

• 论著-临床研究 •

MMP-11 在膀胱癌中的表达及临床意义*

毕娅琼¹ 蒋佳志¹ 晏鑫¹ 袁佳仪¹ 郭梓鑫¹ 冯雨嘉¹ 何恒晶¹ 李胜^{2,3}

【摘要】 目的:探究 MMP-11 基因表达的在膀胱癌(BC)中的临床意义,并研究 MMP-11 推动 BC 发生、发展的机制。方法:从 GEO 数据库中下载 BC 基因表达数据集 GSE13507,分析 MMP-11 在 BC 中的表达情况及 MMP-11 与 BC 的临床病理相关性和预后相关性;利用基因富集分析(GSEA)方法,分析 MMP-11 高表达样本的富集基因及 MMP-11 调控的相关通路。结果:MMP-11 在 BC 中的表达水平明显高于其在正常膀胱组织中的表达水平($P=0.008$);MMP-11 高表达的 BC 患者在疾病进展($P=0.026$)、T 分期($P=0.001$)、N 分期($P<0.0001$)及分级($P<0.0001$)方面明显比 MMP-11 低表达组差;MMP-11 高表达组 BC 患者的肿瘤特异性生存期明显差于 MMP-11 低表达组($P=0.0002$),MMP-11 高表达组 BC 患者的总生存期亦有差于 MMP-11 低表达组的趋势($P=0.0884$);MMP-11 高表达样本富集了与未折叠蛋白反应、精子形成、G2M 检查点、MYC 信号通路、E2F 信号通路、MTORC1 信号通路、有丝分裂纺锤体形成、血管生成、糖酵解、胆固醇平衡、PI3K/AKT/mTOR 通路、炎症反应相关的基因集。结论:MMP-11 在 BC 中高表达,且与 BC 的恶性程度和疾病进展相关,高表达 MMP-11 的 BC 患者临床预后更差。因此 MMP-11 或可作为潜在的判断 BC 患者预后的标志物和治疗 BC 的靶标。

【关键词】 膀胱癌;MMP-11;临床意义

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.03.009

[中图分类号] R737.14 [文献标志码] A

Expression of MMP-11 in bladder cancer and its clinical significance

BI Yaqiong¹ JIANG Jiazhi¹ YAN Xin¹ YUAN Jiayi¹ GUO Zixin¹
FENG Yujia¹ HE Hengjing¹ LI Sheng^{2,3}

¹Department of Urology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430071, China;

²Department of Biological Repositories, Zhongnan Hospital of Wuhan University; ³Human Genetic Resources Preservation Center of Hubei Province)

Corresponding author: LI Sheng, E-mail: lisheng-znyy@whu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the clinical relevance of MMP-11 expression in patients with bladder cancer (BC) and the corresponding mechanisms. **Method:** GEO dataset was collected and the corresponding expression profile and clinical information were analyzed. Gene set enrichment analysis (GSEA) was conducted to explore the associated gene sets regulated by MMP-11. **Result:** The expression of MMP-11 was upregulated in BC ($P=0.008$). MMP-11 expression was significantly associated with progression ($P=0.026$), T stage ($P=0.001$), N stage ($P<0.0001$), grade ($P<0.0001$). Higher expression of MMP-11 predicted poor specific survival in BC ($P=0.0002$), and higher expression of MMP-11 tended to predict poor overall survival in BC ($P=0.0884$). The results of GSEA indicated that MMP-11 regulated gene sets associated with unfolded protein response, spermatogenesis, G2M checkpoint, MYC signaling pathway, E2F targets, mTORC1 signaling pathway, mitotic spindle formation, angiogenesis, glycolysis, cholesterol homeostasis, PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, inflammatory response. **Conclusion:** MMP-11 was highly expressed in BC, correlated with worse clinical pathological features and acted as a prognostic marker and target in the diagnosis and treatment of patients with BC.

Key words bladder cancer; MMP-11; clinical significance

膀胱癌(bladder cancer, BC)是泌尿系统最为常见的恶性肿瘤之一,其具有复发率高,易侵袭周

围组织,呈浸润性生长,患者需多次手术等特点^[1]。BC 是一个多因素、多步骤的复杂变化过程,与多种环境因素相关^[2],但目前 BC 的发生发展机制并不是十分清楚^[3]。经研究发现,肿瘤的复发、侵袭、转移与肿瘤的细胞外基质降解的关系十分紧密,肿瘤的侵袭和转移必须先破坏细胞外基质和血管壁基底膜的屏障,而细胞外基质的降解主要依赖蛋白水解酶,参与破坏细胞外基质的酶类中基质金属蛋白

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 81802541);
武汉大学中南医院科技创新培育基金(编号 znyy2017050)

¹武汉大学中南医院泌尿外科 武汉大学第二临床学院(武汉,430071)

²武汉大学中南医院生物样本库

³湖北省人类遗传资源保藏中心

通信作者:李胜, E-mail: lisheng-znyy@whu.edu.cn

酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)起主要作用^[4]。MMPs 是一类 Zn 离子依赖性内肽酶,具有相似的氨基酸序列和结构^[5,6],大多以酶原的形式由细胞分泌,可降解基底膜^[7-10],分解多种细胞外基质^[11]。目前研究发现在肿瘤的浸润和转移中 MMP-11 发挥重要作用^[12,13],可能的原因与其促进细胞增殖、抗细胞凋亡和具有组织重塑功能相关^[14]。但国内关于 MMP-11 与 BC 的临床意义的研究较少。

NCBI 的基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)是一个基因表达数据资源库,可公共使用和发布基因表达数据,汇聚了大量表达谱数据,是多种生物信息学分析所依赖的重要资源。我们通过收集 GEO 公共数据集 GSE13507^[15,16] 并对其进行分析,探究 MMP-11 在 BC 中的表达情况,讨论 MMP-11 与 BC 的临床病理相关性及预后相关性,并使用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)法预测 MMP-11 在 BC 中调控的信号通路,以期为临床上 BC 的分子诊断和靶向治疗奠定基础。

1 资料与方法

1.1 下载数据资料

从 NCBI 的 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)中下载 GSE13507^[15,16] 基因表达谱数据。在 GSE13507 中, MMP-11 基因对应的探针为 ILMN_1749226。

1.2 临床相关性分析

根据 MMP-11 在该数据集中表达水平的中位数,将 BC 患者分为 MMP-11 高表达组和 MMP-11 低表达组,分析两组中 MMP-11 与 BC 的临床病理相关性。

1.3 GSEA

首先将肿瘤组织样本根据 MMP-11 表达水平分为高、低表达两组,再通过 GSEA 研究 MMP-11 的表达水平影响的生物通路基因集。采用 GSEA3.0 版本进行分析。从 GSEA 网站 MsigDB 数据库中获得的基因集作为参照基因集,置换次数为 1 000 次。通过 GSEA 分析 MMP-11 对 BC 患者可能的作用机制。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6 进行绘图和统计分析。使用两独立样本 *t* 检验分析正常膀胱组织和 BC 组织中 MMP-11 的表达差异, MMP-11 表达值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;采用卡方检验分析 MMP-11 高表达组和 MMP-11 低表达组与 BC 患者的临床病理相关性;使用 Log-rank (Mantel-Cox) 法对 MMP-11 高表达组和 MMP-11 低表达组 BC 患者进行生存期分析研究,

以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;在 GSEA 中,使用“h. all. v6. 0. symbols. gmt”作为参照基因集,将 $P < 0.05$ 及错误发现率(false discovery rates, FDR) < 0.25 的基因集作为显著富集的基因集。

2 结果

2.1 MMP-11 在 BC 中的表达情况

如图 1 所示, MMP-11 在 BC 表达明显高于其在正常膀胱组织中的表达水平 [(8.322 ± 0.091) vs. (7.329 ± 0.089) , $P = 0.008$]。

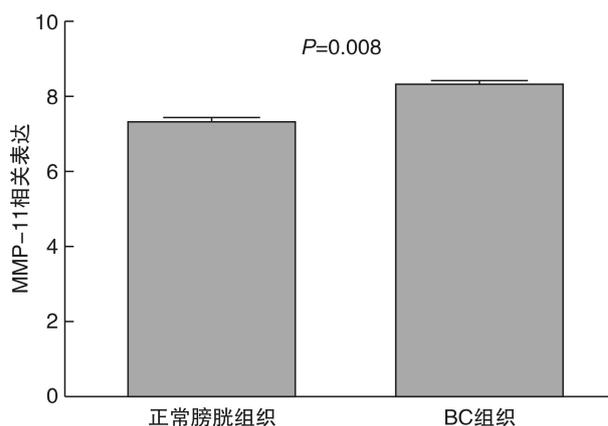


图 1 MMP-11 在 BC 中的表达水平

2.2 MMP-11 与 BC 的临床病理相关性

在 GSE13507 中, MMP-11 高表达组 BC 患者在疾病进展 ($P = 0.026$)、T 分期 ($P = 0.001$)、N 分期 ($P < 0.0001$) 以及不同分级 ($P < 0.0001$) 方面明显差于 MMP-11 低表达组,见表 1。

2.3 MMP-11 与 BC 患者的预后相关性

在 BC 样本数据集 GSE13507 中, MMP-11 高表达组 BC 患者的肿瘤特异性生存期明显差于 MMP-11 低表达组 ($HR = 0.2619$, 95% CI: 0.1304 ~ 0.5264, $P = 0.0002$), 见图 2A。而 MMP-11 高表达组 BC 患者的总生存期亦有差于 MMP-11 低表达组的趋势 ($HR = 0.6602$, 95% CI: 0.4095 ~ 1.0640, $P = 0.0884$), 见图 2B。以上结果说明 MMP-11 的高表达与 BC 患者生存期有关。

2.4 MMP-11 高表达的 GSEA

为了研究 MMP-11 基因对 BC 细胞可能的作用机制,本研究使用 BC 样本数据集 GSE13507 中的 165 例膀胱组织进行 GSEA 分析,结果表明 MMP-11 高表达的肿瘤样本富集了与未折叠蛋白反应、精子形成、G2M 检查点、MYC 信号通路、E2F 信号通路、MTORC1 信号通路、有丝分裂纺锤体形成、血管生成、糖酵解、胆固醇平衡、PI3K/AKT/mTOR 通路、炎症反应有关的基因(表 2),说明 MMP-11 可能通过调节 BC 患者的以上生物学过程或通路等方式,进而影响 BC 的发生及发展。

表1 MMP-11基因表达与BC患者的临床病理相关性
例(%)

指标	例数	MMP-11表达		χ^2	P值
		高	低		
年龄/岁				3.258	0.071
≤55	29	10(6.06)	19(11.52)		
>55	136	72(43.64)	64(37.78)		
性别				2.727	0.099
男	135	63(38.18)	72(43.63)		
女	30	19(11.52)	11(6.67)		
是否复发				1.639	0.200
是	36	17(10.30)	19(11.51)		
否	67	23(13.93)	44(26.66)		
是否进展				4.792	0.026
是	31	21(12.56)	10(6.05)		
否	134	61(36.96)	73(44.23)		
T分期				11.878	0.001
T ₀ ~T ₁	104	41(24.85)	63(38.18)		
T ₂ ~T ₄	61	41(24.85)	20(12.12)		
N分期				12.754	<0.0001
N ₀	149	67(40.61)	82(49.70)		
N ₁ ~N ₃	15	14(8.48)	1(0.61)		
M分期				1.381	0.240
M ₀	158	77(46.67)	81(49.09)		
M ₁	7	5(3.03)	2(1.21)		
分级				20.004	<0.0001
高	60	16(9.70)	44(26.66)		
低	105	66(40.00)	39(23.64)		

注:GSE13507样本数据集中有62例样本“是否复发”信息缺失,有1例样本N分期显示为“N_x”,表示该样本区域淋巴结情况无法评估,故未纳入表格。

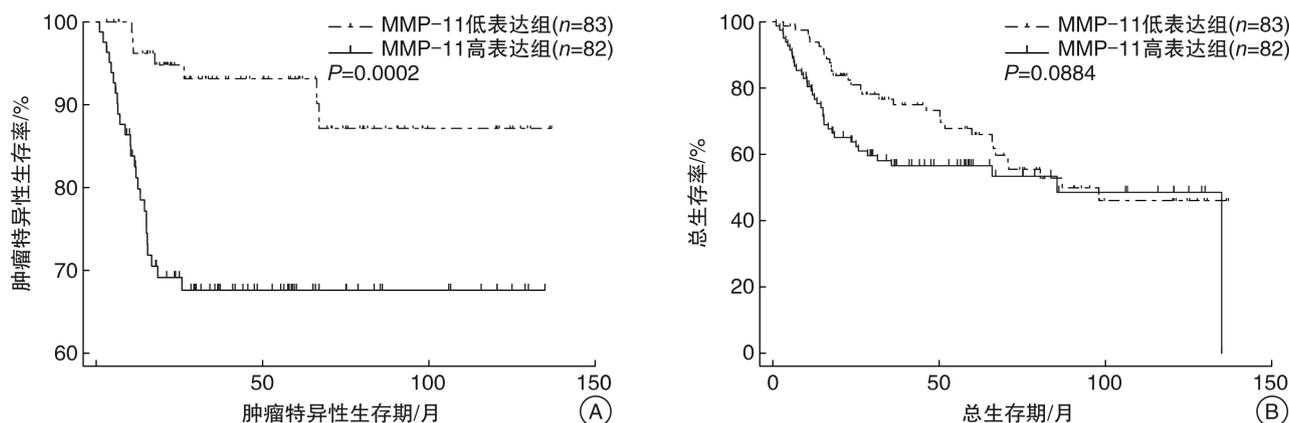
3 讨论

恶性肿瘤最重要的生物学特征之一是浸润和转移,肿瘤发生局部浸润和远处转移,则必须突破细胞外基质的屏障。MMPs是可降解细胞外基质的酶类之一,其可以降解细胞外基质的不同成分使上皮间质转化、细胞间黏附以及肿瘤血管生成^[17,18]。MMP-11是一种锌离子依赖性的内肽酶,属于MMPs家族,其作用底物主要是基质中的蛋白多糖和糖蛋白,能降解细胞外基质和基底膜,可以导致细胞外基质代谢平衡失调,从而引发细胞外基质的浸润和转移。且MMP-11具有一些特性:①MMP-11能降解非细胞外基质的丝氨酸蛋白酶抑制剂、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶、胰岛素样生长因子结合蛋白-1;②MMP-11在细胞内以45kDa的酶形式为活

化状态释放。研究证实,MMP-11在大多数恶性肿瘤如乳腺癌、口腔癌和食管癌中均有表达,在肿瘤的发生、发展和预后中扮演着重要角色^[18]。

在多数研究中报道了MMP-11的表达可以促进肿瘤生长、转移,对肿瘤细胞自身有抗凋亡作用^[19],且MMP-11在肿瘤发生和进展中的作用在不同的小鼠肿瘤模型中已有所表现。有研究利用MMP-11过度表达的小鼠和MMP-11缺陷的小鼠进行实验,结果显示MMP-11过度表达的小鼠体重和体内葡萄糖含量明显下降,氧化应激增强,线粒体的结构功能缺陷,代谢从氧化磷酸化转化为有氧糖酵解,进而糖酵解基因的表达增强。这种氧化应激可能是由于MMP-11介导的胰岛素样生长因子1(IGF1)生物利用度增加,以及在脂肪组织中IGF1/AKT/FOXO1信号的激活,激活的AKT可以促进细胞内活性氧的积累,并在癌细胞中诱导有氧糖酵解,同时增加乳酸的产生^[20~21]。另外,在乳腺癌细胞中MMP-11 mRNA的缺陷抑制了体外和体内肿瘤的增殖、生长和血管形成^[22]。另一项研究表明,MMP-11表达与炎症有关^[23]。在乳腺癌中表达MMP-11的单核炎性细胞可释放IL-1、IL-5、IL-6、IL-17、干扰素 β 和NF- κ B等促炎因子并且和患者的不良预后相关。高表达MMP-11的单核炎性细胞中促炎因子的上调和乳腺癌的浸润转移相关。但MMP-11表达对癌细胞自身有抗炎作用^[17]。对此可推测GSEA分析结果显示的MMP-11也可能通过类似方式调控炎症反应等生物学过程进而影响BC的发生发展,但具体的作用机制还需要进一步的研究。

本研究结果表明:①MMP-11在BC中的表达水平明显高于其在正常膀胱组织中的表达水平,提示MMP-11与BC的发生、发展过程有一定的相关性。②MMP-11高表达组BC患者在疾病进展、T分期、N分期以及不同分级方面明显差于MMP-11低表达组,提示MMP-11的高表达与BC的恶性程度和疾病进展有关。③MMP-11高表达组BC患者的肿瘤特异性生存期明显差于MMP-11低表达组,且MMP-11高表达组BC患者的总生存期亦有差于MMP-11低表达组的趋势,提示MMP-11在BC中起到了癌基因的作用,并影响到BC患者的生存期。④通过GSEA分析还证实了,在BC中MMP-11高表达对未折叠蛋白反应、精子形成、G2M检查点、MYC信号通路、E2F信号通路、MTORC1信号通路、有丝分裂纺锤体形成、血管生成、糖酵解、胆固醇平衡、PI3K/AKT/mTOR通路、炎症反应有关的多种生物通路基因集有影响,说明MMP-11可能通过调节BC患者的以上生物学过程或通路,进而影响BC的发生及发展。



A:BC 患者的特异性生存曲线;B:BC 患者的总生存曲线。

图 2 MMP-11 表达水平与 BC 患者预后的关系

表 2 MMP-11 高表达的 BC 样本富集的基因集(GSE13507)

Gene set	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val
Unfoldedproteinresponse	-0.74360913	-1.568759	0.002096436	0.0955563
Spermatogenesis	-0.58907664	-1.544132	0.003992016	0.07483325
G2M checkpoint	-0.8120183	-1.5029222	0.00811359	0.11439122
Myctargets V2	-0.74224424	-1.5018871	0.039447732	0.08803105
E2F targets	-0.83676344	-1.4560125	0.014056225	0.14177653
mTORC1_signaling	-0.70476127	-1.4546511	0.029411765	0.11900376
Mitoticspindle	-0.6255506	-1.4345515	0.018036073	0.13379571
Angiogenesis	-0.7768468	-1.4308265	0.036144577	0.12249207
Glycolysis	-0.6287132	-1.4277917	0.020746889	0.11374062
Cholesterolhomeostasis	-0.6742314	-1.4168556	0.02736842	0.116845205
PI3K_AKT_mTOR signaling	-0.5772673	-1.4112586	0.0125	0.10334955
Inflammatoryresponse	-0.68118066	-1.4111828	0.047325104	0.095486574

注:MSigDB 基因集“h. all. v6. 0. symbols. gmt”被使用作为参照基因集;富集分数(enrichment score, ES);校正后富集分数(normalized enrichment score, NES);名义 *P* 值(nominal *P* value, NOM *p*-val);错误发现率(False discovery rate *q* value, FDR *q*-val)。

本研究也存在一定的局限性;MMP-11 在 BC 的发生、发展及恶化进程中发挥一定的作用,但 MMP-11 调控这些信号通路的途径及机制还不清楚,MMP-11 是否可以作为 BC 治疗的可能靶点,仍需要进行更大样本量的临床研究加以验证。

对临床和未来研究的启示:MMP-11 高表达与高级病理特征的 BC 患者有密切联系,这些 BC 患者可能有高转移风险。早期积极的治疗可能有益于这些患者。因此,对 MMP-11 表达的检测评估可以识别此类高危患者,并有可能帮助泌尿科医师确定化疗的方式。此外,未来还需要进一步研究 MMP-11 调控 BC 这些信号通路的途径和作用机制,明确其是否可作为 BC 治疗的新靶点。

综上所述,MMP-11 表达水平可能作为 BC 患者的预后因素之一,MMP-11 可能作为 BC 患者靶向治疗的靶标。

[参考文献]

- 1 任虎,任明华,倪少滨.膀胱癌早期诊断方法的进展[J].中华临床医师杂志,2012,6(14):4029-4031.
- 2 陈正升,陈磊,邢金春.膀胱癌新型基因和生物标记物研究进展[J].临床泌尿外科杂志,2017,32(2):157-160.
- 3 张克,张雁钢,任瑞民,等.基质金属蛋白酶 9 在膀胱癌组织中表达及临床意义的 Meta 分析[J].当代医学,2015,21(32):6-8.
- 4 张金玲,费雁,陈伟,等.MMP-2、MMP-14、TIMP-2 在胃癌组织中的表达及意义[J].华中科技大学学报(医学版),2013,42(2):227-230.
- 5 张伟,方子乔,吉化春,等.结肠腺癌组织 MTDH 和 MMP-9 表达临床意义研究[J].中华肿瘤防治杂志,2015,22(10):786-795.
- 6 Waschku B, Faust A, Schäfers M, et al. Performance of a new fluorescence-labeled MMP inhibitor to image

- tumor MMP activity in vivo in comparison to an MMP-activatable probe [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2013, 8(1): 1-11.
- 7 李博,毛颖民,杨建生,等. MMP-11在胃癌组织的表达及临床意义[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2015, 25(5): 427-430.
- 8 Min K W, Kim D H, Do S I, et al. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and-9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. *APMIS*, 2014, 122(12): 1196-1206.
- 9 Han C K, Tien Y C, Jine-Yuan Hsieh D, et al. Attenuation of the LPS-induced, ERK-mediated upregulation of fibrosis-related factors FGF-2, uPA, MMP-2, and MMP-9 by *Carthamus tinctorius*-L in cardiomyoblasts [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(3): 754-763.
- 10 徐进,王斌,陈珺,等. 基质金属蛋白酶-11在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征低关系[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2016, 25(6): 630-632.
- 11 林云华,姜永光,王俊生,等. Pttg1和MMP13调控前列腺癌细胞侵袭力的研究[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2016, 31(9): 836-840.
- 12 Wu Q W, Yang Q M, Huang Y F, et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97804.
- 13 Ingvarsen S, Porse A, Ercicum C, et al. Targeting a single function of the multifunctional matrix metalloproteinase MT1-MMP; impact on lymphangiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(15): 10195-10204.
- 14 徐大方,陈平. MMP-11在肿瘤中低研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(4): 519-521.
- 15 Kim W J, Kim E J, Kim S K, et al. Predictive value of progression-related gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 3.
- 16 Lee J S, Leem S H, Lee S Y, et al. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(16): 2660-2667.
- 17 郑宇,张德进,刘俊,等. MMP-11、CEA、CK-20、CD44 mRNA在结肠癌患者外周血中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(4): 529-532.
- 18 徐海波,熊异平,余恒勇. 膀胱癌组织中MMP-2、MMP-9、Survivin、Livin和VEGF表达的临床意义分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(1): 51-54.
- 19 Boulay A, Masson R, Chenard M P, et al. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 2189-2193.
- 20 Dali-Youcef N, Hnia K, Blaise S, et al. Matrix metalloproteinase 11 protects from diabetes and promotes metabolic switch[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25140.
- 21 Lu J, Tan M, Cai Q, et al. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt A): 156-164.
- 22 Siragam V, Rutnam Z J, Yang W, et al. MicroRNA miR-98 inhibits tumor angiogenesis and invasion by targeting activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(11): 1370-1385.
- 23 Eiró N, Fernandez-Garcia B, González L O, et al. Cytokines related to MMP-11 expression by inflammatory cells and breast cancer metastasis[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(5): e24010.

(收稿日期:2018-08-20)