

Original Article

Association of MMP-9 -1562 C>T and Risk of Bladder Cancer

Mersedeh Rahmani¹ , Farzaneh Tafvizi^{1*} , Kosha Kamali² 

¹Department of Biology,
Parand Branch, Islamic
Azad University, Parand,
Iran.

²Department of Urology,
Hashemi Nejad Hospital,
Iran University of Medical
Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**
Farzaneh Tafvizi;
Department of Biology,
Parand Branch, Islamic Azad
University, Parand, Iran.

Email:
tafvizi@piau.ac.ir

Received: 15 Sep, 2018
Accepted: 26 Nov, 2018

Abstract

Background and Objectives: Bladder cancer (BC) is one of the most common malignant diseases worldwide. The incidence rate of this cancer has been reported three times more in men than in women. Matrix metalloproteinases play an important role in the development and progression of this cancer. In the current study, the polymorphism of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter and risk of bladder cancer were investigated.

Methods: In this case-control study, 141 patients with bladder cancer and 135 healthy subjects were studied. First, DNA extraction was performed, then, PCR was carried out using MMP-9 specific primers. RFLP method was used to investigate the -1562 C>T polymorphism. The association between MMP-9 polymorphism and risk of bladder cancer was determined using chi square method and GraphPad Prism software (version 6.01). The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated using POPGENE software (version 1.32), Confidence Interval (CI), and Odds Ratio (OR). The significance level was considered to be $p < 0.05$.

Results: In this study, there was no significant association between MMP-9 polymorphism and risk for bladder cancer ($p > 0.05$). No significant association was found between the genotypes and stage, grade of disease, and size of tumor. There was also no significant association between smoking and grade of disease, size of tumor, and stage of the disease. A three-fold risk of bladder cancer was associated with smoking.

Conclusion: Based on the results of this study, genetic variation in -1562 C>T polymorphism of MMP-9 gene promoter had no association with the risk of bladder cancer. Therefore, smoking should be considered as an important risk factor for bladder cancer.

Keywords: Urinary bladder neoplasms; Polymorphism; Genetic; Matrix metalloproteinases.

DOI: 10.29252/qums.12.12.1

ارتباط پلی مورفیسم $C>T$ -1562 MMP-9 و خطر سرطان مثانه

مرسده رحمانی^۱، فرزانه تفویضی^{۱*}، کوشا کمالی^۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان مثانه، یکی از شایع ترین سرطان های بدخیم در جهان است. میزان بروز این سرطان در مردان سه برابر زنان گزارش شده است. ماتریکس متالوپروتئینازها نقش مهمی در پیشرفت و توسعه این سرطان دارند. در این مطالعه، پلی مورفیسم پروموتور ژن ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ و خطر سرطان مثانه بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه مورد - شاهدهی، ۱۴۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و ۱۳۵ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا DNA استخراج گردید، سپس روش PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ انجام شد. جهت بررسی پلی مورفیسم $C>T$ -۱۵۶۲، روش RFLP به کار برده شد. ارتباط بین پلی مورفیسم ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ و خطر ابتلا به سرطان مثانه به کمک آزمون کای دو و نرم افزار GRAPHPAD PRISM (Version 6.01) صورت گرفت. تعادل هاردی واینبرگ به کمک نرم افزار POPGENE Ver 1.32 و سطح اطمینان CI (Confidence Interval) و OR (Odds Ratio) محاسبه گردید. سطح معنی داری، $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها: در این مطالعه، ارتباطی بین پلی مورفیسم ژنتیکی و خطر ابتلا به سرطان مثانه مشاهده نشد ($p>0/05$). بین ژنوتیپ ها با استیج، گرید بیماری و سائز تومور، ارتباط معنی داری وجود نداشت. همچنین بین سائز تومور، استیج، گرید بیماری و مصرف سیگار، ارتباط معنی دار نبود. با مصرف دخانیات، ریسک خطر سه برابری ابتلا به سرطان مثانه مشاهده گردید.

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه، تغییرات ژنتیکی در پلی مورفیسم $C>T$ -۱۵۶۲ - پروموتور ژن ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹، ارتباطی با خطر ابتلا به سرطان مثانه ندارد؛ بنابراین مصرف دخانیات باید به عنوان یک ریسک فاکتور مهم در ابتلا به سرطان مثانه در نظر گرفته شود.

کلیدواژه ها: سرطان مثانه؛ پلی مورفیسم؛ ژنتیک؛ ماتریکس متالوپروتئیناز.

^۱گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران.

^۲گروه آموزشی اورولوژی، بیمارستان هاشمی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

فرزانه تفویضی؛ گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
tafvizi@piaou.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Rahmani M, Tafvizi M, Kamali K. Association of MMP-9 -1562 C>T and risk of bladder cancer. Qom Univ Med Sci J 2018;12(12):1-13. [Full Text in Persian]

مقدمه

سرطان مثانه (BC)، یازدهمین سرطان شایع از نظر بروز بیماری و چهاردهمین سرطانی است که منجر به مرگ می شود (۱). میزان بروز و مرگ و میر این سرطان به طور عمده به علت تغییر در ریسک فاکتورها در سراسر جهان متفاوت است؛ به طوری که بیشترین میزان بروز آن از مصر، اروپا و آمریکای شمالی و شمال آفریقا گزارش شده است (۲)، و کشورهای آسیایی، پایین ترین میزان بروز را داشته اند (۳). همچنین این سرطان، دومین تومور دستگاه مجاری ادراری - تناسلی بعد از سرطان پروستات است (۴)، که شیوع آن در مردان سه برابر زنان بوده و در سفیدپوستان نیز شایع تر است. از مهم ترین ریسک فاکتورهای مرتبط با سرطان مثانه، می توان به مصرف سیگار و مواجهه شغلی با کارسینوژن های اوروتیال اشاره کرد. مصرف سیگار، ۲-۴ برابر ریسک سرطان مثانه را افزایش می دهد (۵). یکی از مهم ترین رویدادها در بدخیمی سرطان ها؛ مهاجرت، جای گیری و رشد سلول نوپلاست به داخل بافت میزبان است. این فرآیند مستلزم مراحل پیچیده واکنش های سلول سرطانی با بافت میزبان و تغییرات ماتریکس خارج سلولی است و تاکنون آنزیم های مختلفی در رابطه با آن شناخته شده اند که در هضم ماتریکس خارج سولی مانند سرین پروتئازها (۶، ۷)، ماتریکس متالوپروتئینازها (۸) و متالوپروتئینازهای تجزیه کننده ایفای نقش می کنند (۹). متاستاز طی چندین مرحله شامل: جدا شدن سلول های بنیادی سرطانی از تومور اولیه، تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی، داخل شدن به رگ ها، انتقال از طریق سیستم رگی و خارج شدن از عروق و در نهایت، ایجاد تومور ثانویه در بستر جدید انجام می گیرد. در این مراحل، برای اینکه تومور بتواند تا اندازه بیش از ۲ میلی متر مکعب رشد کند، باید توانایی رگ زایی داشته باشد (۱۰)؛ بنابراین متاستاز و توانایی رگ زایی، دو فرآیند ضروری برای پیشرفت سرطان بوده که به وسیله بیان ژن های مختلفی، از جمله ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) انجام می گیرد. ماتریکس متالوپروتئینازها، خانواده ای از آنزیم های دارای فعالیت پروتئولیتیکی هستند که در هضم اتصالات خارج سلولی و بافت پایه نگهدارنده سلول ها ایفای نقش می کنند و از این لحاظ می توانند بر عملکرد سلول ها در مراحل سرطانی شدن و تسریع این

مراحل تأثیر گذار باشند (۱۱). تحقیقات نشان می دهند این خانواده آنزیمی نه تنها در تغییرات فیزیکی بافت غشای پایه و اتصالات خارج سلولی نقش دارند؛ بلکه در شرایط پاتولوژیک مانند پیشرفت، رشد تومورها، متاستاز و بدخیمی بسیاری از سرطان ها نیز مؤثرند (۱۵-۱۲). ماتریکس متالوپروتئینازها به گروه های مختلفی شامل: MMP های کلاسیک، MMP های متصل به غشا، ADAMs و ADAMTs تقسیم می شوند (۱۶). یکی از اعضای مهم ماتریکس متالوپروتئینازهای کلاسیک، ژن ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ می باشد که بر روی کروموزوم ۲۰ قرار دارد و پروتئین ۹۲ کیلو دالتونی به نام کلاژناز یا ژلاتیناز B را رمزدهی می کند. این پروتئین قادر است کلاژن، پروتئوگلیکان ها، الاستین، فیبرونکتین، همچنین پروتئین های غیرماتریکسی نظیر $TGF-\beta$ ، $TNF-\alpha$ و IL-8 را تجزیه کند. براساس نتایج مطالعات، بیان ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ در انواع بدخیمی ها افزایش می یابد که می تواند عواقب ناخوشایندی در پی داشته باشد، از جمله با آزادسازی بیش از حد فاکتورهای رشد و فاکتورهای رگ زایی می تواند به تکثیر سلول های سرطانی و رگ زایی تومور کمک کرده و با تخریب ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه، فضای کافی برای رگ زایی یا مهاجرت سلولی را ایجاد کند (۱۷، ۱۸). برخی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ژن ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ نیز در افزایش بیان آن مؤثر شناخته شده اند. یکی از این پلی مورفیسم ها به عنوان جایگزین تیمیدین به جای سیتوزین در ناحیه ۱۵۶۲- راه انداز ذکر شده است. این جایگزینی با کاهش قدرت اتصال پروتئین های سرکوبگر به ناحیه تنظیمی AP-1 باعث افزایش ۱/۵ برابری رونویسی از ژن ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ می شود؛ در نتیجه میزان بیان کلی این آنزیم در افراد دارای آلل T افزایش می یابد، ولی در این پلی مورفیسم در افراد واجد نوکلئوتید C (سیتوزین)، پروتئین های مهارکننده رونویسی به پروموتور ژن متصل و بیان کلی ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹ کاهش می یابد (۱۹). همچنین ماتریکس متالوپروتئیناز - ۹، تنها عضوی است که قابلیت هضم ژلاتین (یکی از مهم ترین ترکیبات بافت غشای پایه) را دارد و تاکنون به عنوان یک مارکر سرطانی امیدبخش برای بررسی وضعیت بیماران و پیشگیری از چندین سرطان شناخته شده است (۲۰).

در این مطالعه، ارتباط بین پلی مورفیسم پروموتور ژن *MMP-9-1562 C>T* و احتمال خطر ابتلا به سرطان مثانه، فرکانس الی، شیوع ژنوتیپ‌ها و معرفی الی پرخطر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه مورد - شاهده، نمونه خون ۱۴۱ فرد مبتلا به سرطان مثانه (بازه سنی ۶۰/۸۹±۱۳/۶۲ سال) و ۱۳۵ فرد سالم (بازه سنی ۶۰/۴۰±۱۶/۴۱ سال) از میان افراد مراجعه کننده به بیمارستان جهت چکاپ سالیانه که هیچ گونه بیماری خاص و سرطان نداشتند (به عنوان کنترل) بررسی گردید. پس از هماهنگی های لازم با همکاری کارکنان و پزشکان اتاق عمل هاشمی نژاد، همچنین گرفتن رضایت نامه کتبی از افراد، نمونه ها در فاصله زمانی تیرماه ۱۳۹۳ تا مردادماه ۱۳۹۵ جمع آوری شدند. پس از نمونه گیری از هر فرد، جداسازی خون از سرم صورت گرفت و تا تکمیل شدن نمونه ها در فریز -۲۰ درجه نگهداری شد. ابتدا کل DNA سلولی بر طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA از خون (شرکت زیست دانش یاران) استخراج گردید، سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه خون مورد بررسی، درون میکروتیوب ۱/۵ سی سی ریخته شد و با بافر لیزکننده گلبول های قرمز خون (RBC lysis solution 1) و ۵۰ ماکرولیتر از بافر (RBC lysis solution 2) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس فاز رویی دور ریخته شد. این مرحله سه بار تکرار گردید تا زمانی که یک پلیت سفید رنگ در انتهای میکروتیوب باقی ماند. به میکروتیوب، ۳۰۰ میکرولیتر از بافر ۱ Cell Lysis Solution و ۴۰ میکرولیتر از بافر ۲ Cell Lysis Solution اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر ۳ Cell Lysis Solution به مخلوط اضافه و نمونه ها در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند و فاز رویی به میکروتیوب های جدید منتقل گردید. با استفاده از ایزوپروپانل، رسوب DNA جدا گردید، سپس با الکل ۸۰٪ شست و شو داده شد. رسوب DNA در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد خشک و در بافر DNA hydration حل گردید و تا زمان استفاده در فریزر -۲۰ درجه نگهداری شد.

برای بررسی کیفیت DNA های استخراج شده با دو روش، از ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با DNA Safe Stain (خریداری شده از شرکت سیناژن) استفاده شد. جهت تعیین کمی و کیفیت DNA استخراج شده از نانودراپ Nano Drop ND-1000، با اندازه گیری میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ غلظت DNA، خلوص و آلودگی پروتئینی DNA استخراج شده تعیین گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر آمپلیکون، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۴ میکرومولار) از پرایمر اختصاصی ژن MMP-9 با توالی های پرایمر پیشرو 3'- GCCTGGCACATAGTAGGCC -5' و پرایمر پیرو 3'- CTTCTAGCCAGCCGGCATC -5' تهیه شده از شرکت تکاپوزیست، ۵۰ نانوگرم از DNA نمونه های استخراج شده و حجم ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل شده بود. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامه دمایی شامل: مرحله دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه اتصال پرایمر با اعمال دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. در پایان، مرحله گسترش نهایی پرایمر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR پس از رنگ آمیزی با Safe DNA Stain بر روی ژل آگارز ۲٪ در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت مورد بررسی کیفی قرار گرفت که نتایج به وسیله دستگاه ژل داک و با اشعه UV مشاهده گردید.

جهت بهینه سازی واکنش RFLP، ۱۰ میکروگرم DNA، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X Tango TM و ۱ میکرولیتر آنزیم محدودالایر sph1 (Fermentase) و ۶ میکرولیتر از محصول PCR در نظر گرفته شد. نمونه ها به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد (برای تأثیر آنزیم محدودکننده Sph1) و ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۶۵ درجه سانتیگراد (جهت غیرفعال کردن آنزیم) قرار گرفتند. (آل هموزیگوت C توسط یک باند ۴۴۲ جفت باز مشخص می گردد؛ درحالی که آل T هموزیگوت با دو باند ۲۶۴ و ۱۷۸ و هتروزیگوت با سه باند ۴۴۲، ۲۶۴، ۱۷۸ جفت باز متمایز می شوند.)

در پایان، ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش RFLP به همراه ۶X Loading dye روی ژل آگارز ۳٪ در کنار ۲ میکرولیتر مارکر ۱۰۰bp الکتروفورز شد.

ارتباط بین پلی مورفیسم ژن *MMP-9-1562 C>T* خطر ابتلا به سرطان مثانه و خصوصیات پاتولوژیک با استفاده از آزمون کای اسکور و نرم افزار ۶/۰۱ GRAPHPAD PRISM بررسی شد. سطح اطمینان

OR (Odds Ratio) و CI (Confidence Interval) همچنین

تبادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم افزار POPGENE Ver 1.32 محاسبه گردید. در تمامی محاسبات سطح معنی داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات بالینی و کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

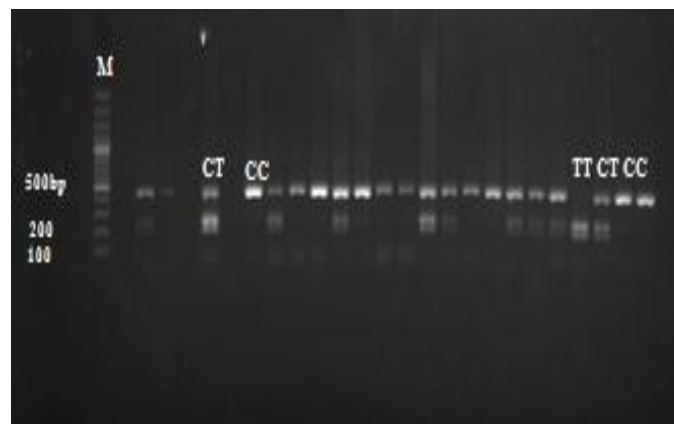
جدول شماره ۱: مشخصات بالینی و کلینیکوپاتولوژیک

مشخصات بیماران		تعداد نمونه‌ها	
گروه‌ها		گروه کنترل (n=۱۳۵)	گروه بیمار (n=۱۴۱)
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
سن	کوچکتر از ۵۰ سال	۴۲ (٪۳۱/۱)	۲۲ (٪۱۵/۶۰)
	بزرگتر مساوی ۵۰ سال	۹۳ (٪۶۸/۹)	۱۱۹ (٪۸۴/۰۴)
جنسیت	مرد	۱۱۷ (٪۸۶/۷)	۱۱۷ (٪۸۳)
	زن	۱۸ (٪۱۳/۳۰)	۲۴ (٪۱۷)
مصرف دخانیات	بله	۳۷ (٪۲۷/۴۰)	۸۲ (٪۵۸/۱۶)
	خیر	۹۸ (٪۷۲/۶۰)	۵۹ (٪۴۱/۸۴)
استیج تومور	Ta	۸۵ (٪۶۰/۲۸)	۴۳ (٪۳۰/۵۰)
	T1	۱۲ (٪۸/۵۱)	۱ (٪۰/۷۱)
	T2	۶۶ (٪۴۶/۸۰)	۷۵ (٪۵۳/۲۰)
	T3	۱ (٪۰/۷۱)	۱ (٪۰/۷۱)
گرید تومور	Low	۶۶ (٪۴۶/۸۰)	۷۵ (٪۵۳/۲۰)
	High	۱ (٪۰/۷۱)	۱ (٪۰/۷۱)

در مورد پلی مورفیسم C>T-۱۵۶۲ در ژن ماتریکس

متالوپروتئیناز - ۹، طول قطعه مورد نظر دارای ۴۴۲ جفت باز بود. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های به دست آمده از روش RFLP برای نمونه‌های بیمار و سالم در شکل شماره ۱ آمده است.

پس از انجام واکنش PCR، محصول واکنش روی ژل آگارز ۲٪ گذاشته شد و طول قطعه با طراحی پرایمر مورد نظر بررسی گردید.



شکل شماره ۱: ژنوتیپ CC با قطعه ۴۴۲ جفت بازی، ژنوتیپ TT توسط دو باند ۲۶۴ و ۱۷۸ جفت بازی و هتروزیگوت‌های CT با سه باند ۴۴۲، ۲۶۴، ۱۷۸ جفت بازی متمایز شده‌اند.

ارتباط معنی داری بین مصرف دخانیات و احتمال بروز سرطان مثانه مشاهده گردید [$p=0/0001$ و $95\% \text{ CI } (2/16-5/96)$]. با توجه به میزان عددی OR: $3/59$ ، مصرف دخانیات به میزان $3/5$ برابر خطر ابتلا به سرطان مثانه را افزایش می دهد.

فرکانس ژنی و ژنوتیپی برای هر دو جمعیت بیمار و سالم محاسبه گردید. الل C در هر دو جمعیت بیمار، $71/28\%$ و جمعیت کنترل، $68/15\%$ ، بیشترین میزان را به خود اختصاص داد. دو جمعیت سالم و بیمار مورد بررسی در حال تعادل بودند و با اینکه الل C فراوانی بیشتری در جمعیت مورد بررسی داشت، ولی اختلاف معنی داری در فرکانس اللی مشاهده نشد ($p=0/42$) (جدول شماره ۲).

براساس آنالیزهای آماری، میانگین سنی در دو گروه کنترل و بیمار بررسی گردید. ۱۱۹ نفر از گروه بیمار و ۹۳ نفر از افراد گروه کنترل، بالای ۵۰ سال سن داشتند و ۲۲ بیمار و ۴۲ فرد سالم، زیر ۵۰ سال بودند. بین افزایش سن و خطر ابتلا به سرطان مثانه، رابطه معنی داری دیده شد

[$OR: 2/44$ ، $95\% \text{ CI } 1/36-4/37$ ، $p=0/002$]. ریسک $2/5$

برابری ابتلا به سرطان با افزایش سن مشاهده گردید.

مصرف دخانیات به عنوان عامل خطری در بروز سرطان مثانه در دو گروه بیمار و کنترل مورد بررسی قرار گرفت. ۸۲ نفر از افراد مبتلا به سرطان و ۳۷ نفر از افراد کنترل، دخانیات مصرف کرده بودند.

جدول شماره ۲: فرکانس ژنی، ژنوتیپی و تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت های سالم و بیمار

ژنوتیپ	(درصد) بیمار n=141	pvalue تعادل هاردی واینبرگ گروه بیمار (HWE)	کنترل (درصد) n=135	pvalue تعادل هاردی واینبرگ گروه کنترل
CC	63 (44/68)	0/0004 ($\chi^2=12/35$)	51 (36/17)	0/00004 ($\chi^2=21/15$)
CT	75 (53/2)		82 (58/15)	
TT	3 (3/12)		2 (1/41)	

اصطلاح HWE Hardy-Weinberg equilibrium:

سطح معنی داری، $p < 0/05$ ؛ *

^a مقایسه بین گروه بیمار و کنترل.

همچنین بین ترکیب ژنوتیپ های مورد مطالعه و خطر ابتلا به سرطان مثانه، ارتباطی وجود نداشت (جدول شماره ۳).

در این مطالعه، ارتباطی بین ژنوتیپ ها و خطر ابتلا به سرطان مثانه دیده نشد.

جدول شماره ۳: ارتباط ژنوتیپ ها با خطر ابتلا به سرطان مثانه

ژنوتیپ	گروه بیمار n=141	کنترل n=135	OR (%95CI)	pvalue
CC	63	51	1 (Reference)	-
CT	75	82	0/74 (0/46-1/2)	0/22
TT	3	2	1/21 (0/19-7/55)	0/83
ترکیب ژنوتیپ ها				
CC	63	51	1 (Reference)	0/24
CT+TT	78	84	0/75 (0/46-1/21)	
TT	3	2	1 (Reference)	0/69
CT+CC	138	133	0/69 (0/11-4/2)	
الل				
C	201	184	1 (Reference)	
T	81	86	0/86 (0/60-1/24)	0/42

نتایج به تفکیک در جدول شماره ۴ آمده است.

همچنین ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ ها با مصرف سیگار، گرید بیماری، مرحله بیماری و اندازه تومور مشاهده نشد ($p < 0/05$).

جدول شماره ۴: بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها با مصرف سیگار، گرید بیماری، مرحله بیماری و اندازه تومور

وضعیت سیگار				
غیرسیگاری				
ژنوتیپ‌ها	گروه	بیمار (n=۵۹)	کنترل (n=۹۸)	OR (95% CI) pvalue
CC		۲۷	۳۷	۱ (Reference) -
CT		۳۱	۵۹	۰/۷۲ (۰/۳۷-۱/۳۹) ۰/۳۲
TT		۱	۲	۰/۶۸ (۰/۰۶-۷/۹۵) ۰/۷۶
ترکیب ژنوتیپ‌ها				
CC		۲۷	۳۷	۱ (Reference) ۰/۲۸
CT+TT		۳۱	۶۱	۰/۶۹ (۰/۳۶-۱/۳۴)
TT		۱	۲	۱ (Reference) ۰/۸۷
CT+CC		۵۸	۹۶	۱/۲۱ (۰/۱۰-۱۳/۶۳)
سیگاری				
ژنوتیپ‌ها	گروه	بیمار (n=۸۲)	کنترل (n=۳۷)	OR (95% CI) pvalue
CC		۳۶	۱۴	۱ (Reference) -
CT		۴۴	۲۳	۰/۷۴ (۰/۳۳-۱/۶۵) ۰/۴۶
TT		۲	۰	۱/۹۸ (۰/۰۹-۴۳/۹۸) ۰/۳۸
ترکیب ژنوتیپ‌ها				
CC		۳۶	۱۴	۱ (Reference) ۰/۵۳
CT + TT		۴۶	۲۳	۰/۷۷ (۰/۳۵-۱/۷۲)
TT		۲	۰	۱ (Reference) ۰/۳۳
CT+CC		۸۰	۳۷	۰/۴۳ (۰/۰۲-۹/۱۷)
CC		۳۶	۱۴	۱ (Reference) ۰/۵۳
سایز تومور				
ژنوتیپ‌ها	cm < ۳ سایز تومور (n=۷۵)	cm ≥ ۳ سایز تومور (n=۶۵)	OR (۹۵% CI) pvalue	
CC	۳۲	۳۱	۱ (Reference) -	
CT	۴۲	۳۳	۰/۸۱ (۰/۴۱-۱/۵۸) ۰/۵۴	
TT	۱	۲	۲/۰۶ (۰/۱۷-۲۳/۹۶) ۰/۵۵	
ترکیب ژنوتیپ‌ها				
CC	۳۲	۳۱	۱ (Reference) ۰/۶۰	
CT+TT	۴۳	۳۵	۰/۸۴ (۰/۴۳-۱/۶۳)	
TT	۱	۲	۱ (Reference) ۰/۴۸	
CT+CC	۷۴	۶۴	۰/۴۳ (۰/۰۳-۴/۸۸)	
گرید بیماری				
ژنوتیپ‌ها	Low (n=۶۶)	High (n=۷۵)	OR (۹۵% CI) pvalue	
CC	۲۷	۳۶	۱ (Reference) -	
CT	۳۸	۳۷	۰/۷۳ (۰/۳۷-۱/۴۳) ۰/۳۶	
TT	۱	۲	۱/۵ (۰/۱۳-۱۷/۴) ۰/۷۴	
ترکیب ژنوتیپ‌ها				
CC	۲۷	۳۶	۱ (Reference) ۰/۳۹	
CT+TT	۳۹	۳۹	۰/۷۵ (۰/۳۸-۱/۴۶)	
TT	۱	۲	۱ (Reference) ۰/۶۳	
CT+CC	۶۵	۷۳	۰/۵۶ (۰/۰۵-۶/۳۴)	

استیج بیماری				
pvalue	OR (۹۵% CI)	T2 and T3 (n=۱۴)	Ta and T1 (n=۱۲۸)	
-	۱(Reference)	۶	۵۷	CC
۰/۹۷	۰/۹۷ (۰/۳۱-۳/۰۷)	۷	۶۸	CT
۰/۵۷	۱/۲۶ (۰/۰۶-۲۷/۳)	۰	۳	TT
ترکیب ژنوتیپ‌ها				
۰/۹۱	۱(Reference)	۶	۵۷	CC
	۰/۹۳ (۰/۲۹-۲/۹۴)	۷	۷۱	CT+TT
۰/۵۷	۱(Reference)	۰	۳	TT
	۰/۷۵ (۰/۰۳-۱۵/۳۸)	۱۳	۱۲۵	CT+CC

در افراد سیگاری، اندازه تومور در ۴۱ نفر، ۳ سانتی‌متر و بیشتر از آن و در ۳۹ نفر کوچکتر از ۳ سانتی‌متر بود. در افراد غیرسیگاری، اندازه تومور در ۲۵ نفر، ۳ سانتی‌متر و بیشتر از آن و در ۳۶ نفر کوچکتر از ۳ سانتی‌متر بود. بین ژنوتیپ‌ها و اندازه تومور ارتباط معنی‌داری دیده نشد ($p>۰/۰۵$). همچنین بین مصرف سیگار و استیج بیماری، رابطه معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$).

در افراد سیگاری، ۴۴ نفر دارای گرید بالا، ۳۶ نفر گرید پایین و در افراد غیرسیگاری به ترتیب ۳۱ نفر گرید بالا و ۳۰ نفر دارای گرید پایین بودند. ولی بین مصرف سیگار با گرید بیماری، ارتباط معنی‌داری یافت نشد ($p>۰/۰۵$) (جدول شماره ۵).
تومورها در دو گروه سیگاری و غیرسیگاری تقسیم شدند (جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵: بررسی ارتباط بین مصرف سیگار، گرید بیماری، مرحله بیماری و سائز تومور در بیماران مبتلا به سرطان مثانه

pvalue	OR (%95CI)	گرید بالا	گرید پایین	گرید سرطان
۰/۶۲	۱ (Reference)	۳۱ نفر	۳۰ نفر	غیرسیگاری
	۱/۱۸ (۰/۶۰-۲/۳)	۴۴ نفر	۳۶ نفر	سیگاری
pvalue	OR (%95CI)	سائز تومور ≥ 3 cm	سائز تومور < 3 cm	سائز تومور
۰/۲۲	۱(Reference)	۲۵ نفر	۳۶ نفر	غیرسیگاری
	۱/۵۱ (۰/۷۷-۲/۹۷)	۴۱ نفر	۳۹ نفر	سیگاری

بحث

می‌شوند. این زیرخانواده شامل: کلاژناز، ژلاتیناز، استرولیزین، ماتریلیزین، MMPهای غشایی و سایر ماتریکس متالوپروتئینازها می‌باشند. یافته‌های علمی نشان می‌دهد ماتریکس متالوپروتئینازها نقش مهمی در مراحل مختلف پیشرفت و گسترش سرطان مانند تنظیم رشد سلول‌های سرطانی، تمایز، آپوپتوز، آنژیوژنز، تهاجم و متاستاز دارند. ماتریکس متالوپروتئینازها این کار را با تخریب ماتریکس خارج سلولی، موانع و سدهای غشایی انجام می‌دهند (۲۲، ۱۴). خانواده MMP شامل بیش از ۲۵ پروتئیناز خارج سلولی است و این آنزیم‌ها در توسعه سرطان، تهاجم و پیشرفت تومور

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs)، یک خانواده پروتئیناز وابسته به عنصر روی هستند که قابلیت تخریب تمامی زیرساختارهای ماتریکس خارج سلولی و تنظیم رفتارهای مختلف سلولی را دارند (۲۱)، و از این طریق در رخدادهای فیزیولوژیک؛ از جمله بازسازی بافت در حاملگی، بهبود زخم و آنژیوژنز (۱۶) و وقایع پاتولوژیک مثل سرطان، نارسایی قلبی، آرتریت و پریودنتیت دخالت دارند (۲۲). ماتریکس متالوپروتئینازها براساس ساختار و خصوصیات سوبستراهایشان به زیرگروه‌های مختلفی تقسیم

بسیار تأثیرگذار بوده و از لحاظ بالینی در تخریب اجزای مختلف ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه نیز مهم می‌باشند (۲۴،۲۳). MMP-1، MMP-2، MMP-3، MMP-7 و MMP-9 پنج عضو مهم خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها هستند. MMP-9 که بر روی کروموزوم 20q11.2-q13.1 قرار دارد به عنوان 92 kDa gelatinase B شناخته می‌شود و فعالیت پروتئولیتیک علیه کلاژن نوع IV را بر عهده دارد که سبب تسهیل مهاجرت سلول‌های ماهیچه‌ای صاف عروقی نیز می‌گردد (۲۵). در پلی مورفیسم ژنتیکی تک‌نوکلئوتیدی

(rs3918242) MMP-9-1562، نشان داده شده است جایگزینی C با T سبب افزایش و تقویت فعالیت پروموتور می‌شود؛ بنابراین حضور آلل T-1562 با کاهش ظرفیت اتصال پروتئین سرکوبگر رونویسی به ناحیه پروموتور و متعاقب آن، افزایش بیان ژن و میزان رونویسی از پروموتور همراه است (۲۶).

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)، شایع‌ترین شکل تنوع ژنتیکی در ژنوم انسان است. بر طبق قرارداد، زمانی از یک جهش نقطه‌ای تحت عنوان SNP یاد می‌شود که فراوانی آلل مینور (نادر) بیش از ۱٪ در یک جمعیت باشد (۲۷)؛ به عنوان مثال وقوع SNP در یک منطقه تنظیم‌کننده ژن ممکن است بر روی رونویسی ژن تأثیر داشته باشد. SNP واقع در جایگاه پیرایش RNA ممکن است بر روی پیرایش RNA نیز مؤثر باشد. SNP در منطقه ۳' غیرترجمه‌نشده یک ژن ممکن است بر ثبات mRNA تأثیر داشته و SNP نیز در منطقه کدگذاری به جایگزینی اسید آمینه در پروتئین کدشده منجر گردد. تصور می‌شود SNPs در تغییرپذیری افراد در حساسیت به بیماری‌های شایع مانند سرطان دخالت دارند (۲۸). سرطان مثانه، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بدخیم ادراری در دنیا است (۲۹-۳۱). بیشتر سرطان‌های مثانه از نوع Transitional Cell Carcinoma و مابقی از نوع

Squamous Tumors، Adenocarcinoma و ساب‌تایپ‌های دیگر هستند (۳۲)، که معمولاً با افزایش سن بروز می‌کنند و مردان از شیوع بالاتری برخوردارند؛ با این حال، مکانیسم دخیل در بروز سرطان مثانه مشخص نیست (۳۳). چندین عامل محیطی به عنوان ریسک فاکتور برای سرطان مثانه معرفی شده‌اند که می‌توان به مصرف دخانیات، التهابات مزمن، آمین‌های

آروماتیک موجود در رنگ‌ها، تشعشعات و غیره اشاره کرد (۳۴،۳۵)؛ با این حال، افراد زیادی با اینکه در معرض این ریزفاکتورها نیستند، دچار ابتلا به سرطان مثانه شده و افرادی نیز که در معرض این ریسک فاکتورها قرار دارند، شواهدی از سرطان مثانه در آن‌ها دیده نمی‌شود و به آن مبتلا نمی‌گردند (۳۶،۳۷). فاکتورهای میزبان همچون پلی مورفیسم‌های ژنتیکی به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای مهم در پیشرفت و توسعه سرطان‌ها، از جمله سرطان مثانه معرفی شده‌اند (۴۰-۳۸). شواهدی در مورد نقش مهم عوامل ژنتیکی در حساسیت میزبان به سرطان مثانه وجود دارد (۴۳-۴۱). MMP-9 نقش مهمی در انواع سرطان‌ها دارد (۴۴). Mutsumura و همکاران نشان دادند الل T-1562 با افزایش ریسک سرطان معده ارتباط دارد (۴۵). همچنین واریانت‌های ژن MMP-9 با ریسک متاستاز در سرطان ریه، ملانوما و گریدهای بالا در Renal Cell Carcinoma مرتبط هستند (۴۸-۴۶). در تحقیق حاضر، ارتباطی بین پلی مورفیسم پروموتور 1562-MMP-9 و ریسک سرطان مثانه پیدا نشد. الل T شیوع بسیار پایینی در جمعیت مورد مطالعه داشت؛ به طوری که ژنوتیپ TT تقریباً در ۲٪ جمعیت بیماران مورد بررسی و ۱/۴٪ در جمعیت گروه کنترل یافت شد. ژنوتیپ CT با ۶۰٪ و ۵۳٪، بیشترین فراوانی را به ترتیب در گروه کنترل و بیمار به خود اختصاص داد و ارتباطی بین پلی مورفیسم ژنتیکی و گریه بیماری، سائز تومور، استیج بیماری و مصرف دخانیات مشاهده نشد که این یافته در مطالعه حاضر همسو با نتایج سایر تحقیقاتی است که در این زمینه صورت گرفته و تأییدکننده نتایج همین مطالعه است که در ادامه به آن اشاره می‌شود.

Kader و همکاران نیز با روش PCR-RFLP تأیید کردند ارتباطی بین پلی مورفیسم پروموتور MMP-9 و حساسیت‌پذیری نسبت به سرطان مثانه وجود ندارد (۴۹) و در یک مطالعه دیگر، ارتباطی بین پلی مورفیسم MMP-9 در Invasive Bladder Cancer و Superficial Bladder Cancer مشاهده نشد (۵۰). Wiczorek همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند ارتباطی بین پلی مورفیسم 1562-MMP-9 و ریسک سرطان مثانه وجود ندارد. روش مورد مطالعه در این تحقیق، Taq man بود و بر روی نژاد Caucasian انجام گرفت.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، عدم ارتباط پلی مورفیسم *MMP-9-1562 C/T* و ریسک سرطان مثانه دیده شد. احتمال دارد پلی مورفیسم‌های دیگری از ژن *MMP-9* در تغییر میزان بیان آنزیم در بین ژنوتیپ‌ها و حساسیت پذیری نسبت به سرطان مثانه تأثیرگذار باشند. همچنین پلی مورفیسم‌های ناشناخته ممکن است بر ارتباط پلی مورفیسم *MMP-9* و خطر سرطان مثانه اثر بگذارند؛ لذا مطالعات بیشتر در این زمینه به درک بیشتر در مورد بیولوژی بیماری و استراتژی درمان کمک خواهد کرد.

ولی در یک مطالعه ترکیب ژنوتیپی نشان داده شد مجموع ژنوتیپ در پلی مورفیسم‌های *MMP-2-1306 C/T* با *MMP-9-1562 C/T* در الل T، خطر ابتلا به سرطان مثانه را افزایش می‌دهد (۲۴). Yan و همکاران نیز سال ۲۰۱۴ در یک مطالعه متاآنالیز نشان دادند ارتباطی بین پلی مورفیسم *MMP-9* و سرطان مثانه وجود ندارد (۵۱). در مقاله متاآنالیز دیگری که در سال ۲۰۱۵ توسط Tao و همکاران منتشر شد، عدم ارتباط پلی مورفیسم پروموتور *MMP-9-1562* و خطر ابتلا به سرطان مثانه به اثبات رسید (۵۲).

References:

1. Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, Goodman M, Jemal A. International variations in bladder cancer incidence and mortality. *Eur Urol* 2014;66(1):59-73. PubMed
2. Hassan TMM, AL-Zahrani IH. Bladder cancer: Analysis of the 2004 WHO classification in conjunction with pathological and geographic variables. *Afr J Urol* 2012;18(3):118-23. Link
3. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Bohl A, Palou J, Buckley R, et al. Epidemiology, staging, grading, and risk stratification of bladder cancer. *Eur Urol Suppl* 2008;7(10):618-26. Link
4. Van Schaik RHN, Van der Heiden IP, Van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 Variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002;48(10):1668-71. Link
5. Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK, Schoenberg M. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. *J Urol* 1998;159(5):1493-6. PubMed
6. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(12):932-43. PubMed
7. Diamandis EP, Yousef GM. Human tissue kallikreins: A family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 2002;48(8):1198-205. PubMed
8. Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: Old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003;4(6):216. PubMed
9. O'Shea C, McKie N, Buggy Y, Duggan C, Hill AD, McDermott, et al. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int J Cancer* 2003;105(6):754-61. PubMed

10. Comen E, Norton L, Massague J. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(6):369-77. PubMed
11. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4. PubMed
12. Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005;87(3-4):273-86. PubMed
13. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10(6):415-33. PubMed
14. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):161-74. PubMed
15. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999;31(1):34-45. PubMed
16. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: An overview. *Front Biosci* 2005;11:1696-701. PubMed
17. Ries C, Pitsch T, Mentele R, Zahler S, Egea V, Nagase H, et al. Identification of a novel 82 kDa proMMP-9 species associated with the surface of leukaemic cells:(auto-) catalytic activation and resistance to inhibition by TIMP-1. *Biochem J* 2007;405(3):547-58. PubMed
18. Awakura Y, Ito N, Nakamura E, Takahashi T, Kotani H, Mikami Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett* 2006;241(1):59-63. PubMed
19. Zhang B, Ye S, Herrmann S-M, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99(14):1788-94. PubMed
20. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:212-27. PubMed
21. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253(1-2):269-85. PubMed
22. VanSaun MN, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006;78(1):69-79. PubMed
23. Forget MA, Desrosiers RR, Be'liveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;77:465-80. PubMed
24. Wiczorek E, Reszka E, Jablonowski Z, Jablonska E, Beata Krol M, Grzegorzczak A, et al. Genetic polymorphisms in matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MPs (TIMPs), and bladder cancer susceptibility. *BJU Int* 2016;112(8):1207-14. PubMed
25. Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, et al. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* 1996;271(18):10672-80. PubMed
26. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99(14):1788-94. PubMed
27. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res* 1999;9:677-9. PubMed

28. Bond GL, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. *Oncogene* 2007;26(9):1317-23. PubMed
29. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90. PubMed
30. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet* 2009;374(9685):239-49. PubMed
31. Oosterlinck W. Chemotherapy: Electromotive mitomycin in superficial bladder cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(11):633-4. PubMed
32. Schmitz-Drager BJ. Identifying risk factors in patients with nonmuscle- invasive bladder cancer: Clinical implications. *Eur Urol* 2011;60(4):721-3. PubMed
33. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:251-85. PubMed
34. Cassidy A, Wang W, Wu X, Lin J. Risk of urinary bladder cancer: A case-control analysis of industry and occupation. *BMC Cancer* 2009;9:443. PubMed
35. Hirao Y, Kim WJ, Fujimoto K. Environmental factors promoting bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2009;19(5):494-9. PubMed
36. Taioli E, Raimondi S. Genetic susceptibility to bladder cancer. *Lancet* 2005;366(9486):610-2. PubMed
37. Matullo G, Guarrera S, Sacerdote C, Polidoro S, Davico L, Gamberini S, et al. Polymorphisms/haplotypes in DNA repair genes and smoking: A bladder cancer case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(11 pt1):2569-78. PubMed
38. Li J, Luo F, Zhang H, Li L, Xu Y. The CCND1 G870A polymorphism and susceptibility to bladder cancer. *Tumour Biol* 2014;35(1):171-7. PubMed
39. Zhang C, Song X, Zhu M, Shi S, Li M, Jin L, et al. Association between MMP1-1607 1G>2G polymorphism and head and neck cancer risk: A meta-analysis. *PLoS One* 2013;8(2):e56294. PubMed
40. Zhang H, Wen X, Lu X, Zhang H. Association between NAD(P)H: quinine oxidoreductase 1 rs1800566 polymorphism and risk of bladder cancer. *Tumour Biol* 2013;34(6):3377-81. PubMed
41. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 2004;25(6):973-8. PubMed
42. Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2004;25(5):729-34. PubMed
43. Putluri N, Shojaie A, Vasu VT, Vareed SK, Nalluri S, Putluri V, et al. Metabolomic profiling reveals potential markers and bioprocesses altered in bladder cancer progression. *Cancer Res* 2011;71(24):7376-86. PubMed
44. St-Pierre Y, Van Themsche C, Este`ve PO. Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2(3):206-15. PubMed
45. Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, 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(1):19-25. PubMed
46. Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(15):5433-9. PubMed

47. Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai Sh, Patel A, et al. Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Med Genet* 2007;8:10. PubMed
48. Awakura Y1, Ito N, Nakamura E, Takahashi T, Kotani H, Mikami Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett* 2006;241(1):59-63. PubMed
49. Kader AK, Shao L, Dinney CP, Schabath MB, Wang Y, Liu J, et al. Matrix metalloproteinase polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Res* 2006;66(24):11644-8. PubMed
50. Kader AK, Liu J, Shao L, Dinney CP, Lin J, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* 2007;13(9):2614-20. PubMed
51. Yan Y, Liang H, Li T, Li M, Li R, Qin X, et al. The MMP-1, MMP-2, and MMP-9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: A meta-analysis. *Tumour Biol* 2014;35(4):3047-52. PubMed
52. Tao L, Li Z, Lin L, Lei Y, Hongyuan Y, Hongwei J, et al. MMP1, 2, 3, 7, and 9 gene polymorphisms and urinary cancer risk: A meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015;19(10):548-55. PubMed