血浆 uPA、PAI－1 和其 4G/5G 多态性与鼻咽癌临床分期关系

张　瑞　毛　露　常　菲　韩　莹　陈艾东

摘　要　目的　探讨尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI－1)的血浆浓度和 PAI－1 基因启动子区 4G/ 5G 多态性与鼻咽癌临床分期的相关性。**方法**　收集 86 例鼻咽癌患者血液标本，35 例健康人血液标本作对照。所有标本均采用用酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测 uPA 和 PAI－1 的血浆浓度，微量法提取 DNA，采用等位基因特异性引物 PCR 分析 PAI－1 基因启动子 4G/5G 多态性。**结果**　与正常对照组相比，鼻咽癌组血浆 uPA 浓度明显升高($P<0.05$)，而血浆 PAI－1 浓度显著降低($P<0.05$)，上述效应和临床分期具有显著相关性；PAI－1 启动子区 4G 和 5G 基因频率与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　鼻咽癌的临床分期和恶性程度和血浆 uPA 浓度呈正相关，与 PAI－1 浓度呈负相关；PAI－1 基因 4G/5G 多态性与鼻咽癌没有相关性。

关键词　鼻咽癌　尿激酶型纤溶酶原激活物　纤溶酶原抑制剂 1　基因多态性

中图分类号　R3　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.011

Correlation between the Plasma concentrations of u－PA and PAI－1 and the 4G/5G Polymorphism of PAI－1 and the Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Zhang Rui, Mao Lu, Chang Fei, et al. Nanjing Medical University, Jiangsu 211166, China*

Abstract　Objective　To examine plasma concentrations of urokinasetype plasminogen activator (u－PA) and plasminogen activator inhibitor－ 1 (PAI－1), and a single nucleotide insertion/ deletion (4G/ 5G) polymorphism located in the promoter region of PAI－1 gene in normal subjects and the patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) at different stages. **Methods**　Eighty six blood samples were collected from the patients with NPC, and 35 blood samples were taken from healthy people as control. Plasma concentrations of uPA and PAI－1 were measured by enzyme－linked immunosorbent assay (ELISA). DNA was extracted by micro extraction and the 4G/ 5G polymorphism were analyzed by PCR using specific primers. **Results**　An increase in u－PA antigen was observed with the advanced stages of the disease. However, the levels of PAI－1 antigen decreased with each advanced stage. Compared with control group, the 4G and 5G allele frequency located in the promoter region of PAI－1 gene was no significant difference ($P>0.05$) in the NPC group. **Conclusion**　The plasma concentrations of uPA were increased while the PAI－1 concentrations were decreased in patients with NPC in stages－related manner. There is no correlation between the 4G/5G polymorphism and NPC. These results suggest that administration of antiplasminic agents may be effective in suppressing tumor invasion.

Key words　Nasopharyngeal carcinoma; Urokinasetype plasminogen activator; Plasminogen activator inhibitor－1; Gene polymorphism

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种上皮起源性的恶性肿瘤，具有明显的地区聚集性，病理类型多为低分化鳞癌，恶性程度高、转移早，出现临床症状时多已至中晚期，且治疗后复发率高。肿瘤发生侵袭、转移与其自身分泌蛋白酶密切相关。近年来较多研究发现，尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、尿激酶激活剂抑制剂－1(PAI－1)与许多实体肿瘤有较为密切的关系且在恶性肿瘤的浸润转移中发挥重要作用[1~9]。癌变的分子机制已进入基因水平，是当今癌症机制研究的主要方向，PAI－1 基因启动子区－675位置上的一个鸟嘌呤插入/缺失多态性(4G/5G)被认为与 PAI－1 活性水平相关，多项研究表明，PAI－1 基因启动子区 4G/ 5G 多态性与疾病发生有密切关系。本研究分析鼻咽癌患者 uPA、PAI－1 血浆浓度及 PAI－1 4G/5G 基因分布频率，探讨其与鼻咽癌发生、发展的相关性，有助于鼻咽癌发病机制的进一步研究，为协助诊断和预后评估提供思路[10,11]。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(面上项目)(31571168)

作者单位：211166　南京医科大学(张瑞、常菲、韩莹、陈艾东)；210009　南京，东南大学附属中大医院(毛露)

通讯作者：陈艾东，电子信箱：aidongchen@ njmu. edu. cn

对象与方法

1. 标本来源：2015 年 6 月 ~2017 年 1 月东南大学附属中大医院收治的鼻咽癌患者 86 例，患者年龄 22 ~69 岁，其中男性 67 例，女性 19 例，均未接受放化疗治疗，所有患者均经鼻咽腔组织病理活检确诊，中国鼻咽癌 2008 临床分期标准进行分期，分别为Ⅰ期 12 例，Ⅱ期 26 例，Ⅲ期 30 例，Ⅳ期 18 例。健康对照组为笔者医院体检的正常人 35 例，年龄 22 ~66 岁，其中男性 27 例，女性 8 例。健康对照组均经各项专科检查确定为健康人群，且 2 周内均未接受抗凝及溶栓治疗。

2. 主要仪器：Q/FTH008 -2000 PCR 扩增仪（日本株式会社）；DU640 核酸定量分析仪（美国 Bio -Rad 公司）；UVP -8000 凝胶紫外光成像仪（美国 UVP 公司）；超低温冰箱（丹麦 Harris 公司）；双蒸水仪（美国 Millipore 公司）。

3. 主要试剂：uPA 和 PAI -1 血浆浓度测定 ELISA 试剂盒购自上海太阳生物技术公司；PCRMatker 和 PCR 引物购自上海 Sangon 生物工程公司。

4. 方法：清晨抽空腹静脉血 2ml 于 EDTA -K_2 抗凝管中，立即颠倒混匀，6h 内 4000r/min 离心 10min，分离血浆和白细胞层，分装 EPP 管中，-80℃保存待用。全自动酶标仪测出 A 492 的值和浓度，乘以稀释倍数，计算出 PAI -1 的血浆浓度（μg/ml）。取出 -80℃保存的白细胞层标本于室温解冻，取 500μl 加入 2ml EP 管中，加入 1ml 无菌双蒸水破坏其中的红细胞，8000r/min 离心 5min，弃上清，重复 2 次。加入 STE 达 500μl，加入 10% SDS 50μl，加入蛋白酶 K 5μl，混匀后 56℃ 2h。在消化管中加入等体积的 Tris 饱和酚再加入等体积氯仿：异戊醇，颠倒混匀 20min，8000r/min 10min，将上层水相转入另一个 EPP 管中，加入 1/10 体积 3mol/L NaAC（pH 5.2），混匀加入两倍体积的无水乙醇，轻轻混匀，白色丝状物即为 DNA。8000r/min 离心 5min，弃无水乙醇，加入 70% 乙醇洗涤 2 次，室温风干。加入 50μl TE（pH 8.0）使 DNA 完全溶解。全部标本均用 DU 640 核酸定量仪测定 A_{260} 及 A_{280}，计算 DNA 浓度，同时检测 DNA 样品纯度，将每个标本稀释到 100μg/ml。PCR 引物系列：插入型 5G 基因型为引物：5′ -GTC TGG ACA CGT GGG GG -3′；缺失型 4G 基因型为引物：5′ -GTC TGG ACA CGT GGG GA -3′；共同下游引物为引物：5′ -TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA -3′；内对照引物为引物：5′ -AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT -3′。PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳鉴定（含 EB 5μg/ml），每孔加入 5 μl PCR 扩增产物和 1μl 上样缓冲液的混和液，取一孔加 PCR Marker 作为标准分子量参照，缓冲液为 0.5 ×TBE，140V 稳压电泳 1h，在 UPV 凝胶成像仪上观察结果并记录。

5. 统计学方法：采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析，根据电泳条带确定每个标本的基因型，基因型频率用直接计数法计算，并按 *Hardy - Weinberg* 平衡定律验证样本取样的随机性，计量资料以均数 ±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

鼻咽癌患者临床各期病例数和所占的百分比见表 1。和健康对照组相比，血浆 uPA 浓度在鼻咽癌组中显著增加临床（$P<0.05$），随临床分期呈上升趋势，临床Ⅳ期升高较之前 3 期有统计学差异，见图 1。PAI -1 血浆浓度在鼻咽癌中明显下降，并且和临床分期呈负相关，同样，临床Ⅳ期下降幅度较之前 3 期有统计学意义（$P<0.05$），而临床Ⅰ期与临床Ⅱ期、临床Ⅱ期与临床Ⅲ期之间比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$），结果见图 2。

表 1　86 例鼻咽癌患者的临床分期

临床分期	n	百分比（%）
Ⅰ期	12	13.95
Ⅱ期	26	30.23
Ⅲ期	30	34.88
Ⅳ期	18	20.93

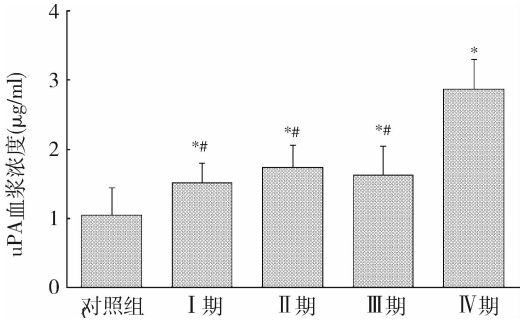

图 1　86 例鼻咽癌患者各临床分期 uPA 血浆浓度与正常对照组比较

与对照组比较，* $P<0.05$；与Ⅳ期比较，# $P<0.05$

PAI -1 基因分布及 4G 和 5G 基因频率检测原始图见图 3，和健康对照组，PAI -1 基因 4G 和 5G 多态性和鼻咽癌组差异无统计学意义（$P=0.729$），见表 2。

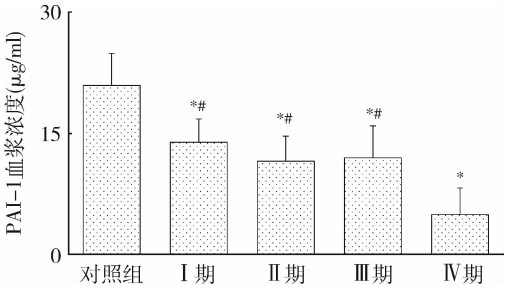

图 2　86 例鼻咽癌患者各临床分期 PAI－1 血浆浓度与正常对照组比较

与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与Ⅳ期比较，$^{\#}P<0.05$

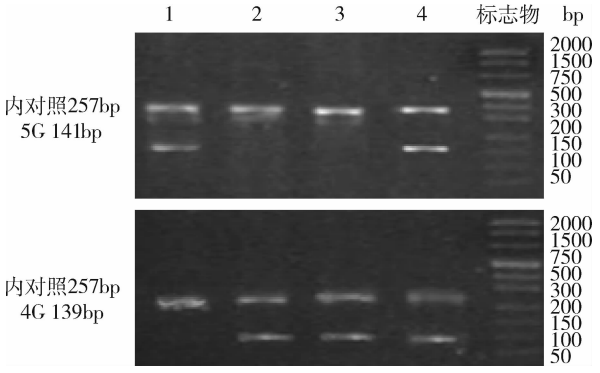

图 3　PAI－1 基因 PCR 产物电泳后基因型鉴定

1,3,5 泳道为 5G/5G 基因型；6,7 泳道为 4G/4G 基因型

表 2　86 例鼻咽癌患者与正常对照者 4G、5G 基因频率分布

基因型	对照组($n=35$)		鼻咽癌组($n=86$)	
	n	频率(%)	n	频率(%)
4G/4G 型	12	34.29	28	32.56
4G/5G 型	17	48.57	44	51.16
5G/5G 型	6	17.14	14	16.28

讨　　论

恶性肿瘤的生物特性是侵袭和转移，这也是肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤细胞必须通过对基膜及细胞外基质成分的附着、黏附和侵袭来穿透细胞和基质屏障。目前已知，细胞外基质的降解与肿瘤转移侵袭密切相关。研究表明，uPA 系统在细胞外基质的降解和转移过程中发挥重要作用[1~3]。

uPA 在肿瘤组织以及循环血中的高表达与多种肿瘤的病理特点、预后相关。研究发现，乳腺恶性肿瘤组织中 uPA 的水平明显较两性增生和正常组织为高，且随细胞的恶变，均逐渐上升[1,3]。Ghasemi 等[2]通过对比卵巢癌的 uPA 活性与肿瘤浸润深度和转移的关系得出，肿瘤浸润程度和深度的增加与 uPA 活性的增加一致。此外，uPA 在其他肿瘤的研究，如胃癌、肺癌、子宫内膜癌等，都得出相似的结论[4~9]。本研究发现，鼻咽癌患者血浆 uPA 浓度明显高于健康对照组，这与上述实体瘤的研究相一致。但是，上述实体瘤的研究，可能由于标本量的限制，大多没有深入探讨 uPA 浓度和肿瘤临床分期的相关性，而本研究发现血浆 uPA 浓度和鼻咽癌的恶性程度和临床分期呈正相关。并且，在临床Ⅳ期 uPA 血浆浓度明显较前 3 期高，这可能因为在此期已经出现了淋巴结或者远处转移，为了利于肿瘤细胞的侵袭和穿透周围组织，产生了大量的 uPA。

PAI－1 是 uPA 的重要抑制物，阻止纤溶酶原的激活，因此，在肿瘤组织局部纤溶中起到控制的作用[12~15]。Fortenberry 等[13]测定子宫内膜癌患者肿瘤组织提取物中 PAI－1 的水平，表明子宫内膜癌的不同阶段 PAI－1 的水平均有不同程度的下降，其可以抑制肿瘤的侵袭。同样，在乳腺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经胶质母细胞癌、脑膜瘤等中也发现了类似的研究结果[5~9,14~20]。本研究显示，鼻咽癌患者 PAI－1 血浆浓度与健康对照组比较，其血浆浓度明显降低，PAI－1 的血浆浓度随着临床分期的增加而降低，特别是临床Ⅳ期 PAI－1 的血浆浓度明显降低。处于临床Ⅳ期 PAI－1 急剧下降可能是由于 uPA 活性过高，而 PAI－1 是 uPA 特异抑制剂，为了对抗过高浓度的 uPA，过度地消耗了 PAI－1；另外一种可能是肿瘤细胞产生了抑制 PAI－1 的表达的物质，相关机制则有待进一步的研究。由于 uPA、PAI－1 的血浆浓度和鼻咽癌的临床分期和恶性程度密切相关，故二者的血浆浓度测定有望成为鼻咽癌临床诊断和预后的重要检查指标，而且比较测定癌组织或者癌旁组织，血浆浓度测定法简单并且创伤小。

近年来，Yıldırım 等[10]认为 PAI－1 基因 4G/5G 插入/缺失多态性和血浆 PAI－1 水平显著相关。本研究发现，4G/4G 基因型 PAI－1 的血浆浓度最高达 17.23 ± 2.94ng/ml，4G/5G 基因型血浆浓度次之为 11.12 ± 3.51ng/ml，5G/5G 基因型血浆浓度最低为 7.36 ± 2.28ng/ml，且上述三者之间比较差异有统计学意义，这与 Yıldırım 等[10]的研究相一致。大多数研究表明 PAI－1 4G/5G 插入/缺失多态性与子宫内膜癌、胶质母细胞瘤和丙型肝炎病毒诱发肝癌等的发病无相关性，但认为 PAI－1 活性与实体肿瘤的浸润、转移、分期、预后有一定相关性[11]。在鼻咽癌患者中，笔者也得出类似的结论，即鼻咽癌组(4G/4G 型：

34%，4G/5G 型：50%，5G/5G 型：16%）与健康对照组（4G/4G 型：34%，4G/5G 型：49%，5G/5G 型：17%）的 4G、5G 基因多态性之间比较差异并无统计学意义。PAI－1 4G/5G 插入/缺失多态性与鼻咽癌的发病无相关性，说明尽管在肿瘤患者中常伴有止血、凝血功能的变化，这些变化涉及血浆凝固酶、血小板、纤溶以及血管功能异常，并由此导致病理性高凝状态，后者与肿瘤的病情和预后有密切关系，但 PAI－1启动子区单核苷酸插入/缺失（4G/5G）多态性与鼻咽癌的发生发展并没有直接相关性。综上所述，鼻咽癌的临床分期和恶性程度与 uPA 呈正相关，与血浆 PAI－1 浓度呈负相关，与 PAI－1 基因 4G/5G 多态性无相关性。

参考文献

1 Mali AV, Joshi AA, Kadam Sh, *et al*. Enterolactone suppresses proliferation, migration and metastasis of MDA－MB－231 breast cancer cells through inhibition of uPA induced plasmin activation and MMPs－mediated ECM remodeling[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(4): 905－915

2 Ghasemi A, Hashemy SI, Aghaei M, *et al*. RhoA/ROCK pathway mediates leptin－induced uPA expression to promote cell invasion in ovarian cancer cells[J]. Cell Signal, 2017, 32(4): 104－114

3 Dovnik NF, Takac I. Prognostic significance of uPA/PAI－1 level, HER2 status, and traditional histologic factors for survival in node－negative breast cancer patients[J]. Radiol Oncol, 2016, 51(1): 65－73

4 Bayramoglu A, Gunes HV, Metintas M, *et al*. Plasminogen activator inhibitor－1 and susceptibility to lung cancer: a population genetics perspective[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2014, 18(8): 587－590

5 Liu B, Tang Y, Yi M, *et al*. Genetic variants in the plasminogen activator inhibitor－1 gene are associated with an increased risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients[J]. Cancer Med, 2017, 6(3): 681－688

6 Kazarian A, Blyuss O, Metodieva G, *et al*. Testing breast cancer serum biomarkers for early detection and prognosis in pre－diagnosis samples[J]. Br J Cancer, 2017, 116(4): 501－508

7 Lin MT, Kuo IH, Chang CC, *et al*. Involvement of hypoxia－inducing factor－1α－dependent plasminogen activator inhibitor－1 up－regulation in Cyr61/CCN1－induced gastric cancer cell invasion[J]. J Biol Chem, 2016, 291(53): 27433－27443

8 Sundaram S, Yan L. Dietary energy restriction reduces high－fat diet－enhanced metastasis of Lewis lung carcinoma in mice[J]. Oncotarget, 2016, 7(40): 65669－65675

9 Zhao S, Dorn J, Napieralski R, *et al*. Plasmin(ogen) serves as a favorable biomarker for prediction of survival in advanced high－grade serous ovarian cancer[J]. Biol Chem, 2017, 398(7): 765－773

10 Yıldırım ME, Karakuş S, Kurtulgan HK, *et al*. The association of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI－1) level and PAI－1 4G/5G gene polymorphism with the formation and the grade of endometrial cancer[J]. Biochem Genet, 2017, 28(17): 96－107

11 Pooyan H, Ahmad E, Azadeh R. 4G/5G and A－844G polymorphisms of plasminogen activator inhibitor－1 associated with glioblastoma in iran－a case－control study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(15): 6327－6330

12 Kaji H. Adipose tissue－derived plasminogen activator inhibitor－1 function and regulation[J]. Compr Physiol, 2016, 6(4): 1873－1896

13 Fortenberry YM, Brandal SM, Carpentier G, *et al*. Intracellular Expression of PAI－1 Specific Aptamers Alters Breast Cancer Cell Migration, Invasion and Angiogenesis[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164288

14 Chen YL, Jia YM, Xie YT, *et al*. Association of single nucleotide polymorphisms in PAI－1 with breast cancer susceptibility and prognosis[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2016, 45(8): 533－539

15 Gils A, Meissenheimer LM, Compernolle G, *et al*. Species－dependent molecular drug targets in plasminogen activator inhibitor－1 (PAI－1)[J]. Thromb Haemost, 2009, 102(3): 609－610

16 Kit OI, Frantsiyants EM, Kozlova LS, *et al*. A plasminogen regulation system in brain tumors[J]. 2017, 81(2): 22－27

17 Wang X, Liu C, Wang J, *et al*. Oxymatrine inhibits the migration of human colorectal carcinoma RKO cells via inhibition of PAI－1 and the TGF－β1/Smad signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 37(2): 747－753

18 Kim YW, Jang EJ, Kim CH, *et al*. Sauchinone exerts anticancer effects by targeting AMPK signaling in hepatocellular carcinoma cells[J]. Chem Biol Interact, 2017, 261(1): 108－117

19 Wallace EM, Rizzi JP, Han G, *et al*. A Small－Molecule Antagonist of HIF2α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma[J]. Cancer Res, 2016, 76(18): 5491－5500

20 Zeeh F, Witte D, Gädeken T, *et al*. Proteinase－activated receptor 2 promotes TGF－β－dependent cell motility in pancreatic cancer cells by sustaining expression of the TGF－β type I receptor ALK5[J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 41095－41109

（收稿日期：2017－06－28）
（修回日期：2017－07－21）

（接第 150 页）

17 Yang Q, Liu HY, Liu D, *et al*. Ultrasonographic features of triple－negative breast cancer: a comparison with other breast cancer subtypes[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(8): 3229－3232

18 李青春，姜浩，刘进才，等. 乳腺癌组织中 VEGF 的表达及其与微小钙化、毛刺征形成的关系[J]. 实用放射学杂志，2014，30(9)：21－25

19 Pilewskie M, Jochelson M, Gooch J C, *et al*. Is preoperative axillary imaging beneficial in identifying clinically node－negative patients requiring axillary lymph node dissection? [J]. J Am Coll Surg, 2015, 222(2): 138－145

20 Jankovic A, Nadrljanski M, Karapandzic V P, *et al*. Posterior breast cancer－mammographic and ultrasonographic features[J]. Vojnosanit Pregl, 2013, 70(11): 1034－1038

21 Irshad A, Leddy R, Pisano E, *et al*. Assessing the role of ultrasound in predicting the biological behavior of breast cancer[J]. AJR Am J Roentgenol, 2013, 200(2): 284－290

（收稿日期：2017－06－17）
（修回日期：2017－07－17）