

uPA、PAI-1 的表达和 MVD 计数与浸润性乳腺癌侵袭性的关系

陈旭伟¹ 孙 伟^{2△} 崔世义¹

(1 潍坊医学院 山东 潍坊 261053 2 潍坊医学院附属医院普通外科 山东 潍坊 261031)

摘要 目的:探讨尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)的表达和血管形成与浸润性乳腺癌侵袭性的关系。**方法:**应用免疫组化 SP 法检测 80 例浸润性乳腺癌、20 例良性乳腺肿瘤组织中 uPA、PAI-1 的表达情况并进行微血管计数。结果:uPA 和 PAI-1 在浸润性乳腺癌组的阳性表达显著高于良性肿瘤组,且其高表达率与乳腺癌的临床病理参数密切相关($P<0.05$)。微血管计数在乳腺癌组和良性肿瘤组分别为 30.87 ± 7.64 、 20.28 ± 8.72 , 两组比较有显著性差异($P<0.01$)。uPA 与 PAI-1 在浸润性乳腺癌中的表达呈正相关($P<0.05$)。结论:uPA、PAI-1 的高表达与浸润性乳腺癌的浸润、转移相关,uPA、PAI-1 的高表达和 MVD 计数可作为评价浸润性乳腺癌侵袭性、评估预后和确定治疗方案的生物学指标。

关键词:尿激酶型纤溶酶原激活因子,尿激酶型纤溶酶原激活物抑制因子,乳腺癌,侵袭性,免疫组化

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)12-2307-03

Relationship Between Expression of uPA ,PAI-1 and Microvessel Density and Invasiveness of Primary Invasive Breast Cancer

CHEN Xu-wei¹, SUN Wei^{2△}, CUI Shi-yi¹

(1 Department of postgraduate, Weifang Medical College; 2 Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College Weifang, Shandong, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of uPA (urokinase plasminogen activator)、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1) and angiogenesis in breast cancer and their relationship with the invasiveness of breast cancer. **Methods:** Eighty surgically resected breast cancer samples and twenty breast benign tumor samples were selected. S-P immunostaining technique was used to detect the expression of uPA、PAI-1 and MVD in all of the tissues. **Results:** The positive expression rates of uPA、PAI-1 in breast cancer was significantly higher than that in the breast benign tumors, and their high expression rates were related with the clinical pathology parameters of the breast cancer ($P<0.05$). MVD were respectively 30.87 ± 7.64 , 20.28 ± 8.72 in breast cancer and breast benign tumor group. There was significantly difference between the two groups ($P<0.01$). There were positive correlations between the level of uPA and PAI-1 in breast cancer ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of uPA and PAI-1 correlated with the invasiveness and metastasis of breast cancer, and they could be used as biological indicators that evaluate the invasiveness and metastasis, estimate prognosis and determine treatment of primary invasive breast cancer.

Key words: Urokinase plasminogen activator(uPA) ; Plasminogen activator inhibitor(PAI-1) ; Breast cancer ; Invasiveness ; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)12-2307-03

前言

浸润和转移是恶性肿瘤细胞的主要生物学特性,也是引起肿瘤患者治疗失败和死亡的主要原因之一,而细胞外基质(ECM)的降解和新生血管的生成是肿瘤细胞浸润转移的基础。在浸润转移过程中,蛋白水解酶对细胞外基质的降解最为关键。研究发现,尿激酶性纤溶酶原激活剂(uPA)及纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)在多种实体肿瘤的血管化、生长、侵袭中发挥着重要作用。本实验通过 S-P 免疫组化法检测乳腺癌组织中 uPA 和 PAI-1 的表达及微血管密度,探讨其与乳腺癌侵袭性的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集潍坊医学院附属医院普外科 2009 年 7 月至 2010 年 12 月 80 例经外科手术切除的浸润性乳腺癌组织标本。年龄 35-72 岁,平均年龄 51.4 岁,绝经前 54 例、绝经后 26 例;肿瘤直径 ≤ 2 cm 组 16 例、 >2 cm 且 ≤ 5 cm 组 52 例、 >5 cm 组 12 例;参照 UICC 2003 年第六版 TNM 分期法,期 7 例,期 38 例,期 29 例,期 6 例;参照 Scarff-Bloom-Richardson 组织学分级法将本组乳腺癌分为三级:级 24 例、级 46 例、级 10 例。淋巴结无转移 32 例、转移 1~3 枚 30 例、转移 >3 枚 18 例;ER 表达 (-)28 例、(+)52 例;PR 表达 (-)32 例、(+)48 例; c-erbB2 低表达 49 例、过表达 31 例。另取我院同期 20 例良性乳腺疾病手术切除标本作对照,其中乳腺小叶增生 12 例,乳腺纤维腺瘤 8 例。

作者简介:陈旭伟(1984-)男,硕士研究生,主要研究方向:普通外科学,电话:15965788683, E-mail: chenxuwei1030@163.com

△通讯作者:孙伟,普外科主任,主任医师,教授。

(收稿日期:2011-01-06 接受日期:2011-01-30)

1.2 试剂与方法

兔抗人 uPA 多克隆抗体、兔抗人 PAI-1 多克隆抗体和兔抗人 CD105 均购于武汉博士德生物工程有限公司。免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 底物显色剂均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组织化学染色采用 SP 法,按试剂盒所附操作程序进行 uPA、PAI-1 和 CD105 免疫组化染色并于显微镜下观察结果和进行微血管计数。

1.3 结果判断标准

免疫组化结果判断标准 uPA 和 PAI-1 均为细胞质和(或)细胞膜着色,综合分析整张切片的阳性细胞率及染色强度,将免疫组化染色结果分为 4 级:阳性细胞数少于 25%,染色较淡,未见明显颗粒者定为阴性,标记为“-”;阳性细胞数大于等于 25%而小于 50%,染色淡,可见稀疏颗粒者定为弱阳性,标记为“+”;阳性细胞数大于等于 50%而小于 75%,染色棕黄,可见到颗粒者定为中度阳性,标记为“++”;阳性细胞数大于等于 75%,染色棕褐,可见到弥漫性颗粒者定为强阳性,标记为“+++”。

“-”为阴性表达,“+”、“++”与“+++”为阳性表达,“-”与“+”为低表达组,“++”与“+++”为高表达组。

MVD 结果判断标准:采用 Weidner 等^[1]报告的技术,记数 5 个 200 倍镜视野下的血管数目,取记数的平均值。

1.4 统计方法

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理,计数资料的比较采用 t 检验、 χ^2 检验,趋势分析采用 Cochran-Armitage 趋势检验,相关资料分析采用 Spearman 等级相关分析法。

2 结果

2.1 uPA、PAI-1 的表达情况

uPA、PAI-1 阳性染色主要定位于肿瘤细胞的细胞质和(或)细胞膜。uPA 在乳腺癌、良性肿瘤中的阳性表达率分别为 85%(68/80)和 10%(2/20),其差异具有统计学意义($P<0.01$); PAI-1 在乳腺癌、良性肿瘤中的阳性表达率分别为 65%(52/80)和 10%(2/20),其差异具有统计学意义($P<0.01$)。微血管记数 MVD 在乳腺癌、良性肿瘤中分别为 30.87 ± 7.64 、 20.28 ± 8.72 ,两组比较差异有统计学意义($t=5.3886$, $P<0.01$)。

2.2 浸润性乳腺癌组织中 uPA 和 PAI-1 的高表达及其与临床病理参数的关系

浸润性乳腺癌组织中 uPA 的高表达率为 32.50%(26/80), PAI-1 的高表达率为 28.75%(23/80)。uPA、PAI-1 的高表达率与患者的年龄、绝经情况均无明显相关性($P>0.05$)。uPA 的高表达率随肿瘤的增大而增高($P=0.0008$),随组织学分级的增高而增高($P=0.0007$),随临床分期的增高而增高($P=0.0016$),随淋巴结转移数目的增加而增高($P=0.0084$);ER(+)和 ER(-)乳腺癌 uPA 的高表达率分别为 19.2%和 57.1%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=11.9245$, $P=0.0006$);PR(+)和 PR(-)乳腺癌 uPA 的高表达率分别为 23.0%和 46.9%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=5.0237$, $P=0.025$);c-erbB2 低表达和 c-erbB2 过表达乳腺癌 uPA 的高表达率分别为 16.3%和 58.1%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=15.078$, $P=0.0001$)。PAI-1 的高表达率随肿瘤的增大而增高($P=0.0027$),随组织学分级的增高而增高($P=0.$

0119),随临床分期的增高而增高($P=0.0071$);与淋巴结转移数目无明显相关性($P=0.9815$);ER(+)和 ER(-)乳腺癌 PAI-1 的高表达率分别为 15.4%和 53.6%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=12.9561$, $P=0.0003$);PR(+)和 PR(-)乳腺癌 PAI-1 的高表达率分别为 14.6%和 50%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=11.7569$, $P=0.0006$);c-erbB2 低表达和 c-erbB2 过表达乳腺癌 uPA 的高表达率分别为 16.3%和 48.3%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=9.5277$, $P=0.0020$)。

2.3 乳腺癌患者癌组织中 uPA、PAI-1 蛋白表达的关系

经 Spearman 等级相关分析,乳腺癌患者癌组织中 uPA 与 PAI-1 的表达呈正相关($r=0.4554$, $P<0.01$)。

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭、转移是一个复杂的过程,瘤细胞在浸润和转移过程中必需穿透一系列天然组织屏障-基底膜和细胞外基质。目前所知参与这一穿透作用的主要是蛋白水解酶类。现已发现与恶性肿瘤侵袭和转移相关的蛋白水解酶类有 4 种,尿激酶型纤溶酶原激活物系统(uPAs)是其中重要的一种,在乳腺癌、胃癌、结直肠癌、口腔癌^[2]等许多种恶性肿瘤的进展中发挥着重要作用。肿瘤对细胞外基质的浸润可分为 3 个步骤:①瘤细胞通过其表面的特异性受体黏附到基质成分上;②瘤细胞分泌相关的蛋白酶对基质成分进行局限性降解;③肿瘤细胞移入被蛋白酶水解后的基质区。这三个步骤反复作用导致肿瘤细胞持续向外浸润。uPA 是一种丝氨酸蛋白水解酶,是体内生理和病理条件下,通过降解细胞外基质、介导细胞转移的主要酶系。通常情况下,μPA 以无活性的单链形式尿激酶前体(pro-uPA)从细胞中释放出来,前体 uPA 与肿瘤细胞膜上特异性受体 uPAR 结合后被激活,活性 uPA 能将纤溶酶原激活成纤溶酶,后者通过直接作用或活化潜在胶原酶而对基底膜和细胞外基质成分起降解作用^[3],μPA 自身也能直接其蛋白水解作用^[4]降解基底膜和细胞外基质成分,从而导致肿瘤细胞发生浸润和转移。此外,μPA 似乎还可以调节多种细胞功能和细胞内的信号传导^[5]。PAI-1 是一种蛋白酶抑制物,它可通过与 uPA 形成牢固的复合物来抑制 uPA。有学者认为 PAI-1 对肿瘤的血管生成是必要的,PAI-1 可能参与血管生成的调节^[6]。B.MARKL 等通过研究 PAI-1 与结肠癌侵袭行为之间的关系发现,高水平的 PAI-1 能够增加结肠癌细胞血性转移的风险^[7]。肖继平等^[7]认为 PAI-1 对预后估计的价值随着时间的推移会逐渐增大,PAI-1 对评价淋巴结阴性的乳腺癌患者预后有很大的价值。最近的研究还发现 PAI-1 有抑制细胞程序化死亡(PCD)的能力,可以保护肿瘤细胞免受细胞凋亡机制的影响^[8]。此外,PAI-1 在肿瘤中的表达,可以防止瘤组织自身及基质的降解,起到保护肿瘤、维持胞外蛋白降解平衡的作用^[9]。与其他实体瘤一样,血管的生成是乳腺癌细胞成长、浸润的前提。肿瘤组织内的血管密度可以反映肿瘤诱导血管生成的能力,从而在一定程度上反映肿瘤的生物学行为。

本实验通过检测 uPA、PAI-1 发现其在浸润性乳腺癌中的阳性表达明显高于其在乳腺良性肿瘤中的表达,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。uPA 的高表达率与乳腺癌肿块大小、临床分期、组织学分级、转移淋巴结及雌孕激素受体和 c-erbB2 显

著相关, PAI-1 的高表达率与乳腺癌肿块大小、临床分期、组织学分级及雌孕激素受体和 c-erbB2 显著相关。与 uPA 不同, PAI-1 高表达率并不随浸润淋巴结数目的增加而增高。PAI-1 不但对淋巴结阳性的乳腺癌患者具有很高的预测价值, 对淋巴结阴性的乳腺癌患者同样具有重要的预测价值, 这与 Françoise Descotes 等^[10]的结论基本一致。uPA 高表达者, 其 TNM 分期较晚, 更易出现淋巴结转移。显示 uPA/PAI-1 与乳腺癌的浸润转移存在相关性, uPA/PAI-1 有促进肿瘤侵袭转移能力这一生物学行为。以上均说明 uPA/PAI-1 通过破坏基底膜成分, 促进瘤细胞突破基底膜向周围组织浸润, 参与了乳腺癌的转移过程。乳腺癌组 MVD 明显高于良性肿瘤组, MVD 记数在恶性和良性组分别为 30.87 ± 7.64 、 20.28 ± 8.72 , 两组比较有显著性差异($t=5.3886$, $P<0.05$)。经 Spearman 等级相关分析, 乳腺癌组中 uPA 与 PAI-1 的表达呈正相关, 这与 Duffy, M. J.^[11], Weigelt, B.^[12]的结论相似, 提示 uPA 与 PAI-1 在乳腺癌的发生、瘤细胞的分化及浸润、转移行为中可能起协同作用。

2007 年美国临床肿瘤学会(ASCO)乳腺癌肿瘤标记指南推荐新增 uPA 和 PAI-1 作为评估淋巴结阴性乳腺癌患者预后和是否应用辅助化疗的生物学指标^[13]。uPA、PAI-1 和 MVD 可作为反映乳腺癌病理生物学行为的指标, 检测乳腺癌组织中 uPA、PAI-1 的表达和 MVD 记数, 有利于临床医生了解肿瘤的侵袭性、判断肿瘤的发展程度, 对指导术后辅助治疗及预测肿瘤的复发具有重要意义。随着技术的进步, 其检测方法更加简单易行, Harbeck N 等发现通过 ELISA 法检测 uPA 和 PAI-1 的水平并进行定量分析, 对原发性乳腺癌患者的预后具有很高的预测价值^[14,15]。此外, 它们还可作为肿瘤治疗的新的分子靶点^[16], 为肿瘤的生物学治疗提供崭新的思路和途径。

参考文献(References)

[1] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl cancer Inst, 1992, 84: 1875-1887

[2] 金晓明, 李雅馨, 李金荣, 等. 基质降解酶 u-PA、PAI-1 与人口腔鳞状细胞癌细胞侵袭转移的相关性研究 [J]. 现代口腔医学杂志, 2003, 17(5): 398-400

JIN Xiao-ming, LI Ya-xin, LI Jin-rong, et al. The correlation between the expression of matrix degrading enzymes u-PA, PAI-1 and invasion and metastasis of human oral squamous cell carcinoma [J]. Journal of Modern Stomatology, 2003, 17(5): 398-400

[3] Macchione E, Epifano O, Stefanini M, et al. Urokinase redistribution from the secreted to cell-bound fraction in granulosa cells of rat preovulatory follicles[J]. Biol Reprod, 2000, 62 (4): 895-897

[4] Han, B., Nakamura, M., Mori, I., Nakamura, Y. and Kakudo, K. Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer [J]. Oncol, 2005, 14: 105-112

[5] Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: Role in malignancy [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10: 39-49

[6] Sandstrom M, Johansson M, Sandstrom J, et al. Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression [J]. Int J Dev Neurosci, 1999, 17 (5): 473-481

[7] B. Markl, Prof. I. Renk, D. V. Oruzio, et al. Tumour Budding, uPA and PAI-1 Are Associated With Aggressive Behaviour in Colon Cancer [J]. Journal of Surgical Oncology, 2010, 102: 235-241

[8] 肖继平, 於席芳, 徐翠琼, 等. 腋淋巴结阴性乳腺癌 uPA 表达的临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(3): 188

XIAO Ji-ping, YU Xin-fang, XU Cui-qiong, et al. The clinical significance of uPA expression in axillary lymph node-negative breast cancer [J]. Chin J Oncol, 2004, 26(3): 188

[9] Lademann UA, Romer MU. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). [J] Thromb Haemost, 2008, 100: 1041-1046

[10] Françoise Descotes, Benjamin Riche, Simone Saez, et al. Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 is the Most Significant of the Usual Tissue Prognostic Factors in Node-Negative Breast Ductal Adenocarcinoma Independent of Urokinase-Type Plasminogen Activator [J]. Clinical Breast Cancer, 2008, 8(2): 168-177

[11] Duffy, M. J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy [J]. Curr. Pharm Des, 2004, 10: 3949

[12] Weigelt B, Peterse, J. L. and van't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models [J]. Nat. Rev. Cancer, 2005, 5: 591-602

[13] Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(33): 5287-5312

[14] Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer [J]. Clin Breast Cancer, 2004, 5: 348-352

[15] Schmitt M, Sturmheit AS, Welk A, et al. Procedures for the quantitative protein determination of urokinase and its inhibitor, PAI-1, in human breast cancer tissue extracts by ELISA [J]. Methods Mol Med, 2006, 120: 245-265

[16] Dass K, Ahmad A, Azmi AS, et al. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers [J]. Cancer Treat Rev, 2008, 34: 122-136