

尿激酶型纤溶酶原激活系统与肺癌转移的关系

乔 慧, 吴惠茜, 赵国华, 丘钜世

(中山医科大学病理教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究尿激酶型纤溶酶原激活物 UPA 及其特异受体 UPAR 和抑制物 PAI-1, PAI-2 与肺非小细胞癌(NSCLC)转移的关系。【方法】用免疫组化 ISAB 法检测 UPA, UPAR, PAI-1 和 PAI-2 在 66 例肺 NSCLC 中蛋白水平表达。【结果】肺腺癌、鳞癌有淋巴结转移组 UPA, PAI-1 阳性率及表达强度均比无转移组高, P 值均 <0.05 。肺大细胞癌有淋巴结转移组 UPA, UPAR 阳性率比无转移组高, $P=0.001$ 和 $P=0.03$ 。对 4 种因素 UPA, UPAR, PAI-1, PAI-2 与肺癌淋巴结转移关系行 logistic 回归分析, UPA, PAI-1, PAI-2 三个因素引入回归方程, $P=0.001$, $P=0.031$ 和 $P=0.043$ 。UPA, PAI-1 回归系数均为正值, 相对危险度(RR)为 4.170 和 2.177, 而 PAI-2 回归系数为负值, $RR=0.504$ 。【结论】UPA, PAI-1 与肺腺癌、鳞癌转移密切相关, UPA, UPAR 与肺大细胞癌转移相关, UPA, PAI-1 是肺癌淋巴结转移促进因子, 而 PAI-2 是其抑制因子。

关键词: 尿激酶; 肺肿瘤; 肿瘤转移; 免疫组织化学

中图分类号: R 734.202 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)01-0014-04

The Expression of Urokinase-type Plasminogen Activation System and Its Relation to Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer

QIAO Hui, WU Hui-qian, ZAO Guo-hua, QIU Ju-shi

(Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To study the role of UPA, UPAR, PAI-1 and PAI-2 in metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC).【Methods】The expression at protein level for UPA, UPAR, PAI-1 and PAI-2 were examined in 66 cases of NSCLC.【Results】The positive rate as well as quantitative assay of immune staining for UPA and PAI-1 were significantly higher ($P<0.05$) in cases with lymph node involvement (LN+) than those without lymph node involvement (LN-) in adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC). In large cell lung cancer (LCLC), the positive rate for UPA, UPAR was significantly higher in LN+ cases than those in LN- cases ($P=0.001$ and $P=0.03$). The relationship between 4 factors and lymph node involvement was analyzed by multivariate backward logistic regression model. The result showed that UPA, PAI-1 and PAI-2 entered the regression model ($P=0.001$, $P=0.031$, and $P=0.043$ respectively). Regression coefficient of UPA and PAI-1 was positive, $RR=4.170$ and $RR=2.177$, while that of PAI-2 was negative, $RR=0.504$.【Conclusions】UPA and PAI-1 are associated with metastasis in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. While UPA and UPAR are associated with metastasis in large cell lung cancer, UPA, PAI-1 may contribute to tumor metastasis, whereas PAI-2 may prevent tumor metastasis.

Key words: urokinase; lung neoplasms; neoplasm metastasis; immunohistochemistry

在肿瘤浸润和转移过程中, 必须降解一系列天然组织屏障, 其中包括细胞外基质和基底膜。细胞外蛋白水解酶是参与这一过程的关键酶, 这些酶大多数是以无活性的酶原形式存在, 尿激酶型纤溶酶

原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, UPA)可直接参与或间接激活这些酶原。它可能是基底膜和细胞外基质发生降解的“始动”和“调节”因子。近年, 国外陆续有 UPA 与各类肿瘤浸润和转移关

收稿日期: 1999-08-24

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(3957029400)

作者简介: 乔 慧(1972-), 女, 江苏人, 在读博士; 赵国华(1958-), 男, 副教授, 课题负责人。

系研究报道。本实验采用免疫组化 LSAB 法观察 UPA 系统各组分: UPA, UPA 受体(UPA receptor, UP-AR)及其抑制物(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1; plasminogen activator inhibitor-2, PAI-2)在 66 例肺癌组织中表达和分布,探讨 UPA 系统与肺癌转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

标本选自中山医科大学病理教研室和附属肿瘤医院病理科 1992~1997 年存档的活检蜡块。要求诊断明确,病史详细,肿瘤组织较多。共选出 66 例,其中肺腺癌 24 例,肺鳞癌 29 例,大细胞癌 13 例。有淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 32 例。UPA, UPAR, PAI-1, PAI-2 的第一抗体均购自 American Diagnostic Inc, 产品代号分别为 PcAb389, McAb3936, McAb3785, McAb3750。免疫组化 LSAB 试剂盒购自 DAKO 公司。

1.2 方法

4 μm 厚度切片,免疫组化染色(LSAB法), UPA, UPAR, PAI-1, PAI-2 工作浓度分别为: 1:500, 1:50, 1:50, 1:50。其中 UPAR 抗原修复采用 50 mmol Glycine+100 mmol NaCl pH 3.0, 微波低档 5min^[8]。PAI-1, PAI-2 分别采用微波和胰酶消化来暴露抗原。每批试验均用已知 UPA, UPAR, PAI-1, PAI-2 阳性乳腺癌标本作阳性对照。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果观察

1.3.1 半定量分析 在光镜下观察,将免疫组化染色分为两个等级:阴性(-):阳性细胞数<5%,阳性(+):阳性细胞数 \geq 5%。

1.3.2 定量分析 采用德国 Kontron 公司 IBSA 2.0 真彩图像分析仪对免疫组化结果进行定量测定。用阳性产物灰度来反映表达强度。灰度数值与阳性产物染色强度呈反比关系。

1.4 统计学处理

应用 SPSS6.0 统计软件分析,

2 结果

2.1 UPA 系统在非小细胞肺癌中分布情况

UPA 阳性信号主要位于癌细胞胞浆内,腺癌腺腔内的巨噬细胞及鳞癌癌巢周围的纤维母细胞也为弱阳性。UPAR 阳性信号主要位于癌细胞胞膜上。PAI-1 分布广泛,癌细胞及肿瘤组织内皮细胞,纤维母样细胞均阳性,而 PAI-2 分布局限仅癌细胞胞浆阳性(图 1~4)。

2.2 UPA 系统在有、无淋巴结转移组的阳性率及灰度

采用 Fisher 精确概率检验法分析肺癌有淋巴结转移组(LN+)与无转移组(LN-)中的 UPA 系统的阳性率。由表 1 可见,肺腺癌(AC)、鳞癌(SCC) LN+组 UPA, PAI-1 阳性率高于 LN-组, P 值均<0.05。肺大细胞癌(LCLC) LN+组 UPA, UPAR 阳性率高于 LN-组, P 值均<0.05。

表 1 UPA 系统在有、无淋巴结转移组中的阳性率

Table 1 Positive rates of UPA system in LN+ cases and LN- cases of lung cancer (n, %)

Type	n	UPA	UPAR	PAI-1	PAI-2
AC LN+	13	13(100)	6(46)	10(77)	8(53)
	LN-	12	3(25)	6(50)	4(33)
		$P = 0.001$	$P = 0.796$	$P = 0.036$	$P = 0.404$
SCC LN+	13	11(85)	9(69)	9(69)	8(53)
	LN-	15	5(33)	8(53)	4(26)
		$P = 0.008$	$P = 0.620$	$P = 0.030$	$P = 0.620$
LCLC LN+	8	8(100)	7(88)	4(50)	3(38)
	LN-	5	0(0)	1(20)	2(40)
		$P = 0.001$	$P = 0.030$	$P = 0.533$	$P = 0.667$

AC: adenocarcinoma, SCC: squamous cell carcinoma, LCLC: large cell lung cancer

采用 t 检验或校正 t 检验比较肺癌有淋巴结转移组(LN+)与无转移组(LN-)中的 UPA 系统的灰度。由表 2 可见, 肺腺癌(AC)、鳞癌(SCC)LN+ 组

UPA, PAI-1 灰度(其数值与染色强度呈反比关系)低于 LN-组, P 值均 < 0.01 。

表 2 UPA 系统在有、无淋巴结转移组中的灰度
Table 2 Gray level of UPA system in LN+ cases and LN- cases of lung cancer

Type	<i>n</i>	UPA	UPAR	PAI-1	PAI-2
AC LN+	13	196.02 ± 10.49	223.52 ± 14.69	222.11 ± 24.09	212.04 ± 23.08
	12	221.91 ± 18.20	223.77 ± 15.47	247.96 ± 12.80	208.96 ± 23.60
		1.1 $P = 0.001$	1.0 $P = 0.967$	1.0 $P = 0.002$	1.0 $P = 0.744$
SCC LN+	13	201.51 ± 9.91	224.42 ± 14.60	227.42 ± 16.89	222.44 ± 19.53
	15	222.78 ± 16.44	230.52 ± 14.24	240.23 ± 13.93	220.11 ± 22.54
		1.0 $P = 0.001$	1.0 $P = 0.274$	1.0 $P = 0.0002$	1.0 $P = 0.733$

2.3 UPA 系统与肺癌淋巴结转移关系的 backward logistic 回归分析

4 个因素 UPA、UPAR、PAI-1、PAI-2 与肺癌淋巴结转移关系用 backward logistic 回归法进行多元变量分析, 确定 $\alpha = 0.05$ 。由表 3 可见 UPA, PAI-1、PAI-2 三个因素引入回归方程 ($P = 0.001$, $P = 0.031$ 和 $P = 0.043$)。UPA, PAI-1 回归系数均为正值 ($B = 1.428$ 和 $B = 0.778$), 相对危险度均大于 1 ($RR = 4.170$ 和 $RR = 2.177$), 而 PAI-2 回归系数为负值 ($B = -0.684$), 相对危险度小于 1 ($RR = 0.504$)。由此说明 UPA 和 PAI-1 是淋巴结转移的危险因子, 而 PAI-2 是个保护因子。

3 讨论

肿瘤转移过程包括一系列相关步骤, 其中以细胞外基质及基底膜降解最关键。它需要一系列蛋白溶解酶参加。已有研究表明 UPA 介导的纤维蛋白溶解系统与此密切相关^[1]。

本组资料显示在人的肺腺癌及鳞癌有淋巴结转移组中 UPA 与 PAI-1 阳性率均高于无转移组 (P 值均 < 0.05)。在肺癌淋巴结转移危险因素 logistic 回归分析中, UPA、PAI-1 相对危险度 RR 值均大于 1。结果提示 UPA, PAI-1 与肺腺癌、鳞癌的转移有关。UPA 与癌细胞表面的受体 UPAR 结合后将纤溶酶原活化为纤溶酶, 后者能降解多种细胞外基质及基底膜的成分, 促进癌细胞的侵袭和转移^[1, 2]。UPA 的作用又受特异性抑制剂的调节, 其中主要的为 PAI-1 和 PAI-2。本实验免疫组化定位分析发现

在肺腺癌及鳞癌中 PAI-1 除了存在于肿瘤细胞外, 间质细胞也阳性。鉴于淋巴结转移组中 PAI-1 表达强度显著升高及 PAI-1 在肿瘤组织中分布的特点, 结合国外研究结果, 推测 PAI-1 作用的机理可能为: ①PAI-1 在瘤细胞中表达可以防止瘤组织自身降解^[3, 3]。②PAI-1 在纤维母细胞中表达可能是参与肿瘤结缔组织生成、基质重建^[3]。③PAI-1 在瘤组织内皮细胞表达或许起到防止血管生成过程中细胞外基质过分降解, 参与血管生成调节^[4]。总的来看, 肿瘤组织中 PAI-1 活性升高, 与淋巴结转移及患者预后差有关^[1, 3]。

在肺大细胞癌中, 有淋巴结转移组中 UPA 和 UPAR 阳性率高于阴性组 (P 值均小于 0.05)。而 PAI-1 及 PAI-2 未见统计学差异, 提示了肺大细胞癌生物学恶性度高与细胞膜上的 UPAR 密切相关。本组另一研究表明在肺大细胞癌移植瘤中, UPA R 水平明显高于其它分子。由此可以看出, 在各种类型的肺癌中尽管都有 UPA 系统各组表达, 但占主导地位因子却不同。

在淋巴结转移危险因素 logistic 回归分析中, PAI-2 相对危险度 $RR = 0.504$, 回归系数为负值 ($B = -0.684$), 说明 PAI-2 在淋巴结转移中是个保护因子。已有研究证实 PAI-2 水平升高是预后良好标志之一^[6, 7]。PAI-2 可抑制 UPA 活性, 但其具体机理还不明。免疫组化表明 PAI-2 仅定位于肿瘤细胞浆内, 它不分泌出细胞外基质, 这点提示可能由于 PAI-1、PAI-2 在肿瘤组中分布区别, 从而导致同为抑制剂的两种蛋白在肿瘤浸润与转移中所起作用却不同。

(下转第 20 页)

胞³H-TdR 掺入降低, 也即 DNA 合成降低, 各 ATRA 处理组的抑制率为 23%~62%, 且随浓度增加抑制率升高; 经方差分析各 ATRA 处理组与 1% 无水乙醇组之间存在显著性差异 ($P < 0.01$); 即 ATRA 可明显抑制 DNA 的合成, 从而使细胞生长速度减慢。

综上所述, 在全反式维甲酸作用下, 舌癌细胞株生长速度减慢, 细胞形态出现一定分化, DNA 合成能力下降。该结果显示舌癌细胞有分化迹象, 细胞恶性表型发生良性逆转。因此可认为全反式维甲酸对体外培养的 Tca8113 细胞具有一定的诱导分化作用, 利用诱导分化剂来防治舌癌是值得进一步探索的新途径。但全反式维甲酸并不能使舌癌细胞在体外完全逆转其恶性表型, 应继续寻求新的诱导分化剂并进一步探讨诱导分化的机制。目前已有有人开始联合其它诱导分化剂或细胞因子来增

强维甲酸的诱导分化作用, 同时减少维甲酸最低有效剂量^[2]。

参考文献:

- [1] Bollag W, Holdenmer E E. Retinoids in cancer prevention and therapy[J] . Ann Oncol, 1992, 3(7): 513.
- [2] Malcolm A, David R, Bruce D, *et al* . Retinoids in cancer therapy[J] . J Clin Oncol, 1992, 10(5): 839.
- [3] Lutan R. Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids[J] . Cancer Res, 1994, 54(1): 1987s.
- [4] Mikael B, Philip F, Beverly A, *et al* . Retinoic acid regulates oral epithelial differentiation by two mechanisms[J] . J Invest Dermatol, 1995, 104(4): 546.

(编辑 刘清海)

(上接第 16 页)

UPA 系统与肺癌的转移密切相关, 调节这些分子功能是抗癌治疗, 抑制癌细胞扩散的基础。

(本文图见插页 2)

参考文献:

- [1] Heiss M M, Babic R, Algayar H, *et al* . Tumor-associated proteolysis and Prognosis; new functional, risk factor in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system[J] . J Clin Oncol, 1995; 13(8): 2084.
- [2] Duffy M J, Reilly D, O' Sullivan C, *et al* . Urokinase-plasminogen activator; a new and independent prognostic marker in breast cancer[J] . Cancer Res, 1990; 50(21): 6827.
- [3] Andreasen P A, Kjoller L, Christensen L, *et al* . The Urokinase-type plasminogen-activator system in cancer metastasis;

a review, Int J Cancer, 1997, 72(1): 1.

- [4] Pyke C, Kristensen P, Rallkjaer E, *et al* . The plasminogen activation system i e plasminogen activator and 2 inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinoma[J] . Bull-Cancer, 1994, 81(9): 770.
- [7] Takeuchi Y, Nakao A, Harada A, *et al* . Expression of plasminogen activators and their inhibitors in human Pancreatic carcinoma; immunohistochemical study[J] . Am J Gastroenterol, 1993, 88(11): 1928.
- [8] Del V S, Stoppelli M P, Carriero M V, *et al* . Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography; comparison with urokinase levels [J] . Cancer Res, 1993, 53(13): 3198.

(编辑 黄小延)

尿激酶型纤溶酶原激活系统与肺癌转移的关系 (正文见第 14 页)

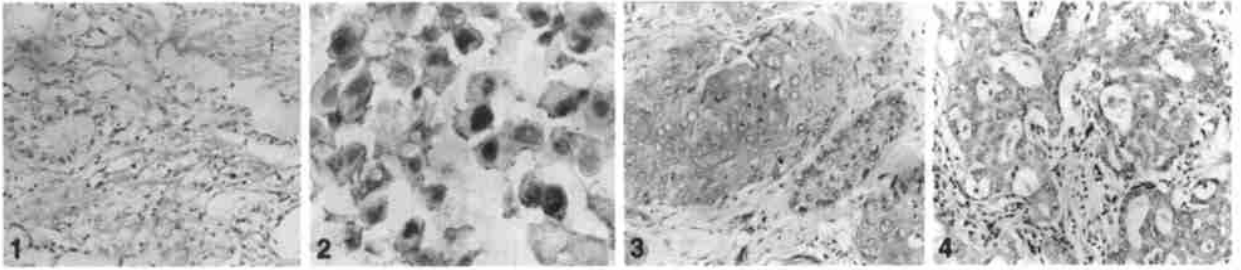


图 1 肺腺癌中 PAI-1 蛋白阳性表达

图 2 肺大细胞癌中 UPAR 蛋白阳性表达

图 3 肺鳞癌中 UPA 蛋白阳性表达

图 4 肺腺癌中 PAI-2 蛋白阳性表达

Fig. 1 PAI-1 protein positive staining in lung adenocarcinoma (LSAB $\times 200$)

Fig. 2 UPAR protein positive staining in large cell lung (LSAB $\times 400$)

Fig. 3 UPA protein positive staining in lung squamous cell carcinoma (LSAB $\times 200$)

Fig. 4 PAI-2 protein positive staining in lung adenocarcinoma (LSAB $\times 200$)

洛沙坦对血管平滑肌细胞增殖的干预作用及 C-myc 基因表达的影响 (正文见第 31 页)

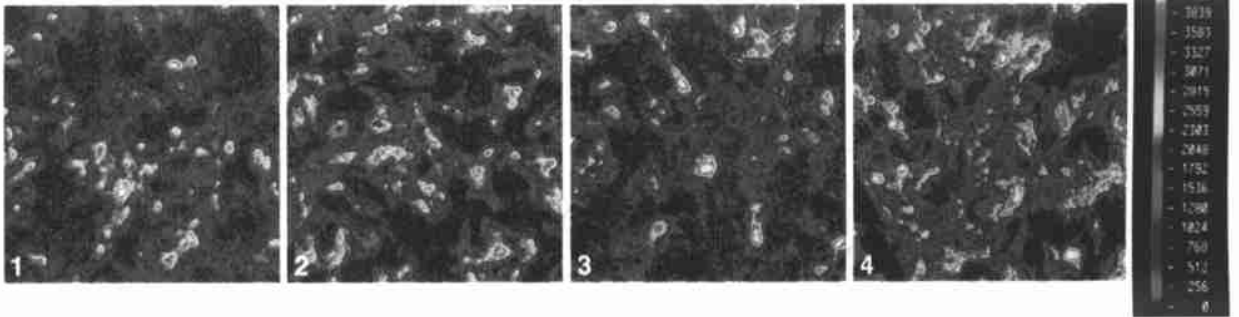


图 1 Losartan 对外培养 VSMC PCNA 表达的影响

图 2 对照组 VSMC 中 PCNA 表达

图 3 Losartan 对外培养 VSMC C-myc 基因的表达

图 4 对照组 C-myc 基因表达

Fig. 1 The effect of Losartan on the expression of PCNA in VSMC (fluorescence immunochemistry method)

Fig. 2 The expression of PCNA in vascular smooth muscle cell in control group (fluorescence immunochemistry method)

Fig. 3 The effect of losartan on the expression of C-myc in VSMC (fluorescence immunochemistry method)

Fig. 4 The expression of C-myc in vascular smooth muscle cells in control group (fluorescence immunochemistry method)