

• 临床研究 •

大肠癌组织中 NRP-2、NRP-1 的表达及其与肿瘤
淋巴结转移的相关性研究*

徐卫国¹,王宇鹏²,孙 红³,王 刚⁴,陈源水¹,董洪超¹,苗 娜¹,宋旭东³,王瑞敏⁵,刘和亮⁵

(1. 河北联合大学附属医院肿瘤外科,河北唐山 063000;2. 天津市北辰医院,天津 300499;3. 河北联合大学基础医学院病理学系,河北唐山 063000;4. 河北联合大学附属开滦医院,河北唐山 063000;5. 河北联合大学实验研究中心,河北唐山 063000)

摘 要:目的 检测大肠癌组织中 NRP-2、NRP-1 的表达情况,探讨 NRP-2、NRP-1 的表达与大肠癌淋巴结转移的关系,以期揭示 NRP-2 与 NRP-1 在大肠癌发生和发展过程中的作用。方法 采用免疫组化法检测 55 例大肠癌患者大肠癌组织、癌旁组织中 NRP-2、NRP-1 的表达情况,并分析 NRP-2、NRP-1 的表达与大肠癌淋巴结转移的相关性。结果 (1)大肠癌组织中 NRP-2 的阳性表达率为 81.8%,癌旁组织中的阳性表达率为 14.5%,差异有统计学意义($\chi^2=58.49, P<0.01$);大肠癌组织中 NRP-2 高表达组的淋巴结转移阳性例数显著多于 NRP-2 低表达组($\chi^2=10.69, P<0.01$)。 (2)大肠癌组织中 NRP-1 的阳性表达率为 70.9%,癌旁组织中的阳性表达率为 25.5%,差异有统计学意义($\chi^2=22.76, P<0.01$);大肠癌组织中 NRP-1 高表达组的淋巴结转移阳性例数显著多于 NRP-1 低表达组($\chi^2=7.73, P<0.01$)。 (3)大肠癌组织中 NRP-2、NRP-1 均为高表达的患者淋巴结转移率显著高于均为低表达者($\chi^2=10.76, P<0.01$)。结论 NRP-2、NRP-1 的表达可能与大肠癌的发生和发展密切相关,并且可能有协同作用。

关键词:大肠肿瘤;NRP-2;NRP-1;淋巴结转移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)04-0382-03

A research of the expression of NRP-2 and NRP-1 in human colorectal carcinoma
and its correlation with the lymph node metastasis of tumor*

Xu Weiguo¹, Wang Yupeng², Sun Hong³, Wang Gang⁴, Chen Yuanshui¹,
Dong Hongchao¹, Miao Na¹, Song Xudong³, Wang Ruimin⁵, Liu Heliang⁵

(1. Department of Surgical Oncology, the Affiliated Hospital of Hebei Union University, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Tian Jin Shi Bei Chen Hospital, Tianjin 300499, China; 3. Department of Pathology, School of Basic Medicine, Hebei Union University, Tangshan, Hebei 063000, China; 4. Affiliated Kailuan Hospital of Hebei Union University, Tangshan, Hebei 063000, China; 5. Experimental Research Center of Hebei Union University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To detect the expression of NRP-2 and NRP-1 in human colorectal carcinoma and the correlation between the expression of NRP-2, NRP-1 and lymph node metastasis of colorectal carcinoma, and to investigate the role of NRP-2, NRP-1 in the process of the generation and development of colorectal carcinoma. Methods The expression of NRP-2, NRP-1 in the parenchymatous and the surrounding tissue of malignancies was detected. The correlation between the expression of NRP-2, NRP-1 and lymph node metastasis of colorectal carcinoma was analyzed. Results 1. The positive expression ratio of NRP-2 was 81.8% in 55 examples of colorectal carcinoma tissue and 14.5% in the surrounding tissue of malignancies, and the difference had statistical significance($\chi^2=22.76, P<0.01$). There were much more positive cases of lymph node metastasis in the high expression groups of NRP-2 than the low expression groups of NRP-2($\chi^2=10.69, P<0.01$). 2. The positive expression ratios of NRP-1 were 70.9% in 55 examples of colorectal carcinoma tissue and 25.5% in the surrounding tissue of malignancies, and the difference had statistical significance($\chi^2=22.76, P<0.01$). And also there were much more positive cases of lymph node metastasis in the high expression groups of NRP-1 than the low expression groups of NRP-1($\chi^2=7.73, P<0.01$). 3. The rate of lymph node metastasis in patients that both NRP-2 and NRP-1 were highly expressed was superior to that of low expression of both. Conclusion Both NRP-2 and NRP-1 were overexpressed in colorectal carcinoma, and the positive rate of lymph node metastasis in patients that both NRP-2 and NRP-1 were overexpressed was far superior to the positive rate of low expression of both. Therefore, the expression of NRP-2 and NRP-1 may be statistically positively correlated with the generation and development of colorectal carcinoma, and which may have a synergetic effect.

Key words: colorectal neoplasms; NRP-2; NRP-1; lymph node metastasis

大肠癌是经济发达国家发病率较高的恶性肿瘤,也是我国常见的消化道恶性肿瘤之一。近年来,随着人民生活水平的提高,以及饮食结构和生活方式的改变,大肠癌的发病率和死亡

率呈逐年上升的趋势,且发病年龄趋于年轻化^[1]。目前,大肠癌治疗的主要方案仍是以手术为中心的多学科综合治疗^[2-3],然而,在施行大肠癌根治术后的 5 年内,仍有部分患者出现局

* 基金项目:河北省科技厅资助项目(10276115D)。 作者简介:徐卫国(1966~),主任医师,教授,博士,主要从事恶性肿瘤的基础与临床研究。

部复发和远处转移^[4-6]。有研究表明,肿瘤新生淋巴管的形成以及肿瘤细胞在区域淋巴结的转移、微转移被认为是导致术后复发和转移的重要原因^[7-9]。NRP_s系多功能非酪氨酸激酶跨膜糖蛋白,相对分子质量为 $120\times10^3\sim130\times10^3$ ^[10]。NRP_s家族有两个成员——NRP-1 和 NRP-2,过去的研究表明,NRP_s在肿瘤血管发生和转移过程中发挥了重要的调节作用^[11]。近年来,随着 NRP_s 相关研究的不断深入,研究认为 NRP_s 可能与肿瘤淋巴道转移密切相关^[12-14]。本文旨在通过检测大肠癌组织中 NRP-2、NRP-1 的表达情况,探讨 NRP-2、NRP-1 的表达与大肠癌淋巴结转移的关系,以期揭示 NRP-2 与 NRP-1 在大肠癌发生淋巴结转移中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集河北联合大学附属医院 2010 年 3 月至 2012 年 1 月期间手术切除的 55 例大肠癌病例中大肠癌组织、癌旁组织及相应的正常组织标本,病理结果均经病理组织学证实。其中男 32 例,女 23 例,年龄 41~87 岁,平均 66 岁。术前所有病例均未接受过化疗、放疗、免疫治疗及中医中药治疗。每例手术标本分取癌组织、癌旁组织及正常组织,各取组织全层 6 块,每块 200~300 mg,10 min 内完成取材;标本经常规脱水,甲醛固定,二甲苯透明,浸蜡包埋,5 μm 连续切片,用于免疫组化等相关研究。

1.2 临床病理特征 肿瘤发病于结肠 34 例,直肠 21 例;原发肿瘤最大直径小于或等于 5 cm 者 23 例,大于 5 cm 者 32 例;高分化癌 17 例,中分化癌 27 例,低分化癌 11 例;肿瘤侵犯浆膜内者 10 例,侵犯浆膜及以外者 45 例;有淋巴结转移者 31 例,无淋巴结转移 24 例;淋巴管受侵 21 例,未受侵 34 例;采用 Dukes 分期标准进行肿瘤分期:A 期 6 例,B 期 18 例,C 期 23 例,D 期 8 例。

1.3 实验方法及试剂来源 采用免疫组化染色方法检测 55 例大肠癌组织、癌旁组织中 NRP-2、NRP-1 的表达情况,并通过统计学分析 NRP-2、NRP-1 的表达与大肠癌淋巴结转移的相关性。每组实验均严格按照说明书操作。采用已知阳性的癌组织切片进行阳性对照,并进行阴性对照实验。兔抗人 NRP-2、NRP-1 单克隆抗体购于 Invitrogen 公司,免疫组化试剂盒及二抗购于北京中杉金桥公司。

1.4 免疫组化结果评定 参照文献^[15-16]中对 NRP-2、NRP-1 的表达以细胞阳性百分率和细胞染色强度得分之和进行评定。随机选择 5 个高倍镜视野(×400):(1)阳性细胞数小于 5%为 0 分,5%~<25%为 1 分,25%~50%为 2 分,大于 50%为 3 分;(2)无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将上述两项相加,0 分评为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。两项相加之和大于或等于 3 分为高表达,小于 3 分为低表达。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理。组间计量资料比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

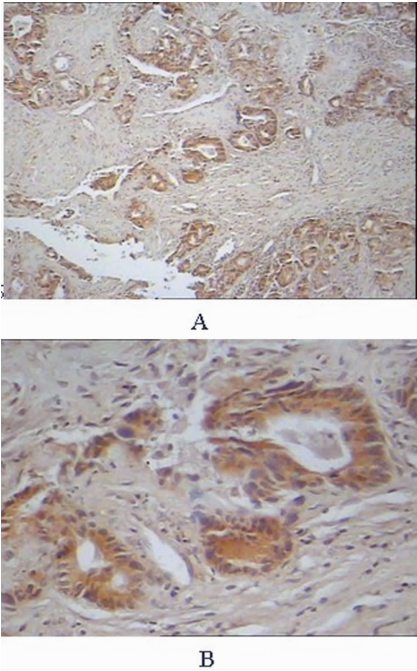
2.1 大肠癌组织 NRP-2 蛋白质的表达 NRP-2 主要表达于癌细胞和淋巴管内皮细胞(LEC_s)胞质,呈淡黄色至棕黄色颗粒状分布。大肠癌组织中,NRP-2 阳性表达 34 例(61.8%);癌旁组织中 NRP-2 阳性表达 8 例(14.5%),且均为弱阳性。NRP-2 在大肠癌组织中的阳性表达率明显高于其在癌旁组织的阳性表达率,差异有统计学意义($\chi^2=58.49,P=0.000$)。见图 1、表 1。

2.2 大肠癌组织 NRP-1 蛋白质的表达 NRP-1 主要表达于

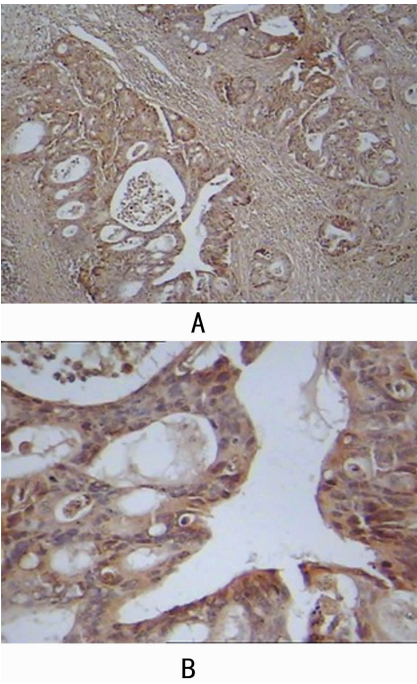
癌细胞和 LEC_s 胞质,淡黄色至棕黄色颗粒状为阳性表达。55 例癌组织中,NRP-1 阳性表达 39 例(70.9%);癌旁组织中 NRP-2 阳性表达 14 例(25.5%)。NRP-1 在大肠癌组织中的阳性表达率明显高于其在癌旁组织的阳性表达率,差异有统计学意义($\chi^2=22.76,P=0.000$)。见图 2、表 2。

表 1 NRP-2 蛋白在大肠癌及相应癌旁组织中表达的比较

组织类型	n	NRP-2 表达(n)				阳性表达率 (%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
癌组织	55	10	11	25	9	81.8	58.49	0.000
癌旁组织	55	47	8	0	0	14.5		



A:SP×100;B:SP×400。
图 1 癌组织中 NRP-2 免疫组化染色结果



A:SP×100;B:SP×400。
图 2 癌组织中 NRP-1 免疫组化染色结果

表 2 NRP-1 蛋白在大肠癌及相应癌旁组织中表达的比较

组织类型	n	NRP-1 表达(n)				阳性表达率 (%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
癌组织	55	16	11	21	7	70.9	22.76	0.000
癌旁组织	55	41	13	1	0	25.5		

2.3 NRP-2 的表达与淋巴结转移的关系 大肠癌组织中 NRP-2 高表达组为 34 例,其中有淋巴结转移阳性 25 例;NRP-2 低表达组为 21 例,其中有淋巴结转移阳性 6 例。统计学分析 NRP-2 表达程度与大肠癌淋巴结转移相关($\chi^2=10.69,P=0.001$)。见表 3。

2.4 NRP-1 的表达与淋巴结转移的关系 大肠癌组织中 NRP-1 高表达组为 30 例,其中有淋巴结转移阳性 22 例;NRP-1 低表达组为 25 例,其中有淋巴结转移阳性 9 例。统计学分析 NRP-1 表达程度与大肠癌淋巴结转移相关($\chi^2=7.73,P=0.005$)。见表 4。

表 3 NRP-2 的表达与淋巴结转移的关系(n)

NRP-2 表达	n	淋巴结转移例数		χ^2	P
		阴性	阳性		
高表达	34	9	25	10.69	0.001
低表达	21	15	6		

表 4 NRP-1 的表达与淋巴结转移的关系(n)

NRP-1 表达	n	淋巴结转移例数		χ^2	P
		阴性	阳性		
高表达	30	8	22	7.73	0.005
低表达	25	16	9		

2.5 NRP-1、NRP-2 的表达与淋巴结转移的关系 大肠癌组织中 NRP-1、NRP-2 均为高表达的患者淋巴结转移阳性率为 72.7%,显著高于 NRP-1、NRP-2 均为低表达的 15.4%,经统计学分析差异有统计学意义($\chi^2=10.76,P=0.001$)。见表 5。

表 5 NRP-1、NRP-2 的表达与淋巴结转移的关系(n)

NRP-1、NRP-2 表达情况	n	淋巴结转移例数		χ^2	P
		阴性	阳性		
均为高表达	22	6	16	10.76	0.001
其中一项高表达	20	7	13		
均为低表达	13	11	2		

3 讨 论

有研究表明 NRPs 可能与肿瘤淋巴管的新生有关,以及与肿瘤区域淋巴结转移密切相关^[17]。也有学者认为,通过利用 NRP-2 特异性抗体能够抑制 NRP-2 的作用,能够有效降低肿瘤新生淋巴管密度,减少功能性肿瘤淋巴管的生成,进而有效抑制肿瘤发生淋巴道转移。

以往有关 NRP-1 的研究,多侧重于与肿瘤新生血管方面的相关性^[13]。随着相关研究的不断深入,有研究认为 NRP-1 的表达可能与肿瘤淋巴结转移也密切相关。Ochiumi 等^[14]研究发现,结肠癌组织中 NRP-1 高水平表达组淋巴结转移的阳性率显著高于低水平组,并且利用 NRP-1 特异性小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)来抑制 NRP-1 的作用,

能够有效降低肿瘤淋巴结转移的发生率。国内有关研究也表明,NRP-1 的表达与直肠癌直肠系膜淋巴结转移有关。并且,本课题组先前的研究也显示,NRP-1mRNA 的表达程度与肿瘤淋巴结转移密切相关^[17]。

本研究表明,大肠癌组织中 NRP-1、NRP-2 均为高表达的患者淋巴结转移阳性率为 72.7%,显著高于 NRP-1、NRP-2 均为低表达的 15.4%,经统计学分析差异有统计学意义($\chi^2=10.76,P=0.001$)。因此,作者认为 NRP-2、NRP-1 的表达不仅可能与大肠癌淋巴结转移密切相关,而且可能有协同作用。然而,鉴于本研究样本量尚少,且相关机制尚不明确,对于 NRP-2、NRP-1 的表达程度对大肠癌淋巴结转移的影响何者更大,尚不能明确表述,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 陈宝钿,许岸高,余志金,等. 广东地区 8 172 例大肠癌发病部位分析[J]. 广东医学,2010,31(4):484-486.

[2] Park JJ,Cheon JH,Kwon JE,et al. Clinical outcomes and factors related to resectability and curability of EMR for early colorectal cancer[J]. Gastrointest Endosc,2011,74(6):1337-1346.

[3] Masi G,Fornaro L,Caparello C,et al. Liver metastases from colorectal cancer;how to best complement medical treatment with surgical approaches[J]. Future Oncol,2011,7(11):1299-1323.

[4] 徐燕平,金世禄,刘宝珍,等. 大肠癌淋巴结转移相关的基因蛋白产物及病理多因素分析研究[J]. 临床消化病杂志,2011,23(2):90-93.

[5] Dassanayake BK,Samita S,Deen RY,et al. Local recurrence of rectal cancer in patients not receiving neoadjuvant therapy—the importance of resection margins[J]. Ceylon Med J,2011,56(4):159-161.

[6] Siani LM,Ferranti F,De Carlo A,et al. Laparoscopic total mesorectal excision for extraperitoneal rectal cancer. Oncological outcome at 5 years[J]. Chir Ital,2009,61(5/6):585-589.

[7] Rahbari NN,Bork U,Motschall E,et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer; a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Oncol,2012,30(1):60-70.

[8] 钟丽,董晖,周铁军,等. 大肠癌 nm23、E-cadherin 表达与淋巴结微转移关系的研究[J]. 吉林医学,2011,32(30):6325-6326.

[9] Hermanek P,Merkel S,Fietkau R,et al. Regional lymph node metastasis and locoregional recurrence of rectal carcinoma in the era of TME surgery. Implications for treatment decisions[J]. Int J Colorectal Dis,2010,25(3):359-368.

[10] Chédotal A,Del Rio JA,Ruiz M,et al. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors[J]. Development,1998,125(21):4313-4323.

[11] Soker S,Takashima S,Miao HQ,et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor[J]. Cell,1998,92(6):735-745.

(下转第 387 页)

达于抑制细胞核杀伤性 T 细胞表面,抑制抗体的合成、分泌及 T 细胞增生。CD4/CD8 比值检测反映了免疫功能紊乱^[12]。本研究两种麻醉方式均可造成不同程度的 CD3、CD4、CD8 阳性细胞比例及 CD4/CD8 比值降低,两组相比,腰硬联合麻醉上述指标下降程度较靶控输注静脉麻醉轻,表明这两种麻醉方式对直肠癌根治术患者细胞免疫功能有抑制作用,腰硬联合麻醉的免疫抑制作用较弱。这可能是由于尽管靶控输注静脉麻醉可控制药物浓度,但只能阻断大脑皮质的投射系统,不能有效地阻断手术创伤性刺激向中枢传导,并且气管插管、机械通气增加了急性的创伤性刺激,而腰硬联合麻醉在神经根水平阻断了创伤性刺激的传入,对全身干扰小,减轻手术的应激反应,并且麻醉药物应用剂量低于静脉麻醉^[13-15]。

总之,靶控输注静脉麻醉和腰硬联合麻醉均可抑制直肠癌根治术患者的免疫功能,尤其以抑制细胞免疫为主,腰硬联合麻醉对免疫功能的抑制作用较低。

参考文献:

- [1] Liu S, Wang B, Li S, et al. Immune cell populations decrease during craniotomy under general anesthesia [J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(3): 572-577.
- [2] Bauer M, Rensing H, Ziegenfuss T. Anesthesia and perioperative immune function [J]. *Anaesthesist*, 1998, 47(7): 538-556.
- [3] Wagner F, Radermacher P, Stahl W. Anesthesia and the immune response: evidence for an "isoflurane paradox" [J]. *Shock*, 2010, 34(4): 437-438.
- [4] Vannucci L. Cancer immunology and colorectal cancer recurrence [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3(12): 1421-1431.
- [5] Ogino S, Galon J, Fuchs CS, et al. Cancer immunology——analysis of host and tumor factors for personalized medicine [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(12): 711-719.
- [6] 王旻, 陈学博, 王欢, 等. 直肠癌扩大根治术对患者外周血中细胞免疫功能的影响 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15

(3): 521-523.

- [7] 杨现会, 程静林, 吕森森, 等. 不同麻醉方法对直肠癌患者围术期免疫功能的影响 [J]. *中国实用医刊*, 2010, 37(1): 37-38.
- [8] 赵仁, 李卫强, 杨治花, 等. 益气养阴基本方对直肠癌放疗后气阴两虚证患者的疗效及其免疫功能的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(3): 557-558.
- [9] 王红禄, 赵振生, 刘炜, 等. 腰硬联合麻醉在结直肠癌根治术中的临床应用研究 [J]. *基层医学论坛*, 2007, 11(3): 494-495.
- [10] 唐晓军, 曹维克, 贾绍昌, 等. 直肠癌患者血清中白介素-8、TNF- α 和 T 细胞亚群的临床研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(7): 631-633.
- [11] 蒲晓允, 陈晓莉, 陈华, 等. 直肠癌患者 IL-2、IL-6、IL-8、TGF- α 表达变化及临床意义 [J]. *重庆医学*, 2003, 32(8): 1022-1023.
- [12] Wieder T, Braumuller H, Kneilling M, et al. T cell-mediated help against tumors [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(19): 2974-2977.
- [13] Calvo-Soto P, Trujillo-Hernandez B, Martinez-Contreras A, et al. Comparison of combined spinal and general anesthesia block and combined epidural and general anesthesia block in laparoscopic cholecystectomy [J]. *Rev Invest Clin*, 2009, 61(6): 482-488.
- [14] Solanki S L, Jain A, Singh A, et al. Low-dose sequential combined-spinal epidural anesthesia for cesarean section in patient with uncorrected tetralogy of Fallot [J]. *Saudi J Anaesth*, 2011, 5(3): 320-322.
- [15] Kulshrestha A, Arora S, Mathur M, et al. Combined spinal-epidural anesthesia for cesarean section in a patient with dilated cardiomyopathy [J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2012, 28(2): 273-274.

(收稿日期: 2012-09-12 修回日期: 2012-10-12)

(上接第 384 页)

- [12] Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice [J]. *Development*, 2002, 129(20): 4797-4806.
- [13] Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, et al. Neuropilin-2 expression in papillary thyroid carcinoma: correlation with VEGF-D expression, lymph node metastasis, and VEGF-D-induced aggressive cancer cell phenotype [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(11): 1857-1861.
- [14] Ochiumi T, Kitadai Y, Tanaka S. Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon-cancer [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 105-161.

- [15] 周琪, 梁后杰, 阎晓初, 等. 结肠癌组织中 NRP-2 的表达与淋巴结转移的关系 [J]. *临床肿瘤杂志*, 2009, 14(9): 797-802.
- [16] 黎明, 彭勃, 谈顺, 等. 直肠癌 NRP-1、VEGF-C 的表达与直肠系膜淋巴结转移的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, (24): 3659-3662.
- [17] 徐卫国, 杨小青, 郝世柱, 等. 大肠癌组织中 Neuropilin-1 的表达及其与肿瘤血管生成的相关性研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(1): 29-33.

(收稿日期: 2012-09-09 修回日期: 2012-10-05)