

uPA/uPAR 与恶性肿瘤关系的研究进展

王学谦 林洪生

摘要 肿瘤细胞的侵袭转移是导致恶性肿瘤治疗失败和引起患者死亡的首要原因。经研究发现,尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)与尿激酶型纤溶酶原激活物受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)与恶性肿瘤的侵袭转移关系密切,在对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解,组织重塑,血管生成,细胞浸润增殖中发挥着重要作用,对肿瘤的恶性程度以及预后的判断具有一定的指导意义。因此,针对他们的靶点干预是目前肿瘤治疗的研究热点之一。本文就 uPA、uPAR 以及他们之间的作用关系做以介绍,同时将其作用靶点的干预策略做简要综述。

关键词 尿激酶型纤溶酶原激活物 肿瘤 转移 受体

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.005

肿瘤细胞的侵袭转移是导致恶性肿瘤治疗失败和引起患者死亡的首要原因。肿瘤发生侵袭并最终实现转移,是一个复杂且有规律的过程。研究发现,尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)和其受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)的相互作用,对基膜及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、组织重塑、血管生成、细胞浸润增殖、最终完成远处转移灶的形成发挥着重要作用。因此,针对 uPA 和 uPAR 的靶向治疗药物也已在研发过程中。为此,本文针对 uPA 和 uPAR 在恶性肿瘤发生、侵袭、转移的作用,以及治疗策略和方法做简要综述。

一、uPA 的结构功能以及基因表达

1. uPA 的结构和功能: uPA 是一种丝氨酸蛋白酶,可由成纤维细胞、中性粒细胞、单核细胞、上皮细胞、肿瘤细胞合成。最初以无酶活性的单链酶原(pro-uPA)的形式分泌到细胞间质中,之后一旦离开细胞,可与细胞膜上的 uPAR 结合而被激活,或者被一系列的蛋白酶,如纤维蛋白酶、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 L、激肽释放酶、胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶作用而被激活。在其 158 位 Lys 处裂解成由二硫键连接的双链结构,这个激活后的标准结构,包含 1 个生长因子样区域,1 个 kringle 区域和 1 个带有丝氨酸

活性的接触反应区域。这个结构具有把纤维蛋白溶酶原限定为主要底物的作用。被活化的 uPA 能将纤溶酶原转变成纤溶酶,纤溶酶在降解 ECM 的同时,可使基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)原活化成为有活性的 MMPs,加强对 ECM 的降解。uPA 除了对纤维蛋白溶酶原具有激活作用外, uPA 还具有激活分散因子和促肝细胞生长因子的作用,所以说 uPA 不单具有降解 ECM 的作用,还有控制细胞增殖和防止细胞凋亡能力。此外,有报道称 uPA 进行核转录时可以不依赖 uPAR,进而增加了 uPA 研究的复杂性^[1]。有研究者认为,这种拓扑学特点使得 uPA 通过调节基因转录在肿瘤干细胞和药物反应中发挥着重要作用^[2]。

2. uPA 在肿瘤组织中的基因表达: uPA 基因(PLAU)的表达是由一些确定的调控元件在其 5'侧翼区,和许多表观遗传和转移后机制紧密调节, uPA 的强烈持续的过表达发生在肿瘤进展期间。uPA 基因的转录主要被其上游的两个区域调控,即近端最小启动子和增强元件,前者包含 1 个 TATA 盒上游的富含 GC-/GA- 的序列,其被认为是普遍存在的转录因子——Sp1 和 Sp3,主要负责基础表达。后者,含有两个 PEA3/AP1(激活蛋白 1)结合位点,是由中央的 PLAU 基因诱导。其基本的表达和 uPA 基因的诱导均被不同的致癌信号途径调控,如 MAPK、JNK、PI₃K^[3],这在恶性肿瘤中 uPA 异常表达提供了一个额外的解释。在与肿瘤表达相关的 PLAU 基因启动子的调节区域,包括 NF- κ B、TCF 和 β -catenin 的识别位点。另外, uPA 基因的表观遗传调节,例如

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273947);国际科技合作与交流专项基金资助项目(2013DFA32540)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院

通讯作者:林洪生,教授,博士生导师,电子邮箱:linhongsheng1949

@sina.com

DNA 甲基化和组蛋白乙酰化均已证明在肿瘤发展中的作用^[4,5]。更为引人注目的是,uPA 的 mRNA 半衰期很短,它能通过抑制蛋白质合成而变得很稳定。在高转移的肿瘤细胞中,对 uPA 的转录发现比在非转移细胞中的更稳定。实验证明蛋白激酶 C(PKC)通过在 3'非翻译区结合富含 AU 的元件(ARE)促进 uPA 的 mRNA 衰变。而 mRNA 结合因子,Hu 抗原 R(HuR)能通过相同的方式稳定 uPA 的 mRNA。这些发现总结性的表明 uPA 表达在肿瘤生成和肿瘤转移的相关性。因此,在血浆中可溶性 uPA 水平的测量已经在预测前列腺和膀胱癌预后中开始使用,并被推荐到对乳腺癌的预后做以评价^[6]。

二、uPAR 的结构功能以及基因表达

1. uPAR 的结构和功能:uPAR 是一个富含半胱氨酸的糖基化的单链蛋白,是一种定位于细胞表面的糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚受体。它包含 3 个内在的二硫键区域(D1、D2、D3),所有的这些都需要与细胞外的 uPA 结合。因为缺少横跨膜和细胞内区域,uPAR 必须与整合素,G 蛋白偶联受体(GPCRs)和生长因子受体等合作形成共受体,以激活细胞内的信号,促进细胞运动、侵袭、增殖和存活^[7]。最近的研究发现血管生成素,分泌促血管生成因子,可促进 uPAR 和 uPA 的相互作用,导致纤维蛋白溶酶的形成,为肿瘤浸润、迁移提供可能^[8]。除了 uPA 外,玻连蛋白是 uPAR 的另一种关键配体,这两种配体与受体间的结合位点是分开的。uPAR 同时结合以上两种配体来共同进行蛋白酶的下调调节,细胞黏附和信号转导。此外,GPI 锚受体能通过细胞外蛋白水解缝隙或磷脂酶使得其与 uPAR 分开,使得膜结合的 uPAR 变得可溶。已得到证实,完整形式的可溶性 uPAR 被认为是肿瘤预后的指标。通过其活动来隔离受体配体,抑制纤溶酶原的激活或干扰 GPI 锚定的 uPAR 与整合素受体的相互作用^[7]。此外,uPAR 也可以一个网格蛋白依赖性方式,通过与 uPAR 相关内吞蛋白受体 ENDO180,6-磷酸甘露糖/胰岛素样生长因子(IGF)成员-2 受体家族相互作用实现受体的内化。uPAR 的内吞和再循环作用能够达到细胞表面重新分配闲置 uPAR 的目的,进而促进 uPAR 的活动,从另一角度看,这也实现了对 uPA 活性的补充。

2. uPAR 在肿瘤组织中的基因表达:uPAR 基因(PLAUR)的表达通过转录和转录后结合机制进行调控。PLAUR 基因的上游区域包含许多转录因子的顺

式作用元件,包括 Sp1、AP1、AP2、PEA3、Kruppel-like factor 4、乏氧因子 1 α (HIF-1 α)、NF- κ B、TCF 和 LEF 等大量的信号通路激活这些作用在 PLAUR 基因的转录因子,从而协调 uPAR 在肿瘤中的表达^[9]。TCF 和 LEF 蛋白家族的参与将 uPAR 表达与经典的 WNT/ β -catenin 信号通路激活相联系,并提示 uPAR 与 TF 表达有关,同时证明 uPAR 与肿瘤干细胞相关^[10]。此外,ERK1/2、JNK、MAPK、NF- κ B 和 AP-1 信号通路被激活均可调节 uPAR 转录^[11]。和 uPA 表达类似,uPAR 表达也会被 mRNA 结合蛋白的表观遗传进行转录后调节。通过与呈现在 uPAR mRNA 的 3'非编码区(3'UTR)不同的位点结合,HuR 和异质核糖核蛋白 C 被认为具有稳定 PLAUR 转录的功能,而肿瘤抑制蛋白 p53 促进 PLAUR mRNA 的降解^[12]。

三、uPA/uPAR 在肿瘤侵袭转移中的作用

1. ECM 的蛋白质水解:ECM 是一个复杂的有着各种生物特征的大分子网络,在维持着肿瘤内环境的过程中有着重要作用^[13]。ECM 蛋白水解平衡的改变会导致不可控的肿瘤生长、组织重塑、炎症以及肿瘤细胞的浸润和转移。纤维黏连蛋白作为目前唯一已知的 ECM,uPA 已经证实对其有着特异性作用,通过直接激活 MMPs 和纤维蛋白溶酶,能够降解多种 ECM 蛋白^[14]。MMPs 的激活,不仅使得 ECM 重塑,而且还会从细胞表面释放 ECM 相关生长因子。这些生长因子的释放和激活反过来还会提高 uPA 和 uPAR 的表达,同时还可对肿瘤进展中的其他关键过程进行调节,例如血管再生和上皮间充质转化。

2. 细胞黏附和迁移:越来越多的证据表明 uPA 和 uPAR 具有调节细胞黏附和转移的作用。通过 uPA 和 uPAR 影响细胞黏附和浸润,包括增强 ECM 蛋白的水解,触发与 G 蛋白偶联受体合作的信号通路,诱导整合素介导的细胞信号,调节与之相关的玻连蛋白等。特别是当 ECM 被 uPA 介导激活的纤维蛋白溶酶降解,许多隐藏的抗原决定簇基质蛋白被暴露出来,联合 MMPs 的作用,提高细胞迁移率。此外有研究显示,在子宫内膜癌中,uPA 表达与卵巢癌侵袭相关,能够表现卵巢癌的侵袭转移能力及恶性行为^[15]。还有实验发现,将 uPAR 敲除后,能够通过调节 uPA/uPAR 和 Notch 信号途径减轻恶性胶质瘤的迁移和浸润^[16]。

3. 血管新生:血管新生是描述新生血管从先前存在血管中生长的过程。在肿瘤血管,这些新血管不仅

为肿瘤细胞提供氧气和营养,而且还为恶性细胞提供转移途径。血管新生是一个复杂的多步骤过程,包括 ECM 降解,内皮细胞激活、增殖、浸润、管腔形成和发芽稳定,其中大多数是与 uPA/uPAR 作用密切相关的^[17]。uPA 介导纤维蛋白溶酶和多种 MMPs 的激活,它们在 ECM 的蛋白质水解中起着重要作用,这对血管的初始生成是至关重要的。值得注意的是,uPA 和 uPAR 在静态内皮细胞中检测不到,但是在迁移的血管内皮细胞中和新生血管的尖端里 uPA 和 uPAR 均是高表达的,这与 Dll4/notch1 信号通路的调节作用相似,他们之间是否存在串扰或其他某种联系,值得进一步研究。另外值得一提的是,uPAR 与特异性整合素通过结合玻连蛋白能够使内皮细胞调节细胞的黏附和迁移,同时这种“三维”形式的结合,可以通过抑制肿瘤抑制磷酸酶的转录和 NF- κ B 依赖性的 PTEN 蛋白来促进血管生成^[18]。由此可见,uPAR 在肿瘤血管新生中具有不可替代的作用,有待于深入研究。

4. 与整合素相互作用:整合素家族是由 α , β 亚基经非共价连接形成异二聚体的一类重要的跨膜受体,uPAR 通过与整合素家族形成共受体转导信号,能够使肿瘤细胞完成增殖、浸润、迁移等生物学行为。MAC1 是第 1 个被证实能够介导 uPAR 信号转导的整合素,uPAR 与其相互作用,促使巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞黏附于血管内皮,随后促使白细胞从血管中游出,因为肿瘤微环境中常含有大量的炎性细胞,故 uPAR 与 MAC1 相互作用可能为肿瘤细胞实现远端转移提供适宜的炎性环境^[19]。此外,uPAR 和整合素 α V β 6 被认为在肿瘤转移中起着关键作用。这些结果通过蛋白组学研究证实了这两个分子间的相互作用,并利用邻位连接技术已基本阐明 uPAR 和整合素 α V β 6 结合的潜在位点,同时表示二者作用与上皮间质转化有关,有利于肿瘤细胞从原发灶上脱落促进转移^[20]。

四、基于 uPA/uPAR 的肿瘤治疗策略

在临床上,uPA/uPAR 的表达与恶性肿瘤有着密切的联系^[21]。这些研究为肿瘤的治疗提供了较为明确的靶点^[22]。治疗策略的制定主要是对 uPA 和 uPAR 的表达水平和生物活性进行干预。

1. 抑制 uPA 或 uPAR 的表达:肿瘤治疗中抑制 uPA 或 uPAR 表达主要使用转录和转录后基因沉默的方法,或使用细胞外信号来抑制 uPA 和 uPAR 表达。前者主要应用反义 RNA 或 RNA 干扰技术来抑

制 uPA 或 uPAR 的表达,目前已经被应用在多种肿瘤的临床前研究^[23]。后者通过各种细胞外刺激负调节 uPA 或 uPAR 表达以抑制肿瘤生长和血管生成。例如,糖皮质激素已经被证实作为一种 uPA 或 uPAR 基因表达的负向调节药物,对多种肿瘤有潜在疗效。

2. uPA/uPAR 蛋白水解酶活性抑制:另一个基于 uPA/uPAR 靶向抑制肿瘤治疗的策略是通过阻滞其基本功能,抑制其接触性反应活性和纤溶酶活性。uPA 活性可以通过使用一系列的具有选择性的特异性抗体得到抑制,但尽管发现抗体的使用可以阻滞肿瘤的扩散,但其在临床上的使用可能受药代动力学和药效学的限制没能进一步推广。相比之下,一个更为可行的抑制 uPA 活性的方法即使用合成的或天然低分子量的抑制剂,其中 Mesupron 和他的前体 WX-UK1 已经被证实取得了一些可喜的成果。目前许多抗肿瘤药物的研发是从纤溶酶抑制剂角度开展的,实验证明尿胰蛋白酶抑制剂,在体内实验中能够抑制 Lewis 肺癌的转移。纤维蛋白溶酶抑制剂,如 DX-1000 和 YO-2,已经证实在肿瘤的增殖、血管生成和浸润转移均有抑制作用。

3. 干预 uPA 和 uPAR 相互作用:uPA 和 uPAR 生物学行为很大程度上是通过 uPAR 与其配体相结合,随后发生 uPAR 共受体的激活。针对 uPA 和 uPAR 的抗肿瘤研究中,阻滞 uPAR 和 uPA 相结合,能够进一步抑制 uPAR 下游通路的激活。目前,直接针对 uPAR 的抗体或抗体类似物已经被研发,用来抑制 uPAR 与其配体相结合进而减缓肿瘤的进展^[24]。另外,干预 uPAR 和整合素相互作用的工作也已经在一些抗肿瘤药物的研发中逐步开展了。一种特定的肽被设计并安插在 uPAR 和整合素的结合位点,并在体内实验中证实其可以抑制 uPAR 和整合素间相互作用,减少血管生成,抑制肿瘤进展^[25]。

总之,uPA 和 uPAR 在恶性肿瘤的侵袭转移过程中均发挥着极其重要的作用。诸多实验已经证实,uPA 可以与 uPAR 相结合,发挥蛋白水解功用,激活多种效应因子以促进肿瘤转移。此外 uPA 和 uPAR 也可不互相依赖,在肿瘤进展中发挥其各自作用,尤其是 uPAR,作为共受体,与多种信号通路关系密切。目前已经研发出多种抑制 uPA、uPAR,以及干预其相互作用的药物,并取得了一定成果,但因为种种原因仍没有得到推广。从基因水平观察,uPA 和 uPAR 的表达不仅受到转录和转录后调控,而且还被表观遗传调控所影响。近年来中医药在基因水平的研究日益

深入,中医药在调控转录、转录后以及表观遗传方面的作用均逐步得到证实。中医药在肿瘤疾病中的作用也逐渐得到世界医学的认可。中医药在调控 uPA 和 uPAR 抑制肿瘤侵袭转移方面存在着巨大潜力。

参考文献

- Stepanova V, Lebedeva T, Kuo A, *et al.* Nuclear translocation of urokinase - type plasminogen activator [J]. *Blood*, 2008, 112 (1): 100 - 110
- Asuthkar S, Stepanova V, Lebedeva T, *et al.* Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24 (17): 2620 - 2632
- Wu YJ, Neoh CA, Tsao CY, *et al.* Sinulariolide suppresses human hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by inhibiting matrix metalloproteinase - 2/-9 through MAPKs and PI3K/Akt signaling Pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (7): 16469 - 16482
- 张松,李烁,高春生. uPA 基因启动子区低甲基化在鼻咽癌侵袭转移中的作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39 (6): 691 - 693
- 闫洪亮,吴维光,王筝,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS - 275 对子宫颈癌 SiHa 细胞迁移和侵袭的影响 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41 (2): 191 - 193
- Lampelj M, Arko D, Cas - Sikosek N, *et al.* Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type - 1 (PAI - 1) in breast cancer - correlation with traditional prognostic factors [J]. *Radiol Oncol*, 2015, 49 (4): 357 - 364
- Noh H, Hong S, Huang S. Role of urokinase receptor in tumor progression and development [J]. *Theranostics*, 2013, 3 (7): 487 - 495
- 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
- Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11 (1): 23 - 36
- Asuthkar S, Gondi CS, Nalla AK, *et al.* Urokinase - type plasminogen activator receptor (uPAR) - mediated regulation of WNT/ β - catenin signaling is enhanced in irradiated medulloblastoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (24): 20576 - 20589
- Park JS, Park JH, Khoi PN, *et al.* MSP - induced RON activation upregulates uPAR expression and cell invasiveness via MAPK, AP - 1 and NF - κ B signals in gastric cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32 (2): 175 - 181
- Shetty S, Velusamy T, Idell S, *et al.* Regulation of urokinase receptor

expression by p53: novel role in stabilization of uPAR mRNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27 (16): 5607 - 5618

- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196 (4): 395 - 406
- Fortenberry Y. The role of serpins in tumor cell migration [J]. *Biol Chem*, 2015, 396 (3): 205 - 213
- 洪龙年,张颖. 浅谈尿激酶型纤溶酶原激活系统与卵巢恶性肿瘤的相关性 [J]. *当代医药论丛*, 2014, 12 (7): 171 - 173
- Raghu H, Gondi CS, Dinh DH, *et al.* Specific knockdown of uPA/uPAR attenuates invasion in glioblastoma cells and xenografts by inhibition of cleavage and trafficking of Notch - 1 receptor [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 130
- 郑杰. 肿瘤的细胞和分子生物学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 281 - 282
- Unsel M, Chilla A, Pausz C, *et al.* PTEN expression in endothelial cells is down - regulated by uPAR to promote angiogenesis [J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114 (2): 379 - 389
- Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, *et al.* CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans [J]. *Science*, 2011, 331 (6024): 1612 - 1616
- Ahn SB, Mohamedali A, Anand S, *et al.* Characterization of the interaction between heterodimeric α v β 6 integrin and urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) using functional proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13 (12): 5956 - 5964
- Mekkawy AH, Pourgholami MH, Morris DL. Involvement of urokinase - type plasminogen activator system in cancer: an overview [J]. *Med Res Rev*, 2014, 34 (5): 918 - 956
- Su SC, Lin CW, Yang WE, *et al.* The urokinase - type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 14: 1 - 16
- Raghu H, Nalla AK, Gondi CS, *et al.* uPA and uPAR shRNA inhibit angiogenesis via enhanced secretion of SVEGFR1 independent of GM - CSF but dependent on TIMP - 1 in endothelial and glioblastoma cells [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6 (1): 33 - 47
- Tarighi P, Khorramzadeh M, Madadkar - Sobhani A, *et al.* Growth inhibition of MDA - MB - 231 cell line by peptides designed based on uPA [J]. *Acta Med Iran*, 2015, 53 (7): 403 - 407
- Bifulco K, Longanesi - Cattani I, Liguori E, *et al.* A urokinase receptor - derived peptide inhibiting VEGF - dependent directional migration and vascular sprouting [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12 (10): 1981 - 1993

(收稿日期: 2016 - 02 - 29)

(修回日期: 2016 - 03 - 07)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》已经启用远程稿件处理系统, 请各位作者登录《医学研究杂志》网站: <http://www.yxyjzz.cn>, 注册为作者后进行投稿。咨询电话: 010 - 52328677 (路编辑)。

《医学研究杂志》编辑部