

尿激酶型纤溶酶原激活物在子宫内膜异位症中的表达及意义*

白治苗^{1,3}, 卢玉凤¹, 杨眉¹, 年研¹, 哈春芳^{2△}

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院妇产科, 银川 750004; 3. 榆林市第二医院, 陕西 719000)

[摘要] **目的** 研究尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)在子宫内膜异位症(EMs)组织中的表达及意义。**方法** 分别采用免疫组织化学 SP 法及 RT-PCR 法检测正常子宫内膜组织 30 例, EMs 的在位内膜 35 例, EMs 的异位内膜 35 例, uPA 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** uPA 蛋白主要定位于子宫内膜腺上皮细胞与间质细胞的细胞质中, 极少数表达于血管内皮细胞中, 在 EMs 异位内膜中的表达强于在位内膜、正常内膜, 在 EMs 在位内膜中的表达强于正常内膜($P < 0.05$)。uPA 蛋白在 3 组内膜的增生期与分泌期中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。uPA mRNA 在 EMs 患者异位内膜中的相对表达量高于在位内膜和正常内膜, 在内异症在位内膜中的表达高于正常内膜($P < 0.05$)。**结论** uPA 可能在 EMs 异位内膜的黏附、生长等方面起一定作用。

[关键词] 子宫内膜异位症; 尿纤溶酶原激活物; 聚合酶链反应

[中图分类号] R711.71

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)28-3925-03

The significance and expression of urokinase plasminogen activator in the endometriosis*

Bai Zhimiao^{1,3}, Lu Yufeng¹, Yang Mei¹, Nian Yan¹, Ha Chunfang^{2△}

(1. Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 3. Second Hospital of Yulin City, Yulin, Shaanxi 719000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the significance and expression of uPA in the endometriosis. **Methods** Expressions of uPA in 30 cases of normal endometrium, 35 cases of eutopic endometrium were detected by the immunohistochemical SP and RT-PCR methods. **Results** First, in three groups, the expression of uPA protein was mainly in the cytoplasm of endometrial glandular epithelial cells and stromal cells, few was expressed in vascular endothelial cells, which the expression of uPA protein in ectopic endometrium of EMs was higher than eutopic and normal endometrium, with significantly differences among 3 groups ($P < 0.05$). Second, in three groups, there was no differences between the expression of uPA in proliferative and progesterational stage ($P > 0.05$). Third, the relative expression of uPA mRNA in ectopic endometrium of EMs was higher than eutopic and normal endometrium, with a significant difference among 3 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** uPA may play an important role in the pathogenesis of EMs.

[Key words] endometriosis; urinary plasminogen activator; polymerase chain reaction

尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)是尿激酶型纤溶酶原激活系统(简称 uPA 系统)的一个重要组成部分,主要在细胞外基质、基底膜等多种成分的降解中发挥作用,是维持细胞外基质动态平衡的一种关键因子^[1-2]。在正常情况下, uPA 存在于人或动物的血液、尿中,其本质是一种丝氨酸蛋白酶,具有将无活性的纤溶酶原转化成有活性的纤溶酶的作用,从而激活体内的纤溶系统,但纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)能特异性地抑制 uPA 的活性,从而保证了机体细胞外基质的动态平衡。子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)简称内异症,容易引起女性,尤其是育龄期妇女下腹坠胀痛、月经失调、性交痛,以及不孕等症状的常见良性疾病。但 EMs 却有着类似恶性肿瘤的黏附、种植、侵袭及远处转移等生物学行为。该病的病因与发病机制尚不明确,目前被普遍接受的是 1921 年 Sampson 提出的子宫内膜种植学说,于经期时子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞随经血逆流,经输卵管进入盆腔并种植于卵巢和邻近的腹膜。这一学说在动物实验中已被证实,但经血中的腺上皮、间质细胞是如何黏附并种植于腹膜细胞外基质中的,目前尚不清楚。因此,推测原位内膜

uPA 的活性增强, PAI-1 的抑制作用不足,使经血中的内膜碎片降解腹膜细胞外基质的能力增加,为子宫内膜的异位黏附、种植创造了条件。本研究试图通过免疫组织化学和 RT-PCR 检测 uPA 蛋白、mRNA 在 EMs 患者在位、异位及正常内膜组中的表达,由此阐述 uPA 在 EMs 发病机制中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2014 年 9 月于宁夏医科大学总医院妇产科因 EMs 行手术治疗并于术中或术后确诊的病理存档石蜡标本及新鲜组织各 35 例,纳入病例组。按照美国生育协会(AFS)修正 EMs 分期法(1985),所有病例组患者均处于 II 期。收集同年因子宫肌瘤经手术治疗并排除 EMs 的正常子宫内膜 30 例作为对照组。纳入标准:所有病例组及对照组患者于手术前月经周期均正常,病例组于术中或术后证实为 EMs,两组近 3 个月均未接受过激素类药物的治疗,无不孕、子宫内膜非典型性增生、宫颈上皮内瘤变、生殖道炎症等其他妇科器质性疾病,患者年龄在 25~45 岁,平均(30.50±4.98)岁。

1.2 主要试剂 兔抗人 uPA 多克隆抗体由美国 abcam 生物

公司生产(稀释浓度分别为 1 : 100),兔超敏二步法免疫组织化学检测试剂 PV-6001,DAB 显色试剂盒均由北京中杉生物工程公司生产。RT-PCR 所需引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,cDNA 反转录核,免疫荧光定量试剂盒均购置于 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 所有标本均由病理科证实,由甲醛浸泡过夜,10%甲醛固定,程序脱水、石蜡包埋,3~4 μm 厚度连续切片,65℃烤箱烤片过夜,脱蜡、水洗、抗原修复、一抗孵育过夜、PBS 冲洗、二抗孵育 2 h、显色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明及中性树脂胶封片,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 RT-PCR 步骤 引物根据引物设计原则,采用引物设计软件 Primer Premier 5 设计,上游引物:5'-GGG AGC AGA GAC ACT AAC GAC-3',下游引物:5'-CTT ACA CTC ACA GCC CAC ACA-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3.3 操作步骤 (1)内膜组织中总 RNA 提取:称取约 50 mg 在位或异位内膜组织置于含有液氮的匀浆器中,加入 1 mL 预冷的 TRIZOL 充分匀浆后将裂解液移入 1.5 mL EP 管,4℃,12 000 r/min,离心 10 min,取上层裂解液加入 0.2 mL 氯仿,混匀,冰浴 5 min,4℃,12 000 r/min,离心 10 min,取上层水相加 0.5 mL 异丙醇,颠倒混匀后冰浴 10 min,4℃,12 000 r/min,离心 10 min,小心去除上清液,加入 1 mL 75%乙醇,4℃,7 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,让沉淀 RNA 自然干

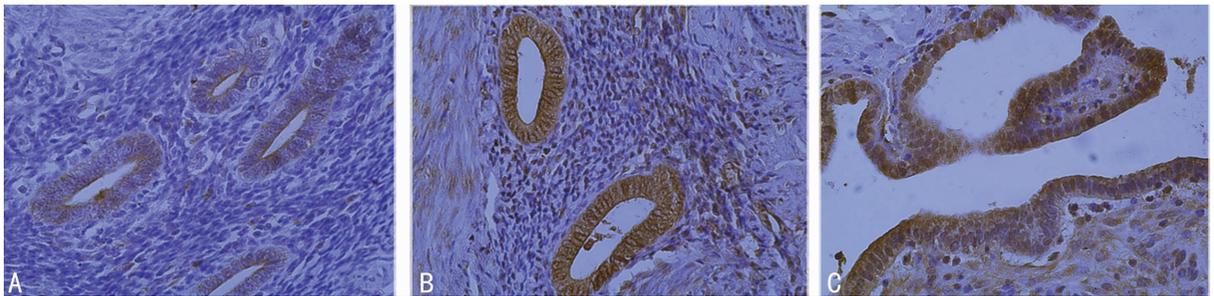
燥 5~10 min。(2)RNA 定量:用无 RNA 酶的水溶解 RNA 沉淀至 20 μL,取 2 μL 于 750 紫外分度计测量 RNA 纯度及浓度,将终浓度稀释为 1 μg /μL。(3)反应条件:94℃ 预变性 3 min,1 个循环,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,各 35 个循环,72℃ 终反应 5 min。

1.4 结果判定标准 (1)采用 OLYMPUS BX51 正置荧光显微镜观察染色结果,uPA 以细胞质或基底膜中出现黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。用 image pro-plus 6.0 专业图像分析软件对 uPA 蛋白的表达情况进行半定量分析,计算出每张切片的平均光密度值(IOD)。(2)RT-PCR 结果判定,用 BIO-RAD 凝胶扫描系统分析摄像,用 Roche-Lightcycler 96 对产物半定量分析,以正常内膜、内异症在位内膜和异位内膜中 uPA/GADPH mRNA 表示相对量结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析、两独立样本 t 检验等统计方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 uPA 蛋白在 3 组中表达的结果 uPA 蛋白主要表达于子宫内腺上皮细胞、间质细胞的细胞质及基底膜中,极少数表达于血管内皮细胞中,见图 1。其中 uPA 蛋白在 EMs 异位内膜组中的表达明显高于 EMs 在位内膜组、正常内膜组,EMs 在位内膜组中的表达高于正常内膜组,其差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



A: 正常内膜;B: EMs 在位内膜;C: EMs 异位内膜。

图 1 uPA 蛋白在 3 组内膜中的表达(SP×400)

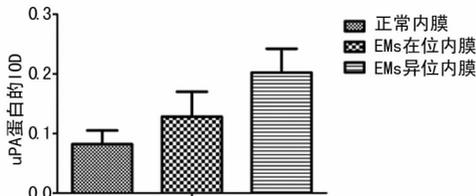


图 2 uPA 蛋白在 3 组内膜中的表达

($P > 0.05$),见图 3。

2.3 uPA mRNA 在 3 组内膜中的相对表达量 其中 uPA mRNA 在 EMs 异位内膜组中的表达明显高于 EMs 在位内膜组、正常内膜组,在 EMs 在位内膜组中的表达高于正常内膜组,其差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

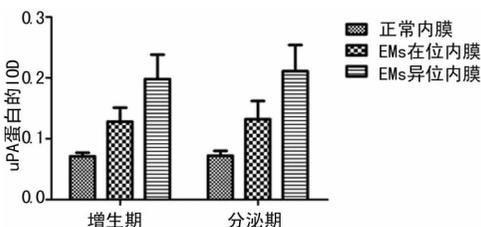


图 3 uPA 蛋白在 3 组内膜增生期、分泌期中的表达

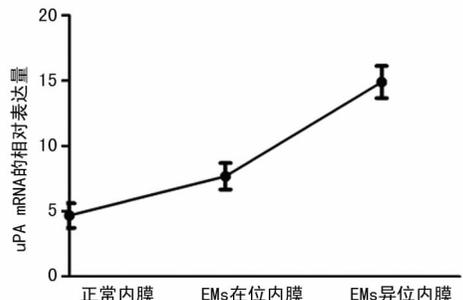


图 4 uPA mRNA 在 3 组内膜中的表达

2.2 uPA 蛋白在 3 组内膜中增生期与分泌期的表达 uPA 蛋白在 3 组内膜中的增生期与分泌期中的表达无明显差异

3 讨论

EMs 发生可能要经过 3 个阶段即异位内膜的黏附、侵袭

及血管形成,但异位内膜侵袭并破坏周围正常器官组织除了需要辨别、黏附的能力,还需要酶类,如蛋白水解酶,来降解细胞外基质、基底膜等细胞成分。在异位内膜的侵袭及转移过程中,存活及生长需要大量的微血管形成以保证其营养供应,而 uPA 在此过程中起着至关重要的作用。

uPA 是一种丝氨酸蛋白水解酶,以无活性的单链(sc-uPA)和有活性的双链(tc-uPA)两种形式存在。当细胞合成和分泌的 sc-uPA 与其特异性受体 uPAR 结合后,scPA 被酶解成具有纤溶酶原激活剂活性的双链形式 tc-uPA,而大量有活性的 uPA 的聚集使纤溶酶原转变成纤溶酶,降解细胞外基质和基底膜等多种成分,且可上调 uPAR 的表达^[3]。此外,uPA 与 uPAR 结合可激活细胞内的信号传递途径,调节细胞增殖、远处转移和浸润等生物学行为^[4]。国内有研究发现在癌变组织器官中 uPA/uPAR 高表达,也表明肿瘤细胞的侵袭、迁移与 uPA/uPAR 降解细胞外成分和激活细胞信号密切相关^[5]。国外学者也在细胞和动物恶性肿瘤模型水平通过小干扰 RNA 或相关拮抗剂下调 uPA 和 uPAR 的表达,发现可以有效抑制恶性肿瘤细胞的侵袭、迁移及增殖^[6-7]。EMs 在病理上虽是良性疾病,但却有着类似于恶性肿瘤的种植、侵袭及远处转移的生物学行为。本研究结果表明,uPA 蛋白在 EMs 患者异位内膜腺上皮、间质细胞中的表达明显高于 EMs 在位内膜及正常子宫内膜,uPA mRNA 在 EMs 患者异位、在位内膜中的表达也明显增强,且在整个月经周期中持续表达,无明显的波动性,与陈露等^[8]的研究结果 uPA 的高表达使其降解细胞周围基质及基底膜的能力增强,为异位内膜的黏附、侵袭、转移及形成异位病灶提供了必要条件的观点基本一致。国内学者的研究表明,在很大程度上肿瘤细胞中 uPA 的表达水平与其降解细胞外基质、基底膜等细胞组分及其侵袭转移能力密切相关^[9]。因 EMs 的发病机制与恶性肿瘤相似,结合本研究的结果,发现该观点与 EMs 中 uPA 表达高低和异位内膜侵袭性关系的密切程度相吻合。此外,本实验结果还表明 uPA 蛋白在 EMs 患者异位内膜及在位内膜的血管内皮细胞中亦有表达,因此猜测 uPA 蛋白可能在异位内膜的血管形成中发挥至关重要的作用。uPA 降解细胞外基质蛋白和基底膜,促使血管内皮细胞在周围组织间移动、增殖、聚集,更容易形成血管腔,为异位的内膜提供营养供应。国外学者的研究发现子宫内膜间质细胞释放 uPA/PAI-1 复合物,而该复合物可促使人血管内皮细胞的迁移,进一步支持 uPA 在 EMs 发病机制中的作用^[10]。综上所述,uPA 与 EMs 发病阶段中的异位内膜的黏附、侵袭及血管生成密切相关。

总之,本研究结果显示 uPA mRNA 及蛋白在 EMs 患者异位内膜与在位内膜的腺上皮、间质细胞中呈高表达,一方面激活纤溶酶降解细胞外基质及基底膜,使异位内膜细胞更易侵袭及转移;另一方面 uPA mRNA 及蛋白在 EMs 患者异位内膜与在位内膜的血管内皮细胞细胞中表达,诱导微血管的形成成为异位内膜的黏附提供营养。二者共同促进 EMs 的形成,为 EMs 的发病机制拓展一条新的思路,更为寻找 EMs 有效的药物治疗靶点提供依据,但 uPA 在 EMs 的发病机制中的具体作用仍不清楚,本课题组下一步希望通过 uPA 的激活剂及抑制剂干

预 EMs 患者在位内膜腺上皮细胞后采用 Transwell、RT-PCR、Western blot 等试验方法检测 uPA 蛋白、mRNA 的表达及细胞侵袭性的变化进一步验证 uPA 在 EMs 发生、发展中的作用。

参考文献

- [1] Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, et al. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(9): 923-929.
- [2] Dutta S, Bandyopadhyay C, Bottero V, et al. Angiogenin interacts with the plasminogen activation system at the cell surface of breast cancer cells to regulate plasmin formation and cell migration[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(3): 483-507.
- [3] Jarvinen HM, Laakkonen L, Haiko J, et al. Human single-chain urokinase is activated by the ompptins PgtE of *Salmonella enterica* and Pla of *Yersinia pestis* despite mutations of active site residues[J]. *Mol Microbiol*, 2013, 89(3): 507-517.
- [4] Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system; a multifunctional role in tumor progression and metastasis[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003(415 Suppl): S46-58.
- [5] 詹灵凌, 吕小平, 李山, 等. 肝硬化患者血浆 uPA、uPAR 水平与肝纤维化和癌变的相关性[J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(2): 144-145.
- [6] Nowicki TS, Zhao H, Darzynkiewicz Z, et al. Downregulation of uPAR inhibits migration, invasion, proliferation, FAK/PI3K/Akt signaling and induces senescence in papillary thyroid carcinoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(1): 100-107.
- [7] Xu X, Cai Y, Wei Y, et al. Identification of a new epitope in uPAR as a target for the cancer therapeutic monoclonal antibody ATN-658, a structural homolog of the uPAR binding integrin CD11b (α M)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85349.
- [8] 陈露, 申爱荣, 胡孟彩, 等. 子宫内膜异位症患者内膜组织中 uPA 与 PAI-1 蛋白的表达[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2014, 49(2): 251-254.
- [9] Liu WD, Bo YZ, Fan Y, et al. Effect of Bcl-xL gene expression silenced by RNA interference on invasion of human colorectal cancer cells[J]. *J BUON*, 2014, 19(4): 925-929.
- [10] Braza-Boils A, Mari-Alexandre J, Gilabert J, et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(5): 978-988.