反应结束后, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 凝胶成像仪拍照。

1.2.5 限制性内切酶酶切: 按照 *EcoR* I 的产品说明书体系和要求进行酶切。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测基因分型: 本实验所用凝胶浓度为 8%, 以 1 \times TBE 为电解液, 电压 15 V/cm。电泳完成后, EB 染色, 凝胶成像仪拍照。

1.2.7 MMP3 基因 5' 端调控区 DNA 序列中转录因子核心序列的搜索与比对: 通过生物信息学方法对 MMP3 基因上游 5' 转录调控区进行分析, 运用 Searching Transcription Factor Binding Sites(ver 1.3) 软件(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)对 MMP3 基因翻译起始点上游 -2 000 bp 区域的预测结果显示, 可能与 rs522616 附近核苷酸序列结合的转录因子有 C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein beta) 和 CRE-BP1(cAMP-responsive element binding protein 1)。Williams 等^[11]对增强子 C/EBP 转录调节功能的研究发现, C/EBP 所结合的顺式作用元件核心序列为 TTAATTGCTTCA。据此, 应用 Clustal-W 软件对 MMP3 基因 5' 端调控区 DNA 序列进行比对。

统计学处理 对于实验中涉及的人群信息包括年龄、是否患食管癌、SNP 位点基因分型

表 2 不同人群MMP3 SNP rs522616基因分型统计

分组	<i>n</i>	GG <i>n</i> (%)	AG <i>n</i> (%)	AA <i>n</i> (%)	Hardy-Weinberg 平衡 <i>P</i> 值	G : A
湖北正常人群	127	43(0.339)	68(0.535)	16(0.126)	0.1707	0.606 : 0.394
湖北散发病例	95	28(0.295)	53(0.558)	14(0.147)	0.1707	0.574 : 0.426
河南高发区正常人群	120	30(0.250)	68(0.567)	22(0.183)	0.1295	0.533 : 0.467
河南高发区散发病例	129	23(0.178)	57(0.442)	49(0.380)	0.3704	0.399 : 0.601
高发易感移民人群	105	21(0.200)	62(0.590)	22(0.210)	0.0636	0.495 : 0.505

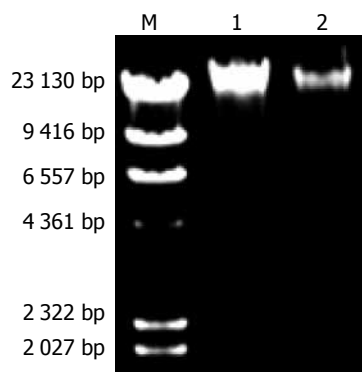


图 1 蛋白酶K法提取外周血基因组DNA。1, 2: 人体外周血基因组条带; M: Marker.

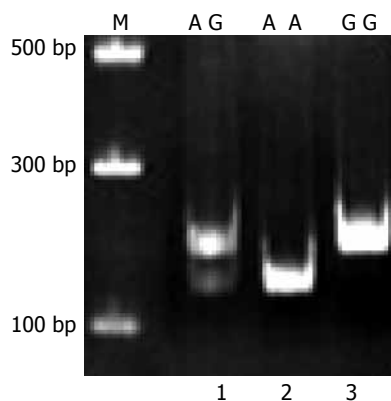


图 2 rs522616区域DNA PCR扩增产物EcoR I 酶切结果。1-3: EcoR I 完全酶切产物; M: Marker.

等数据, 首先输入EXCEL里进行初步处理; 然后运用SPSS17.0软件包, 进行 t 检验、 χ^2 检验、Logistic regression分析等; HWE值用SHEsis软件(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)计算。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 基因组DNA提取 提取后的人体外周血基因组DNA经琼脂糖凝胶电泳结果(图1)。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳基因分型 PCR产物酶切后经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 依据基因分型结果可知, rs522616 PCR扩增产物经EcoR I 完全酶切后产生3种结果, 1号泳道为杂合型半数酶切, 从上到下2个片段大小分别为142 bp、119 bp, 即A/G基因型; 2号泳道为纯合型完全酶切, 单一片段大小为119 bp, 即A/A基因型; 3号泳道为纯合型完全不酶切, 此单一片段大小为142 bp, 即G/G基因型(图2)。其中, 随机抽样上述PCR产物的10%进行DNA测序验证, 其结果与酶切结果相符合。

2.3 MMP3基因型相关数据统计 rs522616基因型频率差异的统计结果见表2, 之后对rs522616各组间的基因型进行 χ^2 检验和Logistic回归分析。对研究对象中的湖北人群(包括湖北食管鳞癌病例和湖北正常人群共计222人)与河南人群(包括河南食管鳞癌散发病例和河南正常人群共计249人)的MMP3 SNP rs522616基因分型进行

■创新盘点

新发现在基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)基因基因的5'端转录调控区DNA序列中单核苷酸多态性位点rs522616具有AA型的人有更高的MMP3的表达量, 更容易罹患食管癌, 且更快地引起癌症的转移。这也可能是食管癌高发区特别是一些高发家族里有较多人患食管癌并且预后很差的原因之一。

χ^2 检验和Logistic回归分析, 发现: 具AA基因型的河南人群达28.5%, 湖北人群仅为13.5%($P = 0.001$, $\chi^2 = 15.677$, $OR = 2.553$, 95%CI = 1.591-4.097, 两人群Hardy-Weinberg 平衡*P*值均>0.05; 此两种人群在性别、年龄及籍贯上能相互匹配)。对研究对象中的正常人群(包括湖北和河南正常人群共计247人)与两地食管鳞癌患者(包括湖北和河南食管鳞癌病例共计224人)的MMP3 SNP rs522616基因分型进行 χ^2 检验和Logistic回归分析发现: 具AA基因型的两地食管鳞癌患者达28.1%, 两地正常人群仅为15.3%($P = 0.001$, $\chi^2 = 11.319$, $OR = 2.152$, 95%CI = 1.370-3.382, 两人群Hardy-Weinberg平衡*P*值均>0.05; 此两种人群在性别、年龄及籍贯上能相互匹配, 表3)。

经SPSS检验, 发现在rs522616(G/A)SNP位点上, 湖北正常人群与河南食管鳞癌人群在AA基因型频率上有显著差异($P = 0.001$, $OR = 4.249$); 在GG基因型频率有差异($P = 0.003$, $OR = 4.424$); 湖北正常人群与河南高发区移民在GG基因型频率上有差异($P = 0.019$, $OR = 0.488$); 湖北食管鳞癌人群和河南食管鳞癌人群在GG基因型频率上有差异($P = 0.04$, $OR = 1.926$); 在AA基因型频率上有显著差异($P = 0.001$, $OR = 0.282$);

■应用要点

这项研究对于食管癌易患人群卫生工作中的“预防为主”和“早诊早治”来说, SNP-rs522616可作为一个潜在的食管癌易感性的“肿瘤标志物”, 可指导相关的预防、治疗和研究工作。

表 3 分组人群MMP3 SNP rs522616基因型频率差异 χ^2 检验和Logistic回归分析

不同人群 组间比较		GG		AG		AA	
		P值	χ^2 值	P值	χ^2 值	P值	χ^2 值
		OR值	95%CI	OR值	95%CI	OR值	95%CI
湖北 正常组 vs	湖北散发人群	0.488	0.480	0.739	0.111	0.645	0.213
		0.816	0.460–1.450	1.095	0.642–1.868	1.199	0.554–2.596
	河南高发区正常人群	0.127	2.325	0.622	0.243	0.212	1.559
		0.651	0.651–1.132	1.135	0.687–1.874	1.557	0.774–3.133
	河南高发区散发病例	0.003	8.593	0.134	2.243	0.001	21.771
		0.424	0.237–0.758	1.456	0.890–2.382	4.249	2.256–8.005
湖北 散发组 vs	高发易感移民人群	0.019	5.526	0.400	0.707	0.109	2.929
		0.488	0.267–0.893	1.251	0.742–2.109	1.839	0.910–3.718
	河南高发区正常人群	0.462	0.539	0.898	0.017	0.483	0.492
		0.798	0.436–1.460	1.036	0.602–1.783	1.299	0.625–2.700
	河南高发区散发病例	0.040	4.219	0.086	2.947	0.001	14.627
		1.926	1.025–3.619	1.594	0.935–2.718	0.282	0.144–0.551
河南高发区 散发组 vs	高发易感移民人群	0.12	2.420	0.642	0.217	0.253	1.305
		1.672	0.872–3.204	0.875	0.499–1.534	0.652	0.312–1.362
	河南高发区正常人群	0.167	1.908	0.049	3.874	0.001	11.778
		0.651	0.353–1.200	1.652	1.001–2.726	1.893	1.041–3.442
	高发易感移民人群	0.673	0.179	0.024	5.115	0.005	7.945
		0.868	0.450–1.675	0.549	0.326–0.925	2.311	1.282–4.166
河南高发区 正常组 vs	高发易感移民人群	0.371	0.799	0.718	0.130	0.621	0.244
		0.750	0.399–1.411	1.103	0.649–1.875	1.181	0.611–2.283

河南食管鳞癌患者与河南正常人群有在AA基因型频率上有显著差异($P = 0.001$, $OR = 1.893$), 在AG基因型频率上有差异($P = 0.049$, $OR = 1.652$); 河南高发区移民与河南食管鳞癌患者在AA基因型频率上有显著差异($P = 0.005$, $OR = 2.311$), 在AG基因型频率上有差异($P = 0.024$, $OR = 0.549$); 另外, 湖北人群(湖北正常人群+湖北食管鳞癌患者)与河南人群(河南正常人群+河南食管鳞癌患者)在AA基因型频率有显著差异($P = 0.001$, $OR = 2.553$); 湖北与河南两地的正常人群与两地的食管鳞癌病患在MMP3 SNP rs522616基因AA基因型频率有显著差异($P = 0.001$, $OR = 2.152$). 因此, 河南人群在MMP3基因5'端调控区rs522616位点上具有明显较高的AA基因型频率可能与其食管鳞癌遗传易感性有明显的关联关系。

2.4 MMP3基因5'端调控区DNA序列中转录因子核心序列的搜索与比对的结果 应用Clustal-W软件对MMP3基因5'端调控区DNA序列进行比对发现, rs522616及附近DNA序列与其能较好匹配, 且rs522616的第14位为单核苷酸多态性位点(图3)。

3 讨论

湖北省钟祥柴湖乡在50多年前因整体迁入河南

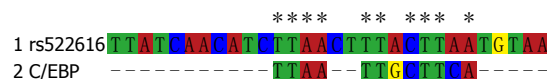


图 3 C/EBP核心序列与MMP3基因5'端调控区DNA序列的Clustal-W比对。

浙川食管癌高发区居民(约4万人)而成为一个新的相对封闭的食管癌高发区。这一特殊的人群为研究环境、遗传与食管癌的关系提供了极佳的样本。2004年初湖北省肿瘤医院对钟祥柴湖乡进行的流行病学调查结果显示, 该迁移人群人口已增长至10万多人, 其食管癌的发病率、死亡率仍呈上升趋势($>131/10$ 万)^[12,13]。在以往的食管癌普查过程中, 利用电子内窥镜检查发现, 移民村的居民与湖北当地的土著居民相比较食管生理状态存在明显不同和异常。与环境因素相比, 河南移民村居民极为明显的食管癌家族聚集趋势提示遗传因素在食管癌变过程中起着重要作用^[12,13]。

已发现MMP1、MMP2、MMP3基因多态性与一些肿瘤的遗传易感性相关, 进一步研究MMPs家族其他成员与肿瘤易感性的关系将为肿瘤的预防和早期诊断及治疗提供更完善的分子生物学基础^[14]。近有报道, MMP3也存在于肝

细胞核内并参与细胞凋亡的过程^[3]. 进一步的研究表明, MMP3含有的多个NLS(nuclear localization signal)介导MMP3的细胞核内定位; 其多肽链C末端的PEX区域参与核内DNA的结合, 并证实了MMP3作为反式因子参与细胞核内基因的转录调控^[15]. 其中, MMP3蛋白第44-56位氨基酸的NLS₀(LKDVDKQFVRRKD)中含有SNP Lys45Glu(rs679620), 他的多态性对NLS₀的影响及其后续的转录调控和细胞凋亡的改变可能与癌症的发生和发展相关^[8,9]. 随着MMP3在肿瘤发生、发展和转移中的作用机制研究的进展, 将会进一步了解有关MMP3基因5'端转录调控区单核苷酸多态性对MMP3蛋白的表达效率和数量, 及其在细胞代谢和周期调控中的影响, 进而揭示其在诱发肿瘤及其导致肿瘤转移中的作用机制. 迄今为止, 对MMP3与肿瘤的关系的研究大都集中在研究其基因启动子区域的-1171的5A/6A SNP现象, 而对基因5'端转录调控区其他SNP的筛查和研究报道极少^[16]. 一般认为, 转录因子特异结合序列可能因其碱基组成和排列的变化, 导致转录因子对核苷酸序列识别和结合能力的改变, 造成转录活性增强或者减弱, 进而改变MMP3蛋白的表达量, 这有可能对肿瘤发生、发展和转移产生较大影响.

转录因子C/EBP特异识别和结合的核心序列与MMP3基因5'端调控区rs522616附近核苷酸序列能良好匹配, 而转录因子C/EBP(CCAAT enhancer factor)是CCAAT增强子结合蛋白, 显然他对其调控的基因表达有重要影响. 国内外研究者发现C/EBP β 与肿瘤细胞的侵袭和扩散有关, 过表达的C/EBP β 可以激活elafin在乳腺癌细胞中表达, 使癌细胞侵袭和转移能力增强^[17,18]. 这些表明, C/EBP转录因子在肿瘤的发生和发展中可能具有重要的作用.

MMP3基因5'端转录调控区DNA序列中单核苷酸多态性位点rs522616由G到A的改变, 显示其更符合C/EBP转录因子与之结合的序列要求, 即具更强的结合能力导致更明显的增强子作用, 因此rs522616的A型MMP3的转录效率也会显著增强. MMP3蛋白表达量的升高则会导致肿瘤易感和浸润扩散以及预后效果差, 这种遗传差异暗示河南食管癌高发区人群较高比例的MMP3基因rs522616的AA基因纯合型可能与其食管癌高发有关; 在基因转录调控区顺式因子中关键性的单核苷酸的改变有可能导致转录因子在与之结合时结构有明显改变, 以致对MMP3

基因的表达调控也发生重大变化, 引起细胞生长分化的错误, 加速肿瘤的发生、发展和转移.

Cre-BP1(ATF-2)重要的细胞信号转导途径中的转录因子乙型肝炎病毒X蛋白与C/EBP α 和ATF-2相互作用形成复合物而作用于近端启动子的cAMP反应元件位点(CRE-1), 从而介导了磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶基因的反式激活^[19], 从而诱导一系列生理生化过程的改变. 转录因子C/EBP和Cre-BP1可能在rs522616附近核苷酸序列结合后相互作用, G \rightarrow A的改变, 共同作用导致MMP3基因转录效率的增强.

由此看出, rs522616由G到A的单核苷酸多态性改变(特别是AA基因纯合型)可作为潜在的人群食管癌易感性的肿瘤标志物. 不过, 以上分析尚需深入的多方面研究来证实.

总之, 通过MMP3基因5'端调控区单核苷酸多态性(rs522616)进行SNP分型检测及统计分析, rs522616的AA基因型与食管癌的部分人群高发和易感呈现明显的相关性.

4 参考文献

- 1 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究. 中华流行病学杂志 2003; 24: 939-943
- 2 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174
- 3 Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc JF, Robinson DR, Rosenbaum J. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* 2006; 169: 1390-1401
- 4 Zinzindohoué F, Blons H, Hans S, Lorient MA, Houllier AM, Brasnu D, Laccourreye O, Tregouet DA, Stucker I, Laurent-Puig P. Single nucleotide polymorphisms in MMP1 and MMP3 gene promoters as risk factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 2021-2026
- 5 Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3820-3823
- 6 Tu HF, Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Kao SY, Chang CP, Liu TY. The functional (-1171 5A \rightarrow 6A) polymorphisms of matrix metalloproteinase 3 gene as a risk factor for oral submucous fibrosis among male areca users. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 99-103
- 7 Zhang J, Jin X, Fang S, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Kuang G, Dong Z. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2519-2524
- 8 欧阳刚, 姚品芳, 胡文娟, 黄环元, 王红, 王朝元, 陈思礼, 王立东, 李劲. MMP3基因Lys45Glu单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2456-2462

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 研究内容具有一定的研究价值.

- 9 Ouyang G, Yao PF, Hu WJ, Chen QB, Wang H, Wang LB, Li J. A non-synonymous coding SNP Lys45Glu of MMP3 associated with ESCC genetic susceptibility in population of Henan, China. *Chin-Ger J Clin Oncol* 2009; 8: 510-515
- 10 欧阳刚, 胡文娟, 姚品芳, 黄环元, 王红, 王朝元, 陈思礼, 王立东, 李劲. PCR-RFLP中Chelex-100制备DNA模板方法建立及其条件优化. 中南民族大学学报(自然科学版) 2009; 28: 38-41
- 11 Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE. C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 30232-30239
- 12 姚品芳, 黄环元, 付由高, 李广灿, 夏和顺, 杨小玲, 王瑞勤, 王锡印, 沙聚伟. 湖北钟祥河南移民与湖北本地居民食管鳞状细胞癌组织中HPV感染的比较. 肿瘤防治研究 2005; 32: 46-48
- 13 Yao PF, Li GC, Li J, Xia HS, Yang XL, Huang HY, Fu YG, Wang RQ, Wang XY, Sha JW. Evidence of human papilloma virus infection and its epidemiology in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1352-1355
- 14 金霞, 张健慧. 基质金属蛋白酶基因多态性的研究进展. 国外医学·遗传分册 2005; 28: 76-79
- 15 Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 2391-2413
- 16 葛金梅, 张忠英, 彭宣宪, 任建林. SNP的研究现状及在MMPs研究中的应用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2128-2137
- 17 Sterneck E, Zhu S, Ramirez A, Jorcano JL, Smart RC. Conditional ablation of C/EBP beta demonstrates its keratinocyte-specific requirement for cell survival and mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 2006; 25: 1272-1276
- 18 O'Brien P, O'Connor BF. Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 1130-1145
- 19 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子ATF-2的调节. 世界华人消化杂志 2004; 12: 165-168

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *Vd*, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.