论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2280-03

乙酰肝素酶在膀胱移行细胞癌中的表达及与临床特征的关系

鄢俊安,宋 波,陈志文,宋彩萍 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨乙酰肝素酶(heparanase,HPA)在膀胱移行细胞癌中的表达及与肿瘤临床病理特征的关系。**方法** 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组织化学方法检测68例膀胱移行细胞癌、24例癌旁组织中HPA mRNA的水平及蛋白表达定位,并结合患者临床病理指标及预后进行分析。**结果** 68例膀胱移行细胞癌组织中HPA mRNA检出阳性41例(60.3%),24例癌旁组织中HPA mRNA检出阳性1例(4.2%),两组间差异有统计学意义($P<0.01$),HPA mRNA的表达在膀胱移行细胞癌不同病理分级、临床分期及淋巴结转移与否分组中显著不同($P<0.01$)。免疫组化结果显示,HPA定位于细胞质及细胞核,阳性率为77.9%(53例),在膀胱移行细胞癌淋巴结转移与否分组中显著不同($P<0.01$)。**结论** HPA在膀胱移行细胞癌的生长浸润、侵袭转移中可能发挥重要作用。

关键词: 乙酰肝素酶;膀胱移行细胞癌;免疫组织化学

中图法分类号: R345; R730.23; R737.14 **文献标识码**: A

Heparanase expression in bladder transitional cell carcinoma and its correlation with clinical pathological features

YAN Jun-an, SONG Bo, CHEN Zhi-wen, SONG Cai-ping (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of heparanase (HPA) and its correlation with the clinical pathological features and angiogenesis in bladder transitional cell carcinoma. **Methods** HPA mRNA level was detected with RT-PCR and its protein level was determined by immunohistochemical staining in 68 cases of bladder cancer and 24 cases of adjacent tissues of bladder cancer. **Results** The positive rate of HPA mRNA was 60.3% (41/68) in bladder cancer, 4.2% (1/24) in the adjacent tissues of bladder cancer. The expression of HPA mRNA had statistically significant correlation with pathological stage, clinical staging and lymphonode metastasis ($P<0.01$). Immunohistochemistry showed HPA located in the cytoplasm and nucleus of bladder cancer and its positive rate was 77.9% (53/68). In addition, HPA protein levels were statistically different in the cases with and without lymphonode metastasis ($P<0.01$). **Conclusion** HPA may play an important role in the growth, invasion and metastasis of bladder cancer. HPA was a useful marker of the biological behavior of bladder cancer and an independent prognosis factor of bladder cancer.

Key words: heparanase; bladder transitional cell carcinoma; immunohistochemistry

膀胱移行细胞癌是我国最常见的泌尿生殖系统恶性肿瘤,其发病率和病死率均居泌尿生殖系统恶性肿瘤的第1位,高发年龄为50~70岁,男性多于女性,近年来发病率有增高趋势。此疾病极易复发,且具有明显的病理分级,其生物学性状与肿瘤细胞分化程度密切相关。肿瘤的侵袭和转移是肿瘤发生和演变过程中的危险阶段,临床上有80%以上肿瘤患者死于侵袭和转移[1]。乙酰肝素酶(heparanase,HPA)是近年来发现的与肿瘤关系密切相关的功能酶,是体内唯一能降解硫酸乙酰肝素多聚糖(heparan sulfate proteoglycans,HSPG)的一种β-D葡萄糖醛酸内切酶,可降解细胞外基质(extracellular matrix,ECM)和基底膜(basement membrane,BM)中的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate,HS),裂解HSPG,并与基质金属蛋白酶2(MMP-2)共同破坏BM,致使肿瘤细胞分裂、趋化,微血管形成,促进肿瘤的浸润和转移[2]。我们应用RT-PCR和免疫组化方法检测膀胱移行细胞癌手术切除标本中HPA mRNA水平及细胞定位表达,并分析其与膀胱移行细

作者简介:鄢俊安(1976-),男,湖北省黄石市人,博士研究生,主治医师,主要从事膀胱肿瘤机制及治疗方面的研究。电话:(023)68753866

通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186

收稿日期:2007-03-05;修回日期:2007-07-20

胞癌临床病理特征及预后的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

68 例标本取自我院 2005 年 11 月至 2006 年 11 月膀胱移行细胞癌手术治疗患者，病理证实均为膀胱移行细胞癌。其中男性 48 例，女性 20 例，年龄 42～77（60.2±7.3）岁，全部为初发病例。按最大单个肿瘤直径分组，≥3 cm 者 46 例，<3 cm 者 22 例；按 WHO 病理分级标准，高分化 22 例，中分化 25 例，低分化 21 例。肿瘤临床分期按 UICC-TNM 标准，T_a～T_1期 28 例，T_2～T_4期 40 例，25 例发现远处淋巴结转移。同时取 24 例膀胱移行细胞癌癌旁组织（距肿瘤 2 cm 以内）作为对照。所有标本取下后立即以液氮速冻，并保存于 -80 ℃冰箱，用以进行 mRNA 检测。部分标本经 10% 中性福尔马林固定，石蜡包埋，切片，用于免疫组织化学染色。

1.2　HPA mRNA 检测

①RT-PCR：取 100 mg 冰冻组织，常规方法提取总 RNA，按 TaKaRa 一步法 RNA PCR 试剂盒（日本 TaKaRa 公司）提供方法进行 RT-PCR 检测。HPA 基因引物序列：上游：5′-ACTGGCAATCTCAAGTCAA-3′，下游：5′-GCTTCTTTCTGCCGATTC-3′，扩增片段长度为 482 bp。PCR 条件：50 ℃逆转录 45 min，95 ℃变性 1 min，52 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，循环 35 次，末次充分延伸 7 min。② 电泳：扩增产物加溴酚蓝指示剂，1.5% 琼脂糖凝胶电泳，紫外透射仪下观察、照相。③内参照：以 β-actin 扩增产量作为内参照，基因引物序列：上游：5′-AGGTTTTGTCAAAGAAAGGG-3′，下游：5′-ACAGTGCTGTCTGGTGGTAC-3′，扩增片段长度为 288 bp。④HPA mRNA 阳性判断标准：RT-PCR 产物电泳后在紫外灯照射下出现 482 bp 的荧光条带。

1.3　HPA 免疫组化染色方法

采用 S-P 法，一抗为鼠抗人 HPA 抗体，稀释度为 1∶100，购自美国 Sauta Cruz 公司，S-P 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司，DAB 显色，苏木精复染，光镜观察。阴性对照一抗用 PBS 取代。阳性细胞 >5% 为阳性片。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

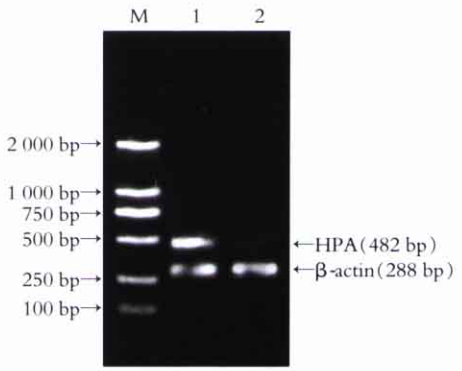
2　结果

2.1　HPA mRNA 检测结果及与肿瘤临床病理特征的关系

RT-PCR 结果显示，24 例癌旁组织中仅 1 例（4.2%）呈微弱表达，68 例膀胱移行细胞癌组织中 41 例（60.3%）表达阳性，二者差异有统计学意义（$\chi^2=20.756$，$P<0.01$）。不同临床分期、肿瘤病理分级及淋巴结远处转移 HPA mRNA 检测结果显著不同，见图 1 和表 1。

2.2　HPA 表达定位及与肿瘤临床病理特征的关系

HPA 主要表达在细胞质内，膀胱移行细胞癌阳性率是 77.9%（53/68），癌旁组织阳性率是 8.3%（2/24），二者差异显著（$\chi^2=35.749$，$P<0.01$）。不同肿瘤病理分级及淋巴结远处转移的 HPA 免疫组化检测结果显著不同。结果见表 1 和图 2。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：阳性结果；2：阴性结果

图 1　膀胱移行细胞癌 HPA 转录水平检测结果

表 1　HPA 表达及与肿瘤临床病理特征的关系

指标	例数	mRNA 阳性率（%）	免疫组化阳性率（%）
性别			
男	48	30（62.5）	38（79.2）
女	20	11（55.0）	17（85.0）
肿瘤直径（cm）			
≥3.0	46	29（63.0）	35（76.1）
<3.0	22	12（54.5）	18（81.8）
临床分期			
T_a～T_1	28	10（35.7）	19（67.9）
T_2～T_4	40	31（77.5）[a]	34（85.0）
病理分级			
低分化	21	18（85.7）	20（95.2）
中高分化	47	23（48.9）[b]	33（70.2）[b]
淋巴结转移			
是	25	25（100.0）	25（100.0）
否	43	16（37.2）[c]	28（65.1）[c]

a：$P<0.01$，与 T_a～T_1期比较；b：$P<0.01$，与低分化比较；c：$P<0.01$，与发生淋巴结转移比较

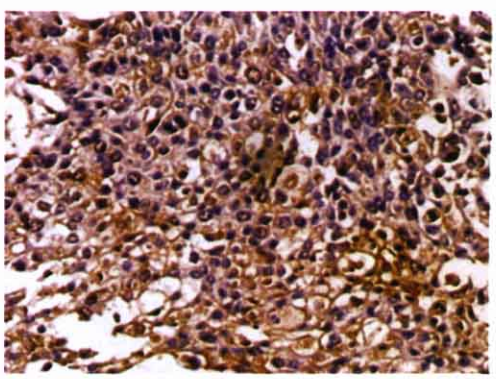


图 2　膀胱移行细胞癌 HPA 阳性表达　（S-P×200）

3　讨论

膀胱移行细胞癌是全身常见的肿瘤之一，也是泌尿系统最常见的肿瘤，膀胱移行细胞癌的扩散主要向深部浸润，直至膀胱外组织，浸润至膀胱周围组织时，多数已有远处淋巴结转移[3]。肿瘤细胞要实现转移必须穿越由 ECM 和 BM 组成的屏障。HSPG 是广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物组织 ECM 和细胞表面的

生物大分子，是 BM 的主要构成成分。它能与细胞表面及 ECM 中的活性分子结合，黏附于细胞表面，是 ECM 聚集和稳定的基础。HSPG 是 HPA 的天然底物，是细胞外微环境的主要成分，HSPG 在细胞生理学中起着很多重要作用，其中包括细胞与基质的黏附功能、隔离生长因子或细胞因子、保持血管屏障、抗凝、抗原递呈细胞活化、限制过氧化物歧化酶、调节内皮细胞脂质代谢及胚胎种植等。HPA 正是一种裂解糖氨聚糖中 HS 链的内切糖苷酶，可在特定的部位降解 HSPG，破坏 BM 和 ECM 的稳定结构，降低细胞间的屏障作用，释放结合 HSPG 的活性分子，产生一系列生物效应，为肿瘤细胞浸润和转移提供条件[4]。HPA 在胎盘和血小板中表达量最高，在其他组织和细胞中表达量都很低，而在心脏、脑、肺、骨骼肌、肾脏以及胰腺中不表达，但在增生性病变、炎症、损伤、免疫反应以及恶性肿瘤生长与转移等多种病理改变中普遍存在[5,6]。

HPA 的表达与癌症细胞的转移潜能有关。高转移潜力肿瘤细胞中 HPA 活性比低或无转移潜力肿瘤细胞中 HPA 活性高 4～10 倍。在人类结肠癌的早期可以检测到 HPA mRNA 和蛋白，随着病变的进展，HPA 水平逐渐增高，而癌旁组织没有此酶的表达。Takaoka 等[7]认为，胃癌细胞中 mRNA 表达水平的提高能够导致位于侵袭前沿的 HPA 蛋白表达水平的提高，并指出 HPA 的高表达是胃癌低生存率的一项预兆指标。HPA 能够增强癌细胞的浸润性。研究表明，正常组织与浸润性乳腺癌组织切片的原位杂交，随着浸润性增强，组织中 HPA 的含量升高[8]。将 HPA 基因导入淋巴瘤细胞系 E6(非浸润性)形成的稳定克隆能够表达 HPA，接种到裸鼠肝脏后的转移性以及致死能力显著升高[9]。Gohji 等[10]研究发现膀胱移行细胞癌Ⅰ级 HPA 阳性率为 36%，Ⅱ、Ⅲ级分别为 45% 和 53%。

本研究结果显示，膀胱移行细胞癌组织中 HPA mRNA 的表达明显高于癌旁组织，说明 HPA 与膀胱移行细胞癌之间存在一定的内在联系，提示 HPA 在膀胱移行细胞癌的发生、发展过程中起着重要作用。HPA 阳性表达与肿瘤病理分级、分期有关，浸润型膀胱移行细胞癌 HPA 表达明显增强，HPA mRNA 的表达与膀胱移行细胞癌预后的独立指标肿瘤浸润深度、组织学分化程度及淋巴结转移指标有相关性。肿瘤浸润程度较深、分化较差 HPA mRNA 的表达水平就越高；有淋巴结转移组 HPA 的表达明显高于无转移组，说明 HPA 与膀胱移行细胞癌的转移潜力密切相关，参与了膀胱移行细胞癌的淋巴转移及远处转移过程。免疫组化结果表明，HPA 阳性表达与肿瘤细胞的分化程度、侵袭深度密切相关。此酶在浸润肌层内的肿瘤细胞呈强阳性表达，进一步说明其仅在细胞处于侵袭状态下才高表达，它可切断 HSPG 上的 HS 侧链，引起细胞外及 BM 的降解，可与 MMP 共同作用，破坏 BM 的完整性，HPA 通过水解释放与 HS 结合的生物活性分子，以满足肿瘤血管生成及肿瘤生长的需要[11,12]。本研究结果提示，HPA 在膀胱移行细胞癌的生长浸润、侵袭转移和血管生成中可能发挥重要作用，可为膀胱移行细胞癌生物学行为和预后的判断提供较客观的指标。

参考文献：

[1] Pectasides D, Pectasides M, Economopoulos T. Systemic chemotherapy in locally advanced and/or metastatic bladder cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(6): 456－470.

[2] Miao H Q, Liu H, Navarro E, *et al*. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(18): 2101－2111.

[3] 于冬梅，阎晓初，郭德玉，等. VEGF 和 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报，2006，28(21)：2180－2182.

[4] Fjeldstad K, Kolset S O. Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans[J]. Curr Drug Targets, 2005, 6(6): 665－682.

[5] 韩　静，杨　鹰，阎　萍，等. 乙酰肝素酶在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2006，28(20)：2054－2056.

[6] 于建斌，张　岚，李　琳，等. 乙酰肝素酶反义寡核苷酸对 A375 细胞增殖及乙酰肝素酶蛋白表达的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(6)：1067－1070.

[7] Takaoka M, Naomoto Y, Ohkawa T, *et al*. Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers[J]. Lab Invest, 2003, 83(5): 613－622.

[8] Cohen I, Pappo O, Elkin M, *et al*. Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors[J]. Int J Cancer, 2006, 118(7): 1609－1617.

[9] Dafni H, Cohen B, Ziv K, *et al*. The role of heparanase in lymph node metastatic dissemination: dynamic contrast-enhanced MRI of Eb lymphoma in mice[J]. Neoplasia, 2005, 7(3): 224－233.

[10] Gohji K, Okamoto M, Kitazawa S, *et al*. Heparanase protein and gene expression in bladder cancer[J]. J Urol, 2001, 166(4): 1286－1290.

[11] Joyce J A, Freeman C, Meyer-Morse N, *et al*. A functional heparan sulfate mimetic implicates both heparanase and heparan sulfate in tumor angiogenesis and invasion in a mouse model of multistage cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(25): 4037－4051.

[12] Zetser A, Bashenko Y, Edovitsky E, *et al*. Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1455－1463.

（编辑　王小寒）