

# UTI 对人膀胱癌 T24 细胞尿激酶型纤溶酶原激活剂表达的影响

曹正国, 周四维, 宋晓东, 罗刚, 刘继红, 叶章群

Effect of Urinary Tryptsin Inhibitor on the Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator in Human Bladder Cancer Cell T24 in Vitro

CAO Zhen-guo, ZHOU Si-wei, XONG Xiao-dong, LUO Gan-g, LIU Ji-hong, YE Zhan-g-qun

Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

**Abstract: Objective** To study the effect of urinary trypsin inhibitor (UTI) on the expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in human transitional cell bladder cancer cell T24 in vitro and investigate the mechanism of UTI in inhibiting bladder tumor metastasis and invasion. **Methods** Semi-quantitative RT-PCR and immunohistochemical techniques were used to examine the expression of uPA in T24 cells after different doses of UTI were added to T24 cells cultured in vitro. **Results** The expression of uPA was suppressed by UTI with a negative dose-effect correlation. **Conclusion** UTI can significantly inhibit the expression of uPA in human bladder T24 cells, and the effect provides experimental evidence for the mechanism of UTI in inhibiting bladder tumor metastasis and invasion.

**Keywords:** Urinary trypsin inhibitor (UTI); Bladder tumor; Urokinase-type plasminogen activator (uPA)

**摘要:**目的 体外研究尿胰蛋白酶抑制物对人膀胱癌 T24 细胞尿激酶型纤溶酶原激活剂表达的影响, 探讨 UTI 抑制膀胱肿瘤侵袭和转移的机制。方法 采用免疫组化和半定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测不同量的 UTI 对体外培养的人移行细胞膀胱癌 T24 细胞 uPA 表达的影响。结果 免疫组化和 RT-PCR 结果均表明, UTI 能拮抗 uPA 的表达并呈负的剂量效应关系。结论 UTI 能有效抑制人膀胱癌 T24 细胞 uPA 的表达, 为 UTI 抑制膀胱肿瘤侵袭和转移提供了实验依据。

**关键词:** 尿胰蛋白酶抑制物 (UTI); 膀胱肿瘤; 尿激酶型纤溶酶原激活 (uPA)

中图分类号: R737.14 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 12-0754-02

## 0 引言

近年的研究表明尿胰蛋白酶抑制物 (urinary trypsin inhibitor, UTI) 能抑制肿瘤的侵袭和转移<sup>[1]</sup>, 而尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 在肿瘤的侵袭和转移过程中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。为了探讨 UTI 抑制肿瘤侵袭和转移的机制, 我们分别采用免疫组化和半定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术检测不同剂量的 UTI 对体外培养的人移行细胞膀胱癌 T24 细胞 uPA 的表达影响, 现报告如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验材料** UTI 由美国 Sigma 公司生产, 胎牛血清、RPMI1640 培养基和 Trizol 试剂由美国 GIBCO 公司生产, RT-PCR RNAPCR Kit (AMV)

Ver.2.1 试剂盒由日本 TaKaRa 公司生产, 抗 uPA 多克隆抗体、琼脂糖、免疫组化 SP 试剂盒和 AEC 显色试剂盒由武汉博士德公司提供。其余试剂均为分析纯。

**1.2 细胞株、细胞培养和实验分组** 人移行细胞膀胱癌 T24 细胞由武汉大学生命科学院典藏中心提供。将 T24 细胞置于含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养至 T24 细胞处于对数生长期时, 用 0.25% 胰蛋白酶常规消化后传代至对数生长期, 将 T24 细胞分为 5 组, 除对照组加 PBS 100 μl (A 组) 外, 其余 4 个试验组分别加 10 μl (B 组)、20 μl (C 组)、50 μl (D 组)、100 μl (E 组) 的 UTI, 并继续置入 CO<sub>2</sub> 孵育箱培养 48h 后进行以下操作。

**1.3 UTI 对 uPA 表达的免疫组化和 RT-PCR 检测**  
**1.3.1 细胞的免疫组化染色** 将各试验和对照组细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化制成 1 × 10<sup>5</sup>/ml 细胞浓度的悬液, 800r · min<sup>-1</sup> 离心 8min 后, 每张载片用 0.2 ml 涂片, 用 4% 多聚甲醛固定 15min, PBS 冲洗, 免

收稿日期: 2003-09-05; 修回日期: 2003-12-03

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科

疫组织化学染色按照 SP 试剂盒和 AEC 显色试剂盒说明书中的步骤进行。抗 uPA 多克隆抗体以 1:100 稀释,甘油封片。以胞浆或胞核染为红色为阳性细胞。

1.3.2 半定量 RT-PCR 检测 T24 细胞总 RNA 的提取参照 Trizol 试剂的说明书进行。提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值在 1.8 ~ 2.0 之间。RT-PCR 按 TaKaRaRNAPCR 试剂盒的说明书进行。逆转录反应体系为 20μl, 总 RNA 为 2μl。逆转录反应结束后,取 10μl 逆转录反应产物,加入 MgCl<sub>2</sub> (25mM) 3μl,10 × RNAPCR Buffer 4 μl,TaKaRaTaq<sup>TM</sup> (5U/μl) 0.25 μl,uPA 和 -actin 的上、下游引物(大连宝生物工程有限公司)各 1μl,PCR 的反应体系为 50μl。UPA 的上游引物序列:5' -GCCGAGATTCTGAACATA-3', 下游引物序列:5' -TCTGAGGCAGTCAAGGAG-3', 预计扩增产物为 367bp。-actin 的上游引物序列:5' -CCCAGAGCAAGAGAGGCTC-3', 下游引物序列:5' -AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3', 预计扩增产物为 250bp。PCR 反应条件:94 预变性 2min, 94 30 秒;60 30 秒;72 1.5 min。循环 30 次。PCR 反应结束后取 3μl PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,应用 UVP 凝胶成像系统扫描,测定标本的灰度值,以 -actin 作为内参照,计算出每个标本 uPA 与 -actin 表达量的比值。

1.4 统计学分析 所有检验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异用 *t* 检验进行显著性检验,以 SAS 6.12 统计软件进行分析。

## 2 结果

2.1 免疫组化检测结果 正常情况下,对照组(A组)人移行细胞膀胱癌 T24 细胞分泌的尿激酶型纤溶酶原激活剂在胞浆中染成红色。滴加不同量尿胰蛋白酶抑制物的各实验组中 T24 细胞分泌的 uPA 在胞浆中的染色明显变淡,而且 uPA 在胞浆中的染色程度与 UTI 的量呈明显的负相关效应。

2.2 半定量 RT-PCR 检测结果 各组 T24 细胞中 uPA 的 PCR 扩增产物电泳结果,见图 1。UPAmRNA 在对照组和各实验组 T24 细胞中的相对表达量,见表 1。

如图 1 所示,1、2、3、4、5 泳道分别是 A、B、C、D、E5 组的 uPA 和对应的 -actin 条带,其中 uPA 大小约为 367bp, -actin 大小约为 250bp。

如表 1 所示,与正常对照组相比,经过不同量 UTI 处理后的各实验组 T24 细胞中 uPA mRNA 的表达明显降低,差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。

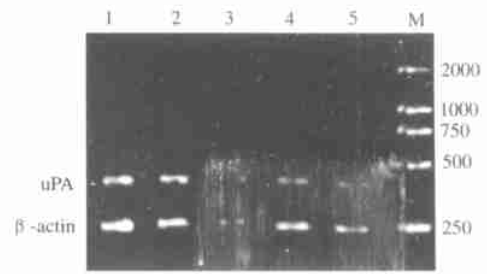


图 1 各组 uPA 的 PCR 扩增产物电泳结果

表 1 uPA mRNA 在 T24 细胞中的相对表达量

组别	滴加 UTI 的量(μl)	uPA mRNA 的相对量
A	0	0.952 ± 0.015
B	10	0.623 ± 0.010 **
C	20	0.545 ± 0.008 **
D	50	0.483 ± 0.012 **
E	100	0.420 ± 0.007 **

与 A 组相比,\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

肿瘤细胞降解细胞外基质、基底膜的过程是肿瘤浸润和转移的前提。在这个过程中,有一系列的蛋白酶参与,其中最重要的就是尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)。肿瘤细胞首先分泌的是无活性的单链原酶 Pro-uPA,后者与细胞表面的特异性 uPA 受体相结合后被血浆中的某些组织蛋白酶激活成活性双链 uPA。活性 uPA 一方面激活纤溶酶系统直接降解细胞外基质、基底膜,另一方面还激活金属蛋白酶间接参与细胞外基质成分的降解,从而引起肿瘤细胞的侵袭和转移。同时被 uPA 激活的纤溶酶原又反馈激活 Pro-uPA 变成双链 uPA,继而再激活纤溶酶原形成更多的纤溶酶,以适应肿瘤细胞侵袭和转移的需要。由于 uPA 含量的高低与肿瘤的体积、组织学类型及淋巴结转移等情况密切相关,因而常常作为临床判断膀胱肿瘤恶性程度和预后的指标<sup>[3]</sup>。UTI 是近年来发现的一种存在于血浆和尿液中含有型 Kunitz 第二结构域的蛋白多糖,具有抑制多种丝氨酸蛋白酶活性和广泛的抗炎、抗肿瘤等作用。到目前为止国内还没有关于 UTI 抑制肿瘤侵袭和转移机制的报告。过去认为 UTI 主要是通过其肿瘤细胞表面的 UTI 受体结合,改变细胞表面的环境、调节一些血浆酶的活性来抑制肿瘤细胞的浸润和转移<sup>[4]</sup>。新的研究发现,UTI 不能抑制肿瘤细胞的增生,其抑制肿瘤的浸润和转移也不是 UTI 直接作用于肿瘤细胞的结果,而是通过抑制与肿瘤细胞受体相关的纤溶酶系统而发挥作用,而这个过程与 UTI 抑制 uPA 密切相关。

(下转第 761 页)

文献报道<sup>[6-8]</sup>,多数恶性肿瘤细胞中不仅能检测到高水平的血管内皮生长因子 VEGF,而且抑制 VEGF 的表达后能显著抑制肿瘤细胞的生长,VEGF 不仅通过调节血管形成促进肿瘤生长,还可能通过自分泌促进肿瘤细胞自身的生长。本实验观察到肠复康可明显降低 VEGF 的含量,提示肠复康抑制移植瘤增殖的机制之一可能也通过减少癌细胞 VEGF 的生成而发挥作用。

综上,肠复康具有抑制人大肠癌 HT-29 裸鼠移植瘤细胞增殖的作用,其机制可能与抑制细胞增殖相关 Kf67 基因表达,及抑制癌细胞 VEGF 的表达有关。

(本文图见封 3)

参考文献:

[1] 吴雪梅,姚德蛟. 肠复康胶囊治疗原发性中晚期大肠癌近期疗效观察[J]. 成都中医药大学学报,2001,24 (2):12-13.  
 [2] 熊绍权,刘碧涛,王科丁,等. 肠复康胶囊治疗大肠癌临床疗效

探析[J]. 中药药理与临床,2003,19 (1):45-46.  
 [3] 艾兆伟,查锡良,陈惠黎. 视黄酸对人肿瘤细胞一些表型的逆转作用[J]. 中华肿瘤杂志,1991,13 (6):9-11.  
 [4] AiZW,ZhaXL,ChenHL.Effectofretinacidonhe pato-carcinoma cell line[J]. JTumorMarkerOncol,1990,26 (5):59-64.  
 [5] BrunoS,Darz ynkieviczZ.Celle cycle dependence of tyrosine phosphorylation of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in human cells[J]. Cell Prolif,1992,25 (1):31-40.  
 [6] MasoodR,CaiJ,Zheng T,etal.Vascularendothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94 (3):979-984.  
 [7] ZhangW,RanS,SambadeM,etal.A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/FLK-1) inhibits vascular expression of FLK-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model[J]. Angiogenesis,2002,5 (1-2):35-44.  
 [8] EmaM,FaloonP,Zhang WJ,etal.Combinatorial effects of Flk1 and Tumor necrosis factor- $\alpha$  on hematopoietic development in the mouse[J]. Genes Dev,2003,17 (3):380-393.

[编辑:贺文;校对:杨卉]

(上接第 755 页)

本研究的免疫组化结果显示,所有的 T24 细胞胞浆中均呈现不同程度的染色,而且随着 UTI 量的增多,T24 细胞胞浆染色明显减弱,说明 UTI 能抑制 T24 细胞 uPA 蛋白的分泌。同时半定量 RT-PCR 的检测结果表明,T24 细胞中 uPA mRNA 的水平在经过 UTI 处理后有显著的降低,进一步表明 UTI 能拮抗人移行细胞膀胱癌 T24 细胞 uPA 的表达并呈负的剂量效应关系,这与其他学者的研究结果是相符的<sup>[5]</sup>。Kobayashi 等<sup>[6]</sup>研究了 UTI 对人卵巢癌细胞 uPA mRNA 表达的影响,他发现 UTI 是通过阻断人卵巢癌细胞 PKC 及 MEK/ERK/c-Jun 依赖性信号传导途径从而达到抑制人卵巢癌细胞 uPA mRNA 表达的作用。这些研究都说明 UTI 在抑制肿瘤侵袭和转移过程起着重要的作用,同时也为膀胱肿瘤的治疗提供了新的参考方法和途径。当然,对 UTI 抑制膀胱肿瘤 uPA 表达的具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Kobayashi H, Sugino D, She MY, et al. A bifunctional hybrid

molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of bikunin efficiently inhibits tumor cell invasion and metastasis[J]. Eur J Biochem,1998,253 (3):817-826.  
 [2] Higazi A, Cohen RL, Henkin J, et al. Enhancement of the enzymatic activity of urokinase-type plasminogen activator by soluble urokinase receptor[J]. J Biol Chem,1995,270 (29):17375-17380.  
 [3] 杨进益,李韶,周荣祥,等. 尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体在膀胱移行细胞癌中表达的临床意义[J]. 中华泌尿外科杂志,2000,21 (8):465-466.  
 [4] Wei Y, Lukashev M, Simon DI, et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor[J]. Science,1996,273 (5281):1551-1555.  
 [5] Kobayashi H, Suzuki M, Sun GW, et al. Suppression of urokinase-type plasminogen activator expression from human ovarian cancer cells by urokinase-type plasminogen activator inhibitor[J]. Biochim Biophys Acta,2000,1481 (2):310-316.  
 [6] Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, et al. Suppression of urokinase expression and invasiveness by urokinase-type plasminogen activator inhibitor mediated through inhibition of protein kinase C- $\alpha$  and MEK/ERK/c-Jun-dependent signaling pathways[J]. J Biol Chem,2001,276 (3):2015-2022.

[编辑:刘红武;校对:杨卉]