

uPA 系统在 4 株非小细胞性肺癌细胞中的表达^①

彭挺生 赵国华 赵国强 张 萌 周慕珩

(中山医科大学病理学教研室; 广州, 510089)

摘 要 目的: 研究尿激酶型纤溶酶原(uPA)激活系统中 4 种主要成分 uPA、PAI-1、PAI-2、uPAR 在非小细胞性肺癌细胞株中的表达及各因子之间的作用方式。方法: 应用免疫组化、蛋白免疫印迹技术对培养细胞中 4 种成分进行定位、定性及半定量分析; 应用斑点杂交技术检测 4 种细胞中 uPA mRNA 和 uPAR mRNA 的表达。结果: 4 种成分在 4 株细胞的胞浆及胞膜均有表达。蛋白免疫印迹法检测 uPA、PAI-1、PAI-2、uPAR, 4 株细胞均在约 140 ku 和约 80 ku 处出现特异性条带, 且两种腺癌细胞的表达水平显著高于其他两株细胞。斑点杂交结果示 4 株细胞中均有 uPA mRNA 和 uPAR mRNA 的表达。结论: 此 4 株细胞中均能合成与分泌 uPA 系统的 4 种主要成分, 各因子以二联及三联复合物(uPA/PAI-1、uPA/PAI-2、uPA/uPAR、uPA/PAI-1/uPAR、uPA/PAI-2/uPAR)的形式存在; uPA 系统的表达与这 4 种细胞的恶性程度并不一致。

主题词 尿激酶; 癌, 非小细胞性肺; 细胞, 培养的

中图分类号 R 734.2

The Expression of uPA System in Four Non-small Cell Lung Cancer Cell Line

Peng Tingsheng Zhao Guohua Zhao Guoqiang Zhang Meng Zhou Muheng

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

Abstract Objective: To study the expression and the reaction patterns of the main components of the uPA system (uPA, PAI-1, PAI-2, uPAR) in non-small cell lung cancer cell lines. **Methods:** uPA system was detected and analyzed using immunohistochemistry and Western Blot. Dot blot hybridization was used to detect the expression of uPA, uPAR mRNA. **Results:** The four components of uPA system were expressed in the plasma and membrane of the four cell lines. Using Western blot to detect the expression of uPA, PAI-1, PAI-2, uPAR, specific appeared special bands near 80 ku and 140 ku were observed, and the expression level of the two adenocarcinoma cell lines was significantly higher than the other two cell lines. Both uPA and uPAR mRNA were expressed by the four cell lines. **Conclusions:** The four components of uPA system could be synthesized and secreted by all the four cell lines, existed in duplet or triplet form (uPA/PAI-1, uPA/PAI-2, uPA/uPAR, uPA/PAI-1/uPAR and uPA/PAI-2/uPAR). The expression of uPA system were not in concomitance with the malignance of the cell lines.

Subject headings urokinase; carcinoma, non-small-cell lung; cells, cultured

纤溶酶原激活系统包括纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)及其特异性受体和抑制剂。PA 是一种特殊的丝氨酸蛋白酶, 能催化无活性血纤溶酶原转化为纤溶酶, PA 以两种形式存在, 一为组织型(tissue-type PA, tPA), 另一为尿激酶型(urokinase-type PA, uPA); uPA 有两种活性形式, 即

高相对分子质量(约 54 ku) uPA(HMW-uPA)和低相对分子质量(约 30 ku) uPA(LMW-uPA); 与细胞外基质蛋白的降解和肿瘤转移有关的绝大多数是 uPA^[1]。uPA 的特异性受体(uPA receptor, uPAR)是细胞膜上高度糖基化的 50~60 ku 的单链糖蛋白, 从 N-端开始依次为 1、2、3 区^[2]。纤溶酶原激活抑

制剂 (PA inhibitors, PAIs) 能特异地抑制 uPA 的活性, 抑制剂主要分为两大类, 即血管内皮型 (PAI-1) 和胎盘型 (PAI-2)^[3]。

uPA 系统参与细胞外基质及基底膜中多种成分的降解, 是调控细胞外基质动态平衡的一种反应系统, 这个系统的平衡失调被认为是恶性肿瘤侵袭转移的重要步骤之一, 弄清楚肿瘤细胞本身有关这种系统的状态是必要的; 我们从蛋白及 RNA 水平检测了培养肺癌细胞中 uPA 系统各成分的表达, 以探讨 uPA 系统在4种肺癌细胞中的存在方式及其可能的生物学意义。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

肺巨细胞癌细胞系 (PLA-801) 由中国人民解放军总医院建立, 肺腺癌细胞系 (GLC-82) 由昆明医学院第一附属医院建立, 肺腺癌细胞系 (SPC-A-1) 由上海市胸科医院及中科院上海细胞所建立, 肺鳞癌细胞系 (L-78) 由北京肺部肿瘤研究所建立, 以上细胞株均在标准条件下常规体外培养。

1.2 细胞切片的制作

常规胰酶消化贴壁细胞, 收集后离心 1 000 r/min, 5 min, 弃上清, 加入适量中性福尔马林, 吹打均匀后, 4 °C 固定 3~4 h。离心, 弃上清, 吸取细胞沉淀注入加热溶解琼脂糖滴内, 完全凝固后常规固定、脱水、石蜡包埋。切 4 μm 备用。

1.3 免疫组化

常规 LSAB 法对细胞切片进行染色, 一抗购自 American Diagnostic Inc, 工作浓度为: uPA 1 : 1 500,

PAI-1 1 : 50, PAI-2 1 : 50, uPAR 1 : 50。

1.4 蛋白免疫印迹

取处于生长旺盛期的细胞, 加入适量预冷的细胞裂解液, 制成细胞全蛋白抽提液。考马斯亮蓝 G-250 染色法测定样本蛋白浓度, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白条带 (分离胶为 5~20 g/L 的线性梯度胶, 积层胶浓度为 4 g/L), 将蛋白转移至尼龙膜上, 该膜用 LSAB 法染色, 一抗工作浓度为 uPA 1 : 5 000, PAI-1 1 : 100, PAI-2 1 : 100, uPAR 1 : 500。图像分析仪 (Kontron IBASS 2.0) 分析结果。

1.5 DNA-RNA 斑点杂交

Digoxigenin 标记的 uPA cDNA 和 uPAR cDNA (探针来源: Department of Orthopaedic Surgery, University of Western Australia) 检测 4 种细胞中 uPA 和 uPAR mRNA 的表达。

2 结果

2.1 肺癌细胞中 uPA 系统各因子的免疫组化染色结果 (定性)

4 株细胞中 uPA、PAI-1、PAI-2、uPAR 均有不同程度着色, 阳性信号为胞浆内及胞膜上出现棕黄色颗粒。uPA、PAI-1、PAI-2 主要为胞浆内着色, uPAR 在胞浆及胞膜均有着色, 且胞膜着色明显。阳性信号主要位于细胞与细胞交界处, 见图 1。

2.2 4 株肺癌细胞中 uPA 系统各种蛋白的表达 (定量)

分别检测 uPA、PAI-1、PAI-2、uPAR, 4 株细胞均在 80 ku 和 140 ku 处出现特异性条带, 且两株腺癌细胞 SPC-A-1 和 GLC-82 中各成分的表达水平显著

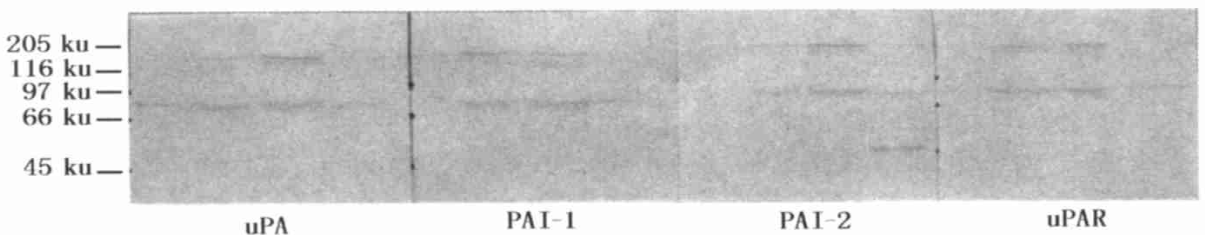


图 2 4 株肺癌细胞抽提蛋白中 uPA 系统各种蛋白的免疫表达

Fig. 2 The expression of uPA system in the extract of the four lung cancer cell lines (Western Blot)

lane 1: PLA-801 lane 2: SPC-A-1 lane 3: GLC-82 lane 4: L-78

可数字化为以下柱形图:

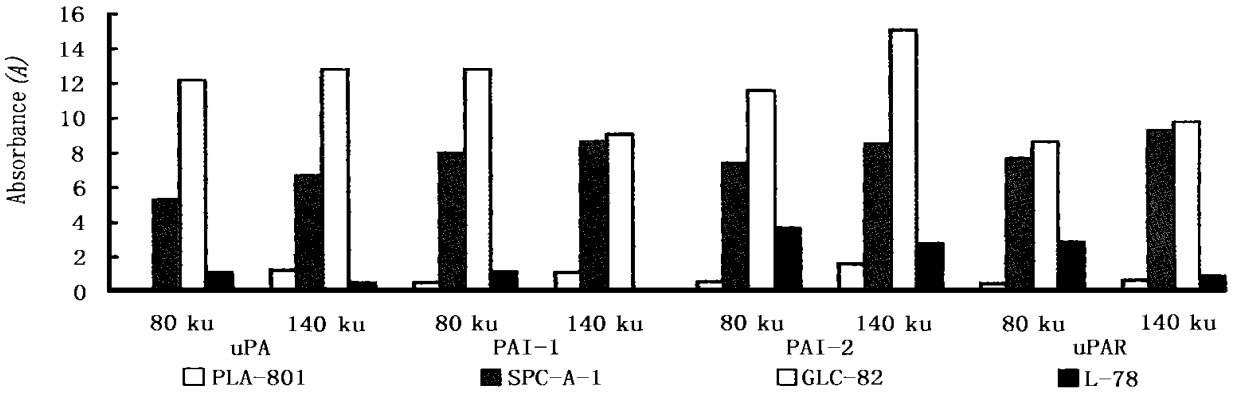


图3 uPA系统各种蛋白在4株肺癌细胞中的表达

Fig. 3 The expression of uPA system in the four lung cancer cell lines

2.3 4株肺癌细胞中uPA mRNA、uPAR mRNA的表达

经图像分析仪处理分析结果,4株肺癌细胞中uPA mRNA和uPAR mRNA的表达如下图所示,uPA mRNA和uPAR mRNA的表达水平并不一致;鳞癌细胞L-78 uPA mRNA的水平显著高于其它细胞株,4株细胞之间uPAR mRNA水平无显著差异,见图4。

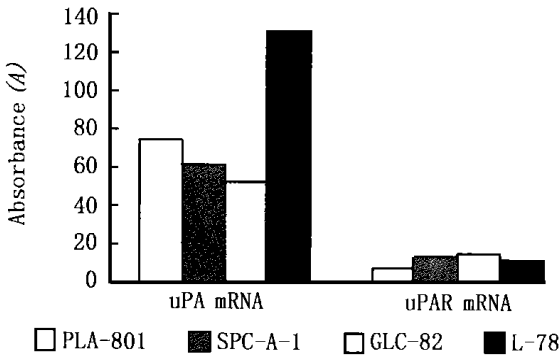


图4 uPA mRNA、uPAR mRNA在4株肺癌细胞中的表达
Fig. 4 The expression of uPA mRNA, uPAR mRNA in the four lung cancer cell lines

3 讨论

Pyke C等认为^[4]uPA和PAI-1由肿瘤组织周围的纤维母细胞、巨噬细胞和内皮细胞在癌细胞旁分泌刺激下产生,分泌出细胞后再与癌细胞表面uPAR结合,形成的复合物被癌细胞内吞,因而在癌细胞中检测到的uPA和PAI-1可能是由其它部位转运而来。本实验检测的是培养细胞中uPA系统各蛋白与mRNA的表达,不存在间质细胞的影响,因而认为这4株细胞均能合成与分泌uPA系统的4种成分,

支持Nagayama等人^[5]的观点。

本实验对细胞总蛋白的Western Blot分析发现在约80 ku和约140 ku处,4株细胞中uPA、PAI-1、PAI-2、uPAR均显示阳性,提示在这两个特异性位置上存在uPA系统的4种因子,但这两种相对分子质量明显大于各因子的单体相对分子质量,提示各因子可能以复合物的形式存在,与Lang^[6]等人的发现相一致。uPA前体与细胞表面的uPAR结合并变成活性uPA后,能直接或间接地使uPAR1区及2区之间断裂,1区游离,uPAR(2+3)区仍存留于胞膜上,因此uPA/uPAR(2+3)复合物的水平更能反映癌组织中uPA、纤溶酶的活性和细胞的侵袭性,LMW-uPA同样也能裂解uPAR,并形成三联复合物^[7];uPA/PAI-1复合物的量也能反映uPA的活性^[3]。4种成分的相对分子质量分别为HMW-uPA 54 ku,LMW-uPA 32 ku,PAI-1 50 ku,PAI-2 47 ku,uPAR 50 ku,uPAR(2+3) 40 ku,因而我们认为80 ku的特异性条带代表LMW-uPA分别与PAI-1、PAI-2、uPAR形成的复合物;而约140 ku的特异性条带代表uPA/PAI/uPAR或uPA/PAI/uPAR(2+3)所形成的三联复合物,提示uPA系统是一种复杂的调控网络,这个网络中各因子之间相互作用、相互协调,共同影响细胞的生物学特性。

两株肺腺癌细胞SPC-A-1和GLC-82中uPA系统各成分的表达水平均显著高于其它两株细胞,根据细胞的生物学特性,肺巨细胞癌细胞株恶性度高、侵袭性强,其恶性度似与uPA系统的作用无关系,国内也有学者^[8]认为uPA与PLA-801的某些子株的侵袭性无显著相关,此结果尚待进一步证实。

斑点杂交分析的结果表明4株细胞中uPA mRNA、uPAR mRNA的表达与其蛋白表达不甚一致,可能

在不同类型的肺癌细胞中 uPA 系统各成分的蛋白质合成和降解机制不同; uPA mRNA 的表达明显高于 uPAR mRNA, 但 uPAR 的蛋白表达水平却较高, 可能 uPAR 的合成并不多, 但由于 uPA/PAI-1/uPAR 被癌细胞吞后, uPAR 能再循环至细胞表面重复利用^[9], 因而蛋白含量较高, 具体机制有待进一步深入研究。

(本文图1见插页3)

参 考 文 献

- 1 Liotta L A, Steeg P S, Stetler W G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1991, 64(2): 327
- 2 Behrendt N, Ploug M, Patthy L, *et al*. The ligand-binding domain of the cell surface for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1991, 266(12): 7842
- 3 Andreassen P A, Sottrup J L, Kjoller L, *et al*. Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett*, 1994, 338(3): 329
- 4 Pyke C, Ralkiaer E, Ronne E, *et al*. Immunohistochemical detection of the receptor for urokinase plasminogen activator in human colon cancer. *Histopathology*, 1994, 24(2): 131
- 5 Nagayama M, Sato A, Hayakawa H, *et al*. Plasminogen activators and their inhibition in non-small cell lung cancer. *Cancer*, 1994, 73(5): 1398
- 6 Laug W E, Cao X R, Yu Y B, *et al*. Inhibition of invasion of HT-1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res*, 1993, 53(24): 6051
- 7 Abd A R H, Andrew M, Wang J Y, *et al*. Soluble human urokinase receptor is composed of two active units. *J Biol Chem*, 1997, 272(8): 5348
- 8 魏 泓, 吴丰春, 周建华, 等. nm23/NDPK 基因、整合蛋白、IV型胶原酶及尿激酶表达与鼠肺癌转移的关系. *中华医学杂志*, 1997, 77(8): 597
- 9 Nakjaer A, Conese M, Christensen E L, *et al*. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of uPA: Serpin complexes. *EMBO J*, 1997, 16(10): 2610

(1998-08-14 收稿 1999-05-03 修回)

· 简 讯 ·

现代辅助生育技术研究在中山医科大学取得显著成绩

在中山医科大学附属一院生殖医学研究中心庄广伦教授的办公室里看到一尊观音像, 这是一位试管婴儿的家人送给庄教授的, 赞誉他象民间流传的“送子观音”, 解除了不少不孕夫妇的烦恼, 为不少家庭带来了希望和幸福。

为了解决难治的不育症及人类的优生问题, 庄广伦教授长期以来在生殖医学领域里辛勤耕耘, 带领生殖医学研究中心全体同志, 通力合作, 以常规体外受精与胚胎移植(IVF-ET)即第1代试管婴儿技术为起点, 结合我国国情, 洋为中用, 不断改进技术、不断总结, 从超排卵引起的过度刺激征与多胎妊娠处理以及实验室配子处理技术等苦苦探索, 积累了丰富的经验。他们改进了治疗周期超排卵方案, 提高卵子受精率, 使试管婴儿临床妊娠率达20%~30%, 达到了国际先进水平。现已有500名试管婴儿喜降人间, 出生的试管婴儿数名列全国前茅。

该中心已实施了全国首例选择性减胎术, 达到准确、简便、安全减少多胎妊娠, 为试管婴儿多胎妊娠提供了一种有效处理方法。他们应用试管婴儿技术为卵巢早衰患者及遗传病夫妇提供赠卵、赠胚胎治疗方法, 成功取得了全国首例卵巢早衰赠卵足月分娩正常婴儿。应用卵母细胞单精显微注射技术治疗严重男性因素不育与不明原因不育, 将第1代常规试管婴儿技术发展发展到第2代, 即使在精液常规“无精子”而在睾丸或附睾获得极少精子的情况下可以受精, 解除了临床常规试管婴儿技术不能解决的一大片严重男性少弱精子及不明原因不育患者的烦恼。

生殖医学研究中心正朝着一个新的高峰攀登—提高试管婴儿妊娠率, 为此, 他们着手人工辅助孵出序贯囊胚培养和提高种植率, 妊娠率的研究。该中心将显微注射操作技术与分子生物学技术相结合, 发展胚胎种植前遗传学诊断(PGD)即第3代试管婴儿技术的研究, 当胚胎在体外发育至4~8细胞阶段时取出1~2个卵裂球进行活检, 再将无致病基因的胚胎移植入宫腔内种植, 以避免遗传病、代谢病的出现。目前, 从性连锁性疾病着手取得了可喜的苗头。他们一贯的宗旨是要求技术与国际接轨, 用最新的技术、过硬的技术为人民服务。

中山医科大学生殖医学研究中心迅猛发展引起人们的注意, 有人问庄广伦教授:“你们走的是什么路线?”庄教授回答是:“开放改革路线”。庄广伦教授认为试管婴儿这项技术作为一门行之有效的技术, 应在中国广泛推广, 知识和技术不是私有的, 应为大家掌握应用。因此, 他不遗余力地、毫无保留地为我国试管婴儿技术发展奉献自己的力量。现代辅助生育系列技术的建立为不孕症育龄夫妇、计划生育绝育术后小孩发生意外死亡、第1次怀孕人流后继发不孕的妇女带来了福音, 为计划生育提供一个坚强后盾。

(冯世容)

uPA 系统在 4 株非小细胞性肺癌细胞中的表达 (正文见第 174 页)

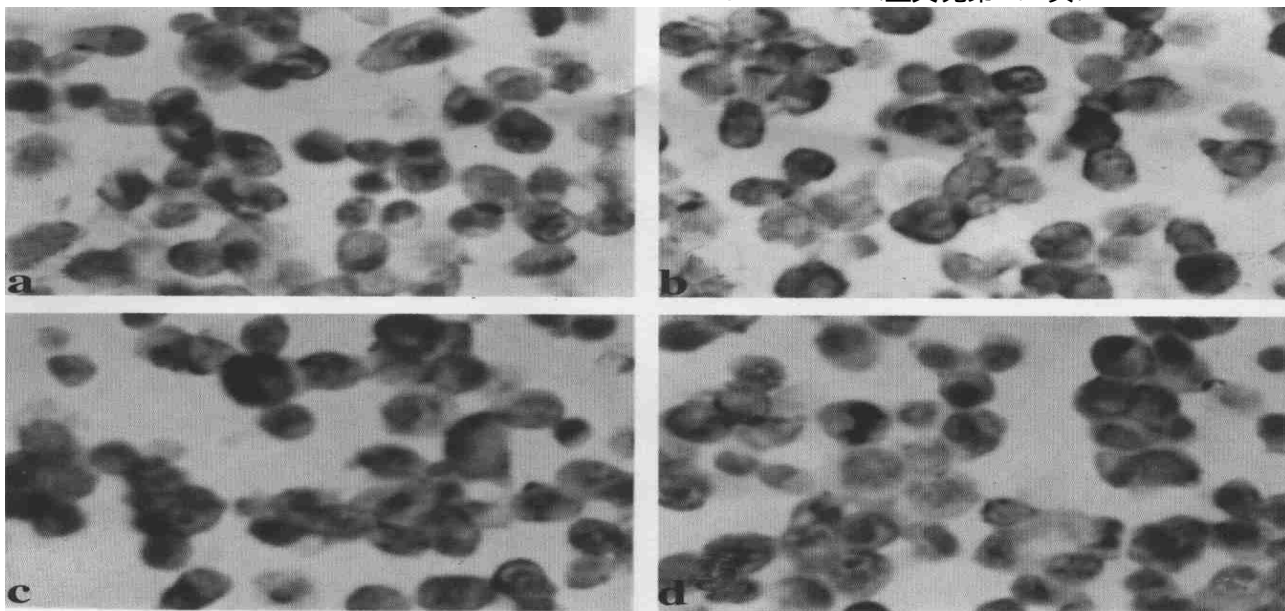


图 1 4 株非小细胞性肺癌细胞株 PAL-801 中 uPA(a)、PAI-1(b)、PAI-2(c)、uPAR(d) 的表达

Fig. 1 The expression of uPA(1)、PAI-1(2)、PAI-2(3)、uPAR(4) in the non small cell line PAL-801 (LSAB× 200)

食管癌中 P16 蛋白和 Rb 蛋白的表达及其意义(正文见第 182 页)

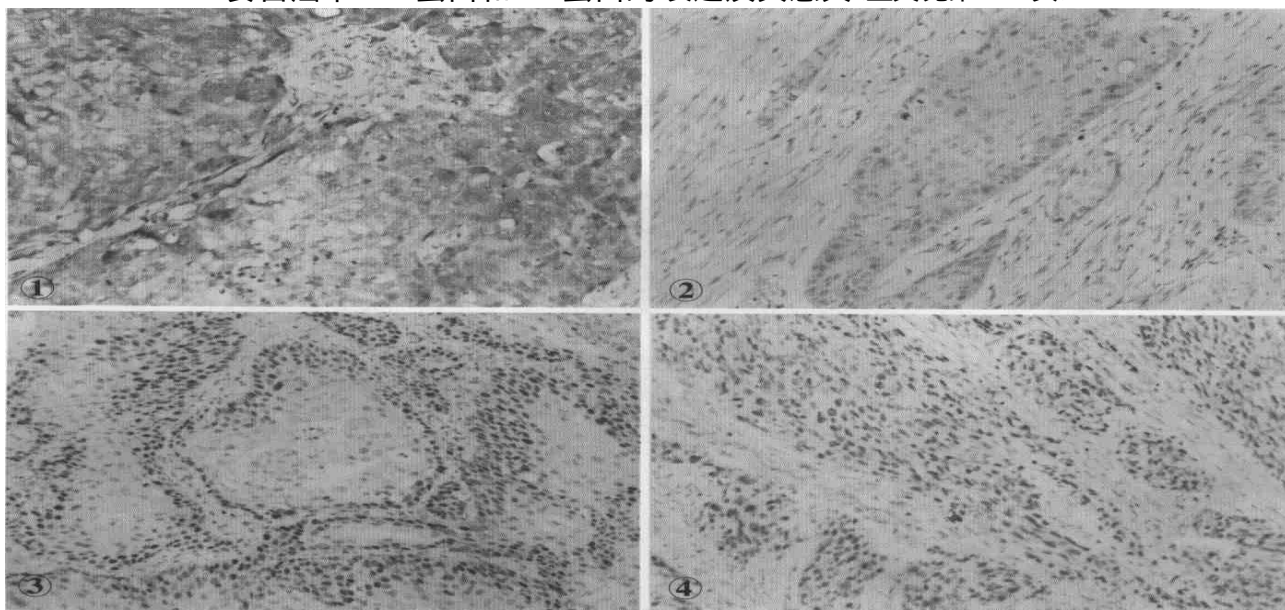


图 1 食管鳞状上皮癌(II 级), P16 阳性, 可见癌巢中癌细胞胞浆着色, 免疫组化染色, 100×

图 2 食管鳞状上皮癌(II 级), P16 阳性, 可见癌巢中癌细胞核呈弱阳性表达, 免疫组化染色, 100×

图 3 食管鳞状上皮癌(I 级), 癌巢中核强阳性细胞清晰可见, 阳性细胞主要靠近癌巢周边, 癌巢中央细胞, 弱阳性或不着色, Rb 免疫组化染色, 100×

图 4 食管鳞状上皮癌(II 级), 癌巢中大量 Rb 阳性细胞, 阳性部位位于核内, 免疫组化染色, 100×

Fig. 1 Esophageal squamous cell carcinoma (grade II). P16 positive reactivity can be seen in the cytoplasm of tumor cells. Immunohistochemical staining. 100×

Fig. 2 Esophageal squamous cell carcinoma (grade II). P16 shows weak reactivity in the nucleus of tumor cells. Immunohistochemical staining. 100×

Fig. 3 Esophageal squamous cell carcinoma (grade I). Extensive nuclear positive cells present in the nest clearly. Positive cells are mainly locate near the boundary of nest while cells in the center show weak reactivity. Rb immunohistochemical staining. 100×

Fig. 4 Esophageal squamous cell carcinoma (grade II). A large amount of Rb positive cells can be seen in nests. The positive reactivity was located in nucleus. Immunohistochemical staining. 100×