

uPARAP/Endo180 在鼻咽癌中的表达及其意义 *

姜元芹 叶社房 吴艺晖 张其清 林 蓁 郭春华 胡君程
厦门大学生物学工程研究中心 福建省生物医学工程重点实验室
厦门市生物医学工程技术研究中心 (福建省厦门市 361005)

摘要 目的: 探讨尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂相关蛋白(uPAR-associated protein, uPARAP/Endo180)、uPAR和 VEGF 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义。方法: 采用免疫组化 SP 法检测 58 例鼻咽癌组织和 30 例慢性鼻咽炎组织中 uPARAP、uPAR 和 VEGF 蛋白的表达, 分析其与鼻咽癌临床病理特征的关系。结果: 鼻咽癌组织中 uPARAP 的阳性表达见于肿瘤间质的成纤维细胞和巨噬细胞, 定位于胞膜和胞质, 呈棕黄色颗粒状分布; uPAR 阳性染色定位于肿瘤细胞与间质细胞胞浆内; VEGF 阳性染色定位于肿瘤细胞胞浆内。鼻咽癌组织中 uPARAP、uPAR 和 VEGF 的阳性表达率分别为 75.9%、81.0%和 77.6%; 与慢性鼻咽炎比较, uPARAP、uPAR 和 VEGF 在鼻咽癌组织中的阳性表达率有显著性差异 ($P < 0.05$); 鼻咽癌组织中 uPARAP 表达与 uPAR、VEGF 的表达水平呈明显正相关 ($P < 0.05$); uPARAP 在角化型鳞癌、非角化型癌和未分化癌的阳性表达率分别为 42.9%、66.7%和 86.1%。随着肿瘤组织类型分化程度的下降, uPARAP 表达水平有上升趋势 ($P < 0.05$)。不同组织学类型之间进行两两比较发现, uPARAP 的表达也有显著性差异 ($P < 0.05$)。uPARAP 蛋白的表达与鼻咽癌组织病理分级、颈部淋巴结转移、临床分期密切相关 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别等因素无关。结论: uPARAP、uPAR 和 VEGF 在鼻咽癌组织中协同表达对促进鼻咽癌的扩散转移可能起重要作用, 联合检测这些指标有望成为判断鼻咽癌恶性程度和估计患者预后的重要生物学标志。

关键词 尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂相关蛋白 鼻咽癌 免疫组化

Expression of uPARAP/ Endo180 and Its Clinical Significance in Nasopharyngeal Carcinoma

JIANG Yuanqin¹, YE Shefang², WU Yihui², ZHANG Qiqing³, LIN Zhen¹, GUO Chunhua¹, HU Juncheng¹

Corresponding author: ZHANG Qiqing, E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

¹Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

²No.174 PLA Hospital, Xiamen 361003, China

³Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Grant support: Natural Science Foundation of Fujian Province(C0610045)

Objective: To investigate the expression and clinical significance of uPARAP/Endo180 (uPAR-associated protein), urokinase plasminogen activator receptor(uPAR) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in nasopharyngeal carcinoma(NPC). **Methods:** Streptavidin-horseradish peroxidase immunohistochemistry (SP-IHC) method was used to detect the expression of uPARAP, uPAR and VEGF in 58 samples of NPC and 30 samples of chronic nasopharyngitis. **Results:** The positive expression of uPARAP in NPC was mainly confined to mesenchymal cells, including fibroblasts and macrophages. The uPARAP immunoreactivity was found as granulated diffuse cytoplasmic staining, as well as in a pattern suggesting localization on the cell surface. uPAR in NPC tissues was evenly distributed in the cytoplasm of both cancer cells and mesenchymal cells. The expression of VEGF in NPC was mainly seen in the cytoplasm of tumor cells. In the NPC tissues, the expression rate of uPARAP, uPAR and VEGF was 75.9%, 81.0%, and 77.6%, respectively ($P < 0.05$). A significant difference was found in the expression of uPARAP, uPAR and VEGF between NPC tissues and chronic nasopharyngitis tissues. The expression of uPARAP was positively correlated with the expression of uPAR and VEGF in NPC. The positive expression rate of uPARAP was 42.9% in keratinizing NPC, 66.7% in non-keratinizing NPC, and 86.1% in undifferentiated carcinoma. The expression of uPARAP was associated with the differentiation of NPC. The expression of uPARAP was significantly different among different pathological types of NPC ($P < 0.05$). The expression of uPARAP in nasopharyngeal carcinoma was significantly correlated with pathological classification, tumor grade, cervical lymph node metastases and clinical

* 本文课题受福建省自然科学基金资助(编号: C0610045)

中国人民解放军第 174 医院 中国医学科学院/中国协和医科大学生物医学工程研究所

通讯作者: 张其清 zhangqiq@xmu.edu.cn

staging, but not with age or gender. Conclusion: Co-expression of uPARAP, uPAR and VEGF may be important for metastasis of NPC. Combined detection of these proteins may serve as a useful biomarker for evaluating the potential of metastasis and prognosis of NPC.

Keywords uPARAP/Endo180; Nasopharyngeal carcinoma; Immunohistochemistry

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解是肿瘤细胞浸润和转移过程中的重要步骤, 其降解过程需要一系列蛋白酶的参与, 其中尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 及其受体 (urokinase plasminogen activator receptor, uPAR) 起了重要作用。尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂相关蛋白 (uPAR-associated protein, uPARAP/Endo180) 是新近发现的具有丝氨酸蛋白酶活性的巨噬细胞甘露糖受体, 它通过与 uPAR 受体结合调节尿激酶型纤溶酶原激活系统, 激活纤溶酶原活化与纤溶过程, 参与细胞外基质的降解, 在肿瘤的浸润和转移、炎症与血栓形成中具有重要作用^[1,2]。

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方最常见的恶性肿瘤, 其病理特点是易浸润性生长和高转移性, 局部复发和远处转移是鼻咽癌治疗失败的主要原因^[3]。本文采用免疫组化 SP 法对 58 例鼻咽癌组织中的 uPARAP/Endo180 表达进行了研究, 探讨其在鼻咽癌转移中的作用并分析其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

材料来源于中国人民解放军 174 医院病理科 1992 年 9 月~2003 年 8 月经病理检查证实的鼻咽癌组织标本 58 例。所有患者病历资料完整, 术前均未化、放疗和免疫治疗。其中男性 42 例, 女性 16 例; 年龄 17~72 岁, 中位年龄 46.5 岁。按 1991 年 WHO 分类标准: 鼻咽癌分为角化型鳞癌和非角化型癌, 后者又再分为分化型非角化癌和未分化癌; 其中角化型鳞癌 7 例, 分化型非角化癌 15 例, 未分化癌 36 例。对照组随机选取同一时期的慢性鼻咽炎活检标本 30 例, 其中男 17 例, 女 13 例; 平均年龄 45.3 岁。按照 1992 年福州标准对鼻咽癌进行临床分期: I 期 4 例, II 期 11 例, III 期 26 例, IV 期 17 例。

1.2 主要试剂

uPARAP/Endo180 抗体 (鼠抗人单克隆抗体, 美国 Neomarker 公司, clone 2D7), 工作浓度为 1:50; uPAR 抗体 (鼠抗人单克隆抗体, 美国 Santa-cruz 公司, clone BA1687), 工作浓度为 1:50; VEGF 抗体 (鼠抗人单克隆抗体, 美国 Neomarker 公司, JH121), 工作浓度为 1:100; SP 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 方法

标本经 10% 中性甲醛液固定, 常规处理, 石蜡包埋, 连续切片厚 4 μm 。采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (streptavidin-peroxidase, SP) 法: 石蜡切片脱蜡至水; 3% H_2O_2 室温孵育 30min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5min; 微波抗原修复; 10% 正常山羊血清封闭, 室温孵育 15min, 倾去血清, 分别滴加 uPARAP、uPAR 和 VEGF 一抗工作液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 冲洗, 5min \times 3 次; 滴加生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20~30min, PBS 冲洗, 5min \times 3 次; 滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20~30min, PBS 冲洗, 5min \times 3 次; DAB 显色; 自来水充分冲洗、复染、封片。实验同时设阳性和阴性对照组。

1.4 染色结果判断

uPARAP 阳性染色定位于胞膜和胞质 (图 1), uPAR 阳性染色定位于胞浆 (图 2), VEGF 阳性染色定位于胞质 (图 3)。参照 Carcangiu 等^[4]的半定量评分方法, 采用双盲法, 观察切片至少 5 个以上具有代表性的高倍视野, 不少于 1000 个细胞, 对免疫组化结果进行评估。通过光学显微镜观察, 根据标本中棕黄色阳性信号的强弱和阳性细胞比例进行判断: 1) 按阳性细胞百分率计分: 阳性细胞 <10% 计 0 分; 10%~50% 计 1 分; >50% 计 2 分。2) 按染色强弱计分: 淡黄色计 0 分; 黄色计 1 分; 棕黄色计 2 分。两项得分相加 0~1 分为阴性 (-/+); 2~3 分为阳性 (+); 4 分为强阳性 (++)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计分析软件, 计数资料采用卡方检验, 等级资料采用 Spearman 等级相关分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 uPARAP 在鼻咽癌、慢性鼻咽炎中的表达

鼻咽癌组织中 uPARAP 的阳性表达见于肿瘤间质的成纤维细胞和巨噬细胞, 定位于胞膜和胞质, 呈棕黄色颗粒状分布, 肿瘤细胞未见阳性染色 (图 1); uPAR 阳性染色定位于肿瘤细胞与间质细胞胞浆内 (图 2); VEGF 阳性染色定位于肿瘤细胞胞浆内 (图 3)。58 例鼻咽癌组织中 uPARAP、uPAR 和 VEGF 阳性表达分别为 75.9%、81.0% 和 77.6%; 30 例慢性鼻咽炎组织中 uPARAP、uPAR 和 VEGF 表达率分别为 6.7%、8.1% 和 9.7%。由表 1 可见, uPARAP 在两组间的表达有显著性差异 ($P<0.05$)。

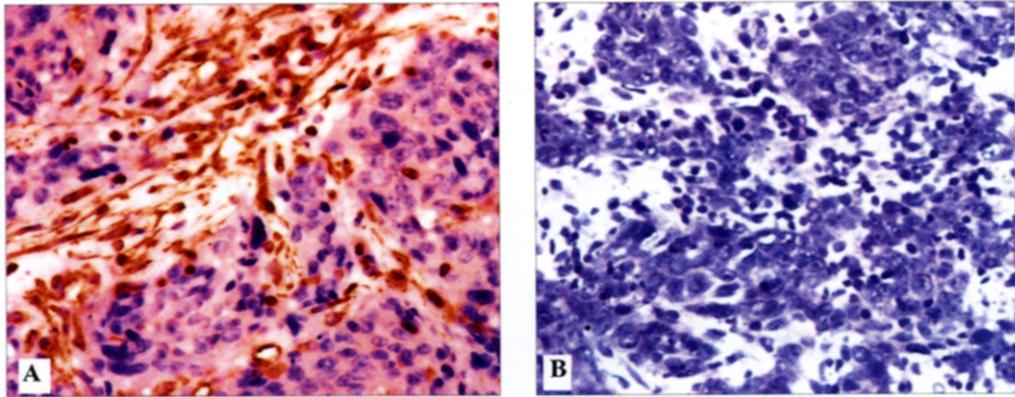


图1 uPARAP在鼻咽部低分化鳞癌间质中的表达(A);阴性对照(B) (SP法×400)

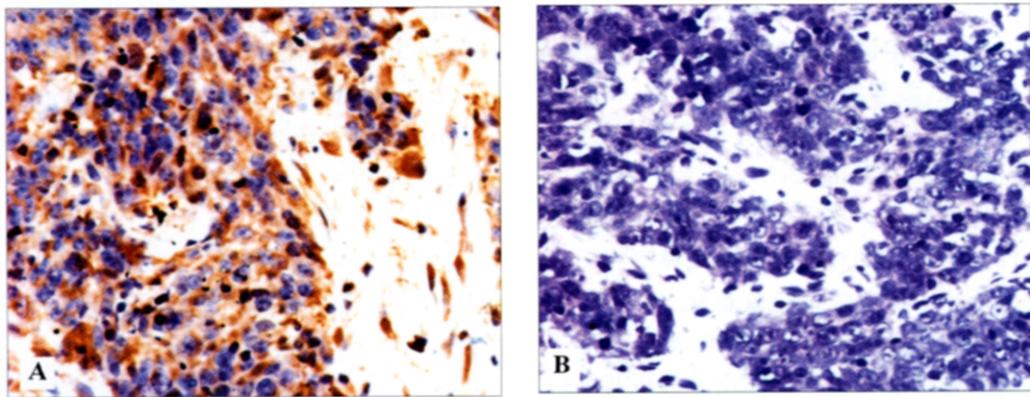


图2 uPAR在鼻咽部低分化鳞癌细胞及间质中的表达(A);阴性对照(B) (SP法×400)

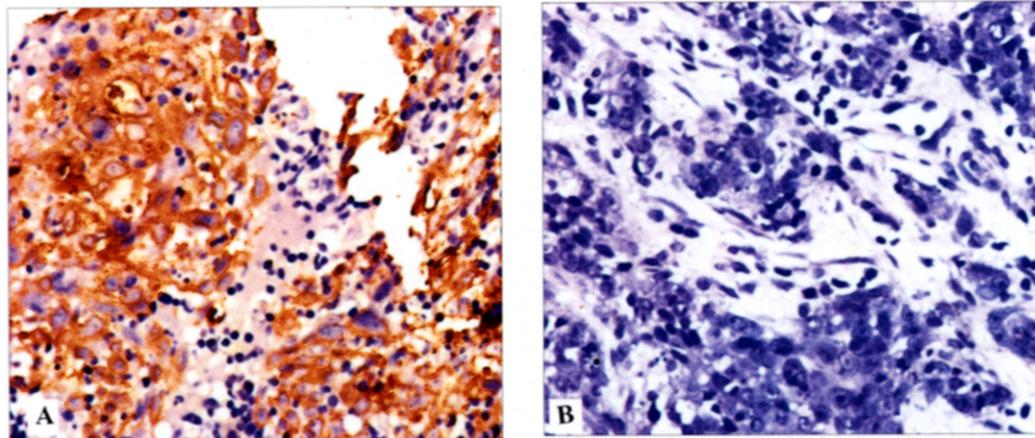


图3 VEGF在鼻咽癌低分化鳞癌细胞中的表达(A);阴性对照(B) (SP法×400)

2.2 uPARAP在不同类型鼻咽癌组织中的表达

uPARAP在角化型鳞癌、分化型非角化癌及未分化癌的表达结果显示(表2),角化型癌、非角化型癌和未分化癌的阳性表达率分别为42.9%、66.7%和86.1%。随着肿瘤组织类型分化程度的下降,uPARAP表达水平有上升趋势($P<0.05$)。不同组织学类型之间进行两两比较发现,uPARAP的表达也有

显著性差异($P<0.05$)。

表1 uPARAP在鼻咽癌、慢性鼻咽炎中的表达 例

组织类型	例数	uPARAP的表达强度			P值
		-/+	+	++	
鼻咽癌	58	14	13	31	<0.05
慢性鼻咽炎	30	28	2	0	

表2 uPARAP 在不同类型鼻咽癌组织中的表达

病理类型	例数	uPARAP 的表达强度			P 值
		-/+	+	++	
角化型鳞癌	7	4	1	2	<0.05
分化型非角化癌	15	5	3	7	
未分化癌	36	5	9	22	

2.3 鼻咽癌组织中 uPARAP、uPAR 和 VEGF 表达的相关性

将 uPARAP、uPAR 和 VEGF 蛋白在鼻咽癌组织中表达水平进行 Spearman 等级相关统计学分析结果发现, uPARAP 的表达水平分别与 uPAR 和 VEGF 存在显著性正相关, 当 uPARAP 表达水平较高时, uPAR 或 VEGF 的表达水平也增高 ($r=0.415, P<0.05$; $r=0.460, P<0.05$), (表 3)。

表3 鼻咽癌组织中 uPARAP、uPAR 和 VEGF 表达的相关性 例

uPARAP 的表达	uPAR 的表达			P 值	VEGF 的表达			P 值
	-/+	+	++		-/+	+	++	
-/+	3	2	9	<0.05	3	4	7	<0.05
+	3	4	6		2	4	7	
++	5	12	14		8	10	13	

2.4 鼻咽癌组织中 uPARAP 表达与临床病理特征的关系

从表 4 中可见, 无颈部淋巴结转移的鼻咽癌组织中 uPARAP 的表达率为 62.5%(15/24), 有颈部淋巴结转移的鼻咽癌组织中 uPARAP 的表达率为 85.3%(29/34), 两组比较差异有显著性意义 ($P<0.05$); 早期(+)鼻咽癌组织中 uPARAP 表达率为 60.0%(9/15), 晚期(+)为 81.4%(35/43), 两组比较差异有显著性意义 ($P<0.05$)。uPARAP 阳性表达与鼻咽癌患者的年龄, 性别无关。

表4 鼻咽癌组织中 uPARAP 表达与临床病理特征的关系

项目	例数	uPARAP			P 值
		-/+	+	++	
总例数	58	14	13	31	
性别					>0.05
男	42	10	10	22	
女	16	4	3	9	
年龄(岁)					>0.05
50	45	11	10	24	
>50	13	3	3	7	
淋巴结转移					<0.05
无	24	9	5	10	
有	34	5	8	21	
分期					<0.05
+	15	6	4	5	
+	43	8	9	26	

3 讨论

uPARAP 是最近发现的一种可与胶原蛋白结合的 uPAR 相关蛋白, 研究证实, uPARAP 与内吞受体 Endo180 是同一种蛋白^[1,2], 属于巨噬细胞甘露糖受体家族蛋白成员, 具有丝氨酸蛋白酶活性, 能参与细胞外基质降解与组织重建, 在促进肿瘤细胞的侵袭和转移过程中发挥重要作用^[5]。

Sulek 等^[6]研究了 uPARAP 在头颈部鳞癌组织中的表达情况发现, 与肿瘤邻近或正常组织相比 uPARAP 在肿瘤间质中的表达水平增高, 尤其以低分化鳞癌的表达强度最为显著。Schnack 等^[7]研究表明, 乳腺间质组织中纤维母细胞 uPARAP 的表达增高, 还发现 uPARAP 在肌上皮细胞呈异位阳性表达。他认为, uPARAP 的表达分布特点与肌上皮细胞基膜的溶解和基质成分的降解有关, 可能对促进乳腺恶性上皮细胞侵袭周围组织有重要作用。本研究结果显示, uPARAP 在鼻咽癌组织中的阳性表达率明显高于慢性鼻咽炎组织, 阳性细胞多限于鼻咽癌组织中的间质细胞, 如成纤维细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞等, 而鼻咽癌实质细胞中 uPARAP 未见阳性表达, 这些研究结果与文献报道^[6,7]的多种肿瘤组织中的 uPARAP 表达分布的结果一致。

尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)与其细胞表面特异性受体(uPAR)相结合, 催化纤溶酶原转化为纤溶酶降解细胞外基质在恶性肿瘤的侵袭和转移过程中起重要作用^[8,9]; 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作用能刺激血管内皮细胞有丝分裂, 促进肿瘤新生血管和肿瘤生长、增加血管的通透性, 为肿瘤进一步侵袭转移创造了条件^[10,11]。大量研究表明, uPAR、VEGF 的过量表达与乳腺癌、胃癌、食管癌、肠癌等许多肿瘤的发生发展、侵袭及转移密切相关^[12]。本实验结果显示, 鼻咽癌组织中 uPAR、VEGF 的表达分布特点及表达水平与前人报道的结果一致; uPAR、VEGF 的表达与鼻咽癌淋巴结转移密切相关。本文对鼻咽癌中 uPARAP 的表达与 uPAR、VEGF 表达相关性的研究表明, 在鼻咽癌组织中随着 uPARAP 表达的增加, uPAR 与 VEGF 的表达呈上升的趋势, uPARAP 的表达与 uPAR、VEGF 的表达呈密切正相关。由于 uPARAP 是 uPAR 功能调节的重要结合蛋白, uPARAP 与 uPAR 的相互作用一方面可以通过选择性地内吞和降解 uPA/PAl-1(纤溶酶原激活物抑制剂1)复合物, 增加肿瘤组织中的蛋白水解酶活性; 另一方面也有利于细胞外基质的降解, 为肿瘤新生血管形成提供条件, 进而促进肿瘤的浸润和转移^[1,2,5]。

uPARAP 的表达与恶性肿瘤的许多临床特征密

切相关^[6,7]。本研究结果还表明, uPARAP 的表达强度与鼻咽癌的组织学分级、颈部淋巴结转移、临床分期等重要参数密切相关, 提示 uPARAP 的过表达在鼻咽癌的发展进程中可能起重要作用。由于 uPARAP 的表达仅在少数肿瘤中有相关研究, 而在鼻咽癌中的研究还未见报道, 因此这一结果还有待于进一步研究加以证实。

uPARAP、uPAR 和 VEGF 在鼻咽癌组织中协同表达对促进鼻咽癌的扩散转移可能起重要作用, 联合检测这些指标有望成为判断鼻咽癌恶性程度和估计患者预后的重要生物学标志, 并可为寻找治疗鼻咽癌的重要分子靶点提供科学依据。

参考文献

- 1 Curino AC, Engelholm LH, Yamada SS, et al. Intracellular collagen degradation mediated by uPARAP/Endo180 is a major pathway of extracellular matrix turnover during malignancy [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(6): 977-985
- 2 Kjoller L, Engelholm LH, Hoyer-Hansen M, et al. uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 293(1): 106-116
- 3 Cho WC. Nasopharyngeal carcinoma: molecular biomarker discovery and progress[J]. *Mol Cancer*, 2007, 53(2): 241-250
- 4 Carcangiu ML, Chambers JT, Voynick IM, et al. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations[J]. *Am J Clin Pathol*, 1990, 94(3): 247-254
- 5 Mousavi SA, Sato M, Sporstol M, et al. Uptake of denatured collagen into hepatic stellate cells: evidence for the involvement of urokinase plasminogen activator receptor - associated protein/Endo180[J]. *Biochem J*, 2005, 387(Pt 1): 39-46

- 6 Sulek J, Wagenaar - Miller RA, Shireman J et al. Increased expression of the collagen internalization receptor uPARAP/Endo180 in the stroma of head and neck cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55(4): 347-353
- 7 Schnack Nielsen B, Rank F, Engelholm LH, et al. Urokinase receptor - associated protein (uPARAP) is expressed in connection with malignant as well as benign lesions of the human breast and occurs in specific populations of stromal cells [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(5): 656-664
- 8 Giannopoulou I, Mylona E, Kapranou A, et al. The prognostic value of the topographic distribution of uPAR expression in invasive breast carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2007, 246(1-2): 262-267
- 9 Leissner P, Verjat T, Bachelot T, et al. Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor - 1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor- positive breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 216
- 10 郭翔, 曹素, 洪明晃, 等. VEGF 蛋白检测对预测鼻咽癌远处转移风险的价值 [J]. *癌症*, 2004, 23(10): 1171-1175
- 11 Yang EV, Sood AK, Chen M, et al. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)- 2, and MMP- 9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10357-10364
- 12 Yue SQ, Yang YL, Zhou JS, et al. Relationship between urokinase-type plasminogen activator receptor and vascular endothelial growth factor expression and metastasis of gallbladder cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(18): 2750-2752

(2007- 07- 25 收稿)
(2007- 11- 06 修回)
(韩豫生校对)

《中国肿瘤临床》英文版欢迎投稿

《中国肿瘤临床》英文版期刊于 2004 年正式出版, 主编郝希山院士。本刊为中国科协主管, 中国抗癌协会主办的国家级期刊, 中国抗癌协会 (CACA) 系列期刊 (ISSN 1672- 7118, CN 12- 1359/R), 双月刊。重点报道国内外肿瘤学科的最新研究成果和进展, 为国内外肿瘤学科临床医生和研究人员提供全新的英文语种学术交流园地。2007 年本刊由国际著名施普林格出版社 (Springer- Verlag) 负责合作出版。《中国肿瘤临床》英文版于 2007 年被收录于美国化学文摘 (CA), 中国英文版科技期刊数据库统计源期刊 (中国科学技术信息研究所) 和中国核心期刊 (遴选) 数据库 (中国科学技术信息研究所 万方数据股份有限公司)。2008 年本刊将更名为 *Clinical Oncology & Cancer Research* (正在审批过程中), 同时本刊的独立网站将于 2008 年投入使用, 欢迎广大读者和作者浏览投稿。

全文阅读: <http://springer.metapress.com/content/120510/?p=ef36fce8d8c14d09a4827bb558e07521&pi=0>

电话(传真): 022- 2352- 2919 E- mail: 2008coccr@gmail.com <http://www.cjco.cn>

通讯地址: 《中国肿瘤临床》英文版编辑部 联系人: 王永川 李雯

天津市河西区体院北环湖西路 邮编: 300060