

尿激酶纤溶酶原激活物和基质金属蛋白酶-9在结直肠癌中表达及意义

Expressions of Urokinase-type Plasminogen Activator and Matrix Metalloproteinase-9 in Colorectal Cancer and Their Clinical Significance

MAO Xiao-wei, WANG Shao-cheng, ZHENG Hong-rong

毛晓伟¹, 王绍臣², 郑洪荣¹

(1. 衢州市柯城区人民医院, 浙江 衢州 324000;

2. 杭州师范大学附属医院, 浙江 杭州 310015)

摘要: [目的] 研究尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在大肠癌中的表达及其意义。[方法] 应用免疫组化 SP 法检测大肠癌术后标本中 uPA、MMP-9 蛋白的表达情况, 并分析不同病理特征间的 uPA、MMP-9 蛋白的表达情况。[结果] 在 75 例大肠癌中, uPA 阳性表达率为 28.0%(21/75)。uPA 阳性表达率与肿瘤大小相关, 肿瘤>4cm 者 uPA 阳性率为 42.3%(11/26); 而肿瘤≤4cm 者 uPA 阳性率为 20.4%(10/49)($\chi^2=4.041$, $P=0.044$)。MMP-9 阳性表达率为 33.3%(25/75)。肿瘤>4cm 者 MMP-9 阳性率为 50.0%(13/26); 而肿瘤≤4cm 者 MMP-9 阳性率为 24.5%(12/49)($\chi^2=4.974$, $P=0.026$)。[结论] uPA 和 MMP-9 共同促进了肿瘤的发生发展及侵袭和转移。联合检测 MMP-9、uPA 的表达情况对于评估大肠癌的发展及预后具有重要意义。

主题词: 结直肠肿瘤; 尿激酶纤溶酶原激活物; 基质金属蛋白酶; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)01-0046-04

大肠癌是常见的消化道肿瘤之一。中国肿瘤登记地区 2008 年结直肠癌的发病率为 31.39/10 万, 死亡率为 14.82/10 万^[1]。尿激酶纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)可激活纤溶酶原为纤溶酶, 后者可催化降解细胞外基质, 而且活性纤溶酶还能激活基质金属蛋白酶的前体。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)可降解细胞外基质、参与新生血管形成及调节细胞黏附。研究表明 uPA 系统可能通过多种途径对消化道肿瘤的血管生成、侵袭转移等进行调节, 与单核细胞激活抗原、基质金属蛋白酶(MMP)的产生有关^[2]。本研究应用免疫组化法检测大肠癌中的 uPA、MMP-9 蛋白表达情况, 探讨 uPA、MMP-9 在大肠癌中表达和临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取衢州市柯城区人民医院 2007~2011 年经病

收稿日期: 2012-09-10; 修回日期: 2012-10-29

理学证实为结直肠癌的手术标本 75 例, 年龄 32~78 岁, 平均年龄(59.13±10.72)岁; 男性 37 例, 女性 38 例; 肿瘤部位: 直肠 53 例, 结肠 22 例。病理类型均为腺癌, 分化程度: 低分化 17 例, 中分化 54 例, 高分化 4 例。所有患者术前均未行放疗、化疗及其他针对肿瘤的治疗。术后 TNM 分期: T₁ 期 5 例, T₂ 期 7 例, T₃ 期 28 例, T₄ 期 35 例; N₀ 期 31 例, N₁ 期 27 例, N₂ 期 17 例; M₀ 期 66 例, M₁ 期 9 例。

1.2 uPA 和 MMP-9 检测方法

试剂和方法: 兔抗人 uPA 抗体购于武汉博士德公司。鼠抗人 MMP-9 单抗、SP 试剂盒、DAB 显色剂均购于福州迈新公司。

标本经甲醛固定, 石蜡包埋, 4μm 连续切片, 用于免疫组化染色。免疫组化染色采用 SP 法, 按试剂盒操作程序进行。主要步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水, 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)微波抗原修复, 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 室温 20min, 血清封闭 30min, 一抗 4℃过夜, DAB 显色, 苏木素复染。常规脱水、透明、中性树胶封片。分别设立阳性对照和阴性对照, 以正常结直肠黏膜和淋巴细胞为阳性对照,

阴性对照用 PBS 代替一抗。

结果判定标准:MMP-9、uPA 蛋白阳性表达均为棕黄色颗粒,定位于细胞浆。光镜下取 10 个高倍镜视野,阳性细胞数占整个观察细胞的百分率<10%为阴性,阳性细胞占 10%以上为阳性^[3]。阳性率=阳性例数/总观察例数×100%。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS13.0 软件,不同临床病理特征间 uPA 和 MMP-9 阳性率比较采用 χ^2 检验,uPA 和 MMP-9 表达的相关性分析采用 Spearman 相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 uPA 在大肠癌中的表达及其与临床病理特征间的关系

在 75 例大肠癌中,uPA 阳性表达 21 例,阳性表达率为 28.0%(21/75)。uPA 阳性表达与大肠癌临床病理特征间的关系显示 uPA 阳性表达与年龄、肿瘤部位、T 分期和分化程度均无关(Table 1)。

N₁ 患者的 uPA 阳性表达率较高,为 44.4%(12/27),N₂ 患者的 uPA 阳性表达率为 23.5%(4/17);而无淋巴结转移患者的 uPA 阳性表达为 16.1%(5/31),但差异无统计学意义($\chi^2=5.947, P=0.051$)。

uPA 阳性表达与肿瘤大小相关。肿瘤>4cm 者的 uPA 阳性表达率为 42.3%(11/26);而肿瘤≤4cm 者患者的 uPA 阳性表达为 20.4%(10/49),差异有统计学意义($\chi^2=4.041, P=0.044$)。

2.2 MMP-9 在大肠癌中的表达及其与临床病理特征间的关系

在 75 例大肠癌中,MMP-9 阳性表达 25 例,阳性表达率为 33.3%(25/75)。MMP-9 阳性表达与肠癌临床病理特征间的关系显示,MMP-9 阳性表达与性别、年龄、肿瘤部位、TNM 分期均无关(Table 2)。

MMP-9 阳性表达与肿瘤大小相关,肿瘤>4cm 者的 MMP-9 阳性表达率为 50.0%(13/26);而肿瘤≤4cm 者的 MMP-9 阳性表达为 24.5%(12/49),差异有统计学意义($\chi^2=4.974, P=0.026$)。不同肿瘤分化程度的患者 MMP-9 阳性表达率不同,高、中、低分化 MMP-9 阳性表达率依次降低,分别为 75.0%、35.2%和 17.6%,但差异无统计学意义($\chi^2=5.091, P=0.078$)。

2.3 uPA 和 MMP-9 在大肠癌中表达的相关性

在 75 例大肠癌中,uPA 和 MMP-9 共阳性表达例数为 14 例,阳性表达率为 18.7%;共阴性表达率为 57.33%(43/75)。uPA 和 MMP-9 表达呈正相关(Table 3),Spearman 相关系数为 0.581, $P<0.001$ 。uPA 和 MMP-9 表达一致性经 Kappa 一致性检验, $\kappa=0.438, P<0.001$ 。

Table 1 Expression of uPA in colorectal cancer with various clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristics	n	uPA			χ^2	P
		Negative case	Positive case	Positive rate(%)		
Gender						
Male	37	31	6	16.2	5.030	0.025
Female	38	23	15	39.5		
Age(years)						
≥50	61	43	18	29.5	0.369	0.544
<50	14	11	3	31.4		
Site						
Rectum	53	39	14	26.4	0.225	0.635
Colon	22	15	7	31.8		
Size of tumor(cm)						
≤4	49	39	10	20.4	4.041	0.044
>4	26	15	11	42.3		
T stage						
T ₁	5	4	1	20.0	1.511	0.680
T ₂	7	5	2	28.6		
T ₃	28	1	10	35.7		
T ₄	35	27	8	22.9		
N stage						
N ₀	31	26	5	16.1	5.957	0.051
N ₁	27	15	12	44.4		
N ₂	17	13	4	23.5		
M stage						
M ₀	66	48	18	27.3	0.144	0.704
M ₁	9	6	3	33.3		
Differentiation degree						
Well differentiation	4	3	1	25.0	1.246	0.536
Moderate differentiation	54	37	17	31.5		
Poor differentiation	17	14	3	17.6		

Table 2 Expression of MMP-9 in colorectal cancer with various clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristics	n	MMP-9			χ^2	P
		Negative case	Positive case	Positive rate(%)		
Gender						
Male	37	27	10	27.0	1.307	0.253
Female	38	23	15	39.5		
Age(years)						
≥50	61	42	19	31.1	0.703	0.402
<50	14	8	6	42.9		
Site						
Rectum	53	37	16	30.2	0.804	0.370
Colon	22	13	9	40.9		
Size of tumor(cm)						
≤4	49	37	12	24.5	4.974	0.026
>4	26	13	13	50.0		
T stage						
T ₁	5	3	2	40.0	0.300	0.960
T ₂	7	5	2	28.6		
T ₃	28	18	10	35.7		
T ₄	35	24	11	31.4		
N stage						
N ₀	31	21	10	32.3	0.300	0.861
N ₁	27	17	10	37.0		
N ₂	17	12	5	29.4		
M stage						
M ₀	66	44	22	33.3	0.000	1.000
M ₁	9	6	3	33.3		
Differentiation degree						
Well differentiation	4	1	3	75.0	5.091	0.078
Moderate differentiation	54	35	19	35.2		
Poor differentiation	17	14	3	17.6		

Table 3 Correlation of expressions of uPA and MMP-9

uPA	MMP-9		Total
	-	+	
-	43	11	54
+	7	14	21
Total	50	25	75

3 讨论

肿瘤侵袭与转移是一个多因素相互依赖的多步骤的复杂过程，其中需要相关的肿瘤蛋白水解酶的表达，其中一种重要的蛋白水解酶就是尿激酶。研究表明，uPA 系统在细胞外基质的降解过程中发挥重要作用。uPA 是一种丝氨酸蛋白酶，由多种肿瘤细胞或其他细胞分泌，通过与细胞膜上的特异性受体

结合后，激活纤溶酶原变成纤溶酶，直接降解大多数的细胞外基质，并激活金属蛋白酶，间接参与细胞外基质成分的降解作用，并通过降解细胞外基质促进肿瘤新血管生成^[4]。

研究发现 uPA 系统与胃癌^[5]、肝癌^[6]、胰腺癌^[7]的形成、转移及侵袭密切相关。李竹林等^[8]应用免疫组化 SP 法、Western blot 方法检测 uPA 在结肠癌组织和正常组织中的表达，uPA 在结肠癌组织和正常组织中均有表达，并且在肿瘤组织中的表达率明显高于正常组织(P<0.01)。在结肠癌组织中，uPA 表达率与结肠癌 Dukes 分期、分化程度、淋巴结转移及远处转移密切相关，uPA 表达率在 Dukes C、D 期明显高于 A、B 期 (P<0.01)，在有淋巴结转移组和远处转移组的表达也高于相应无转移组 (P<0.05)。Halamkova 等^[9]分析 80 例结直肠癌治疗前的 uPA、uPAR 水平，在晚期结直肠癌中 uPA、uPAR 表达水平与肿瘤分级有关，且与预后相关 (P=0.019)。本研究发现在 75 例大肠癌中，uPA 阳性表达率为 28.0% (21/75)，uPA 阳性表达率与年龄、肿瘤部位、T 分期和分化程度均无关。但与

肿瘤大小相关。肿瘤>4cm 者的 uPA 阳性表达率 (42.3%) 高于肿瘤≤4cm 者患者 (20.4%)，差异有统计学意义 ($\chi^2=4.041$, P=0.044)。可见，uPA 在大肠癌的发生发展及浸润转移过程中发挥重要作用，可作为一个反映大肠癌侵袭能力的重要检测指标。

MMP-9 可降解细胞外基质、参与肿瘤新生血管形成及调节细胞黏附，在肿瘤的浸润和转移过程中扮演着重要角色。雒洪志等^[10]研究发现在结肠癌组织中的 MMP-9 mRNA 表达水平明显高于正常结肠组织 (P=0.001)，MMP-9 mRNA 表达水平与 Dukes 分期、淋巴结转移及组织学分化程度相关。历春等^[11]应用免疫组化染色法检测 MMP-9 在 66 例大肠癌及 22 例正常大肠组织中的表达情况，结果大肠癌组织 MMP-9 阳性表达率为 75.8%，与正常大肠组织的

91%相比有显著性差异 ($P<0.01$),MMP-9 表达与淋巴结转移显著相关 ($P<0.05$)。王光茂等^[12]采用免疫组化 SP 法检测 60 例结肠癌组织中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 表达情况,并以 25 例正常结肠组织作为对照。结肠癌组织中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的阳性表达率分别为 81.6%、78.3%和 90.0%,高于正常结肠组织中的表达 ($P<0.05$)。结肠癌组织中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 阳性表达与 TNM 分期和淋巴结转移相关 ($P<0.05$)。本文研究发现在 75 例大肠癌中,MMP-9 阳性表达率为 33.3%(25/75)。MMP-9 阳性表达与肿瘤大小相关,肿瘤 $>4\text{cm}$ 者的 MMP-9 阳性表达率为 50.0%,高于肿瘤 $\leq 4\text{cm}$ 者患者的 24.5% ($\chi^2=4.974, P=0.026$)。MMP-9 阳性表达率在高、中、低分化中依次降低,分别为 75.0%、35.2%和 17.6% ($\chi^2=5.091, P=0.078$),此结果与以往报道^[11,12]均不一致,可能与本文的样本数较少有关。

Langenskiöld 等^[13]分析 221 例术前结直肠癌的 uPA 水平,发现 uPA 表达水平与无病生存率相关,但与总生存期无关。Angenete 等^[3]分析免疫组化方法检测 91 例结直肠癌组织中的 uPA 水平,Cox 多因素回归分析显示 uPA/PAI-1 比例与疾病进展有关 ($P<0.01$)。综上所述,MMP-9、uPA 的表达共同促进了大肠癌的发生发展,联合检测 MMP-9、uPA 表达可作为判断大肠癌患者病情的一种依据,具有重要的临床意义。但针对 uPA 系统的干预措施来抑制肿瘤侵袭转移,目前研究并不成熟,也多处于实验研究阶段,还有许多困难和问题需要克服和解决,如 uPA 系统各成分在肿瘤的侵袭转移过程中作用不同,uPA 系统的信号转导途径复杂并存在交叉通路等,肿瘤微环境对肿瘤的生长、转移、血管形成仍有很多地方有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zheng RT, Zhang SW, Wu LY, et al. Report of incidence and mortality from China cancer registries in 2008 [J]. China Cancer, 2012, 21(1):1-12.[郑荣寿,张思维,吴良有,等.中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2012,21(1):1-12.]
- [2] Li ZL, Zhu MC, Dong PJ. Relationship of VEGF-D and uPA with invasion and metastasis of human colon carcinoma[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2008,30(22):2146-2149.[徐冠军,吴建兵.uPA 系统与消化系统肿瘤的研究进展[J].实用医学杂志,2011,27(12):2287-2289.]
- [3] Angenete E, Langenskiöld M, Palmgren I, et al. uPA and PAI-1 in rectal cancer-relationship to radiotherapy and clinical outcome [J]. J Surg Res, 2009, 153(1):46-53.
- [4] Offersen B V, Pfeiffer P, Andreasen P, et al. Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer:relation to prognosis and angiogenesis[J]. Lung Cancer, 2007, 56(1):43-50.
- [5] Yang MD, Lai KC, Lai TY, et al. Phenethyl isothiocyanate inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells through suppressing MAPK and NF-kappaB signal pathways[J]. Anticancer Res, 2010, 30(6):2135-2143
- [6] Alfano D, Votta G, Schulze A, et al. Modulation of cellular migration and survival by c-Myc through the downregulation of urokinase (uPA) and uPA receptor [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(7):1838-1851.
- [7] Hildenbrand R, Niedergethmann M, Marx A, et al. Amplification of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene in ductal pancreatic carcinomas identifies acclinically high-risk group[J]. Am J Pathol, 2009, 174(6):2246-2253.
- [8] Li ZL, Zhu MC, Dong PJ. Relationship of VEGF-D and uPA with invasion and metastasis of human colon carcinoma[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2008,30(22):2146-2149.[李竹林,朱明才,董蒲江.结肠癌中 VEGF-D 和 uPA 的表达与侵袭转移的关系 [J]. 第三军医大学学报,2008,30(22):2146-2149.]
- [9] Halamkova J, Kiss I, Pavlovsky Z, et al. Clinical relevance of uPA, uPAR, PAI 1 and PAI 2 tissue expression and plasma PAI 1 level in colorectal carcinoma patients [J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(112):1918-1925.
- [10] Luo HZ, Huang ZH, Yu YL, et al. Expression of MMP-9 in colon cancer and its clinical significance [J]. Journal of Chinese Oncology, 2009, 15(6):552-555.[雒洪志,黄宗海,余元龙,等. MMP-9 在结肠癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志,2009,15(6):552-555.]
- [11] Li C, Gai XD, Liu XH. Expression and clinical significance of COX-2, MMP-9 and bFGF in colorectal carcinoma[J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2009, 10(1):46-49.[历春,盖晓东,刘晓红.COX-2, MMP-9 和 bFGF 在大肠癌中的表达及临床意义[J]. 北华大学学报(自然科学版),2009,10(1):46-49.]
- [12] Wang GM, Yuan YP, Zhao CX, et al. Expression and significance of MMP-2, MMP-9 and VEGF in colon carcinoma tissues [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2011, 18(16):1267-1269.[王光茂,原银萍,赵翠秀,等. 结肠癌组织 MMP-2 和 MMP-9 及 VEGF 表达临床意义的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(16):1267-1269.]
- [13] Langenskiöld M, Holmdahl L, Angenete E, et al. Differential prognostic impact of uPA and PAI-1 in colon and rectal cancer[J]. Tumour Biol, 2009, 30(4):210-220.